

## ABSCHLUSSBERICHT

Zuwendungsempfänger:	Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Prof. Dr. Bernd Müller-Röber
Förderkennzeichen:	0315042A
Vorhabensbezeichnung:	CentroPlanta - (Integrating growth-affecting stimuli and centrosomal protein function)
Laufzeit des Gesamtvorhabens:	01.07.2007 - 30.06.2010
Berichtszeitraum:	01.07.2007 - 30.06.2010

### I. KURZE DARSTELLUNG ZUR PROJEKT-AUFGABENSTELLUNG, DURCHFÜHRUNG UND VORRAUSSETZUNGEN

#### 1. Aufgabenstellung

Die Hauptziele des Projektes sind (a) pflanzliche zentrosomale Gene zu identifizieren, (b) deren Rolle für Wachstumsprozesse in Höheren Pflanzen zu untersuchen und (c) neue Proteine von Pflanzenzentrosomen mit einem biochemischen Ansatz zu identifizieren. Das Projekt zielt darauf ab ein besseres Verständnis und Integration von Wachstumsrelevanten Stimuli (z.B. Nährstoffe, Metabolite, Licht, Hormone, abiotischen Stress) und Zellproliferation zu gewinnen. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse wird zu einer Entwicklung von neuen Konzepten beitragen, die Wachstumsstimulation und Biomassenproduktion in Pflanzen und die Regulation von Erntewachstum optimieren könnten. Zentrosomen spielen eine wichtige Rolle in der Zellproliferation. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass weitere zentrosomale Komponenten mit Proteinen interagieren, die für die Zellzyklusprogression verantwortlich sind (Müller *et al.* 2006). Allerdings sind bisher nur sehr wenige von diesen Genen in Pflanzen untersucht worden (Pastuglia *et al.* 2006) und praktisch überhaupt nichts ist bekannt, wie die Regulation dieser Proteine mit wachstumsstimulierenden oder inhibierenden externen oder internen Faktoren integriert sind. Deswegen war die Aufgabe dieses Projektes, das gewonnene Wissen (Sequenz und funktionelle Daten von *Drosophila* Genen) auf Pflanzen zu übertragen resp. entsprechende Gene in Pflanzen zu identifizieren. Die zu erwartenden Ergebnisse sollten zu einem erweiterten Verständnis von Prozessen führen, die Zellproliferation, Pflanzenzellmorphogenese, Signaltransduktionswege und den Einfluss von Umweltfaktoren auf Wachstum und Entwicklung in Pflanzen führen.

## **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das CentroPlanta Projekt basierte auf Ergebnissen, die durch eine Proteomstudie des mitotischen Zentrosoms von *Drosophila melanogaster* in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bodo Lange am MPI für molekulare Genetik gewonnen worden waren (Lehmann *et al.* 2006; Müller *et al.* 2006). Durch eine Kollaboration mit der AG Lange wurden die Expertisen auf dem Gebiet der Zellbiologie und Proteomforschung (AG Lange) mit der Expertise auf dem Gebiet der molekularen Pflanzenbiologie und Genomforschung (AG Müller-Röber) zu einem gemeinsamen Projektziel für CentroPlanta vereinigt. Die durchgeführten Arbeiten beruhten auf keinen geschützten Verfahren oder Konstruktionen. Die Daten wurden in regelmäßigen Projekttreffen ausgetauscht und auch anderen Wissenschaftler, z.B. auf den GABI Statustreffen in Potsdam oder im Rahmen von Vorträgen, die national und international gehalten wurden, zugänglich gemacht.

## **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Gesamtprojekt wurde in 5 Arbeitspakete eingeteilt:

AP 1: Bioinformatik

AP 2: Expressionsanalyse

AP 3: Transgenes Pflanzenmodell zur funktionellen Analyse

AP 4: Funktionelle Analysen

AP 5: Biochemische und zellbiologische Charakterisierung

Das Projekt wurde durch Prof. Müller-Röber koordiniert und in Kollaboration mit PD Dr. Bodo Lange vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt. Durch einen Datenaustausch und enge Zusammenarbeit zwischen den Gruppen konnten die Projektziele erreicht werden.

## **4. Vorhergehender wissenschaftlicher und technischer Stand**

Unsere Kenntnisse über Zellproliferation und die Regulation von zellmorphologischen und genetischen Vorgängen ist für das Feld der Zellbiologie von zentralem Interesses. Zusätzlich haben diese gewonnenen Kenntnisse eine Anwendung und Vorteile in der landwirtschaftlichen Pflanzenproduktion, die zu einer höheren Ernteausbeute, besserer Stresstoleranz und Krankheitsresistenz führen können. Obwohl viele zellproliferative Faktoren in Eukaryoten, z.B. zwischen Hefe und Mensch, konserviert sind, ergibt sich eine zunehmende Komplexität in multizellulären Organismen. Z.B. sind in Arabidopsis 60 zellzyklusregulatorische Gene bekannt aber nur wenige davon sind im Detail funktionell

charakterisiert worden. Besonders die Mechanismen der Interaktionen und gegenseitigen Beeinflussung von Zellzyklus- und Zellproliferationsgenen mit Umwelteinflüssen sind immer noch weitgehend unbekannt (Beemster *et al.*, 2006; Inze 2005). Pflanzenexperimente haben gezeigt, dass Organentwicklung und individuelle Zellausdehnung durch Zellzyklus regulatorische Mechanismen beeinflusst werden, aber auch durch Umwelteinflüsse wie Stress durch Wasser Unter- oder Überversorgung (Cookson *et al.* 2006). Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, dass das Zentrosom eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Stressreaktion und in weiteren wichtigen zellulären Signalwegen spielt (Lange, 2002; Müller *et al.*, 2006). Um einen besseren Einblick in die Mechanismen zu erhalten, die zur verbesserten Produktion von pflanzlicher Biomasse führen, haben wir ausgewählte Gene anhand von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten charakterisiert und die Auswirkungen der Mutationen auf das pflanzliche Wachstum untersucht. Um die erhaltenen Daten einer mathematischen Modellierung zugänglich zu machen, wurde ein automatisiertes Analysesystem, basierend auf einem LemnaTec Scanalyzer, entwickelt.

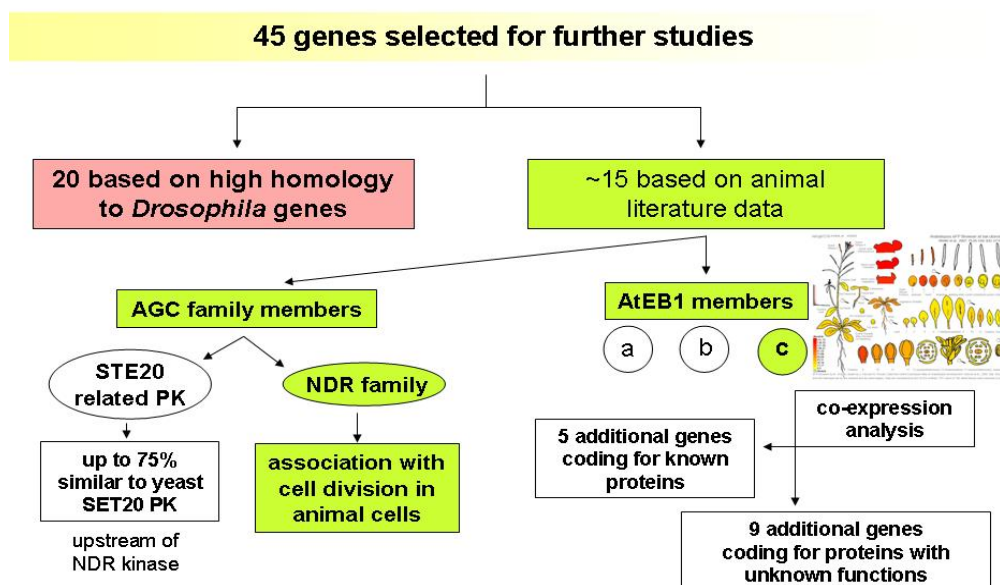
## II. EINGEHENDE DARSTELLUNG

### 1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

**Nur die hier für den Projektpartner an der UP erreichten Ergebnisse werden dargestellt:**

Die durchgeführten Arbeiten lagen in dem im Projektantrag geplanten Zeitrahmen. Im Zuge des Projektes wurden zunächst ca. 45 *Arabidopsis thaliana*-Gene mittels bioinformatischer Ansätze identifiziert (Abb. 1), für die eine mögliche Rolle in der Zellteilung und einer Centrosomen-assoziierten Funktion angenommen werden kann. Die Auswahl der Gene orientierte sich an Genen, die bereits aus *Drosophila* bekannt waren und vom Kollaborationspartner Bodo Lange benannt wurden. Die entsprechenden Gensequenzen aus *Drosophila* wurden dazu für Abgleiche gegen das Genom von Pflanzen (*Arabidopsis*) mittels Sequenzanalyseprogrammen (BLAST) verwendet und homologe Gene auf diese Weise identifiziert. Entsprechende Analysen wurden auch anhand von Reis durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnten 20 Gene in die engere Wahl genommen werden. Weiterhin wurden Literaturdaten ausgewertet, um Gene zu selektieren, für die eine Rolle im Zusammenhang mit Zellteilungsprozessen / Centrosomenfunktion beschrieben war. Durch Sequenzvergleiche konnten ca. 15 homologe Gene in *Arabidopsis* gefunden werden. Diese kodieren für Proteine der so genannten Proteinkinase AGC-Familie, innerhalb derer für die NDR-Kinasen eine Funktion in der Zellteilung in tierischen Zellen beschrieben ist. Auch

Mitglieder der AtEB1-Familie (microtubule end-binding protein) wurden selektiert. Durch Ko-Expressionsanalyse, die unter Verwendung verschiedener Datenbanken durchgeführt wurden, z.B. ATTED-II, Genevestigator, Expression Angler, konnten weitere 14 Kandidatengene selektiert werden. In der experimentellen Arbeit haben wir uns auf die NDR-Genfamilie konzentriert; im Genom von *Arabidopsis* kodieren insgesamt acht Gene für NDR-Kinasen, wohingegen in anderen eukaryotischen Systemen wie z.B. Hefe und Tieren lediglich ein oder zwei Gene bekannt sind. Diese spielen zentrale Rollen im Zellwachstum. Im Rahmen des CentroPlanta-Projektes wurden T-DNA-Insertionslinien für die acht NDR-Kinase-Gene (sowie zahlreiche weitere Gene der oben genannten Auswahl, soweit verfügbar) vom Arabidopsis Stock Center bezogen (Linien der SALK- und GABI-Kat-Kollektionen). Diese Linien wurden zunächst zur Samenvermehrung angezogen, in die nachfolgende Generation überführt und weiter im Gewächshaus (und zum Teil in Pflanzenkulturschränken) kultiviert. Anschließend wurde genomische DNA der erhaltenen Pflanzen isoliert und diese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Hetero- versus Homozygotie hinsichtlich der T-DNA-Insertionen analysiert. Dazu wurde die genomische DNA mehrerer Individuen der unterschiedlichen Insertionslinien isoliert und PCRs unter Verwendung von Primern durchgeführt, die Anlagerungsorte entweder im entsprechenden Gen oder in der T-DNA Insertion haben. Molekular charakterisierte Pflanzen wurden anschließend phänotypisch hinsichtlich des vegetativen Wachstums und der Biomasseakkumulation (Spross) charakterisiert. Dabei war es wichtig, Analysen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen durchzuführen, um zum Beispiel Keimungseffekte von Effekten auf das vegetative Wachstum (was hier im Vordergrund stand) separieren zu können.



**Abb. 1: Auswahl von Kandidatengenen.** Die Gene wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu Genen aus dem tierischen Modellsystem *Drosophila melanogaster* sowie aufgrund von Literaturanalysen und Ko-Expressionsuntersuchungen ausgewählt.

Homozygote T-DNA-Insertionslinien konnten im Falle der Gene *AtNDR3*, *AtNDR7* und *AtNDR8* identifiziert werden; für die anderen Gene konnten lediglich (auch nach mehreren Anzuchten bzw. Generationen) heterozygote Linien erhalten werden. Dies deutet darauf hin, dass der vollständige Verlust einzelner NDR-Gene letal ist, das pflanzliche Wachstum also vollkommen zum Erliegen bringt und sogar zum Absterben entsprechender Mutanten führt (möglicherweise auf der Ebene der Embryonalentwicklung). Ein Funktionsverlust der Gene *AtNDR3*, *AtNDR7* und *AtNDR8* führte bei Anzucht unter standardisierten Bedingungen (Kurztag, 12h:12hTag-Nacht-Rhythmus, in Erde) zu einer Zunahme der Blattfläche (für Beispiele siehe Abb. 2), wohingegen das Wachstum der verfügbaren *AtNDR5*-Mutante stark verzögert war. Keine Wachstumsveränderung konnte für *AtNDR1* gefunden werden; dies passt zur Beobachtung, dass das Gen in Wildtyp-Pflanzen nicht in Blättern exprimiert ist.

Um die Analyse des pflanzlichen Wachstums auf eine quantitative und sehr gut reproduzierbare Basis zu stellen, haben wir ein neues, bisher nur in wenigen wissenschaftlichen Einrichtungen verfügbares Gerät (Scanalyzer der Firma LemnaTec) erworben und der im Projekt angestellte Wissenschaftler hat eine einwöchige, intensive Einführung in die Nutzung des Gerätes, die Datenerhebung und die Datenauswertung erhalten. Mit dem Scanalyzer wird das pflanzliche Wachstum bei täglicher Messung von Blattflächen und Rosettengrößen über einen längeren Zeitraum durch digitale Bildaufnahme verfolgt und die erhaltenen Daten anschließend einer mathematischen Analyse zugänglich gemacht. Für die Wachstumsanalyse eignen sich 12- und 96er-Mikrotiterplatten, in denen die Samen unter sterilen Bedingungen gekeimt und die Pflanzen angezogen werden. Auch die Anzucht in Töpfen in Erde ist möglich, dabei können die Pflanzen über einen längeren Zeitraum angezogen und Blattflächenbestimmungen und daraus abgeleitete Biomassewerte auch zu späteren Stadien des Pflanzenwachstums gewonnen werden. Darüber hinaus lassen sich Parameter wie z.B. der Zeitpunkt der Sprossung (die der sichtbaren Blütenbildung voraus geht) bestimmen. Da bis dato keine standardisierten Protokolle für solche Wachstumsstudien zur Verfügung standen, wurden unterschiedliche Versuchsabläufe zunächst an Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Unter anderem wurden Lichtbedingungen, die Anzuchtdichte der Pflanzen in Mikrotiterplatten sowie unterschiedliche Wachstumsstadien (direkt nach der Keimung, im Zweiblattstadium und danach) analysiert. Dabei konnten die Bedingungen für Wachstumsanalysen anhand von Pflanzen, die in Mikrotiterplatten sowie in Erde angezogen wurden, etabliert werden.

Für die Analyse des pflanzlichen Wachstums wurden im Laufe des CentroPlanta-Projektes dann zahlreiche Messungen vergleichend anhand von Wildtyp- und gentechnisch modifizierten *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf unterschiedliche Wachstumsstadien gelegt (u.a. Keimungsstadium, Keimblattbildungsstadium, nachfolgende Blatt-/Sprossbildung, bis hin zum Austreiben des