

**Untersuchungen zur Regulation der  
Flavonoidbiosynthese im Kulturapfel**  
*Malus x domestica*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Julian Brüggemann**

aus Frechen

angefertigt am Lehrstuhl für Genomforschung

**Bielefeld im Dezember 2010**

Berichtersteller: Prof. Dr. Bernd Weißhaar

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Einst hatte ich einen schönen Traum:

Da sah ich einen Apfelbaum,  
Zwei schöne Äpfel glänzten dran;  
Sie reizten mich, ich stieg hinan.

Der Äpfelchen begehrt Ihr sehr,  
Und schon vom Paradiese her.  
Von Freuden fühl ich mich bewegt,  
Dass auch mein Garten solche trägt.

*Johann Wolfgang Freiherr von Goethe – Faust I*

## Kurzzusammenfassung

Im Gegensatz zu zahlreichen Pflanzen ist die Flavonoidbiosynthese und deren Regulation im Kulturapfel *Malus x domestica* bisher kaum untersucht. Zwar sind die wesentlichen Intermediate und deren zugrunde liegende Strukturgene identifiziert, über den genauen Regulationsprozess und die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren ist jedoch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Regulatoren der Flavonoidbiosynthese in *M. x domestica* isoliert und genauer charakterisiert.

Dazu gehörten mit *MdMYB9* und *MdMYB11* zwei MYB-Transkriptionsfaktoren, die hohe Ähnlichkeit mit bekannten Proanthocyanidin-Regulatoren aus anderen Pflanzen aufwiesen. Beide Proteine waren in der Lage, mit Kofaktoren zu interagieren und Promotoren von homologen Zielgenen aus *A. thaliana* *in vivo* zu aktivieren. Ein weiteres untersuchtes Protein war das ebenfalls zu den MYB-Faktoren gehörende *MdMYB10*, was die größte Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren zeigte, die spezifisch für die Akkumulation von Anthocyanen sind. *MdMYB10* zeigte ebenfalls Zielgen-aktivierende Fähigkeiten und interagierte ähnlich wie *MdMYB9* und 11 mit Kofaktoren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *MdMYB10* in *A. thaliana pap1 knock-out* Mutanten die Akkumulation von Anthocyanen induziert.

Der vierte untersuchte Faktor *MdTTG1* gehörte zur Gruppe der *WD-repeat* Proteine. *MdTTG1* zeigte Interaktion mit BHLH- und MYB Kofaktoren, was in *M. domestica* auf den gleichen MBW-Komplex schließen lässt, der schon aus anderen Organismen bekannt ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass *MdTTG1* *A. thaliana ttg1 knock-out* Pflanzen in sämtlichen phänotypischen Merkmalen funktionell komplementieren konnte.

Ebenfalls konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Fruchtmaterial von *M. domestica* zwischen der Expression von ausgewählten Strukturgenen, der Aktivität der von diesen kodierten Enzymen sowie der Akkumulation von entsprechenden Produkten in zwei verschiedenen Jahren eine Korrelation existiert. Dabei waren Expression, Enzymaktivität und Produktakkumulation in frühen Entwicklungsstadien am höchsten, während im weiteren Verlauf der Fruchtreife die ermittelten Werte deutlich geringer waren.

## English Abstract

In contrast to many other plants where biosynthesis of flavonoids and regulation of the involved genes is well analyzed, only little is known in the cultured apple *M. x domestica* about this pathway. Although most important intermediates and their structural genes are identified, regulation and the involved transcription factors are almost completely unknown.

In this work, four regulators of the flavonoid biosynthesis in *M. x domestica* were isolated and further analyzed.

Two of them were *MdMYB9* and *MdMYB11*, both belonging to the group of MYB transcription factors and showing high similarity to proanthocyanidin-specific regulators from other plants. Both proteins were able to interact with co-factors and showed activation capabilities regarding promoters of putative *A. thaliana* target gene homologues *in vivo*. Another analyzed protein was *MdMYB10*, which showed the highest similarity to known regulators specific for anthocyanin accumulation. *MdMYB10* was also able to activate target genes while interacting with co-factors. Additionally, *MdMYB10* could induce anthocyanin accumulation in *A. thaliana pap1 knock-out* mutants.

A fourth investigated factor, *MdTTG1* belonged to the group of WD-repeat proteins. *MdTTG1* showed interaction with bHLH and MYB co-factors, leading to the assumption, that the same MBW complex known from other plants is also present in *M. x domestica*.

Furthermore, in this work could be shown that *MdTTG1* was able to functionally complement *A. thaliana ttg1 knock-out* plants in all known phenotypes.

In fruit material of *M. x domestica*, expression of selected structural genes, activity of the encoded enzymes and accumulation of metabolites could be shown to be correlated in two different years. Expression, enzyme activity and metabolite accumulation were found to be highest in early fruit developmental stages while during fruit ripening, measured values for each parameter decreased.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Flavonoide	1
1.1.1 Die Biosynthese der Flavonoide	4
1.1.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese	7
1.2 Transkriptionsfaktorklassen in der Flavonoidbiosynthese	8
1.2.1 Die Gruppe der MYB-Transkriptionsfaktoren	8
1.2.2 Die <i>WD-repeat</i> -Proteine	10
1.3 Der Kulturapfel	13
1.3.1 Die Biosynthese von Flavonoiden im Kulturapfel	14
1.4 Ziele dieser Arbeit	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	18
2.1.2.1 Medien für die Anzucht von Bakterien	19
2.1.2.2 Medien für die Anzucht von <i>A. thaliana</i>	21
2.1.2.3 Medien für die <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskultur At7	21
2.1.2.4 Puffer und Lösungen	22
2.1.3 Desoxyoligonukleotide	26
2.1.3.1 In dieser Arbeit verwendete Desoxyoligonukleotide	26
2.1.4 Bakterienstämme und DNA-Vektoren	28
2.1.5 Reagenziensätze	30
2.1.6 Zellkultur und Pflanzen	30
2.1.6.1 At7 Zellsuspensionskultur	30
2.1.6.2 Pflanzen	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Methoden zur Pflanzenkultivierung und –präparation	31
2.2.1.1 Pflanzenkultivierung	31
2.2.1.1.1 Anzucht auf Erde	31
2.2.1.1.2 Sterile Anzucht auf MS-Platten	32
2.2.1.2 Saccharose-Streißversuch mit <i>A. thaliana</i> Keimlingen	32
2.2.1.3 Quantifizierung löslicher Anthocyane in <i>A. thaliana</i> Keimlingen	32
2.2.2 DNA-Präparation	33
2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.2.2.1.1 Kolonie-PCR	33
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	34

2.2.2.3	Restriktionsverdau von DNA	34
2.2.2.4	Dephosphorylierung von DNA	35
2.2.2.5	Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese	35
2.2.2.6	Aufreinigung und Elution von DNA	35
2.2.2.7	Ligation	36
2.2.2.8	TOPO™ TA Cloning	36
2.2.2.9	Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte	36
2.2.2.10	DNA-Extraktion aus <i>A. thaliana</i> Pflanzenmaterial	37
2.2.2.11	DNA-Extraktion aus <i>M. x domestica</i> Pflanzenmaterial	38
2.2.2.12	Ammoniumacetat-Fällung von DNA	38
2.2.2.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.2.14	ExoSAP Verdau von DNA	38
2.2.2.15	DNA-Sequenzierung	49
2.2.2.16	Gelelektrophorese und Kapillartransfer von Nukleinsäuren	49
2.2.2.17	Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren	39
2.2.3	RNA-Präparation	40
2.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	40
2.2.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>M. x domestica</i> Fruchtmaterial	40
2.2.3.3	Erststrang-cDNA-Synthese für semiquantitative RT-PCR	41
2.2.3.4	Semiquantitative RT-PCR	41
2.2.3.5	Vorbereitung der Proben für die quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR)	42
2.2.3.6	Quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR)	42
2.2.4	Mikrobiologische Methoden	43
2.2.4.1	Kultivierung von Bakterien	43
2.2.4.2	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation	44
2.2.4.3	Transformation von Bakterienzellen	45
2.2.4.4	Dauerkulturen transformierter Bakterien	46
2.2.5	Herstellung transgener Pflanzen	47
2.2.5.1	Agrobakterium-vermittelte transiente Transformation von <i>A. thaliana</i>	47
2.2.5.1	Agrobakterium-vermittelte Transformation durch „ <i>floral dipping</i> “	47
2.2.5.3	Selektion transgener Pflanzen	48
2.2.6	At7-Zellkultur	48
2.2.6.1	Kultivierung der At7-Zellkultur	48
2.2.6.2	Vorbereitung der Transfektions-DNAs	49
2.2.6.3	Gewinnung von At7-Protoplasten	49
2.2.6.4	Transfektion von At7-Protoplasten	49
2.2.6.5	Ernte von transfizierten Protoplasten	50

2.2.6.6	Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten	50
2.2.6.7	Proteinbestimmung nach Bradford	50
2.2.6.8	Bestimmung der Luziferase-Aktivität	51
2.2.6.9	Bestimmung der $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität	51
2.2.6.10	Berechnung von Reportergergenaktivitäten	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	<i>MdMYB9, 10 und 11</i> , drei putative Transkriptionsfaktoren in <i>Malus x domestica</i>	53
3.1.1	Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft von <i>MdMYB9, 10 und 11</i> zu bekannten R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren	53
3.1.2	Sequenzvergleiche der isolierten Apfelsequenzen mit putativen Homologen	55
3.1.3	Bestimmung der Expression von der putativen Regulatoren sowie verschiedener Strukturgene in unterschiedlichen Fruchtgewebestadien	57
3.1.4	Untersuchungen zum Zusammenhang von Genexpression, Enzymaktivität und Akkumulation von Produkten in der Flavonoidbiosynthese in verschiedenen Fruchtgeweben von <i>M. x domestica</i>	60
3.1.5	Mögliche Zielgene und Interaktionspartner der putativen Transkriptionsfaktoren aus <i>M. x domestica</i>	62
3.1.6	Transiente Transformation von <i>A. thaliana myb75</i> -Mutanten durch <i>MdMYB10</i>	64
3.2	<i>MdTTG1</i> , ein möglicher Regulator der Flavonoidbiosynthese in <i>M. x domestica</i>	66
3.2.1	Phylogenetische Verwandtschaft von <i>MdTTG1</i> zu Homologen aus verschiedenen Organismen	66
3.2.2	Analyse der Proteinstruktur von <i>MdTTG1</i> im Vergleich zu bekannten Homologen	68
3.2.3	Expression von <i>MdTTG1</i> und relative Quantifizierung in verschiedenen Apfelpflanzen mittels RT-PCR	68
3.2.4	Untersuchungen zur genomischen Organisation von <i>TTG1</i> in <i>M. x domestica</i>	69
3.2.4.1	Bestimmung der genomischen Sequenz von <i>MdTTG1</i>	70
3.2.4.1	Genomische DNA-Gel-Blot-Analyse	70
3.2.5	Interaktionsanalysen von <i>MdTTG1</i> mit möglichen Kofaktoren in der At7-Zellkultursuspension	71
3.2.6	<i>MdTTG1</i> komplementiert durch stabile Transformation <i>AtTTG1 knock out</i> Pflanzen	74
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	<i>MdMYB9</i> und <i>11</i> sind putative Regulatoren der Proanthocyaninbiosynthese in <i>M. x domestica</i>	77

4.1.1	<i>MdMYB9</i> und 11 zeigen hohe Ähnlichkeit zu bekannten Proanthocyanidin-Regulatoren	77
4.1.2	<i>MdMYB9</i> und 11 sind in verschiedenen Stadien der Fruchtentwicklung im Apfel exprimiert	78
4.1.3	<i>MdMYB9</i> und 11 bilden einen Aktivierungskomplex mit Kofaktoren und sind in der Lage, putative Zielpromotoren zu aktivieren	79
4.1.4	Weiterführende Experimente zur Rolle von <i>MdMYB9</i> und 11	81
4.2	Die Expression von Strukturgenen korreliert mit Enzymaktivität und Produktakkumulation in der Frucht	82
4.2.1	Weiterführende Experimente	83
4.3	<i>MdMYB10</i> ist ein Regulator der Anthocyan-Biosynthese im Apfel	84
4.3.1	<i>MdMYB10</i> ist in rotem Fruchtgewebe während der Fruchtentwicklung exprimiert	85
4.3.2	<i>MdMYB10</i> aktiviert den <i>A. thaliana DFR</i> -Promoter in Kombination mit Kofaktoren	86
4.3.3	<i>A. thaliana MYB75 knock-out</i> Mutanten werden durch transiente Transformation mit <i>MdMYB10</i> funktional komplementiert	87
4.3.4	Fortführende Untersuchungen zur Rolle von <i>MdMYB10</i>	87
4.4	<i>MdTTG1</i> ist ein funktionelles Homolog von <i>AtTTG1</i>	88
4.4.1	<i>MdTTG1</i> ist ein Homolog anderer <i>WD-repeat</i> Proteine	89
4.4.2	<i>MdTTG1</i> ist in verschiedenen Apfelgeweben exprimiert und zeigt eine genomische Struktur, die mit bekannten Homologen übereinstimmt	90
4.4.3	<i>MdTTG1</i> interagiert mit MYB- und bHLH-Proteinen	91
4.4.4	<i>MdTTG1</i> komplementiert funktional <i>A. thaliana ttg1-1</i> Mutanten	92
4.4.5	Weitere Untersuchungen zur Funktion von <i>TTG1</i> in <i>M. x domestica</i>	94
4.5	Ausblick	95
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>112</b>
7.1	Wertetabellen zu den Ko-Transfektionsexperimenten	112
7.2	Sequenzen der <i>Malus x domestica</i> isolierten Transkriptionsfaktoren	119

## Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylbelliferon
4-MUG	4-Methylbelliferyl-Glukuronid
A	Adenin
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAN	BANYULS
bHLH	Basische Helix-Schleifen-Helix
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
BZIP	Basisches Leuzin-Reißverschluss-Protein
C	Cytosin
<i>CaMV</i>	<i>cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalkonsynthase
CHI	Chalkonisomerase
Col	Columbia
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,81 m/s)
G	Guanin
GUS	β-Glukuronidase
GUS'	Spezifische standardisierte GUS-Aktivität
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobasen(paare)
L	Liter
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
LUC	Luciferase

Mbp	Megabasen(paare)
MCS	Multiple Klonierungsstelle
<i>M. domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>
<i>Md</i>	<i>Malus x domestica</i>
Min	Minute
MRE	MYB-Erkennungselement
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Murashige-Skoog
Nö	Nössen
nos	Nopalin-Synthase
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PA	Proanthocyanidin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RLU	Relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tt	transparent testa
ttg	transparent testa glabra
U	Enzymeinheit
UBI	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
VP16	<i>Herpes simplex</i> Virus Protein 16
v/v	Volumen pro Volumen
WD-repeat	Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholungen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

**Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode**

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

# 1. Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise müssen Landpflanzen einer Reihe von biotischen und abiotischen Stressfaktoren begegnen, um auch unter ungünstigen Bedingungen ihr Überleben zu sichern. Eine spezifische Anpassung ist dabei die Synthese von sogenannten Sekundärmetaboliten, welche nur im Pflanzenreich und in praktisch allen höheren Landpflanzen zu finden sind. Diese Metabolite haben im Gegensatz zu den Primärmetaboliten, welche für das direkte Überleben notwendig sind, häufig keine klar umrissene Funktion, dienen aber oft als Schutz gegen Pathogene, Herbivore oder UV-Strahlung und können in der Anlockung von Fremdbestäubern und Samenverbreitern eine Rolle spielen. Auch für den Menschen sind einige Sekundärmetabolite von Interesse, da diese im gesundheitlichen und industriellen Bereich genutzt werden. Insgesamt sind über 10.000 verschiedene pflanzliche Sekundärmetabolite bekannt (Wink, 1999), welche in drei Untergruppen, die Alkaloide, Isoprenoide und Phenylpropanoide, eingeteilt werden. Zur Gruppe der Phenylpropanoide gehören weitere Stoffklassen wie Cumarine, Lignine, Suberine und Flavonoide, die wohl hinsichtlich Funktion, Biosynthese und deren Regulation am genauesten untersucht sind.

## 1.1 Die Flavonoide

Die Flavonoide (von lat. *flavus* = gelb), von denen derzeit mehr als 6.000 verschiedene bekannt sind (Lepiniec *et al.*, 2006), wurden zum ersten Mal vom Nobelpreisträger Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt beschrieben (von Szent-Györgyi Nagyrápolt, 1941) und bestehen aus zwei aromatischen Ringen (A und B), die über eine C<sub>3</sub>-Brücke miteinander verbunden sind und das C-15-Grundgerüst der Flavonoide bilden. Die Oxidationsstufe des dabei entstehenden mittleren Heterozyklus, der ein Sauerstoffatom enthält, dient der weiteren Gliederung der Flavonoide in Untergruppen wie Flavanone, Flavan-3-ole, Flavan-3,4-diole, Flavone, Flavonole, Isoflavone oder Anthocyanidine. Innerhalb der einzelnen Untergruppen erfolgt eine weitere Unterscheidung aufgrund der Modifikationen des Grundgerüsts vor allem am B-Ring (siehe Abbildung 1.1).

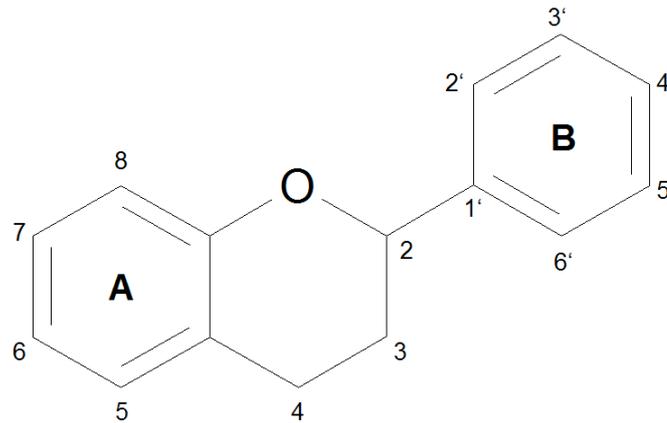
Flavonoide erfüllen in Pflanzen zahlreiche wichtige Funktionen in praktisch allen Phasen der Entwicklung. Anthocyane bilden rote und blaue Farbpigmente in Blüten und Frucht (Koes *et al.*, 2005; Iwashina *et al.*, 2007), die vor allem der Anlockung von bestäubenden und samenverbreitenden Tieren wie Vögel oder Insekten dienen. Flavonole sind in der Lage, Licht im UV-Spektrum zu absorbieren und werden von Pflanzen bei intensiver Lichteinstrahlung vor allem in den Vakuolen epidermalen und subepidermalen Gewebes

akkumuliert um die DNA vor Schädigungen durch energiereiches, kurzwelliges Licht zu schützen. (Schmelzer *et al.*, 1988 ; Li *et al.*, 1993 ; Stapleton und Walbot, 1994). So konnte gezeigt werden, dass aus Apfelschale aufgereinigte Flavonoide *in vitro* DNA-Schäden durch UV-Bestrahlung verhinderten (Marles *et al.*, 2003). Proanthocyanidine oder kondensierte Tannine, die vor allem in der Samenschale, aber auch in Früchten und Rinde akkumulieren (Marles *et al.*, 2003), dienen als Schutz des Embryos vor Pathogenen und Herbivoren (Shirley, 1998), fungieren jedoch auch als stabilisierendes Element der Samenschale und haben so Einfluß auf die Dormanz und damit auf den Zeitpunkt der Keimung (Debeaujon *et al.*, 2000; Debeaujon *et al.*, 2001).

Weiterhin haben Flavonoide noch andere Funktionen in verschiedenen Organismen, in Mais (*Zea mays*) und Petunie (*Petunia hybrida*) sind sie für die sexuelle Fortpflanzung notwendig (Taylor und Jorgensen, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Ylstra *et al.*, 1994), während Isoflavonoide in Leguminosen als Phytoalexine zur Pathogenabwehr und als Signalmoleküle für symbiotische Bakterien in der Stickstofffixierung dienen (Lamb *et al.*, 1989).

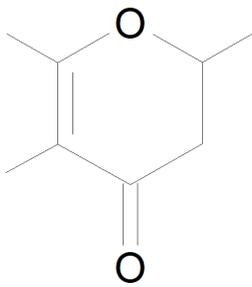
Aufgrund dieser zahlreichen Funktionen sind Flavonoide auch im medizinischen und industriellen Bereich von Interesse. So sind Proanthocyanidinextrakte aus Weintrauben in der Lage, den Gehalt von oxidiertem LDL (low density lipoprotein), einem Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, im menschlichen Körper signifikant zu senken, sowie in Mäusen und Hamstern Arteriosklerose zu verhindern (Bagchi *et al.*, 2003), was auf eine mögliche Anwendung in der Prävention derartiger Erkrankungen hinweist. Aufgrund ihrer Schutzfunktion vor Herbivoren und Pathogenen erhöhen Proanthocyanidine die Qualität von Früchten und Saatgut, während Anthocyane die Resistenz der Pflanzen gegenüber UV-Strahlung erhöhen (Dixon *et al.*, 1996) und im industriellen Sektor als Lebensmittelfarben Verwendung finden.

**A**

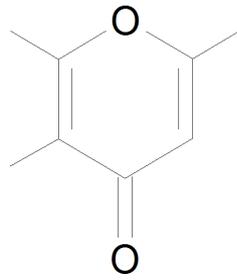


**Flavan-Grundgerüst**

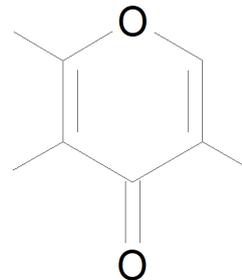
**B**



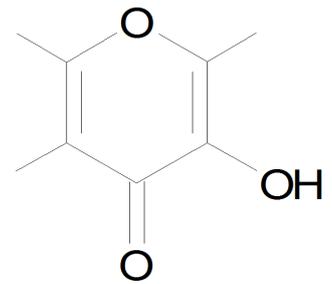
**Flavanon**



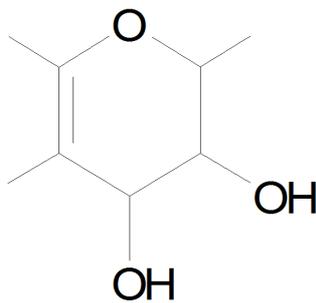
**Flavon**



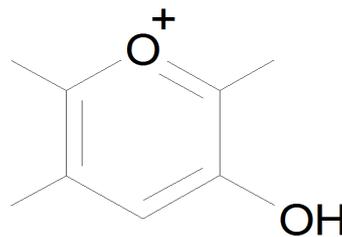
**Isoflavon**



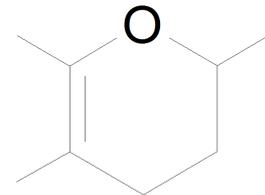
**Flavonol**



**Leucoanthocyanidin  
(Flavan-3,4-diol)**



**Anthocyanidin**



**Catechin  
(Flavan-3-ol)**

**Abbildung 1.1 Grundgerüste verschiedener Flavonoide.**

(A) Flavangrundgerüst, bestehend aus den zwei aromatischen A- und B-Ringen sowie dem mittleren Heterozyklus. (B) Mittlere Heterozyklen einiger Flavonoid-Untergruppen (nach Huep, 2008).

### 1.1.1 Die Biosynthese der Flavonoide

Obwohl in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf der Synthese und Regulation von Flavonoiden im Kulturapfel (*Malus x domestica* Borkh.) liegt, ist es für das Verständnis notwendig, die verschiedenen Einzelschritte und deren zugrunde liegende Regulation zunächst am Modellorganismus Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) darzustellen (siehe Abbildung 1.2). *A. thaliana* bietet sich hierbei aus verschiedenen Gründen an. So ist das Genom mit 125 Mb verhältnismäßig klein, übersichtlich und zudem vollständig sequenziert. Weiterhin ist die Generationszeit mit etwa acht Wochen relativ kurz, was *A. thaliana* zu einem geeigneten Modellorganismus in der Genetik macht.

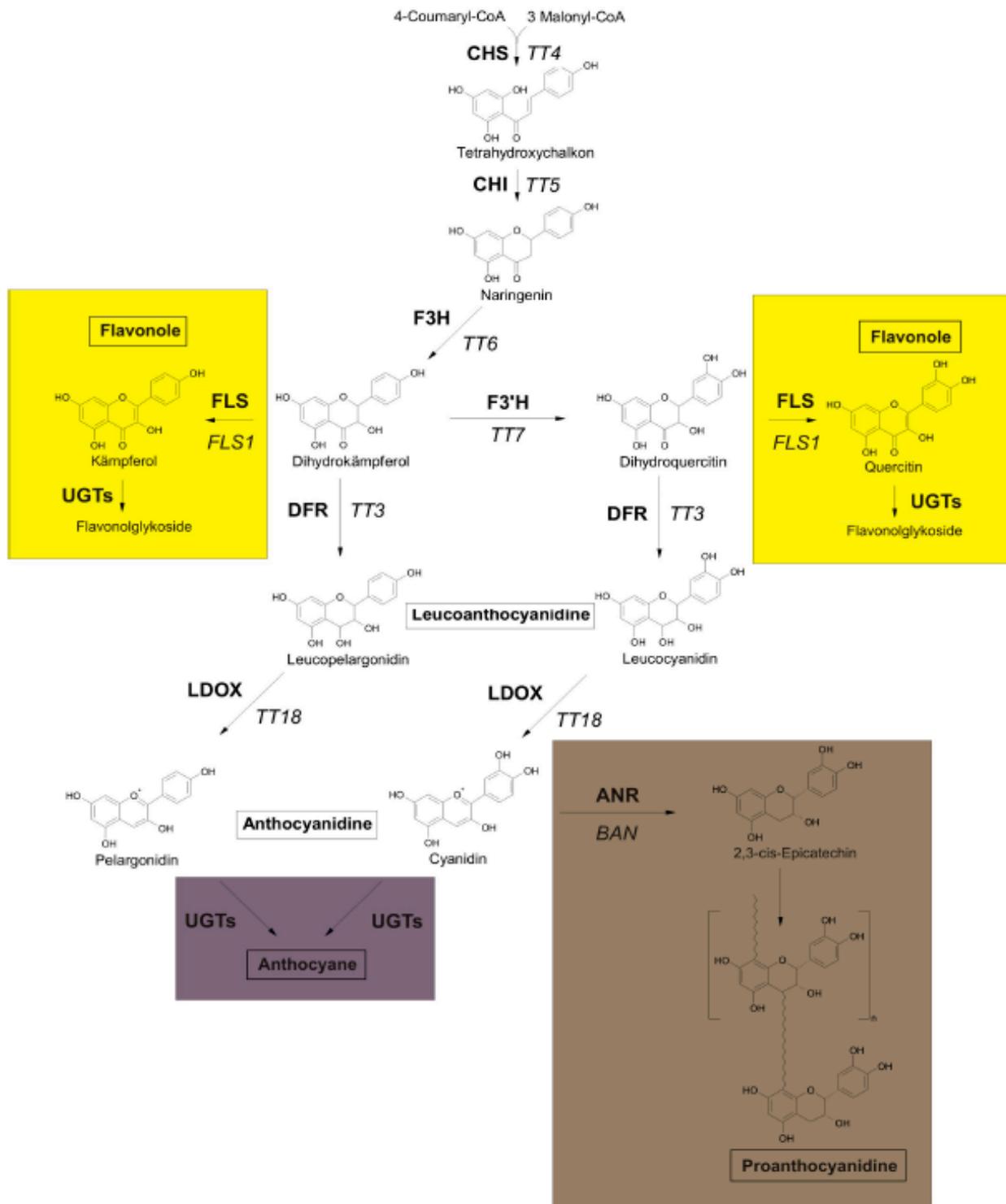
Sämtliche Flavonoide werden durch eine Kondensation der beiden Ausgangssubstanzen 4-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA gebildet, deren Synthese in der Petersilie (*Petroselinum crispum*) aufgeklärt wurde. 4-Coumaroyl-CoA entsteht im allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechselweg unter Beteiligung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), Zimtsäure-4-Hydroxylase (Cinnamate-4-hydroxylase, C4H) und 4-Coumarat:CoA-Ligase (4CL) aus Phenylalanin (Hahlbrock und Ragg, 1975). Malonyl-CoA wird aus Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase synthetisiert.

In der ersten spezifischen Reaktion der Flavonoid-Biosynthese wird durch die Chalkonsynthase (CHS) 4-Coumaroyl-CoA schrittweise mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon verbunden (Heller und Hahlbrock, 1980). Im darauffolgenden Schritt wird durch eine stereospezifische Isomerisierung des Tetrahydroxychalkons zu Naringenin der für Flavonoide typische Heterozyklus etabliert, was durch die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert wird. Anschließend erfolgt eine Hydroxylierung des Naringenins durch die Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) zu Dihydrokämpferol welches seinerseits mittels Flavonoid-3'-Hydroxylase zu Dihydroquercetin umgesetzt wird (Britsch *et al.*, 1981). Diese beiden Intermediate aus der Klasse der Dihydroflavonole sind die beiden letzten Verbindungen, die sowohl zur Bildung von Anthocyanen und Proanthocyanidinen einerseits, als auch zur Synthese von Flavonolen andererseits führen können. Beide Dihydroflavonole können nun durch die Flavonolsynthase (FLS) zu den Flavonolen Quercetin und Kämpferol umgesetzt werden (Forkmann *et al.*, 1986), die ihrerseits in weiteren Schritten durch verschiedene Glykosyltransferasen zu Flavonolglykosiden umgewandelt und als stabile Endprodukte in der Vakuole gelagert werden (Jones *et al.*, 2003).

Die Vorstufen von Anthocyanen und Proanthocyanidinen stellen Leucocyanidin und Leucopelargonidin dar, die aus den Dihydroflavonolen durch Reduktion mit Hilfe der Dihydroflavonol-Reduktase (DFR) zu den Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diolen) umgesetzt werden (Forkmann, 1991).

Über eine Oxidation des Heterozyklus erfolgt die Bildung der Anthocyanidine Cyanidin und Pelargonidin, die durch die Leucoanthocyanidin-Dioxygenase (LDOX; auch als Anthocyanidin-Synthase ANS bezeichnet) katalysiert wird (Pelletier *et al.*, 1997). Die Biosynthese der Anthocyane erfolgt über eine Glykolisierung der Anthocyanidine mit unterschiedlichen Zuckerresten an der C<sub>3</sub>-Hydroxylgruppe, die über eine UDP-Glykosyltransferase katalysiert wird. Zusätzlich können jedoch auch später noch weitere Zucker und auch Acetylgruppen übertragen werden (Holton und Cornish, 1995).

Aus Cyanidin werden neben den Anthocyanen auch die Proanthocyanidine synthetisiert, wobei zuerst eine Reduktion des Heterozyklus notwendig ist. Diese Reaktion wird durch die Anthocyanidin-Reduktase (ANR) katalysiert, die durch das *BANYULS*-Gen kodiert wird (Xie *et al.*, 2003). Das dabei entstehende 2,3-*cis*-Epicatechin (ein Flavan-3-ol) ist die monomere Einheit der durch Kondensation daraus entstehenden Proanthocyanidine (daher auch die Bezeichnung kondensierte Tannine). Die genaue Entstehung der kondensierten Tannine aus den Flavan-3-olen ist noch nicht vollständig geklärt, es ist jedoch davon auszugehen, dass die Polymerisation in der Vakuole stattfindet. Am Transport der Vorgänger sind mehrere Enzyme beteiligt, unter anderem ein MATE (multidrug and toxic compound extrusion)-Transporter, eine H<sup>+</sup>-ATPase (kodiert vom *AHA10*-Gen) sowie zwei Transferasen, eine Glutathion-S-Transferase (GST) und eine UDP-Glc: Sterol-Glykosyltransferase (zusammengefasst in Zhao *et al.*, 2010). Die eigentliche Polymerisation zu den braungefärbten Proanthocyanidinen ist weitgehend unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass aufgrund des sauren Milieus eine enzymunabhängige Kondensation stattfinden kann (Dixon *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu steht die Identifizierung einer Laccase-ähnlichen Polyphenol-Oxidase, von der einerseits angenommen wird, dass sie bereits gebildete Proanthocyanidine oxidiert, andererseits jedoch auch als initiales Enzym zur Polymerisation der kondensierten Tannine fungieren könnte (Pourcel *et al.*, 2005).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese in *A.thaliana***

Die Strukturformeln der wichtigsten Intermediate und Verbindungen sowie Abkürzungen der beteiligten Enzyme. Flavonol-spezifische Teile des Stoffwechsels sind gelb unterlegt, der Anthocyan-spezifische Teil violett und Proanthocyanidin-spezifische Teil braun. CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; DFR, Dihydroflavonolreduktase; LDOX, Leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, Anthocyanidinreduktase; UGT, UDP-Glycosyltransferasen. Kodierende Gene werden kursiv dargestellt. BAN, BANYULS; TT, TRANSPARENT TESTA (Huep, 2008)

### 1.1.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese

Da die Flavonoide gewebe- und entwicklungsspezifisch gebildet werden und End- und Intermediärprodukten oft eine spezifische Funktion aufweisen, ist eine gezielte Regulation des Biosynthesewegs durch eine Änderung der Syntheseraten vor allem als Reaktion auf externe Stimuli wie UV-Einstrahlung, Trockenheit, Hitze, Kälte oder Verletzung (Mol *et al.*, 1996; Koes *et al.*, 2005) für die Pflanze notwendig. Die Regulation des Flavonoidsbiosynthesewegs erfolgt dabei vorwiegend auf der Ebene der Transkription (Mol *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1999). Der überwiegende Teil der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren stammt dabei aus den Familien der bHLH- (basische Helix-Schleifen-Helix) und R2R3-MYB-Proteine (Stracke *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2003). Weiterhin bekannt sind jedoch auch Regulatoren die zu den Zinkfinger-, WRKY-, bZIP- oder WD40-Proteinen gehören (Walker *et al.* 1999; Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000; Sagasser *et al.*, 2002; Johnson *et al.* 2002; Ishida *et al.* 2007). Diese Transkriptionsfaktoren fungieren in den meisten Fällen als Aktivatoren, es sind jedoch auch einige Negativregulatoren beschrieben worden (Jin *et al.*, 2000; Dubos *et al.*, 2008).

In *A. thaliana*, aber auch in anderen Pflanzenarten wie *Zea mays* (Mais), ist eine Kombination aus MYB-, bHLH- und WD40-Transkriptionsfaktoren für die Regulation mehrerer Schritte in der Flavonoidbiosynthese verantwortlich. Die Proanthocyanidin- und auch Anthocyan-spezifischen Enzyme DFR, LDOX, BAN sowie der schon erwähnte MATE-Transporter werden von einem derartigen Komplex aus MYB123, BHLH42 und TTG1 reguliert. Dabei sind die MYB- und bHLH-Partner für die korrekte Bindung des Proteinkomplexes an den Zielgenpromoter verantwortlich, während das WD-Repeat-Protein TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1) maßgeblich für die Stabilisierung des Komplexes am Promoter benötigt wird (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Debeaujon *et al.*, 2003; Marles *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2006). Durch diesen Komplex wird einerseits die Expression von Genen, die in der samenschalenspezifischen Akkumulation von Proanthocyanidinen von Bedeutung sind gesteuert, andererseits kontrolliert dieser Komplex jedoch auch die Gene *DFR* und *LDOX*, die zu den sogenannten „späten“ Genen im Flavonoidbiosyntheseweg gehören (Pelletier *et al.*, 1997).

Ein zweiter Transkriptionsfaktorkomplex, der ebenfalls für die Expression von *DFR* und damit von entscheidender Bedeutung für die Biosynthese von Anthocyanen vor allem in Keimlingen zuständig ist, besteht aus MYB75/BHLH2/TTG1. Das MYB75-kodierende Gen wird dabei auch als *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT* (PAP1) bezeichnet, was auf seine Rolle in der Anthocyan-synthese hinweist. Weitere TTG1-abhängige Faktoren, die in der Produktion von Anthocyanen regulative Funktion erfüllen, sind MYB90 (PAP2) sowie BHLH1 (GLABRA3; GL3) die ebenfalls die Expression von *F3'H*, *DFR* und *LDOX* steuern können (Borevitz *et al.*, 2000; Cominelli *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008).

Neben den TTG1-abhängigen Transkriptionsfaktoren gibt es weitere Regulatoren, die für ihre Funktionalität keine bHLH- oder WD40-Kofaktoren benötigen. Dazu gehören die MYB-Faktoren *MYB11*, *MYB12* und *MYB112*, die vor allem die früh im Flavonoidbiosyntheseweg auftretenden Gene *CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS* beeinflussen, welche für die Biosynthese der Flavonole benötigt werden. In *A. thaliana* werden sie als *PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES* (PFG) in die MYB-Untergruppe 7 zusammengefasst (Stracke *et al.*, 2001; Mehrrens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007).

Ein weiterer in *A. thaliana* beschriebener Transkriptionsfaktor ist das Zinkfinger-Protein TRANSPARENT TESTA 1 (TT1), das vor allem im proanthocyanidin-spezifischen Teil der Flavonoidbiosynthese eine Rolle spielt, bei dem jedoch der molekulare Wirkmechanismus noch ungeklärt ist (Sagasser *et al.*, 2002; Appelhagen *et al.*, 2010).

Zusammengefasst kann also gesagt werden, dass die meisten Transkriptionsfaktoren im Flavonoid-Stoffwechsel von *A. thaliana* aufgrund ihrer Fähigkeit, den Fluß von Intermediären in Richtung bestimmter Endprodukte zu steuern, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Der Komplex aus MYB123/BHLH42/TTG1 reguliert die Synthese von Proanthocyanidinen im Samen, während MYB75/BHLH2/TTG1 für die Akkumulation von Anthocyanen verantwortlich ist. Eine dritte Gruppe von Transkriptionsfaktoren steuert die Bildung von Flavonolen, zu der die von den PFG-Genen kodierten Faktoren MYB11, 12 und 111 gehören.

## 1.2 Transkriptionsfaktorklassen in der Flavonoidbiosynthese

Transkriptionsfaktoren werden zumeist aufgrund der Ähnlichkeit ihrer DNA-Binderegionen in verschiedene Familien eingeteilt. Im Hinblick auf die Flavonoidbiosynthese sind dies vor allem die schon erwähnten WD40, R2R3-MYB und bHLH-Gruppen, jedoch auch weitere Klassen wie WRKY, MADS-Box oder basische Region/Leucin Reißverschluss (bZIP)-Proteine. Zwei dieser Gruppen, die R2R3-MYB- und WD40-Klassen, sollen im folgenden vorgestellt werden.

### 1.2.1 Die Gruppe der MYB-Transkriptionsfaktoren

Die Proteine der MYB-Familie gehören zu einer phylogenetisch alten Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit Ähnlichkeit zum Protein des viralen Onkogens *v-MYB* aus dem „avian myeloblastosis virus“, nach dem diese Gruppe benannt ist. Das *v-MYB* entwickelte sich vermutlich aus einem Wirbeltier-Vorläufer, nachdem es vom Virus aufgenommen wurde (Klempnauer *et al.*, 1982). Die meisten Wirbeltiere besitzen drei *v-MYB*-ähnliche Gene, die als *c-MYB*, *A-MYB* und *B-MYB* bezeichnet werden (Weston, 1998). Diese Proteine kontrollieren vor allem die Proliferation und Entwicklung in einer Vielzahl von Zelltypen und

werden durch eine konservierte MYB-DNA Bindedomäne im N-terminalen Teil des Proteins charakterisiert. Diese Bindedomäne besteht aus drei Sequenzwiederholungen, die jeweils eine Helix-Turn-Helix-Konformation aus ca. 50 Aminosäuren bilden und die als R1, R2 und R3 bezeichnet werden. Charakteristisch für jede Wiederholung sind drei Tryptophanreste, die für die Faltung der MYB-Domäne wichtig sind (Ogata *et al.*, 1992; König *et al.*, 1996).

In Pflanzen werden MYB-Proteine aufgrund der Anzahl der Wiederholungen ihrer MYB-Domänen in drei Unterklassen eingeteilt, die R1-MYB-Proteine, die R2R3-MYB-Proteine und die R1R2R3-MYB-Proteine. R1-MYB-Proteine (auch *single repeat MYBs* oder kleine *MYB-Gene*) können stark variieren und beinhalten Faktoren, die als transkriptionale Aktivatoren fungieren (Baranowskij *et al.*, 1994], während andere in *A. thaliana* eine Rolle bei der circadianen Uhr spielen und an spezifische DNA-Sequenzen binden können (Schaffer *et al.*, 1998; Schaffer *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997). Zwei Vertreter dieser R1-MYBs in *A. thaliana* sind die Gene *CAPRICE (CPC)* und *TRYPTICHON (TRY)*, die in Epidermiszellen von Blättern und Wurzeln die Ausbildung von Trichomen und Wurzelhaaren kontrollieren. Dabei interagieren sie mit bHLH-Faktoren, die normalerweise als Aktivatoren fungieren und wirken so als Repressoren, indem sie die Formation des aktivierenden Komplexes aus MYB-, bHLH- und WD40-Faktoren kompetitiv hemmen (Tominaga *et al.*, 2007; Digiuni *et al.*, 2008). R1R2R3-MYB-Proteine beinhalten drei MYB-Wiederholungen und spielen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren eine Rolle in der Zellzykluskontrolle, indem sie die Transkription von Cyclinen steuern (Ito *et al.*, 2001).

R2R3-MYB-Faktoren enthalten gemäß ihres Namens zwei MYB-Wiederholungen und bilden die größte MYB-Genfamilie in Pflanzen mit bisher 125 bekannten Vertretern in *A. thaliana*. Dabei zeigen alle R2R3-Vertreter hohe Konservierung in den beiden Wiederholungen mit etwa 40% Übereinstimmung zur Konsensussequenz. Insgesamt sind die Aminosäuren der beiden MYB-Wiederholungen zu mehr als 90% konserviert (Stracke *et al.*, 2001). Deutlich geringere Konservierung zeigt der Carboxy-terminale Bereich der MYB-Proteine. Obwohl diese Motive teilweise stark divergieren, lassen sich die R2R3-MYB-Proteine in *A. thaliana* aufgrund konservierter Bereiche im C-terminalen Teil in 24 Untergruppen klassifizieren (Kranz *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Trotz dieser Unterschiede gibt es Hinweise darauf, dass einige dieser konservierten Bereiche zur Funktion der Proteine beitragen. So bewirkt die Deletion dieses Bereiches bei *AtMYB0/GL1* einen vollständigen Funktionsverlust (Kranz *et al.*, 1998). Weiterhin besitzen einige R2R3-MYB-Proteine in den ersten beiden Helices der R3-Sequenzwiederholung eine konservierte Aminosäuresequenz mit dem Muster  $[(DE)Lx_2[RK]x_3Lx_6Lx_3R)$ , die für die Interaktion des Proteins mit bHLH-Kofaktoren notwendig ist (siehe auch Kapitel 1.1.2) (Zimmermann *et al.*, 2004).

Hauptaufgabe der R2R3-MYB-Proteine in Pflanzen ist die Regulation zahlreicher Stoffwechselprozesse (Borevitz *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004). So sind

sie bei der Antwort auf geringe Sauerstoffkonzentrationen ebenso involviert wie bei der Reaktion auf Pathogenangriffe (Hoeren *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001).

Weiterhin sind in R2R3-MYB-Faktoren in der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt (siehe Kapitel 1.1.2). So reguliert in *A. thaliana* MYB12 kofaktor-unabhängig den flavonol-spezifischen Teil des Phenylpropanoidstoffwechselwegs (Mehrtens *et al.*, 2005), während die Bildung von Anthocyanen durch die Interaktion von MYB-Faktoren der Subgruppe 6 (Stracke *et al.*, 2001) mit verschiedenen spezifischen bHLH-Partnern gesteuert wird. Dazu gehören unter anderem MYB75 (PAP1) und MYB90 (PAP2), sowie die bHLH-Faktoren BHLH1 (GL3), BHLH2 (EGL3), BHLH12 (MYC1) sowie BHLH42 (TT8) (Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008). So führt die Überexpression dieser MYB-Faktoren zu einer erhöhten Produktion von Anthocyanen, während die Überexpression von *MYB75* zusätzlich in einer erhöhten Aktivität der Strukturgene *PAL*, *CHS* und *DFR* resultiert (Borevitz *et al.*, 2000). Auch in anderen Pflanzenarten wurden MYB-Faktoren als Regulatoren der Anthocyan synthese identifiziert. In der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) wurde gezeigt, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren *IpMYB1* und *IpMYB2s* mit der Akkumulation von Anthocyanen korrelierte und eine Überexpression dieser Faktoren zu einer gesteigerten Anthocyan-Produktion führte (Mano *et al.*, 2007). Auch in der Weintraube (*Vitis vinifera*) ist mit *VvMYB5a* ein R2R3-MYB-Faktor für die Kontrolle der Anthocyan synthese verantwortlich (Deluc *et al.*, 2006; Deluc *et al.*, 2008).

Weiterhin wird auch die Synthese von Proanthocyanidinen von R2R3-MYB-Faktoren kontrolliert. In *A. thaliana* fungiert der Komplex aus MYB123 (TT2), BHLH42 (TT8) und TTG1 als positiver Regulator, der durch Bindung an den *BAN*-Promoter dessen Aktivierung vermittelt. Überexpression in Keimlingen resultierte in gesteigerter Expression der späten Gene im Flavonoid-Biosyntheseweg wie *DFR* und *BAN*, während *TT2*-knockout-Mutanten keine Proanthocyanidin-Akkumulation aufwiesen (Baudry *et al.*, 2004). Weitere bekannte MYB-Faktoren, die in anderen Pflanzenarten die Proanthocyanidin-Synthese steuern, sind *VvMYBPA1* und 2 in *V. vinifera* (Bogs *et al.*, 2006; Terrier *et al.*, 2008), aber auch *DkMYB4* in der Dattelpflaume *Diospyros kaki* (Akagi *et al.*, 2009) oder *LjTT2A* im Hornklee *Lotus japonicus* (Yoshida *et al.*, 2008), beides putative Homologe von *AtMYB123*.

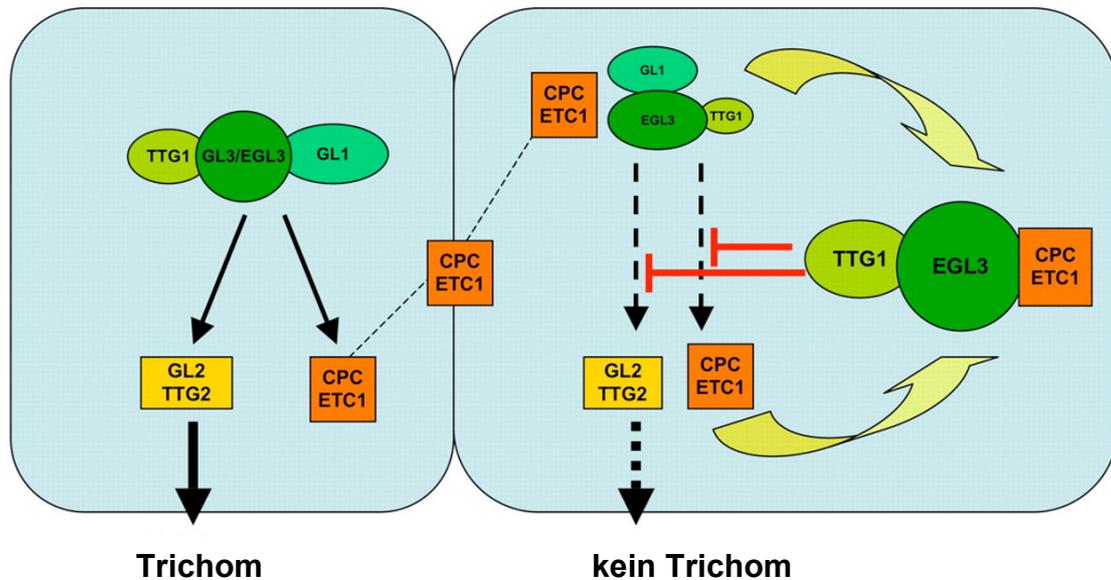
### 1.2.2 Die WD-Repeat-Proteine

Als WD-Repeat-Proteine wird eine Familie von Proteinen bezeichnet, die in praktisch allen eukaryotischen Organismen zu finden sind und eine Vielzahl verschiedener Funktionen ausübt. Da die bislang alle vollständig sequenzierten Prokaryotengenome keine erkennbaren WD-Repeat-Sequenzen enthalten und bisher nur in einem Prokaryoten zwei WD-Repeat-Proteine gefunden wurden (Grigorieva und Shestakov, 1982) wird angenommen, dass die WD-Repeat-Proteine zum ersten Mal in den ersten Prokaryoten oder deren unmittelbaren

Vorgängern auftraten. (Smith *et al.*, 1999). Zu den Funktionen von Proteinen mit WD-Repeats zählen die Regulation von RNA-weiterverarbeitenden Prozessen (Bjorn *et al.*, 1989), die Kontrolle von Vorgängen während der Zellteilung (Feldman *et al.*, 1997), aber auch die Steuerung des Schwefelmetabolismus in Pilzen (Natorff *et al.*, 1998). Weitere Proteine dieser Gruppe spielen eine Rolle im Aufbau des Spindelapparates während der Mitose (Vaisman *et al.*, 1995) und in der Cytoskelettbildung (de Hostos *et al.*, 1991). Weiterhin sind Vertreter der WD-Repeat-Proteine auch als Transkriptionsfaktoren bekannt (Williams *et al.*, 1991; Hoey *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1999).

Charakteristisch für diese Proteine ist die Präsenz mehrerer konservierter Sequenzen mit den typischen Dipeptiden GH und WD. Das bekannteste WD-Repeat-Protein ist die G $\beta$ -Untereinheit der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine). Kristallstruktur-Untersuchungen zeigten, dass diese Untereinheit eine dreidimensionale  $\beta$ -Propellerform mit sieben Propellerblättern annimmt, die drei potentielle Interaktionspunkte für Protein-Protein-Interaktionen aufweist (Smith *et al.*, 1999).

In der Flavonoid-Biosynthese ist mit TTG1 ein WD-Repeat-Protein als Regulator beteiligt. In *A. thaliana* kontrolliert TTG1 zusammen mit MYB123 und BHLH42 die Expression der Anthocyan- und Proanthocyanidin-spezifischen Gene *DFR*, *LDOX* und *BAN* (Walker *et al.*, 1999, Gonzalez *et al.*, 2008), wobei TTG1 für die Stabilisierung dieses ternären Komplexes notwendig ist (Nesi *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2006). Weiterhin ist TTG1 an der Ausbildung von Trichomen und Wurzelhaaren beteiligt. Zusammen mit den MYB- und bHLH-Proteinen GLABRA1 (GL1) und GLABRA3 (GL3) fungiert TTG1 bei der Trichombildung (siehe Abbildung 1.3.) in einem Aktivierungskomplex als positiver Regulator des Homöobox-Gens *GLABRA2* sowie des WRKY-Transkriptionsfaktors TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2), die ebenfalls in der Kontrolle der Trichombildung aktiv sind (Payne *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008). Gleichzeitig fungiert TTG1 jedoch auch als Aktivator für das R1-MYB-Protein CAPRICE, was in benachbarte Zellen transportiert wird und dort als lateraler Inhibitor auf molekularer Ebene an Stelle des R2R3-MYBs GL1 mit TTG1 und GL3 interagiert, was zu einer Repression von GL2 führt (Zhao *et al.*, 2008). Ein dieser Repression ähnlicher Mechanismus ist für die Ausprägung der Wurzelhaare verantwortlich, hier fungiert TTG1 zusammen mit GL3 und dem R2R3-MYB WEREWOLF ebenfalls als Aktivator für GL2, was jedoch im Falle von Wurzelzellen im Gegensatz zur Trichombildung als Repressor die Bildung von Wurzelhaaren verhindert (Masucci und Schiefelbein, 1996; Bernhardt *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.3 Rolle von TTG1 und weiteren Transkriptionsfaktoren bei der Determination der Trichomentwicklung.**

Regulatoren sind grün unterlegt, Aktivatoren (GL2/TTG2) gelb und Inhibitoren (CPC/ETC1) orange. Schwarze Pfeile zeigen transkriptionelle Aktivierung. In Trichomzellen werden die Inhibitoren direkt aktiviert und in benachbarte Zellen transportiert (gestrichelte Linien), wo sie zusammen mit endogenen Inhibitoren den Aktivierungskomplex blockieren und damit die Expression von GL2 bzw. TTG2 verhindern. TTG1, TRANSPARENT TESTA GLABRA 1; GL3, GLABRA 3; EGL3, ENHANCER OF GLABRA 3; GL1, GLABRA 1; GL2, GLABRA 2; TTG2, TRANSPARENT TESTA GLABRA 2; CPC, CAPRICE; ETC 1, ENHANCER OF TRCY AND CPC (nach Zhao *et al.*, 2008).

Ebenfalls eine Rolle spielt TTG1 als Regulator in der Schleimkapselproduktion im Samen von *A. thaliana*. Auch hier fungiert TTG1 in einem aktivierenden Komplex mit einem R2R3-MYB-Faktor (MYB5) und einem bHLH (TT8), die zusammen die für die Bildung der Schleimkapsel notwendigen Strukturgene *ALPHA/BETA FOLD ESTERASE1* und *4* (*ABE1* und *4*) kontrollieren (Li *et al.*, 2009).

*A. thaliana ttg1*-Mutanten zeigen einen sogenannten TRANSPARENT TESTA-Phänotyp, der auf die fehlenden Proanthocyanidine im Endothel der Samenschale hinweist. Weiterhin zeigen Keimlinge und adulte Pflanzen auch unter Stressbedingungen keine Anthocyan-Akkumulation. Blätter und Stängel zeigen einen trichomlosen (engl. *glabrous*) Phänotyp, während Wurzeln ein unkontrolliertes Wachstum von Wurzelhaaren aufweisen. Die Samen von mutanten Pflanzen zeigen keine Schleimkapsel und benötigen daher im Gegensatz zu Wildtyp-Samen keine Trockenheit und Kälteperiode, um keimen zu können (Koorneef, 1981; Galway *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999).

Neben *A. thaliana* sind *TTG1*-Homologe auch in anderen Organismen beschrieben worden, unter anderem in Baumwolle (*Gossypium hirsutum*), Mais (*Zea mays*), Tabak (*Nicotiana tabacum*) oder der Gartenlevkoje (*Matthiola incana*). Alle aus diesen Pflanzen isolierten Gene waren in der Lage, mutante Arabidopsis-Pflanzen hinsichtlich ihres Phänotyps zu komplementieren (Humphries *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Dressel und Hemleben, 2009).

### 1.3 Der Kulturapfel

Der Kulturapfel (*Malus x domestica* Borkhausen; auch: *Pyrus malus*) gehört zur Gattung der Kernobstgewächse (*Pyrinae*) aus der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Zur Gattung *Malus* gehören schätzungsweise 25 bis 47 verschiedene Arten, je nach Einteilung der verschiedenen Taxa. Eine genaue Bestimmung der Artenzahl wird weiterhin durch die Existenz verschiedener Hybride erschwert (Robinson *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass der Kulturapfel durch Kreuzung des wild vorkommenden Holzapfels (*Malus sylvestris*) mit weiteren Apfelarten (*Malus praecox*, Zwergholzapfel; *Malus dasyphyllia*, Balkanapfel) entstanden ist. Sequenzanalysen weisen weiterhin auf eine mögliche Abstammung von asiatischem Wildapfel (*Malus siversii*) und Kaukasusapfel (*Malus orientalis*) hin, die in Zentralasien zu finden sind (Coart *et al.*, 2006). Für den Kulturapfel sind derzeit mehr als 7.500 verschiedene Kultivare bekannt, von denen 30-40 von kommerziellem Interesse sind (Elzebroek und Wind, 2008).

Die Apfelfrucht entsteht ausschließlich über Fremdbestäubung (Allogamie) und gehört morphologisch zu den Sammelbalgfrüchten, da sie nicht aus dem Fruchtknoten, sondern aus der Blütenachse entstammt; daher wird sie auch als Scheinfrucht bezeichnet. Der Fruchtbalg entsteht dabei aus dem mit sich selbst verwachsenden Fruchtblatt, was zu einem pergamentartigen Fruchtgehäuse führt, in dem die eigentlichen Samen zu finden sind. Moderne Zuchtformen werden in den meisten Fällen durch vegetative Vermehrung, insbesondere durch Klonen oder Veredelung („Pfropfen“) vermehrt. Dabei wird auf eine Pflanzenunterlage (meist Stamm oder ein bewurzelter Zweig einer Jungpflanze) ein angespitzter Trieb („Edelreis“) der zu vermehrenden Pflanze gesteckt. Die unter der Rinde liegenden Bastschichten verwachsen dann miteinander, wodurch die Knospen des aufgesetzten Triebes auskeimen können.

Das Genom des Kulturapfels beträgt ungefähr 742 Mb die in allopolyploider Form, meist triploid, auf 17 Chromosomen vorliegen. Insgesamt besitzt der Kulturapfel schätzungsweise 57.000 verschiedene Gene, die größte bekannte Zahl für eine Pflanzenart bisher (Velasco *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Triploidie können die Chromosomen bei der Meiose nicht gleichmäßig verteilt werden, was ungewollte, teilweise radikale Änderungen in den

Eigenschaften der Nachkommen verursachen kann. Für die kommerzielle Apfelmehrung führt dies zu ungewünschten Änderungen der Zuchtformen, weswegen in diesem Falle auf die schon erwähnte vegetative Vermehrung zurückgegriffen wird.

Gegenwärtig wird der Kulturapfel in mehr als 90 Staaten weltweit industriell in größerem Maßstab angebaut. Insgesamt betrug die Produktion 2009 weltweit etwa 71 Millionen Tonnen. Mehr als 40% stammen dabei aus China, gefolgt von den USA mit etwa 6%, sowie Polen, Frankreich, Italien und der Türkei mit 3%. Größte Importeure von Kulturäpfeln waren Russland, Deutschland, die Niederlande und Großbritannien (UN-Organisation für Ernährung und Landwirtschaft, 2009).

Konsumiert werden Äpfel zumeist in Form von frischem Obst oder Saft und sind im Allgemeinen dafür bekannt, gesundheitsfördernde Eigenschaften zu besitzen. Zurückzuführen ist dies neben einigen anderen Faktoren auf den hohen Gehalt an Flavonoiden, insbesondere Anthocyanen und Proanthocyanidinen, die vor allem in Schale und Frucht zu finden sind und antioxidative Eigenschaften aufweisen. (Honda *et al.*, 2002). Untersuchungen an Extrakten aus verschiedenen Apfelmehrungen zeigten, dass deren Inhaltsstoffe Schutz vor karzinogenen Prozessen vermitteln (Lee *et al.*, 2004) und eine apfelreiche Diät das Risiko von Krebs-, Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen signifikant verringert (zusammengefasst in Boyer und Liu, 2004).

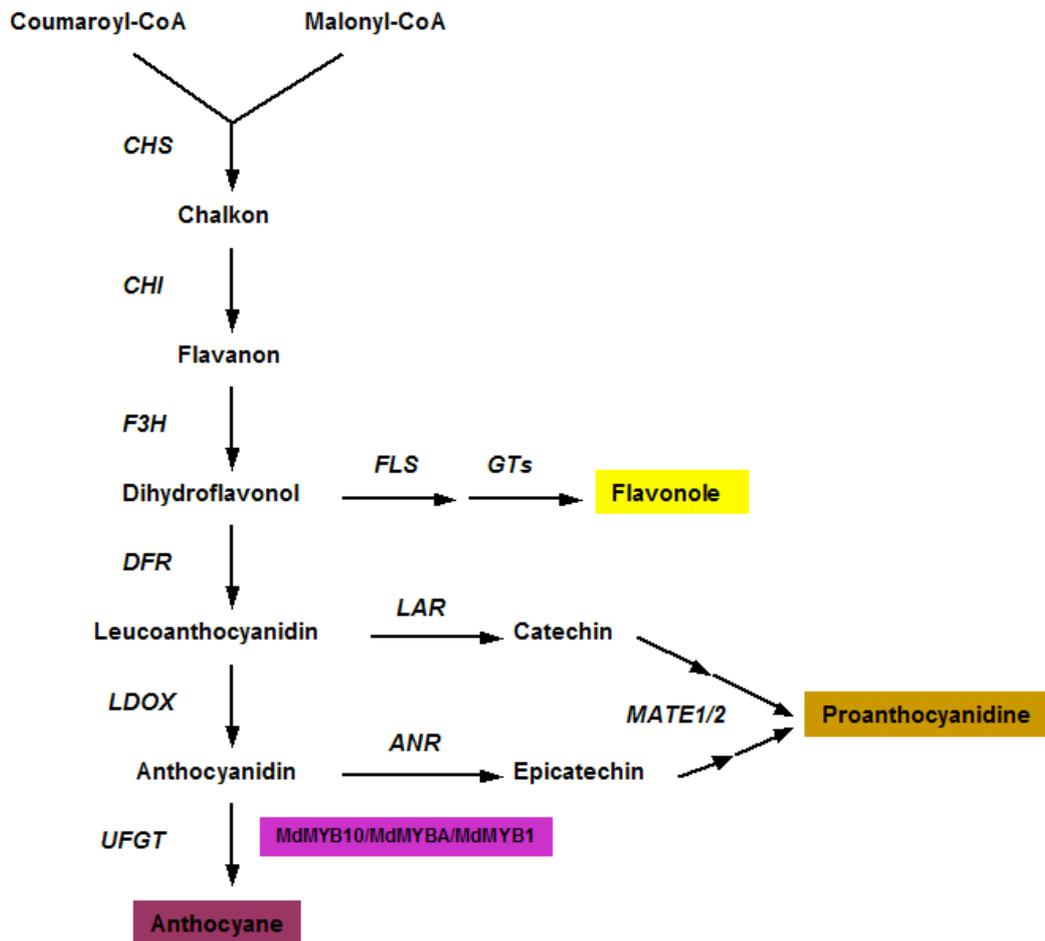
### 1.3.1 Die Biosynthese von Flavonoiden im Kulturapfel

Die Biosynthese der Flavonoide im Kulturapfel ist zwar in den meisten bekannten relevanten Prozessen, jedoch nicht in allen Aspekten, mit der in *A. thaliana* identisch (siehe Abbildung 1.4). Im Gegensatz zu *Arabidopsis* liegen im Apfel alle bekannten Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in mehreren Kopien vor (Tako *et al.*, 2006a; Fischer *et al.*, 2006, Frank *et al.*, 2010), was auf die Phylogenese des Kulturapfels als polyploider Organismus zurückzuführen ist.

Zunächst werden auch im Apfel durch PAL und CHS aus Coumaryl- und Malonyl-CoA Chalkon-Zwischenprodukte gebildet, die durch CHI, F3H und F3'H zu den Dihydroflavonolen Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin umgewandelt werden. Aus diesen entstehen in Folgeschritten die Endprodukte der Flavonole, Anthocyane und Proanthocyanidine. Flavonole entstehen analog zu anderen Pflanzenarten über die FLS-vermittelte Reaktion aus den Dihydroflavonolen, wobei die in den anschließenden Reaktionen aktiven Glykosyltransferasen bisher nicht genau identifiziert werden konnten. Anthocyanidine werden durch die Aktivität von DFR und LDOX gebildet, die für die Bildung der Anthocyane ebenfalls notwendigen Glykosyltransferasen sind ebenfalls nur unzureichend charakterisiert, wobei zumindest eine UDP-Glukose:Flavonoid 3-O-Glykosyltransferase (UFGT) identifiziert werden konnte (Kim *et al.*, 2003). Proanthocyanidine werden im Apfel, im Gegensatz zu *A. thaliana*,

nicht nur ausschließlich aus Anthocyanidinen durch die ANR gebildet, sondern ebenfalls aus den eigentlichen Vorgängern Leucopelargonidin und Leucocyanidin. Dieser Reaktionsschritt wird durch die in *A. thaliana* fehlende Leucoanthocyanidin-Reduktase (LAR) katalysiert (Tako *et al.*, 2006a; Pfeiffer *et al.*, 2006), die auch in einigen anderen Pflanzenarten zu finden ist (Tanner *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2007). Ähnlich wie in *A. thaliana* sind auch die folgenden Reaktionsschritte, die zu den kondensierten Tanninen führen, weitestgehend unbekannt. Mögliche Homologe des in *A. thaliana* beschriebenen MATE-Transporters TT12 sind die zwei kürzlich identifizierten Enzyme *MdMATE1* und 2, die beide in der Lage waren, mutante Arabidopsis-Pflanzen zu komplementieren (Frank *et al.*, 2010).

Aufgrund der Erkenntnisse aus anderen Organismen ist zu erwarten, dass auch die Regulation der Flavonoidbiosynthese im Kulturapfel meist auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wobei die meisten Transkriptionsfaktoren bislang nicht identifiziert sind. Ein Anthocyan-spezifischer Regulator, der vor allem in Früchten mit rotem Kortextgewebe stark exprimiert wird, ist *MdMYB10*, der zu den R2R3-MYB-Faktoren gehört und starke Ähnlichkeit zu bekannten Anthocyan-Regulatoren aus anderen Pflanzenarten aufweist (Espley *et al.*, 2007). *MdMYB10* induziert bei Überexpression in homo- und heterologen Pflanzensystemen starke Anthocyan-Bildung. Die Aktivität von *MdMYB10* ist dabei von zwei bHLH-Faktoren (*MdBHLH3* und 33) abhängig, was auf einen ähnlichen Aktivierungskomplex wie in *A. thaliana* hinweist (Espley *et al.*, 2007). Die starke Expression von *MdMYB10* beruht auf mehreren Tandemwiederholungen in der Promoterregion des kodierenden Gens, die in allen *MYB10*-Sequenzen, die aus rotem Fruchtmaterial isoliert wurden, zu finden sind und zu einer Autoaktivierung führen (Espley *et al.*, 2009). *MdMYBA*, ein weiterer Anthocyan-Regulator, der sich von *MdMYB10* nur in drei Aminosäuren unterscheidet, ist auf die Fruchtschale beschränkt und wird durch UV-Strahlung induziert, was auf wenigstens zwei Genorte für Anthocyan-bezogene MYB-Faktoren im Apfel schliessen lässt (Ban *et al.*, 2007). Ebenfalls aus Fruchtschale isoliert wurde der Faktor *MdMYB1*, der hohe Ähnlichkeit zu den beiden anderen bekannten Anthocyan-Regulatoren, insbesondere zu *MdMYBA*, aufweist. Auch *MdMYB1* ist vor allem in rotem Schalenmaterial exprimiert, was mit der Akkumulation von Anthocyanen korreliert und wird ebenfalls durch UV-Strahlung induziert (Tako *et al.*, 2006b). Ob es sich bei diesen drei Faktoren um Allele oder aufgrund von Genduplikationen nahe beieinander liegende Gene handelt, ist bisher unklar (Allan *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese im Kulturapfel**

Für Enzyme kodierende Strukturgene sind kursiv dargestellt. Drei für die Anthocyan-Synthese spezifische Transkriptionsfaktoren sind hellviolett unterlegt. Zum besseren Verständnis wurde die Flavonoid-3'-Hydroxylase (*F3'H*) ausgelassen, die nach der Reaktion zu Dihydroflavonol mehrere Intermediate hydroxyliert. *CHS*, Chalkonsynthase; *CHI*, Chalkonisomerase; *F3'H*, Flavanon-3-Hydroxylase; *DFR*, Dihydroflavonolreduktase; *LDOX*, Leucoanthocyanidindioxygenase; *UFGT*, UDP-Glukose:Flavonoid-3-O-Glykosyltransferase; *FLS*, Flavonolsynthase; *GTs*, unidentifizierte Glykosyltransferasen; *LAR*, Leucoanthocyanidinreduktase; *ANR*, Anthocyanidinreduktase, *MATE*, *multidrug and toxic compound extrusion*-Transporter (nach Takos *et al.*, 2006).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an der Flavonoid-Biosynthese im Kulturapfel (*Malus x domestica*) beteiligte Transkriptionsfaktoren zu identifizieren und isolieren, um so ein tiefergehendes Verständnis über die Regulation dieses Stoffwechselweges in einer der wichtigsten Obstarten zu gewinnen, was vor allem im Hinblick auf die medizinische und industrielle Anwendung von Flavonoiden von besonderem Interesse ist. Hierbei lag die Auswahl auf verschiedenen MYB-Transkriptionsfaktoren, für die angenommen wurde, dass sie die Synthese sowohl von Anthocyanen, als auch von Proanthocyanidinen beeinflussen können. Von besonderem Interesse waren mögliche Homologe von *AtMYB75* und *AtMYB123*, die in *A. thaliana* anthocyan- und proanthocyanidin-spezifische Reaktionen in der Flavonoid-Biosynthese regulieren. Ein weiterer Faktor von Interesse gehörte zur Untergruppe der WD40-Proteine. Diese Regulatoren wurden hinsichtlich verschiedener Zielgene, aber auch Interaktionspartner im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Diese potentiell interessanten Gene sollten hinsichtlich ihrer Verwandtschaft zu bekannten Regulatoren des Flavonoid-Biosynthesewegs in DNA- und Aminosäuresequenz analysiert und ihre Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien untersucht werden. Außerdem sollte die Fähigkeit der Regulatoren getestet werden, in *A. thaliana*-Protoplasten zusammen mit Interaktionspartnern homologe Promotersequenzen zu aktivieren. In *A. thaliana* und anderen Organismen wurde bereits gezeigt, dass anthocyan- und proanthocyanidin-spezifische Transkriptionsfaktoren regulatorische Komplexe bilden. Interaktionstests sollten zeigen, ob auch im Apfel eine solche Komplexbildung mehrerer Transkriptionsfaktoren stattfindet. Komplementationsexperimente in *A. thaliana*-Mutanten sollte die Charakterisierung der Apfel-Regulatoren abschließen.

Zusätzlich sollte die Expression ausgewählter bekannter Strukturgene im Flavonoid-Stoffwechselweg aus *M. x domestica* zu verschiedenen Zeitpunkten der Fruchtentwicklung analysiert werden, um genauere Informationen über den zeitlichen Verlauf der Genaktivität zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in analytischer Qualität eingesetzt und von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), BioZym (Hameln), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuklease A (RNaseA), DNaseI, *Exo-SAP IT*, *Antarctic Phosphatase* und Lysozym wurden von den Herstellern Ambion (Austin, Texas, USA), Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius, Litauen), Invitrogen (Paisley, UK), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg) und USB (Staufen) bezogen. Taq-DNA-Polymerase und *Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase* wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und Roche (Mannheim), *Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase* von Invitrogen (Paisley, UK) geliefert. Zellulase („Onozuka R-10“) und Mazerzym wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen.

#### 2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Sterilisierung durch Autoklavieren. Hitzelabile Substanzen (Antibiotika) wurden zunächst sterilfiltriert (Flaschenfilter, Nalgene-Nunv, 0,22 µm Porengröße) und dann unter sterilen Bedingungen nach dem Autoklavieren zugesetzt.

**2.1.2.1 Medien für die Anzucht von Bakterien**

IPTG/X-Gal-Mix: 30  $\mu$ L X-Gal (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid in DMF)  
40  $\mu$ L IPTG (100 mM Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid)  
30  $\mu$ L LB-Medium

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
5 g NaCl  
H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

LB-Platten: 10 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
5 g NaCl  
18 g Bacto Agar  
H<sub>2</sub>O ad 1000mL

SOC-Medium: 20 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
0,5 g NaCl  
2,5 mL 1 M KCl  
3,6 g Glukose  
5 mL 2 M MgCl<sub>2</sub>  
H<sub>2</sub>O ad 1000 mL  
sterilfiltrieren anstatt autoklavieren

TB I: 23 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
164 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

TB II: 12 g Bacto Trypton

24 g Bacto Hefeextrakt  
4 mL Glycerin

TB-Medium: TB I und TB II im Verhältnis 1:9 mischen

TFB1-Medium: 30 mM Kaliumacetat  
100 mM Rubidiumchlorid  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerin  
pH 5,8 mit Essigsäure  
sterilfiltrieren

TFB2-Medium: 10 mM MOPS  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM RbCl  
15 % Glycerin  
pH 6,5 mit KOH  
sterilfiltrieren

YEP-Medium: 10 g Bacto Trypton  
10 g Bacto Hefeextrakt  
5 g NaCl  
H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

YEP-Platten: 10 g Bacto Trypton  
10 g Bacto Hefeextrakt  
5 g NaCl  
H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

Für Selektionsmedien wurden die notwendigen Antibiotika (Duchefa Biochemie, Niederlande) in den folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin:	100 µg/mL
Kanamycin:	50 µg/mL
Carbenicillin:	100 µg/mL
Rifampicin:	100 µg/mL
Gentamycin:	40 µg/mL

#### 2.1.2.2. Medien für die Anzucht von *A. thaliana*

<u>½ MS-Platten:</u>	2,15 g <i>Murashige-Skoog Basal Salt Mixture</i> (Sigma)
	pH 5,7 mit KOH einstellen
	8 g Agar
	H <sub>2</sub> O ad 1000 mL

Für Selektionsplatten wurden 50 µg/mL Kanamycin und 2% Saccharose zugesetzt.

#### 2.1.2.3. Medien für die *A. thaliana* Zellsuspensionskultur At7

<u>B5-Medium:</u>	3,2 g <i>Gamborg's B5 Medium</i> (Sigma, Deisenhofen)
(Kombrink und Hahlbrook, 1986)	1 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
	136 g Saccharose
	pH 5,7 mit NaOH einstellen
	H <sub>2</sub> O ad 1000 mL
	sterilfiltrieren

Enzym-Lösung: 1,4 g Zellulase Onozuka R-10  
 0,325 g Mazerozym R-10  
 240 mM CaCl<sub>2</sub> ad 120 mL  
 Die Komponenten in einem Becherglas über einen Zeitraum von 1h vorsichtig lösen und sterilfiltrieren

MS-Medium: 4,3 g *Murashige-Skoog Basal Salt Mixture* (Sigma)  
 (Murashige und Skoog, 1962) 1 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure  
 1 mL 1000x *Gamborg's Vitamin Solution* (Sigma)  
 30 g Kölner Haushaltszucker (ALDI Süd)  
 pH 5,7 mit KOH einstellen  
 H<sub>2</sub>O ad 1000 mL  
 Die Leitfähigkeit sollte ca. 6,7 mS/cm betragen.  
 40 mL Aliquots in Erlenmeyerkolben autoklavieren

MS-Agar: wie MS-Medium mit 0,8 % Agar

#### 2.1.2.4. Puffer und Lösungen

240 mM CaCl<sub>2</sub>: 240 mmol CaCl<sub>2</sub>  
 H<sub>2</sub>O (MilliQ) ad 1000 mL, autoklavieren

275 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 275 mmol Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 H<sub>2</sub>O (MilliQ) ad 1000 mL  
 pH 6,0 mit 1 M KOH einstellen, autoklavieren

Chloralhydrat-Lösung: 800 mg Chloralhydrat  
 100 µL Glycerin  
 200 µL H<sub>2</sub>O

2x CTAB-Puffer: 100 mM Tris pH 8.0

20 mM EDTA pH 8.0  
1,4 mM NaCl  
1 % (v/v) Polyvinylpyrrolidone  
2 % (v/v) CTAB (N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid)

DEPC-Wasser: 1,5 mL Diethylpyrocarbonat (DEPC)  
H<sub>2</sub>O (MilliQ) ad 1000 mL  
Schütteln über Nacht, danach zur Inaktivierung des  
DEPC autoklavieren

Fixans: 0,3 % (v/v) Formaldehyd  
10 mM MES-KOH  
300 mM Mannitol

100 mM Kalium-  
phosphatpuffer: 16 mL 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
84 mL 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100 mL H<sub>2</sub>O  
der pH-Wert sollte 7,5 betragen

Luziferase-  
Extraktionspuffer: 100 mM Kaliumphosphatpuffer  
1 mM Dithiothreitol

Luziferase-  
Substratlösung: 75,75 mL 2 x Stocklösung  
33,3 mM Dithiothreitol  
270 µM CoA Lithiumsalz  
470 µM Luziferin  
570 µM ATP  
ad 151,5 mL mit H<sub>2</sub>O (MilliQ)  
sterilfiltrieren und aliquotieren, bei -80 °C einfrieren

Lysozym-Lösung: 10 mg/mL Lysozym  
10 mM Tris/HCl pH 7,5

0,1 mM EDTA

4-MUG-Substrat-  
lösung :

100 mL GUS-Puffer  
0,07046 g 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid (4-MUG)  
Sterilfiltrieren und aliquotieren, bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  einfrieren

NaP<sub>i</sub>-Puffer:

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen

100 mM Natrium-  
phosphatpuffer:

39 mL 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
61 mL 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100 mL H<sub>2</sub>O  
der pH-Wert sollte 7,0 betragen

PEG-Lösung:

25 % (w/v) PEG 6000  
100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
450 mM Mannitol  
pH 9 mit KOH einstellen

5x Probenpuffer:

20 mM EDTA (pH 8,0)  
50 % (v/v) Glycerin  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau  
0,02 % (w/v) Xylencyanol

RNA-Extraktions-  
puffer:

2 % CTAB (N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid)  
2 % PVP (Polyvinylpyrrolidone)

100 mM Tris-HCl pH 8,0  
25 mM EDTA pH 8,0  
2 M NaCl  
0,5 g/L (w/v) Spermidin  
DEPC-H<sub>2</sub>O ad 100 mL  
kurz vor Verwendung 2 %  $\beta$ -Mercaptoethano zugeben

RNase-Lösung: 10  $\mu$ g/mL RNaseA  
10 Minuten auf 100 °C erhitzen

Saures Methanol: 1 % HCl zu MeOH zugeben

20 x SSC 3,0 M NaCl  
0,3 M Tri-Natriumacetat

2 x Stocklösung: 40 mM Tricine  
2,14 mM Mg(CO<sub>3</sub>) · Mg(OH)<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris  
57,1 mL Eisessig  
40 mL 0,5 M EDTA pH 8,0  
H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5  
1 mM EDTA für TE (10/1)  
0,1 mM EDTA für TE (10/0,1)

TELT-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5  
62,5 mM EDTA  
2,5 mM LiCl  
0,4 % Triton X-100

### 2.1.3 Desoxyoligonukleotide (Primer)

Verwendete Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Paisley, GB) und Metabion (Martinsried) bezogen. Sequenzen sind in 5'.3'-Orientierung angegeben. Die Desoxyoligonukleotide wurden entweder mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt, oder aber mit folgender Formel in Abhängigkeit der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) entworfen:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times [\text{Anzahl G/C}] + 2 \times [\text{Anzahl A/T}]$$

#### 2.1.3.1 In dieser Arbeit verwendete Desoxyoligonukleotide

##### ***MdMYB9***-spezifische Oligonukleotide:

J042 CCC AAA AGA GCT GTC TAA AGA GAT G  
 J043 GAC TAC AAC ATT TTC TTG GGA AGG  
 J048 TCC CCC ATG GAG AAG CCT TCC CAA AAG AG  
 J050 GAA GGG GCC CTT AGA CTA CAA CAT TTT CTT GGG AAG  
 J081 GCC GCC ATG GAT GGA GAA GCC TTC CCA AAA G  
 J082 GAA GCC CGG GTC AGA CTA CAA CAT TTT CTT GGG  
 J090 GCC GCC ATG GAG AAG CCT TCC CAA AAG AG  
 J093 GCC GCC ATG GGG AGG AGT CCG TGT TG  
 J119 GGT CCT TAA TAG CCG GAA GG  
 J120 TGG TCA ACC TAG TGG CCT TG

##### ***MdMYB10***-spezifische Oligonukleotide:

J040 ATG GAG GGA TAT AAC GAA AAC C  
 J041 ATG ATT CCA AAG GTC CGT GCT A  
 J053 GAA GCC ATG GAG GGA TAT AAC GAA AAC CTG  
 J054 GAA GGG GCC CTC ATT CTT CTT TTG AAT GAT TCC  
 J079 GCC GCC ATG GAG GGA TAT AAC GAA AAC C  
 J080 GTT GCC CGG GTC ATT CTT CTT TTG AAT GAT TCC  
 J094 GTT GCC CGG GTC ATT CTT CTT TTG AAT GAT TCC  
 J134 TTT CCC AAA AGC CTG TGA AG  
 J140 GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC CTG ATT AGC  
 GAT GAT CAT ACA GAA  
 J141 GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA TTC TTC  
 TTT TGA ATG ATT CC  
 J145 AGA CCA ATG TGA TAA GAC CTC AG  
 J146 AAC CAA AAA CTT GTG AAG AGT TC

**MdMYB11-spezifische Oligonukleotide:**

J038 AGG AGT CCT TGT TGT TCA AAG G  
 J039 ATT ATC TAC GAG CCA GCA GTC C  
 J051 GAA GCC ATG GGA AGG AGT CCT TGT TGT TC  
 J052 GAA GGG GCC CTC AAT TAT CTA CGA GCC AGC AGT CC  
 J065 CAA GAG AGG AAA CAT CAC TCG  
 J066 CAA GAG AGG AAA CAT CAC TCA  
 J067 TGT ACT AGG TTT AGG TGA CAG C  
 J068 ACT TTG GTG CAT GAA TTA TTT GTA  
 J069 CTA GGT TCT GGT GAC GAC TGT  
 J118 GAA GCC CGG GTC AAT TAT CTA CGA GCC AGC AGT CC

**MdTTG1-spezifische Oligonukleotide:**

J022 TGG AGA ACT CTA CGC AAG AAT CC  
 J023 AAT GGA AAT CCA ATC AGG CTG T  
 J024 TCC CCC ATG GAG AAC TCT ACG CAA GAA TCC C  
 J025 AAA GGC CAT TGC GTA CAG CGG  
 J026 GAA GCC CGG GTC AAA CCT TCA AAA GCT GCA TCT TG  
 J027 CTG GGA ATT CGT AAA CGT GGG TTT GGG GTT G  
 J028 GGG GCC ATG GAA ATG TGT GGT GCT G  
 J055 AGG CCA TTC TAT AGC TCT TAA CG  
 J056 CAA ATT GTG CAG GTG GTG TC  
 J126 TTT CCC GAG AAA ATT TGA GG  
 J127 TCA AAA TTC TCC GAC GAC TTC  
 J128 GCA GAG CAA ATG TGC CTA CA  
 J129 TTC GAT TGG AAC GAC ATT GA  
 J137 TAG GCA CAT TTG CTC TGC TG  
 J142 GTC ACA CTG CTT GCT TTA AG  
 J149 TTT CGA TTT GAG GGA CAA GG  
 J150 TCT AGA CCA AGA TAG CAA GAC TAG TTG

**Weitere *M. x domestica*-genspezifische Oligonukleotide:**

J070	TGA	CCG	AAT	GAG	CAA	GGA	AAT	TAC	T	<i>Actin</i>
J071	TAC	TCA	GCT	TTG	GCA	ATC	CAC	ATC		<i>Actin</i>
J072	TCA	CGT	CCT	CGC	CTT	TAT	TG			<i>Actin</i>
J073	TTC	ATA	AAT	AGG	GAC	CGT	GTG	G		<i>Actin</i>
J096	GAA	GAT	CAT	CCT	TAA	GCC	ACT	G		<i>LDOX</i>
J097	ATA	ATT	TAG	CAC	AAC	CCG	CTT	C		<i>LDOX</i>
J102	GCA	TCG	AAG	AAA	TAT	ATG	ACC	A		<i>ANR</i>
J103	AAT	TTA	CGG	TAA	GCC	AGA	CAA	T		<i>ANR</i>
J108	GCA	AGT	GTT	GTC	AGA	TTA	CGG			<i>CHS</i>
J109	TGA	TAC	TGG	TGT	CTT	CAA	GCA	G		<i>CHS</i>
J116	CTC	CGT	GGT	GGT	TTT	TAA	GT			<i>Ubiquitin</i>
J117	GGA	GGC	AGA	AAC	AGT	ACC	AT			<i>Ubiquitin</i>

**Weitere Oligonukleotide:**

BTtG	GAG TCA GTG AGC GAG GAA GCG	pBT10
G088	GTT TAC CCG CCA ATA TAT CCT G	pJAN
G123	CCG CAG CCG AAC GAC CGA G	pBT10
nosT	GCA AGA CCG GCA ACA GGA TT	nos terminator
P35S	ACA ATC CCA CTA TCC TTC	Pro <sub>35S</sub>
revl	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG	pTOPO
RS651	ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GCC ATG TTT	oligo-dT
	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TV	
unil	CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	pTOPO

**2.1.4 Bakterienstämme und DNA-Vektoren**

Zur Herstellung von dam- und dcm-methylierter Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* XL 1-Blue-Bakterienstamm verwendet. Da für Experimente in der At7-Zellsuspensionskultur DNA in nicht methylierter Form benötigt wurde, wurde für deren Herstellung der Stamm *E. coli* K12 ER2925 verwendet.

Für die Herstellung transgener *A. thaliana*-Pflanzen wurden je nach Art der Transfektion (stabil oder transient) zwei verschiedene Agrobakterienstämme verwendet, entweder *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90RK (stabil) oder *A. tumefaciens* LB4404.pBBR1MCS (transient).

**E. coli Stamm****Genotyp****Referenz**

XL 1-Blue

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44*  
*relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ Δ M15 Tn10* (Tetr)]

Fa. Stratagene

K12 ER2925

*ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44*  
*galk2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1*  
*R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136*  
*dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsd1*  
*hsdR2*

Fa. New England Biolabs

**A. tumefaciens Stamm****Genotyp****Referenz**

GV 3101 pMP90RK

C58C1 Rif<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup> Gmr  
 (mit Virulenzplasmid pMP90RK)

(Konz *et al.*, 1984;  
Konz und Schell, 1986)

LBA 4404.pBBR1MCS

PAL 4404 Smr  
 (mit Virulenzplasmid virGN54D)

(Hoekema *et al.*, 1984)

Für Promoterinteraktionsstudien wurden zur Herstellung von Reporter- und Effektor-konstrukten Vektoren eingesetzt, die Derivate von pBT2 sind (Weisshaar *et al.*, 1991).

Für manche Zwischenschritte bei Klonierungen wurde der Vektor pCRII TOPO (Invitrogen) verwendet. Zur Transformierung von Pflanzen wurden Plasmide verwendet, die Derivate von pANGUS (Jakoby und Weisshaar, unveröffentlicht) sind. Alle übrigen Plasmide wurden von Mark Heim, Gunnar Huep, Martin Sagasser und Ralf Stracke zur Verfügung gestellt.

<b><u>Plasmid</u></b>	<b><u>Wesentliche Merkmale</u></b>	<b><u>Referenz</u></b>
<b>pANGUS</b>	Vektor zur Pflanzentransformation, Amp <sup>r</sup> zur Vermehrung in Bakterien, zwischen LB ( <i>left border</i> ) und RB ( <i>right border</i> ) des T-DNA Bereiches eine Kanr ( <i>nptII</i> ), Minimal-TATA Promotor, MCS, <i>uidA</i> -ORF und <i>nosPA</i>	Marc Jakoby unveröffentlicht
<b>pBT4::Pro35s:NLS:VP16</b> (MS9)	basierend auf pBT2 mit 35S Promotor aus <i>CaMV</i> , NLS, VP16 Aktivierungsdomäne, <i>nosPA</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT4::Pro35s:GUS (MS275)	basierend auf pBT2 mit 35S Promotor aus <i>CaMV</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT4::Δ:GUS (MS156)	basierend auf pBT2 ohne funktionellen Promotor für <i>uid-ORF</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
<b>pBT8::Pro35s:LUCm3</b> (MS83)	pBT2 basierter Vektor, <i>coIE1ori</i> , Amp <sup>r</sup> , -417 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> , modifizierter ORF der <i>Photinus pyralis</i> Luziferase ( <i>LUCm3</i> ) mit stillen Mutationen für <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> sowie entfernter <i>Clal site</i> , <i>nosPA</i> , MCS	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT8::Pro35s: <i>AtBHLH42</i> (mhei024)	wie pBT8::Pro35s: <i>LUCm3</i> mit <i>AtBHLH42-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	unveröffentlicht
pBT8::Pro35s: <i>AtMYB75</i> (mhei028)	wie pBT8::Pro35s: <i>LUCm3</i> mit <i>AtMYB75-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	unveröffentlicht
pBT8::Pro35s: <i>AtMYB123</i> (RST257)	wie pBT8::Pro35s: <i>LUCm3</i> mit <i>AtMYB123-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	unveröffentlicht
pLBR19::Pro35s: <i>AtTTG1</i> (mhei088)	pUC19 basierter Vektor mit 35S Promoter, Amp <sup>r</sup> , mit <i>AtTTG1-ORF</i>	(Baudry <i>et al.</i> , 2004)
<b>pBT10::GUS</b> (MS23)	<i>coIE1ori</i> , Amp <sup>r</sup> , -46 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> , <i>uidA-ORF</i> , <i>nosPA</i> , MCS, Deletionen im Vektorrückgrat	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT10::Δ: <i>LUCm3</i> (MS47)	wie pBT10::GUS mit <i>LUCm3-ORF</i> aus MS83 statt <i>uidA-ORF</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT10::Pro <sub>ubi</sub> : <i>LUCm3</i> (MS129)	wie pBT10::Δ: <i>LUCm3</i> mit konstitutiv exprimiertem <i>UBI4/2</i> Promotor aus <i>P. crispum</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT10::Pro <sub>CHS(1416)</sub> :GUS (JH6)	wie pBT10::Δ: <i>LUCm3</i> mit 1416Bp Fragment des <i>AtCHS</i> -Promoters	
pBT10::Pro <sub>DFR(520)</sub> :GUS (RSt633)	wie pBT10::GUS mit 520bp Fragment des <i>AtDFR</i> -Promoters	(Mehrtens <i>et al.</i> , 2005)
pBT10::Pro <sub>LDOX</sub> :GUS (SA155)	wie pBT10::GUS mit <i>AtLDOX</i> -Promoter	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT10::Pro <sub>BAN</sub> :GUS (SA96)	wie pBT10::GUS mit <i>AtBAN</i> -Promoter	Martin Sagasser, unveröffentlicht

<b>pCRII TOPO</b>	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
<b>pJAN (SA160)</b>	Vektor zur Pflanzentransformation, Amp <sup>r</sup> zur Vermehrung in Bakterien, zwischen LB ( <i>left border</i> ) und RB ( <i>right border</i> ) des T-DNA Bereiches eine Kan <sup>r</sup> ( <i>nptII</i> ), -417 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> und <i>nosPA</i> zwischen LB und RB	unveröffentlicht

## 2.1.5 Reagenziensätze

Folgende Fertig-Präparationshilfen (Kits) und Reagenziensätze der Firmen Amersham Biosciences (Buckinghamshire, GB), AppliChem (Darmstadt), Genomed (Bad Oeynhausen), Invitrogen (Karlsruhe) und Qiagen (Hilden) verwendet.

<i>Amersham GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	Aufreinigung von DNA aus Lösungen oder Agarosegelen
<i>JETstar Plasmid Purification MIDI Kit</i>	Plasmid-DNA Präparation im MIDI-Maßstab
<i>MAXXBOND</i>	Regeneration von Silica-Säulen zur Wiederverwendung
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
<i>QIAGEN Plasmid Mega Kit</i>	Plasmid-DNA Präparation im MEGA-Maßstab
<i>TOPO TA Cloning® Kit</i>	Klonierung von DNA-Fragmenten
<i>Amersham Ready-to-go DNA DNA Labelling Beads Kit</i>	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

## 2.1.6 Zellkultur und Pflanzen

### 2.1.6.1 At7 Zellsuspensionskultur

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *A. thaliana* Zellsuspensionskultur At7 (Ökotyp Columbia) ist aus Hypokotylzellen hervorgegangen und wird im Dunkeln kultiviert. Sie ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden (Trezzini *et al.*, 1993; Zimmermann *et al.*, 2005; Mehrrens *et al.*, 2005).

### 2.1.6.2 Pflanzen

In dieser Arbeit wurden bei der Anzucht von *Arabidopsis thaliana*, sofern nicht anders vermerkt, die Ökotypen Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (Ler) und Nössen (Nö-0) verwendet. Linien, die nicht selbstständig im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, sind im Folgenden aufgelistet.

Gen	besondere Funktion	Bezeichnung der Pflanzen	Quelle
<i>TTG1</i>	EMS-Linie	<i>ttg1-1</i>	Maarten Koornneef
<i>MYB75</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>myb75/pap1</i> Riken PST16228	Riken BioResource
<i>TT2</i>	EMS-Linie	<i>tt2-1</i>	Maarten Koornneef

Material von Apfelpflanzen (Fruchtmaterial der Kultivare Rewena und WeihRouge sowie Blatt- und Blütenblattmaterial) stammte von 4-6 Jahre alten Apfelbäumen aus dem Obstgarten der Technischen Universität München in Weihenstephan und wurde von Thilo Fischer und Judith Pfeiffer zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Pflanzenkultivierung und –präparation

#### 2.2.1.1 Pflanzenkultivierung

Zur Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen wurde grundsätzlich zwischen Anzucht auf Erde und Anzucht auf sterilen ½ MS-Platten unterschieden. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte weiterhin teilweise unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) und unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit).

##### 2.2.1.1.1 Anzucht auf Erde

*A. thaliana* Samen wurden hier zunächst auf Erde ausgelegt und im Dunklen bei 4 °C für 3-5 Tage stratifiziert. Anschließend wurden sie für 2-4 Wochen unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus oder einer Klimakammer kultiviert. Danach wurde die Ausbildung von Blüten durch Überführung der Pflanzen in Langtagbedingungen für 4-6 Wochen induziert. Zum Sammeln von Samen wurden die Pflanzen mit Papiertüten eingetütet, sobald gelbliche

Schoten zu sehen waren. Die Samen konnten anschließend nach 1-2 weiteren Wochen geerntet werden.

#### **2.2.1.1.2 Sterile Anzucht auf MS-Platten**

Für die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen auf sterilen ½ MS-Platten wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Dazu wurden die Samen zweimal in 1 mL Waschlösung (70 % Ethanol + 0,05 % Triton X-100) für 10 min stehen gelassen und gelegentlich invertiert. Nach Entfernen der Waschlösung erfolgten zwei weitere Waschschrte in 70 %igem Ethanol für jeweils 5 min unter gelegentlichem Invertieren. Anschließend wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf einem mit 100 % Ethanol getränkten Rundfilter ausgebracht und getrocknet. Danach erfolgte die Aussaat auf sterile ½ MS-Platten. Nach einer Stratifikation im Dunkeln für 3-5 Tage bei 4 °C wurden die Platten in eine Klimakammer mit Langtagbedingungen überführt. Sofern größere Pflanzen benötigt wurden, erfolgte nach 1-3 Wochen eine Pikierung der Pflanzen von den Platten auf Erde und eine Weiterkultivierung im Gewächshaus unter Langtagbedingungen.

#### **2.2.1.2 Saccharose-Streßversuch mit *A. thaliana* Keimlingen**

Um bei auf ½ MS-Platten heranwachsenden jungen Keimlingen eine erhöhte Anthocyanproduktion zu induzieren, wurde der Saccharoseanteil im Medium erhöht. Dazu wurden die entsprechenden Samen auf ½ MS-Platten mit 4 % Saccharose angezogen. 7 Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge fotografiert und gegebenenfalls die Anthocyanmenge photometrisch quantifiziert.

#### **2.2.1.3 Quantifizierung löslicher Anthocyane in *A. thaliana* Keimlingen**

Zur Quantifizierung von löslichen Anthocyanen wurde von 7 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen etwa 80-100 mg Material geerntet und mit 1 mL saurem Methanol versetzt. Die Freisetzung der Anthocyane erfolgte unter Schütteln bei 1400 rpm für 5-6 Stunden bei RT. Nach anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min bei 20 °C wurde 1 mL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Messung der Absorption verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte im Spektralphotometer bei 530 und 657 nm. Zur Berechnung des relativen Anthocyangehaltes wurde folgende Formel verwendet.

$$Q_{\text{ANT}} = (A_{530} - 0,25 \cdot A_{657}) / M_{(\text{g})}$$

Q ist dabei der relative Anthocyanwert, M stellt die Einwaage an frischem Pflanzenmaterial dar.

## 2.2.2 DNA-Präparation

### 2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(modifiziert nach Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona 1987)

Die PCR-Ansätze wurden je nach Verwendungszweck entweder mit *Taq*-DNA-Polymerase oder *Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase* (*proof reading* Aktivität) angesetzt. Die Ansätze hatten in der Regel ein Volumen von 25 µL und enthielten dabei 100-500 ng Matrizen-DNA, jeweils 10 pmol gegenläufige Primer (Desoxyoligonucleotide), 2 nmol (bei *Taq*-Polymerase) bzw. 5 nmol (bei *Phusion<sup>TM</sup>*-Polymerase) dNTP-Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase oder *Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase* im entsprechenden 1 x Puffer. Die Amplifikation der DNA erfolgte entweder in *Mastercycler epgradient* (Eppendorf), *Flexcycler* (AnalytikJena) oder MJ Research PTC-200 (Biozym) Maschinen nach folgendem Schema.

Schritt	<i>Phusion<sup>TM</sup></i> -Polymerase			<i>Taq</i> -Polymerase		
	Zeit	Temperatur	Zyklen	Zeit	Temperatur	Zyklen
<b>Aktivierung</b>	30 sec	98 °C	1	3 min	94 °C	1
<b>Denaturierung</b>	10 sec	98 °C		25 sec	94 °C	
<b>Annealing</b>	25 sec	50-65 °C	35	30 sec	50-65 °C	25-36
<b>Elongation</b>	30 sec / kb	72 °C		1 min / kb	72 °C	
<b>Elongation</b>	10 min	72 °C	1	5 min	5 min	1
<b>Kühlen</b>	∞	4-16 °C	1	∞	4-16 °C	1

Zur Berechnung der *Annealing*-Temperatur wurden die Schmelztemperaturen der verwendeten Desoxynucleotide abgeschätzt und eine *Annealing*-Temperatur gewählt, die etwa 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der Desoxynucleotide lag.

#### 2.2.2.1.1 Kolonie-PCR

(modifiziert nach Gussow und Clackson, 1989)

Für eine schnelle Überprüfung von transformierten Zellen auf das zu transformierende Plasmid wurde zu jedem PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase direkt mit einer sterilen Pipettenspitze

Zellmaterial einer einzelnen Kolonie von der Platte gegeben. Die Amplifikation der DNA erfolgte nach obigem Schema mit der Ausnahme einer 5-minütigen Aktivierungsdauer.

### 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

#### Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (*TELT* Miniprep)

(modifiziert nach Holmes und Quigley, 1981)

Zur Isolation von Plasmid-DNA im Minimaßstab wurden 1,5 mL einer 3 mL *E. coli* Übernachtskultur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 2 min, 13.000 rpm, RT) und das Pellet in 200 mL *TELT*-Puffer mit 20 µL Lysozymlösung (1 mg/ml) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 3-5 min bei 95 °C wurde die Suspension auf Eis für 5 min abgekühlt. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 100 µL präzipitiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets im Vakuum für 5 min bei 40 °C (Speedvac SPD111V, Thermo Electron Corporation) wurde die Plasmid-DNA in 50 µL *TE*-Puffer (10/0,1) mit 10 µg/ml RNase gelöst.

#### Plasmid-DNA Präparation im *MIDI*- und *MEGA*-Maßstab

Zur Gewinnung von hochreiner Plasmid-DNA für den Einsatz in Transfektionsexperimenten wurde über die Technik der Säulenchromatographie gewonnen. Je nach benötigter Menge an Plasmid wurde entweder das *JETstar Plasmid Purification MIDI Kit* oder das *QIAGEN Plasmid Mega Kit* verwendet. Die Übernachtskultur wurde dafür in selektivem TB-Medium angezogen und die gewonnene Plasmid-DNA in *TE*-Puffer (10/0,1) gelöst. Verunreinigungen durch Säulenmaterial wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 5 min, 13.000 rpm, 4 °C) und Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß entfernt.

### 2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Doppelsträngige DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen des Typs II sequenzspezifisch gespalten. Die Durchführung dieser Spaltungen wurde nach Angaben der Hersteller (New England Biolabs oder Fermentas) durchgeführt. Für eine komplette Restriktion wurde pro µg Plasmid-DNA 5 U Restriktionsenzym verwendet und für eine Stunde inkubiert. Wurden DNA-Fragmente gespalten, die mittels Polymerasekettenreaktion gewonnen wurden, ist je nach Notwendigkeit mehr Enzym eingesetzt worden (maximal 50 U in 50 µL Reaktionsansatz).

#### 2.2.2.4 Dephosphorylierung von DNA

Zur Entfernung von freien 5'-Phosphatresten von DNA-Fragmenten wurde alkalische Phosphatase (*Antarctic Phosphatase*, New England Biolabs) verwendet um bei Ligationen der durch Eigenligation von Vektoren bedingte Hintergrund herabzusetzen. Dabei wurde für einen Ansatz bei 5 µg zu verdauender Vektor-DNA (in 30 µL) 5 µL 10x Puffer, 4 µL *Antarctic Phosphatase* (insgesamt 20 U) und 11 µL H<sub>2</sub>O gemischt, für 15 min bei 37 °C und anschließend für 20 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und eluiert.

#### 2.2.2.5 Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Da der optimale Trennbereich von Agarosegelen von der Konzentration der Agarose abhängig ist, wurden DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe in Gelen unterschiedlicher Konzentration aufgetrennt. DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 3 kb wurden in 0,8-1,0 %igen (w/v) Gelen (PeqLab, Erlangen) analysiert, kleinere Fragmente in 1,5-2 %igen Gelen (jeweils in 1x TAE-Puffer). Um die DNA zur späteren Analyse unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Gel 0,04 µg Ethidiumbromid pro mL Gelvolumen zugegeben. Die DNA wurde mit 5x Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 5-15 Volt/cm aufgetrennt. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde eine *1 kb Ladder* (Invitrogen) bei größeren Fragmenten oder eine *100 bp Ladder* (NEB) bei kleineren DNA-Fragmenten. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht-Bestrahlung mit einem Geldokumentationssystem der Firma INTAS. Wurde DNA für präparative Zwecke benötigt, wurde Agarose der Firma Invitrogen verwendet.

#### 2.2.2.6 Aufreinigung und Elution von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen oder Agarosegel erfolgte entweder mit dem *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham), dem *QIAquick PCR Purification Kit* oder dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (jeweils von Qiagen). Die Durchführung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieser Kits beruht auf der DNA-Bindung an Silicasäulenmaterial in Anwesenheit von chaotropen Salzen und der anschließenden Möglichkeit, unter niedrigeren Salzbedingungen die DNA wieder von den Säulen zu eluieren. Sollten PCR-Ansätze von Enzymen und Desoxyoligonukleotiden befreit werden oder lag nur eine einzelne aufzureinigende DNA-Fraktion vor, wurde das *PCR Purification Kit* verwendet.

Eine Gelelektion erfolgte, wenn aus einem DNA-Gemisch nur ein bestimmtes Bestandteil verwendet werden sollte.

### 2.2.2.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µL durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 5:1 unter Verwendung von 400 U T4-Ligase (New England Biolabs) im entsprechenden 1x Puffer eingesetzt. Da ausschließlich „sticky-end“ Klonierungen durchgeführt wurden, reichte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei einer Temperatur von 25 °C. Die kompletten Ligationsansätze wurden für die anschließende Transformation in chemo- oder elektrokompetente *E. coli* Zellen (Stamm XL1-Blue) verwendet.

### 2.2.2.8 TOPO™ TA Cloning

Bei einigen Klonierungen von PCR-Fragmenten wurde das *TOPO™ TA Cloning Kit* (Invitrogen) verwendet. Dazu wurde zunächst eine PCR mit *Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase* (*proof reading* Aktivität) durchgeführt. Da diese PCR sogenannte „blunt ends“ produziert, wurde anschließend 3'-A-Überhänge im PCR-Produkt generiert. Hierzu wurden nach Aufreinigung des PCR-Produkts 12,5 mL mit 0,5 µL *Taq*-DNA-Polymerase (2U) und 0,5 µL 10mM dATP im entsprechenden 1x PCR-Puffer für 10 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die folgende TOPO™ Reaktion wurden 2 µL des 3'-A-Reaktionsansatzes mit 0,5 µL *salt solution*, 0,5 µL TOPO™ Vektor (pCRII-TOPO) und 3 µL Wasser bei RT für 30 min inkubiert. Zur Transformation in chemokompetente *E. coli* Zellen wurden anschließend 2 µL des Reaktionsansatzes verwendet. Der komplette Ansatz der transformierten Bakterien wurde auf LB-Platten ausgebracht, die zuvor mit einem IPTG/X-Gal-Mix behandelt worden waren. Die Identifizierung von positiven Kolonien erfolgte über die fehlende Blaufärbung.

### 2.2.2.9 Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmidkonstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. *A. thaliana*-Sequenzen basieren auf dem Ökotyp Columbia-0.

<u>Klon-Nr.</u>	<u>Plasmid</u>	<u>Eigenschaften und Einzelheiten zur Klonierung</u>
pJB08	pANGUS:: <i>MdTTG1</i>	Vektor zur stabilen Transformation von <i>A. thaliana</i> , Insert über Amplifikation mit J024/J026 und Rewena Blatt-cDNA als Matrize, Klonierung über NcoI/XmaI
pJB09	pANGUS:: <i>Pro<sub>AtTTG1</sub>:MdTTG1</i>	Vektor zur stabilen Transformation von <i>A. thaliana</i> , Insert über Amplifikation mit J027/J028 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI und NcoI Vektorrückgrat aus pLB08

pJB10	pBT8::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB11</i>	Vektor zur Expression von <i>MdMYB11</i> in Protoplasten, Insert über Amplifikation mit J051/J118 und Rewena Frucht-cDNA als Matrize, Klonierung über NcoI und XmaI
pJB11	pBT8::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB10</i>	Vektor zur Expression von <i>MdMYB10</i> in Protoplasten, Insert über Amplifikation mit J079/J094 und Rewena Frucht-cDNA als Matrize, Klonierung über NcoI und XmaI
pJB12	pBT8::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB9</i>	Vektor zur Expression von <i>MdMYB9</i> in Protoplasten, Insert über Amplifikation mit J081/J093 und Rewena Frucht-cDNA als Matrize, Klonierung über NcoI und XmaI
pJB13	pJAN::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB9</i>	Vektor zur stabilen Transformation von <i>A. thaliana</i> , Insert über Amplifikation mit J081/J093 und Rewena Frucht-cDNA als Matrize, Klonierung über NcoI und XmaI
pJB14	pJAN::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB10</i>	Vektor zur stabilen und transienten Transformation von <i>A. thaliana</i> , Insert über Amplifikation mit J079 und J09 und Rewena Frucht-DNA als Matrize, Klonierung über XmaI und NcoI
pJB15	pJAN::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdMYB11</i>	Vektor zur stabilen Transformation von <i>A. thaliana</i> , Insert über Amplifikation mit J051/J118 und Rewena Frucht-cDNA als Matrize, Klonierung über XmaI und NcoI
pJB19	pBT8::Pro <sub>35S</sub> : <i>MdTTG1</i>	Vektor zur Expression von <i>MdTTG1</i> in Protoplasten, Insert über Amplifikation mit J024/J026 und pJB08 als Matrize, Klonierung über NcoI und XmaI
pJB24	pCRII:: <i>MdTTG1</i> -3'UTR	TOPO-Klon für 3'UTR-Sequenz von <i>MdTTG1</i> , Insert über Amplifikation mit J126/J128 und Rewena gDNA als Matrize

### 2.2.2.10 DNA-Extraktion aus *A. thaliana* Pflanzenmaterial

(modifiziert nach Edwards *et al.*, 1991)

Um genomische DNA aus Pflanzenmaterial zu extrahieren wurden 100 bis 500 mg Blattmaterial mit 400 µL Extraktionspuffer und zwei Stahlkugeln in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Materials durch eine Behandlung im *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden) für 3 min bei 30 s<sup>-1</sup>. Nach einer Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 2 min 14.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand von ca. 250 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol bei Inkubation von 10 min bei 4 °C. Das Präzipitat wurde durch erneutes Zentrifugieren (Eppendorf Centrifuge 5415D, 10 min, 13.000 rpm, RT) pelletiert und das erhaltene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in 50 µL TE-Puffer (10/1) aufgenommen.

### **2.2.2.11 DNA-Extraktion aus *M. x domestica* Pflanzenmaterial**

Für die Extraktion von DNA aus Apfelmateriale wurde die Methode von Rogers und Bendich (1985) verwendet. Dazu wurden 500 mg Blattmaterial mit einer Spatelspitze Seesand versetzt und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein zermahlen. Das Pulver wurde in 2 mL bei 65 °C vorgewärmten 2x CTAB-Puffer gegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird ein Volumen Chloroform zugegeben und vorsichtig für 1 min geschwenkt. Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 5 min, 4.600 rpm, RT) wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2). Nach Inkubation für 5 min bei RT erfolgte eine weitere Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 5 min 4.600 rpm). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung anschließend in 250 µL TE-Puffer (10/1) aufgenommen.

### **2.2.2.12 Ammoniumacetat-Fällung von DNA**

Für die Sequenzierung wurde DNA eingesetzt, die zuvor durch Ammoniumacetat aufgereinigt wurde. Dazu wurde die DAN mit 6 Volumen absolutem Ethanol und 1 Volumen 4 M Ammoniumacetat gefällt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) aufgenommen.

### **2.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Da Nukleinsäuren Licht im UV-Bereich absorbieren ist es möglich, die Konzentration von DNA, RNA und Oligonukleotiden in Lösungen durch Messung der Lichtabsorption photometrisch zu bestimmen. Diese Messung erfolgt dabei nach dem Gesetz von Lambert-Beer, nach dem die Abnahme der Lichtintensität beim Strahlendurchgang proportional zur Schichtdicke des absorbierenden Materials und der Konzentration der Nukleinsäuren ist. Nukleinsäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei eine Extinktion von 1 etwa einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA, 40 µg/mL RNA, 35 µg/mL einzelsträngiger DNA und 20 µg/mL Oligonukleotiden entspricht. Die photometrische Bestimmung der Konzentration erfolgte in Quarzküvetten oder UV-durchlässigen Kunststoffküvetten (Eppendorf, Biophotometer).

### **2.2.2.14 ExoSAP Verdau von DNA**

Durch PCR amplifizierte DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde zunächst durch eine *ExoSAP-IT*-Behandlung vorbereitet. Dazu wurden 6,5 µL PCR-Produkt

mit 0,5 µl *Exo-SAP-IT* gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 80 °C für 15 min zur Inaktivierung des Enzyms.

#### **2.2.2.15 DNA-Sequenzierung**

Die automatisierte DNA-Sequenzanalyse wurde von der „*Sequencing Core Facility*“ der Universität Bielefeld nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung von „*Big Dye –terminator Chemistry*“ durchgeführt. Dabei befindet sich in einem Ansatz zur DNA-Amplifikation nur ein Primer, wodurch die DNA ausschließlich linear amplifiziert wird. Neben den vier verschiedenen Desoxynukleotiden befinden sich auch vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide im Ansatz, welche die Termination der Polymerisation verursachen. Die durch die Amplifikation entstandenen, unterschiedlich großen und markierte Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des Analysegerätes „*Abi-Prism 3730xl DNA-Sequencer*“ (Applied Biosystems) detektiert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms „*Sequencher*“ (Gene Codes Corporation, USA) ausgewertet.

#### **2.2.2.16 Gelelektrophorese und Kapillartransfer von Nukleinsäuren**

modifiziert nach Southern (1975)

Für genomische DNA-Gel-Blot-Analysen wurden zunächst 10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht geschnitten. Dem Reaktionsansatz wurde anschließend 0,1 Volumen 5 M Natriumacetat zugegeben und anschließend zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 20 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 40 µL TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem 0,8%igen Agarosegel. Anschließend wurde die DNA im Gel depuriniert, indem das Gel zunächst 20 min in 400 mL frisch hergestellter 0,25 M HCl geschüttelt und dann in Wasser gewaschen wurde. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 45 min in 400 mL 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH geschüttelt. Die Neutralisation erfolgte dann durch 30-minütiges Waschen des Gels in 400 mL 1 M Tris/HCl (pH 7,4)/1,5 M NaCl, wobei nach 15 Minuten der Puffer erneuert wurde.

Der Kapillartransfer auf die Nylonmembran (*Hybond N*, Amersham Pharmacia) erfolgte in 20x SSC-Puffer über Nacht. Anschließend wurde die Membran für 2 h in der Mikrowelle bei 80 °C gebacken, um die Nukleinsäuren kovalent zu binden.

#### **2.2.2.17 Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren**

Die Hybridisierung der immobilisierten Nukleinsäuren erfolgte in verschließbaren Röhren über Nacht bei 65 °C in einem Rollinkubator. Zunächst wurde die Prähybridisierungslösung auf 65 °C vorgewärmt und 200 µg ultrageschaltete, nicht homogene Lachssperma-DNA in 100 µL

Wasser für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Membran mit den Nukleinsäuren wurde mit der DNA-Seite nach innen in die Hybridisierungsröhre gegeben und mit 5-10 mL Prähybridisierungslösung und der Lachssperma-DNA für 2 Stunden bei 65 °C prähybridisiert. Die zuvor unter Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP mit dem „*random primed DNA Labelling Kit*“ (Roche) radioaktiv markierte Sonde wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort für mehrere Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurde die Sonde zur Membran in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für etwa 16 Stunden, nach denen die Membran zunächst in der Röhre in 100 mL 6x SSC-Puffer für 5 min bei 65 °C gewaschen wurde. Es folgte ein zweiter Waschschrift in 100 mL 2x SSC/0,1% SDS für 30 min bei 65 °C. Anschließend wurde die Membran in 300 mL vorgewärmtes 1x SSC/0,1% SDS überführt und 20 min bei 65 °C geschüttelt. Die Membran wurde abschließend auf Filterpapier aufgezogen, in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit dem *Phosphoimager Typhoon 8600* (GE Healthcare) analysiert.

## 2.2.3 RNA-Präparation

### 2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

RNA wurde aus *A. thaliana*-Pflanzen mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) oder mit Tri-Reagent® nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden 50 bis 100 mg Pflanzenmaterial entweder durch Behandlung im *Tissue Lyser* (Qiagen) im jeweiligen Puffer (3 min, 30 s<sup>-1</sup>) oder durch sorgfältiges Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die isolierte RNA wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *M. x domestica* Fruchtmaterial

Zur Gewinnung von RNA aus einem Gewebe mit hohen Phenol- und Polysaccharidanteilen wurde die modifizierte Methode nach Gasic *et al.* (2004) verwendet. Dazu wurden 500 mg Material in flüssigem Stickstoff sorgfältig gemörsert und in 5 mL RNA-Extraktionspuffer aufgenommen. Nach Inkubation für 15 min bei 60 °C erfolgte ein weiterer Aufschluß durch einen Ultra-Turrax (30 sec, 20.000 rpm). Nach erneuter Inkubation für 15 min bei 60 °C wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und 2 min gevortext. Nach Zentrifugation bei 4.6000 rpm für 30 min bei 4°C (Heraeus Multifuge 3 S-R) wurde der Überstand abgenommen und eine weitere Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden je 1,5 mL der wässrigen Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 0,3 Volumen 7.5 M LiCl zugegeben. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht erfolgte die Präzipitation der RNA durch eine weitere Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die RNA in 40 µL DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt.

### 2.2.3.3 Erststrang-cDNA-Synthese für semiquantitative RT-PCR

Um für die semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) Matrizen-DNA zu gewinnen, wurde eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 17 µL gebracht. Zur Entfernung von Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden anschließend 2 µL 10x DNase Puffer (Ambion, *DNA-free*<sup>TM</sup>) und 1 µL DNaseI (Ambion) zugegeben. Nach Inkubation des Ansatzes für 25 min bei 37 °C wurden 2 µL *DNase Inactivation Reagent* (Ambion) zugegeben und erneut 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 90 sec bei 10.000 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend 1 µL einer 10 µM Lösung des oligo-RT-Primers RS651 sowie 4 µL Wasser zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 65 °C und Kühlen des Ansatzes auf Eis wurden 8 µL 5x *first strand buffer*, 4 µL 0,1 M DTT, 1 µL Reverse Transkriptase (Invitrogen, *SuperScript*<sup>TM</sup> II *Reverse Transcriptase*) und 2 µL 10 mM dNTPs zugesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte anschließend für 1 h bei 42 °C. Nach 5-minütigem Abstoppen der Reaktion bei 90 °C wurde die cDNA-Erststrang-Präparation bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.3.4 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) wurde angewendet, um die Expressionsstärke der zu untersuchenden Gene abzuschätzen. Dazu wurde die Transkriptmenge des entsprechenden Gens mit der Transkriptmenge eines Kontrollgens (Aktin) verglichen, das konstitutiv exprimiert wird. Als Maßstab für die Expressionsstärke diente die Bandenstärke nach einer Agarosegel-Elektrophorese. Für die Kontrolle wurden spezifische Primer eingesetzt (J070 und J071, siehe auch Espley *et al.*, 2007). Das Volumen der Matrizen-DNA wurde dann gegebenenfalls angepasst, so dass nach der Aktin-PCR eine vergleichbare Bandenstärke im Agarosegel in den zu vergleichenden Proben vorhanden war. Das so bestimmte Matrizen-DNA-Volumen wurde dann in der PCR für die zu untersuchenden Gene mit genspezifischen Primern verwendet, wobei die Zyklenzahl so gewählt wurde, dass die PCR noch in der exponentiellen Phase der Amplifikation gestoppt wurde. Im Allgemeinen wurde für die PCR die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet und nach dem Schema aus 2.2.2.1 verfahren.

### 2.2.3.5 Vorbereitung der Proben für die quantitative *real time* PCR (qPCR)

Für die Probenvorbereitung zur quantitativen *real time* PCR (qPCR) wurde ebenfalls zunächst eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Dazu wurden 2-5 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 8,8 µL gebracht und anschließend zur Entfernung von Verunreinigungen durch genomische DNA 1 µL 10x DNase Puffer (Ambion, *DNA-free*<sup>TM</sup>) und 0,2 µL DNase I (Ambion) zugegeben. Nach Inkubation des Ansatzes für 2 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µL *DNase Inactivation Reagent* (Ambion) abgestoppt. Nach erneuter Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde 90 sec bei 10.000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge Eppendorf Centrifuge 5415D) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt und zur RNA-Lösung 100 µL 5 M LiCl (mit DEPC-Wasser angesetzt) zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei -20 °C für mindestens 2 h, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und nach Aufnahme des Pellets in 100 µL 3 M Natriumacetat erneut zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4 °C). Es folgten zwei Waschschriffe mit 70%igem Ethanol, nach denen das Pellet in 8 µL DEPC-Wasser gelöst wurde. Zu diesen 8 µL wurden 0,5 µL *Random-Hexamere* (50 ng/µL), 0,5 µL oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer sowie 1 µL 10 mM dNTPs gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 4 µL 5x *first strand buffer*, 2 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µL 0,1 M DTT, 0,5 µL BSA (nukleasefrei, 1 µg/µL) und 1 µL reverse Transkriptase (Invitrogen, *SuperScript*<sup>TM</sup> II *Reverse Transcriptase*) sowie 0,5 µL RNase Inhibitor (Fermentas). Der Ansatz wurde zur Erststrang-cDNA-Synthese 5 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C und abschließend für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde mit 180 µL DEPC-Wasser verdünnt und in 16 Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

### 2.2.3.6 Quantitative *real time* PCR (qPCR)

Zur relativen Quantifizierung der Expression von zu untersuchenden Genen wurde die quantitative *real time* PCR (qPCR) verwendet und erfolgte mit Hilfe des *Rotor-Gene*<sup>TM</sup> 6000 Systems (Corbett). Der Entwurf der verwendeten Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe der *Probefinder Software* (Roche), die im Internet unter <http://qpcr2.probefinder.com/roche2.html> zu finden ist. Die Rohdaten wurden zunächst mit der REST-Software bearbeitet. Die Datenauswertung erfolgte nach Pfaffl *et al.* (2002), wozu das Tabellenkalkulationsprogramm Excel® (Microsoft) benutzt wurde. Die verwendete qPCR-Methode beruht auf der Verwendung des Farbstoffs *SYBR Green I*, der an doppelsträngige DNA binden kann, die während der PCR gebildet wird. Dadurch wird ein Fluoreszenzfarbstoff-Komplex gebildet, der ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 498 nm und ein Emissionsmaximum bei 522

nm aufweist und daher durch eine Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus den genauen Verlauf der PCR kontrollierbar macht.

Für die qPCR wurde das *Platinum® SYBR® Green qPCR Super-Mix-UDG Kit* (Invitrogen) verwendet. Der PCR-Mix wurde hergestellt, indem 12,5 µL *Platinum®-Quantitative PCR SuperMix-UDG*, 0,75 µL des 10 µM 5'-PCR-Primers (Endkonzentration 300 nM), 0,5 µL ROX, 5 µL Matrizen-DNA (1-100 ng) aus den vorbereiteten Proben und 5,5 µL Wasser gemischt wurden. Jedes untersuchte Gen wurde dabei als Triplikat untersucht. Die *SYBR Green* Messung erfolgte dabei nach jedem Zyklus. Verwendet wurde folgendes PCR-Profil:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
<b>Aktivierung</b>	2 min	50 °C	1
	2 min	95 °C	1
<b>Denaturierung</b>	10 sec	98 °C	
<b>Annealing</b>	25 sec	50-65 °C	40
<b>Elongation</b>	30 sec / kb	72 °C	
<b>SYBR Green Messung</b>			
<b>Schmelzkurve</b>	10 sec/ °C	72 °C-95 °C	1

In allen Fällen wurde als endogene Referenz zur Normalisierung der Genexpression wurde in allen Fällen die in den Proben enthaltene Menge an Ubiquitin-RNA gemessen, wofür die spezifischen Primer J116 und J117 verwendet wurden. Für die Messung der Zielgene wurden genspezifische Primer verwendet.

## 2.2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.4.1 Kultivierung von Bakterien

Für die Herstellung methylierter Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-blue verwendet, während zur Herstellung unmethylierter Plasmid-DNA der Stamm *E. coli* K12 ER2925 benötigt wurde. Grundsätzlich wurden die *E. coli* Bakterien auf LB-Platten bei 37 °C angezogen, die gegebenenfalls mit den entsprechenden Antibiotika versetzt waren. Flüssigkulturen wurden entweder mit LB- oder TB-Medium angesetzt. Sollten Plasmide in Pflanzen transformiert werden, wurden diese zuerst in *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien transformiert. Bei transienter Transformation wurde der *A. tumefaciens* Stamm EHA105 verwendet, während bei stabiler Transformation der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 genutzt

wurde. Die *A. tumefaciens* Bakterien wurden sowohl auf Platte, als auch in Flüssigkultur mit Yep-Medium bei 28 °C angezogen.

#### **2.2.4.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation**

Zur Transformation wurden wahlweise elektrokompetente, als auch chemokompetente *E. coli* Zellen verwendet. Bei der Transformation von *A. tumefaciens* Zellen wurden ausschließlich elektrokompetente Zellen verwendet. Die Zellen wurden den nachfolgenden Protokollen gemäß selbst hergestellt. Dabei wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt, um die Kompetenz der Bakterien nicht zu verringern.

##### **Herstellung chemokompetenter *E. coli* Bakterienzellen**

Mit einer einzelnen Kolonie des Stammes XL1-blue oder K12 ER2925 wurde eine 3 mL Übernachtkultur in LB-Medium angesetzt, die am nächsten Tag in 100 mL frisches LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600}$  von 0,5 angezogen wurde. Die Bakteriensuspension wurde danach auf zwei 50 mL Reaktionsgefäße verteilt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 4.000 g für 6 min zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Die Pellets wurden jeweils in 2 mL eiskaltem TFB1-Medium resuspendiert, in einem Reaktionsgefäß vereinigt und das Gesamtvolumen mit TFB1-Medium auf 40 mL aufgefüllt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und 1.500 g für 6 Minuten (Heraeus Multifuge 3 S-R). Die Zellen wurden in 4 mL eiskaltem TFB2-Medium resuspendiert und nach 15 Minuten Inkubation in 100  $\mu$ L Aliquots auf 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

##### **Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Bakterienzellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine Einzelkolonie der *E. coli* Zellen (XL1-blue oder K12 ER2925) zur Animpfung zweier 5 mL Übernachtkulturen in LB-Medium verwendet. Am nächsten Tag wurden mit den Kulturen je 500 mL LB-Medium angeimpft und die Suspensionen bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,5$  bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden in zwei 500 mL Zentrifugenbecher überführt und für 15 bis 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 g für 15 min (Heraeus Multifuge 3 S-R). Die Pellets wurde in 250 mL eiskaltem Wasser resuspendiert und beide Ansätze vereinigt. Es folgte eine erneute Pelletierung durch Zentrifugation (4 °C, 4.000 g, 15 min). Die Zellen wurden in 20 mL eiskaltem, 20%igem Glycerin aufgenommen und das Volumen auf 40 mL mit 10%igem Glycerin aufgefüllt. Nach Zentrifugation (4 °C, 4.000 g, 15 min) wurde das Pellet in 2-3 mL eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und in 50  $\mu$ L

Aliquots auf eisgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Bakterienzellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV3101 pMP90RK oder EHA105) wurden 2x 5 mL selektives YEP-Medium mit einer Einzelkolonie angesetzt und über Nacht bei  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm angezogen. Die angewachsenen Kulturen wurden verwendet, um zwei 500 mL YEP-Hauptkulturen zu inokulieren, die über Nacht bei  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm inkubiert wurden. Die Suspensionen wurden in 500 mL Zentrifugenbecher überführt und 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $4.000\text{g}$  für 15 min (Heraeus Multifuge 3 S-R). Die Pellets wurden in 500 mL eiskaltem Wasser resuspendiert und abermals zentrifugiert. Es folgte eine erneute Aufnahme des Pellets in 500 mL eiskaltem Wasser. Nach weiterer Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $4.000\text{g}$  für 15 min (Heraeus Multifuge 3 S-R) wurde das Pellet in 50 mL 10%igem Glycerin aufgenommen und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurde abermals bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $4.000\text{ g}$  für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 1-2 mL eiskaltem, 10%igem Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 50  $\mu\text{L}$  Aliquots aufgeteilt und in eisgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.4.3 Transformation von Bakterienzellen**

##### **Transformation von chemokompetenten *E. coli* Bakterienzellen**

Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen (XL1-blue oder K12 ER2925) auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben. Bei Retransformierungen wurden 500 ng eingesetzt, während bei Ligationsansätzen 10  $\mu\text{L}$  verwendet wurden. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 90 sec bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach erneuter Kühlung für 2 min auf Eis wurde 1 mL SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für etwa 45 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1250 rpm im *Thermomixer* (Eppendorf) inkubiert. In Abhängigkeit von der erwarteten Transformationseffizienz wurden unterschiedliche Mengen auf selektive LB-Platten ausgestrichen. Normalerweise wurden 50  $\mu\text{L}$  der Transformationsansätze ausgestrichen, bei Ligationen wurde jedoch die komplette Bakteriensuspension zentrifugiert, das Pellet in 50  $\mu\text{L}$  LB-Medium resuspendiert und komplett ausgestrichen. Im Falle von Blau-/Weißselektionen wurden die LB-Platten vorher mit einem IPTG/X-Gal-Mix behandelt. Die Inkubation der ausgestrichenen Bakterien erfolgte über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Bakterienzellen**

Die kompetenten *E. coli* Zellen (XL1-blue oder K12 ER2925) wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA (50-500 ng) zugegeben. Der Ansatz wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, PeqLab) gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in einem *Micropulser* (Biorad) über einen Elektroimpuls (1,8 kV), wobei die Entladungszeit im Mittel etwa 5 msec betragen sollte. Nach dem Puls wurde zügig 1 mL SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 45 min bei 37 °C und 1250 rpm im *Thermomixer* (Eppendorf). Anschließend wurden je nach erwarteter Transformationseffizienz unterschiedliche Mengen Bakteriensuspension auf selektive LB-Platten ausgetrichen, im Normalfall waren dies 50 µL. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

**Transformation von elektrokompetenten *A. tumefaciens* Bakterienzellen**

Die kompetenten *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV 3101 pMP90RK oder EHA105) wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA (100 bis 1.000 ng) wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 oder 2 mm Elektrodenabstand, PeqLab) gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Elektropuls (1,8 kV) in einem *Micropulser* (Biorad), wobei die mittlere Entladungszeit etwa 5 msec betragen sollte. Nach der Elektroporation wurde zügig 1 mL YEP-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 28 °C und 1250 im *Thermomixer* (Eppendorf). Anschließend wurden 50 µL der Bakteriensuspension auf einer selektiven YEP-Platte ausgestrichen. Der Rest wurde pelletiert, in 50 µL YEP-Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer selektiven YEP-Platte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte für 2-4 Tage bei 28 °C.

**2.2.4.4 Dauerkulturen transformierter Bakterien**

Um Dauerkulturen von transformierten Bakterien zu erstellen, wurden 825 µL der entsprechenden Bakterien-Übernachtskultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 375 µL sterilem, 80%igem Glycerin gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen konnten anschließend bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

## 2.2.5 Herstellung transgener Pflanzen

### 2.2.5.1 Agrobakterium-vermittelte transiente Transformation von *A. thaliana*

Zur transienten Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurden die entsprechenden Keimlinge für 4 Tage auf ½ MS-Platten unter Langtagbedingungen angezogen. Von vorher transformierten hypervirulenten Agrobakterien (Stamm EHA105) wurde in 5 mL selektivem YEP-Medium eine Übernachtskultur angesetzt und am nächsten Morgen zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1s, 4.000 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 1 mL Infiltrationsmedium resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in 1 mL Infiltrationsmedium aufgenommen und eine 10x Verdünnung erstellt, bei der die OD<sub>600</sub> etwa 0,1 betragen sollte. Die *A. thaliana* Keimlinge wurden in 1500 µL Infiltrationsmedium + Agrobakteriensuspension gegeben und für 1-2 Stunden unter leichtem Schütteln bei 27 °C infiltriert. Anschließend wurden die Keimlinge auf ½ MS-Platten + 4 % Saccharose gelegt und für 3 Tage unter Langtagbedingungen angezogen. Die Infiltrationsanalyse erfolgte über den Anthocyan-Phänotyp der Keimlinge auf den MS-Platten.

### 2.2.5.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation durch „floral dipping“

Transgene *A. thaliana* Pflanzen wurden durch einen DNA-Transfer, der durch Agrobakterien vermittelt wurde, hergestellt (An *et al.*, 1986; Sprenger, 1997). Es wurde dabei die vom Ti-Plasmid abgeleiteten binären Vektoren pANGUS und pJAN verwendet, die sowohl in *E. coli*, als auch in *A. tumefaciens* vermehrt werden können. Die zu transformierenden Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* XL1-blue hergestellt und dann in *A. tumefaciens* (Stamm GV3101 pMP90RK) transformiert. Die Transformation der Konstrukte in *A. tumefaciens* wurde per PCR überprüft, wobei eine Bakterienkultur als Matrize verwendet wurde, mit der im weiteren Verlauf 5 mL selektives YEP-Medium inokuliert wurde. Diese Vorkultur wurde nach 4-5 Tagen Inkubationszeit bei 28 °C zum Animpfen einer 500 mL YEP Hauptkultur (mit entsprechenden Antibiotika) verwendet. Die Pflanzentransformation wurde nach dem Anwachsen der Hauptkultur für 2-3 Tage bei 28 °C und 180 rpm nach der „floral dipping“ Methode durchgeführt (Clough und Bent, 1998). Die zu transformierenden Pflanzen wurden dafür so angezogen, dass nach etwa 30 Tagen die Primärfloreszenzen abgeschnitten wurden und sich so zusätzliche Sekundärfloreszenzen bilden konnten. Die beschriebene 500 mL Hauptkultur, in der sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, wurde mit 5 % Saccharose und 0,02 % Silwet L-77 versetzt und in ein Becherglas überführt. Anschließend wurden die zu transformierenden Pflanzen mit den Blüten für etwa 45 sec in die Bakteriensuspension getaucht und danach in einem Plastikbeutel verpackt. Die Pflanzen

wurden über Nacht im Gewächshaus dunkel gelagert und am nächsten Tag entpackt. Die weitere Anzucht bis zur Samenreife erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen.

### 2.2.5.3 Selektion transgener T1-Pflanzen

Die Identifikation erfolgreicher Transformationsereignisse erfolgte über die T1-Samen, die auf selektive ½ MS-Platten ausgelegt und unter Langtagbedingungen kultiviert wurden. Dabei zeigten transgene Pflanzen eine normale Entwicklung, während nicht-transgene Pflanzen keine grüne Blattfärbung zeigten, klein blieben und abstarben. Die transgenen Pflanzen wurden auf Erde pikiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus weiter angezogen. Das Vorhandensein des Transgens wurde über PCR mit konstrukt-spezifischen Desoxyoligonukleotiden und DNA aus T1-Pflanzenmaterial überprüft.

### 2.2.6 At7-Zellkultur

Die At7-Zellsuspensionskultur wurde verwendet, um Protein/Promoterwechselwirkungen genauer zu untersuchen (Trezza *et al.*, 1993; Mehrrens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007). Das Prinzip dieser ursprünglich aus Hypokotyl-Zellen stammenden Kultur beruht auf der Kotransfektion mehrerer unterschiedlicher Konstrukte in Protoplastenzellen. Ein DNA-Bindeprotein, was durch ein Effektor-konstrukt kodiert wird, kann dabei an den Zielpromoter-Bereich in einem Reporter-konstrukt binden, was zur Expression des *uidA*-ORF führen kann, das im Promoter-konstrukt liegt. Die derartig hervorgerufene Aktivität des Reportergens kann anschließend fluorimetrisch bestimmt werden. Da oftmals unterschiedliche Transfektionseffizienzen auftreten, wurde zur Berechnung des Korrekturfaktors zusätzlich ein Kontrollplasmid (pBT10::Pro<sub>Ubi</sub>:*LUCm3*; MS129) kotransfiziert, das ein Luziferase-Reporter-gen unter der Kontrolle eines Ubiquitinpromoters enthält. Durch luminometrische Messung der Luziferaseaktivität kann so die unterschiedliche Transfektionseffizienz mathematisch korrigiert werden. Weiterhin wurde ein Auffüllplasmid verwendet (pBT::Δ: *LUCm3*; MS47), was dazu dient, in jedem Ansatz die gleiche Menge an DNA zu transfizieren. Die DNA für die Transfektionsexperimente wurde im *E. coli* Bakterienstamm K12 ER2925 hergestellt und war daher Dam- und Dcm-methylierungs-negativ.

#### 2.2.6.1 Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur erfolgte wie bei Trezza *et al.* (1993) beschrieben. Die Zellen wurden im Dunkeln bei 26 °C bei 105 rpm (Infors) in 40 mL MS-Medium in Erlenmeyerkolben inkubiert. Einmal wöchentlich wurden 3 g einer Zelllinie mit einem Sieblöffel in frisches Medium überführt.

### 2.2.6.2 Vorbereitung der Transfektions-DNAs

Die bei einer Transfektion verwendeten DNAs wurden grundsätzlich nach dem gleichen Schema pipettiert, wobei ein Ansatz 10 µg Reporterplasmid, 0-3 Effektorplasmide (je 1 µg), 5 µg Kontrollplasmid (pBT10::Pro<sub>Ubi</sub>:LUCm3; MS129) und Auffüllplasmid (pBT::Δ: LUCm3; MS47) bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 25 µg enthielt. Das Volumen der zu transfizierenden DNA-Lösung wurde mit Wasser auf 50 µL aufgefüllt. In jedem Transfektionsexperiment wurde weiterhin eine Positivkontrolle mitgeführt, die als Reporterplasmid das konstitutiv GUS-exprimierende Plasmid pBT4::Pro<sub>35S</sub>:GUS (MS275) und keinen Effektor enthielt. Als Negativkontrolle diente das pBT::Δ:GUS-Plasmid (MS156), ebenfalls ohne Effektor.

### 2.2.6.3 Gewinnung von At7-Protoplasten

modifiziert nach Dangl *et al.* (1987)

Zur Gewinnung von Protoplasten aus der At7-Zellkultur wurden 40 mL einer 5 Tage alten Kultur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 rpm, 5 min, Raumtemperatur, Beschleunigung 3, Bremse 5). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 mL 240 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet bis zu einem Gesamtvolumen von 40 mL in steriler Enzymlösung (enthält Zellulase und Mazerozym) aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die 40 mL auf zwei Petrischalen (Durchmesser 14,5 cm), die je 10 mL Enzymlösung enthielten, aufgeteilt. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 26 °C und 20 rpm im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Schalen für 30 min bei 26 °C und 50 rpm geschüttelt und die Suspension in 50 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (Heraeus Multifuge 1s, 1300 rpm, 6 min, Raumtemperatur) wurden die Pellets mit 25 mL 240 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend in jeweils 5,5 mL B5-Medium resuspendiert. Je zwei Ansätze wurden in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereinigt und die überlebenden Protoplasten durch Zentrifugation (800 rpm, 6 min) flotiert. Lebende Protoplasten wurden mit einer weitlumigen Pipette abgenommen und in einem Gesamtvolumen von 14,5 mL wie vorher erneut flotiert. Die überlebenden Protoplasten wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurz invertiert. Die so erhaltenen Protoplasten konnten direkt für die Transfektion eingesetzt werden.

### 2.2.6.4 Transfektion von At7-Protoplasten

modifiziert nach Krens *et al.* (1982), Hain *et al.* (1985) und Lipphardt *et al.* (1988)

Die Aufnahme von DNA durch die Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. Dazu wurden je 200 µL Protoplastensuspension in 10 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und zu den Ansätzen die vorbereitete Transfektions-DNA gegeben und mit 200 µL PEG-Lösung gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz 5 mL 275 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-

Lösung gegeben um die Aufnahme der DNA abzustoppen und die Zellen anschließend pelletiert (Heraeus Multifuge 1s, 800 rpm, 8 min, Raumtemperatur). Danach wurden die Zellen in jeweils 7 mL B5-Medium aufgenommen und bei 26 °C für 20 h im Dunkeln inkubiert.

#### **2.2.6.5 Ernte von transfizierten Protoplasten**

Zur Ernte der Protoplasten wurde die Zellsuspension nach der Inkubation in jeweils 25 mL vorgekühlte 240 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R, 1.200 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von etwa 1 mL abgenommen und die im restlichen Überstand verbliebenen Protoplasten resuspendiert. Die Protoplastensuspension wurde anschließend mit „Cell Saver“-Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 4 °C). Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

#### **2.2.6.6 Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten**

Zur Extraktion der Proteine, die in den transfizierten Protoplasten enthalten sind, wurden die Protoplasten-Pellets zuerst auf Eis aufgetaut und dann in 750 µL Luziferase-Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 sec bei maximaler Drehzahl durch Vortexen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 13.200 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und der Überstand für die Proteinbestimmung nach Bradford, die Bestimmung der Luziferase-Aktivität und die Bestimmung der Glukuronidase-Aktivität benutzt.

#### **2.2.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

modifiziert nach Bradford (1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Extrakten wurden 10 µL des Extraktes mit 200 µL einer 1:5 mit Wasser verdünnten „*Proteinassay-Reagenz*“ (BioRad) in einer transparenten Mikrotiterplatte gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde über die Absorption des resultierenden Protein-Coomassie-Brilliant-Blau-Konjugats bei 595 nm ermittelt, die in einem Fluorimeter (Fluostar Optima) gemessen wurde. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe mit bekannten definierten Proteinkonzentrationen.

### 2.2.6.8 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

modifiziert nach Wood (1991)

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 10 µL des Protoplastenextraktes mit 100 µL Luziferase-Substratlösung gemischt und unmittelbar in einem Luminometer (Bioscan, MiniLum) gemessen. Dabei wurde die Summe der während eines Zeitintervalls von 10 sec emittierten Photonen (RLU = *relative light units*) ermittelt.

### 2.2.6.9 Bestimmung der β-Glukuronidase-Aktivität

modifiziert nach Jefferson *et al.* (1986)

Zur Bestimmung der β-Glukuronidase-Aktivität wurde die Umsetzung von 4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid (4-MUG) in das fluoreszierende Produkt 4-Methyl-Umbelliferon (4-MU) gemessen. Dazu wurden zu 100 µL Protoplastenextrakt in einer schwarzen Mikrotiterplatte 100 µL 4-MUG-Substratlösung gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. In Intervallen von 20 min wurde die Fluoreszenz des 4-MU nach Anregung bei 366 nm bei einer Wellenlänge von 455 nm gemessen (BMG Labtech, Fluostar Optima). Die umgesetzten Stoffmengen konnten durch einen Abgleich mit einer 4-MU Eichreihe in GUS-Puffer, die unter gleichen Bedingungen mitgeführt wurde, ermittelt werden.

### 2.2.6.10 Berechnung von Reporterogenaktivitäten

Für die Berechnung der Reporterogenaktivitäten wurde zunächst der Proteingehalt pro µL Protoplastenextrakt unter Annahme eines linearen Konzentrations-Absorptionsverhältnis durch den Vergleich mit der BSA-Eichreihe bestimmt. Die während der Bestimmung der Luziferase-Aktivität emittierten Photonen wurden dann zur Proteinmenge im Extrakt in Bezug gesetzt und die spezifische Luziferase-Aktivität  $LUC_i$  in  $RLU \mu g^{-1} sec^{-1}$  angegeben. Die spezifische β-Glukuronidase-Aktivität  $GUS_i$ , die in  $pmol mg^{-1} min^{-1}$  angegeben wird, wurde gemäß folgender Formel ermittelt:

$$GUS = \left( \frac{\Delta A_{460nm} - b}{a} \cdot \frac{1}{100} \right) \cdot \left( \frac{1}{20 \text{ min}} \right) \cdot \left( \frac{1}{\mu g \text{ Protein}} \cdot 1000 \right)$$

Dabei ist  $\Delta A_{460}$  der Mittelwert der Fluoreszenzänderung von Minute 20 bis 40 und von Minute 40 bis zur Messung der GUS-Aktivität nach 60 min, die vom Substratumsatz abhängt. Weiterhin ist  $m$  die Steigung und  $b$  ist der Ordiantenabschnitt der 4-MU Eichreihe (Fluoreszenzwerte auf der Ordinate, pmol 4-MU auf der Abszisse).

Um den unterschiedlichen Transfektionseffizienzen, Zellzahlen und weiteren nicht genau bestimmbareren Bedingungen Rechnung zu tragen, wurde für jede einzelne Messung der

Korrekturfaktor  $F_i$  ermittelt, der sich aus Luziferase-Aktivitäten der entsprechenden Proben berechnet. Die Berechnung des Korrekturfaktors wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$F_i = \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum LUC_i}{LUC_i}$$

Dabei entspricht  $n$  der Summe aller Transfektionen und  $LUC_i$  sind die jeweiligen spezifischen Luziferase-Aktivitäten, die in die Auswertung einfließen.

Aus der spezifischen  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität  $GUS_i$  erhält man durch Multiplikation mit dem jeweiligen Korrekturfaktor  $F_i$  die spezifische korrigierte GUS-Aktivität  $GUS_{ki}$ :

$$GUS_{ki} = F_i \cdot GUS_i$$

Da es sich bei den in dieser Arbeit ermittelten Werten um Werte aus acht unabhängigen Protoplastentransfektionen handelt, wurde als spezifische korrigierte GUS-Aktivität  $GUS'$  der Mittelwert der  $GUS_{ki}$ -Werte berechnet, wobei der jeweils höchste und niedrigste Wert nicht in die Berechnung eingeflossen ist:

$$GUS' = \frac{1}{n} \cdot \sum GUS_{ki}$$

Dabei ist  $n$  die Anzahl der in die Berechnung einfließenden Einzelwerte. Die Fehlerbalken in den Ergebnisdiagrammen entsprechen dem mittleren Fehler des Mittelwertes (Standardabweichung).

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Regulatoren der Flavonoid-Biosynthese im Kulturapfel *Malus x domestica* isoliert und näher charakterisiert. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf drei verschiedenen R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren als putative Regulatoren der sogenannten späten Gene der Flavonoidbiosynthese. Ein weiterer Transkriptionsfaktor von Interesse war das WD-Repeat-Protein TTG1, welches vor allem als stabilisierender Faktor im ternären Aktivationskomplex mehrerer Strukturgene der Flavonoid-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt und zudem für zahlreiche andere Stoffwechselfvorgänge wie Trichom- und Wurzelhaarausbildung notwendig ist. Ebenfalls untersucht wurde die Korrelation von Expression verschiedener Strukturgene im Flavonoid-Stoffwechselweg, der Aktivität der entsprechenden Enzyme und der Akkumulation der korrespondierenden Stoffwechselprodukte in der Apfelfrucht.

#### 3.1 ***MdMYB9, 10 und 11, drei putative Transkriptionsfaktoren in *Malus x domestica****

In *A. thaliana* sind die zwei R2R3-MYB-Proteine MYB123 (TT2) und MYB75 (PAP1) spezifische Regulatoren für zwei Teilbereiche der Flavonoid-Biosynthese. MYB123 reguliert zusammen mit BHLH42 und TTG1 die *BAN*-Expression und somit den Proanthocyanidin-spezifischen Bereich des Stoffwechselwegs, aber auch die beiden „späten“ Gene *DFR* und *LDOX* spezifisch in der Samenschale. MYB75 steuert ebenfalls in Kombination mit einem bHLH- und WD-Repeat-Faktor die Expression von *DFR* in Keimlingen und adulten Pflanzen und ist damit wesentlicher Regulator für die Synthese von Anthocyanen (siehe Abschnitt 1.1.2).

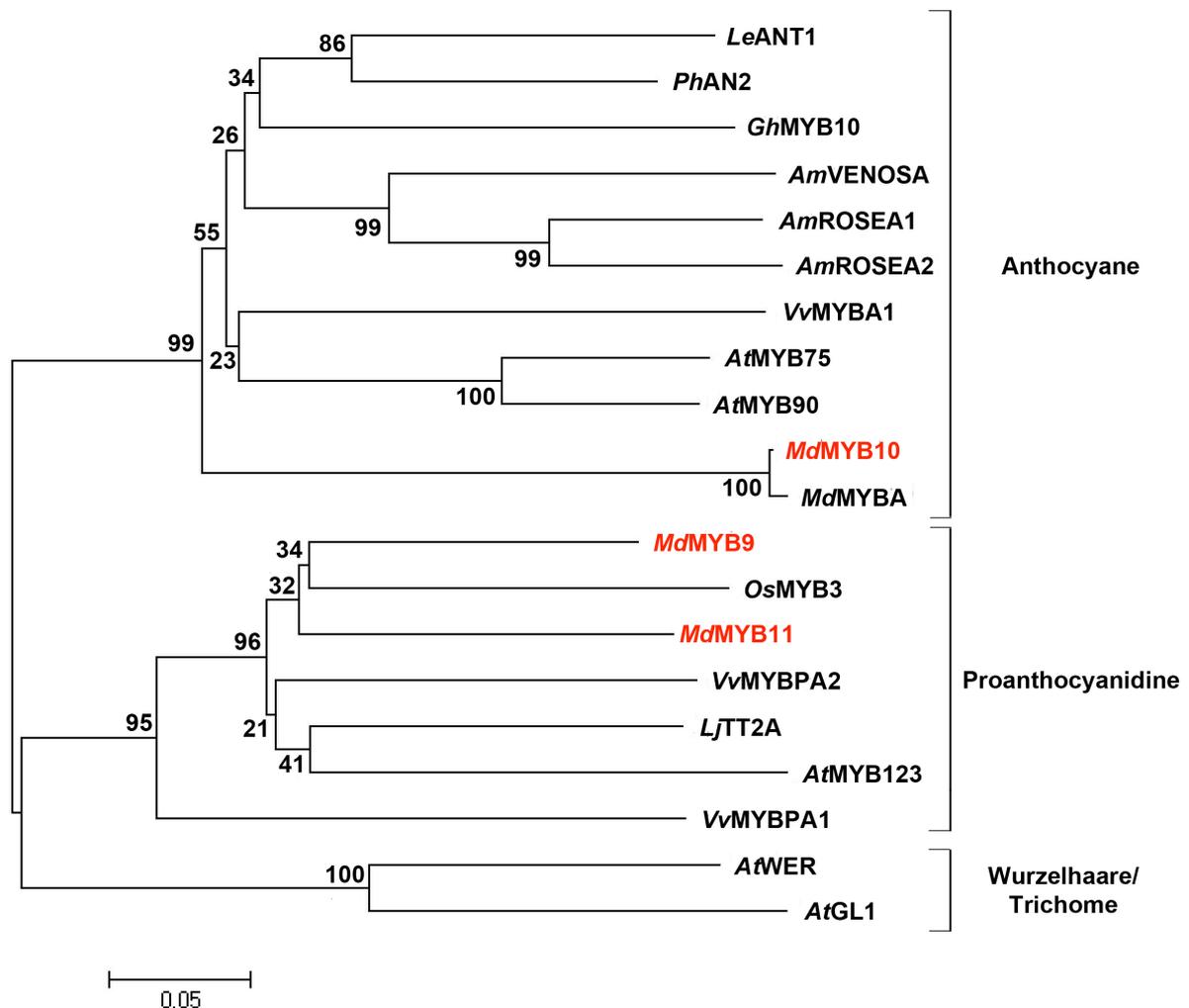
Zur genaueren Untersuchung des Flavonoid-Stoffwechselwegs in *M. domestica* wurden daher zunächst putative Homologe von *MYB123* und *75* aus Fruchtmaterial isoliert und dann funktioniell näher charakterisiert. Desoxyoligonukleotide zur Isolierung wurden dabei auf Grundlage von Sequenzen entwickelt, die freundlicherweise von Roger Hellens (HortResearch, NZL) zur Verfügung gestellt wurden.

##### 3.1.1 **Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft von *MdMYB9, 10 und 11* zu bekannten R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren**

Zur Isolierung putativer homologer R2R3-MYB-Sequenzen wurde nach der Extraktion von RNA aus Fruchtmaterial (drei Wochen nach voller Blüte) des Kultivars Rewena mittels RT-PCR cDNA gewonnen, aus der dann drei verschiedene Sequenzen isoliert wurden, die

analog zu den HortResearch-Sequenzen als *MdMYB9*, 10 und 11 bezeichnet wurden. Dabei ergaben sich Sequenzlängen von 732 Bp für *MdMYB10*, sowie von 873 Bp für *MdMYB9* und 861 Bp für *MdMYB11*.

Phylogenetische Untersuchungen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten, daß *MdMYB10* mit bekannten R2R3-MYB-Proteinen aus verschiedenen Organismen gruppierte, von denen eine Funktion in der Kontrolle der Anthocyan-Biosynthese bekannt ist, während *MdMYB9* und 11 phylogenetische Verwandtschaft zu bekannten Proanthocyanidin-Regulatoren zeigten (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener R2R2-MYB-Regulatoren aus der Flavonoid-Biosynthese verschiedener Pflanzenarten.**

Die Aminosäuresequenzen wurden mit CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) abgeglichen, der dargestellte Baum wurde mit TREECON (van der Peer und De Wachter, 1994) mittels *neighbor-joining* Analyse und 100 *bootstrap* Wiederholungen konstruiert. Der Größenmaßstab zeigt Aminosäure-Austausche pro Position. Drei putative Regulatoren aus *M. x domestica* sind rot dargestellt.

*MdMYB10* zeigte dabei insbesondere eine nahe Verwandtschaft zu *MdMYBA*, von dem eine regulatorische Funktion in der Anthocyan-Biosynthese in der Fruchtschale bekannt ist und dessen Expression durch UV-Bestrahlung induziert werden kann (Ban *et al.*, 2007).

Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten cDNAs mit diesen phylogenetisch nahe gruppierenden MYB-Proteinen zeigten vor allem für *MdMYB10* hohe Identität der Aminosäuren mit 99.6% Übereinstimmung zu *MdMYBA* und mehr als 75% bei *AtMYB75* (PAP1). *PhAN2* und *AtMYB90* (PAP2) zeigten zwischen 65 und 70% identische Aminosäuren. Etwas geringer war die Ähnlichkeit zu *AmVENOSA* und *VvMYBA1* mit etwa 55% Identität der Aminosäuren.

Deutlich geringere Übereinstimmung mit möglichen Homologen wiesen die beiden anderen isolierten MYB-Faktoren *MdMYB9* und 11 auf. Insgesamt zeigte *MdMYB9* in sämtlichen Vergleichen größere Identität und auch Ähnlichkeit als *MdMYB11*. Beide Sequenzen wiesen die größte Ähnlichkeit zu *LjTT2A*, einem Proanthocyanidin-Regulator aus dem Hornklee (Yoshida *et al.*, 2008) mit etwa 52% Übereinstimmung auf. *AtMYB123* (TT2) und *VvMYBPA1* zeigten mit 49% Identität zu *MdMYB9* eine etwas höhere Ähnlichkeit als zu *MdMYB11* mit etwa 41%, während *VvMYBPA2* und *OsMYB3* mit 49 bzw. 43% zu beiden Apfelsequenzen vergleichbare Übereinstimmungen aufwiesen.

### 3.1.2 Sequenzvergleiche der isolierten Apfelsequenzen mit putativen Homologen

Für weitere Analysen der isolierten Sequenzen wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen mit denen der phylogenetisch ähnlichsten Proteine abgeglichen (Abbildung 3.2 und 3.3). Alle drei Apfelsequenzen wiesen dabei im N-terminalen Bereich die höchste Übereinstimmung mit putativen Homologen auf. Weiterhin zeigten sie ebenfalls wie die Vergleichsequenzen die beiden typischen R2R3-MYB-Wiederholungen mit einer Länge von etwa 50 Aminosäuren und innerhalb der zweiten MYB-Wiederholung die von Zimmermann *et al.* (2004) beschriebene und für die Interaktion mit bHLH-Kofaktoren notwendige Domäne mit dem Muster ([DE]Lx<sub>2</sub>[RK]x<sub>3</sub>Lx<sub>6</sub>Lx<sub>3</sub>R).

<i>MdMYB10</i>	MEGYNENLSV	RKGA	WTREEDN	LLRQ	CV	IEH	GEGK	WNV	QSYK	AGLN	RCRK	SC	RQ	RWL	NLYL	KPN	62						
<i>AmVENOSA</i>	MG--	NNPLG	VVRK	GI	WT	KEE	DILL	KQ	CI	EKY	GEGK	WH	OV	PI	RAGL	NRCR	KSCR	MR	RWL	NLYL	SPN	60	
<i>VvMYBA1</i>	----	MESL	GVRK	GA	WI	QEE	DV	LL	RK	CI	EKY	GEGK	WH	LV	PL	RAGL	NRCR	KSCR	LR	RWL	NLYL	KPD	58
<i>AtPAP1</i>	ME--	GSSK	GLRK	GA	WT	TEED	SLL	RQ	CI	INKY	GEGK	WH	QV	PV	RAGL	NRCR	KSCR	LR	RWL	NLYL	KPS	60	
<i>AtPAP2</i>	ME--	GSSK	GLRK	GA	WT	AEED	SLL	RQ	CI	DKY	GEGK	WH	QV	PL	RAGL	NRCR	KSCR	LR	RWL	NLYL	KPS	60	

<i>MdMYB10</i>	I	K	R	G	D	E	K	E	D	E	V	D	L	L	R	L	H	R	L	L	G	N	R	W	S	L	I	A	R	R	L	P	G	R	T	A	N	A	V	K	N	Y	W	N	-	T	R	L	R	I	D	S	R	M	K	T	-	V	K	N	K	122
<i>AmVENOSA</i>	I	K	R	G	S	F	T	R	D	E	V	D	L	I	V	R	L	H	K	L	L	G	N	R	W	S	L	I	A	G	R	L	P	G	R	T	G	N	D	V	K	N	F	W	N	-	T	H	F	E	K	---	K	S	G	E	R	E	N	T	118	
<i>VvMYBA1</i>	I	K	R	G	E	F	A	L	D	E	V	D	L	M	T	R	L	H	N	L	L	G	N	R	W	S	L	I	A	G	R	L	P	G	R	T	A	N	D	V	K	N	Y	W	H	S	H	F	K	E	V	Q	F	Q	E	E	G	R	D	K	120	
<i>AtPAP1</i>	I	K	R	G	K	L	S	S	D	E	V	D	L	L	R	L	H	R	L	L	G	N	R	W	S	L	I	A	G	R	L	P	G	R	T	A	N	D	V	K	N	Y	W	N	-	T	H	L	S	K	K	H	E	P	-	C	C	K	I	K	M	120
<i>AtPAP2</i>	I	K	R	G	L	S	N	D	E	V	D	L	L	R	L	H	K	L	L	G	N	R	W	S	L	I	A	G	R	L	P	G	R	T	A	N	D	V	K	N	Y	W	N	-	T	H	L	S	K	K	H	E	S	S	C	C	K	S	K	M	121	

<i>Md</i> MYB10	SQE-----MRK----TNVIRPQPQKFN-RSSYYLSSREPILGHIQSAEDLSTPPQTSSTKN	173
<i>Am</i> VENOSA	ENI-----NPKLINSSNI IKPQPRTEL-KLR---PKETKKQKNIRNVCTA-----NDDKQQ	165
<i>Vv</i> MYBA1	PQT-----HSK----TKAIKPHPHKFS-KALPRFELKTAVDTFDTQVSTSRKPSSTSPQPN	162
<i>At</i> PAP1	KKRDITPIPTTPALKNNVYKPRPRSEFTVNNDNHLNAPPKVDVNPCLGLNINNVCDNSIY	182
<i>At</i> PAP2	KKKNIISPPTTPVQKIGVFKPRRSESVNNGCSHLNGLPEVDLIP SCLGLKKNV CENSITC	183

<i>Md</i> MYB10	G-NDWWTLE--GEDTFERAAYPSIELEELFTSFWFDDRLSPR--SCANFPEGQ--GRSE	229
<i>Am</i> VENOSA	PLS--TSGQLE--EVNERIRWSELLEDFADYVD-----	194
<i>Vv</i> MYBA1	DDIIWWESLLA--EHAQMDQETDFSAS-GEMLIASLRTEETATQKKGPMDGMIEQIQGGEGD	231
<i>At</i> PAP1	NKDKKKDQLVN-NLIDGDNMWLEKFLEESQEV DILVPEATTTEKG----DTLAFDQDLWLSL	239
<i>At</i> PAP2	NKDEKDDFVN-NLMNGDNMWLENLLGENQEADAI VPEATTAEHG----ATLAFDVEQLWLSL	240

<i>Md</i> MYB10	FSFSTDLWNHSKEE-----	243
<i>Am</i> VENOSA	-----	
<i>Vv</i> MYBA1	FPPDVGFWDT PNTQVNHLI	250
<i>At</i> PAP1	FDGETVKFD-----	248
<i>At</i> PAP2	FDGETVELD-----	249

**Abbildung 3.2: Sequenzvergleich ausgewählter regulatorischer R2R3-MYB-Proteine in der Anthocyanbiosynthese.**

Die Aminosäuresequenz von *Md*MYB10 wurde mit *A. majus* VENOSA, *V. vinifera* MYBA1, *A. thaliana* MYB75 (PAP1) und *A. thaliana* MYB90 (PAP2) verglichen. Graue Markierungen zeigen chemisch konservierte Aminosäuren, schwarze identische Aminosäuren. Die bHLH-Interaktionsdomäne ist durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet, ein roter Rahmen zeigt eine mögliches konserviertes Motiv von Anthocyan-Regulatoren.

Zusätzlich zeigte die Sequenz von *Md*MYB10 das von Stracke *et al.* (2001) für Anthocyan-Regulatoren postulierte Motiv [K/R]PRPR[S/K]F. Ein weiteres Motiv für Proanthocyanidin-Regulatoren konnte bei *Md*MYB9 und 11 hingegen nicht identifiziert werden.

<i>Md</i> MYB9	MGRSPCCSK--EGLNRGAWTAL EDKILSSYTKAHGEGKWRSLPKRAGLKR CGKSCRLRWL	58
<i>Md</i> MYB11	MGRSPCCSKD-EGLNRGAWTAMEDKVLTEYIGNHGEGKWRNLPKRAGLKR CGKSCRLRWL	59
<i>At</i> TT2	MGRKATTSVRREELNRGAWTDHEDKILRDYITTHGEGKWSLTPNQAGLKR CGKSCRLRWK	60
<i>Os</i> MYB3	MGRKPCCSK--EGLNRGAWTAMEDDILVSYIAKHGEGKWGALPKRAGLKR CGKSCRLRWL	58
<i>Vv</i> MYBPA1	MGRAPCCSK--VGLHRGSWTAREDTLLTKYIQAHGEGHWRS LPKKAGLLRCGKSCRLRW	58

<i>Md</i> MYB9	NYLRPDIKRGNISGDEEELIIVRLHNLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLGKKSKV	118
<i>Md</i> MYB11	NYLRPDIKRGNITRDEEELIIVRLHKLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLGKRIQV	119
<i>At</i> TT2	NYLRPGIKRGNISSDEEELIIVRLHNLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNHWNSTLKRKR---	117
<i>Os</i> MYB3	NYLRPGIKRGNISGDEEELIIVRLHLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTLTKRVAM	118
<i>Vv</i> MYBPA1	NYLRPDIKRGNITPDEDDLIIVRLHSLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTLHLSKRLRS	118

<i>Md</i> MYB9	DS-----FSGSSKETS LNPKCSIAKKKDVESKTSTAAA---QPLVIRTKATRLTKILV	168
<i>Md</i> MYB11	E-----GRSCSDGNRRPTQEKPKPT-LSPKPSTNIS---CTKVVRTKASRCTKVVL	166
<i>At</i> TT2	-----LPKTQTKQPKRIKHSTNNENNVC-----VIRTKAIRCSKTL	154
<i>Os</i> MYB3	QRTAAATSM PAAATTSSNADAAGAAARRR-RSPEPRTVVVSPIRTKALRCNNNSSSGIVV	177
<i>Vv</i> MYBPA1	Q-----GTDPNTHKKMTEPPEPKRRKNTRTRTNNGGGSKRVKISKDQENSNHKVHL	169

```

MdMYB9      PQN-----IPSDENYTA AAAANPLELQTSAEKGGSTEEFPRTNAGDCSNILKNFGCDDDD 223
MdMYB11     PHESQKFGYSTEQVVNAAP--TLNQAVNNPMVGI DEPLLPM SFLDDENNNSC-EFLVDFK 223
AtTT2       FSD-----LSLQKKSSTSP LPLKEQEMDQGGSSLMGDLEFDFDRIHSE 197
OsMYB3      VQQAGACSHGGRPPESGAPGDAADKVATPQAVQQQQQELAGAEDDDDL PVPVCIDL D 237
VvMYBPA1    PKP-----VRVTSLSI MSRNNSFESNTVSGGSGSSSGNGETLPWPSFR-D 214

MdMYB9      IDAK--GDQYCNEFQLLNSI PLDEAMINDGCWT---GGNGCDLEEDYG-----ASLDLDSL 273
MdMYB11     MDENFLSDFLNVD FSVLYNN-EGAGKAAAAAATT---EDTSNKLEHGP----DLRSSKAPII 275
AtTT2       FHFPDLMDFDGLDCGNVTS LVSSNEILGELVPA----QGNLDLNRP-----FTSC 243
OsMYB3      LDDIELGGLDGFLIS PWRGGHDDGNAAGAVPNLPMPIGYKLEGGAGGGGEAGAVDLEAL 297
VvMYBPA1    IRDDKVI GVDGVDFFIGDDQGD LVASSDPESQSHMPPTDNSLEKLY-----EEYLQL 267

MdMYB9      AFLLDSEEWPSQENVVV----- 290
MdMYB11     ESELD CWLVDN----- 286
AtTT2       HHRGDDEDWLRDFTC----- 258
OsMYB3      LGQLEAEEDDDGDH HHHHHHHHHHQ 321
VvMYBPA1    LEREDTQVQLDSFAESLLI----- 286

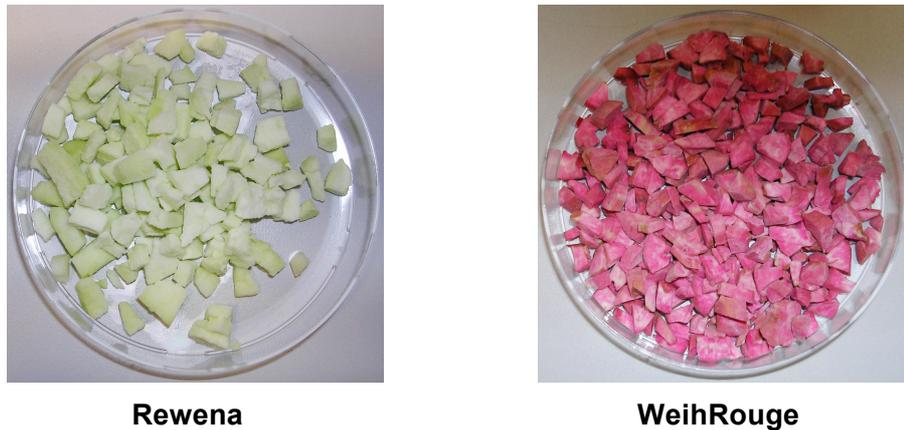
```

### Abbildung 3.3: Vergleich der Aminosäuresequenz ausgewählter R2R3-MYB-Regulatoren in der Proanthocyanidinbiosynthese.

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen von *MdMYB9* und 11 wurden mit *O. sativa* MYB3, *A. thaliana* MYB123 (TT2) und *V. vinifera* MYBPA1 verglichen. Graue Markierungen zeigen chemisch konservierte Aminosäuren, schwarze identische Aminosäuren. Die Position der bHLH-Interaktionsdomäne ist schwarz markiert.

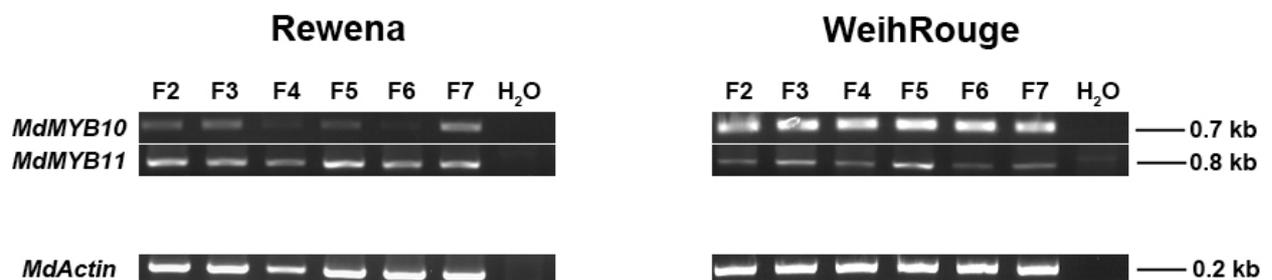
#### 3.1.3 Bestimmung der Expression der putativen Regulatoren sowie verschiedener Strukturgene in unterschiedlichen Fruchtgewebestadien

Proanthocyanidine akkumulieren im Apfel vor allem im Fruchtfleisch und in der Fruchtschale in einem Zeitraum bis etwa 40 Tage nach voller Blüte (Renard *et al.*, 2007). Anthocyane finden sich dagegen nur in rotgefärbten Teilen der Apfelfrucht (Espley *et al.*, 2007). Zur näheren Bestimmung der isolierten Sequenzen als mögliche Regulatoren der Flavonoid-Biosynthese insbesondere im Bereich des Anthocyan- und Proanthocyanidin-spezifischen Teil des Stoffwechselwegs wurde die Genaktivität in verschiedenen Frucht-Entwicklungsstadien im Bereich von zwei bis sieben Wochen nach voller Blüte mittels RT-PCR bestimmt. Da in weißem Fruchtfleisch praktisch keine Anthocyane zu finden sind, wurde neben dem Kultivar Rewena zusätzlich Fruchtmaterial der Varietät WeihRouge verwendet, die rotgefärbtes Fruchtfleisch aufweist (Abbildung 3.4). Zunächst wurde etwa 1 µg RNA mit Hilfe eines oligo-dT-Primers in komplementäre DANN (cDNA) umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Zur Überprüfung der Einheitlichkeit der eingesetzten Matrizen-cDNA-Mengen wurde zusätzlich eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die spezifisch für das konstitutiv exprimierte Gen *MdActin* waren.



**Abbildung 3.4: Fruchtmaterial der beiden Kultivare Rewena und WeihRouge, 4 Wochen nach voller Blüte**

Sowohl im Fruchtfleisch von Rewena, als auch von WeihRouge konnte eine Expression von *MdMYB11* nachgewiesen werden, die in Rewena im Vergleich zu WeihRouge leicht erhöht ist. Die Expression von *MdMYB10* ist in WeihRouge deutlich zu erkennen, wohingegen in Rewena nur geringe Mengen von Transkript detektierbar sind (Abbildung 3.5).



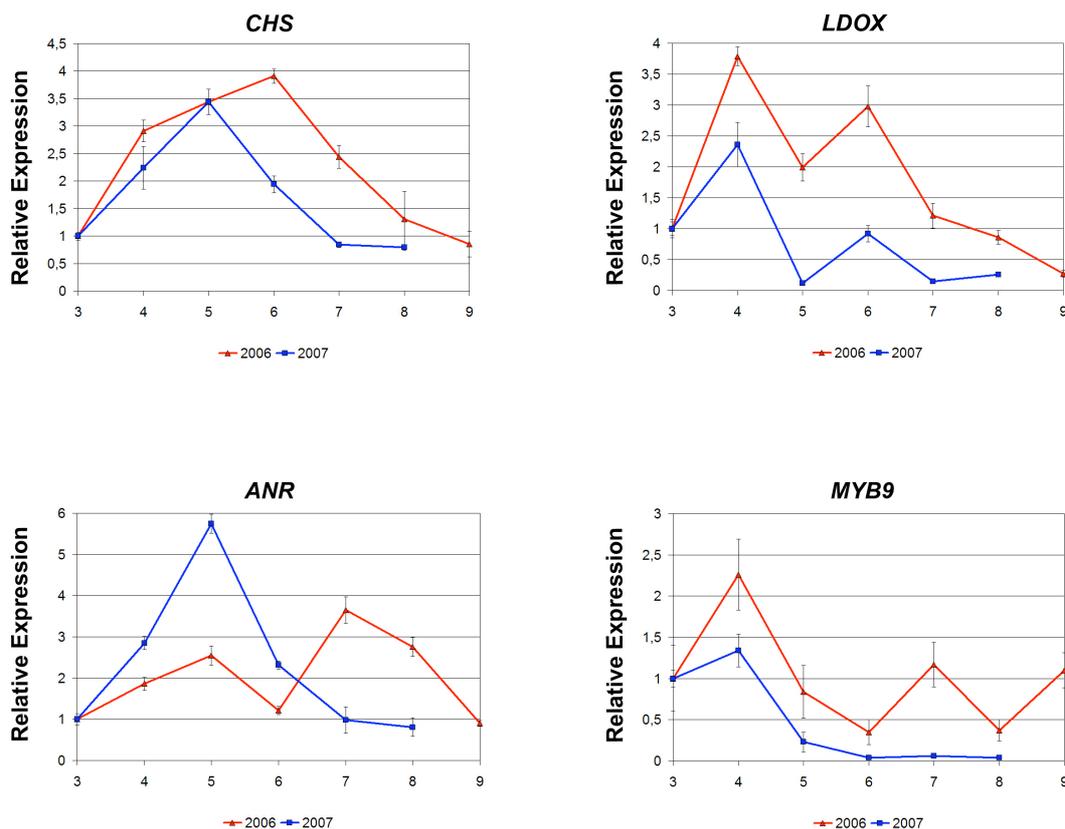
**Abbildung 3.5: Expression von *MdMYB10* und *MdMYB11* in verschiedenen Fruchtgewebestadien der Kultivare Rewena und Weihrouge.**

RT-PCR Analysen zeigen Expression zweier putativer R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren aus zwei verschiedenen *M. x domestica*-Kultivaren. Aktin dient als Positivkontrolle. F2-F7, Fruchtstadien 2-7 Wochen nach voller Blüte; H<sub>2</sub>O, Leerkontrolle. Größenmarkierung in Kilobasen.

Zusätzlich zur Untersuchung der Aktivität der beiden möglichen Regulatoren *MdMYB10* und *MdMYB11* wurde in Rewena die Aktivität der Strukturgene *CHS*, *LDOX* und *ANR* als in Frage kommende Ziele, sowie des dritten möglichen Regulators *MdMYB9* durch quantitative *real-time* PCR bestimmt. Dazu wurde Fruchtmaterial aus den Jahren 2006 und 2007 verwendet, um neben dem zeitlichen Verlauf der Expression während der Fruchtentwicklung auch feststellen zu können, ob dieser Verlauf in verschiedenen Jahren Unterschiede aufweist (Abbildung 3.6).

Die Expression der drei Strukturgene, als auch von *MdMYB9*, konnten in den verschiedenen Stadien aus beiden Jahren nachgewiesen werden, wobei die Expressionsmuster sämtlicher Gene in den beiden verschiedenen Jahren einen ähnlichen Verlauf aufwiesen. Insgesamt war die Expression in den frühen bis mittleren Stadien vier bis sechs Wochen nach voller Blüte am höchsten, während mit zunehmender Fruchtreife die Genaktivität deutlich abnahm. Die *LDOX* zeigte dabei in beiden untersuchten Jahren nach einem ersten Expressionsmaximum nach vier Wochen und einer verringerten Expression in der darauffolgenden Woche ein weiteres Maximum nach sechs Wochen. Die *CHS* wies die stärkste Genaktivität nach sechs (2006) bzw. fünf Wochen (2007) auf, im Falle der *ANR* war 2007 die Aktivität nach fünf Wochen am stärksten ausgeprägt. 2006 gab es ein zusätzliches Maximum sieben Wochen nach voller Blüte.

Auch die Expression von *MdMYB9* zeigte sowohl 2006 als auch 2007 vergleichbare Genaktivität mit einem Maximum nach vier Wochen. Ähnlich wie beim mögliche Zielgen *ANR* gab es 2006 ein zusätzlichen Aktivitätsanstieg sieben Wochen nach voller Blüte.



**Abbildung 3.6: Quantitative *real-time* Expressionsanalyse von *MdCHS*, *LDOX*, *ANR* und *MYB9* in verschieden altem Fruchtgewebe des Kultivars Rewena.**

Quantitative RT-PCR für drei verschiedene Strukturgene und einen putativen R2R3-MYB Proanthocyanidin-Regulator auf 3-8 (2007) bzw. 3-9 (2006) Wochen altem Fruchtgewebe des Kultivars Rewena aus den Jahren 2006 und 2007. Die relative Expression zu einem definiertem Zeitpunkt wurde mit der des ersten Fruchtstadiums des entsprechenden Jahres korreliert.

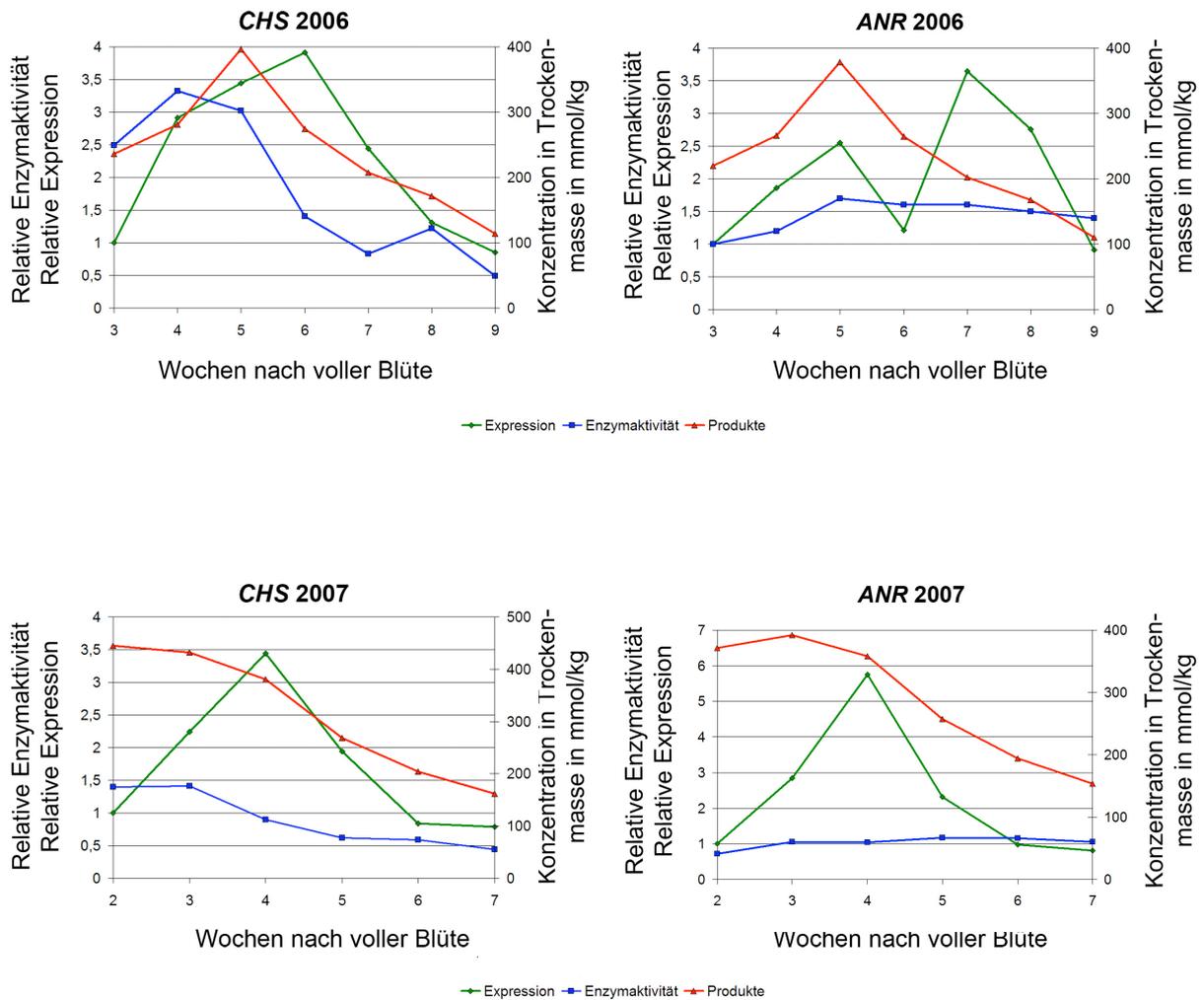
### **3.1.4 Untersuchungen zum Zusammenhang von Genexpression, Enzymaktivität und Akkumulation von Produkten in der Flavonoidbiosynthese in verschiedenen Fruchtgeweben von *M. x domestica***

Um die Biosynthese von Flavonoiden im Apfel im Hinblick auf den Zusammenhang von Genexpression, Aktivität der beteiligten Enzyme sowie der Akkumulation von Produkten zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung der Frucht genauer zu untersuchen, wurden die entsprechenden Stoffwechselforgänge einzeln für die beiden Strukturgene *CHS* und *ANR* in zwei verschiedenen Jahren (2006 und 2007) im Kultivar Rewena ermittelt, sowie für das Kultivar WeihRouge im Jahr 2007.

Die Ergebnisse der Studien zur Genexpression sind im Abschnitt 3.1.3 genauer beschrieben, während die Enzymaktivität von Judith Pfeiffer an der Technischen Universität München (Wissenschaftszentrum Weihenstephan) nach den Methoden von Schröder *et al.* (1988) für die *CHS* sowie Pfeiffer *et al.* (2006) für die *ANR* bestimmt wurde. Die Analyse der Produktakkumulation wurde von Sylvain Guyot am Institut de Recherche Agronomique (INRA) Rennes durchgeführt. Dafür wurden sämtliche gemessenen Flavanole, Flavonole sowie weitere Dihydrochalkone als *CHS*-Produkte definiert. Zu den Produkten der *ANR* gehörten dabei sämtliche (-)-Epicatechine, die in der Proanthocyanidin-Synthese als Erweiterungseinheiten dienten, sowie sämtliche freien (-)-Epicatechine, die als Intermediate auftraten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anschließend die Ergebnisse der verschiedenen Messungen miteinander korreliert um einen besseren Überblick über den Zusammenhang dieser Vorgänge zu erhalten.

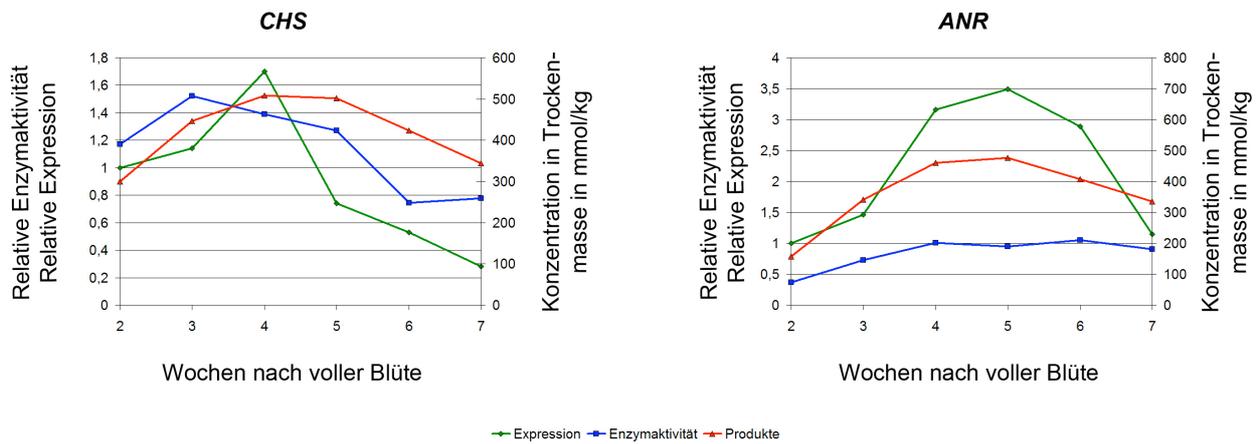
Es zeigte sich dabei, daß sowohl Expression, wie auch die Enzymaktivität und Produktakkumulation im Falle des Kultivars Rewena sowohl in beiden untersuchten Jahren, als auch für beide untersuchten Strukturgene/Enzyme einen ähnlichen Verlauf aufwiesen (Abbildung 3.17). In Fruchtmaterial des Jahres 2006 waren die Meßwerte sowohl für *CHS*, als auch für *ANR* vier bzw. fünf Wochen nach voller Blüte am höchsten und fielen dann kontinuierlich ab. Eine Ausnahme zeigte dabei jedoch die Expression der *ANR*, die 2006 ein zusätzliches Maximum nach sieben Wochen aufwies. Für die Fruchtstadien des Jahres 2007 waren die Werte bei beiden untersuchten Strukturgenen sehr ähnlich, hier waren Enzymaktivität und Produktakkumulation bei der *CHS* in den frühen Stadien am größten, während für bei den Messungen der *ANR* die Enzymaktivität in den verschiedenen Entwicklungsstadien kaum variierte. Die Expression der beiden Gene war jeweils vier Wochen nach voller Blüte am höchsten.



**Abbildung 3.7: Korrelation von Genexpression, Enzymaktivität und Produktakkumulation in verschieden altem Fruchtgewebe des Kultivars Rewena.**

Die Korrelation von Expression, korrespondierender Enzymaktivität und Akkumulation entsprechender Intermediärprodukte wurde für die Jahre 2006 und 2007 für zwei verschiedene Strukturgene in verschieden altem Fruchtgewebe des Kultivars Rewena durchgeführt. Die Expression wurde per quantitativer RT-PCR bestimmt, Enzymdaten stammen von J. Pfeiffer (TU München), die Analytik der Produkte wurde von S. Guyot (INRA Rennes) durchgeführt. *CHS*, Chalkonsynthase; *ANR*, Anthocyanidinreduktase.

Für die Messungen bei Fruchtstadien des Kultivars WeihRouge aus dem Jahr 2007 (Abbildung 3.18) ergab sich ein ähnliches Muster für die *CHS* mit hohen Werten in frühen Entwicklungsstadien bei Maxima nach etwa 4 Wochen nach voller Blüte. Die Werte für die *ANR* sind hingegen im Vergleich zur *CHS* zeitversetzt, hier sind Expression und Konzentration der Produkte fünf Wochen nach voller Blüte am höchsten, während die Enzymktivität der *ANR* nahezu in allen Stadien identische Werte zeigte.



### Abbildung 3.8: Korrelation von Expression, Enzymaktivität und Produktakkumulation in verschieden altem Fruchtgewebe des Kultivars WeihRouge.

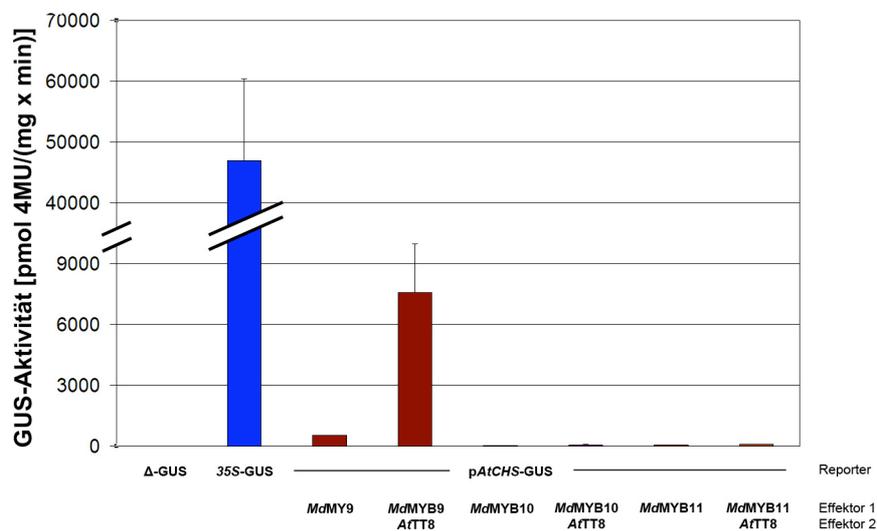
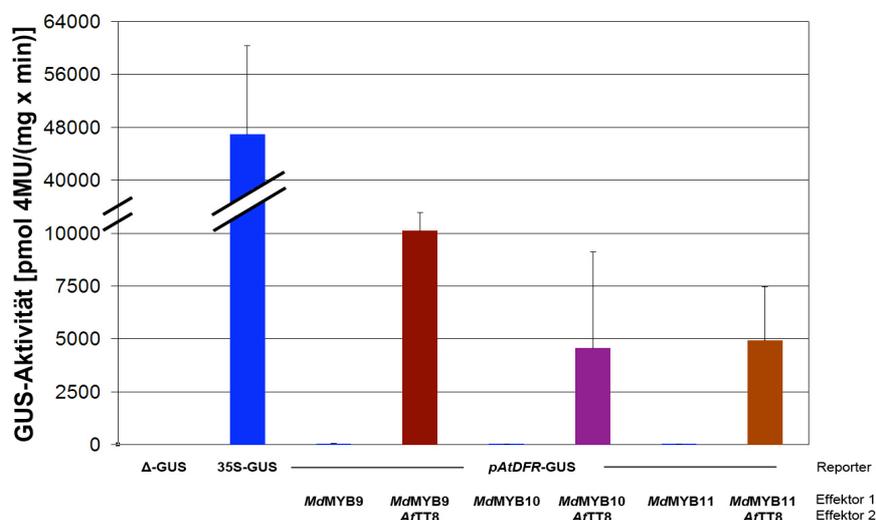
Die Korrelation von Expression, korrespondierender Enzymaktivität und Akkumulation entsprechender Intermediärprodukte wurde für zwei verschiedene Strukturgene in verschieden altem Fruchtgewebe des Kultivars WeihRouge durchgeführt. Die Expression wurde per quantitativer RT-PCR bestimmt, Enzymdaten stammen von J. Pfeiffer (TU München), die Analytik der Produkte wurde von S. Guyot (INRA Rennes) durchgeführt.

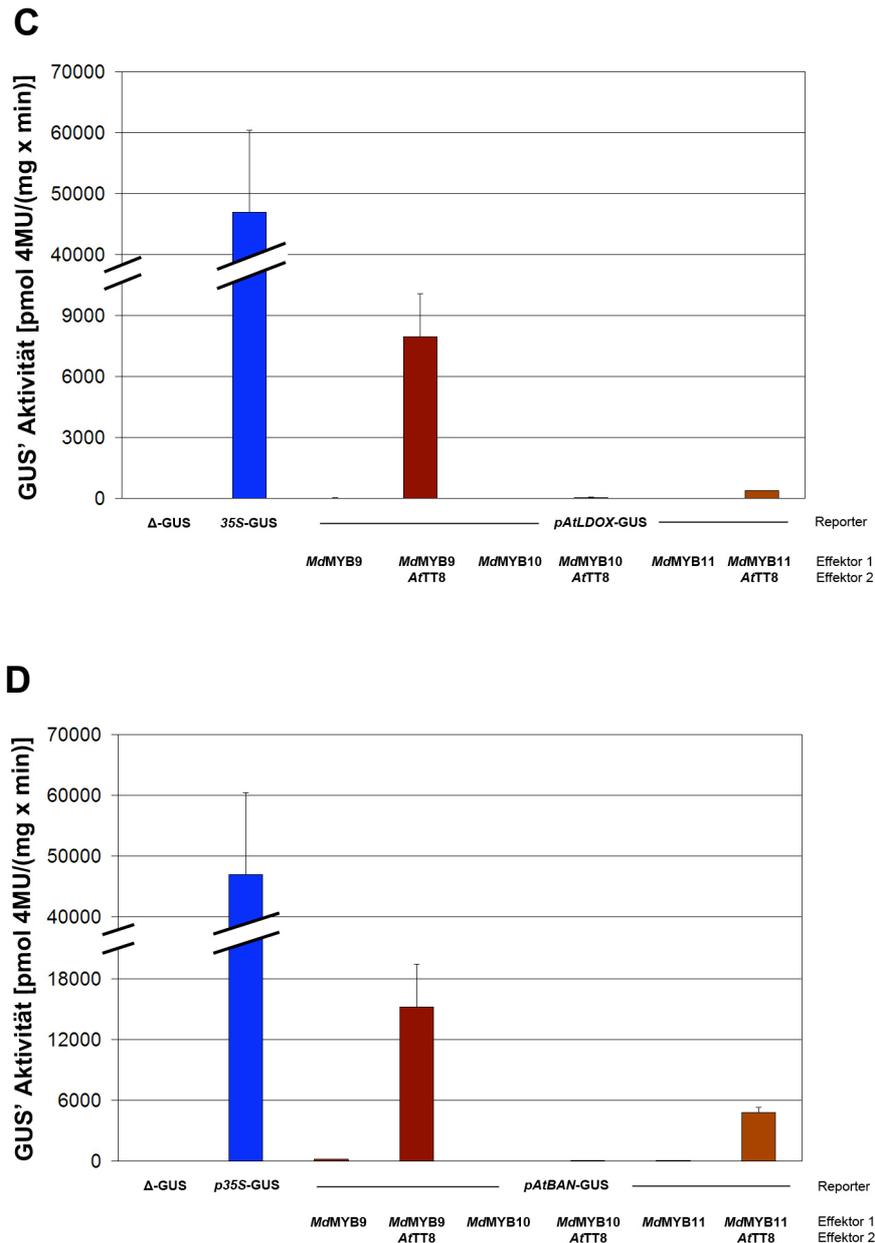
#### 3.1.5 Mögliche Zielgene und Interaktionspartner der putativen Transkriptionsfaktoren aus *M. x domestica*

Da die vorhergehenden Untersuchungen der drei isolierten Sequenzen bisher eine Rolle in der Regulation der Flavonoid-Biosynthese nicht ausschlossen, wurden phylogenetische Untersuchungen durchgeführt, die eine Verwandtschaft zu bekannten Regulatoren aus anderen Organismen erkennen liessen, während vergleichende Analysen der Aminosäuresequenzen bei allen drei Proteinen sowohl die beiden MYB-Wiederholungen, als auch eine Domäne für die Interaktion mit bHLH-Kofaktoren zeigten. Die Fähigkeit, putative homologe Zielpromoter zu aktivieren, wurde durch Ko-Transfektionsexperimente in der *At7*-Zellsuspensionskultur untersucht (Abbildungen 3.7 A-D). Dabei wurde die GUS'-Aktivität bei der Transfektion mit Promoter-GUS Konstrukten der *A. thaliana*-Gene *CHS*, *DFR*, *LDOX* und *BAN* in An- und Abwesenheit der drei MYB-Proteine aus *M. x domestica* als Effektoren unter Kontrolle des 35S-Promoters untersucht. Als Positivkontrolle diente ein 35S-GUS-Konstrukt verwendet, als Negativkontrolle diente ein  $\Delta$ -GUS-Konstrukt. Insgesamt wurden sechs unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt.

In *A. thaliana* werden die Promotoren dieser Zielgene durch den ternären Komplex aus einem MYB-Protein, einem bHLH-Partner und dem WD-repeat-Protein TTG1 aktiviert (Baudry *et al.*, 2004). Dementsprechend wurde durch Zugabe des bHLH-Faktors TT8 (bHLH42) getestet, ob die Apfel-MYBs ebenfalls einen Kofaktor zur Promoteraktivierung und damit zur Ausbildung eines solchen Komplexes benötigen. Eine weitere Zugabe von TTG1 war hingegen nicht notwendig, da eine endogene Expression von TTG1 in der Zellsuspensionskultur stattfand.

Alle Promotoren waren ohne Zugabe von Effektoren nicht aktiv und zeigten lediglich GUS'-Aktivität im Rahmen von Hintergrundsignalen bei Transfektionsexperimenten. Auch bei alleiniger Zugabe der MYB-Effektoren aus dem Apfel war keine Aktivierung der Promotoren zu erkennen. Lediglich der *CHS*-Promoter lies sich in geringem Maße durch *MdMYB9* ohne weitere Zugabe von Kofaktoren aktivieren. Bei Zugabe von *AtTT8* zeigten jedoch alle drei Apfel-MYB-Proteine Aktivierungseigenschaften. *MdMYB9* wies dabei das höchste Aktivierungspotential bei allen vier untersuchten Promotoren auf und war als einziger Faktor in der Lage, den *CHS*-Promoter zu aktivieren, während *MdMYB11* in schwächerem Maße in der Lage war, die *DFR*- und *BAN*-Promotoren zu aktivieren. *MdMYB10* als möglicher Anthocyan-Regulator verursachte alleine beim *DFR*-Promoter eine GUS'-Aktivierung.

**A****B**



**Abbildung 3.9** Analyse der Aktivierbarkeit verschiedener *A. thaliana*-Promoter durch drei verschiedene R2R3-MYB-Faktoren aus *M. x domestica*.

Kotransfektionsanalyse der Aktivierungsfähigkeit des *BAN*-Promoters durch die drei Apfel-MYB-Faktoren *MdMYB* 9, 10 und 11 in *At7*-Protoplasten.  $\Delta$ -GUS dient als Negativ-, 35S-GUS als Positivkontrolle. (A) Aktivierung des *CHS*-Promoters. (B) Aktivierung des *DFR*-Promoters. (C) Aktivierung des *LDOX*-Promoters. (D) Aktivierung des *BAN*-Promoters.

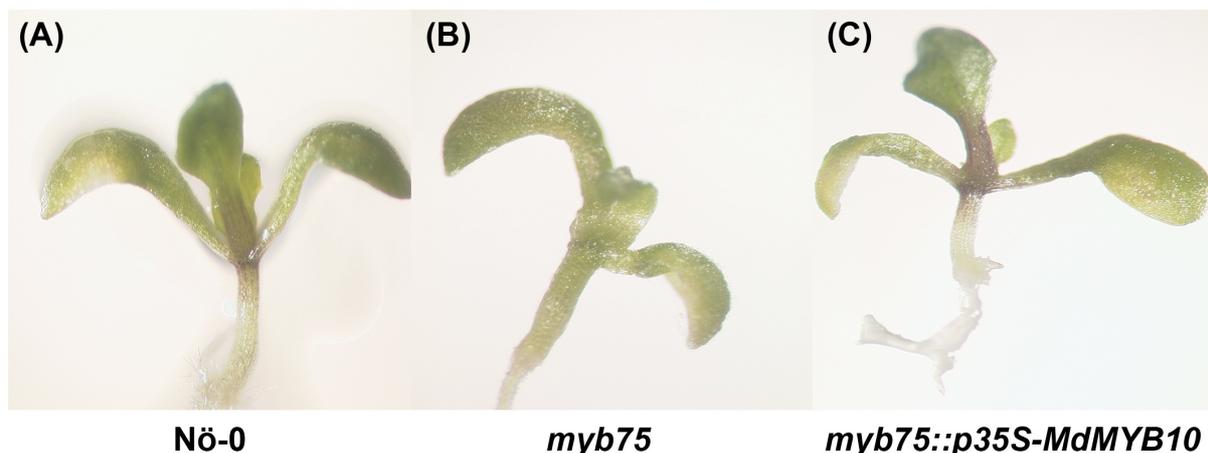
### 3.1.6 Transiente Transformation von *A. thaliana myb75*-Mutanten durch *MdMYB10*

Obwohl die Zellkulturexperimente *in vivo* die Funktionalität der MYB-Proteine in bezug auf die Fähigkeit, homologe Promotoren zu aktivieren bestätigten, ist dies noch kein Nachweis,

daß diese Proteine auch in Pflanzen exprimiert werden und die Aufgaben des eigentlichen nativen Transkriptionsfaktors übernehmen können.

Um die Funktion *in planta* nachzuweisen, wurden *A. thaliana MYB75 knock-out* Pflanzen transient mit dem putativen Homolog *MdMYB10* unter Kontrolle des 35S-Promoters transformiert. Dabei ist es von Vorteil, daß die mutanten Keimlinge bei Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium im Gegensatz zum Wildtyp keine Akkumulation von Anthocyanen im Hypokotyl aufweisen, so daß eine funktionelle Komplementierung schnell und unproblematisch erkannt werden kann.

Die Plasmide mit der *MdMYB10*-Sequenz wurden in den hypervirulenten Agrobakterienstamm *EHA105* transformiert. *A. thaliana MYB75 knock-out* Pflanzen wurden für 4 Tage auf MS-Platten mit 4% Saccharose angezogen und anschließend mit einer Kultur der transformierten Agrobakterien infiltriert und erneut auf Saccharose-haltige MS-Platten angezogen. Zwei bis drei Tage nach der Infiltration wurden die Keimlinge phänotypisch analysiert. Bei Anzucht auf Medium ohne Saccharose zeigten weder Wildtyp- noch *knock-out* Pflanzen Anthocyan-Akkumulation, auf Saccharose-haltigem Medium war jedoch bei Wildtyp-Pflanzen und mit *MdMYB10* transformierten Pflanzen eine deutliche Anthocyanakkumulation erkennbar (Abbildung 3.8, A und C). Die *myb75*-Mutanten zeigten auch auf zuckerhaltigem Medium keine sichtbare Bildung von Anthocyanen (Abbildung 3.8, B).



**Abbildung 3.10: Phänotypen von transient transformierten *A. thaliana myb75 knock-out* Pflanzen und Kontrollen.**

Mutante *myb75*-Keimlinge wurden transient mit dem putativen R2R3-MYB-Regulator *MdMYB10* unter Kontrolle des 35S-Promoters transformiert. Die Identifikation der komplementierten Pflanzen erfolgte über die Saccharose-induzierte Anthocyanakkumulation.

(A) Nö-0 als Hintergrund der *myb75*-Mutante

(B) *myb75 knock-out* Mutante

(C) *myb75 knock-out* Mutante, mit *myb75::p35S-MdMYB10* komplementiert.

7 Tage alte Keimlinge wurden nach der Infiltration auf ½ MS-Platten mit 4% Saccharose unter Langtagbedingungen angezogen.

## 3.2 ***MdTTG1*, ein möglicher Regulator der Flavonoid-biosynthese in *M. x domestica***

Neben den bisher schon erwähnten MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren gibt es einige weitere Proteine, die gewebe- und entwicklungsspezifisch die Synthese von Flavonoiden kontrollieren. Einer dieser Faktoren ist das *WD-repeat* Protein TTG1, welches in *A. thaliana* in der Flavonoid-Biosynthese zusammen mit einem MYB- und bHLH-Faktor einen ternären Komplex ausbildet, wobei TTG1 vor allem für die Stabilisierung dieses Komplexes notwendig ist (Nesi *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2006). In der Samenschale besteht dieser Komplex neben TTG1 aus dem MYB-Protein TT2 (MYB123) und dem BHLH-Faktor TT8 (BHLH42) und kontrolliert Proanthocyanidin-spezifisch die Expression von *DFR*, *LDOX* und *BAN* (Walker *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2008).

Im Anthocyan-spezifischen Bereich der Flavonoid-Biosynthese tritt an die Stelle von TT2 der Transkriptionsfaktor MYB75 (PAP1). Als bHLH-Kofaktoren fungieren entweder TT8 (BHLH42) oder EGL3 (BHLH2) (Borevitz *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2008).

In mutanten *ttg1*-Pflanzen findet die korrekte Formation dieses Komplexes nicht statt, so daß die Produktion von Proanthocyanidinen im Endothel der Samenschale nicht stattfindet und in gelben Samen resultiert. Keimlinge und adulte Pflanzen zeigen keine Akkumulation von Anthocyanen in Hypokotyl und Blättern.

Weiterhin kontrolliert TTG1 die Bildung von Trichomen und Wurzelhaaren. In *TTG1 knock-out* Pflanzen findet keine Trichombildung statt, während zusätzliche Wurzelhaare gebildet werden, da hier keine negative Regulation durch TTG1 stattfinden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der GenBank-Datenbank ein mögliches TTG1-Homolog aus dem Kulturapfel identifiziert und aus Blattmaterial des Kultivars Rewena isoliert und funktionell charakterisiert.

### 3.2.1 **Phylogenetische Verwandtschaft von *MdTTG1* zu Homologen aus verschiedenen Organismen**

Zur Isolierung der kodierenden Sequenz von *MdTTG1* wurden Desoxyoligonukleotide, die auf dem GenBank-Eintrag AF220203 beruhen, entworfen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab eine Sequenz von 1029 Bp Länge, die nur in einem Nukleotid vom GenBank-Eintrag abwich, ohne einen Einfluß auf die Aminosäuresequenz zu haben.

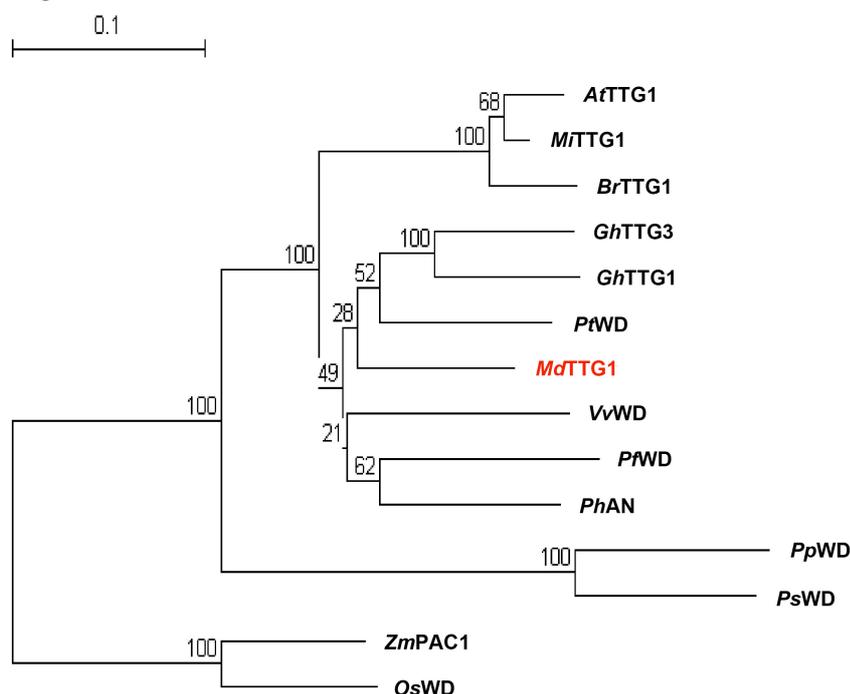
Vergleiche der *MdTTG1*-Aminosäuresequenz mit bekannten TTG1-Homologen aus anderen Organismen zeigten eine Ähnlichkeit von über 90% mit AN11 aus *Petunia hybrida* (Petunie) und den Homologen aus *Gossypium hirsutum* (Baumwolle), *Matthiola incana* (Levkoje) und *A. thaliana*. Die Ähnlichkeit zu *PfWD* aus *Perilla frutescens* (Schwarznessel), TTG1 aus

*Brassica rapa* (Rübsen) und einem weiteren Homolog aus Baumwolle, *GhTTG3* war etwas geringer, während PAC1 aus *Zea mays* (Mais) etwa 77% Ähnlichkeit aufwies (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Prozentuale Übereinstimmung (Ähnlichkeit) der Aminosäuresequenzen von *MdTTG1* und funktionell charakterisierten Homologen aus verschiedenen Organismen.**

	<i>PtWD</i>	<i>PhAN11</i>	<i>GhTTG1</i>	<i>VvWD</i>	<i>GhTTG3</i>	<i>AtTTG1</i>	<i>PtWD</i>	<i>BrTTG1</i>	<i>PpWD</i>	<i>ZmPAC1</i>	<i>OsWD40</i>
<i>MdTTG1</i>	85.1 (93.9)	82.8 (90.9)	81.9 (90.7)	81.8 (91.5)	80.6 (89.6)	80.2 (90.7)	80.1 (89.1)	78.2 (89.2)	64.6 (81.1)	63.6 (76.7)	63.3 (74.0)

Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der verschiedenen TTG1-Homologe zeigten, daß *MdTTG1* mit den Proteinen der verschiedenen dikotylen Pflanzen gruppierte (Abbildung 3.9). Neben den weiter oben erwähnte Sequenzen wiesen zwei weitere Proteine aus *Vitis vinifera* (Weintraube) und *Populus trichocarpa* (Westliche Balsam-Pappel) nähere Verwandtschaft zu *MdTTG1* auf. Die beiden monokotylen Sequenzen *ZmPAC1* aus Mais und *OsWD* aus *Oryza sativa* (Reis) zeigten wie auch zwei putative Homologe aus *Physcomitrella patens* (Kleines Blasenmützenmoos) und *Picea sitchensis* (Sitka-Fichte) deutlich geringere Verwandtschaft.



**Abbildung 3.11: Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener TTG1-ähnlicher WD-Repeat-Proteine.**

Die Aminosäuresequenzen wurden mit CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) abgeglichen, der dargestellte Baum wurde mit TREECON (van der Peer und De Wachter, 1994) mittels *neighbor-joining* Analyse und 100 *bootstrap* Wiederholungen konstruiert. Der Größenmaßstab zeigt Aminosäure-Austausche pro Position. *M. x domestica* TTG1 ist rot dargestellt.

### 3.2.2 Analyse der Proteinstruktur von *MdTTG1* im Vergleich zu bekannten Homologen

Wie schon für die drei R2R3-MYB-Proteine aus dem Apfel wurde auch für *MdTTG1* die Aminosäuresequenz durch Abgleich zu vier möglichen Homologen näher charakterisiert (Abbildung 3.10). Unter Benutzung des Programmes *PSA Protein Structure Prediction* (Neer *et al.*, 1994) konnten in *MdTTG1* insgesamt vier WD-Wiederholungen identifiziert werden, die auch in den entsprechenden Homologen zu finden sind. Weiterhin ergab eine Analyse der Sequenz mit dem PSORT-Programm (Nakai *et al.*, 1999), daß kein Kernlokalisierungssignal in der Proteinsequenz vorhanden ist.



**Abbildung 3.12: Sequenzvergleich von ausgewählten TTG1-ähnlichen WD-Repeat-Proteinen.**

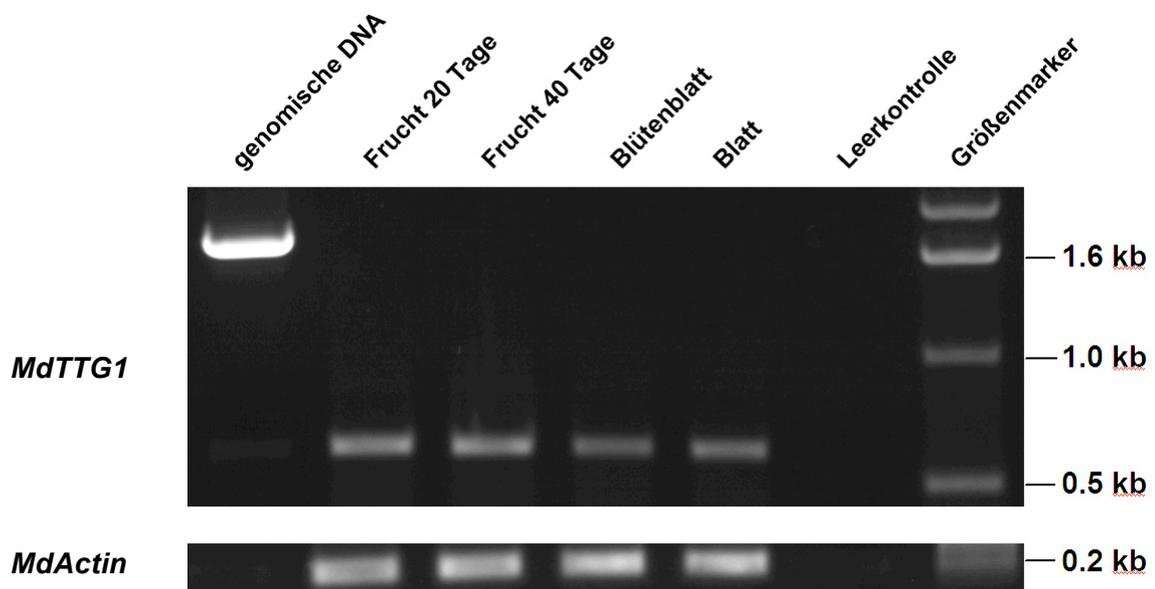
Die Aminosäuresequenz von *MdTTG1* wurde verglichen mit *A. thaliana* TTG1, *P. frutescens* PFWD, *G. hirsutum* TTG1 und *B. rapa* TTG1. Graue Markierungen zeigen chemisch konservierte Aminosäuren, schwarze identische Aminosäuren. Die Positionen der WD-Wiederholungen werden durch schwarze Boxen angezeigt.

### 3.2.3 Expression von *MdTTG1* und relative Quantifizierung in verschiedenen Apfelgeweben mittels RT-PCR

Aufgrund der Rolle von TTG1 in zahlreichen Stoffwechselvorgängen wie der Akkumulation von Proanthocyanidinen und Anthocyanen, Wurzelhaar- und Trichomentwicklung, aber auch der Schleimkapselproduktion von Samen war zu vermuten, daß *MdTTG1* in verschiedenen Geweben des Apfels exprimiert wird. Dementsprechend wurde die Expression von *MdTTG1*

in mehreren Geweben des Apfels per RT-PCR untersucht, wozu zunächst RNA aus Blättern, Blütenblättern und Fruchtparenchym (ohne Schale oder Samenmaterial) von 20 und 40 Tagen nach voller Blüte des Kultivars Rewena extrahiert wurde. Nach der Umschreibung der RNA in cDNA durch oligo-dT-Primer wurden die spezifischen *MdTTG1*-Primer J149 und J150 zum Nachweis der Expression verwendet. J149 lag dabei in der kodierenden Region, während J150 in der vermuteten 3'-untranslatierten Region lag. Als Kontrolle des Einsatzes gleicher Mengen Matrizen-DNA diente hier ebenfalls *MdActin*.

Insgesamt konnte in allen überprüften Geweben die Expression von *MdTTG1* nachgewiesen werden, am stärksten waren dabei die Signale der beiden Fruchtproben. Etwas schwächer war die Expression sowohl in Blatt- und Blütenblattmaterial (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.13: Expression von *MdTTG1* in verschiedenen Apfelgeweben.**

RT-PCR Analyse der Expression von *MdTTG1* in verschiedenen Geweben des *M. x domestica*-Kultivars Rewena. *MdActin* dient als Positivkontrolle.

### 3.2.4 Untersuchungen zur genomischen Organisation von *TTG1* in *Malus x domestica*

Im Folgenden wurde die genomische Sequenz des *MdTTG1*-Gens genauer bestimmt, da die PCR-Expressionsanalysen bei der Kontrollreaktion mit genomischer DNA als Matrize einen deutlichen Größenunterschied zu den PCR-Ergebnissen mit cDNA als Matrize ergaben und somit zu erwarten war, daß ein oder mehrere intronische Bereiche innerhalb der genomischen Sequenz zu finden sind. Weiterhin wurde durch DNA-Gel-Blot-Analysen die

Kopienzahl von *MdTTG1* im Apfelgenom genauer bestimmt, da im Gegensatz zu *A. thaliana* im Apfel die Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in mehrfacher Kopienzahl vorliegen (Tako *et al.*, 2006a; Fischer *et al.*, 2006, Frank *et al.*, 2010) und auch der charakterisierte Anthocyan-Regulator *MdMYBA* mehrere Kopien im Genom des Kultivars Tsugaru aufweist (Ban *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse lassen daher die Erwartung zu, daß auch *MdTTG1* mehrfach im Apfelgenom zu finden ist.

#### **3.2.4.1 Bestimmung der genomischen Sequenz von *MdTTG1***

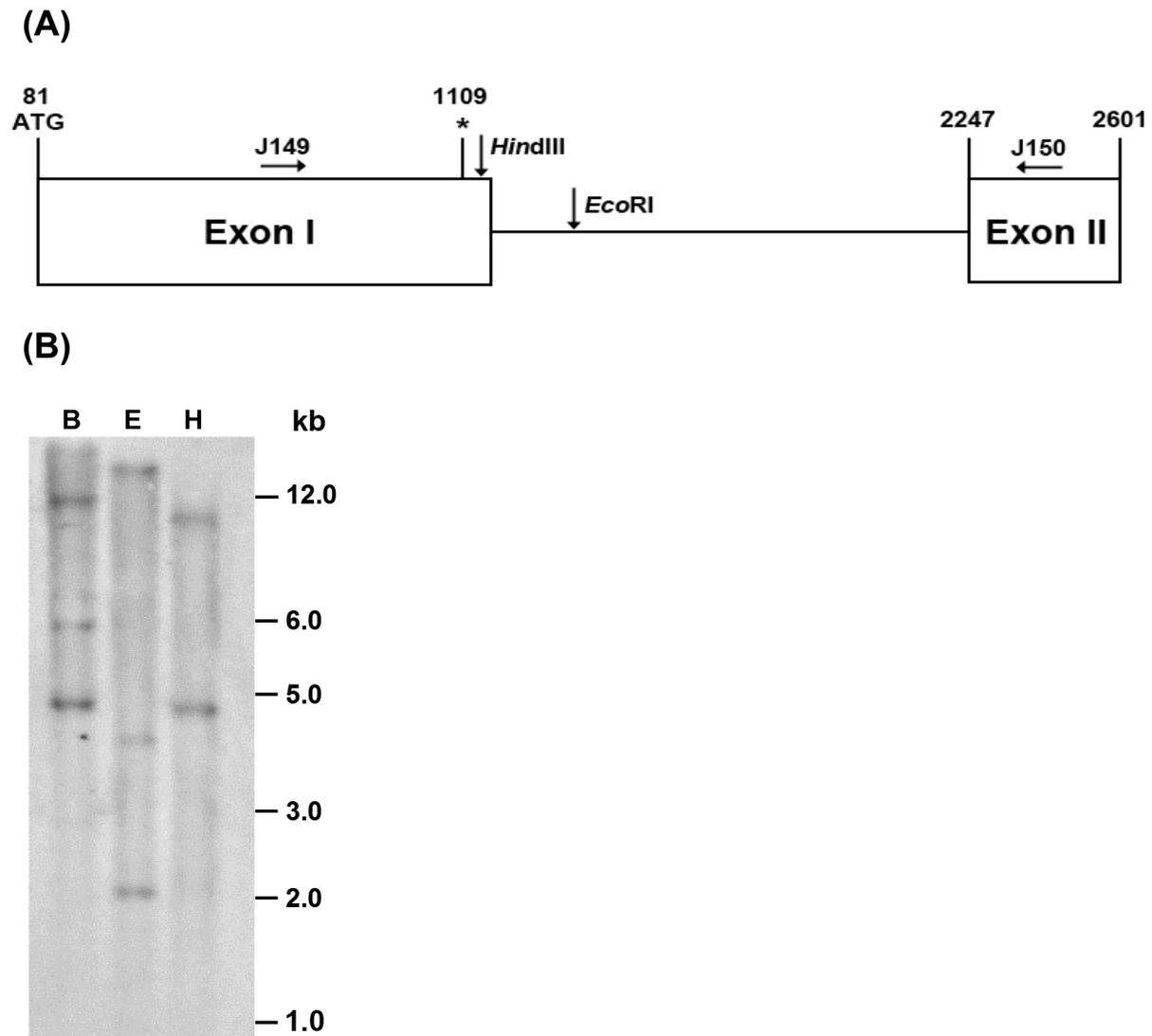
Zur genaueren Untersuchung der genomischen Sequenz im Apfelgenom wurden Oligonukleotide auf Grundlage der in GenBank hinterlegten mRNA des Kultivars McIntosh, die für ein WD-repeat Protein kodiert, entworfen. Da die nach der PCR mit genomischer DNA als Matrize erhaltenen Fragmente für eine direkte Sequenzierung zu groß waren, wurden diese zunächst in den Vektor pCRII TOPO kloniert und dann schrittweise einzeln sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden anschließend mit der cDNA des selben Kultivars verglichen und zeigten einen offenen Leserahmen von 1029 Bp Länge, der vor einem einzelnen Intron von 1129 Bp Länge lag, welches 37 Bp hinter dem Stop-Codon des ersten Exons beginnt (Abbildung 3.12 A). Die vollständige Sequenz wurde in der NCBI-Datenbank unter der Zugangsnummer GU173813 hinterlegt.

#### **3.2.4.2 Genomische DNA-Gel-Blot-Analyse**

Durch eine DNA-Gel-Blot-Analyse wurde ermittelt, ob im *M. x domestica*-Genom eine oder mehrere Kopien des *TTG1*-Gens vorhanden waren.

Dazu wurde zunächst genomische DNA aus Blättern des Kultivars Rewena extrahiert und jeweils 10 µg DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III gespalten. Anschließend wurde die gespaltene DNA im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert. Als Sonde diente dabei die vollständige cDNA-Sequenz von *MdTTG1* um Kreuz-Hybridisierungen mit weiteren WD-repeat Proteinen zu vermeiden. Durch die vorhergehende Sequenzierung war bekannt, daß *MdTTG1* in der genomischen DNA jeweils eine *Eco*RI und eine *Hind*III-Schnittstelle besitzt (Abbildung 3.12 A).

In den Restriktionen mit *Bam*HI und *Eco*RI wurden jeweils drei Banden detektiert, während die Restriktion mit *Hind*III zwei Banden ergab (Abbildung 3.12 B). Dieses Muster lässt daher vermuten, daß zumindest zwei Kopien von *MdTTG1* im Genom des Kultivars Rewena vorhanden sind, obwohl nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß Allele als eigene Banden auftreten.



**Abbildung 3.14: Genomische Organisation von *MdTTG1*.**

(A) Struktur von *TTG1* in *M. x domestica*. *HindIII* und *EcoRI* Restriktionsschnittstellen sind durch Pfeile angezeigt. Die Nummerierung entspricht der GenBank-Sequenz AF220203. J149 und J150 markieren Desoxyoligonukleotide, die zur Intron-Sequenzierung verwendet wurden.

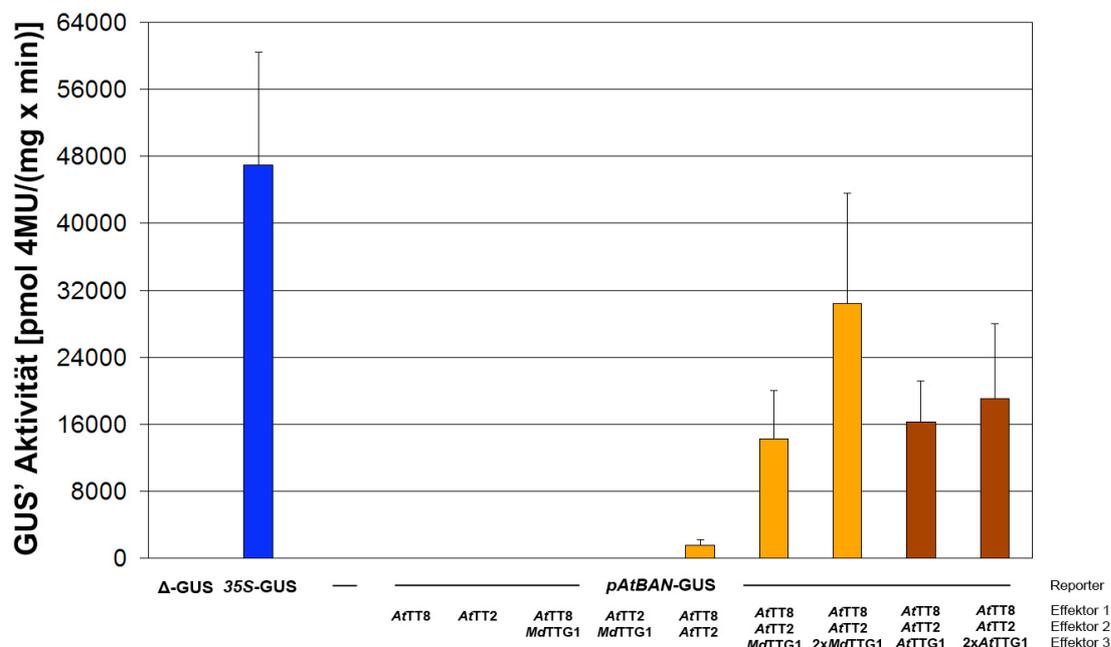
(B) DNA-Gel Blot (*Southern Blot*) Analyse von *MdTTG1*. Jede Spur enthält 10  $\mu$ g genomische DNA die vom entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten wurde. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; kb, Molekularer Marker, Größe in Kilobasen. Als Sonde wurde die Vollängen-cDNA von *MdTTG1* verwendet.

### 3.2.5 Interaktionsanalysen von *MdTTG1* mit möglichen Kofaktoren in der At7-Zellkultursuspension

Zur Bestätigung, daß die Sequenzähnlichkeit des isolierten *MdTTG1*-Proteins zu charakterisierten *TTG1*-Homologen ebenfalls zu funktioneller Ähnlichkeit bedeutet, wurde *MdTTG1* in der At7-Zellsuspensionskultur auf Interaktionsfähigkeit mit Kofaktoren und möglichen homologen Zielgenen aus *A. thaliana* getestet (Abbildung 3.13). Als Reporterkonstrukt diente der *A. thaliana* *BAN*-Promoter, der an das offene Leseraster des

*uidA-* (*GUS*) Gens fusioniert wurde. Als Effektor-konstrukt wurde *MdTTG1* unter Kontrolle des 35S-Promoters verwendet. Als zusätzliche Kofaktoren dienten dabei *AtMYB123* und *AtTT8*, die als Interaktionspartner von TTG1 bei der Aktivierung des *BAN*-Promoters in *A. thaliana* bekannt sind (Baudry *et al.*, 2004). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß dabei TTG1 als Stabilisator des Aktivierungskomplex wichtig ist und zudem Überexpression von *TTG1* in einer erhöhten Aktivität des *BAN*-Promoters resultierte, also ein quantitativer Effekt von TTG1 auf den Promoter vorliegt (Baudry *et al.*, 2004).

Während die transiente Transformation der Protoplasten nur mit *AtTT2* oder *AtTT8* keine Aktivierung des Promoters induzierte, zeigte eine Kotransfektion mit beiden Effektoren eine geringe, aber signifikante Aktivierung des *BAN*-Promoters aufgrund der bereits erwähnten basalen Expression von *AtTTG1* in den Protoplasten. Eine zusätzliche Kotransfektion mit *AtTTG1* resultierte in erhöhter Aktivität des *BAN*-Promoters der durch weitere Steigerung der eingesetzten *AtTTG1*-Effektormenge noch gesteigert werden konnte und so die von Baudry *et al.* gezeigten Ergebnisse verifiziert. Der gleiche Effekt konnte bei der Verwendung von *MdTTG1* an Stelle von *AtTTG1* beobachtet werden. Wurde *MdTTG1* zusammen mit den beiden *A. thaliana*-Effektoren transfiziert, zeigte der *BAN*-Promoter im Vergleich zur Transfektion nur mit den beiden Effektoren aus *A. thaliana* ebenfalls erhöhte Aktivität, wodurch der Einfluss von *MdTTG1* auf den Aktivierungskomplex deutlich wurde. Weiterhin korrelierte die Aktivierung des *BAN*-Promoters mit der eingesetzten Effektormenge von *MdTTG1*, hier war der Dosiseffekt sogar erkennbar stärker als bei *AtTTG1*.

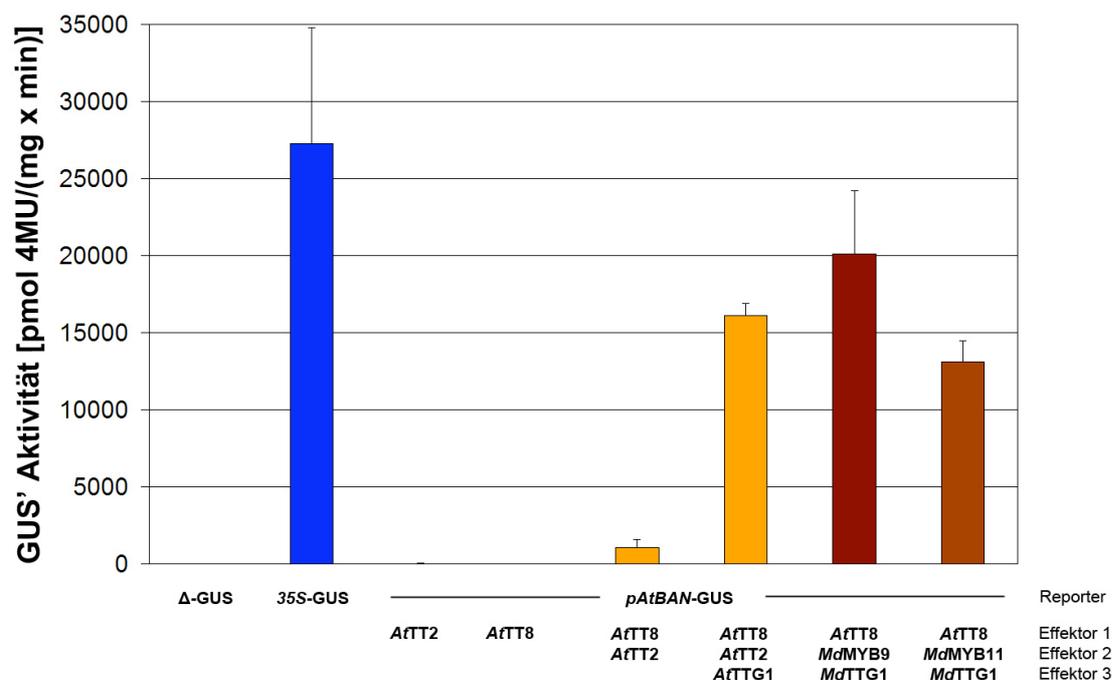


**Abbildung 3.15: Interaktion von *MdTTG1* mit verschiedenen Kofaktoren aus *A. thaliana* im At7-System.**

Kotransfektionsanalyse der Aktivierung des *A. thaliana* CHS-Promoters durch *MdTTG1* in Kombination mit verschiedenen *A. thaliana* Kofaktoren. Δ-GUS dient als Negativ-, 35S-GUS als Positivkontrolle.

Weiterhin wurden die in Abschnitt 3.1 näher beschriebenen putativen *AtMYB123*-Homologe *MdMYB9* und *MdMYB11* in Kombination mit *AtTT8* und *MdTTG1* als Kofaktoren in der Zellsuspensionskultur getestet. Falls diese beiden MYB-Transkriptionsfaktoren tatsächlich Homologe von *AtTT8* sind, sollte hier ebenfalls eine Bildung des ternären Aktivierungskomplexes stattfinden und eine Aktivierung des *AtBAN*-Promoters erkennbar sein.

Wie bereits gezeigt, fand eine geringe Aktivierung des *BAN*-Promoters bei Transfektion mit *AtTT2* und *AtTT8* statt, der bei zusätzlicher Transfektion mit *AtTTG1* stärker wurde. Wurde *MdMYB9* an Stelle von *AtTT2* verwendet, war sogar eine signifikant stärkere Aktivierung zu erkennen. Bei Kotransfektion von *MdMYB11* zusammen mit *MdTTG1* und *AtTT8* war die GUS'-Aktivität jedoch etwas geringer als bei Transfektion mit den drei *A. thaliana*-Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3.14)



**Abbildung 3.16: Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren aus *M. x domestica* und *A. thaliana* im At7-System.**

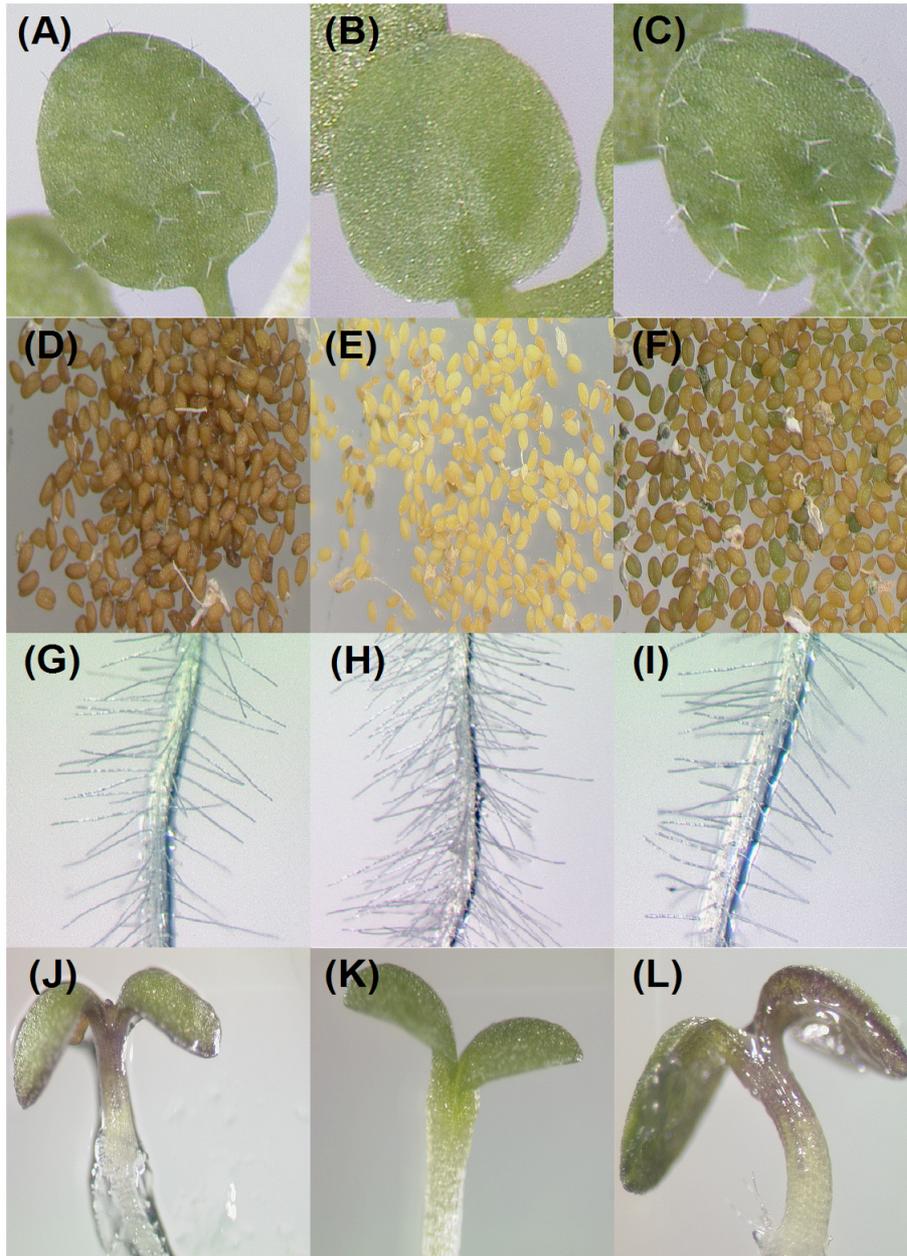
Kotransfektionsanalyse der Aktivierung des *A. thaliana BAN*-Promoters durch verschiedene Kombinationen aus *MdTTG1*, *MdMYB9* und *MdMYB11* und *A. thaliana TT8* als zusätzlichem Kofaktor. Δ-GUS dient als Negativ-, 35S-GUS als Positivkontrolle.

### 3.2.6 *MdTTG1* komplementiert durch stabile Transformation *AtTTG1* knock-out Pflanzen

Um näher zu untersuchen, ob die beobachteten Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz von *MdTTG1* zu bekannten TTG1-Homologen und die Fähigkeit der Interaktion sowohl mit möglichen Interaktionspartnern aus *M. x domestica* sowie Homologen dieser Interaktionspartner aus *A. thaliana* und die Aktivierungskapazität von *MdTTG1* bezüglich des putativen homologen BAN-Zielpromoters tatsächlich auf eine funktionelle Homologie zurückzuführen sind, wurde die Fähigkeit von *MdTTG1* untersucht, *A. thaliana ttg1-1* Mutanten zu komplementieren.

Dazu wurde *MdTTG1* unter Kontrolle des nativen *AtTTG1*-Promoters kloniert und in den Agrobakterienstamm GV3101 pMP90RK transformiert. Die eigentliche Transformation der *knock-out* Pflanzen erfolgte dann über die „floral dip“-Methode, indem adulte Pflanzen mit den offenen Blüten in die angezogene selektive Agrobakteriensuspension getaucht wurden. Die transformierten Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen und geerntete Samen auf Selektionsplatten ausgebracht. Überlebende transgene Pflanzen wurden visuell auf Trichombildung untersucht und für weitere Untersuchungen verwendet. Sämtliche transgene Pflanzen zeigten ein Trichomwachstum, das dem von Wildtyp-Pflanzen entsprach (Abbildung 3.15 A-C). Die ausgewählten Pflanzen wurden dann bezüglich einer vollständigen funktionellen Komplementierung weiter untersucht. Die reifen Samen der transgenen Pflanzen zeigten eine deutliche Braunfärbung der Samenschale (Abbildung 3.15 D-F) und somit eine Wiederherstellung der Proanthocyanidin-Produktion.

Ebenfalls untersucht wurde der Effekt des Transgens auf die Entwicklung der Wurzelhaare. Während Wildtyp-Pflanzen ein regelmäßiges Muster in der Wurzelhaarbildung aufweisen, zeigen *ttg1-1* Mutanten ein übermässiges Wachstum von Wurzelhaaren mit einem irregulären Muster (Abbildung 3.15 G-H), da hier auch atrichoblaste Zellen Wurzelhaare entwickeln. Komplementierte Pflanzen zeigten im Vergleich zur Mutante ein reduziertes Wurzelhaarwachstum, was dem des Wildtyps entsprach (Abbildung 3.15 I), so daß auch hier eine Komplementierung vorlag.



**Abbildung 3.17: Phänotypen der mit *MdTTG1* stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen und der entsprechenden Kontrollen.**

Ler (linke Spalte) als Hintergrund der *ttg1-1* knock-out Mutante, *ttg1-1* (mittlere Spalte) und *ttg1-1::pAtTTG1-MdTTG1* (rechte Spalte).

(A-C) Trichome auf Keimlingsblättern.

(D-F) Pigmentierung der Samenschale durch Proanthocyanidine.

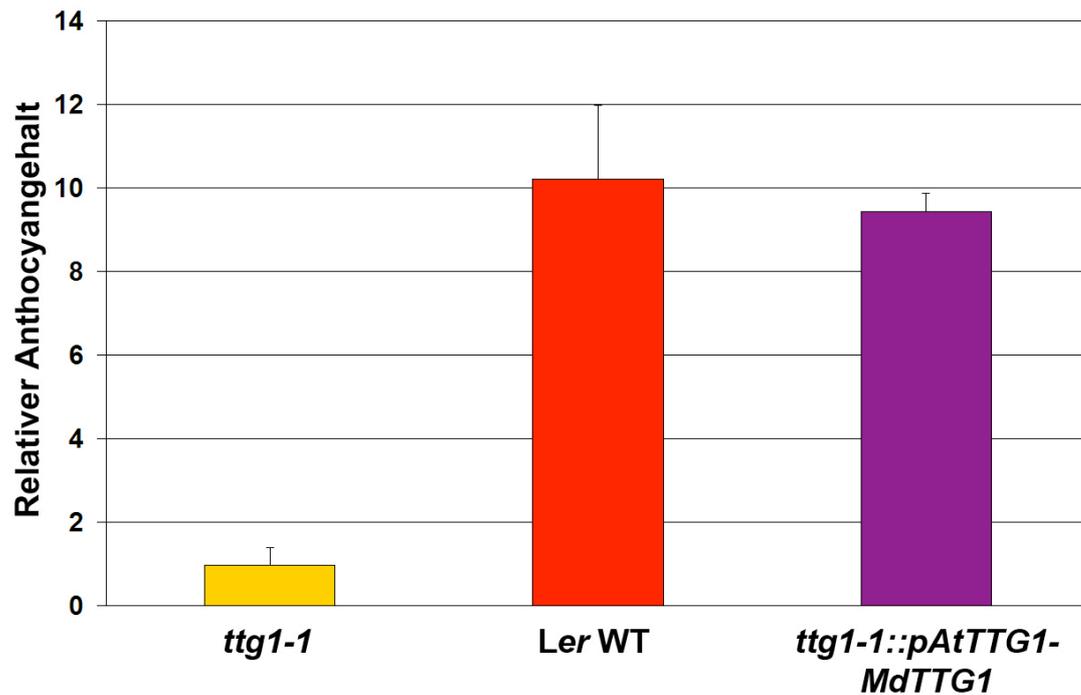
(G-I) Wurzelhaarentwicklung bei Keimlingen.

(J-L) Anthocyanakkumulierung in 7 Tage alten Keimlingen auf  $\frac{1}{2}$  MS und 4% Saccharose unter Langtagbedingungen angezogen.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß *MdTTG1* den Defekt in der Anthocyan-Akkumulation der mutanten Pflanzen wiederherstellen konnte. Keimlinge der transformierten Pflanzen, die für 7 Tage auf MS-Medium mit 4% Saccharose angezogen wurden, zeigten

eine Akkumulation von Anthocyanen im Hypokotyl, die der des Wildtyps entsprach (Abbildung 3.15 J-L).

Der Anthocyan-Gehalt der Keimlinge wurde zusätzlich photometrisch quantifiziert (Abbildung 3.16) und zeigte, daß die transformierten Keimlinge einen Anthocyan Gehalt ähnlich dem des Wildtyps aufwiesen.



**Abbildung 3.18: Photometrische Analyse der Anthocyanmenge in stabil mit *MdTTG1* transformierten *A. thaliana ttg1-1* Keimlingen.**

Quantifizierung des relativen Anthocyan Gehaltes in sieben Tagen alten *A. thaliana* Keimlingen, die auf  $\frac{1}{2}$  MS und 4% Saccharose unter Langtagbedingungen gewachsen sind. Als Kontrollen wurden mutante *ttg1-1* sowie Ler Wildtyp-Pflanzen verwendet.

## 4. Diskussion

Obwohl in zahlreichen Pflanzenarten die Biosynthese der Flavonoide bisher sehr gut dokumentiert ist, sind im Apfel vor allem regulatorisch wirkende Prozesse und die darin aktiven Gene bzw. deren Proteine kaum untersucht. Bisher untersucht sind vor allem die wichtigsten Strukturgene (Kim *et al.*, 2003; Strissel *et al.*, 2005; Takos *et al.*, 2006a; Frank *et al.*, 2010), wohingegen bislang nur die drei Transkriptionsfaktoren *MYBA*, *MYB1* und *MYB10*, welche die Synthese der Anthocyane kontrollieren, charakterisiert wurden (Takos *et al.*, 2006b; Ban *et al.*, 2007, Takos *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die drei potentiellen MYB-Transkriptionsfaktoren *MYB9*, *10* und *11* näher untersucht sowie mit *MdTTG1* ein weiterer Regulator, der zur Gruppe der *WD-repeat* Proteine gehört, vollständig charakterisiert.

### 4.1 *MdMYB9* und *11* sind putative Regulatoren der Proanthocyanidinbiosynthese in *Malus x domestica*

In *A. thaliana* sind mehrere Transkriptionsfaktoren bekannt, die unter anderem für die Regulation des Proanthocyanidin-spezifischen Teils der Flavonoid-Biosynthese verantwortlich sind. Da Proanthocyanidine vor allem in der Apfelfrucht akkumulieren (Renard *et al.*, 2007), ist davon auszugehen, dass in *Malus x domestica* Homologe zu diesen bekannten Faktoren vorhanden sind. Zwei mögliche homologe Sequenzen zum MYB-Transkriptionsfaktor *AtMYB123*, als *MdMYB9* und *MdMYB11* bezeichnet, wurden im neuseeländischen Horticulture and Food Research Institute aus dem Kultivar Royal Gala isoliert und zur Verfügung gestellt. Aufgrund dieser Sequenzen wurden Oligonukleotide im Rahmen dieser Arbeit konstruiert und die entsprechenden Sequenzen aus Fruchtmaterial des Kultivars Rewena per PCR isoliert.

#### 4.1.1 *MdMYB9* und *11* zeigen hohe Ähnlichkeit zu bekannten Proanthocyanidin-Regulatoren

Erste Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Gene ergaben eine nähere Verwandtschaft zu bekannten Regulatoren im Flavonoid-Biosyntheseweg, die vor allem die Akkumulierung von Proanthocyanidinen kontrollieren (Abbildung 3.1). *MdMYB9* und *11* gruppieren phylogenetisch zusammen mit *AtMYB123* (TT2) sowie *OsMYB3*, während weitere MYB-Transkriptionsfaktoren, die andere Teilbereiche der Flavonoid-Biosynthese regulieren, geringere Verwandtschaft zeigen. Da phylogenetische Untersuchungen von

MYB-Faktoren in *A. thaliana* und *V. vinifera* ebenfalls Dendrogramme ergaben, bei denen funktionell ähnliche Proteine miteinander gruppieren (Stracke *et al.*, 2001; Bogs *et al.*, 2007) ist zumindest zu vermuten, dass *MdMYB9* und 11 mögliche Homologe von *AtMYB123* sein könnten, beziehungsweise ähnliche Funktionen erfüllen.

Weitere Vergleiche der Aminosäuresequenzen der beiden putativen Regulatoren mit nahe gruppierenden MYB-Proteinen sowie weiteren bekannten Proanthocyanidin-spezifischen MYB-Regulatoren zeigten starke Konservierung im N-terminalen Bereich der beiden MYB-Wiederholungen, wohingegen praktisch keine Ähnlichkeit im C-terminalen Teil der Sequenzen erkennbar ist (Abbildung 3.3). Dementsprechend konnte auch ein von Stracke *et al.* (2001) postuliertes charakteristisches Motiv im C-terminalen Bereich nicht identifiziert werden. Dieses Motiv ist in *VvMYBPA1* ebenfalls nicht vorhanden, trotzdem ist *VvMYBPA1* in der Lage, *TT2 knock-out* Pflanzen vollständig zu komplementieren (Bogs *et al.*, 2007). Daher kann angenommen werden, dass ein solches Motiv nicht zur Funktionalität des Proteins notwendig ist und auch die spezifische Funktion in der Flavonoid-Biosynthese nicht davon abhängt.

Innerhalb des N-terminalen konservierten Bereichs der zwei MYB-Wiederholungen ist jedoch ein kurzer Bereich von 23 Aminosäuren vorhanden, der für eine Interaktion mit bHLH-Partnern notwendig ist. Dieser Bereich ist in *A. thaliana* bei allen charakterisierten MYB-Transkriptionsfaktoren zu finden, die für ihre Funktion ein bHLH-Protein als Interaktionspartner benötigen (Zimmermann *et al.*, 2004) und ist auch in MYB-Regulatoren aus anderen Spezies vorhanden, sofern diese ebenfalls einen bHLH-Kofaktor benötigen (Tako *et al.*, 2006b; Espley *et al.*, 2007; Mano *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2010).

Im Gegensatz dazu stehen MYB-Faktoren, die für ihre Aktivität keine Interaktionspartner benötigen und dementsprechend über keine bHLH-Interaktionsdomäne verfügen, wie zum Beispiel *AtMYB12* als spezifischer Regulator der Flavonol-Synthese (Mehrtens *et al.*, 2005) oder *VvMYBF1*, welches ein Homolog von *AtMYB12* in der Weinrebe darstellt (Czemmel *et al.*, 2009).

#### **4.1.2 *MdMYB 9* und *11* sind in verschiedenen Stadien der Fruchtentwicklung im Apfel exprimiert**

Wie schon erwähnt, akkumulieren Proanthocyanidine vor allem in der Apfelfrucht, so dass *MdMYB9* und *11* bei einer vermuteten Funktion in der Biosynthese der Proanthocyanidine in der Frucht exprimiert sein sollten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde zunächst mittels RT-PCR die Expression von *MdMYB11* in sechs verschiedenen Fruchtstadien (zwei bis sieben Wochen nach voller Blüte) der beiden Kultivare Rewena und WeihRouge überprüft. Bei beiden war eine Expression von *MdMYB11* in sämtlichen Fruchtstadien zu erkennen, wobei Rewena etwas höhere Transkriptmengen aufwies (Abbildung 3.5). In WeihRouge

zeigte *MdMYB11* zudem höhere Expression in den frühen Entwicklungsstadien der Frucht als in späteren. Da Proanthocyanidine vor allem in den früheren Fruchtstadien synthetisiert werden (Renard *et al.*, 2007; Sylvain Guyot, persönliche Mitteilung), lässt eine hohe Aktivität von *MdMYB11* hier ebenfalls auf eine mögliche Rolle als Regulator schließen. In Rewena ließ sich ein solcher Verlauf der Aktivität jedoch nicht beobachten.

Für *MdMYB9* wurde die Expression in Rewena per qPCR ermittelt (Abbildung 3.6), um ein genaueres Bild des Verlaufs zu erhalten. Dafür wurde Material aus zwei verschiedenen Jahren (2006 und 2007) verwendet, um zusätzlich festzustellen, ob Unterschiede in verschiedenen Jahren erkennbar sind. Insgesamt war der Expressionsverlauf von *MdMYB9* in beiden Jahren ähnlich, mit deutlich stärkerer Genaktivität in den frühen Fruchtstadien zu einem Zeitpunkt, an dem auch die Produktion von Proanthocyanidinen am höchsten ist.

Analog dazu verlief die Expression der drei Strukturgene *MdCHS*, *LDOX* und *ANR* als mögliche Zielgene von *MdMYB9* und *11*, die ebenfalls hohe Aktivität in den frühen Entwicklungsstadien sowohl in Material aus 2006, wie aus 2007, zeigten (Abbildung 3.6).

Eine Ausnahme davon wies die Expression der *ANR* in Material aus dem Jahr 2006 auf, hier war zusätzlich eine hohe Expression zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt sieben Wochen nach voller Blüte zu erkennen. Eine mögliche Erklärung könnte dabei die Funktion der Proanthocyanidine als Schutzmechanismus sein, da zu diesem Zeitpunkt die Apfelpflanzen einem Hagelsturm ausgesetzt waren, so dass hier eine Induktion der Expression als Stressreaktion auf äußere Umwelteinflüsse vorgelegen haben kann.

Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen in der Weinrebe (*Vitis vinifera*), hier korrelierte der Zeitpunkt der höchsten Expression der Regulatoren *VvMYBPA1* und *VvMYBPA2* mit der Akkumulation von Proanthocyanidinen während der frühen Fruchtentwicklung (Bogs *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2009) und auch mit der Aktivität der entsprechenden strukturellen Zielgene. Takos *et al.*, 2006a und b konnten nachweisen, dass auch in der Apfelschale proanthocyanidin-spezifische Strukturgene hohe Aktivität zeigen, insbesondere von *MdLAR1* und *MdANR* während der frühen Fruchtentwicklung starke Expression nachgewiesen werden, was eine mögliche regulatorische Funktion von *MdMYB9* und *11* in der Bildung von Proanthocyanidinen weiter stützen könnte, sollte deren Expression auch in der Fruchtschale nachgewiesen werden.

#### **4.1.3 *MdMYB9* und *11* bilden einen Aktivierungskomplex mit Kofaktoren und sind in der Lage, putative Ziel promotoren zu aktivieren**

In vielen Organismen sind Proteinkomplexe, bestehend aus MYB/bHLH/WD-repeat Proteinen an der Regulation zahlreicher Zielgene in der Flavonoid-Biosynthese beteiligt.

In *A. thaliana* regulieren diese Komplexe aus MYB- und bHLH-Faktoren in Kombination mit dem WD-repeat Protein TTG1 die Akkumulation von Anthocyanen und Proanthocyanidinen

als Aktivatoren der Promotoren der „späten“ Gene im Flavonoid-Biosyntheseweges, *DFR*, *LDOX* und *BAN* (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008). Ähnliche Komplexbildungen konnten ebenfalls in *V. vinifera* sowohl bei Anthocyan- als auch Proanthocyanidin-Bildung nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005; Bogs *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2009). Auch für verschiedenen Rosaceen konnte eine solche Komplexbildung indirekt gezeigt werden, da MYB-Transkriptionsfaktoren aus mehreren Organismen wie Erd- und Himbeere, aber auch Kirsche, Pflaume oder Pfirsich in der Lage waren, mit entsprechenden homologen bHLH-Kofaktoren den *A. thaliana* *DFR*-Promoter zu aktivieren (Wang *et al.*, 2010). Innerhalb dieses Komplexes sind die MYB-Transkriptionsfaktoren für die spezifische Funktion des Komplexes zuständig (Zhang *et al.*, 2003), während TTG1 stabilisierende Funktion aufweist (Baudry *et al.*, 2004). Der bHLH-Faktor vermittelt die Komplexbildung von MYB-Protein und TTG1, die ihrerseits nicht direkt miteinander interagieren können (Payne *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2004). Vermutlich bindet also der bHLH-Faktor zunächst im Cytoplasma nach seiner Synthese an TTG1, bevor die beiden Proteine mit dem MYB-Faktor im Zellkern einen Komplex bilden (Zhao *et al.*, 2008). Die bHLH-Faktoren binden bei Aktivierung eines Promoters vermutlich an sogenannte RREs (*R recognition element*), die bisher in jedem charakterisierten Promoter von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese gefunden wurden, während MYB-Faktoren an MREs (*MYB recognition element*) binden, die in den unterschiedlichen Promotoren zwar bezüglich ihrer Konsensussequenz ähnlich, aber im Detail unterschiedlich sind (Duettmann, 2008) und daher die Spezifität der Regulation verursachen.

Für die beiden *M. x domestica* MYB-Faktoren *MdMYB 9* und *11* war aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse der Aminosäuresequenzen und des Expressionsmusters im Fruchtgewebe eine aktivierende Funktion zu erwarten. Dabei konnte anhand von Interaktionstests in der *At7*-Zellsuspensionskultur sowohl die Interaktion mit einem bHLH-Kofaktoren aus *A. thaliana* (BHLH42/TT8) sowie mit *AfTTG1*, als auch die Fähigkeit zur Aktivierung entsprechender homologer Zielpromoter gezeigt werden (Abbildung 3.7 A-D). Beide Faktoren waren in der Lage, sowohl den *A. thaliana* *DFR*-, als auch den *BAN*-Promoter signifikant zu aktivieren, sofern die oben beschriebenen Kofaktoren *AfTT8* und *AfTTG1* ebenfalls vorhanden waren. Der bHLH-Faktor TT8 musste dabei kotransfiziert werden, während *AfTTG1* in der Zellkultursuspension aufgrund endogener Expression bereits vorhanden war.

Insgesamt zeigte *MdMYB9* erkennbar stärkeres Aktivierungspotential auf den *DFR*- und *BAN*-Promoter als *MdMYB11*. Zusätzlich konnten die *CHS*- und *LDOX*-Promotoren von *A. thaliana* durch *MdMYB9* aktiviert werden, was für *MdMYB11* beim *CHS*-Promoter nicht und beim *LDOX*-Promoter nur in sehr geringem Ausmaß der Fall war. Wurde an Stelle von

*AtTTG1* mit *MdTTG1* ein Homolog aus dem Apfel kotransfiziert, konnte die bessere Aktivierungsfähigkeit von *MdMYB9* in bezug auf den *AtBAN*-Promoter ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 3.14).

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist zunächst die größere Ähnlichkeit von *MdMYB9* zu *AtMYB123* im Vergleich zu *MdMYB11*. *MdMYB9* weist in allen Vergleichen höhere Ähnlichkeit nicht nur zu *AtMYB123*, sondern auch zu weiteren charakterisierten Homologen wie *VvMYBPA1*, *OsMYB3* oder *LjTT2A* auf. *MdMYB9* zeigt insbesondere in der Region, die für die Interaktion mit dem bHLH-Kofaktor notwendig ist, eine leicht höhere Ähnlichkeit zu *AtMYB123*, so dass vermutet werden kann, dass *MdMYB9* besser mit einem bHLH-Protein aus *A. thaliana* interagiert. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die höhere Funktionalität von *MdMYB9* sind unterschiedliche Bindungsfähigkeiten des MYB/bHLH/TTG1-Komplexes an die entsprechenden Zielpromotoren. Da diese Bindung und deren Spezifität hauptsächlich durch das MYB-Protein vermittelt wird (Zimmermann *et al.*, 2004), wäre es möglich, dass *MdMYB11* aufgrund einer schwächeren Bindung an den Promoter ein geringeres Aktivierungspotential zeigt. Eine dritte Erklärung für die unterschiedlich starke Aktivierung könnte in der putativen Aktivierungsdomäne begründet sein. Diese Domäne ist bei MYB-Proteinen im C-terminalen Teil lokalisiert und konnte bisher für *AtMYB2*, *AtMYB66*, *AtMYB0* und *AtMYB75* genauer charakterisiert werden (Urao *et al.*, 1996; Lee und Schiefelbein, 2001; Ruhe, 2007). Im Gegensatz zum konservierten N-terminalen Bereich der MYB-Domäne ist dieser Aktivierungsbereich stark variabel. Da sich auch bei *MdMYB9* und 11 der C-terminale Teil stark unterscheidet, könnte hier eine bisher uncharakterisierte Aktivierungsdomäne für die unterschiedlich starke Promoteraktivierung entscheidend sein.

#### 4.1.4 Weiterführende Experimente zur Rolle von *MdMYB9* und 11

Zur genaueren Überprüfung, inwiefern die beiden aus dem Apfel isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren mit potentiellen Kofaktoren zusammenarbeiten, bietet sich in erster Linie an, das bisher in den Zellkulturexperimenten verwendeten *A. thaliana* BHLH42 (TT8)-Konstrukt durch ein mögliches Homolog aus *M. x domestica* zu ersetzen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden Apfel-MYBs mit einem TTG1-Homolog aus dem Apfel interagieren (Abbildung 3.14). Auch die Komplexbildung eines möglichen *AtBHLH42*-Homologs aus dem Apfel mit einem Apfel-MYB Partner wurde bereits gezeigt (Espley *et al.*, 2007). Sollten diese Transkriptionsfaktoren zur Interaktion miteinander in der Lage sein, wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass dieser MYB/bHLH/WD-repeat-Komplex auch im Apfel vorhanden ist und funktionelle Äquivalenz vorliegt.

Um ein vollständiges Bild über die Komplexbildung zu erhalten, können weiterführend die als Reporter-Sequenzen verwendeten *A. thaliana*-Promotoren gegen solche aus dem Apfel

ausgetauscht werden, wodurch die unterschiedliche Aktivierungskapazität von *MdMYB9* im Vergleich zu *MdMYB11* genauer untersucht werden kann. Wenn der native Promoter aus dem Apfel verwendet wird kann ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der Aktivierung in einer unterschiedlich starken Bindung der MYB-Faktoren an den Arabidopsis-Promoter begründet sind. Interessant könnten weiterhin Aktivierungsversuche mit dem *MdLAR*-Promoter sein, da ein Homolog dieses Strukturgens in *A. thaliana* nicht vorhanden ist. Möglicherweise ist einer der beiden Apfel-MYB Faktoren ein spezifischer Regulator für dieses Gen, was zwei eine Erklärung für die Existenz mehrerer *AtMYB123* ähnlicher Proteine in *M. x domestica* sein könnte.

Die Versuche zur Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit entsprechenden Kofaktoren und Zielpromotoren können zwar recht eindeutig Aussagen über die grundsätzliche Funktionsweise mittels Komplexbildung ermöglichen, reichen jedoch nicht aus, um Aussagen über die tatsächliche Funktion der Proteine *in planta* treffen zu können, da das Zellkultursystem aufgrund der Rahmenbedingungen immer noch stark artifizielle Züge aufweist. Funktionell lassen sich die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren am besten durch Komplementationsexperimente von mutanten Pflanzen untersuchen. Da der *A. thaliana MYB123 knock-out* Phänotyp aufgrund der fehlenden Proanthocyanidine in der Samenschale und der damit vorliegenden gelben Samenfärbung einfach zu erkennen und eine funktionelle Komplementation mit den beiden MYB-Faktoren aus dem Apfel daher leicht identifizierbar ist, wäre dies die einfachste Möglichkeit, tatsächliche funktionelle Homologie nachzuweisen.

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion der MYB-Proteine *in planta* zu untersuchen, ist die Transformation von Apfelpflanzen zur genaueren Analyse in einem homologen System. Dazu werden meist Blätter durch Infiltration mit *A. tumefaciens* transformiert und aus diesem Pflanzenmaterial Schößlinge gezogen, die das transformierte Gen tragen. Es ist zwar möglich, *M. x domestica knock-out* Pflanzen zu erzeugen, allerdings ist diese Methode sehr zeitintensiv, so dass meist Überexpressions-Pflanzen erzeugt werden. Sollten die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren tatsächlich die Proanthocyanidin-Synthese regulieren, wäre also in den transformierten Pflanzen eine erhöhte Akkumulation von Proanthocyanidinen zu erwarten.

#### **4.2 Die Expression von Strukturgenen der Flavonoid-Biosynthese korreliert mit Enzymaktivität und Produktakkumulation in der Frucht**

Um einen genaueren Zusammenhang zwischen Genexpression, Enzymaktivität und Produktakkumulation in Fruchtgewebe zu erhalten, wurden diese drei Prozesse für die

Strukturgene *CHS* und *ANR* in den beiden Jahren 2006 und 2007 für das Kultivar Rewena, sowie für WeihRouge im Jahr 2007 ermittelt. Die Messung der Genexpression fand dabei im Rahmen dieser Arbeit statt, während Enzymaktivität und Produktakkumulation von Projektpartnern ermittelt wurden (siehe Abschnitt 3.3). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Rewena, als auch bei WeihRouge bei beiden untersuchten Genen eine Korrelation zwischen Expression, Enzymaktivität und Akkumulation von Stoffwechselprodukten vorliegt. Bei Material des Kultivars Rewena aus dem Jahr 2006, sowie für das Kultivar WeihRouge war für beide untersuchte Gene Expression, Aktivität des entsprechenden Enzyms und Akkumulation der Produkte nach fünf bis sechs Wochen am höchsten, während die Werte mit zunehmender Fruchtreife wieder abnehmen. Das ist vor allem mit einem Verdünnungseffekt zu erklären, da mit fortschreitender Entwicklung ab etwa 35 bis 40 Tage nach voller Blüte die meisten Flavonoide synthetisiert sind und weitere Akkumulation nur noch in sehr geringem Maße stattfindet (Renard *et al.*, 2007), während gleichzeitig noch weiteres Fruchtwachstum zu beobachten ist. Eine Ausnahme stellt die *ANR* im Jahr 2006 bei Rewena dar, die nach acht Wochen ein zusätzliches Maximum aufweist. Wie schon unter 4.1.2 erwähnt, ist hier eventuell ein Hagelsturm die Erklärung, da Proanthocyanidine auch als Schutz gegen Umwelteinflüsse fungieren. Zu erwarten wäre dann jedoch auch ein Anstieg der Enzymaktivität und damit verbunden eine erhöhte Produktbildung, was nicht zu erkennen war. Auch dies ist möglicherweise durch den bereits genannten Verdünnungseffekt erklärbar, eventuell waren hier Aktivität und Akkumulation nicht hoch genug für einen Nachweis. Für das Rewena-Material von 2007 war zu beobachten, dass schon zwei bis drei Wochen nach voller Blüte die Werte für Enzymaktivität und Produktakkumulation im Vergleich zur Expression sowohl bei *CHS* als auch bei *ANR* ein Maximum aufweisen. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied zu Material aus dem Jahr 2006 könnte eine unterschiedlich schnelle Entwicklung der Früchte aufgrund abweichender Witterungsbedingungen sein, was zur Folge hatte, dass die entsprechenden Zeitpunkte in der Entwicklung nur annähernd aufeinander abgeglichen werden konnten. Da jedoch *CHS* und *ANR* 2007 in allen drei untersuchten Stoffwechselvorgängen einen ähnlichen zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier eine Korrelation vorliegt.

#### 4.2.1 Weiterführende Experimente

Für die zwei Strukturgene *CHS* und *ANR* konnte gezeigt werden, dass Expression, Enzymaktivität und Produktakkumulation miteinander korreliert sind. Da für weitere Strukturgene wie *CHI*, *F3H*, *DFR*, *LDOX* und *UFGT* gezeigt werden konnte, dass höchstwahrscheinlich eine koordinierte Expression vorliegt (Tako *et al.*, 2007), wäre es von Interesse ob für diese Gene ebenfalls eine Korrelation von Expression, Aktivität und Produktbildung vorliegt. Dadurch könnten weiterhin genauere Einblicke auf die zeitliche

Aktivität der entsprechenden Gene in der Frucht und den Entwicklungsverlauf bezüglich der Flavonoid-Akkumulation gewonnen werden. Gerade im Hinblick auf die Synthese von Anthocyanen ist eine genauere Untersuchung der für diesen Teil des Stoffwechselwegs verantwortlichen Strukturgene im Kultivar WeihRouge interessant, da hier aufgrund des roten Fruchtfleischs eine erhöhte Expression von Anthocyan-spezifischen Genen zu erwarten wäre. Insbesondere die Frage, ob mit höherer Expression auch eine erhöhte Enzymaktivität erfolgt, könnte so geklärt werden. Analog gelten diese Überlegungen natürlich auch für Kultivare mit im Vergleich erhöhtem Proanthocyanidingehalt.

### **4.3 *MdMYB10* ist ein Regulator der Anthocyan-Biosynthese im Apfel**

Analog zur Akkumulation der Proanthocyanidine wird auch die Synthese der Anthocyane in verschiedenen Organismen wie *A. thaliana* (Borevitz *et al.*, 2000; Tohge *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008), *V. vinifera* (Walker *et al.*, 2007; Azuma *et al.*, 2008) oder der Süßkartoffel *Ipomoea batatas* (Mano *et al.*, 2007) durch die Aktivität eines MYB-Transkriptionsfaktors kontrolliert. Dabei wird angenommen, dass auch hier die Bildung eines Aktivierungskomplexes, bestehend aus MYB- und BHLH-Partner sowie TTG1 als stabilisierendes Element vorliegt (Zimmermann *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008). Hinweise auf die Bildung eines solchen Komplexes wurden in verschiedenen Rosaceen ebenfalls gezeigt (Wang *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010).

Im Apfel werden Anthocyane fast ausschließlich in der Fruchtschale synthetisiert, was optisch anhand der roten Färbung ersichtlich ist. Als Regulatoren dieser Synthese wurden bislang drei Gensequenzen identifiziert, die alle für ein R2R3-MYB Protein kodieren und als *MdMYB1*, *MdMYBA* und *MdMYB10* bezeichnet wurden. Für alle drei Faktoren konnte Aktivität in roter Fruchtschale gezeigt werden, während in grüner Fruchtschale die Genexpression signifikant geringer war (Tako *et al.*, 2006b; Ban *et al.*, 2007; Espley *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde für *MdMYB10* ebenfalls Expression in rotem Fruchtgewebe nachgewiesen (Espley *et al.*, 2007). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich bei allen drei isolierten Sequenzen um Allele des selben Gens handelt (Wang *et al.*, 2010) und dass der Grund für eine stärkere Expression in rotem Gewebe nicht aufgrund von Unterschieden in der DNA-Sequenz des Gens, sondern in der Struktur des Promoters begründet ist. So zeigt der Promoter von *MdMYB10* im roten Kultivar Red Field eine Reihe von fünf Sequenz-Wiederholungen, die jeweils aus 23 Basenpaaren bestehen und eine Minisatelliten-ähnliche Struktur bilden, während diese Struktur in Kultivaren mit weißem

Fruchtfleisch nicht vorhanden ist (Espley *et al.*, 2009). Dabei bindet *MdMYB10* an diese 23 Bp-Sequenz, was zu einer Transaktivierung und erhöhter *MYB10*-Expression führt.

Auf Basis dieser *MYB10*-Sequenz aus dem Kultivar Royal Gala wurden Primer entworfen und die korrespondierende Gensequenz aus dem in dieser Arbeit verwendeten Kultivar Rewena per PCR isoliert und analog ebenfalls als *MdMYB10* bezeichnet. Die aus der erhaltenen DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt im Vergleich zum Protein aus Royal Gala sowie zu den möglichen Allelen MYBA und 1 nur einen Unterschied von einer Aminosäure und gruppiert wie erwartet bei phylogenetischen Untersuchungen zusammen mit bekannten Regulatoren der Anthocyan-Biosynthese wie zum Beispiel *AtMYB75*, *AtMYB90* oder *VvMYBA1* (Abbildung 3.1).

Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz zeigte wie schon bei *MdMYB9* und 11 die erwartete hohe Konservierung im N-terminalen Bereich der zwei MYB-Wiederholungen, der weiterhin die bHLH-Interaktionsdomäne in der zweiten Wiederholung beinhaltet. Am C-terminalen Ende ist im Vergleich dazu geringe Ähnlichkeit vorhanden, allerdings ist ein für Anthocyan-Regulatoren typisches Motiv [K/R]PRPR[S/K]F zu erkennen, für das jedoch bisher noch keine eindeutige Funktion ermittelt werden konnte. Für den Anthocyan-Regulator *MYB75* aus *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass im C-terminalen Teil eine Aktivierungsdomäne bestehend aus 16 Aminosäuren vorhanden ist, wobei der Position 207 besondere Bedeutung zukommt. Ein Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Alanin resultierte in einer Verminderung der Aktivierungsfähigkeit um fast zwei Drittel (Ruhe, 2007). In *MdMYB10* ist an dieser Position die ähnliche Asparaginsäure zu finden, so dass hier möglicherweise ebenfalls ein Aktivierungsbereich vorliegen könnte.

#### **4.3.1 *MdMYB10* ist in rotem Fruchtgewebe während der Fruchtentwicklung exprimiert**

Aufgrund der geringen Expression der bisher charakterisierten Anthocyan-Regulatoren aus *M. x domestica* in weißem Fruchtmaterial wurde neben dem Kultivar Rewena die Expression von *MdMYB10* durch RT-PCR ebenfalls im Kultivar WeihRouge ermittelt, das charakteristisch rot gefärbtes Fruchtgewebe aufweist (Abbildung 3.4). Untersucht wurden wie schon für *MdMYB9* und 11 sechs unterschiedliche Fruchtentwicklungsstadien im Alter von zwei bis sieben Wochen nach voller Blüte. Tatsächlich war in WeihRouge wie erwartet in allen untersuchten Fruchstadien starke *MYB10*-Aktivität zu erkennen, während in Rewena nur geringe Mengen an Transkript detektierbar waren (Abbildung 3.5). Unterschiede in der Transkriptmenge bei den einzelnen Entwicklungsstadien waren mittels RT-PCR nicht zu erkennen, was vermutlich in der nicht ausreichenden Sensitivität begründet ist. Für *MdMYB10* konnte mit qPCR-Versuchen gezeigt werden, dass die Expression vor allem in den späten Entwicklungsstadien des Kultivars Red Field zunimmt, was vor allem mit der

Aktivität der Anthocyan-spezifischen Strukturgene korreliert (Espley *et al.*, 2007). RT-PCR Experimente zeigten auch hier zu geringe Sensitivität.

Weiterhin war in WeihRouge eine geringere Expression des putativen Proanthocyanidin-Regulators *MdMYB11* zu erkennen. Dies ist möglicherweise durch Substratkompetition bei den Strukturgenen zu erklären, da Intermediate des Flavonoid-Stoffwechsels sowohl für Anthocyan- als auch für die Proanthocyanidin-Synthese benötigt werden. Da in rotem Gewebe deutlich mehr Anthocyane gebildet werden als in weißem und dafür die Proanthocyanidin-Gesamtmenge abnimmt, zeigen die Anthocyan-spezifischen Strukturgene deutlich höhere Aktivität (Tako *et al.*, 2006a; Espley *et al.*, 2007), was möglicherweise eine geringere Expression der Proanthocyanidin-Regulatoren verursacht.

Aufgrund dieser Ergebnisse und da für die nahezu identischen Sequenzen *MdMYBA* und *MdMYB1* in Fruchtschale, sowie für die *MdMYB10*-Sequenz aus dem Kultivar Red Field in Fruchtgewebe eine regulatorische Funktion in der Anthocyan-Biosynthese gezeigt wurde, kann vermutet werden, dass es sich bei der in dieser Arbeit untersuchten MYB-Sequenz aus Rewena ebenfalls um einen Anthocyan-Regulator handelt.

#### **4.3.2 *MdMYB10* aktiviert den *A. thaliana DFR*- Promoter in Kombination mit Kofaktoren**

Wie bereits weiter oben erwähnt, bilden auch die MYB-Regulatoren der Anthocyan-Biosynthese in verschiedenen Organismen einen Aktivierungskomplex mit einem bHLH- und einem WD-repeat-Kofaktor. Espley *et al.* (2007) konnten zeigen, dass *MdMYB10* dabei mit einem bHLH-Faktor, der ebenfalls aus *M. x domestica* isoliert wurde und Ähnlichkeit zu *AtBHLH42* (TT8) aufweist, interagiert. Weiterhin war die Fähigkeit von *MdMYB10*, in transient transformierten Tabakblättern den *DFR*-Promoter zu aktivieren, von der Anwesenheit dieses bHLH-Faktors abhängig. Mit einem weiteren bHLH-Protein aus dem Apfel, das größere Ähnlichkeit zu *AmDELILA* zeigt, war ebenfalls eine Komplexbildung zu erkennen, hier war jedoch die Aktivierung des *DFR*-Promoters deutlich geringer. Der in roter Apfelschale als Regulator der Anthocyan-Biosynthese charakterisierte Transkriptionsfaktor *MdMYBA* war in der Lage, den *MdDFR*-Promoter zu aktivieren, wenn beide in Weinreben-Zellen koinzidiert wurden (Tako *et al.*, 2006b).

Der im Rahmen dieser Arbeit isolierte Faktor *MdMYB10* wurde in der At7-Zellsuspensionskultur ebenfalls auf die Fähigkeit, an mögliche homologe Zielpromotoren zu binden und diese zu aktivieren, getestet. Es zeigte sich, dass *MdMYB10* dabei in der Lage war, den *A. thaliana DFR*-Promoter zu aktivieren, während keine Aktivierung der *CHS*-, *LDOX*- und *BAN*-Promotoren zu erkennen war (Abbildung 3.7 A-D). Wie zu erwarten war *MdMYB10* dabei von einem bHLH-Kofaktor (*BHLH42*) als Komplexpartner abhängig. Obwohl gezeigt werden konnte, dass *AtMYB75* und in geringerem Maße auch *MYB90* zusammen mit

einem bHLH-Protein als Kofaktor den *AtCHS*-Promoter aktivieren (Heim, 2003; I. Appelhagen, unveröffentlicht) war für *MdMYB10* keine Aktivierung des Promoters zu erkennen. Möglicherweise ist auch hier, ähnlich wie schon beim putativen Proanthocyanidin-Regulator *MdMYB11*, eine verminderte Bindungsfähigkeit an den *AtCHS*-Promoter aufgrund zu großer Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu *AtMYB75* oder *AtMYB90* der Grund, so dass keine Aktivierung mehr vermittelt werden kann.

#### **4.3.3 *A. thaliana* MYB75 knock-out Mutanten werden durch transiente Transformation mit *MdMYB10* funktional komplementiert**

Um den Regulationsmechanismus von *MdMYB75* *in planta* genauer zu analysieren, wurden Keimlinge von *A. thaliana* *MYB75* knock-out Pflanzen mit *MdMYB10* unter Kontrolle des 35S-Promoters transient transformiert. Mutante Pflanzen zeigen eine deutlich reduzierte Anthocyanakkumulation auf saccharose-haltigem Medium, das bei Wildtyp-Pflanzen die Transkription von *MYB75* induziert (Teng *et al.*, 2005) und somit zu einer höheren Anthocyan-Produktion führt. Transient mit *MdMYB10* transformierte Keimlinge zeigten bei Anzucht auf MS-Medium mit 4% Saccharose eine deutliche Akkumulation von Anthocyanen im Hypokotyl, die dem des Wildtyps entsprach (Abbildung 3.8). Eine ähnliche Induktion der Anthocyan-Biosynthese konnte auch für die anderen, vermutlich allelischen Sequenzen *MdMYBA* und *MdMYB1* gezeigt werden. So war *MdMYBA* in der Lage, bei Überexpression in Tabakblättern, sowie in Kotyledonen und –blütenblättern von *Malus x domestica* deutliche Anthocyan-Akkumulation hervorzurufen, die in untransformiertem Gewebe in beiden Organismen nicht erkennbar war (Ban *et al.*, 2007). Überexpression von *MdMYB1* in *A. thaliana* resultierte in erkennbarer Anthocyanbildung in reifenden Samen (Tako *et al.*, 2006b). Der aus dem Kultivar Red Field isolierte *MdMYB10*-Transkriptionsfaktor vermittelte bei Überexpression in Apfelexplantaten und den daraus gezogenen Schößlingen einen deutlichen Anstieg des Anthocyan Gehaltes (Espley *et al.*, 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann daher angenommen werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit isolierte Faktor *MdMYB10* ebenfalls ein Allel der drei bisher charakterisierten Anthocyan-Regulatoren aus *Malus x domestica* ist, da es nicht nur funktionelle Übereinstimmung zeigt, sondern auch auf DNA- und Aminosäureebene nahezu identisch ist.

#### **4.3.4 Fortführende Untersuchungen zur Rolle von *MdMYB10***

Für die beiden putativen Proanthocyanidin-Regulatoren *MdMYB9* und 11 konnte bereits gezeigt werden, dass sie mit einem TTG1-Homolog aus dem Apfel interagieren. Da davon ausgegangen werden kann, dass *MdMYB10* ebenfalls einen solchen stabilisierenden Kofaktor benötigt, wäre ein Interaktionstest in der *At7*-Zellsuspensionskultur eine weitere Möglichkeit, die Bildung des MYB/bHLH/TTG1-Komplexes im Apfel genauer zu

charakterisieren. Da bereits von Takos *et al.* (2006b) nachgewiesen wurde, dass *MdMYB10* mit bHLH-Faktoren aus dem Apfel interagiert, würde ein solcher Test zum ersten Mal die Bildung des Aktivierungskomplexes aus drei Apfel-Transkriptionsfaktoren zeigen, wenn zusätzlich an Stelle von *AtBHLH42* das entsprechende Homolog aus *M. x domestica* verwendet wird. Zusätzlich stellt das Zellsuspensionssystem eine geeignete Möglichkeit dar, die Aktivierungsfähigkeiten dieses Komplexes bezüglich Apfel-Promotersequenzen genauer zu untersuchen, da nicht notwendigerweise eine Beschränkung auf *A. thaliana*-Promotoren gegeben ist. Zusätzlich könnte bei Verwendung der nativen *M. x domestica* *CHS*-Promotoren untersucht werden, ob *MdMYB10* tatsächlich nicht in der Lage ist, die Expression der *CHS* zu regulieren und somit im Vergleich zu *A. thaliana* im Apfel eine unterschiedliche Regulation vorhanden ist, oder ob die fehlende Aktivierung des *AtCHS*-Promoters durch *MdMYB10* tatsächlich durch zu große Unterschiede entweder in der Aminosäurestruktur der beiden MYB-Regulatoren oder der DNA der jeweiligen Promotersequenzen begründet ist.

Vergleiche der *MdMYB10*-Promotoren eines Kultivars mit weißem Fruchtfleisch (Pacific Rose) und eines Kultivars mit roter Frucht (Red Field) zeigten, dass die unterschiedlich starke Expression des Regulators auf Unterschiede in der DNA-Sequenz des Promoters zurückzuführen ist. Verantwortlich ist dafür eine Minisatelliten-Struktur aus fünf Wiederholungen von 23 Bp Länge (Espley *et al.*, 2009), die nur bei Red Field vorhanden ist und eine Autoregulation verursacht. Da auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kultivar WeihRouge mit rotem Fruchtfleisch im Vergleich zum weißen Kultivar Rewena deutliche höhere *MdMYB10*-Expression zu erkennen ist, kann eine genauere Analyse der *MdMYB10*-Promotoren aus beiden Kultivaren möglicherweise Aufschluß darüber geben, ob diese Varianz in der Promotersequenz grundsätzlich für stärkere Expression des Regulators und die damit verbundene rote Fruchtfärbung verantwortlich ist, oder aber eine Ausnahme für Red Field darstellt.

Mittels transienter Transformation konnte bereits in Keimlingen von *A. thaliana* *MYB75* *knock-out* Pflanzen die grundsätzliche Rekonstituierung der Anthocyan-Produktion durch *MdMYB10* beobachtet werden. Genauere Erkenntnisse können jedoch bei stabiler Transformation von *A. thaliana* gewonnen werden, da hier sowohl adulte Pflanzen, als auch deren Nachkommen zur Analyse verwendet werden können. Zusätzlich können auch *MdMYB10*-Überexpressions-Pflanzen hergestellt werden, um zu untersuchen, ob sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei Überexpression des entsprechenden *A. thaliana*-Homologs erkennen lässt. Analog dazu wäre es auch möglich, die Funktion von *MdMYB10* durch Überexpression in Apfelpflanzen näher zu untersuchen. Tatsächlich konnte in Pilotexperimenten bereits gezeigt werden, dass *MdMYB10* in transformierten Apfel-Calli eine Rottfärbung induziert (I. Szankowski, Universität Hannover, persönliche Mitteilung).

## 4.4 *MdTTG1* ist ein funktionelles Homolog von *AtTTG1*

Neben den bereits beschriebenen *M. x domestica* MYB-Transkriptionsfaktoren wurde im Rahmen dieser Arbeit mit *MdTTG1* ein weiterer Regulator der Flavonoidbiosynthese untersucht, der zur Gruppe der *WD-repeat* Proteine gehört. Auf der Basis einer mRNA-Sequenz aus dem Kultivar McIntosh (GenBank-Eintrag AF220203) wurde per PCR die *MdTTG1*-Sequenz aus Blattmaterial des Kultivars Rewena isoliert und vollständig charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass *MdTTG1* nicht nur hohe Ähnlichkeit mit bekannten Regulatoren dieser Proteingruppe aufweist, sondern auch in Zellkulturexperimenten mit homologen Interaktionspartnern aus *A. thaliana* aktivierende Eigenschaften aufweist und in *TTG1 knock-out* Pflanzen eine vollständige Komplementation des mutanten Phänotyps verursacht.

### 4.4.1 *MdTTG1* ist ein Homolog anderer *WD-repeat* Proteine

Die phylogenetische Untersuchung der Aminosäuresequenz des isolierten Gens zeigte nahe Verwandtschaft von *MdTTG1* zu *WD-repeat* Proteinen von dikotylen Pflanzen wie der Baumwolle, Petunie, Levkoje, Rübsen, oder *A. thaliana*, für die die genaue Funktion von *TTG1* bereits gezeigt werden konnte. Zwei *WD-repeat* Proteine aus Weinrebe und Pappel gruppierten ebenfalls in dieser Gruppe, was die hohe Konservierung von *TTG1*-ähnlichen Proteinen in verschiedenen dikotylen Pflanzenfamilien wie Rosaceen, Brassicaceen, Malvaceen und Solanaceen verdeutlicht. Deutlich geringere Verwandtschaft wiesen Sequenzen aus monokotylen Pflanzen auf.

Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz zeigte insgesamt vier *WD*-Wiederholungen, die ebenfalls in bereits bekannten *TTG1*-Homologen zu finden sind (Walker *et al.*, 1999; Sompornpailin *et al.*, 2002; Humphries *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Diese vier Wiederholungen sind die minimale Anzahl für die Ausbildung eines funktionellen  $\beta$ -Faltblatt-Propellers (Yu *et al.*, 2000), einer Struktur, die bereits für *TTG1* aus *A. thaliana* und *P. frutescens* gezeigt wurde (Galway *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999; Sompornpailin *et al.*, 2002) und auch für Homologe aus Baumwolle und Mais erwartet wird (Carey *et al.*, 2004; Humphries *et al.*, 2005). Eine Funktion dieser *WD*-Propellerstruktur ist die Bildung einer stabilen Matrix, die reversible Komplexe mit weiteren Proteinen eingehen kann und die Koordination von Proteinkomplexen vermittelt (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). Eine ähnliche dreidimensionale Struktur kann also auch für *MdTTG1* vermutet werden, auch wenn ein Nachweis für eine derartige Struktur bisher ausgeblieben ist.

Weiterhin konnte kein Kernlokalisierungssignal in der Aminosäuresequenz von *MdTTG1* identifiziert werden, was eine Rolle als Regulator der Flavonoid-Biosynthese weiter stützt, da bei Bildung des ternären MYB/bHLH/*TTG1*-Komplexes *TTG1* in *A. thaliana* zunächst an das

bHLH-Protein im Cytoplasma bindet und dann erst in den Zellkern transportiert wird (Zhao *et al.*, 2008).

#### **4.4.2 *MdTTG1* ist in verschiedenen Apfelpgeweben exprimiert und zeigt eine genomische Struktur, die mit bekannten Homologen übereinstimmt**

Die Expression von *MdTTG1* wurde mittels RT-PCR in verschieden altem Fruchtgewebe, sowie Blättern und Blütenblättern ermittelt. Dabei zeigte sich, dass Transkript in sämtlichen untersuchten Geweben zu finden war. Zusätzliche Analysen von EST-Sequenzen aus GenBank (UniGene Mdo.2946) zeigten weiterhin, dass in weiteren Kultivaren *MdTTG1* auch in Blüten, Stamm und Wurzeln exprimiert ist. Ähnliche Expressionsmuster sind ebenfalls für *A. thaliana TTG1*, *PAC1* aus *Z.mays* und PfWD aus *P. frutescens* gezeigt worden (Walker *et al.*, 1999; Sompornpailin *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2004), was mit der Rolle von TTG1 als Regulator in einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen wie Trichom- und Wurzelhaarbildung, sowie der Flavonoid-Biosynthese erklärt werden kann.

Da bei der Kontrollreaktion der Expressionsanalyse mit genomischer DNA als Matrize ein DNA-Fragment amplifiziert wurde, das deutlich größer als die mit cDNA als Matrize erhaltenen PCR-Produkte war, konnte vermutet werden, dass in der genomischen Sequenz von *MdTTG1* mindestens ein Intron zu finden ist. Tatsächlich ergab die Sequenzierung der genomischen PCR-Produkte zwar einen einzelnen offenen Leserahmen, gefolgt von einer intronischen Sequenz, die im 3'-untranslatierten Bereich liegt. Diese strukturelle Organisation wurde bereits für *AtTTG1*, *P. frutescens PFWD*, *G. hirsutum TTG1*, *M. incana TTG1* und *PAC1* gezeigt (Walker *et al.*, 1999; Sompornpailin *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2004; Humphries *et al.*, 2005; Dressel und Hemleben, 2009), was ein weiterer Hinweis auf die nahe Verwandtschaft von *MdTTG1* zu den anderen WD-repeat Genen ist.

Obwohl *TTG1* in *A. thaliana*, *Z. mays*, *P. hybrida* und *M. truncatula* nur in einer Kopie im Genom vorliegt (de Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999; Carey *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2009), zeigte die genomische DNA-Gel-Blot-Analyse, dass vermutlich mindestens zwei *TTG1*-Kopien im Apfelgenom vorhanden sind. Ein ähnliches Muster der Kopienzahl zeigt die Baumwolle, wo ebenfalls zwei *TTG1*-Kopien identifiziert werden konnten und zusätzlich zwei weniger verwandte *TTG1*-ähnliche Sequenzen vorhanden sind, was durch das tetraploide Baumwolle-Genom erklärt werden kann (Humphries *et al.*, 2005). Alle bekannten Strukturgene der Flavonoidbiosynthese liegen im Apfel in mehreren Kopien vor (Takos *et al.*, 2006a; Fischer *et al.*, 2006, Frank *et al.*, 2010), und auch der als Anthocyan-Regulator identifizierte MYB-Faktor *MdMYBA* weist mehrere Kopien im Genom auf (Ban *et al.*, 2007). Das Genom im Kultivar Rewena liegt hingegen in diploider Form vor (Andreas Peil, JKI Dresden, persönliche Mitteilung), so dass hier zwar möglicherweise weniger Genkopien als in anderen Kultivaren auftreten, trotzdem entspricht dieses Ergebnis den Untersuchungen zu

anderen in der Flavonoid-Biosynthese involvierten Genen, da auch in den Kultivaren M9 und Royal Gala EST-Sequenzen zeigen, dass mindestens zwei verschiedene *TTG1*-Sequenzen in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden.

#### 4.4.3 *MdTTG1* interagiert mit MYB- und bHLH-Proteinen

Es wurde bereits darauf eingegangen, dass *MdTTG1* aufgrund der vier WD-Wiederholungen, die ebenfalls in allen verwandten Proteinsequenzen zu finden waren, vermutlich eine ähnliche Rolle als Vermittler bei der Formation von Proteinkomplexen spielt. Aus *A. thaliana* ist bereits bekannt, dass *TTG1* zusammen mit einem MYB- und bHLH-Faktor einen ternären Aktivierungskomplex bildet und dabei als stabilisierendes Element fungiert. Dabei wird in *A. thaliana* der *BAN*-Promoter durch diesen ternären Komplex aktiviert, wobei die Stärke der Aktivierung von der *TTG1*-Expression abhängt (Baudry *et al.*, 2004). Eine ähnliche Interaktion mit bHLH- und MYB-Transkriptionsfaktoren konnte ebenfalls für das *AfTTG1*-Homolog *PFWD* aus *P. frutescens* gezeigt werden (Sompornpailin *et al.*, 2002).

Die Fähigkeit von *MdTTG1*, ebenfalls mit R2R3-MYB- und bHLH-Faktoren zu interagieren und den *A. thaliana*-Promoter zu aktivieren, wurde in der At7-Zellsuspensionskultur näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *MdTTG1* in diesen Zellkulturexperimenten das native *AfTTG1* vollständig ersetzen konnte (Abbildung 3.13). Bei Untersuchung des von Baudry *et al.* (2004) beschriebenen Dosiseffektes auf den *BAN*-Promoter war zusätzlich zu erkennen, dass dieser bei Verwendung von *MdTTG1* deutlich stärker war als bei Kotransfektion von *AfTTG1*. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass im Apfel *TTG1* analog zu *A. thaliana* ebenfalls eine Rolle als Stabilisator eines ternären Komplexes zukommt. Zur genaueren Untersuchung dieser Fragestellung wurde der bisher in diesem Experiment verwendete Proanthocyanidin-Regulator *AfMYB123* gegen die beiden weiter oben schon genauer beschriebenen putativen MYB123 Homologe *MdMYB9* und 11 ausgetauscht. Tatsächlich war *MdTTG1* in der Lage, mit beiden Apfel-MYBs bei Kotransfektion von *AfBHLH42* einen Komplex zu bilden und den *BAN*-Promoter zu aktivieren. Dabei zeigte im Falle von *MdMYB9* der Komplex stärkere aktivierende Fähigkeiten als bei Verwendung von *AfMYB123*, was möglicherweise mit der verbesserten Vermittlung der Komplexbildung durch *MdTTG1* aufgrund der Verwendung zweier Apfelfaktoren zu begründen ist. Es ist dabei denkbar, dass *MdTTG1* besser an den Apfel-MYB binden kann, da beide aus dem selben Organismus stammen.

Weitere potentielle Interaktionspartner wurden mit *MdMYB1*, A und 10 als homologe Proteine von *AfMYB75* im Rahmen dieser Arbeit bereits genannt. Da in *A. thaliana* die Biosynthese von Anthocyanen ebenfalls durch den Komplex aus MYB/bHLH/*TTG1* reguliert wird, ist anzunehmen, dass dies in *M. x domestica* auch der Fall ist.

Diese Beobachtungen in Verbindung mit der hohen Konservierung der verschiedenen TTG1-Homologe lassen eindeutig den Schluß zu, dass dieser ternäre Komplex nicht nur in *A. thaliana* oder *P. frutescens* zu finden ist, sondern auch in weiteren Organismen wie dem Apfel.

#### 4.4.4 ***MdTTG1* komplementiert funktional *A. thaliana ttg1-1* Mutanten**

Um zu überprüfen, ob der isolierte WD-repeat Faktor *MdTTG1* nicht nur zur Interaktion mit potentiellen Komplexpartnern und Aktivierung möglicher homologer Ziel promotoren in der Lage ist, wurde zusätzlich die Funktion durch Komplementation von *A. thaliana ttg1-1* Mutanten untersucht. Dazu wurden die mutanten Pflanzen per *floral dipping* durch Infiltration mit *A. tumefaciens* stabil mit dem Apfel-TTG1 unter Kontrolle des nativen *A. thaliana* TTG1-Promoters transformiert. *A. thaliana* Pflanzen zeigen im Falle des *TTG1*-Defekts keine Proanthocyanidin-Akkumulation im Endothel der Samenschale was zu gelblich gefärbten Samen und dem TRANSPARENT TESTA-Phänotyp führt. Keimlinge mutanter Pflanzen akkumulieren weiterhin keine Anthocyane im Hypokotyl und auch adulte Pflanzen zeigen unter Zuckerstreß keine Anthocyan-Biosynthese (Koornneef *et al.*, 1981; Walker *et al.*, 1999). Grund für diese Phänotypen ist die nicht funktionelle Bildung des ternären Komplexes, da hier TTG1 als stabilisierendes Element fehlt. Zwar ist TTG1 für eine kurzfristige Bindung des MYB/bHLH-Komplexes an den Zielpromoter nicht dringend notwendig, da FCS-Messungen zeigten, dass eine solche Bindung trotzdem möglich ist (Duettmann, 2008). In Zellkulturexperimenten ist für die Aktivierung des Promoters TTG1 hingegen notwendig, was offensichtlich auch in der Pflanze der Fall ist.

Transformierte Pflanzen wiesen eine Rekonstitution der Proanthocyanidin-Akkumulation im Samen auf, was in einer deutlichen Braunfärbung, die dem des Wildtyps nahe kommt, erkennbar ist. Ebenso konnte bei Anzucht von transgenen Keimlingen auf Saccharosehaltigem Medium die Biosynthese von Anthocyanen im Hypokotyl beobachtet werden, wobei photometrisch ermittelt werden konnte, dass die Menge an synthetisierten löslichen Anthocyanen dem des Wildtyps entspricht.

Weiterhin ist TTG1 als regulatorisches Protein an der Formierung von Trichomen und Wurzelhaaren beteiligt. In beiden Fällen geht TTG1 wie schon in der Flavonoid-Biosynthese einen Komplex mit einem MYB- und bHLH-Protein ein. Im Falle der Trichombildung sind dies GL1 (MYB) und GL3 (bHLH). Fehlt eines dieser Proteine, zeigen Blätter der mutanten Pflanzen einen sogenannten *glatten* Blattphänotypen ohne Trichome (Zhao *et al.*, 2008), da die Promoter der zu regulierenden Zielgene *GL2* und *TTG2* nicht aktiviert werden können. Bei Bildung der Wurzelhaare fungiert TTG1 als negativer Regulator zusammen mit GL3 und dem R2R3-MYB WEREWOLF, die zwar wie schon bei Ausbildung der Trichome die

Expression von *GL2* aktivieren, was jedoch in diesem Fall als Repressor die Wurzelhaarbildung hemmt (Masucci *et al.*, 1996; Bernhardt *et al.*, 2003).

Mutante *ttg1* Pflanzen zeigen dabei die Bildung von zusätzlichen Wurzelhaaren, die von atrichoblasten Zellen der Wurzelepidermis gebildet werden, in denen im Wildtyp aufgrund des beschriebenen Mechanismus die Bildung gehemmt wird.

Die mit *MdTTG1* transformierten Pflanzen zeigten hingegen sowohl Trichom-, als auch Wurzhaarwachstum, was dem des Wildtyps entsprach. Insgesamt war *MdTTG1* also in der Lage, sämtliche mutanten Phänotypen zu komplementieren, womit nachgewiesen werden konnte, dass *MdTTG1* tatsächlich ein funktionelles Homolog der verschiedenen *TTG1*-Gene ist.

Eine vollständige Komplementation des *A. thaliana ttg1*-Phänotyps konnte auch für *GhTTG1* und *BrTTG1* gezeigt werden (Humphries *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für *ZmPAC1* und *MtWD40-1* gemacht werden, allerdings zeigten *PAC1*- und *WD40-1* defiziente *Z. mays* und *M. truncatula* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in bezug auf Trichom- und Wurzelhaarwachstum (Carey *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2009). Zwar bildet der Apfel sowohl Wurzelhaare, als auch Trichome (Head, 1964; Lewis und Goodman, 1966), die Fähigkeit zur Wiederherstellung des Wildtyps durch *MdTTG1* in mutanten Arabidopsis-Pflanzen ist aber kein Nachweis für eine Rolle in der Regulation dieser Prozesse im Apfel, sondern wird vermutlich aufgrund der hohen Konservierung der Proteinsequenz vermittelt. Da DNA-Gel-Blot-Analysen auf mindestens zwei *TTG1*-Kopien im Apfelgenom schliessen lassen, liegt hier möglicherweise eine funktionelle Redundanz vor, wobei beide Genkopien zur Trichom- und Wurzelhaarbildung beitragen könnten. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch die bereits weiter oben beschriebene Expression von zwei unterschiedlichen *TTG1*-Sequenzen in unterschiedlichem Gewebe der Kultivare M9 und Royal Gala.

Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass *MdTTG1* im Apfel ebenso einen ternären Komplex bildet wie von Baudry *et al.* (2004) beschrieben und in Blättern und Blüten sowie in rotem Fruchtgewebe wahrscheinlich die Anthocyan-Synthese reguliert, während im Fruchtfleisch die Proanthocyanidin-Akkumulation von *TTG1* gesteuert wird. Eine Rolle in der Trichom- und Wurzelhaarbildung ist ebenfalls zu vermuten, konnte aber bislang nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

#### 4.4.5 Weitere Untersuchungen zur Funktion von TTG1 in *M. x domestica*

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse konnte nicht vollständig geklärt werden, ob *MdTTG1* ebenfalls in der Regulation von Wurzelhaar- und Trichombildung involviert ist. Eine mögliche regulatorische Funktion könnte hierbei zunächst bei Zellkulturexperimenten weiter untersucht werden. Da die die Fähigkeit der Komplexbildung von *MdTTG1* mit den in diesen Vorgängen beteiligten *A. thaliana* MYB- und bHLH-Faktoren GL1, GL3 sowie WEREWOLF im Falle der Wurzelhaarbildung aufgrund der Ergebnisse der Komplementation in *A. thaliana ttg1* Mutanten zu erwarten ist, könnten stattdessen die entsprechenden homologen Sequenzen aus dem Apfel isoliert und kotransfiziert werden. Zudem wäre es auch möglich, putative Zielpromotoren aus dem Apfel zu verwenden, wie schon bei den weitergehenden Untersuchungen zu den MYB-Faktoren 9, 10 und 11 beschrieben.

Ebenfalls kann auch die Rolle von *MdTTG1* in der Anthocyan-Regulation genauer untersucht werden. *MdTTG1* komplementierte die mutanten Pflanzen zwar hinsichtlich des Anthocyan-Phänotyps, die genaue Interaktion mit den dafür notwendigen Komplexpartnern wurde aber bisher in der Zellkultur nicht gezeigt. Zusätzlich kann bei diesen Kotransfektionen auch das bereits beschriebene mögliche *AtBHLH42*-Homolog *MdBHLH3* verwendet werden, um ausschließlich Faktoren aus dem Apfel zu verwenden um so den möglicherweise *in planta* vorkommenden Aktivierungskomplex nachzuempfinden, was verbesserte Aussagen über den genauen Ablauf der Komplexbildung und Promoteraktivierung zulässt.

Die genaue Rolle von *MdTTG1* in den verschiedenen Prozessen kann jedoch am besten durch Komplementation bzw. Überexpression in Apfelpflanzen nachgewiesen werden. In *A. thaliana* zeigen Überexpressionspflanzen einen Expressionsanstieg der von *AtTTG1* koregulierten Strukturgene *DFR* und *LDOX* sowie des Kofaktors *BHLH42* (Gonzalez *et al.*, 2008). Bei der erwarteten Rolle von *MdTTG1* bei der Flavonoidbiosynthese im Apfel sollten also auch hier bei *knock-out* Mutanten eine Wiederherstellung der Flavonoidakkumulation zu erkennen sein, während bei Überexpressionspflanzen verstärkte Expression von Zielgenen und möglicherweise damit einhergehende größere Anthocyan- und Proanthocyanidin-Mengen als Ergebnis einer solchen Studie erwartet werden könnten.

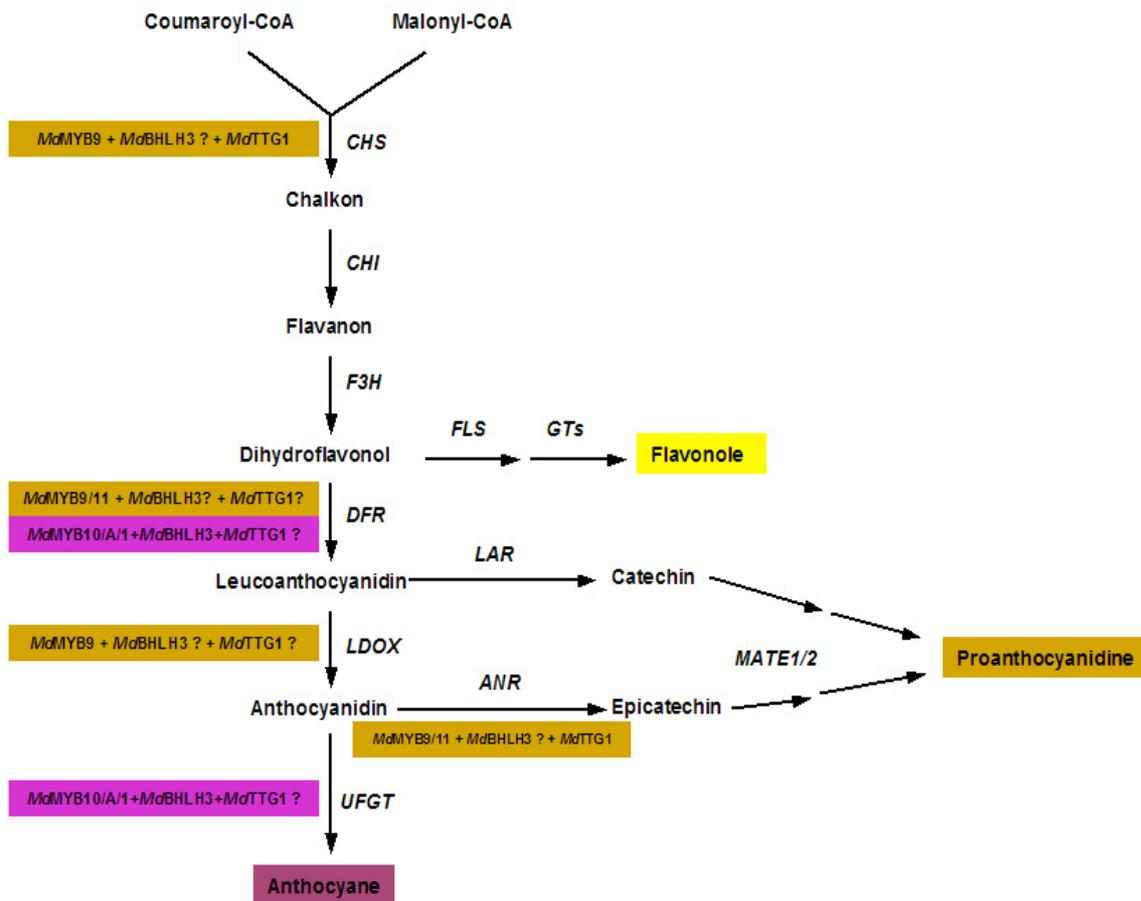
## 4.5 Ausblick

Weitere Fragestellungen und experimentelle Ansätze, die sich aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stellen, sind bereits in den entsprechenden Abschnitten detailliert angesprochen worden.

Insgesamt lassen die gezeigten Daten vermuten, dass die Flavonoidbiosynthese im Apfel zumindest größtenteils ähnlich zu der aus bereits besser untersuchten Organismen verläuft. Die wichtigsten Strukturgene des Stoffwechselweges sind bereits beschrieben und genauer untersucht worden, während Gene mit regulatorischer Funktion bisher bis auf wenige Ausnahmen unbekannt sind (siehe auch Abschnitt 1.3.1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für *MdTTG1* gezeigt werden, dass es sich um ein funktionelles Homolog zu bekannten WD-repeat Proteinen handelt, die in anderen Organismen in der Regulation der Flavonoidbiosynthese involviert sind. Mit *MdMYB9* und 11 wurden zwei Proteine, die zu den MYB-Transkriptionsfaktoren zählen, als mögliche Proanthocyanidin-Regulatoren näher untersucht, während die Rolle des bereits charakterisierten Faktors *MdMYB10* als Anthocyan-Regulator bestätigt werden konnte. Einen Überblick über bekannte und zumindest vermutete Transkriptionsfaktoren in der Flavonoid-Biosynthese von *Malus x domestica* ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Grundsätzlich ist es ein vielversprechender Ansatz, Kandidatengene über Funktionstests in bekannten Systemen wie der hier verwendeten Zellsuspensionskultur oder auch durch Komplementationsversuche zu charakterisieren. Absolute Aussagen über die genaue Rolle der zu untersuchenden Gene kann jedoch nur ein Funktionstest im homologen System erbringen, beispielsweise eine Komplementation von Apfelmutanten.

Interessant sind die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auch aus industrieller bzw. wirtschaftlicher Sicht. Der Kulturapfel ist weltweit mit mehr als 70 Millionen Tonnen an Produktionsmenge eine der wichtigsten industriell angebauten Früchte, so dass genauere Kenntnisse über Stoffwechselforgänge von größerem Interesse für Züchter und Verbraucher sind. Weiterhin konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass vor allem Flavonoide gesundheitsfördernde Eigenschaften haben (siehe Abschnitt 1.3), so dass weitere Untersuchungen bezüglich der genauen Abläufe innerhalb der Flavonoidbiosynthese auch aus medizinischer Hinsicht von Relevanz sind. Ein genaueres Verständnis der Vorgänge bei der Akkumulierung von Flavonoiden stellt also die Basis für die Zucht von Früchten dar, deren Flavonoidgehalt so mit Blick auf die menschliche Gesundheit optimiert werden kann. Aufgrund der kürzlich erfolgten vollständigen Sequenzierung des Apfelgenoms (Velasco *et al.*, 2010) sind daher weitere Untersuchungen zu diesem bisher im Apfel kaum aufgeklärten Stoffwechselforgang zu erwarten, da die Identifizierung von Faktoren, die in der Synthese von Flavonoiden beteiligt sind deutlich vereinfacht wird.



#### Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese im Kulturapfel

Für Enzyme kodierende Strukturgene sind kursiv dargestellt. Für die Anthocyan-Synthese spezifische Transkriptionsfaktor-Komplexe sind hellviolett unterlegt, während Proanthocyanidin-spezifische Komplexe hellbraun dargestellt sind. Zum besseren Verständnis wurde die Flavonoid-3'-Hydroxylase (*F3'H*) ausgelassen, die nach der Reaktion zu Dihydroflavonol mehrere Intermediate hydroxyliert. Regulatoren, deren Beteiligung am Regulationskomplex *in planta* nicht vollständig geklärt ist, sind zusätzlich mit einem Fragezeichen versehen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt vier Regulatoren der Flavonoidbiosynthese im Kukurapfel genauer analysiert. Drei untersuchte Regulatoren gehörten zur Klasse der R2R3-MYB-Faktoren. Analyse der Proteinsequenzen und phylogenetische Vergleiche zeigten, dass zwei der Faktoren, *MdMYB9* und *MdMYB11* hohe Ähnlichkeit mit *AtTT2*, einem spezifischen Regulator der Proanthocyanidin-Synthese. Der dritte putative Regulator *MdMYB10* wies hingegen Ähnlichkeit zu bekannten Anthocyanin-Regulatoren auf und enthielt ebenfalls das in *A. thaliana* für diese Regulatoren typische Motiv. Alle drei Regulatoren enthielten ebenfalls eine bHLH-Interaktionsdomäne, was ein weitere Hinweis auf eine regulatorische Funktion in der Flavonoidbiosynthese war.

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass *MdMYB9* in Kombination mit notwendigen Interaktionspartnern in der Lage war, die *A. thaliana*-Promoter der Strukturgene *CHS*, *DFR*, *LDOX* und *BAN* zu aktivieren. Die Aktivierungsfähigkeit von *MdMYB11* hingegen war auf die *DFR*- und in geringerem Masse, *LDOX*- und *BAN*-Promoter beschränkt, möglicherweise in der höheren Ähnlichkeit von *MdMYB9* zu *AtTT2* begründet. *MdMYB10* aktivierte ausschließlich den *AtDFR*-Promoter.

*MdMYB9* und *11* waren zusätzlich in der Lage, mit dem potentiellen Interaktionspartner *MdTTG1* den *AtBAN*-Promoter zu aktivieren, auch hier zeigte *MdMYB9* ein höheres Aktivierungspotential.

Die Rolle von *MdMYB10* als Regulator der Anthocyanin-Synthese wurde durch eine transiente Komplementation von *pap1*-Mutanten untersucht. Transgene Keimlinge dabei bei Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium deutliche Anthocyanin-Akkumulation im Hypokotyl auf, was eine mögliche Funktion von *MdMYB10* als möglicher Anthocyanin-Regulator in *M. x domestica* weiter unterstrich.

Ein weiterer untersuchter Regulator war *MdTTG1*, der zur Gruppe der WD40-Proteine gehört. Die vorliegende Proteinsequenz zeigte hohe Übereinstimmung mit weiteren Proteinen aus anderen dikotylen Pflanzen, die funktionell bereits charakterisiert wurden. Weiterhin gruppierte *MdTTG1* mit den entsprechenden Proteinen in phylogenetischen Untersuchungen. *MdTTG1* zeigte ebenfalls die für diese Proteingruppe typischen WD-Wiederholungen, welche für die Funktion als Stabilisator während der Formierung von Proteinkomplexen notwendig sind. Expressionsanalysen von *MdTTG1* in verschiedenen Geweben zeigten eine nahezu ubiquitäre Expression in Blättern, Blütenblättern und verschiedenen Fruchtstadien, was mit der Funktion von *TTG1* in verschiedensten biologischen Prozessen wie die Ausbildung von Trichomen und Wurzelhaaren, der Akkumulation von Flavonoiden, aber auch der Bildung der Schleimkapsel von Samen in Übereinstimmung steht.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *MdTTG1* mit bHLH- und R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren in Zellkulturexperimenten interagiert und als Aktivator des *AtBAN*-Promoters fungieren konnte. Dabei war mit steigender *MdTTG1*-Expression ein Dosiereffekt zu erkennen, wodurch die Rolle von *MdTTG1* als stabilisierender Faktor deutlich wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass der aus *A. thaliana* bekannte ternäre Komplex aus TTG1 und jeweils einem bHLH- und MYB-Faktor auch im Apfel funktionell zu finden ist.

Phänotypisch wurde die Funktion von *MdTTG1* durch Komplementation entsprechender *A. thaliana*-Mutanten untersucht. *MdTTG1* war dabei in der Lage, die Mutanten bezüglich Trichom- und Wurzelhaarwachstum und der Akkumulation von Proanthocyanidinen in der Samenschale vollständig zu komplementieren. Die Messung des Anthocyanin-Gehaltes in transgenen Pflanzen ergab Werte, die denen von Wildtyp-Pflanzen entsprachen.

Zur genaueren Analyse des Flavonoid-Stoffwechselweges im Apfel wurde die Expression von ausgewählten Strukturgenen in verschiedenen Frucht-Entwicklungsstadien des Kultivars „Rewena“ aus zwei verschiedenen Jahren per qPCR ermittelt. Dabei zeigte sich, dass der Expressionsverlauf der Gene in beiden Jahren ein übereinstimmendes Muster zeigte, wobei die Genaktivität in den frühen Fruchtstadien am höchsten war und mit zunehmender Reife der Frucht abnahm. Analog dazu war auch der Expressionsverlauf von *MdMYB9*, mit hoher Aktivität in jüngeren Fruchtstadien. Die Expressionsergebnisse wurden mit Untersuchungen zu Enzymaktivität und Produktakkumulation (Daten von J.Pfeiffer und S.Guyot) abgeglichen und zeigten eine erkennbare Korrelation von Expression, Enzymaktivität und Produktmenge, die jeweils in den jüngeren Stadien am höchsten waren.

Zusätzlich wurde für die Strukturgene *CHS* und *ANR* im Kultivar „WeihRouge“ die gleiche Korrelation durchgeführt, die ebenfalls die schon in „Rewena“ erkennbaren Muster zeigte.

## 6. Literatur

- Akagi, T., Ikegami, A., Tsujimoto, T., Kobayashi, S., Sato, A., Kono, A. und Yonemori, K.** (2009). *DkMYB4* is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. *Plant Physiol* **151**, 2028-2045.
- Allan, A.C., Hellens, R.P. und Laing, W.A.** (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in plant science* **13**, 99-102.
- Almeida, J.R., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., de Vos, C.H., Deiml, B., Mourgues, F., Perrotta, G., Fischer, T.C., Bovy, A.G., Martens, S. und Rosati, C.** (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of biochemistry and biophysics* **465**, 61-71.
- An, G., Watson, B.D. und Chiang, C.C.** (1986). Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and Arabidopsis thaliana Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiol* **81**, 301-305.
- Appelhagen, I., Huet, G., Lu, G.H., Strompen, G., Weisshaar, B., Sagasser, M.** (2010). Weird fingers: functional analysis of WIP domain proteins. *FEBS letters* **584**, 3116-3122.
- Azuma, A., Kobayashi, S., Mitani, N., Shiraishi, M., Yamada, M., Ueno, T., Kono, A., Yakushiji, H. und Koshita, Y.** (2008). Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin. *Theoretical and applied genetics*. **117**, 1009-1019.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G. und Vinson, J.A.,** (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research* **523-524**, 87-97.
- Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H. und Moriguchi, T.** (2007). Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant cellular physiology* **48**, 958-970.
- Baranowkij, N., Froberg, C., Prat, S. und Willmitzer, L.** (1994). A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *The EMBO journal* **13**, 5383-5392.
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. und Lepiniec, L.** (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **39**, 366-380.
- Baudry, A., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2006). TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **46**, 768-779.
- Bernhardt, C., Lee, M.M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A. und Schiefelbein, J.** (2003). The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root. *Development* **130**, 6431-6439.

- Bjorn, S.P., Soltyk, A., Beggs, J.D. und Friesen, J.D.** (1989). PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Molecular and cellular biology* **9**, 3698-3709.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D. und Robinson, S.P.** (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol* **140**, 279-291.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Boyer, J. und Liu, R.H.** (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal* **3**:5
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Britsch, L., Heller, W. und Grisebach, H.** (1981). Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with enzyme systems from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung* **36c**, 742-750.
- Carey, C.C., Strahle, J.T., Selinger, D.A. und Chandler, V.L.** (2004). Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 450-464.
- Chagné, D., Carlisle, C.M., Blond, C., Volz, R.K., Whitworth, C.J., Oraguzie, N.C., Crowhurst, R.N., Allan, A.C., Espley, R.V., Hellens, R.P. und Gardiner, S.E.** (2007). Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC genomics* **8**:313.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Coart, E, van Glabeke, S., de Loose, M., Larsen, A.S. und Roldán-Ruiz, I.** (2006). Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the european wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular ecology* **15**, 2171-2182.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H.K., Jenkins, G.I. und Tonelli, C.** (2007). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P. und Bogs, J.** (2009). The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* **151**, 1513-1530.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1987). Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *The EMBO journal* **6**, 2551-2556.

- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M. und Koornneef, M.** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 403-414.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J., Leon-Kloosterziel, K.M. und Koornneef, M.** (2001). The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**, 853-871.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**, 2514-2531.
- de Hostos, E.L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. und Gerisch, G.** (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections has sequence similarities to G protein beta subunits. *The EMBO journal* **10**, 4097-4104.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Mérillon, J.M. und Hamdi, S.** (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* **140**, 499-511.
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.M., Robinson, S.P. und Barrieu, F.** (2008). The transcription factor *VvMYB5b* contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* **147**, 2041-2053.
- De Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J. und Koes, R.** (1997). The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes Dev* **11**, 1422-1432.
- Digiuni, S., Schellmann, S., Geier, F., Greese, B., Pesch, M., Wester, K., Dartan, B., Mach, V., Srinivas, B.P., Timmer, J., Fleck, C. und Hulskamp, M.** (2008). A competitive complex formation mechanism underlies trichome patterning on *Arabidopsis* leaves. *Molecular systems biology* **4**, 217-227.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. und Paiva, N.L.** (1996). Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review. *Gene* **179**, 61-71.
- Dixon, R.A., Xie, D.Y. und Sharma, S.B.** (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist* **165**, 9-28.
- Dressel, A. und Hemleben, V.** (2009). *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* and *TTG1*-like genes in *Matthiola incana* R. Br. and related Brassicaceae and mutation in the WD-40 motif. *Plant Biology* **11**, 204-212.
- Dubos, C., Le Gourrierec, J., Baudry, A., Huet, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Alboresi, A., Weisshaar B. und Lepiniec, L.** (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**, 940-953.

- Duettmann, V.** (2008). Analyse und Visualisierung eines R2R3-MYB / bHLH Transkriptionsfaktorkomplexes aus *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation an der biologischen Fakultät der Universität Bielefeld.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**, 1349.
- Elzebroek, T. und Wind, K.** (2008) Guide to cultivated plants. (Wallingford: CAB International).
- Espley, R.V., Hellens, R.P., Putterill, J., Stevenson, D.E., Kutty-Amma, S. und Allan, A.C.** (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal* **49**, 414-427.
- Espley, R.V., Brendolise, C., Chagné, D., Kutty-Amma, S., Green, S., Volz, R., Putterill, J., Schouten, H.J., Gardiner, S.E., Hellens, R.P. und Allan, A.C.** (2009). Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell* **21**, 168-183.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B. und Deshaies, R.J.** (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221-230.
- Feng, S, Wang, Y., Yang, S., Xu, Y. und Chen, X.** (2010). Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor *PyMYB10*. *Planta* **232**, 245-255.
- Fischer, T.C., Halbwirth, H., Meisel, B., Stich, K. und Forkmann, G.** (2006). Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* **15**, 223-230.
- Forkmann, G., De Vlaming, P., Spribille, R., Wiering, H. und Schram, A.W.** (1986). Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **41**, 179-186.
- Forkmann, G.** (1991). Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding* **106**, 1-26.
- Frank, S., Keck, M., Sagasser, M., Niehaus, K., Weisshaar, B. und Stracke, R.** (2010). Two differentially expressed *MATE* factor genes from apple complement the *Arabidopsis transparent testa12* mutant. *Plant Biology* (ahead of print).
- Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W. und Schiefelbein, J.W.** (1994). The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental biology* **166**, 740-754.
- Gasic, K., Hernandez, A. und Korban, S.S.** (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant molecular biology reporter* **22**, 437a-437g.

- Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J.M. und Lloyd, A.M.** (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **53**, 814-827.
- Grigorieva, G. und Shestakov, S.** (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology letters* **13**, 367-370.
- Gussow, D. und Clackson, T.** (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic acids research* **17**:4000
- Hahlbrock, K., und Ragg, H.** (1975). Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **166**, 41-46.
- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbiß, H.H., Herrera-Estrella, L. und Schell, J.** (1985). Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Molecular General Genetics* **199**, 161-168.
- Head, G.C.** (1964). A study of „exudation” from the root hairs of apple by time-lapse cinematomicrography. *Annual botany* **28**, 495-498.
- Heim, M.A.** (2003). Basische Helix-Schleifen-Helix Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*: Eine genomweite Studie zu Struktur und Funktion. Dissertation an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. und Bailey, P.C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology and evolution* **20**, 735-747.
- Heller, W. und Hahlbrock, K.** (1980). Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Archives of biochemistry and biophysics* **200**, 617-619.
- Hoekema, A., de Pater, B.S., Fellingner, A.J., Hooykaas, P.J.J. und Schilperoort, R.A.** (1984). The limited host range of an *Agrobacterium tumefaciens* strain extended by a cytokinin gene from a wide host range T-region. *The EMBO journal* **3**, 3043-3047.
- Hoeren, F.U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W.J. und Dennis, E.S.** (1998). Evidence for a role for *AtMYB2* in the induction of the *Arabidopsis alcohol dehydrogenase* gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics* **149**, 479-490.
- Hoey, T., Weinzierl, R.O., Gill, G., Chen, J.L., Dynlacht, B.D. und Tjian, R.** (1993). Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* **29**, 247-260.
- Holmes, D.S. und Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry* **114**, 193-197.
- Holton, T.A. und Cornish, E.C.** (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.

- Honda, C., Kotoda, N., Wada, M., Kondo, S., Kobayashi, S., Soejima, J., Zhang, Z., Tsuda, T. and Moriguchi, T.** (2002). Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant physiology and biochemistry* **40**, 955-962.
- Huep, G.** (2008). Untersuchungen zu Regulatoren der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*: Eine Studie zu neuen Funktionen bekannter Proteinklassen. Inaugural-Dissertation an der biologischen Fakultät der Universität Bielefeld.
- Humphries, J.A., Walker, A.R., Timmis, J.N. und Orford, S.J.** (2005). Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) gene. *Plant Mol Biol* **57**, 67-81.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H. und Watanabe, A.** (2001). G<sub>2</sub>/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant Cell* **13**, 1891-1905. Erratum in *The Plant Cell* **13**, 2159.
- Iwashina, T., Githiri, S.M., Benitez, E.R., Takemura, T., Kitajima, J. und Takahashi, R.** (2007). Analysis of flavonoids in flower petals of soybean near-isogenic lines for flower and pubescence color genes. *The Journal of heredity* **98**, 250-257.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. und Hirsh, D.** (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8447-8451.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. und Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO journal* **19**, 6150-6161.
- Johnson, C.S., Kolevski, B. und Smyth, D.R.** (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell* **14**, 1359-1375.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schaffner, A.R. und Saito, K.** (2003). UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43910-43918.
- Kim, S.H., Lee, J.R., Hong, S.T., Yoo, Y.G., An, G. und Kim, S.R.** (2003). Molecular cloning of and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. *Plant science* **165**, 403-413.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J. und Bishop, J.M.** (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**, 453-463.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. und Hirochika, H.** (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**:982.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. und Hirochika, H.** (2005). Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **74**, 196-203.

- König, P., Giraldo, R., Chapman, L. und Rhodes, D.** (1996). The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* **85**, 125-136.
- Koes, R., Verweij, W. und Quattrocchio, F.** (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* **10**, 236-242.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z. und Schell, J.** (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *The EMBO journal* **3**, 1029-1037.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular General Genetics* **204**, 383-396.
- Koornneef, M.** (1981). The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis information service* **18**, 45-51.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. und Weisshaar, B.** (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* **16**, 263-276.
- Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J. und Schilperoort, R.A.** (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**, 72-74.
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. und Dixon, R.A.** (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**, 215-224.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lee, K.W., Lee, S.J., Kang, N.J., Lee, C.Y. und Lee, H.J.** (2004). Effects of phenolics in empire apples on hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. *Biofactors* **21**, 361-365.
- Lee, M.M. und Schiefelbein, J.** (2001). Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 1539-1546.
- Lee, M.W., Qi, M. und Yang, Y.** (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Molecular plant-microbe interactions* **14**, 525-537.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. und Caboche, M.** (2006). Genetics and biochemistry of seed flavanoids. *Annual review of plant biology* **57**, 405-430.
- Lewis, S. und Goodman, R.N.** (1966). The glandular trichomes, hydathodes and lenticels of Jonathan apple and their relation to infection by *Erwinia amylovora*. *Journal of phytopathology* **55**, 352-358.

- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. und Last, R.L.** (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Li, S.F., Milliken, O.N., Pham, H., Seyit, R., Napoli, R., Preston, J., Koltunow, A.M. und Parish, R.W.** (2009). The Arabidopsis MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development and trichome morphogenesis. *Plant Cell* **21**, 72-89.
- Lipphardt, S., Brettschneider, R., Kreuzaler, F., Schell, J. und Dangl, J.L.** (1988). UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Anthirrhinum majus* chalcone synthase gene. *The EMBO journal* **7**, 4027-4033.
- Mano, H., Ogasawara, F., Sato, K., Higo, H. und Minobe, Y.** (2007). Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiol* **143**, 1252-1268.
- Marles, M.A., Ray, H. und Gruber, M.Y.** (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367-383.
- Masucci, J.D. und Schiefelbein, J.W.** (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. *Plant Cell* **8**, 1505-1517.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P. und Weisshaar, B.** (2005). The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 1083-1096.
- Mol, J., Jenkins, G.I., Schäfer, E. und Weiss, D.** (1996). Signal perception, transduction and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**, 525-557.
- Mol, J., Grotewold, E. und Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**, 212-217.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263-273.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Nakai, K. und Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in biochemical sciences* **24**, 34-36.
- Natorff, R., Piotrowska, M. und Paszewski, A.** (1998). The *Aspergillus nidulans* sulphur regulatory gene *SconB* encodes a protein with WD40 repeats and an F-Box. *Molecular & general genetics* **257**, 255-263.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. und Smith, T.F.** (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300.

- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2000). The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* **12**, 1863-1878.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2001). The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. und Nishimura, Y.** (1992). Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6428-6432.
- Pang, Y., Wenger, J.P., Saathoff, K., Peel, G.J., Wen, J., Huhman, D., Allen, S.N., Tang, Y., Cheng, X., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Sumner, L.W., Marks, M.D. und Dixon, R.A.** (2009). A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis but not for trichome development. *Plant Physiol* **151**, 1114-1129.
- Payne, C.T., Zhang, F. und Lloyd, A.M.** (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**, 1349-1362.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R. und Shirley, B.W.** (1997). Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. Further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes. *Plant Physiol* **113**, 1437-1445.
- Pelletier, M.K., Burbulis, I.E. und Winkel-Shirley, B.** (1999). Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Mol Biol* **40**, 45-54.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. und Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**:e36.
- Pfeiffer, J., Kühnel, C., Brandt, J., Duy, D., Punyasiri, P.A., Forkmann, G. und Fischer, T.C.** (2006). Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant physiology and biochemistry* **44**, 323-334.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L. und Debeaujon, I.** (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **17**, 2966-2980.
- Renard, C.M., Dupont, N. und Guillermin, P.** (2007). Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apple during fruit growth. *Phytochemistry* **68**, 1128-1138.
- Robinson, J.P., Harris, S.A. und Juniper, B.E.** (2001). Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant systematics and evolution* **226**, 35-58.

- Ruhe, N.** (2007). Funktionelle Substitutionsanalysen zur Untersuchung von R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.
- Sagasser, M., Lu, G.H., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (2002). A. thaliana TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev* **16**, 138-149.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A. und Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **26**, 1219-1229.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. und Wisman, E.** (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 113-123.
- Schmelzer, E., Jahnen, W. und Hahlbrock, K.** (1988). In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 2989-2993.
- Shirley, B.W.** (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research* **8**, 415-422.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K. und Neer, E.J.** (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* **24**, 181-185.
- Sompornpailin, K., Makita, Y., Yamazaki, M. und Saito, K.** (2002). A WD-repeat containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol* **50**, 485-495.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**, 503-517.
- Sprenger, M.** (1997). Transkriptionsregulierende Eigenschaften DNA-bindender Faktoren des Chalkonsynthasepromotors aus *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana*. In Mat.-Nat. Fak. (Köln, Germany: Universität zu Köln).
- Sprenger-Haussels, M. und Weisshaar, B.** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *The Plant journal* **22**, 1-8.
- Stapleton, A.E. und Walbot, V.** (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* **105**, 881-889.
- Stracke, R., Werber, M. und Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology* **4**, 447-456.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huel, G., Barsch, A., Mehrrens, F., Niehaus, K. und Weisshaar, B.** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant Journal* **50**, 660-677.

- Strissel, T., Halbwirth, H., Hoyer, U., Zistler, C., Stich, K. und Treutter, D.** (2005). Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biology* **7**, 677-685.
- Takos, A.M., Jaffé, F.W., Jacob, S.R., Bogs, J., Robinson, S.P. and Walker, A.R.** (2006). Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol* **142**, 1216-1232.
- Takos, A.M., Ubi, B.E., Robinson, S.P. and Walker, A.R.** (2006). Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant science* **170**, 487-499.
- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J. und Ashton, A.R.** (2003). Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *The journal of biological chemistry* **278**, 31647-31656.
- Taylor, L.P. und Jorgensen, R.** (1992). Conditional male fertility in chalcone synthase deficient petunia. *Journal of heredity* **83**, 11-17.
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M. und Smeekens, S.** (2005). Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiol* **139**, 1840-1852.
- Terrier, N., Torregrosa, L., Ageorges, A., Vialet, S., Verriès, C., Cheynier, V. und Romieu, C.** (2008). Ectopic expression of *VvMYBPA2* promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiol* **149**, 1028-1041.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. und Saito, K.** (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* **42**, 218-235.
- Tominaga, R., Iwata, M., Okada, K. und Wada, T.** (2007). Functional analysis of the epidermal-specific MYB genes *CAPRICE* and *WEREWOLF* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2264-2277.
- Trezzini, G.F., Horrichs, A. und Somssich, I.E.** (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol Biol* **21**, 385-389.
- Urao, T., Noji, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.** (1996). A transcriptional activation domain of *AtMYB2*, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *The Plant Journal* **10**, 1145-1148.
- Vaisman, N., Tsouladze, A., Robzyk, K., Ben-Yehuda, S., Kupiec, M. und Kassir, Y.** (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and mitotic spindle formation and/or maintenance. *Molecular & general genetics* **247**, 123-136.
- van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N. und Stuitje, A.R.** (1992). Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**, 253-262.

- van der Peer, Y, und De Wachter, Y.** (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer applications in the biosciences* **10**, 569-570.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troglio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., und Viola, R.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature genetics* **42**, 833-839.
- von Szent-Györgyi Nagyrápolt, A.** (1941). On Oxidation, Fermentation, Vitamins, Health, and Disease. *Journal of Chemical Education* **18** (1), 49.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. und Gray, J.C.** (1999). The *TRANSPARENT TESTA 1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1350.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A., Thomas, M.R. und Robinson, S.P.** (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal* **49**, 772-785.
- Wang, K.L., Bolito, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T.K., Espley, R.V., Hellens, R.P. und Allan, A.C.** (2010). An R2R3-MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*. *BMC plant biology* **10**:50.
- Wang, Y., Liu, R., Chen, L., Wang, Y., Liang, Y., Wu, X., Li, B., Wu, J., Liang, Y., Wang, X., Zhang, C., Wang, Q., Hong, X. und Dong, H.** (2009). *Nicotiana tabacum* TTG1 contributes to ParA1-induced signalling and cell death in leaf trichomes. *Journal of cell science* **122**, 2673-2685.
- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S. und Tobin, E.M.** (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis *Lhcb* gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O. und Hahlbrock, K.** (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *The EMBO journal* **10**, 1777-1786.
- Weston, K.** (1998). Myb proteins in life, death and differentiation. *Current opinion in genetics & development* **8**, 76-81.

- Williams, F.E., Varanasi, U. und Trumbly, R.J.** (1991). The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Molecular and cellular biology* **11**, 3307-3316.
- Wink, M.** (1999). Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. (Sheffield: Sheffield Academic Press).
- Wood, K.V.** (1991). The origin of beetle luciferases. *Bioluminescence and Chemiluminescence: current status*. Stanley P., Kricka L., Wiley J. and sons (eds.), Chichester **1**.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D. und Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**, 396-399.
- Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollman, P.C.H., Mol, J.N.M. und van Tunen, A.J.** (1994). Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localisation and mode of action during pollen tube growth. *The Plant Journal* **6**, 201-212.
- Yoshida, K., Iwasaka, R., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S. und Sakuta, M.** (2008). Functional differentiation of *Lotus japonicus* R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family. *Plant Cell Physiol* **49**, 157-169.
- Yu, L., Gaitatzes, C., Neer, E. und Smith, T.F.** (2000). Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein science* **9**, 2470-2476.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T. und Lloyd, A.** (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* **130**, 4859-4869.
- Zhang, J., Lu, Y., Yuan, Y., Zhang, X., Geng, J., Chen, Y., Cloutier, S., McVetty, P.B. und Li, G.** (2009). Map-based cloning and characterization of a gene controlling hairiness and seed coat color traits in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* **122**, 2673-2685.
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E. und Lloyd, A.** (2008). The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* **135**, 1991-1999.
- Zhao, J., Pang Y. und Dixon, R.A.** (2010). The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiol* **153**, 437-443.
- Zimmermann, I.M., Heim, M.A., Weisshaar, B. und Uhrig, J.F.** (2004). Comprehensive identification of Arabidopsis thaliana MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J* **40**, 22-34.

## 7. Anhang

### 7.1 Wertetabellen zu den Ko-Transfektionsexperimenten

**Tabelle A1 zu Abb. 3.9:** Rohdaten für die Experimente zu potentiellen Zielgenen von *MdMYB9*, *10* und *11* durch Ko-Transfektion möglicher homologer Zielpromotoren mit *M. domestica* R2R3-MYB-Faktoren.

Reporter	Effektor	GUS [4-MU / mg x min]]	LUC [RLU / (µg x sec)]	GUS' [pmol 4-MU / mg x min]]
Positivkontrolle (MS 275)		24109	3150	46953
		23292	1932	
		18229	418	
		39172	1760	
		12905	5104	
		21889	867	
Negativkontrolle (MS156)		16	3488	6
		7	2899	
		2	1087	
		3	5969	
		266	9277	
		10	7925	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB9</i>	61	433	523
		555	2742	
		731	5486	
		387	3957	
		421	3541	
		661	7483	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB9/AtTT8</i>	1604	558	7577
		4369	1516	
		2456	2239	
		4659	2927	
		14171	8411	
		9604	3128	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB10</i>	32	1731	22
		25	3189	
		43	2416	
		21	3157	
		51	7632	
		11	2985	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB10/AtTT8</i>	45	1617	54
		103	4439	
		63	2750	
		52	3217	
		22	4389	
		38	3128	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB11</i>	6	139	51
		34	3678	
		32	3611	
		54	2179	
		67	4524	
		41	3723	
<i>AtCHS</i>	<i>MdMYB11/AtTT8</i>	22	564	81
		47	2040	
		58	4641	
		60	4199	
		51	3276	
		28	2179	

Reporter	Effektor	GUS [4-MU / mg x min]]	LUC [RLU / (µg x sec)]	GUS' [pmol 4-MU / mg x min]]
Positivkontrolle (MS 275)		24109	3150	46953
		23292	1932	
		18229	418	
		39172	1760	
		12905	5104	
		21889	867	
Negativkontrolle (MS156)		16	3488	6
		7	2899	
		2	1087	
		3	5969	
		266	9277	
		10	7925	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB9</i>	23	130	41
		52	794	
		113	1878	
		38	4941	
		113	1878	
		54	2163	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB9/AtTT8</i>	2714	74	10109
		15884	603	
		15063	3655	
		15867	3011	
		12778	1391	
		7542	1784	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB10</i>	8	198	23
		16	790	
		22	1558	
		4	2381	
		32	1787	
		11	1340	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB10/AtTT8</i>	60	174	4562
		4254	1717	
		1054	1601	
		2146	4611	
		6589	2508	
		2396	1548	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB11</i>	6	303	20
		13	1076	
		45	3291	
		27	5488	
		19	705	
		10	1873	
<i>AtDFR</i>	<i>MdMYB11/AtTT8</i>	175	167	4925
		8404	849	
		1858	2055	
		3265	5763	
		569	1117	
		3217	1586	

Reporter	Effektor	GUS [4-MU / mg x min]]	LUC [RLU / (µg x sec)]	GUS' [pmol 4-MU / mg x min]]
Positivkontrolle (MS 275)		24109	3150	46953
		23292	1932	
		18229	418	
		39172	1760	
		12905	5104	
		21889	867	
Negativkontrolle (MS156)		16	3488	6
		7	2899	
		2	1087	
		3	5969	
		266	9277	
		10	7925	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB9</i>	0	2427	13
		43	7996	
		22	426	
		21	713	
		5	2658	
		32	6528	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB9/AtTT8</i>	10379	1819	7948
		24994	6025	
		4423	382	
		2772	273	
		2839	1437	
		11437	3218	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB10</i>	2	1885	7
		4	69	
		4	296	
		2	1898	
		2	2175	
		13	4071	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB10/AtTT8</i>	31	1917	43
		34	153	
		15	275	
		17	1384	
		21	2164	
		30	3769	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB11</i>	6	1694	9
		29	9664	
		2	52	
		10	165	
		6	1498	
		21	3217	
<i>AtLDOX</i>	<i>MdMYB11/AtTT8</i>	407	1940	380
		2193	6055	
		30	89	
		942	213	
		162	1062	
		438	3059	

<b>Reporter</b>	<b>Effektor</b>	<b>GUS</b> [4-MU / mg x min]]	<b>LUC</b> [RLU / (µg x sec)]	<b>GUS'</b> [pmol 4-MU / mg x min]]
Positivkontrolle (MS 275)		24109	3150	46953
		23292	1932	
		18229	418	
		39172	1760	
		12905	5104	
		21889	867	
Negativkontrolle (MS156)		16	3488	6
		7	2899	
		2	1087	
		3	5969	
		266	9277	
		10	7925	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB9</i>	22	827	186
		113	2232	
		126	4428	
		11	424	
		130	3703	
		154	2547	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB9/AtTT8</i>	14952	2232	15202
		22034	3274	
		20468	5608	
		10238	2170	
		14697	2948	
		25779	4581	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB10</i>	15	1817	13
		7	281	
		0	4376	
		6	2179	
		88	8646	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB10/AtTT8</i>	21	1817	35
		60	4729	
		26	3217	
		7	381	
		130	5708	
		40	2167	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB11</i>	0	2367	32
		15	635	
		11	6421	
		6	2790	
		46	2522	
		58	3767	
<i>AtBAN</i>	<i>MdMYB11/AtTT8</i>	3094	2526	4811
		4815	5439	
		4433	3290	
		5663	2176	
		788	672	
		7037	6095	

**Tabelle A2 zu Abb. 3.15:** Rohdaten für die Experimente zu potentiellen Interaktionspartnern und Zielgenen durch Ko-Transfektion von *M. domestica* TTG1 mit möglichen homologen *A. thaliana* Co-Faktoren.

Reporter	Effektor	GUS [4-MU / mg x min]	LUC [RLU / (µg x sec)]	GUS* [pmol 4-MU / mg x min]
Positivkontrolle (MS 275)		9097	1087	46953
		55645	1092	
		55972	1940	
		30094	3252	
		31689	207	
		66550	745	
Negativkontrolle (MS156)		1	418	6
		30	832	
		125	850	
		3	1817	
		1	861	
		3	613	
<i>AtBAN</i>		24	275	12
		2	1185	
		4	1547	
		11	974	
		19	627	
		12	732	
<i>AtBAN</i>	<i>AtTT8</i>	5	553	11
		8	741	
		11	1764	
		9	630	
		23	906	
		15		
<i>AtBAN</i>	<i>AtTT2</i>	0	414	22
		44	572	
		16	1525	
		27	1126	
		23	2005	
		23	2160	
<i>AtBAN</i>	<i>AtTT8/MdTTG1</i>	2	1029	11
		14	713	
		7	987	
		7	662	
		23	1327	
		31	1231	
<i>AtBAN</i>	<i>AtTT2/MdTTG1</i>	6	425	27
		38	887	
		15	913	
		27	259	
		49	4021	
		13	1634	
<i>AtBAN</i>	<i>AtTT8/AtTT2</i>	2490	698	1526
		1554	1436	
		1588	978	
		1529	570	
		471	1634	
		1423	1673	

<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2/MdTTG1</i>	22479	385	14260
		21371	1479	
		14049	2726	
		11647	456	
		5506	1393	
		16765	1094	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2/2xMdTTG1</i>	50833	1001	30366
		37503	884	
		14941	1294	
		17318	214	
		31235	960	
		5358	873	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2/AfTTG1</i>	6422	1943	16267
		20907	1882	
		18557	2150	
		15266	352	
		14257	451	
		45991	6230	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2/2xAfTTG1</i>	8697	751	19044
		37035	3269	
		15624	1878	
		22256	238	
		6993	547	
		21563	2233	

**Tabelle A3 zu Abb. 3.16:** Rohdaten für die Experimente zu potentiellen Interaktionspartnern und Zielgenen durch Ko-Transfektion von *M. domestica* TTG1 mit *MdMYB9* und 11 sowie möglicher homologer *A. thaliana* Co-Faktoren.

Reporter	Effektor	GUS [4-MU / mg x min]]	LUC [RLU / (µg x sec)]	GUS' [pmol 4-MU / mg x min]]
Positivkontrolle (MS 275)		9097	1087	46953
		55645	1092	
		55972	1940	
		30094	3252	
		31689	207	
		66550	745	
Negativkontrolle (MS156)		1	418	6
		30	832	
		125	850	
		3	1817	
		1	861	
		3	613	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT2</i>	0	414	22
		44	572	
		16	1525	
		27	1126	
		23	2005	
		23	2160	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8</i>	5	553	11
		8	741	
		11	1764	
		9	630	
		23	906	
		15		
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2</i>	2490	698	1526
		1554	1436	
		1588	978	
		1529	570	
		471	1634	
		1423	1673	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/AfTT2/AfTTG1</i>	6422	1943	16267
		20907	1882	
		18557	2150	
		15266	352	
		14257	451	
		45991	6230	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/MdMYB9/MdTTG1</i>	6913	2233	14794
		45279	1216	
		19430	1058	
		21877	1322	
		8700	1776	
		13217	1377	
<i>AtBAN</i>	<i>AfTT8/MdMYB11/MdTTG1</i>	17539	1217	12399
		14183	5571	
		13105	1798	
		7255	1206	
		12568	1781	

## 7.2 Sequenzen der aus *Malus x domestica* isolierten Transkriptionsfaktoren

*MdMYB9*, isoliert aus Fruchtmaterial des Kultivars Rewena

Kodierende Sequenz:

```

ATGGGGAGGAGTCCGTGTTGCTCCAAGGAAGGACTCAACAGAGGAGCCTG
GACTGCCTTGGAGATAAAAATTTTATCATCTTACATCAAAGCTCATGGAG
AAGGAAAATGGAGAAGCCTCCCTAAAAGAGCTGGTCTGAAGAGATGTGGT
AAAAGTTGTAGACTTAGATGGTTAAACTATCTGAGACCAGACATAAAGAG
AGGCAACATTTTCAGGTGATGAAGAAGAACTCATTGTCAGGCTCCATAACC
TTCTTGGTAACAGATGGTCCCTAATAGCCGGAAGGCTACCGGGGCGAACA
GACAATGAAATCAAGAATTACTGGAATACAACTTTGGGGAAGAAATCGAA
AGTCGATTTCGTTTTCTGGATCCTCGAAAGAACTTCTCTAAATCCATGCA
AATCCATAGCGAAAAAGAAAGATGTCGAGTCCAAAACATCAACTGCCGCT
GCTCAACCTCTAGTAATAAGAACCAAGGCCACTAGGTTGACCAAATTTT
AGTCCCACAAAATATTCCTAGTGACGAAAATTTATACAGCAGCTGCCGCAA
ACCCATTAGAGCTTCAGACCCAATCGGCGGAAAAAGGCGGAAGCACCGAA
GAGTTTCCGAGGACTAATGCAGGTGACTGCAGCAACATCTTGAAGAACTT
TGGCTGCGATGATGACGACATTTGATGCGAAGGGAGATCAACTGCAACG
AGTTTCAGTTGCTCAACTCTATACCGTTGGATGAGGCAATGATAAATGAC
GGCTGCTGGACGGGAGGAAACGGTTGCGATCTGGAGGACTACGGTGCCTC
GTTGGATTTAGATTCTTTGGCATTCTTGCTTGAAGTCTGAGGAATGGCCTT
CCCAAGAAAATGTTGTAGTCTGA

```

Abgeleitete Aminosäuresequenz:

```

MGRSPCCSKEGLNRGAWTALEDKILSSYIKAHGEGKWRSLPKRAGLKRCG
KSCRLRWLNLYLRPDIKRGNISGDEEELIVRLHNLLGNRWSLIAGRLPGRT
DNEIKNYWNTTLGKKSVDSEFSGSSKETS LNPKSIAKKKDVESKTSTAA
AQPLVIRTKATRLTKILVPQNI PSDENYTA AANPLELQTQSAEKGGS TE
EFPRTNAGDCSNILKNFGCDDDDIDAKGDQYCNEFQLLNSIPLDEAMIND
GCWTGGNGCDLEDYGASLDLDSLAFLLDSEEWPSQENVVV

```

**MdMYB10, isoliert aus Fruchtmaterial des Kultivars Rewena****Kodierende Sequenz:**

ATGGAGGGATATAACGAAAACCTGAGTGTGAGAAAAGGTGCCTGGACTCG  
 AGAGGAAGACAATCTTCTCAGGCAGTGCCTGAGATTCATGGAGAGGGAA  
 AGTGAACCAAGTTTCATACAAAGCAGGCTTAAACAGGTGCAGGAAGAGC  
 TGCAGACAAAGATGGTTAAACTATCTGAAGCCAAATATCAAGAGAGGAGA  
 CTTTAAAGAGGATGAAGTAGATCTTCTAATTAGACTTCACAGGCTTTTGG  
 GAAACAGGTGGTCATTGATTGCTAGAAGACTTCCAGGAAGAACAGCAAAT  
 GCTGTGAAAAATTATTGGAACACTCGATTGCGGATCGATTCTCGCATGAA  
 AACGGTGAAAAATAAATCTCAAGAAATGAGAAAGACCAATGTGATAAGAC  
 CTCAGCCCCAAAATTCAACAGAAGTTCATATTACTTAAGCAGTAGAGAA  
 CCAATTCTAGGCCATATTCAATCGGCAGAAGATTTAAGTACGCCACCACA  
 AACGTCGTCGTCAACAAAGAATGGAAATGATTGGTGGGAGACCTTGTTAG  
 AAGGCGAGGATACTTTTGAAAGAGCTGCATATCCAGCATTGAGTTGGAG  
 GAAGAACTCTTCACAAGTTTTTGGTTTTGATGATCGACTGTCGCCAAGATC  
 ATGCGCCAATTTTCCTGAAGGACAAGGTAGAAGTGAATTCCTCTTTAGCA  
 CGGACCTTTGGAATCATTCAAAGAAGAATGA

**Abgeleitete Aminosäuresequenz:**

MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVEIHGEGKWNQVSYKAGLNRCRKS  
 CRQRWLNLYLKPNIKRDFKEDEVDLIIRLHRLGNRWSLIARRLPGR TAN  
 AVKNYWNTRLRIDSRMKTVKNKSQEMRKTNVIRPQPQKFNRSYYLSSKE  
 PILDHIQSAEDLSTPPQTSSSTKNGNDWETLLEGEDTFERAAYPSIELE  
 EELFTSFWFDDRLSPRSCANFPEGQSRSEFSFSTDLWNHSKEE

**MdMYB11, isoliert aus Fruchtgewebe des Kultivars Rewena****Kodierende Sequenz:**

ATGGGAAGGAGTCCTTGTGTTCAAAGGATGAGGGGTTGAATAGAGGAGC  
 ATGGACAGCTATGGAAGACAAAGTACTGACTGAATATATCGGAAATCATG  
 GTGAAGGGAAATGGAGAAACCTTCCCAAAGAGCAGGGCTCAAGAGATGT  
 GGCAAAGTTGCAGGCTGCGATGGTTGAACTACCTAAGACCTGACATCAA  
 GAGAGGAAACATCACTCGTGATGAAGAAGAGCTCATCATCAGGCTTACA  
 AGCTCCTGGGCAACAGATGGTCTTTGATAGCTGGAAGGCTTCCAGGCCGA  
 ACAGACAATGAAATCAAGAATTATTGGAACACTACAATTGGAAAGAGAAT  
 TCAAGTTGAAGGTCGCTCATGTTCTGATGGAAATCGTAGACCAACCCAAG  
 AAAAACCAAACCTACGCTGTCACCTAAACCTAGTACAAATATTTTCATGC  
 ACCAAAGTGGTCAGAACCAAAGCATCAAGGTGCACAAAAGTGGTCTTGCC  
 CCATGAGTCCCAAAGTTTGGTTACAGTACTGAACAAGTGGTCAATGCAG  
 CACCAACACTAAACCAGGCGGTGAATAATCCAATGGTGGGGATTGATGAA  
 CCTTTGTTACCAATGTCATTTTTGGACGATGAAAACAATAATTCGTGTGA  
 GTTTTTGGTGGATTTTAAGATGGACGAGAATTTTCTATCCGATTTTCTTA  
 ATGTCGATTTCTCTGTGCTCTATAACAATGAGGGAGCTGGTAAAGCTGCT  
 GCTGCTGCTACCACTGAAGACACGAGTAATAAGTTGCATGGCCCAGATCT  
 CCGATCATCCAAGGCTCCTATCATTGAATCTGAATTGGACTGCTGGCTCG  
 TAGATAATTGA

**Abgeleitete Aminosäuresequenz:**

MGRSPCCSKDEGLNRGAWTAMEDKVLTEYIGNHGEKWRNLPKRAGLKRC  
 GKSCRLRWLNLYLRPDIKRGNI TRDEEELIIRLHKLLGNRWSLIAGRLPGR  
 TDNEIKNYWNTTIGKRIQVEGRSCSDGNRRPTQEKPKPTLSPKPSTNISC  
 TKVVRTKASRCTKVVLPHESQKFGYSTEQVVNAAPTLNQAVNNPMVGIDE  
 PLLPMSFLDDENNSCEFLVDFKMDENFLSDFLNVD FSVLYNNEGAGKAA  
 AAATTEDTSNKLHGPDLRSSKAPIIESELDCWLVDN

**MdTTG1, isoliert aus Blattmaterial des Kultivars Rewena****Kodierende Sequenz (GenBank-Eintrag GU173813):**

ATGGAGAACTCTACGCAAGAATCCCATCTCAGAGCGGAGAACTCGGTGAC  
 GTACGAGTCGCCGTACCCGCTGTACGCAATGGCCTTTGCCTCGCCCCAAA  
 CCCGAACCCGCCACCAGCACCACCGAATCGCCGTCGGCAGCTTTATCGAG  
 GAGTACTCGAACC GGTCGATATCCTTTCTTCGACCCGGATACCCTTTC  
 AATAAAGCCGAACCCGACCTCTCCTTCGACCACCTTATCCGCCACCA  
 AGCTCATGTTCCACCCGAACCCCAACGCCCTCCACAAAACCAACGACGTC  
 TTAGCTTCTCTGGCGACTACCTCCGCCTTTGGGAGGTGGCGACTCCAC  
 CGTCGAGCCTATCCAGGTGTTAAACAACAGCAAGACCAGCGAGTTTTGCG  
 CTCCGCTGACGTCATTGATTGGAACGACATTGAGCCCCGGCGAATTGGG  
 ACTTCCAGCATCGACACCACCTGCACAATTTGGGACATCGAAAAGGGTGT  
 CGTCGAGACGCAGCTGATTGCTCACGATAAAGAGGTGTACGACATCGCGT  
 GGGGGGAAGCTAGGGTTTTTGC'TTCGGTTTCGGCTGATGGTTCGGTGAGA  
 ATTTTCGATTTGAGGGACAAGGAGCACTCCACGATCATCTATGAGAGCCC  
 TCAGCCGGATAACCCCTTTCGCTTCGATTGGCTTGGAAACAAGCAGGATTTGA  
 GGTACATGGCCACAATTTTGATGGACAGCAATAAAGTTGTGATCTTGGAT  
 ATCCGATCGCCGACGATGCCAGTGGCGGAGCTGGAGAGGCACAGAGGTAG  
 TGTGAATGCTATTGCTTGGGCCCCCAGAGTTGTAGGCACATTTGCTCTG  
 CTGGGGATGACACTCAGGCGCTTATTTGGGACCTGCCACGGTCGCTGGG  
 CCGAATGGAATCGACCCCATGTCGATGTACTCCGCAGGTGCGGAGATTAA  
 TCAGCTGCAGTGGTCTGCTGCACAGCCTGATTGGATTTCCATTGCATTTT  
 CTAACAAGATGCAGCTTTTGAAGTTTTGA

**Abgeleitete Aminosäuresequenz:**

MENSTQESH LRAENSVTYESPYPLYAMAFASPQTRTRHQHRIA VGSFI  
 EEYSNRVDILSFDPTLSIKPNPTLSFDHPYPPTKLMFHPNPNALHKTN  
 DVLASSGDYLRLEWVGDSTVEPIQVLNNSKTSEFCAPLTSFDWNDIEPR  
 TIRIGTSSIDTTCWDIEKGVVETQLIAHDKEVYDIAWGEARVFASVSAD  
 EHSTIIYESPQGSVRIFDLRDKPDTPLLR L AWNKQDLRYMATILMDSNK  
 VVILDIRSPTMPVAELERHRGSVN AIAWAPQSCRHIC SAGDDTQALIWD  
 LPTVAGPNGIDPMSMYSAGAEINQLQWSAAQPDWISIAFSNKMQLLKV

**Genomische Sequenz (GenBank-Eintrag GU173813.1):**

ATGGAGAACTCTACGCAAGAATCCCATCTCAGAGCGGAGAACTCGGTGAC  
GTACGAGTCGCCGTACCCGCTGTACGCAATGGCCTTTGCCTCGCCCCAAA  
CCCGAACCCGCCACCAGCACCACCGAATCGCCGTCGGCAGCTTTATCGAG  
GAGTACTCGAACCGGGTCGATATCCTTTCCTTCGACCCGGATACCCTTTC  
AATAAAGCCGAACCCGACCCTCTCCTTCGACCACCCTTATCCGCCACCA  
AGCTCATGTTCCACCCGAACCCCAACGCCCTCCACAAAACCAACGACGTC  
TTAGCTTCTCTGGCGACTACCTCCGCCTTTGGGAGGTCGGCGACTCCAC  
CGTCGAGCCTATCCAGGTGTTAAACAACAGCAAGACCAGCGAGTTTTGCG  
CTCCGCTGACGTCATTCGATTGGAACGACATTGAGCCCCGGCGAATTGGG  
ACTTCCAGCATCGACACCACCTGCACAATTTGGGACATCGAAAAGGGTGT  
CGTCGAGACGCAGCTGATTGCTCACGATAAAGAGGTGTACGACATCGCGT  
GGGGGAAGCTAGGGTTTTTGCTTCGGTTTTGGCTGATGGGTCGGTGAGA  
ATTTTCGATTTGAGGGACAAGGAGCACTCCACGATCATCTATGAGAGCCC  
TCAGCCGGATAACCCCTTTGCTTCGATTGGCTTGAACAAGCAGGATTTGA  
GGTACATGGCCACAATTTTGATGGACAGCAATAAAGTTGTGATCTTGAT  
ATCCGATCGCCGACGATGCCAGTGGCGGAGCTGGAGAGGCACAGAGGTAG  
TGTGAATGCTATTGCTTGGGCCCCCAGAGTTGTAGGCACATTTGCTCTG  
CTGGGGATGACACTCAGGCGCTTATTTGGGACCTGCCACGGTCGCTGGG  
CCGAATGGAATCGACCCCATGTGATGTACTCCGCAGGTGCGGAGATTAA  
TCAGCTGCAGTGGTCTGCTGCACAGCCTGATTGGATTTCCATTGCATTTT  
CTAACAAGATGCAGCTTTTGAAGGTTTGAGGGCGGAAGCTGGGAAGCTTG  
TTTTGTGATATGGATTGTAAGTGTTCATTCAATTGTTTTCTGCTTTGCTT  
ACATTAATTGATTTTTCGATTGCTCTACTGATGTAATTTAGGCTAAATTG  
ATTAATTTCAATAAAACATTGAAATTCGTCACACTGCTTGCTTTAAGTTA  
GTTTAAGACTGATCTGTTTTCGCTTGTAAGTTTTGCATGTCTGAATTGCT  
GGTAAATGTCGCGGATATGTTAATCTGGGATAGATGTTTCGTGTGCATCTG  
TTGCAGAATTATTGAAAAACATTTACATTTGTGGGAGCACTCCATCTTCC  
TGCCAAATTTGTTTACGTTTTCTTCTAGGAAGATATTTTTTAGCATAGTATA  
GCTCTAAGTTTAATTTGGTTATCTTCTTGTTCTTTTTCTTTTCATGTTT  
CCTTGTTTGAAGATAACAACTCATTCTATTGCGTTTATGGACATTGCAT  
TTTGGCTCATGCTTTTACACCTGGTTTTTGGAAACATCAAAGTCGTCTTCCC  
CTTGAATTTGTAGTTTGCTTTTCTTCTTTTCTTTCGCCCTCCAATTAC  
AGCATGATTATCTAGTGTCATTGTTACGTTCTGTTCTGTTTGCGAATGG  
TTTTCTTTGAATTTCCAACCTTACCAATCTGTTTCATGAGCTTCTTCTCTGT  
ATACAATTATGGCACACTGTGTGTACAATTGAAACCTAGACAGTGAAGTT  
TTCATTCGCATGGCAACTGTCCGCAAGTATTTGTAATTATGCTACAGGTT

TCATTTCCGGGAAAATTGTTCAATATACACATGTATACTATTTGTTTGT  
TTATCTAATCCTGGTGCTTTCTAGTCTAGTTGTTTCTTCATTATTAATGA  
GTTAGGCATTATTGTTAACTGCTACTATGCATCTGTACATTATTAATGGG  
GCGGTGCTATCCACACGCATCTTTTTACCTCTCACATACCCGCTGTTAAT  
TTATGTCCCTTTATCCTATTCAATTCATTCAATTCGACGGCCTGAAATTA  
AGAGGTGTGTCGAAGGTAAAAGGGTTGTGTCCAATCACAATGCTGTGTGA  
ATTATTATTTTTTTCATTCACCTTTGGTTCAGTCATTTTCTCCTTATTAACG  
GGATAAATTGCATGTTTAACTGCTTTCGATGCAGGCATCCTATCTTGATG  
GAAGCGGTGATGATCAC TAGGGGAAGTTAGCTGGAAGTAGTTCTTCGATT  
ACCTATGAGGCTTATTTATAAAGGAATATGGTTAGCTTTGAACTCTTTAG  
AGATATGTTTATTGTTGATTATCAACTAGTCTTGCTATCTTGGTCTAGAC  
CCGCAATGTGAGTAGCGTGTCTTCTTCCCCTCACACGCTTCGTCTAAT  
CCAACGTTAATTGTACCTGTTAGTGTGGCCTCTCCTGTATTGCATATGT  
TATGCCCTCGTGTGTTGACAGCACTCTACTCTATTGAGAAAAGTAA  
AAAAGGAAGTCGTCCGAGAATTTTGAT

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut und Sinn entnommen sind, in jedem Einzelfall kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie abgesehen von der unten angegebenen Publikation noch nicht veröffentlicht worden ist und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Bezüglich der Publikation sei auf die nächste Seite verwiesen.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Bernd Weißhaar (Lehrstuhl für Genomforschung, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld) betreut worden.

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

---

Datum

---

(Julian Brüggemann)

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikation:

**Brueggemann, J., Weisshaar, B. und Sagasser, M.** (2010). A WD40-repeat gene from *Malus x domestica* is a functional homologue of *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*. *Plant Cell Reports* **29**, 285-294.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Bernd Weißhaar für die Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Weiterhin danke ich ihm dafür, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, im Rahmen des FLAVO-Projektes Kooperationspartner aus anderen Instituten kennenzulernen und mit diesen an verschiedenen Projekten arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Olaf Kruse für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Dr. Martin Sagasser für die wissenschaftliche Betreuung und viele hilfreiche Anregungen und Ideen, die er im Rahmen dieser Dissertation zum Thema Flavonoidbiosynthese eingebracht hat. Die mit ihm geführten Gespräche haben stets geholfen, neue Ansätze aufzufinden und zweifelhafte Ideen zu verwerfen.

Dr. Gunnar Huep für seine immer vorhandene Hilfsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge und Diskussionen, die mir oft weitergeholfen haben. Weiterhin danke ich ihm, dass er einfach ein guter Freund ist, wie man ihn nur selten findet.

PD Dr. Thomas Merkle und Dr. Ralf Stracke für ihre Ideen und fachlichen Hilfen während dieser Dissertation. PD Dr. Thomas Merkle danke ich besonders für die Hilfe mit dem TREECON-Programm.

Melanie Kuhlmann für immer hilfreiche Ratschläge zu allen erdenklichen Problemen, die im Laboralltag auftreten können, Insbesondere gilt mein Dank für die Einführung in die Zellkultur und die damit verbundene Geduld. Weiter danke ich ihr für ihre stets gute Laune, die das Arbeiten im Labor immer angenehm gemacht hat.

Dipl.-Ing. Prisca Viehöver für die Generierung stets großartiger DNA-Sequenzen in der *Sequencing Core Facility*.

Meinen weiteren Laborkollegen aus G0-134, insbesondere Ingo Appelhagen, Oliver Jahns und Hirofumi Ishihara, die immer für ein angenehmes und nettes Arbeitsklima gesorgt haben. Danke für eure Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge.

Allen weiteren Mitgliedern des Lehrstuhls für Genomforschung, deren namentliche Aufzählung den Rahmen dieser Danksagung sprengen würde, obwohl sie es eigentlich verdient hätten.

Meiner Familie für ihre Unterstützung und Hilfe bei dieser Arbeit und für alles, was sie mir bislang ermöglicht hat.

Falk Barton für seine Unterstützung und dafür, dass er mein bester Freund ist

## Lebenslauf

Name: Julian Alexander Brüggemann  
 Anschrift: Feldstr.70, 33609 Bielefeld  
 Geburtsdatum: 8. Februar 1978  
 Geburtsort: Frechen  
 Nationalität: deutsch

Schulbildung: 1984 – 1988 Salvator-Grundschule, Dormagen-Nievenheim  
 1988 – 1997 Bettina von Arnim-Gymnasium, Dormagen  
 Schulabschluss: Abitur 07/1997

Studium: 1997 – 2005 Biologie Diplom, Universität Düsseldorf  
 08/2004 Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. William Martin  
 bis 02/2005 am Institut für ökologische Pflanzenphysiologie,  
 Universität Düsseldorf:  
 „Untersuchungen zur Funktion von Rubrerythrin im  
 anaeroben Flagellaten *Trichomonas vaginalis*“

Abschluss: Diplom-Biologe (Gesamturteil der Prüfung: „sehr gut“)

Doktorarbeit: 05/2005 Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Weißhaar  
 bis heute am Lehrstuhl für Genomforschung, Universität Bielefeld:  
 „Untersuchungen zu Regulatoren der Flavonoidbio-  
 synthese im Kulturapfel *Malus x domestica*“