

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

***TORTIFOLIA* Gene kontrollieren das Streckungswachstum
in *Arabidopsis*.
Klonierung von *TORTIFOLIA1***

Henrik Buschmann

aus Berlin

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. A. R. Schäffner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am

Henrik Buschmann

Dissertation eingereicht am

1. Gutachter PD Dr. A. R. Schäffner

2. Gutachter Prof. Dr. K. P. Hopfner

Mündliche Prüfung am

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	6
1	Einleitung 8
1.1	Pflanzliche Organe entstehen durch koordinierte Zellstreckung..... 8
1.2	Das Wachstum pflanzlicher Zellen wird durch die Zellwand beschränkt..... 8
1.2.1	Bestandteile der Zellwand..... 8
1.2.2	Zellwachstum und die Anforderungen an die Zellwand..... 9
1.3	Mikrotubuli kontrollieren das diffuse Wachstum pflanzlicher Zellen..... 11
1.3.1	Mikrotubuli..... 11
1.3.2	Das kortikale Mikrotubuli-Skelett..... 12
1.3.3	Die Funktion des kortikalen MT-Skeletts im diffusen Wachstum 13
1.3.4	Mikrotubuli-assoziierte Proteine 14
1.4	Alternative Konzepte zu Entstehung und Struktur der Zellwand..... 15
1.5	Helikales Wachstum 16
1.5.1	Helikales Wachstum von Einzelzellen..... 17
1.5.2	Helikales Wachstum pflanzlicher Organe..... 19
1.5.3	Mutanten mit Organtorsionen in <i>Arabidopsis</i> 20
1.5.3.1	Bisherige Ergebnisse zu <i>Arabidopsis</i> Mutanten mit helikalem Wachstum 21
1.5.3.2	Bisherige Ergebnisse zu den Mutanten <i>tor1</i> , <i>tor2</i> und <i>tor3</i> 22
1.6	Ziele der Arbeit..... 26
2	Material und Methoden..... 27
2.1	Materialien 27
2.1.1	<i>Arabidopsis</i> Linien 27
2.1.2	Mikroorganismen..... 27
2.1.3	Enzyme..... 28
2.1.4	BAC-Klone 28
2.1.5	Vektoren..... 28
2.1.6	Oligonukleotide..... 29
2.1.6.1	Oligonukleotide für Klonierungen 29
2.1.6.2	Oligonukleotide des <i>TOR1</i> Gens und Umgebung..... 30
2.1.6.3	Oligonukleotide für die Analyse genetischer Marker 30
2.1.6.4	Weitere Oligonukleotide..... 31
2.1.7	Chemikalien 32
2.1.8	Medien und Lösungen 32
2.2	Methoden 32
2.2.1	Arbeiten mit lebendem Pflanzenmaterial 32
2.2.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> 32
2.2.1.2	Einfache Anzucht von <i>Arabidopsis</i> auf agarhaltigem MS-Medium 32
2.2.1.3	Anzucht auf hochprozentigen Agar-Platten und Etiolierung von <i>Arabidopsis</i> 33
2.2.1.4	Sterilisation der Samen von <i>Arabidopsis</i> 33
2.2.1.5	Arbeiten mit Mutanten in <i>Arabidopsis</i> 34
2.2.1.6	Erzeugung von <i>Arabidopsis</i> Mesophyll-Protoplasten..... 35
2.2.1.7	Transiente Transformation von <i>Arabidopsis</i> Protoplasten mit PEG..... 36
2.2.2	Arbeiten mit Mikroorganismen 37
2.2.2.1	Routinearbeiten mit <i>E. coli</i> 37
2.2.2.2	Die Transfektion von <i>E. coli</i> mit in Phagenpartikeln verpackten Cosmiden 37
2.2.2.3	Kultur und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 40
2.2.2.4	Transformation von <i>Arabidopsis</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 41
2.2.3	Die Isolation von Nukleinsäuren..... 41
2.2.3.1	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial 41
2.2.3.2	Isolierung von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA aus <i>E. coli</i> 43
2.2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA 44
2.2.4	Arbeiten mit Nukleinsäuren..... 45
2.2.4.1	Molekulares Klonieren 45
2.2.4.2	PCR-Bedingungen..... 45
2.2.4.3	Reverse Transkription..... 46
2.2.4.4	Bestimmung des 5' Endes der <i>TOR1</i> mRNA 46
2.2.4.5	DNA-Sequenzierungen..... 46

2.2.4.6	Elektroelution von DNA-Fragmenten einer Größe über 10 kb.....	47
2.2.4.7	Denaturierende Elektrophorese von Gesamt-RNA.....	47
2.2.4.8	Kapillarer Transfer und Fixierung von Gesamt-RNA auf eine Membran.....	48
2.2.4.9	Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktivem ATP.....	49
2.2.4.10	Northern Hybridisierung.....	49
2.2.4.11	Southern Analyse (DNA-Gel, Transfer der DNA und Hybridisierung).....	50
2.2.4.12	Das <i>Strippen</i> von Nylonmembranen.....	50
2.2.5	Genetische Marker.....	51
2.2.5.1	PCR-gestützte Marker in <i>Arabidopsis</i>	51
2.2.5.2	Duplex-Marker auf hochauflösenden Gelen.....	52
2.2.6	<i>In situ</i> Färbung von <i>GUS</i> exprimierenden transgenen <i>Arabidopsis</i>	53
2.2.7	Mikroskopie.....	54
2.2.8	Verzeichnis der Web-Adressen zur Analyse von Proteinsequenzen.....	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Die Phänotypen der Mutanten <i>tor1</i> , <i>tor2</i> und <i>tor3</i>	56
3.1.1	Die <i>tor</i> Mutanten zeigen pleiotropische Veränderungen.....	56
3.1.2	Das Wurzelwachstum der <i>tor</i> Mutanten.....	57
3.1.3	Die Etiolierung der <i>tor</i> Mutanten.....	58
3.1.4	Trichome mit verändertem Phänotyp.....	59
3.2	Die Klonierung des <i>TOR1</i> Gens.....	60
3.2.1	Die Kartierung von <i>TOR1</i>	60
3.2.1.1	Neue Marker für einen zentralen Bereich von Chromosom 4.....	61
3.2.1.2	Die verbesserte Kartierung des <i>TOR1</i> Locus.....	62
3.2.2	Komplementation von <i>tor1</i> Pflanzen durch genomische DNA des Wildtyps.....	62
3.2.2.1	Subklonierung von genomischer <i>Arabidopsis</i> DNA aus BACs in Cosmide.....	62
3.2.2.2	Komplementation von <i>tor1</i> Mutanten zum Wildtyp.....	65
3.2.3	Veränderungen des <i>TOR1</i> Gens in den <i>tor1</i> Mutanten.....	67
3.3	Molekulare Analyse von <i>TOR1</i>	70
3.3.1	Die Struktur des <i>TOR1</i> Gens.....	70
3.3.2	Northern Analysen und RT-PCR.....	71
3.3.3	Expressionsanalyse mit Hilfe des <i>TOR1</i> Promotors.....	72
3.3.3.1	Synthese eines <i>TOR1</i> -Promotor- <i>GUS</i> Konstruktes.....	72
3.3.3.2	Expression von <i>GUS</i> durch den <i>TOR1</i> Promotor in transgenen <i>Arabidopsis</i>	74
3.3.4	Southern Blot Analyse des <i>TOR1</i> Gens.....	75
3.4	Das <i>TOR1</i> Protein.....	76
3.4.1	Wesentliche Eigenschaften des <i>TOR1</i> Proteins.....	76
3.4.2	Eine neue Familie von Proteinen in <i>Arabidopsis</i>	76
3.4.3	Entfernte Ähnlichkeit von <i>TOR1</i> mit Proteinen bekannter Funktion.....	79
3.4.4	Hinweise auf <i>HEAT repeats</i> in der <i>TOR1</i> Proteinfamilie.....	80
3.4.5	Hinweise auf eine <i>coiled coil</i> Domäne in der <i>TOR1</i> Proteinfamilie.....	81
3.4.6	Die konservierte C-terminale Region des <i>TOR1</i> Proteins.....	83
3.4.7	Vertreter der <i>TOR1</i> Proteinfamilie in anderen Pflanzengattungen.....	83
3.5	Zellbiologische Untersuchungen zu <i>TOR1</i>	85
3.5.1	Vorbereitende Arbeiten.....	85
3.5.1.1	Synthese eines <i>TOR1-sGFP</i> Expressions-Konstruktes.....	86
3.5.1.2	Synthese eines <i>TOR1-ECFP</i> Expressions-Konstruktes.....	87
3.5.1.3	Synthese eines <i>MBD-EYFP</i> Expressions-Konstruktes.....	88
3.5.2	Transiente Expression von <i>TOR1</i> Fusionsproteinen und Markern des Cytoskeletts in Protoplasten von <i>Arabidopsis</i>	89
3.5.2.1	Die <i>TOR1</i> Fusionsproteine markieren filamentöse kortikale Strukturen.....	89
3.5.2.2	Die von <i>TOR1</i> markierten Filamente können durch Oryzalin aufgelöst werden.....	91
3.5.2.3	Kokolisierung von <i>TOR1-ECFP</i> und <i>MBD-EYFP</i> in Protoplasten.....	92
3.6	Analyse der <i>tor2</i> Mutation.....	94
3.6.1	Die Suche nach genetischen Markern für die Kartierung von <i>TOR2</i>	94
3.6.2	Die Kartierung von <i>TOR2</i>	95
3.6.3	Sequenzierung von <i>TUA4</i> aus der Mutante <i>tor2</i>	96
3.7	Die Mutante 590501.....	98
3.7.1	Die Kartierung des 590501 Locus.....	98
3.7.2	Genetische Daten zur 590501 Mutation.....	99
3.7.3	Der Phänotyp von 590501 Pflanzen.....	100

4	Diskussion.....	102
4.1	Die Expressionsanalyse von <i>TOR1</i>	103
4.2	Die Funktion des TOR1 Proteins	104
4.2.1	Versuche zur <i>in vivo</i> Lokalisierung des markierten TOR1 Proteins.....	104
4.2.2	Die Analyse der Sekundärstruktur des TOR1 Proteins.....	105
4.2.2.1	Die HEAT <i>repeat</i> Domäne in TOR1 und Assoziation mit Mikrotubuli	106
4.2.2.2	Besitzt TOR1 eine <i>coiled coil</i> Domäne?	107
4.2.3	Zellstreckung und die Eigenschaften des TOR1 Proteins.....	109
4.3	Die Interaktion von links- und rechtsgängigem Wachstum.....	110
4.3.1	„Asymmetrisches Modell für das helikale Wachstum in Mutanten von <i>Arabidopsis</i> “	110
4.4	Helikales Wachstum in <i>Arabidopsis</i> : multiple Loci, mehrere Wirkungswege	115
4.4.1	Diskussion der Kartierung von <i>TOR2</i>	116
4.5	Circumnutation und Tropismus	118
4.6	Aussicht	119
5	Zusammenfassung	121
6	Literatur	123
7	Anhang	135
	Danksagung.....	138
	Curriculum Vitae.....	139

Abkürzungen

(ohne SI-Einheiten und den Buchstabencodes für Aminosäuren, Nukleotide und chemische Elemente)

35S	35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus
Amp	Ampicillin
<i>an1</i>	<i>angustifolia 1</i> Mutante
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C24	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp C24
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
Kat. No.	Katalognummer
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
cM	centi-Morgan
CMF	Cellulosemikrofibrille
Col	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAG	<i>days after germination</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	<i>red fluorescent protein</i> aus <i>Discosoma sp.</i>
DTT	Dithiothreitol
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
En-2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Enkheim 2
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
E-Wert	Erwartungswert für die zufällige Ähnlichkeit zweier Sequenzen
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotide
F	Filialgeneration
F-Aktin	filamentöses Aktin
<i>fra2</i>	<i>fragile fiber2</i> Mutante
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β -Glucuronidase
HEAT	repetitive Sequenz gefunden in <u>H</u> untingtin, <u>e</u> longation factor 3, Proteinphosphatase <u>2A</u> und in <u>t</u> arget of rapamycin.
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ler	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Landsberg <i>erecta</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MBD	Mikrotubulus-Bindungsdomäne
MG	Molekülgewicht
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MIPS	<i>munich information center for protein sequences</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<i>mor1</i>	die <i>microtubule organization1</i> Mutante
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Murashige und Skoog
MT	Mikrotubulus
nospA	Sequenzen zur 3' Prozessierung aus dem Nopalinsyntheseogen
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-PCR</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

sGFP	synthetisches <i>green fluorescent protein</i>
<i>spr</i>	die <i>spiral</i> Mutante
SSC	NaCl- und Na ₃ -Citrat-haltige Lösung
SSLP	<i>simple sequence length polymorphism</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tet	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TOR	das TORTIFOLIA Protein
TOR	das TORTIFOLIA Gen, seine cDNA oder mRNA
<i>tor</i>	die <i>tortifolia</i> Mutante, das <i>tortifolia</i> Allel
Tor	<i>target of rapamycin</i> , ein Gen/Protein aus Hefe; die Abkürzung ist zufällig gleichlautend mit <i>tortifolia</i> . Wenn im Text <i>target of rapamycin</i> gemeint ist, wird dieses kenntlich gemacht.
TSB2	<i>Tryptophan Synthase β2 Gen</i>
TUA	α-Tubulin
T-DNA	Transfer-DNA
u	unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
Ws	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Wassilewskija
wt	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure

1 Einleitung

1.1 Pflanzliche Organe entstehen durch koordinierte Zellstreckung

Wurzel und Spross höherer Pflanzen leiten sich von terminal gelegenen Meristemen ab, in welchen durch Teilung embryonaler Zellen neues Zellmaterial hervorgebracht wird. Die aus dem Meristem verdrängten Zellen durchlaufen anschließend den Prozess der Differenzierung. Ein zentraler Aspekt der Differenzierung ist die Zellstreckung. Die Zellstreckung ermöglicht die eigentliche Volumenzunahme des sich entwickelnden pflanzlichen Organs.

Junge Blätter haben selbst Meristemcharakter. In Blättern überlappen Zellteilung und Zellstreckung einander stark. Zellteilungen können in Blättern stattfinden bis sie 90 % ihrer Größe erreicht haben. Danach wachsen auch Blätter ausschließlich durch Zellstreckung (Dengler und Tsukaya 2001). Zellteilungen können zuletzt im Bereich des vaskulären Gewebes festgestellt werden, wodurch vermutlich dem höheren Bedarf an Stofftransport Rechnung getragen wird (Donnelly et al. 1999). Auch das Volumen eines erwachsenen Blattes hängt wesentlich von der Zellstreckung ab; in Blättern können die Zellen das zwanzig- bis fünfzigfache Volumen ihrer meristematischen Vorläufer einnehmen (Van Volkenburgh 1999).

Interessanterweise sind die unterschiedlichen Gewebe eines Organs bereits angelegt, bevor das Organ in einer Phase schnellen Streckungswachstums sein eigentliches Volumen einnimmt (Dubois et al. 1996; Torres-Ruiz und Jürgens 1994). Demnach muss, damit die zuvor angelegten Muster der Gewebe erhalten bleiben, der Prozess der Zellstreckung innerhalb eines wachsenden Organs hochgradig koordiniert sein. Die unterschiedlichen Gewebe des Organs sind jedoch nicht im gleichen Umfang verantwortlich für die Organstreckung. Vermutlich wird in Blättern die Streckung vor allem von inneren Zellschichten vorangetrieben, während die Epidermis die Streckung zurückhält (Van Volkenburgh 1999). Außerdem wird angenommen, dass der Epidermis von zylindrischen Organen wie Hypokotyl und Wurzel eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Richtung des Wachstums des Organs zukommt. Bei Pflanzenbewegungen spielt deshalb die Fähigkeit der Epidermis zur Streckung eine zentrale Rolle (Hart 1990).

1.2 Das Wachstum pflanzlicher Zellen wird durch die Zellwand beschränkt

1.2.1 Bestandteile der Zellwand

Pflanzliche Zellen besitzen eine zentrale Zellsaft-Vakuole und sind von einer Zellwand umgeben. Das aus der Umgebung aufgenommene Wasser strömt in die Vakuole ein, wodurch diese sich ausdehnt und den Protoplasten gegen die Zellwand presst. Der dadurch entstehende Druck, der Turgor, ermöglicht das Wachstum der pflanzlichen Zelle. Allerdings

muss die Zellwand dafür flexibel gemacht werden. Dieses kann durch den Protoplasten gesteuert werden.

Das in Bezug auf seine Belastung durch Zugkräfte wichtigste Polymer der Zellwand ist die Cellulose. Sie besteht aus D-Glucose Monomeren, die an den C-Atomen 1 und 4 β -glykosidisch verbunden sind. Cellulosemoleküle können aus vielen tausend Monomeren bestehen und sind mit 30 bis 100 Ketten zu kristallinen Cellulosemikrofibrillen (CMF) einer Länge von 1 bis 8 μm vereinigt. Entsprechend eines häufig zitierten Modells werden die CMF durch ein weiteres Zuckerpolymer, den Xyloglucanen, miteinander verbunden. Das resultierende Netzwerk wird durchwoben von Pektinen (z.B. Rhamnogalacturonan) und strukturellen Proteinen (vergleiche Modelle in Cosgrove 2001). In der Zellwand gibt es strukturelle Proteine verschiedener Klassen, beispielsweise Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine und Arabinogalactan-Proteine. Der Masseanteil von Proteinen in der Primärwand kann über 10 % betragen. Zusätzlich gibt es in der Zellwand Proteine mit regulatorischen bzw. enzymatischen Aufgaben (Pennell 1998).

Bei unverändertem Turgordruck kann Zellwachstum durch biochemische Veränderungen in der Zellwand ausgelöst werden. Beispielsweise löst Applikation des Pflanzenhormons Auxin eine rasche Acidifizierung der Zellwand aus. Das Fallen des pH-Wertes aktiviert in der Zellwand befindliche Proteine, z.B. Expansin. Expansine lösen offenbar nicht-kovalente Bindungen in der Zellwand und ermöglichen dadurch ein Gleiten der durch Zug belasteten Polysaccharide. Obwohl Expansin katalytische Eigenschaften zu haben scheint, konnte eine dezidierte enzymatische Aktivität nicht gezeigt werden. Enzyme der Zellwand mit Funktionen bei der Zellstreckung sind u.a. Endoglucanasen und Xyloglucan-Endotransglycosylasen. Letztere können Xyloglucanketten lösen und wieder miteinander verbinden. Dieses ermöglicht vermutlich ein Separieren der CMF (Cosgrove 2001).

1.2.2 Zellwachstum und die Anforderungen an die Zellwand

Pflanzliche Zellen zeigen zwei Formen des Wachstums: Spitzenwachstum und diffuses Wachstum (letzteres wird auch als interkalares Wachstum bezeichnet). Pollenschläuche und Wurzelhaare zeigen Spitzenwachstum. Beim Spitzenwachstum erfolgt die Zellverlängerung ausschließlich an einem bestimmten Ort. Dafür muss lokal die Zellwand gelockert werden und durch Vesikelfusion neues Membran- und Zellwandmaterial bereitgestellt werden. Für den Vesikeltransport wird das Aktin-Cytoskelett eingesetzt. Die Ausrichtung der CMF am Ort des Zellwachstums von Zellen mit Spitzenwachstum ist zufällig (Ketelaar und Emons 2001). Bestimmte Zelltypen, z.B. die Trichome von *Arabidopsis*, zeigen eine Kombination von Spitzenwachstum und diffusem Wachstum (Szymanski et al. 1999).

Beim diffusen Wachstum erfolgt die Streckung der Zelle in einem großen, auf ihrer Oberfläche verteilten Bereich. Die Zellen sind meist zylindrisch und verlängern sich in longitudinaler Richtung. Die meisten Zellen zusammenhängender Gewebe zeigen diffuses Wachstum, so auch epidermale, kortikale, und endodermale Zellen von Petiolen, Hypokotylen und Wurzeln. Die strikte Polarität dieser Zell- beziehungsweise Organverlängerung wird mit dem Begriff der Anisotropie des Wachstums belegt. Der Anisotropie wird die Isotropie des Wachstums gegenübergestellt. Isotropes Zellwachstum wird von sphärischen Zellen verwirklicht (z.B. *Chlorella pyrenoidosa*) oder erfolgt nach Applikation von Giften, welche sich auf die Organisation der Zellwand auswirken. Um eine Anisotropie der Zellstreckung zu ermöglichen, kann die Zelle die an der Plasmamembran synthetisierten CMF in spezifischer Weise ausrichten (Roelofsen 1965, Arioli et al. 1998). Wenn die oben beschriebenen Mechanismen zur Lockerung der Zellwand eingesetzt haben, erfolgt Zellstreckung. Die Dehnbarkeit der Zellwand ist in der Regel minimal in Richtung der CMF, jedoch maximal senkrecht zur Richtung der CMF (Abb. 1A). Die Ausdehnung der Zelle folgt dem geringeren Widerstand. Die Beobachtung, dass CMF und direkt unter der Plasmamembran gelegene Mikrotubuli (MT) in vielen Fällen parallel verlaufen, führte zu der Hypothese, dass pflanzliche Zellen durch Ausrichtung der kortikalen MT die Deposition von CMF und dadurch die Richtung der Zellstreckung steuern (siehe unten).

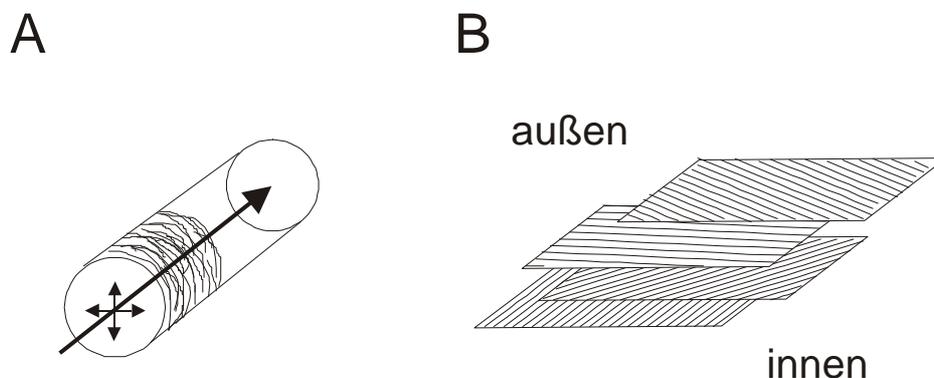


Abb. 1. Beispiele für Zellwandstrukturen in der Pflanze. (A) Schema zur Entstehung der Wachstumsanisotropie in pflanzlichen Zellen. Die transversal angeordneten Cellulosemikrofibrillen erlauben Wachstum hauptsächlich in Richtung senkrecht zu ihrer durchschnittlichen Ausrichtung. Wachstum in andere Raumrichtungen ist nur eingeschränkt möglich oder wird (in bestimmten Zelltypen) total unterbunden. (B) Modell einer helikoidalen Zellwand, bei der sich die Ausrichtung der Cellulosemikrofibrillen von Lamelle zu Lamelle um einen bestimmten Winkel ändert.

Das oben beschriebene einfache Verhältnis von Ausrichtung der CMF und Richtung des Wachstums trifft nicht für jede pflanzliche Zelle zu. Demnach sind CMF nicht allein ausschlaggebend bei der Kontrolle der Wachstumsanisotropie. In einigen Fällen konnte Zellstreckung, welche in Richtung der CMF erfolgte, beobachtet werden. Es ist denkbar, dass Zellwandproteine wie Expansine zur Regulation der Zellstreckung in beide Richtungen,

parallel und senkrecht zur Ausrichtung der CMF, verwendet werden können (Baskin et al. 1999; Wiedemeier et al. 2002).

Neben einer zufälligen Ausrichtung (beim Spitzenwachstum) und transversalen Ausrichtung (beim diffusen Wachstum) von CMF kennt die Pflanze weitere Möglichkeiten, CMF in der Zellwand anzuordnen. Bei der helikalen Ausrichtung sind die CMF schräg auf der Oberfläche der zylindrischen Zelle angeordnet. Tatsächlich bilden die CMF dabei keine Helices, da sie zu kurz sind, um eine pflanzliche Zelle zu umfassen (siehe oben). Gemeint ist stattdessen die Netto-Ausrichtung einer Schicht von CMF. Bei den gekreuzt-polylamellaten Zellwänden wechseln sich Schichten (Lamellen) von CMF mit zwei entgegengesetzten helikalen Orientierungen ab. Beide Zellwandtypen können in sich streckenden Zellen auftreten (Kutschera 2001; Mayumi und Shibaoka 1996; Roelofsen 1965). Bei der helikoidalen Zellwand verändert sich der Winkel helikal ausgerichteter CMF von Lamelle zu Lamelle nur wenig (beispielsweise 20°), aber kontinuierlich (Abb. 1B). Helikoidale Zellwände sind unter anderem für die lateralen, nicht wachsenden Zellwände von Wurzelhaaren beschrieben worden (Emons und Mulder 2000). Helikoidale Anordnungen kristalliner Makromoleküle wurden auch für das Tierreich beschrieben, beispielsweise für das Polysaccharid Chitin in der Cuticula von Arthropoden (Neville und Levy 1984).

1.3 Mikrotubuli kontrollieren das diffuse Wachstum pflanzlicher Zellen

1.3.1 Mikrotubuli

Der Besitz von Mikrotubuli (MT) ist ein Charakteristikum eukaryotischer Zellen. MT sind aus den Proteinen α -Tubulin und β -Tubulin aufgebaut. Die Ähnlichkeit der Sequenzen dieser Proteine innerhalb der Gruppe der Eukaryoten belegt die bemerkenswerte Konservierung der grundsätzlichen Eigenschaften von MT. *Arabidopsis* besitzt 6 Gene, die für Isoformen des α -Tubulin Monomers kodieren und 9 Gene für Isoformen von β -Tubulin (Kost und Chua 2002).

MT sind Hohlzylinder (Außendurchmesser 25 nm), welche aus 13 Längsreihen (Protofilamenten) von Tubulindimeren zusammengesetzt sind. Tubulindimere sind Heterodimere bestehend aus α - und β -Tubulin. Da die Tubulindimere mit gleichbleibender Orientierung mit dem Protofilament eines MT assoziieren, ist ein MT eine polare Struktur. Ein MT verlängert sich durch bevorzugte Assoziation der Tubulindimere mit dem Plus-Ende. Die Dissoziation der Tubulindimere erfolgt bevorzugt am Minus-Ende des MT. Wachstum und Schrumpfen der MT ist abhängig von der Konzentration freier Tubulindimere. Es können nur Tubulindimere addiert werden, welche zuvor ein GTP gebunden haben. Nach dem Einbau von GTP-Tubulindimeren in ein MT wird das GTP zeitlich verzögert hydrolysiert. Daher hat ein stabiler MT an seinem Plus-Ende stets GTP-Untereinheiten, während in seinem zentralen Bereich nur Tubulindimere mit GDP auftreten. GTP-Kappen verhindern eine

rasche Depolymerisation von MT. Der Begriff „Tretmühlmechanismus“ beschreibt einen Gleichgewichtszustand, in welchem ein MT eine konstante Länge hat, jedoch an seinem Plus-Ende GTP-Tubulin addiert, und an seinem Minus-Ende GDP-Tubulin verliert (Cyr 1994). Dieses ist jedoch eine idealisierte Situation: Bei einer gleichbleibenden Konzentration von Tubulindimeren enthält eine Population von MT gleichzeitig MT mit Netto-Wachstum und MT mit Netto-Verkürzung. MT zeigen dann eine „dynamische Instabilität“.

1.3.2 Das kortikale Mikrotubuli-Skelett

Man unterscheidet vier prinzipielle Anordnungen von MT in pflanzlichen Zellen: das kortikale MT-Gerüst (siehe unten), das Preprophaseband (Festlegung der Ebene der Zellteilung), die Teilungsspindel (Separation der homologen Chromosomen in der Mitose) und den Phragmoplast (Belieferung der entstehenden Zellplatte mit Membran- und Wandmaterial).

Pflanzliche Interphasezellen besitzen ein sich unter der Plasmamembran ausdehnendes Gerüst von kortikalen MT. Die kortikalen MT in jungen, sich streckenden Zellen sind überwiegend transversal angeordnet, wobei die Mikrotubuli-Enden einander häufig überlappen. Einzelne kortikale MT können eine Länge von über 10 μm haben (Lloyd 1991). Die kortikalen MT sind untereinander über akzessorische Proteine verbunden (Hemsley 2001; Chan et al. 1999). Zusätzlich können kortikale MT mit der Plasmamembran verknüpft sein (Gardiner et al. 2001). Kortikale MT haben vermutlich Kontakt zum Aktin-Cytoskelett (Baskin 2001; Kost et al. 1999; Ketelaar und Emons 2001). Da in den Zellen der höheren Pflanzen Centrosomen fehlen, war die Natur der MT-organisierenden Zentren lange Zeit rätselhaft. Vermutlich haben kortikale MT von Interphasezellen ihren Ursprung an der nach der Zellteilung neu konstituierten Kernmembran. Das MT-organisierende Zentrum wird kurz darauf zum Zellkortex verlagert (Hasezawa et al. 2000; Granger und Cyr 2000). Die Tatsache, dass im Bereich des Kortex γ -Tubulin nachgewiesen werden konnte, wird als Beleg für ein delokalisiertes MT-organisierendes Zentrum betrachtet (Marc 1997). Am Ende beziehungsweise nach der Zellstreckungsphase treten schräge (helikale) und longitudinale kortikale MT auf (Sugimoto et al. 2000). Obwohl auch regionale MT-Orientierungen beobachtet werden können (z.B. in Xylemzellen während der Synthese der Sekundärwand) ist die Netto-Orientierung von kortikalen MT häufig konsistent innerhalb einer ganzen Zelle, in anderen Fällen sogar innerhalb ganzer Gewebe (Liang et al. 1996; Lloyd 1994; Williamson 1990).

Eine Umorientierung von kortikalen MT, beispielsweise der Übergang von transversalen zu helikalen MT konnte in einer Vielzahl von Experimenten erreicht werden. Eine Umorientierung kann entstehen durch Applikation von Ethylen, Gibberellin, Auxin, Licht verschiedener Qualitäten, Schwerkraft, durch von außen auf das Gewebe einwirkende Kräfte und durch Verwundung (Nick 1998; Fischer und Schopfer 1998; Shibaoka 1994; Lloyd 1994;

Williamson 1991). Da in vielen Fällen gleichzeitig eine Veränderung der Richtung des Wachstums beobachtet werden konnte, wurde meist ein kausaler Zusammenhang von Orientierung von MT und Umorientierung der Wachstumsrichtung impliziert. Der Zusammenhang könnte in der Kontrolle der Deposition von CMF durch kortikale MT liegen.

1.3.3 Die Funktion des kortikalen MT-Skeletts im diffusen Wachstum

Aufgrund der im Elektronenmikroskop beobachteten Parallelität von kortikalen MT und den extrazellulären CMF wurde frühzeitig eine funktionelle Verbindung der beiden Elemente angenommen. Demnach kann die Zelle die Ausrichtung von CMF in ihrer Zellwand durch kortikale MT kontrollieren. Entsprechend der weithin akzeptierten Hypothese von Giddings und Staehelin (1991) bewegen sich die Cellulose-Synthasekomplexe in Bahnen, welche von direkt unter der Plasmamembran gelegenen MT seitlich begrenzt werden. Es wird angenommen, dass die Polymerisation der Celluloseuntereinheiten die nötige Energie zum Vorwärtstreiben der Cellulose-Synthasekomplexe erzeugt (Nick 1998). Die dabei erzeugte CMF hat dieselbe Ausrichtung wie der MT unterhalb der Plasmamembran. Die Hypothese, dass kortikale MT die Ausrichtung von CMF beim diffusen Wachstum kontrollieren, wird insbesondere durch Experimente mit gegen MT gerichteten Substanzen gestützt (Colchizin, Oryzalin, Taxol, Propyzamid und andere). In vielen Fällen wird dadurch ein Übergang von anisotropem zu isotropem Wachstum erzeugt. Die Applikation dieser Substanzen erzeugt häufig eine ungeordnete Deposition von CMF in die Zellwand (siehe Referenzen in Baskin 2001).

Der Phänotyp der Mutante *fragile fiber2* (*fra2*) ist ein weiterer Beleg für die funktionale Kopplung von kortikalen MT mit CMF. Das *FRA2* Gen kodiert für ein Katanin-Homolog und ist ein MT-destabilisierendes Protein. Die Mutante *fra2* zeigt ein ungeordnetes kortikales MT-Skelett, fehlerhaft ausgerichtete CMF und reduziertes Zellwachstum (Burk und Ye 2002). Auch im Falle der Mutante *angustifolia1* (*an1*) ist versucht worden, eine Beziehung zwischen Zellstreckung und Ausrichtung der MT herzustellen. Die individuellen Blattzellen und die gesamten Blätter von *an1* sind schmaler als die des Wildtyps. Tatsächlich ist die Ausrichtung kortikaler MT in *an1* verändert: in transversalen Schnitten des Blattes zeigen die kortikalen MT von *an1* häufiger eine horizontale Position als die MT des Wildtyps. Sind die CMF entsprechend ausgerichtet, dann sollte in *an1* einer Ausdehnung der Zelle in die Breite mehr Widerstand entgegengesetzt werden als im Wildtyp. Leider ist die Zellwand in *an1* bisher nicht untersucht worden (Tsuge et al. 1996; Kim et al. 2002).

Wesentlicher Bestandteil der Vorstellung, dass MT und CMF funktionell miteinander gekoppelt sind, ist das Vorhandensein eines physischen Kontaktes von MT mit der Plasmamembran. Im Elektronenmikroskop sind Strukturen einer derartigen Verbindung bereits gezeigt worden, außerdem gibt es experimentelle Befunde, die eine Assoziation von

MT und der Plasmamembran belegen (Baskin 2001; Shibaoka 1994). Ein Einblick in die biochemische Natur einer solchen Verbindung gelang mit der Klonierung eines Phospholipase D Gens aus Tabak. Das resultierende Protein p90 assoziiert mit der Plasmamembran und bindet MT. Es wird angenommen, dass p90 als Teil einer Signalkette Informationen an das MT-Skelett weiterleitet (Gardiner et al. 2001).

Die Frage, ob kortikale MT pflanzlicher Interphasezellen auch an der Sekretion von Golgi-Vesikeln beteiligt sind, wird zur Zeit kontrovers diskutiert. In tierischen Zellen haben MT eine bedeutende Funktion für die Beweglichkeit von Organellen und im intrazellulären Vesikeltransport. Experimentelle Befunde zeigen aber, dass beide Funktionen in Interphasezellen der Pflanze wesentlich durch das Aktin-Cytoskelett gesteuert sind. Dennoch hat der auf MT basierende Vesikeltransport eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Zellteilung (Mayer und Jürgens 2002; Ketelaar und Emons 2001; Wasteneys 2000).

1.3.4 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Es wird angenommen, dass das kortikale MT-Skelett von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) reguliert wird (Marc et al. 1998). Das kortikale MT-Skelett ist eine dynamische Struktur, welche, wie oben bereits erwähnt, auf eine Vielzahl von exogenen Einflüssen spontan reagiert (Nick et al. 1998). Außerdem ist das gesamte MT-Skelett während des Durchlaufens des Zellzyklus einer kontinuierlichen Veränderung unterworfen (Hasezawa und Kumagai 2002). Auch Zellen, die den Zellzyklus verlassen, zeigen eine entwicklungsabhängige Konfiguration des kortikalen MT-Skeletts (Sugimoto et al. 2000). MAPs haben für die Regulation des kortikalen MT-Skeletts die erforderlichen Eigenschaften. MAPs können die Polymerisation von Tubulinuntereinheiten stimulieren. MAPs können MT stabilisieren, destabilisieren oder führen zu einer Bündelung von MT. MAPs können posttranslationale Veränderungen von Tubulinuntereinheiten herbeiführen oder sind Motorproteine und haben Aufgaben beim intrazellulären Transport. MAPs können MT mit anderen subzellulären Strukturen verbinden. Die Funktion der MAPs selbst wird häufig durch Phosphorylierung reguliert (Drewes et al. 1998). Strukturelle MAPs aus tierischen Zellen sind u.a. die Proteine MAP1, MAP4 und Tau. Von ihnen wurden auch MT-Bindungsmotive abgeleitet.

Biochemische Untersuchungen haben vielfach die Existenz von für Pflanzen spezifischen MAPs gezeigt. Methoden der Gen-Isolierung, welche auf Sequenzhomologie beruhen, haben bei diesen MAPs nicht zu Erfolg geführt (Wick 2000). Die Isolierung von respektiven Genen erfolgte erst in jüngster Zeit. Gene anderer pflanzlicher MAPs haben direkte tierische Homologe. Die p86 Untereinheit des Eukaryotischen Initiationsfaktors-(iso)4F aus *Triticum* kann MT bündeln, aber auch „nahtlos“ aneinander fügen (Hugdahl et al. 1995) und der Elongationsfaktor-1a aus *Daucus carota* assoziiert mit MT entsprechend

einem Kalzium/Calmodulin-abhängigen Mechanismus (Moore et al. 1998). Für Importin- α (Smith und Raikhel 1998) und ein Hitzeschock-Protein (Petrasek et al. 1998; Nick et al. 2000) konnte die Assoziation mit MT in pflanzlichen Zellen gezeigt werden. Das *Tangled1* Gen aus Mais kodiert für ein basisches Protein und hat Homologie zu APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) aus *Homo sapiens* (Smith et al. 2001). Das Genprodukt von *FRA2* ist ein Katanin-Homolog (Burk et al. 2001), das Genprodukt von *MOR1* ist ein XMAP215/TOGp-Homolog (die zugehörige Mutante heißt *microtubule organization1*, Whittington et al. 2001). Das Protein p90 eines Gens aus Tabak ist ein Phospholipase D-Homolog und bindet kortikale MT und die Plasmamembran (Gardiner et al. 2001). Ein Homolog des peroxisomalen Multifunktionalen-Proteins aus Reis bindet MT und RNA und ist fähig zu enzymatischen Reaktionen der β -Oxidation (Chuong et al. 2002). Ferner wurden die Gene einiger Proteine mit Ähnlichkeit zum Motorprotein Kinesin kloniert (siehe beispielsweise Oppenheimer et al. 1997).

Im Gegensatz zu den genannten Genen und Proteinen sind die MAP65-Familie und MAP190 spezifisch für Pflanzen und haben kein direktes tierisches Homolog. Beide Klassen sind strukturelle MAPs. Proteine der MAP65-Familie können MT bündeln und/oder die Polymerisation von Tubulin stimulieren. Die Proteine der Familie haben spezifische Positionen in den vier prinzipiellen MT-Strukturen der pflanzlichen Zelle (Smertenko et al. 2000). MAP190 kann MT und Aktin-Filamente binden. Das Protein lokalisiert vor dem Zusammenbrechen der Kernmembran im Kern und anschließend in Spindel und Phragmoplast (Igarashi et al. 2000).

Über eine etwaige *in vivo* Funktion der pflanzlichen MAPs in Bezug auf das kortikale MT-Skelett ist wenig bekannt. Die Proteine *FRA2* und *MOR1* könnten direkte Gegenspieler bei der Organisation der kortikalen MT in *Arabidopsis* sein. Durch Destabilisieren beziehungsweise Stabilisieren von MT könnten sie ein Gleichgewicht herstellen (Burk et al. 2001; Whittington et al. 2001). In der *Arabidopsis* Mutante *fass/tonneau2* fehlt das Preprophaseband, außerdem zeigt sie ein gestörtes kortikales MT-Skelett. Die Mutante ist in der regulativen Untereinheit der Proteinphosphatase PP2A betroffen, das Protein ist also kein MAP im strengen Sinne. Das Protein *FASS/TONNEAU2* könnte aber an der Dephosphorylierung von MAPs beteiligt sein (Camilleri et al. 2002).

1.4 Alternative Konzepte zu Entstehung und Struktur der Zellwand

Die Regulation der Anisotropie im pflanzlichen Wachstum ist ein komplexer Prozess. Entsprechend den oben geschilderten Mechanismen kontrollieren MT die Deposition von CMF in die Zellwand. Die Ausrichtung von MT und CMF zusammen legen die Anisotropie des Wachstums fest. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die Wachstumsanisotropie auch auf andere Weise reguliert werden kann: zum einen sind nach Applikation von MT-

Giften vielfach Zellwände mit einem erheblichen Grad an Ordnung gefunden worden, zum anderen ist die Ausrichtung von MT und entstehenden CMF nicht immer parallel (siehe Referenzen in den Übersichtsartikeln von Roland et al. 1987; Emons et al. 1992; Wasteneys 2000; Baskin 2001). Ich werde kurz zwei Konzepte erwähnen, durch welche die Entstehung der Anisotropie auf andere Weise erklärt wird.

Konzept 1: Da bei der Biogenese helikoidaler Zellwände kortikale MT nur eine untergeordnete Rolle spielen, haben Emons und Mulder (1998) ein geometrisch-mathematisches Modell entwickelt, welches eine geordnete Deposition von CMF ohne Mitwirkung von MT erklärt. Entsprechend dieses Modells ist der Raum zwischen Zellwand und Plasmamembran limitierend. Essentiell hängt daher die Ausrichtung der eingelagerten CMF von a) Anzahl der CMF, b) Breite der CMF, inklusive weiterem Zellwandmaterial und c) dem Durchmesser der Zellen ab. Das Modell kann auch auf Zellen mit diffusem Wachstum ausgeweitet werden (Emons und Mulder 2000). Andererseits schlagen die Autoren vor, dass der geometrisch-mathematische Mechanismus der *default*-Weg sein könnte, während in diffus wachsenden Zellen MT die Kontrolle über die Deposition von CMF übernehmen (Emons und Mulder 1998).

Konzept 2: Das Modell wird als *templated incorporation model* bezeichnet (Baskin 2001). Demnach wird die Ausrichtung von CMF in der Zellwand durch eine Matrix festgelegt, welche Bindungsstellen für CMF hat. Die Bindungsstellen sind gerichtet und können so den Winkel der CMF zur Zellachse festlegen. Dadurch können transversale, helikale, helikoidale und gekreuzte CMF-Ausrichtungen festgelegt werden. Die Matrix besteht aus rezeptorartigen Molekülen, welche in der Zellwand und/oder in der Plasmamembran verankert sind. Die Matrix kann über die Plasmamembran direkten Kontakt zu MT haben. Demnach kann die Zellwand CMF ohne Beteiligung von MT ausrichten. In anderen Zellen wiederum haben MT einen entscheidenden Einfluss. Die Existenz von direkten Verbindungen zwischen MT und CMF durch rezeptorartige Strukturen, welche durch die Plasmamembran reichen, wurde auch von anderen Autoren gefordert (Cyr 1994; Williamson 1991).

1.5 Helikales Wachstum

Helikales Wachstum ist, wie unten eingehend erklärt werden wird, ein im Pflanzenreich häufig auftretendes Phänomen. In der Mehrheit der Fälle entsteht helikales Wachstum während des Streckungswachstums der Zelle beziehungsweise des Organs. Ein Verständnis der Ursachen des helikalen Wachstums sollte daher Einblick in die Mechanismen der pflanzlichen Zellstreckung bringen.

1.5.1 Helikales Wachstum von Einzelzellen

Helikales Wachstum ist für verschiedene frei wachsende Einzelzellen beschrieben worden, so für die Sporangioophoren von *Phycomyces*, für die Riesenzellen von *Nitella* und für die filamentösen Grünalgen *Cladophora* und *Chaetomorpha* (Oort 1931; Castle 1953; Green 1954; Frei und Preston 1961). Diese Zellen zeigen diffuses Streckungswachstum. Die Ursache für das helikale Wachstum wurde in einer helikalen Struktur der Zellwand gesehen. Tatsächlich war Identifizierung und Quantifizierung der helikalen Zellwandstruktur in *Phycomyces* und *Nitella* mit technischen Schwierigkeiten verbunden. Der Winkel der Abweichung der CMF von der transversalen Orientierung (gemessen wird die Doppelbrechung des Lichts durch die Zellwand im Polarisationsmikroskop) wurde ursprünglich als zu gering angesehen, um den beobachteten Winkel des helikalen Wachstums zu erklären. Theoretische Modelle zur Feinstruktur der Zellwand können diese Diskrepanz jedoch erklären (Roelofsen 1965). Es wird angenommen, dass die Netto-Ausrichtung von CMF der Zellwand und die daraus resultierende Torsion der sich streckenden Zelle umgekehrte Vorzeichen haben. Die Verhältnisse sind analog einer Feder, deren freies Ende bei Streckung in einer der Windung entgegengesetzten Richtung rotiert (Abb. 2A). Tatsächlich entspricht bei *Phycomyces* und *Nitella* diese Situation lediglich der initialen Phase des helikalen Wachstums. Später kann sich die Richtung des helikalen Wachstums umkehren. Dieses wird vermutlich durch verstärktes Wachstum in die Breite möglich (Roelofsen 1965). Die Richtung des helikalen Wachstums ist spezifisch für den jeweiligen Organismus. Frei wachsende Zellen höherer Pflanzen zeigen ebenfalls helikales Wachstum, beispielsweise die Blütenhaare von *Tradescantia* und Baumwolle (Lloyd 1984; Roelofsen 1965; Stewart 1975).

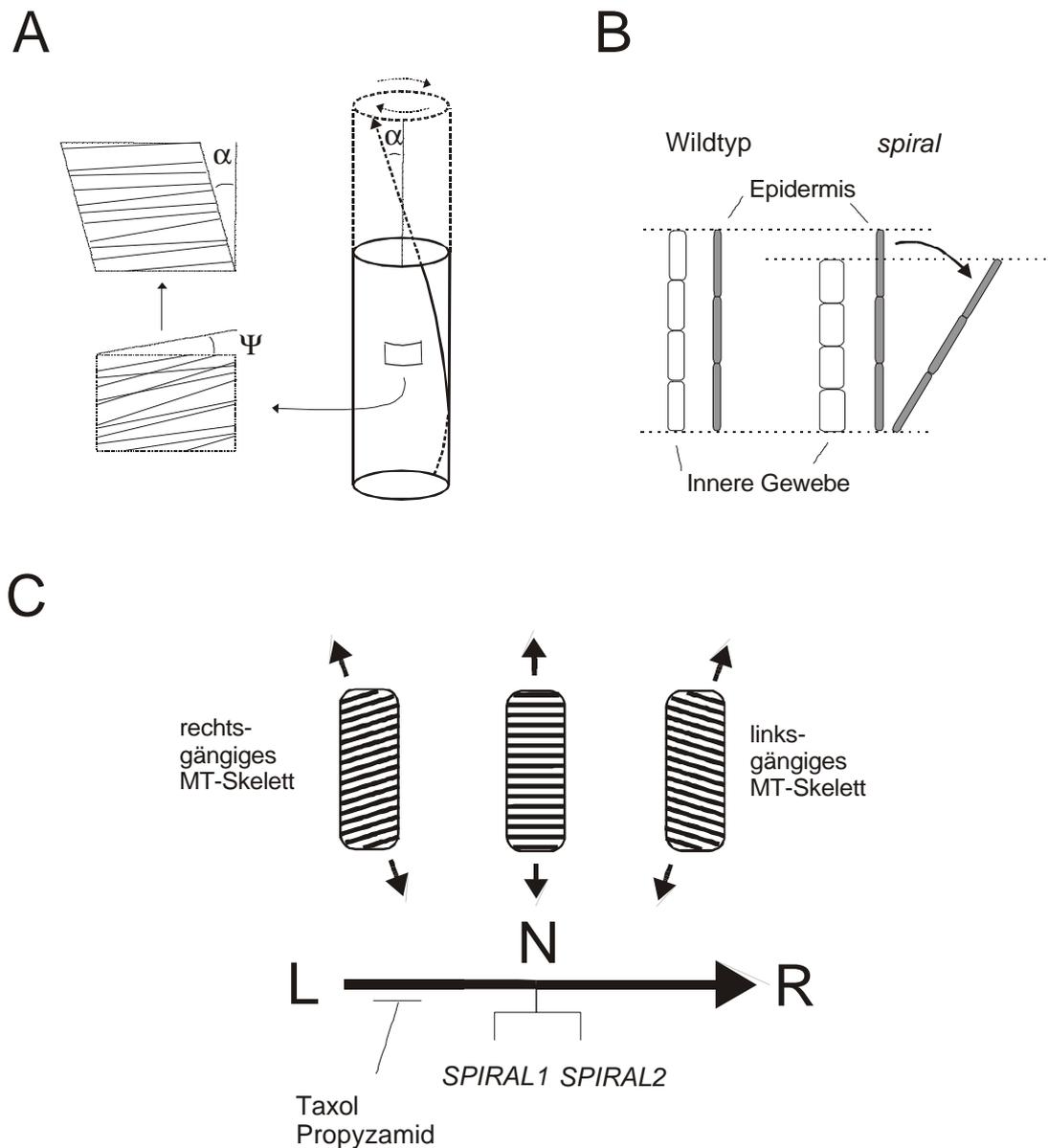


Abb. 2. Helikales Wachstum von Einzelzellen und pflanzlichen Organen. (A) Diagramm für das helikale Wachstum einer sich streckenden Zelle und deren Torsion. Die Zelle zeigt eine rechtsgängige Wandstruktur, die Torsion der Zelle ist linksgängig. Der Winkel ψ (Ausrichtung der Cellulosemikrofibrillen) muss dem Winkel α (Richtung des Wachstums) entsprechen, da die Zellstreckung senkrecht zur durchschnittlichen Ausrichtung der Mikrofibrillen erfolgt. Experimentelle Daten zeigten jedoch, dass ψ meist kleiner ist als α . (aus Roelofsen 1965, verändert). (B, C) Modell für helikales Wachstum in *Arabidopsis*. (B) Im Wildtyp ist die Länge der Zellreihen für innere und äußere Zellschichten gleich, wohingegen bei den *spiral* Mutanten die Länge der inneren Zellreihen geringer ist als die Länge der epidermalen Zellreihen. Um diesen Unterschied auszugleichen, müssen die äußeren Zellen seitlich ausweichen. Das Modell wird auch auf Organe des Wildtyps angewandt, nachdem sie mit geringen Mengen von MT-Giften behandelt wurden. (C) Die Richtung, in welcher die epidermalen Zellen ausweichen, ist abhängig von der Händigkeit des Mikrotubuli-Skeletts bzw. der Cellulosemikrofibrillen. Es wird angenommen, dass Mikrotubuli die Deposition von gleichartig ausgerichteten Mikrofibrillen bewirken. Rechtsgängige Mikrotubuli/ Cellulosemikrofibrillen führen zu linksgängigem Wachstum (vergleiche A). (aus Furutani et al. 2000, verändert)

1.5.2 Helikales Wachstum pflanzlicher Organe

Einige Beispiele des helikalen Wachstums in den Organen von Pflanzen sind für den Beobachter direkt evident. Die mächtigen Stämme der Rosskastanie zeigen fast immer Torsionen; diese Torsionen sind immer rechtsgängig. Das Thema ist für die Holzwirtschaft von unmittelbarer Bedeutung, weil viele Baumarten, insbesondere wenn sie unter umweltbedingtem Stress leiden, derartige Torsionen zeigen. Da die Entstehung dieser Torsionen vor allem auf die Richtung der Zellteilung in embryonalen Geweben des Stammes zurückzuführen ist (Harris 1989) und nicht eine Eigenschaft des Streckungswachstums ist, wird die Torsion von Stämmen hier nicht weiter behandelt.

Beim Streckungswachstum entstehende Torsionen findet man bei verschiedenen Schlingpflanzen. Abhängig von der Pflanzenart winden diese sich in rechts- (*Lonicera*) oder linksgängiger (*Phaseolus*), aber auch in wechselnder Manier (*Polygonum convolvulus*) um einen geeigneten Gegenstand (Hart 1990). Das zylindrische Organ kann dabei eine Torsion erfahren. Die Torsion und die Gängigkeit der Windung können gleiche Vorzeichen haben, sie müssen aber nicht (Baillaud 1962). Das Winden entsteht durch Schwanken des Sprosses beim Wachsen. Dieses Schwanken wird auch als Circumnutation (siehe unten) bezeichnet.

Die Entstehung von Torsionen kann ihre Ursache auch in einer durch einen Reiz ausgelösten, gerichteten Pflanzenbewegung haben (Tropismus). Die meisten Tropismen führen zu einer einfachen Verbiegung eines zylindrischen Organs. Dabei verlängern sich die Zellen der einen Flanke des Organs stärker als die Zellen auf der gegenüberliegenden Flanke. Im Ergebnis wird die Organspitze gekippt. Ein Tropismus, der zu einer Torsion der Organspitze führt, wird als Strophismus bezeichnet. Snow (1962) präsentiert neben weiteren Konzepten folgendes Modell für die Entstehung von Organtorsionen: Die äußeren Zellen eines Organs strecken sich schneller als die inneren Zellen des Organs. Um den entstehenden Längenunterschied auszugleichen, müssen die äußeren Zellen seitlich ausweichen. Sofern alle Zellen in die gleiche Richtung ausweichen, entsteht dadurch eine gerichtete Drehung der Organspitze. Möglicherweise ist dieses Modell auch auf Organtorsionen anderer Ursache, beispielsweise den Torsionen der Schlingpflanzen oder den Torsionen in *Arabidopsis* Mutanten übertragbar (Hashimoto 2002; vergleiche Abb. 2B).

Der von Darwin und Darwin (1880) eingeführte Begriff Circumnutation wird zur Beschreibung von Wachstumsbewegungen von Pflanzen benutzt. Häufig wird der junge Keimling untersucht. Circumnutationen erfolgen in kreisförmigen, aber auch pendelartigen Bewegungen. Kreisförmige Bewegungen zeigen eine für die Pflanzenart spezifische Händigkeit. In einigen Fällen zeigt ein Organ gleichzeitig rechts- und linksgängige Bewegungen, wobei Periode und Amplitude der beiden Bewegungen in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen. Die Periodenlänge von Circumnutationen ist zu gering, um das Phänomen mit dem nackten Auge wahrnehmen zu können (meist zwischen 30 min und

5 h). Mit Beendigung des Wachstums stellt die Pflanze die Circumnutation ein. Die Circumnutation führt bei der Mehrheit der Pflanzenarten nicht zu Torsionen der Organe und ist deshalb kein helikales Wachstum im strengen Sinne. Circumnutationen des Hypokotyls sind eingehend für *Arabidopsis* beschrieben worden (Schuster 1996; Schuster und Engelmann 1997). Vermutlich zeigen auch die Wurzeln von *Arabidopsis* Circumnutationen (Simmons et al. 1995; Mullen et al. 1998). Wurzeln von *Arabidopsis* zeigen, wenn sie entlang einer angeschrägten Agar-Oberfläche wachsen, zwei auffällige Eigenheiten: zum einen wächst die Wurzelspitze in einer wellenförmigen Manier (*root waving*; Okada und Shimura 1990), zum anderen ist die durchschnittliche Richtung des Wurzelwachstums gegenüber dem Vektor der Erdschwere nach rechts verschoben (*root slanting*). Das *root waving* hat seine Ursache in der Kombination zweier Tropismen, des Gravitropismus und des Thigmotropismus. Die Häufigkeit des *root slanting* könnte seine Ursache in der Circumnutation haben (Simmons et al. 1995).

1.5.3 Mutanten mit Organtorsionen in *Arabidopsis*

Mutantensammlungen in *Arabidopsis* erleichtern die Analyse pflanzlicher Morphogenese. Die sorgfältige Auswahl eines Studienobjekts ermöglicht die Untersuchung eines bestimmten Aspekts der Morphogenese. Man kann annehmen, dass eine Mutante mit einem Defekt in der Zellstreckung ihre Organe zunächst normal anlegt, jedoch in der Phase der Zellstreckung eine Abnormität aufweisen wird. Die Torsion eines sich streckenden Organs entspricht einer solchen Abweichung von der Norm. In *Arabidopsis* gibt es unterschiedliche Mutanten mit Organtorsionen. In den Mutanten *lopped1* (allelisch zu *tornado1*) und *tornado2* (Carland und McHale 1996; Cnops et al. 2000), *twisted dwarf* (B. Schulz, ZMBP Tübingen, persönliche Mitteilung) und *an1* (eigene Beobachtung) sind die Torsionen der Organe nicht gerichtet. Stattdessen wechseln einander linksgängige und rechtsgängige Torsionen ab.

Arabidopsis Mutanten mit gerichteten Organtorsionen wurden zuerst durch Bürger (1971) und wenig später durch Relichova (1976) beschrieben. Es handelt sich dabei um die Mutanten F104 und *convoluta*, welche ausschließlich rechtsgängige Torsionen zeigen. Wie später gezeigt werden konnte, sind F104 und *convoluta* allelisch, das heißt es ist das gleiche Gen betroffen (C. Fabri und A. R. Schäffner, unveröffentlicht). Die Mutante F104 wurde schließlich mit dem Namen *tortifolia1* (*tor1*) belegt, da sie auffällige Torsionen in den Blattstielen (Petiolen) zeigt (Kranz und Kirchheim 1987). Die nächste Erwähnung der *tor1* Mutation beinhaltet die Bestätigung seiner ungefähren chromosomalen Position, nämlich auf dem zentralen Teil von Chromosom 4 (Fabri und Schäffner 1994).

1.5.3.1 Bisherige Ergebnisse zu *Arabidopsis* Mutanten mit helikalem Wachstum

Eine eingehende phänotypische Untersuchung zweier Mutanten, genannt *spiral1* (*spr1*) und *spiral2* (*spr2*), erbrachte ein tieferes Verständnis des helikalen Wachstums in *Arabidopsis*. Die Mutante *spr2* ist allelisch mit *tor1* (A. R. Schäffner unveröffentlicht; Furutani et al. 2000). Die Mutationen *spr1* und *spr2* führen zu einer Reduktion der Anisotropie in inneren Zellschichten der Organe und zu einem rechtsgängig helikalem Wachstum in epidermalen Zellen. Die beiden Mutanten wurden anhand ihres Wurzelphänotyps isoliert. Die endogene Händigkeit des Wurzelwachstums des Wildtyps (siehe oben) ist in *spr1* und *spr2* umgekehrt. Es wurde festgestellt, dass die Applikation von geringen Mengen von MT-Giften ebenfalls Organtorsionen herbeiführt, welche allerdings linksgängig waren. Wurden *spr1* und *spr2* diesen MT-Giften ausgesetzt, dann wurde entweder, bei geringeren Mengen, der Zellstreckungsdefekt der Mutanten aufgehoben, oder, bei größeren Mengen, linksgängiges Wachstum herbeigeführt. Ferner wurde gezeigt, dass in epidermalen Zellen helikales Wachstum von einer helikalen Ausrichtung kortikaler MT begleitet werden kann. Dieses wurde für den Wildtyp bei Applikation von MT-Giften und für die Mutante *spr1* gezeigt. Die Händigkeit des tordierten Organs und die Händigkeit des darin gefundenen kortikalen MT-Skeletts haben umgekehrte Vorzeichen. Die Autoren nehmen an, dass die Ausrichtung der MT der Ausrichtung der CMF entspricht. In dieser Veröffentlichung (Furutani et al. 2000) wird ferner ein Modell zur Beschreibung des helikalen Wachstums vorgestellt (Abb. 2B, C). Es entspricht weitgehend dem oben erwähnten Modell für Organtorsionen als Folge von Tropismen (Snow 1962).

In einer weiteren Veröffentlichung (Thitamadee et al. 2002) wurde eine direkte Verbindung zwischen helikalem Wachstum und MT hergestellt. Aus einer Suche nach Mutanten, welche den rechtsgängigen *spr1* Phänotyp unterdrücken, gingen zwei Mutationen hervor, welche im Wildtyp linksgängig helikales Wachstum induzieren. Die Mutanten wurden deswegen *lefty1* und *lefty2* genannt. Sie tragen dominant-negative *missense* Mutationen (S180F) in den α -Tubulin Genen TUA6 beziehungsweise TUA4. In dieser Publikation wird außerdem gezeigt, dass die mutanten Tubuline in kortikale MT eingebaut werden und dass das resultierende MT-Skelett rechtsgängig und in erhöhtem Maße empfindlich gegen MT-Gifte ist. Die Autoren folgern, dass eine reduzierte Stabilität des MT-Skeletts linksgängiges Wachstum erzeugen kann.

Es gibt weitere Hinweise für eine Beteiligung kortikaler MT am helikalen Wachstum in *Arabidopsis*. In der bereits erwähnten Mutante *mor1*, welche fragmentierte kortikale MT zeigt, treten ebenfalls linksgängige Torsionen der Organe auf (Whittington et al. 2001). Rechtsgängig helikale Organtorsionen finden sich in zwei transgenen *Arabidopsis* Überexpressionslinien zur Markierung des Cytoskeletts mit *green fluorescent protein* (GFP):

TUA6-GFP und MBD-sGFP (Mikrotubuli-Bindungsdomäne aus MAP4) (Granger und Cyr 2001; Hashimoto 2002).

Neben weiteren Mutationen, welche in Wurzeln verstärkte oder invertierte Torsionen hervorrufen (Rutherford und Masson 1996; Marinelli et al. 1997) ist insbesondere die Mutante *sku5* von Interesse (Sedbrook et al. 2002). Die Mutante *sku5* zeigt verstärkt linksgängiges Wachstum in Wurzeln und im Hypokotyl. *SKU5* kodiert für ein Ascorbat-Oxidase/Laccase-Homolog. Das Protein ist mit einem Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker versehen und lokalisiert in der Plasmamembran und in der Zellwand. Eine enzymatische Aktivität konnte bisher nicht gezeigt werden. Die *sku5* Mutante belegt, dass helikales Wachstum auch ohne Beteiligung des Cytoskeletts durch eine in der Zellwand induzierte Veränderung entstehen kann. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass bisher für keine der oben genannten *Arabidopsis* Mutanten mit helikalem Wachstum eine Veränderung in der Zellwand gezeigt wurde.

1.5.3.2 Bisherige Ergebnisse zu den Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3*

Aus einer EMS-mutagenisierten *Arabidopsis* Population waren weitere Mutanten mit Torsionen in den Petiolen isoliert worden (A.R. Schaeffner und T. Laux, unveröffentlicht). Die Mutanten wurden sämtlichst als *tortifolia* Mutanten bezeichnet. Sie dienten als Grundlage für diese Arbeit. Später wurden zusätzliche Mutanten von anderen Forschern beigesteuert. Kreuzungen der *tor* Mutanten belegten zunächst 3, später 4 unabhängige Komplementationsgruppen (siehe Material und Methoden). Die Erkenntnis, dass die Mutagenese verschiedener Loci in *Arabidopsis* zu Torsionen von Petiolen führen kann, warf selbstverständlich die Frage nach den Veränderungen in der Morphologie der Petiolen auf (Abb. 3A-H). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Epidermis zeigten, dass die Zellreihen der allgemeinen Richtung der Torsion folgen (Abb. 3B-D). *tor2* Petiolen zeigen gelegentlich vergrößerte Zellen, welche aus der Oberfläche der Epidermis herausragen (Abb. 3G). Querschnitte der Petiolen der *tor* Mutanten präsentierten nicht die klare Größenverteilung der Zellen der äußeren Gewebe wie sie im Wildtyp vorliegt, sondern zeigten Zellen mit vergrößertem Durchmesser in den jeweiligen Schichten. Die Abfolge der Zellschichten erscheint in den Mutanten *tor2* und (weniger deutlich) *tor3* regelrecht durcheinander gebracht (Abb. 3F-H). Offenbar verlieren einzelne Zellen die Fähigkeit zu streng anisotropem Wachstum. Diese Veränderungen treten nur in den kortikalen und endodermalen Zellschichten und der Epidermis auf, nicht jedoch im Gefäßsystem.

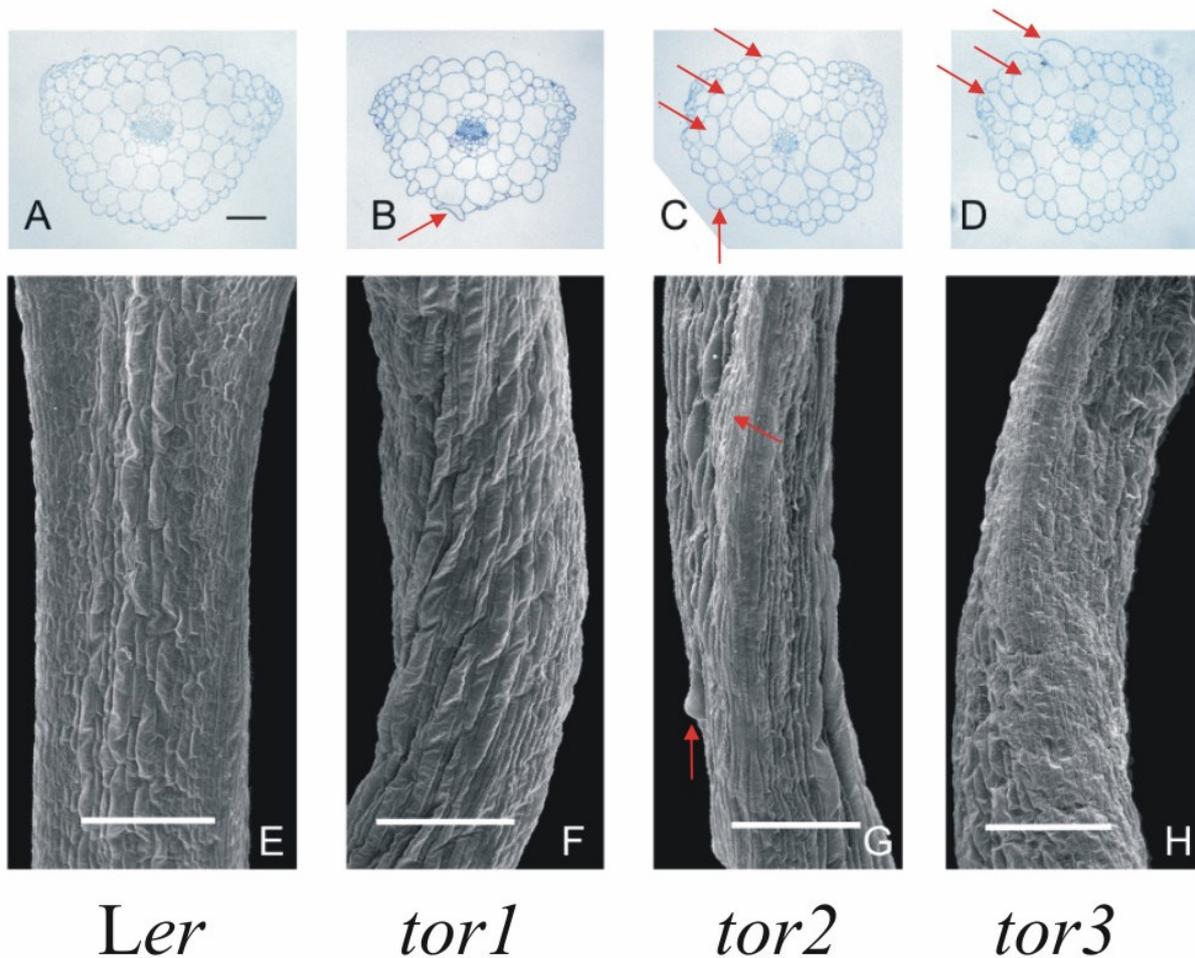


Abb. 3. Querschnitte (A-D) von Petiolen des Wildtyps und *tor* Mutanten und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (E-H) ganzer Petiolen des Wildtyps und *tor* Mutanten. Petiolen stammen vom Wildtyp (A, E), *tor1* (B, F), *tor2* (C, G) oder *tor3* (D, H). Das Alter der Petiolen betrug 18 DAG. *tor* Pflanzen zeigen unnatürlich vergrößerte Zellen (Pfeile) in der Epidermis (zu sehen in B-D und G) und in kortikalen Geweben (in B-D), aber nicht im vaskulären System (siehe B-D). Balken in A-D 100 μm , Balken in E-H 300 μm . (Petiolenquerschnitte wurden angefertigt von C. Fabri. Aufnahmen am Elektronenmikroskop wurden von T. Laux angefertigt.)

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die zeitliche Entstehung der Torsionen in den Petiolen. Die Drehbewegung der Petiolen während der Expansion von Primärblättern wurde dokumentiert, indem der Winkel der Blattspreite relativ zur horizontalen Position für verschiedene Zeitpunkte abgeschätzt wurde (Abb. 4A). Bis zum Tage 10 ist das Wachstum von Primärblättern im *Arabidopsis* Wildtyp hauptsächlich von Zellteilungen bestimmt (Pyke et al. 1991). Wie auch im Wildtyp werden in *tor* Mutanten bis zu diesem Zeitpunkt keine Torsionen in Primärblättern beobachtet. Die Torsionen werden erst im folgenden Entwicklungsabschnitt, welcher mehr und mehr durch Zellstreckung gekennzeichnet ist, sichtbar. In der Abbildung 4 (A, B) werden die links- und rechtsgerichteten Torsionen als negative beziehungsweise positive Werte dargestellt. Durchschnittliche *tor1* und *tor2* Blätter erreichen fast eine vollständige Umdrehung (entsprechend 360°), bevor das

Streckungswachstum eingestellt wird. Die durchschnittliche Drehung der Blätter von *tor3* ist wesentlich geringer, aber von entgegengesetzter Richtung.

Die Analyse von Doppelmutanten ermöglicht die Aufdeckung von Wechselwirkungen von Genprodukten bereits bevor das eigentliche Genprodukt bekannt ist. Für eine solche Analyse waren auf Basis der Mutanten *tor1-1*, *tor2-1* und *tor3-1* durch Kreuzungen die drei Doppelmutanten *tor1/tor2*, *tor1/tor3* und *tor2/tor3* erzeugt worden. Dies geschah mit Hilfe genetischer Marker, welche zur Überprüfung der Segregation der Loci eingesetzt wurden. Alle Doppelmutanten zeigten Torsionen der Petiolen, allerdings mit spezifischer Qualität und Quantität (Abb. 4B). *tor1/tor2* Doppelmutanten zeigen deutlich einen additiven Phänotyp, erkennbar an der betonten rechtsgängigen Torsion ihrer Petiolen. Demnach haben *TOR1* und *TOR2* im Wildtyp unterschiedliche Funktionen mit unabhängigen Wirkungswegen in der Zelle. Die Gängigkeit der Torsion hängt aber von der Situation am *TOR3* Locus ab. In Bezug auf die Richtung der Torsion ist die *tor3* Mutation in den Doppelmutanten *tor1/tor3* und *tor2/tor3* dominant. Interessanterweise ist jedoch das Ausmaß der linksgerichteten Torsion in *tor1/tor3* und *tor2/tor3* Doppelmutanten ausgeprägter als bei *tor3* Mutanten. Demnach sind die Mutationen *tor1* und *tor2* dominant im Hinblick auf das Ausmaß der Torsion (Abb. 4B). Einige *tor1/tor2* Doppelmutanten zeigten extreme Verdrehungen der Petiolen (Abb. 4C).

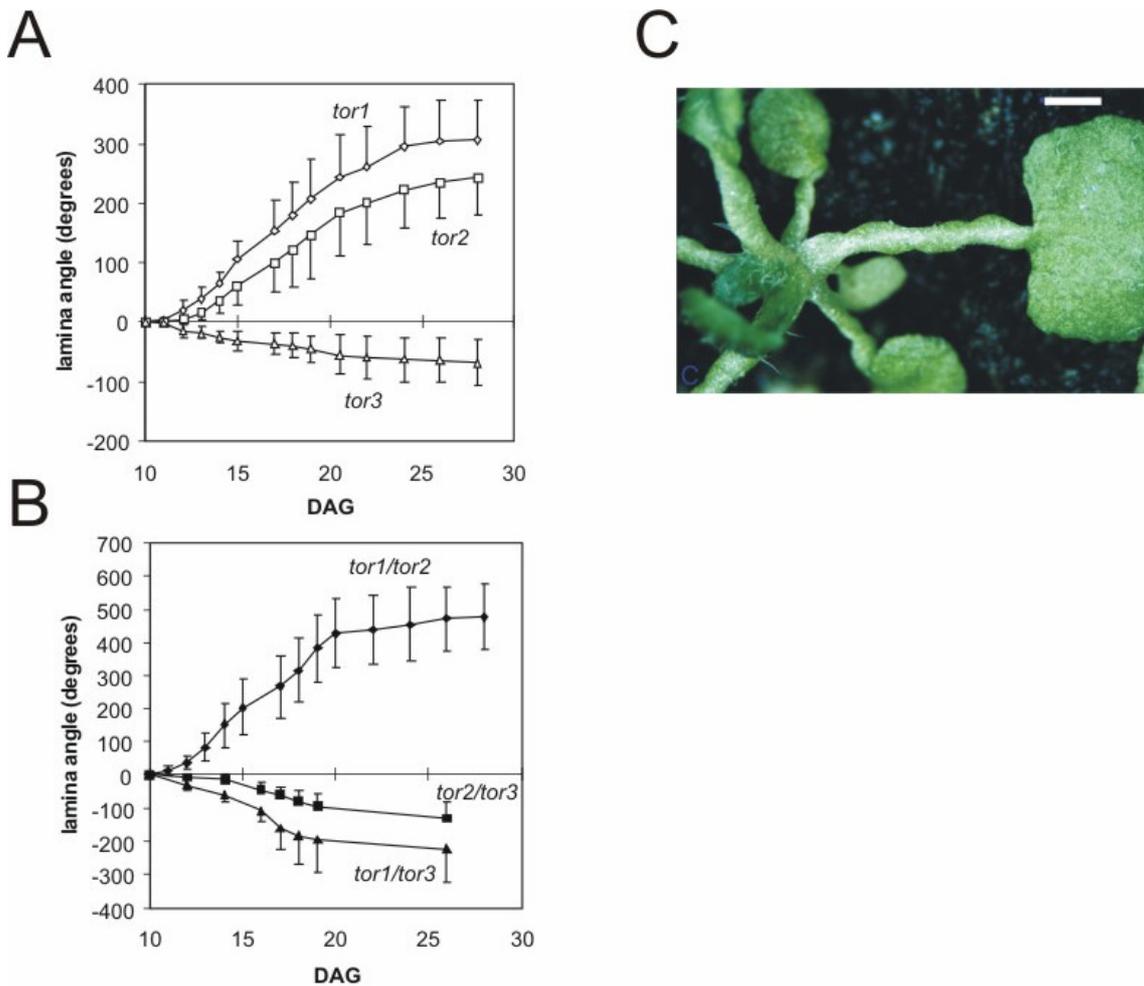


Abb. 4. Torsion der Petiolen der Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3* und der respektiven Doppelmutanten. Die zeitliche Entwicklung der Torsionen wurde erfasst durch Messung der Position der Primärblätter der einfachen Mutanten (A) und der Doppelmutanten (B). Vor Beginn des Streckungswachstums hatten alle Blätter eine horizontale Position. Die Horizontale wird mit 0° angegeben, eine volle Umdrehung des Blattes entspricht 360°. Rechtsgängige und linksgängige Drehungen werden mit positiven beziehungsweise negativen Zahlen angegeben. Blätter des Wildtyps zeigten keine signifikante Abweichung von der horizontalen Position. (A) *tor1* ◇, *tor2* □, *tor3* △. (B) *tor1/tor2* ◆, *tor2/tor3* ■, *tor1/tor3* ▲. DAG day after germination. (C) *tor1/tor2* Doppelmutante mit einer heftigen Verdrehung des Primärblattes (Balken 1 mm). (Messungen erfolgten durch C. Fabri. Die genetische Analyse der Doppelmutanten erfolgte durch M. Hauptmann.)

1.6 Ziele der Arbeit

Während des Streckungswachstums findet der eigentliche Massenzuwachs der Pflanzen statt. Bei der Zellstreckung nimmt die Zelle häufig eine Form ein, die ihrem terminalen Differenzierungszustand stark ähnelt. In einem Organ erfahren verschiedene Zelltypen meist gleichzeitig den Vorgang der Zellstreckung. Zellstreckung ist daher ein komplexer Prozess, der durch exogene Faktoren (z.B. Hormone) und endogene Faktoren (z.B. das Cytoskelett) reguliert werden muss. *tortifolia* (*tor*) Mutanten in *Arabidopsis* zeigen Störungen im Streckungswachstum, augenscheinlich durch eine kontinuierliche Torsion der Organe, und ermöglichen daher die Analyse der beteiligten Komponenten.

Zentrales Ziel der Arbeit war, die Ursachen für das helikale Wachstum in *tor* Mutanten von *Arabidopsis* aufzuklären. Zu diesem Zweck sollte die phänotypische Analyse der Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3* fortgesetzt werden. Angestrebt wurde die Klonierung des *TOR1* Gens, die Fortsetzung der Kartierung des *TOR2* Gens und gegebenenfalls seine Klonierung. Nach erfolgter Identifikation des *TOR1* Gens galt es, die Struktur des *TOR1* Gens zu beschreiben und die Mutationen in den verschiedenen *tor1* Allelen aufzudecken. Die Charakterisierung des *TOR1* Genproduktes erforderte eine eingehende Analyse der Sekundärstrukturen von *TOR1* und der Mitglieder der *TOR1* Proteinfamilie. Im Hinblick auf die Funktion beim Streckungswachstum war die Untersuchung der *TOR1* Genexpression auf Ebene der Organe und Gewebe geplant. Zur Aufklärung der zellbiologischen Funktion des *TOR1* Proteins wurde seine subzelluläre Lokalisierung angestrebt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 *Arabidopsis* Linien

Folgende Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. wurden verwendet: Landsberg *erecta* (Ler), Columbia (Col, von G. Redei persönlich erhalten), Enkheim 2 (En-2), Wassilewskija (Ws), S96 und C24. Es wurden die *tortifolia* (*tor*) Mutanten der Komplementationsgruppen 1 bis 4 und die Mutante 590501 verwendet (Tab. 1). Vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center können die Mutanten *tor1-1* (N378) und *tor1-5* (N258) bezogen werden.

Tabelle 1. *tortifolia* Mutanten in *Arabidopsis*

Allel	Synonym	Ökotyp	Mutagen	Erbgang	Chromosom	Referenz
<i>tor1-1</i>	F104	En-2	chemisch?	rezessiv	4	Bürger 1971
<i>tor1-2</i>	450401	Ler	EMS	rezessiv	4	diese Arbeit
<i>tor1-3</i>	500805	Ler	EMS	rezessiv	4	diese Arbeit
<i>tor1-4</i>	TL2 ^a	Ler	EMS	rezessiv	4	diese Arbeit
<i>tor1-5</i>	convoluta	S96	Röntgen-Strahlung	rezessiv	4	Relichová 1976
<i>tor1-6</i>	propellor ^b	Ler	EMS	rezessiv	4	diese Arbeit
<i>tor1-7</i>	CVC8	Ws	T-DNA	rezessiv	4	diese Arbeit
<i>tor1-8</i>	spiral2	Ler	schnelle Neutronen	rezessiv	4	Furutani et al. 2000
<i>tor2</i>	281105	Ler	EMS	unvollständig dominant	1	diese Arbeit
<i>tor3</i>	GJ1 ^c	Ler	EMS	unvollständig dominant	5	diese Arbeit
<i>tor4</i>	<i>tor4</i> ^d	Col	EMS	unvollständig dominant	?	diese Arbeit
Mutante 590501				siehe Ergebnisse/ Diskussion		

^a überlassen von T. Laux; ^b überlassen von I. Furner; ^c überlassen von G. Jürgens; ^d überlassen von R.B. McGrath. *tor4* wurde bei der Suche nach Taxol-hypersensitiven Mutanten gefunden.

2.1.2 Mikroorganismen

Die Tabelle 2 gibt Auskunft über die verwendeten *E. coli* Stämme. Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (pMP90) wurde für die Transformation von *Arabidopsis* verwendet.

Tabelle 2. Verwendete *E. coli* Stämme, deren Eigenschaften und Herkunft.

<i>E. coli</i> Stamm	Verwendung	Herkunft
SCS110	Defizient in Dam und Dcm Methylasen. Ermöglicht das Schneiden von Restriktionsstellen, welche durch Dam- und Dcm-Methylierung blockiert sind.	Stratagene
xl10Gold	Klonierungsarbeiten. Hohe Transformationseffizienz bei großen Vektoren. DNA-Vermehrung von großen pUC18-Derivaten erwies sich als effektiver im Vergleich zu DH5a.	Stratagene
DH5a	Klonierungsarbeiten, DNA-Vermehrung.	Aus dem Labor von A. R. Schäffner
NM554	Für Transfektion mit Phagenpartikeln. Zum Propagieren von Cosmiden.	Aus dem Labor von E. Grill
XL1Blue MR	Für Transfektion mit Phagenpartikeln. Zum Propagieren von Cosmiden.	Stratagene

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas
Cellulase "Onozuka R-10"	Serva
Klenow-Fragment Polymerase	MBI Fermentas
Macerozyme R-10	Serva
<i>PfuTurbo</i> [®]	Stratagene
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, MBI Fermentas
RNAse A, RNAse H	Roche
Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Gibco BRL Life Technologies
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Q-Biogene

2.1.4 BAC-Klone

TAMU- und IGF-BACs mit Insertionen genomischer Fragmente aus *Arabidopsis* (Ökotyp Columbia) wurden bezogen vom *Arabidopsis* Biological Resource Center der Ohio State University, Ohio, USA. TAMU-BACs verleihen *E. coli* Resistenz für Chloramphenicol, IGF-BACs für Kanamycin.

2.1.5 Vektoren

In der Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren dargestellt. Sie waren auch Ausgangspunkt für Klonierungsarbeiten.

Tabelle 3. Verwendete Vektoren und ihre wichtigsten Eigenschaften.

Vektor	Marker	Eigenschaften, Verwendung	Referenz
35S-sGFP(TYG)-nos (ein pUC18-Derivat)	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Expression über 35S-Promotor. Synthetisches GFP: DNA-Kodons optimiert, Schnittstellen für viele Restriktionsenzyme und kryptisches Intron entfernt; das Chromophor ist TYG (nativ ist SYG): 120x heller als originales GFP in Pflanzen. Mit 3' prozessierenden Sequenzen (nospA).	Chiu et al. 1996
35S-sGFP-MBD-nos (ein pUC18-Derivat)	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Die MBD aus MAP4 aus der Maus wurde an sGFP (TYG) gekoppelt. Das Fusionsprotein markiert pflanzliche MT. Vergleiche 35S-sGFP(TYG)-nos.	Marc et al. 1998
pBIC20 (siehe auch Abb. 5)	Tet ^R in <i>E. coli</i> , Kan ^R in <i>Agrobacterium</i> und Pflanzen.	Cosmid-Vektor. Kann aufgrund seiner <i>cos</i> -sites mit Verpackungsproteinen zu Phagenpartikeln verpackt werden und <i>E. coli</i> infizieren. Enthält T-DNA borders zur Pflanzentransformation. <i>Low copy</i> in <i>E. coli</i> .	Meyer et al. 1994
pBluescript (KS)+	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Zum Subklonieren von DNA-Fragmenten. <i>Blue/white screening</i> ist möglich.	Stratagene
pECFP-N1 und pEYFP-N1	Kan ^R in <i>E. coli</i>	Vektoren zur Erzeugung von Fusionsproteinen mit <i>enhanced</i> CFP oder <i>enhanced</i> YFP. Die Plasmide enthalten den Cytomegalovirus-Promotor zur Expression in tierischen Zellen. Beide fluoreszierenden Proteine sind in Pflanzenzellen funktionell.	Clontech
pGem [®] -T Easy	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Zum Klonieren von PCR Produkten. <i>Blue/white screening</i> ist möglich.	Promega
pGPTV-Kan	Kan ^R in <i>E. coli</i> , <i>Agrobacterium</i> und Pflanzen.	Binärer Vektor zur Pflanzentransformation mit den erforderlichen T-DNA borders. Der pflanzliche Selektionsmarker liegt bei der linken border-Sequenz. Enthält das GUS-Gen als Reporter. <i>Low copy</i> in <i>E. coli</i> .	Becker et al. 1992
pGUSpA-K (ein pBluescript-Derivat)	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Enthält die GUS kodierende Sequenz, gekoppelt an 3' prozessierende Sequenzen (nospA).	Konstrukt aus dem Labor A. R. Schäffner
pDsRed-Talin	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Die F-Aktin-Bindungsdomäne aus Talin ist an DsRed (Clontech) gekoppelt. Das Plasmid kann für die Markierung von F-Aktin in Protoplasten verwendet werden.	O.R. Patharkar, Massachusetts General Hospital, unveröffentlicht

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Cla-T1-xFPN	5 AGAGAATCGATCTCCAACAGTTCGACAAGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3
MAP4-TER-rev	5 ATGCGGCCGCACCTCATGCAGGAAAG 3
Not-TER-xFPN	5 TAGAGTCGCGGCCGCTTTACTTG 3
SpeCla-F	5 TCGACACTAGTGGGAAATCGATCTCCAACAGTTCGACAAGGC 3
SpeCla-R	5 CATGGCCTTGTCGAAGTGGAGATCGATTTCCACTAGTG 3
T1Sall_front	5 GAGAGCGGTGCGAGTTCGAGATTTAGAAATGAGCAC 3
T1-1R_Sall	5 CTGTCTGGTTCGACAATTATGAACAACAACGGTACTGAAG 3
TPBgIII-F	5 ACTTTGGAAGCTTAGATCTCGTCTTTCTTCTCC 3
TPBgIII-R	5 GGTGTGCCCATGGCTAAATCTCCGACGAGAG 3

2.1.6.2 Oligonukleotide des *TOR1* Gens und Umgebung

bacT5742-R	5 GACCGTCCGGTTGATGTTTCAG 3
bacT11203-R	5 CATTACCGTGCTTGAGACCTGC 3
bacT12604-R	5 CACCCGATTTTCCGCGACAAATGC 3
bacT13075-F	5 CACATTGGAGAGGCTTCCGAG 3
F104p-F	5 TGACAGAGGCGCTGCAGTCATG 3
F104p-R	5 TTCCTTTAGAAGCAGAGTCTGGTGAG 3
F21F11R/f	5 GCAGATGACTGGTTCATACCTCC 3
F21F11R/r	5 GCACAGAGGACTTCTGCGTAAG 3
F21F11R/f1	5 GTTGGTGACATTGATGCTGCTTAC 3
F21F11R/r1	5 GTTCACAAGCTCATGTTTACTTGTC 3
T1-1R	5 AATTATGAACAACAACGGTACTGAAG 3
T1-2R	5 TCCAGATGCTTTATTATCCCACC 3
T1-2R1	5 CTGCCATTACCCATGTGCTC 3
T1-3R	5 TCGAGTCCTGATTCTTCCTCATC 3
T1-4F	5 AGGACTGTTGAAGAAGAAAGCACC 3
T1-4F1	5 TCTCTCACCCAGACTCTGCTTC 3
T1-5R	5 AAAGCTTTTGGAAAGAAGTAACTGG 3
T1-6F	5 GGGTTTGTTCGTTAAGCCATTG 3
T1-7F	5 CTAGGTCATGTTCCAATTCCGG 3
T1-8F	5 GAGCAATTACTTTGATTCAGGTGG 3
T1-9R	5 TCTGTACACTTTCCCTAACAGG 3
T1-10F	5 CTGAGCATTGAAATGGCTGGATG 3
T1_2254	5 TCCATCAGCTTGATGACCAAGTG 3
T1-lead	5 ATCTAATCTCTCGTCGGAGATTTAG 3
T1SP1	5 GACTAGCAGCTGATTC 3
T1SP2	5 CCACCGCTAACGACGCTGAAC 3
T1SP3	5 CGCAGCCGTCGAATCGCAATG 3

2.1.6.3 Oligonukleotide für die Analyse genetischer Marker

2D3LE_CF	5 GTGAATAGTTAGCAAAGGTGACAAC 3
2D3LE_CR	5 GTTCAGCAGCGAGAAGTAGTATTTG 3
F24K12L/f	5 GTGTCATTGAAGATGAAGGACGAC 3
F24K12L/r	5 CTAATCTTCAGTGGTATGTGTAGAC 3
F16H17L/f	5 GGATCAGTCGTTATCCCGTACG 3
F16H17L/r	5 CACATATGTATTGTGACAGTTCTCG 3
F23K2L/f	5 CACATGTTCAATGTAACCCATGGAC 3
F23K2L/r	5 TTGATTTAGTGGAAGATGTCCGGC 3
LT1F	5 GACAATCTGCGTGACTCCGTTCCCG 3
LT1R	5 GGGTTTGGAGATATCTTACACCGCCG 3
LT2F	5 ATGAATCGATTAAGTTGATGCAGACG 3
LT2R	5 TTAGGTGATACCTTCCCTCTACCATC 3
LT4F	5 TACTTGCATCCTCCCAATC 3
LT4R	5 GACCGCGAAACAGCATTCTC 3

LT5F	5 AGATGCAACAATAAGATGTTGAGG 3
LT5R	5 GAGATCTGCGATGGTGAAATTG 3
LT7F	5 TGTCATGACTCATTACGTCACATC 3
LT7R	5 CTTTTGATACAAATCGAATCTGTACG 3
LT11F	5 ATAGTAAAAGATCCCATTGAGATCTC 3
LT11R	5 CTTCCAATTATTCAGTAGTACCCTC 3
LT15F	5 GAAAT GGCGATATGT CTCTCCGTTG 3
LT15R	5 ACCAGCGTGTATGTAAGCTATGAGG 3
m600T3	5 CACCCTGTGGCTCAAGGCACTC 3
m600T7	5 GGTTATCAAGTCAAGCCATG 3
mi106b-f2	5 TGACGAGCCACAACCTCCG 3
mi106b-r3	5 CAAACCAACTTGGTCCCATAC 3
nEATF	5 CTGCGTGAATGATATGTAAGTCTG 3
nEATR	5 ACCACTTAAACATACAACAACATG 3
O846A_F	5 ACTCACTTCCGCATCAAC 3
O846A_R	5 CAAGAAAAACGGGTGATAG 3
PG11F	5 CGCAACTAACCACACATTAC 3
PG11R2	5 GGTTTTGATTGATTACAGGGG 3
PT1F	5 ATATTCTAGTACTCGATCGCGAC 3
PT1R	5 TTGTATGTTCTAAAACACGTAGCG 3
PT2F1	5 CGAACACAACTAGACAAAGTACTTC 3
PT2R	5 TTGGCAGAGAGCTAAGTAGGTAAAG 3
PT3F	5 GCAGAGGAATCATGACAGG 3
PT3R	5 TTGGTATACTTGTTCCTTGCAAC 3
PT4F	5 CTTGTAGGTTGTGACATATGCTG 3
PT4R2	5 TCACACGACTCCGACTTG 3
PT13F2	5 ATGTTAGAGAATTCATTTACGTATTGC 3
PT13R1	5 CAACTTTCTCAGAAAACTTGAGTG 3
PT14-NIaIV	5 GATCGATCGATAAAAAGCAAGGTCC 3
PT14R1	5 TGGTTCGTCTCTTGACAAATC 3
PT15F	5 GGTGGTAATGGTATGTGTTACTTAAG 3
PT15R	5 CCATGTTGATGAGTCATTCATTATGC 3
yUP3E9LE_F	5 GGCTCGGTCTACTGAAATATATG 3
yUP3E9LE_R	5 GCTCTAGTTTCTGTTAATGTTC 3

2.1.6.4 Weitere Oligonukleotide

35S(-344)F	5 AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG 3
35S(-81)R	5 GAAGACGTGGTTGGAACGTCTTC 3
pBIC20cs-L	5 AAGTCCTTTCTGAGCTCGTCGG 3
pBIC20cs-R	5 TAAGCCTCTCTAACCATCTGTGG 3
TUA4-F1	5 CTTCCCTGGAAATCTAGTTTCTTTC 3
TUA4-R1	5 GATAATAGAGAGATAACATGGCTACG 3

2.1.7 Chemikalien

Standard-Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysi* und wurden von den Firmen Merck, Serva, Fluka oder Sigma bezogen. Oryzalin wurde von der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH (Deutschland) bezogen. Silvet L-77 ist eine freundliche Gabe von Csaba Koncz, MPI für Züchtungsforschung (Köln). Das Detergenz kann jedoch bei Lehle Seeds (Round Rock, Texas, USA) gekauft werden.

2.1.8 Medien und Lösungen

Die Zubereitung der üblichen Medien und Lösungen kann dem Laborhandbuch *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. 1987) entnommen werden. Spezielle Medien und Lösungen finden sich im Teil Methoden.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit lebendem Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht der *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte bei 20–25 °C und 50 % Luftfeuchte in der Pflanzenkammer. Die normale Beleuchtungsstärke betrug 180-230 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ bei einem Tag-Nachtrhythmus von 16:8 h. Für Erdkulturen wurde gedüngte Einheitserde gemischt mit Kies in einem Verhältnis von 3:1 verwendet. Nach der Aussaat der Samen auf feuchte Erde wurden die Keimungshemmung von *Arabidopsis* durch Vernalisation überwunden: Die quellenden Samen wurden für mindestens zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Die Ernte der Samen von *Arabidopsis* erfolgte möglichst nach vollständigem Abblühen der weiterhin gegossenen Pflanzen. Die Samen sollten für eine maximale Keimfähigkeit getrocknet werden; für eine baldige Aussaat sollten die Samen für mindestens eine Woche in den Exsikkator kommen. Lediglich der Ökotyp Enkheim zeigte unter den oben genannten Bedingungen gelegentlich geringe Keimungsraten.

2.2.1.2 Einfache Anzucht von *Arabidopsis* auf agarhaltigem MS-Medium

Für die Anzucht auf MS-Medium wurden sterilisierte Samen verwendet. Die Anzucht von großen Pflanzenmengen, wie z.B. bei der Selektion transgener Pflanzen, erfolgte in Petrischalen. Petrischalen wurden für die Kultur mit Laborfilm (Parafilm „M“, American National Can™) abgedichtet. Wegen des unausgeglichene Mikroklimas in Petrischalen wurden größere Kulturgefäße, meist Weckgläser, bei längerer Dauer der Kultur bevorzugt. Einfaches MS-Medium enthielt 4,2 g/l Murashige and Skoog Salze inklusive Vitaminen (M-5519, Sigma), 1,5 % Saccharose und 0,8 % Phytagar (Gibco BRL Life Technologies). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 5,8 eingestellt (mit 1 M NaOH). Nach Vernalisation der Samen erfolgte die Kultur der Pflanzen in der Pflanzenkammer unter den

dort herrschenden Bedingungen. Transgene Pflanzen wurden auf MS-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) angezogen. Kanamycin wurde in das flüssige, agarhaltige Medium bei einer Temperatur von 60 °C zugefügt.

2.2.1.3 Anzucht auf hochprozentigen Agar-Platten und Etiolierung von *Arabidopsis*

Um das Wachstum der Wurzeln der *tor* Mutanten analysieren zu können, wurden die Mutanten auf schräg aufgestellten, hochprozentigen Agar-Platten angezogen. Die Methode ähnelt weitgehend der Methode von Okada und Shimura (1990). In quadratische Petrischalen wurde sogenanntes GM-Medium gegossen: 2,15 g/l MS-Salze ohne Vitamine (M-5524, Sigma), 1,5 % Saccharose und 1,5 % Phytagar (pH-Wert 5,8). Die Agar-Platten wurden nach Bestückung mit sterilisierten Samen mit Laborfilm abgedichtet und für mehrere Tage bei 4 °C inkubiert (um gleichzeitige Keimung zu erzielen; der Vorgang ist vergleichbar mit der Stratifikation von Samen). Die Agar-Platten wurden danach in die Pflanzenkammer übertragen und unter den dortigen Bedingungen für drei Tage senkrecht (90°) und direkt nebeneinander stehend inkubiert. Die Agar-Platten wurden anschließend nach hinten gekippt: Die Pflanzen wuchsen fortan auf gekippten Oberflächen (bei einem Winkel von etwa 60°) für weitere sechs Tage. Anschließend wurden die Pflanzen fotografiert. Die Kultur von *Arabidopsis* Pflanzen mit dem Ziel der Etiolierung erfolgte unter gleichartigen Bedingungen mit dem Unterschied, dass die Agar-Platten vor der Überführung in die Pflanzenkammer mit lichtundurchlässiger Alufolie umwickelt worden waren. Da die Keimung von *Arabidopsis* (nach der Quellung der Samen) mindestens einen kurzen Lichtpuls erfordert, sollte die 4 °C-Inkubation für die Etiolierung nicht bei völliger Verdunkelung erfolgen.

2.2.1.4 Sterilisation der Samen von *Arabidopsis*

Zur Anzucht von *Arabidopsis* auf MS-Medium müssen sterilisierte Samen verwendet werden. Die Sterilisation erfolgte in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen oder in 15 bis 50 ml Falcon-Röhrchen. Zuerst werden die Samen im Gefäß mit Wasser befeuchtet und durch Schütteln leicht gewaschen. Dafür wurde dem Wasser ein Tropfen Spülmittel (Pril, Henkel) zugefügt. Nachdem man die Samen sedimentieren ließ, wurde das Wasser mit der Pipette abgezogen. Nun wurde 70 % Ethanol hinzugefügt. Das geschlossene Gefäß wurde dann für 5 min auf dem Schüttler bewegt. Fortan wurde das Gefäß mit den zu sterilisierenden Samen nur noch unter der laufenden Sterilbank geöffnet. Der Alkohol wurde nun durch 33 % Klorix (DanKlorix Hygienereiniger, Colgate-Palmolive GmbH) ersetzt und das Gefäß für 10 min auf dem Schüttler bewegt. Danach wurden die Samen mit autoklaviertem Wasser mindestens dreimal gewaschen. Sie konnten nun direkt auf MS-Medium übertragen werden. Schließlich konnten die Samen auch in sterilem 0,1 % Phytagar (Gibco BRL, Life Technologies)

aufgenommen werden. Da die Samen in 0,1 % Phytagar nicht sedimentieren, können sie nun mit der Pipette einzeln auf Agar-Medium gegeben werden.

2.2.1.5 Arbeiten mit Mutanten in *Arabidopsis*

Alle für phänotypische Analysen verwendete *Arabidopsis* Mutanten wurden, um eventuell vorhandene zusätzliche Mutationen zu verlieren, mehrfach in ihren Ursprungs-Ökotyp rückgekreuzt. In den Folgegenerationen (F2 oder später) wurden reinerbig mutante Individuen identifiziert und weitergeführt. Um Komplementationsgruppen zu bestimmen, wurden die reinerbigen Mutanten miteinander gekreuzt und die Segregation der Phänotypen bis zur F2- oder F3-Population verfolgt.

Die Kartierung der *TOR* Loci erfolgte mit Hilfe der Rückkreuzungsmethode. Nach Kreuzung der Mutante mit einer Wildtyp-Pflanze eines anderen Ökotypen-Hintergrundes und Selbstung der resultierenden F1, entstehen (in den Folgegenerationen) aufgrund von Rekombination Individuen, die genetische Mosaik bezüglichen der elterlichen Ökotypen darstellen. Die Durchmischung des genetischen Hintergrundes hat zwei Gründe: Vermischung der elterlichen Chromosomen (zwischen den Chromosomen eines haploiden Satzes besteht keine genetische Kopplung) und *crossing over* der homologen Chromosomen bei der Gametenbildung (bedingte genetische Kopplung zweier Orte auf einem Chromosom). Selektiert man in den Folgegenerationen Individuen, welche die Mutation tragen, können diese zur Genlokalisierung verwendet werden. Dieses erfolgt mit Hilfe genetischer Marker, welche DNA der beiden elterlichen Ökotypen unterscheiden können. Durch Abtasten des Genoms der mutanten Individuen mit diesen Markern wird nach Regionen gesucht, welche an die Mutation gekoppelt sind und deshalb eine geringe Austauschfrequenz zeigen. Je strikter die Kopplung eines genetischen Markers an die Mutation, desto näher liegt er dem Mutationsort. Deshalb wird man bevorzugt DNA des Ökotyps jenes Elters, welcher die Mutation trug, in der Nähe der Mutation antreffen. Die unterschiedliche genetische Konstitution zweier Ökotypen an einem Ort (Allel) wird auch als Polymorphismus bezeichnet.

Entsprechende Arbeiten zur Genlokalisierung wurden mit Hilfe von homozygot-mutanten F2- oder F3-Individuen durchgeführt. Homozygot mutante Individuen konnten im Falle der *tor* Mutanten allein aufgrund ihres ausgeprägten Phänotyps isoliert werden. Es ist wichtig, zur Kartierung verwendete Linien über weitere Generationen auf die Segregation der Phänotypen zu überprüfen. Es wurde darauf geachtet, dass auch in der F3-Generation keine Individuen mit Wildtyp-Phänotyp auftreten. DNA-Isolierungen aus zur Kartierung verwendeten Linien erfolgte grundsätzlich in der F2-Generation, aber in vielen Fällen auch aus Pflanzen der F3-Generation. Im letzteren Fall wurden immer Gewebe von mindestens zehn F3-Individuen in einer Probe extrahiert.

Als genetische Maßeinheit für die Entfernung auf Chromosomen wird die „Morgan-Einheit“ oder das „Centi-Morgan“ (cM) verwendet. 1 cM entspricht einer Austauschfrequenz von 1 %; sie liegt dann vor, wenn bei der Bildung von 100 Gameten durch *crossing over* ein einziger Austausch zustande kommt. Eine Distanz von 1 cM entspricht in vielen Arten einer physikalischen Entfernung von etwa 10^6 Basenpaaren. Die in *Arabidopsis* beobachtete Rekombinationshäufigkeit ist jedoch etwas größer, hier entspricht 1 cM etwa 2×10^5 Basenpaaren. Chromosomen von *Arabidopsis* zeigen pro Meiose durchschnittlich 1-2 *crossing over*.

2.2.1.6 Erzeugung von *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten

Für die Protoplastierung wurden etwa 20 Tage alte *Arabidopsis* Pflanzen vom Ökotyp Ler verwendet. Die Pflanzen wurden auf Erde in der Pflanzenkammer angezogen. Sie wurden zusätzlich mit einer klaren Plastikhaube abgedeckt, um lokal die Luftfeuchte zu erhöhen. Eingesetzt wurden alle entfalteten Blätter ohne Kotyledonen und Primärblätter. Diese wurden mit frischen Rasierklingen in feine, etwa 1 mm breite Streifen geschnitten. Diese Blattstreifen wurden nun in eine Cellulase/Macerozyme-Lösung überführt. Für etwa 40 Blätter wurden 10 ml Enzymlösung verwendet. Dieses ergab Material für deutlich mehr als 25 unabhängige Transformationen. Pro Transformationsansatz wurden $1-2 \times 10^4$ Protoplasten verwendet (siehe unten). Zur Infiltration des Blattgewebes mit Cellulase/Macerozyme-Lösung wurde nun 3x für 3 min Vakuum angelegt. Dieses erfolgte mit Hilfe eines Erlenmeierkolbens mit Saugstutzen. Der Verdau der Zellwand wurde danach für 100 min bei leichter Bewegung auf dem Schüttler (40 rpm) fortgesetzt. Die Enzymlösung zeigte nach dieser Zeit eine blassgrünliche Verfärbung, welche von freigewordenen Protoplasten herrührte. Abschließend wird die Suspension aus Gewebe und Enzymlösung vorsichtig für 1 min bei etwa 80 rpm geschüttelt, um weitere Protoplasten aus dem Gewebe zu entlassen. Im Mikroskop werden die Protoplasten nun als etwa 30 bis 50 μm große, abgerundete und mit Chloroplasten angefüllte Kugeln sichtbar. Alle weiteren Arbeiten mit den nackten Protoplasten sollten sehr schonend durchgeführt werden.

Die Protoplastensuspension wurde nun mit einem 71 μm Nylonnetz filtriert und bei 100 g für 2 min in Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden pelletiert. Dafür wurde die *swing-out* Hettich-Zentrifuge Typ Rotanta/TR (680 rpm, Rotorradius 194 mm) verwendet. Die Protoplasten wurden nun in 4 °C kalter W5 Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und nun in einer Konzentration von 2×10^5 in kalter W5 Lösung aufgenommen. Zählungen der Protoplasten erfolgten mit Hilfe einer Blutkörperchenzählkammer der Firma Türk am Mikroskop. Die Protoplasten wurden nun für mindestens 30 min in W5 Lösung auf Eis inkubiert. Eine längere Inkubation auf Eis (über 2 h) ist allerdings möglich und erschien keine Herabsetzung der Vitalität der Protoplasten mit sich zu bringen. Für eine Transformation mit

PEG wurden die Protoplasten erneut zentrifugiert und bei gleicher Konzentration (2×10^5) in ungekühlter MMg Lösung aufgenommen.

Enzymlösung:

- 1-1,5 % Cellulase R10
- 0,2-0,4 % Macerozyme R10
- 0,4 M Mannitol
- 20 mM KCl
- 20 mM MES, pH 5,7

Diese Lösung wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert (um die Enzyme zu lösen und Proteasen zu inaktivieren). Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurden hinzugefügt:

- 10 mM CaCl_2
- 5 mM β -Mercaptoethanol (optional)
- 0,1 % BSA (Sigma A-6793)

Die Enzymlösung wurde nun mit Hilfe eines 0,45 μm Filters geklärt und hatte danach eine hellbraune Farbe.

W5 Lösung:

- 154 mM NaCl
- 125 mM CaCl_2
- 5 mM KCl
- 2 mM MES (pH 5,7)

2.2.1.7 Transiente Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten mit PEG

Alle Schritte zur Protoplastentransformation werden bei RT (23 °C) durchgeführt. In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden in 20 μl Volumen 24 μg DNA des zu transformierenden Plasmids gegeben. In jedem Fall sollten zwischen 20 und 40 μg DNA eingesetzt werden. Nun wurden 200 μl Protoplasten in MMg Lösung hinzugefügt (4×10^4 Zellen) und gut aber vorsichtig gemischt. Jetzt wurden 220 μl PEG/ Ca^{2+} Lösung hinzugegeben und gemischt. Diese Mischung wird nun für etwa 20 min bei RT inkubiert. Die drei Lösungen müssen in der oben beschriebenen Reihenfolge zusammengeführt werden, auch sollten nicht mehr als 8 Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Schließlich wurden 0,8 ml W5 Lösung hinzugegeben, die Proben gemischt und bei 100g für 2 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde nun abgezogen und die Protoplasten in 100 μl W5 Lösung resuspendiert. Diese 100 μl Protoplastensuspension wurden danach in 1 ml W5 (inklusive 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) in Gewebe-Kultur-Platten (Falcon 3046) überführt und bei RT ohne Licht ÜN inkubiert. Die Gewebe-Kultur-Platten waren zuvor mit 5 % Kalbsserum für 1 s beschichtet worden, um ein

Verkleben der Protoplasten mit der Plastikoberfläche zu verhindern. Am nächsten Tag (nach 12 h) wurden die Protoplasten im Mikroskop untersucht. Die Effizienz der Transformation mit PEG sollte bei 50 bis 90 % liegen.

PEG/Ca²⁺ Lösung (40 % PEG, w/v):

4 g PEG 4000 (Fluka, Kat. No. 81240)

3 ml H₂O

2,5 ml 0,8 M Mannitol

1 ml 1M CaCl₂

MMg Lösung:

0,4 M Mannitol

15 mM MgCl₂

4 mM MES (pH 5,7)

2.2.2 Arbeiten mit Mikroorganismen

2.2.2.1 Routinearbeiten mit *E. coli*

Für die routinemäßige Vermehrung von Plasmiden, Cosmiden oder BACs in *E. coli* wurde nur LB Medium verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C ÜN in flüssigem Medium oder auf 1 % Agar-Platten. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Kanamycin 50 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 25µg/ml. Glycerinkulturen von *E. coli* enthielten 15 % Glycerol und wurden bei -80 °C aufbewahrt. Cosmid-Bänke in *E. coli* wurden in Mikrotiterplatten im 96-er Format bei 37 °C in ca. 24 h herangezogen. Das Kulturvolumen betrug dabei 100 bis 150 µl. Die Transformation von *E. coli* mit Vektoren (mit Ausnahme der Cosmide) erfolgte mit RbCl-kompetenten Zellen (http://www.neb.com/neb/faqs/dam_dcm/transformation.html).

2.2.2.2 Die Transfektion von *E. coli* mit in Phagenpartikeln verpackten Cosmiden

Für Experimente zur Komplementation von *tor1* Pflanzen wurden Fragmente aus *Arabidopsis*-BACs in der Größe von 12-22 kb in den Cosmid-Vector pBIC20 ligiert. Für die Verwendung des Vektors pBIC20 (Abb. 5; Meyer et al. 1994) gab es mehrere Gründe: a) pBIC20 kann in *E. coli* und *Agrobacterium* propagiert werden. Er trägt außerdem eine T-DNA und ermöglicht somit eine effiziente Transformation von Pflanzen. b) Da es sich bei pBIC20 um einen Cosmid-Vector handelt, kann die Effizienz von Ligation und Transformation durch die Verwendung von Verpackungsproteinen aus Phagen sehr gesteigert werden.

Der Cosmid-Vector pBIC20 trägt eine T-DNA, auf welchem sich ein Gen für Kanamycin-Resistenz in Pflanzen und *Agrobacterium* befindet (50 µg/ml). Außerdem enthält

die T-DNA das *GUS*-Gen aus *E. coli* (Jefferson 1987), welches unter der Kontrolle des 35S-CaMV Promotors steht (für konstitutive Expression). Das *GUS*-Gen ist direkt neben der linken *border* gelegen. Dieses ermöglichte nach der Transformation von Pflanzen die Überprüfung der Übertragung der T-DNA auf Vollständigkeit. Die T-DNA von pBIC20 enthält nur eine *HindIII*-Klonierungsstelle für zu übertragende DNA. Die Oligonukleotide pBIC20cs-L und pBIC20cs-R hybridisieren unmittelbar links beziehungsweise rechts der Klonierungsstelle. Sie können verwendet werden, um die Identität inserierter Sequenzen zu bestimmen.

Der pBIC20 Vektor wurde in *E. coli* unter Verwendung von Tetracyclin (10 µg/ml) propagiert. Der Vektor hat eine Größe von etwa 28,5 kb. Da die Verpackungsproteine des Phagensystems Cosmide nur bis zu einer Gesamtgröße von etwas über 50,0 kb verpacken, können ausschließlich Fragmente von 10-25 kb Größe in den Vektor ligiert und auf diese Weise auf *E. coli* übertragen werden. Verwendet wurden die rekombinasedefizienten *E. coli* Stämme NM554 oder XL-1Blue MR. Vektor-DNA aus NM554 muss gut aufgereinigt werden (Minipräparation mit Phenolextraktion). Laut Empfehlung der Firma Stratagene sollten bei der Transfektion von Cosmiden mit Hilfe des Phagensystems nur *E. coli* Stämme verwendet werden, die keinen Fertilisations-Faktor (*F-factor*) tragen.

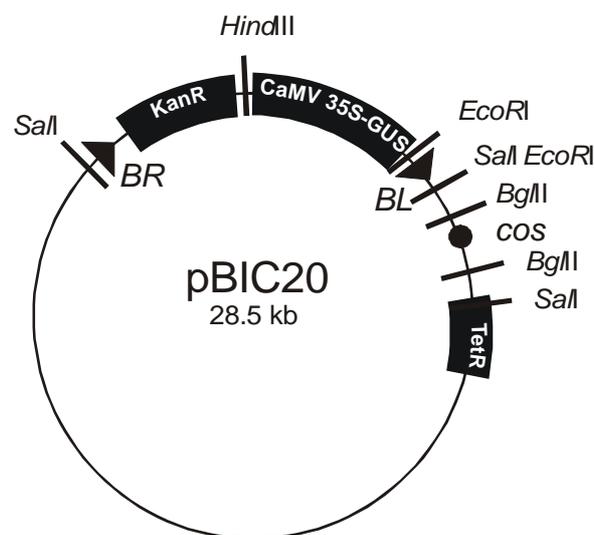


Abb. 5. Karte des pBIC20 Cosmids. *BR*, *BL* T-DNA *border* rechts und links.

Für die Ligationen wurden DNA-Fragmente partiell *HindIII*-verdauter BACs (12-22 kb) aus einem präparativen Gel ausgeschnitten, elektroeluiert und gereinigt. Es folgte die Ligation mit *HindIII*-verdautem und dephosphoryliertem pBIC20. In der Ligation herrschte eine hohe Konzentration von DNA, damit bevorzugt Konkatomere aus Cosmid-DNA und BAC-DNA entstehen, welche (mittels der *cos-sites*) effizient von Verpackungsproteinen verpackt

werden können: etwa 100 ng Insert/350 ng Cosmid in einem totalen Volumen von 2,5 µl bei Anwesenheit von 0,5 u Ligase.

Nach der Ligation erfolgte die Verpackung der DNA. Verwendet wurden die Verpackungsproteine des Gigapack[®] III Gold Packaging Extract von Stratagene. Für die Verpackung wurden 1,0–1,5 µl aus der Ligation vorsichtig mit 12,5 µl Extrakt gemischt und 2 h bei RT inkubiert (nicht länger!). Nun wurden 50 µl SM-Puffer und 2 µl Chloroform hinzugegeben, vorsichtig gemischt und das Ganze bei 13000 rpm für ca. 15 sec zentrifugiert, um unlöslich gewordene Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand ist für längere Zeit haltbar (ca. 1 Monat bei 4 °C). Vom Überstand wurden nicht mehr als 10 µl zu 200 µl präparierten NM554 (oder XL1-Blue) Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz nun bei 37 °C für 20 min inkubiert (Transfektion). Nun erfolgte nach Zugabe von ca. 1 ml LB (ohne Antibiotika) die phänotypische Expression der Resistenz in 1 h bei 37 °C und Schütteln. Die Selektion erfolgte über Nacht auf Agar-Platten (10 µg/ml Tetracyclin).

Die Effizienz der Transfektion lag bei 5×10^3 Kolonien/µg Vektor. Cosmid-DNA aus resistenten Klonen (Minipräparation) wurde mit der DNA des ursprünglichen BACs mit Hilfe von Restriktionsverdau verglichen. Schließlich wurde mit „colony-PCR“ nach den gewünschten Cosmiden-Klonen, welche in Mikrotiterplatten übertragen worden waren, gesucht.

SM-Puffer (pro Liter):

- 5,8 g NaCl
- 2,0 g MgSO₄·7H₂O
- 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
- 5,0 ml 2% Gelatine (w/v)
- (autoklavieren)

Für das Präparieren von *E. coli* zur Transfektion mit verpackten Cosmiden wurden 50 ml LB (enthaltend 10 mM MgSO₄ und 0,2 % Maltose; wurde nach dem Autoklavieren hinzugefügt) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm in ca. 4–8 h bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 herangezogen (NM554 zeigte eine Verdopplungszeit von 45 min). Die Zellen wurden dann bei 500g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun vorsichtig in sterilem 10 mM MgSO₄ aufgenommen (mit etwa der Hälfte des Volumens der Kultur) und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Die Zellen sollten sofort verwendet werden: Jetzt erfolgte das Hinzufügen des Überstandes aus der Verpackungsreaktion (Transfektion, siehe oben).

2.2.2.3 Kultur und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für alle Arbeiten wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (pMP90) verwendet. Er wurde bei 28 °C in LB-Flüssigmedium (240 rpm) oder auf 1 % LB-Agar-Platten kultiviert. Auf Agar-Platten wurden Kolonien nach ca. 48 h sichtbar. Allen Medien wurden 100 µg/ml Rifampicin in Methanol und 25 µg/ml Gentamicin zugefügt.

Die Übertragung von Plasmiden und Cosmiden auf *Agrobacterium* erfolgte über Elektroporation. Für eine effiziente Elektroporation müssen die Bakterienzellen in großer Dichte in möglichst ionenfreiem Wasser vorliegen. Für das Waschen der Bakterien nach der Anzucht wurde daher ausschließlich bidest. Wasser aus Glasflaschen verwendet, welche nicht dem allgemeinen Spülkreislauf eines Labors entstammten und daher auch keinen Kontakt mit ionischen Detergenzien hatten. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde zunächst eine 4 ml Übernachtkultur angeimpft. Diese diente am nächsten Morgen zum Animpfen einer 300 ml Kultur (1:100). Nachdem die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht hatten, wurden sie im Eiswasserbad für 30 min auf 0 °C abgekühlt und nach Aufteilen auf zwei Zentrifugenbecher durch Zentrifugation geerntet (4000 rpm bei 4 °C für 20 min in der Sorvall-Zentrifuge, Rotor GSA). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Bakterien vorsichtig in eisgekühltem, bidest. Wasser (ca. 125 ml je Zentrifugenbecher) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Diese Zentrifugation und anschließende Inkubation in einem großen Volumen Wasser wurden nun zweimal wiederholt. Abschließend wurde noch einmal wie oben zentrifugiert, das Pellet jedoch nun in 1 ml eisgekühltem bidest. Wasser aufgenommen, in 100 µl Portionen aliquotiert (unter Verwendung vorgekühlter Eppendorf-Reaktionsgefäße) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C. Alternativ kann auch eine 15 % (v/v) Glycerin-Lösung für die Aliquotierung/Lagerung verwendet werden (Erhöhung der Transformationsrate).

Für die Elektroporation von *Agrobacterium* wurde die Elektroporationsapparatur Gene Pulser™ von Bio-Rad verwendet. Der Gerätewiderstand wurde auf 200 Ω eingestellt, die Kapazität des Kondensators betrug 25 µF. Verwendet wurden Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm. Die Höhe des Spannungspulses betrug 2,48 kV (dieses entspricht der für die Elektroporation von *E. coli* üblichen Feldstärke, nämlich etwa 12,5 kV/cm). Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 1 ml eisgekühltem bidest. Wasser resuspendiert und anschließend in der Tischzentrifuge pelletiert (4.600 rpm bei 4 °C und 10 min). Das Pellet wurde in 70-80 µl eiskaltem, frischen bidest. Wasser resuspendiert. 40 µl dieser Suspension wurden mit 0,5 bis 1,5 µl der zu transformierenden DNA gemischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Sofort wurde die Küvette in die Elektroporationskammer gestellt und der Puls gegeben. Nach Ende des Pulses wurden schnell 2 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben. Die gesamte Suspension wurde abgesaugt und in einem Kulturgefäß für 1 h bei 30 °C im Wasserbad inkubiert

(phänotypische Expression der Resistenz). Die Zellen wurden danach in der Zentrifuge aufkonzentriert und auf selektivem Medium ausplattiert (50 µg/ml Kanamycin für pBIC20- und pGPTV-Kan-Derivate). Die bei der Elektroporation von *Agrobacterium* beobachtete Zeitkonstante lag um 4,0 ms.

2.2.2.4 Transformation von *Arabidopsis* mit *Agrobacterium tumefaciens*

Transformationen von *Arabidopsis* erfolgten nach dem *floral dip* Protokoll (Clough and Bent 1998). Der einen Vektor mit zu übertragender T-DNA enthaltende *Agrobacterium* Klon wurde aus einer ÜN-Kultur 1:100 in eine 200 ml Kultur überimpft. Nach 18 bis 24 h Wachstum der 200 ml Kultur (die Kultur erreichte dabei die stationäre Phase) wurde sie durch Zentrifugation für 20 min bei 5500 g und RT geerntet und das Pellet in einer 5 % Saccharose-Lösung aufgenommen. Nachdem die Bakterien-Suspension mit der Saccharose-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt worden war, wurde Silwet L-77 für eine Endkonzentration von 0,05% hinzugefügt und das Ganze gemischt.

In diese *Agrobacterium* Suspension wurden nun die Infloreszenzen der zu transformierenden *Arabidopsis* Pflanzen getaucht und darin bei leichter Bewegung etwa 10 s belassen. Dann wurden die Pflanzen aus der Suspension herausgenommen und die Blüten gegebenenfalls etwas entwirrt und abgetrocknet. Die Pflanzen müssen nun für mindestens 24 h bei erhöhter Luftfeuchte (um 100 %) und bei nur schwacher Beleuchtung kultiviert werden. Danach können sie unter normalen Bedingungen im Pflanzenraum gehalten werden. Der Vorgang des Eintauchens in die *Agrobacterium* Suspension kann zur Erhöhung der Transformationseffizienz zwei- bis dreimal wiederholt werden, allerdings darf dieses nicht in Abständen von weniger als jeweils 5 Tagen geschehen. Schließlich lässt man die Pflanzen normal ausreifen und erntet die Samen.

Für die Transformation sollten nur Pflanzen verwendet werden, welche junge und kräftige Blütenstiele von nicht mehr als 20 cm Höhe tragen. Damit ausreichend viele Blüten vorhanden sind, können die ersten schießenden Infloreszenzen zurückgeschnitten und die Pflanzen anschließend gedüngt werden. Vor dem Eintauchen in die *Agrobacterium* Suspension können sich bereits entwickelnde Samenschoten entfernt werden. In der Regel wurden Transformationsraten von etwa 0,05 % erreicht.

2.2.3 Die Isolation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Die folgende, schnelle Methode lieferte genomische DNA von geringer Sauberkeit und Menge (sogenannte „CTABs“). DNA aus diesen Präparationen wurde insbesondere für PCR zur Markeranalyse eingesetzt. Dafür wurden Blätter, Stengel oder Blüten von weniger als 100 mg verwendet. Die Gewebe wurden im Eppendorfreaktionsgefäß mit Hilfe einer zuvor

unter Hitze umgeformten, rotierenden Pipettenspitze bei Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Dann wurden 400 µl Carlson-Lysis-Puffer (65 °C) hinzugefügt und die auftauende Probe mit der rotierenden Pipettenspitze homogenisiert. Nach kräftigem Vortexen wurde die Probe 10–60 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurde 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt, gevortext und nun 5 min bei = 13000 rpm zentrifugiert. Die Extraktion der wässrigen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol wurde so oft wiederholt bis keine Interphase mehr entstand. Der resultierende Überstand wurde schließlich nach Zugabe von drei Vol Ethanol (abs.) für mindestens 15 min auf Eis gefällt. Nun wurde die Probe für 15 min bei = 13000 rpm und 4 °C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und schließlich in 100 µl TE mit RNase A (20 µg/ml) aufgenommen. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C zum Verdau der RNA. Die DNA wurde dann bei –20 °C gelagert.

Größere Mengen genomischer DNA von hoher Reinheit wurden durch Erweiterung der obigen Methode gewonnen. Es wurden bis zu 4,0 g Pflanzenmaterial im Mörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Die verwendete Menge Carlson-Lysis-Puffer betrug dann 20 ml. Die Extraktion der wässrigen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erfolgte mit Hilfe des GSA-Rotors in der Sorvall-Zentrifuge bei Verwendung von 50 ml Falcon-Röhrchen in Einsätzen (10 min bei 6000 rpm). Anschließend wurde die genomische DNA für 15 min bei RT nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol gefällt. Nun folgte eine 30-minütige Zentrifugation im GSA-Rotor bei 4 °C und 7000 rpm. Das entstandene Pellet wurde kurz getrocknet und in 4 ml ¼ TE mit RNase A (40 µg/ml) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 5 M NaCl wurde die Lösung zum Verdau der RNA für 30 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 1,7 ml H₂O und 3,3 ml Puffer QBT hinzugefügt und die Probe auf eine mit Puffer QBT equilibrierte Qiagensäule (QIAGEN-tip 100) aufgetragen. Die Säule wurde danach zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die DNA anschließend mit 5 bis 10 ml Puffer QF eluiert. Nun erfolgte eine erneute Fällung der DNA durch Hinzugabe von 0,7 Vol Isopropanol. Die Probe wurde anschließend im SS34-Rotor bei 4 °C und = 15000 g für 30 min zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol wurde die DNA in 400 µl ¼ TE aufgenommen und eingefroren.

Carlson-Lysis-Puffer:

100 mM Tris

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

2 % CTAB

1 % PEG 2000, (pH 9,1)

0,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol (wurden erst vor Arbeitsbeginn hinzugefügt)

2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von *high-copy* Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung unterschiedlicher Kits zur Plasmid Präparation (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Isolierung von BAC- oder Cosmid-DNA erfolgte ebenfalls unter Verwendung des Qiagen-Systems, wurde allerdings um einen Reinigungsschritt erweitert. Eine typische DNA-Isolierung von BACs oder Cosmiden wurde wie folgt durchgeführt:

Eine 250 ml Kultur wurde mit etwa 2 ml einer Starterkultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm ÜN geschüttelt. Die Kultur wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C im GSA Rotor (Sorvall) geerntet. Das Zell-Pellet wurde in 15 ml P1-Lösung (mit RNase A, 100 mg/l) vollständig resuspendiert. Nach Hinzufügen von 15 ml Lösung P2 wurde 4-5 mal kurz gemischt und die Mischung für nicht länger als 5 min bei RT stehen gelassen. Nun wurden 15 ml eiskalte Lösung P3 hinzugefügt, kurz gemischt (nicht vortexen) und die Mischung für 15 bis 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und möglichst hoher Geschwindigkeit (hier: 24000 g im GSA-Rotor). Dabei wurden unlöslich gewordene Proteine, genomische DNA und Zellschrott pelletiert. Der Überstand wurde nun durch eine doppelte Lage Miracloth (Calbiochem, Kat. No. 475855) filtriert, auf zwei SS34-Röhrchen aufgeteilt und durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Es erfolgte direkt anschließend eine Zentrifugation bei 4 °C und 24000 g für 30 min. Die resultierenden Pellets wurden kurz getrocknet (5-10 min) und in 1 ml 1/5 TE vereint. Nach Zugabe von 9 ml Puffer QBT wurde die Lösung auf eine zuvor mit Puffer QBT equilibrierte Qiagen-Säule aufgetragen (QIAGEN-tip 100). Die Säule wurde danach zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Nachdem die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert worden war, wurde die DNA erneut unter Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 24000 g für 30 min wurde das resultierende Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl 1/2 TE aufgenommen.

Die Isolierung von DNA von *low-copy* Vektoren in kleinerer Menge für hauptsächlich analytische Zwecke (z.B. Cosmide) erfolgte nach einer weiteren Methode: Zweimal 2 ml einer ÜN Kultur wurden im Reaktionsgefäß geerntet (2 min bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 150 µl Lösung P1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl P2. Die Lösungen wurden vorsichtig gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert (Zelllysis). Nach Zugabe von Lösung P3 und kurzem, vorsichtigem Mischen erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge für 5 min. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt und das Ganze ausgiebig gevortext. Nach Zentrifugation für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde der nun resultierende Überstand mit 2 Vol Ethanol gemischt und die DNA für 5 bis 10 min auf Eis

gefällt. Nun erfolgte eine Zentrifugation für 10 min in der auf 4 °C vorgekühlten Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 25 µl ¼ TE + RNase (20 µg/ml) aufgenommen.

Die Zusammensetzung der Puffer kann den Qiagen-Handbüchern entnommen werden.

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Verwendet wurde eine Erweiterung der Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA nach Logemann et al. (1986). Etwa 75-150 mg Pflanzenmaterial (Frischgewicht) im Eppendorfreaktionsgefäß, zuvor in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gegebenenfalls bei –80 °C gelagert, dienen als Ausgangsmaterial. Das Pflanzenmaterial wurde im selben Gefäß mit Hilfe eines konisch geformten, rotierenden Hartplastikstiftes unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Nachdem 500 µl Z6-Puffer hinzugefügt worden waren, wurde weiterhin, unter gelegentlichem vortexen, homogenisiert. Schließlich wurden 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) hinzugefügt. Nun wurde wieder ausgiebig gevortext (danach können die Proben kurze Zeit auf Eis aufbewahrt werden). Zur Phasentrennung wurden die Proben zentrifugiert (15000 rpm, 16 °C, für 10 min). Wenn die verwendeten Gewebe aus Agar-Kulturen stammten, so wurde der Überstand nun weiterhin mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, bis keine sichtbare Interphase mehr entstand. Abschließend wurde der Überstand einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der resultierende Überstand wurde nun unter Zugabe von 0,7 Vol Ethanol (absolut) und 0,2 Vol 1 M Essigsäure gefällt (1 h bei –20 °C). Nach 20-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und schließlich einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nun kurz getrocknet und in 200 µl mit DEPC behandeltem H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 120 µl 8 M LiCl wurde über Nacht auf Eis gefällt. Die RNA wurde dann pelletiert (15000 rpm, 4 °C, 20 min) und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wird die RNA in einem möglichst kleinen Volumen mit DEPC behandeltem H₂O aufgenommen.

Z6-Puffer:

8 M Guanidium-Hydrochlorid

20 mM MES (4-Morpholinoethansulfonsäure)

20 mM EDTA, (pH 7,0)

und

50 mM β-Mercaptoethanol wurden direkt vor Arbeitsbeginn zugefügt.

2.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.4.1 Molekulares Klonieren

Die regulären Methoden für die Manipulation von DNA mit dem Ziel der Ligation und anschließender Selektion geeigneter Plasmid-Klone können den Laborhandbüchern (Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1987) entnommen werden.

Das Einfügen kurzer DNA-Fragmente in Plasmide erfolgte mit hybridisierten Oligonukleotiden. Komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide wurden in 1x PCR-Puffer denaturiert und in einem halbstündigen Temperaturgradienten (95 bis 42 °C) hybridisiert. Die entstandenen, doppelsträngigen DNA-Fragmente konnten direkt mittels ihrer überhängenden Enden in geschnittene, nicht dephosphorylierte Plasmide ligiert werden.

Die Synthese des Konstruktes *YFP-MBD* (beziehungsweise *CFP-MBD*) erfolgte durch Ligation der Fragmente *YFP* (beziehungsweise *CFP*) mit *MBD* durch einfache PCR. Die beiden zu ligierenden Fragmente überlappten dabei um 30 komplementäre Nukleotide (Marc et al. 1998).

2.2.4.2 PCR-Bedingungen

Es kamen die PCR-Maschinen von MJ Research (PTC-200) und Biometra (UNO-Thermoblock) zum Einsatz. Es wurden die Polymerasen Taq (Q-Biogene) und *PfuTurbo*[®] (Stratagene, geringste Fehlerrate) verwendet. Zum Überschichten von Proben mit Öl wurde Pristane (Sigma) eingesetzt. In einigen Fällen war es nötig, die PCR-Bedingungen zu verbessern. Die Produktmenge kann durch Erhöhung der Menge Matrizen DNA und durch die Anzahl der u Polymerase in der Probe gesteigert werden. Substanzen wie DMSO (bis 10 %), Glycerol (5-20 %), aber auch Gelatine und BSA können förderlich sein. Eine Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration begünstigt das Hybridisieren der Primer mit der Matrize, kann aber eben deshalb auch zu unspezifischen Produkten führen. Die Konzentration der dNTPs sollte nicht erhöht werden, da dieses die Fehlerrate steigert und außerdem die Taq-DNA-Polymerase inhibiert werden kann. DEPC und SDS können PCR empfindlich stören. Von äußerster Wichtigkeit sind die Eigenschaften der Oligonukleotide. Computerprogramme erleichtern die Auswahl (siehe z.B. <http://www.alkami.com/primers/>). Die Dauer der Elongationreaktion pro Zyklus (üblicherweise ~ 1min/1000 bp) sollte im Falle der *PfuTurbo*[®] nach oben korrigiert werden. Die Dauer für Denaturierung der DNA und Hybridisierung der Oligonukleotide betrug 30-40 s pro Zyklus. Die Anzahl der Polymerisierungszyklen lag zwischen 30 und 35. Standard PCR-Ansatz für Taq (20 µl): 2 µl DNA, 13,7 µl H₂O, 2 µl 10x Puffer (10x enthält 15 mM MgCl₂), 1 µl Primer F (10 µM), 1 µl Primer R (10 µM), 0,2 µl dNTP (jedes dNTP 20 mM), 0,1 µl Taq (5u/µl).

E. coli Klone in 96-er Mikrotiterplatten wurden mit PCR für den Nachweis von Cosmiden mit spezifischen Inserts durchmustert: Dieses geschah durch Übertragen einer

kleinen Menge der *E. coli* Kultur in PCR Gefäße mit einem mit Stahlspitzen bewährten Stempel. Die PCR wurde daraufhin unter normalen Bedingungen durchgeführt.

2.2.4.3 Reverse Transkription

Alle Reagenzien sollten RNase frei sein. Dieses konnte durch einfache DEPC-Behandlung erfolgen. Flüssigkeiten mit Ausnahme von Tris werden mit 2 ml DEPC pro 1 l Lösung versetzt. Nachdem DEPC sich durch ständiges Rühren gelöst hat, wird es durch Autoklavieren inaktiviert und ungiftig. Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe der Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase von Gibco BRL (Life Technologies). In eine 40 µl Reaktion wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In dasselbe Reaktionsgefäß wurden 2 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) und H₂O bis zu einem Volumen von 23 µl hinzugegeben. Die Mixtur wurde nun für 10 min bei 70 °C inkubiert und dann in Eiswasser schnell abgekühlt. Nun wurden 15 µl einer Mixtur von 8 µl 5x Superscript-Puffer, 2 µl RNasin (35 u/µl; MBI Fermentas), 4 µl 100 mM DTT und 1 µl 20 mM dNTP hinzugegeben. Nach Mischen und kurzem Zentrifugieren wurde der Ansatz für 3-5 min bei 42 °C inkubiert. Nun werden 2 µl Superscript II hinzugefügt und mit der Pipette gemischt. Die Reverse Transkription wurde für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde nun durch Hitze terminiert: 70 °C für 15 min.

Die cDNA konnte nun als Matrize in PCR Reaktionen eingesetzt werden. Für die semiquantitative RT-PCR wurden die artifizielle RNA pAW109 und die Oligonukleotide DM151 und DM152 (Applied Biosystems) als interner Standard verwendet. Für die Synthese der *TOR1* cDNA durch PCR wurden die im fertigen RT-Ansatz enthaltenen RNAs durch Einsatz von RNase A und RNase H verdaut.

2.2.4.4 Bestimmung des 5' Endes der *TOR1* mRNA

Um den Transkriptionstart des *TOR1* Gens festzulegen, wurde das Gibco BRL 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Life Technologies, Kat. No. 18374-058) verwendet. Als Ausgangsmaterial diente ferner *Arabidopsis thaliana* Col Gesamt-RNA aus ganzen oberirdischen Pflanzenteilen. Das Enzym Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase wurde mit T1-5R geprimt. Die Oligonukleotide T1SP2 und T1SP3 sowie Oligonukleotide des 5' RACE-Kits wurden in den PCR-Reaktionen verwendet. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt in den pGem[®]-T Easy Vektor ligiert (Kat. No. A1360, Promega) und anschließend sequenziert.

2.2.4.5 DNA-Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Fa. Medigenomix, Martinsried, Deutschland vorgenommen. Die Chromatogramme wurden, wenn nötig, auch selbst gelesen.

2.2.4.6 Elektroelution von DNA-Fragmenten einer Größe über 10 kb

Zur Trennung von DNA-Fragmenten einer Größe über 10 kb von weiteren, unerwünschten DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau wurde die Elektroelution angewandt. Für diesen Zweck wurde eine Dialysemembran (Spectra/Por[®], Kat. No. 132724; Molekulargewicht der Durchlassgrenze: ~3500) eingesetzt. Die Membran wurde vor Verwendung rehydriert, indem sie in ein Becherglas mit beinahe 100 °C heißem 1x TAE-Puffer getaucht wurde und dort bis zur Abkühlung des Puffers belassen wurde. Die Probe mit der zu eluierenden DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und über dem Transiluminator ausgeschnitten. Das resultierende Gel-Stückchen wurde nun zusammen mit der rehydrierten Membran in ein weiteres Agarosegel eingegossen. Die Membran wölbte sich dabei an zwei gegenüberliegenden Seiten um das Gel-Stückchen. Gleichzeitig wurde mit einem Gel-Kamm auf einer Seite des Gel-Stückchens, direkt an die Membran angrenzend, eine Aussparung geschaffen.

Bei der nun folgenden Gel-Elektrophorese wurde die DNA in die Aussparung, gegen die Membran eluiert. Dafür wurde das Gel nur bis zu exakt seiner Oberfläche in 1x TAE Puffer eingetaucht. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 4 °C und geringer Spannung: 20 V bei einem Gel-Querschnitt von etwa 15 cm². Das Gel darf sich nicht erhitzen. Wenn die Fragmente die Aussparung erreicht hatten, wurde für nicht länger als 1 min eine Umkehr-Spannung von etwa 100 V angelegt und das in der Aussparung befindliche Puffervolumen abgesaugt. Die im Puffer befindliche DNA wurde nun mit Hilfe von elutip-D Minisäulchen (Schleicher & Schuell, Kat. No. 462615; alternativ können auch die tip20 Säulchen der Firma Qiagen unter Verwendung der empfohlenen Waschlösungen eingesetzt werden) gereinigt und aufkonzentriert.

2.2.4.7 Denaturierende Elektrophorese von Gesamt-RNA

Zwei g Agarose wurden in 144 ml H₂O und 20 ml 10x MOPS-Puffer geschmolzen und auf 60 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 35,5 ml 37 % Formaldehyd wurde vorsichtig gemischt und das Gel sofort unter dem Abzug gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer. Vor dem Auftragen wurde die Gesamt-RNA in einem Verhältnis von nicht größer als 1:1 mit RNA-Probenpuffer gemischt. Diese Mischung wurde bei 65 °C denaturiert (15 min) und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl Ethidium-Bromid (1 mg/ml) pro 10 µg RNA werden die Proben kurz gemischt, zentrifugiert und möglichst bald auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bis die Bromphenolblau-Bande etwa 1/3 des Gels durchlaufen hatte (Länge des Gel-Schlittens: ca. 14 cm). Das Gel darf sich während der Elektrophorese nicht erhitzen. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel, zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal, auf dem UV-Tisch fotografiert.

10x MOPS-Puffer:

- 0,2 M MOPS
- 50 mM Na-Acetat
- 10 mM EDTA, (pH 7)

RNA-Probenpuffer:

- 0,75 ml Formamid
- 0,15 ml 10x MOPS-Puffer
- 0,24 ml Formaldehyd
- 0,10 ml H₂O
- 0,10 ml Glycerol
- 0,08 ml 10 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.4.8 Kapillarer Transfer und Fixierung von Gesamt-RNA auf eine Membran

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mehrfach in H₂O gespült (um das beim Transfer störende Formaldehyd zu beseitigen) und danach für 20 min in 0,05 M NaOH vorsichtig bewegt (dadurch werden Strangbrüche in den RNAs erzeugt, wodurch auch große RNAs, allerdings in kleinere Fragmente zerlegt, übertragen werden). Anschließend wird das Gel wieder in H₂O gespült und für 45 min vorsichtig in 20x SSC bewegt.

Der Transfer erfolgt durch Saugkraft von Papiertüchern: das Gel wurde zunächst umgedreht und auf eine mit 20x SSC angefeuchtete Brücke aus Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB 002, Schleicher & Schuell), deren Enden in ein Reservoir mit 20x SSC als Transferpuffer ragten, luftblasenfrei aufgelegt. Auf die nun oben liegende Gelunterseite wurde eine mit H₂O angefeuchtete Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham) ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Darüber wurden drei in Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere gelegt und schließlich mehrere Schichten (etwa 8 cm) saugfähiges Papier gestapelt. Zusätzlich wurde der Aufbau mit einem Gewicht von ca. 400 g beschwert. Der Transfer erfolgte für 16-18 h.

Der Aufbau wurde abgebaut und die Nylonmembran vorsichtig in 2x SSC gespült. Die übertragene RNA wurde dann auf die noch leicht feuchte Membran fixiert, indem die Membran (RNA-Seite oben) im *crosslinker* (Stratalinker 2400, Stratagene) einer UV-Bestrahlung von 120 mJ/cm² ausgesetzt wurde. Abschließend wurde die Membran bei 80 °C für 1-2 h gebacken.

2.2.4.9 Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktivem ATP

Markierte DNA-Fragmente wurden für Northern und Southern Hybridisierungen verwendet. Für die Markierungsreaktion wurde das DecaLabel™ DNA Labelling Kit (Kat. No. K0622) von MBI Fermentas eingesetzt. Ungefähr 100 ng eines spezifischen PCR-Produktes wurden in der Reaktion markiert. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden gegeben: 10 µl DNA in H₂O (~100 ng), 10 µl 5x Reaktionspuffer (enthaltend Decamere und Puffersubstanz), 20 µl H₂O. Nach dem Mischen wurde zum Denaturieren der DNA der Reaktionsansatz für 10 min im Wasserbad auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlung in Eiswasser wurden folgende Substanzen zugefügt: 3 µl Mix A (Desoxynukleotide ohne dATP), 6 µl [α -³³P]dATP (10 mCi/ml; 370 MBq/ml), 1 µl Klenow-Fragment, exo⁻ (5 u). Der Inhalt des Gefäßes wurde gemischt, zum Sammeln der Flüssigkeit am Boden des Gefäßes kurz zentrifugiert und nun für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden für einen verbesserten Ablauf der Polymerisierungsreaktion 4 µl dNTP zugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 5 min Verweilen bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und mit H₂O auf 82 µl aufgefüllt.

Die das markierte DNA-Fragment enthaltende Probe wurde nun mit Hilfe des MicroSpin™ -Systems (Column S-400 HR, Amersham Pharmacia Biotech) von nicht eingebautem [α -³³P]dATP befreit. Es handelt sich dabei um eine Reinigung durch Gelfiltration (Sephacryl S-400HR Matrix). Für die Zentrifugation wurde die Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C bei einer Drehzahl von 3000 rpm (735 g) eingesetzt. Die Effektivität der Markierungsreaktion wurde durch Vergleichen der Menge Radioaktivität/Probe vor und nach der Reinigung abgeschätzt. Dafür wurde die Radioaktivität eines 1 µl Aliquots vor und nach der Gelfiltration im Beckman LS 6000 SC Szintillationszähler gemessen. Die Effektivität des Einbaus von [α -³³P]dATP bei der Markierungsreaktion lag bei über 38 %.

2.2.4.10 Northern Hybridisierung

Für die Detektion von mRNA-Spezies auf Nylonmembranen wurden die RNA-Blots zunächst in 6x SSC angefeuchtet und dann 2-3 h in Formamid-Hybridisierungslösung (FPH-Lösung) in Hybridisierungsröhren bei 42 °C vorhybridisiert. Nun wurde die FPH-Lösung ausgetauscht und die markierte und denaturierte (10 min bei 100 °C) DNA-Sonde in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei ebenfalls 42 °C ÜN im Hybridisierungsofen. Am Tag darauf wurde die FPH-Lösung mit enthaltener Sonde dekantiert und zur etwaigen Wiederverwendung bei -20 °C aufgehoben. Das stringente Waschen der Blots in der Hybridisierungsröhre erfolgte so: zweimal für 5 min in 2x SSC und 0,1 % SDS bei RT, zweimal für 20 min in vorgewärmtem 0,2x SSC und 0,1 % SDS bei 68 °C im Ofen, einmal für 5 min mit 2x SSC und 0,1 % SDS bei RT. Die feuchten RNA-Blots wurden in dünne Plastikfolie eingeschweißt und eine Imaging-Platte zur Detektion aufgelegt.

Die Auswertung der Hybridisierungen erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimager (FLA-3000, FUJI Photo Film Co.). Die Intensität der Banden wurde nicht quantifiziert.

Formamid-Hybridisierungslösung (FPH-Lösung):

5x SSC

5x Denhardt

50 % Formamid

1 % SDS

100 µg/ml denaturierte Salmon Sperm DNA

2.2.4.11 Southern Analyse (DNA-Gel, Transfer der DNA und Hybridisierung)

Nach Verdau von je 3 µg genomischer *Arabidopsis* DNA (Col) mit Restriktionsenzymen, wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt und in 10 µl H₂O aufgenommen. Die DNA wurde nun in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal auf dem Transilluminator fotografiert. Danach wurde das Gel kurz mit H₂O gespült und bei RT für 30 min in 0,25 M HCl (etwa 10 Vol des Gels) bewegt. Nach erneutem Spülen des Gels mit H₂O wurde es bei RT für 20 min in 0,4 M NaOH bewegt. Der Transfer auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham) erfolgte anschließend in 0,4 M NaOH mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Apparatur (Pharmacia) bei einem Unterdruck entsprechend einer 40 cm H₂O-Säule für 70 min. Die Membran wurde danach kurz in 2x SSC gespült. Die feuchte Membran wurde zum Fixieren der DNA im *crosslinker* (Stratalinker 2400, Stratagene) einer UV-Bestrahlung von 120 mJ/cm² ausgesetzt. Die getrocknete Membran wurde abschließend für 1 h bei 65 °C im Ofen gebacken. Trockene Blots können bei RT aufbewahrt werden.

Für die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde wurde der DNA-Blot zunächst in 2x SSC angefeuchtet. Die Methode der Hybridisierung entsprach der oben beschriebenen Northern-Hybridisierung in FPH-Lösung, mit dem Unterschied, dass die Hybridisierung bei 39 °C durchgeführt wurde. Nicht-stringentes Waschen des Southern Blots erfolgte mit 2x SSC und 0,1 % SDS bei RT, gefolgt von zweimal 20 min in 1x SSC und 0,1 % SDS bei 68 °C und abschließend einmal mit 2x SSC und 0,1 % SDS bei RT. Nun wurde ein Film (X-Omat DS, Kodak) mit dem feucht eingeschweißten Blot in einer Röntgen-Kassette bei -80 °C für etwa 2 Tage exponiert.

2.2.4.12 Das Strippen von Nylonmembranen

DNA- und RNA-Blots wurden von hybridisierten, radioaktiven Proben befreit, indem sie mehrfach für 5 min in 100 °C Stripping-Lösung inkubiert wurden. Die radioaktive Lösung

wurde dabei jeweils gegen frische Stripping-Lösung eingetauscht. Stripping-Lösung: 0,1x SSC, 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,0 % SDS.

2.2.5 Genetische Marker

2.2.5.1 PCR-gestützte Marker in *Arabidopsis*

Die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen genetischen Marker werden anhand der Methoden zur Detektion in verschiedene Gruppen eingeteilt: *simple sequence length polymorphism* Marker (SSLP; Bell und Ecker 1994), *cleaved amplified polymorphic sequence* Marker (CAPS; Konieczny und Ausubel 1993), *derived CAPS* Marker (dCAPS; Neff et al. 1998; Michaels und Amasino 1998) und Duplex-Marker auf hochauflösenden Gelen (Hauser et al. 1998). Derartige genetische Marker wurden von anderen Arbeiten übernommen (siehe Tab. 4) oder selbst entwickelt (siehe Ergebnisse). Heutzutage ist es aufgrund der Bemühungen, für die beiden Ökotypen Col und Ler Sequenzinformation anzureichern, möglich, am Bildschirm genetische Marker zu entwickeln. Dazu dienen vor allem folgende Internetadressen: TIGR, *Ler* database (<http://www.tigr.org/tdb/at/atgenome/Ler.html>); Stanford Genome Center SNP (http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=marker); Cereon Genomics (<http://www.arabidopsis.org/Cereon/index.html>).

Tabelle 4. Für Kartierungsarbeiten verwendete genetische Marker. Marker in dieser Tabelle wurden nicht in dieser Arbeit entwickelt.

Marker	Chromosom	Detektion	Bemerkung	Referenz
AtEAT1	1	SSLP	Derselbe Polymorphismus kann mit den verbesserten Oligonukleotiden nEATF/R detektiert werden.	Bell und Ecker (1994)
m600	4	CAPS mit <i>EcoRI</i>	ursprünglich RFLP Marker; zu CAPS umgewandelt von C. Fabri.	Chang et al. (1988)
nF7G19	1	SSLP	/	TAIR Marker ^a
nga-Marker	1, 4, 5	SSLP	nga63, nga151, nga249 u.a.	Bell und Ecker (1994)
nT1G11	1	SSLP	/	TAIR Marker ^a
O846A	1	CAPS mit <i>DraI</i>	ursprünglich RFLP Marker; zu CAPS umgewandelt von O. Leyser (Nottingham).	TAIR Marker ^a
PG11	4	CAPS mit <i>BfaI</i>	/	Konieczny und Ausubel (1993)
yUP3E9LE	4	CAPS mit <i>Bsh1236I</i>	Polymorphismus entdeckt von C. Fabri.	unveröffentlicht; Position des Klons bestimmt durch Schmidt et al. 1996.

^a http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=marker

2.2.5.2 Duplex-Marker auf hochauflösenden Gelen

Die Methode der Analyse von Markern mit hochauflösenden Gelen (Hauser et al. 1998) wurde wiederholt eingesetzt, um unbekannte Polymorphismen aufzuspüren. Auch wurden mit dieser Technik Mutationsorte im *TOR1* Gen identifiziert. Die Methode basiert auf der Differenz in der Laufgeschwindigkeit von PCR-Fragmenten in (nicht-denaturierenden) Polyacrylamidgelen. Bei der Analyse genetischer Marker ermöglicht die relative Laufgeschwindigkeit die Zuordnung zu einem *Arabidopsis* Ökotyp. Es handelt sich dann um einfache kodominante Marker. Die Methode ist daher direkt mit der Methode der SSLP Marker vergleichbar. Der Einsatz von hochauflösenden Polyacrylamidgelen (es wurde ausschließlich das MDE-Gel von FMC Bioproducts verwendet) bietet mehrere Vorteile: a) Kleinste Längenunterschiede führen zu signifikanten Abweichungen im Laufverhalten und b) DNA-Duplices gleicher Länge, aber unterschiedlicher Komposition, haben häufig unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten. Die Auflösung solcher Polyacrylamidgele ist so stark, dass sogar *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) unterschiedliche Laufverhalten bei Homoduplices (und Heteroduplices) erzeugen können.

Heteroduplices können in Mischungen allelischer DNA-Fragmente durch einfaches Denaturieren und anschließendes Renaturieren erzeugt werden. PCR-Produkte, welche mit heterozygoter DNA als *template* erzeugt wurden, enthalten zwei Populationen von Homoduplices, jedoch (theoretisch) keine Heteroduplices. Durch einmaliges Denaturieren und Renaturieren nach der PCR, ohne dass ein vollständiger PCR Zyklus durchlaufen wird, kann nun eine stöchiometrische Mischung aus Homoduplices und Heteroduplices erzeugt werden. Bei der hier beschriebenen Methode der Analyse mit Polyacrylamidgelen erleichterten Heteroduplices häufig die Identifikation des heterozygoten Zustandes in einem F2-rekombinanten Individuum (Abb. 6).

Damit Homo- und Heteroduplices analysiert werden konnten, wurden alle PCR-Proben vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel denaturiert (95 °C) und renaturiert (mit Hilfe eines etwa 30-minütigen Temperaturgradienten). Verwendet wurde die Biorad Gelkammer Protean für Proteingele (0,7 mm tief; ca. 20 cm Laufstrecke). Die Auftrennung erfolgte mit höchstens 500 V bei Kühlung der Apparatur. In der Regel wurden PCR-Fragmente einer Größe zwischen 300 und 800 bp analysiert. Entsprechend wurden unterschiedliche Laufzeiten veranschlagt: beispielsweise wurden 500 bp Fragmente mit 5-6 kVh aufgetrennt. Die Verwendung von DNA-Längenstandards ist nur bedingt sinnvoll, da bei den verwendeten Polyacrylamidgelen die Laufgeschwindigkeit auch von der Basenpaarkomposition abhängt. Das Gel darf nicht überladen werden, da sonst geringe Unterschiede in der Laufgeschwindigkeit nicht ausreichen, um die Fragmente zu trennen (daher maximal 50 ng pro slot). Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidium-Bromid gefärbt und bei UV-Anregung fotografiert (Abb. 6).

Nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel:

20 ml MDE-Gel (enthält Acrylamid, FMC Bioproducts)

13,3 ml Urea (7,5 M)

2,4 ml TBE (10x)

4,3 ml H₂O

20 µl TEMED

200 µl APS (10 %)

(total ~40 ml)

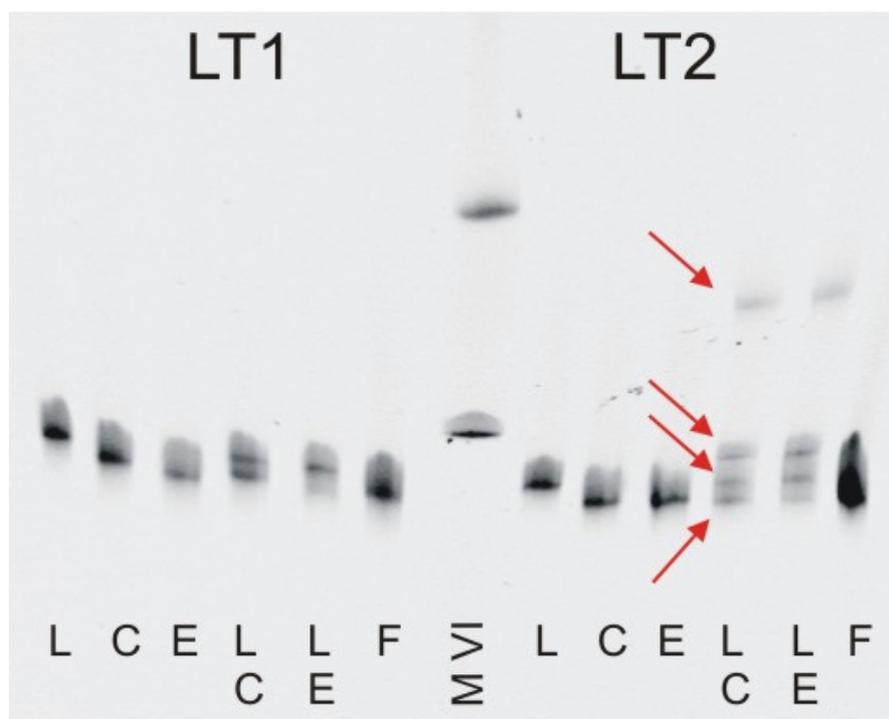


Abb. 6. Analyse der Marker LT1 und LT2 (~800 bp) auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel. Nach Elektrophorese und Färbung der Banden mit Ethidium-Bromid werden bei LT2 Heteroduplices für die beiden Mischproben sichtbar (die beiden oberen Pfeile), nicht jedoch bei LT1. LT1 und LT2 zeigen einen Polymorphismus der Homoduplices (untere Pfeile in LT2). L Ler, C Col, E En-2, F BAC F10M23 (Col Ökotyp), M VI Roche Marker VI.

2.2.6 *In situ* Färbung von *GUS* exprimierenden transgenen *Arabidopsis*

Das Gen für β -Glucuronidase (*GUS*) aus *E. coli* wird in Pflanzen häufig als Reportergen verwendet (Jefferson 1987). *GUS* aus *E. coli* ist ein robustes Enzym und kann unter verschiedenen Assay-Bedingungen detektiert werden. *GUS* aus *E. coli* toleriert große N-terminale Fusionen, wodurch verschiedene Strategien bei der Reportergenanalyse verwirklicht werden können. Höhere Pflanzen zeigen keine oder nur geringe endogene *GUS*-Aktivität. In dieser Arbeit wurde nur 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) als Substrat für *GUS* verwendet. Als finales Reaktionsprodukt entsteht bei Anwesenheit von

oxidativen Substanzen das unlösliche Indigo, welches durch seine blaue Färbung detektiert werden kann. Ein anderes häufig verwendetes Substrat ist 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG). Sein Reaktionsprodukt wird durch Fluoreszenz sichtbar gemacht.

Für die *in situ* Färbung wurde das zu untersuchende transgene Pflanzenmaterial zunächst unter Verwendung einer Vakuumpumpe mit Fixierungspuffer infiltriert. Die Gewebe wurden dann für 30 min bei RT im Fixierungspuffer belassen. Schließlich wurden die Pflanzenteile dreimal mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen. Nun erfolgte die Infiltration der Pflanzenteile mit Färbepuffer. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend bei 37 °C für 4 bis maximal 24 h durchgeführt. Nachdem das Pflanzenmaterial eine genügende Färbung zeigte, wurde die Reaktion gestoppt und das Blattgrün entfernt, indem das Pflanzenmaterial mehrfach mit 70 % Ethanol gewaschen wurde. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C in 70 % Ethanol.

Fixierungspuffer:

- 0,5 % Formaldehyd
- 0,05 % Triton X 100
- 50 mM Na-PO₄, pH 7,0

Färbepuffer:

- 1 mM X-Gluc in DMSO
- 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(II)
- 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III)
- 0,1 % Triton X 100
- 50 mM Na-PO₄, pH 7,0

Bei der Suche nach transgenen *Arabidopsis*, welche GUS exprimieren, wurde ein vereinfachtes Protokoll angewendet (Deruère et al. 1999). Entsprechend wurden ganze, unbehandelte Pflänzchen in einen X-Gluc enthaltenden Puffer überführt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe infiltriert. Für die Färbereaktion wurden die Pflanzen danach sofort bei 37 °C für 4 bis maximal 24 h inkubiert. Die Pflanzen wurden dann wie oben mit Ethanol entfärbt und konserviert. „Deruère-Puffer“ (5 ml): 2 ml Na-PO₄-Puffer (0,25 M, pH 7,0), 1 ml Methanol, 50 μ l Kaliumhexacyanoferrat(II) (200 mM), 50 μ l Kaliumhexacyanoferrat(III) (200 mM), 50 μ l X-Gluc (100 mM), 100 μ l EDTA (0,5 M), auffüllen mit H₂O bis 5 ml.

2.2.7 Mikroskopie

Durchlicht- und einfache Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Zeiss Axioskop. Für die Färbung von Trichomen mit DAPI wurden Blätter von *Arabidopsis* in 3,7 % Formaldehyd in PBS-Puffer fixiert. Anschließend wurden die Blätter mit 1 μ g/ml DAPI in PBS-Puffer für 15

min gefärbt und 4x gewaschen. Mikroskopie erfolgte nachdem die Blätter in 80 % Glycerol überführt worden waren.

Die Mikroskopie von transient transformierten Protoplasten erfolgte mit dem *laser scanning microscope* LSM510 (Carl Zeiss Jena). Die Bildbearbeitung erfolgte mit der *AIM software*, vs. 3.0 (Carl Zeiss Jena) und mit Corel Photo-Paint, vs. 8 (Corel Corporation). Bei der Mikroskopie am LSM wurde das Wasserobjektiv C-Apo 40x/1.2w eingesetzt. Die Fluoreszenzsignale der unterschiedlichen Kanäle wurden als monochromatische Bilder aufgezeichnet und nachträglich als Falschfarbenbilder dargestellt. ECFP wurde mit der 458 nm Argonlaserlinie angeregt und mit einem 480-520 nm Bandpass detektiert. GFP wurde mit der 488 nm Argonlaserlinie angeregt und mit dem 500-550 nm Bandpass detektiert. EYFP wurde mit der 514 nm Argonlaserlinie angeregt und mit dem 535-590 nm Bandpass detektiert. DsRED wurde mit der 543 nm Helium/Neonlaserlinie angeregt und mit dem 565-615 nm Bandpass detektiert. Chlorophyllfluoreszenz wurde (u.a.) mit der 543 nm Helium/Neonlaserlinie erzeugt und mit dem 650 nm Langpass detektiert.

Objektglasschälchen (Mattek, USA; Kat. No. P35GC-0-14-C) wurden für die Mikroskopie am LSM mit poly-D-Lysin (Kat. No. P-0899, Sigma) beschichtet. Dafür wurde eine 0,1 % Lösung auf die zu beschichtende Oberfläche gegeben und dort für 3 h belassen. Die Lösung wurde dann durch vorsichtiges Spülen mit bidest. H₂O entfernt. Die Objektglasschälchen wurden nun an der Luft getrocknet.

2.2.8 Verzeichnis der Web-Adressen zur Analyse von Proteinsequenzen

Blast NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Blocks WWW Server <http://www.blocks.fhcrc.org/>

Coils Server http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

Compute pl/ MW tool http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

Multicoil Program <http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>

Paircoil Program <http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/score>

ProfileScan Server <http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>

Prosite <http://www.expasy.ch/prosite/>

PSORT WWW Server <http://psort.nibb.ac.jp/>

REP Search <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/papers/rep/search.html>

SAM Server <http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/sam.html>

SignalP Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Structural Classification of Proteins <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>

TargetP v1.01 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

The PredictProtein Server <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>

TMHMM (v. 2.0) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

3 Ergebnisse

3.1 Die Phänotypen der Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3*

3.1.1 Die *tor* Mutanten zeigen pleiotropische Veränderungen

Die Vielseitigkeit des *tortifolia* (*tor*) Phänotyps erforderte eine Weiterführung der phänotypischen Beschreibung in dieser Arbeit. Die Rosettenstadien der *tor* Mutanten zeigen die in der Einleitung erwähnten Verdrehungen der Blätter (Abb. 7). Die Verdrehungen der Blätter entstehen im Wesentlichen durch eine Torsion der Petiolen. Alle Blätter der *tor* Mutanten zeigen Torsionen, wobei späte Rosettenblätter auch im ausgewachsenen Zustand weniger verdreht sind als frühe. Demnach hat die entwicklungsbedingte Anisophyllie (auch bezeichnet als Heteroblastie, Poethig 1997) der Blätter in *Arabidopsis* Einfluss auf die Stärke des *tor* Phänotyps. Die Blätter von *tor2* zeigten meist eine verstärkte Epinastie und sind im Vergleich zum Wildtyp verkürzt (Abb. 7). Zusätzlich zum auffälligen Phänotyp der Torsion der Petiolen (für eine quantitative Beschreibung siehe Einleitung) zeigten alle *tor* Mutanten auch Torsionen in anderen Organen. Die Richtung der Torsionen in den Organen war immer konsistent, das heißt ein Allel zeigt rechtsgängige oder linksgängige Torsionen. Alle Mutanten zeigten Torsionen unterschiedlicher Intensität in Hypokotylen und Wurzeln (siehe unten), aber auch im Infloreszenzstamm (Abb. 8), in den Brakteen, in den Sepalen, Petalen und in Stamineen. Die Infloreszenzstämme aller *tor* Mutanten sind kleiner als die des Wildtyps. *tor2* Infloreszenzen sind etwa um die Hälfte verkürzt (Abb. 8). *tor2* zeigte im Gegensatz zu den anderen beiden Mutanten häufig missgebildete Schoten, wobei eine gerichtete Torsion nicht offenkundig wurde. Im Allgemeinen erschien die Fruchtbarkeit der Mutanten nicht herabgesetzt. Keine der Mutanten zeigte veränderte Wurzelhaare.



Abb. 7. Rosettenstadien von *Ler* und *tor* Mutanten in *Arabidopsis* (21 DAG). Balken 1 cm.

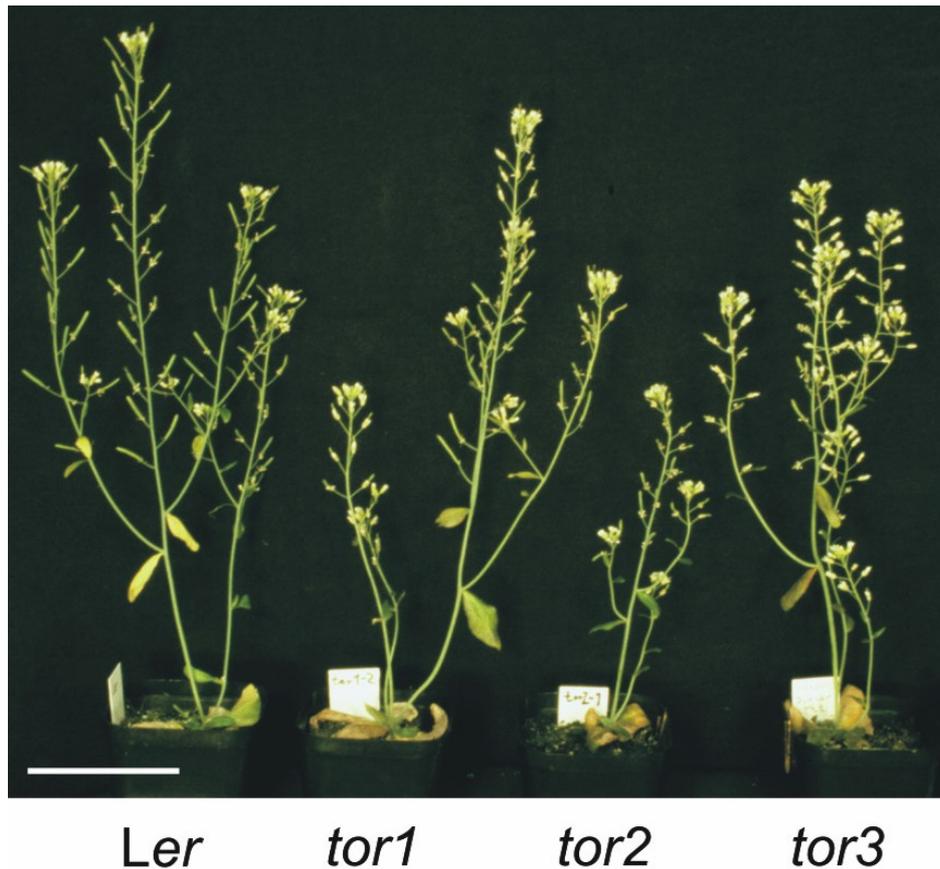


Abb. 8. *Arabidopsis tor* Mutanten im Zustand der Blüte (35 DAG). Balken 5 cm.

3.1.2 Das Wurzelwachstum der *tor* Mutanten

Zur Analyse des Wurzelwachstums der *tor* Mutanten wurden Sämlinge auf hochprozentigen, um 30° aus der Vertikalen gekippten Agarplatten herangezogen (siehe Material und Methoden). Die Wurzeln von *Arabidopsis* können in diesen Agar nicht eindringen und wachsen entlang seiner Oberfläche. Das Netto-Wachstum der Wurzel erfolgt nicht genau in Richtung der Erdschwere, sondern zeigt bei den meisten *Arabidopsis* Wildtypen (beispielsweise *Ler*) eine kontinuierliche seitliche Abweichung des Wurzelwachstums vom Vektor der Erdschwere. Betrachtet man die Wurzel in Richtung ihrer Verlängerung, so erfolgt diese Abweichung immer nach rechts (Simmons et al. 1995). *tor1-2* Pflanzen (aber auch *tor1-1* und *tor1-6*) offenbarten jedoch eine Umkehrung der Richtung des Wurzelwachstums, denn sie wuchsen nach links (Abb. 9A, B). Ähnliche Ergebnisse wurden für *tor1-8 (spr2)* bereits von anderen erzielt (Furutani et al. 2000). Das *root waving* (siehe Einleitung) der *tor1* Wurzeln zeigte jedoch keine deutliche Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Die Wurzeln von *tor2* waren viel kürzer und dicker als die Wurzeln des Wildtyps. Die gedrungeneren Wurzeln von *tor2* zeigten, ähnlich *tor1*, eine Abweichung der Richtung des Wurzelwachstums nach links (Abb. 9C). Eine typische pflanzliche Wurzelspitze gliedert sich in einen distalen meristematischen Bereich, eine Zellstreckungszone und eine Differenzierungszone. In

Arabidopsis ist die Differenzierungszone der Wurzeln durch das Auftreten von Wurzelhaaren gekennzeichnet (Schiefelbein und Benfey 1991). Die epidermalen Zellreihen der Differenzierungszone waren bei *tor2* immer deutlich rechtsgängig und zeigten auch geschwollene Zellen. Interessanterweise war der meristematische Bereich der Wurzeln von *tor2* gegenüber dem Wildtyp nicht verändert. Dieses deutet darauf hin, dass TOR2 nicht in der meristematischen Region gebraucht wird. Nichtsdestotrotz ist die Zellstreckungszone in *tor2* gegenüber dem Wildtyp auffällig verkürzt (Abb. 9E, F). Im Gegensatz zu *tor1* und *tor2* zeigte das Wurzelwachstum von *tor3* keinen auffälligen Phänotyp unter diesen Bedingungen (Abb. 9A, D).

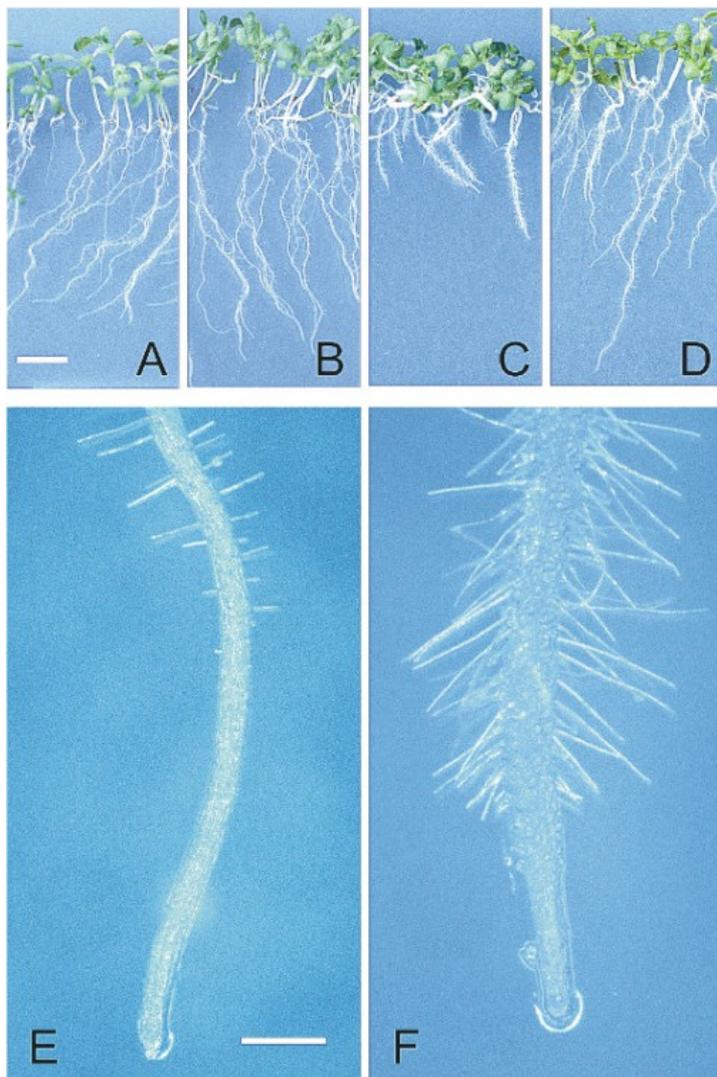


Abb. 9. Wurzelwachstum der *tor* Mutanten auf hochprozentigen Agarplatten (Aufsicht). Nach 9 DAG zeigten der Wildtyp und *tor* Mutanten Torsionen der Wurzel. Während Ler (A) und *tor3* (D) eine Abweichung nach rechts (gesehen in Richtung des Vektors der Erdschwere) zeigten, zeigten *tor1* (B) und *tor2* (C) eine Abweichung nach links. Balken (A-D) 5 mm. Die Wurzelspitze von *tor2* war von normaler Erscheinung; im Gegensatz zum Wildtyp verbreiterte sich der Wurzeldurchmesser von *tor2* im Übergangsbereich von Streckungs- zu Differenzierungszone deutlich (E, F). Balken (E, F) 250 μ m.

3.1.3 Die Etiolierung der *tor* Mutanten

Alle *tor* Mutanten zeigten bereits bei Keimung im Licht Torsionen im Hypokotyl. Etiolierung erzeugt in den Hypokotylen des *Arabidopsis* Wildtyps ein erheblich beschleunigtes Längenwachstum. Die Etiolierung der *tor* Mutanten erzeugte eine Verstärkung des Phänotyps im Hypokotyl. Während *tor2* durch die Etiolierung schwerwiegende

Veränderungen präsentierte, war die Verstärkung des Phänotyps bei *tor3* moderat, und bei *tor1* nur schwach (Abb. 10A-D). In allen Fällen waren die epidermalen Zellreihen der Hypokotyle auffällig helikal angeordnet und der Durchmesser der Hypokotyle war vergrößert. *tor2* zeigte blasenförmige epidermale Zellen. Wenn *tor3* Mutanten auf gekippten, hochprozentigen Agarplatten im Dunkeln herangezogen wurden, dann zeigten ihre Wurzeln rechtsgerichtete Spiralen (Abb. 10E). Die Wurzeln des Wildtyps hingegen zeigten keine Spiralen, sondern wuchsen in Richtung der Erdschwere. Demnach bewirkt eine Verstärkung der *tor* Phänotypen durch Etiolierung entweder ein verstärktes helikales Wachstum, eine Abnahme der Zellanisotropie oder eine Kombination aus beidem. Dadurch entstehen Phänotypen, die von helikalem (*tor1* Hypokotyle, *tor3* Wurzeln) bis zu nahezu isodiametrischem (*tor2* und *tor3* Hypokotyle) Wachstum reichen. Die Kompetenz des Hypokotyls des Wildtyps zu raschem Zellwachstum bei Etiolierung bleibt also bei den *tor* Mutanten erhalten, wird jedoch unterschiedlich umgesetzt.

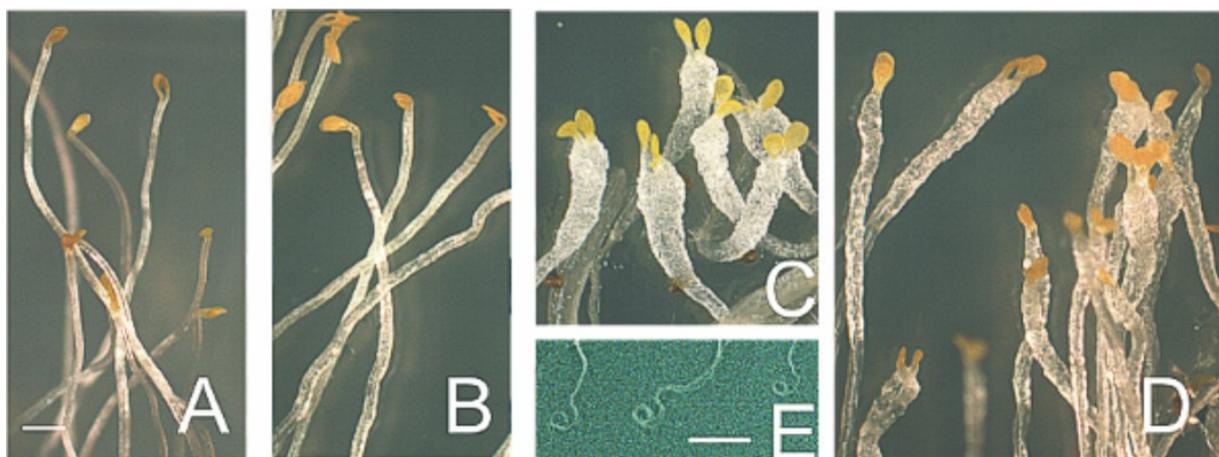


Abb. 10. Etiolierung erzeugte eine Verstärkung des *tor* Phänotyps im Hypokotyl. Nur die apikalen Teile der Hypokotyle des Wildtyps (A), von *tor1* (B) und von *tor3* (D) sind dargestellt. Die Hypokotyle des Wildtyps erreichten nach neun Tagen eine Länge von 2,5 bis 3,0 cm. *tor2* (C) und *tor3* (D) blieben im Wachstum zurück, wobei die Hypokotyle stark anschwellen. Die Hypokotyle von *tor1* waren nur wenig breiter als die des Wildtyps (B). Balken (A-D) 1 mm. Etiolierung erzeugte bei Wurzeln von *tor3* nach rechts gerichtete Spiralen (E). Dieses wurde beim Wildtyp nicht beobachtet, er wuchs stattdessen unsterk in Richtung der Erdschwere (Daten nicht gezeigt). Balken (E) 5 mm.

3.1.4 Trichome mit verändertem Phänotyp

Die Trichome der *tor2* Mutante präsentierten auffällige Veränderungen gegenüber den Trichomen des Wildtyps (Abb. 11A-C). Trichome von *tor2* waren größer als die des Wildtyps und zeigten, wenn sie von oben betrachtet wurden, etwas verlängerte, im Uhrzeigersinn verbogene Äste. Die Händigkeit des Wachstums der *tor2* Mutante wird hier auf der Ebene der Einzelzelle sichtbar (Abb. 11C). Die Anzahl der Verzweigungen der Trichome in der *tor2* Mutante war gegenüber dem Wildtyp nicht reduziert. Die Trichome der *tor2* Mutante erinnern entfernt an die *distorted* Gruppe der Trichom-Mutanten (Hülkamp et al. 1994; Szymanski et

al. 1999). Die Trichome der Mutante *tor1* zeigten in der Regel keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Das Vorhandensein von veränderten Trichomen kann für die Mutante *tor3* ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Trichome der Mutante 590501 werden im Abschnitt 3.7.3 gezeigt.

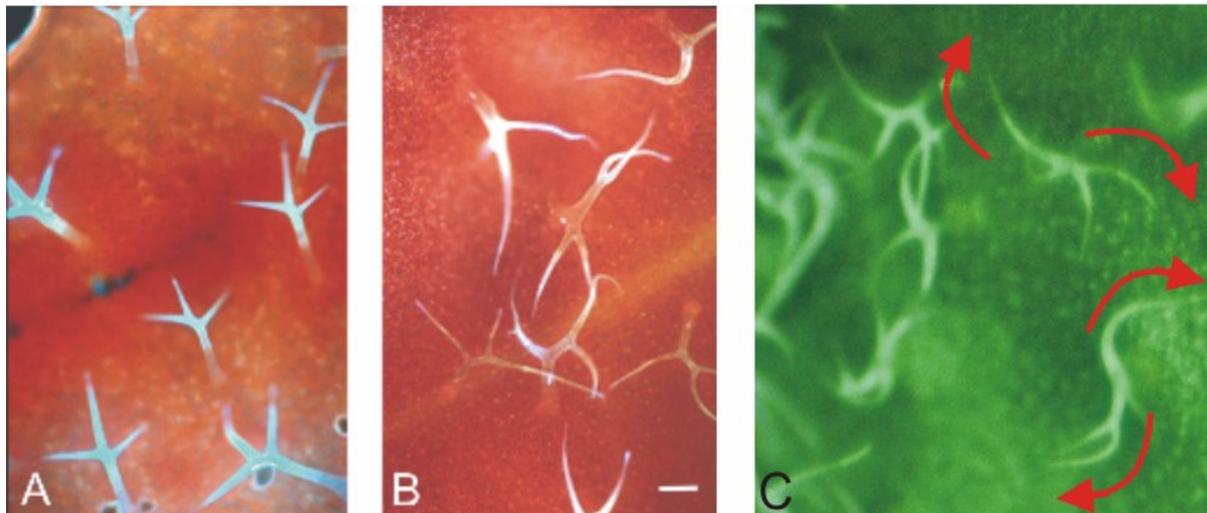


Abb. 11. Trichome des Wildtyps und von *tor2*. (A, B) DAPI-Färbung von Trichomen. Fixierte und gefärbte Blättchen wurden in 80 % Glycerol unter einem Deckgläschen am Zeiss Axioskop fotografiert. Die Äste der Trichome des Wildtyps (A) sind gerade, bei *tor2* (B) sind sie verlängert und verdreht. (C) Die Richtung der Verdrehung der lebenden *tor2* Trichome erweist sich bei Betrachtung durch das Olympus Binokop (SZ-PT) als rechtsgängig. Balken (A, B) 100 μ m.

3.2 Die Klonierung des *TOR1* Gens

3.2.1 Die Kartierung von *TOR1*

Erste Untersuchungen hatten zur Bestimmung der ungefähren Position des *TOR1* Gens geführt. Demnach sollte sich *TOR1* in einem zentralen Bereich des Chromosomes 4, gekoppelt an die Marker *cer2* und *d104C*, befinden (Fabri und Schöffner 1994). Noch vor Beginn der vorliegenden Arbeit war die Position von *TOR1* weiter auf einen Bereich von 325 kb zwischen den Markern *PG11* und *yUP3E9LE* eingegrenzt worden (siehe Material und Methoden). Eine genauere Kartierung des *TOR1* Locus erwies sich zunächst als schwierig, da für den fraglichen Bereich keine bekannten polymorphen Marker vorlagen. Andererseits waren in der verwendeten F2-rekombinanten *tor1* Population noch eine Anzahl von Individuen mit Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Markern gefunden worden, nämlich 10 Ereignisse für *PG11* und 7 Ereignisse für *yUP3E9LE*. Deswegen war eine Suche nach neuen polymorphen Markern in der 325 kb Region zwischen *PG11* und *yUP3E9LE* sinnvoll (Abb. 12).

3.2.1.1 Neue Marker für einen zentralen Bereich von Chromosom 4

Die Suche nach verwertbaren Polymorphismen wurde durch die Methode der Analyse von PCR-Produkten auf hochauflösenden Polyacrylamidgelen erleichtert (Hauser et al. 1998; Material und Methoden). Durch das *Arabidopsis* Genomprojekt waren Teile der DNA-Sequenz zwischen PG11 und yUP3E9LE auf Chromosom 4 bekannt geworden. Diese Sequenzen dienten nun zur PCR-Amplifikation genomischer DNA von verschiedenen Ökotypen, um sie auf Polymorphismen zu untersuchen. Die Auswahl der zu amplifizierenden Bereiche richtete sich nach der Verfügbarkeit von Sequenzinformation im Bereich; nachdem größere Sequenzabschnitte bekannt geworden waren erfolgte die Auswahl entsprechend der relativen Position, außerdem wurden nicht-kodierende Bereiche bevorzugt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschließend auf hochauflösenden Polyacrylamidgelen analysiert. In etwa 40 % der Fälle wurden nun Polymorphismen der Ökotypen sichtbar. Die beobachteten Unterschiede in den Laufgeschwindigkeiten waren häufig nur gering. Zeigten die zwei Ökotypen für den amplifizierte Bereich einen Polymorphismus, so wurden bei Proben mit heterozygoter DNA als PCR-Matrize häufig Heteroduplexe sichtbar (Abb. 6). Heteroduplexe wurden erkennbar an einer gegenüber den Homoduplexen deutlich veränderten Laufgeschwindigkeit. Das Auftreten von Heteroduplexen erleichterte die Bewertung der genomischen Situation. Tabelle 5 zeigt die für den Bereich bei PG11 und yUP3E9LE gefundenen Marker.

Tabelle 5. Neue kodominante PCR-Marker für einen Bereich von 325 kb in Nähe zu *TOR1*.

Marker ^a	Elektrophorese ^b	Polymorphismus ^c	Heteroduplex ^d
LT1	MDE-Gel	Ler > Col = En-2	nicht gefunden
LT2	MDE-Gel	Ler > Col = En-2	Ler/ Col; Ler/ En-2
LT5	1,5 % Agarosegel	Ler = Col > En-2	-
LT7	MDE-Gel	Ler < Col = En-2	Ler/ Col; Ler/ En-2
LT11	MDE-Gel	Ler < Col = En-2	Ler/ Col; Ler/ En-2
LT15	MDE-Gel	(Ler ohne Produkt) Col > En-2	Col/ En-2
F23K2L	MDE-Gel	Ler = Col > En-2	nicht gefunden
F24K12L	MDE-Gel	Ler < Col = En-2	Ler/ Col; Ler/ En-2
F16H17L	MDE-Gel	Ler = Col > En-2	nicht gefunden

^a Sequenzen der Oligonukleotide siehe Material und Methoden. ^b Für Polyacrylamidgelen wurde nur die MDE-Gelmatrix (FMC Bioproducts) verwendet. ^c Angaben beziehen sich auf die apparente Fragmentgröße. Auf MDE-Gelen korrelieren Fragmentgröße und Laufgeschwindigkeit nicht streng.

^d Heteroduplexe wurden entsprechend der Methode von Hauser et al. (1998) erzeugt. Die Kombination Col/ En-2 wurde nur im Falle von LT15 auf Heteroduplexen untersucht.

3.2.1.2 Die verbesserte Kartierung des *TOR1* Locus

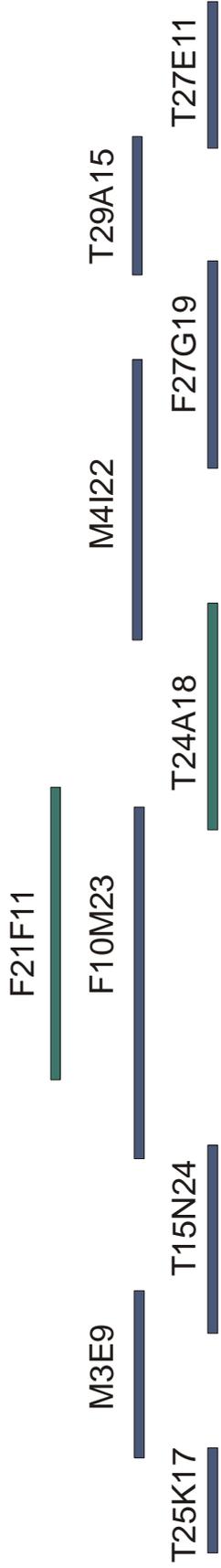
Die für die Kartierung verwendete F2-rekombinante *tor1* Population ist aus Kreuzungen der Mutante *tor1-1*, welche im Ökotyp En-2 erzeugt worden war, mit dem Ökotyp Ler hervorgegangen. Wenn die PCR-Fragmente aus der Region um *TOR1* Polymorphismen zwischen den Ökotypen Ler und En-2 offenbarten, wurde die genomische DNA von rekombinanten *tor1* Individuen mit Hilfe einer entsprechenden PCR und durch anschließende Gel-Elektrophorese analysiert. Jene Marker, welche bei Mischproben auf Polyacrylamidgelen Heteroduplices hervorbrachten, zeigten nun bei der heterozygoten Situation Heteroduplices. Durch diese Arbeiten war eine Eingrenzung von *TOR1* auf einen Bereich von 111 kb zwischen den Markern LT5 und LT7 möglich (siehe Abb. 12). Tatsächlich fanden sich nur drei rekombinante *tor1* Individuen (von insgesamt ca. 1600 Stück), welche an der Position dieser beiden Marker heterozygot für die elterliche DNA waren. An den Positionen der Marker LT11 und F23K2L, welche zwischen den Markern LT5 und LT7 liegen, zeigten alle rekombinanten *tor1* Individuen ausschließlich den Genotyp des mutanten genetischen Hintergrundes (En-2).

3.2.2 Komplementation von *tor1* Pflanzen durch genomische DNA des Wildtyps

3.2.2.1 Subklonierung von genomischer *Arabidopsis* DNA aus BACs in Cosmide

Um den *TOR1* Locus zu bestimmen, wurde eine Strategie angewandt, welche auf der Annahme basiert, dass rezessive *tor1* Pflanzen durch das Übertragen von Stücken genomischer DNA aus der Region von *TOR1* zum Wildtyp komplementiert werden können. Wenn bekannt ist, welches Stück DNA zur Komplementation führt, sollte sich daraus die Identität des *TOR1* Gens direkt erschließen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden zunächst BAC-Klone ausgewählt, welche den Bereich von *TOR1* abdecken. Die beiden BACs T24A18 und F10M23, welche einander mit ca. 8 kb überlappen, sind vollständig sequenziert worden (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Für die Experimente zur Komplementation wurden jedoch die BACs T24A18 und F21F11 verwendet, da sie einander mit ca. 25 kb überlappen (Abb. 12). Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit, vollständige Gensequenzen auch aus dem Überschneidungsbereich der BACs zu isolieren und übertragen zu können.

Abb. 12. Kartierung des *TOR1* Locus (umseitig). Dargestellt ist ein Bereich aus Chromosom 4. Darüber sind korrespondierende BACs und darunter genetische Marker und Rekombinanten dargestellt. Nördliche und südliche F2-rekombinante *tor1* Pflanzen werden namentlich aufgeführt, wenn sie an der entsprechenden Position nicht homozygot für En-2 DNA waren. Mit Ausnahme von F21F11 sind die gezeigten BACs durch das *Arabidopsis* Genomprojekt sequenziert worden. F21F11 und T24A18 sind für die Komplementierung von *tor1* Pflanzen in Cosmide subkloniert worden (grün). Das *TSB2* Gen ist als Orientierungshilfe angegeben. Wie sich herausstellte, liegt es direkt neben *TOR1*. Der Marker PG11 liegt bei 75,16 cM. * die Pflanze ist an dieser Position homozygot für En-2; CHR 4 Chromosom 4.



CHR 4

Marker	PG11	LT2	LT5	LT11	F23K2L	TSB2	LT7	F16H17L	yUP3E9L	F24K12L
m600										
#24	#24	#24	#24	*	*		*	*	*	*
#94	#94	*	*	*	*		*	*	*	*
#293	*	*	*	*	*		*	*	*	*
#448	#448	#448	*	*	*		*	*	*	*
#592	#592	*	*	*	*		*	*	*	*
#1303	#1303	*	*	*	*		*	*	*	*
#1335	#1335	*	*	*	*		*	*	*	*
#1404	#1404	*	*	*	*		*	*	*	*
#1544	#1544	*	*	*	*		*	*	*	*
#2008	#2008	*	*	*	*		*	*	*	*
#2129	#2129	#2129	*	*	*		*	*	*	*
*	*	*	*	*	*		*	*	#61 (t1/3)	#61 (t1/3)
*	*	*	*	*	*		#86 (t1/3)	#86 (t1/3)	#86 (t1/3)	#86 (t1/3)
*	*	*	*	*	*		*	#90 (t1/3)	#90 (t1/3)	#90 (t1/3)
*	*	*	*	*	*		#198	#198	#198	#198
*	*	*	*	*	*		*	#1387	#1387	#1387
*	*	*	*	*	*		*	*	#1760	#1760
*	*	*	*	*	*		*	#2008	#2008	#2008

Fragmente genomischer DNA, welche durch partiellen Verdau der beiden BACs mit der Restriktionsendonuclease *Hind*III erzeugt worden waren, wurden in den mit *Hind*III geöffneten Cosmid-Vektor pBIC20 (Meyer et al. 1994) subkloniert. Dieser Cosmid-Vektor ermöglicht die einfache Übertragung von DNA auf Pflanzen, da er in *E. coli* und in *Agrobacterium tumefaciens* propagiert werden kann. Die T-DNA von pBIC20 fungiert dabei als Vehikel für die Übertragung von (üblicherweise) 12-22 kb großen DNA-Stücken, welche in die *Hind*III Klonierungsstelle des Vektors ligiert wurden (siehe Material und Methoden). Nach Transfektion von *E. coli* mit Phagenpartikeln sind zahlreiche Cosmid-Klone erhalten worden. Wie sich durch Restriktionsverdau herausstellte, trugen nicht alle Cosmid-Klone rekombinante *Arabidopsis* DNA. Daher wurde nach Übertragen etlicher Cosmid-Klone in 96er Mikrotiterplatten mit Hilfe von PCR nach solchen Klonen gesucht, welche rekombinante *Arabidopsis* DNA trugen. Für diese PCR dienten u.a. die oben erwähnten Oligonukleotidpaare der genetischen Marker. Da die Position der genetischen Marker bekannt ist, ermöglichte dieses Vorgehen auch eine grobe Zuordnung der chromosomalen Position der positiven Cosmid-Klone. Eine genaue Zuordnung, welche Cosmide welchem genomischen Abschnitt der *TOR1* Region entsprechen, wurde anschließend durch Restriktionsverdau der rekombinanten Cosmide festgelegt (Abb. 13). Da inzwischen Sequenzinformation für den gesamten *TOR1* Bereich vorlag, konnten durch Einsatz von Computeranalysen Restriktionsfragmentprofile für die verwendeten BACs F21F11 beziehungsweise T24A18 und deren resultierende rekombinante Cosmide erstellt werden.

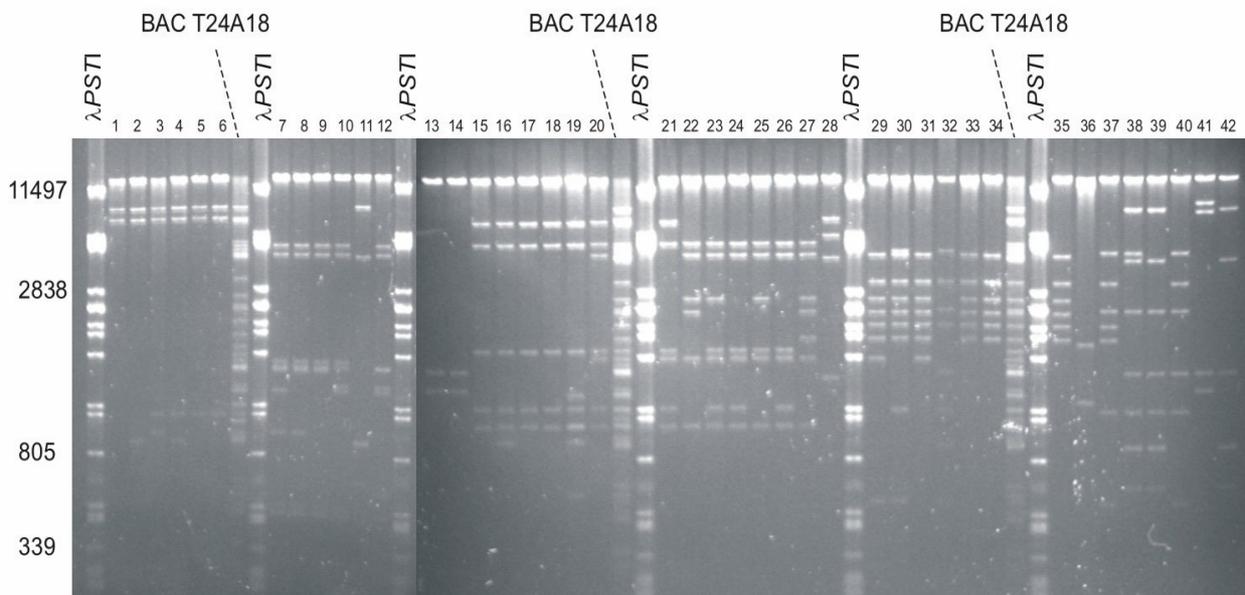


Abb. 13. Mit *Hind*III verdaute Cosmide und BAC T24A18 nach Auftrennung im 1 % Agarosegel. Als DNA-Längenstandard dient ? *Pst*I. Von links nach rechts: 1 = 10BV, 2 = 8CV, 3 = 4GV, 4 = 1CV, 5 = 11FI, 6 = 1BI, 7 = 12AIV, 8 = 5GIV, 9 = 9FIII, 10 = 6EIII, 11 = 5GVI, 12 = 5DVI, 13 = 2BIV, 14 = 5DIII, 15 = 9FVI, 16 = 10DIV, 17 = 7DIII, 18 = 10DV, 19 = 12GI, 20 = 11CI, 21 = 7FI, 22 = 1GV, 23 = 1DV, 24 = 9GI, 25 = 4BI, 26 = 3CI, 27 = 1DI, 28 = 10CI, 29 = 9BI, 30 = 10HVI, 31 = 8HVI, 32 = 2BVI, 33 = 6FIV, 34 = 5FIV, 35 = 11HIII, 36 = 6HV, 37 = 8EIII, 38 = 12HIV, 39 = 6DIV, 40 = 12FI, 41 = 12EI, 42 = 10BI.

3.2.2.2 Komplementation von *tor1* Mutanten zum Wildtyp

Zur Transformation von *tor1* Pflanzen wurde eine Abfolge von einander überlappenden Cosmiden verwendet. Alle transformierten Cosmide stammten von BAC T24A18 ab. Die Cosmide überlappten einander um mindestens 6 kb. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass alle Gene bis zu einer Größe von 6 kb vollständig übertragen werden würden. Es wurden folgende Cosmide in *tor1* Pflanzen transformiert: 2BVI, 12FI, 8EIII, 10HVI, 9BI, 1DI, 11CI, 12GI, 12AIV, 5DVI, 4BI, 9GI, 11HIII und 9FIII. Bei den für die Komplementationsversuche verwendeten *tor1* Pflanzen handelte es sich um *tor1-2*, *tor1-5* und *tor1-6*.

Es wurden drei unabhängige, die *tor1* Mutation komplementierende Cosmide gefunden (Abb. 13, 14, 15). Für das Cosmid 2BVI wurden 4 transgene Wildtyp-Pflanzen und 3 transgene *tor1*-Pflanzen isoliert. Für das Cosmid 12FI wurden 6 transgene Wildtyp-Pflanzen und 1 transgene *tor1*-Pflanze isoliert. Für das Cosmid 8EIII wurden 4 transgene Wildtyp-Pflanzen (Abb. 15) und 1 transgene *tor1* Pflanze isoliert. Alle anderen Transformationen brachten nur transgene *tor1* Pflanzen hervor. Von besonderer Wichtigkeit sind dabei die Cosmide 10HVI und 9BI, da sie mit den komplementierenden Cosmiden teilweise überlappen. Für das Cosmid 10HVI sind 12 und für das Cosmid 9BI 3 transgene Pflanzen isoliert worden, die sämtlichst den *tor1* Phänotyp zeigten. Obwohl die Cosmide meist mehr als ein vollständiges Gen trugen, ließ sich aus diesen Ergebnissen direkt die Identität des *TOR1* Gens ableiten (Abb. 14). Demnach handelt es sich bei *TOR1* um das kurz zuvor sequenzierte und von MIPS annotierte Gen At4g27060 (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Die Annotierung von MIPS fordert ein Protein von 826 Aminosäuren (als hypothetisches Protein). Ein neuer Eintrag für das *TOR1* Gen wurde in den öffentlichen Datenbanken hinterlegt (*accession number* AJ249836).

Die Tatsache, dass die Komplementation der *tor1* Mutation durch ein bestimmtes Cosmid (2BVI, 12FI oder 8EIII) immer auch durch das Auftreten von nicht-komplementierten Pflanzen begleitet wurde, lässt sich durch einen unvollständigen Transfer der T-DNA erklären. Die Übertragung der T-DNA durch *Agrobacterium* beginnt an der rechten *border*; bei unvollständigen Transfers fehlen häufig Sequenzen aus dem Bereich der linken *border*. Daher war es insbesondere für die *tor1* nicht-komplementierenden Cosmide nötig, die Vollständigkeit der Übertragung der T-DNA im Komplementationsexperiment zu belegen. Dies konnte mit Hilfe der GUS-Reporter-Analyse geschehen, da die T-DNA der Cosmide zusätzlich ein vollständiges *GUS*-Gen enthält (siehe Material und Methoden). Nach Durchführung der GUS-Reporter-Analyse zeigten von 7 überprüften 10HVI-transgenen *tor1* Pflanzen 7 Pflanzen ein positives Ergebnis. Das Vorhandensein des linken Endes der T-DNA wurde für dieselben Pflanzen auch durch PCR belegt. Ferner wurde aus jener 200 ml 10HVI *Agrobacterium*-Kultur, welche zur Transformation von *tor1* Pflanzen verwendet wurde, eine

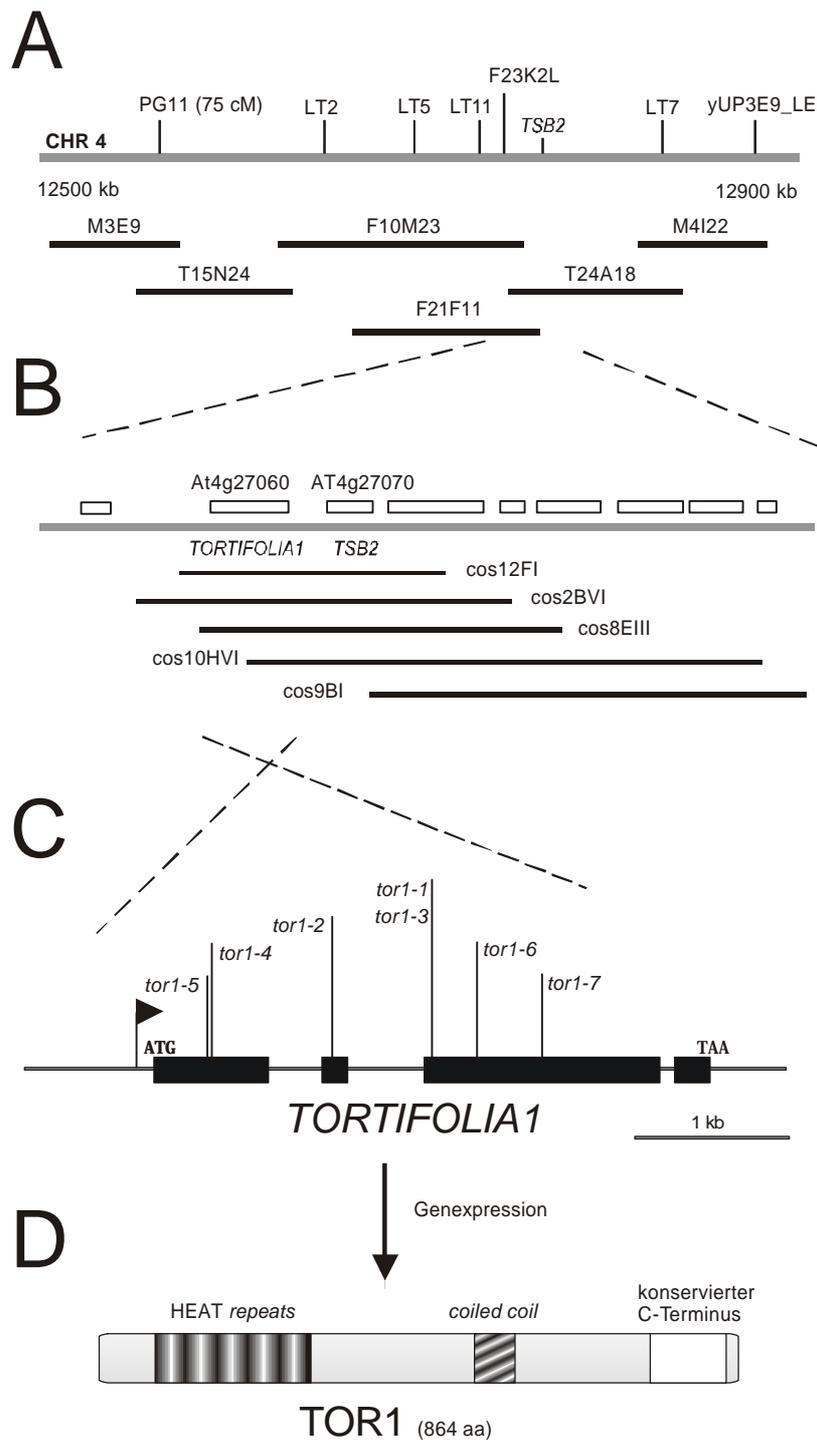


Abb. 14. Klonierung von *TOR1*, Analyse der *TOR1* Gen-Struktur, Identifikation der Mutationen in den *tor1* Allelen und Eigenheiten des TOR1 Proteins. (A) Für die Fein-Kartierung des *TOR1* Locus verwendete genetische Marker sind über dem Chromosom eingezeichnet. Die gesamte *TOR1* Region ist durch BAC-Klone repräsentiert. (B) Vergrößerung der *TOR1* Region mit annotierten Leserahmen. Die Cosmide 2BVI, 12FI und 8EIII komplementierten *tor1* zum Wildtyp, im Gegensatz zu den Cosmiden 10HVI und 9BI. Dies deutete darauf hin, dass At4g27060, direkt neben TSB2 gelegen, für TOR1 kodiert. (C) Struktur des *TOR1* Gens und Mutationsorte in verschiedenen *tor1* Allelen. Der durch 5' RACE bestimmte Transkriptionsstart ist durch ein Fähnchen angegeben. (D) Eigenheiten des TOR1 Proteins. Das Protein besteht aus 864 Aminosäuren (94,0 kDa). Im N-terminalen Bereich liegen 5 aufeinanderfolgende HEAT repeats. Der konservierte zentrale Teil des Proteins deutet auf die Ausbildung von coiled coil Strukturen. Der konservierte C-terminale Bereich des Proteins zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zu Domänen mit bekannter Funktion.

kleine Menge DNA isoliert und zur Transformation des *E. coli* Stammes NM554 verwendet. Insgesamt 6 der resultierenden NM554 Klone wurden bezüglich ihrer Cosmid-DNA analysiert: Es konnte keine Veränderung dieser Cosmid-DNA gegenüber dem ursprünglichen 10HVI Cosmid festgestellt werden. Demnach war die fehlende Komplementation von *tor1* Pflanzen durch das Cosmid 10HVI mit großer Sicherheit nicht auf ein verändertes Cosmid oder eine fehlerhafte Transformation zurückzuführen.

Mehrere Linien der transgenen, komplementierten *tor1* Pflanzen (2BVI, 12FI und 8EIII) wurden auf Segregation der Phänotypen in der T2-Generation untersucht. Alle auf Erde ausgebauten Linien der komplementierenden Cosmide zeigten wie erwartet einige Nachkommen mit Blatttorsionen, jedoch überwiegend Nachkommen mit Wildtyp-Phänotyp. Die Segregation der Phänotypen in der T2-Generation entspricht der als wahrscheinlich anzusehenden Situation, dass in der T1-Generation meist mehrere Kopien der komplementierenden T-DNA vorlagen, diese jedoch niemals in einer homozygoten Konfiguration auftritt.

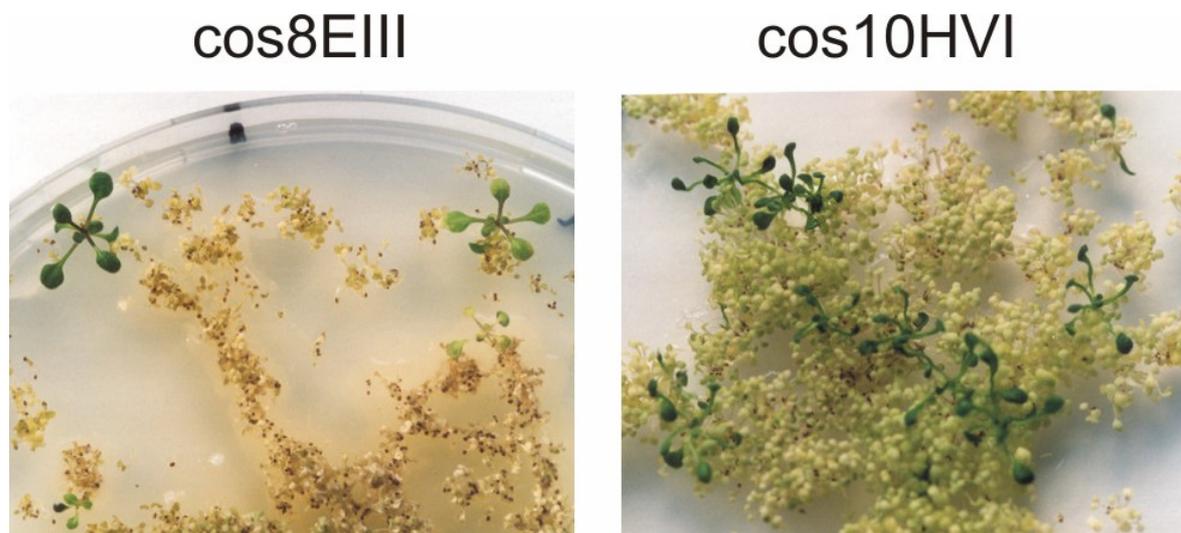


Abb. 15. Komplementation von *tor1* Pflanzen zum Wildtyp. Mit cos8EIII DNA transformierte *tor1* Pflanzen sind phänotypisch Wildtyp, während alle mit cos10HVI transformierte *tor1* Pflanzen den *tor* Phänotyp zeigen. Nicht transformierte Keimlinge zeigen keine Resistenz für Kanamycin. Sie vergilben und sterben schließlich ab.

3.2.3 Veränderungen des *TOR1* Gens in den *tor1* Mutanten

Um die Ergebnisse der Komplementation von *tor1* Pflanzen zu abzusichern, aber auch um ein tieferes Verständnis des *tor1* Syndroms zu erlangen, wurden die Veränderungen des *TOR1* Gens in den unabhängigen *tor1* Mutanten aufgespürt. Dafür wurde für die Allele *tor1-1* bis *tor1-8* das gesamte vorhergesagte Gen in überlappenden PCR-Fragmenten amplifiziert.

Die 0,57 bis 1,6 kb großen Fragmente zeigten zunächst für kein Allel eine Abweichung in ihrer Größe. Demnach trägt keines der *tor1* Allele eine größere Deletion im *TOR1* Gen. PCR-Produkte der drei größten Abschnitte wurden nun, um eine bessere Auflösung zu erzielen, mit Restriktionsenzymen verdaut und erneut analysiert. Dabei wurde für *tor1-2* ein *NlaIII*-Polymorphismus aufgedeckt. Für eine schnelle Identifikation weiterer Mutationsorte wurden über PCR Mischproben von *tor1* Allelen und entsprechender Wildtyp-DNA erzeugt. Die Fragmente wurden anschließend auf hochauflösenden MDE-Gelen (FMC Bioproducts) analysiert. Tatsächlich zeigten sich im Falle der Mutanten *tor1-4* und *tor1-5* zusätzliche Banden, welche offensichtlich auf Heteroduplices, bestehend aus Einzelsträngen des Wildtyps und der Mutante, zurückzuführen waren (Abb. 16).

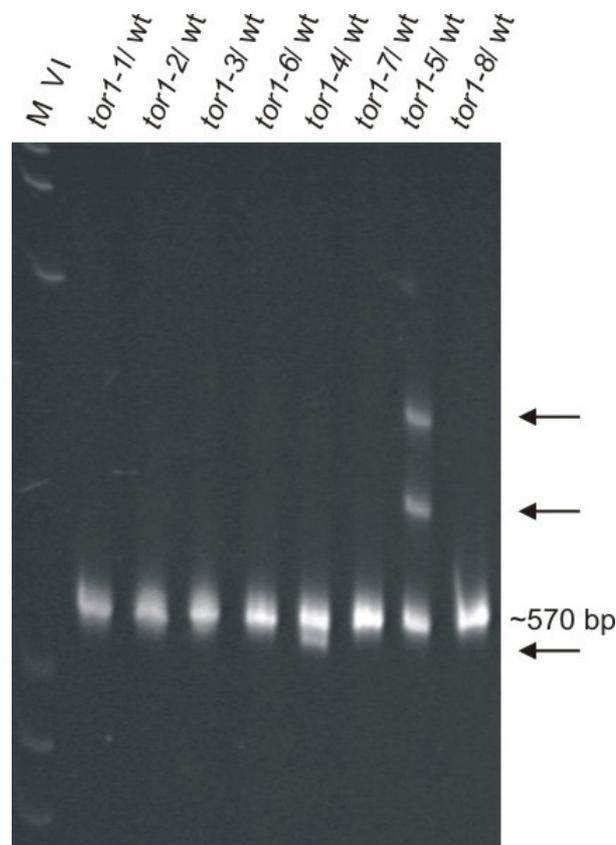


Abb. 16. Detektion der Mutationen in zwei *tor1* Mutanten. Mischungen von *tor1* DNA mit DNA des jeweiligen Wildtyps wurden für die Amplifikation durch PCR mit den Oligonukleotiden T1-5R und T1-7F eingesetzt. Nach der PCR wurde die Formierung von Heteroduplices ermöglicht. Die Elektrophorese der Fragmente (~570 bp) erfolgte auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel (MDE-Gel). Pfeile zeigen Duplices an, welche vermutlich aus Hybriden der Mutanten- und der Wildtyp-DNA bestehen. Die anschließende Sequenzierung bestätigte, dass die Mutationen von *tor1-4* und *tor1-5* in diesem Fragment lagen. M VI Roche Marker VI.

Schließlich wurde durch DNA-Sequenzierung die spezifische Veränderung des *TOR1* Gens für die Allele *tor1-1* bis *tor1-6* und *tor1-8* belegt. Dafür wurden jeweils die kodierenden Sequenzen eines Allels mit den Sequenzen des zugehörigen Wildtyps verglichen. Nur im

Fälle der Mutante *tor1-7*, welche durch T-DNA Mutagenese entstanden war, konnte bisher keine Mutation für das *TOR1* Gen aufgedeckt werden. Die Mutationen der Mutanten *tor1-1* bis *tor1-6* und *tor1-8* befinden sich im vorderen und mittleren Bereich des *TOR1* Leserahmens (Abb. 14, Tab. 6). In allen Fällen führen die Mutationen zu einer frühzeitigen Termination der Translation. Wo die Mutation durch eine einfache Transition entstanden ist, resultiert immer ein *nonsense* Kodon. Transitionen sind das typische Ergebnis bei Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS). Im Falle der Mutanten *tor1-5* und *tor1-8* treten jedoch kleinste Deletionen auf. Beide Mutanten sind durch Strahlung erzeugt worden: Röntgenstrahlung im Falle von *tor1-5* und Neutronenstrahlung im Falle von *tor1-8* (Tab. 6). Die Deletionen führen zu *frameshifts* und anschließend zur frühzeitigen Termination der Translation, nämlich nach sechs fremden Aminosäuren im Falle der Mutante *tor1-5* und nach 53 fremden Aminosäuren im Falle der Mutante *tor1-8*.

Alle untersuchten *tor1* Allele sind rezessiv. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachteten Veränderungen sämtlichst zu einem Ausfall der *TOR1* Funktion führen. Man kann außerdem vermuten, dass *missense* Mutationen anstelle der beobachteten *nonsense* und *frameshift* Mutationen nicht zu einem *tor* Phänotyp führen.

Um die *tor1-1* und die *tor1-3* Mutation in Präparationen genomischer DNA detektieren zu können, sind zwei Oligonukleotide für die Amplifikation durch PCR geschaffen worden (F104p-F und F104p-R). Nach Verdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *BspHI* wird ein dCAPS Polymorphismus (Neff et al. 1998) gegenüber der Wildtyp-DNA offenbar.

Kürzlich sind für das *TOR1* Gen weitere T-DNA Insertionen bekannt geworden (SALK_094291 und SALK_009305). Solche Insertionen wurden in Sammlungen von Insertionsmutanten durch Sequenzierung der an die T-DNA angrenzenden pflanzlichen DNA entdeckt (Salk T-DNA Linien; Alonso et al. 2001). Ob diese Insertionsmutanten den zu fordernden Phänotyp zeigen, ist noch nicht bekannt.

Tabelle 6. Mutationen des *TOR1* Gens.

Allel	Synonym	Mutagen	Veränderung	Konsequenz ^a	Position ^b
<i>tor1-1</i>	F104	chemisch?	Transition	Termination	960
<i>tor1-2</i>	450401	EMS	Transition	Termination	805
<i>tor1-3</i>	500805	EMS	Transition	Termination	960
<i>tor1-4</i>	TL2	EMS	Transition	Termination	373
<i>tor1-5</i>	convoluta	Röntgen-Strahlung	Deletion	Frameshift + Termination	341-342
<i>tor1-6</i>	propellor	EMS	Transition	Termination	1237
<i>tor1-7</i>	CVC8	T-DNA Transfer	? (T-DNA ist nicht im Gen inseriert)	?	?
<i>tor1-8</i>	spiral2	schnelle Neutronen	Deletion	Frameshift + Termination	1651

^abezogen auf die Translation des *TOR1* Gens; ^bin Basenpaaren, Zahlen beziehen sich auf die Position im *TOR1* Leserahmen (Gesamtlänge des *TOR1* Leserahmens ist 2592 bp).

3.3 Molekulare Analyse von *TOR1*

3.3.1 Die Struktur des *TOR1* Gens

Nachdem die Identität des von MIPS annotierten Gens At4g27060 mit *TOR1* festgestellt worden war, galt es die Vorhersagen für dieses Gen zu überprüfen. Für die Existenz des Gens At4g27060 gab es zunächst jenseits der Computeranalysen keinen Hinweis, entsprechend wurde das Genprodukt von At4g27060 von MIPS als hypothetisches Protein eingestuft. Heute hingegen ist ein EST, welcher vom *TOR1* Gen abstammt, bekannt (siehe unten).

Die ursprüngliche Annotation des *TOR1* Gens durch MIPS beinhaltet eine Vorhersage für die Positionen von vier Exons und drei Introns im Gen. Die tatsächliche Position von Introns im *TOR1* Gen wurde durch Sequenzierung mehrerer überlappender cDNA-Fragmente, welche durch RT-PCR erzeugt worden waren, ermittelt. Dazu dienten Oligonukleotide des *TOR1* Gens (Material und Methoden). Nachdem eine vollständige *TOR1* cDNA durch PCR erzeugt worden war (siehe unten), wurde auch diese ganz sequenziert. Alle Sequenzierungen bestätigten die Vorhersagen für die Position und Anzahl von Introns im *TOR1* Gen durch MIPS (Abb. 14; siehe Anhang).

Die Vorhersagen von MIPS für At4g27060 (*TOR1*) beinhalten auch eine Prognose für den Translationsstart. Diese Vorhersage wurde nun experimentell untersucht. Die Bestimmung des 5' Endes der *TOR1* mRNA erfolgte mit der 5' RACE Technologie (siehe Material und Methoden). Die erste PCR mit Hilfe der synthetisierten 5' cDNA führte nur zu einer schwachen Bande im Agarosegel. Die darauf folgende *nested* PCR lieferte starke Produkte. Diese PCR-Produkte wurden in den pGEMT[®]-Easy Vektor subkloniert. In einem Agarosegel wurden anschließend 21 positive Klone analysiert. Diese zeigten unterschiedlich große Insertionen. Von den 21 Klonen wurden 9 mit möglichst unterschiedlichen Insertionen ausgewählt und sequenziert. Alle Sequenzen setzten nach unterschiedlich häufigen Wiederholungen des Nukleotids G (vermittelt durch die Terminale Transferase des Kits) an der gleichen Stelle im *TOR1* Gen ein: 193 Nukleotide stromaufwärts des ursprünglich von MIPS angenommenen Translationsstarts (Abb. 14). In diesem Bereich liegt ein weiterer möglicher Translationsstart (ATG). Er befindet sich im gleichen Leserahmen wie das folgende erste Exon des *TOR1* Gens. Wird dieses ATG als Translationsstart verwendet, bedeutet dieses eine N-terminale Verlängerung des *TOR1* Proteins um 38 Aminosäuren. Der 5' untranslatierte Teil der *TOR1* mRNA beträgt dann 79 Nukleotide. Beide Translationsstarts befinden sich nicht im optimalen Kontext, wenn der für Vertebraten bestimmte optimale Kontext zugrunde gelegt wird (Kozack et al. 1987; siehe die Sequenz des *TOR1* Gens im Anhang). Der Vergleich mit dem Kontext der Translationsinitiation pflanzlicher Gene zeigt aber, dass beide Sequenzen keine ungewöhnliche Abweichung gegenüber der Situation eines durchschnittlichen pflanzlichen Gens darstellen (Joshi et al. 1997).

Der Nukleotid-BLAST mit der *TOR1* Sequenz gegen eine Datenbank von EST Sequenzen aus *Arabidopsis* ergibt eine 99 % bis 100 % Homologie mit der 5' beziehungsweise 3' Sequenz des Klons RAFL14-53-L10 (Seki et al. 2002). Offensichtlich ist dieser einzige vom *TOR1* Gen stammende EST-Klon nicht vollständig in Bezug auf sein 5' kodierendes Ende, da zwischen Translationsstart und dem Einsetzen der EST-Sequenz 203 bp fehlen. Die 3' Sequenz des Klons zeigt, dass das 3' untranslatierte Ende der *TOR1* mRNA mindestens 170 Nukleotide lang ist. Der Klon entstammt einer cDNA-Bank aus *Arabidopsis* Wurzeln.

3.3.2 Northern Analysen und RT-PCR

Die Expression des *TOR1* Gens in den verschiedenen Organen von *Arabidopsis* wurde durch Northern Analysen und RT-PCR untersucht. Bei der Analyse durch Northern Blots wurde eine radioaktiv markierte Sonde, welche durch PCR mit den Oligonukleotiden T1-2R und T1-4F1 erzeugt worden war, verwendet. Die Expression des *TOR1* Gen lieferte immer nur eine einzelne mRNA von etwa 3,0 kb. Expression von *TOR1* wurde in allen getesteten Organen des Wildtyps festgestellt: in Wurzeln, im Stamm der Infloreszenz, in terminalen Anteilen der Infloreszenz (mit Einzelblüten), im Blattstiel und in ganzen Blättern. Insgesamt war die Expression des *TOR1* Gens schwach und relativ gleichmäßig, lediglich die terminalen Anteile der Infloreszenz zeigten eine etwas verstärkte Expression (Abb. 17). Die Northern-Analysen zur Organspezifität wurden einmal wiederholt und lieferten im Wesentlichen dasselbe Ergebnis. Beide Versuche waren von der Anzucht der Pflanzen bis zur Detektion der Signale unabhängig.

Aufgrund der Schwäche der Signale wurde die Organspezifität der *TOR1* Expression auch mit RT-PCR untersucht. Dafür diente dieselbe Gesamt-RNA, welche in der dargestellten Northern-Analyse verwendet wurde. In der RT-PCR wurden die Oligonukleotide T1-3R und T1-6F verwendet. Das Ergebnis der RT-PCR zeigt eine relativ gleichmäßige Expression von *TOR1* für alle untersuchten Organe an (Abb. 17).

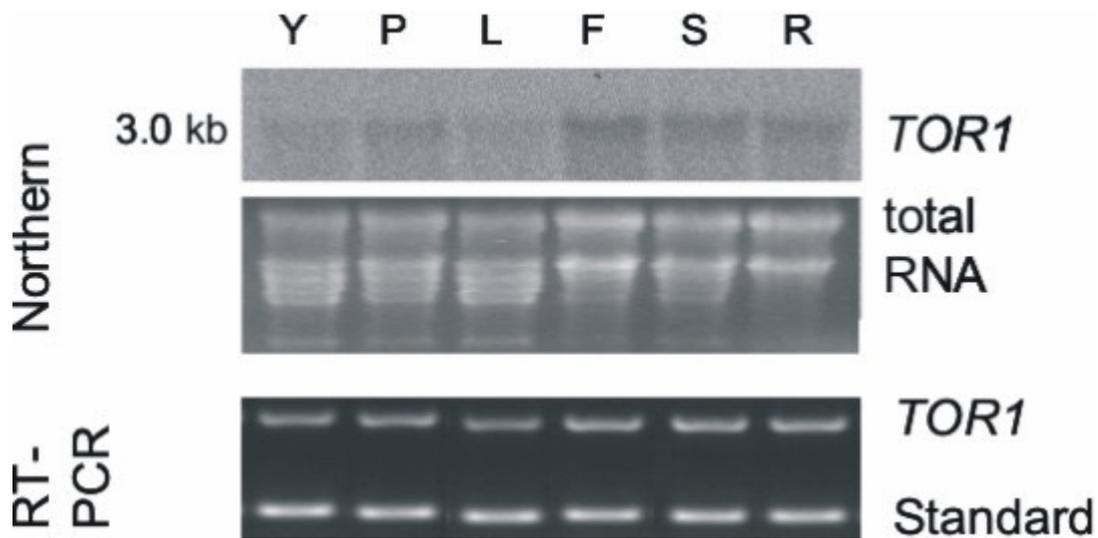


Abb. 17. Northern Blot Analyse und RT-PCR zur Expression des *TOR1* Gens. Gesamt-RNA verschiedener Organe des *Arabidopsis* Ökotyps Col wurde im Formaldehydgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Membran wurde die RNA mit einem radioaktiv markierten Fragment des *TOR1* Gens hybridisiert. Die Signale wurden mit dem FLA-3000 Phosphoimager (Fuji) detektiert (oben). Die Gesamt-RNA derselben Präparation wie in (A) wurde mit RT-PCR analysiert. Als interner Standard diente eine artifizielle mRNA (unten). Y junges Blatt, P Petiole, L Blatt, F Blüte, S Stamm der Infloreszenz, R Wurzel.

3.3.3 Expressionsanalyse mit Hilfe des *TOR1* Promotors

3.3.3.1 Synthese eines *TOR1*-Promotor-*GUS* Konstruktes

Um eine Analyse der *TOR1* Genexpression auf Ebene der Gewebe und Zellen zu ermöglichen, wurde der *TOR1* Promotor isoliert, an das *GUS* Reporter gen (Jefferson 1987) gekoppelt und dieses Konstrukt in *Arabidopsis* Wildtyp (Col und Ler) transformiert. Das *TOR1* Gen und das Tryptophan Synthase $\beta 2$ Gen (*TSB2*, Last et al. 1991) liegen Kopf an Kopf: Beide Gene teilen sich einen Bereich von weniger als 1,4 kb um darin beide Promotoren unterzubringen. Ob sich der *TOR1* Promotor mit dem *TSB2* Promotor oder sogar mit der kodierenden Sequenz des *TSB2* Gens überschneidet, ist nicht bekannt. Der hier verwendete *TOR1* Promotor enthält etwa 800 bp aus dem kodierenden Bereich des *TSB2* Gens.

Ausgangspunkt für die Klonierungen war ein pBluescript-Derivat, welches die *GUS* kodierende Sequenz inklusive Sequenzen zur 3' Prozessierung in Pflanzen enthielt (genannt pGUSpA-K, siehe Material und Methoden). In dieses Plasmid wurde ein kurzes PCR-Fragment (etwa 80 bp) ligiert, welches einem Stück aus dem *TOR1* 5' untranslatierten Bereich inklusive des *TOR1* Translationsstarts entsprach. Dies erfolgte mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Nco*I, welche durch die verwendeten Oligonukleotide (TPBgIII-F und TPBgIII-R) in das Fragment eingeführt worden waren. Der *TOR1* Translationsstart selbst war in die *Nco*I-Stelle (CCATGG) eingekleidet worden und bildete nun den Translationsstart für *GUS*. In diesem kurzen PCR-Fragment lag außerdem die

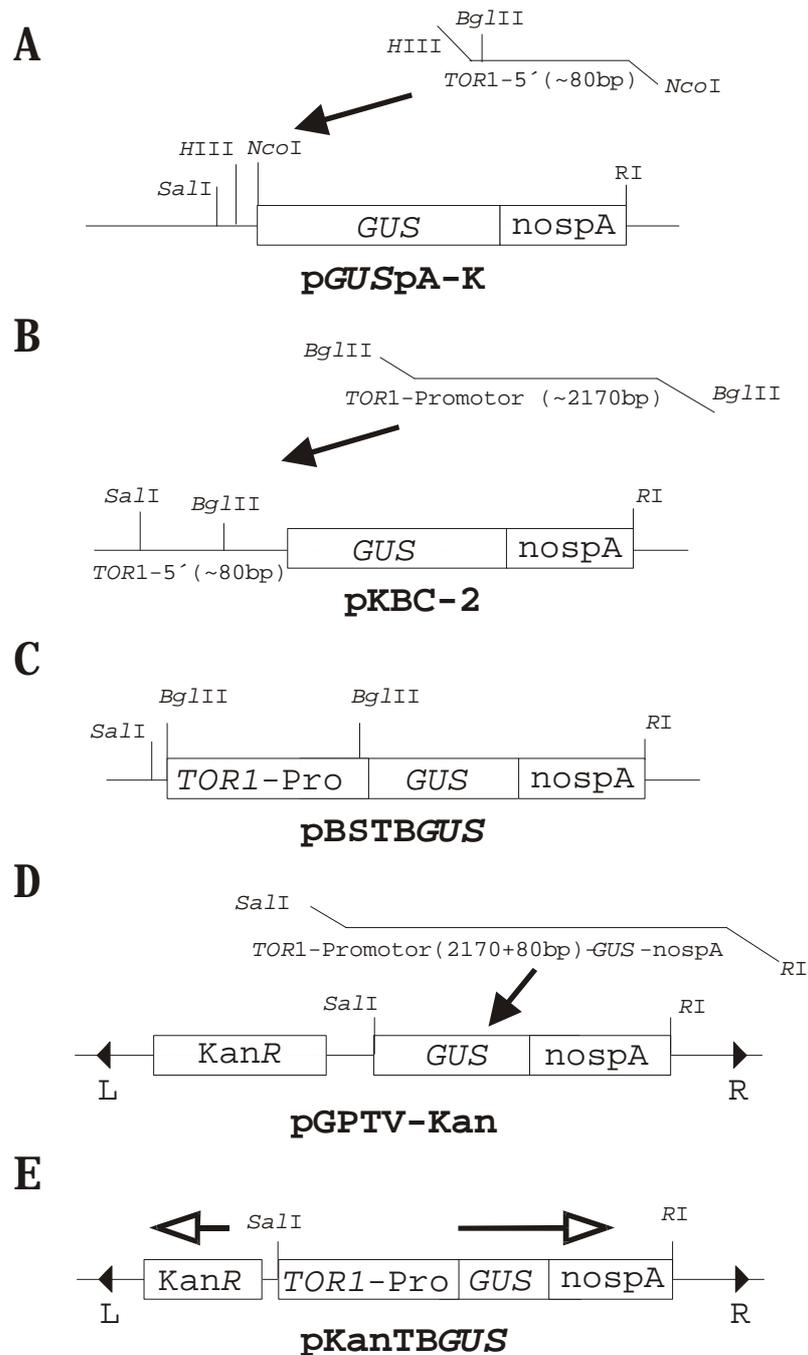


Abb. 18. Klonierungsschema für die Synthese eines *TOR1*-Promotor-*GUS* Konstruktes. Detaillierte Beschreibung im Text. (A) Das Ausgangsplasmid pGUSpA-K. (B) Das Plasmid pKBC-2 enthält den ~80 bp Adapter zum *TOR1* Promotor. (C) pBSTBGUS ist das Ergebnis der beiden ersten Klonierungsschritte. Es enthält das *TOR1*-Promotor-*GUS* Gen. (D) Das *TOR1*-Promotor-*GUS* Gen wird auf pGPTV übertragen. (E) Das fertige pKanTBGUS Plasmid. Offene Pfeile in E geben die Richtung der Transkription an. Schwarze Dreiecke in D und E zeigen die *border* Sequenzen der T-DNA an.

native *BglIII*-Schnittstelle (Abb. 18A). Im nächsten Schritt wurde in diese *BglIII*-Schnittstelle das sich in 5' Richtung anschließende *BglIII*-Fragment des *TOR1* Promotors kloniert (Abb. 18B). Das resultierende Plasmid wurde pBSTBGUS genannt (Abb. 18C). Das etwa 2170 bp große *TOR1* Promotor-Fragment war zuvor aus dem Cosmid 12FI (Abb. 13, 14) isoliert

worden. Nach Selektion von Plasmiden mit richtiger Orientierung des Promotors wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SaI* das gesamte *TOR1*-Promotor-*GUS*-Gen isoliert und in den zur Pflanzentransformation geeigneten Vektor pGPTV-Kan (Becker et al. 1992) eingefügt, wobei die im pGPTV-Kan Vektor befindliche *GUS-nospA* Sequenz entfernt wurde (Abb. 18D). Das resultierende Plasmid wurde pKanTB*GUS* genannt (Abb. 18E).

3.3.3.2 Expression von *GUS* durch den *TOR1* Promotor in transgenen *Arabidopsis*

Die Übertragung des *TOR1*-Promotor-*GUS* Konstruktes mit Hilfe von pKanTB*GUS* lieferte 60 transgene, gegen Kanamycin resistente *Arabidopsis* Linien. Alle Linien wurden auf Expression des *GUS* Gens untersucht. Dieses erfolgte nach dem Protokoll zur *in situ* Färbung mit X-Gluc. Leider konnte nur bei vier Linien eine Aktivität des *GUS*-Enzyms nachgewiesen werden; von diesen lieferten 3 Linien Samen und wurden auch in den Nachfolgenerationen untersucht (Linien A3, B6 und B29).

Obwohl die Expressionsmuster der 4 Linien nicht identisch waren, sondern möglicherweise komplementär, lässt sich folgendes Expressionsmuster ableiten: Wurzelspitzen jeden Alters zeigten eine starke Expression. Dieses galt auch für Seitenwurzeln. Zentrale Gewebe der Wurzel, vermutlich das Leitgewebe, zeigten im distalen Bereich der Wurzel schwache Expression. Das Hypokotyl von bei Licht angezogenen Pflanzen (3 DAG) zeigte schwache Expression in Epidermis und Kortex. Stärkere Expression fand sich in zentral gelegenen Geweben des Hypokotyls, vermutlich dem Leitgewebe. In den Petiolen aller Blätter wurde Expression festgestellt, und zwar vorwiegend im Leitgewebe. Die Laminae älterer Blätter zeigten häufig keine gefärbten Leitgewebe. Auffällig starke Expression wurde im Bereich des Sprossmeristems, insbesondere in den sehr jungen Blättern und im Stamm der jungen Infloreszenz beobachtet. Diese Organe waren vollständig blau gefärbt, zeigten also Expression in den äußeren und vermutlich in den inneren Zellschichten (Abb. 19). Die Analyse der Expression von *GUS* durch den *TOR1*-Promotor wurde nicht vertieft, da Ergebnisse einer unabhängigen Methode zur Überprüfung der beobachteten *TOR1* Expression fehlten (zum Beispiel *in situ* Hybridisierung).

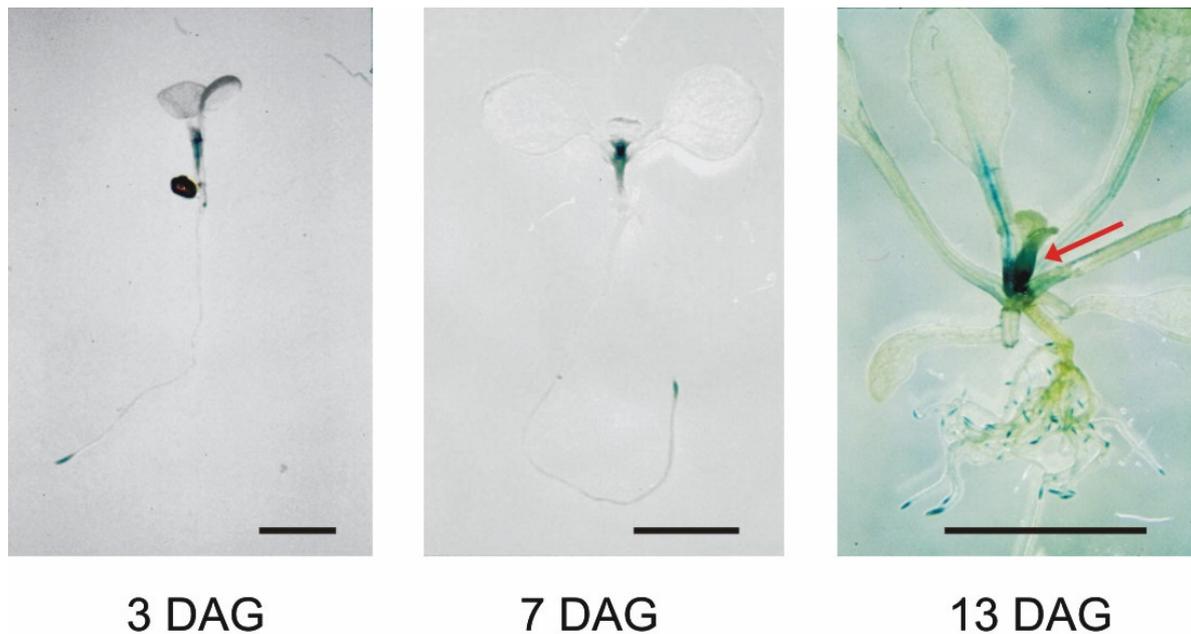


Abb. 19. GUS-Aktivität in der mit dem *TOR1*-Promotor-*GUS* Konstrukt transformierten *Arabidopsis* Linie A3. Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen auf Agar herangezogen und dem GUS-Assay unterworfen. Die Pflanzen haben ein Alter von 3, 7 und 13 DAG. Der Pfeil weist auf die Basis der entstehenden Infloreszenz. Balken 1 cm.

3.3.4 Southern Blot Analyse des *TOR1* Gens

Bei *TOR1* handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein *single copy* Gen. Dieses geht hervor aus BLAST-Suchen mit der *TOR1* Gensequenz gegen die Nukleotidsequenz des gesamten *Arabidopsis* Genoms. Lediglich das Gen des verwandtschaftlich nächsten Mitgliedes der *TOR1* Proteinfamilie (siehe unten) konnte so aufgespürt werden, allerdings bei sehr niedriger Ähnlichkeit auf Nukleotidebene. Ferner konnte im Southern Blot Experiment mit genomischer DNA aus *Arabidopsis* (Ökotyp Col) kein Genfragment, welches nicht offensichtlich zu *TOR1* gehörte, detektiert werden (Abb. 20). Als Sonde diente ein PCR-Fragment, welches mit den Oligonukleotiden T1-4F1 und T1-2R erzeugt worden war. Mit dieser Sonde können nach Verdau der genomischen DNA folgende Fragmente des *TOR1* Gens detektiert werden: 2439 bp (*HindIII*), 5955 bp (*SphI*) und 1101 beziehungsweise 5054 bp (*BamHI*).

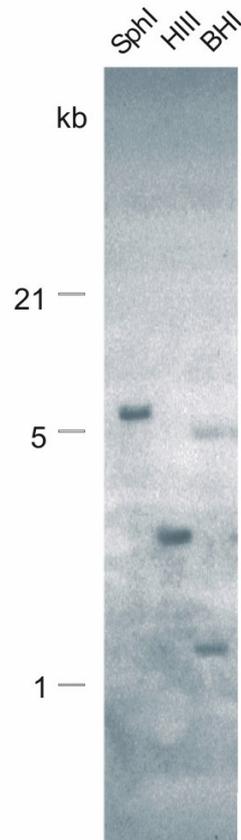


Abb. 20. Southern Blot Analyse des *TOR1* Gens. Genomische DNA des *Arabidopsis* Ökotyps Col wurde mit den Restriktionsenzymen *SphI*, *HindIII* und *BamHI* verdaut und auf einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Nachdem die DNA auf eine Membran transferiert worden war, wurde sie mit einem radioaktiv markierten Fragment des *TOR1* Gens hybridisiert. Nach nicht-stringentem Waschen des Blots wurden die Signale mit einem Röntgen-Film detektiert.

3.4 Das TOR1 Protein

3.4.1 Wesentliche Eigenschaften des TOR1 Proteins

Die abgeleitete TOR1 Polypeptidkette hat eine Länge von 864 Aminosäuren. Das TOR1 Protein hat eine vorhergesagte Masse von 94,0 kDa. Der pH-Wert des isoelektrischen Punktes (pI) liegt bei 5,47. Entsprechend Vorhersagen für die Sekundärstruktur von Proteinen sollte TOR1 überwiegend aus α -Helices und β -Schleifen bestehen. Insbesondere im N-terminalen Teil von TOR1 wechseln sich α -Helices und β -Schleifen regelmäßig ab (etwa alle 18 bis 20 Aminosäuren). Kurze Abschnitte, die die Struktur des β -Faltblatts ausbilden könnten, sind verteilt im Protein vorhanden, nehmen aber nur ungefähr 6 % der Aminosäurepositionen ein. Das Protein könnte insgesamt globulär sein, enthält aber vermutlich mehrere Domänen (PredictProtein Server, siehe Material und Methoden). Mit 11,0 % ist Serin im TOR1 Protein die häufigste aller Aminosäuren, gefolgt von Leucin mit 9,3 %. Serin und Threonin machen 16,1 % des Proteins aus.

3.4.2 Eine neue Familie von Proteinen in *Arabidopsis*

Die Klonierung des *TOR1* Gens belegte die Existenz einer neuartigen Familie pflanzlicher Proteine. BLAST-Suchen (Altschul et al. 1997) mit der TOR1 Sequenz wiesen auf sechs im *Arabidopsis* Genom kodierte, mit TOR1 eng verwandte Proteine hin. Diese Proteine waren

von den Genen At1g50890 (Protein F8A12.11), At2g07170 (T25N22.13), At1g27210 (T7N9.27), At1g59850 (F23H11.17), At5g62580 (K19B1.19) und At4g27060 (T24A18.10; entspricht TOR1) abgeleitet worden. Das TOR1 am stärksten ähnelnde Protein, F8A12.11 (Genbank *accession* AAG50927), zeigte 53 % identische Aminosäurepositionen in der Polypeptidkette und 66 % Homologie bei Berücksichtigung konservativer Austausche. Im Ergebnis der BLAST-Suche wurde angegeben, dass die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Ähnlichkeit von F8A12.11 mit TOR1 gleich 0 ist (der sogenannte Erwartungs- oder E-Wert). Innerhalb der TOR1 Familie ist K19B1.19 am wenigsten ähnlich mit TOR1; der E-Wert im Sequenzvergleich ist dennoch signifikant und liegt bei $5e^{-045}$. Wenig Schwierigkeiten bestanden in der Abgrenzung der TOR1 Familie gegenüber entfernt verwandten Proteinen aus *Arabidopsis*. Beispielsweise zeigt das Protein F20D21.21 im Vergleich zu TOR1 19 % identische Aminosäuren, allerdings nur in einem N-terminalen Bereich von etwa 300 Aminosäuren. Für diesen Sequenzvergleich wurde nur ein E-Wert von 0,008 erzielt. Reziproke BLAST-Suchen belegten dennoch eine Verwandtschaft zur TOR1 Familie. Aufgrund der großen verwandtschaftlichen Entfernung wird das Protein F20D21.21 im Folgenden aber nicht zur TOR1 Familie im strengen Sinn gerechnet. Keinem der oben erwähnten, mit TOR1 mehr oder weniger verwandten Proteine war bisher eine Funktion zugewiesen worden.

Die TOR1 Sequenz weist beim Vergleich mit den Sequenzen der Mitglieder der Familie aus *Arabidopsis* Regionen unterschiedlich starker Konservierung auf (Abb. 21). Starke Konservierung findet sich in einem großen N-terminalen, in einem kurzen zentralen und in einem kurzen C-terminal gelegenen Teil. Der konservierte C-terminale Bereich ist allerdings nur in F8A12.11 und T25N22.13, den beiden mit TOR1 nächstverwandten Proteinen vorhanden (siehe unten).

Abb. 21. Linearer Sequenzvergleich der Mitglieder der TOR1 Proteinfamilie aus *Arabidopsis* (umseitig). Alle Proteine sind in ihrer gesamten Länge dargestellt. Putative HEAT *repeats* befinden sich am N-Terminus der Proteine (grau unterlegt) und sind nummeriert. Die hypothetische *coiled coil* Region ist mit einem Rahmen umschlossen, der mögliche *stutter* (Brown et al. 1996) ist gekennzeichnet (ebenfalls grau unterlegt). Die C-terminale konservierte Region, nur vorhanden in TOR1, F8A12.11 und T25N22.13, ist unterstrichen. Der Sequenzvergleich wurde mit Clustal W (Thompson et al. 1994) erstellt. * identische Aminosäure; : konservativer Austausch; semi-konservativer Austausch.

```

TOR1      MSTPTTSGSAAKPTRPARSSSLATRSCSNSSGLTSFQAMVELKQKILTSISKLADRDTYQ 60
F8A12.11  -----MVELKQRILTSLSRLGDRDTYQ 22
T25N22.13 -----MKTNMQVKGRGGNMKANTNTQQVIFELKKKVIALNKLADRDTYQ 45
K19B1.19  -----MATKNSKQNMVLLTKLGDRDTFT 24
T7N9.27   -----MSVHGRFPASPPIISLSPSSSSTSPSSQSPSTPPDLKQRVIACLNKLADRDTLA 53
F23H11.17 -----MPSVQIRSSPS----HSQPAMTVTDLKQRVIACLNRLSDRDTLA 40
          : *:: : :*.***

          1 1
TOR1      IAVEDLEKTIQSLT--PETLP----MFLNCLYDSCSDPKPAVKKECLHLLSYVCSLHC-D 113
F8A12.11  IAVDDLEKIVVSVDPSP EILP----VLLHCLFDSSSDLKAPVKRESIRLLSFLCLS YT-D 77
T25N22.13 RGVDELEKTVEHLA--PDKVS----CFLSCILDTDSEQKSAVRKECIRLMGTLARFHE-G 98
K19B1.19  MAARELDLMARQID--PSSSSGNLQSFISVILSVDTGDKPAVRKHCIIHLLAVLSVSLPLN 82
T7N9.27   LASAELDSIARNLT--HDSFS----PFLNCIHNTDSSVKS PVRKQCVALLSVLSRYHG-D 106
F23H11.17 LAAAELDSIALNLS--PETFS----LFINCLQSTDS SAKSPVRKHCVSLLSVLSRSHG-D 93
          . *: : . . : : . : *..*::: : *..* . .
          .

          2 2 3
TOR1      STAAHLTKIIAQIVKRLKDSDSGVRDACRDTIGALSIGIYLLKKEEGTNTGSASLAVGLFV 173
F8A12.11  LSFSQLAKIISHIVKRLKDADNGVRDACRDAIGSLSAQFLKEKEVENGNVYGS SSVLGLFA 137
T25N22.13 LVGPYLGKMVSSIVKRLKDPDSVVRDACIETMGVLASKMSCYEDQN-----FGVFVSLV 152
K19B1.19  SLSPFLSKILTRITRRLRDPDSSIRS TCVAAVSAISSRTTK-----PPFYSAFM 131
T7N9.27   SLTPHLAKMVSTVIRRLRDPDSSVRSACAVATADMSAHVTR-----QPF-ASVA 154
F23H11.17 SLAPHLKMOVSTVLRRLRDPDSSVRACVAASVDMT TNITG-----QPF-SILE 141
          . * *::: : :*:*. * . * * : : :
          .

          3 4
TOR1      KPLFEAMG-EQNKVVQSGASMCMARMVES AASPPVTSF-QKLCPRICKLLSNSFLAKAS 231
F8A12.11  KPLFEAMA-EQNKSLQSGAAICMGKMTDSAT EPPVAAF-QKLCPRISKLLSNPNYITKAS 195
T25N22.13 KPLFEAIG-DQNKYVQSGAALCLARVIDSSPE APVAII-QRMLMRTVKLLNNSHFIAKPA 210
K19B1.19  KPLADTLFTEQEVNAQIGAALCLAAALD SASDPEFVRLGQTL LPRLEKLVKCNFAKAKSA 191
T7N9.27   KPLIETLIQEGDNLQIGAALCLAAASVDAATD PESEQL-RKSLPKIGKLLKSDGFKAKAA 213
F23H11.17 GPMIETVIHDCDPNAQISAAMCLAAAVDAAD EFDVEQL-QKALPKIGKLLKSEGFKAKAE 200
          *: : : : : * .*:*. : : : : : : : : : * : : * : : *
          .

          4 5
TOR1      LLPVVSSLSQVGA-----IAPQSLES LLESIHDC LGSTDWVTRKAAAE TLTALASHSSL 286
F8A12.11  LLPVVGSLSQVGA-----IAPQSLES LLHSIHECLGCTNWVTRKAAADV LISLAVHSSSL 250
T25N22.13 VIELNRSIILAGG----ATSKSVLSSAMSSE QDALKNKDWTRKAAASVALMEIAATGEKF 266
K19B1.19  GVVVIGSVIGAGGLSGT SVSSGGLKGLVDCLLSFLVSE DWAARKAAAEALGRLATMERNE 251
T7N9.27   LLSAVGSIITAGG----AGTKPVLDWLV PVLIEFLSSEDWAARKSAAEALGKVAT-AEDL 268
F23H11.17 LLGAIGTVIGAVGGR--NSEKAVLDWLLPNV SEFLSSDDWRARKAAAEAMARVAMEEEL 258
          : : : . . * . : . . * : * : * : * : : : *
          .

TOR1      IKEKTDSTITVLETFRFDKIKPVRESVTEALQLWKKISGKYVDGASDDSKLSASEQLGSE 346
F8A12.11  VADKTDSTLTALEACRFDKIKPVRESLSEALNVWKN IAGKGESGTMDDQKDVSSSEQCILE 310
T25N22.13 LGPLKASCICSLSCRFDKVKPVRDVSILALKYWKGV PGSDSPEPSETESSVKESYNGAR 326
K19B1.19  LGEFKAKCLKIFESRKYDKVAVREVMNQMM EAWKQVP-----DLSEEVSPPRSNAS 303
T7N9.27   ASQYKKTCTTALESRRFDKVKSVRET MNRALNLWKEVST-----DDEASLSPSR--- 318
F23H11.17 APLYKKTCLGILESRRFDKVKLVRET MNRTLGLWKQLE-----GDSTEVSESSS--- 307
          . . :*: :*: * * : : : * :
          .

TOR1      -----KNGEKRSN---LADLMKKEASDGSTL SPDSASKGKGFPEKAV 386
F8A12.11  -----RNGETDSVSC EAGLVMQGGCDGLSSSDSIS-----KAV 345
T25N22.13 ESSELFSTSDFKVKDGM SIKYVTDVTRKKV PVSARQPTRYND DPRKSNQDDWHIEI AVP 386
K19B1.19  -----SKGDASDGRYPSGSRVGS TPAKSRTHLVNRSTPP-----GS 339
T7N9.27   -----STDDGNIGCFSSVTR SSTDIVGLKSARPKK VTP----- 351
F23H11.17 -----SSKSASSGLSATS GKRNT---LKGKDRNLNTP----- 337
          .

TOR1      GLLKKKAPVLSDKDFNPEFFQRLERRQS---- VEVVPRRCKN----NDEEESGLDDLNA 438
F8A12.11  LILRKKAPRLTGKDLNPEFFQKLEKRGSGDMPVEV ILPSRQKNSSNSNTEDESANTSVL 405
T25N22.13 ESSFVSKVDLYNEESEGCITKTF AETTNTPEVTY EYIPMKDKADSYVTGGVNENDDIKS 446
K19B1.19  SLATTARKQANRKSIDQKKTSLTASLTKPNVRRR LEWKAGGAS IPTG----VSLEDEQHC 395
T7N9.27   IMKRSPSPVNRSYAATRQKENLPKR NQGNMTLVEEASSVDNKGPHFTPVKKSSEETEE 411
F23H11.17 LSSKS-----NDVEPLDRGDT PKDVEQEAVVS-----KEKRN 369
          .

TOR1      MGSSNRLKNTQADDKQVKGRFDGNGSQARTSGDD KAGVVNGKETPGHHAPVSN TDNQSEG 498
F8A12.11  RSRNGLCRTAGVHTKQR-HFGDFAREK WVDERMNGGESRLRAF DGDHTEVIQADT---- 460
T25N22.13 ITVSSSSFRASGMVNP AITSKNYAAEETDLEE QPFSTQVKDR TSLDSFVTVSSQINHD- 505
K19B1.19  DHDENAKETS HSHNTVQKLGCVSSSLNGNI PPSGATMVTGHHV LSENPN---SNCK-- 450
T7N9.27   KANSGGPDI IKHTISEKSR EDSKVSSFG LRSGRVAPCSDDGDSVKNCDDVEESKK-- 469
F23H11.17 RSTLGAKRVLFP AKMHKVKENG SNKSQ--VVQSSDEESPKTDSGSSS-----SQAKS-- 420
          .
    
```

		d a d a d a d a d a d a d	
TOR1	SFTSNRGNWSA	IQRQLLQLERQQTNLMMMLQEFIGGSHDSMVTLEGRVVRGLERIVEDMAR	558
F8A12.11	--SENRRGNWPE	LQRQLLHLERQQTTHIMNMLQDFMGGSHDGMISLENRVRVGLERIVEEMSR	518
T25N22.13	CCAKIANEMASV	VRKQLSDIENKQSRLLDQLQVFSTGIMNNFSVLQSKVSSLEYAVEGIAQ	565
K19B1.19	----GLEDISL	IRNQLVQIEQQANLMDLLQRFVGVSSQHGMRGLETRVHGLELALDEISY	506
T7N9.27	----DSEELSL	IREQLALIENQQSSLLDLLQKFMGTSQSGIQSLESRVSGLEMALDEISC	525
F23H11.17	----NAEELSL	IRHQITQIEKQSSLLDLFQKFMESSHNGMQSLERRVRGLETSFSVIST	476
	:	:.:.*: :*.:*: :: :* *	.: * : * .** .. :
TOR1	a	DLSSISSGRRANLTAGFGKYNSFANYPTGKYNGRAPGERGSQTDGAMRGRMWNSDMADDWF	618
F8A12.11	EMSIQSGARGKATASWR	-----SDVDG-----WDSPNYG---	547
T25N22.13	NAALHSDISNSNFVKHN	-----	582
K19B1.19	DLAVSNGR	-----	514
T7N9.27	DLAVSNGRVP	-----	535
F23H11.17	DLLVS	-----	481
	:	:	
TOR1	IPPHAASRNGQAGPRRS	PRSEQYENEHMGNRRGWDNKASGTRIRFGEGPSARSVWQASKD	678
F8A12.11	----PSSRNTQTSTRKIRGTG	--PSEQSGNSRRAWD--KSSVAIRLGEGPSARSVWQASKD	600
T25N22.13	-----QGSTIS	PRSSCTSRSTDIRNRQSTLSTSKYSRENKTHVRSRLNESQGMETR	637
K19B1.19	-----	MSGSSRNNCCLLPSG	530
T7N9.27	-----	RNSSGCAGDSCSKLPGT	552
F23H11.17	-----		
	:	:	
TOR1	EATLEAIRVAGEDGAVPRP	TRVAVAPEAEAMGDDDNE---GQERDPIWVSWSNAMHSLRV	735
F8A12.11	EATLEAIRVAGEDCGTSRNR	RVSIP-EAEAMMEDDDNRRGQGDPIWTCWSNSVHALRV	659
T25N22.13	NPLGKTQLHTREDIWN	NIGQGRQTLIQTRTSSDSIQSIRQQYAEVMSGTRKPVTVGSCE	697
K19B1.19	SFIKSKFWKKHDS---	KYSASRMSTYRNRNAETTEIQNSRHRFNKSPGFIVNPLAEIRP	586
T7N9.27	EFLSPKFWRKTEERPR	RNTANEMAAYDQGMRESTDTNNGQRGGSVFQ-----KRSRR	605
F23H11.17	-----	RSITQNGNHKRN-----ACRQ	497
	:	:	
TOR1	GDIDAAYAEVLCAGDQH	LVIKLMDKTGFSLDQMSNEIANEALNFISQFLLDHSLYDCLSL	795
F8A12.11	GDTDSAFAEVLTGDDH	LLVKLMDKTGFVLDQLSSDMGNEATHSIAQFLLDHTLYDCLSL	719
T25N22.13	DVVESEYLQVLSGDEL	LALVELLDRTGVPVLESMSSTINEILSILLSYLLERRFMNSILP	757
K19B1.19	DNDLQVCLTIEGRRET	KPSKASETLKTTV-----	615
T7N9.27	DQFQDCMHTTLQKPT	TRLST-----	625
F23H11.17	N	-----	498
	:	:	
TOR1	<u>WSQOLLELVLQDGADTF</u>	<u>GVPMELKTEILYNLQDACSTMDPPEDWEGPAPEQLVVOLASVW</u>	855
F8A12.11	<u>WIQOLLEVSVENGADF</u>	<u>MGIPELKLKELLLNLHEALSTDPPEWEGGLAPDHLLVELASNW</u>	779
T25N22.13	<u>WLHQVADLSTTNGANY</u>	<u>LIPSAKRAQVLSAIQEASG-MDFSNAERRAVTQIAMKLRKLV</u>	816
K19B1.19	-----	-----	
T7N9.27	-----	-----	
F23H11.17	-----	-----	
	:	:	
TOR1	EIDLQQFDK	-----	864
F8A12.11	NIEIQHFDT	-----	788
T25N22.13	VSVCLDSNHKRS	SGKSTQKIKQFGGNINNSHTKLEKADHGLDLRFESYNQFTKTEPEGNK	876
K19B1.19	-----	-----	
T7N9.27	-----	-----	
F23H11.17	-----	-----	
	:	:	
TOR1	-----	-----	
F8A12.11	-----	-----	
T25N22.13	PASSQLWKQFP	IKQQDN	893
K19B1.19	-----	-----	
T7N9.27	-----	-----	
F23H11.17	-----	-----	

3.4.3 Entfernte Ähnlichkeit von TOR1 mit Proteinen bekannter Funktion

Homologie-Suchen mit der TOR1 Sequenz unter Verwendung des einfachen BLAST Algorithmus lieferten nur sehr schwache Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion. Unter Verwendung des PSI-BLAST Algorithmus (Altschul et al. 1997) wurde eine entfernte

Ähnlichkeit zu Proteinen mit klassischen HEAT *repeats* festgestellt, so z.B. mit Tor1 und Tor2 aus Hefe (*target of rapamycin*; die Abkürzung für *tortifolia* ist zufällig gleichlautend), Importin- β , Protein Phosphatase 2A und dem Translations-Aktivierungs-Protein GCN1. Das Durchmustern einer Datenbank konservierter Domänen (*reverse* PSI-BLAST; Altschul et al. 1997) lieferte hingegen einen schwachen Hinweis, dass TOR1 eine Ähnlichkeit mit der N-terminalen Region von Adaptinen besitzt. Ähnlichkeiten von TOR1 zu Adaptinen einerseits und zu Proteinen mit klassischen HEAT *repeats* andererseits wurden durch den Algorithmus des IMPALA *block searcher* angezeigt (Schaffer et al. 1999). Sequenzvergleiche, welche sich sogenannter HMMs (*Hidden Markov Models*) bedienen, erzielten beste Werte für den Vergleich von TOR1 mit Proteinen, die HEAT *repeats*, aber auch mit Proteinen, die ARM *repeats* enthalten (Gough et al. 2001; Karplus et al. 1998).

Interessanterweise wurde erst kürzlich ein gemeinsamer evolutiver Ursprung der N-terminalen Region von Adaptinen und der *repeat* Region der klassischen HEAT *repeat* Proteine festgestellt. Demnach enthält auch die konservierte N-terminale Region der Adaptine HEAT *repeats*. HEAT *repeat* Proteine bilden zusammen mit ARM *repeat* Proteinen (beispielsweise β -Catenin) eine phylogenetisch zusammenhängende Überfamilie von *repeat* Proteinen (Andrade et al. 2001).

3.4.4 Hinweise auf HEAT *repeats* in der TOR1 Proteinfamilie

Der REP-search Algorithmus (Andrade et al. 2000) ermöglicht unter anderem die Erkennung und Zuordnung von HEAT *repeats* in Sequenzen von Adaptinen und klassischen HEAT *repeat* Proteinen. Tatsächlich unterscheidet das Programm HEAT *repeats* aus drei unterschiedlichen Klassen, nämlich aus der IMB (mit Importin- β), aus der AAA (mit Proteinphosphatase 2A) und aus der ADB Klasse (mit β -Adaptin). Die Untersuchung der Sequenzen von TOR1 und der anderen Mitglieder der Familie mit Hilfe des REP-search Algorithmus erzielte zunächst keine signifikanten Werte für HEAT *repeats*. Nachdem jedoch aus den Sequenzen der Mitglieder der TOR1 Familie Konsensus-Sequenzen erzeugt (Henikoff et al. 1995) und mit dem REP-search Algorithmus analysiert worden waren, ergaben sich für HEAT *repeats* signifikante Werte in einigen aufeinander folgenden Sequenzabschnitten. Nach Erstellung einfacher, linearer Sequenzvergleiche der TOR1 Sequenz mit den verwendeten Konsensus-Sequenzen, konnte die Position der HEAT *repeats* von den Konsensus-Sequenzen auf die TOR1 Sequenz übertragen werden. Die Position der HEAT *repeats* wurde anschließend für die jeweiligen Mitglieder der TOR1 Proteinfamilie verifiziert. Dies war möglich, da das REP-search Programm (Andrade et al. 2000) auch Werte für *repeats* unterhalb eines Schwellenwertes angibt (die also zunächst als nicht signifikant angesehen werden müssen). Tatsächlich fanden sich die besten Werte für

HEAT *repeats* immer exakt an den durch die Konsensus-Sequenzen angezeigten Positionen.

In dem Sequenzvergleich der Abbildung 21 sind die Positionen der HEAT *repeats* der verschiedenen TOR1 Verwandten, sofern durch die Konsensus-Sequenzen angezeigt, angegeben. Die genauen Dimensionen der einzelnen HEAT *repeats* wurden von den Ergebnissen der einfachen Proteinsequenzen abgeleitet. Auf diese Weise wurden im N-terminalen Bereich von TOR1 fünf aufeinander folgende HEAT *repeats* mit den Aminosäurepositionen 75-113, 116-154, 166-204, 207-245 und 247-285 festgelegt. Interessanterweise fehlt für das Protein T25N22.13 jeder Hinweis auf das 4. HEAT *repeat*; dennoch ist die Aminosäuresequenz in diesem Bereich nicht völlig verschieden im Vergleich zur TOR1 Familie. Die besten Ergebnisse in der TOR1 Familie erzielt die Klasse der IMB *repeats* (22x), alle anderen *repeats* gehören zur AAA Klasse (7x). Beide Klassen sind zueinander ähnlicher als jeweils im Vergleich zur ADB Klasse (Andrade et al. 2001). Obwohl das REP-search Programm auch etliche andere Typen von *repeats* in Proteinen erkennt, sind für die Mitglieder der TOR1 Proteinfamilie niemals signifikante Werte für *repeats* einer anderen Klasse als der der HEAT *repeats* erzielt worden. Das Programm ist jedoch nicht für die Erkennung der kurzen *repeats* der *coiled coils* in Proteinsequenzen ausgelegt (siehe unten).

Im Sequenzvergleich der Mitglieder der TOR1 Proteinfamilie untereinander erkennt man eine starke Konservierung von Aminosäureresten auch direkt vor und nach den putativen HEAT *repeats* (Abb. 21). Möglicherweise handelt es sich auch dabei um HEAT *repeats*, welche aber mit der hier verfolgten Methodik nicht mehr detektiert werden können. Es ist spekuliert worden, dass terminal von HEAT-Domänen gelegene *repeats* ihre strenge Sequenzkonservierung aufgeben und schließlich vor allem die Funktion erfüllen, den hydrophoben Kern der Domäne gegen die polare Umgebung der Lösung abzuschirmen (Andrade et al. 2001).

3.4.5 Hinweise auf eine *coiled coil* Domäne in der TOR1 Proteinfamilie

Beim konservierten, zentralen Teil des TOR1 Proteins könnte es sich nach Analyse mit Computerprogrammen um eine *coiled coil* Domäne handeln. *Coiled coils* vermitteln die Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten. Über das *world wide web* sind mehrere Programme, welche *coiled coils* vorhersagen können, zugänglich (Web-Adressen siehe Material und Methoden). Das Programm COILS (Lupas 1996) sagt für den entsprechenden konservierten Bereich der Mitglieder der TOR1 Familie jeweils *coiled coils* voraus, wenn auch mit unterschiedlicher Signifikanz. Dieses Programm bietet die Möglichkeit, die Ergebnisse zu verifizieren, indem die Gewichtung hydrophober Aminosäurereste im Abschnitt erhöht wird. Im positiven Falle darf das Ergebnis für die Wahrscheinlichkeit eines

coiled coils in der analysierten Sequenz um nicht mehr als 20-30 Prozentpunkte sinken. Die Hypothese von *coiled coils* im zentralen konservierten Teil der Proteine der TOR1 Familie wird durch diesen Test für alle Mitglieder bestätigt (vergleiche Abb. 22). Durch die Analysen mit COILS wurde auch eine Diskontinuität (vermutlich ein sogenannter *stutter*) im Zentrum dieser putativen *coiled coil* Region der TOR1 Familie offenbar (siehe Text unten und Abb. 21).

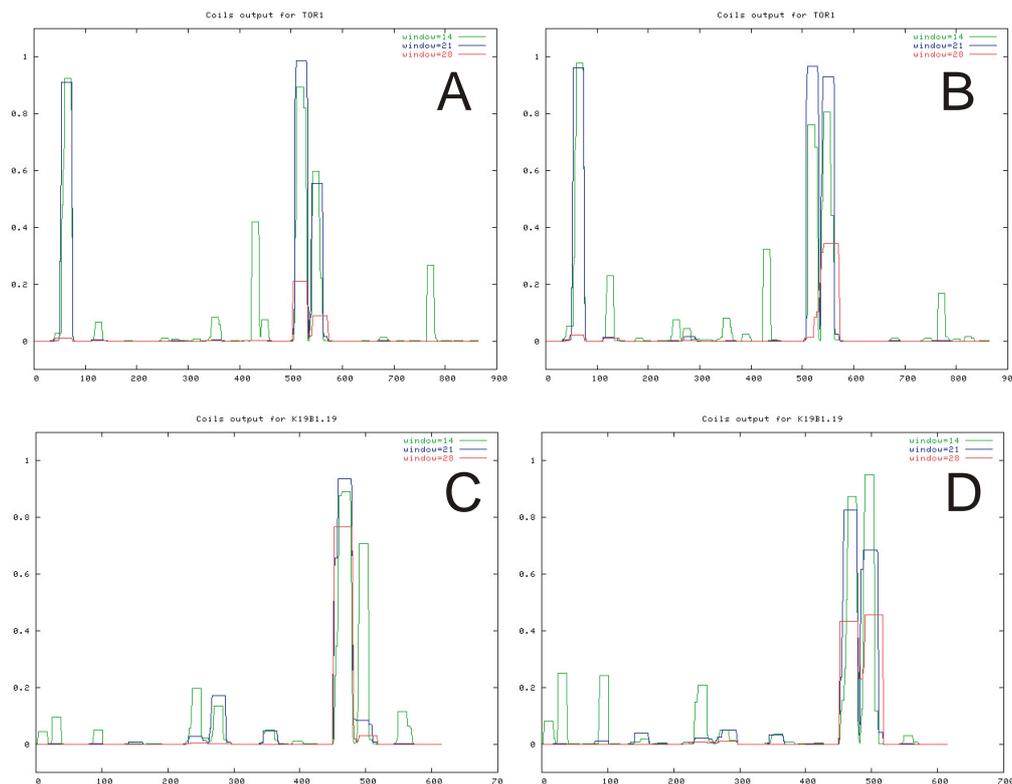


Abb. 22. Ergebnisse des Programms COILS (Lupas 1996) für TOR1 und K19B1.19. Gezeigt wird das Profil für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von *coiled coils* im jeweiligen Protein bei Verwendung der MTIDK Matrix. TOR1 bei einfacher Gewichtung der hydrophoben Aminosäuren (A), TOR1 bei 2,5x Gewichtung der hydrophoben Aminosäuren (B). K19B1.19 bei einfacher Gewichtung der hydrophoben Aminosäuren (C), K19.B.1.19 bei 2,5x Gewichtung der hydrophoben Aminosäuren (D). Such-Fenster: 14 Aminosäuren grün, 21 Aminosäuren blau, 28 Aminosäuren rot.

Das Programm PairCoil (Berger et al. 1995) liefert für die TOR1 Familie Ergebnisse, welche nicht eindeutig sind. Zwar kann das Programm die entsprechende Region in den Mitgliedern der TOR1 Familie detektieren (mit Ausnahme von K19B1.19), jedoch wird niemals eine Wahrscheinlichkeit für *coiled coils* über dem Schwellenwert (0,5) erreicht.

Das Programm MultiCoil (Wolf et al. 1997) stellt eine Erweiterung des PairCoil Programms dar. MultiCoil dient auch zur Unterscheidung von zweisträngigen und dreisträngigen *coiled coils*. Ferner wird die summierte Wahrscheinlichkeit errechnet, dass die fragliche Region als Dimer oder als Trimer vorliegt. Für TOR1 und seine beiden nächsten Verwandten F8A12.11 und T25N22.13 liegt die Wahrscheinlichkeit, zweisträngige oder

dreisträngige *coiled coils* im zentralen konservierten Bereich auszubilden immer deutlich über dem Schwellenwert (0,5). Tatsächlich liefert die Region aus F8A12.11 auch einen hohen Wert für die Ausbildung von Dimeren (0,87), wenn ein Such-Fenster von nur 21 Aminosäuren zugrunde gelegt wird, was aufgrund der Kürze der Region gerechtfertigt erscheint. Die beiden Proteine TOR1 und T25N22.13 erbringen jedoch auch Hinweise für die Ausbildung von Trimeren. Für die anderen drei Proteine der Familie, K19B1.19, T7N9.27 und F23H11.17, errechnet MultiCoil lediglich geringe Wahrscheinlichkeiten für *coiled coils*.

Aufgrund dieser Hinweise für *coiled coils* in der zentralen konservierten Region ist versucht worden, das zu fordernde Heptaden *repeat* in den Sequenzen der TOR1 Proteinfamilie festzulegen. In einer Heptade befindet sich in der Regel an erster und vierter Position (a und d) eine hydrophobe, und an den übrigen Positionen (b, c, e, f und g) eine hydrophile Aminosäure. Vorschläge für die Verteilung dieser Positionen in den verwandten Proteinen sind auch dem Ergebnis des COILS Programmes entnommen worden. Die mögliche Position der Heptaden ist in den Sequenzvergleich der TOR1 Verwandten eingetragen worden (Abb. 21). Wenn eine mittig gelegene Diskontinuität angenommen wird (hier ein Einschub von 4 Aminosäuren), dann finden sich an den Positionen a und d fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren. Gemessen an dem Muster der Heptaden hat die *coiled coil* Domäne in TOR1 die Aminosäureposition 510 bis 560. Die erwähnte Diskontinuität entspricht dem für viele *coiled coils* belegten *stutter* (Brown et al. 1996). Sogenannte *stutter* führen vermutlich zu einer Reduktion der Windungszahl der Superhelix im *coiled coil*, ohne die globale Architektur der Domäne zu zerstören (Lupas 1997). Die Diskontinuität liegt bei TOR1 an der Position 535 bis 538 (Abb. 21).

3.4.6 Die konservierte C-terminale Region des TOR1 Proteins

Die Proteine TOR1, F8A12.11 und T25N22.13 zeigen gegenüber den anderen Proteinen der TOR1 Familie aus *Arabidopsis* eine Verlängerung des C-Terminus (Abb. 21). Die drei Proteine zeigen in diesem Bereich eine ihnen eigene konservierte Region von knapp 120 Aminosäuren mit acidem Charakter: pI 3,77 für TOR1, pI 4,08 für F8A12.11 und pI 5,36 für T25N22.13. Auch dieser C-terminale Bereich von TOR1 besteht im Wesentlichen aus β -Schleifen und α -Helices. Bisher konnte diesem C-terminalen Bereich keine Funktion zugewiesen werden. Diese Region tritt auch in einem TOR1 Homolog aus Reis auf (Protein OJ1793_E11.20; siehe unten).

3.4.7 Vertreter der TOR1 Proteinfamilie in anderen Pflanzengattungen

ESTs und genomische Sequenzen deuten an, dass TOR1-artige Proteine in allen mehrzelligen Landpflanzen auftreten. Bei der Suche mit der TOR1 Proteinsequenz in DNA-Datenbanken (TBLASTN) konnten ESTs aus dikotylen Pflanzen wie Tomate, Baumwolle,

Feldsalat, *Medicago*, *Triphysaria*, aber auch aus monokotylen Pflanzen wie Mais, Reis und Hirse detektiert werden. Die bisher phylogenetisch von *Arabidopsis* am weitesten entfernte Art, für welche ein direktes TOR1 Homolog angenommen werden kann, ist das Laubmoos *Physcomitrella patens*. Die drei kurzen EST-Sequenzen für *Physcomitrella* (pphb37k17, pphn21f06 und pphn44b12) liefern im Aminosäuresequenzvergleich mit TOR1 E-Werte von $9e^{-21}$ bis $2e^{-12}$.

Ein vollständiges Gen mit Homologie zu TOR1 ist für den Reis (*Oryza sativa*) belegt. Das abgeleitete Protein OJ1793_E11.20 zeigt eine starke Homologie über die gesamte Länge der TOR1 Aminosäuresequenz. Im Vergleich zur TOR1 Proteinfamilie zeigt es die höchste Ähnlichkeit zu TOR1 selbst (45 % identische Aminosäuren, 60 % konservative Austausch). Das Protein OJ1793_E11.20 wird daher im Folgenden als OsTOR bezeichnet. Für einen Sequenzvergleich zur Erstellung eines Stammbaumes der TOR1 Familie sind die Sequenzen von TOR1, T25N22.13, F8A12.11 und OsTOR verkürzt worden. Diese Proteine besitzen eine C-terminale Domäne, die den anderen Mitgliedern der Familie fehlt. Im Vergleich für den phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 23 wurden daher nur N-terminale Sequenzen mit Homologie bis zur Position 563 in TOR1 eingeflossen. Der phylogenetische Stammbaum der TOR1 Verwandten zeigt, dass TOR1, T25N22.13, OsTOR und F8A12.11 eine monophyletische Gruppe bilden. T7N9.27 und F23H11.17 bilden eine Schwestergruppe zu der Gruppe um TOR1. Ob K19B1.19 zu der einen oder zu der anderen Gruppe gehört, lässt sich nicht feststellen, da der Stammbaum keine punktuell definierte Basis hat. Nichtsdestotrotz, der Besitz der C-terminalen Domäne ist, obwohl seine Sequenzen nicht in den Vergleich einfließen, charakteristisch für die Gruppe TOR1, T25N22.13, OsTOR und F8A12.11 (Abb. 23).

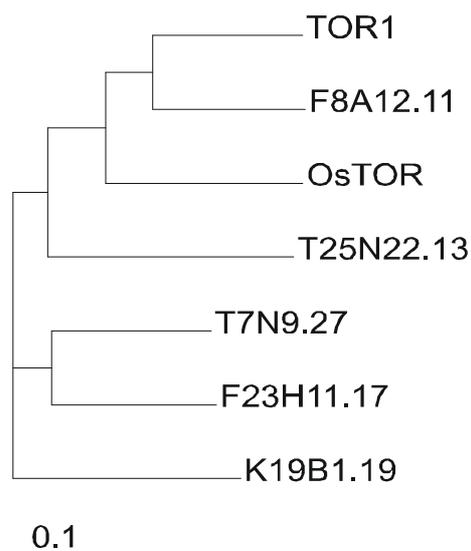


Abb. 23. Phylogenetischer Stammbaum der TOR1 Familie in *Arabidopsis* mit OsTOR (OJ1793_E11.20). Die verkürzten Proteinsequenzen (TOR1 bei Aminosäure 563) wurden mit Clustal W (Thompson et al. 1994) verglichen und das Ergebnis als phylogenetischer Stammbaum dargestellt (TreeView; Page 1996). Die Proteine TOR1, F8A12.11, OsTOR und T25N22.13 bilden eine Gruppe, obwohl die ihnen eigene C-terminale Domäne in diesem Vergleich nicht berücksichtigt wurde.

3.5 Zellbiologische Untersuchungen zu TOR1

Mehrere Gründe sprachen dafür, dass das TOR1 Protein mit dem Cytoskelett assoziiert ist. Die Richtung der Streckung pflanzlicher Zellen wird wesentlich durch die Ausrichtung der Cellulosefibrillen in der Zellwand determiniert. Der Aufbau der Zellwand wird maßgeblich durch das Cytoskelett kontrolliert (Wasteneys 2000). Die Ergebnisse der Analyse der Sekundärstruktur des TOR1 Proteins stimmen mit der Annahme einer Assoziation des TOR1 Proteins mit dem Cytoskelett überein: demnach ist TOR1 vermutlich ein cytosolisches Strukturprotein mit einer Domäne für Protein-Protein Interaktionen (*HEAT repeats*) und einer Domäne für die Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten (*coiled coil*).

Um die Hypothese einer Interaktion von TOR1 mit dem Cytoskelett zu überprüfen, sollte TOR1 an GFP (*green fluorescent protein*) gekoppelt und transient in Protoplasten exprimiert werden. Die gleichzeitige Expression von Markern des Cytoskeletts in Protoplasten sollte den Vergleich mit der Lokalisation des markierten TOR1 Proteins *in vivo* ermöglichen. Als Marker für Mikrotubuli sollte die Mikrotubulus-Bindungsdomäne (MBD) des Mikrotubulus-assoziierten Proteins 4 (MAP4) aus der Maus verwendet werden. Das Fusionsprotein MBD-sGFP kann zur *in vivo* Markierung von MT in Pflanzen verwendet werden (Marc et al. 1998). Zur Markierung von F-Aktin in Pflanzen sollte die Aktin-Bindungsdomäne aus Talin aus der Maus verwendet werden. Das Fusionsprotein Talin-GFP ist bereits zur Markierung von F-Aktin in Pflanzen verwendet worden (Mathur et al. 1999).

Heute gibt es fluoreszierende Proteine mit gegenüber GFP verschobenem Anregungs- beziehungsweise Emissionsspektrum. Dabei handelt es sich unter anderem um die von der Firma Clontech vertriebenen Proteine ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*), EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und DsRed (aus *Discosoma spec.*). Diese Proteine können für die gleichzeitige Beobachtung unterschiedlich markierter Proteine in derselben Zelle verwendet werden. Da sich die Anregungs- beziehungsweise Emissionsspektren dieser Proteine teilweise überschneiden, sind nicht alle Kombinationen der Marker für eine differentielle Observierung geeignet. Geeignete Kombinationen sind ECFP mit EYFP, ECFP mit DsRed und GFP mit DsRed (Brandizzi et al. 2002).

3.5.1 Vorbereitende Arbeiten

Plasmide zur Expression von Talin-DsRed und MBD-sGFP sind freundlicherweise von anderen Forschungsgruppen überlassen worden (siehe Material und Methoden). Weitere Konstrukte zur simultanen Observierung von markierten Proteinen in Protoplasten wurden selbst hergestellt (siehe unten).

3.5.1.1 Synthese eines *TOR1-sGFP* Expressions-Konstruktes

Da für das *TOR1* Gen kein vollständiger EST vorliegt, ist die *TOR1* cDNA über PCR bereitgestellt worden. Als Vorbereitung dafür wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches die Kombination der Leserahmen von *sGFP* und *TOR1* ermöglicht. Das Plasmid 35S-*sGFP*(TYG)-nos wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NcoI* geöffnet und in der anschließenden Ligation mit einem kurzen Oligonukleotid (genannt SpeCla-Dimer) verbunden. Der SpeCla-Dimer hat folgende wichtige Eigenschaften: *SalI*- und *NcoI*-Überhänge und eine kurze Sequenz des 3' Endes des *TOR1* ORFs, inklusive der nativen *Clal*-Stelle der *TOR1* cDNA. In das resultierende Plasmid 35S-SpeCla-Dimer-*sGFP*-nos wurde nun die *TOR1* cDNA ligiert.

Die Bereitstellung der *TOR1* cDNA erfolgte durch RT-PCR unter Verwendung der *PfuTurbo*[®] DNA-Polymerase (Stratagene) mit den Oligonukleotiden T1-1R_Sal und T1-Sal-front. Ausgangspunkt waren Gesamt-RNAs aus mehreren Organen von *Arabidopsis* (Ökotyp Col). Das entstandene Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *Clal* geschnitten, ebenso das obig beschriebene Plasmid 35S-SpeCla-Dimer-*sGFP*-nos. Nach Ligation und Transformation der DNA in *E. coli* (Abb. 24) wurden die Konstrukte sequenziert. Die Sequenzen bestätigten eine Kombination von *TOR1* und *sGFP* im selben Leserahmen. Im Fusionsprotein sind *TOR1* und *sGFP* durch ein einziges Alanin-Molekül verbunden. Die Sequenzen bestätigten ferner eine komplette, fehlerfreie *TOR1* cDNA für den Klon dD1. Der Klon dN2 hingegen enthält einen Basenpaaraustausch (Transition) an Position 1421 des *TOR1* ORF. Als Konsequenz ist ein Austausch der Aminosäure Alanin zu Valin an Position 474 abzuleiten. Es konnte jedoch bezüglich der Klone dD1 und dN2 bei der Expression in *Arabidopsis* Protoplasten kein Unterschied in der Lokalisierung der *TOR1-sGFP* Proteine beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das weiterhin verwendete Plasmid (dD1) wird 35S-*TOR1-sGFP*-nos genannt.

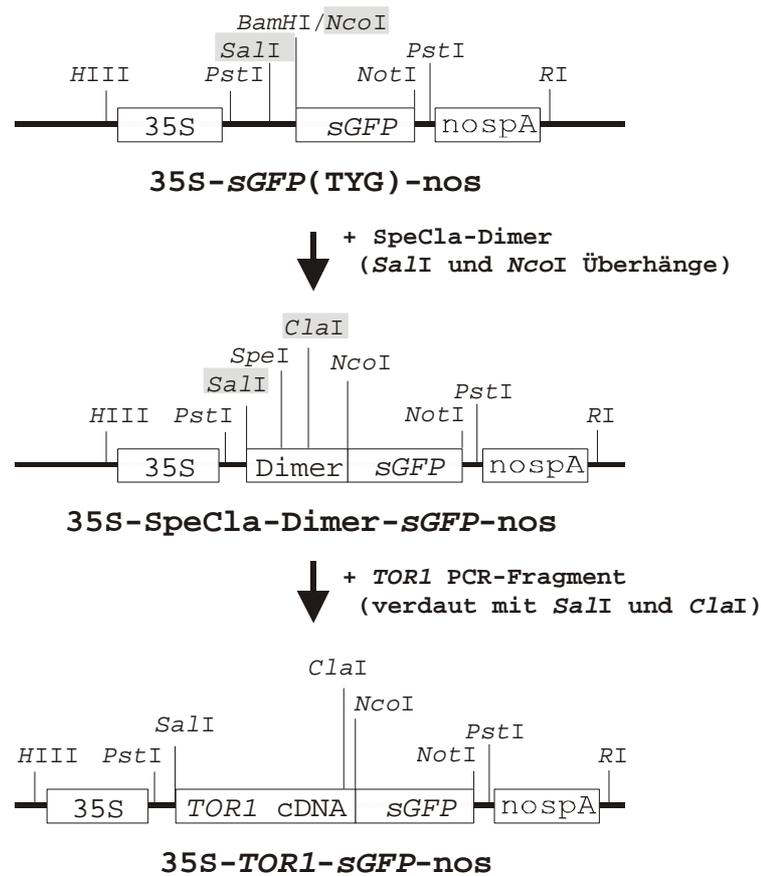


Abb. 24. Klonierung der *TOR1* cDNA und Synthese des *35S-TOR1-sGFP-nos* Expressions-Konstruktes. Verwendete Schnittstellen sind grau unterlegt. Detaillierte Erläuterungen im Text.

3.5.1.2 Synthese eines *TOR1-ECFP* Expressions-Konstruktes

Für die Synthese eines *TOR1-ECFP* Fusionskonstruktes wurde angestrebt, im *35S-TOR1-sGFP-nos* Plasmid (Klon dD1) *sGFP* gegen *ECFP* auszutauschen. Daher wurde mit den Oligonukleotiden Cla-T1-xFPN und Not-TER-xFPN in einer PCR-Reaktion ein *ECFP* Fragment erzeugt, welches geeignete terminale Restriktionsschnittstellen aufwies (als DNA-Matrize diente pECFP-N1, Clontech). Das erhaltene Fragment und der Vektor *35S-TOR1-sGFP-nos* wurden nun mit *NotI* und *ClaI* geschnitten. Die entsprechenden DNA-Stücke wurden anschließend aus dem Gel gereinigt, ligiert und in *E. coli* transformiert. Das resultierende Plasmid wird *35S-TOR1-ECFP-nos* genannt (Abb. 25). Auf analoge Weise wurde ein *TOR1-EYFP* Konstrukt erzeugt.

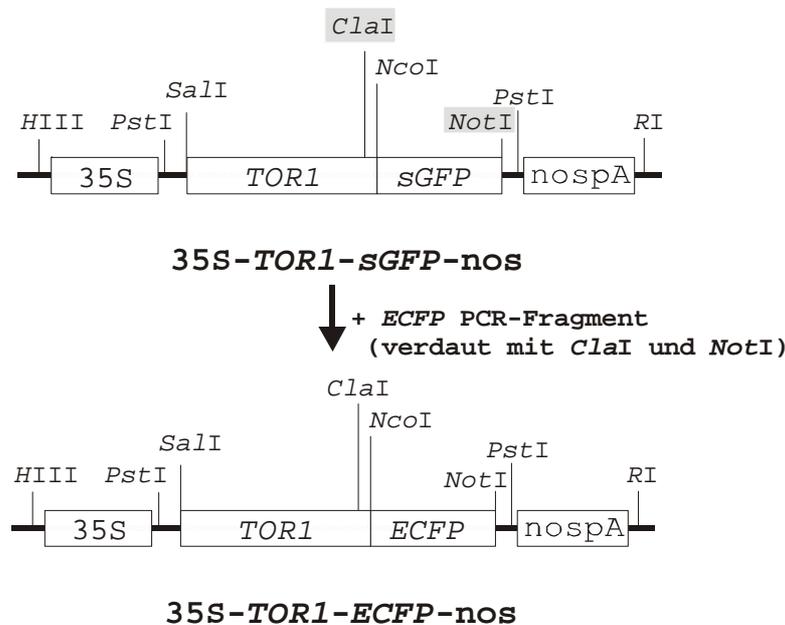


Abb. 25. Synthese des 35S-TOR1-ECFP-nos Expressions-Konstruktes. Verwendete Schnittstellen sind grau unterlegt. Erläuterungen siehe Text.

3.5.1.3 Synthese eines MBD-EYFP Expressions-Konstruktes

Für die Koexpression mit TOR1-ECFP wurde *EYFP* an die *MBD* von *MAP4* gekoppelt. Dabei wurde im Wesentlichen die Methode angewendet, mit der auch das ursprüngliche *sGFP-MBD* Konstrukt erzeugt worden war (Marc et al. 1998). Entsprechend wurden zunächst mit Hilfe der *PfuTurbo*[®] Polymerase (Stratagene) PCR-Fragmente zu *EYFP* einerseits, und zu *MAP4-MBD* andererseits, erzeugt. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pEYFP-N1 (Clontech) beziehungsweise das *MBD-sGFP* Konstrukt. In einem zweiten PCR-Schritt wurde das *MBD* Fragment mit dem *EYFP* Fragment ligiert. Als Primer dienen die Oligonukleotide aus Marc et al. 1998, wobei das dort beschriebene *MAP4 reverse* Oligonukleotid durch das *MAP4-TER-rev* Oligonukleotid (siehe Material und Methoden) ersetzt wurde, um einen Translationsstopp einzuführen. Anschließend wurde das entstandene Genfragment mit *NcoI* und *NotI* verdaut, ebenso der Vektor 35S-sGFP(TYG)-nos. Nach Reinigung der entsprechenden Fragmente aus dem Gel (der Vektor wurde von *sGFP-Sequenzen* getrennt), anschließender Ligation und Transformation der DNA in *E. coli*, wurden positive Klone selektiert. Das resultierende Konstrukt wurde 35S-EYFP-MBD-nos genannt (Abb. 26). Auf analoge Weise wurde ein 35S-ECFP-MBD-nos Konstrukt erzeugt.

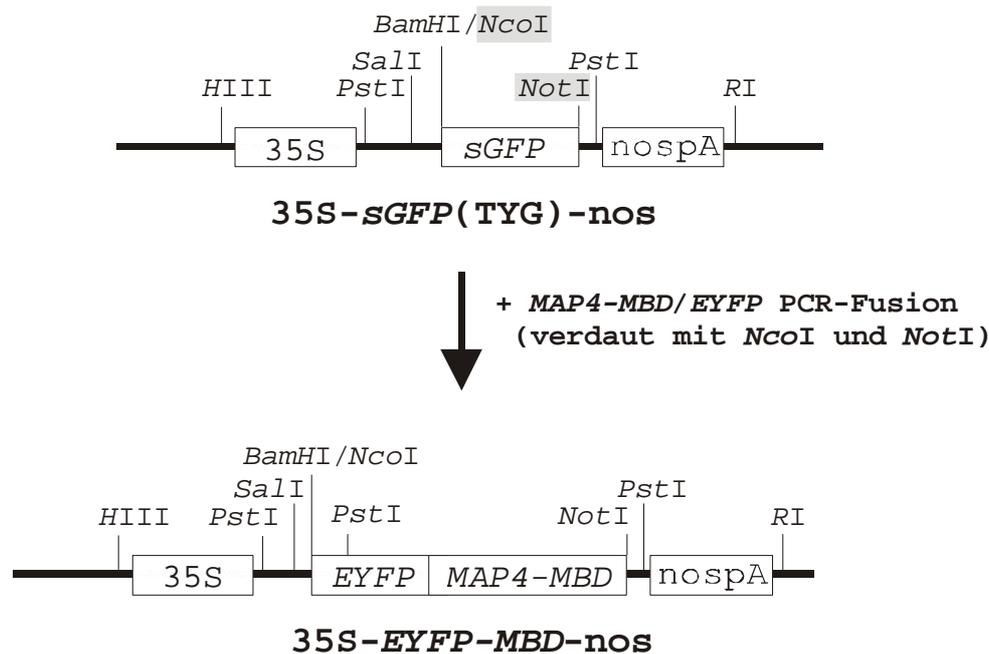


Abb. 26. Synthese des 35S-EYFP-MBD-nos Expressions-Konstruktes. Verwendete Schnittstellen sind grau unterlegt. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

3.5.2 Transiente Expression von TOR1 Fusionsproteinen und Markern des Cytoskeletts in Protoplasten von *Arabidopsis*

3.5.2.1 Die TOR1 Fusionsproteine markieren filamentöse kortikale Strukturen

Die Untersuchung der transformierten Protoplasten von *Arabidopsis* erfolgte durch konfokale Mikroskopie am *laser scanning microscope* (LSM). Lebende Protoplasten, welche transient TOR1-sGFP exprimierten, offenbarten an der Zellperipherie zahlreiche fluoreszierende filamentöse Strukturen (Abb. 27A). Diese Filamente zeigten keine spezifische Orientierung, sondern waren vermutlich zufällig verteilt. Die Filamente waren meist geschwungen und überkreuzten einander vielfach. Die von TOR1-sGFP markierten Filamente waren möglicherweise auch gebündelt, da in derselben Zelle schwach und stark fluoreszierende Filamente auftraten. Häufig, vermutlich in Zellen, welche viel TOR1-sGFP angereichert hatten, zeigten sich neben Filamenten fluoreszierende Punkte an der Zellperipherie. Diese feinen Aggregate lagen meist auf fluoreszierenden Filamenten und kennzeichneten dann häufig Überschneidungspunkte der Filamente. In seltenen Fällen konnten auch von TOR1-sGFP markierte Filamente im Innern der Zelle beobachtet werden. Die Expression von TOR1-sGFP führte zusätzlich fast immer zu einer schwachen und diffusen Fluoreszenz im Cytoplasma.

Experimente, bei welchen neben TOR1-sGFP auch Talin-DsRed transient exprimiert wurde, erlaubten einen Vergleich des durch TOR1-sGFP markierten Filamentsystems mit

dem Aktin-Cytoskelett. Das Aktin-Cytoskelett konnte ebenfalls an der Zellperipherie beobachtet werden, zeigte jedoch meist eine starke Präsenz im Innern der Zelle beziehungsweise in der Nähe der Chloroplasten und wies gegenüber TOR1-sGFP vermutlich einen höheren Grad an Bündelung auf. Von TOR1-sGFP markierte Filamente konnten von F-Aktin begleitet werden, traten aber häufig ohne diese auf (Abb. 27A). Ebenso war F-Aktin nicht notwendigerweise mit von TOR1-sGFP markierten Filamenten vergesellschaftet. Demnach sind das von TOR1-sGFP markierte Filamentsystem und das Aktin-Cytoskelett nicht identisch.

In weiteren Experimenten wurde MBD-sGFP, ein Marker für MT, mit und ohne Talin-DsRed in Protoplasten exprimiert. Die Expression von MBD-sGFP lieferte mit der Expression von TOR1-sGFP identische Ergebnisse. Experimente mit MBD-sGFP belegten, dass in Protoplasten das kortikale MT-Skelett und das Aktin-Cytoskelett einander teilweise überlappen (Abb. 27B).

Die Expression von TOR1-ECFP in Protoplasten führte ebenfalls zur Markierung von kortikalen Filamenten. Allerdings waren die durch ECFP erzeugten Fluoreszenzsignale viel schwächer als die Signale von sGFP. Die Filamente, welche durch TOR1-ECFP markiert wurden, zeigten ähnlich TOR1-sGFP eine vom Aktin-Cytoskelett weitgehend unabhängige Verteilung (Abb. 27C). Das MBD-EYFP Protein markiert ebenfalls kortikale Filamente (Abb. 27D). MBD-EYFP wurde nicht in Gegenwart von Talin-DsRed exprimiert, da die zur Verfügung stehenden Filter des Mikroskops keine vollständige Trennung der beiden Fluoreszenzsignale erlaubt hätten.

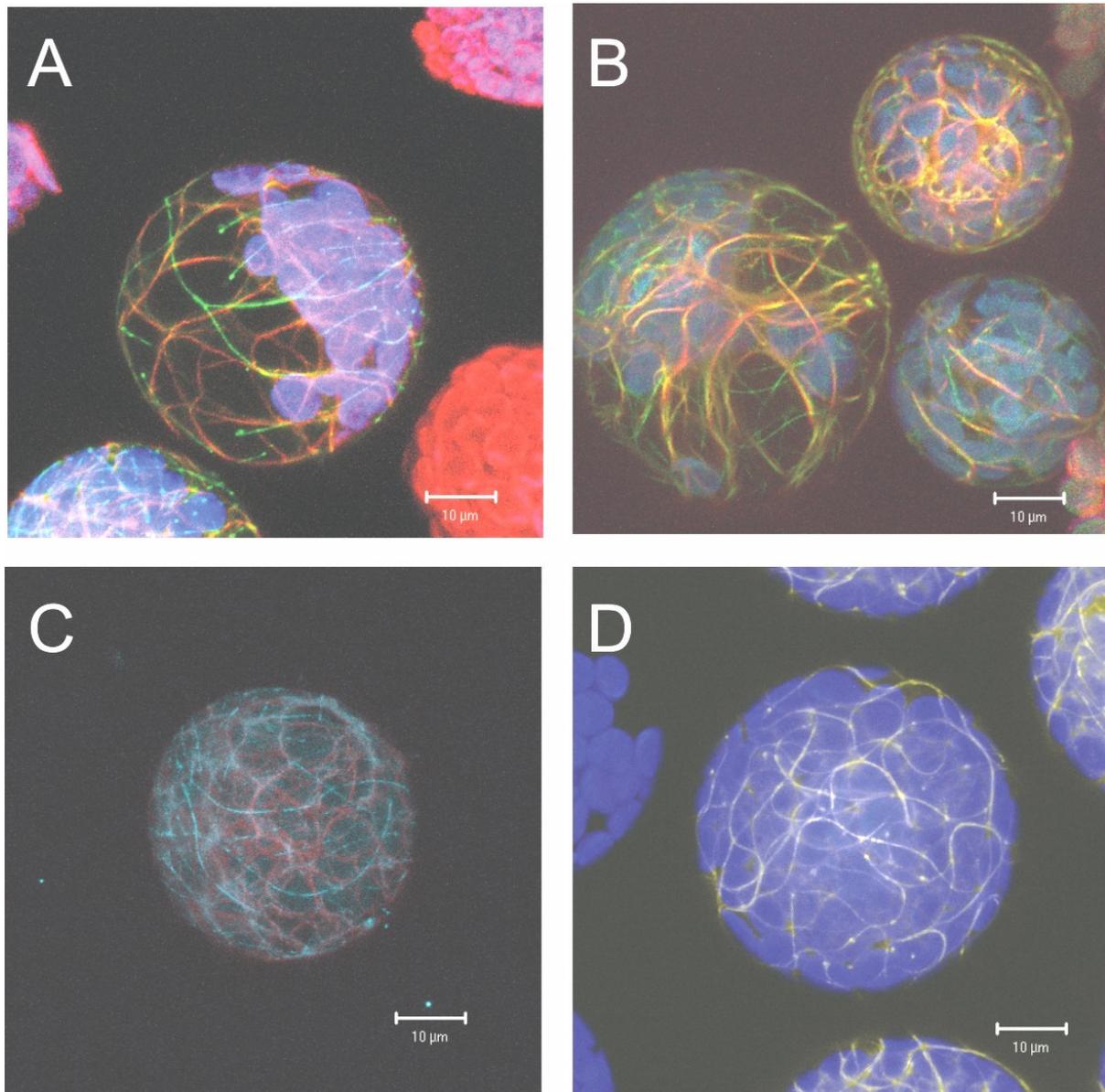


Abb. 27. Markierung filamentöser Strukturen durch TOR1 Fusionsproteine und Marker des Cytoskeletts in lebenden Protoplasten. (A) TOR1-sGFP, grün. (B) MBD-sGFP, grün. (C) TOR1-ECFP, cyan. (D) MBD-EYFP, gelb. (A-C) Es wird gleichzeitig Talin-DsRed exprimiert, rot. (A, C, D) Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wird in blau dargestellt. Im Falle der Koexpression von sGFP und DsRed wird Kolokalisation durch gelbe Farbe angezeigt. Einige geplatzte Protoplasten sind sichtbar in A. Alle Bilder sind Projektionen mehrerer konfokaler Schnitte. Balken 10 μm .

3.5.2.2 Die von TOR1 markierten Filamente können durch Oryzalin aufgelöst werden

Die Koexpression von TOR1-sGFP mit DsRed-talin zeigte, dass TOR1 nicht grundsätzlich mit dem Aktin-Cytoskelett kolokalisiert. Aufgrund der Ähnlichkeit der Lokalisierung von TOR1-sGFP mit der Lokalisation von MBD-sGFP wurde nun die Wirkung der Droge Oryzalin getestet (Abb. 28A, B). Oryzalin depolymerisiert spezifisch die Filamentsysteme des MT-Skeletts. Für diese Versuche wurden Protoplasten verwendet, welche DsRed-talin und TOR1-sGFP koexprimierten. Oryzalin wurde in 2-facher Konzentration im gleichen Volumen vorsichtig mit einer Protoplastensuspension gemischt. In einer Endkonzentration von 10 μM

bewirkte Oryzalin eine Depolymerisation des von TOR1-sGFP markierten Filamentsystems bereits nach 10 bis 15 Minuten. Nach 1 h waren die von TOR1-sGFP markierten Filamente völlig verschwunden und wurden durch sich an der Zellperipherie versammelnde fluoreszierende Punkte ersetzt. Da die Oryzalin-Stammlösung in DMSO angesetzt wird, wurde im Kontrollversuch die äquivalente Menge DMSO eingesetzt (Endkonzentration 0,1 % DMSO). Im Kontrollversuch wurde keine Veränderung in den Filamentsystemen beobachtet. Das von Talin-DsRed markierte Aktin-Cytoskelett zeigte unter Einfluss von Oryzalin keine sichtbare Veränderung (Abb. 28A, B). Die Experimente mit der gegen das MT-Cytoskelett gerichteten Droge Oryzalin belegen, dass das von TOR1 markierte filamentöse System mit dem System der kortikalen MT identisch ist.

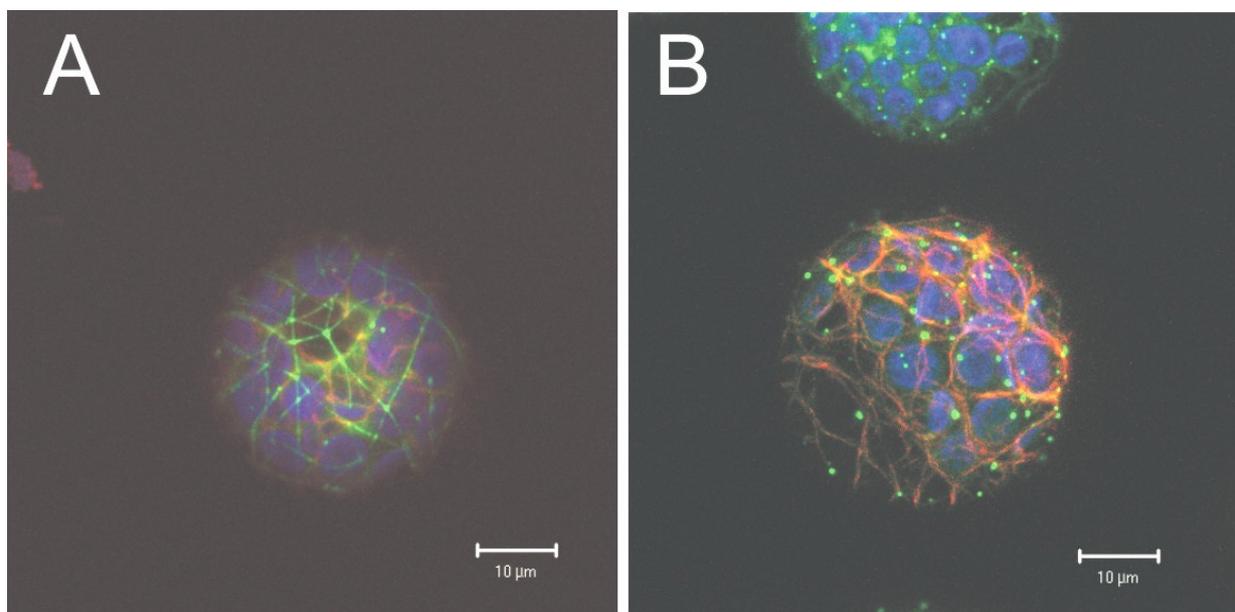


Abb. 28. Koexpression von TOR1-sGFP mit Talin-DsRed in *Arabidopsis* Protoplasten und Wirkung der gegen das Mikrotubuli-Cytoskelett gerichteten Droge Oryzalin (10 µM). (A) Talin-DsRed mit TOR1-sGFP im Kontrollversuch. (B) Etwa 1 h nach Applikation von Oryzalin sind die durch TOR1-sGFP markierten Filamente vollständig verschwunden. TOR1-sGFP versammelt sich in zahlreichen Aggregaten an der Zellperipherie. Das Aktin-Cytoskelett bleibt intakt. Beide Bilder entstanden durch Projektion mehrerer optischer Schnitte. Chloroplasten sind blau dargestellt. Balken 10 µm.

3.5.2.3 Kolokalisierung von TOR1-ECFP und MBD-EYFP in Protoplasten

Weitere unabhängige Evidenz für die Lokalisation von TOR1 mit kortikalen MT sollte durch Koexpression von TOR1-ECFP mit dem MT-Marker MBD-EYFP in Protoplasten erhalten werden. Für dieses Experiment war es zunächst nötig zu überprüfen, ob bei den verwendeten Anregungswellenlängen und Emissionsfiltern eine Trennung der Signale von EYFP und ECFP ermöglicht wird. Nachdem eine befriedigende Konfiguration der Laser und Signal-Verstärker am LSM eingestellt worden war, erfolgte die Mikroskopie von Protoplasten, welche TOR1-ECFP und MBD-EYFP koexprimierten. Die Protoplasten zeigten die bereits beobachteten kortikalen Filamente. Die in den unabhängigen Kanälen observierten Filamente konnten durch Überlagerung der erhaltenen Bilder weitgehend zur Deckung

gebracht werden (Abb. 29A, B, D). Andererseits waren die Bilder nicht völlig identisch, sondern belegten ein etwas unterschiedliches Verhalten der beiden Proteine TOR1-ECFP und MBD-YFP in koexprimierenden Protoplasten. TOR1-ECFP zeigte eine verstärkte Neigung zur Aggregation in an der Zellperipherie gelegenen Punkten. Häufig lokalisierten diese Aggregate auf Filamenten. TOR1-ECFP zeigte vermutlich auch eine verstärkte Präsenz im Cytoplasma. Diese Ergebnisse belegen, dass die TOR1 Fusionsproteine kortikale MT in Protoplasten markieren.

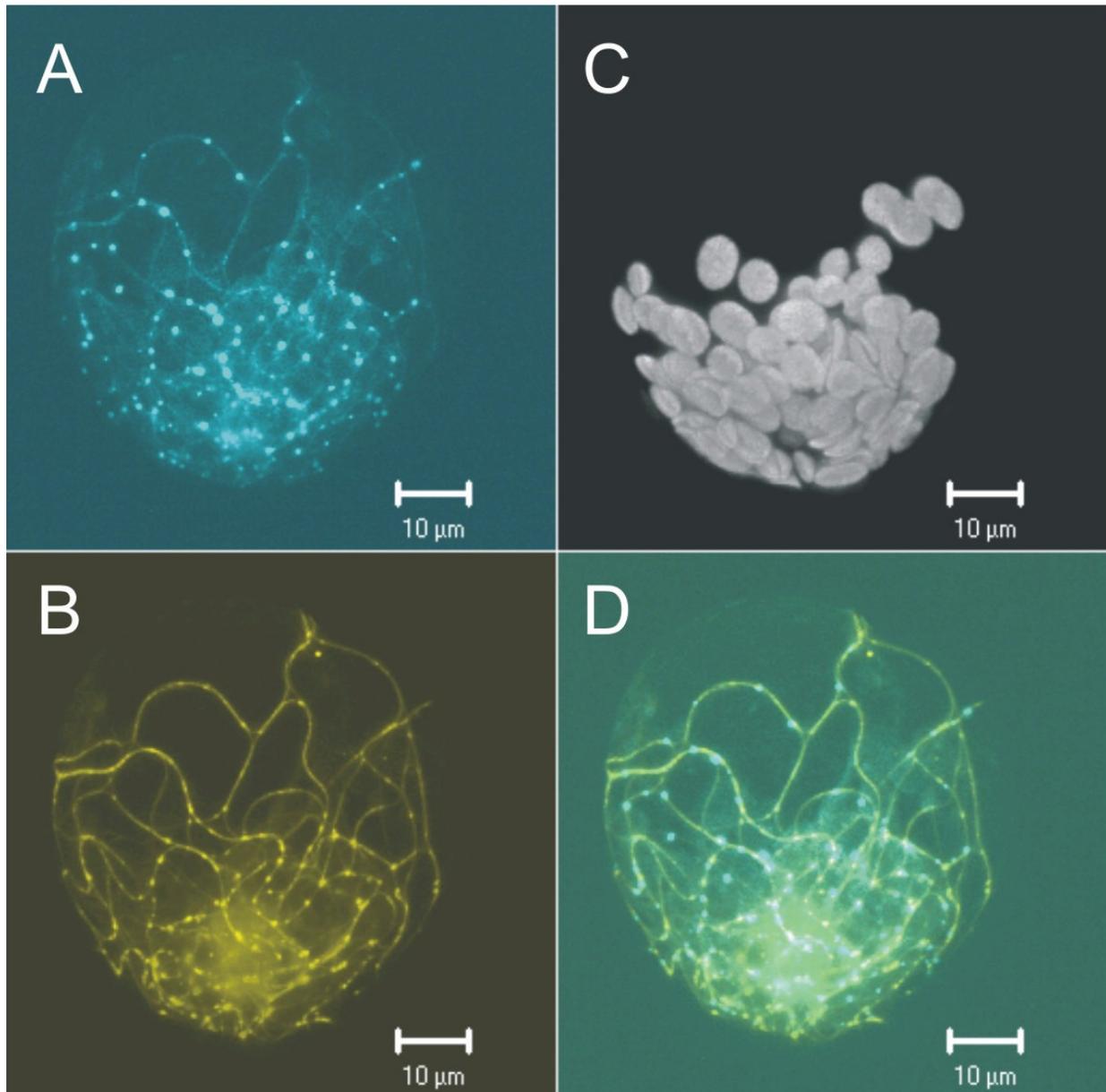


Abb. 29. Kolokalisierung von TOR1-ECFP und MBD-EYFP in Protoplasten. (A) TOR1-ECFP, (B) MBD-EYFP, (C) Chloroplasten, (D) Überlagerung der Bilder (A) und (B). Kolokalisierung wird durch grüne Farbe angezeigt. Alle Bilder sind Projektionen mehrerer konfokaler Schnitte. Balken 10 µm.

3.6 Analyse der *tor2* Mutation

Vorrangiges Ziel war die Identifikation des *TOR2* Locus. Dafür wurden vormals durchgeführte Arbeiten (N. Kälin, M. Hauptmann, nicht veröffentlicht) wieder aufgenommen. Grundlage der Arbeiten war eine Kartierungspopulation aus Kreuzungen zwischen *tor2-1* (im *Ler* Hintergrund) und Col. Etwa 700 F₂-rekombinante *tor2* Individuen waren mit genetischen Markern durchmustert und dadurch *TOR2* auf eine Region an der Spitze von Chromosom 1 eingegrenzt worden. Tatsächlich waren für den nördlich der *TOR2* Region gelegenen Marker O864A 16 heterozygote Pflanzen gefunden worden, während es für den südlich gelegenen Marker nga63 noch 39 heterozygote und sogar 3 (für Col) homozygote Pflanzen waren. Inmitten dieser etwa 2300 kb umspannenden Region auf dem BAC-Klon T7A14 liegt der Marker AtEAT1 (Bell und Ecker 1994), für welchen lediglich eine einzige rekombinante *tor2* Pflanze heterozygot war (#108).

3.6.1 Die Suche nach genetischen Markern für die Kartierung von *TOR2*

Zunächst wurden veröffentlichte Marker zum Durchmustern der rekombinanten *tor2* Pflanzen rekrutiert (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>). Dabei handelte es sich um die Marker nT1G11 und nF7G19. Sie ermöglichten eine weitere Eingrenzung des *TOR2* Bereichs von Norden und von Süden (Abb. 30). Da viele der F₂-rekombinanten *tor2* Pflanzen Rekombinationsereignisse zwischen den Markern nT1G11 und nF7G19 zeigen mussten, wurde nach zusätzlichen genetischen Markern gesucht. Dafür wurden mehrere Strategien gleichzeitig verfolgt.

Anhand der BAC-Sequenzen aus dem *TOR2* Bereich wurden PCR-Fragmente erzeugt, welche mit Hilfe von hochauflösenden Polyacrylamidgelen (Material und Methoden) auf Polymorphismen getestet wurden. Als Zielsequenzen dienten vor allem repetitive Abschnitte aus dem Bereich. Auf diese Weise wurden 10 Oligonukleotid-Paare getestet, die jedoch alle keinen Polymorphismus zwischen *Arabidopsis* Ökotyp Col und Ökotyp *Ler* aufdeckten (vergleiche aber PT4, Tab. 7).

Außerdem wurden RFLP Marker aus dem Bereich in CAPS Marker umgewandelt und auf einen verwertbaren Polymorphismus getestet. Dabei handelte es sich um die Marker 2D3LE und mi106b (Plasmide für 2D3LE erhalten von D. Berger, mi106b Sequenzen erhalten von U. Schneider; beide MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm). Leider konnten lediglich die bereits bekannten Col/C24 Polymorphismen reproduziert werden. DNA aus Col und *Ler* zeigten hingegen identische Banden im Agarosegel (Tab. 7).

Die Sequenzen des *Arabidopsis* Genomprojektes stammen aus dem Ökotyp Col. Die fortschreitende Sequenzierung des Ökotyps *Ler* ermöglichte durch einfachen Sequenzvergleich die Schaffung von genetischen Markern für das Paar Col/*Ler*. So entstanden die Marker PT1 (*Ler* Sequence Database, The Institute for Genomic Research),

PT3 (Stanford Genome Center), PT13, PT14 und PT15 (Cereon Genomics). Die Anbieter dieser Information findet man unter <http://www.arabidopsis.org/>. Die Tabelle 7 zeigt die neuen PCR-Marker für die Region. Die Positionen der zur Kartierung der *tor2* Mutation verwendeten Marker können der Abbildung 30 entnommen werden.

Tabelle 7. Neue kodominante PCR-Marker für den Bereich von *TOR2*.

Marker (Oligos)	Elektrophorese	Polymorphismus	Bemerkungen
PT1 (F/ R)	3 % Agarosegel	Ler ? En-2 ? Col	CAPS mit <i>TaqI</i>
PT3 (F/ R)	1,5 % Agarosegel	Ler = En-2 = Ws = S96 ? Col	CAPS mit <i>HindIII</i>
PT4 (F/ R2) ^a	MDE-Gel	Ler = Col < En-2	HeD nicht gefunden
PT13 (F2/ R1)	3 % Agarosegel	Ler = C24 = En-2 < Col	SSLP
PT14 (NlaIV/ R1)	3 % Agarosegel	Ler ? C24 = En-2 = Col	dCAPS mit <i>NlaIV</i>
PT15 (F/ R)	3 % Agarosegel	Ler < En-2 < Col = C24 = Ws = S96	SSLP
2D3LE_C (F/ R)	1,5 % Agarosegel	Ler = Col ? C24	CAPS mit <i>HaeIII</i>
mi106b (F2/ R3)	1,5 % Agarosegel	Ler = Col = Ws = S96 ? C24 = En-2	CAPS mit <i>BglI</i>

^a PT4 wurde auf Polyacrylamidgelen analysiert (MDE-Gelmatrix, siehe Material und Methoden). Die Größenangaben für PT4 beziehen sich auf apparente Fragmentgrößen. HeD Heteroduplex.

3.6.2 Die Kartierung von *TOR2*

Die mit den Markern nT1G11 und nF7G19 erhaltenen Daten sicherten die zuvor erhaltenen Erkenntnisse zur Position des *TOR2* Locus ab (Abb. 30). Auch die Daten zu den Markern PT1 und PT3 unterstützten die Sichtweise, dass *TOR2* zwischen nT1G11 und AtEAT1 liegen muss. Der Marker PT15 lieferte zudem das gleiche Ergebnis wie AtEAT1.

Eine weitere Eingrenzung der *TOR2* Region wurde von den Markern PT13 und PT14 erwartet. Die mit ihnen erzielten Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. Zehn für nT1G11 heterozygote F2-Rekombinanten sind für die Position PT13 homozygot Ler. Von diesen sind neun F2-Rekombinanten erneut heterozygot für die Position PT14, um schließlich bei AtEAT1 wieder homozygot für Ler zu sein (Abb. 30). Dieser auffällige Befund kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die beiden Marker nicht exakt die ihnen zugeschriebene physikalische Position haben. BLAST-Suchen mit den Primersequenzen für PT13 und PT14 ergeben aber relevante Treffer nur für die angenommene Position. Dieses wurde verifiziert durch PCR der Marker PT13 und PT14 mit den fraglichen BAC-DNAs der Region als Matrize (Daten nicht gezeigt). Demnach sind die Marker PT13 und PT14 spezifisch für die ihnen zugeordneten physikalischen Positionen in *Arabidopsis*.

Bezüglich der Daten zu PT14 ergibt sich eine weitere Schwierigkeit. Die F2-Rekombinante #108 ist an dieser Position, ebenso wie die F2-Rekombinanten der nT1G11-Seite, heterozygot. Dieses kann als Hinweis für zusätzliche Rekombinationsereignisse für die Pflanze #108 gewertet werden. Die F2-Rekombinante #108 verhält sich ansonsten normal: Alle ihre F3-Nachkommen zeigten die typischen Blatttorsionen. Ferner sind mehrere dieser

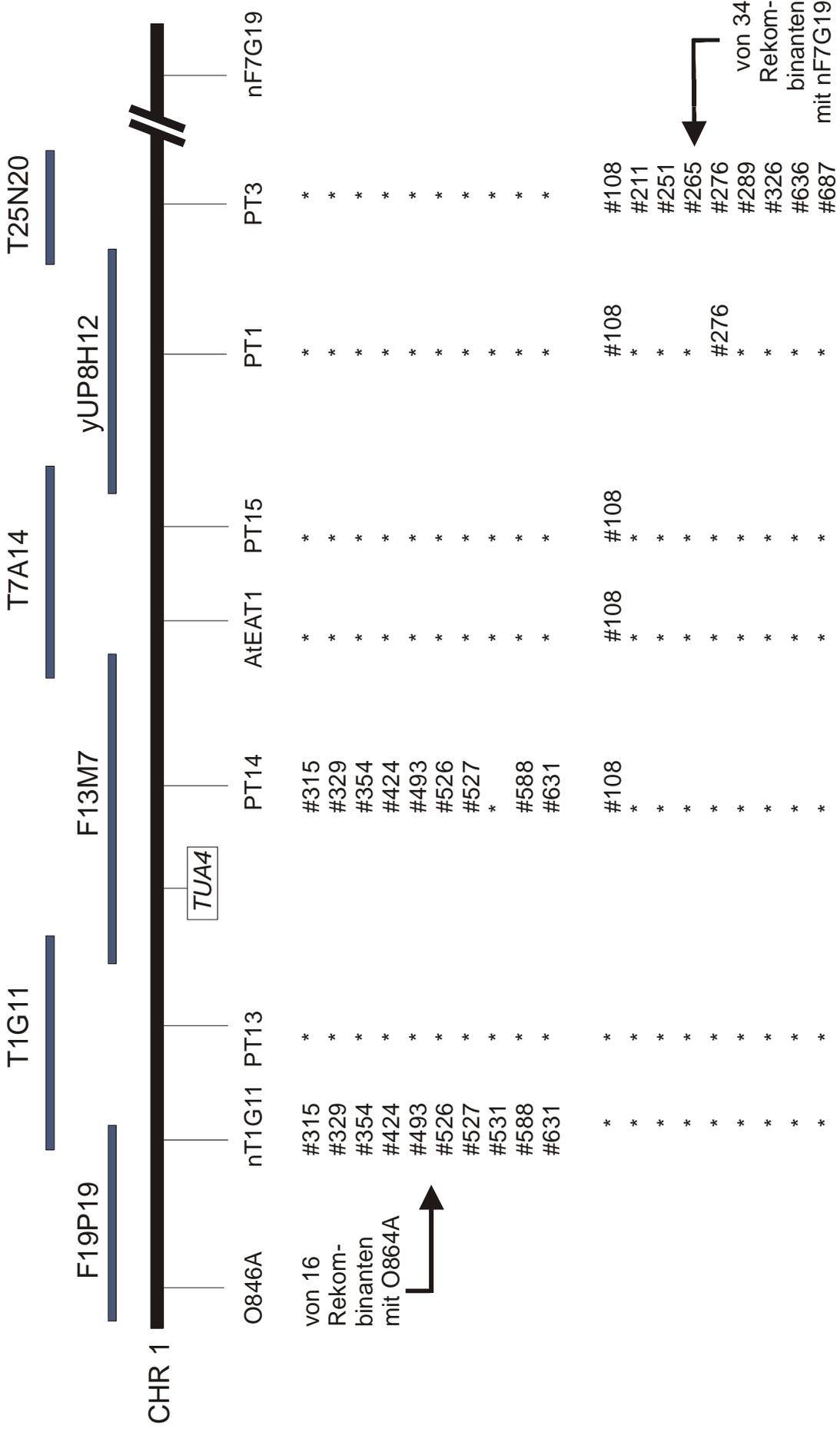
F3-Individuen eindeutig heterozygot für AtEAT1 und PT1, aber gleichzeitig immer homozygot *Ler* für nT1G11.

Das Ergebnis der Bemühungen, die *TOR2* Region weiter einzugrenzen, ist, dass als südliche Grenze der Region nicht länger von AtEAT1, sondern von PT1 ausgegangen werden muss. Diese Grenze wird allerdings nur durch die F2-Rekombinante #276, welche hier heterozygote DNA zeigt, gestützt. Die Position nT1G11 muss als nördliche Grenze der *TOR2* Region gelten. Der *TOR2* Bereich hat jetzt eine Größe von 290 kb.

3.6.3 Sequenzierung von *TUA4* aus der Mutante *tor2*

Arabidopsis kodiert und exprimiert 6 α -tubulin Gene (Kost und Chua 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass *missense* Mutationen in den Tubulin-Genen *TUA4* und *TUA6* linksgängiges helikales Wachstum in *Arabidopsis* auslösen können (Thitamadee et al. 2002). Interessanterweise liegt *TUA4* im für *tor2-1* fraglichen Bereich, nämlich auf F13M7 (Abb. 30). Deswegen wurde *TUA4* als Kandidatengen für die *tor2-1* Mutation betrachtet und sequenziert. Die Oligonukleotide TUA4-F1 und TUA4-R1 können durch PCR auf Basis genomischer DNA den gesamten kodierenden Bereich von *TUA4*, inklusive seiner Introns amplifizieren. Diese Oligonukleotide diskriminieren zwischen den *Arabidopsis TUA*-Sequenzen und sind spezifisch für *TUA4*. Dies wurde über einen *ClaI* Polymorphismus der *TUA* Gene aus *Arabidopsis* für das erhaltene *TUA4* PCR-Fragment bestätigt. Die *TUA4* Fragmente aus *tor2-1* und *Ler* wurden nun sequenziert. Beim Vergleich der entsprechenden Sequenzen untereinander und mit Sequenzen aus Col (Kopczak et al. 1992) wurde kein Hinweis auf eine Mutation in *TUA4* aus *tor2-1* gefunden.

Abb. 30. Kartierung des *TOR2* Locus. Dargestellt ist ein Bereich aus Chromosom 1 (umseitig). Über dem Chromosom sind korrespondierende BACs und yUP8H12 dargestellt, unterhalb genetische Marker und Rekombinanten. Nördliche und südliche F2-rekombinante *tor2* Pflanzen werden namentlich aufgeführt, wenn sie an der entsprechenden Position nicht homozygot für *Ler* DNA waren. Das Kandidatengen *TUA4* ist zur Orientierung eingezeichnet. Der Marker AtEAT1 liegt bei 3.87 cM. * die betreffende Pflanze ist an dieser Position homozygot für *Ler*, CHR 1 Chromosom 1.



3.7 Die Mutante 590501

3.7.1 Die Kartierung des 590501 Locus

Die Mutante *tor2* und 590501 sind einander phänotypisch sehr ähnlich (siehe unten). Die Mutante 590501 wurde zunächst als ein zweites *tor2* Allel angesehen. Da sich beim Mapping von *tor2* Widersprüche ergeben hatten (siehe Ergebnisse *tor2*), wurden auch 29 F₂-rekombinante Individuen der Mutante 590501 (Mutagen EMS, *Ler* Ökotyp) untersucht. Diese kleine F₂-rekombinante 590501 Population war durch Kreuzung mit dem Ökotyp Col entstanden. Erste Ergebnisse mit genetischen Markern aus der Region von *tor2* auf Chromosom 1 ergaben jedoch für die Mutation 590501 keine Kopplung mit diesem Chromosom. Für nT1G11 (nördlich von *tor2*) wurden 56 Chromosomen erfolgreich analysiert und ergaben 26x *Ler* und 30x Col. Für AtEAT1 (vermutlich südlich von *tor2*) wurden 52 Chromosomen erfolgreich analysiert und ergaben 27x *Ler* und 25x Col. Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei der Mutation 590501 stattdessen um ein anderes, bereits bekanntes *tor* Allel handelt, wurden weitere Marker eingesetzt. Für den Marker *nga8* auf Chromosom 4 wurden 56 Chromosomen erfolgreich analysiert und ergaben 33x *Ler* und 23x Col. Daraus lässt sich keine Kopplung zum Chromosom 4 ableiten.

Schließlich konnte eine Kopplung der 590501 Mutation mit Chromosom 5 gezeigt werden (Abb. 31). Dies konnte durch Ergebnisse mit bisher vier untersuchten Markern (*nga76*, 151, 249 und 225) belegt werden. Vermutlich liegt die Mutation zwischen den Orten *nga225* und *nga151*. Der 590501 Locus liegt daher in einer Region, welche sich nach bisherigen Erkenntnissen teilweise mit der Region von *tor3* überschneidet (zwischen *nga249* und *nga106*). Da die beiden Regionen jedoch sehr groß sind, lässt sich daraus keine Identität des *tor3* Locus mit dem 590501 Locus ableiten.

	nga225 14,31 cM	nga249 23,72 cM	nga151 29,62 cM	nga106 33,35 cM	nga76 68,4 cM
CHR 5	//				
#1	L	L	L	-	H
#2	L	L	L	-	L
#3	L	L	L	-	L
#4	H	L	L	-	H
#5	L	L	L	-	C
#6	H	L	L	-	L
#7	L	L	L	-	L
#8	L	L	L	-	L
#9	L	L	L	-	H
#10	-	L	L	-	-
#11	L	L	L	-	L
#12	L	L	L	-	-
#13	L	L	L	-	L
#14	L	L	H	-	C
#15	L	L	L	-	L
#16	L	L	L	-	C
#17	L	L	L	-	L
#18	L	L	L	-	L
#19	L	L	L	-	L
#20	L	L	L	-	-
#21	L	L	L	-	H
#22	L	L	L	-	L
#23	L	L	L	-	H
#24	L	L	L	-	L
#25	L	L	L	-	L
#26	L	L	L	-	L
#27	L	L	L	-	L
#28	L	L	L	-	L
#29	L	L	L	-	L

Abb. 31. Kartierung des 590501 Locus. Eine F₂-rekombinante Population (29 Individuen) wurde mit vier genetischen Markern (Bell und Ecker 1994) von Chromosom 5 untersucht. Die 590501 Mutation wurde im Ler-Hintergrund erzeugt. Die Größe von Chromosom 5 wird mit etwa 140 cM angegeben. CHR 5 Chromosom 5, L Ler, C Col, H heterozygot, - nicht analysiert.

3.7.2 Genetische Daten zur 590501 Mutation

Die Mutante 590501 ist eine typische *tor* Mutante mit rechtsgerichteten Torsionen der Blätter (siehe unten). Die Daten zur Kartierung der 590501 Mutation erforderten eine Untersuchung der Allelie-Verhältnisse innerhalb der *tor* Mutanten. Übereinstimmend mit den Daten zur Kartierung ergaben die Kreuzungen mit der phänotypisch ähnlichen *tor2* Mutante, dass beide Mutationen nicht allelisch sind. Alle F₁-Pflanzen aus den Kreuzungen 590501 x *tor2* zeigten einen schwachen *tor2* Phänotyp in Bezug auf Blätter und Trichome. Dieses Ergebnis entspricht der Tatsache, dass *tor2* unvollständig dominant ist (Tab. 8, vergleiche Tab. 1). Nachkommen der Kreuzungen 590501 x *tor2* wurden in mehreren Linien in die F₂ weitergeführt. Die F₂-Pflanzen zeigten eine deutliche Segregation: Es traten Wildtyp-Pflanzen auf, aber auch Pflanzen mit schwachem *tor* und Pflanzen mit deutlichem *tor* Phänotyp. Diese Daten belegten, dass *tor2* nicht allelisch mit 590501 ist.

Da die chromosomale Position von *tor4* nicht bekannt ist, wurde die Mutante 590501 auch mit *tor4* gekreuzt. Die Phänotypen der erhaltenen F1 und F2 Nachkommen belegten, dass die beiden Loci nicht allelisch sind (Tab. 8). Die Mutante 590501 wurde nicht in *tor1* rückgekreuzt, da hier die chromosomale Position Allelie ausschließt.

Da die Mutationen 590501 und *tor3* in einen sich überschneidenden Bereich auf Chromosom 5 kartieren, wurden auch für diese Mutanten Kreuzungen vorgenommen. Alle F1-Pflanzen aus einer Kreuzung 590501 x *tor3* zeigten einen schwachen *tor3* Phänotyp in Bezug auf Petiolen. Das Ergebnis entspricht der Tatsache, dass *tor3* unvollständig dominant ist (Tab. 8; vergleiche Tab. 1). In der F2 wurde eine Kopplung der Loci und eine Segregation der Phänotypen offenbar: Es treten fast ausschließlich Individuen mit Organtorsionen auf, wobei die Torsionen links- oder rechtsgängig waren. Unter etwa 80 Pflanzen konnten jedoch 3 Wildtyppflanzen isoliert werden. Die 3 phänotypischen Wildtyppflanzen wurden bezüglich ihrer Nachkommen, der F3, analysiert. Die F3 zeigte eine Segregation in Wildtyp und Pflanzen mit dem 590501 Phänotyp. Demnach waren die 3 wildtypischen Eltern aus der F2 heterozygot für den 590501 Locus. Diese Daten belegen, dass die Orte der Mutationen von 590501 und *tor3* durch Rekombination getrennt werden können und deshalb nicht allelisch sind.

Weitere Kreuzungen belegten, dass die Mutante 590501 rezessiv ist. Der Locus 590501 ist offensichtlich ein neues *TOR* Gen, vertreten durch ein einziges mutantes Allel. Die Mutante kann daher als *tor5* angesehen werden.

Tabelle 8. Kreuzungen der Mutante 590501 mit *Ler* und *tor* Mutanten.

Kreuzung	F1	F2	F3	Ergebnis
<i>Ler</i> x 590501	wt	segregierend in wt und <i>tor</i> (rechts)	/	590501 ist rezessiv.
<i>tor2</i> x 590501	schwacher <i>tor</i> Phänotyp (rechts)	segregierend in wt und <i>tor</i> (rechts)	/	Die Mutationen sind nicht allelisch.
<i>tor3</i> x 590501	schwacher <i>tor</i> Phänotyp (links)	etwa 80x <i>tor</i> (rechts oder links) und 3x wt	Die Nachkommen von 3 wt Pflanzen der F2 segregieren in <i>tor</i> (rechts) und wt.	Die Loci sind gekoppelt, aber nicht allelisch.
<i>tor4</i> x 590501	schwacher <i>tor</i> Phänotyp (rechts)	segregierend in wt und <i>tor</i> (rechts)	/	Die Mutationen sind nicht allelisch.

3.7.3 Der Phänotyp von 590501 Pflanzen

Die Mutante 590501 ähnelt phänotypisch der *tor2* Mutante, sie zeigt jedoch einige charakteristische Eigenarten. Vergleichbar den anderen *tor* Mutanten zeigt die Mutante 590501 pleiotropische Veränderungen. Alle Torsionen der Organe erfolgten nach rechts. Die Mutante 590501 hat verdrehte Infloreszenzen, die insgesamt stark verkürzt sind (Abb. 32A).

Die Mutante zeigt verdrehte Rosettenblätter. Die Wurzel von 590501 ist stark verkürzt und zeigt eine Abweichung des Wurzelwachstums nach links (betrachtet in Richtung des Wachstums). Im Gegensatz zu *tor2* hat die Wurzel von 590501 deutlich weniger Wurzelhaare (Abb. 32B, vergleiche Abb. 9). Die Mutante 590501 zeigt einen Phänotyp der Trichome: Der Stamm der Trichome ist stark verkürzt und die Äste werden nur teilweise ausgebildet (Abb. 32C, D, E) oder erscheinen wie geknickt. Auch bei 590501 verstärkt Etiolierung den Phänotyp (Abb. 32F, G). Die Mutante hat rechtsgängig verdrehte Schoten (Daten nicht gezeigt). (Daten nicht gezeigt).

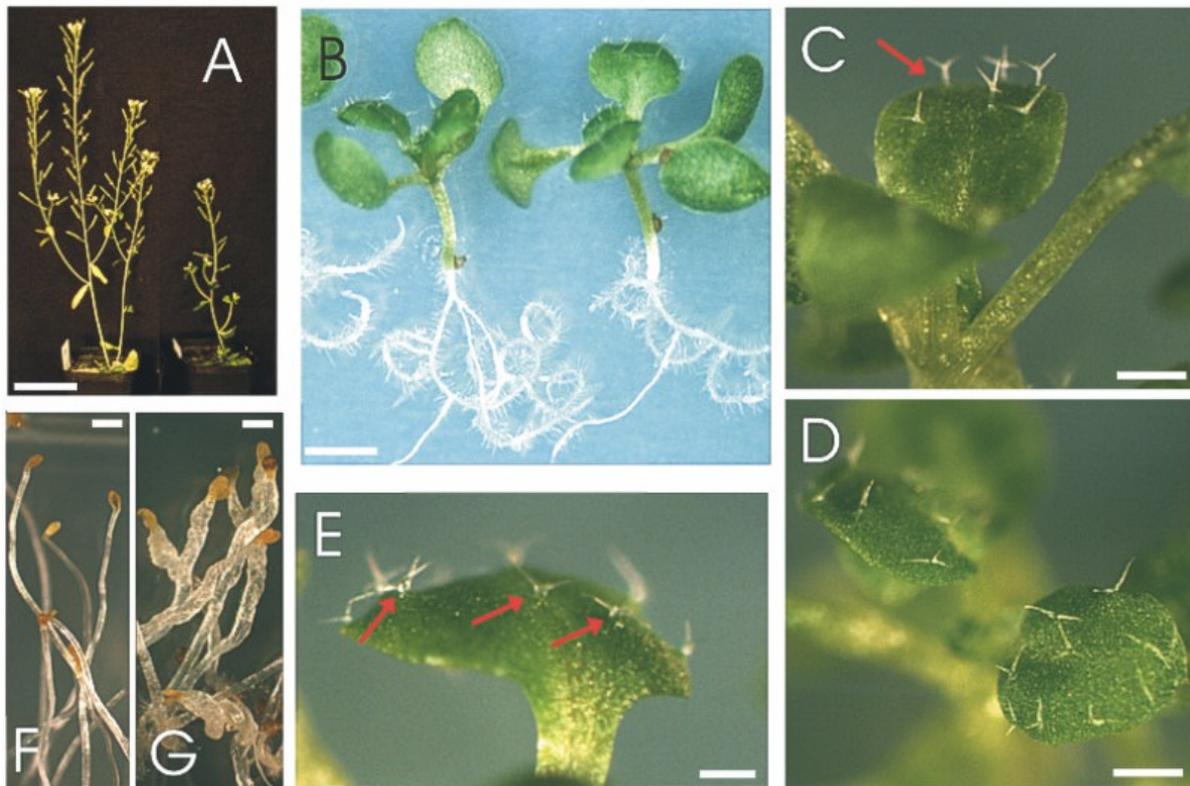


Abb. 32. Der Phänotyp der 590501 Mutante. (A) Blühende Pflanzen, links Ler, rechts 590501. Balken 5 cm. (B) 590501 Pflanzen mit Blatttorsionen, 9 DAG. 590501 Wurzeln sind verkürzt und wachsen in Spiralen. Balken 5 mm. (C) Trichome Ler. Pfeil weist auf den elongierten Stamm eines Trichoms. (D) Trichome 590501. Häufig werden nur zwei Äste vollständig ausgebildet. Balken (C, D) 250 μ m. (E) Trichome 590501, Pfeile weisen auf verkürzte Stämme. Balken 100 μ m. (F) Obere Teile etiolierter Keimlinge Ler, 9 DAG. (G) Ganze etiolierte Keimlinge 590501, 9 DAG. Balken (F, G) 1 mm.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals die Gruppe der *tortifolia* (*tor*) Mutanten in *Arabidopsis* beschrieben. Die zentrale Eigenart der *tor* Mutanten ist das Auftreten von Torsionen in den Organen. Diese Torsionen entstehen während der Organstreckung und haben ihre Ursache vermutlich in einem Defekt im diffusen (interkalaren) Wachstum der Zellen. Die Organe eines Allels sind immer nach rechts (zum Beispiel *tor1*, *tor2*) oder nach links (*tor3*) verdreht. Von anderen Arbeitsgruppen sind ähnliche Mutanten beschrieben worden. So drehen die Organe von *spiral1* (*spr1*) und *spiral2* (*spr2*, allelisch mit *tor1*) nach rechts, die Organe der Mutanten *lefty1*, *lefty2* und *microtubule organization1* (*mor1*) verdrehen sich nach links. Im Falle der Mutanten *lefty1*, *lefty2* und *mor1* ist gezeigt worden, dass die ursächlichen Mutationen Komponenten des Mikrotubuli-Cytoskeletts betreffen (Thitamadee et al. 2002; Whittington et al. 2001). Pharmakologische Daten belegen dieses auch für *spr1* und *spr2/tor1* (Furutani et al. 2000). Da in Pflanzen die Form der Zellen und Organe durch die Zellwand festgelegt wird, liegt die Ursache der Phänotypen von Mutanten mit helikalem Wachstum vermutlich in einer Beeinträchtigung der Kontrolle des Cytoskeletts über die Zellwanddeposition (Hashimoto 2002, Preston 1974).

Morphologische Händigkeit ist in Tieren weit verbreitet. Mutationen können in Tieren bestimmte Händigkeiten erzeugen oder die Festlegung der Händigkeit dem Zufall überlassen. Beispielsweise rufen Mutationen in Kollagen-Genen den *roller* Phänotyp in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* hervor. Die Tiere zeigen eine Fortbewegung in Spiralen definierter Händigkeit. Ursache ist eine Veränderung im Aufbau der Kutikula der Tiere (Johnstone 2000). Bei der *inversus viscerum* Mutante der Maus tritt die normale (*situs solitus*) und die inverse (*situs inversus*) Asymmetrie der Rechts-Links-Achsen mit nahezu zufälliger Häufigkeit auf. In der Mutante sind die Cilien des sogenannten Knoten des frühen Embryos nicht bewegungsfähig. Deshalb kommt es nicht zum linksgerichteten Fluss der extraembryonalen Flüssigkeit und der darin vermutlich enthaltenen Morphogene. Das *inversus viscerum* Gen kodiert für Dynein, ein mit Mikrotubuli (MT) assoziiertes Motorprotein, welches in den Cilien für Beweglichkeit sorgt (Capdevila et al. 2000). Obwohl bei den genannten Beispielen offensichtlich erhebliche Unterschiede zum Phänomen in Pflanzen existieren, gibt es dennoch Parallelen: die zentrale Bedeutung des Exoskeletts (Zellwand bzw. Kutikula) oder des Cytoskeletts. Die Klonierung des *TOR1* Gens ermöglicht die Analyse des Phänomens des helikalen Wachstums beziehungsweise der Zellstreckung in Pflanzen mit einem molekularen Werkzeug.

4.1 Die Expressionsanalyse von *TOR1*

Northern Analysen und RT-PCR zur Expression des *TOR1* Gens ergaben, dass *TOR1* relativ gleichmäßig in den Organen Wurzel, Petiole, ganzes Blatt, junges Blatt, Infloreszenzstamm und Infloreszenz exprimiert wird (Abb. 17). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund, dass in den respektiven Organen der *tor1* Pflanzen Torsionen auftreten. In einer Northern Analyse mit derselben Sonde wurde der Frage nachgegangen, ob die Expression des *TOR1* Gens im Wildtyp reguliert wird und unterschiedlich starke Aktivität zeigen kann. Verglichen wurden dafür a) etiolierte und bei Licht angezogene Keimlinge des Wildtyps (8 DAG) und b) Rosettenblätter des Wildtyps, die bei Nacht (24.00) und bei Tag (12.00) geerntet worden waren. In allen Fällen war die *TOR1* Expression sehr schwach und war vermutlich niemals verstärkt (Daten nicht gezeigt).

Nun wurde versucht, die Expressionsanalyse durch Untersuchung von *TOR1*-Promotor-*GUS* Linien zu vertiefen (Abb. 19). Das Expressionsmuster, welches durch die *TOR1*-Promotor-*GUS* Linien offenbar wurde, war nur teilweise erwartet worden. Beispielsweise zeigten Petiolen, welche noch nicht die Hälfte ihrer vollen Länge erreicht hatten, Expression lediglich im Bereich der Nervatur. Auch im sich noch verlängernden Hypokotyl junger Keimlinge (3 DAG) überwog die Expression im vaskulären Bereich. Um eine stabile Richtung im Wachstum zu gewährleisten, sind jedoch vor allem die Epidermis und äußere Gewebe der Organe von Bedeutung (Hart 1990; vergleiche auch das Modell zum helikalen Wachstum in der Einleitung). In der Epidermis zeigten Petiolen Expression durch den *TOR1* Promotor nur in einem sehr frühen Stadium der Blattentwicklung. Ebenso konnte *TOR1* Expression in der Epidermis von Hypokotylen, die älter als 3 DAG waren, nicht beobachtet werden. Demnach wird die Expression des *TOR1* Gens möglicherweise bereits bei der Zellteilung, vermutlich aber kurz darauf benötigt. Expression im Leitgewebe könnte daher Zellen anzeigen, welche gerade den Zellzyklus verlassen und zur Zellstreckung übergehen. Leitgewebe zeigen auch in fast ausgewachsenen Petiolen noch Zellteilungsaktivität (Donnelly et al. 1999). Die Tatsache, dass *TOR1* Expression in Epidermis (und vermutlich Kortex) älterer, sich streckender Gewebe nicht angetroffen wird, könnte auf eine erhöhte Stabilität der *TOR1* mRNA oder des *TOR1* Proteins hinweisen.

Viele Mutanten mit Defekten bei der Zellstreckung zeigen eine Verstärkung des Phänotyps, wenn sie in Gegenwart hoher Saccharosekonzentration angezogen werden (siehe z.B. Hauser et al. 1995). Wurden *TOR1*-Promotor-*GUS*-Pflanzen auf 4,5 % Saccharose angezogen, veränderte sich das Expressionsmuster nicht signifikant gegenüber Pflanzen, die auf 1,5 % Saccharose angezogen wurden. Übereinstimmend damit, zeigten auch *tor1* Pflanzen keine Verstärkung des Phänotyps bei Anzucht auf 4,5 % Saccharose (Daten nicht gezeigt).

Leider konnten unter 60 transgenen *Arabidopsis TOR1*-Promotor-*GUS* Linien nur 4 identifiziert werden, welche *GUS* Aktivität zeigten. Möglicherweise kann Transkriptionsaktivität durch den *BglI-TOR1*-Promotor nur nachgewiesen werden, wenn der Ort der Insertion des Konstruktes im Genom diese zusätzlich begünstigt. Es erscheint daher notwendig, die mit dem *TOR1*-Promotor-*GUS* Konstrukt erhaltenen Daten zur Expression mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich über die Expression des *TOR1* Gens sagen, dass seine Aktivität pleiotrop ist und dass das *TOR1* Genprodukt vermutlich in einer frühen Phase der Zellstreckung benötigt wird. Das Expressionsverhalten des *TOR1* Gens wird wahrscheinlich nicht durch Etiolierung, Tag/Nachtwechsel oder durch die Saccharosekonzentration im Medium reguliert.

4.2 Die Funktion des TOR1 Proteins

4.2.1 Versuche zur *in vivo* Lokalisierung des markierten TOR1 Proteins

Zur Aufdeckung der Funktion des TOR1 Proteins wurde seine subzelluläre Lokalisierung angestrebt. Die in dieser Arbeit erzeugten Expressionskonstrukte für TOR1-sGFP, TOR1-ECFP und MBD-EYFP (MBD bedeutet Mikrotubulus-Bindungsdomäne; MBD dient als Marker für MT) sind funktionell und liefern in *Arabidopsis* Protoplasten vermutlich die zu fordernden fluoreszierenden Proteine. Die transiente Expression dieser Konstrukte und von MBD-sGFP und Talin-DsRed in Protoplasten ermöglichte die Observation von Komponenten des Cytoskeletts. Mehrere unabhängige Ergebnisse belegen, dass fluoreszierende TOR1 Proteine in Protoplasten mit kortikalen MT assoziieren. Zum einen zeigen die von TOR1 markierten Filamente große Ähnlichkeit mit den durch MBD markierten Filamenten in Bezug auf Anordnung und Position in Protoplasten. Von TOR1 und MBD markierte Filamentsysteme sind weitgehend unabhängig vom Aktin-Cytoskelett. Ein direkter Hinweis, dass das von TOR1 markierte Cytoskelett identisch mit dem MT-Skelett ist, erfolgte durch Versuche mit der Droge Oryzalin. Die von TOR1-sGFP markierten Filamente konnten effektiv und spezifisch durch Oryzalin aufgelöst werden. Die entstehenden fluoreszierenden, an der Zelloberfläche befindlichen Punkte sind auch für das Konstrukt MBD-sGFP nach Applikation von MT-Giften beschrieben worden (Marc et al. 1998). Schließlich ist es gelungen, TOR1-ECFP und MBD-EYFP in Protoplasten gleichzeitig zu observieren. Da die beiden Proteine häufig weitgehend identische Strukturen markieren, assoziiert das markierte TOR1 Protein in Protoplasten vermutlich mit MT und nicht mit anderen filamentösen Strukturen des Cytoskeletts. Ob jedoch TOR1 ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein (MAP) im strengen Sinne ist, d.h. ob es physischen Kontakt zu MT aufnimmt, lässt sich durch diese Studie nicht sicher entscheiden.

In Experimenten der Koexpression von TOR1-ECFP und MBD-EYFP schien die Eigenschaft von markiertem TOR1, gleichmäßig mit Filamenten zu assoziieren, häufig herabgesetzt. Stattdessen traten verstärkt feine Aggregate an der Zellperipherie auf (Abb. 29) und/oder TOR1-ECFP lokalisierte verstärkt im Cytoplasma. Auch in Experimenten der einfachen Expression von markiertem TOR1 oder MBD wurde beobachtet, dass (insbesondere ältere) Protoplasten fluoreszierende Aggregate akkumulierten. Vermutlich führt die Expression vom 35S-Promotor zu großen Protein-Mengen in Protoplasten. Möglicherweise ist in Protoplasten die Anzahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche von MT limitierend, weshalb eine Überexpression von MBD oder TOR1 Fusionsproteinen auch zu einer fehlerhaften Lokalisierung der Proteine, und somit zu einer Entstehung von Aggregaten führen kann. Im Falle der Koexpression von TOR1-ECFP und MBD-EYFP könnten beide Proteine um Bindungsstellen konkurrieren und einander von MT verdrängen. Die verstärkte Präsenz von TOR1-ECFP in feinen Aggregaten oder im Cytoplasma könnte dann eine im Vergleich zu TOR1 stärkere Bindung von MBD an MT bedeuten.

Transgene *Arabidopsis*, welche MBD-sGFP überexprimieren, können ähnlich *tor1* Mutanten rechtsgängige Verdrehungen von Organen zeigen (Hashimoto 2002). Falls TOR1 *in planta* direkten Kontakt mit MT aufnimmt, könnte die Überexpression von MBD-sGFP über einen dominant-negativen Effekt zur Verdrängung von TOR1 von seinem Bindungsort führen. TOR1 wäre dann nicht mehr in der Lage, seine spezifische biologische Funktion auszuüben. Die entstandene Situation gleicht dem Verlust der TOR1 Aktivität im *tor1* Hintergrund (siehe Ergebnisse).

Die in dieser Arbeit gefundenen Anordnungen von kortikalen MT in Protoplasten spiegeln nicht notwendigerweise die normale Konfiguration von MT in Protoplasten wider. Das MBD-sGFP Konstrukt ist in der Lage MT zu bündeln. Möglicherweise kann es auch MT stabilisieren (Marc et al. 1998; Granger und Cyr 2000). Wenn TOR1 ein MAP ist, könnte seine Überexpression zu Veränderungen des MT-Skeletts führen. Da in Protoplasten, welche MBD-sGFP oder TOR1-sGFP exprimierten, Filamente stark unterschiedlicher Fluoreszenz auftraten, könnte auch TOR1 die Funktion der Bündelung von MT haben. Die Länge der markierten Filamente (oft > 10 µm; Abb. 27) spricht ebenfalls für eine Bündelung.

4.2.2 Die Analyse der Sekundärstruktur des TOR1 Proteins

Das TOR1 Protein begründet eine neuartige, bisher nicht beschriebene Proteinfamilie aus Pflanzen und weist nur schwache Homologie zu Proteinen bekannter Funktion auf. Daher ist versucht worden, durch Analyse der Sekundärstruktur des Proteins Aufschluss über seine Funktion zu erhalten. Die computergestützte Analyse zur Vorhersage von Transmembranspannen in Proteinen (z.B. Sonnhammer et al. 1998) lieferte keinen Hinweis, dass TOR1 ein integrales Membranprotein ist. Computerprogramme zur Vorhersage von

Signalsequenzen in Proteinen (Nielsen et al. 1997; Emanuelsson et al. 1999) wiesen auf eine entfernte Ähnlichkeit des TOR1 N-Terminus mit Transitpeptiden für den Chloroplastenimport hin. Das Vorhandensein eines N-terminalen Transitpeptides im TOR1 Protein konnte jedoch in einem Assay zum Chloroplastenimport nicht bestätigt werden (J. Meurer, Botanisches Institut der LMU, München, persönliche Mitteilung). Die weitere Analyse von TOR1 und den Mitgliedern der TOR1 Familie aus *Arabidopsis* ergab, dass TOR1 eine Domäne mit HEAT repeats und vermutlich eine Domäne zur Ausbildung von *coiled coils* besitzt.

4.2.2.1 Die HEAT repeat Domäne in TOR1 und Assoziation mit Mikrotubuli

Die Anwendung mehrerer unabhängiger bioinformatischer Methoden führte zu der Einschätzung, dass TOR1 und die Mitglieder der TOR1 Familie eine Anzahl von HEAT repeats besitzen (siehe Ergebnisse). Dennoch liefert der REP-search Algorithmus (Andrade et al. 2001) zunächst keine über dem Schwellenwert liegenden Werte für die Anwesenheit von HEAT repeats in diesen Proteinen. Die Consensus-Sequenzen der Proteine der TOR1 Familie lieferten hingegen signifikante Ergebnisse für 5 aufeinanderfolgende HEAT repeats. Durch den Vergleich der Consensus-Sequenzen mit den Sequenzen der einzelnen Mitglieder der TOR1 Familie konnte jeweils die Position der HEAT repeats abgeleitet werden. Demnach handelt es sich bei der TOR1 Familie um eine neue Klasse von HEAT repeat Proteinen, welche lediglich in Pflanzen existiert. Möglicherweise geht diese Spezialisierung mit der im Vergleich zu Tieren weitgehend unterschiedlichen Funktion pflanzlicher MT einher (Wasteneys 2002).

HEAT repeats sind in Proteinen mit diversen Funktionen gefunden worden. Die Gemeinsamkeit von Proteinen mit HEAT Domänen liegt in der Fähigkeit zu Protein-Protein Interaktionen (Andrade et al. 2001). Domänen mit einer kontinuierlichen Abfolge von HEAT repeats bilden eine helikale Superstruktur aus, deren Oberfläche für den Kontakt mit anderen Proteinen dient (Groves und Barford 1999). Die jeweiligen Bindungspartner der Proteine mit HEAT Domänen sind unterschiedlicher Natur. Da TOR1-sGFP in Protoplasten vermutlich mit MT assoziiert, ist die Frage, ob die putativen HEAT repeats in TOR1 eine Bindung des Proteins an MT vermitteln, von zentraler Bedeutung.

Das Protein MOR1/GEM1 aus *Arabidopsis* und seine Homologe XMAP215 aus *Xenopus* und TOGp aus *Homo sapiens* sind HEAT repeat Proteine. Die Funktion der Proteine liegt vermutlich in der Regulation der Dynamik von MT (Twell et al. 2002; Popov et al. 2001; Spittle et al. 2000). Die Sequenzen von MOR1/GEM1, XMAP215 und TOGp präsentieren mehrere Abschnitte mit HEAT repeats, wobei jeweils der C-Terminus dieser Proteine keine HEAT repeats enthält. Diese drei Proteine haben im C-terminalen Bereich ein MT-Bindungsmotiv. Bindung des C-Terminus an MT ist für MOR1/GEM1 und XMAP215

gezeigt worden (Twell et al. 2002; Popov et al. 2001). TOGp scheint mit dem N-Terminus an MT zu binden, aber auch der N-Terminus von XMAP215 zeigt eine Affinität zu MT (Hussey und Hawkins 2001; Spittle et al. 2000). Demnach ist eine Beteiligung von HEAT *repeats* an der Assoziation der Proteine mit MT nicht auszuschließen.

Proteine mit ARM *repeats* bilden ähnliche Superstrukturen wie HEAT *repeat* Proteine aus; beide Protein-Klassen bilden eine verwandtschaftlich zusammenhängende Überfamilie von *repeat* Proteinen. Auch ARM *repeats* vermitteln Protein-Protein Interaktionen. Das ARM *repeat* Protein Importin- α assoziiert mit MT in Tabak-Protoplasten (Smith and Raikhel 1998). Das Protein *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) aus *Homo sapiens* besitzt ein MT-Bindungsmotiv außerhalb der Domäne mit ARM *repeats* (Hatzfeld 1999). Ob bei diesen Proteinen oder weiteren Mitgliedern der ARM *repeat* Familie, die direkt oder indirekt mit MT assoziiert sind, ARM *repeats* an der Bindung mit MT beteiligt sind, ist nach meinem Wissen bisher nicht gezeigt worden.

In vielen MAPs ist der Ort der Interaktion mit MT durch ein MT-Bindungsmotiv charakterisiert. MT-Bindungsdomänen gelten jedoch als nicht streng konserviert, ferner sind MT-Bindungsmotive bisher für Pflanzen nicht charakterisiert worden. Die MT-Bindungsmotive "L-x(5)-K-[IV]-G-S-x-[ED]-N-x-K" (Popov et al. 2001) oder "G-S-x(2)-N-x(2)-H-x-[PA]-[AG]-G(2)" (www.expasy.ch/prosite/) finden sich nicht im TOR1 Protein. Da Tubuline acide Proteine sind, haben MT-Bindungsdomänen basischen Charakter. Die Gesamtsequenz von TOR1 hat einen pI von 5,47. Einzelne Abschnitte des Proteins sind hingegen basisch, so ein Bereich, welcher direkt hinter der putativen *coiled coil* Domäne liegt (pI 10,62 für die Aminosäuren 566-677). Solche Bereiche könnten die Bindung an MT vermitteln.

Die in dieser Arbeit verwendete Technik der transienten Expression in Protoplasten könnte auch zu einer Identifikation derjenigen Anteile im TOR1 Protein führen, welche eine Assoziation mit kortikalen MT vermitteln. Durch die transiente Expression von Deletionskonstrukten des TOR1 (-sGFP) Leserahmens sollten die Sequenzen, welche für die MT-Assoziation notwendig sind, auf einfache Weise bestimmt werden können.

4.2.2.2 Besitzt TOR1 eine *coiled coil* Domäne?

Coiled coils sind helikale Bündel von 2 bis 5 α -Helices mit spezifischer Packung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureresten. Das Bündel (die Superhelix) selbst ist in der Regel linksgängig. Die involvierten α -Helices entstammen meist getrennten Aminosäureketten, so dass die Bündelung zu einer Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten führt (Beck und Brodsky 1998). *Coiled coils* finden sich in vielen Proteinen des Cytoskeletts; sie können dann stabförmige Strukturen von beträchtlicher Länge ausbilden (z.B. Tropomyosin). Andererseits sind viele *coiled coils* recht kurz und

bestehen aus 20 Aminosäureresten oder weniger (Lupas 1996). *Coiled coils* werden auch von einer Anzahl von DNA-bindenden Proteinen ausgebildet (z.B. der *leucine zipper* in GCN4).

Das Programm COILS (Lupas 1996) zur Erkennung von *coiled coil* Domänen in Proteinen sagt für TOR1 und die Mitglieder der TOR1 Familie eine zentral gelegene *coiled coil* Domäne einer Länge von über 50 Aminosäuren voraus. Weitere Regionen in den Proteinen der TOR1 Familie können hohe Wahrscheinlichkeiten für kurze *coiled coils* zeigen. Da diese Regionen jedoch niemals in der gesamten TOR1 Familie konserviert sind, werden sie hier nicht weiter behandelt.

Das Ergebnis des Programms COILS für die TOR1 Familie ist in Bezug auf die zentral gelegene *coiled coil* Domäne eindeutig, allerdings ist das Ergebnis des Programms nicht in allen Fällen zutreffend (Lupas 1997). Deswegen wurden zur Analyse der TOR1 Familie auch die Programme PairCoils und MultiCoil eingesetzt (Berger et al. 1995; Wolf et al. 1997). Während das Ergebnis von MultiCoil für die Proteine TOR1, F8A12.11 und T25N22.13 positiv ist, stellt das Ergebnis von Paircoil die Hypothese von *coiled coils* in der TOR1 Familie in Frage. Das Programm PairCoil ist jedoch besonders für zweisträngige, parallele *coiled coils*, die keine Diskontinuitäten enthalten, geeignet (Lupas 1997).

Vermutlich wird die Analyse der Programme durch die Anwesenheit einer Diskontinuität in den Sequenzen der TOR1 Familie gestört. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen *stutter* (Abb. 21, Abb. 22). *Stutter* in *coiled coils* führen zu einem geringfügigen Aufwinden der Superhelix und damit auch zu einer Destabilisierung der Struktur. Die Häufigkeit, mit der Diskontinuitäten wie *stutter* in *coiled coil* Sequenzen gefunden wurden, spricht dafür, dass sie spezielle Funktionen ausüben. Im Falle von Vimentin ermöglicht der *stutter* das Zusammentreten der Untereinheiten des *coiled coils* (Burkhard et al. 2001). Eine andere Funktion des *stutters* mag in der Erzeugung von Flexibilität im *coiled coil* liegen (Brown et al. 1996).

Die Hypothese, dass TOR1 mit Hilfe von *coiled coils* zu Oligomeren zusammentritt, könnte durch Röntgenstrukturanalyse der kristallisierten Proteine verifiziert werden. Eine interessante Alternative zur Beantwortung derselben Frage bietet sich mit der FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Technologie an. Bei dieser Technologie kann die Übertragung der Anregungsenergie zwischen zwei Fluorochromen, die an interagierende Proteine gekoppelt sind, *in vivo* gemessen werden. Der Abstand der durch die interagierenden Proteine zusammengeführten Fluorochrome muss dafür zwischen 10 und 100 Å liegen (Kato et al. 2002). Die Dimerisierung einer extrazellulären *leucine zipper* Domäne einer Rezeptorkinase aus *Arabidopsis* ist durch FRET gezeigt worden (Shah et al. 2001). Für ein entsprechendes Experiment könnten Fusionsproteine von TOR1 mit ECFP und EYFP in Protoplasten simultan exprimiert werden.

4.2.3 Zellstreckung und die Eigenschaften des TOR1 Proteins

Der Phänotyp der *tor* Pflanzen kommt vermutlich durch eine fehlerhafte Deposition von CMF in die Zellwand zustande. Aufgrund der beobachteten Organtorsionen wird angenommen, dass bei *spr1* und *spr2/tor1* CMF in einer helikalen Manier in die Zellwand eingelagert werden, wodurch die gesamte Zellwand eine Gängigkeit bekommt (Hashimoto 2002). MT spielen in Zellen mit diffusem Streckungswachstum eine wichtige Rolle bei der Zellwandgenese (Baskin 2001). Da TOR1 vermutlich mit kortikalen MT assoziiert, könnte es die Deposition von CMF in die Zellwand regulieren. Die Aufdeckung der Aufgaben des TOR1 Proteins könnte zum Verständnis des Mechanismus, durch welchen MT die Deposition von CMF kontrollieren, beitragen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse klären nicht die Frage, ob TOR1 ein MAP im strengen Sinn ist und direkten physischen Kontakt zu MT aufnimmt (Hussey and Hawkins 2001), oder ob es nur indirekt mit MT assoziiert ist. Wichtig ist auch die Frage nach möglichen weiteren Bindungspartnern des TOR1 Proteins. Die putativen *coiled coils* im TOR1 Protein deuten an, dass TOR1 *in vivo* als ein Oligomer vorliegt. Dieses würde eine räumlich definierte Position mehrerer Domänen mit HEAT *repeats* in der TOR1 Quartärstruktur bedeuten. Falls zur gleichen Zeit in der gleichen Zelle vorhanden, könnten die verschiedenen Mitglieder der TOR1 Familie mittels ihrer *coiled coils* zu Heterooligomeren mit modifizierten Eigenschaften zusammentreten. Die zentrale Funktion des TOR1 Proteins könnte deshalb die räumliche Koordination mehrerer gleichartiger oder verschiedener Proteinpartner sein.

Viele Proteine mit HEAT oder ARM *repeats* sind Membran-assoziierte Proteine (Kunz et al. 1999; Mishra et al. 2001; Hatzfeld 1999). Möglicherweise gehört TOR1 zum cytoplasmatischen Teil einer physikalischen Verbindung, welche durch die Plasmamembran reicht und MT mit den CMF der Zellwand verbindet. Strukturen mit den Eigenschaften von Rezeptoren, welche CMF mit darunterliegenden MT verbinden, sind durch verschiedene Modelle des Zusammenspiels zwischen Zellwand und Cytoskelett gefordert worden (Baskin 2001; Williamson 1991). Entsprechend dieser Modelle haben die Rezeptoren räumlich orientierte Bindungsstellen, mit Hilfe derer sie den Winkel zwischen MT innerhalb und CMF außerhalb der Zelle festlegen. Vermutlich findet bei der Ausrichtung von CMF und MT eine funktionelle Rückkopplung der beiden Systeme statt (Cyr 1994). TOR1 könnte den Winkel, mit welchem die Rezeptoren CMF bzw. MT binden, spezifizieren und dadurch die Richtung des Wachstums festlegen. Möglicherweise bindet TOR1 dafür direkt an MT und zusätzlich an den cytoplasmatischen Teil des Rezeptors. In *tor1* Pflanzen bliebe die Verbindung zwischen MT und CMF zwar bestehen, der Winkel zwischen beiden Strukturen würde aber im Vergleich zum Wildtyp stets um einen bestimmten Betrag abweichen. Alternativ, oder in

Überschneidung mit diesem Mechanismus, könnte TOR1 transversale MT selektiv stabilisieren. In *tor1* Pflanzen würde dann ein helikales MT-Skelett einer bestimmten Händigkeit vorherrschen. Beide Mechanismen weisen auf die Existenz weiterer Proteine hin, die an der Entstehung der verdeckten Händigkeit in Pflanzen beteiligt sind.

4.3 Die Interaktion von links- und rechtsgängigem Wachstum

Im vorherigen Abschnitt wurde die Funktion des TOR1 Proteins und das Zustandekommen der Organtorsionen in *tor1* diskutiert. Die molekulare Natur der zu fordernden Proteine TOR2 und TOR3 ist hingegen nicht bekannt. Unter Zuhilfenahme von veröffentlichten Daten über die Entstehung von rechts- und linksgängigen Organtorsionen (Furutani et al. 2000; Whittington et al. 2001; Thitamadee et al. 2002) und mit Hilfe der Ergebnisse der Doppelmutantenanalyse der *tor* Mutanten (siehe Einleitung) kann man Überlegungen anstellen, welche Faktoren der Interaktion von links- und rechtsgängigem Wachstum zugrunde liegen könnten. Das Auftreten von Mutanten mit nach rechts oder nach links gerichteten Torsionen könnte beispielsweise bedeuten, dass sich im Wildtyp beide Tendenzen gegenseitig aufheben und somit im Gleichgewicht befinden. Ich werde im Folgenden argumentieren, dass das nicht der Fall ist. Diese hypothetischen Überlegungen werden in einem Modell zusammengefasst (Abschnitt 4.3.1).

4.3.1 „Asymmetrisches Modell für das helikale Wachstum in Mutanten von *Arabidopsis*“

Rechts oder Links – ein Gleichgewicht?

In der Einleitung wurde die Analyse von Doppelmutanten der Loci *tor1*, *tor2* und/oder *tor3* beschrieben. Zwei wesentliche Ergebnisse dieser Analyse sind: a) Die linksgängige *tor3* Mutation ist dominant über die rechtsgängigen Mutationen *tor1* oder *tor2* in Bezug auf die Richtung der Torsion und b) *tor1* und *tor2* sind dominant über *tor3* in Bezug auf die Stärke der Torsion.

Nimmt man also an, dass sich beim Wildtyp die Aktivitäten der Genprodukte TOR1 beziehungsweise TOR2 und TOR3 im Gleichgewicht befinden, dann sollte in den Doppelmutanten *tor1/tor3* oder *tor2/tor3* die Drehung nach links schwächer ausfallen als bei der Mutante *tor3* selbst. Das Gegenteil ist der Fall: In beiden Doppelmutanten mit *tor3* ist die Drehung gegenüber *tor3* verstärkt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Applikation von Giften, welche gegen MT gerichtet sind erzielt. Solche Gifte können bereits beim *Arabidopsis* Wildtyp linksgängige Torsionen der Organe hervorrufen. Bei bestimmten Konzentrationen verstärkten die mutanten Hintergründe *spr1* und *spr2* die Linksgängigkeit, statt sie abzuschwächen (Furutani et al. 2000). Demnach ist ein Modell, in welchem Linksgängigkeit

und Rechtsgängigkeit einander als gleichberechtigte „Kräfte“ gegenüberstehen, nicht zutreffend.

Stattdessen ist in *Arabidopsis* Linksgängigkeit in fast allen Fällen dominant (die Ausnahme bilden die natürliche Linksgängigkeit in Wurzeln und etiolierem Hypokotyl, siehe Gliederungsabschnitt 4.1.2). So zeigen auch die Doppelmutanten *spr1/lefty1* und *spr1/lefty2* linksgängige Organtorsionen (Thitamadee et al. 2002). In der Doppelmutante *spr1/mor1* treten linksgängige Organtorsionen auf (Geoffrey Wasteneys, mündliche Mitteilung). Deswegen sollte ein Modell zur Erklärung des rechts- und linksgängigen Wachstums die übergeordnete Position der Linksgängigkeit in den Wirkungsketten berücksichtigen (und somit asymmetrisch sein).

Linksgängigkeit ist dominant, weil sie am Ende der Wirkungskette steht

Linksgängig helikales Wachstum ist mehrfach in *Arabidopsis* beobachtet worden: in *mor1* Mutanten, welche nur noch ein fragmentiertes kortikales MT-Gerüst aufweisen (Whittington et al. 2001), in *lefty1* und *lefty2*, welche *missense* Mutationen in den α -tubulin Genen 4 bzw. 6 tragen (Thitamadee et al. 2002), und in Pflanzen des Wildtyps, die mit geringen Mengen MT-stabilisierender oder MT-destabilisierender Substanzen behandelt wurden (Furutani et al. 2000).

Diese Beispiele des linksgängigen Wachstums haben eine Störung des kortikalen MT-Gerüsts gemein, wobei jedoch die jeweilige Ursache recht unterschiedlich ist. Die Gemeinsamkeit für das Phänomen des linksgängigen Wachstums scheint in einer Reduktion der Funktionalität des kortikalen MT-Gerüsts zu liegen, welches wiederum zu einer reduzierten Kontrolle über die Deposition der Cellulosemikrofibrillen (CMF) führen sollte. Auf der anderen Seite kann man annehmen, dass im Falle des helikalen Wachstums die Zellwand eine Händigkeit aufweist, verursacht durch helikal ausgerichtete CMF. Deshalb schlage ich vor, dass die Deposition von helikalen CMF die *default*-Situation bei reduzierter Führung durch kortikale MT ist. Entsprechend dieser Vorstellung wird die Linksgängigkeit des Wachstums durch eine Eigenart der Zellwand oder der Zellwanddeposition hervorgerufen. Gleichzeitig ist die Zellwand die ausführende Struktur des helikalen Wachstums; eine von der Zellwand aufgezwungene Händigkeit hätte deshalb eine übergeordnete Position (Abb. 33).

Eine reguläre, nicht-mutante pflanzliche Zelle kann ihr Wachstum über die Ausrichtung von CMF in der Zellwand durch kortikale MT kontrollieren (Shibaoka 1994; Wymer and Lloyd 1996; Baskin et al. 2001). Rechtsgängiges und linksgängiges Wachstum in *Arabidopsis* Mutanten sind vermutlich determiniert durch Zellwände, die eine Händigkeit entgegengesetzter Vorzeichen aufweisen (Hashimoto 2002). Wenn man annimmt, dass zur Verwirklichung rechtsgängigen Wachstums kortikale MT benötigt werden, während

linksgängiges Wachstum auf einer Eigenschaft der Zellwand beruht, dann erklärt sich mühelos, warum in den Doppelmutanten Rechtsgängigkeit immer von Linksgängigkeit überschrieben wird (Abb. 34). Entsprechend dieser Vorstellung ist linksgängiges Wachstum dominant, weil seine Ausprägung nicht von kortikalen MT abhängt und auch nach Applikation von gegen MT gerichteten Drogen stattfinden kann. Möglicherweise wird das Paar Links- und Rechtsgängigkeit durch das Paar Händigkeit der Zellwand und Kontrolle durch das Cytoplasma repräsentiert (Abb. 33).

Die Tatsache, dass in den Doppelmutanten *tor1/tor3* und *tor2/tor3* die Drehung gegenüber der Mutante *tor3* verstärkt ist, könnte dadurch erklärt werden, dass die Proteine TOR1 oder TOR2 im Wildtyp an der Interaktion von kortikalen MT mit CMF beteiligt sind. Eine Assoziation von TOR1 mit kortikalen MT ist in dieser Arbeit gezeigt worden. Der Verlust der Aktivität von TOR1 und TOR2 könnte die im *tor3* Hintergrund noch verbliebene Kontrolle über die Deposition von CMF weiter schwächen.

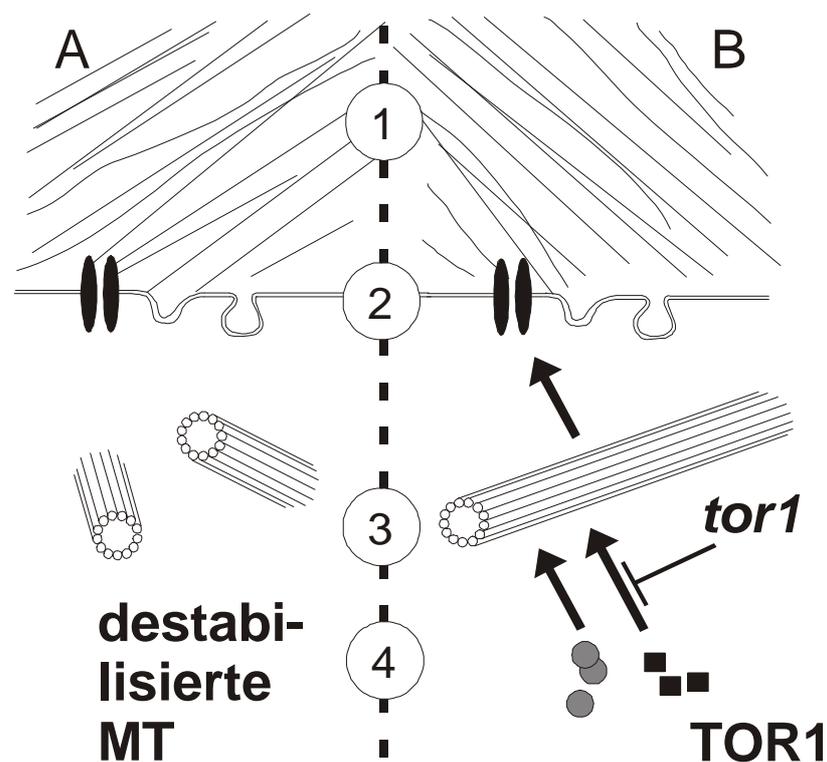


Abb. 33. Hypothese für die Hierarchie der Faktoren im helikalen Wachstum und Ebenen der Kontrolle (1-4). (1) Das Exekutivorgan des helikalen Wachstums ist die Zellwand. Ihre Händigkeit bestimmt die Händigkeit des Wachstums. (2) Die Deposition der Zellwand erfolgt an der Plasmamembran. Cellulosesynthasekomplexe erzeugen neue Cellulosemikrofibrillen. Die Zellwandstruktur kann auch durch die Sekretion von Zellwandproteinen modifiziert werden. (3) Das kortikale Mikrotubuliskelett reguliert die Ausrichtung der von den Cellulosesynthasekomplexen erzeugten Mikrofibrillen. (4) Mikrotubuli-assoziierte Proteine kontrollieren die Ausrichtung der Mikrotubuli. (A) Linksgängiges Wachstum. Kortikale Mikrotubuli sind in ihrer Funktionalität beeinträchtigt und haben einen reduzierten Einfluss auf die Zellwanddeposition. In der Regel erfolgt dies durch Destabilisierung (Ausnahme: Taxol, Furutani et al. 2000). Die Händigkeit entsteht auf Ebene (1) und/oder (2). (B) Rechtsgängiges Wachstum. Ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein fällt aus (z.B. TOR1). Die Händigkeit wird durch die Ebenen (3) und (4) kontrolliert.

Linksgängiges Wachstum als eine Eigenschaft der Zellwand

Es stellt sich daher die Frage, woher beim linksgängigen Wachstum die intrinsische Händigkeit der Zellwand rührt? Diese Händigkeit könnte von einem Mechanismus rühren, welcher in Pflanzen zur Entstehung von helikoidalen Zellwänden führt (siehe Einleitung). Tatsächlich ist eine weitgehende Unabhängigkeit des Aufbaus einer helikoidalen Zellwand von kortikalen MT in mehreren Pflanzen gezeigt worden (Baskin 2001; Derksen et al. 1990; Vian et al. 1982). Helikoidale Zellwände können eine festgelegte Händigkeit aufweisen (Roland et al. 1987). Allerdings ist der Mechanismus der Entstehung helikoidaler Zellwände in Pflanzen bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang Mechanismen, die auf einem strikten *self-assembly* der Biopolymere der Zellwand beruhen (Roland und Vian 1979; Neville und Levy 1984) und Mechanismen, welche die Geometrie der Zelle ausnutzen (Emons and Mulder 1998). Auch Zellwand-Proteine könnten eine Zellwand-intrinsische Händigkeit hervorrufen. In einem vor kurzem veröffentlichten umfassenden *Review* über die Entstehung von Zellwänden präsentiert Baskin die Hypothese, dass eine zellwandständige Matrix mit Rezeptor-Eigenschaften die Ausrichtung von CMF regulieren könnte (Baskin 2001). Tatsächlich löst die *antisense*-Suppression eines Zellwandproteines in *Daucus carota* gerichtetes helikales Wachstum aus (Holk et al. 2002). In *Arabidopsis* können Torsionen der Wurzel und des Hypokotyls auch in einer Mutante mit einem Defekt in einem apoplastischen Ascorbat-Oxidase/Laccase-Homolog beobachtet werden (Sedbrook et al. 2002).

Im Gegensatz zur oben erläuterten Anschauung eines weitgehend MT-unabhängigen *default*-Mechanismus im linksgängigen Wachstum, vermuten andere Autoren, dass in den Mutanten *lefty1* und *lefty2*, aber auch nach der Applikation von MT-Giften, helikale CMF von helikalen kortikalen MT ausgerichtet werden. Tatsächlich konnten in diesen linksgängig wachsenden Pflanzen kortikale MT mit der zu fordernden Orientierung nachgewiesen werden (Furutani et al. 2000; Thitamadee et al. 2002; Hashimoto 2002). Die Autoren berufen sich dabei auf das Paradigma zur Beschreibung der Biogenese pflanzlicher Zellwände, entsprechend welchem CMF stets durch MT ausgerichtet werden (Giddings und Stahelin 1991, vergleiche auch Baskin 2001). Die Allgemeingültigkeit der Beobachtung, dass kortikale MT entstehende CMF vektoriell ausrichten können, ist jedoch durch Berichte, in denen MT passiv der Ausrichtung von CMF folgten und Berichte, in denen sich MT entsprechend physikalischer Felder ausrichteten, in Frage gestellt worden (Takeda et al. 2002; Wasteneys 2000; Fisher und Cyr 1998; Fischer und Schopfer 1998; Williamson 1991).

Rechts- und Linksgängigkeit als eine Vorstufe zur Isotropie der Zelle

In vielen Fällen tritt im Zusammenhang mit helikalem Wachstum eine Reduktion der Anisotropie der Zelle auf. Die Querschnitte der Petiolen der *tor* Mutanten zeigen unnatürlich vergrößerte Zellen. Die etioliierten Hypokotyle aller *tor* Mutanten weisen einen erhöhten Durchmesser auf. Die Epidermis von etioliierten *tor2* Hypokotylen, aber auch von *tor2* Wurzeln, zeigt blasenförmige Zellen. Die Mutante *spr1* zeigt stark geschwollene Zellen im Innern des Hypokotyls (Furutani et al. 2000). *mor1* Mutanten zeigen in der Wurzel anfangs helikales Wachstum, schließlich verliert die Wurzelspitze aber ihre Anisotropie und zeigt schwere Schwellungen (Whittington 2001). Offensichtlich kann die gleiche Veränderung, die helikales Wachstum hervorruft, auch isodiametrisches Wachstum erzeugen (Abb. 34). Dieses wird auch durch Versuche mit gegen MT gerichteten Drogen deutlich. Geringe Mengen zerstören das kortikale MT-Skelett nicht vollständig und erzeugen helikales Wachstum (Furutani et al. 2000), hohe Mengen hingegen erzeugen Isotropie (Baskin et al. 1994). Demnach ist auch linksgängiges Wachstum, vermutlich um die Integrität der Zelle aufrecht zu erhalten, von der Anwesenheit kortikaler Mikrotubuli abhängig (vergleiche Hypothese zur Entstehung der Linksgängigkeit des Wachstums oben).

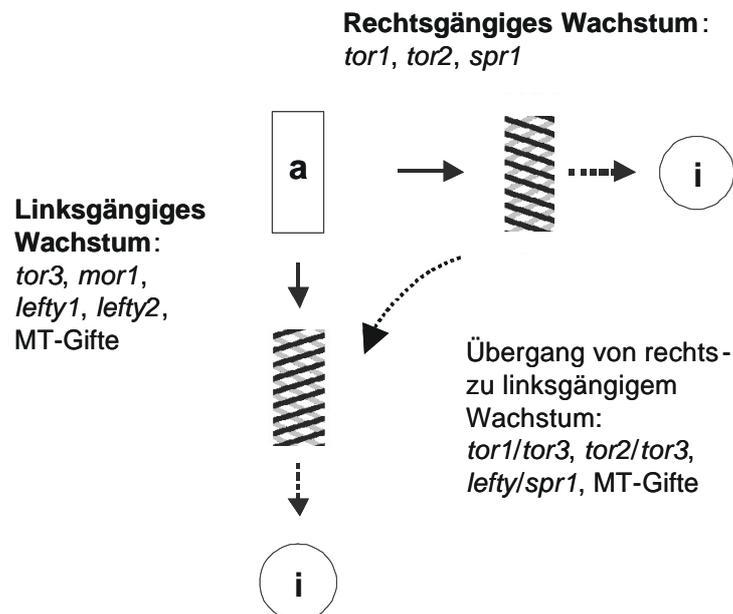


Abb. 34. „Asymmetrisches Modell für das helikale Wachstums in Mutanten von *Arabidopsis*“. Aufgeführt sind einige Beispiele des helikalen Wachstums. Wachstum erfolgt anisotropisch (a), helikal (links- oder rechtsgängig), oder isotropisch (i). Die Händigkeit im linksgängigen Wachstum beruht auf einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Kontrolle über die Deposition von Cellulosemikrofibrillen. Stattdessen werden die Cellulosemikrofibrillen durch einen *default*-Mechanismus ausgerichtet, welcher auf einer Eigenart der Zellwand bzw. der Zellwanddeposition beruht. Rechtsgängiges Wachstum beruht auf einem funktionellen Mikrotubuligerüst bei modifizierter Wirkung desselben auf die Zellwanddeposition. Das Modell wird als asymmetrisch bezeichnet, da linksgängiges Wachstum dominant über rechtsgängiges Wachstum ist. Eine Verstärkung des helikalen Wachstums erzeugt einen weitgehenden Verlust der Zellanisotropie.

4.4 Helikales Wachstum in *Arabidopsis*: multiple Loci, mehrere Wirkungswege

Neben den Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3* ist in dieser Arbeit die Mutante 590501 beschrieben worden. Die Mutante 590501 ist eine rezessive Mutante mit einem pleiotropen *tor* Phänotyp. Die Daten zur Rückkreuzung und Kartierung der Mutante 590501 legen den Schluss nahe, dass durch sie ein neuer *TOR* Locus angezeigt wird. Die Regionen der Loci 590501 und *tor3* überschneiden einander mit einem Bereich zwischen 23,72 bis 68,4 cM auf Chromosom 5 (total ~140 cM). Obgleich *tor3* linksdrehend und die Mutante 590501 rechtsdrehend ist, konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass beide im gleichen Gen betroffen sind. Da es gelungen ist, unter 80 F₂-Individuen einer Kreuzung der Mutanten *tor3* und 590501 insgesamt 3 phänotypische Wildtyp Pflanzen zu isolieren, deren Nachkommen (F₃) in Wildtyp und 590501 segregieren, sind die beiden Mutationsorte als gekoppelt, aber nicht als allelisch anzusehen. Demnach handelt es sich bei der Mutante 590501 um *tor5*.

In jüngerer Zeit sind einige neue Mutanten, welche helikales Wachstum zeigen, beschrieben worden. Für nicht alle in Tabelle 9 aufgeführten Mutanten ist die chromosomale Position der Veränderung bekannt. Daher kann die Tabelle in Bezug auf Allelieverhältnisse teilweise redundant sein. Es ist anzunehmen, dass in naher Zukunft einige der jetzt nicht bekannten Gene/Proteine aus *Arabidopsis* entdeckt werden. Die verschiedenen Loci vertreten vermutlich mehrere unabhängige Wirkungswege. Zellbiologische Wirkungsketten können durch Analyse von Doppelmутanten aufgeklärt werden. Beispielsweise wirken *tor1* und *tor2* (siehe Einleitung), aber auch *spr1* und *spr2/tor1* (Furutani et al. 2000) in unterschiedlichen Wirkungsketten (vergleiche auch Abb. 33). Wichtig ist die Beantwortung der Frage, ob die beiden phänotypisch ähnlichen Mutanten *tor2* und *spr1* im gleichen Wirkungsweg betroffen sind. Fortschritte zur Aufdeckung des *TOR2* Locus werden unten beschrieben.

Tabelle 9. *Arabidopsis* Mutanten mit gerichtetem helikalem Wachstum der Organe.

Mutante	Anzahl Allele	Locus	Protein	Phänotyp	subzellulärer Defekt	Referenz
<i>tor1/ spiral2</i>	mind. 8	At4g27060	HEAT repeats, putativ <i>coiled coils</i>	rechtsgängig	unbekannt, vermutlich MT assoziiert	diese Arbeit; Furutani et al. 2000; Bürger 1971
<i>tor2</i>	1	auf Chr. 1	unbekannt	rechtsgängig, starke Isotropie, Trichom-Phänotyp	unbekannt	diese Arbeit
<i>tor3</i>	1	auf Chr. 5	unbekannt	linksgängig	unbekannt	diese Arbeit
<i>tor4</i>	1	unbekannt	unbekannt	rechtsgängig, Trichom-Phänotyp	unbekannt	diese Arbeit
<i>tor5 (590501)</i>	1	auf Chr. 5	unbekannt	rechtsgängig, Trichom-Phänotyp	unbekannt	diese Arbeit
<i>spiral1</i>	mind. 4	auf Chr. 2	kloniert, nicht veröffentlicht	rechtsgängig, starke Isotropie, Trichom-Phänotyp	helikale MT	Furutani et al. 2000
Mutante 1-6c	1	unbekannt	unbekannt	rechtsgängig, Trichom-Phänotyp	unbekannt	Marinelli et al. 1997
<i>mor1/ gemini1</i>	2 + 2	At2g35630	XMAP215/ TOGp-Homolog	linksgängig, starke Isotropie, Trichom-Phänotyp bzw. Zellteilungsdefekt	fragmentierte MT	Whittington et al. 2001; Twell et al. 2002
<i>lefty1</i>	1	At4g14960	a-Tubulin (TUA6)	linksgängig	helikale MT	Thitamadee et al. 2002
<i>lefty2</i>	1	At1g04820	a-Tubulin (TUA4)	linksgängig	helikale MT	Thitamadee et al. 2002
<i>sku1, sku2</i>	je 1	unbekannt	unbekannt	linksgängig	unbekannt	Rutherford und Masson 1996
<i>sku5</i>	1	At4g12420	Askorbat-Oxidase/ Laccase; Glykosyl-Phosphatidylinositol verankert	linksgängig	unbekannt, vermutlich Zellwand-chemie	Sedbrook et al. 2002

4.4.1 Diskussion der Kartierung von *TOR2*

Mit Hilfe der genetischen Marker nF7G19 und nT1G11, noch weitergehend aber durch den Einsatz der selbst entwickelten genetischen Marker PT1 und PT3, konnte die *TOR2* Region wirkungsvoll eingegrenzt werden. Schließlich wurden die Marker PT13, 14 und 15 entwickelt. Von ihnen wurde eine weitere Verkleinerung des *TOR2* Bereiches erwartet. Die mit den Markern erzielten Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich (siehe Abb. 30). Die zehn heterozygoten nT1G11-seitigen F2-Rekombinanten zeigten im *TOR2* Bereich nicht den erwarteten einfachen Übergang zur homozygoten DNA des *Ler* Ökotyps, sondern zeigten

fast alle nach kurzer Distanz (von PT13 zu PT14, das sind etwa 101 kb) einen erneuten Übergang zur heterozygoten Situation, um schließlich (nach etwa 50 kb, bei AtEAT1) wieder homozygot für *Ler* zu werden. Dieser Verlauf deutet eine unnatürliche Häufung von Rekombinationsereignissen an. In dieser Region entspricht jedoch 1 cM etwa 400 kb (Rhee et al. 1998; Meinke et al. 1998). Das ist eine für *Arabidopsis* etwas unterdurchschnittliche Rekombinationshäufigkeit und kann die hypothetischen zusätzlichen Rekombinationen der nT1G11-seitigen Pflanzen keinesfalls erklären. Die Tatsache, dass die Pflanze #108, ebenso wie die nT1G11-seitigen F2-Rekombinanten, heterozygot an der Position PT14 ist (Abb. 30), deutet auch für diese Pflanze zusätzliche Rekombinationsereignisse an. Solange in *tor2* F2-rekombinanten Pflanzen die Natur etwaiger zusätzlicher Rekombinationsereignisse in der *TOR2* Region nicht präzise aufgeklärt werden kann, sind solche Pflanzen für Kartierungsarbeiten wertlos.

Der Verlauf der Rekombinationsereignisse entlang der Chromatiden in den *tor2* Rekombinanten der nT1G11-Seite könnte hingegen durch einen Artefakt vorgetäuscht werden. Obgleich die Marker PT13 und PT14 spezifisch für die jeweilige Position zu sein scheinen (siehe Ergebnisse), ist es möglich, dass durch die verwendeten Oligonukleotide zusätzlich DNA einer anderen chromosomalen Position amplifiziert wird. Dadurch könnten weitere Banden entstehen und einen heterozygoten Zustand vortäuschen. Es scheint geboten, weitere genetische Marker aus der direkten Umgebung von PT13 und PT14 einzusetzen.

Wenn man annimmt, dass die Marker PT13 und PT14 in Wirklichkeit eine umgekehrte physikalische Abfolge haben, dann würden die Widersprüche der Ergebnisse für die nT1G11-seitigen Rekombinanten scheinbar aufgelöst (Abb. 30). Die physikalische Karte (d.h. die Genomsequenz) für *Col* ist bekannt; demgegenüber kann die Abfolge bestimmter Marker in *Ler* umgekehrt sein. Inversionen in *Arabidopsis* Ökotypen sind an anderer Stelle bereits beobachtet worden. So beschreiben Franz et al. (2000) eine Inversion auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 für den Ökotyp *Ws* gegenüber einer Landsberg-Linie (Ökotyp *Landsberg ERECTA*). Sollte in der *TOR2* Region eine Inversion vorliegen, dann müsste im Falle der T1G11-seitigen Rekombinanten die Rekombination in der invertierten Region stattgefunden haben (hätte die Rekombination außerhalb stattgefunden, würde die hypothetische Inversion so nicht entdeckt worden sein). *Crossing over* wird im Bereich von Inversionen jedoch meist unterdrückt.

Interessanterweise ist die lineare Abfolge der für die Kartierung verwendeten Marker AtEAT1, nT1G11 und O846A in der physischen Karte gegenüber der Karte der Rekombinanten-Inzucht-Linien (RI-Linien) aus *Col* und *Ler* (Rhee et al. 1998; Meinke et al. 1998) umgekehrt. Für AtEAT1 wird die genetische Position 3,87 cM angegeben. Die Abfolge von weiteren Markern, beispielsweise ACC2 (3,36 cM) und PAI1 (8,53 cM), welche direkt

nördlich und südlich an die drei Marker AtEAT1, nT1G11 und O846A angrenzen, ist wiederum identisch für die physische Karte und die Karte der RI-Linien. Weiter außerhalb liegende Marker wie nga59, nga63 und AtHACs (Bell und Ecker 1994), welche auch für das mapping von *tor2* verwendet wurden, zeigen keine Unregelmäßigkeiten (A. R. Schöffner und M. Hauptmann, unveröffentlicht). Die Widersprüchlichkeit der Abfolge von AtEAT1, nT1G11 und O846A bezüglich der physischen Karte und der Karte der RI-Linien deckt sich nicht vollständig mit der in dieser Arbeit entdeckten Unregelmäßigkeit. Allerdings wird insbesondere die Verwertbarkeit des Markers AtEAT1 für Kartierungen in dieser Region durch beide Beobachtungen in Frage gestellt (vergleiche Pflanze #108, Abb. 30). Möglicherweise ist die genomische Konstitution von Col und Ler in dieser Region aufgrund von Inversionen oder Translokationen relativ heterogen. Dieses könnte zu den genannten Problemen bei Kartierungsprojekten führen.

Es stellt sich daher die Frage, welche Strategie am effektivsten die Klonierung von *TOR2* ermöglicht. Eine denkbare Strategie liegt in der Erzeugung einer weiteren *tor2* Mutante durch Insertionsmutagenese. Die Insertionsmutagenese bietet den Vorteil, dass betroffene Loci durch Isolierung von Sequenzen aus dem Übergang zwischen Insertion und Gen vergleichsweise einfach identifiziert werden können. Der gezielte *knock-out* von *TOR2* könnte durch Transposons geschehen. Transposons springen häufig nicht an zufällige Orte im Genom, sondern inserieren in einer bestimmten Entfernung auf demselben Chromatid (Parinov et al. 1999 und Referenzen darin). Durch Auswahl einer geeigneten Ausgangslinie, welche ein mobilisierbares Transposon trägt, könnte die Effizienz, mit der *TOR2* getroffen wird, erheblich gesteigert werden. Daher sind zwei *Arabidopsis*-Linien, welche Transposons (sogenannte *Ds*-Elemente) auf Bereichen der BACs F19P19 beziehungsweise T7A14 tragen (vergleiche auch Abb. 30) von besonderem Interesse (Parinov et al. 1999). Die beiden *Ds*-Linien N100023 (F19P19) und N100040 (T7A14) können beim Nottingham *Arabidopsis* Stock Center bestellt werden.

4.5 Circumnutation und Tropismus

Der Begriff Circumnutation beschreibt die rhythmische, in der Regel kreisförmige Bewegung wachsender Pflanzenorgane. Circumnutationen sind auch für die Hypokotyle von *Arabidopsis* beschrieben worden (Schuster 1996; Schuster und Engelmann 1997). Wie bereits erwähnt, wachsen die Wurzeln von *Arabidopsis* des Wildtyps auf schräg aufgestellten, hochprozentigen Agarplatten nicht senkrecht nach unten, sondern mit einer Abweichung nach rechts. Es wurde vermutet, dass die Ursache für diese helikale Wachstumsbewegung in der Circumnutation der Wurzelspitze liegen könnte (Simmons et al. 1995; Mullen et al. 1998). Die Beschreibung von Mutanten mit pleiotropen Organtorsionen (siehe Ergebnisse; Thitamadee 2002; Whittington et al. 2001; Furutani et al. 2000) zeigt

hingegen an, dass die nach rechts gerichtete Abweichung der Wurzel des Wildtyps vermutlich auf eine linksgängige, natürliche Torsion der Wurzel zurückzuführen ist. Tatsächlich ist in den Mutanten mit rechtsgängigen Organtorsionen wie *tor1*, *tor2* und der Mutante 590501 die Händigkeit des Wurzelwachstums umgekehrt, während in Mutanten mit linksgängigen Organtorsionen wie *mor1* und *lefty1* beziehungsweise *lefty2* die natürliche Händigkeit des Wurzelwachstums verstärkt wird. Demnach ist das nach rechts gerichtete Wurzelwachstum des Wildtyps vermutlich keine Folge von Circumnutation, sondern Folge einer natürlichen, beim Wachstum entstehenden Torsion des Organs. Interessanterweise zeigen etiolierte Hypokotyle des Wildtyps von *Arabidopsis* auch linksgängige Torsionen (Migliaccio und Piconese 2001). Dennoch kann man vermuten, dass Mutanten mit helikalem Wachstum eine veränderte Circumnutation zeigen. In Versuchen zur Circumnutation der Hypokotyle sind für *tor* Mutanten interessante Veränderungen aufgefallen. Die auffälligste Veränderung zeigte sich bei Circumnutationen einer Periodenlänge von etwa 100 min im Vergleich von *Ler* mit *tor3*. Während bei *Ler* in 79 % der Fälle Circumnutationen im Gegenuhrzeigersinn erfolgten, erfolgten Circumnutationen bei *tor3* in 87 % der Fälle im Uhrzeigersinn (die Daten entstammen einer Kooperation mit W. Engelmann, Institut für Botanik, Universität Tübingen).

Tropismen stellen, im Gegensatz zur Circumnutation, Pflanzenbewegungen dar, welche erst durch einen von außen stammenden Reiz ausgelöst werden. Beim Tropismus ist die Richtung der ausgeführten Bewegung bereits durch die Richtung des Reizes festgelegt. Viele pflanzliche Tropismen führen zu einer Verbiegung des Organs, beispielsweise richten sich Hypokotyle durch Verbiegen des zylindrischen Organs nach dem Licht aus. Tropismen können aber auch zu Organtorsionen führen. Pflanzen können ihre Petiolen für eine verbesserte Beleuchtung der Blattspreite verdrehen (Snow 1962; Ehleringer und Forseth 1980). Wird die Lichtquelle aus der Senkrechten in die Horizontale verlagert, dann zeigt *Arabidopsis* bereits nach 4 h deutliche Torsionen der Petiolen (persönliche Beobachtung). Demnach sollte diese Fähigkeit in *tor* Pflanzen beeinträchtigt oder außer Kraft gesetzt sein. Möglicherweise benutzen Pflanzen des Wildtyps zur Durchführung bestimmter Tropismen die gleichen Gene, welche in *tor* Mutanten verändert sind.

4.6 Aussicht

Neben der Analyse der Gene und Genprodukte von Pflanzen mit helikalem Wachstum muss die phänotypische Analyse auf einen wesentlichen Punkt ausgedehnt werden: die Untersuchung der Zellwände der Mutanten mit helikalem Wachstum. Für keine der in dieser Arbeit erwähnten Mutanten mit helikalem Wachstum ist eine Beschreibung der Konfiguration der Zellwandkomponenten veröffentlicht worden. Zur Untersuchung der Orientierung der Cellulosemikrofibrillen in den Zellwänden kann die Polarisationsmikroskopie, besser jedoch

die Elektronenmikroskopie angewandt werden (Wiedemeier et al. 2002). Als ein frei zugängliches, einzelliges System mit definierter Händigkeit im Wachstum scheinen die tordierten Trichome von *tor2* ein besonders lohnendes Objekt zur Zellwandanalyse zu sein.

Da TOR Proteine vermutlich indirekt auf die Biogenese der Zellwand wirken, ist eine Bedeutung der TOR Proteine für Forschungsgebiete jenseits der Cytoskelettforschung wahrscheinlich. In der Diskussion wurde bereits die mögliche Verbindung einer Händigkeit in der Zellwand mit dem Phänomen der Circumnutation angesprochen. In der Forstwirtschaft ist die Ausrichtung der Cellulosemikrofibrillen in Holzzellen von Bedeutung, da sie eine direkte Auswirkung auf die Festigkeit von Holz hat (Vainio et al. 2002). Preston (1974) fasste die mögliche Bedeutung des helikalen Wachstums für die verschiedenen Arbeitsfelder der Forschung an Pflanzen wie folgt zusammen:

“It seems, however, reasonable to conclude from these three examples that all cells growing in isolation with helically organised walls should show spiral growth and that this is dictated by the mechanical properties of the wall. When such cells, growing as part of a tissue, do not show this phenomenon, then they must be prevented from doing so by external impressed forces. We have seen [...] the steps which need to be taken to allow for an associated phenomenon in explaining the strength properties of wood and other fibrous tissues. If, in tissues, cells are allowed to slip over each other, then it follows that the cells must tilt, and an attempt has been made to explain *spiral grain* in conifers in this way (Preston 1949). It is to be supposed that the movement of elaters in liverworts are to be explained in similar terms. Otherwise circumstances could be envisaged in tissues, whereby an overall torque is developed in the tissue; could it be that the spiralling of tendrils and even the nutation of stem apices are similarly based?”

R.D. Preston 1974. in: *The Physical Biology of Plant Cell Walls*

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die phänotypische Analyse von *tortifolia* (*tor*) Mutanten aus *Arabidopsis* fortgesetzt. *tor* Mutanten zeigen Defekte im Streckungswachstum der Organe, woraus Organtorsionen (helikales Wachstum) resultieren. Es wurde gezeigt, dass *tor* Mutanten in fast allen Organen helikales Wachstum präsentieren. Der Phänotyp im Hypokotyl kann durch Etiolierung verstärkt werden. Dadurch wurde offenbar, dass die Mutanten *tor1*, *tor2* und *tor3* Übergänge zur Isotropie des Wachstums zeigen.

Um die positionelle Klonierung von *TOR1* zu ermöglichen, wurden 9 neue PCR-gestützte genetische Marker für die *TOR1* Region auf Chromosom 4 in *Arabidopsis* entwickelt. Arbeiten zur Kartierung grenzten *TOR1* auf eine Region von 111 kb auf Chromosom 4 ein. Ferner wurden 8 neue PCR-gestützte genetische Marker für den Bereich von *TOR2* auf Chromosom 1 etabliert. *TOR2* wurde auf einen Bereich von 290 kb eingegrenzt. Molekulare und genetische Analysen belegen, dass durch die Mutante 590501 ein neues *Arabidopsis* Allel mit helikalem Wachstum angezeigt wird. Der neue Locus liegt auf Chromosom 5 und wird als *tor5* bezeichnet.

Es ist gelungen, *TOR1* durch Komplementation von *tor1* Pflanzen mit genomischer DNA aus *Arabidopsis* zu identifizieren. Die Mutationen in 7 *tor1* Allelen zeigen an, dass der *tor1* Phänotyp durch *loss of function* Mutationen entsteht. Der Transkriptionsstart des *TOR1* Gens wurde experimentell bestimmt. Northern Analysen zur Expression des *TOR1* Gens ergaben, dass seine Aktivität ubiquitär ist. Expressionsanalysen mit dem *TOR1* Promotor ergaben, dass das *TOR1* Genprodukt vermutlich in einer frühen Phase der Zellstreckung benötigt wird. Das *TOR1* Protein begründet eine neuartige Proteinfamilie mit 6 Mitgliedern in *Arabidopsis*. Die *TOR1* Proteinfamilie tritt nur in Moosen und Gefäßpflanzen auf. Die Analyse der Sekundärstruktur von *TOR1* und den Mitgliedern der *TOR1* Familie aus *Arabidopsis* ergab, dass *TOR1* eine Domäne mit *HEAT repeats* und vermutlich eine Domäne zur Ausbildung von *coiled coils* besitzt. Die *TOR1* cDNA wurde kloniert und an Gene verschiedener fluoreszierender Proteine gekoppelt. Ebenso wurde eine Mikrotubuli-Bindungsdomäne aus der Maus an Fluoreszenzmarker gekoppelt. Die transiente Expression der Proteine in *Arabidopsis* Protoplasten ergab, dass das markierte *TOR1* Protein mit filamentösen Strukturen des kortikalen Plasmas assoziiert, welche durch Oryzalin aufgelöst werden können. *TOR1* ist vermutlich ein neuartiges Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus Pflanzen.

Die Ergebnisse belegen, dass *TOR1* Teil des Zusammenspiels von Cytoskelett und Zellwanddeposition ist und dadurch eine wichtige Funktion bei der pflanzlichen Zellstreckung hat. Es wird ein zusammenfassendes Modell vorgestellt, welches die Interaktion von rechts- und linksgängigem Wachstum beschreibt und die beim helikalen Wachstum vermutlich beteiligten zellbiologischen Faktoren benennt.

Summary

tortifolia (*tor*) mutants in *Arabidopsis* show a petiole-twisting phenotype that develops during expansion growth of the leaf. Whereas *tor1* and *tor2* show a consistent right-handed displacement of laminae, *tor3* shows left-handed twistings. The work conducted here documented that the *tor* mutants show helical growth in almost every organ. The phenotype of the hypocotyls can be enhanced by etiolation. The results proved that the helical growth phenotype can advance to a severe loss of growth anisotropy.

With the aim to clone *TOR1* by a map-based approach 9 new PCR-based genetic markers were developed for the *TOR1* region on chromosome 4. These markers enabled the localization of *TOR1* to an 111 kb region on chromosome 4. The establishment of 8 new PCR-based markers on chromosome 1 enabled the mapping of *TOR2* to a 290 kb region on the top of the chromosome. Molecular and genetic analysis proved that the mutation 590501 is a new *Arabidopsis* mutant with a helical growth phenotype. The new locus maps to chromosome 5 and is designated *tor5*.

TOR1 was identified by complementation of *tor1* mutants with genomic DNA from wild-type *Arabidopsis*. The mutations of 7 *tor1* alleles indicate that the *tor1* phenotype is caused by *loss of function* mutations. Northern analysis of *TOR1* gene expression showed that its activity was low but ubiquitous. The transcription start of *TOR1* was determined by experiment. Expression analysis with the β -Glucuronidase reporter indicated that the *TOR1* message is needed in the early phase of cell expansion. The *TOR1* protein constitutes a new family of 6 *Arabidopsis* proteins. Homologs are found in vascular plants and mosses, but not in animals or fungi. Thorough analysis of the secondary structure of *TOR1* and its homologs in *Arabidopsis* revealed that *TOR1* has a protein interaction domain and an additional domain that presumably forms coiled coils. The *TOR1* cDNA was cloned and coupled to the *green fluorescent protein* and similar markers. Transient expression in *Arabidopsis* protoplasts showed that *TOR1* is located on filamentous structures in the cortical cytoplasm which are not identical with the actin-cytoskeleton, that *TOR1* localization is sensitive to oryzalin and that the labelled structures are identical with the structures labelled by the microtubule binding domain from murine microtubule associated protein 4. It was concluded that *TOR1* is a novel plant specific microtubule associated protein.

These results document that *TOR1* controls cell expansion by the interaction with microtubules, which suggests that *TOR1* has an indirect function in cell wall biogenesis. A comprising model is presented which is based on factors assumed to participate in the control of the direction of growth to describe the interplay of left- and right-handed helical growth in *Arabidopsis* mutants.

6 Literatur

- Alonso, J.M., Leisse, T.J., Barajas, P., Chen, H., Cheuk, R., Gadrinab, C., Jeske, A., Karnes, M., Kim, C.J., Parker, H., Prednis, L., Shinn, P., Zimmerman, J., Ecker, J.R. 2001. A Sequence-Indexed Library of Insertion Mutations in the *Arabidopsis* Genome, unpublished.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W., Bork, P. 2001. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* **309**: 1-18.
- Andrade, M.A., Ponting, C., Gibson, T., Bork, P. 2000. Homology-based method for identification of protein repeats using statistical significance estimates. *J. Mol. Biol.* **298**: 521-537.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R.E. 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* **279**: 717-720.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley, New York, NY.
- Baillaud, L. 1962 Les mouvements d'exploration et d'enroulement des plantes volubiles. in *Physiology of movements, Encyclopedia of Plant Physiology* **17** (ed, W. Ruhland), pp. 378-389. Springer, Berlin.
- Baskin, T.I. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* **215**: 150-171.
- Baskin, T.I., Meekes, H.T.H.M., Liang, B.M., Sharp R.E. 1999. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant Physiol.* **119**: 681-692.
- Baskin, T.I., Wilson, J.E., Cork, A., Williamson R.E. 1994. Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.* **35**: 935-942.
- Beck, K., Brodsky, B. 1998. Supercoiled Protein Motifs: the collagen triple-helix and the a-helical coiled coil. *J. Struct. Biol.* **122**: 17-29.
- 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**: 1195-1197.
- Bell, C.J., Ecker, J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144.

- Berger, B., Wilson, D.B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M., Kim, P.S. 1995. Predicting coiled coils by use of Pairwise Residue Correlations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 8259-8263.
- Brandizzi, F., Fricker, M., Hawes, C. 2002. A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat. Rev.* **3**: 520-530.
- Brown, J.H., Cohen, C., Parry, D.A.D. 1996. Heptad breaks in α -helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins* **26**: 134-145.
- Bürger, D. 1971. Die morphologischen Mutanten des Göttinger *Arabidopsis*-Sortiments, einschließlich der Mutanten mit abweichender Samenfarbe. *Arab. Inf. Serv.* **8**: 36-42.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., Ye, Z. 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**: 807-827.
- Burk, D.H., Ye, Z.H. 2002. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell* **14**: 2145-2160.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**: 82-88.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., Bouchez, D. 2002. The *Arabidopsis* *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**: 833-845.
- Capdevila, J., Vogan, K.J., Tabin, C.J., Izpisua Belmonte, J.C. 2000. Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* **101**: 9-21.
- Carland, F.M., McHale, N.A. 1996. LOP1: a gene involved in auxin transport and vascular patterning in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 1811-1819.
- Castle, E.S. 1953. Problems of oriented growth and structure in *Phycomyces*. *Quart. Rev. Biol.* **28**: 364-372.
- Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C.W., Bush, M., Lloyd, C.W. 1999. A 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 14931-14936.
- Chang, C., Bowman, J.L., DeJohn, A.W., Lander, E.S., Meyerowitz, E.M. 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6856-6860.
- Chiu, W.-L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* **6**: 325-330.
- Chuong, S.D.X., Mullen, R.T., Muench, D.G. 2002. Identification of a rice RNA- and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the β -oxidation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* **277**: 2419-2429.
- Clough, S.J., Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.

- Cnops, G., Wang, X., Linstead, P., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M., Dolan, L. 2000. *TORNADO1* and *TORNADO2* are required for the specification of radial and circumferential pattern in the *Arabidopsis* root. *Development* **127**: 3385-3394.
- Cosgrove, D.J. 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* **125**: 131-134.
- Cyr, R.J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 153-180.
- Darwin, C.R., Darwin, F. 1880. *The power of movements in plants*. John Murray, London.
- Dengler, N.G., Tsukaya, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. *Int. J. Plant Sci.* **162**: 459-464.
- Derksen, J., Wilms F.H.A., and Pierson, E.S. 1990. The plant cytoskeleton: its significance in plant development. *Acta Bot. Neerl.* **39**: 1-18.
- Deruère, J., Jackson, K., Garbers, C., Soll, D., DeLong, A. 1999. The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *Plant J.* **20**: 389-399.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., Dengler, N.G. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **215**: 407-419.
- Drewes, G., Ebneith, A., Mandelkow, E.M. 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 307-311.
- Dubois, F., Bui Dang Ha, D., Sangwan, R.S., Durand, J. 1996. The *Petunia tra1* gene controls cell elongation and plant development, and mediates responses to cytokinins. *Plant J.* **10**: 47-59.
- Ehleringer, J., Forseth, I. 1980. Solar tracking by plants. *Science* **210**: 1094-1098.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Prot. Sci.* **8**: 978-984.
- Emons, A.M.C., Derksen, J., Sassen, M.M.A. 1992. Do microtubules orient plant cell wall microfibrils? *Physiol. Plant.* **84**: 486-493.
- Emons, A.M.C., Mulder, B.M. 1998. The making of the architecture of the plant cell wall: how cells exploit geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7215-7219.
- Emons, A.M.C., Mulder, B.M. 2000. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci.* **5**: 35-40.
- Fabri, C.O., Schäffner, A.R. 1994. An *Arabidopsis thaliana* RFLP mapping set to localize mutations to chromosome regions. *Plant J.* **5**: 149-156.
- Fischer, K., Schopfer, P. 1998. Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. *Plant J.* **15**: 119-123.

- Fisher, D.D., Cyr, R.J. 1998. Extending the microtubule/microfibril paradigm. Cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiol.* **116**: 1043-1051.
- Fransz, P.F., Armstrong, S., de Jong J.H., Parnell, L.D., van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bisseling, T., Jones, G.H. 2000. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* **100**: 367-376.
- Frei, E., Preston, R.D. Cell wall organization and wall growth in the filamentous green algae *Cladophora* and *Chaetomorpha*. II. Spiral structure and spiral growth. *Proc. Roy. Soc.* **B155**: 55-77.
- Furutani, I., Watanabe, Y., Prieto, R., Masukawa, M., Suzuki, K., Naoi, K., Thitamadee, S., Shikanai, T., Hashimoto, T. 2000. The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**: 4443-4453.
- Gardiner, J.C., Harper, J.D., Weerakoon, N.D., Collings, D.A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R.J., Marc, J. 2001. A 90-kd phospholipase d from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* **13**: 2143-2158.
- Giddings, T.H., Staehelin, L.A. 1991. Microtubule-mediated control of microfibril deposition: A re-examination of the hypothesis. in *The cytoskeletal basis of plant growth and form* (ed, C.W. Lloyd), pp. 85-99. Academic, London.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., Chothia, C. 2001. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J. Mol. Biol.* **313**: 903-919.
- Granger, C.L. Cyr, R.J. 2000. Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* **210**: 502-509.
- Granger, C.L. Cyr, R.J. 2001. Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct *GFP-MBD*. *Protoplasma* **216**: 201-214.
- Green, P.B. 1954. The spiral growth pattern of the cell wall in *Nitella axillaris*. *Amer. J. Bot.* **41**: 403-409.
- Groves, M.R. and Barford, D. 1999. Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 383-389.
- Harris, J.M. 1989. *Spiral grain and wave phenomena in wood formation*. Springer, Berlin Heidelberg NewYork Tokyo.
- Hart, J.W. 1990. *Plant tropisms and other growth movements*. Unwin Hyman, London.
- Hasezawa, S., Kumagai, F. 2002. Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **214**: 161-191.

- Hasezawa, S., Ueda, K., Kumagai, F. 2000. Time-sequence observations of microtubule dynamics throughout mitosis in living cell suspensions of stable transgenic *Arabidopsis*-direct evidence for the origin of cortical microtubules at M/G1 Interface-. *Plant Cell Physiol.* **41**: 244-250.
- Hashimoto, T. 2002. Molecular genetic analysis of left-right handedness in plants. *Philos. Trans. Roy. Soc. Biol. Sci.* **357**: 799-808.
- Hatzfeld, M. 1999. The armadillo family of structural proteins. *Int. Rev. Cytol.* **186**: 179-224.
- Hauser, M.T., Adhami, F., Dorner, M., Fuchs, E., Glossl, J. 1998. Generation of co-dominant PCR-based markers by duplex analysis on high resolution gels. *Plant J.* **16**: 117-125.
- Hauser, M.T., Morikami, A., Benfey, P.N. 1995. Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* **121**: 1237-1252.
- Hemsley, R., McCutcheon, S., Doonan, J., Lloyd, C. 2001. P34cdc2 kinase is associated with cortical microtubules from higher plant protoplasts. *FEBS Letters* **508**: 157-161.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G., Alford, W.J., Pietrokovski, S. 1995. Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene* **163**: GC 17-26.
- Holk, A., Klumpp, L., Scherer, G.F. 2002. A cell wall protein down-regulated by auxin suppresses cell expansion in *Daucus carota* (L.). *Plant Mol. Biol.* **50**: 295-305.
- Hugdahl, J.D., Bokros, C.L., Morejohn, L.C. 1995. End-to-end annealing of plant microtubules by the p86 subunit of eukaryotic initiation factor-(iso)4F. *Plant Cell* **7**: 2129-2138.
- Hülkamp, M., Misra, S., Jürgens, G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555-566.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J. 2001. Plant microtubule-associated proteins: the HEAT is off in temperature-sensitive *mor1*. *Trends Plant Sci.* **6**: 389-392.
- Igarashi, H., Orii, H., Mori, H., Shimmen, T., Sonobe, S. 2000. Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: possible involvement in the interaction between Actin filaments and microtubules. *Plant Cell Physiol.* **41**: 920-931.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405.
- Johnstone, I.L. 2000. Cuticle collagen genes. Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet.* **16**: 21-27.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., Chiang, V.L. 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.* **35**: 993-1001.
- Karplus, K., Barrett, C., Hughey, R. 1998. Hidden Markov Models for detecting remote protein homologies. *Bioinf.* **14**: 846-856.

- Kato, N., Pontier, D., Lam, E. 2002. Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol.* **129**: 931-942.
- Ketelaar, T., Emons, A.M.C. 2001. The cytoskeleton in plant cell growth: lessons from root hairs. *New Phytol.* **152**: 409-418.
- Kim, G.T., Shoda, K., Tsuge, T., Cho, K.H., Uchimiya, H., Yokoyama, R., Nishitani, K., Tsukaya, H. 2002. The *ANGUSTIFOLIA* gene of *Arabidopsis*, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation. *EMBO J.* **21**: 1267-1279.
- Konieczny, A., Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**: 403-410.
- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D., Snustad, D.P. 1992. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *Plant Cell* **4**: 539-547.
- Kost, B., Chua, N.-H. 2002. The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* **2**: 9-12.
- Kost, B., Mathur, J., Chua, N.-H. 1999. Cytoskeleton in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 462-470.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- Kranz, A.R., Kirchheim, B. 1987. Genetic resources in *Arabidopsis*. - Mutant lines of *Arabidopsis thaliana*. *Arab. Inf. Serv.* **24**: 3.3-24.
- Kunz, J., Schneider, U., Howald, I., Schmidt, A., Hall, M.N. 2000. HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *J. Biol. Chem.* **275**: 37011-37020.
- Kutschera, U. 2001. Stem elongation and cell wall proteins in flowering plants. *Plant Biol.* **3**: 466-480.
- Last, R.L., Bissinger, P.H., Mahoney, D.J., Radwanski, E.R., Fink, G.R. 1991. Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *Plant Cell* **3**: 345-358.
- Liang, B.M., Dennings, A.M., Sharp, R.E., Baskin, T.I. 1996. Consistent handedness of microtubule arrays in maize and *Arabidopsis* primary roots. *Protoplasma* **190**: 8-15.
- Lloyd, C.W. 1984. Toward a dynamic helical model for the influence of microtubules on wall patterns in plants. *Int. Rev. Cytol.* **86**: 1-51.
- Lloyd, C.W. 1991. Microtubules and the cellular morphogenesis of plants. in *The cytoskeletal basis of plant growth and form* (ed, C.W. Lloyd), pp. 85-99. Academic, London.

- Lloyd, C.W. 1994. Why should stationary plant cells have such dynamic microtubules? *Mol. Biol. Cell* **5**: 1277-1280.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analyt. Biochem.* **163**: 16-20.
- Lupas, A. 1996. Prediction and Analysis of Coiled-Coil Structures. *Meth. Enzymology* **266**: 513-525.
- Lupas, A. 1997. Predicting coiled coil regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 388-393.
- Marc, J. 1997. Microtubule-organizing centers in plants. *Trends Plant Sci.* **2**: 223-230.
- Marc, J., Granger, C.L., Brincat, J., Fisher, D.D., Kao, T-H., McCubbin, A.G., Cyr, R. 1998. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**: 1927-1939.
- Marinelli, B., Gomasasca, S., Soave, C. 1997. A pleiotropic *Arabidopsis thaliana* mutant with inverted root chirality. *Planta* **202**: 196-205.
- Mathur, J., Spielhofer, P., Kost, B., Chua, N.-H. 1999. The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **126**: 5559-5568.
- Mayer, U. and Jürgens, G. 2002. Microtubule cytoskeleton: a track record. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 494-501.
- Mayumi, K., Shibaoka, H. 1996. The cyclic reorientation of cortical microtubules on walls with a crossed polylamellate structure: effects of plant hormones and an inhibitor of protein kinases on the progression of the cycle. *Protoplasma* **195**: 112-122.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662, 679-682.
- Meyer, K., Leube, M.P., Grill, E. 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455.
- Michaels, S.D., Amasino, R.M. 1998. A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.* **14**: 381-385.
- Migliaccio, F., Piconese, S. 2001. Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci.* **6**: 561-565.
- Mishra, S.K., Agostinelli, N.R., Brett, T.J., Mizukami, I., Ross, T.S., Traub, L.M. 2001. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 46230-46236.
- Moore, R.C., Durso, N.A., Cyr, R.J. 1998. Elongation factor-1a stabilizes microtubules in a calcium/calmodulin-dependent manner. *Cell Motil. Cytoskel.* **41**: 168-180.
- Mullen, J.L., Turk, E., Johnson, K., Wolverton, C., Ishikawa, H., Simmons, C., Soll, D., Evans, M.L. 1998. Root-growth behaviour of the *Arabidopsis* mutant rgr1. Roles of

- gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. *Plant Physiol.* **118**: 1139-1145.
- Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., Pepper, A.E. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**: 387-392.
- Neville, A.C., Levy, S. 1984. Helicoidal orientation of cellulose microfibrils in *Nitella opaca* internode cells: ultrastructure and computed theoretical effects of strain reorientation during wall growth. *Planta* **162**: 370-384.
- Nick, P. 1998. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants. *Int. Rev. Cytol.* **184**: 33-80.
- Nick, P., Heuing, A., Ehmann, B. 2000. Plant chaperonins: A role in microtubule-dependent wall formation. *Protoplasma* **211**: 234-244.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Engineering* **10**: 1-6.
- Okada, K., Shimura, Y. 1990. Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **250**: 274-276.
- Oort, A.J.P. 1931. Spiral growth of *Phycomyces*. *Proc. Kon. Akad. Wet. Amsterdam* **34**: 564.
- Oppenheimer, D.G., Pollock, M.A., Vacik, J., Szymanski, D.B., Ericson, B., Feldmann, K., Marks, M.D. 1997. Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 6261-6266.
- Page, R.D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Parinov, S., Sevugan, M., De, Y., Yang, W.C., Kumaran, M., and Sundaresan, V. 1999. Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2263-2270.
- Pennell, R. 1998. Cell walls: structures and signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 504-510.
- Petrasek, J., Freudenreich, A., Heuing, A., Opatrny, Z., Nick, P. 1998. Heat-shock protein 90 is associated with microtubules in tobacco cells. *Protoplasma* **202**: 161-174.
- Poethig, R.S. 1997. Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell* **9**: 1077-1087.
- Popov, A.V., Pozniakovskiy, A., Arnal, I., Antony, C., Ashford, A.J., Kinoshita, K., Tournebize, R., Hyman, A.A., Karsenti, E. 2001. XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains. *EMBO J.* **20**: 397-410.
- Preston, R.D. 1949. Spiral structure and spiral growth. The development of spiral grain in conifers. *Forestry* **23**: 48-55.
- Preston, R.D. 1974. *The physical biology of plant cell walls*. Chapman & Hall, London.

- Pyke, K.A., Marrison J.L., Leech, R.M. 1991. Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* **42**: 1407-1416.
- Relichova, J. 1976. Some new mutants. *Arab. Inf. Serv.* **13**: 25-28.
- Rhee, S.Y., Weng, S., Flanders, D., Cherry, J.M., Dean, C., Lister, C., Anderson, M., Koornneef, M., Meinke, D.W., Nickle, T., Smith, K., Rounsley, S.D. 1998. Genome maps 9. *Arabidopsis thaliana*. Wall chart. *Science* **282**: 663-667.
- Roelofsen, P.A. 1965. Ultrastructure of the wall in growing cells and its relation to the direction of the growth. *Adv. Bot. Res.* **2**: 69-149.
- Roland, J.C., Reis, D., Vian, B., Satiat-Jeunemaitre, B., Mosiniak, M. 1987. Morphogenesis of plant cell walls at the supramolecular level: internal geometry and versatility of helicoidal expression. *Protoplasma* **140**: 75-91.
- Roland, J.C., Vian, B. 1979. The wall of the growing plant cell: its three dimensional organization. *Int. Rev. Cytol.* **61**: 129-166.
- Rutherford, R., Masson, P.H. 1996. *Arabidopsis thaliana sku* mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector. *Plant Physiol.* **111**: 987-998.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2. ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Schaffer, A.A., Wolf, Y.I., Ponting, C.P., Koonin, E.V., Aravind, L., Altschul, S.F. 1999. IMPALA: Matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics* **15**: 1000-1011.
- Schiefelbein, J.W., Benfey, P.N. 1991. The development of plant root: New approach to underground problems. *Plant Cell* **3**: 1147-1154.
- Schmidt, R., West, J., Cnops, G., Love, K., Balestrazzi, A., Dean, C. 1996. Detailed description of four YAC contigs representing 17 Mb of chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Plant J.* **9**: 755-765.
- Schuster, J. 1996. *Untersuchungen zur Circumnutation des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana und Helianthus annuus*. Dissertation. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Schuster, J., Engelmann, W. 1997. Circumnutations of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Biol. Rhythm Res.* **28**: 422-440.
- Sedbrook, J.C., Carroll, K.L., Hung, K.F., Masson, P.H., and Somerville, C.R. 2002. The *Arabidopsis* SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell* **14**:1635-1648.
- Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh,

- M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., Shinozaki, K. 2002. Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* **296**: 141-145.
- Shah, K., Gadella, T.W. Jr., van Erp, H., Hecht, V., and de Vries, S.C. 2001. Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1. *J. Mol. Biol.* **309**: 641-655.
- Shibaoka, H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of the cortical microtubules: Alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 527-544.
- Simmons, C., Söll, D., Miglicaccio, F. 1995. Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **46**: 143-150.
- Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., Hussey, P.J. 2000. A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat. Cell Biol.* **2**: 750-753.
- Smith, H.M.S., Raikhel, N.V. 1998. Nuclear localization signal receptor importin a associates with the cytoskeleton. *Plant Cell* **10**: 1791-1799.
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., Levy, J. 2001. Tangled1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *J. Cell Biol.* **152**: 231-236.
- Snow, R. 1962. Geostrophism. in *Physiology of movements, Encyclopedia of Plant Physiology* **17** (ed, W. Ruhland), pp. 378-389. Springer, Berlin.
- Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G., Krogh, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. in *Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology* (ed, J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen), pp. 175-182. AAAI Press, Menlo Park, CA.
- Spittle, C., Charrasse, S., Larroque, C., Cassimeris, L. 2000. The interaction of TOGp with microtubules and tubulin. *J. Biol. Chem.* **275**: 20748-20753.
- Stewart, J. McD. 1975. Fiber initiation on the cotton ovule (*Gossypium hirsutum*). *Amer. J. Bot.* **62**: 723-730.
- Sugimoto, K., Williamson, R.E., Wasteneys, G.O. 2000. New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**: 1493-1506.
- Szymanski, D.B., Marks, M.D., Wick, S.M. 1999. Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2331-2347.
- Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., and Hayashi, T. 2002. Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 9055-9060.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

- Thitamadee, S., Tuchiara, K., Hashimoto, T. 2002. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* **417**:193-196.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Torres-Ruiz, R.A., Jürgens, G. 1994. Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120**: 2967-2978.
- Tsuge, T., Tsukaya, H., Uchimiya, H. 1996. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* **122**: 1589-1600.
- Twell, D., Park, S.K., Hawkins, T.J., Schubert, D., Schmidt, R., Smertenko, A., Hussey, P.J. 2002. MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat. Cell Biol.* **4**: 711-714.
- Vainio, U., Andersson, S., Serimaa, R., Paakkari, T., Saranpää, P., Treacy, M., Evertsen, J. 2002. Variation of microfibril angle between four provenances of sitka spruce (*Picea sitchensis* [Bong.] Carr.). *Plant Biol.* **4**: 27-33.
- Van Volkenburgh, E. 1999. Leaf expansion – an integrating plant behaviour. *Plant Cell Environ.* **22**: 1463-1473.
- Vian, B., Mosiniak, M., Reis, D., Roland, J.C. 1982. Dissipative process and experimental retardation of the twisting in the growing plant cell wall. Effect of ethylene-generating agent and colchicine: a morphogenetic reevaluation. *Biol. Cell* **46**: 301-310.
- Wasteneys, G. O. 2002. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* **115**: 1345-1354.
- Wasteneys, G.O. 2000. The cytoskeleton and growth polarity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 503-511.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., Wasteneys, G.O. 2001. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* **411**: 610-613.
- Wick, S. 2000. Plant microtubules meet their MAPs and mimics. *Nat. Cell Biol.* **2**: E204-206.
- Wiedemeier, A.M.D., Judy-March, J.E., Hocart, C.H., Wasteneys, G.O., Williamson, R.E., Baskin, T.I. 2002. Mutant alleles of *Arabidopsis* *RADIALLY SWOLLEN 4* and *7* reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or microfibrils. *Development* **129**: 4821-4830.
- Williamson, R.E. 1990. Alignment of cortical microtubules by anisotropic wall stresses. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 601-613.
- Williamson, R.E. 1991. Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **129**: 135-206.

- Wolf, E., Kim, P.S., Berger, B. 1997. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **6**: 1179-1189.
- Wymer, C., Lloyd, C. 1996. Dynamic microtubules: implications for cell wall patterns. *Trends Plant Sci.* **1**: 222-228.

7 Anhang

Sequenz des *TOR1* Gens (GenBank AJ249836). Introns und andere nicht-translatierte Sequenzen in kleinen Buchstaben, Exons in Großbuchstaben. Der putative Translationsstart (vergleiche Ergebnisse auf S. 70) und das Ende des TOR1 Leserahmens sind unterstrichen.

```
1  gaaataaaaa ttaacaatcc ataatgtaga acgtgatgtc tctaaatttg ataatgtccg
61  aacttatttg catggatggt tatatattac actagaactc gtattattga ttattaatnt
121 aaacgaagta tcacgaatnt aaactatatt ttcatactnt gtctttcaca cccgattntc
181 cgcgacaaat gcaaaatcca gatactgaaa attatgcaat attaaaatnt gaaaaaatg
241 aaaaagtgaa atactaataa aattgagcga cacatntctg attccagtct taactgntac
301 actnttcgagt gtcagatctc gtctntcttc tccaactcgt ctatctntct ctccgattaa
361 tctaactctct cgtcggagat ttagaaATGA GCACACCTAC AACTTCCGGT TCGGCGGCGA
421 AACCGACGAG ACCAGCACGG TCGTCGAGTT TAGCAACTAG GTCATGTTCC AATTCCGGTT
481 CCCTCACTTC GTTCCAAGCA ATGGTGGAGC TGAAGCAAAA GATCCTTACC TCAATCTCTA
541 AGCTCGCCGA TCGAGATACA TACCAGATCG CCGTCGAGGA TCTCGAGAAA ACTATTCAAT
601 CTCTCACTCC CGAAACCCTA CCGATGTTTC TCAATTGTCT CTACGATTCG TGCTCCGATC
661 CGAAACCTGC AGTGAAGAAG GAGTGTCTCC ATCTTCTCTC CTACGTTTGT AGTCTCCATT
721 GCGATTGAC GGTGCGCAT CTCACTAAAA TCATCGCTCA GATAGTTAAA CGGTTGAAGG
781 ATTCTGATTC TGGAGTTAGG GATGCTTGTA GAGATACGAT TGGTGCTTTG TCTGGGATTT
841 ATCTCAAGGG AAAAGAAGAG GGGACTAATA CTGGTTCAGC GTCGTTAGCG GTGGGTTTGT
901 TCGTTAAGCC ATTGTTTGAG GCAATGGGAG AGCAGAACAA AGTGGTACAA TCTGGAGCTT
961 CAATGTGTAT GGCTAGGATG GTTGAATCAG CTGCTAGTCC TCCAGTTACT TCTTTCCAAA
1021 AGCTTTGCC TAGAATTTGC AAGCTATTGA GCAATTCCAG TTTCTTGCT AAGGCTTCCC
1081 TTTTGCCAGT TGTTTCAAGT CTCTCTCAGg tttgcccaga atcctataa tctcctcctt
1141 gtcatgctat agacagcaaa tggaagaata tggatgaatnt tgaatatcag tgtcagtaag
1201 tagaacacaa agtttttagta aataaactg cttgagntnt tagtcttaat ccgacactnt
1261 ttctgnttagg tgttgctgaa gtttattgnt tgatntgagc atacaagtct cagtgaatnt
1321 ttgagntnt taatatctct ctctctctnt actntctgnt gttcaatgct agtagntnta
1381 gtgntntaat ctgntntatga aaaagagaag taaagagcaa ttactntntgat tcagGTGGGA
1441 GCCATTGCAC CTCAGAGCTT GGAGTCATTG CTAGAAAAGCA TCCATGATTG CCTTGGAAAGT
1501 ACAGATTGGG TAACACGAAA AGCTGCGGCT GAGACCCTGA CTGCATTGGC ATCACATTCA
1561 AGCGGTTTAA TTAAGGAAAA AACCGATTCC ACCATTACCG TGCTTGAGAC CTGCCGNTT
```

1621 GACAAGgtag ctatcttttc tttctctaataa taatctaatt ccactattat cgtgtttgag
1681 acacgtcatt ttttacaagg tagctacatt tttctagtaa tctaaagtgg tcctgtagtg
1741 aagtaaacgt aaaccccata agctcttcaa ttccttgtaa atgtcatcag cagctcagac
1801 atatctgtta gtggttgata gtgcttttgg acctttctcc tcatttgcta tgctgatgaa
1861 acgcacaagc aagtagcttg aaattctcac gaagccttac cttttgattt ttgactacta
1921 tatgatattac atatctcaag aattttcagt catctataat ttttctttca ctactgagca
1981 ttgaaatggc tggatgtttt atgaaatgga ttatggctct ctacacattc atcaaaaattc
2041 tattacttag gacatggaat gatctttctca agacacttta ctgatggaat tttcttgagc
2101 agATCAAACC TGTTAGGGAA AGTGTGACAG AGGCGCTGCA GTTATGGAAG AAGATTTCTG
2161 GAAAATATGT CGATGGTGCT TCAGATGATT CAAAGCTTTC AGCTAGTGAG CAGCTTGGAT
2221 CAGAGAAGAA CGGGGAGAAA AGGTCTAATC TAGCTGATCT AATGAAAAAG GAGGCATCCG
2281 ATGGTTCCAC TCTCTCACCA GACTCTGCTT CTAAAGGAAA AGGATGTTTTT CCTGAAAAAG
2341 CAGTAGGACT GTTGAAGAAG AAAGCACCTG TCTTAAGTGA TAAAGATTTTT AATCCTGAGT
2401 TTTTCCAAAG ACTAGAAAGA AGGCAATCCG TGAAGTAGT AGTTCCTCGT AGATGTAAAA
2461 ACAATGATGA GGAAGAATCA GGACTCGATG ATCTCAATGC CATGGGATCT TCAAATCGCC
2521 TCAAGAACAC CCAAGCAGAT GATAAACAGG TAAAAGGTAG GTTTGATGGG AACGGATCAC
2581 AAGCAAGGAC ATCTGGTGAT GATAAGGCTG GTGTTGTAAA CGGAAAAGAG ACACCTGGAC
2641 ATCACGCTCC TGTCTCCAAT ACTGATAACC AATCTGAAGG ATCCTTCACA AGTAATAGAG
2701 GAAATTGGTC AGCCATCCAG AGGCAGTTGT TGCAGCTAGA GAGACAACAA ACAAATCTTA
2761 TGAACATGCT CCAAGAGTTT ATTGGTGGCT CACATGACAG TATGGTGACC TTGGAGGGCA
2821 GAGTAAGGGG TTTAGAAAGG ATTGTTGAAG ACATGGCAAG AGATCTTTTCG ATATCATCAG
2881 GTCGTAGGGC TAATCTCACA GCTGGGTTTG GCAAATATAA TAGTTTTGCT AACTATCCAA
2941 CTGGAAAGTA TAATGGTCGA GCTCCAGGGG AAAGAGGCTC ACAAACAGAT GGAGCTATGA
3001 GGGGGAGAAT GTGGAATTCT GACATGGCAG ATGACTGGTT CATACTCCA CATGCTGCTT
3061 CCAGAAACGG ACAAGCCGGG CCAAGAAGAT CACCTCGGTC AGAACAATAT GAGAATGAGC
3121 ACATGGGTAA TGGCAGGAGA GGGTGGGATA ATAAAGCATC TGGAACTATT AGATTTGGTG
3181 AAGGCCCTTC AGCAAGAAGT GTGTGGCAAG CATCAAAGGA TGAAGCTACA CTTGAAGCTA
3241 TTAGAGTAGC CGGCGAGGAT GGTGCAGTCC CTCGTCCAAC CCGAGTGGCT GTTGCCCTG
3301 AAGCTGAAGC CATGGGAGAT GATGATAACG AAGGGCAGGA ACGTGACCCG ATATGGGTTT
3361 CATGGAGTAA TGCAATGCAC TCACTCCGTG TTGGTGACAT TGATGCTGCT TACGCAGAAG
3421 TCCTCTGTGC TGGTGACCAG CACTTGGTCA TCAAGCTGAT GGACAAGACG GGACCTTCTC
3481 TTGACCAGAT GTCGAATGAG ATTGCCAATG AAGCTCTAAA CTTTCATCTCT CAGTTTCTGC

3541 TGGATCATAG TCTCTACGAC ATTTGCTTAT CTTGGAGTCA ACAGgtacat ctcttacagt
3601 acattactgg gttccaagaa tcacacatat gttttgtctt taacctctct ttctctcttt
3661 ttgccattcc atttgcagCT GTTGGAAATTG GTTTTACAAG ACGGTGCAGA CACGTTTGGGA
3721 GTTCCAATGG AACTGAAGAC AGAGATCTTG TACAACCTTAC AAGACGCATG TTCGACTATG
3781 GATCCACCTG AAGACTGGGA AGGTCCTGCG CCGGAACAGC TCGTGGTGCA GTTGGCATCA
3841 GTTTGGGAAA TCGATCTCCA ACAGTTCGAC AAGTAAacat gagcttgtga acggagcttt
3901 aacttcagta ccgttgttgt tcataatfff cgtacagaca ggattcaaca tctagactct
3961 agagtctaga gtttgatfff tottattaaa aaccctgaaa agatgactgg aattgatcaa
4021 atattgctat gtatttgagt tttacaatat tttgtcattc ttccttttgc ttaattgaaa
4081 aagccggaac tttgaagaac aaataaataa gacagaaatt attttaagaa tatcattaat
4141 aaatccctaa ttttataaca gactttttaa ataaagtttt ttgtttttgt tttggccaga
4201 caaaattaat taatttataa tatgatacga gtttgagaca attatccatt taactttttt
4261 tttttggtaa tcattgatcc atgtaaattt taatgttttt atttttgtca aattggaatt
4321 ctcgacatag aaaacagaaa caattacaaa tagtttttga atgtacacaa tttgca

Danksagung

Ich bedanke mich bei PD Dr. A. R. Schäffner für die Betrauung mit dem Thema, seine immerwährende Unterstützung und seine anhaltende Begeisterung für *tortifolia*.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. K. P. Hopfner für das Anfertigen des zweiten Gutachtens dieser Arbeit.

Vielfachen Dank an Prof. Dr. W. Engelmann für die Untersuchungen zur Circumnutation, die Diskussionen und seine Gastfreundschaft.

Ich danke PD Dr. R. A. Torres-Ruiz für seine anhaltende Bereitschaft, mich in Sachen „tortellini“ Mutanten zu beraten.

Mein besonderer Dank geht an Dr. P. Hutzler, Institut für Pathologie der GSF, für die Einweisung und Hilfe beim Umgang mit dem *laser scanning microscope*.

Ich danke Prof. Dr. T. Laux für Diskussion, Daten und Material.

Mein Dank geht an Prof. Dr. B. Steipe für die Ermutigung bei der Analyse der TOR1 Primärstruktur.

Besten Dank an Dr. G. Benning für die Übertragung des Wissens über Cosmide.

Ich danke Dr. J. Meurer für den Versuch zur Funktion des *TOR1 5'* Endes.

Ich danke dem gesamten Institut für biochemische Pflanzenpathologie (BIOP) für die Möglichkeit, ein thematisch etwas abseits liegendes Thema in völliger Gleichheit durchzuführen.

Dank außerdem an C. Glander-Höbel und R. Ranzinger, beide Zentralbibliothek der GSF, und U. Linzner, Oligosynthese in der GSF.

Ich danke der einstigen und heutigen AG Schäffner für ein fruchtbares Arbeitsklima und Unterstützung.

Mit äußerstem Nachdruck danke ich M. Hauptmann und C. Fabri, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlichen Dank an Tina Haug für Korrekturlesen und an Annegret.

Ich danke meiner Familie in Berlin und Bielefeld.

Curriculum Vitae

Henrik Buschmann

- 3.2.1968 Geboren in Berlin.
- 1988 Abitur an der Bröndby-Oberschule, Berlin.
- 1989 - 1992 Ausbildung zum Baumschulgärtner bei Baumschulen Ewald Fischer, Berlin.
- 1992 - 1997 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin,
Abschluss mit der Diplomarbeit: „Molekulare Charakterisierung von Saccharose- und Hexosetransportern aus *Lycopersicon esculentum* und *Solanum tuberosum*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf Frommer, Tübingen.
- 1997 Gastwissenschaftler am Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Stratifizierte Seen, Neuglobsow.
- 1998 Beginn der Promotion am GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg bei München. Arbeitsgruppe PD Dr. Anton Rudolf Schäffner, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie.
- 2000 Besuch der 11. Internationalen Konferenz für Forschung an *Arabidopsis*, Madison, USA. Präsentation eines Posters.
- 2002 Teilnahme am EMBO-Kurs für Zellbiologie der Pflanzen, Wageningen, Niederlande.

Publikation:

Weise, A., Barker, L., Kuhn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B., Ward, J.M.
2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**: 1345-1355.