

**Untersuchungen zu Regulatoren der
Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*:
Eine Studie zu neuen Funktionen
bekannter Proteinklassen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Gunnar Huep
aus Herford

angefertigt am Institut für Genomforschung

Bielefeld im Januar 2008

Berichtersteller: Prof. Dr. Bernd Weißhaar
PD Dr. Helge Küster

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Kurzzusammenfassung

Der Flavonoidmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* kann als Modellsystem zum Verständnis der Regulation von Genexpression und Stoffwechsel in Pflanzen aufgefasst werden. Als Endprodukte der Flavonoidbiosynthese werden Flavonole, Anthocyane und Proanthocyanidine gefunden. Viele der Transkriptionsfaktoren, die an der entwicklungs- und gewebespezifischen Akkumulation dieser Metabolite beteiligt sind, sind bereits charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch Regulatoren, die jeweils die Biosynthese einer der drei Flavonoidklassen beeinflussen, detailliert untersucht. Hierbei konnten für sie entweder bislang unbekannte Funktionen beobachtet werden oder Hilfsmittel für ihre weiterführende Analyse bereitgestellt werden.

Als Regulator der samenschalenspezifischen Proanthocyanidinakkumulation wurde das C2H2-Zinkfingerprotein TT1 behandelt. Es wurde unter Verwendung einer Transposon-Insertionslinie ein stabiler *knock out* des *tt1*-Gens generiert und der vermutete *knock out* Phänotyp bestätigt. Eine Reihe neuer *TT1*-Allele wurde durch TILLING identifiziert, die nun zur molekularen Charakterisierung von TT1 zur Verfügung stehen. Weiterhin wurden fünf zu *TT1* homologe Gene, die zusammen die *WIP*-Genfamilie in *A. thaliana* bilden, hinsichtlich Expressionsmuster, intrazellulärer Lokalisation, *knock out* und Überexpressionsphänotypen sowie möglicher Zielgene untersucht. Weiterhin wurde die auch im *tt1 knock out* spezifisch in den Samengeweben Mikropyle und Chalaza stattfindende Proanthocyanidinsynthese analysiert. Hierzu wurde eine Population EMS-mutagenisierter *tt1* Pflanzen aufgebaut. Diese steht nun für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung, die einerseits Hinweise zur molekularen TT1-Funktion liefern könnten und andererseits die Aufklärung der vom restlichen Samengewebe abweichenden Regulation der Flavonoidbiosynthese in Mikropyle und Chalaza ermöglichen könnten. Die von den *PGF*-Genen kodierten R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren MYB11, MYB12 und MYB111 stellen flavonolspezifische Regulatoren der Flavonoidbiosynthese dar. Einige Strukturgene des Flavonoidstoffwechsels wie beispielsweise *CHS* oder *FLS* werden von ihnen aktiviert. Weitere Zielgene wurden aufgrund von ATH1-Genchip-Analysen angenommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit A5g62210, At2g22590 und At4g15480 drei dieser weiteren Zielgene durch Ko-Transfektionsexperimente experimentell bestätigt werden. Neben R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren werden in *A. thaliana* R3-MYB-Proteine gefunden. Für eine Reihe von ihnen wird üblicherweise eine Beteiligung an der Zelldifferenzierung zu Trichom- oder Wurzelhaarzellen gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das R3-MYB-Protein MYBL2 ein negativer Einfluss auf die Aktivierung des an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Gens *DFR* nachgewiesen werden und somit erstmalig eine Beteiligung eines *R3-MYB*-Gens am Flavonoidmetabolismus gezeigt werden.

English Abstract

The biosynthesis of flavonoids in *Arabidopsis thaliana* can be interpreted as a model system for the regulation of gene expression and metabolism in plants. The flavonoids can be subdivided into flavonols, anthocyanins and proanthocyanidins. A majority of the transcription factors, which are involved in the developmental and tissue specific accumulation of these metabolites, is well known. In this work a number of regulators of the flavonoid metabolism was analysed in detail. Each of these regulators was mainly involved in the biosynthesis of one of the three subclasses of flavonoids. Either new functions of the regulators could be observed or tools for further investigations concerning their functions were generated.

The C2H2 zinc finger protein TT1 was analysed as an example for a regulator of the seed coat specific proanthocyanidin accumulation. A stable knock out of the *tt1* gene was generated using a transposon insertion line and the previously assumed *tt1* knock out phenotype was confirmed. A number of new *TT1* alleles was identified by the TILLING method. Those alleles are now available for the molecular characterisation of TT1. Moreover five homologues of *TT1*, which form the *WIP* gene family in *A. thaliana* together with *TT1*, were analysed concerning expression profiles, intracellular localisation, knock out and overexpression phenotypes and possible target genes. In *tt1* proanthocyanidins are mainly found in the micropylar and chalazal area of the seeds. To analyse this tissue specific accumulation in more detail, a population of EMS mutagenised *tt1* plants was generated. This population is available now for further investigations, which could lead to new insights in the molecular function of TT1 or in the different regulation of gene expression in the micropylar and chalazal areas of the seed. The *PFG* genes encode the R2R3-MYB transcription factors MYB11, MYB12 and MYB111, which are flavonol specific regulators. They are known to activate some genes, which are encoding enzymes of the flavonoid metabolism, like for example *CHS* and *FLS*. There were hints for further candidate target genes, resulting from ATH1 gene chip analysis. In this work three of these candidate target genes could be confirmed experimentally by using co-transfection assays. Besides R2R3-MYB transcription factors R3-MYB proteins are found in *A. thaliana*. An involvement in processes leading to the determination of the cell identity of trichomes and root hairs has been shown for several R3-MYBs. In this work a negatively regulating effect of the R3-MYB protein MYBL2 on the activation of the *DFR* gene, which is involved in anthocyanin formation has been shown. This is the first known example of an *R3-MYB* gene, which is involved in flavonoid metabolism in plants.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Flavonoide	1
1.1.1. Biosynthese der Flavonoide in <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.1.2. Regulation der Flavonoidbiosynthese	6
1.1.3. Mutanten in der Flavonoidbiosynthese	8
1.2. <i>TT1</i> und die <i>WIP</i> -Genfamilie.....	10
1.3. Die Samenschale in <i>A. thaliana</i>	12
1.4. Transkriptionsfaktorklassen in <i>A. thaliana</i>	14
1.4.1. R3-MYB-Gene – Negative Regulation	14
1.4.2. Klasse 1 KNOX-Gene – Sprossachsenmeristementwicklung.....	17
1.5. Ziele dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	21
2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen.....	21
2.1.2.1. Medien für die Anzucht von Bakterien	21
2.1.2.2. Medien für die Anzucht von <i>A. thaliana</i>	23
2.1.2.3. Medien für die <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskultur At7	24
2.1.2.4. Puffer und Lösungen	24
2.1.3. Desoxyoligonukleotide (Primer).....	28
2.1.4. Bakterienstämme und DNA-Vektoren.....	32
2.1.5. Reagenziensätze	35
2.1.6. Zellkultur und Pflanzen	35
2.1.6.1. At7 Zellsuspensionskultur	35
2.1.6.2. Pflanzen	35
2.2. Methoden	37
2.2.1. Pflanzenkultivierung.....	37
2.2.1.1. Anzucht auf Erde	37
2.2.1.2. Anzucht auf MS-Platten	37
2.2.1.3. Kreuzen von <i>A. thaliana</i> Pflanzen.....	38
2.2.2. GUS-Färbung von Pflanzenmaterial	38
2.2.3. Vanillin-Färbung von <i>Arabidopsis</i> -Samen.....	39
2.2.4. Chloralhydrat-Klärung von <i>Arabidopsis</i> Samen	39
2.2.5. EMS Mutagenese von <i>Arabidopsis</i> Samen	39
2.2.6. TILLING von <i>TT1</i>	40

2.2.7. DNA-Präparation	41
2.2.7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
2.2.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.2.7.3. Restriktionsverdau von DNA	42
2.2.7.4. Dephosphorylierung von DNA	43
2.2.7.5. Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese	43
2.2.7.6. Aufreinigung und Elution von DNA	43
2.2.7.7. Ligation	44
2.2.7.8. TOPO™ TA Cloning	44
2.2.7.9. Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte	45
2.2.7.10. DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial	48
2.2.7.11. Ammoniumacetat-Fällung von DNA	48
2.2.7.12. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	48
2.2.7.13. ExoSAP Verdau von DNA	49
2.2.7.14. DNA-Sequenzierung	49
2.2.8. RNA-Präparation	49
2.2.8.1. Isolierung von Gesamt-RNA	49
2.2.8.2. Erststrang-cDNA-Synthese für semiquantitative RT-PCR	50
2.2.8.3. Semiquantitative RT-PCR	50
2.2.8.4. Probenvorbereitung für die quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR)	51
2.2.8.5. Quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR)	52
2.2.9. Mikrobiologische Methoden	53
2.2.9.1. Kultivierung von Bakterien	53
2.2.9.2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation	53
2.2.9.3. Transformation von Bakterienzellen	55
2.2.9.4. Dauerkulturen transformierter Bakterien	56
2.2.10. Herstellung transgener Pflanzen	56
2.2.10.1. Transformation durch „ <i>floral dipping</i> “	56
2.2.10.2. Selektion transgener T1-Pflanzen	57
2.2.11. At7-Zellkultur	57
2.2.11.1. Vorbereitung der Transfektions-DNAs	57
2.2.11.2. Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur	58
2.2.11.3. Gewinnung von At7-Protoplasten	58
2.2.11.4. Transfektion von At7-Protoplasten	59
2.2.11.5. Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten	59
2.2.11.6. Proteinbestimmung nach Bradford	59

2.2.11.7. Bestimmung der Luziferase-Aktivität	60
2.2.11.8. Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität	60
2.2.11.9. Berechnung von Reportergenaktivitäten	60
2.2.12. At7 Transfektion zur Analyse von GFP-Fusionsproteinen	61
3. Ergebnisse	62
3.1. Proanthocyanidine in der Samenschale von <i>A. thaliana</i>	62
3.1.1. TT1 – ein samenschalenspezifischer Regulator	62
3.1.1.1. Potenzielle Zielgene von TT1 im Flavonoid-Metabolismus	62
3.1.1.2. <i>Knock out</i> Phänotyp von <i>tt1</i>	64
3.1.1.3. TILLING von <i>TT1</i>	68
3.1.2. Proanthocyanidine in Mikropyle und Chalaza	70
3.1.2.1. <i>GL3/BHLH1</i> als Kandidatengen für die Regulation der PA-Biosynthese	70
3.1.2.2. EMS Mutagenese von <i>tt1-1</i> Samen	73
3.2. Die WIP-Proteinfamilie	74
3.2.1. Expressionsmuster der WIP-Gene	76
3.2.2. Subzelluläre Lokalisation der WIP-Proteine	78
3.2.3. Phänotypen von WIP knock out Pflanzen	79
3.2.4. Phänotypen von WIP Überexpressions-Pflanzen	81
3.2.5. Mögliche Zielgene von WIP Transkriptionsfaktoren	82
3.2.5.1. At7 Zellsuspensionskultur Ko-Transfektionsexperimente	83
3.2.5.2. <i>WIP2</i> Expression im <i>KNAT1</i> und <i>KNAT2 knock out</i> Hintergrund	85
3.3. Analyse ausgewählter MYB-Faktoren	87
3.3.1. Zielgene der PFG-R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren	87
3.3.2. Negative Regulation durch das kleine MYB-Gen MYBL2	89
4. Diskussion	92
4.1. Charakterisierung des <i>knock out</i> Phänotyps für <i>tt1</i>	92
4.1.1. Der <i>tt1</i> knock out Phänotyp beinhaltet punktuelle PA-Akkumulation in der Samenschale	93
4.1.2. T-DNA-Insertions- und EMS-Linien von <i>tt1</i> zeigen den <i>knock out</i> Phänotyp	93
4.1.3. Das variante Transkript trägt nicht zur Genfunktion des <i>tt1-1</i> Allels bei	94
4.2. Einordnung der molekularen Funktion von TT1	95
4.2.1. TT1 scheint nicht als transkriptioneller Aktivator zu fungieren	95
4.2.1.1. Ko-Transfektionsexperimente	95
4.2.1.2. TT1:EAR-Fusionsproteine	96
4.2.2. TT1 könnte als transkriptioneller Repressor fungieren	98
4.2.3. Mögliche Protein-Protein-Interaktion von TT1	99

4.3. Abweichende Regulation in Mikropyle und Chalaza.....	101
4.3.1. Die Doppelmutante <i>tt1-1 gl3-1</i>	101
4.3.2. EMS-Mutagenese von <i>tt1-1</i> Samen.....	102
4.4. Weitere Ansätze zur Funktionsaufklärung von TT1	104
4.4.1. Gen-Chip Analyse.....	104
4.4.1.1. Genetischer Hintergrund der zu vergleichenden Proben.....	105
4.4.1.2. Zu untersuchendes Gewebe.....	106
4.4.1.3. Material zur Gen-Chip Analyse.....	107
4.4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	108
4.4.3. Yeast Two-Hybrid Experimente	108
4.4.4. TT1 in weiteren Organismen.....	109
4.4.5. TILLING von TT1	110
4.5. Die WIP-Proteinfamilie.....	112
4.5.1. Die WIP-Proteine gehören zur Klasse A1d der Zinkfingerproteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
4.5.2. Die WIP-Domäne ist der am stärksten konservierte Bereich.....	114
4.5.3. Die WIP-Gene zeigen unterschiedliche Expressionsmuster.....	115
4.5.4. Molekulare Funktion der WIP-Proteine	118
4.5.5. Interaktion mit KNOX-Gen Klasse 1 Promotoren.....	119
4.5.5.1. Versuche in der <i>At7</i> -Zellsuspensionskultur	120
4.5.5.2. <i>KNAT1</i> Expression im <i>wip2 knock out</i> Hintergrund	121
4.5.5.3. Schlussfolgerungen	123
4.6. Weiterführende Experimente zur Rolle der <i>WIP</i> -Gene	123
4.6.1. Experimente basierend auf <i>tt1</i> -Komplementation.....	123
4.6.1.1. Mögliche Äquivalenz der WIP-Proteine	123
4.6.1.2. Domänen innerhalb der WIP-Proteine.....	123
4.6.2. Fehlende knock out Phänotypen	124
4.7. Die Analyse der <i>WIP</i> -Gene erleichtert die Aufklärung der TT1-Funktion nicht wesentlich.....	125
4.8. Kontrolle des Flavonoid-Metabolismus durch MYB-Transkriptionsfaktoren	125
4.8.1. Funktion der PFG-MYB-Proteine	125
4.8.1.1. Die PFG-MYB-Proteine verhalten sich funktionell ähnlich.....	125
4.8.1.2. Die Rolle der PFG-MYB kontrollierten Glykosyltransferasen	126
4.8.1.3. Weiterführende Experimente	127
4.8.2. Negativ-regulatorische Eigenschaften von MYBL2.....	128
4.8.2.1. MYB-Transkriptionsfaktoren mit reprimierenden Eigenschaften.....	128

4.8.2.2. Möglicher Wirkmechanismus von MYBL2	129
4.8.2.3. Weiterführende Experimente	130
4.9. Ausblick.....	130
5. Zusammenfassung	132
6. Literatur.....	135
7. Anhang.....	144
7.1. Wertetabellen zu den Ko-Transfektionsexperimenten	144

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl-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	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
BZIP	Basisches Leuzin-Reißverschluss-Protein
C	Cytosin
<i>CaMV</i>	<i>cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFI	Chalkonflavanonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CHI	Chalkonisomerase
Col	Columbia
DAG	Tage nach Keimung
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
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GUS	β-Glukuronidase
GUS'	Spezifische standardisierte GUS-Aktivität
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
L	Liter
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
LUC	Luciferase
Mbp	Megabasen(paare)
MBW	MYB/bHLH/WD40
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MRE	MYB-Erkennungselement
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Murashige-Skooge
nos	Nopalin-Synthase
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
OX	Überexpression
PA	Proanthocyanidin

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
qPCR	Quantitative <i>real time</i> PCR
RLU	Relative Lichteinheiten
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
U	Enzymeinheit
UBI	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
VP16	<i>Herpes simplex</i> Virus Protein 16
WD40	40 Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholungen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Glukuronat

Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

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

Anmerkung zum Stil der vorliegenden Arbeit:

Diese Arbeit wurde in deutscher Sprache verfasst und es wurde daher weitestgehend auf die Verwendung von Anglizismen verzichtet. Da bei einigen Fachtermini eine nicht sinnverfremdende Übersetzung nur schwer möglich oder umständlich ist, wurden diese Begriffe in der Originalsprache belassen und durch *Kursivdruck* markiert.

Da sich für die in dieser Arbeit verwendeten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* der Name „Arabidopsis“ zu einem feststehenden Synonym entwickelt hat, wurde die korrekte systematische Nomenklatur in *Kursivdruck* nur bei der Verwendung des Gattungsnamens in Verbindung mit dem Artnamen eingehalten. Im Übrigen wurde der Begriff „Arabidopsis“ in Normalschrift verwendet.

Da sich die überwiegende Zahl der Fälle bei den in der Arbeit genannten Genen und Proteinen auf Arabidopsis bezieht, wurde weitestgehend auf das Präfix „At“ verzichtet. Wenn bei Gen- oder Genproduktbezeichnungen Nukleinsäuren gemeint waren, wurden diese durch *Kursivdruck* gekennzeichnet, Peptide oder Proteine wurden in Normaldruck belassen. Intakte Gene oder Proteine wurden durch „GROSSBUCHSTABEN“, defekte Gene durch „*kleinschreibung*“ gekennzeichnet.

Wenn Plasmidkonstrukte oder transgene Pflanzen beschrieben wurden, wurde das Vektorrückgrat bzw. der genetische Hintergrund durch zwei aufeinander folgende Doppelpunkte von der restlichen Konstruktbeschreibung separiert (Beispiele: pDONR::“Plasmidbeschreibung“ oder Col-0::“Konstruktbeschreibung“). Verschiedene Abschnitte der beschriebenen Konstrukte wurden durch einfache Doppelpunkte voneinander getrennt. Promotoren wurden als „Pro“_{GEN}“ dargestellt. Wenn aus dem Kontext ersichtlich war, dass cDNAs und keine genomischen Fragmente gemeint waren, wurde nicht explizit darauf hingewiesen. Ebenso wurde, wenn der 35S-Promotor des *cauliflower mosaic virus* beschrieben wurde, nicht konsequent auf die Herkunft aus dem erwähnten Organismus hingewiesen. In Konstruktbeschreibungen wurde teilweise auf das *uidA*-Gen durch den Terminus „GUS“ verwiesen. (Ein Beispiele für die Anwendung der oben beschriebenen Nomenklatur ist: pBT8::Pro_{35S}:*At1g34790* für ein Konstrukt, dass die cDNA des Gens *At1g34790* unter Kontrolle des 35S-Promotors des *cauliflower mosaic virus* im Vektorrückgrat pBT8 enthält.)

Sofern nicht anders angegeben, wurde für DNA, RNA und Proteine die Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis (2001) angewandt.

1. Einleitung

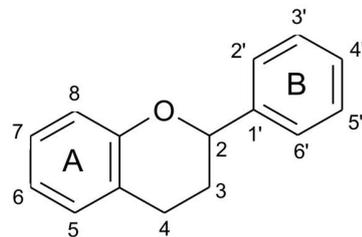
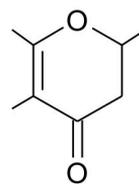
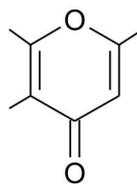
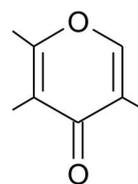
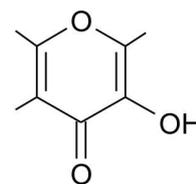
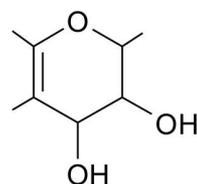
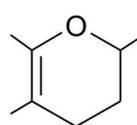
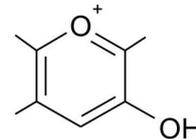
Pflanzen müssen im Gegensatz zu tierischen Organismen den Problemen einer sessilen Lebensweise begegnen. Das bedeutet, dass sie unter anderem in der Lage sein müssen, einen Schutz gegen biotischen oder abiotischen Schaden aufzubauen oder mit ihrer Umgebung in Interaktion zu treten. Hierbei kommt dem pflanzenspezifischen Sekundärmetabolismus eine bedeutende Rolle zu. Sekundärmetabolite von Pflanzen, die innerhalb der pflanzlichen Zelle üblicherweise in der Vakuole oder außerhalb der Zellen im Apoplasten gelagert werden, können beispielsweise als Phytoalexine eine Funktion zum Schutz gegen Pathogene oder Herbivoren erfüllen (Tsuji *et al.*, 1992), UV-Schutz vermitteln (Li *et al.*, 1993) oder dazu dienen Fremdbestäuber und samenverbreitende Organismen anzulocken (Winkel-Shirley, 2001). Zurzeit sind über 10.000 pflanzliche Sekundärmetabolite bekannt (Wink, 1999), die in drei große Gruppen, die Alkaloide, die Isoprenoide und die Phenylpropanoide, eingeteilt werden können. In die Gruppe der Phenylpropanoide fallen weitere Stoffklassen, wie Lignine, Suberine, Cumarine und Flavonoide, von denen die Flavonoide hinsichtlich Biosynthese und deren Regulation am besten untersucht sind.

1.1. Die Flavonoide

Es sind derzeit mehr als 6000 verschiedene Flavonoide bekannt (Harborne und Williams, 2000). Sie teilen sich die gleiche Grundstruktur des Flavans aus zwei aromatischen Ringen (A und B), die über eine C₃-Brücke verbunden sind. Dabei entsteht ein Heterozyklus, anhand dessen Oxidationszustand sich die Flavonoide weiter in Untergruppen wie Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavan-3-ole, Flavan-3,4-diole, Isoflavone und Anthocyanidine aufgliedern (siehe Abb. 1-1). Innerhalb jeder Untergruppe existieren wiederum einzelne Substanzen, die sich durch unterschiedliche Modifikationen des Grundgerüsts unterscheiden.

Flavonoide erfüllen vielfältige biologische Funktionen. So zeichnen sie sich vor allem durch ihre lichtabsorbierenden Eigenschaften aus (lat. *flavus* = gelb). Viele Pflanzen akkumulieren unter Einfluss hoher Lichtintensitäten in den Vakuolen subepidermaler und epidermaler Zellschichten Flavonole, die aufgrund dieser absorbierenden Eigenschaften im kurzwelligen UV-Bereich in der Lage sind, die Zellen vor DNA-Schädigungen zu bewahren (Schmelzer *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1993; Stapleton und Walbot, 1994). Die Blüten- und Fruchtfarbe vieler Pflanzen wird unter anderem von Anthocyanen hervorgerufen (Iwashina *et al.*, 2007). Die Blütenfarbe ist wichtig, um Fremdbestäuber anzulocken und die Fruchtfärbung kann dazu dienen, Tiere anzulocken, die für die Samenverbreitung benötigt werden. Proanthocyanidine,

die in der Samenschale akkumuliert werden können, dienen einerseits dazu, den Embryo vor Pathogenen und Herbivoren schützen (Shirley, 1998), haben andererseits aber auch Einfluss auf die Stabilität der Samenschale und beeinflussen dadurch unter anderem die Dormanz (Debeaujon *et al.*, 2000; Debeaujon *et al.*, 2001). Neben den genannten Funktionen erfüllen die Flavonoide noch weitere Aufgaben, die der Pflanzenentwicklung förderlich sein können. Sie sind jedoch für die Pflanzen nicht essenziell. Mutanten der Flavonoidbiosynthese sind insbesondere unter Laborbedingungen lebensfähig und bieten sich aufgrund von teilweise problemlos zu beobachtender Phänotypen zur Analyse der Flavonoidbiosynthese an. Aufgrund der genannten Vorteile liegt mit dem Flavonoid-Metabolismus ein beliebtes Modellsystem für die Genexpression und deren Regulation in Pflanzen vor.

A**Flavan-Grundgerüst****B****Flavanon****Flavon****Isoflavon****Flavonol****Leucoanthocyanidin
(Flavan-3,4-diol)****Catechin
(Flavan-3ol)****Anthocyanidin****Abbildung 1-1. Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoide.**

(A) Das Flavangrundgerüst, bestehend aus den aromatischen A- und B-Ringen und dem mittleren Heterozyklus, ist dargestellt. (B) Abbildung der mittleren Heterozyklen einiger Untergruppen der Flavonoide.

1.1.1. Biosynthese der Flavonoide in *Arabidopsis thaliana*

Ein pflanzlicher Modellorganismus, der sich für die Untersuchung von Genexpression und deren Regulation gut eignet, ist *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand). *A. thaliana* bietet sich hierbei aus verschiedenen Gründen an. Ein Vorteil liegt in der kurzen Generationszeit von etwa acht Wochen. Außerdem besitzt sie mit 125 Mbp ein relativ kleines Genom, das seit dem Jahr 2000 sequenziert ist, welches vorwiegend aus kodierenden DNA-Sequenzen besteht. Im Folgenden soll die Flavonoidbiosynthese hauptsächlich für *A. thaliana* beschrieben werden (siehe Abb. 1-2).

Die beiden Ausgangsverbindungen für die Flavonoide sind 4-Coumaryl-CoA und Malonyl-CoA. 4-Coumaryl-CoA stammt dabei aus dem generellen Phenylpropan-Stoffwechselweg. Im einleitenden Schritt der Flavonoidbiosynthese katalysiert die Chalkonsynthase (CHS) die Bildung des zyklischen Tetrahydrochalkons aus einem Molekül 4-Coumaryl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA (Heller und Hahlbrock, 1980). Bei der durch die Chalkonisomerase (CHI) katalysierten Isomerisierung zu Naringenin wird der flavonoidtypische Heterozyklus etabliert. Anschließend können verschiedene Hydroxylierungsreaktionen an der Position 3 des Heterozyklus und an Position 3' des B-Rings, die durch Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) und Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) vermittelt werden, zu den Zwischenprodukten Dihydrokämpferol und Dihydroquercitin führen (Britsch *et al.*, 1981). Diese beiden Verbindungen, die in die Klasse der Dihydroflavonole fallen, stellen die letzten gemeinsamen Intermediate dar, die sowohl zur Synthese von Flavonolen auf der einen Seite als auch zur Synthese von Anthocyanen und Proanthocyanidinen auf der anderen Seite führen können. Dihydrokämpferol und Dihydroquercitin können von der Flavonolsynthase (FLS) zu den Flavonolen Kämpferol und Quercitin umgesetzt werden (Forkmann *et al.*, 1986). Diese wiederum werden von verschiedenen Glykosyltransferasen zu Flavonolglykosiden umgesetzt, die als Endprodukte in die Vakuole der Pflanzenzellen transportiert werden (Jones *et al.*, 2003). Dihydrokämpferol und Dihydroquercitin können darüber hinaus, unter Beteiligung der Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR), zu Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diolen) – Leucocyanidin und Leucopelargonidin – reduziert werden, gemeinsamen Vorstufen der Anthocyane und Proanthocyanidine (Forkmann, 1991). Die darauf folgende Oxidation des Heterozyklus, die zur Bildung von Anthocyanidinen führt, wird von der Leucoanthocyanidinooxygenase (LDOX; auch bezeichnet als Anthocyanidinsynthase, ANS) katalysiert. Von den Anthocyanidinen Cyanidin und Pelargonidin aus verzweigt sich der Stoffwechselweg ein weiteres mal und führt einerseits zu den Anthocyanen, wobei eine Glykosylierung mit verschiedenen Zuckerresten an der C₃-Hydroxylgruppe erfolgen kann, die von einer UDP-Glykosyltransferase katalysiert wird. Später können weitere Zucker und Acylgruppen

übertragen werden (Holton und Cornish, 1995). Die glykosylierten Anthocyanidine, die in die Vakuole der Pflanzenzellen transportiert werden, werden als Anthocyane bezeichnet. Auf der anderen Seite können aus Cyanidin die Proanthocyanidine (PAs) synthetisiert werden. Hierzu erfolgt zunächst eine Reduktion des Heterozyklus, die von der Anthocyanidinreduktase (ANR) katalysiert wird, welche vom *BANYULS*-Gen (*BAN*) kodiert wird. Durch die Reduktion entsteht Epicatechin (ein Flavan-3-ol) mit 2,3-*cis*-Konformation, das als monomere Einheit für die PAs dient, die durch Kondensation, welche vermutlich von einem kondensierenden Enzym katalysiert wird, aus Epicatechin entstehen. Durch Oxidationsprozesse bilden sich die in der Vakuole lokalisierten oxidierten braunen PAs, die als Pigmente in *A. thaliana* lediglich in der Samenschale auftreten (Debeaujon *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Lepiniec *et al.*, 2006).

Mutanten, die einen Defekt in enzymkodierenden Strukturgenen aufweisen, die für die PA-Biosynthese benötigt werden oder Mutanten, die in einem oder mehreren dafür benötigten Regulationsgenen defekt sind, sind unter Umständen nicht mehr in der Lage PAs zu bilden und weisen daher den so genannten *transparent testa* (*tt*) Phänotyp auf. Die Samen entsprechender Pflanzen sehen aufgrund der unpigmentierten Samenschale und der darunter liegenden Kotyledonen gelblich aus. Die entsprechenden Gene werden, vor allem im Fall der regulatorischen Gene, auch als *TRANSPARENT TESTA* (*TT*) Gene bezeichnet (Koornneef, 1990).

Zusammengefasst ergibt sich hinsichtlich der Flavonoidbiosynthese folgendes Bild: Flavonole, Anthocyane und Proanthocyanidine stellen die Flavonoide dar, die in *A. thaliana* auftreten. Eine Reihe von Enzymen – CHS, CHI, F3H, F3'H – hat im Rahmen ihrer Biosynthese eine gemeinsame Funktion. Die Flavonolsynthase (FLS), sowie spezielle Glykosyltransferasen treten nur im Rahmen der Flavonolglykosid-Biosynthese auf. Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) und Leucoanthocyanidinoxigenase (LDOX) erfüllen ihre Funktion dagegen ausschließlich im Anthocyan- und Proanthocyanidin-spezifischen Zweig der Flavonoidbiosynthese. Weiterhin treten bestimmte Glykosyltransferasen ausschließlich bei der Synthese von Anthocyanen auf. Das Enzym, welches die PA-Biosynthese initiiert, liegt mit der Anthocyanidinreduktase (ANR) vor, welche vom *BAN*-Gen kodiert wird. Die Synthese der verschiedenen Flavonoide erfolgt, wie anhand der Proanthocyanidine beschrieben wurde, gewebespezifisch.

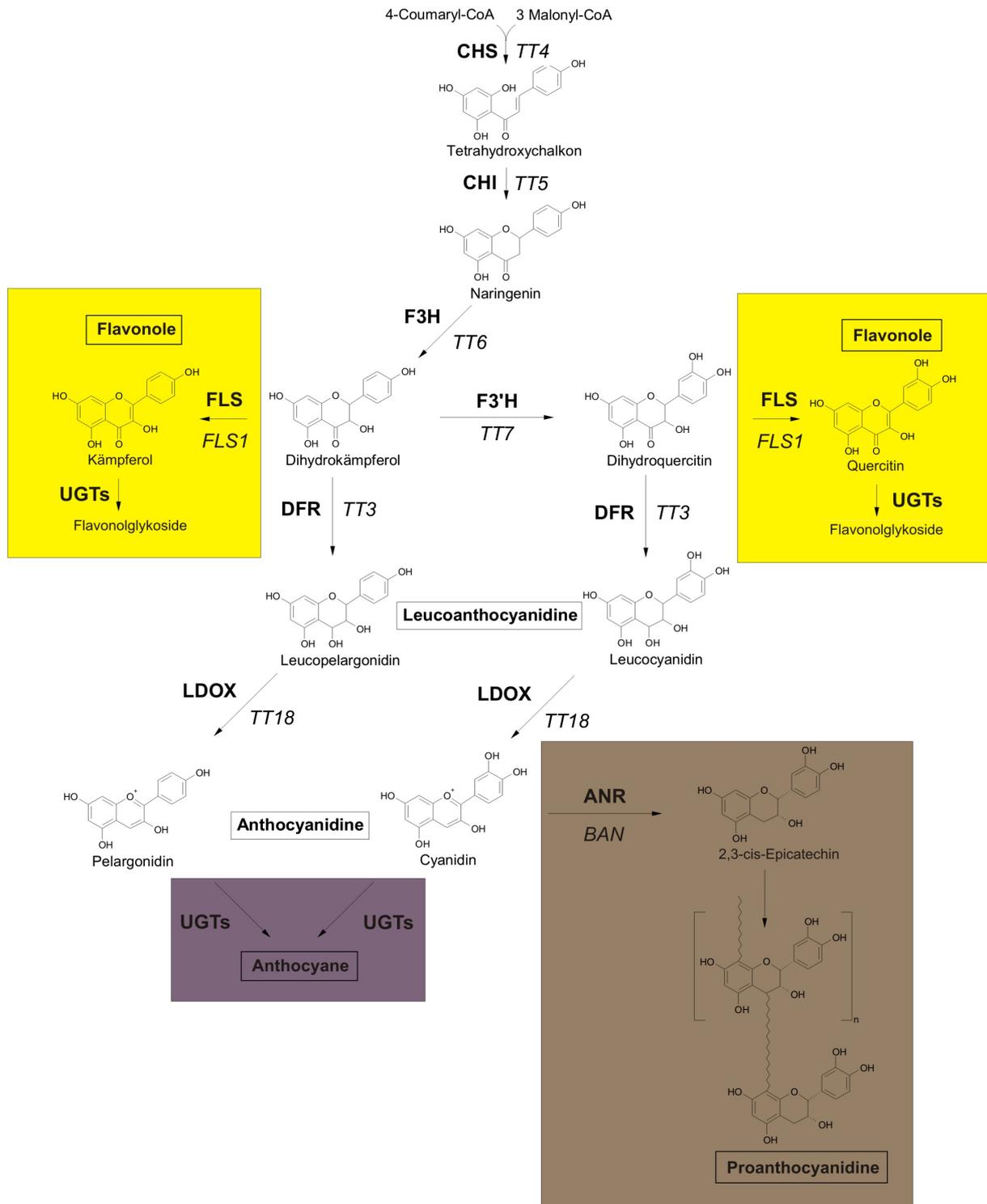


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana*. Strukturformeln der wichtigsten Intermediate und Verbindungen sowie die Abkürzungen der beteiligten Enzyme. Die Flavonol-spezifischen Teile des Stoffwechselwegs sind gelb unterlegt, der Anthocyan-spezifische Teil ist violett und der Proanthocyanin-spezifische Teil braun unterlegt. Chalkonsynthase, CHS; Chalkonisomerase, CHI; Flavanon-3-Hydroxylase, F3H; Flavonoid-3'-Hydroxylase, F3'H; Flavonolsynthase, FLS; Dihydroflavonol-4-Reduktase, DFR; Leucoanthocyanidindioxygenase, LDOX; Anthocyanidinreduktase, ANR; UGT, UDP-Glykosyltransferasen. Die kodierenden Gene sind kursiv dargestellt. *BANYULS*, *BAN*; *TRANSPARENT TESTA*, *TT*.

1.1.2. Regulation der Flavonoidbiosynthese

Eine gezielte Regulation des Flavonoidstoffwechsels ist nötig, um eine gewebe- und entwicklungspezifische Bildung der Flavonoide zu ermöglichen. Sie erlaubt es der Pflanze aber auch auf externe Reize wie UV-Strahlung, Trockenheit, Hitze, Kälte, Verwundung oder osmotischen Stress in der Umgebung durch geänderte Syntheseraten zu reagieren (Mol *et al.*, 1996). Die Regulation des Flavonoidmetabolismus erfolgt hauptsächlich auf Transkriptionsebene (Mol *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1999). Ein Großteil der an dieser Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren stammt aus den Familien der R2R3-MYB- und der bHLH-Proteine (Stracke *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2003). Daneben sind Regulatoren aus den Klassen der WD40- oder Zinkfinger-Proteine bekannt. Üblicherweise fungieren diese Transkriptionsfaktoren als transkriptionelle Aktivatoren, in Einzelfällen wurde aber auch von Negativregulation im Umfeld der Flavonoidbiosynthese berichtet (Jin *et al.*, 2000), wobei zum Teil ist der genaue Regulationsmechanismus nicht eindeutig geklärt ist.

In *A. thaliana* werden einige Reaktionsschritte im Flavonoidmetabolismus durch eine Kombination aus MYB-, bHLH- und WD40-Transkriptionsfaktoren reguliert. So werden die Expression der PA- und teilweise Anthocyan-spezifischen Enzyme DFR, LDOX und ANR und die Expression des für die Vakuolenlokalisierung erforderlichen Transportproteins TT12 durch MYB123/BHLH42/TTG1 (TT2/TT8/TTG1) reguliert. Hierbei werden für die korrekte DNA-Bindung an den Zielgenpromotoren auf jeden Fall der MYB- und der bHLH-Partner benötigt. Zur korrekten Funktion *in vivo* ist darüber hinaus das WD40-Protein TTG1 erforderlich, welches zur Ausbildung stabiler MBW-Transkriptionsfaktorkomplexe (MYB/BHLH/WD40) benötigt wird, die gleichzeitig alle drei Bestandteile enthalten (Nesi *et al.*, 2000; Debeaujon *et al.*, 2001; Nesi *et al.*, 2001; Debeaujon *et al.*, 2003; Marles *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2006). Die Regulation durch den MYB123/BHLH42/TTG1 Transkriptionsfaktorkomplex trägt hauptsächlich zu einer samenschalenspezifischen Expression der an der PA-Biosynthese beteiligten Gene bei.

Ein anderer MBW-Transkriptionsfaktorkomplex, der für die Expression von DFR entscheidend ist, ist MYB75/BHLH2/TTG1 (PAP1/EGL3/TTG1). Die Bezeichnung *PAP1* für das MYB75-kodierende Gen leitet sich von *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT* ab und trägt seiner Rolle in der Biosynthese der Anthocyane Rechnung. Weitere TTG1-abhängige MYB- und bHLH-Faktoren sind MYB90 (PAP2) und BHLH1 (GL3), die ebenfalls die Expression der Gene F3'H, DFR und LDOX im Anthocyan-spezifischen Teil des Flavonoidstoffwechsels beeinflussen können (Borevitz *et al.*, 2000; Cominelli *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008).

Neben den oben beschriebenen TTG1-abhängigen MYB-Transkriptionsfaktoren beeinflussen weitere Aktivatoren wie MYB11, MYB12 und MYB111 die Flavonoidbiosynthese. Diese bilden die Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Proteine in *A. thaliana* und benötigen für ihre Funktionalität weder bHLH- noch WD40-Partner. Sie beeinflussen die Expression der früh im Flavonoidstoffwechselweg auftretenden Gene *CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS*, welche für die Biosynthese der Flavonole benötigt werden. Aus diesem Grund wurden die Gene *MYB11*, *MYB12* und *MYB111* auch als *PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES (PFG)* Gene zusammengefasst (Stracke *et al.*, 2001; Mehrrens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007). Die Regulation des Flavonoidstoffwechsels durch MYB-, bHLH- und WD40-Transkriptionsfaktoren ist in Abbildung 1-3 schematisch dargestellt.

Im Proanthocyanidin-spezifischen Teil der Flavonoidbiosynthese übernimmt das Zinkfingerprotein TT1 eine wichtige Rolle. Es sind phänotypischen Auswirkungen von Mutationen im *TT1*-Gen beschrieben worden (Sagasser *et al.*, 2002). Der molekulare Wirkmechanismus ist allerdings ungeklärt. Neben TT1 erfüllen noch weitere Proteine ihre Funktion ausschließlich im Rahmen des PA-Stoffwechsels. Zu diesen gehören TT16 – das Produkt eines *MADS box* Gens (Nesi *et al.*, 2002), AHA10 – eine vermutlich in der Zytoplasmamembran lokalisierte Protonenpumpe (Baxter *et al.*, 2005), TT10 – eine Laccase-ähnliche Polyphenoloxidase (Pourcel *et al.*, 2005), TT12 – ein MATE-Transporter (Debeaujon *et al.*, 2001) und TT19 – eine Glutathion S-Transferase (Kitamura *et al.*, 2004).

Wie erläutert gibt es demnach Transkriptionsfaktoren, die den Substratfluss durch Expressionskontrolle von Strukturgenen im Flavonoidstoffwechsel in Richtung bestimmter Endprodukte lenken. Der MBW-Komplex MYB123/BHLH42/TTG1 (TT2/TT8/TTG1) ist für die samenspezifische PA-Biosynthese verantwortlich, wohingegen MYB75/BHLH2/TTG1 (PAP1/EGL3/TTG1) für die Anthocyan-Biosynthese entscheidend ist. Als Transkriptionsfaktoren, die die Flavonolbiosynthese begünstigen, sind vor allem die von den *PFG*-Genen kodierten MYB-Faktoren der Untergruppe 7 – MYB11, MYB12 und MYB111 – zu nennen.

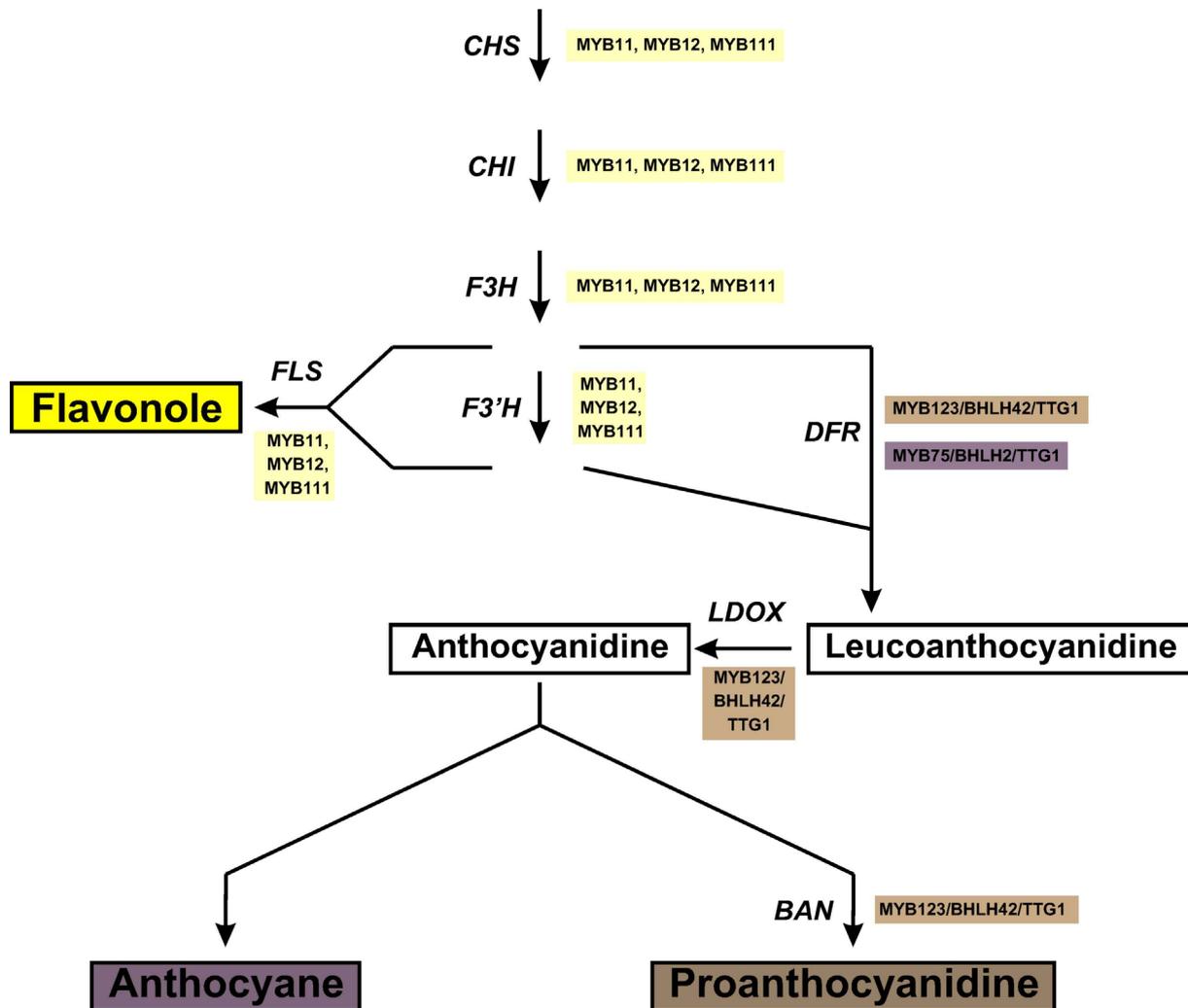


Abbildung 1-3. Regulation der Flavonoidbiosynthese.

Es sind die Gene der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme kursiv eingetragen und einige deren bekannter MYB-, bHLH- und WD40-Regulatoren aufgeführt. Die wichtigsten End- und Zwischenprodukte des Stoffwechselwegs sind ebenfalls dargestellt. Transkriptionsfaktoren sind den Endprodukten, deren Synthese sie hauptsächlich beeinflussen, durch entsprechende Farbkodierung zugeordnet. Abkürzungen der Gene: Chalkonsynthase, *CHS*; Chalkonisomerase, *CHI*; Flavanon-3-Hydroxylase, *F3H*; Flavonoid-3'-Hydroxylase, *F3'H*; Flavonolsynthase, *FLS*; Dihydroflavonol-4-Reduktase, *DFR*; Leukoanthocyanidindioxygenase, *LDOX*; *BANYULS*, *BAN*.

1.1.3. Mutanten in der Flavonoidbiosynthese

Ein Großteil der Mutanten für Enzyme, Regulatoren oder Proteine mit anderen Funktionen, wie Transportproteine oder Transferasen, die eine Rolle im Flavonoidstoffwechsel von *A. thaliana* spielen, weisen als Merkmal die Produktion gelbfarbiger Samen auf, was als *transparent testa* (*tt*) Phänotyp bezeichnet wird. Darüber hinaus treten aber in der Flavonoidbiosynthese auch Mutanten auf, die keinen veränderten Samenschalenphänotyp zeigen, wenn keine Faktoren mit essenzieller Rolle auf dem Weg des Substratflusses in Richtung PAs betroffen sind. Beispiele sind die Flavonolsynthase oder verschiedene

Glykosyltransferasen. Ebenfalls wird kein veränderter Samenschalenphänotyp beobachtet, wenn andere Faktoren die mutierten Genprodukte funktionell ersetzen können oder wenn bestimmte Regulationsmechanismen nur gewebespezifisch wichtig sind. Die bekannten Mutanten mit einer Beteiligung am Flavonoidmetabolismus sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Liste der bekannten Mutanten mit Beteiligung am Flavonoidmetabolismus.

Die bekannten am Flavonoidmetabolismus beteiligten Gene sind aufgelistet (Koorneef *et al.*, 1980; Lepiniec *et al.*, 2006). Es sind jeweils die Samenfarbe der jeweiligen Mutanten, das Genprodukt beziehungsweise die Proteinklasse des Genprodukts, sowie der ATG-Code aufgeführt. Nicht aufgeführt wurden die ebenfalls am Flavonoidstoffwechsel beteiligten Glykosyltransferasen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *tt*, *transparent testa*; *tds*, *tannin deficient seed*; *ban*, *banyuls*; *egl*, *enhancer of glabra*; *gl*, *glabra*; *pap*, *production of anthocyanin pigment*; *pfg*, *production of flavonol glycosides*; *ttg*, *transparent testa glabra*; C, Chalaza; M, Mikropyle; DFR, Dihydroflavonol-4-Reduktase; CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; MATE, *multidrug and toxic extrusion*; LDOX, Leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, Anthocyanidinreduktase; FLS, Flavonolsynthase.

Locus	Samenfarbe	Genprodukt	ATG
Strukturgene			
<i>tt3</i>	gelb	DFR	At5g42800
<i>tt4</i>	gelb	CHS	At5g13930
<i>tt5</i>	gelb	CHI	At3g55120
<i>tt6</i>	blass braun, gesprenkelt	F3H	At3g51240
<i>tt7</i>	blass braun, gesprenkelt	F3'H	At5g07990
<i>tt10</i>	gelb / braun nach 6-12 Monaten	Laccase-ähnliche Polyphenoloxidase	At5g48100
<i>tt12</i>	blass braun	MATE-Transporter	At3g59030
<i>tt18/tds4/tt11</i>	gelb	LDOX	At4g22880
<i>tt19/tt14</i>	dunkel gelb	Glutathion S-Transferase	At5g17220
<i>aha10</i>	blass braun	Protonenpumpe	At1g17260
<i>ban</i>	blass grau / CM grau	ANR	At1g61720
<i>fls1</i>	braun	FLS	At5g08640
Regulatorische Gene			
<i>egl3</i>	braun	BHLH2	At1g63652
<i>gl3</i>	braun	BHLH1	At5g41315
<i>pap1</i>	braun	MYB75	At1g56650
<i>pap2</i>	braun	MYB90	At1g66390
<i>pfg1/myb12</i>	braun	MYB12	At2g47460
<i>pfg2/myb11</i>	braun	MYB11	At3g62610
<i>pfg3/myb111</i>	braun	MYB111	At5g49330
<i>tt1</i>	gelb / CM braun	Zinkfingerprotein der WIP-Familie	At1g34790
<i>tt2</i>	gelb	MYB123	At5g35550
<i>tt8</i>	gelb	BHLH42	At4g09820
<i>tt16</i>	gelb / CM braun	MADS-Domäne-Protein	At5g23260
<i>ttg1</i>	gelb	WD40-Protein	At5g24520
<i>ttg2</i>	gelb	WRKY44	At2g37260

Die meisten an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Faktoren liegen im Genom von *A. thaliana* in Einzelkopie vor (Shirley *et al.*, 1992; Pelletier und Shirley, 1996; Pelletier *et al.*, 1997). Die einzige bekannte Ausnahme stellt die Flavonolsynthase (FLS) dar, die von einer kleinen Genfamilie kodiert wird (Pelletier *et al.*, 1997). Da aber eventuell nur eine Isoform *in vivo* aktiv ist, werden auch bei einem *knock out* von *fls1* phänotypische Effekte beobachtet.

Ein Gen, für das Mutanten im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, ist das zur Familie der *WIP*-Gene gehörende *TT1*.

1.2. *TT1* und die *WIP*-Genfamilie

Ein Ausfall *der TT1*-Genfunktion ruft einen gelbsamigen Phänotyp hervor. *TT1* (At1g34790) wurde als Gen identifiziert, das für ein C₂H₂-Zinkfingerprotein kodiert (Sagasser *et al.*, 2002). Da die an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene weitestgehend bekannt sind, liegt die Annahme einer regulatorischen Funktion des *TT1*-Zinkfingerproteins nahe. Aufgrund der gelben Samenfarbe im Fall von funktionsunfähigen *TT1*-Proteinen liegt eine offensichtliche Beteiligung am Flavonoidstoffwechsel vor. Für die gestörte Synthese der PAs können, wie für einige andere Mutanten in Abschnitt 1.1.3. demonstriert, mehrere Ansatzpunkte im Stoffwechselweg bestehen. Allerdings scheint im Fall von *tt1* Pflanzen ausschließlich der PA-Gehalt in der Samenschale betroffen zu sein – andere Flavonoide wie Flavonole oder Anthocyane in vegetativen Teilen der Pflanzen werden unverändert akkumuliert. Darüber hinaus kann das *TT1*-Protein seine Funktion offensichtlich nur in der Samenschale erfüllen, da es spezifisch im Samenschalenendothel exprimiert wird, der innersten Schicht des inneren Integuments (Sagasser *et al.*, 2002). *TT1* könnte daher entweder im PA-spezifischen Teil des Stoffwechselwegs eingreifen oder seine PA-spezifische Funktion könnte in seinem Expressionsmuster begründet liegen.

Im Arabidopsisgenom wurden durch Sequenzanalyse fünf weitere homologe (paraloge) Gene zu *TT1* identifiziert. Die durch die Gene kodierten Proteine teilen sich mit *TT1* eine Konsensussequenz, die mit den Aminosäuren Tryptophan, Isoleucin und Prolin – oder im Einbuchstabencode W, I und P – beginnt. Die auf dieser Basis begründete Genfamilie, die in *A. thaliana* inklusive *TT1* aus sechs Mitgliedern (*WIP1* bis *WIP6*) besteht, wird daher als Familie der *WIP*-Gene bezeichnet (Sagasser *et al.*, 2002). *WIP1* entspricht dabei *TT1*. Aufgrund der teilweise hohen Sequenzhomologien lag für die von den *WIP*-Genen kodierten Proteine die Vermutung eines einheitlichen molekularen Wirkmechanismus nahe, wurde aber bislang nicht experimentell überprüft. Zumindest bot sich jedoch die Gelegenheit durch die Analyse der gesamten *WIP*-Genfamilie, Rückschlüsse auf die *TT1*-Funktion zu ziehen.

Neben *A. thaliana* werden *WIP*-Proteine auch in anderen Organismen wie beispielsweise in *Glycine max* (Sojabohne), *Medicago truncatula* (Schneckenklee), *Gossypium arboreum* (Baumwolle), *Oryza sativa* (Reis), *Triticum turgidum* (Weizen) und *Hordeum vulgare* (Gerste) gefunden (Sagasser *et al.*, 2002). Einige homologe Gene der *WIP*-Klasse sind in Tabelle 2 zusammengefasst und in Abbildung 1-4 dargestellt.

Tabelle 2. Homologe WIP-Gene und weitere Gene mit C2H2-Zinkfingerdomänen aus verschiedenen pflanzlichen Organismen.

Es sind die Namen der Gene, der Organismus, der ATG-Code, die Genbank-Akzession und die prozentuale Identität und Ähnlichkeit der Konsensussequenzen auf Aminosäureebene aufgeführt. n.v., nicht verfügbar; n.b., nicht bestimmt. Nach Sagasser *et al.* (2002).

Name	Organismus	ATG	Akzession	% Ident.	% Ähnl.
<i>AtTT1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g34790	AF190298	100	100
<i>AtWIP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g57670	AF254447	82	87
<i>AtWIP3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g08290	AF254448	75	86
<i>AtWIP4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g20880	AJ311811	80	88
<i>AtWIP5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g51220	AJ311810	81	88
<i>AtWIP6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g13290	AJ311809	77	85
<i>GmWIP1</i>	<i>Glycine max</i>	n.v.	AJ311808	81	89
<i>MtWIP1</i>	<i>Medicago truncatula</i>	n.v.	BE203286	81	87
<i>GaWIP1</i>	<i>Gossypium arboreum</i>	n.v.	BE052647	76	80
<i>OsWIP1</i>	<i>Oryza sativa</i>	n.v.	AC090054	78	87
<i>TtWIP1</i>	<i>Triticum turgidum</i>	n.v.	BF293596	80	87
<i>HvWIP1</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	n.v.	AJ234704	72	82
<i>StPCP1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	n.v.	X82328	34	46
<i>ZmID1</i>	<i>Zea mays</i>	n.v.	AF058757	32	42
<i>PhEPF1</i>	<i>Petunia hybrida</i>	n.v.	X60700	n.b.	n.b.
<i>TaWZF1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	n.v.	D16416	n.b.	n.b.
<i>AtSTZ1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g27730	X95573	n.b.	n.b.

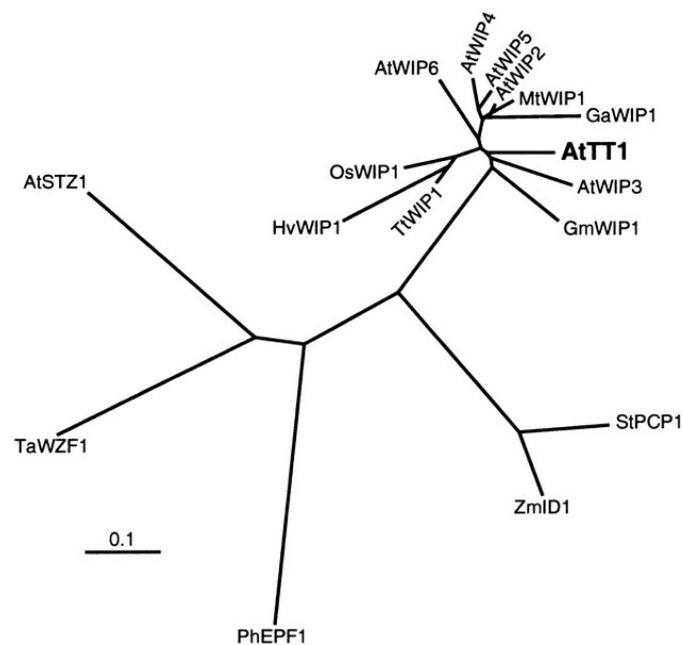


Abbildung 1-4. Distanzanalyse der der WIP-Proteine und weiterer C2H2-Zinkfingerproteine verschiedener pflanzlicher Organismen auf Aminosäureebene.

Es wurden ausschließlich die Aminosäuresequenzen der WIP-Domänen beziehungsweise vergleichbarer Zinkfingerdomänen zur Analyse verwendet. Die Gene deren Produkte miteinander verglichen wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet. Der Maßstab gibt die Anzahl an Aminosäuresubstitutionen pro Position an. Nach Sagasser *et al.* (2002).

1.3. Die Samenschale in *A. thaliana*

Die Samenschale ist bei der Untersuchung der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* von besonderem Interesse, da ausschließlich dort die zur braunen Pigmentierung führenden PAs gebildet werden (vergleiche Abschnitt 1.1.1.). Daher soll im Folgenden auf ihren Aufbau und ihre Entstehung im Rahmen der Samenentwicklung eingegangen werden.

In der zu den Angiospermen (Bedecktsamern) gehörenden Pflanze *A. thaliana* sind die Ovulen, die den weiblichen Gametophyten enthalten, von zwei Fruchtblättern umgeben. Dabei wird die Verbindung der Ovule zum Fruchtblatt vom sogenannten Funiculus ausgebildet. Der Gametophyt enthält am mikropylaren Ende eine haploide Eizelle, eine diploide Zentralzelle und zwei Synergiden, die der Eizelle benachbart sind (siehe Abb. 1-5 A). Am Chalaza-Ende, das darüber hinaus die Verbindung mit dem Funiculus bildet, befinden sich drei antipodale Zellen (Chaudhury *et al.*, 2001). Der Gametophyt ist von zwei Schichten epidermalen Ursprungs, dem äußeren und dem inneren Integument umgeben. Das äußere Integument besteht seinerseits aus zwei Zellschichten – oi1 und oi2. Das innere Integument besteht im Bereich von Mikropyle und Chalaza aus zwei Zellschichten – ii1 und ii2 – und im restlichen Teil der Ovule teilweise aus drei Zellschichten – ii1, ii1' und ii3 (Beekman *et al.*, 2000). Der Aufbau der Samenschale ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

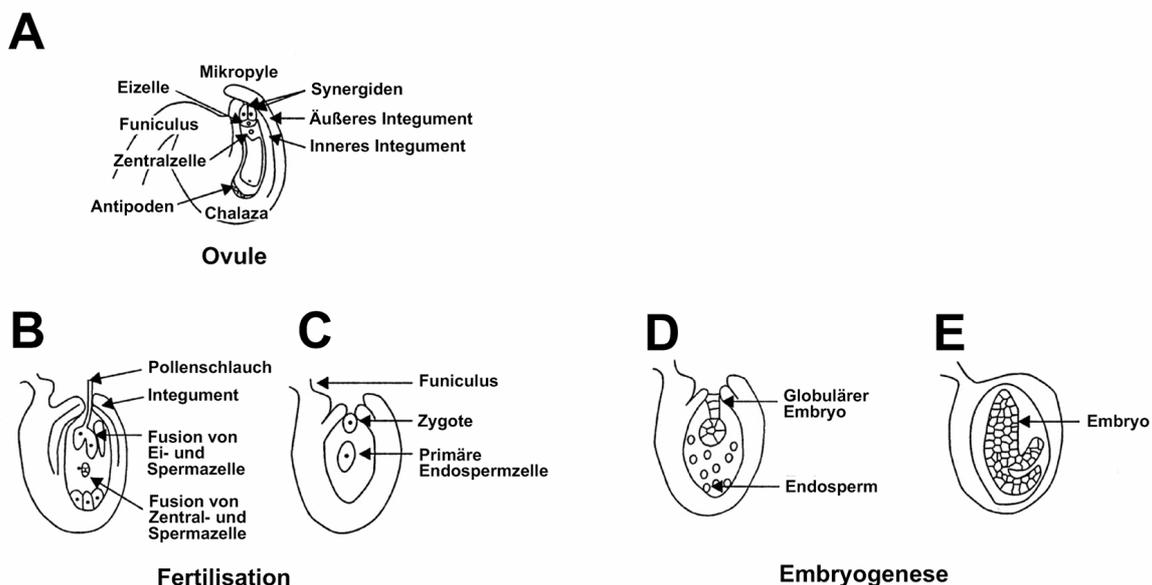


Abbildung 1-5. Weiblicher Gametophyt, Fertilisation und Embryogenese.

(A) Die Ovule enthält den weiblichen Gametophyt, der die Eizelle, die Zentralzelle und zwei Synergiden im Bereich der Mikropyle sowie drei antipodale Zellen im Bereich der Chalaza beinhaltet. (B) Bei der Fertilisation verschmilzt ein Spermium mit der Eizelle und eines mit der Zentralzelle. (C) Hierbei entstehen die Zygote und eine primäre Endospermzelle. (D) Aus diesen entwickeln sich der Embryo und das Endosperm. (E) Reifer Embryo im Samen. Modifiziert nach Chaudhury *et al.* (2001).

Zur Fertilisation wächst der Pollenschlauch im Bereich der Mikropyle in die Ovule ein und entlässt zwei Spermiumzellen, von denen eine mit der Eizelle verschmilzt und sich zum Embryo entwickelt und die andere durch Verschmelzung mit der Zentralzelle zur Ausbildung des Endosperms führt. Fertilisation und Embryogenese sind in Abbildung 1-5 dargestellt.

Zeitgleich zur Fertilisation beginnt die Entwicklung der Samenschale (Testa) aus den Zellen der Integumente. Unmittelbar nach der Fertilisation findet in den Integumenten starkes Wachstum statt, welches wahrscheinlich durch Endosperm-vermittelte Signale initiiert wird (Ohad *et al.*, 1999). Die Zellen der innersten Schicht des Endothels (ii1) akkumulieren im weiteren Verlauf der Entwicklung die nach Oxidation braun gefärbten Proanthocyanidine in ihren Vakuolen. Aus diesem Grund wird diese Schicht auch als Pigmentschicht bezeichnet. Später werden die Zellen der ii1-Schicht apoptotisch und geben die zuvor hauptsächlich im inneren ihrer Vakuolen gespeicherten Pigmente teilweise an die darüber liegenden Zellschichten ab (Beeckman *et al.*, 2000).

Neben der ii1 Schicht sind mit einigen Zellen der ii2-Schicht und der Chalaza noch zwei weitere Gewebe im Samen als PA-akkumulierend identifiziert worden (vergleiche Abbildung 1-6). Diese Gewebe wurden als Region 1 bis 3 klassifiziert (Debeaujon *et al.*, 2003). Region 1 besteht aus wenigen Zellen der ii2-Schicht im Bereich der Mikropyle, Region 2 umfasst das gesamte Endothel (ii1-Schicht) und Region 3 besteht aus wenigen Zellschichten der Chalaza. Hinsichtlich der PA-Biosynthese innerhalb dieser Regionen ist diskutiert worden, dass die Regionen 1 und 3, welche die Bereiche der Mikropyle und der Chalaza umfassen, abweichend von der endothelialen Region 2 koreguliert sein könnten (Debeaujon *et al.*, 2003).

In einigen Mutanten der Flavonoidbiosynthese konnten im Gegensatz zum Endothel in den Bereichen der Mikropyle und der Chalaza Epicatchine, Vorläufer der PAs, nachgewiesen werden (vergleiche Tabelle 1). Dies ist beispielsweise der Fall bei *tt1* Mutanten, die Epicatchine hauptsächlich in den Region 1 und 3 akkumulieren. Man findet bei *tt1* darüber hinaus teilweise ein punktuell Auftreten von Epicatchinen in der gesamten Region 2. Allerdings scheint TT1 einen von den übrigen Regulatoren der PA-Biosynthese zu unterscheidenden Modus der Regulation auszuüben. So wird im Fall von *tt2*, *tt8*, *tt16* und *ttg1* Mutanten die *BAN*-Expression in Region 2 beeinträchtigt. Bei *tt1*-Mutanten ist die *BAN*-Expression in Region 2 dagegen nur in wenigen Zellen im Bereich der Chalaza gestört (Debeaujon *et al.*, 2003). Dennoch wird PA-Akkumulation im *tt1*-Hintergrund hauptsächlich in Mikropyle und Chalaza, hingegen kaum im restlichen Endothel gefunden. Die PA-Biosynthese scheint also in Mikropyle und Chalaza TT1-unabhängig zu sein und im Endothel TT1-abhängig, obwohl die *BAN*-Expression dort weitestgehend TT1-unabhängig ist. Es ist

allerdings anzumerken, dass eine leicht verminderte *BAN*-Expression in Schoten von *tt1*-Mutanten beobachtet wurde (Lu, unveröffentlicht).

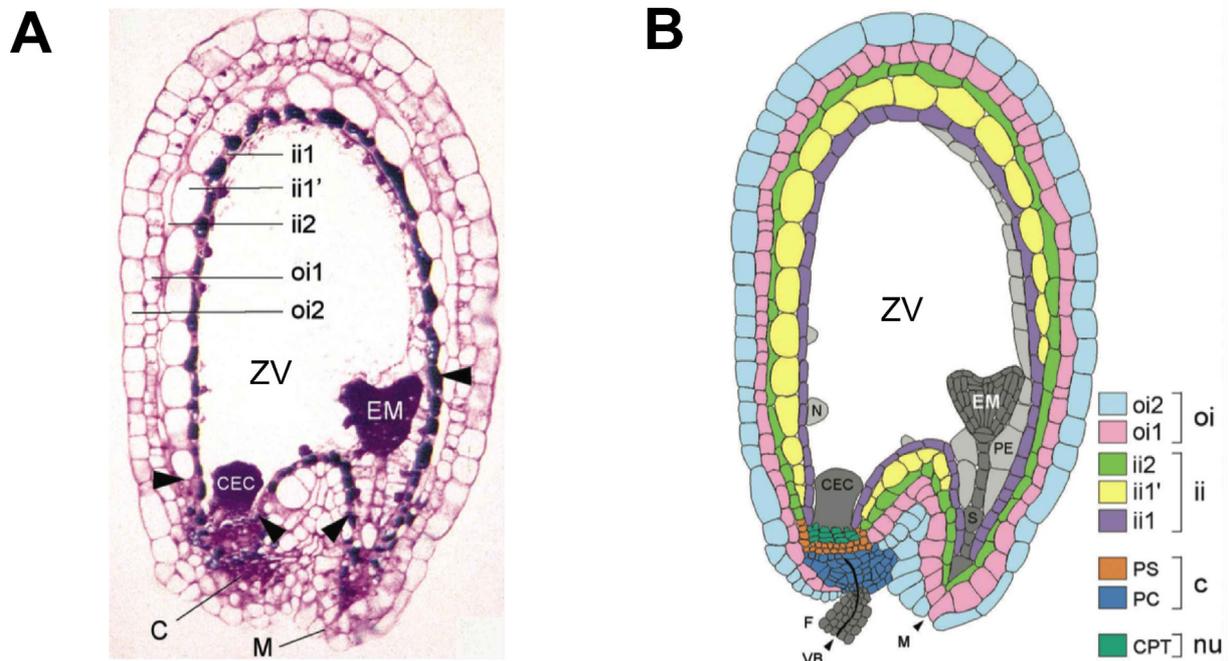


Abbildung 1-6. Struktur der Samenschale von *A. thaliana*.

(A) Längsschnitt eines Samens im Herzstadium des Embryos, der mit Toluidin-Blau gefärbt wurde. Man erkennt die Akkumulation polyphenolischer Substanzen in der ii1-Schicht, sowie in einigen Zellen der Chalaza und wenigen Zellen der ii2-Schicht. (B) Schematische Darstellung des gezeigten Samens. Abkürzungen: C, Chalaza; CEC, *chalazal endosperm cyst*; CPT, proliferierendes Chalazagewebe; EM, Embryo; F, Funiculus; ii, inneres Integument; M, Mikropyle; N, Nodule; nu, Nucellus; oi, äußeres Integument; PC, Plazentochalaza; PS, pigmentierter Strang; PE, peripheres Endosperm; S, Suspensor; VB, Leitbündel; ZV, zentrale Vakuole. Modifiziert nach Debeaujon *et al.*, (2003).

1.4. Transkriptionsfaktorklassen in *A. thaliana*

Zwei wichtige Klassen von Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana*, die R2R3-MYB- und bHLH-Proteine, sind bereits in Abschnitt 1.1.2. behandelt worden. Daneben erfüllen noch weitere Transkriptionsfaktorfamilien wichtige Aufgaben in der Entwicklung und im Metabolismus der Pflanzen. Die kodierenden Gene für zwei dieser Familien, die *R3-MYB*- und die *KNOX*-Gene, sollen im Folgenden behandelt werden.

1.4.1. *R3-MYB*-Gene – Negative Regulation

Die große Familie der *R2R3-MYB*-Gene (Stracke *et al.*, 2001) in *A. thaliana* stammt wahrscheinlich von einem Vorläufergen ab, das für ein Protein mit drei MYB-Wiederholungen

kodiert. Solche *R1R2R3-MYB*-Gene treten in Tieren mit *c-MYB* und verwandten Genen auf und werden in Pflanzen in der *pc-MYB* Genfamilie gefunden (Braun und Grotewold, 1999). Daneben werden in Pflanzen jedoch auch *MYB*-artige Gene gefunden, die für Proteine mit nur einer *MYB*-Wiederholung kodieren (Tominaga *et al.*, 2007). Diese Gene werden im Folgenden als *R3-MYB*-, *single repeat MYB* oder kleine *MYB*-Gene bezeichnet.

Zu den *R3-MYB*-Genen in *A. thaliana* zählen die Gene *CAPRICE* (*CPC*), *TRIPTYCHON* (*TRY*), *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE 1, 2 und 3* (*ETC1*, *ETC2* und *ETC3*) (Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b; Simon *et al.*, 2007). Die von diesen Genen kodierten Proteine sind an der Ausbildung des Trichommusters auf Blättern und der Zellidentität von Wurzelepidermiszellen beteiligt. Im hierfür verantwortlichen Mechanismus kommt es wahrscheinlich zu einer *R3-MYB*-vermittelten „lateralen Inhibierung“ der Expression bestimmter Gene in Zellen, die den *R3-MYB*-exprimierenden Zellen benachbart sind. Dies wurde im Fall von *CPC* gezeigt, das in Nicht-Wurzelhaarzellen exprimiert wird und in Wurzelhaarzellen seine eigene Expression sowie die des *R2R3-MYB*-Gene *WEREWOLF* (*WER*) und des Homöoboxgens *GLABRA2* (*GL2*) hemmt (Lee und Schiefelbein, 2002). Für die anderen *R3-MYB*s wird ein ähnlicher Mechanismus angenommen (Simon *et al.*, 2007). Auf molekularer Ebene wird angenommen, dass die *R3-MYB*-Proteine mit *bHLH*-Proteinen interagieren können, die üblicherweise in Kombination mit *R2R3-MYB*-Proteinen und *WD40*-Proteinen unter Ausbildung von *MBW*-Komplexen als transkriptionelle Aktivatoren fungieren. So wurde eine Interaktion zwischen den *R3-MYB*-Proteinen *CPC* und *TRY* und den *bHLH*-Proteinen *GL3* und *EGL3* in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten gezeigt (Bernhardt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Durch die *R3-MYB/bHLH*-Interaktion könnte die Ausbildung der *MBW*-Komplexe gestört werden, was zu einer *R3-MYB*-vermittelten Reprimierung führen würde. Ein solcher Mechanismus der lateralen Inhibierung vermittelt durch *R3-MYB/bHLH*-Interaktion ist in Abbildung 1-7 schematisch für die Rolle von *CPC* in der Wurzelzellentwicklung dargestellt.

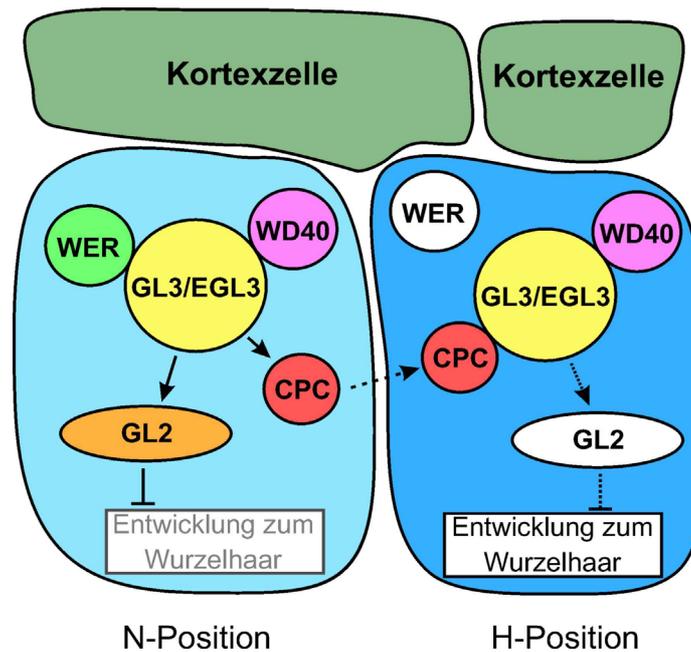


Abbildung 1-7. Rolle von CPC bei der Zellentwicklung in der Wurzelepidermis.

In der Wurzelepidermis werden zwei verschiedene Positionen für die Zellen unterschieden. Zellen der H-Position entwickeln sich im Gegensatz zu Zellen der N-Position zu Wurzelhaaren. Die für die Zellentwicklung entscheidenden Transkriptionsfaktoren sind dargestellt. Pfeile deuten auf Aktivierung hin, Linien, die mit einem Querstrich abschließen auf Inhibierung. Gestrichelte Linien zeigen hierbei an, dass die entsprechende Regulation nicht aktiv ist. *CPC* wird in Zellen der N-Position exprimiert. Es erfolgt dann eine Translokation des Proteins in Zellen der H-Position, wo es die Aktivierung von *GL2* verhindert, was zur Wurzelhaarzellendifferenzierung führt. Modifiziert nach (Bernhardt *et al.*, 2003).

Ein weiteres R3-MYB Protein, das jedoch lediglich entfernt verwandt mit den genannten Faktoren *CPC*, *TRY* und *ETC1-3* ist, ist *MYBL2*, das zuvor als Blatt-spezifisches MYB-Protein beschrieben wurde (Kirik und Baumlein, 1996). *MYBL2* weist jedoch tatsächlich ein breiteres Expressionsmuster auf und wird darüber hinaus unter anderem in Kotyledonen, Infloreszenzen und in der Samenschale gefunden (Dubos, unveröffentlicht). Auch für *MYBL2* gibt es Hinweise auf Interaktion mit bHLH-Faktoren, wie *GL3*, *EGL3* und *TT8* (Sawa, 2002; Zimmermann *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *MYBL2* einen Einfluss auf die Trichomentwicklung haben könnte. Diese ist in *MYBL2*-Überexpressionslinien gestört, was auf eine verminderte *GL2*-Expression zurückgeführt werden kann, da *GL2* zur Trichomentwicklung benötigt wird (Sawa, 2002). Weil *MYBL2* aber vermutlich *in vivo* auch mit *TT8* interagieren kann, worauf es Hinweise in Yeast Two-Hybrid Experimenten gibt (Zimmermann *et al.*, 2004), ist neben einer Rolle in der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung eine Beteiligung am Flavonoidmetabolismus nahe liegend (vergleiche Abschnitt 1.1.2. und 1.1.3.).

1.4.2. Klasse 1 KNOX-Gene – Sprossachsenmeristementwicklung

Eine wichtige Genfamilie, die für Transkriptionsfaktoren kodiert, welche die Entwicklung des Sprossachsenmeristems beeinflussen, ist die Familie der Homöobox-Gene. Die von den Homöoboxgenen kodierten Transkriptionsfaktoren werden auch als Homöodomänenproteine bezeichnet. Die Homöodomäne besteht aus 61 bis 66 Aminosäuren und besteht aus drei Helices, von denen die dritte sequenzspezifische DNA-Interaktionen eingehen kann und auf diese Weise den Homöodomänenproteinen die Erkennung von Zielgenen erlaubt, deren Expression sie regulieren können. Homöoboxgene wurden zunächst in *Drosophila* beschrieben, wo sie die segmentartige Organisation des Körpers regulieren, wurden aber auch in anderen Organismen gefunden (Scott und Weiner, 1984; Gehring, 1987).

Unter den Homöobox-Genen, die in Pflanzen eine Rolle spielen, ist die Gruppe der *Knotted1-like homeobox (KNOX)* Gene zu finden. Das im Maisgenom gefundene Gen *Knotted1 (Kn1)* stellt das erste identifizierte Gen in Pflanzen dar, das für ein Homöodomänenprotein kodiert. Der *kn1 knock out* führt zu einer veränderten Blattmorphologie (Vollbrecht *et al.*, 1991). Die mit *Kn1* verwandten KNOX-Gene werden in den verschiedensten pflanzlichen Organismen gefunden. Grundsätzlich lassen sie sich in zwei Klassen einteilen. Die KNOX-Gene der Klasse 1 werden üblicherweise im Sprossachsenmeristem exprimiert, während die der Klasse 2 ein breiteres Expressionsmuster aufweisen (Hake *et al.*, 2004). In Abbildung 1-8 ist ein phylogenetischer Baum von Genen beider Klassen aus verschiedenen Organismen dargestellt.

In *A. thaliana* werden mit *KNAT1/BREVIPEDICELLUS (BP)*, *KNAT2*, *KNAT6* und *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* vier verschiedene KNOX-Gene der Klasse 1 gefunden. Diese sind an der Bildung und Beibehaltung der Gewebeidentität des Sprossachsenmeristems beteiligt. So wurde durch Analyse von *stm knock out* Pflanzen gezeigt, dass das *STM* Gen für die Bildung des Sprossachsenmeristems während der Embryogenese erforderlich ist (Long *et al.*, 1996). *KNAT1/BP* beeinflusst dagegen die Elongation der Stängel, was im Fall von *bp knock out* Mutanten in veränderter Morphologie der Infloreszenzen zum Ausdruck kommt (Venglat *et al.*, 2002).

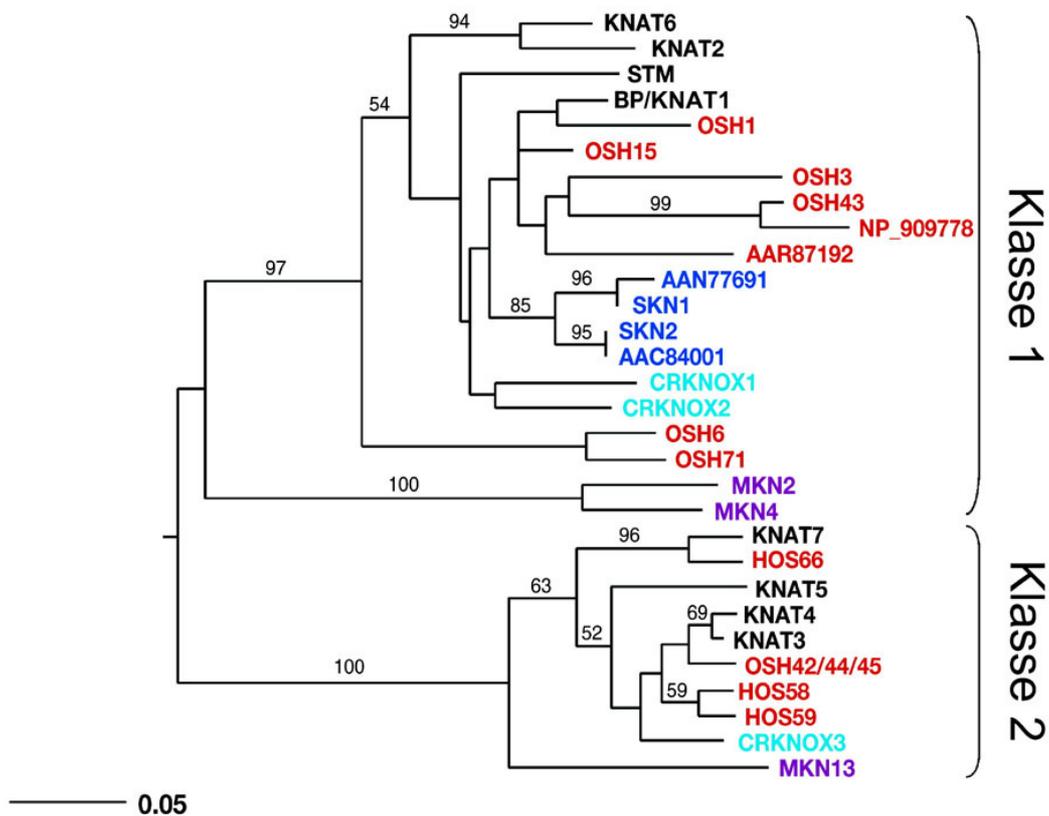


Abbildung 1-8. Phylogramm der Homeodomänen in KNOX-Transkriptionsfaktoren.

Die bekannten Homöodomänen aus KNOX-Proteinen verschiedener Organismen sind dargestellt. Die Namen der KNOX-Proteine sind in die Klassen 1 und 2 eingeteilt (siehe Text). Schwarz, *A. thaliana*; rot, *Oryza sativa*; blau, Gymnospermen; türkis, Farne; violett, Bryophyten. Die Nummern über den Ästen geben *bootstrap* Werte an, wobei nur Werte über 50 % angegeben wurden. Der Maßstab gibt die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position an. Modifiziert nach Hake *et al.*, (2004).

Die *KNOX*-Gene können wiederum von anderen Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Bislang ist in *A. thaliana* mit der *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* Familie lediglich eine Genfamilie beschrieben, die die *KNOX*-Genexpression positiv reguliert (Aida *et al.*, 1999; Hibara *et al.*, 2003). Dagegen treten inhibitorische Mechanismen im Zusammenhang mit der Regulation der Expression der *KNOX*-Gene häufiger auf. Negative Regulatoren, die beispielsweise dazu dienen können, *KNOX*-Gen Fehlexpression in Blättern zu verhindern, wurden dadurch identifiziert, dass entsprechende *knock out* Mutanten phänotypisch *KNOX*-Gen Überexpressionspflanzen glichen. Ein negativer Regulator der *KNOX*-Genexpression in *A. thaliana* ist das *MYB*-Gen *ASYMMETRIC LEAVES / AS1*. Ein *as1 knock out* führt zu morphologischen Veränderung der entsprechenden Pflanzen (Byrne *et al.*, 2000). Weitere Beispiele für negative Regulatoren sind die *YABBY/YAB* und *BLADE ON PETIOLE / BOP* Genfamilien (Kumaran *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2003).

1.5. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es ein tieferes Verständnis für die von Regulatoren der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* beeinflussten biologischen Prozesse zu gewinnen. Hierzu wurde eine Reihe von Regulatoren ausgewählt, für die eine Beteiligung am Flavonoidstoffwechsel bekannt war oder vermutet wurde. Die Auswahl beinhaltete dabei Proteine verschiedener Klassen, für die angenommen wurde, dass sie die Synthese jeweils einer der drei Untergruppen der in *A. thaliana* gebildeten Flavonoide – der Flavonole, der Anthocyane und der Proanthocyanidine – beeinflussen können. Als Flavonol-spezifische Regulatoren wurden die R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe 7, als Proanthocyanidin-spezifischer Regulator wurde das Zinkfingerprotein TT1 und als potenzieller Regulator der Anthocyane das R3-MYB-Protein MYBL2 ausgewählt. Diese Regulatoren sollten hinsichtlich potenzieller neuer Zielgene oder hinsichtlich ihres Einflusses auf physiologische Prozesse innerhalb der Pflanze untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Regulation der Proanthocyanidinbiosynthese in der Samenschale von *A. thaliana* untersucht werden. Insbesondere sollte der Einfluss von TT1 im Samenschalenendothel betrachtet werden. Obwohl verschiedene *tt1*-Mutanten bekannt waren, war zu Beginn dieser Arbeit keine stabile *tt1 knock out* Linie verfügbar, in der von einem vollständigen Ausfall der TT1-Proteinfunktion ausgegangen werden konnte. Eine solche sollte generiert werden, um den im Fall der bekannten *tt1*-Mutanten beobachteten Phänotyp zu überprüfen. Weiterhin bestand über die unterschiedlichen Regulationsmechanismen, die auf die Proanthocyanidinbiosynthese in Mikropyle und Chalaza auf der einen Seite und im Samenschalenendothel auf der anderen Seite Einfluss nehmen, Unklarheit. Um Hilfsmittel für die Analyse dieser Regulationsmechanismen zur Verfügung zu stellen, sollte eine EMS-mutagenisierte Population von Pflanzen mit *tt1* Hintergrund generiert werden. Um weiterhin die molekulare Funktion des zur WIP-Familie der C2H2-Zinkfingerproteine gehörenden TT1-Proteins besser verstehen zu können, sollten die restlichen Mitglieder dieser Proteinfamilie WIP2 bis WIP6 hinsichtlich intrazellulärer Lokalisation und potenzieller Zielgene (*KNOX*-Gene der Klasse 1) untersucht sowie die Expressionsprofile und Auswirkungen von *knock out* und Überexpression der entsprechenden Gene bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten neue Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren aus der MYB-Proteinfamilie untersucht werden. Auf der einen Seite sollten potenzielle neue Zielgene von MYB11, MYB12 und MYB111, die die Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren bilden und von der *PFG*-Genfamilie kodiert werden, bestätigt werden. Für diese R2R3-MYB-Proteine war bekannt, dass sie Gene, die für die Produktion von

Flavonolen benötigt werden, nicht jedoch für die Synthese von Anthocyanen und Proanthocyanidinen, positiv regulieren. Die potenziellen neuen Zielgene, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten, wurden zuvor bereits durch ATH1 Genchip-Analyse identifiziert. Sie beinhalten zwei Glykosyltransferase-kodierende Gene, die möglicherweise für die Synthese von Flavonolglykosiden benötigt werden sowie ein Gen mit unbekannter Funktion. Ein anderes MYB-Protein, dessen vermuteter Einfluss auf die *DFR*-Expression, die vor allem die Anthocyanbiosynthese reguliert, untersucht werden sollte, ist MYBL2. MYBL2 gehört – im Gegensatz zu den *PFG*-kodierte R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren – zu den R3-MYB-Proteinen. Für MYBL2 wurde eine Beteiligung am Flavonoidmetabolismus bislang lediglich vermutet, da zuvor in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten eine Interaktion mit dem bHLH-Protein TT8 nachgewiesen wurde, welches eine Rolle bei der Proanthocyanidinbiosynthese spielt. Ein weiterer bHLH-Faktor, der aber im Gegensatz zu TT8 hauptsächlich Einfluss auf die Anthocyanbiosynthese nimmt, ist EGL3. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob MYBL2 in der Lage ist die TT2/TT8/TTG1- und die PAP1/EGL3/TTG1-vermittelte Aktivierung des *DFR*-Promotors zu beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Laborchemikalien wurden soweit nicht anders angegeben in analytischer Qualität eingesetzt. Sie wurden – soweit nicht gesondert vermerkt – von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Biorad (München), Biozym (Hameln), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

Es wurden Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuklease A (RNaseA), DNaseI, *ExoSAP-IT*, *Antarctic Phosphatase* und Lysozym der Firmen Ambion (Austin, TX, USA), Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius), Invitrogen (Paisley, GB), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Promega (Madison, WI, USA), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg) und USB (Staufen) eingesetzt. Taq-DNA-Polymerase und *PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase* wurde von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und Roche (Mannheim), *SuperscriptTM II RNase H Reverse Transkriptase* von Invitrogen (Paisley, GB) bezogen. Weiterhin wurden Zellulase ("Onozuka R-10") und Mazeroyzm (R-10) von der Firma Serva (Heidelberg) verwendet.

2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien für die Anzucht von Bakterien und Pflanzen sowie Zellkulturmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Die Sterilisierung erfolgte – soweit nicht anders angegeben – durch Autoklavieren. Hitzelabile Substanzen (Antibiotika) wurden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

2.1.2.1. Medien für die Anzucht von Bakterien

IPTG/X-Gal-Mix:

30 µL	X-Gal (50 mg/mL 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid in DMF)
40 µL	IPTG (100 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid)
30 µL	LB-Medium

LB-Medium:

10 g	Bacto Trypton
5 g	Bacto Hefeextrakt
5 g	NaCl
	H ₂ O ad 1000 mL

LB-Platten: 10 g Bacto Trypton
 5 g Bacto Hefeextrakt
 5 g NaCl
 18 g Bacto Agar
 H₂O ad 1000 mL

SOC-Medium: 20 g Bacto Trypton
 5 g Bacto Hefeextrakt
 0,5 NaCl
 2,5 mL 1 M KCl
 3,6 g Glukose
 5 mL 2 M MgCl₂
 H₂O ad 1000 mL
 Sterilfiltrieren (Flaschenfilter mit Porengröße 0,22 µm,
 Millipore, Billerica, MA, USA) statt autoklavieren!

TBI: 23 g KH₂PO₄
 164 g K₂HPO₄
 H₂O ad 1000 mL

TBII: 12 g Bacto Trypton
 24 g Bacto Hefeextrakt
 4 mL Glycerin

TB-Medium: TBI und TBII im Verhältnis 1:9 mischen

TFB1-Medium: 30 mM Kaliumacetat
 100 mM Rubidiumchlorid
 10 mM CaCl₂
 50 mM MnCl₂
 15 % Glycerin
 pH 5,8 mit Essigsäure
 sterilfiltrieren

TFB2-Medium: 10 mM MOPS
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl
 15 % Glycerin
 pH 6,5 mit KOH
 sterilfiltrieren

YEP-Medium: 10 g Bacto Trypton
 10 g Bacto Hefeextrakt
 5 g NaCl
 H₂O ad 1000 mL

YEP-Platten: 10 g Bacto Trypton
 10 g Bacto Hefeextrakt
 5 g NaCl
 15 g Bacto Agar
 H₂O ad 1000 mL

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

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

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

1/2 MS-Platten: 2,15 g *Murashige-Skoog Basal Salt Mixture* Salze (Sigma)
 pH 5,7 mit KOH einstellen
 8 g Agar
 H₂O ad 1000 mL

Für Selektionsplatten wurden 50 µg/mL Kanamycin zugesetzt. Bei Bedarf wurde 0,5 x *Gamborg's Vitamin Solution* (Sigma, Deisenhofen) zugegeben (500 µL pro Liter Medium).

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

B5-Medium: 3,2 g Packung *Gamborg's B5-Medium* (Sigma, Deisenhofen)
 (Kombink und Hahlbrock, 1986) 1 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
 136 g Saccharose
 pH 5,7 mit NaOH einstellen
 H₂O ad 1000 mL
 Sterilfiltrieren (Flaschenfilter mit Porengröße 0,22 µm, Millipore, Billerica, MA, USA)

Enzym-Lösung: 1,4 g Zellulase Onozuka R-10
 0,325 g Mazerozym R-10
 240 mM CaCl₂ ad 120 mL
 Die Komponenten werden in einem Becherglas über einen Zeitraum von ca. 1 h gelöst. Anschließend sterilfiltrieren (Flaschenfilter mit Porengröße 0,22 µm, Millipore, Billerica, MA, USA).

MS-Medium: 4,3 g *Murashige-Skoog Basal Salt Mixture* Salze (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
 H₂O ad 1000 mL
 Die Leitfähigkeit sollte ca. 6,7 mS/cm betragen. 40 mL Aliquots in Erlenmeyer-Kolben autoklavieren.

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

2.1.2.4. Puffer und Lösungen

240 mM CaCl₂: 240 mmol CaCl₂
 H₂O (MilliQ) ad 1000 mL, autoklavieren

275 mM Ca(NO₃)₂: 275 mmol Ca(NO₃)₂
 H₂O (MilliQ) ad 1000 mL,
 pH 6,0 mit 1 M KOH, autoklavieren

<u>Chloralhydrat-Lösung:</u>	800 mg	Chloralhydrat
	100 µL	Glycerin
	200 µL	H ₂ O
<u>DEPC-Wasser:</u>	1,5 mL	Diethylpyrocarbonat (DEPC)
		H ₂ O (MilliQ) ad 1000 mL,
		Schütteln über Nacht, danach zur Inaktivierung des DEPC autoklavieren.
<u>Fixans:</u>	0,3 % (v/v)	Formaldehyd
	10 mM	MES-KOH
	300 mM	Mannitol
<u>GUS-Puffer:</u>	50 mL	100 mM Natriumphosphatpuffer
	200 µL	0,5 M EDTA pH 8,0
	100 µL	Triton X-100
	71 µL	β-Mercaptoethanol
		H ₂ O (MilliQ) ad 100 mL
<u>100 mM Kalium-phosphatpuffer:</u>	16 mL	0,2 M NaH ₂ PO ₄
	84 mL	0,2 M Na ₂ HPO ₄
	100 mL	H ₂ O
		Der pH-Wert sollte 7,5 betragen.
<u>Luziferase-Extraktionspuffer:</u>	100 mM	Kaliumphosphatpuffer
	1 mM	Dithiothreitol
<u>Luziferase-Substratlösung:</u>	75,75 mL	2x Stocklösung
	33,3 mM	Dithiothreitol
	270 µM	CoA Lithiumsalz
	470 µM	Luziferin
	570 µM	ATP
		ad 151,5 mL mit H ₂ O (MilliQ)
		Sterilfiltration und Aliquotierung, einfrieren bei -80 °C

<u>Lysozym-Lösung:</u>	10 mg/mL	Lysozym
	10 mM	Tris/HCl pH7,5
	0,1 mM	EDTA
<u>4-MUG-Substrat-lösung:</u>	100 mL	GUS-Puffer
	0,07046 g	4-Methylumbelliferyl- β -D-glukuronid (4-MUG)
		Sterilfiltration und Aliquotierung, einfrieren bei -20 °C
<u>NaP_i-Puffer:</u>	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	pH 7,0	mit Phosphorsäure einstellen
<u>100 mM Natrium-phosphatpuffer:</u>	39 mL	0,2 M NaH ₂ PO ₄
	61 mL	0,2 M Na ₂ HPO ₄
	100 mL	H ₂ O
		Der pH-Wert sollte 7,0 betragen.
<u>PEG-Lösung:</u>	25 % (w/v)	PEG 6000
	100 mM	Ca(NO ₃) ₂
	450 mM	Mannitol
	pH 9	Mit KOH
<u>5x Probenpuffer:</u>	20 mM	EDTA (pH 8,0)
	50 % (v/v)	Glycerin
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,02 % (w/v)	Xylencyanol

<u>RNA- Extraktionspuffer:</u>	6 g	p-Aminosalicylsäure
	10 mL	1M Tris/HCl (pH8)
	50 mL	100 mM EGTA (pH8)
	0,584 g	NaCl
	1 g	SDS
	0,5 g	Natriumdeoxycholat
	472 µL	Nonidet P40 Substitute (Fluka, Buchs, Schweiz)
	0,5 g	Polyvinylpyrrolidon (PVP)
	38 mg	Thioharnstoff
		DEPC-Wasser ad 100 mL, sterilfiltrieren
	75 g	Polyvinyl-polypyrrolidon (PVPP)
	1 %	β-Mercaptoethanol direkt vor der Verwendung zusetzen
<u>RNase-Lösung:</u>	10 µg/mL	RNaseA
		10 min auf 100 °C erhitzen
<u>Saures Phenol:</u>	65 mL	0,25 M Natriumacetat (pH4,5) mit 19 % Glycerin
	100 g	<i>molecular grade</i> Phenol
<u>2x Stocklösung:</u>	40 mM	Tricine
	2,14 mM	Mg(CO ₃) · Mg(OH) ₂ · 5H ₂ O
	5,34 mM	Mg(SO ₄) ₂
	0,2 mM	EDTA
<u>50x TAE-Puffer:</u>	242 g	Tris
	57,1 mL	Eisessig
	40 mL	0,5 M EDTA (pH 8,0)
		H ₂ O ad 1000 mL
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/HCl pH7,5
	1 mM	EDTA für TE (10/1)
	0,1 mM	EDTA für TE (10/0,1)

TELT-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH7,5
 62,5 mM EDTA
 2,5 mM LiCl
 0,4 % Triton X-100

X-Gluc-Lösung: 0,5 mg/mL X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glukuronsäure)
 5 mg X-Gluc in 50 µL DMF lösen und mit NaPi-Puffer auf
 10 mL auffüllen

2.1.3. Desoxyoligonukleotide (Primer)

Der Entwurf der verwendeten Desoxyoligonukleotide erforderte ein Abschätzen der Schmelztemperatur (T_m). Die Berechnung erfolgte gemäß den folgenden Formeln:

$$(1) T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times [\text{Anzahl G/C}] + 2 \times [\text{Anzahl A/T}]$$

$$(2) T_m [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 0,41 \times [\% \text{ G/C}] - 675 / [\text{Anzahl Basenpaare}] - [\% \text{ Fehlpaarungen}]$$

Üblicherweise wurde Formel (1) angewendet. (2) betrifft Fälle, in denen Fehlpaarungen vorgesehen sind.

Die verwendeten Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Paisley, GB) und Metabion (Martinsried) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben:

TT1-spezifische Oligonukleotide:

GH01 ATCATACCGGTAAAAACAAAGTCTCGGAGAC
 GH08 ATCATGAATTCTTAAAAACAAAGTCTCGGAG
 G070 TTTTTAACTAGTATACATTGAAGTTAAATATTTGA
 G071 CAATCTTCAGATTATCATGTGGGGAC
 G072 GTCCCCACATGATAATCTGAAGATTG
 G073 GCCCCGAGCTCAAAAAAAAAAAGTCTCGGAG
 G076 CCTTTACCGAGCTCAAAAAACAAAGTCTCG
 G077 ATGACGGAGCTCGCAGCACTGGATCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGT
 TTCGCTTAACCCGGGATGACG
 G078 CGTCATCCCGGGTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATC
 CAGTGCTGCGAGCTCCGTCAT
 G086 TCTTGAATGAAACATTACTATGCTCGGTCA
 G087 TGCATGGTCAATTTTGTATTGATCTGTTTTT
 K100 GCAAATTCTCATAGGGTTCACCTC
 K101 ATGTCCCCACATGTGCATC
 L35 CAATCTTCAGATGCACATGTG
 L73 CTGTATTGTGAACCATGTCC
 S105 CACCACCACTATACGAGATATCCTC

S130	TCCTTAAGAGAACGTTTGTG
S143	GAACCATGTCCCCACATGTGC
S150	ATAACTAGTATATTAGAAGTAATACTTG
S151	GACTCCATGGAATGTGGTGAATAG
S152	CATTCCATGGAGTCACCACCACTATAC
S233	CGGAAAGTTCATTCTCGATGC
S265	CACCACTATACGAGATATCC
S323	GTTCACTCATTTTTCTTGCCATGTATG
S333	GAACCATGTCCCCACATGATA
S339	CTCTAAATATTATGAATATAGATTAT
S346	TTAAAAAACAAGTCTCG
S383	TCCTTAAGAGAAGCGGCAGC

WIP-spezifische Oligonukleotide:

GH02	ATCATACCGGTTTTAGACTGCATTGACTCATG	WIP2
GH03	ATCATACCGGTCTCTGTGGTGACGCATTC	WIP3
GH04	ATCATACCGGTTTCTTGCTGCTCGACATCAG	WIP4
GH05	ATCATACCGGTTTGCTCGATATCAGAAGCAG	WIP5
GH06	ATCATACCGGTGTAATTGTCATCAGAAATCTG	WIP6
GH09	ATCATGAATTCCTATTTAGACTGCATTGACTC	WIP2
GH10	ATCATGAATTCTCACTCTGTGGTGACGCATTC	WIP3
GH11	ATCATGAATTCTCATTCTTGCTGCTCGACATC	WIP4
GH12	ATCATGAATTCTTATTGCTCGATATCAGAAGC	WIP5
GH13	ATCATGAATTCTTAGTAATTGTCATCAGAAATC	WIP6
GH37	AAGTTGCGTCTGCTGGTTAGA	WIP2
GH38	TTTGAAAAGCCCTACCTCCA	WIP2
GH39	CAACAGATACAATAACATGCAGATG	WIP2
GH40	TACCTCAGAGGCAGGCTCAT	WIP2
GH41	CTGTGGTTTGCTGCTTTTCA	WIP2
GH42	ATAGCACGGAAGCCTTAGCA	WIP2
GH43	GCAAGTTTCTTTTTCCCTTCTTC	WIP4
GH44	CAAAAAGTCAAAACTTGAAAATCA	WIP4
GH45	ATCATCCATGGATTTAGACTGCATTGACTCATG	WIP2
GH46	ATCATCCATGGACTCTGTGGTGACGCATTC	WIP3
GH47	ATCATCCATGGATTCTTGCTGCTCGACATCAG	WIP4
GH48	ATCATCCATGGATTGCTCGATATCAGAAGCAG	WIP5
GH49	ATCATCCATGGAGTAATTGTCATCAGAAATCTGAC	WIP6
G085	GGAGATCCCGGGCTATTTAGACTGCATTGACT ATG	WIP2
G126	GACCTCGACCATGAGTACAGC	WIP2
G127	TCTCCGCCGACTGAATCTT	WIP2
S178	ATGAGACGAAAGGCTTAAGTTTCG	WIP3
S183	AGACCATGGCTAATTCTTATGAGACGAAAGGC	WIP3
S185	AGAGGCCATGGCGGCCACTGATCCTTATTTCCAATTTT	WIP2
S243	AGACCATGGCTCTATTTTCCACTGTTTTGTACATCG	WIP4

S245	AGACCATGGCTTCTAATCCAGCTTGTTCGAATCTC	WIP5
S247	AGACCATGGCTTATAATAATAACCAATATAGCTTCTCC	WIP6
S271	CGGTCCTTTTCTGTATTGTGAA	WIP4
S348	CTATTTAGACTGCATTGACTC	WIP2
S353	TTATTGCTCGATATCAGAAGC	WIP5

KNOX-spezifische Oligonukleotide:

GH17	ATACTAGGATCCGATCTAGAGCCCTAGGATTTG	KNAT1
GH18	ATACTACCATGGCCAGATGAGTAAAGATTTGAG	KNAT1
GH19	ATATTAGAATTCGAATGACAATAAACTCCTAC	KNAT2
GH20	ATACTACCATGGATGTGATCGTAGTGAGATAC	KNAT2
GH21	ATACTAGAATTCTTAGTTTTATCCACAACTTG	KNAT6
GH22	ATACTACCATGGCATCCATAAGTATAAGATCTC	KNAT6
GH23	ATACTAGGATCCCATGCTTATTCTCTTGATAG	STM
GH24	ATACTACTCGAGACTAGTATTATTATTCACTTTGG	STM
GH25	ATACTAGAATTCACGGGAACAGTATGAAC	KNAT2
GH28	ATATCATTCAACCTAGCAAGAAAC	KNAT1
GH29	CAGGCTATGGTTTCTTGCTAGG	KNAT1
GH30	GGCCACTATAAAAAATAGTTCC	KNAT2
GH31	CACTCTTAGGAACTATTTTTTATAGTG	KNAT2
GH32	GTTTTTCGAAAATATATATACATTGGG	KNAT6
GH33	TAATCCCCAATGTATATATATTTTTCG	KNAT6
GH34	GGTATGAAAACCAAACCAAATG	STM
GH35	GTCATTTGGTTTTGGTTTTTCATAC	STM
G057	ATACTAAGTCGACTGAAATTGTACACACTTTTGAAAACA	KNAT1
G058	ATACTAAGTCGACATGACTTGCTATGCCGAAAT	KNAT1
G067	TTCTTGGTCGACCATATTAATGAGAATATTGG	KNAT1
G068	CGAAAAGTCGACGGTTTTATTTATATATAAATCGTC	KNAT1
G074	TCAACACCGTCTGTCTCTGCTG	KNAT1
G075	CATCCATCACCATGAACTGC	KNAT1
G124	GCTTACTTGACTGCCAAAAG	KNAT1
G125	CCGCCGTAATTCTATCAACC	KNAT1
G146	TCCTAAAGAAGCACGGCAGAAGC	KNAT1
G147	GCCAACGCTACCTTCTCTGACTCA	KNAT1

Weitere genspezifische Oligonukleotide:

GH26	GCTGGACGGGTTGCTTAC	GL3
GH27	GGTTCCTGATGATGATGACG	GL3
G060	ATTGGGAATTCAACTTATTACCCAC	TT16
G061	CTACCCATGGCTCTCTTCTTCC	TT16
G062	GGAAGAGGGAGCCACTCATA	TT16
G063	GGTTTCCATAGCCACACAAAA	TT16
G116	AACTTTCTCTCAATTCTCTCTACC	At4g05320

G117	CTTCTTAAGCATAACAGAGACGAG	At4g05320
G139	GGTACCTCCGGAATGAACAAAACCCGCCTTGG	At1g71030
G140	GGATCCTCCGGATCGGAATAGAAGAAGCGT	At1g71030
G144	GTATCGACCGGTATGAACAAAACCCGCCTTCG	At1g71030
G145	AACGTCATGCATTCATCGGAATAGAAGAAGCGTT	At1g71030
RS469	TCCGCTCTTTCTTTCCAAGCTCAT	ACTIN2
RS470	TCCAGCACAATACCGGTTGTACG	ACTIN2

Weitere Oligonukleotide:

8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	T-DNA
BTtG	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG	pBT10
En8130	GAGCGTCGGTCCCCACACTTCTATAC	Transposon
GH07	CCAGCCCCGCCTCTTCG	VP16
GH15	CAAACCCAAAAAAGAGATC	pACTIIa
GH16	GTTTTTCAGTATCTACGATTC	pACTIIa
G084	TAGAGGACATGTTAGATAAAGCGGAATTAATTCCCGAG	GAL4AD
G088	GTTTACCCGCCAATATATCCTG	pJAN
G123	CCGCAGCCGAACGACCGAG	pBT10
GUSu	CGCGATCCAGACTGAATGCCCA	<i>uidA</i> ORF
J504	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG	T-DNA
K074	TGGGATAACATCATAGGATTTTCG	18S rRNA
K075	CGACTGTCCCTGTTAATCATTACTC	18S rRNA
nosT	GCAAGACCGGCAACAGGATT	nos terminator
P35S	ACAATCCCACTATCCTTC	Pro _{35S}
revI	CAGGAAACAGCTATGACCATG	pTOPO
RS651	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCCATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTV	oligo-dT
unil	CGTTGTAAAACGACGGCCAGT	pTOPO

2.1.4. Bakterienstämme und DNA-Vektoren

Zur Herstellung dam- und dcm-methylierter Plasmid-DNA wurde der Stamm *Escherichia coli* XL1-Blue, zur Herstellung nicht methylierter DNA der Stamm *E. coli* K12 ER2925 verwendet. Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 wurde zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt.

<u><i>E. coli</i> Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz</u>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i>	Fa. Stratagene
K12 ER2925	<i>relA1 lac [F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] 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 hsdR2</i>	Fa. New England Biolabs

<u><i>A. tumefaciens</i> Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz</u>
GV3101	C58C1 Rif ^r Kan ^r Gm ^r (mit Virulenzplasmid pMP90RK)	(Koncz <i>et al.</i> , 1984; Koncz und Schell, 1986)

Zur Herstellung von Reporter- und Effektoronstrukten in Promotorinteraktionsstudien wurden Vektoren eingesetzt, die Derivate von pBT2 sind (Weisshaar *et al.*, 1991). Für Zwischenstufen während einiger Klonierungen wurde der Vektor pCRII TOPO (Fa. Invitrogen) eingesetzt. Für Pflanzentransformationen wurden Plasmide eingesetzt, die Derivate von pGPTV (Becker *et al.*, 1992), pJAN (Weisshaar, unveröffentlicht) und pANGUS (Weisshaar, unveröffentlicht) sind. Die übrigen als Ausgangsmaterial verwendeten Plasmide wurden von Ingo Appelhagen, Christian Dubos, Loïc Lepiniec, Frank Mertens, Pieter Ouwerkerk, Martin Sagasser und Ralf Stracke zur Verfügung gestellt.

<u>Plasmid</u>	<u>Wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pACTIIa::NLS:GAL4AD:HA	Hefevektor zur Expression von Fusionsproteinen, Vektorrückgrat kodiert für NLS, eine GAL4 Aktivierungsdomäne und das Hämagglutinin Epitop, Propagation in <i>E. coli</i> möglich, Amp ^r , LEU2	Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht
pANGUS (SA164)	Vektor zur Pflanzentransformation, Amp ^r zur Vermehrung in Bakterien, zwischen LB (<i>left border</i>) und RB (<i>right border</i>) des T-DNA Bereiches eine Kan ^r (<i>nptII</i>), Minimal-TATA Promotor, MCS, <i>uidA</i> -ORF und <i>nosPA</i>	unveröffentlicht
pANGUS::Pro _{AtWIP2} :GUS (SA185)	wie pANGUS mit <i>AtWIP2</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pANGUS::Pro _{AtWIP3} :GUS (SA182)	wie pANGUS mit <i>AtWIP3</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pANGUS::Pro _{AtWIP4(kurz)} :GUS (SA199)	wie pANGUS mit <i>AtWIP4</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pANGUS::Pro _{AtWIP4(lang)} :GUS (SA200)	wie pANGUS mit einer verlängerten Version des <i>AtWIP4</i> -Promotor, die bis in den ORF hineinreicht	Martin Sagasser, unveröffentlicht

pANGUS::Pro _{AtWIP5} :GUS (SA201)	wie pANGUS mit <i>AtWIP5</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pANGUS::Pro _{AtWIP6} :GUS (SA181)	wie pANGUS mit <i>AtWIP6</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pAVA393	<i>f1ori</i> , <i>coIE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , doppelter 35S Promotor aus <i>CaMV</i> , translationeller Enhancer aus <i>TEV</i> , <i>GFP5</i> -ORF, <i>35SPA</i>	(Siemering <i>et al.</i> , 1996; von Arnim <i>et al.</i> , 1998)
pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtTT1</i> :GFP5 (SA81)	wie pAVA393 mit <i>AtTT1</i> , eine NcoI Erkennungsstelle im pAVA393 Vektorrückgrat ist entfernt	(Sagasser <i>et al.</i> , 2002)
pBT4::Pro_{35S}:NLS:VP16 (MS9)	basierend auf pBT2 mit 35S Promotor aus <i>CaMV</i> , NLS, VP16 Aktivierungsdomäne, <i>nosPA</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT4::Pro _{35S} :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>uidA-ORF</i>	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT4::Pro _{TT1} :GUS (SA86)	wie pBT4::Pro _{35S} :GUS mit 3 kb <i>AtTT1</i> -Promotor statt Pro _{35S}	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro_{35S}:LUCm3 (MS83)	pBT2 basierter Vektor, <i>coIE1ori</i> , Amp ^r , -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</i> site, <i>nosPA</i> , MCS	(Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtBHLH2</i> (mhei016)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtBHLH2-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtBHLH42</i> (mhei024)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtBHLH42-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtMYB75</i> (IA16)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtMYB75-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Ingo Appelhagen, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtTT1</i> (SA91)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtTT1-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtWIP2</i> (SA122)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtWIP2-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtWIP3</i> (SA110)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtWIP3-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtWIP4</i> (SA147)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtWIP4-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtWIP5</i> (SA148)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtWIP5-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtWIP6</i> (SA149)	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtWIP6-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT8::Pro _{35S} : <i>AtMYB11</i>	wie pBT8::Pro _{35S} : <i>LUCm3</i> mit <i>AtMYB11-ORF</i> statt <i>LUCm3-ORF</i>	(Stracke <i>et al.</i> , 2007)
pBT10::GUS (MS23)	<i>coIE1ori</i> , Amp ^r , -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 _{ubi} : <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 _{DFR(520)} :GUS (RSt633)	wie pBT10::GUS mit 520bp Fragment des <i>AtDFR</i> -Promotors	(Mehrtens <i>et al.</i> , 2005)
pBT10::Pro _{At2g22590} :GUS (RSt623)	wie pBT10::GUS mit <i>At2g22590</i> -Promotor	(Stracke <i>et al.</i> , 2007)
pBT10::Pro _{At4g15480} :GUS (RSt624)	wie pBT10::GUS mit <i>At4g15480</i> -Promotor	(Stracke <i>et al.</i> , 2007)
pBT10::Pro _{At5g62210} :GUS (RSt625)	wie pBT10::GUS mit <i>At5g62210</i> -Promotor	(Stracke <i>et al.</i> , 2007)

pBT10::Pro _{BAN} :GUS (SA96)	wie pBT10::GUS mit <i>BAN</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT10::Pro _{TT12} :GUS (SA154)	wie pBT10::GUS mit <i>TT12</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBT10::Pro _{LDOX} :GUS (pSA155)	wie pBT10::GUS mit <i>LDOX</i> -Promotor	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pBTdest	wie pBT8, enthält eine <i>atb1-ccdB-atb2</i> -Kassette	(Baudry <i>et al.</i> , 2004)
pBTdest::Pro _{35S} : <i>AtMYB111</i> (RSt256)	wie pBTdest mit <i>AtMYB111</i> -ORF statt <i>ccdB</i>	(Stracke <i>et al.</i> , 2007)
pBTdest::Pro _{35S} : <i>AtMYB123</i> (RSt257)	wie pBTdest mit <i>AtMYB123</i> -ORF statt <i>ccdB</i>	unveröffentlicht
pCRII TOPO	f1ori, <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , Kan ^r	Fa. Invitrogen
pDONR207::AtMYBL2 (GH57)	Gent ^r , Gateway-Vektor der ein <i>AtMYBL2</i> (At1g71030) Insert enthält	Christian Dubos, Loïc Lepiniec, unveröffentlicht
pGPTV	binärer Vektor zur Pflanzentransformation, Kan ^r (<i>nptII</i>), MCS, -46 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> , <i>uidA</i> -ORF, <i>nosPA</i>	(Becker <i>et al.</i> , 1992)
pGPTV::Pro _{35S} : <i>AtTT1</i> (SA92)	wie pGPTV:: <i>TATA</i> :GUS mit Pro _{35S} : <i>AtTT1</i> statt <i>TATA</i> :GUS	(Sagasser <i>et al.</i> , 2002)
pGPTV::Pro _{35S} : <i>AtWIP2</i> (SA123)	wie pGPTV:: <i>TATA</i> :GUS mit Pro _{35S} : <i>AtWIP2</i> statt <i>TATA</i> :GUS	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pGPTV::Pro _{35S} : <i>AtWIP4</i> (SA157)	wie pGPTV mit Pro _{35S} : <i>AtWIP4</i> statt <i>TATA</i> :GUS	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pGPTV::Pro _{35S} : <i>AtWIP5</i> (SA158)	wie pGPTV mit Pro _{35S} : <i>AtWIP5</i> statt <i>TATA</i> :GUS	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pGPTV::Pro _{35S} : <i>AtWIP6</i> (SA159)	wie pGPTV mit Pro _{35S} : <i>AtWIP6</i> statt <i>TATA</i> :GUS	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pJAN (SA160)	Vektor zur Pflanzentransformation, Amp ^r zur Vermehrung in Bakterien, zwischen LB (<i>left border</i>) und RB (<i>right border</i>) des T-DNA Bereiches eine Kan ^r (<i>nptII</i>), -417 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> und <i>nosPA</i> zwischen LB und RB	unveröffentlicht
pJAN::Pro _{35S} : <i>AtWIP3</i> (SA111)	wie pJAN mit <i>AtWIP3</i>	Martin Sagasser, unveröffentlicht
pMDC32::Pro_{2x35S}:AtMYBL2 (pGH56)	Kan ^r , Expressionsvektor für <i>AtMYBL2</i> (At1g71030) zur Verwendung für Protoplastentransfektion	Christian Dubos, Loïc Lepiniec, unveröffentlicht
pUC::Pro _{CHS} :GUS	pUC Vektor mit Pro _{CHS} :GUS	(Hartmann <i>et al.</i> , 1998)
Pro _{35S} : <i>AtMYB12</i>	<i>AtMYB12</i> -Expressionsvektor	(Mehrtens <i>et al.</i> , 2005)

2.1.5. Reagenziensätze

Es wurden die folgenden Reagenziensätze und *Kits* der Firmen AppliChem (Darmstadt), Genomed (Bad Oeynhausen), Qiagen (Hilden) und verwendet.

<i>JETstar Plasmid Purification MIDI Kit</i>	Plasmid-DNA Präparation im <i>MIDI</i> -Maßstab
<i>MAXXBOND</i>	Regeneration von Silicasäulen zur Wiederverwendung
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Elution von DNA aus Agarosegelen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Entfernung von kurzen DNA-Fragmenten (z.B. Oligonukleotide) und anderen unerwünschten Bestandteilen aus DNA-Lösungen
<i>QIAGEN Plasmid Mega Kit</i>	Plasmid-DNA Präparation im <i>Mega</i> -Maßstab
<i>RNeasy Plant Mini Kit</i>	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial bzw. zusätzliche Reinigung von RNA, die zuvor mit anderen Methoden isoliert wurde

2.1.6. Zellkultur und Pflanzen

2.1.6.1. At7 Zellsuspensionskultur

Die in dieser Arbeit verwendete *A. thaliana* Zellkultur At7 (Ökotyp Columbia) wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Trezza *et al.*, 1993; Mehrrens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007). Es handelt sich um eine aus Hypokotyl-Zellen hervorgegangene Zellsuspensionskultur.

2.1.6.2. Pflanzen

Bei der Anzucht von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Pflanzen wurden – soweit nicht anders vermerkt – die Ökotypen Landsberg *erecta* (*Ler*) und Columbia (Col-0) verwendet. Für einige Experimente wurden bereits transformierte Pflanzen oder kommerziell verfügbare Linien verwendet. Die Linien, die nicht selbstständig im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, sind im Folgenden aufgelistet.

Gen	besondere Funktion	Bezeichnung der Pflanzen	Quelle
<i>GL3</i>	EMS-Linie	<i>gl3-1</i>	NASC
<i>TT1</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>tt1-3</i> (SALK_026171)	NASC
	T-DNA Insertionslinie	<i>tt1-4</i> (INRA DXL-6)	Martin Sagasser
	EMS-Linie	<i>tt1-1</i>	Martin Sagasser
	Transposon-Linie	<i>tt1-2</i>	Martin Sagasser
<i>WIP2</i>	T-DNA Insertionslinie	SALK_007406	NASC
	Promotor-GUS Linie	Col-0::Pro _{WIP2} :GUS	Gieta Dewal
	Überexpressionslinie	Col-0::Pro _{35S} : <i>WIP2</i>	Martin Sagasser
<i>WIP3</i>	T-DNA Insertionslinie	SALK_072471	NASC
	Promotor-GUS Linie	Col-0::Pro _{WIP3} :GUS	Gieta Dewal
	Überexpressionslinie	Col-0::Pro _{35S} : <i>WIP3</i>	Martin Sagasser
<i>WIP4</i>	T-DNA Insertionslinie	GABI-Kat 557F12	Mario Rosso
	Promotor-GUS Linie	Col-0::Pro _{WIP4} :GUS	Gieta Dewal
	Überexpressionslinie	Col-0::Pro _{35S} : <i>WIP4</i>	Martin Sagasser
<i>WIP5</i>	T-DNA Insertionslinie	SALK_114838	NASC
	Promotor-GUS Linie	Col-0::Pro _{WIP5} :GUS	Gieta Dewal
	Überexpressionslinie	Col-0::Pro _{35S} : <i>WIP5</i>	Martin Sagasser
<i>WIP6</i>	T-DNA Insertionslinie	SALK_148869	NASC
	Promotor-GUS Linie	Col-0::Pro _{WIP6} :GUS	Gieta Dewal
	Überexpressionslinie	Col-0::Pro _{35S} : <i>WIP6</i>	Martin Sagasser

2.2. Methoden

2.2.1. Pflanzenkultivierung

Bei der Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen wurde grundsätzlich zwischen Anzucht auf Erde und Anzucht auf 1/2 MS-Platten unterschieden. Außerdem erfolgte die Kultivierung teilweise unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkel pro Tag) und unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkel pro Tag).

2.2.1.1. Anzucht auf Erde

Die *A. thaliana* Samen wurden auf Arabidopsis-Erde ausgesät und zunächst im Dunkeln bei 4 °C für 3-5 Tage stratifiziert. Anschließend wurden sie für 2-4 Wochen unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus, in einer Klimakammer oder einem Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry, IA, USA) kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Schossen der Pflanzen durch Überführung in Langtagbedingungen induziert. Sollten Samen der Pflanzen gesammelt werden, wurden diese noch weitere 4-6 Wochen kultiviert und anschließend mit Papiertüten eingetütet. Nach 1-2 weiteren Wochen konnten die Samen geerntet werden.

2.2.1.2. Anzucht auf MS-Platten

Für die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen auf 1/2 MS-Platten mussten die Samen zunächst oberflächensterilisiert werden. Hierzu wurden bis zu 200 µL Samen in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL Waschlösung (70 % Ethanol, 0,05 % Triton X-100) behandelt. Das Gefäß wurde unter gelegentlichem *Vortexen* 10 min stehen gelassen. Nach Entfernen der Waschlösung wurde mit 1 mL Ethanol gewaschen (5 min unter gelegentlichem *Vortexen*). Der Waschschrift mit 1 mL Ethanol wurde noch einmal wiederholt und die Samen unter sterilen Bedingungen anschließend auf einem Ethanol-getränkten Rundfilter ausgestreut. Nach Trocknen der Samen wurden diese unter sterilen Bedingungen auf 1/2 MS-Platten ausgesät. Es erfolgte danach zunächst eine Stratifikation im Dunkeln bei 4 °C für 3-10 Tage. Danach wurden die Platten in eine Klimakammer unter Langtagbedingungen überführt. Wurden größere Pflanzen benötigt, wurden diese von den Platten nach 1-3 Wochen auf Erde pikiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.2.1.3. Kreuzen von *A. thaliana* Pflanzen

nach Koornneef *et al.* (1998)

Für Kreuzungen von *A. thaliana* wurden Pflanzen ausgewählt, die gerade begonnen hatten zu blühen. Von einer Infloreszenz der Mutterpflanze wurden alle bis auf drei Knospen, deren Öffnung unmittelbar bevorstand mit einer feinen Pinzette entfernt. Darüber hinaus wurden sämtliche bereits geöffneten Blüten der Infloreszenz ebenfalls entfernt. Die verbliebenen Knospen wurden mit der Pinzette vorsichtig geöffnet und alle Blütenteile mit Ausnahme des Gynoëceum entfernt. Von der als männlicher Elternteil fungierender Pflanze wurden Blüten gewählt, die sich am selben Tag geöffnet hatten. Das Öffnen der Blüte wurde durch Quetschen mit der Pinzette an der Basis unterstützt. Die Übertragung der Pollen auf die Mutterpflanze erfolgte durch leichtes Auftupfen der Staubbeutel auf die Narbe. Die Pollenübertragung wurde am darauf folgenden Tagen noch ein weiteres Mal wiederholt. Eine erfolgreiche Befruchtung ließ sich durch einsetzendes Streckungswachstum sowie durch eine leichte Rotfärbung der sich entwickelnden Schote erkennen. Nach begonnener Gelbfärbung der Schoten wurden diese zur Ernte der F1-Samen eingetütet.

2.2.2. GUS-Färbung von Pflanzenmaterial

Der Nachweis von β -Glukuronidaseaktivität in transgenen pflanzen erfolgte über Hydrolyse des synthetischen Substrats X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glukuronat) in Glukuronsäure und einen Indigofarbstoff, dessen Dimere blau gefärbte Präzipitate bilden. Auf diese Weise kann das gewebspezifische Expressionsmuster des Reportergens ermittelt werden. Hierzu wurde das zu färbende Pflanzenmaterial zunächst geerntet – das heißt es wurden z.B. ganze Keimlinge direkt von MS-Platten genommen oder Teile von älteren Pflanzen zunächst zurechtgeschnitten. Das Material wurde dann sofort in Fixans überführt und 45 min inkubiert. Danach wurde das fixierte Material mindestens 45 min in NaP_i -Puffer unter Pufferwechsel gewaschen. Anschließend wurde das Material in einem ausreichend großen Gefäß mit X-Gluc-Lösung versetzt und im Vakuum infiltriert. Hierzu wurde mit einem Exsikkator mehrfach Vakuum gezogen und schlagartig belüftet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und mit NaP_i -Puffer gewaschen. Es folgte eine Entfärbung durch Behandlung mit technischem Ethanol über mehrere Stunden. Das Pflanzenmaterial wurde dann in 50%igem Glycerin aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte am Binokular (Zeiss).

2.2.3. Vanillin-Färbung von Arabidopsis Samen

Bestimmte Vorläufermoleküle von Proanthocyanidinen (PAs) (in *A. thaliana* Leucoanthocyanidine und Epicatechine) lassen nach Behandlung PA-haltiger Gewebe mit saurem Vanillin eine Rotpigmentierung erkennen, die auf der Kondensation des Vanillins mit den PA-Vorläufern basiert (Deshpande *et al.*, 1986). Die Methode wurde in dieser Arbeit zur Analyse des Proanthocyanidingehalts von *A. thaliana* Samen angewendet. Hierzu wurden die Samen des jeweilig untersuchten Entwicklungsstadium für ca. 30 min in einer 1%igen (w/v) Vanillinlösung (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) in 6 M HCl bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dokumentation erfolgte am Binokular (Zeiss) oder am Mikroskop (Leica DM 5500 B).

2.2.4. Chloralhydrat-Klärung von Arabidopsis Samen

Zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums von *A. thaliana* Samen wurden diese einer Klärung mit Chloralhydrat unterworfen. Hierzu wurden die Samen über Nacht in Reaktionsgefäßen mit Chloralhydrat-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM 5500 B) im *Differential Interference Contrast* (DIC).

2.2.5. EMS Mutagenese von Arabidopsis Samen

Aufgrund der mutagenen, teratogenen und karzinogenen Wirkung von EMS (Ethylmethansulfonat) wurden alle Arbeitsschritte bei denen diese Substanz verwendet wurde unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen und unter einem eigens dafür reservierten Abzug durchgeführt. Alle anfallenden Abfälle und Lösungen wurden mit 10 M NaOH dekontaminiert, wobei die Endkonzentration an NaOH in Lösungen mindesten 1 M betrug.

Je 250 mg *A. thaliana* Samen (*tt1-1*) wurden in vier 50 mL Reaktionsgefäße gegeben und 2 h in 5 mL Leitungswasser aufquellen gelassen. Anschließend wurde das Flüssigkeitsvolumen mit Leitungswasser auf 50 mL aufgefüllt. Zu den Ansätzen wurden 0 µL (0 %), 175 µL (0,35 %), 200 µL (0,40 %) und 225 µL (0,45 %) EMS (Sigma) zugesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden mit ihrem Deckel und zusätzlich mit Parafilm verschlossen und liegend über Nacht bei 80 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Samen filtriert und jeweils 15 Mal mit 50 mL Leitungswasser gewaschen. Hierbei wurden die verwendeten Filter nach dem Filtrationsvorgang jeweils in der Mitte aufgeschnitten und die anhaftenden Samen mit dem Leitungswasser abgespült. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Samen mit 0,15%iger Agaroselösung in ein neues 50 mL Reaktionsgefäß gespült und zur Stratifikation für einen Tag bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie in

einem Verhältnis von ca. 1:3 mit Wasser verdünnt und mit Hilfe eines Dispensers auf Pflanzschalen mit Erde gebracht und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen für 3-8 Wochen kultiviert. Die überlebenden Pflanzen wurden nach dieser Zeit pikiert und einzeln in 6x9er-Pflanzschalen überführt und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen bis zur Samenernte weiterkultiviert.

2.2.6. TILLING von *TT1*

Wenn in das Arabidopsis-Genom zufällige Mutationen eingeführt werden sollen, können dazu verschiedene Methoden – beispielsweise EMS-Mutagenese – herangezogen werden. Ein Nachteil bei der zufälligen Mutagenese ist, dass nicht gezielt bestimmte Gene mutagenisiert werden können. Die TILLING-Methode (*T*argeting *I*nduced *L*ocal *L*esions *I*N *G*enomes) liefert jedoch die Möglichkeit gezielt nach Mutationen in ausgewählten Bereichen des Genoms zu suchen (McCallum *et al.*, 2000b, a; Till *et al.*, 2003).

Das Prinzip der TILLING-Methode besteht darin, dass gezielte Bereiche des Genoms von Pflanzen, die einer zufälligen Mutagenese unterzogen wurden, durch PCR mit entsprechenden Desoxyoligonukleotiden amplifiziert werden. Entsprechende Amplifikate werden mit Amplifikaten, die der Wildtyp-Sequenz entsprechen gemischt, erhitzt und *Reannealing* durch langsames Abkühlen unterworfen. Auf diese Weise entstehen Heteroduplices, die durch bestimmte Restriktionsendonukleasen (Cel-1 oder Endo-1) erkannt und geschnitten werden können. Zusätzlich kann anschließend die Fragmentlänge bestimmt werden. Abschließend werden die Pflanzen identifiziert, die bei dem oben erläuterten Verfahren zur Bildung von Heteroduplices geführt haben. Diese müssen in dem durch PCR ausgewählten Bereich eine Mutation aufgewiesen haben. Auf diese Weise können im Prinzip an jeder möglichen Stelle des Genoms Mutationen identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde TILLING für das Gen *TT1* (At1g34790) bei dem „Seattle TILLING Project“ (<http://tilling.fhcrc.org:9366/>) bestellt. Hierzu wurden die Primer G086 und G087 verwendet. Die Bestellung beinhaltete alle für die *Screening*-Prozedur erforderlichen Schritte. Ebenso die Pflanzenpopulation, die untersucht wurde, ist extern aufgebaut worden.

2.2.7. DNA-Präparation

2.2.7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

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

Je nach Verwendungszweck wurden PCR-Ansätze entweder mit *Taq*-DNA-Polymerase oder mit *PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase* (*proof reading* Aktivität) angesetzt. Die Ansätze hatten in der Regel ein Volumen von 25 µL und enthielten 25-500 ng Matrizen-DNA, 10 pmol gegenläufige Primer (Desoxyoligonukleotide), 2 nmol (*Taq*-Polymerase) bzw. 5 nmol (*PhusionTM*-Polymerase) dNTP-Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase bzw. 0,5 U *PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase* im entsprechenden 1x Puffer. Die Amplifikationen erfolgten entweder in *Mastercycler epgradient* (Eppendorf), *FlexCycler* (AnalytikJena) oder MJ Research PTC-200 (Biozym) Maschinen nach folgendem Schema:

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

Die Berechnung der *Annealing*-Temperatur erfolgte durch Abschätzung der Schmelztemperaturen der verwendeten Desoxyoligonukleotide. Als *Annealing*-Temperatur wurde ein Wert gewählt, der 5 °C unter der niedrigsten beteiligten Schmelztemperatur lag.

2.2.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Minimaßstab wurde nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) vorgenommen. Hierzu wurden 1,5 mL einer 3 mL *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 2 min, 13.000 rpm, RT) und das Pellet in 200 mL TELT-Puffer sowie 20 µL Lysozymlösung resuspendiert. Die Suspension wird 3 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 100 µL Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 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 (aus RNase-Lösung) gelöst.

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

Hochreine Plasmid-DNA für Transfektionsexperimente wurde durch alkalische Lyse, gefolgt von einer säulenchromatographischen Aufreinigung gewonnen. Hierzu wurden, je nach benötigter Plasmidmenge das *JETstar Plasmid Purification MIDI Kit* oder das *QIAGEN Plasmid Mega Kit* eingesetzt. Die gewonnenen Plasmid-DNA-Pellets wurden zunächst in TE-Puffer (10/0,1) gelöst. Mögliche Verunreinigungen der Plasmidlösungen durch Säulenmaterial wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 5 min, 13.000 rpm, 4 °C) und Überführen des Überstands in neue Reaktionsgefäße entfernt.

2.2.7.3. Restriktionsverdau von DNA

Die Durchführung restriktionsendonukleolytischer Spaltungen richtete sich nach den Angaben der Hersteller der Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs oder Fermentas). Pro µg Plasmid-DNA wurden 5 U Restriktionsenzym für einen vollständigen Verdau innerhalb 1 Stunde eingesetzt. Im Fall von Spaltungen von DNA-Fragmenten, die aus einer Polymerasekettenreaktion hervorgegangen sind, ist gegebenenfalls mehr Enzym eingesetzt worden (bis zu 50 U in einem 50 µL Restriktionsansatz). Im Fall von partiellen Restriktionsspaltungen wurde weniger Restriktionsendonuklease eingesetzt und die Reaktionsdauer verkürzt. Es wurden in diesem Fall 5 mg DNA in einem 50 µL Ansatz mit 2,5 U Enzym versetzt und 3 min inkubiert.

2.2.7.4. Dephosphorylierung von DNA

Um Rückligationen von Vektoren, die nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurden zu vermeiden, wurden diese vor der weiteren Verwendung einer Dephosphorylierungsreaktion mit *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs) unterzogen. Für gewöhnlich wurden in einem Ansatz 5 µL 10x Puffer, 4 µL *Antarctic Phosphatase* (20 U), 30 µL verdaute Vektor-DNA (bis zu 5 µg) und 11 µL Wasser gemischt, 15 min bei 37 °C und 20 min bei 65 °C inkubiert. Die Aufreinigung der dephosphorylierten DNA erfolgte über Elution nach Gelelektrophorese.

2.2.7.5. Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in 1 bis 2%igen Agarosegelen vorgenommen (in 1x TAE-Puffer). Um die DNA sichtbar zu machen wurden dem Gel 0,04 µg Ethidiumbromid pro mL Gelvolumen zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei einer Spannung von 5-15 Volt/cm. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht-Bestrahlung an einem Geldokumentationssystem der Firma INTAS. Zur Größenabschätzung der Fragmente diente eine *1 kb Ladder* (Invitrogen) oder eine *100 bp Ladder* (NEB). Für präparative Zwecke wurde Agarose der Firma Invitrogen genutzt, ansonsten wurde Agarose der Firma PeqLab verwendet.

2.2.7.6. Aufreinigung und Elution von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte je nach Bedarf mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* oder dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (jeweils von Qiagen). Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung über das *PCR Purification Kit* wurde durchgeführt, wenn PCR-Ansätze von Enzymen und Desoxyoligonukleotiden befreit werden sollten oder wenn lediglich eine einheitliche aufzureinigende DNA-Fraktion vorlag. Die Elution aus dem Gel erfolgte, wenn nur ein Bestandteil aus einem DNA-Gemisch benötigt wurde. Das Prinzip der verwendeten *Kits* beruht auf der Bindung von DNA an Silicasäulenmaterial in Anwesenheit chaotroper Salze und der anschließenden Möglichkeit der Elution unter Bedingungen mit niedrigen Salzkonzentrationen.

2.2.7.7. Ligation

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde jeweils in einem Reaktionsvolumen von 10 µL durchgeführt. Es wurde jeweils ein Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 5:1 mit 400 U T4 DNA Ligase (New England Biolabs) im entsprechenden 1x Puffer eingesetzt. Es wurde für „sticky-end“ Klonierungen eine Inkubationszeit von 30 min bei einer Temperatur von 25 °C eingehalten. Bei „blunt-end“ Klonierungen wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die kompletten Ligationsansätze wurden für die Transformation in chemokompetente *E. coli* Zellen (Stamm XL1-Blue) eingesetzt.

2.2.7.8. TOPO™ TA Cloning

In einigen Fällen wurde die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem *TOPO™ TA Cloning Kit* (Invitrogen) durchgeführt. Hierbei wurde die PCR zunächst mit *Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase* (*proof reading* Aktivität) durchgeführt. Anschließend mussten 3'-A-Überhänge im PCR-Produkt generiert werden. Hierzu wurden 12,5 µL des (aufgereinigten) PCR-Produkts mit 0,5 µL *Taq*-DNA-Polymerase (2 U) und 0,5 µL 10 mM dATP im entsprechenden 1x PCR Puffer für 10 min bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gekühlt. Für die TOPO™ Reaktion wurden 2 µL des beschriebenen 3'-A-Reaktionsansatzes mit 0,5 µL *Salt Solution*, 0,5 µL TOPO™-Vektor (pCRII-TOPO) und 3 µL Wasser für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µL des TOPO™-Reaktionsansatzes wurden in chemokompetente *E. coli* Zellen (Stamm XL1-Blue) transformiert. Die kompletten Ansätze transformierter Bakterien wurden auf LB-Platten, die zuvor mit IPTG/X-Gal-Mix behandelt wurden ausgestrichen. Positive Kolonien konnten durch ihr weißes Erscheinungsbild identifiziert werden.

2.2.7.9. Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmidkonstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Die Sequenzen basieren soweit nicht anders angegeben auf dem Arabidopsis-Ökotyp Col-0.

<u>Klon-Nr.</u>	<u>Plasmid</u>	<u>Eigenschaften und Einzelheiten zur Klonierung</u>
pGH01	pBT4::Pro _{35S} :AtTT1:VP16	Vektor für die transiente Expression von AtTT1 in Protoplasten, Insert über Amplifikation mit GH01/S152 und pSA91 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI, keine NLS in Vektorrückgrat
pGH02	pBT4::Pro _{35S} :AtWIP2:VP16	wie pGH01 für AtWIP2, Insert über Amplifikation mit GH02/S185 und pSA122 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI
pGH03	pBT4::Pro _{35S} :AtWIP3:VP16	wie pGH01 für AtWIP3, Insert über Amplifikation mit GH03/S183 und pSA110 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI
pGH04	pBT4::Pro _{35S} :AtWIP4:VP16	wie pGH01 für AtWIP4, Insert über Amplifikation mit GH04/S243 und pSA147 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI
pGH05	pBT4::Pro _{35S} :AtWIP5:VP16	wie pGH01 für AtWIP5, Insert über Amplifikation mit GH05/S245 und pSA148 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI
pGH06	pBT4::Pro _{35S} :AtWIP6:VP16	wie pGH01 für AtWIP6, Insert über Amplifikation mit GH02/S185 und pSA122 als Matrize, Klonierung über NcoI/AgeI
pGH07	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtTT1	Vektor für die Expression eines GAL4AD:AtTT1 Fusionsproteins in Hefezellen, Insert über Amplifikation mit GH08/S152 und pSA91 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH08	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtWIP2	wie pGH07 für GAL4AD:AtWIP2, Insert über Amplifikation mit GH09/S185 und pSA122 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH09	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtWIP3	wie pGH07 für GAL4AD:AtWIP3, Insert über Amplifikation mit GH10/S183 und pSA110 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH10	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtWIP4	wie pGH07 für GAL4AD:AtWIP4, Insert über Amplifikation mit GH11/S243 und pSA122 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH11	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtWIP5	wie pGH07 für GAL4AD:AtWIP5, Insert über Amplifikation mit GH12/S245 und pSA148 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH12	pACT11a::Pro _{ADH} :GAL4AD:AtWIP6	wie pGH07 für GAL4AD:AtWIP6, Insert über Amplifikation mit GH13/S247 und pSA149 als Matrize, Klonierung über NcoI/EcoRI
pGH13	pBT10::Pro _{AtKNAT1} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtKNAT1</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH17/GH18 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über BamHI/NcoI
pGH14	pBT10::Pro _{AtKNAT2} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtKNAT2</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH19/GH20 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH15	pBT10::Pro _{AtKNAT6} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtKNAT6</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH21/GH22 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH16	pBT10::Pro _{AtSTM} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtSTM</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Insert aus pGH19 mit BamHI/XhoI ausgeschnitten, Klonierung über BamHI/XhoI

pGH17	pANGUS::Pro _{AtKNAT1} :GUS	Vektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> , <i>AtKNAT1</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH17/GH18 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über BamHI/NcoI
pGH18	pANGUS::Pro _{AtKNAT2} :GUS	Vektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> , <i>AtKNAT2</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH19/GH20 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH19	pANGUS::Pro _{AtSTM} :GUS	Vektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> , <i>AtSTM</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit GH23/GH24 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über BamHI/XhoI
pGH20	pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtWIP2</i> :GFP5	Vektor für die transiente Expression einer translationalen Fusion von <i>AtWIP2</i> mit GFP5, Amplifikation mit GH45/S185 und pSA122 als Matrize, Vektorrückgrat aus pSA81 basierend auf pAVA393, Klonierung über NcoI
pGH21	pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtWIP3</i> :GFP5	wie pGH20 für <i>AtWIP3</i> , Amplifikation mit GH46/S183 und pSA110 als Matrize, Vektorrückgrat aus pSA81, Klonierung über NcoI
pGH22	pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtWIP4</i> :GFP5	wie pGH20 für <i>AtWIP4</i> , Amplifikation mit GH47/S243 und pSA147 als Matrize, Vektorrückgrat aus pSA81, Klonierung über NcoI
pGH23	pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtWIP5</i> :GFP5	wie pGH20 für <i>AtWIP5</i> , Amplifikation mit GH48/S245 und pSA148 als Matrize, Vektorrückgrat aus pSA81, Klonierung über NcoI
pGH24	pAVA393::Pro _{2x35S} : <i>AtWIP6</i> :GFP5	wie pGH20 für <i>AtWIP6</i> , Amplifikation mit GH49/S247 und pSA149 als Matrize, Vektorrückgrat aus pSA81, Klonierung über NcoI
pGH25	pANGUS::Pro _{AtKNAT6} :GUS	Vektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> , <i>AtKNAT6</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Insert aus pGH15 mit EcoRI/NcoI ausgeschnitten, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH27	pBT10::Pro _{AtKNAT1(2,1-1,6)} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtKNAT1</i> -Promotorfragment- <i>uidA</i> -Fusion, das Promotor-Fragment beinhaltet den Bereich von ca. -2,1 bis -1,6 kb vom Translationsstart gezählt, Amplifikation mit G057/G058 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über BamHI/NcoI
pGH29	pBT10::Pro _{TT16} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtTT16</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit G060/G061 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH30	pANGUS::Pro _{TT16} :GUS	Vektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> , <i>AtTT16</i> -Promotor- <i>uidA</i> -Fusion, Amplifikation mit G060/G061 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über EcoRI/NcoI
pGH35	pBT10::Pro _{AtKNAT1(Fragment „A“)} :GUS	Vektor für Protoplastentransfektion, <i>AtKNAT1</i> -Promotorfragment- <i>uidA</i> -Fusion, das „Promotor-Fragment A“ beinhaltet den Bereich von ca. -2 bis -1,4 kb vom Translationsstart gezählt, Insert zunächst in mit G067/G068 und Col-0 gDNA als Matrize in pCRII TOPO kloniert, dann umklont über Sall
pGH40	pJAN::Pro _{35S} : <i>AtTT1</i> :VP16	Expressionsvektor für die stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> mit einer translationalen <i>AtTT1</i> :VP16 Fusion, Insert aus pGH01 mit NcoI/Nsil in pJAN umklont
pGH41	pJAN::Pro _{35S} : <i>AtWIP2</i> :VP16	wie pGH40 für <i>AtWIP2</i> :VP16, Insert durch partiellen Verdau von pGH02 mit NcoI/Nsil, kloniert in pJAN über NcoI/Nsil
pGH42	pJAN::Pro _{35S} : <i>AtWIP3</i> :VP16	wie pGH40 für <i>AtWIP3</i> :VP16, Insert aus pGH03 mit NcoI/BglII in pJAN umklont

pGH43	pJAN::Pro _{35S} :AtWIP4:VP16	wie pGH40 für AtWIP4:VP16, Insert aus pGH04 mit NcoI/BglII in pJAN umkloniert
pGH44	pJAN::Pro _{35S} :AtWIP5:VP16	wie pGH40 für AtWIP5:VP16, Insert aus pGH05 mit NcoI/NsiI in pJAN umkloniert
pGH45	pJAN::Pro _{35S} :AtWIP6:VP16	wie pGH40 für AtWIP6:VP16, Insert aus pGH06 mit NcoI/BglII in pJAN umkloniert
pGH48	pBT4::Pro _{35S} :GAL4AD:AtWIP2	Vektor für Protoplastentransfektion, Vektorrückgrat basierend auf pBT4::Pro _{35S} :NLS:VP16, jedoch wurde mit NcoI/BspEI geschnitten und der NLS:VP16 Teil entfernt, Insert durch Amplifikation mit G084/G085 und pGH08 als Matrize und PCR-Amplifikat geschnitten mit PciI/XmaI (komplementäre überhängende Enden zu NcoI/BspEI)
pGH53	pCRII::AtMYBL2	TOPO-Klon für AtMYBL2-cDNA (At1g71030), Insert generiert mit G139/G140 auf pDONR207::AtMYBL2 Matrizen-DNA
pGH54	pBT4::Pro _{35S} :NLS:VP16:AtMYBL2	Expressionsvektor für ein NLS:VP16:AtMYBL2-Fusionsprotein zur Protoplastentransfektion, Insert aus pGH53 mit Kpn2I ausgeschnitten und in BspEI geschnittenen pBT4::Pro _{35S} :NLS:VP16 umkloniert
pGH55	pBT4::Pro _{35S} :NLS:AtMYBL2:VP16	Expressionsvektor für ein NLS:AtMYBL2:VP16-Fusionsprotein zur Protoplastentransfektion, Insert aus pGH53 mit Kpn2I ausgeschnitten und in AgeI geschnittenen pBT4::Pro _{35S} :NLS:VP16 umkloniert

2.2.7.10. DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde die Methode von Edwards *et al.* (1991) in modifizierter Form angewendet. Es wurden 100 bis 500 mg des Materials mit 400 μL Extraktionspuffer und zwei Stahlkugeln in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Die Zerkleinerung des Materials erfolgte durch Behandlung im *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden) (3 min, 30 s^{-1}). Anschließend wurde zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 2 min, 14.000 rpm, 4°C) und der Überstand (ca. 250 μL) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann durch Zugabe von einem Volumenteil Isopropanol und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 5 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur) pelletiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in 50 μL TE-Puffer (10/1) aufgenommen.

2.2.7.11. Ammoniumacetat-Fällung von DNA

DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde durch Ammoniumacetat-Fällung aufgereinigt. Hierzu wurde die DNA mit 6 Volumenteilen absolutem Ethanol und 1 Volumenteil 4 M Ammoniumacetat gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 15 min, 13.000 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung mit 10 mM Tris/HCl pH8,0 aufgenommen.

2.2.7.12. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Präparationen erfolgte photometrisch. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Abnahme der Lichtintensität beim Strahlendurchgang durch eine Probe proportional der Schichtdicke des absorbierenden Materials und der Konzentration absorbierender gelöster Substanzen. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei eine Extinktion von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einzelsträngiger DNA und 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Oligonukleotiden entspricht. Die photometrische Konzentrationsmessung wurde in Quarzküvetten oder UV-durchlässigen Kunststoffküvetten durchgeführt (Eppendorf, Biophotometer).

2.2.7.13. ExoSAP Verdau von DNA

Sollte DNA, die durch PCR amplifiziert wurde, direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden, wurde sie zunächst durch *ExoSAP-IT*-Behandlung dazu vorbereitet. Hierzu wurden 6,5 µL PCR-Produkt mit 0,5 µL *ExoSAP-IT* gemischt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei 80 °C zur Enzyminaktivierung.

2.2.7.14. DNA-Sequenzierung

Automatisierte DNA-Sequenzanalysen wurden von der „*Sequencing Core Facility*“ der Universität Bielefeld nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung von „*Big Dye-terminator Chemistry*“ auf „*Abi-Prism 3730xl DNA-Sequencern*“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms „*Sequencher*“ (Gene Codes Corporation, USA) erstellt.

2.2.8. RNA-Präparation

2.2.8.1. Isolierung von Gesamt-RNA

RNA wurde aus Pflanzenmaterial mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) oder mit Hilfe von Tri-Reagent[®] gemäß den Herstellerangaben isoliert. Hierzu wurden zunächst 50 bis 100 mg Pflanzenmaterial entweder durch sorgfältiges Mörsern in flüssigem Stickstoff oder durch Behandlung im *Tissue Lyser* (Qiagen) im entsprechenden Puffer (3 min, 30 sec⁻¹) aufgeschlossen. Die isolierte RNA wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Im Fall von RNA-Präparationen aus Geweben mit hohem Anteil an Sekundärmetaboliten und Polysacchariden (z.B. Samen) wurde eine andere Methode für die Isolierung verwendet (Ruuska und Ohlrogge, 2001). Hierbei wurde das Pflanzenmaterial (zum Teil sehr geringe Mengen ab ca. 1 mg), das bis zur Verwendung in *RNAlater*[™] (Qiagen) aufbewahrt wurde, zunächst in flüssigem Stickstoff sorgfältig gemörsert. Daraufhin wurde 750 µL RNA-Extraktionspuffer zugesetzt und bis zum Wiederauftauen des Puffers weitergemörsert. Das Homogenat wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und nach 5 min Inkubation bei 65 °C auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 750 µL Chloroform:Isoamylalkohol (4:1) zugesetzt und für 2 min bei höchster Stufe gevortext. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die untere organische Phase wurde mit 200 µL RNA-Extraktionspuffer versetzt, erneut gevortext und die obere Phase mit der wässrigen Phase aus der ersten Extraktion vereinigt. Anschließend wurden die kombinierten wässrigen Phasen erneut mit

Chloroform:Isoamylalkohol (4:1) extrahiert. Die obere wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH6,2) und 1 Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 300 µL eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach Lösen der RNA in 500 µL DEPC-Wasser bei 65 °C wurden 43,5 µL 1 M Natriumacetat (pH4,5) und 200 µL 2-Butoxyethanol zugesetzt. Nach 10 min Inkubation bei 65 °C und 10 min Kühlen auf Eis erfolgte zur Pelletierung der in der Lösung vorhandenen Polysaccharide ein Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und es wurden 30 µL 3 M Natriumacetat (pH6,2) und 750 µL Isopropanol zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei -20 °C und erneuter Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde das RNA-Pellet zwei mal mit je 1,5 mL eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 100 µL DEPC-Wasser aufgenommen und zusätzlich mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) ein weiteres Mal gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Abschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2. Erststrang-cDNA-Synthese für semiquantitative RT-PCR

Die Erststrang-cDNA-Synthese wurde durchgeführt, um Matrizen-DNA für die semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) zu generieren. Hierzu wurden zunächst 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 17 µL gebracht. Anschließend wurden zur Entfernung von möglichen Verunreinigungen mit genomischer DNA 2 µL 10x DNase Puffer (Ambion, *DNA-freeTM*) und 1 µL DNaseI (Ambion) zugesetzt. Der Ansatz wurde 25 min bei 37 °C inkubiert und mit 2 µL *DNase Inactivation Reagent* (Ambion) versetzt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1:30 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 1 µL einer 10 µM Lösung des oligo-dT-Primers RS651 und 4 µL Wasser zugesetzt. Nach 5 min Inkubation bei 65 °C und anschließendem Kühlen auf Eis wurden 8 µL 5x *first strand buffer*, 4 µL 0,1 M DTT, 1 µL Reverse Transkriptase (Invitrogen, *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase*) und 2 µL 10 mM dNTPs zugesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte für 1 h bei 42 °C. Abschließend wurde 5 min bei 90 °C inaktiviert und die cDNA-Erststrang-Präparation bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8.3. Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) wurde angewendet, um die Expressionsstärke der untersuchten Gene abzuschätzen. Hierzu wurde die Transkriptmenge

des untersuchten Gens – quantifizierbar über die jeweilige cDNA – mit der Transkriptmenge eines Kontrollgens verglichen, das konstitutiv exprimiert wird. Es wurde zunächst je 1 µL der zu vergleichenden cDNA-Erststrang-Präparationen als Matrizen-DNA mit spezifischen Primern für *Actin2* (RS469 und RS470) bei einer Zyklenzahl von 26 und einer Elongationszeit von 1:30 min in der PCR eingesetzt. *Actin2* wird in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert und diente hier als Kontrollgen. Als ungefähres Maß für die Expressionsstärke diente die Bandenstärke nach Agarosegel-Elektrophorese. Das Volumen der Matrizen-DNA wurde daraufhin gegebenenfalls so angepasst, dass nach der *Actin2*-PCR eine vergleichbare Bandenstärke im Agarosegel in den zu vergleichenden Proben beobachtet werden konnte. Das ermittelte Matrizen-DNA-Volumen wurden dann in einer PCR mit genspezifischen Primern für die zu untersuchenden Gene eingesetzt, wobei die Zyklenzahl gegebenenfalls noch so angepasst wurde, dass die Reaktion in der exponentiellen Amplifikationsphase gestoppt wurde. Es wurde im Allgemeinen das folgende Schema für die PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	3 min	94 °C	1
Denaturierung	20 sec	94 °C	
Annealing	20 sec	50-65 °C	25-36
Elongation	1 min / kb	72 °C	
Elongation	3 min	72 °C	1
Kühlen	4-16 °C	∞	1

2.2.8.4. Probenvorbereitung für die quantitative *real time* PCR (qPCR)

Die Probenvorbereitung für die quantitative *real time* PCR (qPCR) beinhaltet abermals die Erststrang-cDNA-Synthese. Es wurden hierfür zunächst 2-5 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 8,8 µL gebracht. Anschließend wurden zur Entfernung von möglichen Verunreinigungen mit genomischer DNA 1 µL 10x DNase Puffer (Ambion, *DNA-free*TM) und 0,2 µL DNaseI (Ambion) zugesetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und mit 1 µL *DNase Inactivation Reagent* (Ambion) versetzt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1:30 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µL gebracht. Zu der DNA-freien RNA-Lösung wurden 100 µL 5 M LiCl (mit DEPC-Wasser angesetzt) gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation bei -20 °C für mindestens 2 h gefolgt von

einem Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wurden 100 µL 3 M Natriumacetat zu dem Pellet gegeben und wieder zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 30 min, 13.000 rpm, 4°C). Abschließend wurde noch zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Pellet in 8 µL DEPC-Wasser aufgenommen. Zu diesen 8 µL wurden 0,5 µL *Random-Hexamere* (50 ng/µL), 0,5 µL oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer sowie 1 µL 10 mM dNTPs gegeben. Die Ansätze wurden 5 min bei 65 °C und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 4 µL 5x *first strand buffer*, 2 µL 50 mM MgCl₂, 2 µL 0,1 M DTT, 0,5 µL BSA (nukleasefrei, 1 µg/µL) und 1 µL reverse Transkriptase (Invitrogen, *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*) sowie 0,5 µL RNase Inhibitor (Fermentas) zugesetzt. Die Ansätze wurden zur cDNA-Erststrang-Synthese 5 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde dann mit 180 µL DEPC-Wasser verdünnt und in 16 µL Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung in der qPCR gelagert.

2.2.8.5. Quantitative *real time* PCR (qPCR)

Die quantitative *real time* PCR (qPCR) diente zur relativen Quantifizierung der Expression der untersuchten Gene und erfolgte mit Hilfe des *Rotor-Gene™* 6000 Systems (Corbett). Der Entwurf der verwendeten Primer erfolgte mit Hilfe der *Probefinder Software* (Roche), die im Internet unter <http://qpcr2.probefinder.com/roche2.html> zugänglich ist. Bei der Datenauswertung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel® (Microsoft) eingesetzt. Die angewendete qPCR-Methode beruht auf der Verwendung des Farbstoffs *SYBR Green I*, der an die während der PCR gebildete doppelsträngige DNA binden kann, dadurch einen Fluoreszenzfarbstoff-Komplex mit Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 498 nm und Emissionsmaximum bei 522 nm bildet und somit durch Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus den Verlauf der PCR kontrollieren lässt.

Quantifizierung der relativen Genexpression von 18S-rRNA und Zielgenen

Es wurde für die qPCR das *Platinum® SYBR® Green qPCR Super-Mix-UDG Kit* (Invitrogen) verwendet. Zur Herstellung der PCR-Mixe wurden 12,5 µL *Platinum®-Quantitative PCR SuperMix-UDG*, 0,75 µL des 10 µM 5'-PCR-Primers (Endkonzentration 300 nM), 0,75 µL des 10 µM 3'-PCR-Primers (Endkonzentration 300 nM), 0,5 µL ROX, 5 µL Matrizen DNA (1-100 ng) aus den vorbereiteten Proben (siehe oben) und 5,5 µL Wasser gemischt. Jedes untersuchte Gen wurde als Triplikat gemessen. Es wurde das folgende PCR-Profil verwendet.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	2 min	50 °C	1
	2 min	95 °C	1
Denaturierung	10 sec	95 °C	
Annealing	10 sec	60 °C	40
Elongation	20 sec	72 °C	
SYBR Green Messung	Nach jedem Zyklus		
Schmelzkurve	10 sec / °C	72 °C – 95 °C	1

Als endogene Referenz zur Normalisierung der Genexpression wurde in allen Fällen die in den Proben enthaltene Menge an 18S-rRNA gemessen. Hierzu wurden die spezifischen Primer K074 und K075 verwendet. Für die Messung der Zielgene wurden jeweils genspezifische Primer verwendet, die nach Möglichkeit einen Bereich amplifizierten, der in der genomischen DNA ein Intron enthielt.

2.2.9. Mikrobiologische Methoden

2.2.9.1. Kultivierung von Bakterien

Zur Herstellung von methylierter Plasmid-DNA wurde der Stamm *Escherichia coli* XL1-blue und für die Herstellung unmethylierter Plasmid-DNA wurde der Stamm *E. coli* K12 ER2925 verwendet. Die *E. coli* Bakterien wurden grundsätzlich auf LB-Platten - gegebenenfalls mit den entsprechenden Antibiotika – bei 37 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden mit TB- oder LB-Medium vorbereitet. Plasmide, die in Pflanzen transformiert werden sollten, wurden zunächst in *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien (Stamm GV3101) transformiert. Die *A. tumefaciens* Bakterien wurden sowohl auf Platte als auch in Flüssigkultur mit YEP-Medium bei einer Temperatur von 28 °C angezogen.

2.2.9.2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation

Es wurden zur Transformation wechselnd sowohl elektrokompetente als auch chemokompetente *E. coli* Zellen verwendet. Zur Transformation in *A. tumefaciens* wurden ausschließlich elektrokompetente Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden gemäß den nachfolgenden Protokollen selbst hergestellt.

Herstellung chemokompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Mit einer Einzelkolonie der *E. coli* Zellen (Stamm XL1-blue oder K12 ER2925) wurde eine 3 mL Übernachtkultur in LB-Medium angesetzt. Mit der angewachsenen Kultur wurden 100 mL LB-Medium inokuliert und die Bakteriensuspension bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf zwei 50 mL Reaktionsgefäße verteilt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 4000 g für 6 min pelletiert. Die Pellets wurden in je 2 mL eiskaltem TFB1-Medium resuspendiert, in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Das Gesamtvolumen wurde mit eiskaltem TFB1-Medium auf 40 mL aufgefüllt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde bei 4 °C und 1500 g für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 mL eiskaltem TFB2-Medium aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen auf 100 µL Aliquots in eisgekühlten 1,5 mL Reaktionsgefäßen verteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Mit einer Einzelkolonie der *E. coli* Zellen (Stamm XL1-blue oder K12 ER2925) wurde zwei 5 mL Übernachtkulturen in LB-Medium angesetzt. Mit den angewachsenen Kulturen wurden je 500 mL LB Medium angeimpft und die Bakteriensuspensionen bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden in 500 mL Zentrifugenbecher überführt und 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4 °C und 4000 g für 15 min pelletiert. Die Zellen wurden in 250 mL eiskaltem Wasser resuspendiert und beide Ansätze vereinigt. Danach wurde 15 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mL eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Nach Auffüllen des Volumens auf 40 mL mit 10%igem Glycerin wurde abermals bei 4 °C und 4000 g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 2-3 mL eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und auf 50 µL Aliquots in eisgekühlten 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Bakterienzellen

Mit einer Einzelkolonie der *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV3101 pMP90RK) wurde zwei 5 mL Übernachtkulturen in YEP-Medium mit Rifampicin/Gentamycin angesetzt. Mit den angewachsenen Kulturen wurden 500 mL YEP-Hauptkulturen mit Rifampicin/Gentamycin inokuliert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden in 500 mL Zentrifugenbecher überführt, 15 bis 30 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 4000 g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 500 mL eiskaltem Wasser resuspendiert. Es wurde abermals zentrifugiert und in 500 mL eiskaltem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde erneut bei 4 °C und 4000 g für 15 min pelletiert, das Pellet in 50 mL eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und die Suspension in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach

erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 4000 g wurde das Pellet in 1-2 mL eiskaltem Glycerin aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde auf 25 µL Aliquots in eisgekühlten 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.9.3. Transformation von Bakterienzellen

Transformation chemokompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Die kompetenten *E. coli* Zellen (Stamm XL1-blue oder K12 ER2925) wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben (ca. 500 ng bei Retransformationen, 10 µL im Fall von Ligationsansätzen). Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec. Danach wurde nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Es wurde 1 mL SOC-Medium zugegeben und für ca. 45 min bei 37 °C und 1250 rpm in einem *Thermomixer* (Eppendorf) inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurden anschließend unterschiedliche Mengen auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen. Im Normalfall wurden 50 µL der Bakteriensuspension direkt eingesetzt. Gegebenenfalls (vor allem im Fall von Ligationen) wurde jedoch der Gesamtansatz pelletiert, das Pellet in einem Volumen von 50 µL resuspendiert und komplett ausgestrichen. Für eine Blau-/Weißselektion wurden die Platten vorher noch mit IPTG/X-Gal-Mix behandelt. Die Inkubation der Bakterienplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Transformation elektrokompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Die kompetenten *E. coli* Zellen (Stamm XL1-blue oder K12 ER2925) wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben (50 bis 500 ng). Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, PeqLab) gegeben und ca. 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Elektropuls (1,8 kV) in einem *Micropulser* (Biorad). Die mittlere Entladungszeit sollte ca. 5 msec betragen. Nach dem Puls wurde zügig 1 mL SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Die Bakteriensuspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 45 min bei 37 °C und 1250 rpm in einem *Thermomixer* (Eppendorf) inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurden anschließend unterschiedliche Mengen auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen – im Normalfall 50 µL Bakteriensuspension. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens* Bakterienzellen

Die kompetenten *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV3101 pMP90RK) wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben (100 bis 1000 ng). Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 oder 2 mm Elektrodenabstand, PeqLab) gegeben und ca. 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Elektropuls (1,8 kV) in

einem *Micropulser* (Biorad). Die mittlere Entladungszeit sollte ca. 5 msec betragen. Nach dem Puls wurde zügig 1 mL YEP-Medium zu den Bakterien gegeben. Die Bakteriensuspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 2 h bei 28 °C und 1250 rpm in einem *Thermomixer* (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden 50 µL der Bakteriensuspension entnommen und auf einer YEP-Selektionsplatte ausgestrichen. Der Rest der Bakteriensuspension wurde pelletiert, in 50 µL YEP-Medium aufgenommen und ebenfalls auf einer Selektionsplatte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über 2-5 Tage bei 28 °C.

2.2.9.4. Dauerkulturen transformierter Bakterien

Dauerkulturen transformierter Bakterien wurden erstellt, indem 825 µL der entsprechenden Bakteriensuspension in der exponentiellen Wachstumsphase mit 375 µL sterilem 80%igem Glycerin gemischt wurden und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Lagerung erfolgte daraufhin bei -80 °C.

2.2.10. Herstellung transgener Pflanzen

2.2.10.1. Transformation durch „floral dipping“

Die Herstellung transgener *A. thaliana* Pflanzen erfolgte über Agrobakterien vermittelten DNA-Transfer (An *et al.*, 1986; Sprenger, 1997). Hierzu wurden die vom Ti-Plasmid abgeleiteten binären Vektoren pANGUS oder pJAN verwendet, die sich sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* propagieren lassen. Die auf pANGUS bzw. auf pJAN basierenden, zu transformierenden Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* XL1-BLUE hergestellt und anschließend in *A. tumefaciens* GV3101 pMP90RK transformiert. Eine erfolgreiche Transformation in *A. tumefaciens* wurde mittels PCR verifiziert. Hierbei wurden Konstruktspezifische Desoxyoligonukleotide verwendet und eine Bakterienkultur als Matrize eingesetzt, die im weiteren Verlauf zum Inokulieren einer 5 mL *A. tumefaciens* Flüssigvorkultur in YEP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (in der Regel Rifampicin, Kanamycin, Carbenicillin) verwendet wurde. Die Vorkultur wurde nach 4-5 Tagen Inkubation bei 28 °C zum Animpfen einer 500 mL YEP Hauptkultur mit den entsprechenden Antibiotika verwendet. Nach Anwachsen der Hauptkultur (weitere 2-3 Tage) wurde die Pflanzentransformation nach der „floral dipping“ Methode durchgeführt (Clough und Bent, 1998; Zhang *et al.*, 2006). Hierzu wurden die zu transformierenden Pflanzen zuvor bereits so angezogen, dass nach ca. 30 Tagen die Primärinfloreszenzen abgeschnitten wurden und sich im Verlauf einer weiteren Woche Sekundärinfloreszenzen bilden konnten. Die oben beschriebene 500 mL Hauptkulturen, in denen sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, wurden mit 5 % Saccharose und 0,02 % Silwet L-77

versetzt und in ein Becherglas überführt. Die zu transformierenden Pflanzen wurden anschließend mit den Infloreszenzen für ca. 30 sec in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend für einen Tag in einem verschlossenen Plastikbeutel aufbewahrt. Danach wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.2.10.2. Selektion transgener T1-Pflanzen

Die Identifikation positiver Transformationsereignisse erfolgte über Aussäen der T1-Samen auf 1/2 MS-Platten mit 50 µg/mL Kanamycin. Die Pflanzen wurden daraufhin unter Kunstlicht (Langtag – 16 h Licht, 8 h Dunkel) kultiviert. Transgene Pflanzen ließen sich dadurch erkennen, dass sie nach ca. 1 Woche normal entwickelte und ergrünte Keimblätter zeigten und Primärblätter bildeten, während nicht-transgene Pflanzen keine grüne Färbung entwickelten und abstarben. Transgene Keimlinge wurden auf Erde pikiert und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen weiterkultiviert. Weiterhin wurde das Vorhandensein des Transgens über PCR mit Konstrukt-spezifischen Desoxyoligonukleotiden und DNA aus T1-Pflanzenmaterial überprüft.

2.2.11. At7-Zellkultur

Zur Untersuchung von Protein/Promotorwechselwirkungen wurden Interaktionsstudien in der, ursprünglich von Hypokotylzellen abstammenden, Zellsuspensionskultur At7 unternommen (Trezzini *et al.*, 1993; Mehrrens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007). Das Prinzip des Systems beruht darauf, dass mehrere unterschiedliche Konstrukte in Protoplastenzellen kotransfiziert werden. Ein durch ein Effektor-Konstrukt kodiertes DNA-Bindeprotein kann an den Zielpromotor-Bereich im Reporterkonstrukt binden und dadurch zur Expression des im Promotorkonstrukt liegenden *uidA*-ORF führen kann. Die auf diese Weise hervorgerufene Reporterogenaktivität kann fluorimetrisch bestimmt werden. Zur Korrektur unterschiedlich ausfallender Transfektionseffizienzen wird darüber hinaus zusätzlich ein Kontrollplasmid (pBT10::Pro_{ubi}:*LUCm3* – MS129) kotransfiziert, das ein Luziferase-Reportergen unter Ubiquitinpromotorkontrolle enthält. Über luminometrische Messung der Luziferaseaktivität kann die unterschiedliche Transfektionseffizienz mathematisch korrigiert werden. Des Weiteren wird jeweils ein Auffüllplasmid eingesetzt (pBT10::Δ:*LUCm3* - MS47), das dazu dient, dass in jedem Transfektionsansatz die gleiche Menge DNA eingesetzt wird. Die für die Transfektionsexperimente benötigte DNA wird im Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue hergestellt und ist daher Dam- und Dcm-methylierungsnegativ.

2.2.11.1. Vorbereitung der Transfektions-DNAs

Ein Ansatz Transfektions-DNA enthielt üblicherweise 10 µg Reporterplasmid, 5 µg Kontrollplasmid (pBT10::Pro_{ubi}:*LUCm3* – MS129), entweder kein oder ein bis drei Mal je 1 µg

verschiedener Effektorplasmide und Auffüllplasmid (pBT10:: Δ :LUCm3 - MS47) bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 25 μ g. Das Volumen der zu transfizierenden DNA-Lösung wurde mit Wasser auf 50 μ L eingestellt. In jedem Transfektionsexperiment wurde darüber hinaus eine Positivkontrolle mitgeführt, die als Reporterplasmid das konstitutiv GUS-exprimierende Plasmid pBT4::Pro_{35S}:GUS (MS275) und keinen Effektor enthielt. Als Negativkontrolle diente – ebenfalls ohne Effektor – pBT4:: Δ :GUS (MS156).

2.2.11.2. Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur erfolgte wie in Trezzini et al. (1993) beschrieben. Die Zellen wurden bei 26 °C im Dunkeln unter Schütteln (Infors, 105 rpm) in jeweils 40 mL MS-Medium in Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Einmal wöchentlich wurden 3 g einer Zell-Linie mit einem Sieblöffel in neues Medium überführt.

2.2.11.3. Gewinnung von At7-Protoplasten

modifiziert nach Dangl *et al.* (1987)

Zur Gewinnung von Protoplasten aus der At7-Zellkultur wurden zunächst 40 mL einer 5 Tage alten Kultur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 rpm, 5 min, Raumtemperatur, Beschleunigung 5, Bremse 3). Der Überstand wurde abgossen und das Pellet in 25 mL 240 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach erneuter 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 Suspension auf 2 Petrischalen (Durchmesser 14,5 cm) verteilt, die 10 mL Enzymlösung enthielten. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 26 °C und 20 rpm im Dunkeln inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schalen für 30 min bei 26 °C und 50 rpm geschüttelt und die Suspension anschließend in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 rpm, 6 min, Raumtemperatur). Die Pellets wurden mit 25 mL 240 mM CaCl₂ gewaschen und anschließend in je 5,5 mL B5-Medium resuspendiert. Jeweils 2 Ansätze wurden in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereinigt und die lebenden Protoplasten durch Zentrifugation (800 rpm, 6 min) flotiert. Die lebenden Protoplasten wurden mit einer weitlumigen Pipette abgenommen und in einem Gesamtvolumen von 14,5 mL mit B5-Medium erneut wie vorher flotiert. Die überlebenden Zellen wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurz invertiert. Die auf diese Weise gewonnenen Protoplasten konnten direkt zur Transfektion eingesetzt werden.

2.2.11.4. Transfektion von At7-Protoplasten

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

Die DNA-Aufnahme der Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. Dazu wurden je 200 µL Protoplastensuspension in 10 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Zu den Ansätzen wurde die vorbereitete Transfektions-DNA gegeben und mit 200 µL PEG-Lösung vermischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden zu jedem Ansatz 5 mL 275 mM Ca(NO₃)₂-Lösung gegeben und die Zellen pelletiert (Heraeus Multifuge 1s, 800 rpm, 8 min, Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen in je 7 mL B5-Medium aufgenommen und bei 26 °C für 20 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in je 20 mL auf 4 °C gekühlte 240 mM CaCl₂-Lösung gegeben und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 1200 rpm, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in einem Restvolumen von ca. 1 mL aufgeschwemmt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Ansätze wurden nochmals zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.000 rpm, 30 sec, Raumtemperatur), die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.11.5. Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten

Zur Extraktion der in den transfizierten Protoplasten enthaltenen Proteine wurden die Protoplasten-Pellets zunächst auf Eis aufgetaut und in 750 µL Luziferase-Extraktionspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann durch *Vortexen* für 30 sec bei maximaler Stufe mechanisch aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 13.000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und der Überstand für die Proteinbestimmung, die Bestimmung der Luziferase-Aktivität und die Bestimmung der Glukuronidase-Aktivität eingesetzt.

2.2.11.6. Proteinbestimmung nach Bradford

nach Bradford (1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Extrakt wurden in einer transparenten Mikrotiterplatte 10 µL des Extrakts mit 200 µL eines 1:5 mit Wasser verdünnten „*Proteinassay-Reagenz*“ (BioRad) gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption des resultierenden Protein-Coomassie-Brilliant-Blau-Konjugats wurde bei 595 nm in einem Fluorimeter (Fluostar Optima) gemessen. Die Konzentrationen wurden durch Vergleich mit einer gleichbehandelten BSA-Eichreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen ermittelt.

2.2.11.7. Bestimmung der Luziferase-Aktivität

nach Wood (1991)

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden zu 10 µL des Protoplastenextraktes 100 µL Luziferase-Substratlösung gegeben. In der sich unmittelbar anschließenden Messung in einem Luminometer (Bioscan, MiniLum) wurde die Summe der während eines Zeitintervalls von 10 sec emittierten Photonen (RLU = *relative light units*) ermittelt.

2.2.11.8. Bestimmung der β-Glukuronidase-Aktivität

nach Jefferson *et al.* (1986)

Zur Bestimmung der β-Glukuronidase-Aktivität wurde die Umsetzung von 4-MUG (4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid) in das fluoreszierende Produkt 4-MU (4-Methyl-Umbelliferon) gemessen. Hierzu wurden 100 µL Protoplastenextrakt in einer dunklen Mikrotiterplatte vorgelegt und 4-MUG-Substratlösung zugesetzt. Nach während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde in 20 Minuten Intervallen die Fluoreszenz des 4-MU bei einer Wellenlänge von 455 nm nach Anregung bei 366 nm gemessen (BMG Labtech, Fluostar Optima). Die umgesetzten Stoffmengen wurden durch den Vergleich mit einer 4-MU Eichreihe in GUS-Puffer ermöglicht, die unter gleichen Bedingungen mitgeführt wurde.

2.2.11.9. Berechnung von Reporterogenaktivitäten

Zunächst wurde der Proteingehalt pro µL Protoplastenextrakt unter Annahme eines linearen Konzentrations-Absorptionsverhältnis durch Vergleich mit der BSA-Eichreihe bestimmt. Die während der Bestimmung der Luziferase-Aktivität emittierten Photonen wurden 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 Formel (1) errechnet.

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

Hierbei ist ΔA_{460} der Mittelwert der Fluoreszenzänderung von der 20 min bis zur 40 min und von der 40 min bis zur 60 min Messung der GUS-Aktivität, die vom Substratumsatz abhängt. Des Weiteren ist m die Steigung und b ist der Ordinatenabschnitt der 4-MU Eichreihe (Fluoreszenzwerte auf der Ordinate, pmol 4-MU auf der Abszisse).

Um unterschiedlichen Transfektionseffizienzen, Zellzahlen und weiteren nicht exakt bestimmbareren Bedingungen Rechnung zu tragen, wurden für jede einzelne Messung ein Korrekturfaktor F_i ermittelt, der sich aus den Luziferase-Aktivitäten, der jeweiligen Proben errechnet. Die Berechnung des Korrekturfaktors ist in Formel (2) dargestellt.

$$(2) \quad F_i = \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum LUC_i}{LUC_i}$$

Hierbei entspricht n der Summe aller Transfektionen und LUC_i sind die jeweiligen in die Auswertung einfließenden spezifischen Luziferase-Aktivitäten.

Durch Multiplikation mit dem jeweiligen Korrekturfaktor F_i erhält man aus der spezifischen β -Glukuronidase-Aktivität GUS_i die spezifische korrigierte GUS-Aktivität GUS_{ki} . Die entsprechende Berechnung ist in Formel (3) dargestellt.

$$(3) \quad GUS_{ki} = F_i \cdot GUS_i$$

Wenn es sich bei den in dieser Arbeit ermittelten Werten um Werte handelte, die nicht aus Pilotexperimenten stammten, dann wurden die Experimente mehrfach wiederholt (bis zu sieben unabhängige Protoplastentransfektionen). In diesen Fällen wurde als spezifische, korrigierte GUS-Aktivität GUS' der Mittelwert der GUS_{ki} -Werte ermittelt, wobei jeweils der höchste und der niedrigste Einzelwert nicht in die Berechnung eingeflossen sind. Formel (4) veranschaulicht die Berechnung von GUS' .

$$(4) \quad GUS' = \frac{1}{n} \cdot \sum GUS_{ki}$$

Hierbei ist n die Anzahl der in die Berechnung einfließenden Einzelwerte.

Wenn in entsprechenden Ergebnisdiagrammen Fehlerbalken zu finden sind, dann sind derart gemittelte GUS' -Werte mit ihrer Standardabweichung dargestellt.

2.2.12. At7 Transfektion zur Analyse von GFP-Fusionsproteinen

Die oben beschriebene At7-Zellsuspensionskultur wurde auch verwendet, um die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen zu untersuchen. Hierfür wurden 10 μ g Expressionsplasmid-DNA, die für die entsprechenden Proteine kodiert in einem Gesamtvolumen 50 μ L zur Transfektion eingesetzt. Die Gewinnung der Protoplasten und die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der Inkubation über Nacht in B5-Medium direkt zur weiteren Analyse eingesetzt wurden und nicht wie in den Ko-Transfektionsexperimenten in $CaCl_2$ -Lösung geerntet wurden.

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurden die lebenden Protoplasten, die an der Oberfläche des B5-Mediums angereichert waren, direkt auch Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen vorsichtig abgedeckt. Anschließend erfolgte die Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 5500 B) unter Verwendung eines GFP spezifischen Filters.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Flavonoid-Metabolismus in *A. thaliana* behandelt. Zunächst wurden Faktoren untersucht, die Einfluss auf die Proanthocyanidin (PA) Akkumulation in der Samenschale haben. Hierbei wurde der Fokus insbesondere auf den spezifisch in der Samenschale exprimierten Regulator *TT1* sowie auf die Regulation der PA-Bildung in der Chalaza- und Mikropyleregeion gelegt. Des Weiteren wurden Paraloge von *TT1* untersucht – die so genannte *WIP*-Genfamilie. Darüber hinaus wurden die Eigenschaften bestimmter MYB-Regulatoren untersucht. Insbesondere wurden die R2R3-MYB Proteine der Untergruppe 7, die eine Rolle in der Regulation von Flavonolen und Flavonolglykosiden spielen, hinsichtlich weiterer Zielgene untersucht. Ein weiterer MYB-Regulator, der im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurde, ist das kleine MYB-Protein MYBL2. Dieses Protein spielt möglicherweise eine negativ-regulatorische Rolle in der Flavonoid-Biosynthese.

3.1. Proanthocyanidine in der Samenschale von *A. thaliana*

3.1.1. *TT1* – ein samenschalenspezifischer Regulator

Das Zinkfinger-Protein *TT1* (At1g34790) ist ein samenschalenspezifischer Regulator der PA-Biosynthese in *A. thaliana*. Da in *tt1*-Mutanten keines der bekannten Strukturgene der Flavonoid-Biosynthese von Mutationen betroffen ist, kommen für *TT1* Gene mit regulatorischer Funktion in Betracht. *TT1* ist ein Zinkfinger-Protein, das zur *WIP*-Proteinfamilie gehört (siehe Kapitel 3.2.). Da es sich bei Zinkfinger-Proteinen oft um DNA-bindende Proteine handelt, war eine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrscheinlich. Es waren jedoch keine Zielgene für *TT1* bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von potenziellen Zielgenen hinsichtlich Bindungsfähigkeit von *TT1* untersucht.

Die Aufklärung der molekularen Funktion von *TT1* wurde bislang dadurch erschwert, dass keine stabilen *knock out* Linien vorhanden waren. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Generierung und phänotypischen Analyse einer stabilen *knock out* Linie gearbeitet.

3.1.1.1. Potenzielle Zielgene von *TT1* im Flavonoid-Metabolismus

Da in *TT1*-Mutanten die Proanthocyanidin-Biosynthese in der Samenschale gestört ist, kommen – unter der Annahme, dass es sich bei *TT1* um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor handelt – als Zielgene alle Gene im Flavonoid-Metabolismus in Betracht,

die auf dem Weg zu den PAs essenzielle Rollen spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dahin gehend die Promotoren der Gene *CHS* (At5g13930), *TT12* (At3g59030), *LDOX* (At4g22880), *BAN* (At1g61720) sowie der Promotor des Regulators *TT16* (At5g23260) und der *TT1*-Promotor selbst untersucht. Es wurden hierfür Reporterkonstrukte erstellt, die diese Promotoren vor der kodierenden Region des Reportergens *uidA* enthielten. Um die Bindefähigkeit von TT1 an die Zielpromotoren zu untersuchen, wurde als Effektor-konstrukt die *TT1*-cDNA in translationaler Fusion mit VP16-kodierender DNA kloniert. Bei VP16 handelt es sich um ein saures Transaktivator Protein des *Herpes simplex* Virus. Fusionsproteine, die die VP16-Domäne enthalten werden in der Regel starke transkriptionelle Aktivatoren (Sadowski *et al.*, 1988; Cheng *et al.*, 1992), die auch in Pflanzen angewendet werden können. Es wurde bereits gezeigt, dass TT1 Kernlokalisierungssignale (NLS) enthält (Sagasser *et al.*, 2002). Daher wurde in den *TT1:VP16*-Konstrukten auf den zusätzlichen Einsatz vektorkodierter NLS-Sequenzen verzichtet.

Die beschriebenen Konstrukte wurden in der At7-Zellsuspensionskultur (siehe Material und Methoden) für Ko-Transfektionsexperimente eingesetzt. Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 3-1 zusammengefasst. Es wurde für keins der potenziellen Zielgene eine signifikante Aktivierung durch das *TT1:VP16*-Fusionsprotein detektiert. Der einzige Promotor der im entsprechenden Promotor-GUS-Konstrukt eine Aktivität zeigte, die deutlich über der Aktivität der Negativkontrolle (ein promotorloses GUS-Konstrukt) lag, war der *BAN*-Promotor. Dieser zeigte aber eine Autoaktivität, die durch die Ko-Transfektion mit dem *TT1*-Effektor-konstrukt nicht signifikant erhöht wurde, so dass auch in diesem Fall nicht von einer Bindung des Promotors durch TT1 ausgegangen werden kann.

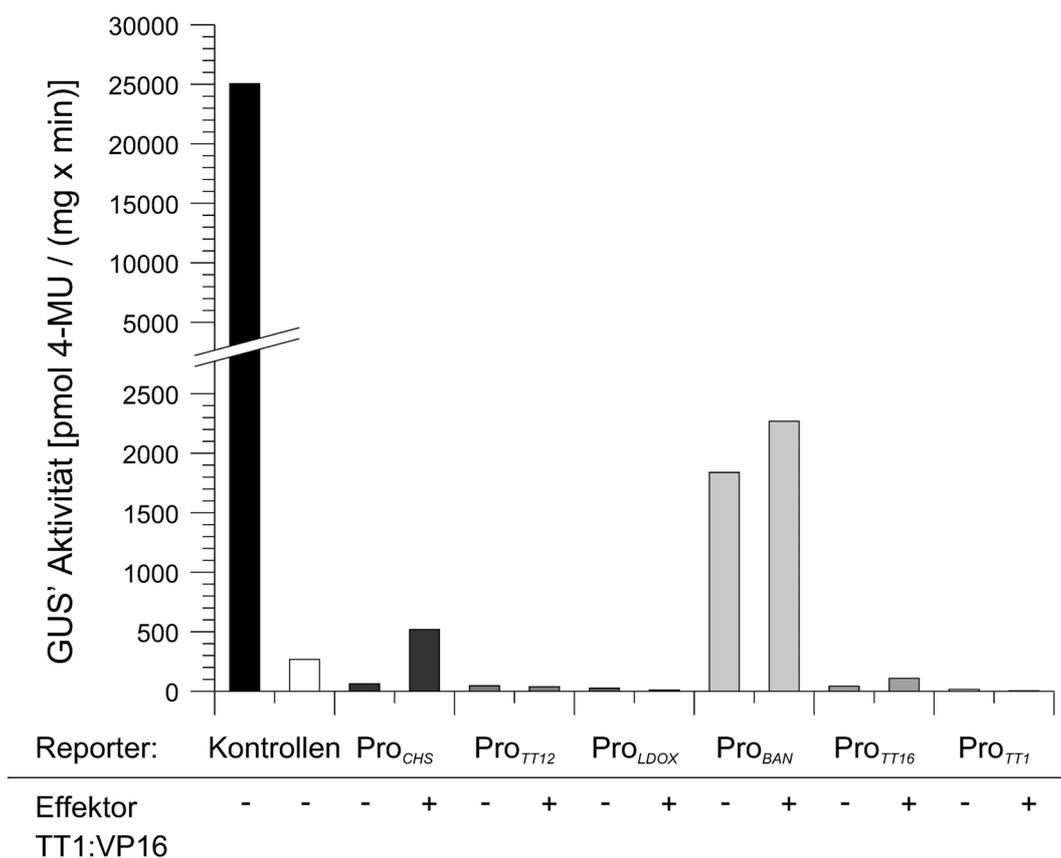


Abbildung 3-1. Analyse potenzieller TT1-Zielgene durch Ko-Transfektionsexperimente. Ein TT1:VP16-Fusionsprotein wurde auf die Fähigkeit der Bindung an die Promotoren der Gene *CHS*, *TT12*, *LDOX*, *BAN*, *TT16* und *TT1* durch Ko-Transfektionsexperimente in der At7-Zellsuspensionskultur überprüft. Es wurde jeweils die Aktivität des jeweiligen Promotor-GUS-Konstrukts mit und ohne TT1:VP16-Effektor überprüft. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle diente ein 35S:GUS sowie ein promotorloses GUS-Konstrukt. Die durchschnittliche relative Luziferaseaktivität lag bei 1379 RLU μg^{-1} Protein sec^{-1} . Die Interaktionsexperimente wurden als „Pilotexperiment“ nur einmalig durchgeführt, nachdem sich die Nicht-Aktivierbarkeit der entsprechenden Promotoren erwiesen hatte.

3.1.1.2. Knock out Phänotyp von *tt1*

Die Aufklärung der molekularen Funktion von TT1 und die Interpretation gewonnener Versuchsergebnisse wurde bislang dadurch erschwert, dass der wirkliche *knock out* Phänotyp von TT1 nicht bekannt war. Es sind zwar zwei verschiedene T-DNA-Insertionslinien verfügbar. Aber sowohl im *tt1-3* als auch im *tt1-4* Allel liegt die Insertion der T-DNA im Intron und bewirkt in den meisten Fällen ein Fehlspleißen des Primärtranskripts – es konnte jedoch in Samenmaterial beider Linien korrekt gespleißtes Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 3-2). Weiterhin existiert ein EMS-Allel (*tt1-1*), in dem eine drei-Basenpaar-Punktmutation in unmittelbarer Nähe des 3'-Spleißsignals zur Nutzung eines noch weiter 3'-wärts liegenden Signals durch das Spleißosom führt. Die Nutzung dieser alternativen Spleißstelle führt jedoch zu einem *frame shift*, der vermutlich zu einem nicht-

funktionellen Protein führt. Allerdings ist denkbar, dass die korrekte Spleißstelle dennoch genutzt wird und zu einem Protein mit zwei veränderten Aminosäuren führt. Tatsächlich ließ sich auch im Fall von *tt1-1* ein Transkript der korrekten Größe nachweisen (Abbildung 3-2). Darüber hinaus ließ sich dieses „variante Transkript“, das zu dem zwei-Aminosäure-Austausch führt, auch tatsächlich in *tt1-1* Samenmaterial nachweisen. Das normale *tt1-1* Transkript führt vermutlich zu einem nicht funktionellen Protein. Im Fall des „varianten Transkripts“ ist eine Restfunktionalität des Proteins allerdings nicht auszuschließen, da lediglich zwei Aminosäuren ausgetauscht sind.

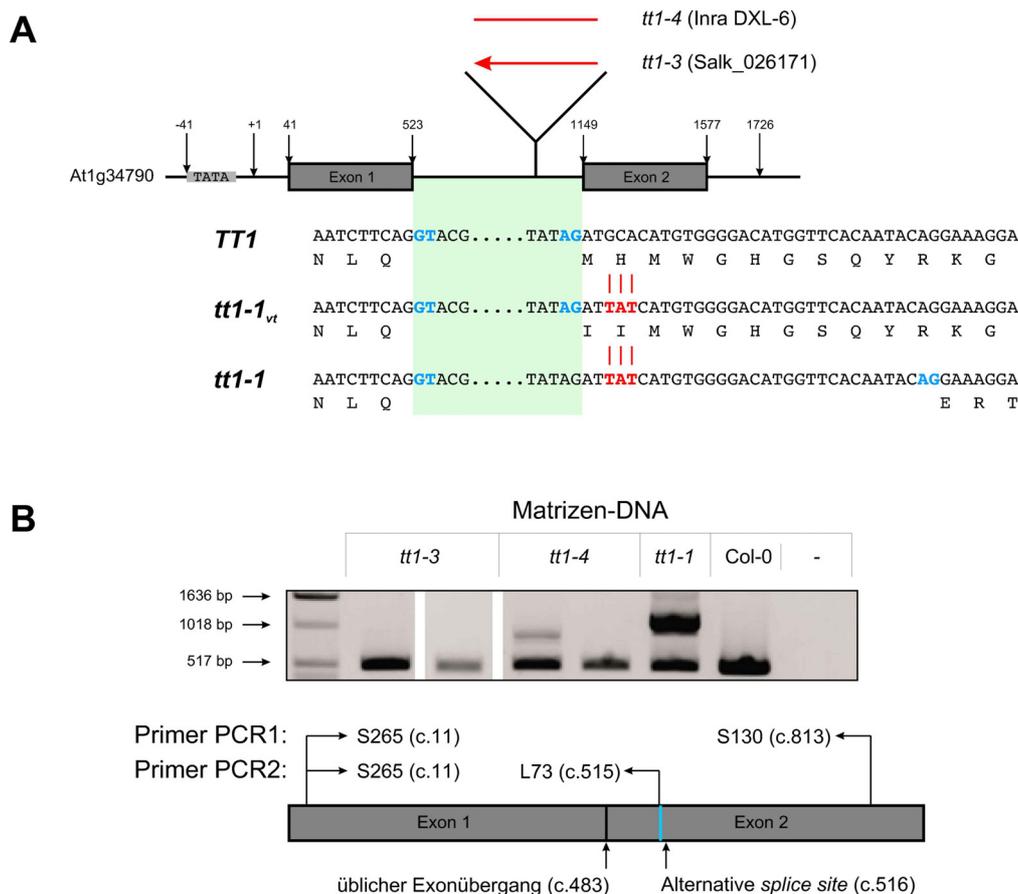


Abbildung 3-2. Nachweis von *TT1*-Transkript in verschiedenen *tt1*-Linien.

(A) Die beiden verfügbaren T-DNA-Insertionslinien *tt1-3* und *tt1-4* weisen die Insertion im Intron auf. Bei *tt1-1* handelt es sich um eine *splice site* Mutante. Üblicherweise findet inkorrektes *splicing* statt und es wird das als „*tt1-1*“ gekennzeichnete Transkript gefunden, das einen *frame shift* aufweist und vermutlich zu einem nicht funktionellen Protein führt. In einigen Fällen kann jedoch eine alternative *splice site* genutzt werden und es wird das als „*tt1-1_{vt}*“ gekennzeichnete „variante Transkript“ gebildet, das nur zu einem zwei-Aminosäuren-Austausch führt. Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf das bei der *TT1*-Expression primär gebildete RNA-Transkript. (B) Durch „*nested PCR*“ mit cDNA aus Schoten als DNA-Matrize konnte für jede der erwähnten *tt1*-Linien Transkript in der korrekten Größe amplifiziert werden. Die Primer hierfür waren so gewählt, dass im Fall von *tt1-1* das variante Transkript gebildet worden sein muss: S265/S130 für die erste, S265/L73 für die zweite PCR. Die Annealing-Temperatur betrug für beide PCRs 55 °C, die Elongationszeit 1:30 min. Jede einzelne PCR wurde mit einer Zyklenzahl von 25 durchgeführt, die Gesamtzyklenzahl betrug also 50.

Es wurde für sämtliche erwähnten *tt1*-Allele ein gelbsamiger Phänotyp beobachtet. Das lässt auf eine Nicht-Funktionalität der gebildeten Transkripte oder Proteine in diesen Linien schließen. Aus den oben erläuterten Gründen bestand jedoch die Möglichkeit einer *TT1*-Restaktivität. Es war daher bislang nicht auszuschließen, dass der beobachtete „*knock out*“ Phänotyp nicht dem wirklichen Null-Allel Phänotyp entspricht.

Ein weitere Beobachtung ist, dass die unreifen Samen der bislang bekannten *tt1* Linien nach Vanillin-Färbung eine sporadisches Auftreten von Pigmentierung („*spotty phenotype*“) über die gesamte Samenschale verteilt zeigen (Lu *et al.*, unveröffentlicht). Die Pigmentierung lässt auf das Vorhandensein von Proanthocyanidin Vorläufermolekülen schließen. Durch Vanillin-Färbung werden in *A. thaliana* Leucoanthocyanidine und Epicatechine detektiert. Aufgrund der Bildung korrekt gespleißten Transkripts auch in den *tt1*-Linien (siehe oben) konnte bislang nicht ausgeschlossen werden, dass der *spotty phenotype* aus einer Restfunktionalität der *TT1*-Proteine resultiert.

Neben den bereits erwähnten *tt1*-Linien ist eine weitere verfügbar, die auf einer *En*-Transposon-Insertion im ersten Exon von *TT1* beruht (Sagasser *et al.*, 2002). Bei dem entsprechenden Allel *tt1-2* handelt es sich um ein Null-Allel, da nur ein geringer Teil des Transkripts korrekt translatiert werden kann. Der genetische Hintergrund dieser Linie ist Columbia. Ein Problem bei der *tt1-2*-Linie ist, dass sie instabil ist, das heißt, dass das *En*-Transposon aufgrund von Transposase-Aktivität aus dem *TT1*-Insertionsloкус entfernt werden kann. Daher kann auch im Fall von *tt1-2* nicht von einem *stabilen knock out* ausgegangen werden. Die Transposonlinie konnte jedoch als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer stabilen Null-Allel *knock out* Linie verwendet werden. Hierzu wurde sie zunächst mit Wildtyp-Pflanzen zu *tt1-2* x Col-0 gekreuzt. In der entsprechenden F1-Generation ist dadurch ein Insertionsallel durch das entsprechende Wildtyp-Allel ersetzt worden. Mit DNA aus F1-Pflanzenmaterial als Matrize wurden durch PCR mit einem *En*-Transposon-spezifischen Primer und einem *TT1*-spezifischen Primer (En8130 und S105) diejenigen Pflanzen identifiziert, die keine Insertion mehr im *TT1*-Gen enthielten. Bei diesen Pflanzen muss das Transposon im verbleibenden Insertionsallel durch Transposase-Aktivität aus dem *TT1*-Gen entfernt worden sein. Bei exakter Entfernung würde wieder das Wildtyp-*TT1*-Allel entstanden sein. Der Vorgang konnte allerdings auch inakkurat erfolgen, wobei einige Basen am Insertionsort zurückgelassen oder zu viele Basen entfernt worden sein konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Natur der potenziellen *footprint* Allele durch Sequenzierung von PCR-Produkten aufgeklärt, die den entsprechenden Teil des Exon 1 von *TT1* beinhalten. Neben Linien, die Allele enthielten, welche für Aminosäureinsertionen

kodierten, wurde aus einer Population von 178 F1-Pflanzen der Kreuzung *tt1-2* x Col-0 eine Linie identifiziert, die ein Allel mit vorzeitigem Stop-Codon enthielt (siehe Abb. 3-3). Das Allel wies die Sequenzvariation c.117_118insTAAT auf cDNA-Ebene und die Sequenzvariation p.T40X auf Aminosäureebene auf (zur Nomenklatur siehe den Dunnen und Antonarakis (2001). Nach Selbstung der entsprechenden F1-Pflanzen wurden in der F2-Generation für das *footprint* Allel homozygote Pflanzen identifiziert und die das vorzeitige Stop-Codon homozygot enthaltenden Pflanzen als Linie *tt1-5f* bezeichnet. Da der Samenschalenphänotyp maternal vererbt wird, wurde dieser in der F3-Generation phänotypisch charakterisiert (Abb. 3-3). Die Samen der Linie *tt1-5f* waren wie auch die Samen der bereits bekannten *tt1*-Linien gelb und unterschieden sich dadurch sichtbar von Wildtypsamensamen des Ökotyps, der jeweils den genetischen Hintergrund lieferte (Columbia im Fall von *tt1-5f* und Landsberg *erecta* im Fall von *tt1-1*). Zur exakteren Charakterisierung wurden unreife Samen (ungefähr im „Herzstadium“ des Embryos) einer Vanillin-Färbung unterworfen und lichtmikroskopisch untersucht. Auch hier ließen sich die Samen der Linie *tt1-5f* nicht von Samen der Linie *tt1-1* unterscheiden. Sie zeigten sporadisch Pigmentierung in Endothelzellen sowie in der Chalaza und in der Mikropyle wohingegen Wildtypsamensamen (Col-0) eine Pigmentierung im gesamten Endothel der Samen aufwiesen.

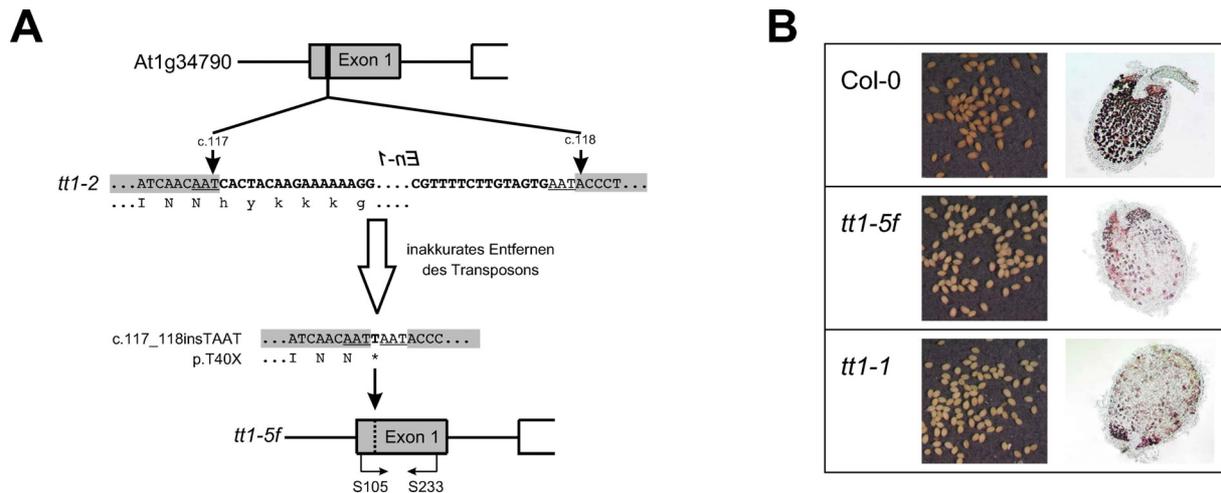


Abbildung 3-3. Herstellung und Phänotyp einer *tt1-footprint* Linie.

(A) Prinzip der Herstellung der *tt1-footprint* Linie *tt1-5f*. Als Ausgangsmaterial diente die *En*-Transposon Insertionslinie *tt1-2*, die die Insertion zwischen der 117. und 118. Base der cDNA in Exon 1 des *TT1*-Gens enthält. Durch inakkurates Entfernen des Transposons blieb eine 4-Basenpaar Insertion zurück, die zu einem *frame shift* führte und anstelle des Threonin-kodierenden Codons ACC ein Stop-Codon generierte. Die Lage des Stop-Codons in *tt1-5f* sowie Desoxyoligonukleotide, die es erlauben den entsprechenden Bereich mittels PCR zu amplifizieren sind im unteren Teil der Abbildung eingetragen. Details zur Herstellung der Linie sind im Text beschrieben. (B) Der Phänotyp der *footprint* Linie *tt1-5f* gleicht dem Phänotyp der EMS-Mutante *tt1-1*. Es wurden im Gegensatz zum Col-0 Wildtyp gelbschalige Samen beobachtet (linke Seite). Durch Vanillin-Behandlung (rechte Seite) ließen sich bei *tt1-5f* und *tt1-1* sporadisch Zellen im Endothel und die Mikropyle und Chalaza färben. Der Col-0 Wildtyp zeigt im Gegensatz dazu eine Pigmentierung im gesamten Endothel des Samens.

Der Vergleich der neuen *footprint* Linie *tt1-5f* mit der EMS-Linie *tt1-1* zeigt also keinen Unterschied und demonstriert, dass bei den vorhandenen *tt1* Linien bereits von einem *knock out* ausgegangen werden kann.

3.1.1.3. TILLING von *TT1*

Die TILLING-Methode (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) liefert die Möglichkeit, aus Populationen zufällig mutagenisierter Pflanzen diejenigen zu identifizieren, die Mutationen in gewünschten Bereichen des Genoms aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde TILLING für das Gen *TT1* durchgeführt. Das *Screening* einer entsprechenden EMS-behandelten Population wurde extern bestellt bei dem „Seattle TILLING Project – Arabidopsis TILLING Project“.

Für das TILLING wurden zunächst Primer entworfen, die potenziell funktionell entscheidende Bereiche des Gens umrahmen. Diese Bereiche auf der DNA entsprechen den Bereichen des Proteins, der die WIP-Domäne und die darin enthaltenen Zinkfinger enthält und liegen weitestgehend innerhalb des zweiten Exons, lediglich der N-terminale Teil der WIP-Domäne und Teile des ersten Zinkfingers werden im ersten Exon kodiert. Aus praktischen Gründen

(Amplifikatgröße) wurden die Primer so gewählt, dass sie lediglich das zweite Exon umfassten.

Es wurden durch das TILLING acht verschiedene neue *tt1*-Allele identifiziert. Hierbei befanden sich drei der entsprechenden Sequenzvariationen im TT1-Protein in Zinkfingerbereichen, zusätzliche zwei innerhalb der WIP-Domäne und drei im C-terminalen, funktionell wahrscheinlich weniger wichtigen Teil des Proteins (siehe Abb. 3-4).

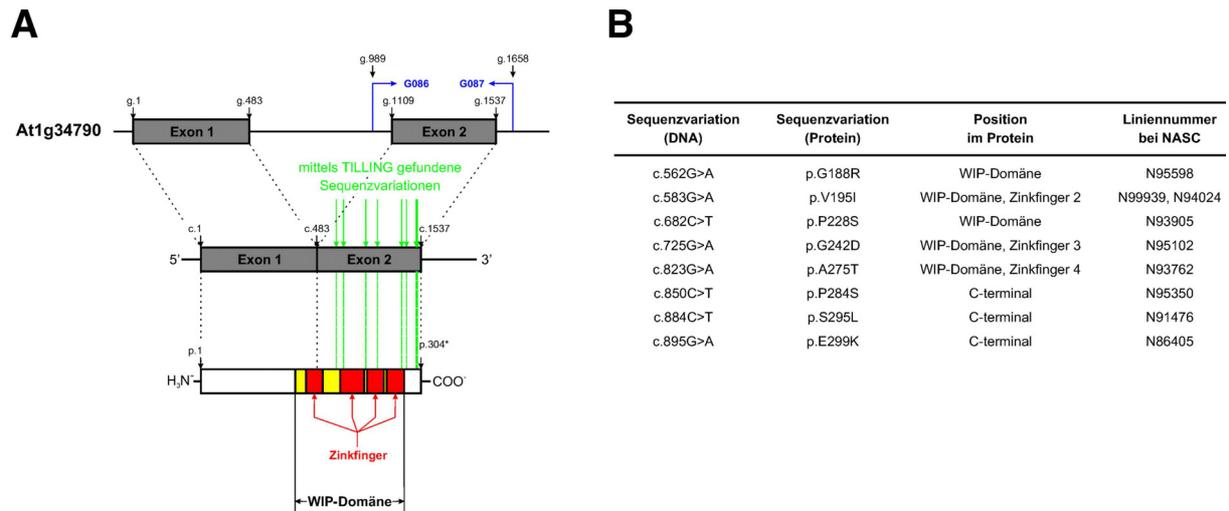


Abbildung 3-4. Durch TILLING identifizierte *tt1*-Allele.

(A) Die genomische DNA und die cDNA des *TT1*-Gens sowie das TT1-Protein sind dargestellt. Oberhalb der genomischen DNA sind die für das TILLING verwendeten Primer in blau eingetragen. In grün ist in der cDNA und im Protein die Lage der neu identifizierten *tt1*-Allele vermerkt. Im Protein sind die potenziell funktionell wichtigen Bereiche – die WIP-Domäne und die darin enthaltenen Zinkfinger – zusätzlich gelb bzw. rot markiert. **(B)** Auflistung der identifizierten Sequenzvariationen. Zusätzlich sind die Position der betroffenen Aminosäuren im Protein sowie die Liniennummer, unter der die entsprechenden Samen bei NASC (<http://arabidopsis.info>) bestellt werden können eingetragen.

Die neu identifizierten *tt1*-Linien wurden bestellt und genotypisiert. Bis zum Abschluss dieser Arbeit wurden homozygote Linien jedoch nur für die neuen Allele c.562G>A, c.682C>T und c.895G>A ermittelt. Diese drei Sequenzvariationen liegen nicht in den für die funktionell wahrscheinlich essenziellen Zinkfinger kodierenden Bereichen. Es wurde in den entsprechenden homozygoten Pflanzen ein braunschaliger Samenschalenphänotyp beobachtet (nicht gezeigt). Zumindest in diesen Linien liegt offensichtlich kein drastischer Funktionsverlust des TT1-Proteins vor.

3.1.2. Proanthocyanidine in Mikropyle und Chalaza

Wie bereits erwähnt findet man in *transparent testa* Mutanten einen reduzierten PA-Gehalt in der Samenschale. In einigen *tt* Mutanten findet man jedoch eine Akkumulation von PAs vor allem in zwei spezifischen Regionen der Samenschale – in der Mikropyle und in der Chalaza (Lepiniec *et al.*, 2006). Die *tt1* Mutante ist ein solcher Fall, in dem eine Anfärbarkeit der Chalaza und der Mikropyle durch Vanillin auf das Vorhandensein von PAs schließen lässt. Da in der restlichen Samenschale eine stark verminderte PA-Bildung beobachtet wird – es wird allenfalls ein sporadisches Auftreten von PA-Vorläufern in der Endothelregion beobachtet – kann von einer Regulation des Flavonoidmetabolismus in Mikropyle und Chalaza ausgegangen werden, die sich von der Regulation im übrigen Samen unterscheidet. Da die molekulare Funktion von TT1 weiterhin ungeklärt ist, ist es noch nicht möglich auf die Natur dieser abweichenden Regulation zurück zu schließen. Eine Möglichkeit ist, dass ein anderer Faktor, der ausschließlich in Mikropyle und Chalaza exprimiert wird, dort die Funktion, die TT1 im übrigen Samen ausübt, übernimmt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass in diesen Geweben ein TT1-unabhängiger Faktor eine Rolle in der PA-Akkumulation spielt, der in den übrigen Samengeweben funktionslos oder nicht exprimiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen begonnen, den geschilderten Sachverhalt aufzuklären. Als Kandidatengen, die eine TT1-unabhängige Rolle bei der PA-Akkumulation in Mikropyle und Chalaza übernehmen könnte wurde *GL3/BHLH1* (At5g41315) ausgewählt. Es wurde eine *tt1-1/gl3-1 Doppelknockout* Mutante generiert und eine Analyse des Samenphänotyps vorgenommen. Des Weiteren wurde eine EMS-Mutagenese im *tt1-1* Hintergrund durchgeführt. An die EMS-Mutagenese schloss sich in der M3-Generation ein phänotypischer *Screen* der Samen an.

3.1.2.1. *GL3/BHLH1* als Kandidatengen für die Regulation der PA-Biosynthese

Die gewebsspezifische Expression von Regulatorgenen der Flavonoidbiosynthese ist lediglich bis zu einem bestimmten Grad bekannt. So kann beispielsweise nicht ausgeschlossen werden, dass Regulatoren, die eine Rolle bei der PA-Akkumulation im Endothel des Arabidopsis-Samens spielen im Bereich der Mikropyle und Chalaza durch andere Faktoren funktionell ersetzt werden können. Für die meisten der bekannten Regulatoren, die die PA-Biosynthese betreffen wie beispielsweise TT2, TT8, TT16, etc. ist eine exklusive Rolle in Mikropyle und Chalaza ausgeschlossen, da sich die Faktoren, wie in entsprechenden *knock outs* gezeigt werden kann, auf den gesamten Samen auswirken oder sie – wie im Fall von TT16 – ihre Funktion nicht in Mikropyle und Chalaza sondern im restlichen Samengewebe ausüben. Als Faktoren, die entsprechende Rollen in Mikropyle und Chalaza ausüben könnten, kommen solche in Betracht, die bekanntermaßen analoge

Funktionen übernehmen können. Für die bHLH-Transkriptionsfaktoren GL3/BHLH1 (At5g41315) und EGL3/BHLH2 (At1g63650) wurde in der Literatur (Zhang *et al.*, 2003) bereits diskutiert, dass sie an der PA-Biosynthese beteiligt sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch untersucht, ob GL3 eine TT1-unabhängige Rolle in Mikropyle und Chalaza ausübt und dort essenziell für die PA-Biosynthese ist. Aus diesem Grund wurden *tt1-1* x *g/3-1* Kreuzungen hergestellt, wobei auch die *g/3-1* Pflanzen ein *knock out* Allel enthielten, das aus einer EMS-Mutagenese hervor ging. In der F2 Generation wurde eine *Screening*-Prozedur durchgeführt, die zur Identifizierung für die Mutationsallele doppelt homozygoter Pflanzen führte (siehe Abb. 3-4). Entsprechende F3-Samen wurden phänotypisch untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen *tt1-1* Samen und den Samen der Doppelmutante *tt1-1 g/3-1* festgestellt werden. Es wurde in der Doppelmutante nach wie vor eine Pigmentakkumulation nach Vanillin-Färbung in Mikropyle und Chalaza beobachtet (Abb. 3-4). GL3 spielt demnach keine exklusive Rolle in diesen Geweben hinsichtlich der Kontrolle der PA-Biosynthese.

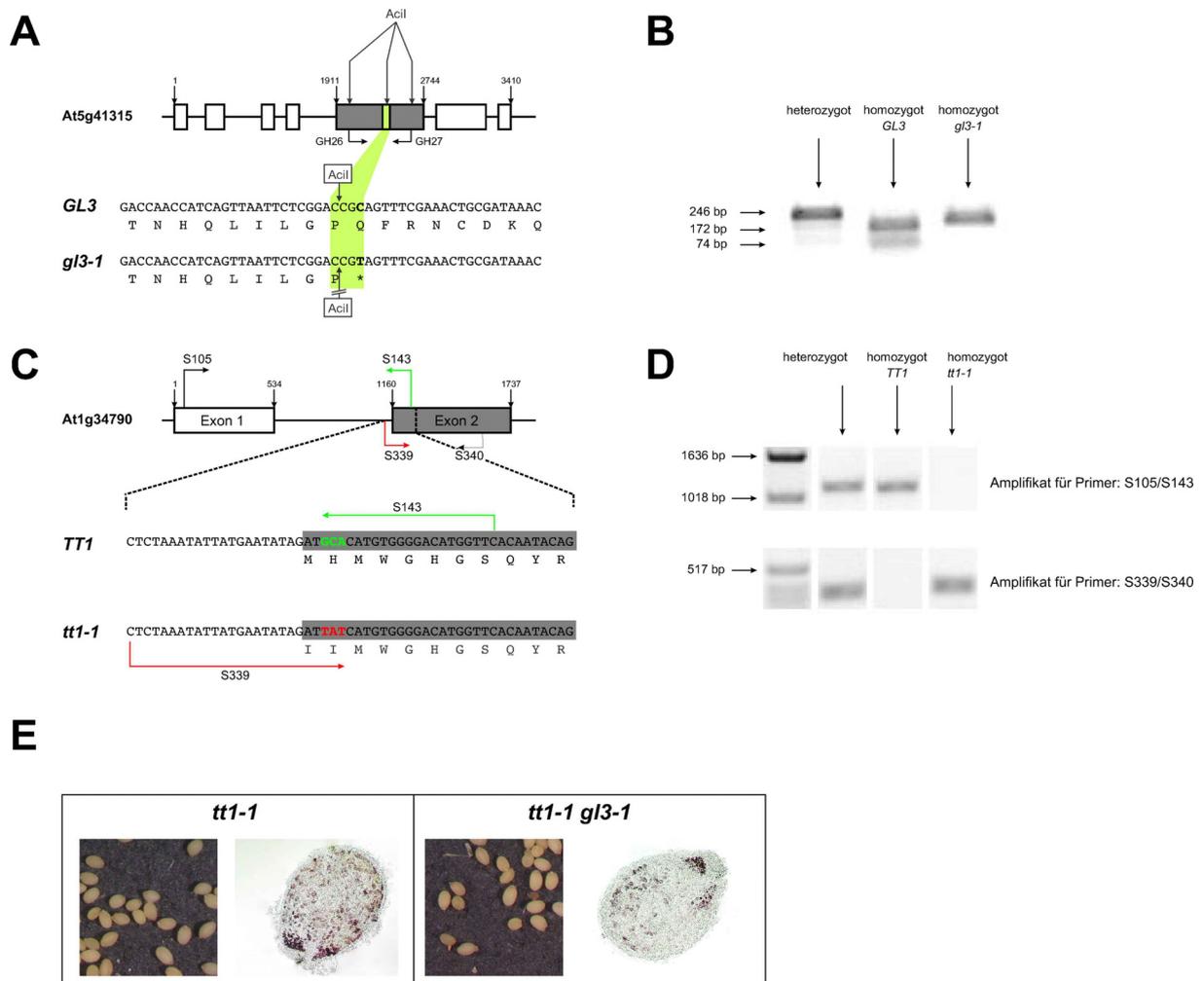


Abbildung 3-4. Identifikation und Phänotyp einer *tt1-1 gl3-1* Doppelmutante.

Das Prinzip des *Screening*-Prozesses, der zur Identifikation einer *tt1-1 gl3-1* Doppelmutante führte ist dargestellt. In **(A)** ist die Natur des *gl3-1* EMS Allels aufgeführt. Ein Einzelbasenaustausch in Exon 5 des *GL3*-Gens führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Durch den Basenaustausch wird außerdem eine *Acil* Erkennungsstelle, die im Wildtypallel vorhanden ist zerstört. **(B)** Diese *Acil* Erkennungsstelle konnte zur Identifikation des *gl3-1* Allels herangezogen werden, da ein entsprechendes PCR-Produkt (Primer GH26/GH27) nur im Fall eines Wildtypallels geschnitten wird. **(C)** Das *TT1* Wildtypallel ist dem *tt1-1* EMS-Allel gegenübergestellt. Entsprechende Primer, die zwischen beiden Allelen diskriminieren können, sind eingetragen. **(D)** Homozygote *tt1-1* Linien konnten über entsprechende PCRs identifiziert werden. **(E)** Die Phänotypen von *tt1-1* und der Doppelmutante *tt1-1 gl3-1* unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Pigmentierung von Mikropyle und Chalaza nach Vanillin-Färbung.

3.1.2.2. EMS Mutagenese von *tt1-1* Samen

Da mit dem oben beschriebenen Kandidatengenansatz der Faktor, der in der Mikropyle und der Chalaza für die TT1-unabhängige PA-Akkumulation verantwortlich ist, nicht identifiziert werden konnte, wurden *tt1-1* Samen einer EMS-Mutagenese unterzogen, in der Absicht, einen *knock out* für den Mikropyle/Chalaza Faktor im *tt1-1* Hintergrund zu generieren. Der Versuch wurde im *tt1-1* Hintergrund durchgeführt, da in dieser Mutante eine gewünschte Veränderung im Metabolismus der Mikropyle und Chalaza potenziell problemlos durch Vanillin-Färbung beobachtet werden kann und nicht durch die Pigmentierung des Endothels des restlichen Samens überdeckt würde.

Es wurden *tt1-1* Samen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EMS (0,35 %, 0,40 %, 0,45 %) behandelt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit 0 % EMS mitgeführt. Aus den EMS-behandelten Samen konnten ca. 4300 Pflanzen vereinzelt werden, von denen ca. 1800 so weit überlebten, dass M2 Samen geerntet werden konnten. Aus diesen Samen wurden 5388 M2 Pflanzen gezogen, wobei wenn möglich mindestens drei M2 Individuen von einem M1 Individuum abstammten. Von 2423 dieser Pflanzen konnten M3 Samen geerntet werden.

Bei den M3 Samen bestand die Möglichkeit, eine homozygote, maternal vererbte Mutation zu entdecken, die sich auf die PA-Akkumulation in Mikropyle und Chalaza auswirkt. Aus diesem Grund wurden reife M3 Samen zunächst visuell begutachtet, danach einer Vanillin-Färbung unterworfen und das Pigmentierungsmuster beobachtet. In der überwiegenden Zahl der Fälle wurde eine Pigmentierung in Mikropyle und Chalaza erwartet, wie es dem genetischen Hintergrund *tt1-1* entspricht. Hierbei ist zu beachten, dass bei dem beschriebenen Verfahren reife Samen der Färbereaktion unterworfen wurden. Die Vanillin-Färbung ist für die Anwendung bei unreifen Samen optimiert. Jedoch handelt es sich bei Mikropyle und Chalaza um Gewebe, die dem Färbereagenz auch im Fall reifer Samen zugänglich sind, was sich in der Anfärbbarkeit von Kontrollsamens zeigt. Als Kontrolle wurden hierbei *tt1-1*, *Ler* und *tt4-1* Samen der Vanillin-Färbung unterworfen. Hierbei zeigten die *tt1-1* und die *Ler* Samen eine Pigmentierung in Mikropyle und Chalaza, während die *tt4-1* Samen, die einen *knock out* des für den Flavonoid-Metabolismus essenziellen *CHS*-Gens darstellen, einheitlich ungefärbt blieben. Mit Fällen, in denen in Mikropyle und Chalaza keine Pigmentierung beobachtet wird, liegen Kandidatenlinien vor, in denen ein Faktor mit einer gewebsspezifischen Funktion in der PA-Biosynthese ausgefallen sein könnte. Die Samen solcher Kandidatenlinien stellen das Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen dar, die nötig sind um die bereits bekannten Gene im Flavonoid-Metabolismus (wie beispielsweise *CHS*), die im jeweiligen *knock out* den gleichen Samenschalenphänotyp hervorrufen würden, auszuschließen.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit wurden M3 Samen von 92 verschiedenen M2-Pflanzen durch Vanillin-Färbung analysiert. Unter diesen befanden sich zwei Fälle, in denen keine Pigmentierung in Mikropyle und Chalaza beobachtet wurde. Die entsprechenden M2-Pflanzen stammten von unterschiedlichen M1-Parentallinien ab – das heißt, dass der beobachtete Phänotyp wahrscheinlich Resultat unterschiedlicher Mutationsereignisse ist.

3.2. Die WIP-Proteinfamilie

Im voran gehenden Kapitel wurde bereits die Rolle von TT1 als Regulator der Flavonoid-Biosynthese in der Arabidopsis-Samenschale behandelt. TT1 besitzt im Arabidopsis-Genom noch 5 weitere Paraloge und bildet mit diesen die WIP-Unterfamilie von pflanzlichen Zinkfingerproteinen. Diese *TT1* = *WIP1* paralogen Gene werden bezeichnet als *WIP2* (At3g57670), *WIP3* (At1g08290), *WIP4* (At3g20880), *WIP5* (At1g51220) und *WIP6* (At1g13290).

Die WIP-Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie lediglich in einem spezifischen Bereich – der so genannten WIP Domäne – auf (siehe Abb. 3-5 A). Die WIP Domäne beinhaltet vier putative Zinkfinger von denen der erste vom C2H2 Typ, der dritte vom C2HC Typ und der zweite und der vierte ungewöhnliche Muster aufweisen. Die WIP-Proteine lassen sich in die Familie A1 der Zinkfinger Proteine in *A. thaliana* einordnen (Englbrecht *et al.*, 2004). Innerhalb der WIP Domäne finden sich darüber hinaus in jedem WIP-Protein zwei putative Kernlokalisations-Signale (NLS) vom SV40-Typ. Außerhalb der WIP Domäne weisen die WIP-Proteine keine vergleichbar hohe Homologie auf, es konnten aber auch dort durch MEME-Analysen (<http://meme.sdsc.edu/meme/>) teilweise konservierte Sequenzen gefunden werden. Die Proteine enthalten jeweils eine saure und mindestens eine nicht näher spezifizierte konservierte Domäne. Darüber hinaus weisen WIP2, WIP4 und WIP5 ein konserviertes prolinreiches Motiv auf (siehe Abb. 3-5 B). Diese Domänen enthalten aber keine auffälligen Ähnlichkeiten zu Motiven bekannter Funktion.

Jedes *WIP*-Gen setzt sich aus zwei Exons und einem Intron zusammen. Die Lage des Exons befindet sich in einem Bereich, der dem ersten Zinkfinger innerhalb der WIP-Domäne entspricht, drei Basenpaare vor dem Codon, das das erste Zink-koordinierende Histidin kodiert (siehe Abb. 3-5 C).

Für die von *TT1* und *WIP2/NTT* unterschiedlichen *WIP*-Gene ist bislang noch keine Funktion beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden die zur weiteren Analyse der Genfamilie benötigten Hintergrundinformationen zusammengestellt. Es wurden Expressionsanalysen mit Hilfe von Promotor-GUS-Linien durchgeführt. Darüber hinaus wurde der phänotypische Effekt von Überexpressionen der *WIP*-Proteine ermittelt und mögliche Effekte von *knock outs*. Die intrazelluläre Lokalisation der *WIP*-Proteine wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen bestimmt. Weiterhin wurden potenzielle direkte Zielgene hinsichtlich der Bindungsfähigkeit der *WIP*-Proteine untersucht. Außerdem wurde das Expressionsprofil zweier potenzieller Zielgene im *WIP-knock-out*-Hintergrund im Vergleich zum Expressionsmuster im Wildtyp-Hintergrund ermittelt.

3.2.1. Expressionsmuster der *WIP*-Gene

TT1 weist ein samenschalenspezifisches Expressionsmuster auf. Für die übrigen *WIP*-Gene wurde bislang keine gewebsspezifische Expression bestimmt. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Promotor-GUS Linien der entsprechenden *WIP*-Gene analysiert (siehe Abb. 3-6).

Die Promotor-GUS Konstrukte wurden in *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia transformiert, transgene Pflanzen selektiert und entsprechende T2 Pflanzen der GUS-Färbung unterworfen. Für jedes *WIP*-Konstrukt wurden 3 bis 6 unabhängige T2-Linien ausgewählt und von jeder Linie jeweils 10 bis 20 Individuen für die verschiedenen Entwicklungsstadien gefärbt. Es wurden ganze Keimlinge 5 bzw. 11 Tage nach Keimung, Infloreszenzen, Stängel von adulten Pflanzen und unreife Samen analysiert. Für die einzelnen Konstrukte wurde innerhalb der Kollektion unabhängiger untersuchter Linien zum Teil ein leicht unterschiedliches Expressionsmuster beobachtet. In diesen Fällen wurde Expression, die konsistent in allen unabhängigen Linien auftrat als konstruktsspezifisch angenommen. Meistens unterschied sich die GUS-Färbung jedoch lediglich in ihrer Intensität.

Für *WIP2* wurde in Keimlingen (5 und 11 Tage nach Keimung) Expression im Sprossachsenmeristem (SAM) beobachtet, wobei sich die Expression im Fall der älteren Keimlinge verstärkte und sich darüber hinaus in die Leitbündel der Blätter ausdehnte (Abb. 3-6 B). Bei älteren Pflanzen wurde Expression außerdem im Lateralmeristem gefunden, innerhalb der Blattachsen, am Ort sich bildender Seitentriebe. Bei Pflanzen im reproduktiven Stadium wurde GUS-Expression im Pollen und an der Basis unreifer Samen beobachtet (Abb. 3-6 C).

WIP3 wird in Keimlingen ebenfalls im SAM exprimiert, jedoch ist das Expressionsmuster in Keimlingen 11 Tage nach Keimung bereits breiter verteilt als im Fall von *WIP2* (Abb. 3-6 B).

Für *WIP3* wurde GUS-Expression in diesen Keimlingen auch außerhalb der Vaskulatur im gesamten Blatt beobachtet. Darüber hinaus scheint *WIP3* wundeninduziert exprimiert zu werden. Im Stängel adulter Pflanzen zeigte sich GUS-Färbung hauptsächlich im Bereich von Schnittkanten. Zusätzlich wurde in Infloreszenzen von Pflanzen im reproduktiven Stadium Expression im Übergangsbereich zu den Schoten beobachtet. In diesen Bereichen finden sich natürlicherweise verletzungartige Veränderungen die durch die Entfernung von Kelch- und Kronenblättern, die zuvor in der Blüte vorhanden waren, entstanden sind. Zusätzlich wurde *WIP3*-Expression analog zu *WIP2* an der Samenbasis beobachtet (Abb. 3-6 C).

Für *WIP4* konnte Expression hauptsächlich in der Wurzelspitze – sowohl in der Hauptwurzel als auch in Seitenwurzeln – beobachtet werden (Abb. 3-6 B & C). Außerdem wurde GUS-Färbung wie auch bei *WIP2* und *WIP3* im Bereich der Samenbasis beobachtet. Im Fall von *WIP4* fiel diese Färbung sogar etwas kräftiger aus als bei *WIP2* und *WIP3* (Abb. 3-6 C). Für *WIP4* wurde die Färbung für zwei verschiedene Promotor-GUS Konstrukte analysiert. Im ersten (kürzeren) Konstrukt war der Promotorbereich bis zum vorhergesagten Startcodon (ATG) vor den *uidA*-ORF im Vektorrückgrat kloniert. Das zweite (längere) Konstrukt beinhaltete 192 zusätzliche Nukleotide im kodierenden Bereich von *WIP4* bis zu einem weiteren im Leseraster liegenden Methionin-kodierenden ATG-Codon. Die beschriebene Expression in der Wurzelspitze wurde in beiden Fällen beobachtet. Im Fall des längeren Konstrukts wurde darüber hinaus in älteren Keimlingen (11 Tage nach Keimung) eine schwache GUS-Färbung im SAM gefunden.

WIP5-Expression wurde in den Kotyledonen von Keimlingen beobachtet. Die Expression war stärker bei jüngeren Keimlingen und nahm bei älteren Keimlingen ab (Abb. 3-6 B). In älteren Pflanzenteilen und Samen wurde keine Expression von *WIP5* gefunden.

WIP6-Expression konnte mit Hilfe der Promotor-GUS Linien nicht beobachtet werden. Keins der analysierten Individuen zeigte eine Färbung.

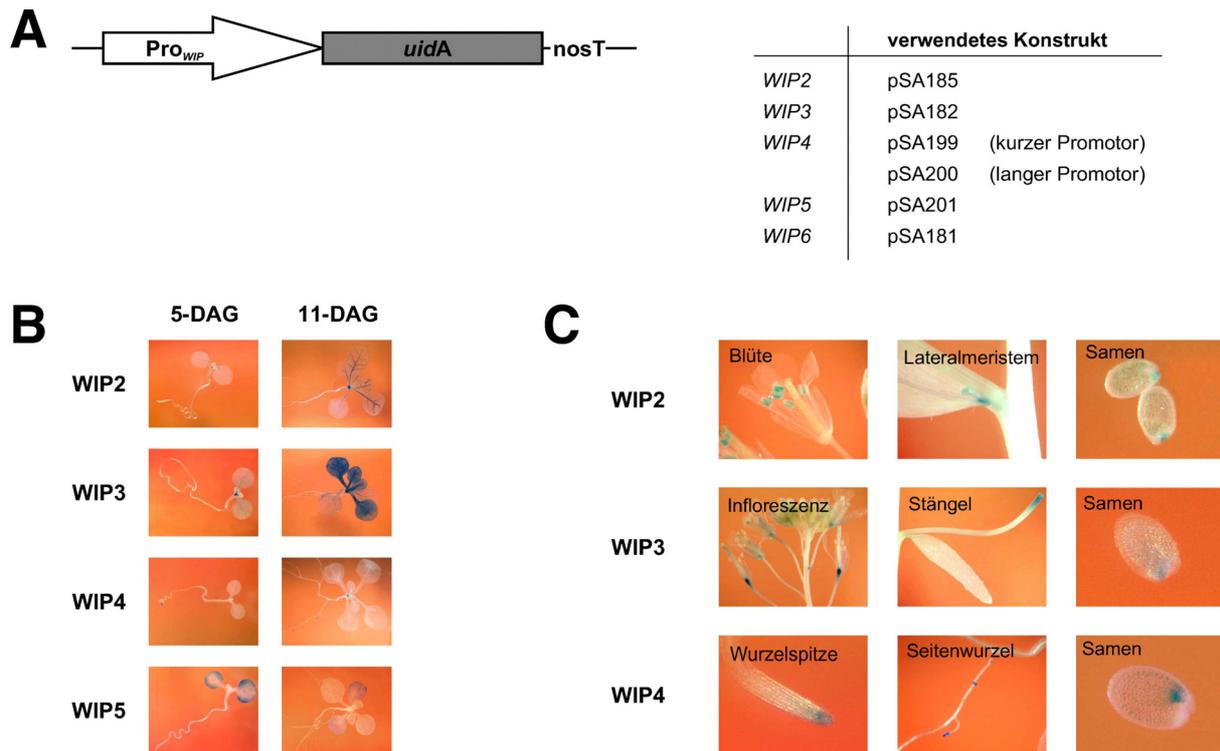


Abbildung 3-6. Expressionsanalyse der WIP-Gene durch Promotor-GUS Linien.

(A) Schematischer Aufbau und Bezeichnungen der verwendeten Konstrukte. Die Länge der verwendeten Promotorbereiche betrug zwischen ca. 1 und 1,5 kb. Im Fall von WIP4 wurden zwei verschiedene Versionen des Promotors analysiert. Die lange Version reichte bis in den ORF hinein. In beiden Fällen wurde das gleiche Expressionsmuster beobachtet. (B) GUS-Expression in entsprechenden transgenen Keimlingen. Es wurden Keimlinge ausgewählt, die 5 oder 11 Tage nach Keimung (5-DAG bzw. 11-DAG) geerntet und gefärbt wurden. Im Fall von WIP6 wurde keine Expression beobachtet. (C) GUS-Expression in ausgewählten Geweben entsprechender transgener Pflanzen. Die dargestellten Wurzeln stammen von 5 und 11 Tage alten Keimlingen. Bei den Samen handelt es sich um unreife Samen, die manuell aus ihren Schoten entfernt wurden. Im Fall von WIP6 wurde keine Expression beobachtet.

3.2.2. Subzelluläre Lokalisation der WIP-Proteine

Für *TT1* wurde die subzelluläre Lokalisation bereits untersucht (Sagasser *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass es sich dabei um einen kernlokalisiertes Protein mit möglicher Funktion als Transkriptionsfaktor handelt. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass für die Kernlokalisation die in Abb.3-5 A markierten Kernlokalisations-Signale (NLS) benötigt werden (Lu, unveröffentlicht). Da beide NLS-Sequenzen in allen WIP-Proteinen exakt konserviert sind, konnte auch für WIP2 bis WIP6 eine Kernlokalisation angenommen werden. Um diese jedoch erstmalig experimentell zu bestätigen, wurden sämtliche WIP-cDNAs in Expressionsvektoren translational an GFP5-kodierende ORFs fusioniert. Die Konstrukte wurden in Protoplasten der Zellsuspensionskultur At7 transfiziert und die Protoplasten anschließend mikroskopisch auf GFP-Fluoreszenz untersucht (siehe Abb. 3-7).

Für sämtliche WIP-Proteine wurde eine Lokalisation im Zellkern der transfizierten Protoplasten beobachtet. Die Transfektionseffizienz war in den durchgeführten Versuchen allgemein recht gering (ca. 5%). Dennoch lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die NLS-Sequenzen, die in TT1 bestätigt wurden, auch in den übrigen WIP-Proteinen funktionell sind.

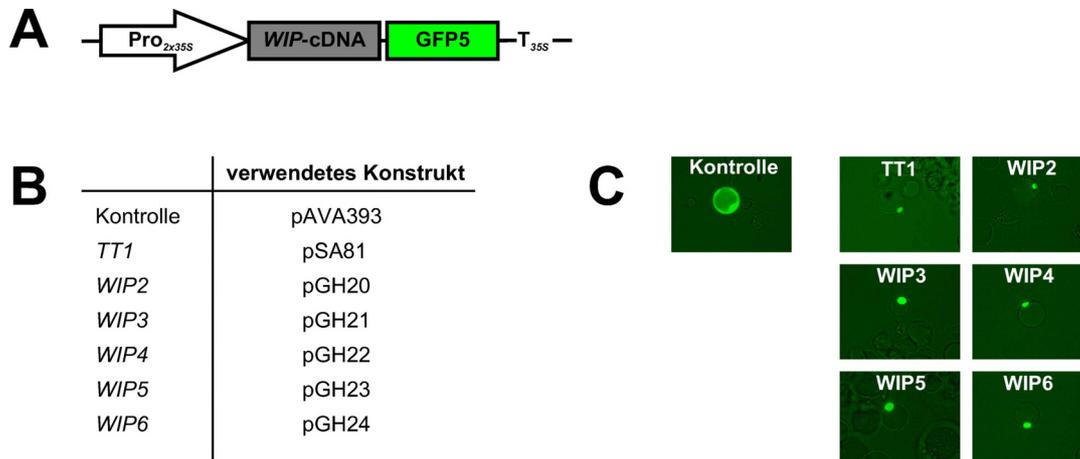


Abbildung 3-7. Intrazelluläre Lokalisation von WIP-GFP-Fusionsproteinen.

(A) Schematischer Aufbau der zur Analyse der intrazellulären Lokalisation verwendeten Konstrukte. Die WIP-cDNA ist im passenden Leseraster an einen GFP5-kodierenden ORF fusioniert. (B) Auflistung der verwendeten Konstrukte. (C) Protoplastierte Zellen der At7-Zellsuspensionskultur, die mit den beschriebenen Konstrukten transient transfiziert wurden. Für die WIP-GFP-Fusionsproteine wurde im Gegensatz zu einer GFP-Kontrolle jeweils eine nukleäre Lokalisation beobachtet. Die Bilder wurden unter Verwendung eines GFP-spezifischen Filters mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

3.2.3. Phänotypen von WIP knock out Pflanzen

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen von *knock outs* in den WIP-Genen wurden T-DNA Insertionslinien herangezogen (siehe Abb. 3-8). Es wurden zur Analyse möglichst Allele gewählt, die die Insertion innerhalb translaterter Bereiche enthielten. Dies war lediglich im Fall von WIP3 nicht möglich, da keine entsprechende SALK- oder GABI-Kat-Linie verfügbar war. Aus diesem Grund wurde für WIP3 eine SALK-Linie gewählt, die die Insertion innerhalb des Introns enthält.

Der exakte Insertionsort der T-DNA wurde jeweils mit Hilfe von PCR mit einer Kombination aus T-DNA-spezifischem (*left boarder*) und genspezifischem Primer und anschließender Sequenzierung des PCR-Produktes bestimmt. Homozygote Pflanzen der verschiedenen Insertionsallele wurden herangezogen und deren Nachkommen phänotypisch untersucht. Im Allgemeinen konnte kein Unterschied zu korrespondierenden Wildtyppflanzen (Ökotyp Columbia) festgestellt werden.

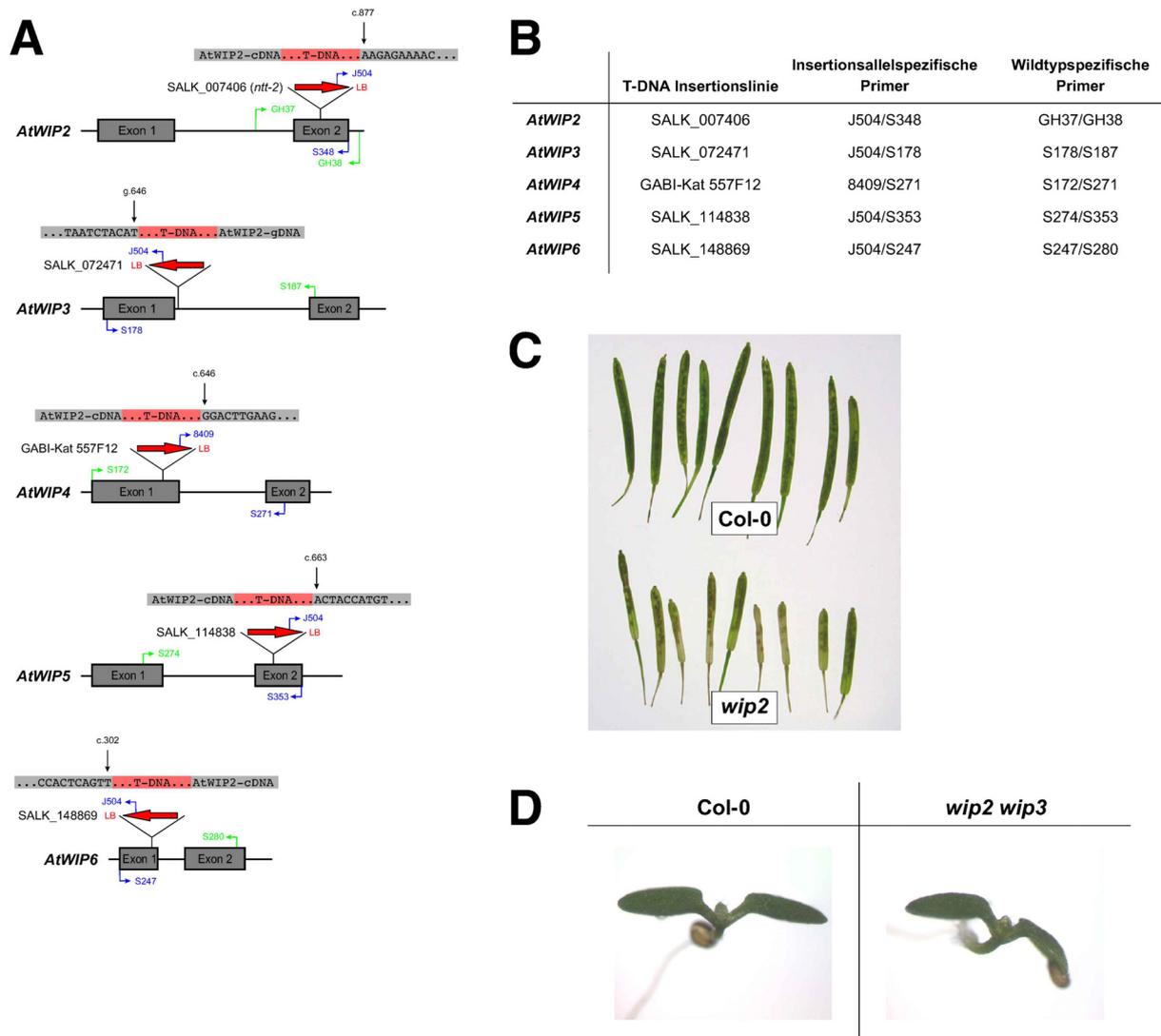


Abbildung 3-8. Knock out Linien der WIP-Gene.

(A) Insertionsorte der T-DNAs in den zur phänotypischen Analyse eingesetzten SALK- und GABI-Kat-Linien. Die T-DNA ist durch einen roten Pfeil symbolisiert, der in Richtung der *left boarder* zeigt. Die zur exakten Bestimmung der Insertionsorte verwendeten Primer sind bei der oberhalb der T-DNA und unterhalb der Gene eingetragen. Der Insertionsort ist jeweils oberhalb der T-DNA genauer spezifiziert. Die Nummerierung bezieht sich auf die jeweils letzte genspezifische Base, wobei vom Translationsstart aus gezählt wurde. Im Fall von WIP3 wurde auf der genomischen DNA, in allen übrigen Fällen auf der cDNA gezählt. (B) Zusammenfassung der verwendeten T-DNA Insertionslinien und Auflistung der Primer, die für die Genotypisierung verwendet wurden. (C) Schoten von Col-0 Wildtyppflanzen und SALK_007406 Pflanzen (*wip2*), die über Nacht in absolutem Ethanol entfärbt wurden. Beobachtungen werden im Text erläutert. (D) Keimlinge 5 Tage nach Keimung von *wip2 wip3* Doppel-knock-out Pflanzen und von Col-0 Wildtyppflanzen. Es wurde keine abweichende Entwicklung im Sprossachsenmeristem beobachtet.

Für *WIP2/NTT* wurde kürzlich ein schotenspezifischer Phänotyp publiziert (Crawford *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Phänotyp überprüft. Die Beobachtung, dass ein verringerter Samengehalt im Fall von *wip2 knock out* Pflanzen (SALK_007406) an der

Schotenbasis beobachtet werden konnte und dass die Schotenlänge generell geringer war konnte reproduziert werden (siehe Abb. 3-8 C).

Da *WIP2* und *WIP3* ein überlappendes Expressionsmuster im Sprossachsenmeristem von Keimlingen zeigen (siehe Abb. 3-6) und da beide Proteine eventuell funktionell äquivalent sind, ist es denkbar, dass ein deutlicher Phänotyp nur im Doppel-*knock-out* sichtbar wird. Aus diesem Grund wurden homozygote SALK-Linien für *WIP2* und *WIP3* gekreuzt und in der F2-Generation doppelt homozygote Individuen identifiziert. Von diesen wurden Samen geerntet und entsprechende F3-Pflanzen phänotypisch untersucht. Es wurden Keimlinge auf morphologische Unterschiede im sich entwickelnden Sprossachsenmeristem hin untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen *wip2 wip3* Doppel-*knock-out* Pflanzen und Col-0 Wildtyppflanzen detektiert werden (siehe Abb. 3-8 D). Auch wurden adulte *wip2 wip3* Pflanzen mit Col-0 Wildtyppflanzen verglichen doch auch diese wiesen keine offensichtlichen Unterschiede auf (nicht gezeigt).

3.2.4. Phänotypen von *WIP* Überexpressions-Pflanzen

Neben *knock out* Pflanzen für die *WIP*-Gene wurden Überexpressionspflanzen, die transgen für entsprechende $Pro_{35S}:WIP$ -cDNA Konstrukte waren, untersucht. Entsprechende T1-Pflanzen wurden auf kanamycinhaltigen MS-Platten auf das Transgen selektiert, wobei die Anwesenheit des Transgens zusätzlich durch Polymerasekettenreaktion bestätigt wurde. Die aus der Selektion hervorgegangenen T2-Samen wurden zur phänotypischen Analyse der Pflanzen verwendet (siehe Abb. 3-9). Für jedes *WIP*-Gen wurde nach 4-wöchiger Kultivierung unter Kurztagbedingungen ein Spektrum an Phänotypen gefunden. Es wurden jeweils unter anderem Pflanzen beobachtet, die gekräuselte Blätter aufwiesen. Dieser Phänotyp war besonders prominent im Fall einer $Pro_{35S}:WIP2$ -Linie. Die beobachteten Phänotypen ähneln dem Phänotyp von $Pro_{35S}:TT1$ -Pflanzen, die nach Kultivierung unter Kurztagbedingungen gezahnte Blätter aufweisen. Diese *TT1*-Überexpressionspflanzen waren jedoch darüber hinaus steril (Sagasser *et al.*, 2002). Die entsprechenden Überexpressionspflanzen für *WIP2* bis *WIP6* waren jedoch nicht steril und es war jeweils möglich Samen zu ernten. Bei der *WIP2*-Linie mit dem stärksten Phänotyp ließ sich dieser in der Folgegeneration problemlos reproduzieren.

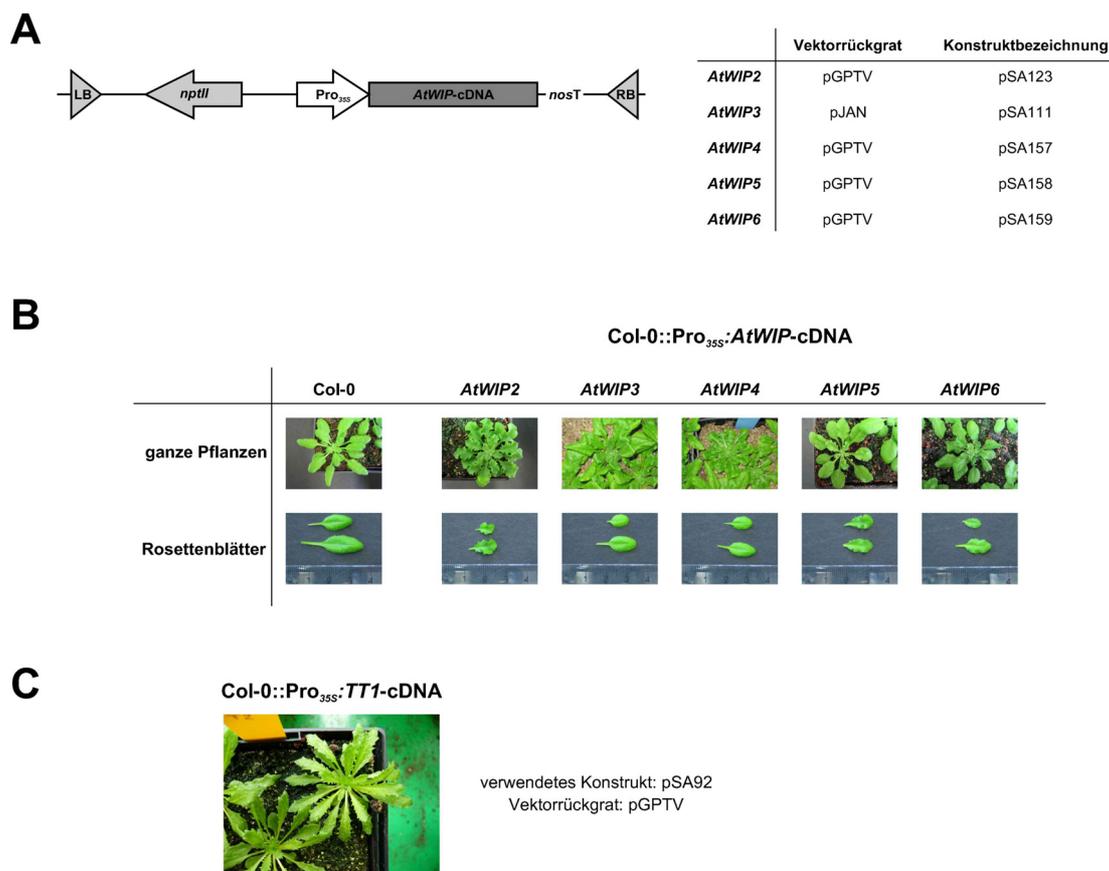


Abbildung 3-9. Überexpressionslinien der *WIP*-Gene.

(A) Aufbau der in Col-0 Pflanzen transformierten Konstrukte. Selektionsmarker ist das Kanamycinresistenz-vermittelnde *nptII*-Gen. Die Konstruktbezeichnungen für *WIP2* bis *WIP6* und die verwendeten Vektoren sind aufgelistet. (B) Phänotypische Analyse von T2-Pflanzen, die transgen für die beschriebenen Konstrukte sind. Die Pflanzen wurden 4 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert. Oben sind ganze Pflanzen dargestellt, unten Rosettenblätter. Insbesondere im Fall von *WIP2*, aber auch im geringeren Maße für die anderen *WIP*-Proteine wurden Pflanzen mit gekräuselten Blättern beobachtet. (C) Phänotyp von *TT1*-Überexpressionspflanzen, die für ca. 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Es wurde ein Phänotyp mit gezahnten Blättern beobachtet.

3.2.5. Mögliche Zielgene von *WIP* Transkriptionsfaktoren

Die bislang beschriebenen Eigenschaften der *WIP*-Gene in *A. thaliana* legen nahe, dass sie eine Rolle als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren spielen könnten. In *Yeast One-Hybrid* Experimenten wurde sowohl für Reis-Homologe der *AtWIP*-Gene als auch für die *AtWIP*-Gene selbst Interaktion mit dem Promotor von *AtKNAT1/AtBP* (At4g08150) beobachtet (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht). *AtKNAT1* gehört zur Klasse 1 der *KNOTTED1 like* Homöobox Gene (*KNOX*-Gene) in *A. thaliana*. Darüber hinaus ähneln die *AtWIP*-Überexpressionsphänotypen dem Phänotyp von *AtKNAT1*-Überexpressionspflanzen (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht). Eine Rolle der *WIP*-Gene als positive Regulatoren von *AtKNAT1* sowie der weiteren *KNOX*-Gene der Klasse 1 (*AtKNAT2*, *AtKNAT6*, *AtSTM*) sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

3.2.5.1. At7 Zellsuspensionskultur Ko-Transfektionsexperimente

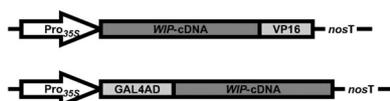
Da durch die oben erwähnten *Yeast One-Hybrid* Ergebnisse lediglich Hinweise auf die Bindefähigkeit der WIP-Proteine an den *KNAT1*-Promotor vorlagen, nicht jedoch auf eine positive Transkriptionsregulation, wurden im Rahmen dieser Arbeit die *WIP*-cDNAs translational mit DNA, die für heterologe Aktivierungsdomänen kodiert, fusioniert. Zunächst wurden C-terminale Fusionen der VP16-Domäne des *Herpes simplex* Virus generiert, die auch in Pflanzen als Aktivierungsdomäne fungiert. Zusätzlich wurde eine N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an *WIP2* erstellt. Das entsprechende GAL4AD:*WIP2*-Konstrukt ist von besonderem Interesse, da eine solches im *Yeast One-Hybrid* Experiment sich als bindefähig an ein Fragment des *KNAT1*-Promotors erwiesen hat (im Folgenden bezeichnet als „Fragment A“: -1934 bp bis -1458 bp vom Startcodon aus gezählt). Auch die GAL4-Aktivierungsdomäne weist Funktionalität im verwendeten At7-System auf, wenn auch in geringerem Maß als die VP16-Domäne.

Mit den erstellten Effektorstrukturen wurde die Bindefähigkeit der WIP-Proteine an die Promotoren der *KNOX*-Gene der Klasse 1 durch Ko-Transfektionsexperimente in der Zellsuspensionskultur At7 überprüft. Als Reporterstrukturen fungierten hierbei Konstrukte, bei denen etwa 1500 Basenpaare der Promotoren von *AtKNAT1* (At4g08150), *AtKNAT2* (At1g70510), *AtKNAT6* (At1g23380) und *AtSTM* (At1g62360) vor den ORF des GUS-kodierenden *uidA*-Gens gesetzt wurden. Weiterhin wurden Fragmente des *KNAT1*-Promotors in Verbindung mit dem -46/+8 TATA-Bereiches des 35S-Promotors des *cauliflower mosaic virus* kloniert. Die entsprechenden Fragmente entsprachen dem „Fragment A“ sowie einem Bereich von -2,1 kb bis -1,6 kb vom *KNAT1*-Startcodon aus gezählt.

Es konnte durch keines der beschriebenen Effektorstrukturen Bindefähigkeit der WIP-Proteine an die untersuchten Bereiche der *KNOX* Klasse 1 Promotoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-10). Der 1500 Basenpaar-Bereich des *KNAT1*-Promotors zeigte hierbei in dem verwendeten System eine Autoaktivität, die durch Zugabe der beschriebenen WIP-Effektoren eher verringert wurde. Bei den *KNAT1*-Promotorfragmenten wurde eine geringere Autoaktivität, aber ebenso keine Aktivierbarkeit im At7-System beobachtet. Dies galt auch für das „Fragment A“, das sich im Hefesystem als Bindestelle für *WIP2* erwiesen hatte. Auch die Promotoren der Gene *KNAT2*, *KNAT6* und *STM* zeigten keine Aktivierbarkeit durch die verwendeten Effektoren. Die beobachtete GUS-Aktivität lag auch mit Effektoren unwesentlich über der Aktivität nach Transfektion mit einem promotorlosen GUS-Konstrukt.

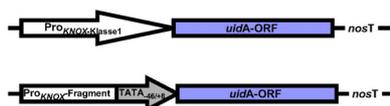
A

Effektorkonstrukte:



Konstruktbezeichnung	cDNA	Aktivierungsdomäne
pGH1	<i>ATT1</i>	VP16
pGH2	<i>AIWIP2</i>	VP16
pGH3	<i>AIWIP3</i>	VP16
pGH4	<i>AIWIP4</i>	VP16
pGH5	<i>AIWIP5</i>	VP16
pGH6	<i>AIWIP6</i>	VP16
pGH48	<i>AIWIP2</i>	GAL4AD

Reporterkonstrukte:



Konstruktbezeichnung	Promotor	Kloniertes Fragment	TATA-Box aus Vektorrückgrat
pGH13	<i>AIKNAT1</i>	1,5 kb Promotor	nein
pGH14	<i>AIKNAT2</i>	1,5 kb Promotor	nein
pGH15	<i>AIKNAT6</i>	1,5 kb Promotor	nein
pGH16	<i>AISTM</i>	1,5 kb Promotor	nein
pGH27	<i>AIKNAT1</i>	-2,1 bis -1,6 kb Bereich	ja
pGH35	<i>AIKNAT1</i>	"Fragment A"	ja

B

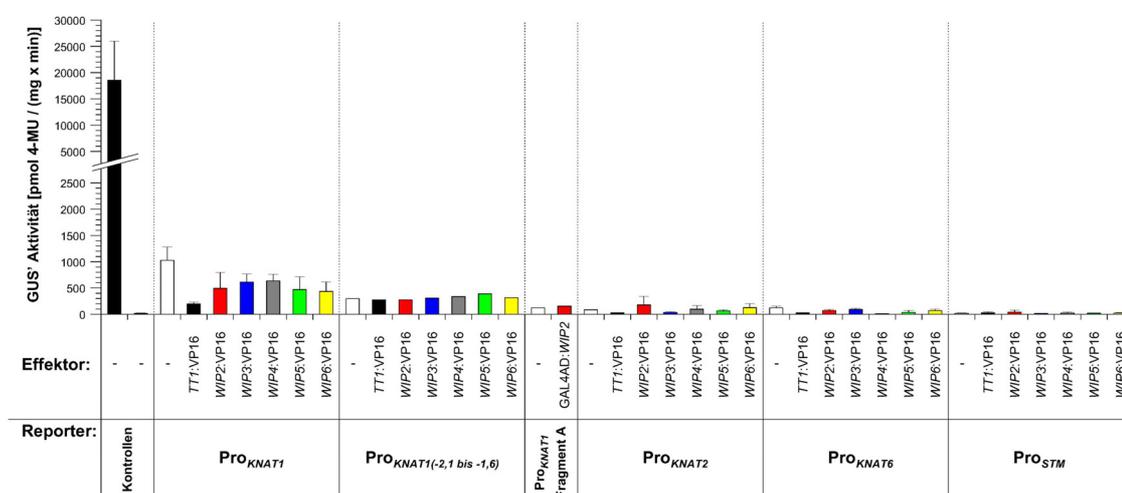


Abbildung 3-10. Interaktion der WIP-Proteine mit KNOX-Promotoren im At7-System.

(A) Die für die Ko-Transfektionsexperimente eingesetzten Konstrukte sind dargestellt. Die Effektorkonstrukte kodieren jeweils für Fusionsproteine, die sich aus einem WIP-Teil und einem Aktivierungsdomänenteil zusammensetzen. Die VP16-Aktivierungsdomäne befindet sich in den entsprechenden Proteinen jeweils C-terminal, die GAL4-Aktivierungsdomäne befindet sich N-terminal. Die Reporterkonstrukte kodieren durch ihren *uidA*-ORF jeweils für GUS. Hierbei befindet sich der *uidA*-ORF unter Kontrolle der KNOX Klasse 1 Promotoren beziehungsweise unter Kontrolle von Fusionen von Fragmenten des KNAT1-Promotors in Verbindung mit dem -46/+8 Teils der TATA-Box des 35S-Promotors aus *CaMV*. (B) Die WIP:VP16-Fusionsproteine und das GAL4AD:WIP2-Fusionsprotein wurden auf die Fähigkeit der Bindung an die KNOX Klasse 1 Promotoren oder entsprechender Fragmente durch Ko-Transfektionsexperimente in der At7-Zellsuspensionskultur überprüft. Es wurde die Aktivität des jeweiligen Promotor-GUS-Konstrukts mit und ohne WIP:VP16- bzw. GAL4AD:WIP2-Effektor überprüft. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle diente ein 35S:GUS sowie ein promotorloses GUS-Konstrukt. Die durchschnittliche relative Luziferaseaktivität lag bei $1801 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ Protein sec}^{-1}$. Die Interaktionsexperimente mit den *KNAT1*-Promotorfragmenten wurden als „Pilotexperiment“ nur einmalig durchgeführt, nachdem sich die Nicht-Aktivierbarkeit durch die WIP-Effektoren erwiesen hatte.

3.2.5.2. *WIP2* Expression im *KNAT1* und *KNAT2* knock out Hintergrund

Da in den oben beschriebenen Ko-Transfektionsexperimenten keine direkte Interaktion zwischen den WIP-Proteinen und den *KNOX* Klasse 1 Promotoren nachgewiesen werden konnte, jedoch zumindest für AtWIP2 und Pro_{KNAT1} in *Yeast One-Hybrid* Experimenten (oben beschrieben) direkte Interaktion gezeigt worden ist, wurden weitere Versuche durchgeführt, um eine Abhängigkeit der *KNAT1*-Expression von WIP2 *in planta* zu überprüfen.

Hierzu wurden Col-0::Pro_{KNAT1}:GUS- beziehungsweise C24::Pro_{KNAT2}:GUS-Pflanzen mit *wip2* knock out Pflanzen (SALK_007406, Accession Col-0) gekreuzt. Die hierfür verwendeten Promotor-GUS Pflanzen enthielten ein 5 kb Promotorfragment, das vor einen *uidA*-ORF kloniert wurde. In der F2-Generation wurde eine Population von jeweils 54 Pflanzen mittels PCR genotypisiert und diejenigen Pflanzen identifiziert, die sowohl homozygot für das *wip2* knock out Allel waren als auch zumindest ein GUS-Allel enthielten (siehe Abb. 3-11). Im Fall vom *KNAT1*-Promotor wurde eine Linie, im Fall vom *KNAT2*-Promotor wurden vier Linien gefunden, die diesen Anforderungen genügten. 5 Tage alte Keimlinge dieser Linien wurden – wie auch Keimlinge der ursprünglichen Promotor-GUS Linien im Wildtyphintergrund – einer GUS-Färbung unterworfen. Generell sind die Promotoren von *KNAT1* und *KNAT2* im Sprossachsenmeristem (SAM) aktiv. Im Fall des *KNAT1*-Promotors wurde eine verstärkte Expression im *wip2* knock out Hintergrund beobachtet. Der *KNAT2*-Promotor war allgemein schwächer aktiv als der *KNAT1*-Promotor und es wurde für ihn auch keine Abhängigkeit von der Anwesenheit des WIP2-Proteins beobachtet, da eine nahezu unveränderte Aktivität im genetischen Hintergrund des *wip2* knock outs vorlag. Es wurde für die Analyse der *KNAT1*-Expression im *wip2* knock out Hintergrund nur eine Linie der Färbung unterworfen. Nachträglich wurde eine Reihe von insgesamt 64 F2-Pflanzen genotypisiert und es konnte bei 46 Individuen das GUS-Allel nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 72 % der untersuchten Pflanzen und lässt darauf schließen, dass in der P1-Pflanze, die transgen für das Pro_{KNAT1}:GUS Konstrukt war, nur eine Kopie des Transgens vorhanden war. Positionseffekte, die aus unterschiedlichen Insertionsorten des transgenen Pro_{KNAT1}:GUS-Bereichs in den miteinander verglichen Linien hätten vorliegen können, sind für die abweichende GUS-Expression im *wip2* knock out Hintergrund daher weitestgehend auszuschließen.

Zusätzlich zu den Auswirkungen eines *wip2* knock outs wurde als Kontrolle die *KNAT1*-Expression im *tt1* knock out Hintergrund überprüft. Hierzu wurde das oben für *wip2* beschriebene Experiment analog für eine *tt1-1* x Pro_{KNAT1}:GUS Kreuzung durchgeführt. Eine Veränderung der *KNAT1*-Promotorstärke wurde hierbei nicht erwartet, da *TT1* selbst nicht im SAM exprimiert wird. Dementsprechend wurde auch kein vom Wildtyp-Hintergrund abweichendes GUS-Expressionsmuster gefunden (nicht gezeigt).

Um ein analoges Experiment für *WIP3* durchführen zu können wurde eine *wip3* x *Pro_{KNAT1}:GUS* Kreuzung durchgeführt. Im anschließenden *Screening* wurde bis zum Abschluss dieser Arbeit in der F2-Generation jedoch keine Pflanze identifiziert, die das *Pro_{KNAT1}:GUS* Transgen im gewünschten (homozygoten) *wip3 knock out* Hintergrund enthielt. Eine Antwort auf die Frage ob das ebenfalls im SAM exprimierte Gen *WIP3* die *KNAT1*-Expression beeinflusst steht daher noch aus.

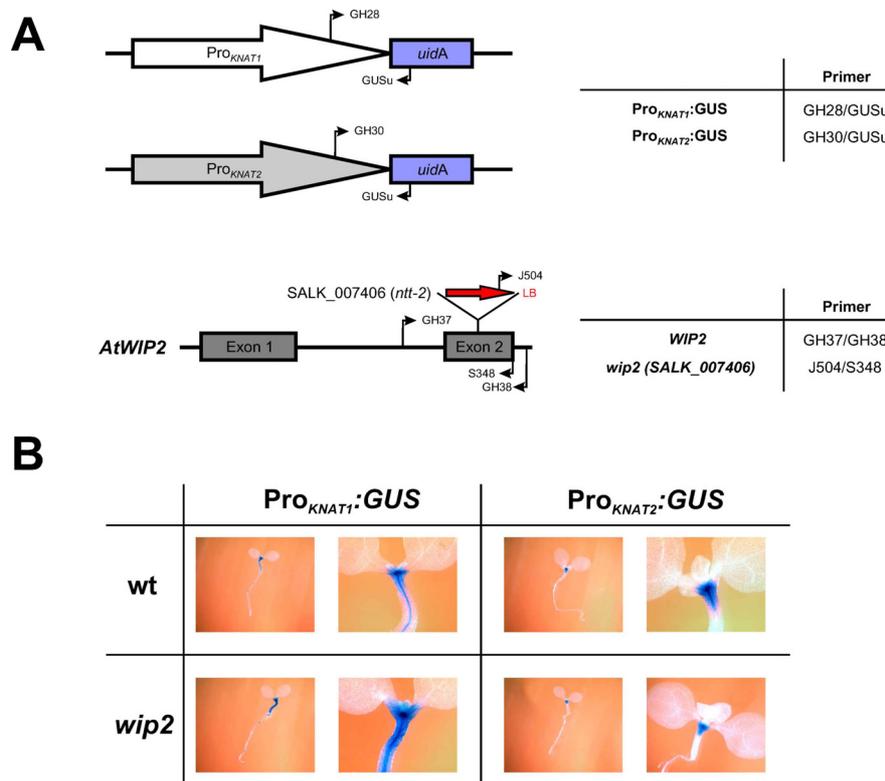


Abbildung 3-11. *KNAT1* und *KNAT2* Expression im *wip2 knock out* Hintergrund.

(A) Die Lage von zur Genotypisierung bei der Erstellung von *KNAT1* und *KNAT2* Promotor-GUS Pflanzen im *wip2 knock out* Hintergrund verwendeten Primern ist dargestellt. (B) Keimlinge von *KNAT1* Promotor-GUS und *KNAT2* Promotor-GUS Pflanzen im Wildtyphintergrund bzw. im *wip2 knock out* Hintergrund wurden 5 Tage nach Keimung einer GUS-Färbung unterworfen. Die Färbung wurde mit einer Linie im Fall von *Pro_{KNAT1}* und mit vier unabhängigen Linien im Fall von *Pro_{KNAT2}* für jeweils ca. 10 Individuen durchgeführt. Gezeigt sind nur exemplarische Bilder, die die konstrukttypische GUS-Expression im jeweiligen genetischen Hintergrund widerspiegeln.

3.3. Analyse ausgewählter MYB-Faktoren

Die gewebsspezifische Regulation des Flavonoid-Metabolismus wird in *A. thaliana* durch ein Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zwei Klassen von Proteinen, die bei der Genregulation in Pflanzen im Allgemeinen eine große Rolle spielen, sind die MYB- und die bHLH-Transkriptionsfaktoren. Wie bereits erläutert ist das Zusammenspiel zwischen einigen R2R3-MYB-Proteinen mit bHLH-Proteinen oder das Wirken anderer R2R3-MYB-Proteine alleine entscheidend für die Transkription bestimmter Gene. Eine von den R2R3-MYB-Genen zu unterscheidende Klasse sind die so genannten *single repeat MYB*-Gene (Stracke *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Untergruppe der R2R3-MYB-Genen hinsichtlich ihrer Aktivierungseigenschaften auf ausgewählte Zielgene untersucht. Weiterhin wurden die negativ-regulatorischen Eigenschaften eines *single repeat MYB*-Gens, das bislang lediglich als blattspezifisch exprimiert beschrieben wurde, auf einen für die Flavonoid-Biosynthese wichtigen Transkriptionsfaktorkomplex untersucht.

3.3.1. Zielgene der PFG-R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren

Es wurden drei ausgewählte potenzielle Zielgene der Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Proteine, die auf der Grundlagen von ATH1-Genchip-Analysen ausgewählt wurden, experimentell bestätigt. Die Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Proteine wird durch die PFG-Gene (*PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES*) MYB11, MYB12 und MYB111 kodiert.

Bei einem der potenziellen Zielgene handelt es sich um ein Gen, das für ein Membranverankertes Protein kodiert (At5g62210), das dem Embryo-spezifischen Protein ATS3 (At5g07190) verwandt ist. Bei den beiden anderen (At2g22590 und At4g15480) handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, die in die Klasse der Glykosyltransferasen eingruppiert werden. Das von At2g22590 kodierte Protein (UGT91A1) weist Ähnlichkeiten zu einem UDP-Glukuronosyl / UDP-Glukosyltransferase Protein (At5g65550) auf. At4g15480 kodiert für ein Protein (UGT84A1), das Sinapat:UDP-Glukose Glukosyltransferaseaktivität aufweisen könnte.

Die Aktivierbarkeit der Promotoren der oben genannten Gene durch MYB11 (At3g62610), MYB12 (At2g47460) und MYB111 (At5g49330) wurde durch Ko-Transfektionsexperimente in der Zellsuspensionskultur At7 untersucht (siehe Abb. 3-12). Die GUS' Aktivität, resultierend aus der Transfektion mit Promotor-GUS Konstrukten von At5g62210, At2g22590 und At4g15480, wurde in An- und Abwesenheit der MYBs der Untergruppe 7 untersucht. Hierbei mussten bei der Klasse der PFG-MYB-Proteine keine zusätzlichen Effektorstrukturen zugesetzt werden, da die PFG-MYB-Proteine – im Gegensatz zu beispielsweise MYB123

oder MYB75 – keinen zusätzlichen bHLH- und WD40-Faktor zur Ausübung ihrer Funktion als positive Regulatoren benötigen. Als Kontrollen wurden in diesen Experimenten darüber hinaus Promotor-GUS Konstrukte der Flavonoidbiosynthese-Strukturgene *DFR* und *CHS* untersucht. Für diese beiden Promotoren war bereits bekannt, ob eine Aktivierung durch MYB12 erfolgen kann (Mehrtens *et al.*, 2005). Der *CHS*-Promotor wird im Gegensatz zum *DFR*-Promotor durch MYB12 aktiviert. Das Verhalten der Promotoren hinsichtlich Ansprache auf Effektoren von MYB11 und MYB111 wurde aber erstmalig im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Ko-Transfektionsexperimente ermittelt.

Alle untersuchten Promotoren mit Ausnahme von At2g22590 waren ohne Zugabe der MYB-Effektoren nicht aktiv und zeigten eine GUS' Aktivität, die lediglich im Bereich der üblichen Hintergrundsignale in der Analyse der Ko-Transfektionsexperimente lag. Der Promotor At2g22590 zeigte eine geringe Autoaktivität im verwendeten At7-System.

Der *DFR*-Promotor war der einzige der untersuchten Promotoren, der nicht auf die Zugabe der MYB-Effektoren ansprach. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da wie oben erwähnt eine Nicht-Aktivierbarkeit durch MYB12 bereits bekannt war. Der Promotor, der am stärksten auf die Anwesenheit der MYB-Effektoren reagierte, war der *CHS*-Promotor. Die Promotoren der drei untersuchten potenziellen Zielgene reagierten von At5g62210 über At2g22590 zu At4g15480 zunehmend stärker auf die Anwesenheit der MYB-Effektoren.

Der Effekt, der durch MYB12 ausgelöst wurde, war hierbei jeweils am stärksten. Der zweitgrößte Effekt wurde im Allgemeinen durch die Zugabe von MYB111 erzielt. Auf MYB11 reagierten die Zielpromotoren in der Regel durch die schwächste Antwort. Die ausgelöste GUS' Aktivität lag aber auch hier jeweils signifikant über dem Wert der Kontrollen ohne die Zugabe von MYB-Effektor.

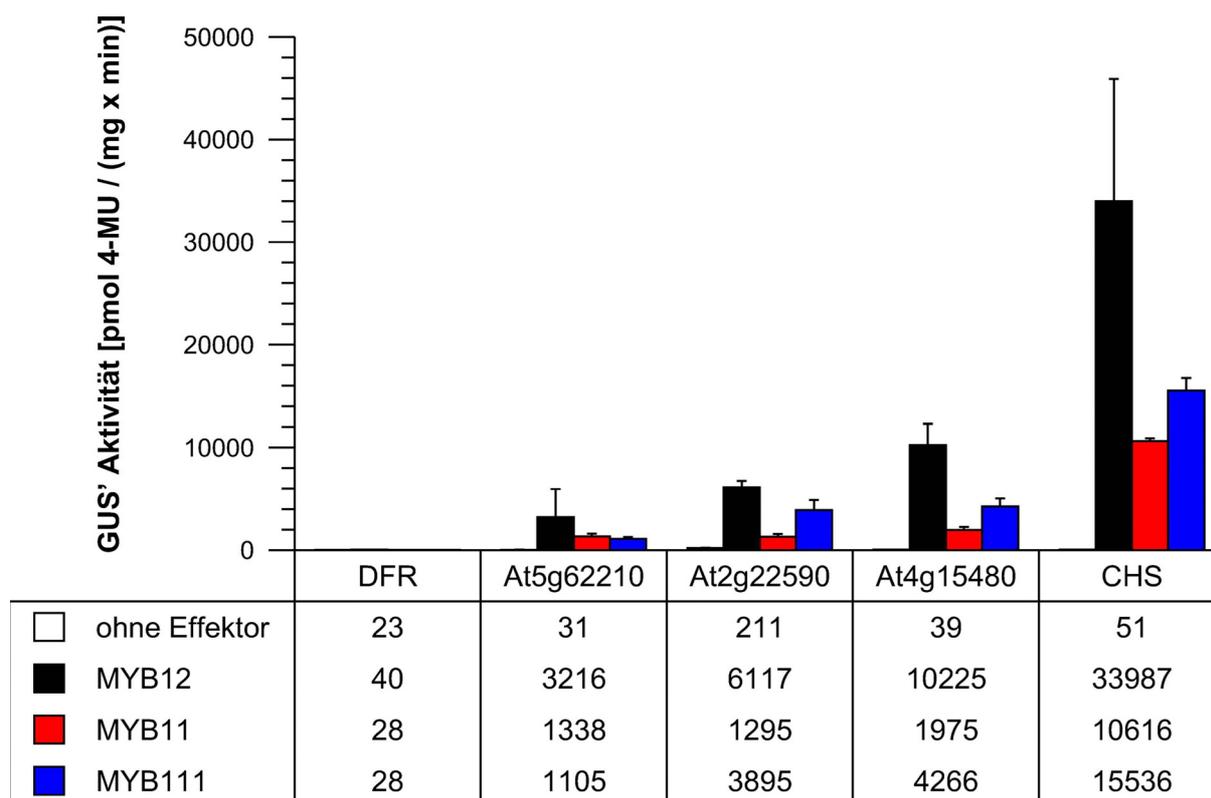


Abbildung 3-12. Aktivierung potenzieller Zielgenpromotoren durch PFG-MYB-Proteine. Ko-Transfektionsanalyse des Aktivierungspotenzials der PFG-MYB-Proteine (MYB11, MYB12, MYB111) in At7-Protoplasten. Promotor-Fragmente von *At5g62210*, *At2g22590*, *At4g15480* und *DFR* und *CHS* (als Kontrollen) wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch MYB11, MYB12 und MYB111 als Effektoren überprüft. Die mittlere Luziferaseaktivität betrug 2942 RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$.

3.3.2. Negative Regulation durch das kleine MYB-Gen MYBL2

Die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) ist ein Enzym, das im Flavonoid-Metabolismus von *A. thaliana* die Umsetzung von Dihydroquercetin in Leucocyanidin katalysiert. Die Expression des *DFR*-Gens wird unter anderem kontrolliert durch das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren TT2/TT8/TTG1 (MYB123/BHLH42/TTG1) (Nesi *et al.*, 2000) und ebenso durch den Transkriptionsfaktorkomplex PAP1/EGL3/TTG1 (MYB75/BHLH2/TTG1). Diese beiden Transkriptionsfaktorkomplexe bewirken eine positive Regulation des *DFR*-Promotors. Die meisten der bislang bekannten Transkriptionsfaktoren, die einen Einfluss auf die Biosynthese von Flavonoiden haben, wirken als positive Regulatoren. Viele dieser Regulatoren fallen in die Klasse der R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des *single repeat MYB*-Gens *MYBL2* (At1g71030), das nicht zu der Klasse der *R2R3-MYB*-Gene gehört, auf die Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors durch die oben genannten Transkriptionsfaktorkomplexe überprüft. Hierzu wurden wiederum Ko-Transfektionsexperimente in der Zellsuspensionskultur At7 durchgeführt (siehe Abb. 3-13). Ein Reporterkonstrukt, das den *DFR*-Promotor fusioniert an

einen *uidA*-ORF enthielt wurde in An- und Abwesenheit entsprechender Effektorkombinationen auf GUS-Aktivität untersucht. Als Aktivatoren dienten hierbei die Kombination TT2 und TT8 beziehungsweise PAP1 und EGL3. Das für die Funktion der Transkriptionsfaktorkomplexe essenzielle TTG1 wird in der verwendeten At7-Kultur konstitutiv exprimiert (Heim und Weisshaar, unveröffentlicht). Beide Aktivator Komplexe wurden in An- und Abwesenheit von MYBL2 analysiert. Die Ausgangshypothese war, dass MYBL2 eine negative Regulation auf die Aktivierung des *DFR*-Promotors durch die Aktivator Komplexe TT2/TT8/TTG1 beziehungsweise PAP1/EGL3/TTG1 ausüben könnte. Für beide der untersuchten Aktivator Komplexe wurde eine signifikante Reduktion des Aktivierungspotenzials für den *DFR*-Promotor in Anwesenheit von MYBL2 beobachtet. Der *DFR*-Promotor war praktisch inaktiv, wenn kein Effektor zugesetzt wurde. Durch die Aktivator Kombination PAP1/EGL3/TTG1 wurde eine etwa 14-mal stärkere Aktivierung als durch die Kombination TT2/TT8/TTG1 erzielt, was in den ermittelten GUS' Werten zum Ausdruck kommt. Es wurde in Anwesenheit von MYBL2 bei der Aktivator Kombination PAP1/EGL3/TTG1 eine Reduktion auf 40 % der GUS' Aktivität, die in Abwesenheit von MYBL2 vorlag, gemessen. Analog wurde im Fall von TT2/TT8/TTG1 in Anwesenheit von MYBL2 eine Reduktion auf etwa 65 % beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der angenommene negativ-regulatorische Effekt, den MYBL2 auf die Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors ausübt, tatsächlich vorliegt.

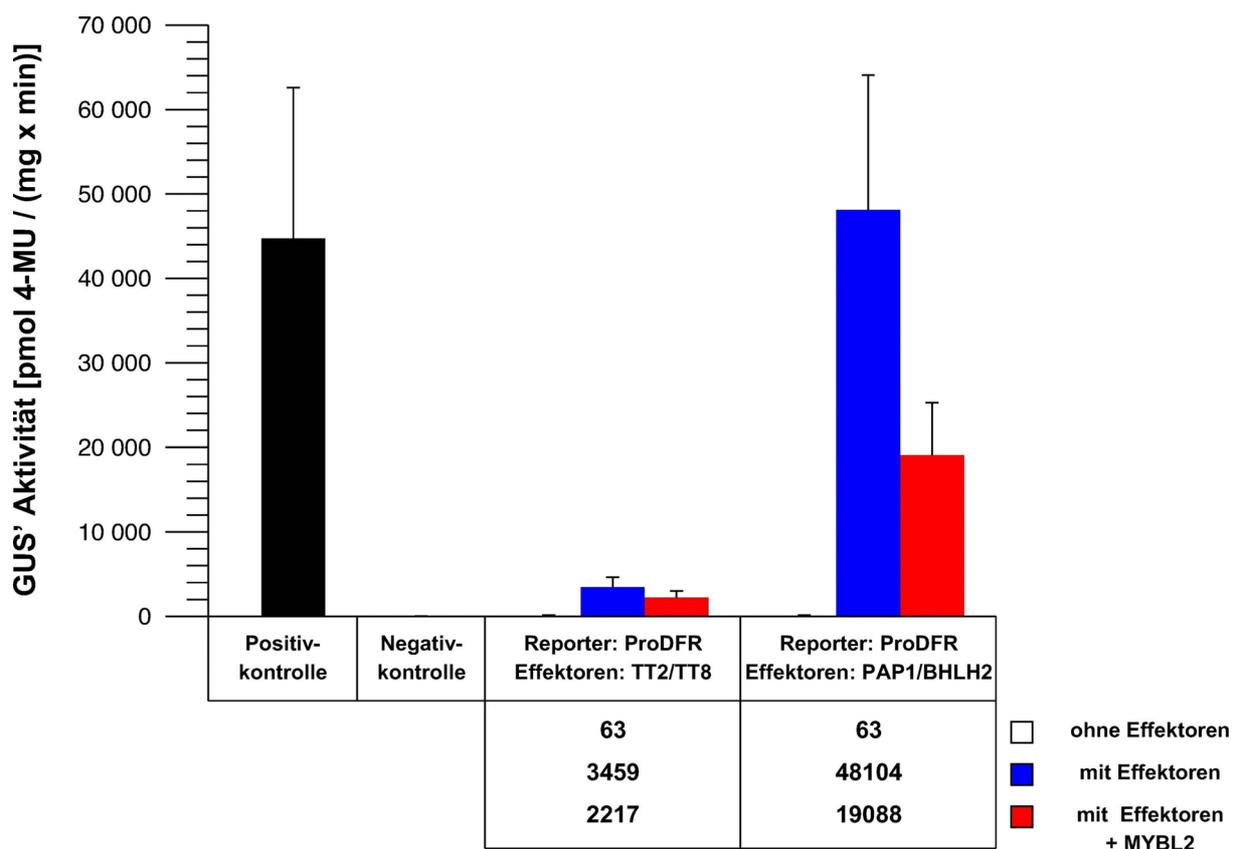


Abbildung 3-13. Negative Regulation der *DFR*-Promotor Aktivierbarkeit durch *MYBL2*. Ko-Transfektionsanalyse zur Beeinflussung der Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors durch das kleine *MYB*-Gen *MYBL2* (At1g71030) in At7-Protoplasten. Der *DFR*-Promotor wurde auf seine Aktivierbarkeit durch die MYB/bHLH-Kombinationen TT2/TT8 und PAP1/BHLH2 in An- und Abwesenheit von *MYBL2* untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Konstrukt, das den *uidA*-ORF unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus *CaMV* enthielt, als Negativkontrolle ein promotorloses GUS-Konstrukt. Die mittlere Luziferaseaktivität betrug $1105 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung des *knock out* Phänotyps für *tt1*

In allen bisherigen Studien war es bislang nicht möglich den *knock out* Phänotyp von *tt1* auf sicherer Basis zu diskutieren, da für die bislang verfügbaren Linien eine Restfunktionalität des TT1-Proteins nicht ausgeschlossen werden konnte.

In den T-DNA Insertionslinien *tt1-3* und *tt1-4* lag die Insertion jeweils im Exon vor, was ein korrektes Spleißen des Primärtranskripts in den meisten Fällen verhindert – es konnte jedoch mittels *nested* PCR ein geringer Anteil korrekt gespleißter mRNA nachgewiesen werden. Ein ähnliches Argument gilt für den Fall der EMS-Mutante *tt1-1*. Fehlspleißen durch die Verwendung einer alternativen Spleißstelle führt in diesem genetischen Hintergrund in den meisten Fällen zu einer Leserasterverschiebung und zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Codons. Allerdings konnte – wiederum mittels *nested* PCR – auch im Fall von *tt1-1* ein mRNA-Transkript der üblichen Größe nachgewiesen werden. Dieses (variante) Transkript führt nach Translation zu einem Protein in dem lediglich zwei Aminosäuren ausgetauscht sind. Diese Aminosäuren liegen im ersten Zinkfinger, der vom C2H2-Typ ist und somit in einem funktionell potenziell wichtigen Bereich des Proteins. Es ist dabei einer der Zinkkoordinierenden Histidin-Reste gegen Isoleucin ausgetauscht. Eine Restaktivität des Proteins ist aber nicht auszuschließen und tatsächlich sogar experimentell nachgewiesen worden (siehe unten).

Die existierende Transposon-Insertionslinie *tt1-2* führt zwar zu einem Kompletterlust der Proteinfunktion, da die Insertion im ersten Exon von *TT1* liegt und daher in der Mutante nur ein TT1-Polypeptidanteil von 39 Aminosäuren korrekt gebildet werden kann, das Transposon ist durch seine Transposaseaktivität aber in der Lage sich selbstständig aus dem *TT1*-Gen zu entfernen. Da die Entfernung des Transposons in den meisten Fällen so verläuft, dass die ursprüngliche *TT1*-Sequenz wiederhergestellt wird, ist die Folge, dass in entsprechenden Mutanten immer Gewebe aus Zellen entstehen, in denen das Transposon akkurat aus dem *TT1*-Lokus entfernt wurde und in denen die normale TT1-Funktion ausgeübt werden kann.

4.1.1. Der *tt1 knock out* Phänotyp beinhaltet punktuelle PA-Akkumulation in der Samenschale

In den bislang verfügbaren *tt1* Linien konnte durch Vanillin-Färbung eine punktuelle Akkumulation von Proanthocyanidinen im Endothel der Samen gezeigt werden. Darüber hinaus waren zwei spezifische Bereiche an der Samenbasis – die Mikropyle und die Chalaza – komplett durch Vanillin anfärbbar. Das in *tt1*-Mutanten beobachtete Muster der PA-Akkumulation im Endothel wurde in ähnlicher Form bereits für andere *transparent testa* Mutanten beschrieben – beispielsweise für *tt12* (Debeaujon *et al.*, 2001). Des Weiteren wird eine PA-Akkumulation in Mikropyle und Chalaza in weiteren *transparent testa* Mutanten, beispielsweise in *tt9*, *tt15*, *tt16* und in *ban* beobachtet (Lepiniec *et al.*, 2006). Dennoch kann aus den oben erläuterten Gründen im Fall von *tt1* nicht zweifelsfrei geschlossen werden, dass diese Beobachtungen auf einen kompletten *knock out* des Gens zurückzuführen sind. Jedoch zeigt die phänotypische Analyse der im Rahmen dieser Arbeit generierten *tt1-5f footprint* Linie, deren Herstellung das Transposonallel aus *tt1-2* zugrunde liegt und in der ein trunkiertes Protein gebildet wird, das nach 39 Aminosäuren abbricht, dass sowohl die punktuelle PA-Akkumulation als auch die PA-Akkumulation in Mikropyle und Chalaza Teile des *knock out* Phänotyps sind.

4.1.2. T-DNA-Insertions- und EMS-Linien von *tt1* zeigen den *knock out* Phänotyp

Aus den oben genannten Gründen erscheint es zulässig, die bereits zuvor verfügbaren *tt1*-Linien (die T-DNA-Insertionslinien und die *tt1-1* EMS Linie) aus praktischen Gründen als komplette *knock outs* zu betrachten. Die korrekt gespleißten Transkripte in diesen Linien ließen sich nur mittels *nested* PCR bei hohen Zyklenzahlen nachweisen (siehe Abb. 3-2). Aus diesem Grund ist die Annahme valide, dass in diesen Mutanten zu wenig oder unfunktionelles *TT1*-Transkript vorliegt, um einen vom kompletten *knock out* zu unterscheidenden Phänotyp zu bedingen. Die *tt1-5f footprint* Linie beinhaltet neben der stabilen Mutation im *TT1*-Gen eine Reihe von Transposoninsertionen an verschiedenen Loci im Genom, die wie auch die Insertion in *tt1-2* im *TT1*-Gen instabil sind.

Um eine saubere *knock out* Linie zu generieren, in der mit keinen Nebeneffekten gerechnet werden muss, die durch die weiteren Transposoninsertionen bedingt werden, müsste die *footprint* Linie gegen den Wildtyp mehrfach zurückgekreuzt werden und jeweils in den Filialgenerationen die Anzahl der Transposoninsertionen abgeschätzt werden. Diese Abschätzung wäre am leichtesten durch *Southern Blots*, mit einer transposonspezifischen

Sonde zu bewerkstelligen. Da eine solche Verfahrensweise sehr zeitaufwendig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet. Die *tt1-5f footprint* Linie lässt sich aber daher momentan nur zur Verifizierung des *knock out* Phänotyps in den bislang bekannten *tt1*-Linien heranziehen, weil Nebeneffekte durch die zusätzlichen Transposoninsertionen nicht ausgeschlossen werden können. Da durch die Verwendung der *footprint* Linie in den T-DNA-Insertionslinien und in der EMS-Linie *tt1-1* der *knock out* Phänotyp verifiziert wurde, ist es momentan am praktikabelsten, diese zu verwenden, wenn ein Experiment die Verwendung einer *tt1 knock out* Linie verlangt. Hierbei bietet sich das *tt1-3* Allel an, wenn ein genetischer Hintergrund von Columbia erforderlich ist. Wenn der genetische Hintergrund Landsberg *erecta* benötigt wird, sollte die *tt1-1* Linie verwendet werden.

4.1.3. Das variante Transkript trägt nicht zur Genfunktion des *tt1-1* Allels bei

In Samen von *tt1-1* Pflanzen wurde das Auftreten von variantem Transkript gezeigt, bei dem nicht die alternative Spleißerkennungsstelle genutzt wird. Das variante Transkript kodiert vielmehr für eine TT1-Variante, in der zwei Aminosäuren im ersten Zinkfinger in der WIP-Domäne ausgetauscht sind (siehe Abb. 3-2). Obwohl diese TT1_{vt} Variante nur in geringem Ausmaß gebildet wird – der Nachweis des Transkripts gelang nur über *nested* PCR – wäre bei voller Funktionalität des Proteins eine signifikante Beteiligung an Prozessen im Samen von *tt1-1* Pflanzen denkbar.

Aus diesem Grund sind Komplementationsversuche durchgeführt worden, in denen ermittelt werden sollte, ob die TT1_{vt}-Variante befähigt ist, den *tt1-1* Phänotyp rückgängig zu machen (Appelhagen, 2007). Es wurden *tt1-1::Pro_{TT1}:TT1_{vt}* Pflanzen auf den Samenschalenphänotyp hin untersucht und mit *tt1-1* und *Ler* Pflanzen verglichen. Das Pigmentierungsmuster nach Vanillin-Färbung und die Farbe der reifen Samen zeigten hierbei, dass das aus dem varianten Transkript resultierende Protein zu keiner vollständigen Komplementation des *tt1-1* Samenschalenphänotyps fähig ist. Bei den Samen der Pflanzen, in denen die TT1_{vt}-Variante vorlag, ließ sich ein Spektrum hinsichtlich der Farbe und der Anfärbbarkeit im Vanillin-Test beobachten. Es wurde jedoch nie die kräftig braune Farbe der Wildtypsamensamen und nur ein geringer Anteil an PA-Vorläufern beobachtet. Dies zeigt einerseits, dass im Fall von TT1_{vt} nur von einer partiellen Funktionalität ausgegangen werden kann und andererseits, dass der erste Zinkfinger in der WIP-Domäne, in dem bei TT1_{vt} einer der potenziell Zink-koordinierenden Histidin-Reste gegen Isoleucin ausgetauscht ist, von Bedeutung für die TT1-Funktion zu sein scheint. Da das vom varianten Transkript kodierte Protein – selbst wenn es ausschließlich gebildet wird und das in Mengen, die dem normalen Transkript in Wildtyppflanzen entspricht – nur eine phänotypische Auswirkung in geringem Ausmaß zeigt, kann davon ausgegangen

werden, dass es bei seinem natürlich in *tt1-1* Pflanzen auftretenden geringen Expressionslevel nicht zur Funktion der durch die vom *tt1-1* Allel kodierten Proteine beiträgt.

4.2. Einordnung der molekularen Funktion von TT1

4.2.1. TT1 scheint nicht als transkriptioneller Aktivator zu fungieren

Da es sich bei TT1 um ein C₂H₂-Zinkfingerprotein handelt und da Mitglieder dieser Proteinklasse in der überwiegenden Zahl der Fälle ihre Funktion durch DNA-Bindung ausüben (Frankel *et al.*, 1987), wurde zunächst angenommen, dass es sich bei TT1 ebenfalls um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor handelt (Sagasser *et al.*, 2002). Da darüber hinaus im *knock out* die Flavonoid-Biosynthese in der Samenschale gestört ist, was in einem drastisch reduzierten Proanthocyanidingehalt im Endothel zum Ausdruck kommt, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei TT1 um einen transkriptionellen Aktivator handelt, der Einfluss auf die Expression von Strukturgenen im Flavonoidmetabolismus oder deren Regulatoren nimmt. Tatsächlich ist die Expression einiger dieser Strukturgene – beispielsweise in den Fällen *TT12*, *LDOX*, *BAN*, *DFR* und *CHS* – gestört (Lu *et al.*, unveröffentlicht). Von diesen Genen ist bereits bekannt, dass sie von einer Anzahl bekannter Transkriptionsfaktoren reguliert werden, die meistens in den Klassen der MYB-, bHLH-, oder WD40-Faktoren angehören. So wird beispielsweise die *CHS*-Expression in Keimlingen unter anderem von den PFG-MYB-Transkriptionsfaktoren reguliert (Stracke *et al.*, 2007), wohingegen eine Kombination von TT2/TT8/TTG1 Einfluss auf die Expression von *DFR* und *BAN* im Arabidopsis-Samen nimmt (Nesi *et al.*, 2000). Eine zusätzliche Regulation eines oder mehrerer dieser Gene durch TT1 war aufgrund der geänderten Expression in der *tt1-1* Mutante zumindest denkbar.

4.2.1.1. Ko-Transfektionsexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Ko-Transfektionsexperimente weitestgehend ausgeschlossen werden, dass TT1 als transkriptioneller Aktivator für die Gene *CHS*, *TT12*, *BAN*, *LDOX* und *TT16* fungiert (siehe Abb. 3-1). In diesen Experimenten wurde durch die Verwendung von TT1:VP16-Fusionsproteinen prinzipiell eine Bindung von TT1 an 1,5 kb Promotorfragmente der genannten Gene überprüft. Mögliche Fehlerquellen in der verwendeten experimentellen Anordnung liegen allerdings darin, dass die dreidimensionale Proteinstruktur von TT1 möglicherweise durch die Fusion an die VP16-Domäne gestört gewesen sein könnte, oder darin dass die verwendeten Promotorkonstrukte einen zu kleinen Bereich abgedeckt haben könnten. Außerdem ist denkbar, dass in der für diese Experimente

verwendeten ursprünglich aus Hypokotylzellen hervorgegangene At7-Zellsuspensionskultur notwendige zusätzliche Transkriptionsfaktoren, die *in vivo* im Samenschalenendothel unter Umständen vorhanden sind, nicht exprimiert werden. Die Ergebnisse der Ko-Transfektionsexperimente sprechen dafür, dass weder Aktivierung der getesteten Promotoren noch Bindung von TT1 an diese stattfindet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass TT1 *in vivo* eine Funktion als transkriptioneller Repressor ausüben könnte und dadurch möglicherweise die aktivierenden Eigenschaften der VP16-Domäne in den Ko-Transfektionsexperimenten aufheben könnte. Diese Möglichkeit lässt sich in dem experimentellen Aufbau nicht ausschließen. (Eine potenzielle TT1-Funktion als transkriptioneller Repressor wird weiter unten diskutiert.)

4.2.1.2. TT1:EAR-Fusionsproteine

Über die oben beschriebenen Experimente hinaus bestehen noch weitere Hinweise, die dafür sprechen, dass es sich bei TT1 nicht um einen transkriptionellen Aktivator handelt. Ein System, das die Möglichkeit bietet, die Funktion von Transkriptionsfaktoren aufzuklären, ist die „*chimeric repressor silencing-Technologie*“ – CRES-T (Hiratsu *et al.*, 2003). Hierbei fungiert das EAR-Motiv (*ERF-associated amphiphilic repression motif*) als dominant wirkende Repressionsdomäne, die in entsprechenden Fusionsproteinen DNA-bindende Proteine zu transkriptionellen Repressoren macht. Das EAR-Motiv ist hierbei ein aus AtSUPERMAN entnommenes Peptid, aus dem die stärker reprimierende 12 Aminosäure umfassende SRDX-Domäne abgeleitet wurde (Hiratsu *et al.*, 2002; Hiratsu *et al.*, 2003; Hiratsu *et al.*, 2004). Für entsprechende PAP1:SRDX Fusionsproteine wurde bereits gezeigt, dass damit ein Einfluss auf den Proanthocyanidin-Metabolismus in *A. thaliana* genommen werden kann (Matsui *et al.*, 2004).

CRES-T wurde in einer Diplomarbeit angewendet, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde (Appelhagen, 2007), um eine Rolle von TT1 als transkriptioneller Aktivator zu überprüfen. Die dominant wirkende SRDX-Domäne sollte in der Lage sein, ein entsprechendes TT1:SRDX-Fusionsprotein mit reprimierenden Eigenschaften auszustatten. Unter der Annahme, dass TT1 DNA bindet, kann daher davon ausgegangen werden, dass man auf diese Weise transkriptionelle Repressoren erzeugen kann, die die TT1-Zielgenpromotoren ausschalten können. Derartige TT1:SRDX-Fusionskonstrukte wurden eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie in der Lage sind den *tt1 knock out* Phänotyp im Wildtypintergrund hervorzurufen. (Appelhagen, 2007). Entsprechende hemizygote Col-0::Pro_{TT1}:TT1:SRDX Pflanzen zeigten aber einen braunsamigen Phänotyp. Aus den oben erläuterten Gründen wäre aber bei einer Funktion von TT1 als transkriptioneller Aktivator die Erwartung gewesen, dass entsprechende transgene Pflanzen gelbe Samen

produzieren. Da die SRDX-Domäne dominant wirkt, hätte das im Transgen kodierte Protein die Aktivität des endogenen überdecken sollen. Um Dosiseffekte auszuschließen, sind neben den T2-Samen – deren Schale aus hemizygotem T1-Gewebe hervorgegangen ist – auch T3-Samen untersucht worden, die das Transgen zum Teil homozygot enthalten sollten. Auch unter den T3-Samen ist keine Abweichung des Phänotyps von Wildtypsamen beobachtet worden.

TT1 selbst enthält eine Domäne, die eine EAR-ähnliche Sequenz enthält (siehe Abb. 4-1). Für diesen Bereich ist tatsächlich auch bereits eine Funktion als Repressionsdomäne diskutiert worden (Debeaujon *et al.*, 2003). Diese putative Repressionsdomäne in TT1 (ELD = *EAR like domain*) ist funktionell untersucht worden, indem sie entweder deletiert oder indem der in ihr enthaltene Aspartatrest durch Alanin ersetzt wurde und das resultierende Protein zur Komplementation des *tt1 knock out* Phänotyps eingesetzt wurde (Appelhagen, 2007). Für den ausgetauschten Aspartatrest wurde in der EAR-Domäne im NtERF3-Protein zuvor bereits gezeigt, dass er essenziell für die Funktionalität der Repressionsdomäne ist (Ohta *et al.*, 2001). Die entsprechend mutierten TT1-Proteine und TT1-Proteine, in denen der ELD-Bereich komplett deletiert war, waren jedoch fähig den *tt1 knock out* Phänotyp zu komplementieren. Eine essenzielle Funktion der putativen Repressionsdomäne in TT1 wurde somit ausgeschlossen.

NtERF3	RGIDL LDLNL APPMEF
AtERF3	PPFQ FDLNE PP L DCV
AtERF4	QLLD LDLNL PP P SEQ
AtZAT1	IISLI DLNL -PAPSE
AtTT1	LNSNL LDLNL PN P LYAE
AtSUP	SEQD LDLEL RLGFA-
SRDX	--LD LDLEL RLGFA-

Abbildung 4-1. Vergleich der EAR-Domänen aus verschiedenen Proteinen.

Die Konsensus-Sequenz aus EAR-Domänen aus verschiedenen Proteinen ist rot unterlegt dargestellt. Einzelne Aminosäuren innerhalb der Konsensus-Sequenz, die sich von dieser unterscheiden sind grau unterlegt. Für jedes der aufgeführten Beispiele mit Ausnahme von TT1 sind reprimierende Eigenschaften experimentell belegt. Des Weiteren sind die EAR-Domäne aus AtSUPERMAN, die als Grundlage für die Entwicklung von CRES-T diente, sowie die künstliche, stärker reprimierend aktive SRDX-Domäne dargestellt. Die SRDX-Domäne unterscheidet sich von der AtSUP-Sequenz lediglich in dem zusätzlichen Vorhandensein eines Leucin und eines Aspartatrestes.

Abgeleitet aus den mit den oben erläuterten Deletionen und Mutationen innerhalb des ELD-Bereiches versehenen TT1-Konstrukten wurden Konstrukte, die für SRDX-Fusionsproteine kodieren, daraufhin getestet, ob sie zur Komplementation des *tt1 knock out* Phänotyps geeignet sind. Entsprechende *tt1-1::Pro_{TT1}:TT1_{delELD}:SRDX* beziehungsweise *tt1-1::Pro_{TT1}:TT1_{subELD}:SRDX* M2-Pflanzen zeigten üblicherweise einen braunsamigen Phänotyp in den von ihnen produzierten M3-Samen. *delELD* bezeichnet hierbei die deletierte ELD-Domäne, *subELD* bezeichnet die ELD Domäne, in der der Aminosäureaustausch von Aspartat zu Alanin vorlag. Zusätzlich zu den oben erläuterten Phänotypen der mit den SRDX-Fusionskonstrukten transformierten Samen im Wildtypintergrund liefert die Komplementation der *tt1-1* Samen mit den Fusionskonstrukten einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei TT1 nicht um einen transkriptionellen Aktivator handelt.

4.2.2. TT1 könnte als transkriptioneller Repressor fungieren

Auch wenn die in TT1 vorhandene EAR-Motiv-ähnliche Domäne (ELD) nicht von funktioneller Bedeutung ist, besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass TT1 als transkriptioneller Repressor fungiert. Für einige Mitglieder der Familie der Pflanzen-Zinkfingerproteine ist eine Funktion als aktive transkriptionelle Repressoren bekannt (Sakamoto *et al.*, 2004). Tatsächlich ist eine Rolle von TT1 als Repressor im Zusammenhang mit der Expression des für die PA-Biosynthese benötigten *BANYULS* (*BAN*) Gens in der Literatur bereits diskutiert worden (Debeaujon *et al.*, 2003). Ob in diesem Zusammenhang zutreffend oder nicht – im Fall von TT1 erscheint eine solche Rolle aus verschiedenen Gründen plausibel.

Ektopische TT1-Überexpression, wie sie beispielsweise in *Col-0::Pro_{35S}:TT1* Pflanzen auftritt, bewirkt üblicherweise die Ausbildung von gezahnten Rosettenblättern und schmalen verlängerten Kotyledonen (Sagasser *et al.*, 2002). TT1:VP16-Fusionsproteine wurden wie zuvor bereits erläutert zur Überprüfung potenzieller Zielgenpromotoren in Ko-Transfektionsexperimenten eingesetzt, da zunächst eine generelle Bindefähigkeit von TT1 an diese Promotoren überprüft werden sollte. Entsprechende Fusionskonstrukte wurden auch zur Generierung transgener Pflanzen eingesetzt (Appelhagen, 2007). Die untersuchten *Col-0::Pro_{35S}:TT1:VP16* Pflanzen wiesen einen abgemilderten TT1-Überexpressionsphänotyp auf, der in den meisten Fällen nicht von Wildtyppflanzen zu unterscheiden war. Im Gegensatz dazu wies die Mehrzahl der Individuen von transgenen *Col-0::Pro_{35S}:TT1:SRDX*-Pflanzen einen auffälligen TT1-Überexpressionsphänotyp auf. Diese Beobachtungen würden zu der Annahme einer TT1-Funktion als transkriptioneller Repressor passen. Der abgemilderte Phänotyp im Fall der ektopischen Expression der TT1:VP16-Fusionsproteine würde sich durch die Annahme einer abgeschwächten

Funktionalität des Fusionsproteins erklären lassen, in dem die VP16-Aktivierungsdomäne die potenziell negativ-regulatorischen Eigenschaften von TT1 vermindern würde. Analog ließe sich der verstärkte TT1-Überexpressionsphänotyp im Fall der ektopischen Expression der TT1:SRDX-Fusionsproteine erklären. Die potenziell ohnehin vorhandenen negativ-regulatorischen Eigenschaften von TT1 könnten durch die zusätzlich vorhandene SRDX-Domäne noch verstärkt worden sein.

Ein weiteres Experiment, das die Annahme einer TT1-Funktion als transkriptioneller Repressor plausibel erscheinen lässt, beruht auf der Verwendung der At7-Zellsuspensionskultur für Ko-Transfektionsexperimente. Mit Hilfe dieses Systems wurden bereits vorher negativ-regulatorische Eigenschaften von MYB4 gezeigt (Jin *et al.*, 2000). Das System beruht darauf, dass ein artifizielles Reporterkonstrukt, das den GUS-kodierenden *uidA*-ORF hinter einer 4x *GAL4-UAS* (*GAL4 upstream activation sequence*) in Kombination mit einem -90/+8-Fragment des 35S-Promotors aus *CaMV* enthält, eine basale Aktivität aufweist. Diese basale Aktivität lässt sich durch Ko-Transfektion mit Effektorstrukturen, die für Fusionsproteine mit einem GAL4-BD-Anteil (GAL4-Bindedomäne) und einem negativ-regulatorischen Anteil kodieren, vermindern. Entsprechende Versuche sind mit verschiedenen Effektorstrukturen durchgeführt worden, die *TT1*-cDNA beziehungsweise Fragmente davon in translationaler Fusion zu GAL4-BD kodierender cDNA enthielten (Appelhagen, 2007). In diesen Versuchen wurde die konstitutive Expression des Reporters leicht vermindert. Vor allem der N-terminale Bereich von TT1 schien hierbei reprimierend aktiv zu sein.

Es deuten also einige Indizien darauf hin, dass es sich bei TT1 um einen transkriptionellen Repressor handeln könnte. Ein Problem hierbei ist, dass die möglichen Zielgene bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Sollte eine Identifikation gelingen, könnte deren Expression im *tt1 knock out* oder Überexpressionshintergrund überprüft werden. Des Weiteren könnten TT1-Subdomänen – beispielsweise durch Ko-Transfektionsexperimente mit entsprechenden Effektoren, die nur für bestimmte Regionen von TT1 kodieren – funktionell charakterisiert werden.

4.2.3. Mögliche Protein-Protein-Interaktion von TT1

Oben wurden Fälle diskutiert, in denen TT1 eine Rolle als DNA-bindender Transkriptionsfaktor zukommt. Tatsächlich sind aber bislang keine Zielgene identifiziert worden und es ist nach wie vor möglich, dass TT1 trotz seiner Zinkfinger motive nicht in der Lage ist DNA zu binden. Für Zinkfingerproteine im Allgemeinen ist neben ihrer Funktion im Zusammenhang mit DNA-Bindung auch beschrieben worden, dass sie in der Lage sein

können RNA zu binden oder Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen (Brown, 2005; Gamsjaeger *et al.*, 2007).

Den in TT1 vorhandenen Kernlokalisierungssignalen kommt eine besondere Rolle in der Proteinfunktion zu. Es wird ein veränderter Samenschalenphänotyp in verschiedenen genetischen Hintergründen beobachtet, wenn zusätzlich zum endogenen TT1 auch dmTT1-Proteine mit zerstörten NLS-Sequenzen exprimiert werden (Lu *et al.*, unveröffentlicht). So werden beispielsweise Col-0::Pro_{TT1}:dmTT1 Samen mit vermindertem Proanthocyanidingehalt in der Samenschale gefunden. Im Fall von *tt1-1*::Pro_{TT1}:dmTT1 Pflanzen werden Samen beobachtet, die frei von Proanthocyanidinen im gesamten Endothel der Samenschale sind und PAs lediglich in der Mikropyle und der Chalaza aufweisen. Dieser dominant negative Effekt lässt unter der Annahme, dass es sich bei TT1 lediglich um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor handelt – positiv oder negativ regulierend – nur schwer erklären. Aus diesem Grund wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen, die TT1 möglicherweise eingehen könnte, im Rahmen eines Erklärungsansatzes für das Phänomen des dominant negativen Effekts diskutiert (Appelhagen, 2007). Als denkbare Ursache wurde eine mögliche Interaktion von TT1 mit anderen Regulatoren vorgeschlagen, die an der Endotheldifferenzierung oder an der Bildung von Proanthocyanidinen beteiligt sein könnten. Wenn diese hypothetisch mit TT1 interagierenden Proteine durch Wechselwirkung mit dmTT1-Proteinen aufgrund deren gestörter Kernlokalisierung im Cytosol gehalten würden, könnten sie unter Umständen ihre natürliche Funktion im Nukleus nicht mehr ausüben. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum trotz Anwesenheit des endogenen TT1 in Samen von Col-0::Pro_{TT1}:dmTT1 Pflanzen ein verminderter Gehalt an PA-Vorläufern beobachtet wird. Im Rahmen dieses Erklärungsansatzes ließe sich auch das punktuelle Auftreten von PA-Vorläufern in *tt1-1* Samen erklären, indem man einen basalen Transport der hypothetischen TT1-interagierenden Proteine annimmt. Der verstärkte Effekt in den Samen von *tt1-1*::Pro_{TT1}:dmTT1 würde dann durch Unterbindung des basalen Transports durch die im Cytosol lokalisierte dmTT1-Variante bedingt.

4.3. Abweichende Regulation in Mikropyle und Chalaza

Mikropyle und Chalaza sind morphologisch distinkte Regionen im Arabidopsis-Samen, deren Genregulation sich von der im übrigen PA-akkumulierenden Gewebe vorherrschenden Regulation unterscheidet. Dieses weitere PA-akkumulierende Gewebe besteht in der ersten Zellschicht des inneren Integuments im Samen (Beeckman *et al.*, 2000; Windsor *et al.*, 2000; Debeaujon *et al.*, 2003). Für die in *tt1*-Mutanten gefundene Akkumulation von Proanthocyanidinen in Mikropyle und Chalaza sind mehrere Erklärungsansätze denkbar. Beispielsweise könnten TT1 Paraloge ausschließlich in diesen Geweben aktiv sein. Eine andere denkbare Möglichkeit wäre, dass im Endothel des Samens negative Regulatoren von für die PA-Biosynthese benötigten Genen exprimiert werden, die in Mikropyle und Chalaza nicht vorhanden sind. Diese könnten wiederum durch TT1 negativ reguliert sein, was auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene geschehen könnte (Debeaujon *et al.*, 2003). Als weitere denkbare Erklärungsmöglichkeit soll hier angeführt werden, dass ein für die PA-Biosynthese benötigter Faktor im Endothel vorhanden sein könnte, der seine Funktion nur TT1-abhängig ausführen kann. Von diesem „Endothel-Faktor“ könnte in Mikropyle und Chalaza ein Paralog vorhanden sein – zusätzlich oder den „Endothel-Faktor“ ersetzend – der TT1-unabhängig agieren könnte. Eine Aufklärung der Natur der abweichenden Regulation der PA-Biosynthese in Mikropyle und Chalaza würde Rückschlüsse auf die molekulare Funktion von TT1 erlauben.

4.3.1. Die Doppelmutante *tt1-1 gl3-1*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Kandidatengenansatz zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung an der abweichenden Regulation der PA-Biosynthese in Mikropyle und Chalaza eingesetzt. Für einige Gene ist bekannt, dass sie ihre Funktion ausschließlich im Proanthocyanidin-spezifischen Teil des Flavonoid-Metabolismus ausüben. Beispiele hierfür sind das *BAN*-Gen, das für eine Anthocyanidinreduktase kodiert, die die Umwandlung von Cyanidin in Epicatechin katalysiert (Xie *et al.*, 2003) oder *TT2/MYB123* und *TT8/BHLH42*, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, die als Aktivatoren für Proanthocyanidin-spezifische Gene fungieren (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). Weitere Gene im PA-spezifischen Teil des Flavonoid-Metabolismus sind *TT10* (Pourcel *et al.*, 2005), *TT12* (Debeaujon *et al.*, 2001), *TT16* (Nesi *et al.*, 2002) und *AHA10* (Harper *et al.*, 1994; Baxter *et al.*, 2005).

Für die *bHLH*-Gene *GL3/BHLH1* und *EGL3/BHLH2* wurde bereits eine Beteiligung am Flavonoid-Metabolismus diskutiert (Zhang *et al.*, 2003). Denkbar wäre beispielsweise, dass

eines dieser Gene (*GL3* oder *EGL3*) eine *TT8*-analoge Rolle in Mikropyle und Chalaza übernehmen könnte und dass die *TT8*-Funktion im Gegensatz zur *GL3*- oder *EGL3*-Funktion abhängig von *TT1* sein könnte. Für *GL3* ist bekannt, dass es analog zu *TT8* mit *TT2* und *TTG1*, um seine Funktion ausüben zu können, mit einem MYB- und einem WD40-Faktor interagieren muss (Payne *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2003). Daher wurde *GL3* exemplarisch auf eine *TT8/BHLH42*-analoge Funktion in Mikropyle und Chalaza untersucht. *tt1-1 gl3-1* Doppel-*knock-out* Pflanzen erwiesen sich aber auf den Samenschalenphänotyp bezogen als nicht von *tt1-1* zu unterscheiden. Dieses Ergebnis demonstriert, dass *GL3* die hypothetische *TT8*-analoge Rolle in Mikropyle und Chalaza nicht übernimmt. Ein weiteres Argument dagegen ist, dass unreife *tt8 knock out* Samen keine Pigmentierung in Mikropyle und Chalaza nach Vanillin-Färbung aufweisen (Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht präsentiert). Wenn ein anderer bHLH-Faktor *TT8* in diesen Geweben funktionell ersetzen könnte, würde man im *tt8 knock out* aber eine PA-Bildung dort erwarten. Weil die Transkriptionsfaktorkombination *TT2/TT8/TTG1* die bislang einzige bekannte MYB/bHLH/WD40-Kombination ist, die in *Arabidopsis* Einfluss auf den PA-spezifischen Teil der Flavonoidbiosynthese nimmt, und da ein *tt8 knock out* bereits die PA-Bildung in Mikropyle und Chalaza verhindert, ist die Theorie eines *TT1*-unabhängigen bHLH-Faktor, der seine Funktion – als *TT2*-interagierender Transkriptionsfaktor – spezifisch in der Mikropyle ausübt, zu verwerfen. Es erübrigt sich somit die Überprüfung weiterer bHLH-Faktoren wie beispielsweise *EGL3/BHLH2* oder *BHLH12* in Kandidatengenansätzen wie dem hier für *GL3* präsentierten.

4.3.2. EMS-Mutagenese von *tt1-1* Samen

Da der oben diskutierte Kandidatengenansatz zur Aufklärung der abweichenden Regulation der PA-Biosynthese in Mikropyle und Chalaza nicht geeignet ist, wurde die in dieser Arbeit präsentierte EMS-Mutagenese von *tt1-1* Samen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese wurden aus verschiedenen Gründen *tt1 knock out* Samen gewählt. Prinzipiell wäre zwar denkbar gewesen, dass ein anderes Protein *TT1* in Mikropyle und Chalaza funktionell ersetzen kann und aus diesem Grund auch in entsprechenden *knock out* Pflanzen dieses Gens im *TT1*-Wildtyphintergrund eine PA-Bildung in diesen Regionen nicht erfolgt. Der entsprechende Phänotyp wäre jedoch schwer zu beobachten, da eine Pigmentierung des übrigen Samens nach Vanillin-Färbung die Verhältnisse in Mikropyle und Chalaza überdecken könnte. Darüber hinaus könnte in diesen Geweben die abweichende Regulation jedoch zusätzlich zu der Regulation funktionell sein, die auch im übrigen Samen abläuft. In diesem Fall könnte man einen Effekt auch nur beobachten wenn der Regulationsweg, der

normalerweise im gesamten Samen abläuft in Mikropyle und Chalaza ebenfalls ausgeschaltet ist.

Da bis zum Abschluss dieser Arbeit lediglich Samen aus 92 M2-Linien (aus insgesamt ca. 2400 verfügbaren) untersucht wurden und unter diesen bereits 2 unabhängige Mutationen gefunden wurden, die einen nicht-pigmentierten Phänotyp nach Vanillin-Färbung in Mikropyle und Chalaza aufwiesen, ist davon auszugehen, dass eine beträchtliche Anzahl von Kandidaten für den Ausfall eines spezifisch in diesen Geweben für den Flavonoid-Metabolismus entscheidenden Gens identifiziert werden kann. Allerdings ist davon auszugehen, dass in der Mehrzahl der Fälle bereits bekannte Faktoren durch entsprechende Mutationen ausgeschaltet sind, die eine Funktion bei der Biosynthese der Proanthocyanidine spielen. Als Beispiele seien die Gene *DFR* (*TT3*), *CHS* (*TT4*), *CHI* (*TT5*), *F3H* (*TT6*), *F3'H* (*TT7*), *LDOX* (*TT18*), *MYB123* (*TT2*), *BHLH42* (*TT8*), WD40 (*TTG1*) und WRKY44 (*TTG2*) genannt – als Gene mit unsicherem Phänotyp im Doppel-*knock-out* mit *tt1* *GST* (*TT19*), *BAN* und *AHA10*. Die meisten dieser Gene würden sich aber beispielsweise durch phänotypische Analyse von mit Naturstoffreagenz A gefärbten Keimlingen ausschließen lassen, wenn die entsprechenden Samen auf Norflurazon angezogen würden (Sagasser, 2000). Eine weitere Möglichkeit, mit der schon bekannte Mutationen ausgeschlossen werden können, besteht in der Sequenzierung der entsprechenden Genbereiche. Hierbei wäre es aus praktischen Gründen sinnvoll, sich zunächst auf die offenen Leseraster zu beschränken, auch wenn mit diesem Verfahren Mutationen in *cis*-regulatorisch wichtigen Bereichen der Gene übersehen würden.

Sollten Samen identifiziert werden können, deren Genotyp keine Mutation in bereits bekannten Genen mit Funktion im Flavonoid-Metabolismus aufweist, müsste das Kandidatengen kartiert werden. Das Kandidatengen könnte anschließend durch Komplementationsversuche bestätigt werden, sowie eventuell durch die nachträgliche Erstellung von Doppel-*knock-out* Mutanten wie im Fall von *tt1-1 gl3-1* überprüft werden.

Die Methode ist zusätzlich zur Identifikation des „Mikropyle/Chalaza-Faktors“ aus verschiedenen Gründen auch zur Klärung der molekularen Funktion von TT1 erfolgsversprechend. Zunächst ließe die Identifikation dieses Faktors eventuell Rückschlüsse über den molekularen Grund für den unterschiedlichen Phänotyp von Mikropyle/Chalaza auf der einen und Endothel im restlichen Samen auf der anderen Seite zu. Sollten Funktionen für den Faktor bereits beschrieben oder aufgrund von Sequenzhomologien vorhergesagt sein, könnte dies Hinweise auf eine mögliche Funktion von TT1 liefern. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Möglichkeit durch die EMS Mutagenese so genannte *second site revertants* zu generieren (van der Graaff *et al.*, 2003). Hiermit ist gemeint, dass es möglich ist in der Samenpopulation trotz nach wie vor bestehender *tt1-1* Mutation wiederum Samen zu finden,

die in der Lage sind Proanthocyanidine im gesamten Endothel zu bilden. Dies könnte beispielsweise der Fall sein, wenn TT1 wie weiter oben angedeutet ein negativer Regulator eines negativen Regulators der PA-Biosynthese im Endothel sein sollte. Ein EMS-induzierter Ausfall eines solchen negativen Regulators der PA-Biosynthese würde dann trotz *tt1-1* Hintergrund zur PA-Bildung im gesamten Samen führen. Natürlich müsste das entsprechende Gen, das zur Bildung der *second site revertants* geführt hat ebenfalls durch Kartierung bestimmt werden. Wie oben angedeutet, würde die Identifikation eines solchen Gens aber großes Potenzial in der versuchten Aufklärung der TT1-Funktion bergen, was den experimentellen Aufwand mehr als rechtfertigen würde.

4.4. Weitere Ansätze zur Funktionsaufklärung von TT1

Da wie oben erläutert die molekulare Funktion von TT1 nach wie vor ungeklärt ist, bedarf es weiterer Versuchsansätze, um diese zu ermitteln. Hierbei sind abhängig von der tatsächlichen Funktion unterschiedliche Methoden erfolgsversprechend. Diese Methoden, die tatsächlich zum Teil schon zur Funktionsaufklärung von TT1 angewendet wurden, sollen im Folgenden erläutert werden.

4.4.1. Gen-Chip Analyse

Im einfachsten Fall könnte es sich bei TT1 um einen direkten transkriptionellen Aktivator oder Repressor handeln. In diesem Fall sollten unterschiedliche Expressionen der Zielgene im Wildtyphintergrund gegenüber *tt1*-Mutanten beobachtet werden. Da Zielgenkandidaten momentan nicht zur Verfügung stehen, bedarf es zur Auswahl solcher einer Methode zur genomweiten Expressionsanalyse. Ein Ansatz, der eine solche Expressionsanalyse erlaubt, liegt in der Verwendung von Oligonukleotid-Arrays. Durch Oligonukleotid-Arrays lassen sich darüber hinaus indirekte Zielgene detektieren, deren Expression durch die An- oder Abwesenheit von TT1 beeinflusst werden könnte, auch ohne dass eine direkte Interaktion nötig ist. Oligonukleotid-Arrays, die den Anspruch haben möglichst große Bereiche des Arabidopsisgenoms abzudecken sind kommerziell verfügbar. Hervorzuheben ist hier der ATH1-Chip von *Affymetrix*, mit dem aufgrund von über 22.000 darauf vorhandenen *probe sets* die Expression für die Mehrzahl der in *A. thaliana* vorhandenen Gene analysiert werden kann (Lipshutz *et al.*, 1999; Hennig *et al.*, 2003). Für *TT1* selbst existiert allerdings kein *probe set* auf dem ATH1-Chip. Dies wäre wünschenswert, um bei einer vergleichenden Analyse, die mit Material aus dem Wildtyphintergrund einerseits und aus *tt1*-Mutantenhintergrund andererseits durchgeführt werden könnte, eine interne Kontrolle auf dem Chip zu haben. Essenziell ist ein *probe set* für *tt1* jedoch nicht, da entsprechende Kontrollversuche für ausgesuchte Gene – wie *TT1* in diesem Fall – natürlich mit anderen

Methoden wie beispielsweise quantitativer *real time* PCR (qPCR) durchgeführt werden können. Es verdeutlicht aber, dass bestimmte differenziell exprimierte Gene mit Hilfe des ATH1-Chips eventuell nicht identifiziert werden können. Mittlerweile sind so genannte *tiling arrays* auch für *A. thaliana* verfügbar, die das gesamte Genom abdecken (Liu, 2007). Eine weitere von Chip-Experimenten zu unterscheidende Möglichkeit Expressionsprofile zu bestimmen liegt in der Verwendung moderner Sequenziermethoden, wie der 454-Technologie. Diese könnten auf entsprechenden cDNA-Proben angewendet werden, um Transkriptmengen in den ursprünglichen mRNA-Präparationen abzuschätzen. Auf diese Weise wäre es möglich Expressionsprofile zu ermitteln ohne dass eine vollständige Repräsentierung des Transkriptoms auf Genchips benötigt würde (Torres *et al.*, 2008).

Es gibt dennoch ein wichtiges Argument für die Verwendung des ATH1-Chips: Er wurde bereits für eine Vielzahl von Experimenten eingesetzt und die gewonnenen Daten sind öffentlich zugänglich – beispielsweise durch die *online* verfügbare Oberfläche von *Genevestigator* (Grennan, 2006). Neu durchgeführte Experimente können also gegebenenfalls mit bereits vorhandenen Daten verglichen werden.

4.4.1.1. Genetischer Hintergrund der zu vergleichenden Proben

Vor der Durchführung eines Chip-Experiments bezüglich der TT1-Funktion ist abzuwägen, welche genetischen Hintergründe am sinnvollsten miteinander verglichen werden sollten. Der einfachste Fall Ergebnisse durch Chip-Experimente zu erzielen würde vorliegen, wenn es sich bei TT1 um ein DNA-bindenden *in trans* wirkenden Aktivator oder Repressor handelt. Wie in Abschnitt 4.2.2. erläutert wurde, ist eine Funktion als Repressor wahrscheinlicher. In diesem Fall wäre es – wie im Folgenden erläutert werden soll – sinnvoller einen *tt1 knock out* mit dem genetischen Hintergrund des Wildtyps zu vergleichen, als eine *TT1*-Überexpression mit dem Wildtyp zu vergleichen. Die Begründung hierfür ist, dass durch den Ausfall eines negativen Regulators – in diesem Fall TT1 – im entsprechenden *knock out* Hintergrund eine Hochregulierung der Zielgene erfolgen würde. Diese wäre wahrscheinlich leichter zu detektieren als eine Herunterregulierung von potenziell ohnehin schon schwach exprimierten Genen wie sie im Überexpressionshintergrund erfolgen würde. Darüber hinaus fiel bei der Verwendung einer *knock out* Linie die Entnahme passender Gewebe, die mit dem für den Wildtyp verwendeten Gewebe übereinstimmen, leichter. Dies wäre bei einem Vergleich Überexpressionslinie/Wildtyp problematisch, da sich die Überexpressionslinie morphologisch stark vom Wildtyp unterscheidet (Sagasser *et al.*, 2002). Für den *knock out* bietet sich an, die *tt1-3* Linie zu verwenden. Wie mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten *footprint* Linie gezeigt wurde, weist diese den *knock out* Phänotyp auf. Sie bietet sich aus dem Grund an, dass ihr genetischer Hintergrund Columbia ist. Dies ist von Vorteil, da für diesen

genetischen Hintergrund die meisten Expressionsdaten verfügbar sind. Die *footprint* Linie selbst sollte nicht verwendet werden, da bei ihr mit Nebeneffekten, die aus zusätzlichen Transposoninsertionen resultieren, gerechnet werden muss.

4.4.1.2. Zu untersuchendes Gewebe

Um einen TT1-abhängigen Effekt in den miteinander zu vergleichenden Geweben von *tt1-3* und Col-0 beobachten zu können, muss darauf geachtet werden, dass in dem gewählten Gewebe und Entwicklungsstadium im Wildtyp eine möglichst starke TT1-Expression stattfindet.

Da TT1 nur im Endothel sich entwickelnder Samen exprimiert wird (Sagasser *et al.*, 2002), und da die Expression am stärksten im Stadium 4 der Schotenentwicklung ist (Lu *et al.*, unveröffentlicht), welches dem frühen bis späten Herzstadium des Embryos entspricht (Bowman, 1994), würde sich idealerweise das Endothel im entsprechenden Stadium als Ausgangsmaterial für Gen-Chip-Analysen anbieten. Derart gewebespezifisches Material hätte den Vorteil, dass eventuelle von TT1 ausgelöste Effekte nicht durch das Transkriptionsprofil nicht-TT1-enhaltender Gewebe maskiert werden könnten. Ein Problem bei einer solchen Vorgehensweise wäre jedoch – neben der sauberen Isolierung des passenden Gewebes – dass nur geringe Mengen Ausgangsmaterial gewonnen werden können. Für die Analyse auf einem *Affymetrix* ATH1 Chip werden üblicherweise 8-15 µg qualitativ hochwertiger RNA benötigt. Eine solche Menge könnte mittels konventioneller Extraktion nicht praktikabel aus Endothelgewebe isoliert werden.

Eine Methode, mit der Transkriptionsprofile gewebespezifisch aus kleinsten Mengen Ausgangsmaterial bestimmt werden können ist *laser-capture microdissection* (LCM), die in Verbindung mit RNA-Amplifikationsschritten durchgeführt werden kann (Spencer *et al.*, 2007). Hierbei bestehen allerdings Probleme darin, dass die Genauigkeit der Transkriptmengenbestimmung unter den Amplifikationsschritten leiden würde. Außerdem müssten natürlich für die Durchführung derartiger Experimente die apparativen Voraussetzungen gegeben sein.

Eine zwar weniger spezifische Gewebeauswahl als das Samenschalenendothel stellt die Auswahl der gesamten Samenschale von Samen aus Stadium 4 (siehe oben) dar. Hierfür sollte die Abtrennung der Samenschale vom Embryo mit manuellen Mitteln möglich sein. Dennoch wäre zur Gewinnung ausreichender RNA-Mengen aus Samenschalengewebe ein Amplifikationsschritt nötig. Tatsächlich wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch einer sauberen Trennung von Samenschale und Embryo vorgenommen. Eine Trennung in Stadium 4 war manuell nahezu unmöglich und wurde etwa in den Stadien 8 oder 9 (*walking-stick to early curled cotyledons* beziehungsweise *curled cotyledons to early green*

cotyledons) praktikabel. Eine reine Samenschalenpräparation war aber auch in diesen Stadien nicht möglich, da von keiner kompletten Abtrennung des Endosperms ausgegangen werden konnte. Tatsächlich musste sogar mit einer geringen Kontamination der Samenschalen-Probe mit embryonalem Gewebe gerechnet werden. Die Gesamtmenge der aus etwa 300 einzeln präparierten Samen gewonnene RNA lag bei ungefähr 1 µg. Diese geringe Menge lässt eine cDNA-Synthese auch ohne vorangehenden RNA-Amplifikationsschritt zu. Allerdings ist mit solch geringen cDNA-Mengen nur eine kleine Zahl von Kontroll-PCRs möglich. Da auf diese Weise potenziell gewinnbare Chip-Daten einer Verifizierung über qPCR mit nicht zusätzlich amplifizierter cDNA als Matrize nur eingeschränkt zur Verfügung stehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein noch weniger spezifisches Gewebe zur RNA-Präparation ausgewählt. Die RNA wurde aus ganzen Schoten im Stadium 4 gewonnen, die die *TT1*-exprimierenden Samen enthielten.

4.4.1.3. Material zur Gen-Chip Analyse

Zur Gen-Chip Analyse wurden sowohl von *tt1 knock out* Pflanzen (*tt1-3*) als auch von Col-0 Pflanzen Schoten ausgewählt, die Samen im Herzstadium der Embryonalentwicklung (Stadium 4) enthielten. In Abbildung 4-2 ist ein mit Chloralhydrat geklärter Samen aus einer repräsentativen Col-0 Schote dargestellt. Es wurde hierbei für jede RNA-Präparation etwa 1 g Schoten verwendet.



Abbildung 4-2. Herzstadium der Embryonalentwicklung in *A. thaliana* Samen.

Dargestellt ist ein Col-0 Samen aus Stadium 4 der Schotenentwicklung, das dem frühen bis späten Herzstadium des Embryos entspricht (Bowman, 1994). Der Samen wurde mit Chloralhydrat geklärt. Die Aufnahme erfolgte lichtmikroskopisch im differentiellen Interferenzkontrast.

Es konnten jeweils etwa 20 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Dies ist eine ausreichende Menge, um für jede Probe einen ATH1-Chip hybridisieren zu lassen. Außerdem kann die übrige RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt werden, um mögliche *TT1*-regulierte Gene, deren differenzielle Expression aus den Chip-Daten hervorgehen könnten, mittels qPCR

überprüfen zu können. Bis zum Abschluss dieser Arbeit lagen die Ergebnisse der Chip-Analyse noch nicht vor. Es kann daher noch keine abschließende Aussage über den Erfolg der Methode gemacht werden.

4.4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Sollten mögliche TT1-Zielgene mit anderen Methoden identifiziert worden sein, würde sich idealerweise eine Überprüfung, ob TT1 eine direkte DNA-Bindung eingehen kann anschließen. Diese könnte theoretisch *in vitro* durch die Durchführung eines *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) erfolgen. Hierbei ist jedoch zunächst das Problem zu lösen, dass es bislang nicht gelungen ist funktionales TT1-Protein bakteriell zu überexprimieren und rein zu isolieren. Ein weiteres noch offensichtlicheres Problem ist natürlich, dass es momentan noch an potenziellen Zielgenen mangelt.

Aufgrund der oben geschilderten Probleme bei der TT1-Expression in Fremdorganismen erscheint die *in vivo* Überprüfung von TT1/Zielgenpromotor-Interaktion, beispielsweise durch Verwendung des At7-Zellsuspensionskultursystems in Ko-Transfektionsexperimenten, momentan eher erfolgsversprechend.

4.4.3. Yeast Two-Hybrid Experimente

Wie in Abschnitt 4.2.3. dargestellt, ist nicht auszuschließen, dass TT1 seine Rolle nur unter Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ausüben kann. Dies könnte im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren unter Ausbildung DNA-bindender Komplexe erfolgen oder zur Ausübung gänzlich anderer Funktionen nötig sein, wie es für eine potenzielle Funktion beim Kernimport bereits erläutert wurde. Die bislang diskutierten Gen-Chip Experimente könnten unter Umständen nicht in der Lage sein Hinweise auf eine derartige TT1-Funktion zu liefern. Eine Methode, die geeignet ist Protein-Protein-Wechselwirkungen zu detektieren ist die *Yeast Two-Hybrid* Methode (Fields und Sternglanz, 1994). TT1 würde sinnvollerweise hierbei – fusioniert mit einer DNA-Bindungsdomäne – als *bait*/Köder eingesetzt und damit eine cDNA-Bibliothek durchsucht werden, deren Bestandteile mit einer Aktivierungsdomäne-kodierenden Sequenz fusioniert wurden. Sollten hierbei Kandidatenproteine identifiziert werden, könnte die Annotation der entsprechenden Gene bereits Aufschluss über eine mögliche TT1-Funktion geben. Auf jeden Fall würde eine Identifikation potenzieller Interaktionspartner aber Hinweise zu möglichen weiterführenden Experimenten zur Klärung einer solchen Funktion liefern.

Ein entscheidender Punkt, der vor der Ausführung eines solchen Experiments geklärt werden muss, liegt in der Auswahl einer passenden cDNA-Bibliothek. Hierbei bietet sich wiederum die Wahl einer Bibliothek aus Schoten im Stadium 4 an, da in diesen wegen der

starken TT1-Expression ein Vorhandensein von Transkripten potenzieller TT1-Interaktionspartner biologisch plausibel erscheint. Auch bei den *Yeast Two-Hybrid* Experimenten wäre, wie auch bei den Gen-Chip Experimenten, wünschenswert eine möglichst spezifische Gewebeprobe für die Erstellung der cDNA-Bibliothek zu verwenden, da in einer solchen der Anteil an potenziellen TT1-Interaktionspartnern maximiert würde. Das ist insbesondere vermutlich notwendig, da es sich bei den Interaktionspartnern um ohnehin gering exprimierte Transkriptionsfaktoren handeln könnte, die in unspezifischen cDNA-Bibliotheken unter Umständen überhaupt nicht detektiert würden.

4.4.4. TT1 in weiteren Organismen

Das Interesse die TT1-Funktion in *A. thaliana* aufzuklären liegt nicht zuletzt darin begründet, dass die bei dieser Modellpflanze gewonnenen Erkenntnisse auf andere Pflanzen umzusetzen sein könnten, unter denen Nutzpflanzen mit wirtschaftlichem Wert sein können. Ein Beispiel für eine solche Nutzpflanze ist der – wie auch *A. thaliana* – zur Familie der Kreuzblütengewächsen (*Brassicaceae*) gehörende Raps (*Brassica napus*). Da *B. napus* amphidiploid/allotetraploid ist, treten bei der Erforschung seines Genoms Probleme auf, die durch die Analyse der diploiden Pflanze *A. thaliana* nicht auftreten. So fällt es beispielsweise schwerer, *knock out* Pflanzen zu generieren, da die Gene zunächst in vier Allelen vorkommen können. Darüber hinaus können noch mehrere Gene, die für unterschiedliche Isoformen eines Proteins kodieren, vorhanden sein. Abgesehen davon erweist sich bei *A. thaliana* beispielsweise das komplett sequenzierte Genom sowie das Vorhandensein von Expressionsdatenbanken oder kommerziell verfügbaren T-DNA-Insertionslinien für die meisten der bekannten Gene als vorteilhaft.

Andererseits kann *B. napus* jedoch auch eingesetzt werden, um die Genfunktionsaufklärung in *A. thaliana* voranzutreiben. Wie in Abschnitt 4.4.3. beschrieben wurde ist zum Beispiel eine möglichst gewebespezifische cDNA-Bibliothek zur TT1-Funktionsaufklärung wünschenswert. Hierbei wären wie auch schon in Abschnitt 4.4.1.2. erläutert Proben aus Samenschalenmaterial ein nahezu ideales Ausgangsmaterial. Für *A. thaliana* ist die Gewinnung einer ausreichenden Menge solchen Materials aufgrund der geringen Samengröße nicht praktikabel. Im Gegensatz dazu können im Fall von *B. napus* Samenschalen der korrekten Embryonalentwicklungsphase wesentlich leichter isoliert werden. Hierbei würde natürlich zunächst angenommen, dass die TT1-Expression auch im Fall von *B. napus* in dieser Phase maximal ist. Die Entwicklungsphase könnte auch im Fall von *B. napus* durch Chloralhydrat-Klärung analog zu *A. thaliana* bestimmt werden.

Eine *B. napus* cDNA-Bibliothek aus Samenschalen könnte in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten, wie in Abschnitt 4.4.3. für eine *A. thaliana* cDNA-Bibliothek aus Schoten

beschrieben wurde, eingesetzt werden. Dies hätte den Vorteil einer höheren Gewebespezifität aber den Nachteil, dass vorausgesetzt würde, dass in *B. napus* homologe Proteine von den putativen TT1-Interaktionspartnern aus *A. thaliana* existieren, die in der Lage sind mit dem AtTT1-Protein aus Arabidopsis zu interagieren. Ob diese Verfahrensweise also aussichtsreicher ist als die Verwendung einer *A. thaliana* cDNA-Bibliothek aus Schoten ist unklar. Maximale Erfolgsaussichten hat sicherlich die parallele Durchführung beider Ansätze.

Wie eingangs erwähnt ist es natürlich von Interesse herauszufinden, ob sich die in *A. thaliana* gewonnenen Erkenntnisse in *B. napus* bestätigen lassen. Als Beispiel sei hier die Überprüfung erwähnt, ob es möglich ist in transgenem Raps über den Einsatz des in Arabidopsis dominant negativ wirkenden, mit zerstörten NLS-Sequenzen (*dmTT1*) versehenen TT1-Proteins eine gelbe Samenfarbe im Gegensatz zu der natürlich vorkommenden braun-schwarzen Samenfarbe hervorzurufen. Entsprechende Versuche sind durchgeführt worden, aber es ist noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen worden, dass der entsprechende Effekt hervorgerufen werden kann (Kah *et al.*, unveröffentlicht). Sollte dies gelingen, wäre es ein eindrucksvolles Beispiel, wie Erkenntnisse, die an Modellpflanzen gewonnen wurden, auf Nutzpflanzen übertragen werden können und dort zumindest das Potenzial haben können, gewünschte Phänotypen hervorzurufen. Die Verwendung der TT1-Variante mit mutierten NLS-Sequenzen wäre darüber hinaus ein Beispiel wie Effekte, die normalerweise durch den *knock out* von Genen – der aus oben erläuterten Gründen in Raps problematisch ist – hervorgerufen werden, durch andere Mittel generiert werden können.

4.4.5. TILLING von *TT1*

Wie in Abschnitt 3.1.1.3. dargestellt wurden durch TILLING acht verschiedene neue Mutationen in kodierenden Bereichen von *TT1* entdeckt, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch führen. Generell sollte die TILLING Methode zur Generierung einer allelischen Serie für *TT1* verwendet werden. Das heißt, dass eine Reihe von Mutationen im *TT1*-Gen identifiziert werden sollten, die möglicherweise zu veränderten Phänotypen unterschiedlich starker Ausprägungen führen sollten. Dies könnte beispielsweise Hinweise über funktionell wichtige Domänen innerhalb des Proteins liefern. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten konkreten Fall des TILLINGS von *TT1* wurde der Fokus auf die Bereiche gelegt, die für die WIP-Domäne kodieren. Dieser Bereich ist für die Analyse einer allelischen Serie besonders interessant, weil die wahrscheinlich für die Proteinfunktion entscheidenden Zinkfingerbereiche dort lokalisiert sind. Unter den acht im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen lagen drei in den Zinkfingerbereichen – jeweils eine in

Zinkfinger 2, 3 und 4. Jedoch ist keiner der potenziell Zink-kordinierenden Aminosäurereste betroffen. Die neuen Mutationen sind größtenteils noch nicht vollständig phänotypisch charakterisiert. Es bleibt daher abzuwarten, ob die Zinkfingermutationen sich auf die Proteinfunktionalität auswirken. Am meisten überraschen würde eine Auswirkung der Mutationen, die in Zinkfinger 2 und 4 gefunden wurden, da diese im Gegensatz zu Zinkfinger 1 (C2H2) und Zinkfinger 3 (C2HC) eine ungewöhnliche Konfiguration aufweisen. Eine tatsächlich vorliegende Zinkfingerkonformation ist für sie daher unwahrscheinlicher. Es werden durch die Mutationen die Aminosäureänderungen p.V195I (2. Finger) und p.A275T (4. Finger) hervorgerufen. Der Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin lässt hierbei wiederum keine allzu großen Auswirkungen vermuten wohingegen der Austausch der kleinen, neutralen Aminosäure Alanin gegen das polare, eine Hydroxylgruppe enthaltende Threonin größeres Potenzial für die mögliche Einschränkung der Funktionalität des Proteins bietet. Die Wahrscheinlichkeit einer Auswirkung ist im Fall der Mutation p.G242D im Zinkfinger 3 am größten. Der Austausch von Glycin nach Asparaginsäure könnte aus verschiedenen Gründen einen Effekt haben. Glycin ist als α -Helix brechende Aminosäure bekannt (Edwards *et al.*, 1987) und wesentlich kleiner als Asparaginsäure, was in Konformationsänderungen im Protein resultieren könnte. Darüber hinaus könnte die in der Asparaginsäure enthaltene Carboxylgruppe aufgrund ihrer sauren Eigenschaften Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben. Ob allerdings eine der neu identifizierten Mutationen einen Effekt zeigt bleibt experimentell zu überprüfen. Hierzu könnte neben der Farbe reifer Samen beispielsweise die mögliche Akkumulation von Proanthocyanidin-Vorläufermolekülen in unreifen Samen entsprechend homozygoter Pflanzen durch Vanillin-Färbung analysiert werden.

4.5. Die WIP-Proteinfamilie

Da von *TT1* fünf paraloge Gene in *A. thaliana* gefunden wurden, die gemeinsam mit *TT1* für die WIP-Proteinfamilie kodieren, bot sich die Chance durch deren Analyse bezüglich Expressionsmuster, Phänotypen von *knock out* Pflanzen, molekularer Wirkmechanismen und möglicher Zielgene, Hinweise auf die *TT1*-Funktion zu bekommen. Darüber hinaus ist die Charakterisierung der Genfamilie für sich genommen schon von generellem Interesse.

4.5.1. Die WIP-Proteine gehören zur Klasse A1d der Zinkfingerproteine in *Arabidopsis thaliana*

Ursprünglich wurde für die WIP-Proteine das Vorhandensein zweier Zinkfinger angenommen (Sagasser *et al.*, 2002), wobei der erste vom C2H2-Typ und der zweite vom C2HC-Typ ist. Eine genomweite Analyse der C2H2-Zinkfingerproteine in *A. thaliana* hat jedoch ergeben, dass sich die WIP-Proteine in eine Familie der Zinkfinger eingruppierten lassen, deren Mitglieder jeweils vier Zinkfinger aufweisen (Englbrecht *et al.*, 2004). Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz der WIP-Proteine bestätigt die mögliche Anwesenheit von vier Zinkfingermotiven, wobei das erste dem C2H2-Typ-Zinkfinger, das dritte dem C2HC-Typ-Zinkfinger zugeordnet werden kann und das zweite und das vierte unüblichere Konfigurationen aufweisen. Gemeinsam mit 18 weiteren Proteinen lassen sich die WIP-Proteine in die Familie A1 der C2H2-Zinkfingerproteine eingruppierten, mit denen sie ihre generelle Zinkfingerstruktur teilen. Sie stellen darin die Untergruppe A1d dar (siehe Abb. 4-3). Diese Gruppe ist am nächsten verwandt mit der Untergruppe A1c, die aus lediglich zwei Mitgliedern – At1g34370 und At5g22890 – besteht. Für At5g22890 ist noch keine Funktion beschrieben worden, es wird lediglich eine Funktion als Transkriptionsregulator postuliert, die sich auf Sequenzähnlichkeiten gründet. Für At1g34370 (*STOP1*) ist jedoch eine Beteiligung an biologischen Prozessen – namentlich Protonentoleranz – gezeigt worden (Iuchi *et al.*, 2007). Allerdings ist auch im Fall von *STOP1* der molekulare Wirkmechanismus des Proteins nach wie vor ungeklärt. Wiederum wird aufgrund von Sequenzhomologien lediglich über eine Rolle als Transkriptionsregulator spekuliert.

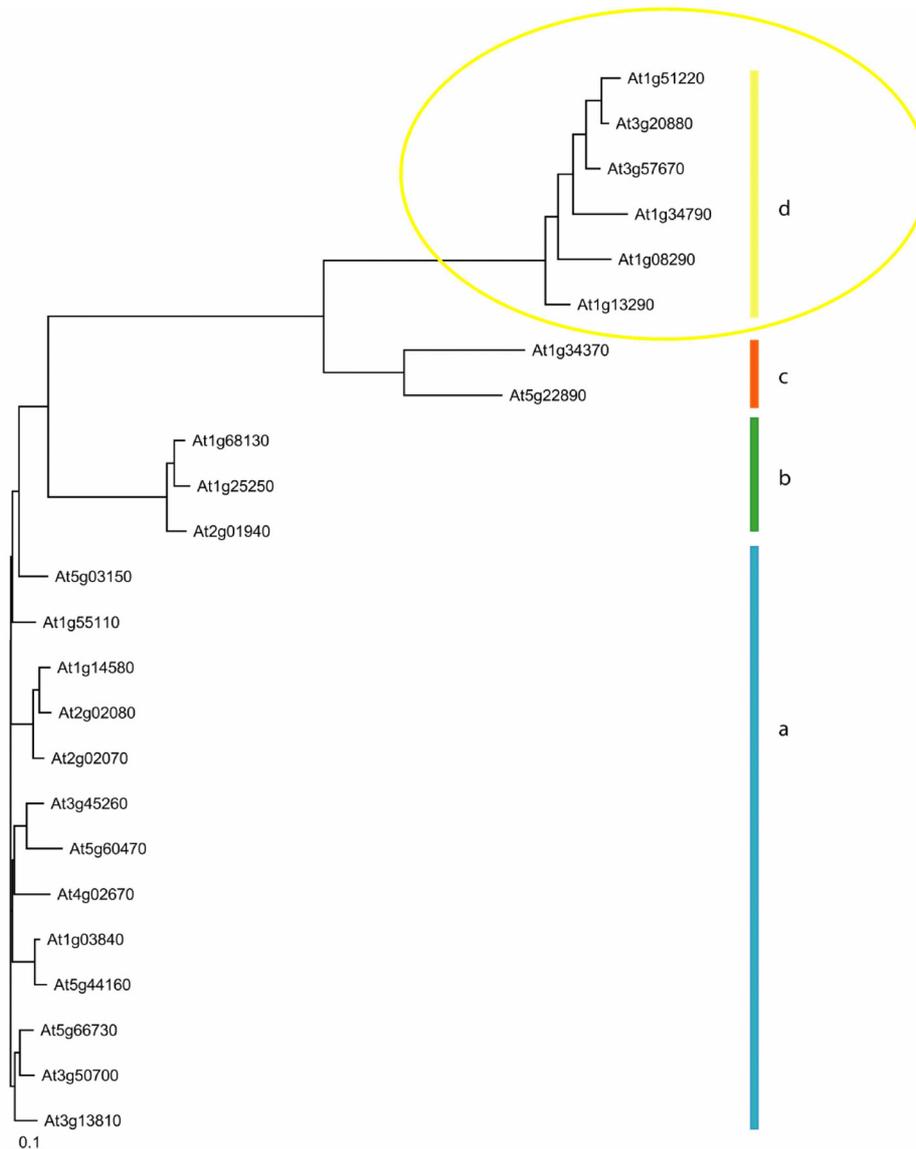


Abbildung 4-3. Neighbour joining tree eines multiplen Sequenz-Alignments der Subgruppen A1a bis A1d der Zinkfingerproteine in *A. thaliana*. Modifiziert nach Englbrecht *et al.* (2004).

Die genetischen Distanzen der Mitglieder der vier Subgruppen von Familie A1 der C2H2-Zinkfingerproteine in *A. thaliana* sind dargestellt. Die Subgruppe A1d entspricht der WIP-Proteinfamilie und ist mit einer gelben Ellipse im phylogenetischen Baum kenntlich gemacht.

4.5.2. Die WIP-Domäne ist der am stärksten konservierte Bereich

Die WIP-Domäne selbst ist der einzige wirklich hoch konservierte Bereich innerhalb der WIP-Proteine. Sie enthält alle vier Zinkfinger und die beiden Kernlokalisierungssignale. Die in Abschnitt 3.2. erwähnten, weiteren, weniger hoch konservierten Regionen liegen in der Regel N-terminal von der WIP-Domäne. Für keine dieser konservierten Regionen liegt der Nachweis einer funktionellen Bedeutung vor. Die unspezifizierte Domäne sowie die prolinreiche Domäne (vgl. Abb. 3-5) werden in Arabidopsis lediglich in der Familie der WIP-Proteine gefunden. Das gleiche gilt für die saure Domäne, die durch MEME-Analyse als konserviert innerhalb der WIP-Proteinfamilie erkannt wird. Für saure Domänen wurde in der Literatur jedoch eine mögliche Funktion als Aktivierungsdomänen berichtet (Mitchell und Tjian, 1989; Cress und Triezenberg, 1991; Triezenberg, 1995). Aus diesem Grund liegt zumindest die Annahme einer solchen möglichen Funktion für diese Domäne nahe. Da jedoch durch BLAST-Analysen der Konsensus-Sequenz der konservierten sauren Domäne der WIP-Proteine keine Übereinstimmung zu weiteren transkriptionellen Aktivatoren gefunden wurde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), bleibt die Annahme einer solchen Funktion spekulativ.

Bei der WIP-Domäne könnte es sich um einen DNA-bindenden Bereich innerhalb der WIP-Proteine handeln, da sie die in den Proteinen enthaltenen Zinkfingerbereiche enthält. Eine Eigenschaft der meisten DNA-bindenden Zinkfingerproteine in Pflanzen ist jedoch das Vorhandensein einer spezifischen Sequenz aus sechs Aminosäuren (QALGGH) in jedem Finger. Das QALGGH-Motiv liegt hierbei in den Bereichen der Finger, für die eine DNA-Interaktion postuliert wird (Takatsuji, 1999). Eine funktionelle Bedeutung dieses Bereiches für die DNA-Interaktion erscheint daher nahe liegend. Das QALGGH-Motiv ist jedoch innerhalb der WIP-Proteinfamilie, wie auch in den übrigen Zinkfingerproteinen der Klasse AI, nicht vorhanden. Diese Tatsache stellt die Annahme einer Funktion als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren zwar in Frage – es wird aber für andere Mitglieder der Zinkfinger der Klasse AI, denen das QALGGH-Motiv ebenfalls fehlt, eine Rolle als Transkriptionsregulatoren, die mit DNA direkt interagieren, diskutiert (Morita *et al.*, 2006).

Unter der Annahme einer Rolle als Transkriptionsfaktoren, die direkte DNA-Bindung eingehen können, stellt sich natürlich die Frage nach den Zielgenen. Wenn die WIP-Domäne für die DNA-Bindung zuständig ist, müsste die Zielgenspezifität ebenfalls durch sie vermittelt werden. Dies würde aufgrund der starken Konserviertheit auf zumindest teilweise übereinstimmende Zielgene schließen lassen. Denkbar wäre, dass in diesem Fall weitere funktionelle Bereiche in den anderen Domänen des Proteins lokalisiert sind, die in der Familie der WIP-Proteine weniger stark konserviert sind. Durch diese weiteren Domänen

könnten so unterschiedliche Eigenschaften wie Aktivierungs- oder Reprimierungspotenzial vermittelt werden. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass die WIP-Proteine in unterschiedlichen Geweben an ähnliche Promotoren binden können, aber dort gegensätzliche Effekte auslösen können. So ist beispielsweise die EAR-ähnliche Domäne in TT1 (siehe Abschnitt 4.2.1.2. und Abb. 4-1), für die negativ regulatorische Eigenschaften postuliert (Debeaujon *et al.*, 2003) aber experimentell nicht bestätigt werden konnten, nicht in den weiteren Mitgliedern der WIP-Proteinfamilie vorhanden.

Die in Abschnitt 4.2.3. für TT1 diskutierte Möglichkeit der Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen könnte für die übrigen WIP-Proteine ebenfalls zutreffen. Hierbei würde man als Proteinbereich, der für die Wechselwirkung verantwortlich sein könnte wiederum die WIP-Domäne annehmen, da für Zinkfinger auch die Möglichkeit der Vermittlung solcher Wechselwirkungen bekannt ist. Wiederum würde auch das gleiche Argument wie bei der Annahme einer Rolle als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren zutreffen. Die hoch konservierte WIP-Domäne würde vermutlich Wechselwirkungen der unterschiedlichen WIP-Proteine mit den gleichen Interaktionspartnern vermitteln. Da die Kernlokalisierungssignale, die in TT1 gefunden wurden, in den übrigen WIP-Proteinen ebenfalls konserviert vorliegen und da eine Lokalisation im Nukleus im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestätigt wurde (siehe Abb. 3-5 und 3-7), liegt die Eigenschaft der intrazellulären Lokalisation wahrscheinlich ebenfalls in der WIP-Domäne kodiert. Wenn es zutreffen sollte, dass die WIP-Proteine eine Funktion beim Kernimport anderer Faktoren übernehmen, wie im Fall von TT1 in Abschnitt 4.2.3. diskutiert wurde, würde die obigen beiden Annahmen, dass sowohl Protein-Protein-Interaktion als auch intrazelluläre Lokalisation in der WIP-Domäne begründet liegen bedeuten, dass die WIP-Proteine funktionell äquivalent sind und sie ihre unterschiedlichen Funktionen hauptsächlich aufgrund unterschiedlicher gewebespezifischer Expressionsmuster ausüben können.

4.5.3. Die WIP-Gene zeigen unterschiedliche Expressionsmuster

Jedes einzelne WIP-Gen zeigt ein spezifisches Expressionsmuster, das sich von dem der übrigen WIP-Gene zumindest teilweise unterscheidet. Konsequenterweise ließen sich auch keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten in den einzelnen Promotorbereichen feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster durch Analyse von Promotor-GUS Linien ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.1.). Hierbei war der WIP6-Promotor der einzige, der in keinem der untersuchten Gewebe oder Entwicklungsstadien Aktivität zeigte.

Die gewebsspezifische Expression von TT1, die auf das Samenschalenendothel begrenzt ist, wurde bereits beschrieben (Sagasser *et al.*, 2002; Debeaujon *et al.*, 2003). Für WIP2 wurde anhand der untersuchten Promotor-GUS Linien Expression in Meristemgeweben

(Sprossachsenmeristem, Lateralmeristem) sowie in der Blattvaskulatur, an der Samenbasis und im Pollen gefunden. In der Literatur (Crawford *et al.*, 2007) wurde *WIP2*-Expression zusätzlich in Schotenanlagen an den Stellen, wo die Fruchtblätter auf das sich bildende Septum treffen und später im Septum selbst beschrieben. Dies ist zur Ausbildung des so genannten *transmitting tracts* essenziell. Mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode der Färbung von Promoter-GUS Linien konnte eine Expression in diesem Gewebe nicht nachvollzogen werden. Der aus der gestörten Entwicklung des *transmitting tracts* resultierende Schotenphänotyp wurde dahingegen auch im Rahmen dieser Arbeit reproduziert (siehe Abbildung 3-8). Für *WIP3* wurden bislang keine Expressionsdaten veröffentlicht. Teilweise zeigte der *WIP3*-Promotor eine mit dem *WIP2*-Expressionsmuster überlappende Aktivität. So wurde Aktivität für ihn ebenfalls im Sprossachsenmeristem, Blattvaskulatur und Samenbasis gefunden, nicht jedoch im Pollen. Er zeigte in adulten Pflanzen darüber hinaus noch Aktivität an den Übergängen zu den Schoten in der so genannten *abscission zone*, was mit dem Gewebe übereinstimmt, in dem in der Blüte die Kelch- und Kronenblätter entsprungen sind. Zusätzlich zu der Tatsache, dass *WIP3*-Expression an den Kanten abgeschnittener Stängel beobachtet wurde, weist dies darauf hin, dass die *WIP3*-Expression unter Umständen durch Verwundung induziert werden kann, da das Ausfallen der Kelch- und Kronenblätter als Vorgang betrachtet werden kann, der einer Verletzung der Pflanze entspricht (Bleecker und Patterson, 1997). *WIP4*-Aktivität wurde hauptsächlich in Wurzelspitzen, sowohl in der Haupt- als auch in Seitenwurzeln gefunden. Diese Beobachtung ist konform mit in der Literatur beschriebenen Expressionsdaten, die auf *WIP4*-Expression im mitotisch wenig aktiven Zentrum der Wurzel (*quiescent center*), das von den Initialzellen der Wurzelgewebe umgeben ist, hindeuten (Nawy *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde *WIP4*-Expression an der Samenbasis und bei älteren Keimlingen teilweise auch im Sprossachsenmeristem gefunden. *WIP5*-Promotoraktivität konnte nur in den Kotyledonen beobachtet werden, vorwiegend bei jüngeren Keimlingen.

Teilweise überlappende Expression konnte demnach hauptsächlich für *WIP2*, *WIP3* und *WIP4* nachgewiesen werden, wobei die Gemeinsamkeiten im Fall von *WIP4* schwächer ausfielen. Es wurde übereinstimmende Genaktivität im Sprossachsenmeristem und an der Samenbasis beobachtet. Hierbei wurde die Expression an der Samenbasis nicht weiter charakterisiert. Dies könnte beispielsweise über die Durchführung von Gewebeschnitten erreicht werden. Da derartige Untersuchungen noch ausstehen, konnte nicht nachgewiesen werden, ob spezifisch Expression in Mikropyle und Chalaza gefunden wird. Falls dies der Fall sein sollte und falls *TT1*, *WIP2*, *WIP3* und *WIP4* redundante molekulare Funktionen haben sollten, wie in Abschnitt 4.5.2. diskutiert, könnte dies eine Erklärung für die Bildung

von Epicatechinen bieten, die in Mikropyle und Chalaza von *tt1 knock out* Pflanzen beobachtet wird. Sollte dies der Fall sein, würde ein Nachweis über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte EMS-Mutagenese von *tt1-1* Samen und Analyse der M3-Samen erschwert (vgl. Abschnitt 4.3.2.), wenn nicht unmöglich gemacht, da der gewünschte Phänotyp nur im Fall des vierfachen *knock outs* beobachtet werden könnte.

Das gleiche Argument der teilweise überlappenden Expression in Kombination mit möglicherweise redundanter Funktion kann zur Begründung dafür dienen, warum keine vom Wildtyp abweichenden Phänotypen in Einzel-*knock-out* Pflanzen der *WIP*-Gene beobachtet werden konnten. Die stärkste Expression wurde im Fall von *WIP2* und *WIP3* im Sprossachsenmeristem gefunden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *wip2 wip3* Doppel-*knock-out* hinsichtlich abweichender Entwicklung in diesem Gewebe untersucht. Es konnten jedoch sowohl in Keimlingen als auch in älteren Pflanzen keine Abweichungen zum Wildtyp festgestellt werden. Dies ließe sich wiederum durch die schwache *WIP4*-Expression erklären, die ebenfalls im Sprossachsenmeristem gefunden wurde. Dementsprechend könnte ein *wip2 wip3 wip4* Dreifach-*knock-out* zur Klärung der Rolle der *WIP*-Proteine in diesem Gewebe beitragen.

Andererseits besteht bei Geweben, in denen exklusive Expression eines *WIP*-Gens gefunden wird, eine gesteigerte Möglichkeit einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zu beobachten. Tatsächlich wurde im Fall des *wip2 knock outs* ein abweichendes Muster der Samenproduktion innerhalb der Schoten beschrieben, was auf eine fehlerhafte Entwicklung des *transmitting tracts* zurückzuführen ist, der für das Eindringen des Pollenschlauchs erforderlich ist (Crawford *et al.*, 2007). Vermutlich wird nur *WIP2* im Inneren sich entwickelnder Schoten exprimiert. Dies ließe sich allerdings nur mit einer gezielten Untersuchung dieses Gewebes ermitteln, da die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Methode der Promotor-GUS Analyse intakter Pflanzenteile nicht sensitiv genug ist die vermutlich schwache Genexpression in diesem Bereich zu detektieren. Die übrigen exklusiven Expressionsmuster der *WIP*-Gene stellen – abgesehen von der *TT1*-Expression im Samenschalenendothel – die wundeninduzierte Expression von *WIP3*, die wurzelspezifische Expression von *WIP4* und die Expression von *WIP5* in Kotyledonen dar. Eine biologische Auswirkung der wundeninduzierten *WIP3*-Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Im Fall von *wip4 knock out* Pflanzen wurde versucht einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp in der Wurzelentwicklung nachzuweisen (nicht gezeigt). Auf MS-Agar angezogene Keimlinge zeigten jedoch keine Abweichungen hinsichtlich der Wurzelentwicklung, was die entwicklungsbedingte Wurzellänge, Anzahl der Seitenwurzeln und Orientierung der Wurzeln betraf. Auch im Fall von *wip5 knock out*

Pflanzen wurde keine abweichende Entwicklung der Kotyledonen beobachtet (ebenfalls nicht gezeigt).

4.5.4. Molekulare Funktion der WIP-Proteine

Die Fragestellung nach der molekularen Funktion der WIP-Proteine lässt sich analog zur Frage der molekularen Funktion von TT1 beantworten. Aufgrund der starken Konserviertheit der Aminosäuresequenz liegt die Annahme einer einheitlichen Funktion nahe. Darüber hinaus wird diese Annahme durch eine einheitliche intrazelluläre Lokalisation der WIP-Proteine im Zellkern gestützt (siehe Abschnitt 3.2.2.). Die nukleäre Lokalisation in Verbindung mit der Zugehörigkeit der WIP-Proteine zur Klasse der C₂H₂-Zinkfingerproteine lässt zunächst die Annahme einer Funktion als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren plausibel erscheinen (vgl. Abschnitt 4.2.1.). Hierbei wäre anzunehmen, dass die molekulare Funktion der übrigen WIP-Proteine der von TT1 gleicht, was nach dem derzeitigen Erkenntnisstand sowohl eine Rolle als transkriptionelle Aktivatoren als auch eine Rolle als Repressoren ermöglichen würde, wobei reprimierende Eigenschaften als wahrscheinlicher anzusehen sind (vgl. Abschnitt 4.2.2.).

Neben der möglichen Funktion als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren ist natürlich nicht auszuschließen, dass die WIP-Proteine andere Funktionen übernehmen könnten. Wie in Abschnitt 4.2.3. für TT1 diskutiert, erscheinen Funktionen im Zusammenhang mit Protein- oder RNA-Interaktion ebenso wahrscheinlich. In den bislang verfügbaren Veröffentlichungen zu Funktionen von TT1 und WIP2/NTT (Sagasser *et al.*, 2002; Crawford *et al.*, 2007) wurden zwar phänotypische Auswirkungen des Ausfalls der jeweiligen Proteinfunktion in *knock out* Pflanzen beschrieben, der molekulare Grund für diese Beobachtungen wurde jedoch nicht erläutert. Auch im Rahmen dieser Arbeit kann auf diese Frage keine abschließende Antwort gegeben werden.

Ob in einer Rolle als Transkriptionsfaktoren, unter Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder als RNA-bindende Proteine – die Annahme potenziell gleicher Ziele erscheint neben der hohen Sequenzhomologie innerhalb der Familie der WIP-Proteine noch aus anderen Gründen plausibel. So konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression der unterschiedlichen WIP-Proteine prinzipiell ähnliche phänotypische Effekte hervorruft (siehe Abschnitt 3.2.4.). Es wird jeweils eine geänderte Morphologie der Rosettenblätter beobachtet, die im Fall der ektopischen WIP-Expression von leicht gewellten über gekräuselte zu gezahnten Blättern reicht, wie sie im Fall von TT1-Überexpressionspflanzen gefunden werden. Hierbei muss jedoch betont werden, dass teilweise beträchtliche Unterschiede im Ausmaß der Auswirkungen der Überexpression der unterschiedlichen WIP-Proteine zu verzeichnen sind. Die stärksten Effekte werden im Fall von TT1 beobachtet,

gefolgt von *WIP2*. Neben dem Rosettenblatt-Phänotyp führt *TT1*-Überexpression im Einzelfall zu Sterilität der entsprechenden Pflanzen (Sagasser *et al.*, 2002), was für die anderen *WIP*-Überexpressionslinien nicht beobachtet wird. Dies kann als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass bestimmte Funktionalitäten der Proteine außerhalb der *WIP*-Domäne kodiert liegen müssen, da die *WIP*-Domäne selbst zu stark konserviert ist als dass unterschiedliche Effekte innerhalb der *WIP*-Proteinfamilie erklärt werden könnten. Die in Abschnitt 3.2. erwähnten und in Abschnitt 4.5.2. diskutierten weiteren konservierten Bereiche neben der *WIP*-Domäne könnten hingegen für die unterschiedliche Schwere der Auswirkungen ektoptischer *WIP*-Expression dienen, da sie in den unterschiedlichen *WIP*-Proteinen stärker voneinander abweichen.

4.5.5. Interaktion mit *KNOX*-Gen Klasse 1 Promotoren

Die ektoptische Expression von *KNOX*-Genen der Klasse 1 (*KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6*, *STM*) kann zu ähnlichen phänotypischen Effekten führen wie die oben diskutierte ektoptische *WIP*-Expression. So besitzen beispielsweise Pflanzen, die *KNAT2* unter der Kontrolle des *CaMV 35S*-Promotors exprimieren, gewellte Rosettenblätter (siehe Abb. 4-4).



Abbildung 4-4. Phänotyp von Keimlingen bei ektoptischer Expression von *KNAT2*.

Gezeigt ist ein Keimling einer *Col-0::Pro_{35S}:KNAT2* Pflanze, die auf MS-Agar angezogen wurde (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht). Der Keimling hat gewellte Rosettenblätter, was dem Phänotyp von Pflanzen, in denen die *WIP*-Gene ektoptisch exprimiert werden gleicht (vgl. Abschnitt 3.2.4.).

Darüber hinaus wurde in *Yeast One-Hybrid* Experimenten eine Bindung des *KNAT1*-Promotors sowohl durch das Reis-Homologe von *WIP2* als auch durch *AtWIP2* selbst nachgewiesen (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht). Da Expression der *KNOX*-Gene der Klasse 1 im Sprossachsenmeristem gefunden wird (Lincoln *et al.*, 1994; Dockx *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1996), was mit dem Expressionsmuster von *WIP2* übereinstimmt (vgl. Abschnitt 3.2.1.), erscheint eine Abhängigkeit der *KNAT1*-Expression von *WIP2 in vivo* ebenfalls plausibel. Es wurde beschrieben, dass aus einer Überexpression von *WIP2* ein verbreitetes Muster der *KNAT1*-Expression resultiert (Kuijt, 2005). Zusammengenommen ließen diese

Daten eine Funktion von WIP2 als transkriptioneller Aktivator von *KNAT1* erwarten. Dies war der Grund für die Untersuchung aller WIP-Proteine aus Arabidopsis auf Bindung an sämtliche Promotoren der *KNOX*-Gene der Klasse 1, was neben dem *KNAT1*-Promotor noch die Promotoren von *KNAT2*, *KNAT6* und *STM* einschließt. Der Fokus wurde jedoch auf den Promotor von *KNAT1* gelegt, da in diesem Fall die meisten Indizien für eine Interaktion – zumindest mit WIP2 – sprachen.

4.5.5.1. Versuche in der At7-Zellsuspensionskultur

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bindung der WIP-Proteine an Promotoren von *KNOX*-Genen der Klasse 1, die im heterologen Hefesystem gezeigt werden konnte, im homologen At7-Zellsuspensionskultursystem nicht nachvollzogen werden (vgl. Abschnitt 3.2.5.1.). Hierbei wurden Fusionsproteine, die aus einem WIP-Bestandteil und der VP16 Aktivierungsdomäne aus dem *Herpes simplex* Virus bestanden, auf Aktivierungspotenzial für die *KNOX*-Promotoren getestet. Die Erwartung bei diesem System war, dass bei einer Bindung der Fusionsproteine an die getesteten *KNOX*-Promotoren, die durch den WIP-Teil der Proteine vermittelt werden muss, eine Aktivierung durch die VP16-Domäne erfolgt. Das System kann demnach Entscheidungen über mögliche Funktionen als transkriptionelle Aktivatoren der WIP-Proteine nicht erleichtern, sondern lässt lediglich Bindefähigkeit an Zielgenpromotoren demonstrieren.

Dass dies im Fall der potenziellen WIP-*KNOX*-Interaktion nicht gelungen ist, kann mehrere Gründe haben. Die WIP-Proteine könnten beispielsweise für eine korrekte Funktionalität zusätzliche Kofaktoren benötigen, die in der At7-Zellsuspensionskultur unter Umständen nicht vorhanden sind. Die At7-Zellen sind ursprünglich aus Hypokotylgewebe abgeleitet und sowohl *WIP*- als auch *KNAT1*- und *KNAT2*-Expression wird neben dem Sprossachsenmeristem auch im Hypokotyl gefunden. Eine Expression derartiger potenzieller zusätzlicher Faktoren in der At7-Kultur ist daher nicht unwahrscheinlich. Andererseits ist davon auszugehen, dass das genomweite Expressionsprofil der At7-Zellen durch die Kulturführung zunehmend verändert wurde und sich stark von dem der ursprünglichen Hypokotylzellen unterscheidet. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass die im Hefesystem gezeigte direkte Interaktion in Arabidopsis nicht stattfindet. Dagegen ist es unwahrscheinlich, dass in der At7-Kultur aufgrund von falsch gewählten Promotorfragmenten in den getesteten Reporterkonstrukten keine Interaktion demonstriert werden konnte. Im Fall des *KNAT1*-Promotors wurde beispielsweise exakt das Fragment analysiert, das im Hefesystem eine Bindung durch WIP2 zeigte („Fragment A“, vgl. Abschnitt 3.2.5.1.).

Eine weitere mögliche Erklärung dafür dass keine Interaktion im At7-System gezeigt werden konnte ist, dass die verwendeten Effektorstrukturen, die für die WIP:VP16 Fusionsproteine

kodieren, eventuell keine funktionellen Proteine liefern. Eine C-terminale Fusion der VP16-Aktivierungsdomäne, wie sie in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet wurde, könnte eventuell die Funktion der WIP-Domäne, die generell auch im C-terminalen Bereich der Proteine zu finden ist, außer Kraft setzen. Es wurde jedoch in den At7-Experimenten unter anderem untersucht, ob eine Aktivierbarkeit des „Fragment A“ durch ein GAL4AD:WIP2 Konstrukt erfolgt. Genau diese Kombination aus Reporter und Effektor hatte in den ursprünglichen Hefeexperimenten miteinander Interaktion gezeigt. Die GAL4-Aktivierungsdomäne, die normalerweise in Hefesystemen eingesetzt wird, weist auch in Pflanzen Aktivität auf (Ma *et al.*, 1988). Im At7-System wurde keine Aktivierung des „Fragment A“ durch GAL4AD:WIP2 beobachtet. Dies kann als Argument dafür aufgefasst werden, dass die Erklärung für die fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem Hefesystem in Arabidopsis doch nicht in fehlender Funktionalität der verwendeten Effektorstrukturen zu suchen ist.

Ein letztes und entscheidendes Problem bei der Durchführung der Interaktionsstudien in Arabidopsis könnte darin liegen, dass die WIP-Proteine, wie in Abschnitt 4.5.4. (und in Abschnitt 4.2.2. im Fall von TT1) diskutiert, *in vivo* eine Rolle als transkriptionelle Repressoren ausüben könnten. Wenn man eine solche Rolle voraussetzen würde, wäre es denkbar, dass die potenzielle reprimierende Funktion die aktivierenden Eigenschaften der VP16-Domäne in entsprechenden Fusionsproteinen dominieren könnte. In diesem Fall könnten Fusionsproteine die potenziellen Zielgenpromotoren nicht aktivieren. Das gleiche Argument gilt in noch stärkerem Maße für den GAL4AD:WIP2-Effektor mit der gegenüber der VP16-Domäne noch schwächeren Aktivierungsdomäne. Die potenziell reprimierenden Eigenschaften der WIP-Proteine könnten im Hefesystem eventuell nicht funktionell sein, wodurch der Nachweis der Bindung der WIP-Proteine an *KNOX*-Gen Klasse 1 Promotoren durch *Yeast One-Hybrid* Experimente ermöglicht wird. Auf diese Weise ließe sich erklären, dass Ergebnisse, die im Hefesystem gewonnen wurden im Arabidopsissystem nicht reproduzierbar sind.

4.5.5.2. *KNAT1* Expression im *wip2 knock out* Hintergrund

Da wie oben erläutert der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen *KNOX*-Gen Klasse 1 Expression und *WIP*-Expression in Arabidopsis nicht gelungen ist und eventuell generelle Probleme bei der Nutzung des At7-Systems für diesen Zweck bestehen, jedoch Daten – unter anderem aus Hefeexperimenten – für einen solchen Zusammenhang sprechen (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht), wurde zur Bestätigung der *WIP2/KNAT1* Interaktion in Arabidopsis ein weiterer experimenteller Ansatz verwendet.

Es wurde hierzu das *KNAT1*-Expressionsmuster im *wip2 knock out* Hintergrund mit dem im Wildtyphintergrund verglichen, wobei eine Verbreiterung des Musters in Abwesenheit des WIP2-Proteins beobachtet wurde. Dies steht im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen, die eine Verbreiterung des *KNAT1*-Expressionsmusters im *WIP2*-Überexpressionshintergrund enthalten (Kuijt, 2005). Allerdings wurde verbreiterte *KNAT1*-Expression dort lediglich im Fall von *WIP2*-Überexpressionslinien mit starkem Phänotyp gefunden. Die entsprechenden Pflanzen wiesen eine generell veränderte Morphologie auf, die einen Vergleich der *KNAT1* exprimierenden Gewebe mit den entsprechenden Geweben in Wildtyppflanzen erschweren. Da sich *wip2 knock out* Pflanzen des für die Untersuchung der *KNAT1* Expression verwendeten Stadiums (5 Tage nach Keimung) morphologisch nicht vom Wildtyp unterscheiden lassen, lassen sich diese mit größerer Sicherheit für einen Vergleich mit Wildtyppflanzen verwenden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Anwesenheit des WIP2-Proteins die Expression von *KNAT1* einschränkt.

Dies ließe sich mit einer WIP2-Funktion als *KNAT1*-Promotor-bindender Transkriptionsfaktor vereinbaren, wenn man negativ regulatorische Eigenschaften zugrunde legt. Weiterhin würde es nicht im Widerspruch zu den Daten aus *Yeast One-Hybrid* Experimenten (Pieter Ouwerkerk, unveröffentlicht) stehen, da dort die heterologe GAL4-Aktivierungsdomäne mit dem WIP2-Protein fusioniert wurde, das potenzielle negativ regulatorische Signal in Hefe eventuell nicht funktionell ist und auf diese Weise das Fusionsprotein zu einem wirksamen Aktivator werden könnte, wie er in dem Hefesystem benötigt würde. Eine WIP2 vermittelte Repression der *KNAT1*-Expression würde auch nicht notwendigerweise im Widerspruch zu den sich gleichenden Phänotypen der *KNAT2*- und der *WIP2*-Überexpression stehen, da der Zusammenhang zwischen *KNAT1*- und *KNAT2*-Expression zurzeit nicht vollständig geklärt ist (Kuijt, 2005). Andererseits kann der hier postulierte WIP2/*KNAT1*-Zusammenhang aber auch nicht zur Erklärung des *KNAT2*-Überexpressionsphänotyps dienen.

Für den beschriebenen Vergleich der *KNAT1*-Expression im Wildtyphintergrund mit dem *wip2 knock out* Hintergrund wurde eine Kreuzung zwischen einer Col-0::Pro_{*KNAT1*}:GUS Linie und einer *wip2 knock out* Linie durchgeführt. Da die Selektionsmarker für die *knock out* Linie und die Promotor-GUS Linie die gleichen waren, war in der F₂-Generation eine Segregationsanalyse zur Bestimmung der Anzahl der Insertionen des Promotor-GUS Konstrukts in der entsprechenden Parentallinie erschwert. Stattdessen wurde eine Genotypisierung in der F₂-Generation durchgeführt, die die Anwesenheit des GUS-Allels bei einem Anteil von etwa drei Vierteln der Pflanzen ergab – genauer bei 46 von 64 Individuen (siehe Abschnitt 3.2.5.2.). Dieses Verhältnis lässt auf die Anwesenheit von einer einzigen Insertion des Promotor-GUS Konstrukts in der entsprechenden Parentallinie schließen. Aus

diesem Grund sind Positionseffekte im späteren Vergleich der *KNAT1*-Expression zwischen Wildtyphintergrund und *wip2 knock out* Hintergrund weitestgehend auszuschließen.

4.5.5.3. Schlussfolgerungen

Wie oben erläutert sprechen einige Ergebnisse für eine direkte Bindung des WIP2-Proteins an den *KNAT1*-Promotor. Eine Rolle als negativ regulierender Transkriptionsfaktor ist hierbei wahrscheinlich. Es ist aber nach wie vor nicht auszuschließen, dass keine direkte Bindung stattfindet und WIP2 seine Rolle in der Beeinflussung des *KNAT1*-Expressionsprofils auf andere Weise ausübt. Wie auch in Abschnitt 4.2.3. für TT1 diskutiert sind andere Rollen nach wie vor ebenfalls denkbar. Hierbei könnte WIP2 seine Funktion auch auf indirektem Weg ausüben indem weitere, bislang unbekannte Faktoren beeinflusst werden könnten.

Ein Einfluss, den die übrigen WIP-Proteine auf die *KNOX*-Gen Klasse 1 Expression ausüben könnten, ist bislang nicht eingehender untersucht. Dies könnte ebenfalls über entsprechende Promotor-GUS Linien geschehen, indem die *KNOX*-Expression im *wip knock out* Hintergrund mit dem Wildtyphintergrund verglichen werden könnte. In diesem Zusammenhang bereits untersucht ist die WIP2-unabhängige *KNAT2*-Expression. Weitere potenziell biologisch relevante Zusammenhänge könnten zwischen WIP3 sowie WIP4 und den *KNOX*-Genen der Klasse 1 bestehen, da diese ebenfalls im Sprossachsenmeristem exprimiert werden.

4.6. Weiterführende Experimente zur Rolle der *WIP*-Gene

4.6.1. Experimente basierend auf *tt1*-Komplementation

4.6.1.1. Mögliche Äquivalenz der WIP-Proteine

Zur Überprüfung, ob die WIP-Proteine funktionell äquivalent sind und unterschiedliche Rollen lediglich aus unterschiedlichen Expressionsmustern resultieren, würde sich anbieten die cDNAs der verschiedenen *WIP*-Gene in Kombination mit dem *TT1*-Promotor im *tt1 knock out* Hintergrund zu Komplementationsexperimenten einzusetzen. Dieses System würde sich vor allem aus dem Grund anbieten, da lediglich im Fall von *tt1* ein leicht zu observierender *knock out* Phänotyp existiert. Sollten entsprechende $\text{Pro}_{TT1}:\text{WIP}$ -cDNA Konstrukte zur Komplementation befähigt sein, wäre dies ein deutlicher Hinweis dafür, dass funktionelle Äquivalenz vorliegt.

4.6.1.2. Domänen innerhalb der WIP-Proteine

Es würde sich dann weiterhin die Frage stellen, ob die Funktion der WIP-Proteine weitestgehend oder zumindest teilweise in der hoch konservierten WIP-Domäne begründet liegt. Zur Beantwortung dieser Frage ließe sich ein analoges Experiment zu 4.6.1.1.

durchführen, indem lediglich der für die WIP-Domäne kodierende cDNA-Bereich in Kombination mit dem TT1-Promotor verwendet wird, um den *tt1 knock out* Phänotyp zu komplementieren.

Sollten die Vollängen-WIP-Proteine zur Komplementation von *tt1* befähigt sein, die WIP-Domäne alleine jedoch nicht, würde sich das System eignen, um funktionell entscheidende Bereiche innerhalb der Proteine zu definieren, indem lediglich Teile des Proteins – die jedoch in jedem Fall die WIP-Domäne enthalten sollten – zur Komplementation eingesetzt werden. Entsprechende Blockmutationen ließen sich problemlos in bereits vorhandene Konstrukte einführen. Hierbei würde sich vor allem anbieten, die weiteren, weniger stark konservierten Domänen (siehe Abb. 3-5 B) zu untersuchen. Selbst wenn eine Komplementation mit WIP2 bis WIP6 nicht möglich sein sollte, könnte der experimentelle Ansatz mit TT1 selbst verwendet werden, indem die angesprochenen Blockmutationen in TT1-Konstrukte eingeführt werden.

4.6.2. Fehlende *knock out* Phänotypen

Es wäre wünschenswert, wenn neben dem offensichtlichen *tt1 knock out* Phänotyp ebensolche für die weiteren WIP-Gene verfügbar würden. Ein relativ subtiler Schotenphänotyp wurde für WIP2 beschrieben (Crawford *et al.*, 2007), jedoch für keines der weiteren WIP-Gene. Die Gründe hierfür könnten in den teilweise redundanten Expressionsmustern liegen. Um diesem Problem zu begegnen, könnte es sich als unumgänglich erweisen Mehrfach-*knock-out* Pflanzen zu generieren. Für die bezüglich des Expressionsmusters ähnlichsten Gene WIP2 und WIP3 ist dies bereits im Rahmen dieser Arbeit geschehen, es wurde jedoch kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp offenbar. In diesem Zusammenhang praktikabel erscheint eventuell noch die Erstellung einer Dreifach-Mutante, was für den Fall *wip2 wip3 wip4* am aussichtsreichsten erscheint, da die WIP4-Expression am ehesten der von WIP2 und WIP3 ähnelt.

Sollte es ermöglicht werden einen leicht zu observierenden Phänotyp neben TT1 für die weiteren WIP-Gene zu generieren, könnte dies die Grundlage für weiterführende Experimente liefern, wie sie beispielsweise im Abschnitt 4.6.1. beschrieben wurden.

Im Zusammenhang mit Mehrfach-*knock-outs* könnte auch die Abhängigkeit der KNOX-Gen Klasse 1 Expression von den WIP-Proteinen tiefergehend analysiert werden. Wie in Abschnitt 4.5.5.2. detailliert beschrieben besteht zumindest eine Abhängigkeit der *KNAT1*-Expression von WIP2. Da WIP3 ebenfalls einen Einfluss haben könnte wäre es unter Umständen sinnvoll die *KNAT1*-Expression im *wip2 wip3* Doppel-*knock-out* Hintergrund zu untersuchen. Die Generierung einer dafür benötigten Pro_{KNAT1}:GUS Linie würde die

Kreuzung mit der seit kurzem verfügbaren *wip2 wip3* Linie mit anschließender Genotypisierung der F2-Generation bedingen und steht noch aus.

4.7. Die Analyse der *WIP*-Gene erleichtert die Aufklärung der *TT1*-Funktion nicht wesentlich

Wie eingangs in Abschnitt 4.5. erwähnt bot sich durch die Analyse der *WIP*-Genfamilie in ihrer Gesamtheit die theoretische Möglichkeit weitergehende Hinweise zur Funktion von *TT1*, dem ersten Mitglied der Familie, zu erhalten. Insbesondere galt dies, da sich durch die erhöhte Zahl potenziell molekular auf gleiche Weise agierender Faktoren Hinweise hätten ergeben können. Durch die hier präsentierten Ergebnisse wird jedoch ersichtlich, dass ein gegenteiliger Zusammenhang besteht. Die Funktionsaufklärung von *TT1* wird voraussichtlich die Funktionsaufklärung für die übrigen *WIP*-Gene erleichtern. Dies ist der Fall, da lediglich für *TT1* ein leicht zu beobachtender Phänotyp im Fall des *knock outs* verfügbar ist. Weiterhin besitzt *TT1* das am klarsten definierte und spezifischste Expressionsmuster, was eventuell auch ein entscheidender Grund für das Vorhandensein des *knock out* Phänotyps ist.

Alles in Allem lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Konzentration auf die Analyse der *TT1*-Funktion zur Klärung der molekularen Wirkungsweise aller Bestandteile der *WIP*-Genfamilie aussichtsreicher erscheint als der Versuch der gleichzeitigen Betrachtung von *WIP2* bis *WIP6*.

4.8. Kontrolle des Flavonoid-Metabolismus durch MYB-Transkriptionsfaktoren

4.8.1. Funktion der PFG-MYB-Proteine

4.8.1.1. Die PFG-MYB-Proteine verhalten sich funktionell ähnlich

Die Gene *MYB11*, *MYB12* und *MYB111* bilden die Untergruppe 7 der *A. thaliana* *R2R3-MYB* Genfamilie (Stracke *et al.*, 2001). Sie sind im Flavonoid-Metabolismus direkt an der Bildung von Flavonolen durch die Regulation von Strukturgenen wie *CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS* beteiligt. Sie haben jedoch noch weitere Zielgene, die teilweise im Rahmen dieser Arbeit durch Ko-Transfektionsexperimente bestätigt wurden, unter anderem Glykosyltransferasen, die möglicherweise an der Synthese von Flavonolglykosiden beteiligt sind. Sie werden daher zur Gruppe der *PFG*-Gene zusammengefasst, wobei sich diese Bezeichnung auf die Charakterisierung als für die Produktion von Flavonolglykosiden benötigte Gene (*PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES*) bezieht. Weitere potenzielle Zielgene, die

wie auch die oben beschriebenen Zielgene, durch Analyse von Expressionsdaten aus ATH1-Genchip-Experimenten mit Pflanzenmaterial aus Wurzeln von *myb11 myb12 myb111* Dreifach-Mutanten und entsprechendem Material aus Col-0 Wildtyppflanzen ermittelt wurden, haben teilweise noch unbekannte Funktionen (Stracke *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden für Glykosyltransferasen kodierenden Gene At2g22590 und At4g15480 sowie das für ein Membran-verankertes Protein kodierende Gen At5g62210 durch Ko-Transfektionsexperimente im At7-Zellsuspensionskultursystem als Zielgene der PFG-MYB-Proteine bestätigt. Auch für die übrigen potenziellen Zielgene, die hier nicht tiefergehend beschrieben werden sollen, ist eine Überprüfung durch analoge Experimente möglich und wird durchgeführt (Jahns, unveröffentlicht).

Die drei *PFG-MYB*-Gene *MYB11*, *MYB12* und *MYB111* zeichnen sich, wie in den Ko-Transfektionsexperimenten exemplarisch nachgewiesen wurde, durch ein ähnliches Aktivierungsverhalten von ihren Zielgenpromotoren aus. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren Expressionsmustern. So wird *MYB11* in unterschiedlichen Geweben von Keimlingen wie beispielsweise dem Sprossachsenmeristem, Wurzelspitzen und Teilen der Kodyledonon schwach exprimiert. Im Fall von *MYB12* wird eine deutliche Expression in Keimlingen hauptsächlich in Wurzeln beobachtet wohingegen *MYB111* hauptsächlich in Kodyledonon exprimiert wird (Stracke *et al.*, 2007). Es ist daher davon auszugehen das die drei *PFG-MYB*-Proteine jeweils eine ähnliche Rolle gewebspezifisch ausüben, was durch ihre unterschiedlichen Expressionsmuster ermöglicht wird.

Eine Rolle im Flavonoidmetabolismus ist durch die Analyse methanolischer Extrakte aus Keimlingen von Col-0 Wildtyppflanzen und *myb* Mutanten der *PFG-MYB*-Gene nachgewiesen worden (Stracke *et al.*, 2007). Die stärksten Effekte wurden im Fall von *myb12 myb111* Doppelmutanten und im Fall der *myb11 myb12 myb111* Dreifachmutante gefunden, die weitgehend einem *chs knock out* glich und sich durch die praktisch komplette Abwesenheit von Flavonolen auszeichnete. Die gewebspezifische Rolle der *PFG-MYB*-Proteine wurde durch NaturstoffreagenzA-Färbung von durch Norflurazon gebleichten Keimlingen überprüft (Stracke *et al.*, 2007). Auf diese Weise ließ sich zeigen, dass passend zu den Expressionsmustern der drei *PFG-MYB*-Gene in entsprechenden Einfach-, Doppel- oder Dreifach-Mutanten ein gewebspezifisches Ausbleiben der Flavonolbiosynthese erfolgte.

4.8.1.2. Die Rolle der PFG-MYB kontrollierten Glykosyltransferasen

Da neben dem Ausmaß der Flavonolglykosylierung und deren Funktion auch die Regulation der meisten Glykosyltransferasen und deren Expressionsmuster momentan nicht geklärt sind, kann über die Rolle der in dieser Arbeit bestätigten *PFG-MYB* kontrollierten

Glykosyltransferasen UGT91A1 und UGT84A1 (Bowles, 2002), die von den Genen At2g22590 und At4g15480 kodiert werden, lediglich spekuliert werden (Stracke *et al.*, 2007). Sie könnten an der Glykosylierung bestimmter Flavonole oder Flavonolglykoside beteiligt sein. Ähnliche Funktionen sind bereits für UGT73C6 und UGT78D1 gezeigt, die Zuckerreste auf spezifische Flavonole und Flavonolglykoside übertragen (Jones *et al.*, 2003). UGT78D1 katalysiert die Übertragung von Rhamnose an die 3-OH Position von Quercetin und Kämpferol wohingegen UGT73C6 die Übertragung von Glukose an die 7-OH Position von Flavonol-3-O-Glykosiden katalysiert. Ein weiteres Beispiel einer Glykosyltransferase deren mögliche Beteiligung am Flavonoidmetabolismus durch *in vitro* Experimente gezeigt wurde, in denen eine katalytische Funktion bei der Bildung von Glukose-Estern von Sinapinsäure und anderen Zimtsäuren nachgewiesen wurde, stellt UGT84A1 dar (Lim *et al.*, 2001; Messner *et al.*, 2003). Da demnach bereits anhand einiger Beispiele eine Beteiligung bestimmter Glykosyltransferasen am Flavonoidmetabolismus demonstriert wurde und weiterhin ein regulatorischer Einfluss der PFG-MYB-Proteine auf die Biosynthese der Flavonole nachgewiesen ist, liegt die Vermutung der Regulation von Glykosyltransferasen, die an der Glykosylierung von Flavonolen und Flavonolglykosiden beteiligt sind nahe. Die PFG-MYB-kontrollierten Enzyme UGT91A1 und UGT84A1 könnten Beispiele für derartige Glykosyltransferasen darstellen, was noch durch Mutantanalyse überprüft werden muss.

4.8.1.3. Weiterführende Experimente

Wie oben bereits erwähnt können noch weitere potenzielle Zielgene der PFG-MYB-Transkriptionsfaktoren durch Verwendung des At7-Zellsuspensionskultursystems untersucht werden. Versuche in diese Richtung werden derzeit durchgeführt (Jahns, unveröffentlicht).

Um eine tatsächlich redundante Funktion der PFG-MYB-Proteine hinsichtlich ihrer Zielgene nachzuweisen bietet sich an, alle möglichen Kombinationen von *PFG-MYB*-Promotoren mit *PFG-MYB*-cDNAs zur Transformation von *myb11 myb12 myb111* Pflanzen einzusetzen. Die entsprechenden resultierenden Phänotypen sollten Doppel-*knock-out* Pflanzen entsprechen, die ein funktionelles Gen besitzen, das dem Promotor in dem zur Transformation der Dreifach-Mutante eingesetzten Konstrukt entspricht. (Beispiel: Der Phänotyp von *myb11 myb12 myb111::Pro_{MYB12}:MYB111* sollte dem von *myb11 myb111* entsprechen.) Derartige Versuche sind teilweise bereits durchgeführt worden (Ruhe, 2007). Die Ergebnisse sind größtenteils noch detailliert zu untersuchen.

Zur Bestätigung vermuteter Zielgene der PFG-MYB-Proteine kann über die Analyse von Ko-Transfektionsergebnissen hinausgehend vergleichende qPCR mit Zielgen-spezifischen Primern auf Pflanzenmaterial der *myb11 myb12 myb111* Dreifach-Mutante einerseits und auf Material von Col-0 Wildtyp andererseits durchgeführt werden. Tatsächlich konnte die

Glykosyltransferase UGT91A1 erwartungsgemäß sowie einige weitere potenzielle Zielgene erstmalig auf diesem Weg bestätigt werden (Jahns, 2007). Weitere diesbezügliche Versuche stehen aus. Darüber hinaus sollte die Untersuchung von Überexpressionsmutanten der verschiedenen *PFG-MYB*-Gene, die die jeweiligen MYB-Proteine ektopisch in jeweils gleicher Art exprimieren, mittels qPCR ein weiteres Mittel zur Überprüfung möglicher funktioneller Äquivalenz zur Verfügung stellen. Derartige Experimente sind teilweise ebenfalls durchgeführt worden (Jahns, 2007).

Einen weiteren Ansatzpunkt bietet die Analyse von *Pro_{35S}:MYB12:EAR* Konstrukten im At7-Zellsuspensionskultursystem sowie *in planta*. Experimente in dieser Richtung wurden ebenfalls teilweise durchgeführt (Appelhagen, 2007) oder sind in Vorbereitung (Appelhagen, unveröffentlicht).

4.8.2. Negativ-regulatorische Eigenschaften von MYBL2

4.8.2.1. MYB-Transkriptionsfaktoren mit reprimierenden Eigenschaften

MYB-Transkriptionsfaktoren übernehmen in der Regel eine Rolle als transkriptionelle Aktivatoren (Weston und Bishop, 1989; Foos *et al.*, 1994). Das erste Beispiel für einen R2R3-MYB-Transkriptionsfaktor mit Eigenschaften als transkriptioneller Repressor in Arabidopsis war das MYB4-Protein, das als Hauptzielgen das Gen des für die Sinapatbiosynthese benötigten Enzyms Cinamat-4-hydroxylase hat. Für MYB4 wurde gezeigt, dass es eine Repressionsdomäne enthält und somit wahrscheinlich einerseits aktiven Einfluss auf die Zielgenexpression ausübt und andererseits durch Konkurrenz mit Aktivatoren um Bindestellen am Zielgenpromotor wirkt (Jin *et al.*, 2000). MYB4 gehört der Untergruppe 4 der R2R3-MYB-Proteine an, in die darüber hinaus die Genprodukte von *MYB3*, *MYB7* und *MYB32* fallen (Stracke *et al.*, 2001). Für diese weiteren Mitglieder der Untergruppe 4 ist die exakte molekulare Funktion noch nicht aufgeklärt worden. Es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, dass sie eine zu MYB4 ähnliche Funktion besitzen und somit ebenfalls als negative transkriptionelle Regulatoren fungieren könnten.

Ein weiteres Protein, das der Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren angehört und das negativ-regulatorische Eigenschaften zu besitzen scheint, ist das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte MYBL2 (siehe Abschnitt 3.3.2.). Es fällt jedoch im Gegensatz zu *MYB4* in die Klasse der *single repeat MYB*-Gene. Weitere Beispiele für *single repeat MYB*-Gene, die ebenso wie *MYBL2* keine Aktivierungsdomäne enthalten, sind *TRIPTYCHON (TRY)* und *CAPRICE (CPC)*. *TRY* und *CPC* sind negative Regulatoren für die Trichomentwicklung und nehmen Einfluss auf das Muster der Wurzelhaarbildung (Schellmann *et al.*, 2002). Der exakte molekulare Mechanismus hierfür ist jedoch nicht im Detail geklärt. Es wird angenommen, dass *TRY* einen negativen Einfluss auf die Funktion von *GL1* nimmt und auf

diese Weise die Zelldifferenzierung in Richtung Trichomzellen behindert (Schnittger *et al.*, 1998). Weiterhin ist in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten gezeigt worden, dass TRY und CPC mit bHLH-Faktoren interagieren können (Zhang *et al.*, 2003). Eine solche Interaktion könnte für die beobachteten negativ-regulatorischen Eigenschaften essenziell sein.

4.8.2.2. Möglicher Wirkmechanismus von MYBL2

Für MYBL2 konnte ein negativ-regulatorischer Einfluss auf die Aktivierbarkeit des DFR-Promotors im At7-Zellsuspensionskultursystem durch die Transkriptionsfaktorkomplexe TT2/TT8/TTG1 und PAP1/EGL3/TTG1 gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.3.2.). Es stellt sich hierbei nach wie vor die Frage nach dem genauen molekularen Wirkmechanismus.

Für die beiden oben genannten Transkriptionsfaktorkomplexe aus MYB-, bHLH- und WD40-Proteinen sind die Bindestellen im DFR-Promotor nicht exakt bekannt. Es ist denkbar, dass sie die gleichen Bindestellen erkennen, was bedeuten würde, dass in beiden Fällen ein prinzipiell ähnlicher Transkriptionsfaktoren-DNA-Komplex vorliegt, dessen Bildung durch die Anwesenheit von MYBL2 gestört wird. Somit ist eine ganze Anzahl an Wirkmechanismen von MYBL2 denkbar. MYBL2 könnte die entsprechende DNA-Sequenz im DFR-Promotor ebenfalls binden und somit die Aktivierung durch die Aktivatoren kompetitiv hemmen. Andererseits ist bekannt, dass TT2 und PAP1 nicht unbedingt die gleichen MYB-Erkennungselemente in ihren Zielgenpromotoren erkennen müssen (Baudry *et al.*, 2004). Daher ist ebenso gut möglich, dass TT2/TT8/TTG1 und PAP1/EGL3/TTG1 an unterschiedlichen Stellen im DFR-Promotor binden. Theoretisch ist auch eine aktive Repression durch MYBL2 wie im Fall von MYB4 denkbar, wobei eine DNA-Bindung ebenso gut an einer anderen Stelle im DFR-Promotor erfolgen könnte, wenngleich ein solcher Mechanismus aufgrund der im Vergleich zu MYB4 geringeren Größe von MYBL2 unwahrscheinlich ist.

Ein Argument, das gegen eine direkte DNA-Bindung von MYBL2 spricht, ist, dass ein MYBL2:VP16-Konstrukt ebenso wie ein VP16:MYBL2-Konstrukt nicht in der Lage war den DFR-Promotor im At7-System zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Entsprechende Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit in An- und Abwesenheit von TT8 und EGL3, die als zusätzliche bHLH-Faktoren erforderlich hätten sein können, durchgeführt. Das zusätzlich für eine Aktivierung durch die eingangs genannten MYB/bHLH-Kombinationen (TT2/TT8, PAP1/EGL3) benötigte WD40-Protein TTG1 wird in der At7-Zellsuspensionskultur konstitutiv exprimiert.

Neben der direkten DNA-Bindung durch MYBL2 ist aber auch denkbar und sogar wahrscheinlicher, dass eine Störung der Ausbildung der Transkriptionsfaktor-Proteinkomplexe oder eine zusätzliche Bindung an diese erfolgt. Hierbei könnte MYBL2

beispielsweise den jeweiligen bHLH-Partner – TT8 und EGL3 – binden und somit die frei verfügbare Konzentration herabsetzen und somit die Bildung der MYB-Aktivator/bHLH-Komplexe verhindern, die zur Aktivierung des Promotors vermutlich benötigt werden (Baudry *et al.*, 2004). Eine solche Bindung zwischen *single repeat* MYB-Faktor und bHLH-Faktor ist wie oben erwähnt bereits für *CPC* und *TRY* gezeigt worden. Auch bei einer angenommenen Funktion unter Bindung der Aktivatorkomplexe ist es darüber hinaus möglich, dass MYBL2 über eine aktive Repressionsdomäne verfügt, die trotz Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an die korrekte Bindestelle im DFR-Promotor dessen aktivierenden Eigenschaften ausschalten könnte.

4.8.2.3. Weiterführende Experimente

Um Entscheidungen über den Wirkmechanismus von MYBL2 treffen zu können, sind weiterführende Experimente notwendig. Es gibt hierbei mehrere Ansatzpunkte.

Die Beantwortung der Frage, ob MYBL2 seine Funktion unter direkter DNA-Bindung ausübt, könnte durch die Überprüfung erfolgen, ob MYBL2 in der Lage ist, die Aktivierung des *BAN*-Promotors durch TT2/TT8 herabzusetzen. Sollte dies der Fall sein wird ein Mechanismus über die Bindung der Transkriptionsfaktorkomplexe anstelle der DNA wahrscheinlicher. Für TT2/TT8 wurde wie oben erläutert im Fall der Aktivierung des *DFR*-Promotors bereits ein Einfluss von MYBL2 nachgewiesen. Dahingegen erscheint die Störung durch Bindung eines zum *DFR*-Promotor analogen Elements im *BAN*-Promotor unwahrscheinlicher. Entsprechende Versuche im At7-System sind in Vorbereitung.

Ob MYBL2 eine aktive Repressionsdomäne besitzt, könnte ebenfalls mit Hilfe des At7-Systems geklärt werden. Hierzu könnte ein Effektor-konstrukt verwendet werden, das für ein Fusionsprotein aus GAL4-Bindedomäne (GAL4BD) und MYBL2 kodiert. Als Reporter-konstrukt könnte eines dienen, das *GAL4-UAS* Bereiche (*upstream activation sequence*) vor einem *uidA*-ORF mit basaler Expression trägt, die durch die Zugabe eines GAL4BD-Repressor-Proteins herabgesetzt werden könnte. Ein solches System wurde bereits eingesetzt, um die negativ regulatorischen Eigenschaften von MYBL4 nachzuweisen (Jin *et al.*, 2000).

4.9. Ausblick

Weiterführende Fragestellungen, die sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergeben, mögliche experimentelle Ansätze, die zu deren Beantwortung beitragen können sowie weiterführende Experimente, die durch die Generierung der neu aufgebauten Pflanzenpopulation ermöglicht wurden, sind bereits oben konkret angesprochen worden.

Generell haben die präsentierten Daten demonstriert, dass auch bei der Untersuchung bereits bekannter und größtenteils erforschter Proteinklassen, Transkriptionsfaktorklassen beziehungsweise deren Mitgliedern in vielen Fällen immer noch unbeantwortete Fragen bestehen. Vor allem deutlich wird dies im Fall von TT1, dessen Beteiligung an physiologischen Prozessen seit längerer Zeit bekannt ist – dessen molekulare Funktion aber nach wie vor ungeklärt bleibt. Es wurden diverse Ansätze aufgezeigt, die zur Klärung seiner Funktion beitragen werden. Viele dieser Ansätze sind zwar zeitaufwendig, aber könnten die einzige Möglichkeit darstellen zu neuen oder umfassenderen Kenntnissen hinsichtlich der Proteinfunktion zu gelangen. Das für die Durchführung neuartiger Versuche in diesem Bereich und deren Interpretation benötigte Material konnte im Rahmen dieser Arbeit generiert werden. Die in *Arabidopsis* gewonnenen beziehungsweise noch ausstehenden Erkenntnisse bezüglich TT1 könnten sich als unerlässlich für das Verstehen der TT1-Genfunktion in anderen Organismen, wie beispielsweise Raps erweisen, in denen das Verständnis des Flavonoidmetabolismus im Samengewebe durchaus von wirtschaftlichem Wert sein kann und ist.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die WIP-Proteinklasse der C2H2-Zinkfinger in *A. thaliana* erstmalig detailliert beschrieben. Dies geschah einerseits im Hinblick auf mögliche Redundanzen zur molekularen TT1-Wirkungsweise, andererseits demonstrierte es, dass paraloge Gene in einem gegebenen Organismus durchaus grundsätzlich verschiedene physiologische Funktionen ausüben kann. Da sich die von TT1 verschiedenen Mitglieder der WIP-Proteinfamilie nicht als bequemer zu analysieren erwiesen haben, konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die TT1-Funktionsaufklärung am besten durch TT1-spezifische experimentelle Ansätze zu erfolgen hat.

Die im Rahmen der Experimente zu MYB-Transkriptionsfaktoren präsentierten Ergebnisse werden dazu beitragen, die vielfältigen Funktionen dieser Proteineklasse im Flavonoidmetabolismus wie im Fall der PFG-MYB-Transkriptionsfaktoren aufzuklären und könnten darüber hinaus zum Verständnis bislang nicht detailliert aufgeklärter molekularer Mechanismen beitragen, wie der Wirkungsweise der *single repeat* MYB-Proteine im Fall von MYBL2. Die Beispiele der hier behandelten MYB-Gene demonstrieren, dass sich auch in bereits intensiv untersuchten Forschungsfeldern Ansatzpunkte für die Untersuchung bislang unbekannter Zusammenhänge bieten, die von generellem Interesse für das Verständnis physiologischer und molekularer Mechanismen sein können.

5. Zusammenfassung

Flavonoide, die sich weiter in Anthocyane, Flavonole und Proanthocyanidine aufgliedern, stellen eine wichtige Stoffklasse mit vielfältigen Funktionen im pflanzlichen Sekundärmetabolismus dar. Da mit ihrer Biosynthese ein attraktives Modell zur Analyse der Genexpression und deren Regulation in Pflanzen vorliegt, sind sie bereits seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Die Grundlagen ihrer Biosynthese im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* aber auch in anderen Organismen sind daher teilweise bereits auf molekularer Ebene gut verstanden. Viele der regulatorisch entscheidenden Transkriptionsfaktoren sind charakterisiert. Ein großer Anteil dieser Regulatoren gehört der Klasse der MYB- und der bHLH-Transkriptionsfaktoren an. Es sind an der Flavonoidbiosynthese jedoch noch weitere Proteinklassen wie WD40- oder bZIP-Transkriptionsfaktoren beteiligt. Mit *TT1* wurde darüber hinaus ein Gen beschrieben, das für ein C₂H₂-Zinkfingerprotein kodiert, welches für die Proanthocyanidinbiosynthese eine entscheidende Rolle spielt. Für viele der angesprochenen Regulatoren sind Zielgenspezifitäten sowie DNA- oder Protein-Interaktionspartner bekannt. Es erweist sich jedoch zunehmend, dass neben den bereits bekannten Regulationsmechanismen im Flavonoidmetabolismus weitere eine Rolle spielen können, deren Natur auf molekularer Ebene noch nicht verstanden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen bezüglich der *TT1*-Funktion in *A. thaliana* durchgeführt, da für dieses Gen bislang weder der Wirkmechanismus noch Interaktionspartner bekannt waren und der *knock out* Phänotyp nur angenommen werden konnte, weil keine stabilen Pflanzenlinien ohne *TT1*-Genfunktion verfügbar waren. In diesem Zusammenhang konnte eine stabile *knock out* Linie unter Verwendung einer instabilen Transposonlinie generiert und deren Phänotyp charakterisiert werden, der in einem drastisch verringertem Proanthocyanidingehalt im Samenschalenendothel besteht, wobei jedoch ein punktuelleres Auftreten von Proanthocyanidinen im gesamten Endothel beobachtet werden kann und die Mikropyle und die Chalaza hinsichtlich deren Synthese unverändert erscheinen. Durch die TILLING-Methode konnten mehrere bislang unbekannte Mutationen im *TT1*-Gen detektiert werden, die nun zur Untersuchung einer allelischen Serie zur Verfügung stehen. Es konnte darüber hinaus im Rahmen von Interaktionsstudien unter Verwendung einer *A. thaliana* Zellsuspensionskultur eine Reihe am Flavonoidmetabolismus beteiligter Gene als direkte Ziele von TT1 ausgeschlossen werden.

Mit dem Ziel, weiteren Aufschluss über die *TT1*-Funktion zu erlangen sowie die Regulation in den samenspezifischen Geweben der Mikropyle und der Chalaza hinsichtlich Proanthocyanidinbiosynthese zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine EMS-

mutagenisierte Population von *tt1-1* knock out Pflanzen generiert. Die M2- und die M3-Generation dieser Population stehen nun ebenfalls zu weiterführenden Untersuchungen zur Verfügung und wurden bereits teilweise hinsichtlich des Samenschalenphänotyps untersucht. Im Zusammenhang mit abweichender Regulation der Proanthocyanidinbiosynthese in Mikropyle und Chalaza wurde darüber hinaus die Beteiligung des bHLH-Transkriptionsfaktors GL3 untersucht, wobei ein solcher Einfluss ausgeschlossen werden konnte.

Ebenfalls wurde die aus insgesamt sechs Mitgliedern bestehende Familie der *WIP*-Gene, der auch *TT1* angehört, im Ganzen untersucht. *TT1* ist das bislang am besten untersuchte Mitglied dieser Genfamilie. Für die übrigen Mitglieder konnte im Rahmen dieser Arbeit das Expressionsprofil, die nukleäre Lokalisation sowie Überexpressionsphänotypen ermittelt werden. *Knock out* Linien wurden identifiziert und phänotypisch untersucht. Hierbei konnte der für *WIP2* seit kurzem bekannte Phänotyp reproduziert werden. Darüber hinaus erfolgte die Analyse potenzieller Zielgene, der *KNOX* Gene der Klasse 1, durch Interaktionsstudien in Ko-Transfektionsexperimenten. Eine direkte *WIP*-Protein/*KNOX*-Promotor-Interaktion konnte ausgeschlossen werden – es wurde jedoch ein funktioneller Zusammenhang durch vergleichende Untersuchung der *KNAT1*-Expression im Wildtyp- beziehungsweise *wip2 knock out* Hintergrund nachgewiesen. Die durch die Experimente zur *WIP*-Genfamilie gewonnenen Erkenntnisse lassen zwei wichtige Schlüsse zu. Erstens können paraloge Gene, die hoch konservierte Sequenzabschnitte teilen, durchaus für grundverschiedene physiologische Funktionen innerhalb eines Organismus verantwortlich sein. Die von *TT1* verschiedenen Gene zeigen stark abweichende Expressionsmuster und sind darüber hinaus nicht am Flavonoidmetabolismus beteiligt. Die Gemeinsamkeit, die die *WIP*-Proteine teilen, liegt wahrscheinlich vielmehr in ihrem molekularen Wirkmechanismus, der zu untersuchen bleibt. Der zweite Schluss, der aus den Ergebnissen der Experimente bezüglich der *WIP*-Gene gezogen werden kann, ist, dass zur Ermittlung der *TT1*-Funktion die Analyse der gesamten Genfamilie vermutlich wenig beitragen wird, da sich die restlichen *WIP*-Gene durch unspezifischere Expressionsmuster und weniger deutliche beziehungsweise noch unbekannte *knock out* Phänotypen auszeichnen.

Ein weiteres Gebiet, das in dieser Arbeit behandelt wurde betrifft die MYB-Transkriptionsfaktoren, die wie eingangs erwähnt eine wichtige Proteinklasse darstellen, die an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt ist. Hierbei wurden zwei Bereiche intensiver behandelt – Zielgene der Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Proteine und die negativ-regulatorischen Eigenschaften des *single repeat* MYB-Proteins MYBL2. Die Untergruppe 7 der R2R3-MYB-Proteine beinhaltet drei Mitglieder – MYB11, MYB12 und MYB111 – die auch als PFG-MYB-Proteine (*production of flavonol glycosides*) bezeichnet werden. Für sie war

eine Beteiligung am Flavonoidmetabolismus aufgrund einer Aktivierung von Flavonol-spezifischen Strukturgenen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei weitere Zielgene, auf die es Hinweise durch ATH1-Genchip-Experimente gab mit Hilfe von Interaktionsstudien durch Ko-Transfektionsexperimente bestätigt. Unter diesen Zielgenen waren zwei Glykosyltransferase-kodierende Gene und eines mit ungeklärter Funktion. Für die Glykosyltransferasen ist eine Beteiligung an der Biosynthese von Flavonolglykosiden möglich oder sogar wahrscheinlich. Für das kleine MYB-Protein MYBL2 konnte ein negativ-regulatorischer Einfluss auf die Aktivierung des an der Flavonoidbiosynthese beteiligten *DFR*-Promotors durch die Transkriptionsfaktorkombinationen TT2/TT8/TTG1 sowie PAP1/EGL3/TTG1 nachgewiesen werden. Hierdurch wurden mögliche Zielgene beziehungsweise Interaktionspartner für MYBL2 erstmalig nachgewiesen. Die Analyse des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus könnte Aufschluss über die Funktionsweise der *single repeat* MYB-Proteine im Allgemeinen liefern.

6. Literatur

- Aida, M., Ishida, T. und Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**, 1563-1570.
- 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.** (2007). Untersuchungen zur Funktion von *TRANSPARENT TESTA 1* bei der Samenschalenpigmentierung in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.
- 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.
- 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.
- Baxter, I.R., Young, J.C., Armstrong, G., Foster, N., Bogenschutz, N., Cordova, T., Peer, W.A., Hazen, S.P., Murphy, A.S. und Harper, J.F.** (2005). A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2649-2654.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* **20**, 1195-1197.
- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R. und Inze, D.** (2000). Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *JOURNAL OF PLANT RESEARCH* **113**, 139-148.
- 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.
- Bleecker, A.B. und Patterson, S.E.** (1997). Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179.
- 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.
- Bowles, D.** (2002). A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Society transactions* **30**, 301-306.
- Bowman, J.** (1994). Flowers. In *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*, J. Bowman, ed (New York: Springer), pp. 139ff.
- 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.
- Braun, E.L. und Grotewold, E.** (1999). Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol* **121**, 21-24.
- 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.
- Brown, R.S.** (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Current opinion in structural biology* **15**, 94-98.

- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. und Martienssen, R.A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-971.
- Chaudhury, A.M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M.R., Dennis, E.S. und Peacock, W.J.** (2001). Control of early seed development. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 677-699.
- Cheng, L.Z., Workman, J.L., Kingston, R.E. und Kelly, T.J.** (1992). Regulation of DNA replication in vitro by the transcriptional activation domain of GAL4-VP16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 589-593.
- 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.
- 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.*
- Crawford, B.C., Ditta, G. und Yanofsky, M.F.** (2007). The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **17**, 1101-1108.
- Cress, W.D. und Triezenberg, S.J.** (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science (New York, N.Y)* **251**, 87-90.
- 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.
- den Dunnen, J.T. und Antonarakis, S.E.** (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* **109**, 121-124.
- Deshpande, S.S., Cheryan, M. und Salunkhe, D.K.** (1986). Tannin analysis of food products. *Critical reviews in food science and nutrition* **24**, 401-449.
- Dockx, J., Quaedvlieg, N., Keultjes, G., Kock, P., Weisbeek, P. und Smeekens, S.** (1995). The homeobox gene ATK1 of *Arabidopsis thaliana* is expressed in the shoot apex of the seedling and in flowers and inflorescence stems of mature plants. *Plant Mol Biol* **28**, 723-737.
- 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.
- Edwards, M.S., Sternberg, J.E. und Thornton, J.M.** (1987). Structural and sequence patterns in the loops of beta alpha beta units. *Protein engineering* **1**, 173-181.
- Engbrecht, C.C., Schoof, H. und Bohm, S.** (2004). Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5**, 39.
- Fields, S. und Sternglanz, R.** (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**, 286-292.
- Foos, G., Grimm, S. und Klempnauer, K.H.** (1994). The chicken A-myb protein is a transcriptional activator. *Oncogene* **9**, 2481-2488.
- Forkmann, G.** (1991). Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding* **106**, 1-26.

- 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.
- Frankel, A.D., Berg, J.M. und Pabo, C.O.** (1987). Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 4841-4845.
- Gamsjaeger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M. und Mackay, J.P.** (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in biochemical sciences* **32**, 63-70.
- Gehring, W.J.** (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science (New York, N.Y)* **236**, 1245-1252.
- 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. *Plant J*.
- Grennan, A.K.** (2006). Genevestigator. Facilitating web-based gene-expression analysis. *Plant Physiol* **141**, 1164-1166.
- Ha, C.M., Kim, G.T., Kim, B.C., Jun, J.H., Soh, M.S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H. und Nam, H.G.** (2003). The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 161-172.
- 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.
- Hake, S., Smith, H.M., Holtan, H., Magnani, E., Mele, G. und Ramirez, J.** (2004). The role of knox genes in plant development. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 125-151.
- Harborne, J.B. und Williams, C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Harper, J.F., Manney, L. und Sussman, M.R.** (1994). The plasma membrane H(+)-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Mol Gen Genet* **244**, 572-587.
- Hartmann, U., Valentine, W.J., Christie, J.M., Hays, J., Jenkins, G.I. und Weisshaar, B.** (1998). Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. *Plant Mol Biol* **36**, 741-754.
- 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.
- Hennig, L., Menges, M., Murray, J.A. und Grissem, W.** (2003). *Arabidopsis* transcript profiling on Affymetrix GeneChip arrays. *Plant Mol Biol* **53**, 457-465.
- Hibara, K., Takada, S. und Tasaka, M.** (2003). CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J* **36**, 687-696.
- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K. und Ohme-Takagi, M.** (2002). The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS letters* **514**, 351-354.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T. und Ohme-Takagi, M.** (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**, 733-739.
- Hiratsu, K., Mitsuda, N., Matsui, K. und Ohme-Takagi, M.** (2004). Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is

- both necessary and sufficient for repression of transcription in Arabidopsis. Biochemical and biophysical research communications **321**, 172-178.
- 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.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. und Kobayashi, M.** (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 9900-9905.
- 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.
- Jahns, O.** (2007). Analyse putativer Zielgene der "Production of Flavonol Glycosides" Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. und Hirsh, D.** (1986). β -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.
- 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.
- Kirik, V. und Baumlein, H.** (1996). A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. Gene **183**, 109-113.
- Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M. und Schiefelbein, J.** (2004a). The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. Developmental biology **268**, 506-513.
- Kirik, V., Simon, M., Wester, K., Schiefelbein, J. und Hulskamp, M.** (2004b). ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis. Plant Mol Biol **55**, 389-398.
- Kitamura, S., Shikazono, N. und Tanaka, A.** (2004). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. Plant J **37**, 104-114.
- Kombrink, E. und Hahlbrock, K.** (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Plant Physiology **81**, 216-221.
- 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.
- 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.
- Koornneef, M.** (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. Arabidopsis Information Services **27**, 1-4.
- Koornneef, M., Rolff, E. und Spruit, C.J.P.** (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **100**, 147-160.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. und Stam, P.** (1998). Genetic Analysis. In Arabidopsis Protocols, J. Martinez-Zapater and J. Salinas, eds (Totowa, USA: Humana Press), pp. 105-117.

- 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.
- Kuijt, S.J.** (2005). Regulation of *Knotted-1* like homeobox genes in rice and Arabidopsis. Dissertation an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Leiden in den Niederlanden.
- Kumaran, M.K., Bowman, J.L. und Sundaresan, V.** (2002). YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2761-2770.
- Lee, M.M. und Schiefelbein, J.** (2002). Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**, 611-618.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. und Caboche, M.** (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual review of plant biology* **57**, 405-430.
- 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.
- Lim, E.K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D.A. und Bowles, D.J.** (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **276**, 4344-4349.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. und Hake, S.** (1994). A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-1876.
- 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.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R. und Lockhart, D.J.** (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics* **21**, 20-24.
- Liu, X.S.** (2007). Getting started in tiling microarray analysis. *PLoS computational biology* **3**, 1842-1844.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. und Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.
- Ma, J., Przibilla, E., Hu, J., Bogorad, L. und Ptashne, M.** (1988). Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* **334**, 631-633.
- Marles, M.A., Ray, H. und Gruber, M.Y.** (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367-383.
- Matsui, K., Tanaka, H. und Ohme-Takagi, M.** (2004). Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in Arabidopsis by a chimeric PAP1 repressor. *Plant biotechnology journal* **2**, 487-493.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. und Henikoff, S.** (2000a). Targeted screening for induced mutations. *Nature biotechnology* **18**, 455-457.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. und Henikoff, S.** (2000b). Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-442.
- 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.
- Messner, B., Thulke, O. und Schaffner, A.R.** (2003). Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**, 138-146.
- Mitchell, P.J. und Tjian, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y)* **245**, 371-378.
- Mol, J., Grotewold, E. und Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**, 212-217.

- 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.
- Morita, M.T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato, T., Nakamura, M. und Tasaka, M.** (2006). A C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J* **47**, 619-628.
- 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.
- Nawy, T., Lee, J.Y., Colinas, J., Wang, J.Y., Thongrod, S.C., Malamy, J.E., Birnbaum, K. und Benfey, P.N.** (2005). Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* **17**, 1908-1925.
- 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.
- 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., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A.J., Jenkins, G.I., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2002). The TRANSPARENT TESTA16 locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* **14**, 2463-2479.
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B. und Fischer, R.L.** (1999). Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* **11**, 407-416.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. und Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- 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. und Shirley, B.W.** (1996). Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. *Plant Physiol* **111**, 339-345.
- 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.
- 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.
- Ruhe, N.** (2007). Funktionelle Substitutionsanalysen zur Untersuchung von R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.

- Ruuska, S.A. und Ohlrogge, J.B.** (2001). Protocol for small-scale RNA isolation and transcriptional profiling of developing Arabidopsis seeds. *BioTechniques* **31**, 752, 754, 756-758.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. und Ptashne, M.** (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563-564.
- Sagasser, M.** (2000). Analyse von *transparent-testa*-Mutanten aus *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- 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.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol* **136**, 2734-2746.
- 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.
- Sawa, S.** (2002). Overexpression of the AtmybL2 gene represses trichome development in Arabidopsis. *DNA Res* **9**, 31-34.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G. und Hulskamp, M.** (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *The EMBO journal* **21**, 5036-5046.
- 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.
- Schnittger, A., Jurgens, G. und Hulskamp, M.** (1998). Tissue layer and organ specificity of trichome formation are regulated by GLABRA1 and TRIPTYCHON in Arabidopsis. *Development* **125**, 2283-2289.
- Scott, M.P. und Weiner, A.J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4115-4119.
- Shirley, B.W.** (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research* **8**, 415-422.
- Shirley, B.W., Hanley, S. und Goodman, H.M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two Arabidopsis transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**, 333-347.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. und Haseloff, J.** (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **6**, 1653-1663.
- Simon, M., Lee, M.M., Lin, Y., Gish, L. und Schiefelbein, J.** (2007). Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Developmental biology* **311**, 566-578.
- Spencer, M.W., Casson, S.A. und Lindsey, K.** (2007). Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol* **143**, 924-940.
- 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. *Plant J* **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., Huet, 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 J* **50**, 660-677.
- Takatsuji, H.** (1999). Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol Biol* **39**, 1073-1078.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Comai, L. und Henikoff, S.** (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome research* **13**, 524-530.
- 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.
- Torres, T.T., Metta, M., Ottenwalder, B. und Schlotterer, C.** (2008). Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome research* **18**, 172-177.
- 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.
- Triezenberg, S.J.** (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Current opinion in genetics & development* **5**, 190-196.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R. und Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **98**, 1304-1309.
- van der Graaff, E., Nussbaumer, C. und Keller, B.** (2003). The *Arabidopsis thaliana* rlp mutations revert the ectopic leaf blade formation conferred by activation tagging of the LEP gene. *Mol Genet Genomics* **270**, 243-252.
- Venglat, S.P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., Martienssen, R., Selvaraj, G. und Datla, R.** (2002). The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4730-4735.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. und Hake, S.** (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**, 241-243.
- von Arnim, A.G., Deng, X.-W. und Stacey, M.G.** (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**, 35-43.
- 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. und Bishop, J.M.** (1989). Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* **58**, 85-93.
- Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J. und Lloyd, A.M.** (2000). *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J* **22**, 483-493.
- Wink, M.** (1999). *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology.* (Sheffield: Sheffield Academic Press).
- Winkel-Shirley, B.** (2001). *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology.* *Plant Physiol* **126**, 485-493.
- 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 (New York, N.Y)* **299**, 396-399.
- 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, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W. und Chua, N.H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols* **1**, 641-646.
- 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. 3-1: Rohdaten für die Experimente zu potenziellen TT1-Zielgenen durch Ko-Transfektion möglicher Zielpromotoren mit TT1:VP16-Konstrukten.

Reporter	Effektor	GUS [pmol 4-MU / (mg x min)]	LUC [RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$]	GUS' [pmol 4-MU / (mg x min)]
Positivkontrolle (MS275)	-	49564	2623	26064
Negativkontrolle (MS156)	-	359	1848	268
<i>CHS</i> (pUC::ProCHS:GUS)	-	49	1075	63
<i>CHS</i> (pUC::ProCHS:GUS)	pGH1	822	2186	519
<i>TT12</i> (pSA154)	-	30	916	46
<i>TT12</i> (pSA154)	pGH1	36	1307	38
<i>LDOX</i> (pSA155)	-	18	977	26
<i>LDOX</i> (pSA155)	pGH1	8	1127	10
<i>BAN</i> (pSA96)	-	1557	1168	1839
<i>BAN</i> (pSA96)	pGH1	2334	1419	2269
<i>TT16</i> (pGH29)	-	27	856	43
<i>TT16</i> (pGH29)	pGH1	92	1171	109
<i>TT1</i> (pSA86)	-	13	1112	16
<i>TT1</i> (pSA86)	pGH1	3	1526	3

Tabelle A2 zu Abb. 3-10: Rohdaten für die Experimente zur Interaktion von heterologen WIP-Aktivatorproteinen mit *KNOX*-Gen Klasse 1 Promotoren durch Kotransfektion.

Reporter	Effektor	GUS [pmol 4-MU / (mg x min)]	LUC [RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$]	GUS' [pmol 4-MU / (mg x min)]
Positivkontrolle (MS275)	-	8335	2355	18535
		34845	2355	
		46510	3331	
		31732	5545	
		42783	6439	
		29621	2863	
		19126	713	
Negativkontrolle (MS156)	-	4	916	15
		41	916	
		26	1336	
		0	3710	
		8	3171	
		17	3304	
		11	1164	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	-	443	639	1028
		385	639	
		2961	2008	
		901	2166	
		818	4909	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH1	18	659	197
		58	659	
		248	2186	
		964	3046	
		963	7637	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH2	183	831	494
		115	831	
		711	1328	
		1553	3354	
		963	7637	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH3	377	1485	614
		508	1485	
		903	1505	
		1024	2405	
		476	2862	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH4	258	738	637
		212	738	
		890	1439	
		1782	4213	
		496	3151	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH5	280	1546	470
		186	1546	
		683	1636	
		1443	2619	
		555	3017	
<i>KNAT1</i> (pGH13)	pGH6	271	1488	435
		239	1488	
		840	1971	
		1077	3000	
		555	3017	
<i>KNAT1</i> -Fragment (pGH27)	-	324	1954	299

KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH1	246	1609	276
KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH2	246	1609	276
KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH3	311	1825	307
KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH4	410	2206	335
KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH5	430	1990	389
KNAT1-Fragment (pGH27)	pGH6	224	1274	317
„Fragment A“ (pGH35)	-	69	1005	123
„Fragment A“ (pGH35)	pGH48	57	664	155
KNAT2 (pGH14)	-	25	598	84
		31	598	
		264	1628	
		52	1988	
KNAT2 (pGH14)	pGH1	5	673	27
		21	673	
		17	1117	
		38	2516	
KNAT2 (pGH14)	pGH2	29	178	179
		44	178	
		47	1284	
		67	2593	
KNAT2 (pGH14)	pGH3	14	932	36
		5	932	
		73	1266	
		65	2613	
KNAT2 (pGH14)	pGH4	4	370	97
		30	370	
		149	1466	
		71	2753	
KNAT2 (pGH14)	pGH5	36	836	65
		43	836	
		32	1091	
		43	2701	
KNAT2 (pGH14)	pGH6	24	603	125
		60	603	
		189	1140	
		45	1996	
KNAT6 (pGH15)	-	73	1265	124
		116	1265	
		166	2053	
		36	2857	
KNAT6 (pGH15)	pGH1	32	1748	27
		21	1748	
		134	2374	
		8	971	
KNAT6 (pGH15)	pGH2	78	869	71
		40	869	
		54	1629	
		59	1864	

<i>KNAT6</i> (pGH15)	pGH3	61	1031	92
		44	1031	
		91	1314	
		21	979	
<i>KNAT6</i> (pGH15)	pGH4	3	1501	9
		3	1501	
		45	1162	
		11	1383	
<i>KNAT6</i> (pGH15)	pGH5	0	1115	36
		38	1115	
		49	1171	
		7	1217	
<i>KNAT6</i> (pGH15)	pGH6	24	826	71
		41	826	
		174	1571	
		4	2623	
<i>STM</i> (pGH16)	-	9	733	17
		15	2349	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH1	29	1243	28
		17	2271	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH2	27	728	41
		16	2082	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH3	11	1459	18
		33	2737	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH4	4	852	23
		57	2770	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH5	10	1016	20
		33	2828	
<i>STM</i> (pGH16)	pGH6	12	742	23
		20	2129	

Tabelle A3 zu Abb. 3-12: Rohdaten für die Experimente zur Interaktion der PFG-MYB Proteine mit potenziellen Zielpromotoren.

Reporter	Effektor	GUS	LUC	GUS'
		[pmol 4-MU / (mg x min)]	[RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$]	[pmol 4-MU / (mg x min)]
<i>DFR</i> (RSt633)	-	21	4849	23
		26	813	
		21	4041	
		75	7137	
<i>DFR</i> (RSt633)	MYB12	175	1449	40
		30	1783	
		13	1567	
		3	281	
<i>DFR</i> (RSt633)	MYB11	59	5169	28
		4	574	
		24	3466	
		118	3758	
<i>DFR</i> (RSt633)	MYB111 (RSt256)	81	7066	28
		1	602	
		22	2848	
		159	3783	
At5g62210 (RSt625)	-	0	3335	31
		12	482	
		3	2979	
		47	2039	
		24	2384	
At5g62210 (RSt625)	MYB12	4429	1515	3216
		9597	1446	
		8841	3577	
		4263	4793	
		1889	1664	
At5g62210 (RSt625)	MYB11	1527	2128	1338
		233	529	
		1478	2539	
		4417	3436	
		1392	1829	
At5g62210 (RSt625)	MYB111 (RSt256)	1614	2991	1105
		228	504	
		910	2116	
		3083	2228	
		814	1870	
At2g22590 (RSt623)	-	255	3345	211
		36	535	
		146	2742	
		826	6352	
		219	3023	
At2g22590 (RSt623)	MYB12	1506	744	6117
		7784	1375	
		8224	3547	
		2732	2964	
		5170	2728	

At2g22590 (RSt623)	MYB11	2191 129 673 3188 1535	4652 383 2461 3282 2992	1295
At2g22590 (RSt623)	MYB111 (RSt256)	8274 298 2291 18365 4761	4968 303 2450 6572 3592	3895
At5g15480 (RSt624)	-	47 8 13 68 65	4818 535 2930 3884 4507	39
At5g15480 (RSt624)	MYB12	4586 7818 9704 6256 8174	1104 922 3527 3988 2321	10225
At5g15480 (RSt624)	MYB11	1587 36 286 2542 898	5386 348 2271 4276 3072	1975
At5g15480 (RSt624)	MYB111 (RSt256)	6440 71 2336 19268 5547	4002 123 2028 5408 3489	4266
<i>CHS</i>	-	51 7 85 364 45	6151 462 4490 9077 2461	51
<i>CHS</i>	MYB12	25509 37454 29844 25489 24990	1628 995 4740 2231 3304	33987
<i>CHS</i>	MYB11	17832 2422 9642 33075	5034 790 2623 6250	10616
<i>CHS</i>	MYB111 (RSt256)	24775 6617 17981 27489	4443 986 3606 5719	15536

Tabelle A4 zu Abb. 3-13: Rohdaten für die Experimente zur negativen Regulation der DFR-Promotor-Aktivierbarkeit durch MYBL2.

Reporter	Effektor	GUS	LUC	GUS'
		[pmol 4-MU / (mg x min)]	[RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$]	[pmol 4-MU / (mg x min)]
Positivkontrolle (MS275)	-	31095	598	57443
		13562	221	67962
		14702	2733	5945
		39172	1760	24597
		38828	1332	32211
		24402	384	70211
		25233	672	41494
Negativkontrolle (MS156)	-	37	1313	31
		28	241	130
		5	6133	1
		3	5969	1
		36	1864	21
		39	2954	15
		16	470	39
DFR (RSt633)	-	50	1463	38
		60	214	310
		34	2692	14
		42	3899	12
		49	1242	44
		59	1110	59
		30	205	161
DFR (RSt633)	TT2/ TT8 (RSt257/ mhei024)	819	171	5279
		319	92	3850
		3428	1318	2873
		3958	1955	2237
		1489	538	3056
		4636	736	6960
		584	294	2193
DFR (RSt633)	TT2/ TT8/ MYBL2 (RSt257/ mhei024/ GH56)	2217	686	3572
		378	184	2273
		2228	1441	1709
		1737	1272	1509
		891	521	1889
		2533	583	4800
		248	167	1642
DFR (RSt633)	PAP1/ BHLH2 (IA16/ mhei016)	26088	308	93577
		4335	124	38613
		14593	1551	10398
		28841	514	62050
		27278	616	48960
		23777	408	64460
		6657	278	26437
DFR (RSt633)	PAP1/ BHLH2/ MYBL2 (IA16/ mhei016/ GH56)	5387	220	27049
		1447	60	26777
		10990	1058	11475
		14815	692	23670
		8414	508	18306
		2257	164	15212
		2054	219	10373

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 oder 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 den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Bezüglich der Teilpublikationen verweise ich auf die nächste Seite.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Bernd Weißhaar (Institut 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

(Gunnar Huep)

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Teilpublikationen oder Publikationen in Vorbereitung:

Teilpublikationen:

Stracke, R., Ishihara, H., Huet, G., Barsch, A., Mehrrens, F., Niehaus, K., and Weisshaar, B. (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. *Plant J* **50**, 660-677.

Dubos, C, Gentilhomme-Legourrierec, J., Baudry, A., Huet, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Weisshaar, B., and Lepiniec, L. (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Manuskript in Vorbereitung*.

Sagasser, M., Lu, G.H., Appelhagen, I., Huet, G., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., and Weisshaar, B. (2008). TRANSPARENT TESTA1 controls early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of Arabidopsis thaliana seeds. *Manuskript in Vorbereitung*.

Kuijt, S.H., Huet, G., t' Hoen C.C.J., Lamers G.E.M., Meijer A.H., Sagasser, M., and Ouwerkerk, P.B.F. (2008). WIP domain proteins act as regulators of KNOX class 1 homeobox genes in rice and Arabidopsis. *Manuskript in Vorbereitung*.

Posterpräsentationen:

Huet, G., Sagasser, M., and Weisshaar, B. (2007). Expression profile and possible target genes of the WIP protein family in Arabidopsis thaliana. *Präsentation im Rahmen der 20. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ vom 27. Februar bis zum 2. März 2007 in Dabringhausen*.

Bartelniewöhner, L., Düttmann, V., Ruhe, N., Huet, G., Weisshaar, B., and Stracke, R. (2007). Sucrose-mediated Anthocyanin Accumulation in Arabidopsis Seedlings depends on the Interaction of the Transcription Factors PAP1, BHLH2 and BHLH42. *Präsentation im Rahmen des 4. Tri-Nationalen Arabidopsis Meetings vom 12. bis zum 15. September in Wien*.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Kollegen mit denen ich während der Erstellung dieser Dissertation das Labor teilen durfte.

Mein besonderer Dank gilt:

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

Herrn PD Dr. Helge Küster für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Martin Sagasser für die Ideen und Anregungen, die er zum Thema dieser Dissertation geliefert hat. Weiterhin danke ich ihm für die bereitgestellten biologischen Materialien und für die im Vorfeld erarbeiteten Grundlagen, die eine eingehendere Beschäftigung mit TT1 und der WIP-Proteinfamilie überhaupt erst ermöglicht haben. Die mit ihm geführten Gespräche im Rahmen der Arbeit waren stets hilfreich neue Ideen zu entwickeln oder zweifelhafte Ideen zu verwerfen.

Dr. Ralf Stracke für die Möglichkeit im Rahmen von durch ihn intiierten Projekten mitarbeiten zu können. Außerdem war es hilfreich, mit ihm die verschiedensten fachlichen Aspekte diskutieren zu können.

Ingo Appelhagen, dessen Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genomforschung ich im Rahmen dieser Dissertation betreut habe. Ich danke ihm für sein ständiges Engagement, viele ausgezeichnete Anregungen und die Möglichkeit neue Ideen stets völlig offen und unbefangen diskutieren zu können. Ohne die gemeinsame Arbeit mit ihm an verschiedenen Teilprojekten hätte nur ein Bruchteil der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bezüglich TT1 gewonnen werden können.

Melanie Kuhlmann, die mich in die praktischen Aspekte der At7-Zellkultur eingeführt hat und ständig gute Ratschläge bezüglich allgemeiner Probleme, die während der Arbeit im Labor auftreten können, wusste. Außerdem waren die Gespräche, die ich mit ihr außerhalb der Arbeit führen konnte immer eine persönliche Bereicherung.

Heike Hagemeyer und Stephanie Hafer, die im Rahmen ihrer Ausbildung zur Laborantin und Technischen Assistentin gemeinsam mit mir an Teilprojekten dieser Dissertation gearbeitet haben.

Meinen weiteren Kollegen aus G0-134, die während der letzten Zeit der Verfassung dieser Dissertation mit mir das Labor geteilt haben – Julian Brüggemann und Oliver Jahns. Mit ihnen konnte sowohl Arbeit als auch Freizeit immer in angenehmer Atmosphäre gestaltet werden.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir all das ermöglicht haben, was ich bis heute erreicht habe.

Ein großer Dank gilt Carolin Wilke, meiner Freundin, die mir persönlich Halt gegeben und mich unterstützt hat. Ich danke ihr für die wunderbare Zeit, die ich bislang mit ihr verbringen durfte.

Lebenslauf

Name: Gunnar Huep
 Anschrift: Bremer Straße 27, 33613 Bielefeld
 Geburtsdatum: 10. Mai 1977
 Geburtsort: Herford
 Nationalität: deutsch

Schulbildung: 1983 - 1987 Grundschule Diebrocker Straße, Herford
 1987 - 1996 Friedrichs-Gymnasium, Herford
 Schulabschluss: Abitur 07/1996
 Zivildienst: 1996 - 1997 Diakoniestation Herford II (Mobile Altenpflege)

Studium: 1997 – 1999 4 Semester Lehramt Sekundarstufe II (Mathe/Chemie)
 1999 - 2004 10 Semester Biochemie Diplom
 12/2003 Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. Knut
 bis 06/2004 Kleesiek am Institut für Laboratoriums und
 Transfusionsmedizin am Herz- und Diabeteszentrum
 Nordrhein-Westfalen:
 „Identifizierung und Charakterisierung genetischer
 Variationen der Xylosyltransferasen XT-I und XT-II
 bei *Arthrosis deformans*“
 06/2004 Diplomprüfung in Biochemie
 Abschluss: Diplom-Biochemiker (Gesamturteil der Prüfung: „Mit Auszeichnung“)

Doktorarbeit: 12/2004 Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd
 bis heute Weißhaar am Institut für Genomforschung,
 Universität Bielefeld:
 „Untersuchungen zu Regulatoren der Flavonoid-
 biosynthese in *Arabidopsis thaliana*:
 Eine Studie zu neuen Funktionen bekannter
 Proteinklassen“