

**Analyse und Visualisierung eines  
R2R3-MYB / bHLH Transkriptionsfaktor-  
komplexes aus *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Verena Düttmann**  
aus Lingen

angefertigt am Institut für Genomforschung

**Bielefeld im Juli 2008**

Berichtersteller: Prof. Dr. Bernd Weißhaar  
Dr. Thorsten Seidel

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

*für Tabea*

## Kurzzusammenfassung

An dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ist die Regulation der Flavonoidbiosynthese seit längerem Gegenstand moderner Forschung und bereits gut untersucht. Ohne das reibungslose und funktionelle Zusammenspiel vieler regulatorischer Transkriptionsfaktoren ist ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden besonders drei Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Dihydroflavonol-Reduktase (DFR), des Schlüsselenzyms der Anthocyanbiosynthese, in Augenschein genommen, MYB75, sowie BHLH2/BHLH42 und TTG1. Um diese Regulationsmechanismen zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Bindung der Transkriptionsfaktoren untereinander sowie an ihre Ziel-DNA mit Hilfe neuer Methoden aus der Physik wie der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) oder der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) untersucht.

Mittels FCS und der Expression rekombinanter Proteine konnten die Promotor-Bindestellen des Transkriptionsfaktorkomplexes identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren gemeinsam und nicht einzeln an die DNA binden. Zur Visualisierung der Lokalisation und der Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren untereinander, sowie an die Promotor DNA in lebenden Zellen (Protoplasten und Keimlinge) wurden mit fluoreszierenden Proteinen (eGFP, mCherry) genetisch markierte Transkriptionsfaktoren transient oder stabil in Pflanzenzellen eingebracht. Hiermit konnte neben der biologischen Funktionalität der Fusionsproteine auch deren Lokalisation in der Zelle gezeigt werden. MYB-Proteine akkumulieren ubiquitär in der Zelle, während bHLH-Proteine ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Stabile Komplementationslinien zeigen, ebenso wie Promotor-GUS-Linien, eine Expression der bHLH-Faktoren in allen Organen junger Keimlinge. Dabei beschränkt sich die Akkumulation auf den Zellkern. MYB75 wird unter Einfluss von Saccharose-Zugabe in hauptsächlich Hypokotylzellen von Keimlingen exprimiert. Die Fusionsproteine können unter der Kontrolle des jeweiligen nativen Promotors die Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten komplementieren. In Interaktionsstudien mittels FRET und bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) wurde die Wechselwirkung der Proteine untereinander im Zellkern der lebenden Zellen bestätigt. Dabei können bHLH-Proteine sowohl miteinander als auch mit weiteren Faktoren der gleichen Subgruppe interagieren, während MYB-Proteine lediglich mit bHLH-Faktoren einen Komplex eingehen können.

## English Abstract

The regulation of flavonoid biosyntheses in the model plant *Arabidopsis thaliana* is well characterized already. A regulated procedure of biosynthesis without frictionless and functional cooperation of many regulatory transcription factors is not possible. In this work, three different transcription factors were analysed in detail, MYB75 as well as BHLH2/BHLH42 and TTG1. These are regulators of the dihydroflavonol-reductase (DFR), the key enzyme of the anthocyanin biosynthesis. To understand the regulatory mechanism, binding of transcription factors among each other and to the target-DNA was analyzed with new methods from the physics like fluorescence correlation spectroscopy (FCS) or fluorescence resonance energy transfer (FRET).

With FCS and recombinant expressed proteins, promoter attachment sites of the transcription factor complex were identified. Simultaneous binding of both transcription factors to specific binding sites was shown, while binding of single transcription factors has not been observed. To visualize the localization and interaction of the transcription factors among each other and to the promoter DNA in plant cells, transcription factors were fused to fluorescent proteins (eGFP, mCherry). With transient protoplast transfection and stable plant transfection, functionality and localization of fusion proteins was shown in plant cells (protoplasts and seedlings). MYB-proteins showed accumulation ubiquitous in cells, while bHLH-proteins are exclusively located in the nucleus. Complementation lines and promoter-GUS-lines showed expression of bHLH-factors in all organs of young seedlings. *MYB75* expression is shown mainly in hypocotyl cells only with sucrose-treatment. Transcription factor mutant plants are able to complement with fusion proteins expressed under the control of the native promoter. Interaction studies with FRET and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) have validated interaction of the proteins among each other in the nucleus of plant cells. BHLH-proteins showed homodimerization as well as heterodimerization with different members of subgroup III<sub>f</sub>, while MYB-proteins are only able to interact with bHLH-proteins.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Flavonoide</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Die Biosynthese der Flavonoide .....  | 3         |
| 1.1.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese.....  | 6         |
| <b>1.2 Transkriptionsfaktoren in <i>A. thaliana</i></b> .....                             | <b>8</b>  |
| 1.2.1 Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren.....                                    | 9         |
| 1.2.2 Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren .....                                    | 11        |
| <b>1.3 Die Expression eukaryotischer Gene – Stress-induzierte Promotoraktivität</b> ..... | <b>15</b> |
| <b>1.4 Die Interaktion von MYB, bHLH und WD40 Proteinen in <i>A. thaliana</i></b> .....   | <b>17</b> |
| <b>1.5 Einzelmolekülmikroskopie</b> .....   | <b>19</b> |
| 1.5.1 Konfokale Mikroskopie.....  | 19        |
| 1.5.2 Weitfeldmikroskopie.....  | 21        |
| 1.5.3 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS).....                                    | 22        |
| 1.5.4 Fluoreszenzfarbstoffe für FCS.....  | 25        |
| 1.5.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....                                   | 26        |
| 1.5.6 Fluoreszenzfarbstoffe und -Proteine für FRET .....                                  | 29        |
| <b>1.6 Ziele dieser Arbeit</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>2.1 Material</b> .....   | <b>34</b> |
| 2.1.1 Chemikalien und Enzyme .....  | 34        |
| 2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen.....  | 34        |
| 2.1.2.1 Medien für die Anzucht von Bakterien.....   | 34        |
| 2.1.2.2 Medien für die Anzucht von <i>A. thaliana</i> .....                               | 36        |
| 2.1.2.3 Medien für die <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskultur At7.....                  | 36        |
| 2.1.2.4 Medien für die Tabak Zellsuspensionskultur BY-2 .....                             | 37        |
| 2.1.2.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden .....                       | 38        |
| 2.1.2.6 Puffer und Lösungen für biochemische Methoden.....                                | 41        |
| 2.1.3 Desoxyoligonucleotide (Primer).....   | 43        |
| 2.1.4 Bakterienstämme und DNA-Vektoren.....   | 44        |
| 2.1.5 Reagenziensätze .....   | 46        |
| 2.1.6 Zellkulturen und Pflanzen .....   | 47        |
| 2.1.6.1 At7-Zellsuspensionskultur .....   | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.6.2 BY-2 Zellsuspensionskultur .....  | 47        |
| 2.1.6.3 Pflanzen .....  | 47        |
| <b>2.2 Methoden.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>2.2.1 Methoden zur Pflanzenkultivierung und -präparation .....</b>                                   | <b>48</b> |
| 2.2.1.1 Pflanzenkultivierung .....  | 48        |
| 2.2.1.1.1 Anzucht auf Erde.....   | 48        |
| 2.2.1.1.2 Sterile Anzucht auf MS-Platten .....  | 48        |
| 2.2.1.2 Kreuzen von <i>A. thaliana</i> Pflanzen .....   | 49        |
| 2.2.1.3 Saccharose-Stressversuch mit <i>A. thaliana</i> Keimlingen.....                                 | 49        |
| 2.2.1.4 Histochemische Analyse der $\beta$ -Glucuronidase (GUS) Aktivität in pflanzlichen Geweben ..... | 49        |
| 2.2.1.4.1 Herstellung der Promotor-GUS Pflanzen .....   | 50        |
| 2.2.1.4.2 GUS-Analyse von Pflanzenmaterial.....   | 50        |
| 2.2.1.4.3 Relative Quantifizierung löslicher Anthocyane.....  | 50        |
| <b>2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>  | <b>51</b> |
| 2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....   | 51        |
| 2.2.2.1.1 Kolonie-PCR.....  | 51        |
| 2.2.2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.....  | 51        |
| 2.2.2.1.3 Punktmutationen von in Plasmiden vorliegenden cDNA-Klonen .....                               | 52        |
| 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....   | 52        |
| 2.2.2.2.1 Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (TELT-Miniprep) .....                                  | 52        |
| 2.2.2.2.2 Plasmid-DNA Präparation im MIDI- und MEGA-Maßstab .....                                       | 52        |
| 2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA .....  | 53        |
| 2.2.2.4 Dephosphorylierung von DNA .....  | 53        |
| 2.2.2.5 Behandlung mit T4 DNA-Polymerase .....  | 53        |
| 2.2.2.6 Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese.....  | 54        |
| 2.2.2.7 Aufreinigung und Elution von DNA .....  | 54        |
| 2.2.2.8 Ligation .....  | 54        |
| 2.2.2.9 Gateway® Rekombination.....   | 54        |
| 2.2.2.10 Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte .....                                  | 56        |
| 2.2.2.11 DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial .....  | 56        |
| 2.2.2.12 Ammoniumacetat-Fällung von DNA .....   | 56        |
| 2.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....                                 | 56        |
| 2.2.2.14 ExoSAP Verdau von DNA .....  | 57        |
| 2.2.2.15 DNA-Sequenzierung.....   | 57        |
| 2.2.2.16 RNA-Präparation .....  | 57        |
| 2.2.2.16.1 RNA-Isolation mit TRI-REAGENT®.....  | 57        |
| 2.2.2.16.2 Erststrang-cDNA Synthese für semiquantitative RT-PCR .....                                   | 58        |
| 2.2.2.16.3 Semiquantitative RT-PCR .....  | 58        |

---

|  |    |
|--|----|
| <b>2.2.3 Mikrobiologische Methoden</b> .....   | 58 |
| 2.2.3.1 Kultivierung von Bakterien .....   | 58 |
| 2.2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation .....   | 59 |
| 2.2.3.2.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen .....   | 59 |
| 2.2.3.2.2 Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen .....  | 59 |
| 2.2.3.2.3 Herstellung elektrokompeter Agrobakterienzellen .....  | 60 |
| 2.2.3.3 Transformation von Bakterienzellen .....   | 60 |
| 2.2.3.3.1 Transformation chemokompetenter Bakterienzellen .....  | 60 |
| 2.2.3.3.2 Transformation elektrokompeter Bakterienzellen .....   | 60 |
| 2.2.3.3.3 Transformation elektrokompeter Agrobakterienzellen .....   | 61 |
| 2.2.3.4 Dauerkulturen transformierter Bakterien .....  | 61 |
| 2.2.3.5 Herstellung transgener Pflanzen .....  | 61 |
| 2.2.3.5.1 Agrobakterium-vermittelte transiente Transformation von Fusionsproteinen in<br><i>A. thaliana</i> .....                | 61 |
| 2.2.3.5.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation durch „floral dipping“ .....  | 62 |
| 2.2.3.5.3 Selektion transgener T1-Pflanzen.....  | 62 |
| <b>2.2.4 Biochemische Methoden</b> .....   | 63 |
| 2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....  | 63 |
| 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....   | 63 |
| 2.2.4.3 Immunologische Methoden .....  | 63 |
| 2.2.4.3.1 Western Blot.....  | 63 |
| 2.2.4.3.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Farbreaktion .....   | 64 |
| 2.2.4.4 Extraktion und Reinigung nativer und rekombinanter Proteine .....  | 64 |
| 2.2.4.4.1 Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....   | 64 |
| 2.2.4.4.2 Herstellung von Rohextrakt aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....   | 65 |
| 2.2.4.4.3 Proteinreinigung über IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography) His-<br>Tag-Affinitätschromatographie ..... | 65 |
| 2.2.4.4.4 Renaturierung der Proteine durch Dialyse .....   | 66 |
| 2.2.4.5 EMSA ( <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ) .....   | 66 |
| 2.2.4.5.1 Expression der Proteine .....  | 67 |
| 2.2.4.5.2 Herstellung des biotinylierten DNA-Fragmentes.....   | 67 |
| 2.2.4.5.3 DNA-Protein-Bindungsassay .....  | 67 |
| 2.2.4.5.4 Gelpräparation und Gellauf .....   | 67 |
| 2.2.4.5.5 Gelanalyse .....   | 68 |
| <b>2.2.5 Zellkulturen</b> .....  | 68 |
| 2.2.5.1 At7-Zellkultur.....  | 68 |
| 2.2.5.1.1 Vorbereitung der Transfektions-DNAs .....  | 68 |
| 2.2.5.1.2 Gewinnung von At7-Protoplasten .....   | 69 |
| 2.2.5.1.3 Transfektion von At7-Protoplasten.....   | 69 |
| 2.2.5.1.4 Ernte transfizierter Protoplasten.....   | 70 |
| 2.2.5.1.5 Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten.....   | 70 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.5.1.6 Proteinbestimmung nach Bradford.....  | 70        |
| 2.2.5.1.7 Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....  | 70        |
| 2.2.5.1.8 Bestimmung der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität.....  | 71        |
| 2.2.5.1.9 Berechnung von Reporter-genaktivitäten.....   | 71        |
| 2.2.5.1.10 At7-Transfektion zur Analyse der Fusionsproteine .....   | 71        |
| 2.2.5.2 Tabak BY-2 Zellkultur .....   | 72        |
| 2.2.5.2.1 Analyse der Lokalisation von Fusionsproteinen.....  | 72        |
| 2.2.5.2.2 Tabak BY-2 Zellsuspensionskultur.....   | 72        |
| 2.2.5.2.3 Protoplastierung der Tabakzellen .....  | 72        |
| 2.2.5.2.4 Transfektion der BY-2 Protoplasten .....  | 72        |
| 2.2.5.2.5 Lokalisation der Fusionsproteine .....  | 73        |
| 2.2.5.3 BiFC ( <i>bimolecular fluorescence complementation</i> ).....   | 73        |
| 2.2.5.3.1 Konstruktion der Split-YFP Vektoren und Klonierung der cDNAs .....  | 73        |
| 2.2.5.3.2 Analyse der BiFC-Interaktionen .....  | 74        |
| <b>2.2.6 Fluoreszenz-Spektroskopische Methoden.....</b>   | <b>74</b> |
| 2.2.6.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....   | 74        |
| 2.2.6.1.1 Der Versuchsaufbau .....  | 74        |
| 2.2.6.2 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS).....  | 76        |
| 2.2.6.2.1 Verwendete Farbstoffe.....  | 77        |
| 2.2.6.2.2 Vorbereitung der Proben .....   | 77        |
| 2.2.6.2.3 Auswertung der Messdaten .....  | 78        |
| 2.2.6.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....  | 78        |
| 2.2.6.3.1 Fluoreszierende Proteine .....  | 79        |
| 2.2.6.3.2 In vivo-Markierung mit fluoreszierenden Proteinen.....  | 79        |
| <b>3. ERGEBNISSE.....</b>   | <b>80</b> |
| <b>3.1 Regulation des <i>DFR</i>-Promotors durch kombinatorische Interaktion von R2R3-MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren .....</b> | <b>80</b> |
| 3.1.1 Die Struktur des <i>DFR</i> -Promotors.....   | 81        |
| 3.1.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren.....   | 82        |
| 3.1.3 Vergleichende Promotoranalyse mit FCS und EMSA .....  | 85        |
| 3.1.3.1 Identifizierung der Promotorbindestellen anhand einer Deletionsreihe.....   | 89        |
| 3.1.3.2 Identifizierung der Bindeelemente anhand einer Mutationsreihe .....   | 92        |
| <b>3.2 R2R3-MYB und bHLH Fusionsproteine komplementieren homozygote Transkriptionsfaktor <i>knock-out</i> Pflanzen.....</b>         | <b>94</b> |
| 3.2.1 R2R3-MYB und bHLH Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen sind in Protoplasten funktionsfähig.....                     | 94        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>3.2.2 Durch stabile Transformation mit Fusionsproteinen können die <i>knock-out</i> Pflanzen komplementiert werden .....</b>             | <b>101</b> |
| <b>3.3 Analyse der Lokalisation und Interaktion der Fusionsproteine in Protoplasten und in <i>A. thaliana</i> Keimlingen .....</b>          | <b>107</b> |
| 3.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine.....   | 108        |
| 3.3.2 Analyse der <i>in planta</i> Lokalisation der Fusionsproteine .....   | 111        |
| 3.3.3 Analyse der Protein-Protein-Interaktion in BY-2 und At7- Protoplasten mittels BiFC .....  | 115        |
| 3.3.4 Analyse der Protein-Protein-Interaktion mittels FRET in Protoplasten und in <i>A. thaliana</i> Keimlingen .....                       | 119        |
| <b>3.4 Regulation der Saccharose-induzierten Anthocyanakkumulation in jungen <i>A. thaliana</i> Keimlingen .....</b>                        | <b>126</b> |
| 3.4.1 Akkumulation von Anthocyanen als Reaktion auf UV- und Saccharose-Stress.....  | 126        |
| 3.4.2 Die Regulation des <i>DFR</i> -Promotors durch UV- und Saccharose-Stress .....  | 129        |
| 3.4.3 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktor-Gene in Abhängigkeit von Saccharose .....                               | 132        |
| <b>4. DISKUSSION .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>4.1 MYB75 reguliert zusammen mit bHLH-Proteinen der Subgruppe IIIf den <i>DFR</i>-Promotor .....</b>                                     | <b>135</b> |
| 4.1.1 Definition des Minimalpromotors.....  | 136        |
| 4.1.2 Aufgereinigte His-Tag Fusionsproteine binden als Komplex an den Minimalpromotor....   | 137        |
| 4.1.3 Analyse der <i>DFR</i> -Promotorbindestellen für R2R3-MYB und R/B-ähnliche bHLH Proteine .....  | 137        |
| 4.1.4 Die Regulation der Expression der „frühen“ und „späten“ Gene der Flavonoidbiosynthese erfolgt über ähnliche <i>cis</i> -Elemente..... | 139        |
| 4.1.5 Vergleichende Promotoranalyse mit FCS, EMSA und Protoplasten-Kotransfektion.....  | 142        |
| 4.1.6 Strukturelle Basis für die Interaktion der Proteine untereinander .....   | 143        |
| 4.1.7 Schlussfolgerungen .....  | 144        |
| <b>4.2 Funktionale Transkriptionsfaktor-Fusionsproteine komplementieren die <i>knock-out</i> Mutanten .....</b>                             | <b>144</b> |
| <b>4.3 Nicht alle Transkriptionsfaktoren sind ausschließlich im Zellkern der Pflanzenzellen lokalisiert.....</b>                            | <b>146</b> |
| 4.3.1 MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren sind in pflanzlichen Zellen nicht ausschließlich kolokalisiert .....                              | 147        |
| 4.3.2 Die Lokalisation in Pflanzenzellen ist zellkernorientiert .....   | 150        |
| 4.3.3 Schlussfolgerungen .....  | 151        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.4 MYB75 und BHLH42 bilden einen Komplex im Zellkern lebender Pflanzenzellen</b>                                    | <b>151</b> |
| .....   |            |
| 4.4.1 MYB75 kann mit BHLH42 oder mit BHLH2 einen Komplex eingehen .....   | 152        |
| 4.4.2 Im Gegensatz zu MYB75 können BHLH42 und BHLH2 Proteine Homodimere bilden....                                      | 153        |
| 4.4.3 Zur Regulation gehört noch ein dritter Partner: TTG1 als Stabilisator des<br>Transkriptionsfaktor-Komplexes ..... | 156        |
| 4.4.4 Schlussfolgerungen .....  | 158        |
| <b>4.5 Der Regulationskomplex MYB75/BHLH2/TTG1 wird durch Saccharose induziert</b>                                      | <b>160</b> |
| .....   |            |
| 4.5.2 Abiotische Stressfaktoren induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren.....                               | 162        |
| 4.5.3 Die DFR-Regulation ist in einigen Transkriptionsfaktor <i>knock-out</i> Mutanten gestört.....                     | 163        |
| 4.5.4 Das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren ist überlappend .....  | 164        |
| <b>4.6 Ausblick.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>169</b> |
| <b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>172</b> |
| <b>7. ANHANG.....</b>   | <b>187</b> |
| 7.1 Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte.....  | 187        |
| 7.2 Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte transgene Linien.....  | 191        |
| 7.3 Wertetabellen und Abbildungen zu BHLH2 .....  | 192        |
| 7.4 Wertetabellen zu den Transfektionsexperimenten.....   | 195        |
| 7.5 Desoxyoligonucleotide (Primer) .....  | 203        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |  |
|-----------------------|--|
| A                     | Adenin   |
| ACE                   | ACGT-Element ( <u>A</u> CGT <u>c</u> ontaining <u>e</u> lement)  |
| AS                    | Aminosäure   |
| <i>A. thaliana</i>    | <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>   |
| BAN                   | BANYULS (putative Leucoanthocyaninreduktase)   |
| bHLH                  | basische Helix-Schleifen( <i>loop</i> )-Helix  |
| bp                    | Basenpaare   |
| BSA                   | Rinderserumalbumin ( <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)  |
| bZIP                  | basische Region/Leucin Reißverschluss ( <u>b</u> asic <u>l</u> eucin <u>z</u> ipper)                         |
| C                     | Cytosin  |
| CaMV                  | Blumenkohl Mosaik Virus ( <u>C</u> auliflower <u>M</u> osaic <u>V</u> irus)                                  |
| Cat. No.              | Katalognummer  |
| cDNA                  | komplementäre Desoxyribonukleinsäure   |
| CLSM                  | <u>C</u> onfocal <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy   |
| CFI                   | Chalkonflavanonisomerase   |
| CHI                   | Chalkonisomerase   |
| CHS                   | Chalkonsynthase  |
| CoA                   | CoenzymA   |
| Col-0                 | Columbia-0   |
| DEPC                  | Diethylpyrocarbonat  |
| DFR                   | Dihydroflavonolreduktase   |
| DMF                   | N,N-Dimethylformamid   |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNase                 | Desoxyribonuklease   |
| dNTP                  | Desoxynukleosintriphosphat   |
| DTT                   | Dithiothreitol   |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraacetat   |
| EMSA                  | <u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay   |
| F1                    | Filialgeneration 1   |
| F2                    | Filialgeneration 2   |
| FCS                   | Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ( <u>f</u> luorescence <u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy)       |
| FRET                  | <u>F</u> luoreszenz <u>R</u> esonanz <u>E</u> nergie <u>T</u> ransfer  |
| fwd                   | Vorwärts ( <i>forward</i> )  |
| g                     | Gramm  |
| G                     | Guanin   |
| GFP                   | Grün fluoreszierendes Protein ( <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)                           |
| GST                   | Glutathion-S-Transferase   |
| GUS                   | β-Glucuronidase  |
| GUS'                  | spezifische, standardisierte GUS-Aktivität   |
| HEPES                 | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure   |
| HLH                   | Helix-Schleifen( <i>loop</i> )-Helix-Motiv   |
| HPLC                  | Hochauflösende Flüssigchromatographie ( <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |
| HTH                   | Helix-Turn-Helix-Motiv   |
| Hz                    | Hertz  |
| IPTG                  | Isopropylthiogalaktosid  |
| k                     | Kilo (10 <sup>3</sup> )  |
| kb                    | Kilo-Basenpaare  |
| kDa                   | Kilo-Dalton  |
| K.O.                  | Knock Out  |
| L                     | Liter  |

|         |   |
|---------|---|
| LAR     | Leucoanthocyanidinreduktase   |
| LB      | LB-Medium   |
| LUC     | Luziferase  |
| m       | Milli ( $10^{-3}$ )   |
| M       | 1. Mega ( $10^6$ ); 2. Mol/Liter                                    |
| MCS     | Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )         |
| min     | Minute  |
| MES     | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure                                   |
| MRE     | MYB-Erkennungselement ( <i>MYB recognition element</i> )            |
| MRS     | MYB-Erkennungssequenz ( <i>MYB recognition sequence</i> )           |
| mRNA    | <i>messenger</i> RNA  |
| MS      | Murashige-Skooge  |
| 4-MU    | 4-Methylumbelliferon  |
| 4-MUG   | 4-Methylumbelliferyl-Glukuronid                                     |
| n       | Nano ( $10^{-9}$ )  |
| nt      | Nukleotid(e)  |
| nos     | Nopalin-Synthase  |
| OD      | optische Dichte   |
| ORF     | offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )                    |
| OX      | Überexpression  |
| PAGE    | Polyacrylamidgelelektrophorese                                      |
| PAL     | Phenylalanin-Ammonium-Lyase   |
| PCR     | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PEG     | Polyethylenglykol   |
| qRT-PCR | Quantitative <i>real time</i> PCR                                   |
| rev     | Rückwärts ( <i>reverse</i> )  |
| RFP     | Rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )     |
| RNA     | Ribonukleinsäure  |
| RNase   | Ribonuklease  |
| rpm     | Umdrehungen pro Minute  |
| RT      | Raumtemperatur  |
| RT-PCR  | Reverse-Transkriptase-PCR   |
| sec     | Sekunde   |
| SDS     | Natriumdodecylsulfat  |
| T       | Thymin  |
| TEMED   | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                                    |
| Taq     | <i>Thermus aquaticus</i>  |
| TF      | Transkriptionsfaktor  |
| Tris    | Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan                                    |
| tRNA    | transfer Ribonukleinsäure   |
| tt      | transparent testa   |
| U       | unit (Enzymeinheit)   |
| UTR     | untranslatierte Region  |
| UV      | Ultraviolett  |
| ü. N.   | über Nacht  |
| V       | Volt  |
| v/v     | Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )                    |
| W       | Watt (Leistung, Energiestrom)                                       |
| w/v     | Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )                    |
| WD40    | 40 Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholungen                         |
| wt      | Wildtyp   |
| $\mu$   | Mikro ( $10^{-6}$ )   |
| °C      | Grad Celsius  |
| X-Gluc  | 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-Glukuronat                    |
| YFP     | Gelb fluoreszierenden Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> ) |

# 1. Einleitung

Die sessile Lebensweise der Landpflanzen setzt eine enorme Anpassungsfähigkeit an biotische und abiotische Stressoren voraus, um das Überleben unter ungünstigen Lebensbedingungen zu meistern. Dabei kommt dem pflanzenspezifischen Sekundärmetabolismus eine wichtige Aufgabe zu. Derzeit sind mehr als 10.000 pflanzliche Sekundärmetabolite bekannt (Wink, 1999), die in die Phenylpropanoide (z.B. Lignine, Anthocyane, Stilbene), die Alkaloide (z.B. Tabak-Alkaloide, Terpenoid-Alkaloide) und die Isoprenoide (Carotinoide) eingeteilt werden können (Wink, 2003). Diesen Sekundärmetaboliten werden vielfältige Aufgaben zugeschrieben, wie etwa die Abwehr von Pathogenen und Herbivoren, der Schutz vor UV-Strahlung, der Verdunstungsschutz oder die mechanische Festigung (Taylor *et al.*, 1992; Debeaujon *et al.*, 2000; Winkel-Shirley, 2001).

Ein bereits sehr gut untersuchter Sekundärmetabolismus ist die Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Die Flavonoidbiosynthese ist sowohl räumlich als auch zeitlich während der pflanzlichen Entwicklung reguliert und wird durch eine Vielzahl von exogenen und endogenen Einflüssen wie Licht, Pathogene, verschiedene Stresse und pflanzliche Wachstumsregulatoren induziert. Um die Vielzahl der Strukturgene differenziell zu steuern, erfolgt oft eine Regulationskontrolle durch Transkriptionsfaktoren, die sowohl gewebsspezifisch, entwicklungspezifisch oder als Antwort auf äußere Signale hergestellt werden und sich im allgemeinen durch ihre Bindung an die DNA auszeichnen. Im Flavonoidstoffwechsel wurden bereits viele Transkriptionsfaktoren identifiziert, die regulierende Einflüsse auf die Strukturgene haben. Eine wichtige Zweigstelle in dem Anthocyanstoffwechsel, als Teil des Flavonoidbiosyntheseweges, ist die Regulation des *DIHYDROFLAVONOL-REDUKTASE* (*DFR*)-Promotors. Dabei sind zwei Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung, *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1* (*PAP1*, im Folgenden als *MYB75* bezeichnet) und *TRANSPARENT TESTA8* (*TT8*, im Folgenden als *BHLH42* bezeichnet), die als Regulatoren des Schlüsselenzyms *DFR* fungieren (Borevitz *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). Dabei treten sowohl die beiden Transkriptionsfaktoren untereinander als auch mit dem *DFR*-Promotor in Kontakt.

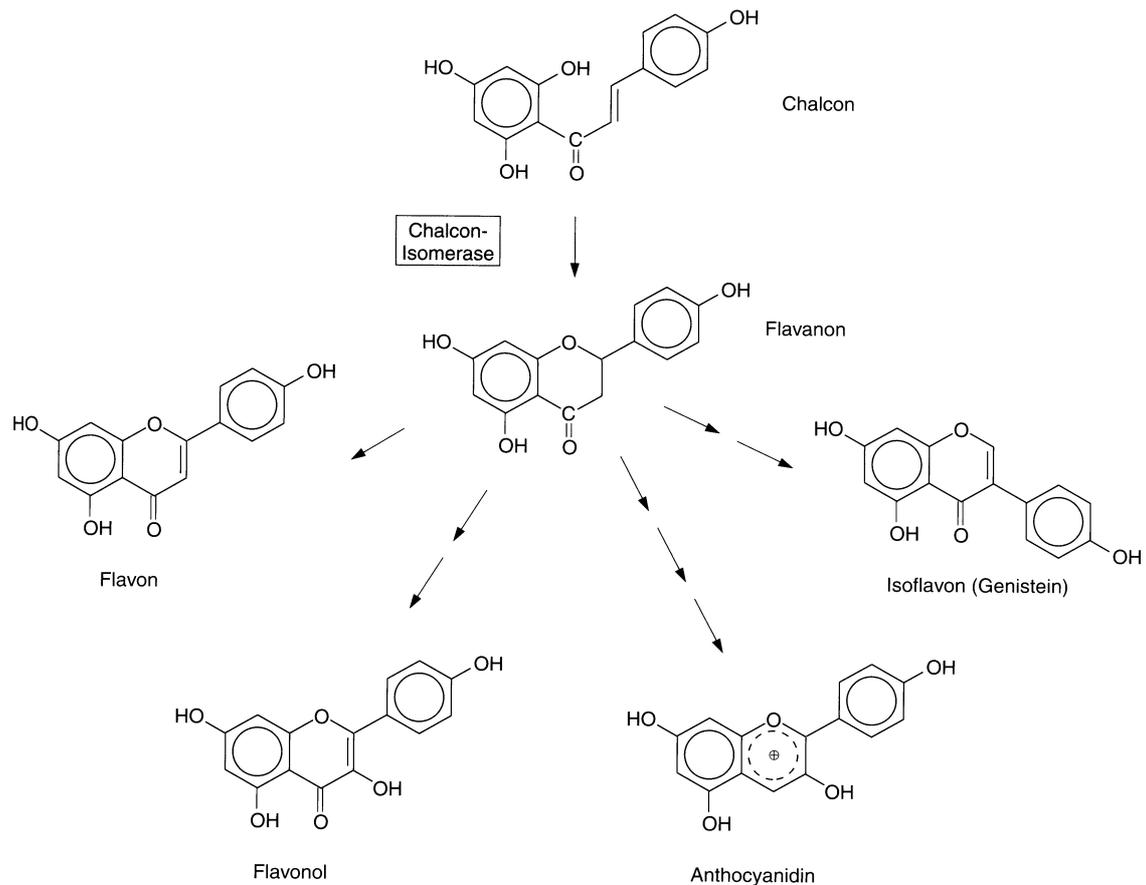
## 1.1 Flavonoide

Flavonoide erfüllen in Pflanzen viele wichtige Funktionen. Sie dienen als Schutz- und Signalpigmente der Blüten, Blätter und Früchte, als Fraßschutz und zur Pathogenabwehr. Ebenso haben Flavonoide Schutzfunktion vor ultraviolettem Licht und sind an Entwicklungsprozessen wie Pollenreifung und Entwicklung der Samenschale beteiligt

(Taylor *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Debeaujon *et al.*, 2000; Winkel-Shirley *et al.*, 2001). Derzeit sind mehr als 8000 verschiedene Flavonoide bekannt (Harborne und Williams, 2000; Pietta *et al.*, 2000; Harborne und Williams, 2001). Die Flavonoide, zu denen beispielsweise die Flavone, Isoflavone und Anthocyanidine zählen, enthalten neben dem Phenylpropangerüst einen, über eine C3-Brücke verbundenen, zweiten aromatischen Ring, der aus drei Molekülen Malonyl-CoA gebildet wird. Ausgangssubstanz für eine Vielfalt von Flavonoiden ist Chalkon, welches durch die Chalkonisomerase in Flavanon umgewandelt wird (Abb. 1-1).

Chalkone sind weitverbreitete gelbe Blütenpigmente, Flavone sind hellgelbe Blütenpigmente, Leukoanthocyane sind rot bis orange Pigmente und Anthocyane bilden eine große Anzahl roter und blauer Pigmente (Koes *et al.*, 2005). Derart gefärbte Blüten sorgen vor allem für die Anlockung von pollenübertragenden Insekten (Koes *et al.*, 1994). Anthocyane sind Glykoside der Anthocyanidine, wobei die Zuckerkomponente meist über eine O-glykosidische Bindung mit dem Pyryliumring verknüpft ist. Anthocyane, die in der Vakuole gelagert werden, umfassen nicht nur Blütenfarbstoffe, sondern sie dienen auch dem Schutz (Beschattung) der Mesophyllzellen. Pflanzen, bei denen das Wachstum durch Stressfaktoren (Phosphatmangel, Kälte, Versalzung des Bodens, hohe Lichtintensitäten) verringert ist, zeigen eine rote Blattfärbung, die auf die Akkumulation von Anthocyanen zurückzuführen ist (Mol *et al.*, 1996). Stressbedingungen reduzieren oft den Verbrauch von NADPH und ATP, das aus der Lichtreaktion der Photosynthese bereitgestellt wird. Eine Beschattung der Mesophyllzellen durch Anthocyane drosselt die Lichtreaktion und vermindert so eine Über-Energetisierung und Über-Reduktion des photosynthetischen Elektronentransports. Proanthocyanidine, die in der Samenschale akkumulieren dienen dazu, den Embryo vor Pathogenen und Herbivoren zu schützen (Shirley, 1998). Sie haben aber ebenso Einfluss auf die Stabilität der Samenschale und beeinflussen dadurch unter anderem die Dormanz (Debeaujon *et al.*, 2000; Debeaujon *et al.*, 2001).

Das Studium der Flavonoidbiosynthese bietet sich zur Analyse besonders an, da die genetische Variabilität der zugrunde liegenden Gene sowie die Mutantenphänotypen leicht zugänglich sind. Der Flavonoidmetabolismus stellt daher ein beliebtes Modellsystem für die Genexpression und deren Regulation in Pflanzen dar.



**Abbildung 1-1: Chalkon als Ausgangssubstanz für eine Vielzahl an Flavonoiden (Heldt, 2003).**

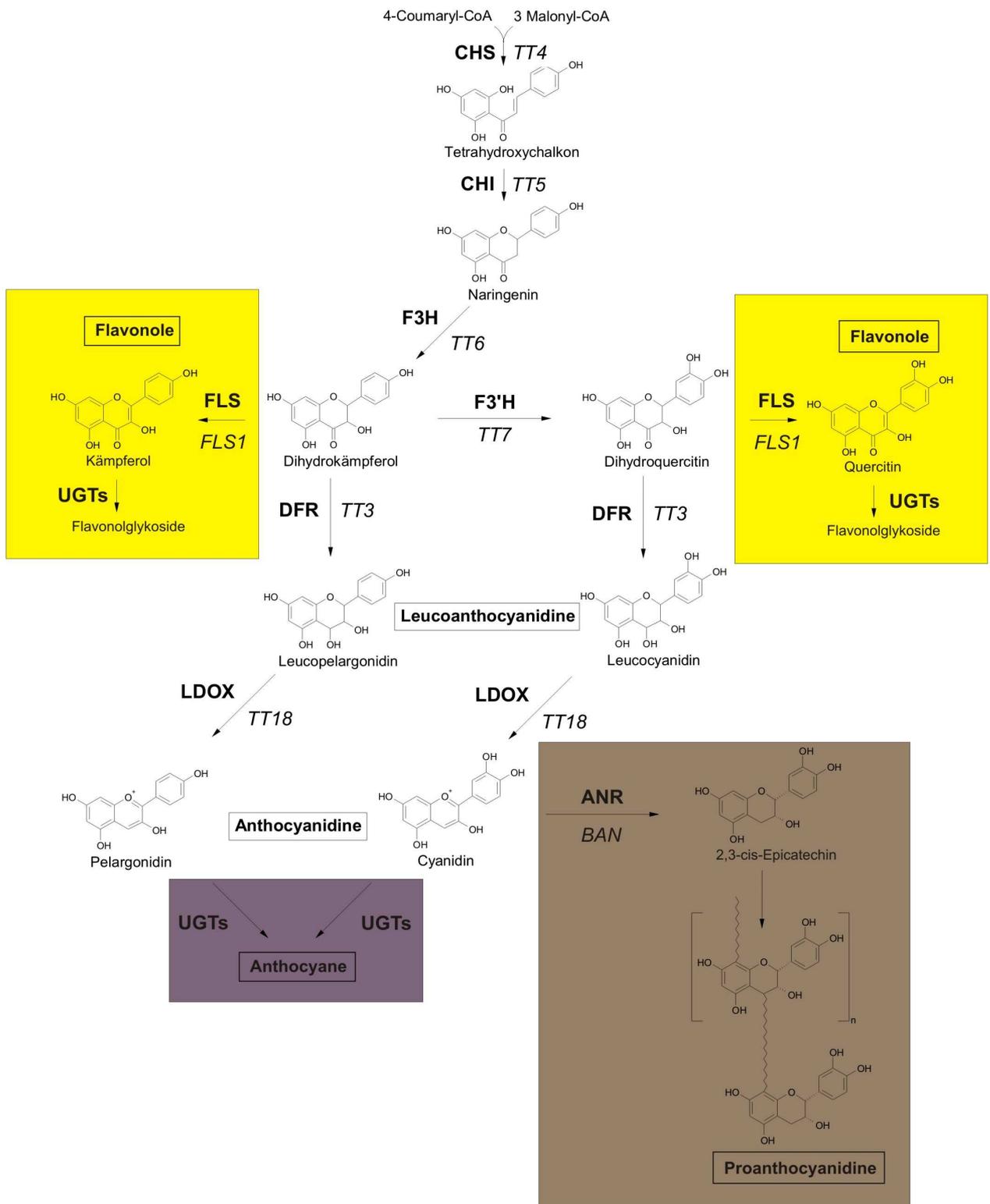
### 1.1.1 Die Biosynthese der Flavonoide

Die vorliegende Arbeit fokussiert vor allem den Anthocyanbiosyntheseweg als Zweig des Flavonoidbiosyntheseweges in *A. thaliana*. Diese Modellpflanze ist für die Untersuchung der Genexpression und deren Regulation aufgrund ihrer kurzen Generationszeit und des übersichtlichen und bereits vollständig sequenzierten Genoms (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) gut geeignet. Im Folgenden soll die Biosynthese der Flavonoide hauptsächlich für *A. thaliana* beschrieben werden (Abb. 1-2).

Es werden drei Flavonoidgruppen synthetisiert, die Flavonole, die Anthocyane und die Proanthocyane. Die Biosynthese der Flavonole und Anthocyane erfolgt in epidermalen Gewebeschichten an der Innenseite des rauen endoplasmatischen Retikulums (Winkel-Shirley, 2001). Flavonole und Proanthocyanidine werden in den inneren Integumenten der Samenschale akkumuliert (Mol *et al.*, 1988; Debeaujon *et al.*, 2003). Das Ausgangsprodukt aller Flavonoide ist die aromatische Aminosäure Phenylalanin, die zu einem aktivierten Zimtsäurederivat p-Coumaroyl-Coenzym A ( $C_6-C_3$ ) synthetisiert wird

(Heller und Hahlbrock, 1980). Im einleitenden Schritt der Flavonoidbiosynthese bildet die Chalkonsynthase (CHS) dann aus 4-Coumaryl-CoA und drei Malonyl-CoA das zyklische Tetrahydroxychalkon. Die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert die Isomerisierung zu Naringenin, welches das Grundgerüst der Flavonoide darstellt. Die Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) hydroxyliert das Naringenin zu einem Dihydrokämpferol, welches einerseits durch die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) zu Dihydroquercitin, andererseits mittels Flavonolsynthase (FLS) zu Kämpferol umgesetzt werden kann (Britsch *et al.*, 1981). Diese Zwischenprodukte der Klasse der Dihydroflavonole sind die letzten Intermediate, die sowohl zur Synthese der Flavonole als auch zur Synthese der Anthocyane und Proanthocyanidine führen können (Abb. 1-2). Für die Synthese der Flavonole werden die Dihydroflavonole von der Flavonolsynthase (FLS) zu Kämpferol und Quercitin umgesetzt (Forkmann *et al.*, 1986).

Verschiedene Glykosyltransferasen setzen diese zu stabilen Flavonolglykosiden um, die als Endprodukte in die Vakuole transportiert werden (Jones *et al.*, 2003). Für die Synthese der Anthocyane und Proanthocyanidine werden die Dihydroflavonole durch die Aktivität der Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) zu Leukoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diolen) umgesetzt (Forkmann, 1991). In divergenten Syntheseprozessen werden daraus die Anthocyane und Proanthocyanidine gebildet. Bei der Anthocyanbiosynthese werden aus den Flavan-3,4-diolen durch die Leucoanthocyanidindioxygenase (LDOX) die 3-OH-Anthocyanidine und in weiteren Schritten die Anthocyane gebildet (Forkmann, 1991). Die Proanthocyanidine werden durch LDOX bzw. die Anthocyanidinreduktase (ANR, wird vom *BANYULS*-Gen (*BAN*) kodiert) zu den Flavan-3-olen reduziert. Kondensierte Tannine (=Proanthocyanidine) sind Biopolymere aus mehreren Flavan-3-ol-Einheiten (Xie *et al.*, 2003). Durch Oxidationsprozesse bilden sich die in der Vakuole lokalisierten braunen Proanthocyanidine, die in *A. thaliana* nur in der äußeren Samenschale (Testa) zu finden sind (Debeaujon *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Lepiniec *et al.*, 2006). Bis zur Einlagerung in die Vakuole sind Flavonole, Anthocyane und Proanthocyanidine instabil und nicht funktionell (Winkel-Shirley, 2001).



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana*.**

Die wichtigsten Intermediate und Verbindungen sind durch Strukturformeln, die beteiligten Enzyme durch Abkürzungen gekennzeichnet. Der flavonolspezifische Teil des Stoffwechsels ist gelb unterlegt, der anthocyan-spezifische Teil violett und der proanthocyanidinspezifische Teil braun. CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; DFR, Dihydroflavonolreduktase; LDOX, Leucoanthocyanidindioxygenase; ANR, Anthocyanidinreduktase; UGT, UDP-Glycosyltransferasen. Kodierende Gene sind kursiv dargestellt. BAN, BANYULS; TT, TRANSPARENT TESTA (Huep, 2008).

## 1.1.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese

Die unterschiedlichen Teile des Flavonoidstoffwechselweges und die Funktionen der End- und Zwischenprodukte erfordern eine exakte Feinregulation des Biosyntheseweges in Reaktion auf externe Stimuli wie etwa UV-Strahlung, Trockenheit, Kälte, Hitze oder Verwundung sowie im Kontext der Pflanzenentwicklung (Mol *et al.*, 1996; Koes *et al.*, 2005). Die Regulation der Transkription von Genen ist ein grundlegender Prozess, der durch die Interaktion vieler verschiedener Proteine gesteuert wird. Die Regulation des Flavonoidbiosyntheseweges erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription (Mol *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1999). Vor allem in *Zea mays* (Mais) ist die Regulation der Strukturgene, die an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, ausführlich untersucht worden (Singh *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1990; Consonni *et al.*, 1993; Tonelli *et al.*, 1994). Sie basiert auf dem kombinatorischen Zusammenwirken von MYB-Proteinen der C1-Unterfamilie (C1, PL1 und P) mit den so genannten R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren (R, Lc, Sn und B), die in unterschiedlichen Organen zeitlich und räumlich koordiniert exprimiert werden (Consonni *et al.*, 1997; Neuffer *et al.*, 1997). Dabei sind die MYB-Proteine C1 und PL1 zur Aktivierung ihrer Zielgene (*C2/CHS*, *A1/DFR*, *As/Aureusidinsynthase*, *AS*) von der Interaktion mit einem der R/B-bHLH-Faktoren abhängig. Eine Kontrolle von Phenylpropanoidgenen durch die Kombination von verschiedenen MYB, bHLH und WD40 Faktoren wurde auch in anderen Pflanzen wie *Petunia hybrida* (Petunie) gezeigt. Dabei sind alle drei Proteinklassen gleichermaßen beteiligt (Quattrocchio *et al.*, 1999).

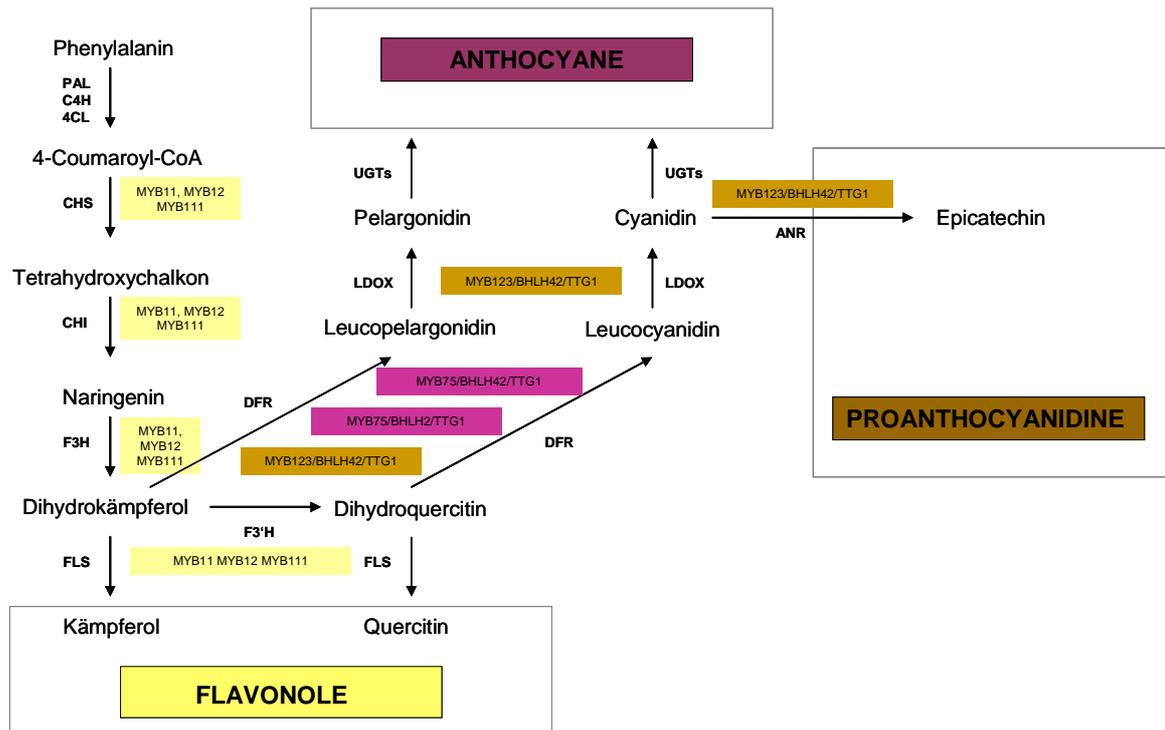
In *A. thaliana* werden ebenfalls einige Reaktionsschritte im Flavonoidbiosyntheseweg durch diese Kombination aus MYB, bHLH und WD40 Transkriptionsfaktoren reguliert. Das MYB- und das bHLH-Protein sind dabei für die korrekte DNA-Bindung an den Zielpromotor verantwortlich, während das WD40-Protein TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktorkomplexes benötigt wird (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Debeaujon *et al.*, 2003; Marles *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2006). Die *ttg* Mutanten sind sowohl im Phenylpropanoidbiosyntheseweg als auch in der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung defekt. Beide Prozesse werden also auf der Grundlage dieses Faktors reguliert (Walker *et al.*, 1999). Ein Komplex aus MYB123/BHLH42 (TT2/TT8) und TTG1 reguliert sowohl die Expression der proanthocyanidinspezifischen Gene in der Samenschale als auch der anthocyaninspezifischen Gene *DFR* und *LDOX* (Abb. 1-3), wobei *DFR* und *LDOX* dabei zu den so genannten „späten“ Genen des Flavonoidbiosyntheseweges (LBG, *late biosynthesis genes*) gehören (Pelletier *et al.*, 1997). In den entsprechenden *tt2* und *tt8*

Mutanten ist die Expression von *DFR* und *LDOX* reduziert, was durch die gelbe Samenfarbe angezeigt wird (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001).

Ein Transkriptionsfaktorkomplex, der einen entscheidenden Schlüsselschritt im Anthocyanbiosyntheseweg in Keimlingen reguliert, ist MYB75/BHLH2/TTG1 (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT, PAP1/ENHANCER OF GLABRA3, EGL3/TTG1) (Abb. 1-3). Das Protein MYB75 hat eine wichtige Funktion in der Biosynthese der Anthocyane, weshalb sich die Bezeichnung PAP1 von PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT ableitet (Borevitz *et al.*, 2000). Weitere TTG1-abhängige MYB- und BHLH-Faktoren sind MYB90 (PAP2) und BHLH1 (GLABRA3, GL3), welche ebenfalls die Expression der *F3'H*, *DFR* und *LDOX* Gene der Flavonoidbiosynthese beeinflussen können (Borevitz *et al.*, 2000; Cominelli *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008). Durch die Überexpression von *MYB75* und *MYB90* kommt es in *A. thaliana* Pflanzen zu einer Erhöhung der Transkriptmenge mehrerer Strukturgene des Phenylpropanoidbiosyntheseweges wie *CHS*, *DFR* und *Phenylalanin-Ammonium-Lyase* (*PAL*). Das führt zu einer Akkumulation von Anthocyanen, Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren. Die Pflanzen zeigen dabei eine deutlich rötlich-violette Färbung (Borevitz *et al.*, 2000).

Eine weitere Gruppe von MYB Faktoren, die PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES (PFG, MYB11/PFG2, MYB12/PFG1 und MYB111/PFG3) können wichtige Schritte im Flavonoidbiosyntheseweg von *A. thaliana* regulieren (Stracke *et al.*, 2007). Diese flavonolspezifischen Aktivatoren benötigen für ihre Funktionalität weder einen bHLH- noch einen WD40-Partner (Mehrtens *et al.*, 2005). Sie beeinflussen die Expression der „früh“ im Stoffwechsel auftretenden Gene *CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS* (EBG, *early biosynthesis genes*) in verschiedenen Geweben von *A. thaliana* Keimlingen (Stracke *et al.*, 2007).

Eine systematische Analyse von *A. thaliana* Mutanten führte zu der Identifizierung einer großen Anzahl von Mutanten des Phenylpropanoidbiosyntheseweges (Shirley *et al.*, 1995; Wisman *et al.*, 1998; Winkel-Shirley *et al.*, 2001). Dabei wurden Mutanten der Flavonoidbiosynthese anhand des „*transparent testa*“ (TT) Phänotyps identifiziert (Koorneef *et al.*, 1990). Aufgrund fehlender kondensierter Tannine in der Samenschale können bei diesen Mutanten gelbe bis hellbraune Samen beobachtet werden, die leicht von den dunkelbraunen Wildtyp-Samen unterschieden werden können. In einigen TT-Mutanten konnten Defekte in den Strukturgenen *DFR/tt3*, *CHS/tt4*, *CFI/tt5*, *F3H/tt6*, *F3'H/tt7* der Flavonoidbiosynthese festgestellt werden (Shirley *et al.*, 1995; Wisman *et al.*, 1998). In diesen Mutanten zeigt die gesamte Pflanze einen Defekt in der Flavonoid-Akkumulation.



**Abbildung 1-3: Regulation der Flavonoidbiosynthese.**

Einige wichtige MYB-, bHLH- und WD40-Regulatoren sind in den Boxen neben den Enzymen aufgeführt. PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; 4CL, 4-Cumarat-CoA-Ligase; CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; DFR, Dihydroflavonolreduktase; LDOX, Leucoanthocyanidinindioxygenase; ANR, Anthocyanidinreduktase.

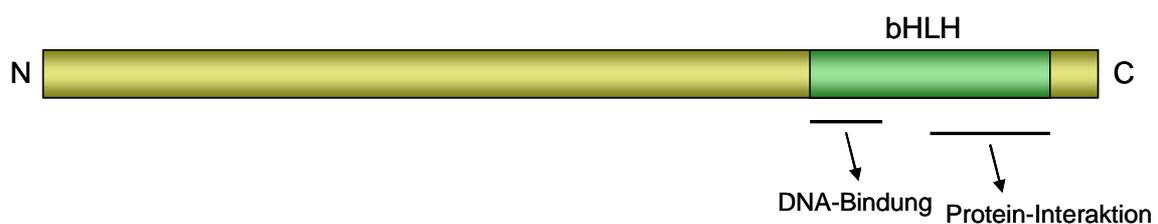
## 1.2 Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana*

Basierend auf Ähnlichkeiten ihrer DNA-Bindedomäne werden Transkriptionsfaktoren verschiedenen Familien zugeordnet (Pabo *et al.*, 1994). Dazu gehören WD40, WRKY, basische Region/Leucin Reißverschluss (bZIP), MADS-Box, basische Helix-Schleifen-Helix (bHLH) und R2R3-MYB Faktoren, welche alle an der transkriptionellen Kontrolle der Flavonoidbiosynthesegene beteiligt sind (Übersicht in Ramsay und Glover, 2005). Viele Familien von Transkriptionsfaktoren kommen dagegen in allen eukaryotischen Organismen vor. In Pflanzen können diese besonders stark exprimiert sein, wie etwa die MADS-Box-Proteine, die bZIP-Proteine oder die MYB-Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000).

In *A. thaliana* kodieren etwa 1600 Gene für mögliche Transkriptionsfaktoren, was fast 6% aller Gene in *A. thaliana* entspricht (Riechmann *et al.*, 2000). Allerdings ist bisher nur ein kleiner Prozentsatz genetisch charakterisiert. Die bHLH- und die R2R3-MYB-Proteine gehören zu den größten Gruppen von Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* (Riechmann *et al.*, 2000; Heim *et al.*, 2003).

### 1.2.1 Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren

Die basischen Helix-Schleifen-Helix Proteine bilden eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Säugetieren, wo sie umfassend untersucht wurden (Atchley *et al.*, 1997; Ledent *et al.*, 2002). Dabei wurde eine Region hoher Sequenzhomologie in zehn tierischen DNA-bindenden Proteinen entdeckt, die aufgrund ihrer Aminosäureeigenschaften und räumlichen Struktur als bHLH (basische Helix-Schleifen-Helix)- Domäne bezeichnet wurde (Murre *et al.*, 1989). Die bHLH-Proteine haben in den verschiedenen Systemen vielfältige Aufgaben in transkriptionsregulierenden Netzwerken von der Zellproliferation bis hin zur Entwicklung der Zellidentität (Grandori *et al.*, 2000; Massari *et al.*, 2000). Sie sind wichtig für die Regulation des circadianen Oszillators (Makino *et al.*, 2002) oder regulieren stress- oder hormonabhängige Gene und sind so auch am Wachstum und an Entwicklungsvorgängen in Pflanzen beteiligt (Friedrichsen *et al.*, 2002). In *A. thaliana* wurden bisher mehr als 133 verschiedene bHLH-Proteine identifiziert. Dabei wurden sie aufgrund von Sequenzhomologien und Übereinstimmungen in der Genstruktur in zwölf Subgruppen unterteilt (Heim *et al.*, 2003). Die bHLH-Domäne besteht aus etwa 60 Aminosäuren mit zwei unterschiedlichen Regionen (Abb. 1-4). Das N-terminale Ende der basischen Region, das an der DNA-Bindung beteiligt ist, besteht aus etwa 15 Aminosäuren mit hochkonservierten basischen Aminosäure-Resten. Das C-terminale Ende bildet die Helix-Schleifen-Helix (HLH) Region, die an der Protein-Interaktion beteiligt ist (Murre *et al.*, 1989; Heim *et al.*, 2003). Sie besteht hauptsächlich aus hydrophoben Resten, die zwei amphipathische Helices bilden, welche durch eine Aminosäureschleife getrennt werden (Murre *et al.*, 1989).



**Abbildung 1-4: Struktur eines R/B-ähnlichen bHLH-Proteins.**

Die basische Helix-Schleifen-Helix (HLH, grün) Domäne befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins und ist an der DNA-Bindung und der Protein-Interaktion beteiligt.

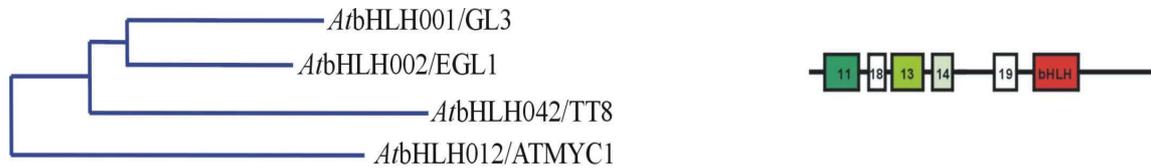
BHLH-Proteine besitzen die Fähigkeit, mit einem konservierten H-E-R-Konsensus an den Positionen 5-9-13 der basischen HLH-Domäne an die DNA zu binden (Atchley *et al.*, 1997). Das DNA-Motiv ist dabei ein Hexanukleotid-Konsensus, der als E-Box bezeichnet wird (5'-CANNTG-3') (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Diese DNA-Motive sind durch die beiden Kernbasen charakterisiert. Die palindromische G-Box ist hierbei das am häufigsten

beschriebene DNA-Motiv (5'-CACGTG-3'). Dabei vermitteln hochkonservierte Aminosäurereste in der basischen Region der bHLH-Proteine die Spezifität für die äußeren Basen, während andere konservierte Aminosäurereste für die Wahrnehmung der zentralen Basen entscheidend sind (Robinson *et al.*, 2000). Neben der Fähigkeit der Transkriptionsfaktoren, an die DNA zu binden, können sie außerdem Interaktionen mit weiteren Proteinen eingehen, um die Transkription der Zielgene zu regulieren. Daher liegen auch außerhalb der bHLH-Domäne signifikante Sequenzhomologien innerhalb bestimmter Subgruppen der bHLH-Proteine vor, die einen funktionellen Zusammenhang zeigen (Heim *et al.*, 2003). Dabei kann die Interaktion zwischen den HLH-Regionen zur Bildung von Homo- und Heterodimeren mit eng strukturverwandten aber auch mit einer Vielzahl von anderen Proteinen führen (Shimizu *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998).

Die ersten bHLH-Faktoren in Pflanzen wurden im Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese in Mais entdeckt (Goff *et al.*, 1992; vgl. 1.1.2). Dabei sind eine Reihe von bHLH-Proteinen beschrieben worden, die essentiell für die Bildung des violetten Pigments im Anthocyanbiosyntheseweg sind und mit den R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren zur transkriptionellen Regulation ihrer Zielgene interagieren (Neuffer *et al.*, 1997; Petroni *et al.*, 2000). Orthologe dieser Mais-bHLH-Proteine sind in *A. thaliana* ebenfalls an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt.

Die Fähigkeit zur Interaktion zwischen bHLH und MYB Transkriptionsfaktoren konnte auch in *A. thaliana* nachgewiesen werden: Die Transkriptionsfaktoren BHLH1 (GLABRA3/GL3) und MYB0 (GLABROUS1/GL1) sind beide durch Interaktion an der Regulation der Epidermisdifferenzierung bei der Trichom- und Wurzelhaarbildung beteiligt (Payne *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor BHLH42 (TT8) kann durch Interaktion mit dem MYB-Protein MYB123 (TT2) die Synthese der kondensierten Tannine in der Samenschale regulieren (Nesi *et al.*, 2000 und Nesi *et al.*, 2001). Neben den R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen und den MYB-Proteinen sind an der Regulation noch das WD40-Protein (TTG1) oder das WRKY-Protein (TTG2) beteiligt, die gemeinsam ein regulatorisches Netzwerk bilden, um die Zielgene zu aktivieren (Schiefelbein *et al.*, 2003). Im *A. thaliana* Genom konnten bisher 32 Genfamilien identifiziert werden, die für die bHLH-Transkriptionsfaktoren kodieren (Riechmann *et al.*, 2000). Jede Familie ist charakterisiert durch eine definierte Region hoch konservierter Aminosäurereste, die die DNA-Bindedomäne beinhaltet. Innerhalb der Familien gibt es Subgruppen, die strukturell einander ähnlicher sind als andere Mitglieder der bHLH-Familie. Ebenso gibt es kleinere Motive außerhalb der DNA-Bindedomäne, die Struktur- und Sequenzhomologien aufweisen (Heim *et al.*, 2003). Innerhalb dieser Subgruppen könnten die Faktoren mit ähnlichen Motiven eventuell redundante Funktionen aufweisen (Zhang *et al.*, 2003). Dabei weisen die Subgruppen IIIId, IIIe und IIIf die größte Ähnlichkeit zu den R/B-ähnlichen

bHLH-Proteinen aus Mais auf. Zu der Subgruppe III<sub>f</sub>, die die ZmSn-ähnlichen bHLH-Proteine in *A. thaliana* bilden, gehören die bHLH-Proteine BHLH1/GL3, BHLH2/EGL1/EGL3, BHLH12/MYC1 und BHLH42/TT8 (Abb. 1-5).



**Abbildung 1-5: Ausschnitt aus einer Übersicht über pflanzliche bHLH Transkriptionsfaktoren.**

Subgruppe III<sub>f</sub> der bHLH Transkriptionsfaktoren besitzt kleinere Motive außerhalb der DNA-Bindedomäne, die Struktur- und Sequenzhomologien aufweisen (modifiziert nach Heim *et al.*, 2003).

## 1.2.2 Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren

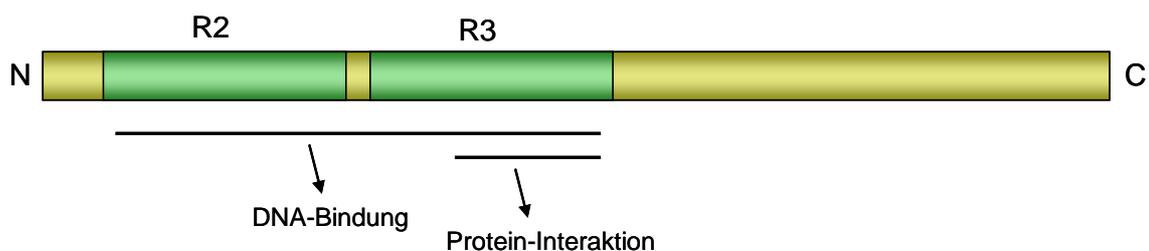
Proteine der MYB-Familie gehören zu einer phylogenetisch alten Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten. Strukturell sind die pflanzlichen MYB Transkriptionsfaktoren den tierischen MYB-Proteinen ähnlich, da beide eine MYB-Domäne im N-terminalen Bereich enthalten (Solano *et al.*, 1997). Die Funktion der MYB-Domäne liegt einerseits in der DNA-Bindung, sie kann aber auch an Proteininteraktionen beteiligt sein, wie etwa bei der Interaktion mit bHLH-Proteinen (Goff *et al.*, 1992). Anders als in Tieren ist in Pflanzen eine große Anzahl von MYB-Proteinen zu finden (Kranz *et al.*, 1998; Rubino *et al.*, 2001; Stracke *et al.*, 2001). Es sind vielfältige biologische Schutzfunktionen beschrieben worden. So werden MYB-Proteine durch Stressfaktoren wie Trockenheit, Nässe und UV-Strahlung, durch Pathogenbefall oder durch Pflanzenhormone induziert (Urao *et al.*, 1993; Kirik *et al.*, 1998a; Abe *et al.*, 2003). Andere MYB Transkriptionsfaktoren sind an der Spross- oder Blattmorphogenese, an der Blütenbildung oder an der Keimung beteiligt (Byrne *et al.*, 2000; Penfield *et al.*, 2001; Galego und Almeida, 2002).

Jeder MYB-Repeat (R1, R2, R3) besteht aus drei  $\alpha$ -Helices von 51-53 hochkonservierten Aminosäuren, wobei die zweite und die dritte Helix eine Helix-Turn-Helix-Konformation ausbilden und sich in die große Furche der DNA anlagern kann (Jin und Martin, 1999). Dabei scheint besonders der dritte MYB-Repeat für die Sequenzspezifität bei der DNA-Bindung verantwortlich zu sein (Gabrielsen *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1994). Durch die sequenzspezifische Bindung an die Promotoren der Zielgene kann deren Transkription so aktiviert oder reprimiert werden.

Anhand der Anzahl der Sequenzwiederholungen können die MYB-Proteine in Pflanzen in drei Gruppen eingeteilt werden: Die 1R-MYB-Proteine, die R2R3-MYB-Proteine und die 3R-MYB-Proteine.

Die 1R-MYB-Proteine enthalten eine Sequenzwiederholung. LONG HYPOKOTYL (LHY) oder CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) als 1R-MYB-Proteine aus *A. thaliana* spielen eine Rolle bei der circadianen Rhythmik und können sequenzspezifisch an die DNA binden (Schaffer *et al.*, 1998; Carré und Kim, 2002).

Die R2R3-MYB-Proteine enthalten zwei Sequenzwiederholungen (Abb. 1-6). Die R2R3-MYB-Domänen sind, mit wenigen Ausnahmen, zu 40% identisch in der Konsensussequenz. Die Aminosäuren dieser Domänen sind in der gesamten Familie zu mehr als 90% konserviert (Avila *et al.*, 1993; Stracke *et al.*, 2001). Diese beiden Sequenzwiederholungen (R2 und R3) sind für die sequenzspezifische Bindung an die DNA ausreichend (Gabrielsen *et al.*, 1991).



**Abbildung 1-6: Struktur eines R2R3-MYB-Proteins.**

Die R2R3-Domäne (grün) befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins und ist an der DNA-Bindung und an der Protein-Interaktion beteiligt.

Das R2R3-MYB-Protein C1 aus Mais aktiviert die Transkription der Gene, deren Produkte an der Biosynthese der Anthocyanpigmente in der äußeren Aleuronschicht des Maiskorns benötigt werden. Das sehr ähnliche MYB-Protein PL übernimmt diese Aufgabe in der restlichen Maispflanze (Martin und Paz-Arez, 1997). In *A. thaliana* stellen die R2R3-MYB-Proteine mit 126 Mitgliedern die größte Gruppe dar (Romero *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Nach konservierten Motiven im C-terminalen Bereich werden sie in 24 Untergruppen eingeteilt (Stracke *et al.*, 2001). Sie kontrollieren in Pflanzen spezialisierte physiologische Funktionen (Borevitz *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Stracke *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004). R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren sind zum Beispiel maßgeblich an der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels beteiligt (siehe Kapitel 1.1.2). Die Regulation der Anthocyanbiosynthese in *A. thaliana* wird durch die kombinatorische Interaktion von R2R3-MYB Proteinen der Subgruppe 6 (Stracke *et al.*, 2001) und bHLH-Proteinen der Untergruppe IIIf kontrolliert (zusammengefasst in Quattrocchio *et al.*, 2006).

In MYB Proteinen wurde eine konservierte Aminosäure-Sequenz in Helix 1 und 2 des R3-Repeats lokalisiert, die die strukturelle Basis für solche Protein-Interaktionen darstellt (Zimmermann *et al.*, 2004). Dabei bildet der Transkriptionsfaktor MYB123/TT2 beispielsweise mit dem Transkriptionsfaktor BHLH42/TT8 in Kombination mit dem WD40-Faktor TTG1 einen regulatorischen Komplex, welcher in Pflanzen durch die Bindung an den *BAN*-Promotor dessen Transkription aktivieren kann (Baudry *et al.*, 2004). MYB75/PAP1 und MYB90/PAP2 stellen mit spezifischen bHLH-Faktoren (BHLH1/GL3, BHLH2/EGL3, BHLH12/MYC1, BHLH42/TT8) ebenfalls Aktivatoren der Anthocyanbiosynthese dar (Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004). Eine Überexpression von *MYB90/PAP2* oder von *MYB75/PAP1* führt zu einer Akkumulation von Anthocyanen (Borevitz *et al.*, 2000). Die *MYB75/PAP1* Überexpression resultiert ebenfalls in einer erhöhten Expression der Gene *PAL*, *CHS*, *DFR* und *Glutathione-S-Transferase (GST)* (Borevitz *et al.*, 2000). Kotransfektionsexperimente in At7-Protoplasten identifizierten MYB12 als flavonolspezifischen Regulator der Flavonoidbiosynthese (Mehrtens *et al.*, 1999).

R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren können ebenfalls als Repressoren wirken. So hat MYB4 negativ-regulatorische Eigenschaften auf das Gen des für die Sinapalbiosynthese benötigten Enzyms Cinamat-4-hydroxylase (Jin *et al.*, 2000). 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)

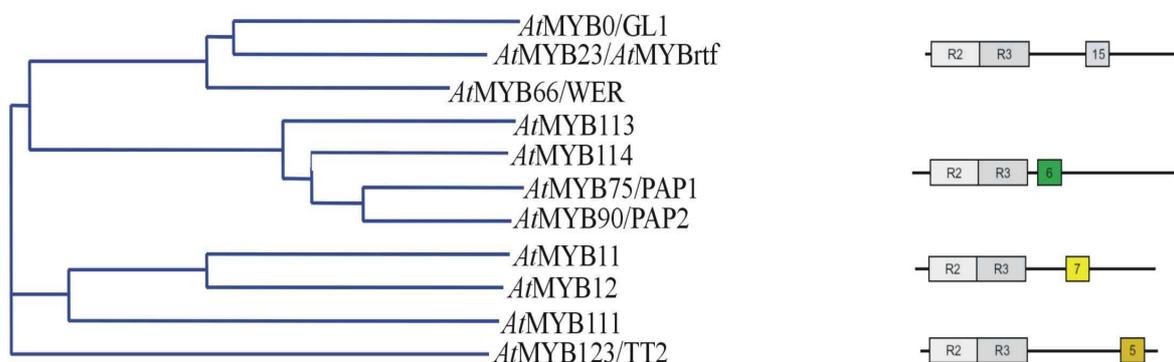
Eine zweite wichtige Aufgabe der MYB-Proteine ist die Kontrolle der Zellform. So ist das Protein MYB90/PAP2 zusammen mit BHLH1/GL1 aus *A. thaliana* wichtig für die Differenzierung von Blatt- und Stielzellen zu Trichomen (Borevitz *et al.*, 2000). Dabei kontrolliert das Protein TTG1 das BHLH1-Protein und steuert somit die Trichomentwicklung und die Anthocyanproduktion (Quattrocchio *et al.*, 2006). Die Expansion dieser Genfamilie lief vermutlich parallel mit der Entwicklung neuer zellulärer Funktionen in höheren Pflanzen (Martin und Paz-Arez, 1997).

Die 3R-MYB-Proteine enthalten drei Sequenzwiederholungen. Diese Proteine, von denen in *A. thaliana* fünf gefunden wurden, besitzen vermutlich konservierte Funktionen in Eukaryoten (Kranz *et al.*, 2000). Sie spielen, ähnlich wie die tierischen 3R-MYB-Gene, eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus. Dabei regulieren sie beispielsweise die Transkription von Cyclingenen (Ito *et al.*, 2001).

Der C-terminale Bereich der MYB-Proteine ist nicht konserviert. Hier finden sich strukturell sehr unterschiedliche Motive, die nach ihrer Funktionalität in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (Stracke *et al.*, 2001). Diese Gruppen sind sowohl an der

Regulation des sekundären Metabolismus (Borevitz *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Stracke *et al.*, 2001; Baudry *et al.*, 2004) als auch an der Kontrolle zellulärer Morphogenese, bei der Meristementwicklung (Lee und Schiefelbein, 1999), der circadianen Rhythmik, der Pathogenabwehr (Daniel *et al.*, 1999) und bei der Stressantwort der Pflanze beteiligt (Meissner *et al.*, 1999; Teng *et al.*, 2005).

Die Analyse der Proteinsequenz ermöglichte eine Einteilung der Proteine in Subgruppen, die vorwiegend auf Sequenzhomologien im Bereich der MYB-Domäne basieren (Abb. 1-7). Die C-terminalen Bereiche weisen nur sehr geringe Homologien auf, die sich innerhalb der Subgruppen auf kurze Motive beschränken (Stracke *et al.*, 2001).



**Abbildung 1-7: Ausschnitt aus einer Übersicht über pflanzliche MYB Transkriptionsfaktoren.** Untergruppen der MYB Subgruppe der R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren (Stracke *et al.*, 2001).

Die Informationen zu putativen Aktivierungsdomänen in den MYB-Faktoren sind begrenzt. In Hefe 2-Hybrid- und Protoplasten-Kotransfektionsexperimenten konnte die Aktivierungsdomäne auf die R3 Wiederholung eingegrenzt werden. Dabei zeigen Deletionsklone von MYB75 (MYB75 $\Delta$ 190) keine Aktivierung mehr, wenn die letzten 58 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins fehlen (Zimmermann *et al.*, 2003; Stracke, unveröffentlicht). Durch weitere Deletionsexperimente in Protoplasten-Kotransfektionsexperimenten konnte die putative Aktivierungsdomäne auf 16 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins eingegrenzt werden: LEKFLEESQEVDILVP (Becker und Stracke, unveröffentlicht). In anderen R2R3-MYB-Proteinen konnte eine putative Aktivierungsdomäne ebenfalls in den letzten Aminosäuren des C-terminalen Endes des Proteins identifiziert werden (Goff *et al.*, 1991; Urao *et al.*, 1996). Mittels Hefe 1-Hybrid Experimenten konnte ebenfalls in der C-terminalen Region von den Proteinen MYB66 (WEREWOLF/WER) und MYB0 (GLABROUS1/GL1) eine 24 Aminosäuren lange Sequenz als Aktivierungsdomäne ermittelt werden (Lee und Schiefelbein, 2001). Um der Frage nachzugehen, welche Aminosäuren eine Rolle bei der

Aktivierung des *DFR*-Promotors durch MYB75 und BHLH42 spielen, wurden gezielt Aminosäuren in der putativen Aktivierungsdomäne von MYB75 gegen Alanin ausgetauscht, um die Wirkung auf die Aktivierung des *DFR*-Promotors im Protoplasten-Kotransfektionsassay zu bestimmen (Zimmermann, 2003; Ruhe, 2007). Bisher beschriebene Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren bestehen hauptsächlich aus sauren Aminosäuren (Urao *et al.*, 1996). Durch Protoplasten-Kotransfektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass der AS-Austausch E207A bei dem MYB75 Protein zu einer signifikanten Verminderung der Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors um 65% führt (Ruhe, 2007). Weiterhin zeigen die Doppelmutationen L201A E202A und P216A E217A eine deutliche Verminderung der Aktivierung des *DFR*-Promotors um 50%. Diese Ergebnisse zeigen, dass wahrscheinlich das Zusammenspiel mehrerer Aminosäuren für eine gezielte Interaktion mit der DNA von Bedeutung ist.

### 1.3 Die Expression eukaryotischer Gene – Stress-induzierte Promotoraktivität

Die eukaryotische Genexpression wird häufig auf der Ebene der Transkription reguliert. Dabei binden bestimmte Proteine (Transkriptionsfaktoren) an gezielte Abschnitte der DNA, um die Transkription zu initiieren bzw. zu reprimieren. Die Transkriptionsfaktoren treten dabei sowohl mit der DNA als auch miteinander in Wechselwirkung. Um die entscheidenden Elemente der transkriptionellen Regulation in den Promotorregionen zu untersuchen, müssen zunächst Minimalpromotoren und *cis*-wirkende Elemente in den Promotorregionen der Strukturgene ermittelt werden. An diese kurzen DNA-Sequenzen, die *cis*-aktiven Elemente, binden sequenzspezifisch die Transkriptionsfaktoren (McKnight und Tjian, 1986; Dynan, 1989; Johnson und McKnight, 1989). Promotoren besitzen häufig eine Reihe verschiedener *cis*-Elemente, wobei die Kombination dieser Elemente die Spezifität eines Promotors bestimmt. Da diese *cis*-Elemente häufig in direkter Nachbarschaft zueinander liegen, kommt es über Protein-Protein-Wechselwirkungen der gebundenen Transkriptionsfaktoren zur Ausbildung eines dreidimensionalen, stereospezifischen Komplexes (Tjian und Maniatis, 1994). Daher haben viele *cis*-aktive Elemente einen synergistischen Effekt auf die Promotoraktivität.

Durch das Erstellen von Promotor/Reporter-Konstrukten können in einem einfachen System die *in vivo* Funktionen von möglichen koregulatorischen Transkriptionsfaktorkomplexen mittels transienter Expressionsanalysen effektiv getestet werden. So wurde für den *CHS*-Promotor ein funktionaler Minimalpromotor definiert, der in transienten Expressionsstudien in At7-Protoplasten für die Untersuchung der *cis*-wirkenden Elemente eingesetzt wurde (Hartmann, 1997). Basierend auf vorherigen Untersuchungen wurden

drei unterschiedliche putative *cis*-wirkende Elemente ermittelt (Hartmann, 1997). In funktionellen Kotransfektionsstudien wurde gezeigt, dass zwei der drei *cis*-wirkenden Elemente, das ACGT Containing Element (ACE) und das MYB Recognition Element (MRE), für die Lichtinduktion entscheidend sind (Hartmann *et al.*, 2005). Zwischen dem ACE und dem MRE findet sich im *CHS*-Minimalpromotor ein drittes Element, das R Recognition Element (RRE), welches eine Bindestelle für bHLH-Transkriptionsfaktoren darstellt. Das RRE ist nicht an der lichtregulierten Expression des *CHS*-Gens beteiligt, jedoch kann der *CHS*-Promotor lichtunabhängig durch einen MYB-Faktor aktiviert werden. Blockmutationen zeigten, dass sowohl ein intaktes MRE als auch ein intaktes RRE für die Interaktion mit dem MYB-bHLH-Komplex zur Aktivierung der Expression des *CHS*-Promotors benötigt werden. Dabei scheint der Einfluss des MRE größer als der des RRE (Hartmann *et al.*, 2005).

Die Aktivität bestimmter Promotoren kann durch äußere Einflüsse wie Licht oder Nährstoffe erhöht werden. Im Stoffwechsel und bei der Energieerzeugung in Pflanzen spielen zum Beispiel Zuckerstoffe eine wichtige Rolle. Diese haben viele unterschiedliche Funktionen als Botenstoffe, in der Regulation der Photosynthese, der Mobilisierung von Nährstoffen oder bei der Stimulation des Wachstums (Koch, 1996; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2002). Daher existieren in Pflanzen verschiedene sensorische Mechanismen, die auf unterschiedliche Zucker reagieren. Verschiedene Studien zeigen, dass diese Stoffe einen anregenden Effekt auf die Anthocyanbiosynthese in verschiedenen pflanzlichen Organen haben. Dabei induziert Saccharose zum Beispiel die Transkription der Anthocyanbiosynthesegene und die Pigment-Akkumulation in sich entwickelnden Blütenkronen von *Petunia hybrida* (Weiss, 2000). Ebenso in Zellen von *Vitis vinifera* oder *Raphanus sativus* wird die Anthocyanakkumulation durch die Anwesenheit von Zucker verstärkt (Larronde *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2003). In *A. thaliana* Keimlingen werden Anthocyane hauptsächlich im Hypokotyl gebildet, was durch die violette Färbung angezeigt wird, wenn die Pflanzen auf zuckerhaltigem Medium anwachsen (Mita *et al.*, 1997b; Ohto *et al.*, 2001). Außerdem zeigen sich entwickelnde *A. thaliana* Keimlinge ein charakteristisches, dynamisches Akkumulationsmuster der Anthocyanpigmentation. Die Färbung beginnt zwischen dem zweiten und dritten Tag und erreicht das Maximum am sechsten Tag, während die Färbung ab dem siebten Tag wieder rückläufig ist. Dabei ist die Färbung begrenzt auf den äußeren Rand der Keimblätter und die epidermalen Zellschichten des Hypokotyls (Kubasek *et al.*, 1992). Dabei kann die Transkription von Anthocyanbiosynthesegenen wie *CHS* durch Zucker induziert werden (Martin *et al.*, 2002; Hiratsu *et al.*, 2003). Teng *et al.* (2005) haben gezeigt, dass Saccharose im Gegensatz zu Maltose oder Glukose die Anthocyanbiosynthese in *A. thaliana* Keimlingen am stärksten induzieren kann. In der

Signalkette zwischen Saccharoseregulation und Anthocyanakkumulation ist der MYB-Faktor MYB75/PAP1 der zentrale Punkt. Saccharose induziert konzentrationsabhängig die Akkumulation von *MYB75* mRNA. Das MYB75-Protein ist also wesentlich für die Saccharose-vermittelte Expression des *DFR*-Gens.

## 1.4 Die Interaktion von MYB, bHLH und WD40 Proteinen in *A. thaliana*

Pflanzliche MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren können physikalisch interagieren (Nesi *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Baudry *et al.*, 2004). Durch diese Interaktion sind sie in der Lage koregulatorisch die transkriptionelle Aktivität einer Vielzahl an Promotoren zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die MYB-bHLH-TTG1 Interaktionen auf ganz bestimmte Subgruppen der bHLH Proteine (III und IV, nach Heim *et al.*, 2003) beschränkt bleiben.

Die bHLH Proteine haben zwei funktionelle Interaktionsdomänen. Die Kartierung der Interaktionsdomänen von BHLH2 und BHLH12 in Hefe 2-Hybrid Experimenten durch Zimmermann (2003) ergab unter anderem, dass nach N-terminalen Deletionen von BHLH2 und BHLH12 keine Interaktion mit MYB75 mehr zu erkennen war. Die Interaktionsdomäne mit dem MYB Protein liegt daher im N-terminalen Bereich der HLH-Domäne. Das WD40-Protein TTG1 interagiert in Hefe 2-Hybrid Experimenten sowohl mit den bHLH-Vollängenproteinen als auch mit den N-terminal verkürzten Proteinen. Die Interaktionsdomäne für das WD40-Protein TTG1 ist daher im C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 331 und 401 lokalisiert (Zimmermann, 2003). Zusätzlich besitzen die bHLH Proteine noch eine Interaktionsdomäne, die der Homo- bzw. Heterodimerisierung mit weiteren bHLH Proteinen dient. Diese befindet sich im C-terminalen Teil der HLH-Domäne. Die Aktivierungsdomäne zur Bindung der bHLH Proteine an die DNA befindet sich dagegen im basischen Teil der HLH-Domäne (Zimmermann, 2003). In direkten Interaktionsstudien zu bHLH Transkriptionsfaktoren der Subgruppe IIIf mit bekannten R2R3-MYB-Interaktionspartnern wie MYB75/PAP1 und MYB123/TT2 konnten solche Interaktionen durch *in vitro Pull-Down* Experimente bestätigt werden (Melcher *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 2003). Durch die Analyse von Deletionsmutanten konnte die Interaktionsdomäne auf Seiten der R2R3-MYB-Proteine am Beispiel von MYB75 bezogen auf die R3-Wiederholung eingegrenzt werden. Für die Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen ist weder die R2-Wiederholung (bis Aminosäure W53) noch der C-Terminus (ab Aminosäure 114) des R2R3-MYB Proteins notwendig. Aminosäure-Austausche in der ersten Hälfte der R3-Wiederholung schwächen

die Interaktion mit bHLH-Faktoren, daher sind diese Aminosäuren wahrscheinlich an der Ausbildung und Stabilität der Interaktion beteiligt (Zimmermann, 2003).

Proteine mit WD40-Sequenzwiederholungen sind ebenfalls an der Interaktion mit MYB und bHLH Proteinen und damit auch an vielen unterschiedlichen regulatorischen Prozessen pflanzlicher Biosynthesewege und Entwicklungsprozesse wie Signaltransduktion, Zellzyklusregulation, Regulation des Sekundärstoffwechsels oder RNA-Processing beteiligt (Neer *et al.*, 1994; Nesi *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). Dabei sind zwei pflanzliche WD40-Proteine bekannt, die in die Anthocyanbiosynthese eingreifen, TTG1 aus *A. thaliana* (Koornneef *et al.*, 1981; Walker *et al.*, 1999) mit vier WD40-Sequenzwiederholungen und ANTHOCYANIN11 (AN11) aus *Petunia hybrida* (Koes *et al.*, 1994; Vetten *et al.*, 1997) mit fünf WD40-Sequenzwiederholungen. Beide Proteine regulieren die Anthocyanbiosynthese zusammen mit bHLH-Proteinen (BHLH42 bzw. AN1) und MYB-Faktoren (MYB123 bzw. AN2) (Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999). TTG1 ist eine essentielle Komponente der gewebsspezifischen Regulation der kondensierten Tannine und der Epidermis-Differenzierung bei der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung. Dabei bindet TTG1 an BHLH1, was eine Verbindung der beiden Phänotypen der Trichomlosigkeit („GLABRA“) und des Fehlens der kondensierten Tannine in der Samenschale („TRANSPARENT TESTA“) schafft. TTG1 hat ebenso einen Effekt auf die Anthocyanbiosynthese (Koornneef *et al.*, 1981). Da in *ttg1* Mutanten keine Anthocyanbiosynthese mehr vorhanden ist, ist die Funktion von TTG1 nicht auf bestimmte Gewebe beschränkt. Ebenso hat TTG1 einen Einfluss auf die Produktion der *seed coat mucilage* (der die Samenschale bedeckende Polysaccharidschleim) (Zhang *et al.*, 2003). Die Expression von TTG1 ubiquitär in der Pflanze und der Einfluss von TTG1 auf eine Vielzahl verschiedener Regulationsmechanismen legt eine eher generalistische Funktion für TTG1 nahe. Da aber keine direkte DNA-Bindung für WD40-Faktoren gezeigt werden konnte, sind sie keine Transkriptionsfaktoren im eigentlichen Sinn. Sie interagieren mit bHLH-Transkriptionsfaktoren und haben so als Mediatoren einen Einfluss auf die Regulation der verschiedenen Zielgene.

Für die Komplexbildung interagieren entweder der bHLH und der WD40 Faktor miteinander oder der bHLH und der MYB Faktor, der WD40 und der MYB Faktor können anscheinend nicht interagieren (Payne *et al.*, 2000). Auch bei der Regulation der Trichomentwicklung erfolgt eine kombinatorische Interaktion von BHLH1/GL3 und MYB0/GL1 mit TTG1, wobei nicht klar ist, ob der WD40 Faktor eine stabilisierende oder eine modifizierende Funktion hat (Payne *et al.*, 2000). Ein ähnliches Interaktionsmuster tritt bei der Regulation der Synthese der kondensierten Tannine auf. Dabei regulieren MYB123 und BHLH42 gemeinsam die Expression des *BAN*-Gens (Nesi *et al.*, 2000).

Auch hier wird für die transkriptionelle Aktivierung ein trimere Komplex aus TTG1/BHLH42/MYB123 benötigt (Baudry *et al.*, 2004), wobei wiederum nur TTG1 und BHLH42 bzw. BHLH42 und MYB123 interagieren können, nicht aber TTG1 und MYB123. TTG1 hat ebenfalls Auswirkungen auf das Aktivierungspotential von bHLH/MYB Interaktionspartnern im Kotransfektionssystem von At7-Protoplasten. Die Ko-Überexpression von TTG1 zusammen mit bHLH (BHLH42, BHLH2) und MYB (MYB123, MYB75) Faktoren führt zu einem starken Anstieg der Reporteraktivität des Promotorkonstruktes (*BAN*, *DFR*) über das 10-fache gegenüber Ansätzen ohne TTG1 (Baudry *et al.*, 2004; Heim, 2003). Wird dagegen ein RNAi-*Silencing*-Konstrukt von TTG1 zugegeben, dann zeigt sich eine deutliche Reduktion der Reporteraktivität (Heim, 2003). Dieser Effekt lässt sich jedoch nur zeigen, wenn auch ohne zusätzliche Zugabe von TTG1 eine Reporteraktivierung durch die Kombination eines bHLH mit einem MYB Faktor zeigen lässt. Die Aktivitätssteigerung durch TTG1 beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer direkten DNA-Bindung. Vielmehr dient der WD40-Faktor der Stabilisierung oder der Modifikation des DNA-bindenden bHLH/MYB-Komplexes (Heim, 2003)

## 1.5 Einzelmolekülmikroskopie

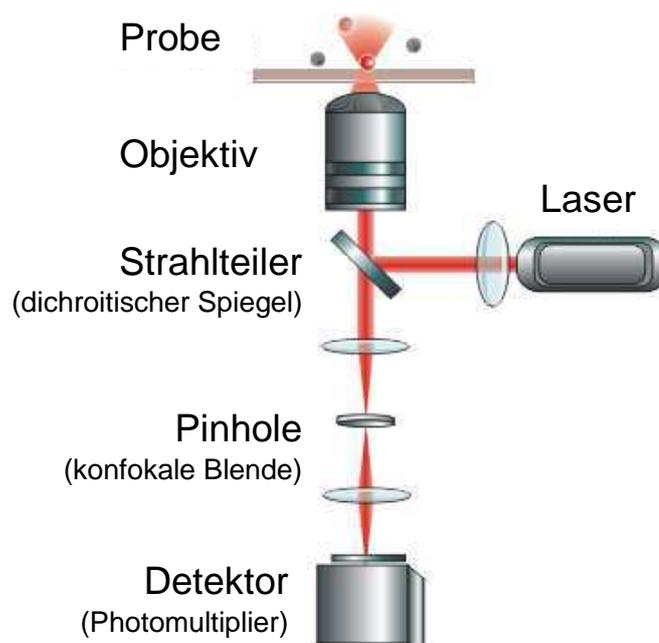
### 1.5.1 Konfokale Mikroskopie

Die Forschung verbindet immer mehr Methoden und Messprinzipien aus unterschiedlichen Naturwissenschaften. Besonders die Physik mit ihrer konfokalen Lasermikroskopie und der Möglichkeit zur Einzelmolekül-Detektion trägt im Wesentlichen dazu bei, Fragestellungen aus den Biowissenschaften aufzunehmen. Dadurch wird gezeigt, wie wichtig es ist, dass sich die Wissenschaften weiter annähern, um das Potential des jeweils anderen (fachfremden) Kooperationspartners nutzen und so neue Sichtweisen entwickeln zu können.

Die optische Mikroskopie gewinnt seit der Entwicklung der konfokalen Mikroskopie (Minsky, 1955) immer mehr Einfluss in Anwendungen aus allen Bereichen der Naturwissenschaft. Zwar ist das Auflösungsvermögen geringer als etwa bei der Raster-Elektronen-Mikroskopie, dennoch hat die Lichtmikroskopie und vor allem die Fluoreszenzmikroskopie entscheidende Vorteile. Da diese Methode nicht invasiv ist, können lebende Zellen untersucht werden. Außerdem ist die Fluoreszenzmikroskopie nicht auf einen physikalischen Zustand limitiert, es kann ein großer Bereich zeitlicher Dynamik und spektraler Breite abgedeckt werden, die mit hoher Auflösung gezielt untersucht werden können. Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht Untersuchungen mit

extrem hoher Sensitivität. Dabei können einzelne Moleküle sichtbar gemacht werden und so für spektroskopische Untersuchungen genutzt werden. Erfolgreiche Einzelmolekülexperimente gab es bereits vereinzelt Anfang der 90er Jahre (Moerner *et al.*, 1989; Shera *et al.*, 1990). Von Rigler *et al.* (1993) wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erstmals frei diffundierende einzelne Moleküle in Lösung detektiert. Die nichtinvasive konfokale Mikroskopie ist eine wichtige Methode bei vielen Einzelmoleküluntersuchungen, da das unkomplizierte Messverfahren ein sehr gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis zeigt.

Bei der konfokalen Mikroskopie dient das Objektiv nicht nur zur Anregung der Probe, sondern auch zum Abbilden der Fluoreszenz. Das Bild wird dabei nicht wie in der Weitfeldmikroskopie in der Zwischenbildebene erzeugt und anschließend vergrößert, sondern 1:1 auf dem Detektor abgebildet. Das Licht außerhalb der Brennebene des Objektivs wird ausgeblendet, d.h. nur der Fokus des Objektivs wird auf dem Detektor abgebildet. Dies wird zum einen durch ein punktförmiges Anregungsvolumen, dem Laserfokus, erreicht und zum anderen durch das Ausblenden störenden Hintergrunds durch eine Aperturblende (*Pinhole*) im Detektionsstrahlengang. In einem konfokalen Mikroskop liegt das Beobachtungsvolumen also in einem Bereich von einigen Femtolitern. Diese Methode bietet den Vorteil, dass eine definierte Schicht eines Objektes (einer Zelle) punktgenau abgerastert werden kann, ohne dass Hintergrundsignale außerhalb der Bildebene stören. In Abb. 1-8 ist der Aufbau eines konfokalen Mikroskops schematisch abgebildet.



**Abbildung. 1-8: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops** (modifiziert nach Tinnefeld, 2002).

Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Strahlteiler durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv aufgefangen, welches auch zur Fokussierung des Anregungslichts eingesetzt wird. Anschließend wird der Fokuspunkt über eine Tubuslinse auf den Detektoren abgebildet.

## 1.5.2 Weitfeldmikroskopie

Für Studien an lebenden Zellen (Protoplasten, Pflanzen) wird das möglichst schnelle Aufnehmen vieler Bilder immer wichtiger. Besonders die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Proben erfordert zeitliche Auflösungen von wenigen Millisekunden bis Sekunden. Daher wird die Weitfeldmikroskopie-Methode sehr häufig genutzt, da sie vor allem bei der Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen sowie für die hochsensitive Detektion schwacher Fluoreszenz-Signale große Vorteile bietet. Ein weiterer Vorteil gegenüber konfokalen Laserscanning-Mikroskopen ist die parallele Beleuchtung aller Bildpunkte und deren simultane Detektion mit schnellen Kameras für eine schnelle Durchlicht-Kontrast Detektion. Wichtig für die Leistungsfähigkeit ist dabei die richtige Wahl der Komponenten für die Beleuchtung, Trennung von Beleuchtungslicht und Signal, sowie dem Detektionssystem. Bei der Weitfeldmikroskopie wird der Laserstrahl durch ein Linsensystem aufgeweitet und auf die hintere fokale Ebene fokussiert, nachdem er durch einen dichroitischen Spiegel reflektiert worden ist. Der Laserstrahl tritt nun parallel aus dem Objektiv aus und regt somit eine räumlich große Fläche der Probe an. Das Fluoreszenzlicht wird wieder durch das Objektiv eingesammelt, tritt durch den dichroitischen Spiegel hindurch und wird zusätzlich noch durch einen Emissionsfilter vom Anregungslicht getrennt. Mit Hilfe einer hochempfindlichen Kamera wird dieses Fluoreszenzlicht detektiert. Bei der Weitfeldmikroskopie wird also die ganze Probe im Untersuchungsfeld beleuchtet. Durch die parallele Beleuchtung des gesamten Bildfeldes können die Prozesse, die über die Fluoreszenz sichtbar gemacht werden, über die gesamte Zeit der Anregung aufgezeichnet werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch Fluoreszenz aus anderen Bereichen als der Fokusebene auf die Kamera fällt. Das Bild wird dabei umso unschärfer, je mehr Fluoreszenz aus den Ebenen darüber oder darunter abgestrahlt wird. Daher ist es wichtig, möglichst dünne Objekte bzw. Schnitte von Objekten zu detektieren. Der Vorteil der Weitfeldmikroskopie gegenüber der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie besteht darin, dass ein bestimmter Teil der Probe räumlich und dynamisch durch die Kamera aufgelöst wird und so Aussagen über die Verteilung der fluoreszierenden Moleküle getroffen werden können.

### 1.5.3 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode für die Protein-DNA Bindungsstudie ist die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS). Diese Methode wurde in den 70er Jahren entwickelt (Madge *et al.*, 1972), jedoch konnte weder eine hohe zeitliche Sensitivität erreicht werden, noch konnte in geringen Probenkonzentrationen gemessen werden (Elson und Madge, 1974; Madge *et al.*, 1974; Webb, 1976). Mit der Einführung der konfokalen Mikroskopie (Riegler *et al.*, 1993) entstand in der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ein starker Aufschwung. Erstaunliche Entwicklungen in der Mikroskopie und derzeitige technische Neuerungen ermöglichen heute routinemäßige Messungen von verschiedensten biomolekularen Wechselwirkungen (Hess *et al.*, 2002; Krichevski und Bonnet, 2002; Muller *et al.*, 2003; Schwille und Hausstein, 2005; Thompson *et al.*, 2002; Van Craenenbroeck und Engelborghs, 2000; Rigler und Elson, 2001). Durch den konfokalen Aufbau wurde das Signal-zu-Rausch Verhältnis wesentlich verbessert, wodurch Messungen auf Einzelmolekülebene möglich wurden.

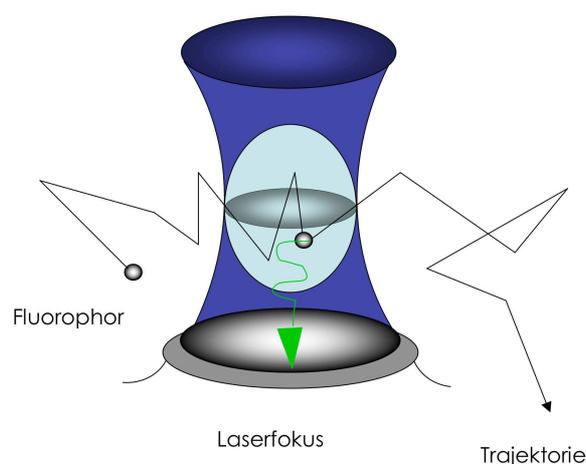
Gegen Ende der 90er Jahre wurde die Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen entwickelt (Enderlein *et al.*, 2003; Weiss, 1999). Dieses Messverfahren ermöglicht es, ein einzelnes System und dessen Eigenschaften zu beobachten. Bei diesen Einzelmolekülmessungen werden Verteilungen anstatt Mittelwerte als Ergebnisse erhalten. Es gibt Informationen über das Zeitverhalten eines einzelnen Farbstoffmoleküls. Dabei werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe als Sonden zur Untersuchung biologischer Prozesse oder in Polymeren zur Untersuchung nanoskopischer Eigenschaften eingesetzt (Zhuang *et al.*, 2000).

Die FCS ist eine sehr vielseitig einsetzbare Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Sie beruht auf der Analyse der gemessenen Fluoreszenzspektren bzw. deren Fluktuationen. Sie misst Fluktuationen von Photonen, die von fluoreszenzmarkierten Molekülen abgegeben werden, welche durch ein definiertes Volumen diffundieren (zusammengefasst in Rigler und Elson, 2001; Maiti *et al.*, 1997; Eigen und Rigler, 1994; Van Craenenbroeck und Engelborghs, 2000). Die fluoreszenzmarkierten Moleküle diffundieren in einer kleinen Volumeneinheit durch einen Laser und geben Fluoreszenzlicht ab. Diese Fluktuationen zeigen sowohl die durchschnittliche Zahl von fluoreszenzmarkierten Molekülen in einem definierten Volumen an, als auch die charakteristische Diffusionszeit jedes Moleküls in diesem konfokalen Volumen. FCS ist eine sehr sensitive Methode, die nur eine geringe Konzentration an Fluorophoren benötigt. Da dadurch einzelne diffundierende Moleküle untersucht werden können, kann es als sehr sensitiver Nachweis von Protein-Protein-DNA

Wechselwirkungen eingesetzt werden. Bei geeigneter Konzentration der Moleküle kann eine Einzelmolekül-Detektion (*Single Molecule Detection*) durchgeführt werden.

Somit wurde FCS zu einer robusten, einfach zu bedienenden und zuverlässigen Technik (Krichevski *et al.*, 2002), mit der mit einer einfachen Messung und einer geringen Probenmenge vielfältige Informationen gesammelt werden können. Mittels FCS können photophysikalische Prozesse wie etwa Molekulargewichte oder Diffusionskoeffizienten bestimmt und chemische Reaktionen sowie molekulare Aggregationen aufgeklärt werden. Die FCS wird im Hinblick auf das zeitliche Auflösungsvermögen und die Signalqualität lediglich durch die Qualität der Detektoren und der Auswertetechnik begrenzt. Die einfachste und weitverbreitetste Anwendung für FCS ist die Analyse der Diffusion von Molekülen, die von der BROWNSchen Molekularbewegung verursacht wird (Abb. 1-9). Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle. Dadurch wird die Fluktuation durch das Hinein- und Herausdiffundieren der Moleküle in und aus dem Detektionsvolumen beschrieben. Die Fluktuation geht auf lokale Konzentrationsschwankungen der fluoreszierenden Moleküle zurück.

Ein stark fokussierter Laserstrahl beleuchtet eine Volumeneinheit in der Größe von einigen Femtolitern. Durch diesen Fokus diffundieren fluoreszierende Teilchen aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung (Abb. 1-9). Das emittierte Fluoreszenzlicht, das von den Fluorophoren abgegeben wird, wenn sie durch den Fokus diffundieren, wird konfokal gesammelt und detektiert. Die Fluktuationsamplitude hängt dabei von der Konzentration und der Helligkeit der Teilchen ab. Die Frequenz dagegen zeigt die Zeitkonstante, die von der Diffusionszeit der Moleküle bzw. ihrer Emissionskinetik abhängen.

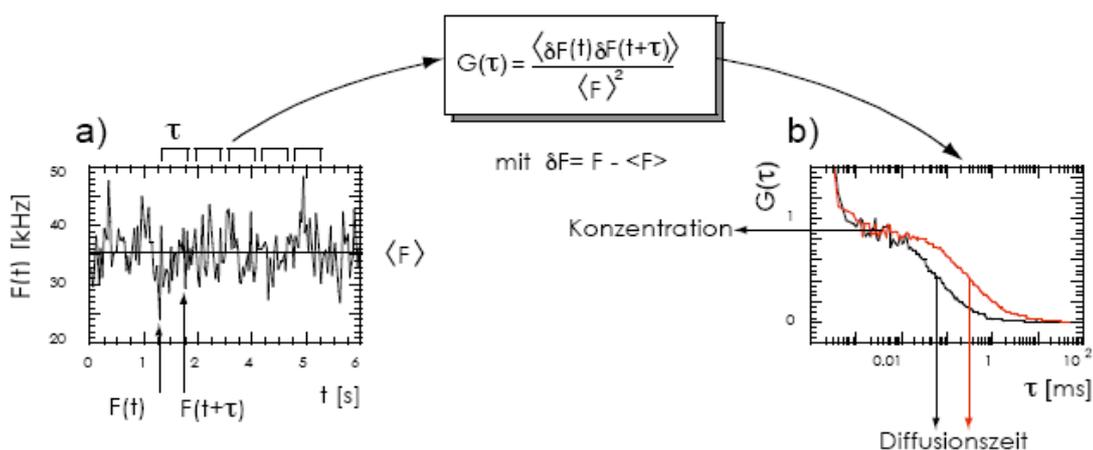


**Abbildung 1-9: Prinzip der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS).**

Aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung diffundieren Fluorophore durch einen mikroskopisch kleinen Fokus. Die durch die Anregung emittierten Fluoreszenzphotonen werden gesammelt und detektiert (modifiziert nach Peters, 2006).

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie können einzelne Moleküle sichtbar gemacht werden (Sauer *et al.*, 2003). Wichtig dabei ist sowohl ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis als auch das Reduzieren des Anregungsvolumens, wodurch die Hintergrundstrahlung vermindert und das detektierte Fluoreszenzsignal eines einzelnen Farbstoffs vergrößert wird. Die Lösung wird dabei soweit verdünnt, bis sich im zeitlichen Mittel nur noch ein Molekül im Laserfokus befindet. Eine andere Störgröße ist die Autofluoreszenz von organischen Verbindungen. Da aber nur wenige in der Natur vorkommende Verbindungen über 600 nm fluoreszieren (Mörtelmaier *et al.*, 2002), kann die Autofluoreszenz durch eine Anregungswellenlänge >600 nm auf ein Minimum reduziert werden. Daher ist die Wahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes besonders wichtig.

Um die Daten analysieren zu können, wird das Signal zeitlich korreliert (Abb. 1-10). Dabei können über die Autokorrelation verschiedene physikalische Parameter wie etwa die Diffusions- und Gleichgewichtskonstante oder die Konzentration bestimmt werden.



**Abbildung 1-10: Analyse der FCS-Messungen.**

(a) Fluktuationen des Fluoreszenzsignals, die am Detektor aufgenommen werden. Die Signale werden zeitlich nach der oben beschriebenen Funktion korreliert. (b) Die daraus erzeugte Autokorrelationskurve steht in Abhängigkeit vom zeitlichen Versatz. Die Amplitude ist umgekehrt proportional zur Teilchenzahl im Fokus. Bei längeren Diffusionszeiten verschiebt sich die Korrelationskurve nach rechts (rot) (Weidemann, 2002).

Da in einem sehr kleinen Beobachtungsvolumen gemessen wird, gilt die FCS-Methode als Einzelmolekültechnik. Bei einem Volumen von einem Femtoliter beobachtet man bei einer 1 nM Lösung durchschnittlich weniger als ein Teilchen (0,6) im Fokus. Bindet ein fluoreszenzmarkierter löslicher Ligand (Promotor-DNA) einen (größeren) unmarkierten Rezeptor (ein oder zwei Proteine), verringert sich die Diffusionszeit des gebundenen Liganden verglichen mit dem freien Liganden. Da mit FCS sowohl freie als auch gebundene Moleküle detektiert werden können, kann diese Messung benutzt werden, um

Affinitätskonstanten zu berechnen (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Da die Promotor-DNA nach der Komplexbildung mit dem Protein / den Proteinen signifikant größer ist als die DNA alleine, kann die Korrelationszeit für die freie und die gebundene Promotor-DNA durch Autokorrelationsmessungen unterschieden werden.

Die Vorteile von FCS gegenüber anderen Methoden für Bindungsstudien sind vor allem die Schnelligkeit und leichte Handhabung der Proben. Die Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Proben ist ungefährlich und nicht wie bei radioaktiv markierten Proben der Gelelektrophorese (EMSA) durch Sicherheitsbestimmungen eingeschränkt. Entscheidend bei diesem Verfahren ist, dass die Messung an einem „offenen System“ stattfindet. Das Detektionsvolumen ist nicht abgeschlossen, sondern stellt einen Teil des Gesamtvolumens dar. Ein weiterer Vorteil ist die Messung in einer homogenen Phase, was der physiologischen Situation in der Zelle eher Nahe kommt. Dies ist beim Gelshiftassay (EMSA) nicht möglich, da hier die Messung nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen kann. Die aufgenommenen Rohdaten werden außerdem in Echtzeit prozessiert, so dass die Messungen direkt verfolgt und bewertet werden können.

#### **1.5.4 Fluoreszenzfarbstoffe für FCS**

Die Aussagekraft vieler Einzelmolekülexperimente ist häufig nicht so sehr von der Messtechnik abhängig, sondern vielmehr von den benutzten Fluoreszenzsonden. Diese werden an die Zielmoleküle gekoppelt, um so experimentelle Informationen zu übermitteln. Zusätzlich werden viele Untersuchungen durch die eingeschränkte Photostabilität der Farbstoffe limitiert (Yip *et al.*, 1998). Dieses Photobleichen ist eine intrinsische Eigenschaft aller Farbstoffe, die nach etwa  $10^5$  bis  $10^7$  Anregungszyklen erfolgt. Bei der Auswahl der Farbstoffe für ein Experiment sind daher ihre spektralen Eigenschaften, die Quantenausbeute und die Photostabilität von besonderer Bedeutung. Es wurden sehr viele Farbstoffe unterschiedlicher chemischer Struktur in allen Wellenlängenbereichen vom infraroten über den sichtbaren bis in den ultravioletten Spektralbereich entwickelt, die in zahlreichen Untersuchungen Anwendung finden. Farbstoffmoleküle können Licht in einem für sie typischen Wellenlängenbereich besonders effizient absorbieren und einen großen Teil der aufgenommenen Energie in Form von Fluoreszenzphotonen wieder abgeben. Alle Moleküle absorbieren Licht im UV und sichtbaren Bereich. Es gibt aber nur wenige Moleküle, Fluorophore oder Chromophore genannt, die als Folge der Absorption Licht im sichtbaren Spektralbereich emittieren. Solche organischen Farbstoffe zeichnen sich durch eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich aus. In dieser Arbeit wird ATTO655 (ATTO-Tec GmbH, Siegen), ein Oxazinderivat, als Fluorophor verwendet (Abb.1-11). Die

Oxazine sind sehr photostabile Farbstoffe. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt im Bereich von 2-3 ns.

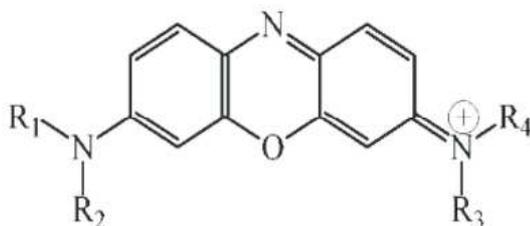


Abbildung 1-11: Strukturformel der verwendeten Farbstoffklasse Oxazin.

Das Maximum der Absorption liegt bei 655 nm, während das Maximum der Emission bei 680 nm liegt. Die Anregung des Farbstoffs erfolgt mit einer Wellenlänge von 633 nm beim HeNe-Laser und mit 635 nm bei der Laserdiode. Das Absorptions- und Emissionsspektrum ist in Abb. 1-12 dargestellt.

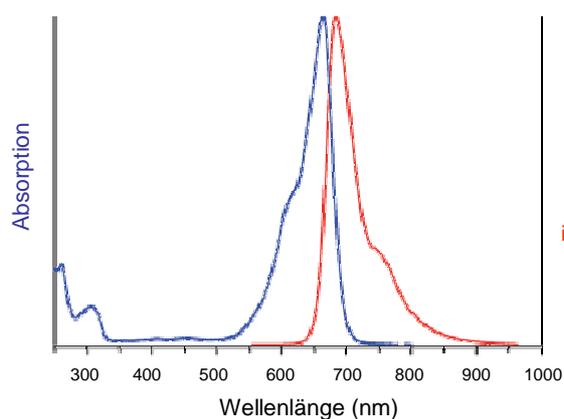


Abbildung 1-12: Absorptions- und Emissionsspektrum von ATTO655 (modifiziert nach [www.atto-tec.com](http://www.atto-tec.com)).

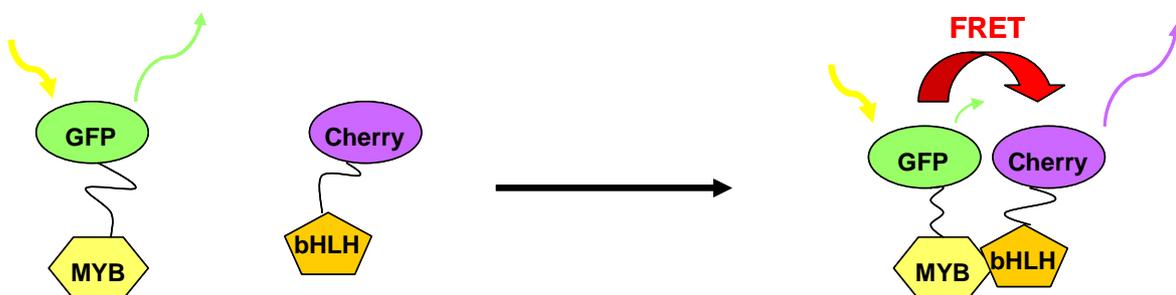
### 1.5.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Um die Wechselwirkungen der Proteine und deren Reaktionspartner in einem komplexen biologischen System charakterisieren zu können, kann auf verschiedene Methoden zurückgegriffen werden. Dabei gibt es *in vitro* viele Methoden für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wie etwa die Immunpräzipitation, Proteinarrays oder Mobilityshiftassays. Doch für die *in vivo* Nachweise sind die Methoden sehr begrenzt. Daher werden für *in vivo* Messungen häufig Fluoreszenztechniken eingesetzt, da diese hoch empfindlich sind und die Möglichkeit der mikroskopischen Lokalisierung bieten. Die

bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) von YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) (Hu *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003) ist eine effektive Methode, um Protein-Interaktionen wie Dimerisierungen *in vivo* nachzuweisen. Dabei wird an jeden der beiden Interaktionspartner ein nicht-fluoreszierendes Fragment von YFP fusioniert, welches nach Dimerisierung der beiden Interaktionspartner ein fluoreszierendes Chromophor bilden kann. Dennoch ist diese Methode nicht authentisch, da die Komplementation irreversibel ist. Die Proteine werden dabei ihrem normalen Gleichgewicht entzogen.

Die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)- Methode (Förster, 1948) ist eine von vielen fluoreszenzspektroskopischen Methoden, mit denen Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können (Matayoshi *et al.*, 1990; Cavrois *et al.*, 2002). Für diese sensitive Messmethode ist die Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Farbstoffen notwendig. Besonders wichtig ist dabei, dass das zu untersuchende Protein auch nach dieser Markierung noch seine biologische Aktivität behält. Unspezifische Bindungen oder Akkumulation der Farbstoffe in der Zelle verursachen ein starkes Hintergrundrauschen und reduzieren so die Sensitivität.

Weiss und Mitarbeiter zeigten 1996 erstmals, dass es möglich ist, FRET zwischen zwei einzelnen Farbstoffen zu detektieren (Ha *et al.*, 1996). Als Abstandshalter zwischen den beiden Farbstoffen fungierten DNA-Fragmente, die auf einer trockenen Glasoberfläche abgelegt wurden. Diese ersten erfolgreichen Experimente führten in den darauf folgenden Jahren zu einer wahren Renaissance des FRET auf Einzelmolekülebene. Die FRET-Methode ist ein physikalischer Prozess, bei welchem Energie von einem Donormolekül durch intermolekulare Dipol-Dipol-Kopplungen auf ein Akzeptormolekül übertragen wird (Abb. 1-13). Beim Energietransfer überträgt das Fluorophor (Donor) seine Anregungsenergie strahlungslos über Dipol-Dipol Kopplung im Nahfeld an ein Akzeptormolekül (FÖRSTER-Transfer).

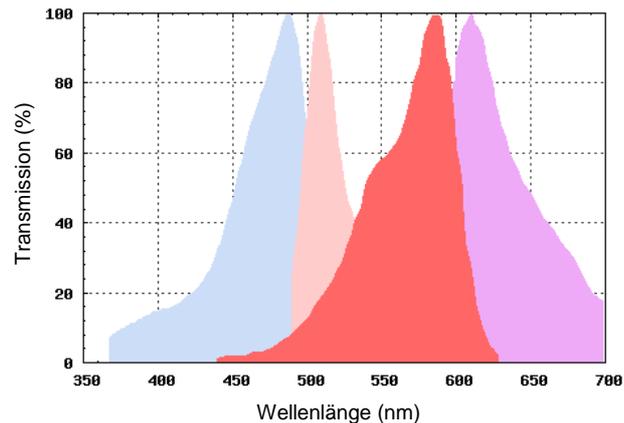


**Abbildung 1-13: Energietransfer zwischen Molekülen durch FRET am Beispiel der Interaktion zwischen einem MYB und bHLH Protein.**

Interagieren die Fusionsproteine GFP-MYB und bHLH-Cherry nicht miteinander, resultiert die Anregung von GFP in starker GFP-Fluoreszenz. Durch die Interaktion der Fusionsproteine werden die Fluorophore in dichte Nähe zueinander gebracht, wodurch die Anregungsenergie von GFP strahlungslos auf Cherry übertragen wird und in starker Cherry-Fluoreszenz resultiert.

Für diesen Energietransfer muss das Emissionsspektrum des Donormoleküls deutlich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls überlappen (Abb. 1-14).

Die Grundvoraussetzung für FRET ist daher die räumliche Nähe der beiden Fluorophore in einem Bereich zwischen 2–10 nm. Außerdem muss zwischen den Bindungspartnern eine geeignete Orientierung zueinander vorliegen, was in größeren Komplexen nicht immer gegeben ist.



**Abbildung. 1-14: Das Emissionsspektrum des Donormoleküls muss deutlich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen.**

Für den Energietransfer bei der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode muss das Emissionsspektrum des Donormoleküls (GFP) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Cherry) überlappen. Beide Absorptionsspektren müssen für die Einzeldetektion aber auch noch deutlich voneinander getrennt sein. Blau: Absorption GFP; rosa: Emission GFP; rot: Absorption Cherry; violett: Emission Cherry (modifiziert nach [www.omegafilters.com](http://www.omegafilters.com)).

Einzelne fluoreszierende Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen, ist im Vergleich zu *in vitro* Messungen deutlich erschwert, da zum einen die Autofluoreszenz der Zellen die Detektion der Fluoreszenzsonde stört und dadurch das Signal-zu-Rausch Verhältnis verschlechtert und zum anderen die 3D-Struktur der Zelle und die schnelle Diffusion der meisten Moleküle die Detektion erschwert. Die Autofluoreszenz kann allerdings zu einem hohen Teil dadurch umgangen werden, dass im roten Wellenlängenbereich (> 600 nm) gearbeitet wird, da hier der autofluoreszente Hintergrund, hervorgerufen durch z.B. Proteine, Pyridine und Flavine, sehr viel niedriger ist (Zhang *et al.*, 2002).

Lokalisations- und Interaktionsstudien von pflanzlichen Proteinen *in vivo* durch Anwendung bildgebender FRET-Analysen hat in den letzten Jahren zu einem erweiterten Verständnis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren biologischer Bedeutung im lebenden pflanzlichen Organismus geführt. So konnten mittels digitaler Epifluoreszenz-Mikroskopie im Kern transfizierter *Nicotiana benthamiana* Zellen Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden (Benvenuto *et al.*, 2002). Auch gelang die simultane Detektion von bis zu vier verschiedenen fluorogenen Proteinen mittels Epifluoreszenz-

Mikroskopie in *A. thaliana* (Benvenuto *et al.*, 2002). Allerdings wurde in den Studien mit starken konstitutiven Promotoren gearbeitet, die die Anzahl der fluoreszierenden Fusionsproteine in den Untersuchungssystemen auf unnatürliche Weise stark erhöht haben und somit zu deutlich verstärkten Signalen führt.

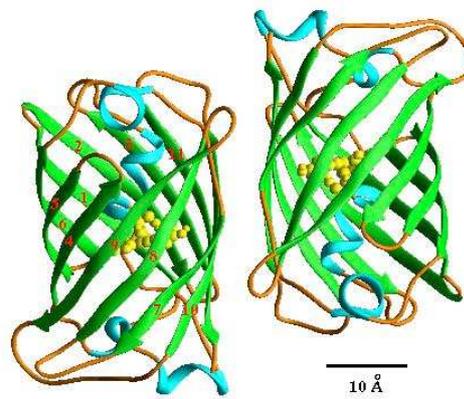
### 1.5.6 Fluoreszenzfarbstoffe und -Proteine für FRET

Die einsetzbaren Sonden stellen ein weiteres zentrales Element beim Arbeiten in lebenden Zellen dar, weil die zu untersuchenden Moleküle mit fluoreszierenden Markern versehen werden müssen ohne signifikant in die Abläufe der Zelle einzugreifen.

Bisher wurden zur Markierung der zu untersuchenden Proteine kleine, organisch-chemische Farbstoffe wie Alexa, ATTO oder Cy-Farbstoffe genutzt. Die Proteine wurden dabei *in vitro* markiert und wieder in die zu untersuchenden Zellen injiziert. Mit Hilfe fluoreszierender Proteine können die Bindungspartner genetisch markiert werden. Der Vorteil ist, dass die Proteine nicht aufwendig aufgereinigt werden müssen, um sie chemisch zu markieren und später wieder in die Zellen zu injizieren. Die genetisch markierten Proteine dagegen können über einen Expressionsvektor von der Zelle als Fusionsprotein exprimiert werden. Damit können die Wechselwirkungen direkt in lebenden Zellen nachgewiesen werden, denn biologische Vorgänge auf molekularer Ebene sichtbar zu machen und zu verstehen wird heutzutage immer wichtiger. Die fluoreszierenden Proteine besitzen eine sehr hohe Sensitivität und gehen keine Wechselwirkungen mit der Zelle ein (Chalfie *et al.*, 1994). Mit Hilfe dieser fluoreszierenden Marker kann also eine sehr hohe zeitliche und räumliche Auflösung bei der Untersuchung der gewünschten markierten Proteine erhalten werden. Dabei repräsentiert die *in vivo* Markierung mit Hilfe genetisch kodierbarer fluoreszenter Proteine wie beispielsweise dem „Grün Fluoreszierenden Protein“ (GFP) die eleganteste Markiermöglichkeit. Trotz enormen Aufwandes zur Entdeckung und Verbesserung fluoreszenter Proteine mit verbesserten Eigenschaften auch für Einzelmolekülanwendungen, steht noch nicht der optimale Fluorophor bzw. das optimale FRET-Paar zur Verfügung (Zhang *et al.*, 2002). Die Entwicklung fluoreszierender Proteine auch im roten Wellenlängenbereich, wie DsRed (Cotlet *et al.*, 2001), HcRed and eqFP611 (Wiedenmann *et al.*, 2002) sind jedoch jetzt schon für die Einzelmoleküldetektion und verbesserte FRET-Experimente vielversprechend.

Je nach Herkunftsorganismus können autofluoreszierende Proteine in Gruppen eingeteilt werden. Die Hauptgruppe der fluoreszierenden Proteine stammt aus einer Qualle im Nordpazifik, der *Aequorea victoria*. In den 60er Jahren wurde zuerst GFP (*Green Fluorescent Protein*) isoliert. Dabei fiel sofort die Eigenschaft des Proteins auf, unter UV-

Licht intensiv grün zu fluoreszieren. GFP liegt in der Qualle mit Aequorin assoziiert vor, dessen Emissionsmaximum sich mit dem Absorptionsmaximum von GFP deckt. Die Qualle konnte durch diesen strahlungslosen Energietransfer grün fluoreszieren (Morise *et al.*, 1974). Die genetische Sequenz des Proteins wurde wesentlich später entschlüsselt (Ormö *et al.*, 1996). Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 27 kDa. Die zylindrische Struktur der Proteine besteht aus 11  $\beta$ -Strängen (Abb. 1-15, grün) und drei  $\alpha$ -Helices (Abb. 1-15, blau). Das Chromophor (Abb. 1-15, gelb) liegt im Zentrum des Zylinders und ist durch zahlreiche Wasserstoffbrücken geschützt. Dieses Chromophor (ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon) wird aus den Aminosäuren der Positionen 65-67 gebildet.



**Abbildung 1-15: Struktur von GFP.**

Die Zylinderstruktur besteht aus 11  $\beta$ -Faltblättern (grün) und 3  $\alpha$ -Helices (blau). Im Zentrum befindet sich das Chromophor (gelb) (Tsien, 1998).

Das *enhanced* GFP (eGFP) ist eine Mutante des Wildtyp GFP (wtGFP). Es hat eine sehr ähnliche Struktur wie das wtGFP, jedoch ist im Chromophor das Serin durch das Threonin ersetzt. Dadurch zeigt sich eine hellere und stabilere Fluoreszenz. Zusätzlich zeigt das eGFP durch eine weitere Mutation eine schnellere Faltung (Tsien, 1998) sowie einen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten als das wtGFP und eine Fluoreszenzquantenausbeute von 60 %. GFP ist aufgrund seiner kompakten Struktur sehr stabil. Weitere Vorteile sind, dass das Protein über einen großen Bereich pH-unabhängig (pH 5,5-12) und sehr temperaturstabil ist (bis 65 °C) (Clontech, 2000). Dennoch gibt es bei GFP auch den Nachteil, dass es bei hohen Konzentrationen die Tendenz zeigt, zu dimerisieren. Ebenso zeigt das Fluoreszenzprotein eine sehr langsame Reifung (4-8 Stunden). Das Absorptions- und Emissionsspektrum von eGFP ist dem des wtGFP sehr ähnlich, jedoch liegt das Maximum bei 488 nm im Anregungsspektrum (Abb. 1-14). Das Emissionsmaximum dagegen liegt wie beim wtGFP bei 509 nm.

Durch gezielte Punktmutationen im *GFP*-Gen wurden später die spektral unterschiedlichen GFP-Mutanten YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), BFP (*Blue Fluorescent Protein*) und CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) erzeugt (Clontech, 2000). Dabei zeigt z.B. das YFP eine Verschiebung des Anregungsspektrums zu einem Maximum von 513 nm, was ein Emissionsspektrum von 527 nm zur Folge hat (Wachter *et al.*, 1998). Die häufigste Mutante ist das eYFP (*enhanced YFP*), die eine sehr hohe molekulare Helligkeit bei einer Fluoreszenzquantenausbeute von 61 % aufweist. Der Extinktionskoeffizient ist noch wesentlich höher als bei eGFP.

Auch aus anderen Organismen wie den Korallen (Anthozoen) *Discosoma striata* oder *Renilla reniformis* wurden später autofluoreszierende Proteine wie DsRed (Matz *et al.*, 1999) oder mRFP (*Monomeric Red Fluorescent Protein*; Campbell *et al.*, 2002) gewonnen. Dabei sind vor allem die rot fluoreszierenden Proteine wichtig, da sie sich besonders als Partner von GFP bei FRET und FCS-Messungen eignen. Probleme bei den rot-fluoreszierenden Proteinen (DsRed) war anfangs die Bildung von Tetrameren oder höheren Oligomeren, wodurch zytotoxische Aggregate gebildet wurden. Jedoch gelang es Roger Tsien durch gezielte Mutationen am *DsRed1*-Gen eine monomere Form zu generieren, das mRFP (Campbell *et al.*, 2002). Das mRFP hat ein ins Rot verschobene Spektrum. Das Absorptionsmaximum liegt bei 584 nm und das Emissionsmaximum bei 607 nm. Es hat sowohl eine niedrige Quantenausbeute (25 %) als auch einen niedrigen Extinktionskoeffizienten, dafür reift es in weniger als einer Stunde und zeigt eine sehr starke Helligkeit *in vivo*.

Als spektralen Partner für GFP bei den FRET-Messungen in dieser Arbeit wurde das monomere rot-fluoreszierende Protein mCherry gewählt (Campbell *et al.*, 2002). Rot-fluoreszierende Proteine sind deutlicher zu unterscheiden von der Autofluoreszenz der Zelle als gelb- oder grün-fluoreszierende Proteine (Zhang *et al.*, 2002) und mCherry hat zudem eine extrem hohe Photostabilität und eine hohe pH-Toleranz (Shaner *et al.*, 2005). Außerdem hat mCherry eine niedrige Quantenausbeute (22 %), eine sehr schnelle Reifung in der Zelle (15 min) und einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten, wodurch es eine gleich gute Leistung zeigt wie eGFP und damit qualifizierter ist als andere ins rote Spektrum verschobene fluoreszierende Proteine wie mOrange, mRFP oder tdTomato (Shaner *et al.*, 2004). Das Absorptionsmaximum liegt bei 587 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 610 nm (Abb. 1-14).

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Ohne das reibungslose und funktionelle Zusammenspiel der variablen Proteine ist ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels in Lebewesen nicht möglich. Im gut untersuchten Flavonoidstoffwechsel von *A. thaliana* wurden bereits viele Transkriptionsfaktoren untersucht, die durch Interaktion mit der DNA regulierende Einflüsse auf ihre Zielgene haben. Eine zentrale Zweigstelle im Anthocyanstoffwechsel als Teil des Flavonoidstoffwechsels ist die Regulation des *DFR*-Promotors. Dabei sind besonders drei zu verschiedenen Transkriptionsfaktor-Familien gehörende Proteine von großer Bedeutung, MYB75, BHLH42 und das WD40-Protein TTG1, die als Genregulatoren des Schlüsselenzyms DFR fungieren. Dafür interagieren die drei Transkriptionsfaktoren miteinander und dieser Komplex tritt mit dem Zielpromotor in Kontakt. Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Interaktion in Bezug auf die Bildung des Komplexes, die Bindungspartner, die Bindestellen im Promotor, sowie die Regulation durch äußere Einflüsse untersucht werden. Dieser Prozess soll in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden.

Die Arbeit ist Teil des Sonderforschungsbereichs SFB613 und wird in enger Zusammenarbeit mit der Fakultät für Physik durchgeführt. Dabei werden neue Aspekte einer in der Physik bereits etablierten Methode für Bindungsstudien (FCS) an einem realen, biologisch relevanten System untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung der FCS, die exakten Bindesequenzen im Zielpromotor zu bestimmen und damit den Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Regulation der Anthocyanbiosynthese zu analysieren. Das Studium der Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren untereinander und mit den Zielpromotoren soll parallel auf der *in vitro* und der *in vivo* Ebene in Angriff genommen werden. Um den Fragen nach der Protein-Protein-Interaktion in lebenden Zellen nachgehen zu können, sollen ebenfalls moderne Messmethoden aus der Physik angewandt werden. Mit Hilfe der FRET Methode soll die Lokalisation des Komplexes und die Reihenfolge der Bindungen untersucht werden. Die Ziele sind dabei insbesondere, den Bildungsweg des R2R3-MYB75/BHLH42/TTG1-Transkriptionsfaktorkomplexes aufzuklären (Abb. 1-16).

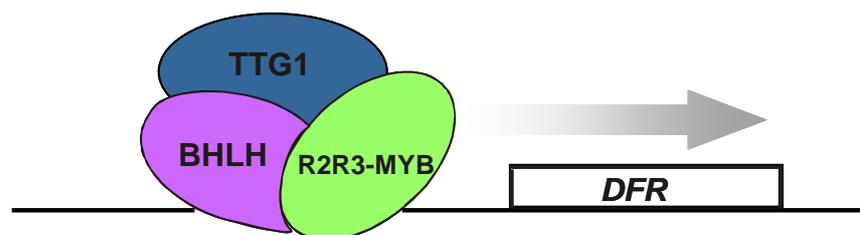


Abbildung 1-16 Schematische Darstellung der Regulation des *DFR*-Promotors durch den MYB75 / BHLH42 / TTG1 Komplex.

Mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie soll in lebenden Zellen das Dimerisierungspotential der beteiligten Proteine, die Reihenfolge der Bindung, sowie der Einfluss der Wechselwirkungen auf die Komplexstruktur untersucht werden. Insbesondere soll analysiert werden, ob zunächst die Transkriptionsfaktoren miteinander interagieren und dann gemeinsam an den Promotor binden oder ob die Transkriptionsfaktoren einzeln an den Promotor binden und dann zusammen mit einem allgemeinen WD40-Protein einen stabilen Komplex bilden. Der *in vivo* Nachweis des MYB/bHLH/TTG1-Komplexes in pflanzlichen Zellen und die Analyse des Transportweges eines Transkriptionsfaktorkomplexes zum Zielpromotor soll mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert werden. Dabei sollen fluoreszenzmarkierte Proteine die Transkriptionsfaktor *knock-out* Linien komplementieren, wodurch die Interaktion der Faktoren miteinander und mit der Ziel-DNA in lebenden Keimlingen nachgewiesen werden soll. Da die erwartete Konzentration der Komplexpartner in der Zelle extrem niedrig ist und Einzelmolekülempfindlichkeit voraussetzt, soll hierfür die FRET-Methode für schnelles und hochempfindliches Imaging erweitert werden, um so Fluoreszenz von Hintergrund zu unterscheiden und Wechselwirkungen zwischen Proteinen in lebenden Zellen sichtbar zu machen. Diese modernen Messmethoden sollen mit gängigen biologischen Methoden verglichen werden. Dabei ist es wichtig, den Zusammenhang der Regulation der Anthocyanbiosynthese in Bezug auf abiotische Faktoren zu untersuchen. So soll der Frage nachgegangen werden, ob die Regulation durch äußere Einflüsse, wie etwa der Verfügbarkeit von Zucker, beeinflusst wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Biozym (Hameln), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen). Soweit nicht anders angegeben wurden sie in ihrer analytischen Qualität eingesetzt.

Restriktionsendonucleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A (RNaseA), DNaseI, ExoSAP-IT, Antarctic Phosphatase und Lysozym wurden von den 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) geliefert. Weiterhin wurde Taq-DNA-Polymerase (Roche), TaKaRa Taq (TaKaRa) und PFX DNA Polymerase (Invitrogen), Superscript<sup>TM</sup>II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen), Zellulase („Onozuka R-10“) und Mazerozym (R-10) von der Firma Serva (Heidelberg) verwendet. Fluoreszenzfarbstoffe wurden von der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande) bezogen.

#### 2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden unter Verwendung von deionisiertem Wasser angesetzt. Die Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren bzw. bei hitzelabilen Substanzen durch Sterilfiltration (Flaschenfilter, Nalgene-Nunc, 0,22 µm Porengröße). Hitzelabile Substanzen (Antibiotika) wurden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

##### 2.1.2.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

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

LB-Platten: Für Platten werden dem LB-Medium 18 g Bacto Agar auf 1000 mL zugesetzt.

|                     |   |
|---------------------|---|
| <u>SOC-Medium:</u>  | 20 g Bacto Trypton<br>5 g Bacto Hefeextrakt<br>0,5 g NaCl<br>2,5 mL 1 M KCl<br>3,6 g Glukose<br>5 mL 2 M MgCl <sub>2</sub><br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL<br>sterilfiltrieren statt autoklavieren |
| <u>TBI:</u>         | 23 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>164 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL  |
| <u>TBII:</u>        | 12 g Bacto Trypton<br>24 g Bacto Hefeextrakt<br>4 mL Glycerin<br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL  |
| <u>TB-Medium:</u>   | TBI und TBII nach dem Autoklavieren im Verhältnis 10:1<br>mischen   |
| <u>TFB1-Medium:</u> | 30 mM Kaliumacetat<br>100 mM Rubidiumchlorid<br>10 mM CaCl <sub>2</sub><br>50 mM MnCl <sub>2</sub><br>15 % Glycerin<br>pH 5,8 mit Essigsäure einstellen<br>sterilfiltrieren                       |
| <u>TFB2-Medium:</u> | 10 mM MOPS<br>75 mM CaCl <sub>2</sub><br>10 mM RbCl<br>15 % Glycerin<br>pH 6,5 mit KOH einstellen<br>sterilfiltrieren   |
| <u>YEP-Medium:</u>  | 10 g Bacto Trypton<br>10 g Bacto Hefeextrakt<br>5 g NaCl<br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL   |

YEP-Platten: Für Platten werden dem YEP Medium 15 g Bacto Agar auf 1000 mL zugesetzt.

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

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

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

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

Für Selektionsplatten wurden 50 µg/mL Kanamycin bzw. 50 µg/mL Hygromycin zugesetzt.  
Für Saccharose-Stressversuche wurden 4% Saccharose zugesetzt.

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

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

Enzym-Lösung: 1,4 g Zellulase Onozuka R-10  
0,325 g Mazeroyz R-10  
240 mM CaCl<sub>2</sub> ad 120 mL  
Die Komponenten werden sehr langsam gelöst und anschließend sterilfiltriert.

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  
 pH 5,7 mit KOH einstellen  
 H<sub>2</sub>O ad 1000 mL  
 Die Leitfähigkeit sollte ca. 6,7 mS/cm betragen.  
 40 mL Aliquots in Erlenmeyerkolben autoklavieren.

MS-Agarplatten Für Platten wurden dem MS-Medium 0,8% Pflanzen-agar zugesetzt.

### 2.1.2.4 Medien für die Tabak Zellsuspensionskultur BY-2

MMM-Lösung: 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1% (w/v) MES-KOH (pH 5,8)  
 0,5 M Mannitol  
 sterilfiltrieren

MS + Sucrose: 0,4 M Saccharose  
 in MS Zellkulturmedium (Merkle *et al.*, 1996)  
 sterilfiltrieren

PEG-Lösung: 40% (w/v) PEG 4000 (Duchefa)  
 0,4 M Mannitol  
 0,1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 pH 8,0-9,0 (pH-Wert sinkt nach dem Autoklavieren auf einen physiologischen Wert)  
 autoklavieren

Verdauungslösung: 1% Cellulase Onozuka RS (Serva)  
 0,5% Macerozym Onozuka RS (Serva)  
 0,5% BSA  
 0,01% β-Mercaptoethanol  
 50 mM CaCl<sub>2</sub>  
 10 mM Na-Acetat (pH 5,8)  
 0,25 M Mannitol  
 sterilfiltrieren

Waschlösung: wie Verdauungslösung, aber ohne Enzyme  
 sterilfiltrieren

W5-Lösung: 154 mM NaCl  
 125 mM CaCl<sub>2</sub>  
 5 mM KCl  
 5 mM Glukose  
 pH 5,8-6,0  
 sterilfiltrieren

### 2.1.2.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

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

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

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

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

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

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

GUS-Puffer: 50 mL 100 mM Natriumphosphatpuffer  
 200 µL 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
 100 µL Triton X-100  
 71 µL β-Mercaptoethanol  
 H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

|  |  |
|--|--|
| <u>Infiltrationsmedium:</u>                        | 50 g Saccharose<br>0,5 g MES<br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL<br>pH 5,7 mit KOH einstellen<br>200 µL Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)  |
| <u>Infiltrationsmedium für die Transformation:</u> | 250 mg D-Glukose<br>5 mL MES (500 mM MES in H <sub>2</sub> O)<br>5 mL Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O)<br>25 µL Acetosyringon (200 mM 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxy Acetophenon in DMSO)<br>für 50 mL H <sub>2</sub> O |
| <u>100 mM Kaliumphosphatpuffer:</u>                | 16 mL 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>84 mL 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL<br>pH 7,5  |
| <u>Luziferase-Extraktionspuffer:</u>               | 100 mM Kaliumphosphatpuffer<br>1 mM Dithiothreitol   |
| <u>Luziferase-Substratlösung:</u>                  | 75,75 mL 2x Stocklösung<br>33,3 mM Dithiothreitol<br>270 µM CoA Lithiumsalz<br>470 µM Luziferin<br>570 µM ATP<br>H <sub>2</sub> O ad 151,5 mL<br>sterilfiltrieren, bei -80°C lagern  |
| <u>Lysozym-Lösung:</u>                             | 10 mg/mL Lysozym<br>10 mM Tris/HCl (pH 7,5)<br>0,1 mM EDTA   |
| <u>4-MUG-Substratlösung:</u>                       | 100 mL GUS-Puffer<br>0,07046 g 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glukuronid (4-MUG)<br>sterilfiltrieren, bei -20°C lagern   |
| <u>NaP<sub>i</sub>-Puffer:</u>                     | 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>pH 7,5 mit Phosphorsäure einstellen  |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <u>100 mM Natriumphosphatpuffer:</u> | 39 mL 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>61 mL 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL, pH 7,0                 |
| <u>PEG-Lösung:</u>                   | 25% (w/v) PEG 6000<br>100 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>450 mM Mannitol<br>pH 9,0 mit KOH einstellen                                      |
| <u>5x Probenpuffer:</u>              | 20 mM EDTA (pH 8,0)<br>50% (v/v) Glycerin<br>0,02% (w/v) Bromphenolblau<br>0,02% (w/v) Xylencyanol  |
| <u>RNase-Lösung:</u>                 | 10 µg/mL RNaseA<br>10 min auf 100°C erhitzen  |
| <u>Saures Methanol:</u>              | 1% HCl zu MeOH zugeben  |
| <u>2x Stocklösung:</u>               | 40 mM Tricine<br>2,14 mM Mg(CO <sub>3</sub> ) x Mg(OH) <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O<br>5,34 mM Mg(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub><br>0,2 mM EDTA |
| <u>50x TAE-Puffer:</u>               | 242 g Tris<br>57,1 mL Eisessig<br>40 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)<br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL  |
| <u>TE-Puffer:</u>                    | 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)<br>1 mM EDTA für TE (10/1)<br>1 mM EDTA für TE (10/0,1)   |
| <u>TELT-Puffer:</u>                  | 50 mM Tris/HCL (pH 7,5)<br>62,5 mM EDTA<br>2,5 mM LiCl<br>0,4 % Triton X-100  |
| <u>X-Gluc-Lösung:</u>                | 0,5 mg/mL X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Glukuron.)<br>5 mg X-Gluc in 50 µL DMF lösen und mit NaPi-Puffer auf<br>10 mL auffüllen              |

### 2.1.2.6 Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

|  |   |
|--|---|
| <u>Agarose-/Polyacrylamidgel:</u>        | 0,41 g Agarose<br>1,5 mL 10x TBE<br>58 mL H <sub>2</sub> O<br>4,8 mL Rotiphorese Gel 30<br>150 µL 10% APS<br>75 µL TEMED                      |
| <u>Bindungspuffer:</u>                   | 60 mM HEPES<br>25 mM Tris<br>0,3 M KCl<br>60% Glycerol<br>5 mM EDTA<br>5 mM DTT<br>pH 7,9 mit KOH einstellen                                  |
| <u>Blocking-Puffer:</u>                  | TBS mit 3% (w/v) BSA  |
| <u>Conjugate Blocking Puffer:</u>        | 0,2 g Blocking Reagent<br>zu 40 mL H <sub>2</sub> O 1x Blocking Reagent Puffer geben<br>bei 70 °C rühren<br>dann 400 µL 10% Tween20 dazugeben |
| <u>Denaturing Solubilization Puffer:</u> | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>8 M Harnstoff<br>pH 8,0  |
| <u>Denaturing Elution Puffer:</u>        | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>8 M Harnstoff<br>250 mM Imidazol<br>pH 8,0   |
| <u>Entfärbelösung:</u>                   | 10% (v/v) Essigsäure<br>45% (v/v) MeOH<br>45% H <sub>2</sub> O  |
| <u>Färbelösung:</u>                      | 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250<br>9% (v/v) Essigsäure  |

|                           |   |
|---------------------------|---|
|                           | 45,5% (v/v) MeOH<br>45% H <sub>2</sub> O  |
| <u>Färbepuffer:</u>       | 1% (w/v) Bromphenolblau<br>1% (w/v) Xylencyanol<br>50% (v/v) Glycerin<br>48% 10x TBE  |
| <u>HRP-Färbelösung:</u>   | 20 mL 50 mM Tris-HCl<br>150 mM NaCl (pH 7,5)<br>20 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 5 mL MeOH<br>15 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37%)                  |
| <u>Laufpuffer:</u>        | 0,25x TBE   |
| <u>LEW-Puffer:</u>        | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>pH 8,0 mit NaOH einstellen   |
| <u>PBS-Puffer:</u>        | 8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O ad 1000 mL<br>pH 7,4 |
| <u>PBST-BSA:</u>          | PBS-Puffer<br>0,3 mg/mL BSA<br>0,05% Tween20  |
| <u>SDS-Gelladepuffer:</u> | 0,05% (w/v) SDS<br>10% (w/v) Glycerin<br>0,25% (w/v) Bromphenolblau<br>62,5 mM Tris-HCl (pH 8,3)<br>0,7 M β-Mercaptoethanol                         |
| <u>SDS-Laufpuffer:</u>    | 192 mM Glycin<br>4 mM SDS<br>25 mM Tris-HCl (pH 8,3)  |
| <u>Spermidin-Lösung:</u>  | Spermidin-HCl in H <sub>2</sub> O   |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <u>10x TBE:</u>                     | 0,5 M Tris-HCl (pH 8,3)<br>0,5 M Borsäure<br>10 mM EDTA         |
| <u>TBS:</u>                         | 150 mM NaCl<br>50 mM Tris-HCl (pH 7,5)                          |
| <u>TBS-Tween-Puffer:</u>            | 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)<br>500 mM NaCl<br>0,1% (v/v) Tween20    |
| <u>Tween20 (10 % Stocklösung) :</u> | 2 mL Tween in 20 mL H <sub>2</sub> O                            |
| <u>Transferpuffer:</u>              | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>0,1% (w/v) SDS<br>20% (v/v) MeOH |

**Tabelle1: SDS-Gel-Ansätze mit verschiedenen Acryl / Bisacrylamidanteilen.**

|                                      | Trenngel<br>(20 mL) |        |        | Sammelgel<br>(5 mL) |
|--------------------------------------|---------------------|--------|--------|---------------------|
|                                      | 10 %                | 12 %   | 15 %   | 5 %                 |
| H <sub>2</sub> O                     | 9,6 mL              | 8,6 mL | 7,1 mL | 3,6 mL              |
| 30% Acrylamid/<br>Bisacrylamid       | 5,0 mL              | 6,0 mL | 7,5 mL | 0,63 mL             |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8<br>+ 0,4% SDS | 5,2 mL              | 5,2 mL | 5,2 mL | —                   |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8<br>+ 0,4% SDS | —                   | —      | —      | 0,68 mL             |
| 10% APS                              | 0,2 mL              | 0,2 mL | 0,2 mL | 0,05 mL             |
| 100% TEMED                           | 8 µL                | 8 µL   | 8 µL   | 5 µL                |

### 2.1.3 Desoxyoligonucleotide (Primer)

Desoxyoligonucleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Paisley, GB) und Metabion (Martinsried) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben (siehe Anhang Tabelle 7.5).

## 2.1.4 Bakterienstämme und DNA-Vektoren

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue wurde zur Herstellung dam- und dcm-methylierter Plasmid-DNA verwendet. Die DNA für die Experimente in der At7-Zellsuspensionskultur wurde in nicht methylierter Form benötigt. Für diese Herstellung wurde der Stamm *E. coli* K12 ER2925 verwendet. Für die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des T7-Promotors im heterologen System wurde der *E. coli* Stamm BL21pLysS verwendet. Der *E. coli* Stamm DB3.1 wurde für die Retransformation von Gateway Klonen genutzt, die wegen des *ccdB*-Gens nicht im XL 1-Blue Stamm vermehrt werden konnten.

Zur Herstellung transgener Pflanzen wurden zwei verschiedene *Agrobacterium* Stämme verwendet. Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 pMP90 und der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LB4404.pBBR1MCS wurden je nach Art der Transfektion (transient oder stabil) eingesetzt.

| <b><u>E. coli Stamm</u></b> | <b><u>Genotyp</u></b>   | <b><u>Referenz</u></b>           |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| XL 1-Blue                   | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB lac<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]   | Fa. Stratagene                   |
| K12 ER2925                  | <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsd1 hsdR2</i>  | Fa. New England Biolabs          |
| BL21 pLysS<br>DB3.1         | F <sup>-</sup> <i>dcm ompT lac<sup>-</sup> Met<sup>+</sup> r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> gal Kan<sup>r</sup></i><br>F <sup>-</sup> <i>gyrA462 endA1 D (sr1- recA) mcrB mrr hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Sm<sup>r</sup>) xyl-5 λ<sup>-</sup> leu mtl-1</i> | Fa. Stratagene<br>Fa. Invitrogen |

| <b><u>A. tumefaciens Stamm</u></b> | <b><u>Genotyp</u></b>  | <b><u>Referenz</u></b>                             |
|------------------------------------|--|--|
| GV3101 pMP90RK                     | C58C1 Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup><br>(mit Virulenzplasmid pMP90RK) | Koncz <i>et al.</i> , 1984; Koncz und Schell, 1986 |
| GV3101 pMP90                       | C58C1 Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Carb <sup>r</sup><br>(mit Virulenzplasmid pMP90) | Koncz <i>et al.</i> , 1984; Koncz und Schell, 1986 |
| LBA 4404.pBBR1MCS                  | PAL 4404 Sm <sup>r</sup><br>(mit Virulenzplasmid virGN54D)                               | Hokema <i>et al.</i> , 1983                        |

In den Promotorinteraktionsstudien wurden Vektoren zur Herstellung von Reporter- und Effektorstrukturen eingesetzt, die Derivate von pBT2 sind (Weisshaar *et al.*, 1991). Für die Pflanzentransformation wurden Plasmide eingesetzt, die Derivate von pMDC-Vektoren (Curtis und Grossniklaus, 2003) oder pANGUS (Jakoby und Weisshaar, unveröffentlicht) sind. Alle übrigen Plasmide, die als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungen dienten wurden von Lutz Bartelniewöhner, Mark Heim, Thomas Merkle, Martin Sagasser und Ralf

Stracke zur Verfügung gestellt. Die Vektoren, die die Fluoreszenzproteine beinhalten wurden von Roger Tsien erworben (Shaner *et al.*, 2004).

| <b><u>Plasmid</u></b>                        | <b><u>Wesentliche Merkmale</u></b>   | <b><u>Referenz</u></b>               |
|--|--|--------------------------------------|
| pANGUS (SA 164)                              | Vektor zur Pflanzentransformation, Amp <sup>r</sup> für Bakterienanzucht, Kan <sup>r</sup> zur Selektion der transgenen Pflanzen. Minimal-TATA Promotor, MCS, uidA-ORF und nosPA   | unveröffentlicht                     |
| pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH2 (mhei016)  | pBT2 basierter Vektor, co/E1 ori, Amp <sup>r</sup> , -417 bis +8 des 35S Promotors aus CaMV, mit AtBHLH2-ORF, nosPA, MCS   | unveröffentlicht                     |
| pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH1 (mhei012)  | wie pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH2 mit AtBHLH1-ORF statt AtBHLH2-ORF  | unveröffentlicht                     |
| pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH42 (mhei024) | wie pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH2 mit AtBHLH42-ORF statt AtBHLH2-ORF   | unveröffentlicht                     |
| pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtMYB75 (mhei028)  | wie pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH2 mit AtMYB75-ORF statt AtBHLH2-ORF  | unveröffentlicht                     |
| pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtMYB123 (RST257)  | wie pBT8::Pro <sub>35S</sub> :AtBHLH2 mit AtMYB123-ORF statt AtBHLH2-ORF   | unveröffentlicht                     |
| pBTdest                                      | wie pBT8, mit <i>attb1-ccdB-attb2</i> -Kassette  | (Baudry <i>et al.</i> , 2004)        |
| pBT10::GUS (MS23)                            | Co/E1 ori, Amp <sup>r</sup> , -46 bis +8 des 35S Promotors aus CaMV, uidA-ORF, nosPA, MCS, Deletionen im Vektorrückgrat  | (Sprenger-Haussels, Weisshaar, 2000) |
| pBT10::Δ:LUCm3 (MS47)                        | wie pBT10::GUS mit LUCm3-ORF aus MS83 statt uidA-ORF   | (Sprenger-Haussels, Weisshaar, 2000) |
| pBT10::Pro <sub>ubi</sub> :LUCm3 (MS129)     | wie pBT10::Δ:LUCm3 mit UBI4/2 Promotor aus <i>P. crispum</i>   | (Sprenger-Haussels, Weisshaar, 2000) |
| pBT10::Pro <sub>DFR(520)</sub> :GUS          | wie pBT10::GUS mit 520 bp Fragment des AtDFR-Promotors   | (Mehrtens <i>et al.</i> , 2005)      |
| pMDC43                                       | Vektor zur Pflanzentransformation, pCambia Rückgrat, Kan <sup>r</sup> für Bakterienanzucht, Hygr <sup>r</sup> zur Selektion der transgenen Pflanzen. 2x35S Promotor, <i>attr1-ccdB-attr2</i> -Kassette, für C-terminale GFP-Fusionen | (Curtis und Grossniklaus, 2004)      |
| pMDC83                                       | Wie pMDC43, aber für N-terminale GFP-Fusionen  | (Curtis und Grossniklaus, 2004)      |
| pDEST15                                      | Vektor zur Proteinexpression, Amp <sup>r</sup> , T7 Promotor, GST-Tag, pBR322 ori, <i>attr1-ccdB-attr2</i> -Kassette   | Fa. Invitrogen                       |
| pDEST17                                      | Vektor zur Proteinexpression, Amp <sup>r</sup> , T7  | Fa. Invitrogen                       |

|                |  |                               |
|----------------|--|-------------------------------|
|                | Promotor, 6x His-Tag, pBR322 ori, enthält eine <i>attr1-ccdB-attr2</i> -Kassette   |                               |
| pDONR201       | pUC <i>ori</i> Kan <sup>r</sup> , enthält eine <i>aafP1-ccdB</i> Cm <sup>r</sup> - <i>aafP2</i> -Kassette, <i>rrnB</i> T2 <i>rrnB</i> T1 | Fa. Invitrogen                |
| p5'YFP         | pUC19-Rückgrat, 35S-Promotor, eYFP-cDNA von Clontech, Amp <sup>r</sup>   | Merkle, unveröffentlicht      |
| p5'YN2         | pUC19-Rückgrat, 35S-Promotor, N-terminales YFP-Fragment, HA-Epitop-Tag, Amp <sup>r</sup>   | Merkle, unveröffentlicht      |
| p5'YC2         | pUC19-Rückgrat, 35S-Promotor, C-terminales YFP-Fragment, MYC-Tag, Amp <sup>r</sup>   | Merkle, unveröffentlicht      |
| pRSET-B Orange | Für Proteinexpression, T7 Promotor, 6x His-Tag, MCS, Amp <sup>r</sup> , abgeleitet vom pRSET-B Vektor von Invitrogen, enthält mOrange    | (Shaner <i>et al.</i> , 2004) |
| pRSET-B Cherry | Für Proteinexpression, T7 Promotor, 6x His-Tag, MCS, Amp <sup>r</sup> , abgeleitet vom pRSET-B Vektor von Invitrogen, enthält mCherry    | (Shaner <i>et al.</i> , 2004) |
| pRSET-B RFP    | Für Proteinexpression, T7 Promotor, 6x His-Tag, MCS, Amp <sup>r</sup> , abgeleitet vom pRSET-B Vektor von Invitrogen, enthält mRFP       | (Shaner <i>et al.</i> , 2004) |

### 2.1.5 Reagenziensätze

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

|  |   |
|--|---|
| JETstar Plasmid Purification MIDI Kit                  | Plasmid-DNA Präparation im MIDI-Maßstab             |
| QIAGEN Plasmid Mega Kit                                | Plasmid-DNA Präparation im Mega Maßstab             |
| Amersham GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit     | Aufreinigung von DNA aus Lösungen oder Agarosegelen |
| Macherey & Nagel Protino® Ni 2000 prepaced columns Kit | Aufreinigung von Proteinen aus Bakterien            |
| LightShift Chemiluminescent EMSA Kit                   | Protein-DNA-Interaktionsstudien                     |
| Pierce   |   |
| Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix                      | Klonierung  |
| Gateway® LR Clonase Enzyme Mix                         | Klonierung  |

## 2.1.6 Zellkulturen und Pflanzen

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Zellsuspensionskulturen gearbeitet. Die At7-Zellsuspensionskultur diente den Promotor-Aktivitätsstudien und der Lokalisierung sowie der Untersuchung zur Interaktion der Fusionsproteine. Die BY-2 Zellsuspensionskultur wurde für die Lokalisations- und Interaktionsstudien der Fusionsproteine untereinander und mit der Promotor-DNA genutzt.

### 2.1.6.1 At7-Zellsuspensionskultur

Die *A. thaliana* Zellsuspensionskultur At7 (Ökotyp Columbia) ist aus Hypokotylzellen gewonnen und wird im Dunkeln kultiviert. Die Kultivierung und Protoplastengewinnung erfolgte unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink und Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Murashige *et al.*, 1962) wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Trezzini *et al.*, 1993; Zimmermann *et al.*, 2005; Mehrtens *et al.*, 2005).

### 2.1.6.2 BY-2 Zellsuspensionskultur

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

### 2.1.6.3 Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* gearbeitet. Zum einen wurde der Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet und zum anderen der Ökotyp Nössen (Nö-0). Die T-DNA Insertionslinien, die nicht im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden sind im Folgenden aufgeführt.

| Gen    | Besondere Funktion    | Bezeichnung der Pflanzen         | Quelle                            |
|--------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| MYB75  | T-DNA Insertionslinie | myb75/pap1<br>Riken PST16228     | Riken BioResource<br>Center (BRC) |
|        | Überexpressionslinie  | Col-0::Pro <sub>35S</sub> :MYB75 | Ralf Stracke                      |
| MYB90  | T-DNA Insertionslinie | myb90/pap2<br>GABI-Kat 127C07    | Mario Rosso                       |
|        | Überexpressionslinie  | Col-0::Pro <sub>35S</sub> :MYB90 | Ralf Stracke                      |
| BHLH42 | T-DNA Insertionslinie | bhlh42/tt8<br>GABI-Kat 241D05    | Mario Rosso                       |
|        | T-DNA Insertionslinie | bhlh2/egl3<br>GABI-Kat 483D04    | Mario Rosso                       |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Pflanzenkultivierung und -präparation

#### 2.2.1.1 Pflanzenkultivierung

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte auf Erde oder steril auf MS-Platten. Die Kultivierung der Pflanzen fand sowohl unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit pro Tag) als auch unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit pro Tag) statt.

##### 2.2.1.1.1 Anzucht auf Erde

Zunächst wurden die *A. thaliana* Samen auf Erde ausgelegt und bei 4 °C für 2-4 Tage in Dunkelheit stratifiziert. Anschließend wurden sie für 2-4 Wochen unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus, in einer Klimakammer oder in einem Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry, IA, USA) kultiviert, bevor sie für weitere 4-6 Wochen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen wurden. Wenn Samen der angezogenen *A. thaliana* Pflanzen gesammelt werden sollten, wurden diese mit Papiertüten eingetütet, sobald die Schoten gelblich geworden sind. Nach weiteren 1-2 Wochen konnten die Samen geerntet werden.

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

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen auf ½ MS-Platten erfolgte steril. Für die Oberflächensterilisierung wurden die Samen zweimal in 500 mL 70 %igem Ethanol für 5 min unter Schütteln inkubiert und abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 13.000 rpm, 30 sec). Ein drittes Mal wurden die Samen mit 100 %igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Die Abnahme des Ethanols erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach dem Abtrocknen der Samen wurden diese unter sterilen Bedingungen auf ½ MS-Platten ausgesät. Es erfolgte zunächst eine Stratifikation der Samen im Dunkeln für 2-4 Tage bei 4 °C. 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 weiter kultiviert. Für die Anzucht von chlorophyllfreien Keimlingen zur Detektion der Fluoreszenzproteine wurden die Samen, wie zuvor beschrieben, sterilisiert und auf einem autoklavierten Rundfilter (Ø 6 cm) ausgelegt, der mit 1 mL einer 3 ppm Norflurazon (Supelco) Lösung getränkt war. Die Anzucht erfolgte für 5 Tage unter Langtagbedingungen.

### **2.2.1.2 Kreuzen von *A. thaliana* Pflanzen**

(modifiziert nach Koorneef *et al.*, 1998)

Für Kreuzungen wurden Pflanzen ausgewählt, die gerade begonnen haben zu blühen. Von der Infloreszenz der Mutterpflanze wurden bis auf die drei großen Knospen, deren Öffnung kurz bevorstand, alle jüngeren oder bereits geöffneten Knospen mit einer feinen Pinzette entfernt. Die verbliebenen Knospen wurden vorsichtig geöffnet und bis auf das Gynoeceum alle weiteren Blütenorgane entfernt. Von der als männlicher Elternteil fungierenden Pflanze wurde eine Blüte ausgewählt, die sich am selben Tag geöffnet hat. Die Öffnung der Blüte wurde durch Quetschen mit der Pinzette an der Basis vergrößert, so dass die Antheren hervortraten. Durch leichtes Antupfen der Staubbeutel auf die Narbe wurde der Pollen auf die Mutterpflanze übertragen. Am folgenden Tag wurden die Gynoeceen ein zweites Mal mit Pollen versehen. Einsetzendes Streckenwachstum und eine leichte Rotfärbung zeigten die erfolgreiche Befruchtung an. Bei beginnender Gelbfärbung der Schoten wurden diese in kleinen Papiertüten aufgefangen, um den Erhalt der Samen zu gewährleisten. Nach dem Abreifen wurden die Samen bei RT gelagert.

### **2.2.1.3 Saccharose-Stressversuch mit *A. thaliana* Keimlingen**

Um bei jungen Keimlingen, die auf ½ MS-Platten heranwachsen, eine verstärkte Anthocyanproduktion zu induzieren, wurde der Sacchroseanteil im Medium erhöht. Die Samen der entsprechenden Linien wurden auf ½ MS-Platten mit 4% Saccharose angezogen. 7 Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge fotografiert und eine Quantifizierung der Anthocyanmenge (2.2.1.4.3) vorgenommen.

### **2.2.1.4 Histochemische Analyse der $\beta$ -Glucuronidase (GUS) Aktivität in pflanzlichen Geweben**

Das Reporterogen *uidA* aus *E. coli*, das für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert, wird in Pflanzen häufig verwendet. Als Transkriptionsfusion dient sie der Detektion von Promotoraktivitäten. Diese Hydrolase katalysiert die Spaltung des farblosen Substrates X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid). Hierbei entsteht der unlösliche blaue Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo, welcher nur in den Geweben gebildet wird, in denen auch der davorgeschaltete Promotor aktiv ist. Da in Pflanzengewebe die Enzymaktivität nicht vorhanden ist, ist kein Hintergrund zu befürchten.

#### 2.2.1.4.1 Herstellung der Promotor-GUS Pflanzen

Um eine Transkriptionsfusion der Promotorfragmente und des *uidA*-Gens herzustellen wurden die Promotorfragmente mittels PCR aus der genomischen Pflanzen-DNA von *A. thaliana* und in den binären Vektor pANGUS kloniert. Die Transformation in Agrobakterien und die Transformation in *A. thaliana* Pflanzen wurden wie in 2.2.3.3.3 und 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die T1-Generation transformierter Pflanzen wurde auf ½ MS-Platten ausgesät und mit Kanamycin selektioniert.

#### 2.2.1.4.2 GUS-Analyse von Pflanzenmaterial

*A. thaliana* Pflanzen der T2-Generation wurden auf ½ MS-Platten angezogen und 7 Tage nach der Keimung geerntet. Pro Promotor-Fragment wurden mindestens 10 Linien analysiert. Die Keimlinge wurden zunächst für 45 min bei RT in Fixans fixiert und anschließend für 45 min in NaP<sub>i</sub>-Puffer unter mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen. Nach dreimaliger Vakuuminfiltration wurden die Pflanzen über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Keimlinge zunächst mit NaP<sub>i</sub>-Puffer gewaschen und dann zur Entfärbung für 1-2 Stunden in 100 % und anschließend für 3-4 Stunden in 60 % Ethanol geschüttelt, bis das Chlorophyll ausgewaschen war. Die Pflanzen wurden in einem Gemisch aus 50% Glycerin und 50% Ethanol aufgenommen und mikroskopisch (Binokular, Zeiss) untersucht.

#### 2.2.1.4.3 Relative Quantifizierung löslicher Anthocyane

Für die Quantifizierung der löslichen Anthocyane wurde etwa 80–100 mg Pflanzenmaterial von 7 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen geerntet und mit 1 mL saurem Methanol versetzt. Die Extraktion erfolgte unter Schütteln (1400 rpm) der Keimlinge für 5-6 Stunden bei RT und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 20 °C und 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R). Es wurden 1000 µL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Messung der Absorption eingesetzt. Dabei diente das Extraktionsmittel als Nullwert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 530 nm und 657 nm im Spektralphotometer. Die Berechnung des relativen Anthocyanwertes erfolgte nach folgender Formel:

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

Dabei ist Q der relative Anthocyanwert, während M die Einwaage an frischem Pflanzenmaterial darstellt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

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

Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ L folgende Komponenten: 100–500 ng Matrizen-DNA, jeweils 10 pmol gegenläufige Primer (Desoxyoligonucleotide), 5  $\mu$ L 10x PCR-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert), 1  $\mu$ L eines dNTP-Gemisches und 1 U Taq-/TaKaRa- (TaKaRa) oder 2 U Pfx-Polymerase (Invitrogen, proof reading Aktivität). Die DNA-Amplifikationen erfolgten im Mastercycler epgradient (Eppendorf) nach folgendem Schema:

| Schritt              | Taq-Polymerase |          |        | Pfx-Polymerase |          |        | TaKaRa Taq |          |        |
|----------------------|----------------|----------|--------|----------------|----------|--------|------------|----------|--------|
|                      | Zeit           | Temp     | Zyklen | Zeit           | Temp     | Zyklen | Zeit       | Temp     | Zyklen |
| <b>Aktivierung</b>   | 3 min          | 94 °C    | 1      | 30 sec         | 98 °C    | 1      | 8 min      | 98 °C    | 1      |
| <b>Denaturierung</b> | 25 sec         | 94 °C    |        | 10 sec         | 98 °C    |        | 10 sec     | 98 °C    |        |
| <b>Annealing</b>     | 30 sec         | 50-65 °C | 32     | 25 sec         | 50-65 °C | 35     | 25 sec     | 50-65 °C | 35     |
| <b>Elongation</b>    | 1 min/kb       | 72 °C    |        | 30 sec/kb      | 72 °C    |        | 1 min/kb   | 72 °C    |        |
| <b>Elongation</b>    | 5 min          | 72 °C    | 1      | 10 min         | 72 °C    | 1      | 5 min      | 72 °C    | 1      |
| <b>Kühlen</b>        | $\infty$       | 16 °C    |        | $\infty$       | 16 °C    |        | $\infty$   | 16 °C    |        |

#### 2.2.2.1.1 Kolonie-PCR

(modifiziert nach Gussow und Clackson, 1989)

Um transformierte Zellen schnell und effektiv auf das von ihnen getragene Plasmid testen zu können wurde zu jedem PCR-Ansatz mit der TaKaRa Taq (Reaktionsgemisch siehe 2.2.2.) direkt mit sterilen Zahnstochern Zellmaterial einer Einzelkolonie von der LB-Platte gegeben. Die DNA-Amplifikation erfolgte im Mastercycler epgradient (Eppendorf) nach dem PCR-Schema der TaKaRa Taq-Polymerase (siehe Tabelle).

#### 2.2.2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion kann die Sequenz von DNA-Molekülen gezielt verändert werden, um etwa Restriktionsschnittstellen zu erzeugen, STOPP-Kodons zu deletieren oder Punktmutationen einzufügen.

### 2.2.2.1.3 Punktmutationen von in Plasmiden vorliegenden cDNA-Klonen

Punktmutationen wurden durch gerichtete PCR-Mutagenese mit modifizierten Primern in vorhandene Plasmide eingeführt. Dazu wurden deckungsgleiche Primer gewählt, die an die komplementären DNA-Stränge binden können. Wenn zusätzlich zur Punktmutation neue Restriktionsschnittstellen eingeführt werden sollten, wurde die Sequenz der Primer so gewählt, dass sie die neuen Restriktionsschnittstellen enthielten. Die PCR wurde auf niedrigen Mengen an Ausgangsplasmid (< 100 ng) durchgeführt und lief nur über 20 Zyklen. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit DpnI für 60 min bei 37 °C inkubiert, um das Ausgangsplasmid zu verdauen. Der Ansatz wurde dann in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und die erhaltenen Klone wurden nach der Plasmid-Präparation erst durch Restriktionsverdau und dann durch Sequenzierung selektiert.

Für viele cDNA-Konstrukte war es notwendig, die ursprünglichen STOPP-Kodons zu mutieren, damit sie als Fusionskonstrukte kloniert werden konnten. Daher wurde mittels gerichteter PCR-Mutagenese (2.2.2.1.2) das STOPP-Kodon entsprechend modifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass trotz verändertem STOPP-Kodon die Konstrukte das Leseraster für die spätere Verwendung beibehielten.

## 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

(modifiziert nach Holmes und Quigley, 1981)

Es wurden 1,5 mL einer selektiv angezogenen 3 mL *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 2 min, 13.200 rpm, RT) und in 200 µL TELT-Puffer sowie 20 µL Lysozymbilösung (1 mg/mL) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 3-5 min bei 96 °C wird die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (15 min, 13.200 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 100 µL Isopropanol präzipitiert. Nach weiterer Zentrifugation (15 min, 13.200 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die Plasmid-DNA in 50 µL TE-Puffer (10/0,1) mit 10 µg/mL RNase gelöst.

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

(modifiziert nach Herstellerangaben der Fa. Qiagen)

Hochreine, unmethylierte Plasmid-DNA für den Einsatz in Transfektionsexperimenten wurde über die Technik der Säulenchromatographie gewonnen. Hierfür wurde, je nach benötigter Menge an Plasmid, das JETstar Plasmid-Purifikation MIDI Kit oder das

QIAGEN Plasmid Mega Kit eingesetzt. Die Übernachtskultur wurde in selektivem TB-Medium angezogen und die erhaltene Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10/1) gelöst.

### **2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA**

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen des Types II sequenzspezifisch gespalten werden. Die Durchführung der restriktionsendonucleolytischen Spaltungen erfolgte nach Herstellerangaben (New England Biolabs oder Fermentas). Für einen vollständigen Verdau wurden pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA 5 U Restriktionsenzym eingesetzt und für eine Stunde inkubiert. Bei partiellen Restriktionspaltungen wurde weniger Restriktionsenzym eingesetzt und die Inkubation verkürzt.

### **2.2.2.4 Dephosphorylierung von DNA**

Die alkalische Phosphatase (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs) entfernt freie 5'-Phosphatreste von DNA-Fragmenten. Da die T4-DNA-Ligase sowohl ein freies 3'-OH-Ende als auch ein freies 5'-Phosphatende zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten benötigt, kann der durch Eigenligation des Vektors bedingte Hintergrund bei Ligationsreaktionen durch Dephosphorylierung des Vektors deutlich herabgesetzt werden. Dies ist nur nötig bei gleichen oder kompatiblen Restriktionsenden im Vektor oder bei glatten Enden. Generell wurde 1 Unit Antarctic Phosphatase pro  $\mu\text{mol}$  freier 5'-Phosphatenden gewählt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die dephosphorylierte DNA konnte direkt für die Ligation (2.2.2.8) eingesetzt werden.

### **2.2.2.5 Behandlung mit T4 DNA-Polymerase**

Für blunt-end Klonierungen wird die DNA mit T4 DNA-Polymerase behandelt, um Einzelstrangüberhänge zu entfernen bzw. aufzufüllen. Die T4 DNA-Polymerase spaltet überhängende Nukleotide am 3'-Ende doppelsträngiger DNA ab (3'-5'-Exonukleasefunktion), kann aber auch bei einem 5'-Überhang Nukleotide an das 3'-Ende anheften (Polymerase-Funktion). Es wurden 5  $\mu\text{g}$  DNA mit 3 U T4 DNA-Polymerase (NEB) in entsprechendem Puffer mit 1x BSA und 200  $\mu\text{M}$  dNTPs in einem 35  $\mu\text{L}$  Ansatz für 20 min bei 16 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Nach dem Aufreinigen aus der Lösung (2.2.2.7) konnte die DNA für die Ligation (2.2.2.8) eingesetzt werden.

### **2.2.2.6 Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese**

Der optimale Trennbereich von Agarosegelen ist abhängig von der Agarosekonzentration. DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 4 kb wurden in 0,8-1,0 %igen (w/v) Agarosegelen (Standard, PeqLab) analysiert. Kleinere Fragmente wurden in 2,0-2,5 %igen (w/v) Gelen analysiert (in 1x TAE-Puffer). Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Gel 0,04 µg Ethidiumbromid pro mL Gelvolumen zugesetzt. Die zu analysierende DNA wurde mit 5x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld mit einer Spannung von 5-15 Volt/cm. Zur Größenabschätzung der Fragmente diente ein 1 kb Leiter (Invitrogen) für größere Fragmente und ein 100 bp Leiter (NEB) für kleine DNA-Fragmente. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht-Bestrahlung an einem Geldokumentationssystem der Firma INTAS. Für präparative Zwecke wurde Agarose der Firma Invitrogen genutzt.

### **2.2.2.7 Aufreinigung und Elution von DNA**

DNA-Fragmente können aus Lösung oder aus dem Agarosegel mit dem GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) aufgereinigt werden. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung erfolgte nach der PCR, nach der Behandlung mit T4 DNA-Polymerase oder nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen bevor die DNA für die Ligation (2.2.2.8) eingesetzt werden sollte.

### **2.2.2.8 Ligation**

Ligasen sind Enzyme, die zwei DNA Enden 5'-3' unter Verbrauch von ATP kovalent miteinander verknüpfen können. In der Molekularbiologie werden sie dazu benutzt, um kleine DNA-Fragmente in Plasmidvektoren zu klonieren (ligieren), um diese nach der Transformation in Bakterien (2.2.3.3) gezielt vermehren zu können. Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmentenden geschieht mit Hilfe von 400 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). Für die Konstruktion von Plasmiden wurde ein Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im T4-DNA-Ligase-Puffer bei 16 °C über Nacht.

### **2.2.2.9 Gateway® Rekombination**

#### **Klonierung von DNA-Fragmenten mittels Gateway® Technologie**

Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mit Restriktionsendonucleasen und Ligasen beruht die Gateway Rekombination auf sequenzspezifischen DNA-Rekombinationen, die durch spezifische Rekombinasen katalysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde

hierzu das Gateway-System der Firma Invitrogen verwendet, das auf der Verwendung der Lambda-Rekombinase und Rekombinationsstellen beruht (Gateway™ Cloning Technology Instruction Manual). Diese Methode ermöglicht eine besonders schnelle und effiziente Klonierung eines Gens in eine Vielzahl von Expressionsplasmiden. So wurden durch PCR gewonnene cDNAs mit flankierenden spezifischen Sequenzen (*attB* sites) durch Rekombination in ein Donor-Plasmid (z.B. pDONR201) mit spezifischen Sequenzen (*attP* sites) kloniert. Durch den BP Clonase II Mix (Int, IHF), der eine Intergrase (Int) des Bakteriophagen  $\lambda$  und den „Integration Host Factor“ (IHF) aus *E. coli* enthält, wird die Rekombination zu einem *attL*-tragenden Entryklon katalysiert (Abb. 2-1). Es entsteht der Eingangsklon ohne *ccdB*-Gen, jedoch mit dem eingefügten PCR-Produkt. Die Eingangsklone können durch die Kanamycinresistenz selektioniert werden. Das *ccdB*-Gen des Donor-Plasmides ist für die Gegenselektionierung nötig. Alle Plasmide mit dem *ccdB*-Gen führen zum Absterben der Bakterientransformanten.



Abbildung 2-1: Vereinfachte Darstellung einer BP-Reaktion (Gateway Technology, 2003).

Aus den erhaltenden pEntry-Plasmiden wurden die codierenden Sequenzen durch eine zweite Rekombination (LR-Reaktion) in die unterschiedlich verwendeten Expressionsvektoren übertragen. Dieser LR Clonase Mix (Int, Xis, IHF) besitzt die enzymatischen Funktionen der Intergrase (Int) und Exzisionase (Xis) des Bakteriophagen  $\lambda$ , sowie ebenfalls den „Integration Host Factor“ (IHF) aus *E. coli*. Hier erfolgt die Rekombination eines *attL*-Substrates (Entry-Vektor) mit einem *attR*-Substrat (Destination-Vektor) zu einem *attB*-tragenden Expressionsvektor (Abb. 2-2). Die Selektionierung der Expressionsklone wird dadurch erreicht, dass der Rekombinationsmix in *E. coli* transformiert wird (2.2.3.3). Nur Plasmide ohne *ccdB*-Gen aber mit der entsprechenden Resistenz des Expressionsklons führen zu Kolonien.



Abbildung 2-2: Vereinfachte Darstellung einer LR-Reaktion (Gateway Technology, 2003).

### 2.2.2.10 Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte

Plasmidkonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, sind tabellarisch im Anhang (vgl. Tabelle 7.1) aufgelistet. Die Sequenzen basieren auf dem Ökotyp Col-0.

### 2.2.2.11 DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

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

Um genomische DNA aus *A. thaliana* Pflanzen zu extrahieren wurden etwa 100–500 mg Blattmaterial mit 400  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffer und 10-15 Silica Beads in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte eine Zerkleinerung des Blattmaterials für 3 min bei  $30\text{ s}^{-1}$  im Tissue Lyser (Qiagen, Hilden). Nach der Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5417R, 10 min, 13.200 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand (ca. 250  $\mu\text{L}$ ) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach Zugabe von 180  $\mu\text{L}$  Isopropanol durch eine Inkubation für 10 min bei 4  $^{\circ}\text{C}$ . Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min, 13.200 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) pelletiert und das Pellet mit 200  $\mu\text{L}$  70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13.200 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) wurde das Pellet nach dem Trocknen in 50  $\mu\text{L}$  Tris-HCL, pH 8 aufgenommen.

### 2.2.2.12 Ammoniumacetat-Fällung von DNA

Die DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt wurde, wurde durch Ammoniumacetat-Fällung aufgereinigt. Dazu wurde die DNA mit sechs Volumenanteilen Ethanol und einem Volumenanteil 4 M Ammoniumacetat gefällt und für 15 min bei 13.200 rpm und 4  $^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation und nach Trocknung in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

### 2.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren absorbieren Licht im UV-Bereich. Daher ist es möglich, durch Messung der Lichtabsorption die Konzentration von DNA, RNA und Oligonukleotiden in Lösung zu bestimmen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren beträgt 260 nm, wobei eine Extinktion von 1 etwa 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Oligonucleotiden entspricht. Von jeder DNA werden Verdünnungen erstellt und gegen einen entsprechenden Leerwert gemessen. Die Konzentration ergibt sich aus  $\text{OD}_{260} \times \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$  in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte in Quarzküvetten oder UV-durchlässigen Kunststoffküvetten (Eppendorf, Biophotometer).

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

Sollte DNA direkt nach der PCR sequenziert werden, wurde sie durch ExoSAP-IT-Behandlung vorbereitet. Dazu wurden 6,5 µL von dem PCR-Produkt mit 0,5 µL ExoSAP-IT versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 15 min Inkubation bei 80 °C zur Inaktivierung des Enzyms konnte die DNA zur Sequenzierung eingesetzt werden.

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

Die „*Sequencing Core Facility*“ der Universität Bielefeld führte die automatisierte DNA-Sequenzanalyse nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, (1977) unter Verwendung von „*Big Dye-terminator Chemistry*“ durch. Hier befindet sich in einem Ansatz zur Amplifikation der DNA nur ein Primer, wodurch die DNA linear amplifiziert wird. Neben den vier Desoxynucleotiden befinden sich auch vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynucleotide zur Termination der Polymerisation in dem Ansatz. Die durch die Amplifikation entstehenden, unterschiedlich großen und markierten Fragmente können mit Hilfe des Analysegerätes „*Abi-Prism 3730xl DNA-Sequencern*“ (Applied Biosystems) detektiert werden. Mit Hilfe des Programms „*Sequencher*“ (Gene Codes Corporation, USA) wurden die erhaltenen Daten ausgewertet.

#### **2.2.2.16 RNA-Präparation**

##### **2.2.2.16.1 RNA-Isolation mit TRI-REAGENT®**

RNA wurde aus *A. thaliana* Keimlingen mit Hilfe von TRI-REAGENT® isoliert. Für die RNA-Isolation wurden 50-100 mg Pflanzenmaterial in 2 mL Reaktionsgefäße gegeben und mit 10-15 Zirkoniakugeln (Roth) und 1 mL TRI-REAGENT versetzt. Die Proben wurden für 2 x 45 sec auf Stufe 6,5 im Ribolyser (Hybaid, Teddington, UK) homogenisiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µL Chloroform wurden die Proben 15 sec geschüttelt und anschließend 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415R, 12.000 g, 15 min, 4 °C) wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 500 µL kaltem Isopropanol versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben erneut zentrifugiert (12.000 g, 8 min, 4 °C). Nach dem Waschen des Pellets mit 75 % Ethanol wurden die Proben abzentrifugiert (12.000 g, 5 min, 4 °C) und das Pellet an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 44 µL DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und für die DNase-Behandlung eingesetzt.

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

Um Matrizen-DNA für die semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) zu generieren, wurde eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Dazu wurde die gesamte RNA in 44 µL DEPC-Wasser aufgenommen und mit 2 µL 10x DNase Puffer (Ambion, DNA-free™) und 1 µL DNaseI (Ambion) versetzt, um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen. Die Reaktion wurde nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C mit 2 µL DNase Inactivation Reagent (Ambion) abgestoppt. Dazu wurde der Ansatz für zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 30 sec bei 13.200 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 µL einer 10 µM Lösung des oligo-dT-Primers (RS651) und 4 µL Wasser vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 65 °C und anschließender Abkühlung auf Eis wurden 8 µL 5x first strand buffer, 4 µL 0,1 M DTT, 1 µL Reverse Transcriptase (Invitrogen, SuperScript™ II Reverse Transcriptase) und 2 µL 10 mM dNTPs zugegeben. Die Erststrangsynthese erfolgte für 1 h bei 42 °C. Nach 5-minütigem Abstoppen der Reaktion bei 90 °C konnte die cDNA-Präparation bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 2.2.2.16.3 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative *reverse transcriptase* PCR wird angewandt, um die Expressionsstärke eines Gens zu untersuchen. Dazu wird die Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens mit der Transkriptmenge eines Kontrollgens (Aktin2) verglichen, das konstitutiv exprimiert wird. Als Maß für die Expressionsstärke dient die Bandenstärke nach einer Agarose-Gelelektrophorese. Für die Kontrolle wurden spezifische Primer eingesetzt (RS469, RS470) um ein etwa 500 bp großes DNA-Fragment zu erhalten. Für die RT-PCR wurde die TaKaRa Taq Polymerase mit dem dazugehörigen Puffer und den dNTPs verwendet (siehe 2.2.2.1). Es wurde jeweils 1 µL Matrizen-DNA eingesetzt und nach dem PCR Schema aus 2.2.2.1 verfahren.

## 2.2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte entweder auf selektiven LB-Platten oder in selektivem LB- bzw. TB-Medium bei 37 °C. Zur Herstellung methylierter Plasmid-DNA wurde der Stamm *E. coli* XL1-blue und für die Herstellung von unmethylierter DNA wurde der Stamm *E. coli* K12 ER2925 verwendet. Plasmide, die in Pflanzen transformiert werden sollten wurden zunächst in *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien (Stamm

GV3101) transformiert. Diese transformierten Bakterien wurden selektiv auf YEP-Platten angezogen und dann in selektives YEP-Medium überimpft und bei 28°C angezogen.

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

#### **2.2.3.2.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen**

Um Bakterien kompetent für die Aufnahme von DNA zu machen, werden sie in verschiedenen Lösungen gewaschen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Dazu wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* XL 1-blue in 3 mL selektivem LB-Medium angesetzt, von der am nächsten Tag 1 mL in 100 mL frisches selektives LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt wurde. Die Lösungen TFB1 und TFB2 wurden aufgetaut und auf Eis gekühlt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 wachsen lassen und in 250 mL Reaktionsgefäße überführt und 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4600 rpm und 4 °C für 6 min pelletiert (Heraeus Multifuge 3S-R). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 2 mL eiskaltem TFB1 resuspendiert. Beide Ansätze wurden vereinigt, auf 40 mL mit kaltem TFB1 aufgefüllt und 5 min auf Eis inkubiert. Bei 4 °C und 3000 rpm wurden die Zellen für 6 min pelletiert und das Pellet anschließend in 4 mL TFB2 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben konnten bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

#### **2.2.3.2.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen**

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Kompetenz der Bakterien nicht zu verringern. Dazu wurde eine selektive Übernachtskultur von *E. coli* XL 1-blue in 5 mL LB-Medium angesetzt, die am nächsten Tag in 500 mL selektives frisches LB-Medium überimpft wurde und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 inkubiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann 15-30 min auf Eis inkubiert und anschließend in je 2 x 250 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 4000 g, 15 min, 4 °C). Die Bakterienpellets wurden in je 250 mL eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (4000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in je 20 mL eiskaltem sterilen 10 %igem Glycerin resuspendiert und anschließend auf 40 mL Glycerin aufgefüllt. Nach der Zentrifugation (4000 g, 15 min, 4 °C) wurde das Pellet je nach Größe in 2-4 mL eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und jeweils 50 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Die

Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnte bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

#### **2.2.3.2.3 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterienzellen**

Es wurden 5 mL einer selektiven Übernachtskultur in YEP-Medium angesetzt und bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Nach etwa 24 Stunden wurde eine selektive Hauptkultur mit der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm anwachsen lassen. Am nächsten Tag wurde die Agrobakteriensuspension bei 4 °C pelletiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 4000 g, 15 min) und in 500 mL kaltem sterilen Wasser resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 4000 g, 15 min) und in 500 mL eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3S-R, 4000 g, 15 min) wurde das Pellet in 50 mL kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und wiederum pelletiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 4000 g, 15 min). Das Zellpellet wurde in 1-4 mL kaltem 10 %igem Glycerin aufgenommen und jeweils in 50 µL Aliquots pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnte bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

#### **2.2.3.3 Transformation von Bakterienzellen**

##### **2.2.3.3.1 Transformation chemokompetenter Bakterienzellen**

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu einem Aliquot Zellen wurden 2-5 µL DNA gegeben und für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation folgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Anschließend wurde auf den Ansatz 1 mL SOC-Medium gegeben und die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C für eine Stunde bei 1200 rpm inkubiert. Es wurden etwa 50-100 µL der Suspension auf selektiven LB-Platten ausgestrichen.

##### **2.2.3.3.2 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen**

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu einem Aliquot Bakterienzellen wurden 0,5-1 µL DNA gegeben und der Ansatz wurde in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) überführt. In einem Micropulser (Biorad) wurden die Zellen elektroporiert und anschließend direkt in 1 mL SOC-Medium überführt. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C und 1200 rpm für eine Stunde inkubiert. Es wurden etwa 50-100 µL der Suspension auf selektiven LB-Platten ausgestrichen.

#### **2.2.3.3.3 Transformation elektrokompetenter Agrobakterienzellen**

Für die Transformation von Agrobakterien wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu einem Aliquot Agrobakterien wurde 1 µL DNA gegeben und der Ansatz wurde in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) überführt. In einem Micropulser (Biorad) wurden die Zellen elektroporiert und anschließend direkt in 1 mL YEP-Medium überführt. Die Bakteriensuspension wurde bei 28 °C und 180 rpm für 3-4 Stunden inkubiert. Es wurden etwa 100-300 µL der Suspension auf selektiven YEP-Platten ausplattiert.

#### **2.2.3.4 Dauerkulturen transformierter Bakterien**

Um Dauerkulturen von transformierten Bakterien anzulegen, wurden 825 µL der Bakterien-Übernachtskultur mit 375 µL sterilem 80 %igen Glycerin gemischt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen konnten dann für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

#### **2.2.3.5 Herstellung transgener Pflanzen**

Transgene Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, sind tabellarisch im Anhang (vgl. Tabelle 7.2) aufgelistet. Die Sequenzen des Transgens basieren auf dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0.

##### **2.2.3.5.1 Agrobakterium-vermittelte transiente Transformation von Fusionsproteinen in *A. thaliana***

Für die transiente Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurden entsprechende Keimlinge für 4 Tage auf ½ MS-Platten + 4 % Saccharose unter Langtagbedingungen angezogen. Von zuvor transformierten hypervirulenten Agrobakterien (EHA105) wurde eine selektive Übernachtskultur in 5 mL YEP-Medium angesetzt. Morgens wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Hereaus Multifuge 1s, 4000 rpm, RT, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL Infiltrationsmedium resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 1 mL Infiltrationsmedium resuspendiert. Es wurde eine 10x Verdünnung erstellt und die OD<sub>600</sub> gemessen (eine OD<sub>600</sub> von 0,1 ist optimal). Die 4 Tage alten Keimlinge wurden in 1500 mL Infiltrationsmedium + Agrobakteriensuspension gegeben und für 1-2 Stunden bei 27 °C unter leichte m Schütteln infiltriert. Anschließend wurden die Keimlinge auf ½ MS-Platten + 4 % Saccharose gelegt und für 2-3 Tage unter Langtagbedingungen angezogen. Die Analyse der Infiltration erfolgte über den Phänotyp

der Keimlinge auf den MS-Platten und über die GFP-Expressionsanalyse am Mikroskop. Ebenso wurde RNA extrahiert und durch PCR mit spezifischen Primern das inserierte Transgen ermittelt.

#### **2.2.3.5.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation durch „floral dipping“**

Für die Transformation in *A. thaliana* wurden von etwa 30 Tage alten Pflanzen die Infloreszenzen nahe der Rosette abgetrennt, um die Bildung der Blüten zu induzieren. Nach einer Woche waren die Infloreszenzen etwa 10 cm lang und die Pflanzen konnten für die Transformation verwendet werden. Es wurde eine 5 mL Vorkultur in selektivem YEP-Medium mit den transformierten Agrobakterien angeimpft und einen Tag bei 28 °C und 180 rpm wachsen lassen. Nach etwa 24 Stunden wurde mit der Vorkultur 150 mL selektives YEP-Medium angeimpft und für 2-3 Tage bei 28 °C und 180 rpm wachsen lassen. Dann wurde pro zu transformierendes Konstrukt 800 mL Infiltrationsmedium vorbereitet und die Kulturen wurden bei 4600 rpm und RT für 10 min pelletiert (Heraeus Multifuge 3S-R). Das Pellet wurde in ca. 50 mL Infiltrationsmedium resuspendiert und in Bechergläser überführt. Das Gemisch wurde mit Infiltrationsmedium auf 800 mL aufgefüllt. Jeder bepflanzte Topf wurde etwa 2 min mit den Blüten voran in das Infiltrationsmedium mit den transformierten Agrobakterien gehalten und anschließend in einer Tüte verpackt. Die Pflanzen wurden über Nacht im Gewächshaus im Dunkeln gelagert und am nächsten Tag entpackt. Am Tag der Transformation wurde erneut eine Vorkultur angesetzt und die Prozedur wurde wie oben beschrieben mit den gleichen Pflanzen wiederholt, um die Effizienz zu steigern. Nach der zweiten Transformation wurden die Pflanzen bis zur Samenreife im Gewächshaus weiter angezogen und die Schoten wurden bis zur Abreife eingetütet.

#### **2.2.3.5.3 Selektion transgener T1-Pflanzen**

Die Identifikation positiver Transformationsereignisse erfolgte über die T1-Samen. Diese wurden auf selektive ½ MS-Platten ausgelegt und unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, Kunstlicht) angezogen. Dabei entwickelten sich die transgenen Pflanzen normal, während nicht-transgene Pflanzen keine grüne Blattfärbung zeigten, sehr klein blieben und später abstarben. Die transgenen Pflanzen wurden auf Erde pikiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen. Das Vorhandensein des Transgens wurde nach DNA-Extraktion mittels spezifischer Primer in einer PCR überprüft.

## 2.2.4 Biochemische Methoden

### 2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(modifiziert nach Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blue G-250 der Proteingehalt bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 595 nm im Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurden 90  $\mu\text{L}$  Bradford-Lösung,  $x$   $\mu\text{L}$  Proteinlösung und  $10-x$   $\mu\text{L}$  Wasser gemischt. Je nach Proteingehalt färbte sich die vorher bräunliche Lösung blau. Zum Erhalt eines Mittelwertes wurden immer zwei gleiche Ansätze nebeneinander gemessen. Entfettetes Rinderserumalbumin (BSA) diente als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgerade.

### 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

(modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Überprüfung der Proteinzusammensetzung einer Probe. Für Polypeptidketten mit einem größeren Molekulargewicht als 10 kDa wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen bei konstanter Feldstärke durchgeführt. Die Proteine werden denaturiert und aufgrund ihres Molekulargewichtes in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 12 %ige Polyacrylamid-Trenngele nach der Polymerisation mit 6 %igen Sammelgelen überschichtet. In die Sammelgele wurden Taschen definierten Volumens durch Kunststoffkämme eingefügt. Zu jeder Proteinprobe wurden 5  $\mu\text{L}$  sechsfach konzentrierter SDS-Gelladepuffer gegeben und zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 100 °C erhitzt. Die Proteinproben wurden bei einer konstanten Spannung von 120 V für 1,5 h aufgetrennt. Es wurden vertikale Gele verwendet (Mini Protean II, BioRad). Als Puffermedium diente SDS-Laufpuffer. Zur Visualisierung der Polypeptide im Gel erfolgte eine Inkubation in einer Coomassie-Färbelösung über Nacht. Der Gelhintergrund wurde durch Inkubation des Gels für mehrere Stunden in Entfärbelösung entfernt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Proteinstandard-Gemischen (*Prestained Protein Ladder* 10-180 kDa, MBI Fermentas).

### 2.2.4.3 Immunologische Methoden

#### 2.2.4.3.1 Western Blot

Nach der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine über Nacht bei 100 mA im Nass-Transfer-Verfahren (Trans-Blot, Semidry, BioRad) auf Immobilon-P-Membranen (PVDF

Membran, BioRad) oder Nitrozellulosemembranen elektrotransferiert. Die Membranen und das Filterpapier wurden zur Optimierung des Proteintransfers in Transferpuffer für 20 min inkubiert. PVDF-Membranen wurden vor dem Blotten für eine Stunde in MeOH inkubiert. Nach dem Blotten wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Zur Suppression unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen nach diesem Anfeuchten in TBS für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 30 min in TBS-Tween-Puffer gewaschen (alle 10 min wurde die Lösung gewechselt). Die Inkubation mit den Penta-His HRP Antikörpern (Qiagen, Hilden) erfolgte in einer 1:2000 Verdünnung für 1-4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation wurde die Membran für 2 x 10 min mit TBS und für weitere 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Detektion des Blots fand in Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Substratlösung statt (2.2.4.3.2).

#### **2.2.4.3.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Farbreaktion**

Antikörperverbindungen können über eine Farbreaktion visualisiert werden. Das Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Enzym liegt als Antikörperkonjugat vor und kann mit großer Geschwindigkeit ein zugegebenes farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umsetzen. Die Detektion des Immunkomplexes erfolgt mit einer HRP-Färbelösung. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurde die Membran so lange bei RT mit HRP-Färbelösung inkubiert, bis eine deutliche Proteinbande sichtbar wurde. Durch Waschen der Membran mit Wasser wurde die Farbreaktion gestoppt. Pro Membran (ca. 8,5 x 5,5 cm) wurden 20-30 mL Färbelösung verwendet.

#### **2.2.4.4 Extraktion und Reinigung nativer und rekombinanter Proteine**

##### **2.2.4.4.1 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3) pLysS**

Für die heterologe Expression der Proteine wurde das pDEST17-System von Gateway verwendet. Die Konstrukte, die unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7 RNA-Polymerase Promotors stehen, wurden in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen transformiert (2.2.3.3) und in einer 5 mL Vorkultur selektiv über Nacht angezogen. Morgens wurden 50-500 mL selektives LB-Medium mit 1% (v/v) der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C aerob bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 kultiviert. Die heterologe Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 0,3-1 mM IPTG induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterienkulturen bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,8-2,0 angezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3S-R, 4600 rpm, 4 °C, 20 min). Das Zellpellet wurde in 1/10 Volumen der Ausgangskultur LEW-Puffer + Pefabloc (100 µg/mL)

(ROTH) resuspendiert und bei 4 °C kühl gehalten. Analysiert wurde die Expression der Proteine über SDS-PAGE (2.2.4.2). Dazu wurden vor der Induktion und jede Stunde nach der Induktion der Proteine durch IPTG 1 mL Aliquots von der Kultur abgenommen und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in LEW-Puffer resuspendiert. Die mit SDS-Probenpuffer denaturierten Fraktionen wurden auf die SDS-Gele aufgetragen.

#### **2.2.4.4.2 Herstellung von Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) pLysS**

Zur Isolation der Einschlusskörper wurde das Zellpellet in 1/10 Volumen der Ausgangskultur LEW-Puffer mit Lysozym (1 mg/mL) und Pefabloc (100 µg/mL) aufgenommen und nacheinander erst 30 min auf Eis, dann 20 min bei RT inkubiert. Die anschließenden Sonifizierungsschritte (2-5 x 60 s, 50 % Microtip) erfolgten auf Eis. Die aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 4600 rpm, 4 °C, 30 min) und das Pellet in 10 mL LEW-Puffer + Pefabloc (100 µg/mL) resuspendiert. Um die Einschlusskörper zu solubilisieren wurde die Suspension erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 10.000 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 mL/g Denaturing Solubilization Puffer resuspendiert und erneut sonifiziert (2-5 x 60 s, 50 % Microtip). Mit diesem Sonifizierungsschritt wurden die Proteine aus den Einschlusskörpern herausgetrennt. Anschließend wurde die Suspension für 60 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 10.000 g, 20 °C, 30 min). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß gegeben und für die Aufreinigung über die IMAC-Säulen (*Immobilized metal ion affinity chromatography*) genutzt.

#### **2.2.4.4.3 Proteinreinigung über IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*) His-Tag-Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung heterolog in *E. coli* exprimierter Proteine, die mit einem Poly-Histidin-Tag (His-Tag) ausgestattet sind, erfolgte mit dem „Protino® Ni 2000 *prepacked columns kit*“ (Macherey & Nagel) unter denaturierenden Bedingungen nach Herstellerangaben.

Als Vorbereitung auf die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)-Messungen bzw. für den *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) wurden die heterolog in *E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimierten Proteine durch enzymatische Lyse der Bakterienzellwände und Sonifizierungsschritte freigesetzt (2.2.4.4.2). Der geklärte Rohextrakt wurde auf die mit Nickelsulfat beladenen und äquilibrierten Säulen gegeben. Die exprimierten mit His-Tag erweiterten Proteine wurden an spezifische Nickel-Bindestellen der Säulenmatrix gebunden, wo sie mit dem Nickel der Matrix eine Chelatbindung eingehen, während andere Proteine und Verunreinigungen durch mehrere

Waschschritte mit *Denaturing Solubilization* Puffer entfernt werden konnten. Die Elution der mit hexamerem Histidinrepeat versehenen Proteine erfolgte mit Hilfe von Imidazol und Harnstoff im LEW-Puffer (*Denaturing Elution* Puffer). Die einzelnen Fraktionen der Waschschritte und der Elution wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Reinheit analysiert. Die Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Reinigung der Proteine aus Einschlusskörpern (HVR) erfolgte in Anwesenheit von 6 M Harnstoff in allen verwendeten Puffern.

#### **2.2.4.4.4 Renaturierung der Proteine durch Dialyse**

Werden Proteine gezielt durch rekombinante DNA-Technologie in Prokaryoten hergestellt, ist die Ausbeute meist sehr hoch. Als Folge können sich jedoch Einschlusskörper (*inclusion bodies*) bilden, die aus nicht korrekt gefalteten Polypeptidketten bestehen. Für die Rückgewinnung der biologischen Aktivität müssen diese aufgelöst und das Protein in seine aktive Konformation überführt werden. Während dieser so genannten Renaturierung werden Proteine, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden (siehe 2.2.4.4.3), in ihre aktive Konformation überführt, um die biologische Aktivität zurückzugewinnen. Bei der Renaturierung durch Dialyse mit Roti®-Fold (ROTH) wird die Präzipitation der Proteine unterbunden und damit die Ausbeute an gereinigtem, nativen Protein erhöht. Ausgangspunkt für die Renaturierung sind die in Puffer gelösten, über Nickelchelate-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine. Zu der Ausgangsfraktion wurde 1/10 Volumen erwärmtes Roti®-Fold (8x) gegeben und in einer Dialysesäule (Spectral® CE (Cellulose Ester) Float A Lyzer™) gegen Roti®-Fold (1x) dialysiert. In bestimmten Intervallen wurde das Roti®-Fold (1x) schrittweise mit PBS-Puffer nach Herstellerangaben verdünnt. Durch Zugabe von reduzierenden Agenzien (DTT, < 10 mM) kann die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken unterstützt werden.

#### **2.2.4.5 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)**

Das LightShift chemiluminescent EMSA Kit (Pierce) ermöglicht die Analyse von Protein-DNA-Interaktionen ohne den Gebrauch von Radioaktivität. DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, zeigen in einem Polyacrylamidgel ein anderes Laufverhalten als die entsprechende, ungebundene DNA. Der DNA-Proteinkomplex wandert aufgrund seines höheren Molekulargewichts langsamer als das proteinfreie Fragment. Diese Verzögerung wird als „*Shift*“ bezeichnet. Dieser Effekt kann genutzt werden, um spezifische Bindungen von Proteinen an DNA-Fragmente zu charakterisieren. Hierzu wurde das entsprechende DNA-Fragment mittels PCR (2.2.4.5.2) mit Biotin markiert und in einem geeigneten Puffer mit dem Proteinextrakt inkubiert (2.2.4.5.3). Die Bindereaktion

erfolgte für 30 min bei RT und die Probe wurde dann auf das native PAGE-Gel gegeben. Als Laufpuffer diente 0,25x TBE. Als Kontrolle diente eine Probe mit dem freien DNA-Fragment. Die Analyse wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.4.5.1 Expression der Proteine**

Die Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte wie in 2.2.4.4 beschrieben.

#### **2.2.4.5.2 Herstellung des biotinylierten DNA-Fragmentes**

Ein 123 bp langes DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert. Die Primer waren dabei so verändert, dass das DNA-Fragment am 5'-Ende während der PCR biotin-markiert wurde. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) aus der Lösung aufgereinigt (2.2.7) und für den Bindungsassay eingesetzt.

#### **2.2.4.5.3 DNA-Protein-Bindungsassay**

Um für alle Ansätze eine gleiche DNA-Lösung zu garantieren, wurde ein DNA-Mastermix hergestellt. Die DNA-Menge wurde entsprechend 1 Mio cpm eingesetzt, 36 µL Bindungspuffer, 10 µL poly [dl/dC]-Lösung und 10 µL 15 mM Spermidin-Lösung zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt. Pro Ansatz wurden 5 µL Mastermix mit 0-9 µL Proteinlösung versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 15 µL aufgefüllt und für 20 min bei RT inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Proteinlösung wurde mit 4 µL Färbepuffer versetzt. Die Bindungsansätze wurden direkt auf das Gel geladen.

#### **2.2.4.5.4 Gelpräparation und Gellauf**

Das Agarose-/Polyacrylamidgel wurde einen Tag vor dem Versuch gegossen. Die Suspension aus Agarose, H<sub>2</sub>O und 10x TBE wurde aufgekocht, das abgedampfte H<sub>2</sub>O ersetzt und die restlichen Komponenten beigefügt. Das flüssige Gel wurde sofort luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nach 30 min Polymerisation wurde das Gel über Nacht in feuchte Tücher eingeschlagen bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde nach einem Vorlauf von einer Stunde bei 100 V in 0,25x TBE-Puffer das Gel mit den Bindungsansätzen beladen und der Gellauf wurde bei 200 V durchgeführt. Als Laufkontrolle diente der Ansatz ohne Protein. Hatte die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht, wurde der Gellauf beendet.

#### 2.2.4.5.5 Gelanalyse

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel für 20 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend mittels Westernblot auf Whatman-Papier übertragen (2.2.4.3.1). Nach dem Blotten wurde die Membran zweimal für 1 min in 2x SSC neutralisiert und anschließend kurz mit 1x TE gewaschen. Zur DNA-Fixierung wurde die Membran auf Whatman-Papier gelegt und in der Mikrowelle (800 W, 2 min) inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben (Pierce). Anschließend wurde die Membran für 5 min in *substrate-working* Lösung (im Kit enthalten) inkubiert und auf Whatman-Papier abgetropft. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie eingeschlagen und gegen einen Film in der Dunkelkammer exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

### 2.2.5 Zellkulturen

#### 2.2.5.1 At7-Zellkultur

Die At7-Zellsuspensionskultur eignet sich für die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen (Trezzini *et al.*, 1993; Mehrrens *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2005). Die ursprünglich von Hypokotylzellen abstammende Zellsuspensionskultur kann durch unterschiedliche Konstrukte kotransfiziert werden, die gleichzeitig aufgenommen werden. Dabei kann ein durch ein Effektor-Konstrukt kodiertes Protein an seinen Zielpromotor im Reporterkonstrukt binden und für die Expression eines kodierten  $\beta$ -Glukuronidase-Enzyms sorgen. Diese hervorgerufene Reporter-Gen-Aktivität kann fluorimetrisch bestimmt werden. Um unterschiedlich ausfallende Transfektionseffizienzen zu korrigieren wird zusätzlich ein Kontrollplasmid (pBT10::*Pro<sub>ubi</sub>:LUCm3*; MS129) transfiziert, das ein Luziferase-Reporter-Gen unter der Kontrolle eines Ubiquitinpromotors enthält. Ein Auffüllplasmid (pBT10:: $\Delta$ :*LUCm3*; MS47) dient dazu, in jedem Transfektionsansatz die gleiche Menge DNA einzusetzen. Die DNA für die Transfektionsexperimente wird im Bakterienstamm *E. coli* K12 ER2925 amplifiziert und ist daher methylierungsnegativ. Die Kultivierung der Zellsuspensionskultur erfolgte wie in Trezzini *et al.* (1993) beschrieben. Die Zellen wurden in jeweils 40 mL MS-Medium in Erlenmeyerkolben bei 26 °C und 105 rpm (Infors) in Dunkelheit inkubiert. Einmal pro Woche wurden 3 g einer Zelllinie mit einem Sieblöffel in frisches Medium überführt.

##### 2.2.5.1.1 Vorbereitung der Transfektions-DNAs

Die DNAs für die Transfektion wurden immer nach dem gleichen Schema pipettiert. Ein Ansatz enthielt immer 10  $\mu$ g Reporterplasmid, 0-2 Effektorplasmide (jeweils 1  $\mu$ g), 5  $\mu$ g Kontrollplasmid (pBT10::*Pro<sub>ubi</sub>:LUCm3*; MS129), ein Auffüllplasmid (pBT10:: $\Delta$ :*LUCm3*;

MS47; bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 25 µg) und die entsprechende Wassermenge um einen Ansatz von 50 µL zu erhalten. In jedem Transfektionsexperiment wurde eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle, jeweils ohne Effektorplasmid, mitgeführt. In der Positivkontrolle wurde das konstitutiv GUS-exprimierende Reporterplasmid pBT4::*Pro<sub>35S</sub>:GUS* (MS275) eingesetzt und als Negativkontrolle diente das pBT4:: $\Delta$ :*GUS* (MS156) Plasmid.

#### 2.2.5.1.2 Gewinnung von At7-Protoplasten

(modifiziert nach Dangl *et al.*, 1987)

Um Protoplasten aus der At7-Zellkultur zu gewinnen wurden 40 mL einer 5 Tage alten Kultur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 rpm, 5 min, RT, Beschleunigung 3, Bremse 5) und das Pellet in 25 mL 240 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bis zu einem Gesamtvolumen von 40 mL in steriler Enzymlösung (enthält Zellulase und Mazerozym) aufgenommen und resuspendiert. Verteilt auf zwei Petrischalen (Durchmesser 14,5 cm) wurde die Zellsuspension über Nacht bei 26 °C und 20 rpm in Dunkelheit inkubiert. Nach spätestens 20 Stunden wurden die Protoplasten für 30 min bei 26 °C und 50 rpm geschüttelt und anschließend in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 6 min, RT). Die Pellets wurden in 25 mL 240 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen, erneut wie vorher zentrifugiert und anschließend in 5,5 mL B5-Medium aufgenommen. Es wurden immer zwei Ansätze vereinigt und die lebenden Protoplasten durch Zentrifugation (800 rpm, 6 min, RT) flotiert. Die lebenden Protoplasten wurden mit einer weitlumigen Pipette abgenommen und in 14,5 mL B5-Medium erneut wie vorher flotiert. Die überlebenden Protoplasten wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Protoplasten konnten direkt für die Transfektion eingesetzt werden.

#### 2.2.5.1.3 Transfektion von At7-Protoplasten

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

Die DNA-Aufnahme in die At7-Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. Dazu wurden in 10 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) je 200 µL Protoplastensuspension vorgelegt, in die die vorbereitete Transfektions-DNA gegeben wurde. Nach der Zugabe von 200 µL PEG-Lösung wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die DNA-Aufnahme wurde anschließend durch Zugabe von 5 mL 275 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung abgestoppt. Nach Zentrifugation (Heraeus Multifuge 1s, 800 rpm, 8 min, RT) wurden die Zellen in je 7 mL B5-Medium aufgenommen und bei 26 °C für 20 Stunden in Dunkelheit inkubiert.

#### **2.2.5.1.4 Ernte transfizierter Protoplasten**

Für die Ernte wurde die Zellsuspension nach der Inkubation in je 25 mL vorgekühlte 240 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben und zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 1200 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde bis auf 1 mL Restvolumen abgenommen und die Protoplasten im verbliebenen Überstand resuspendiert. Unter Verwendung von „Cell saver“-Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik) wurde die Protoplastensuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 4 °C). Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.5.1.5 Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten**

Zur Extraktion der Proteine, die in den transfizierten Protoplasten enthalten sind, wurden die Protoplasten-Pellets zunächst auf Eis aufgetaut und in 750 µL Luziferase-Extraktionspuffer resuspendiert. Nachdem die Zellen für 30 sec auf dem Vortex-Mischer bei maximaler Drehzahl geschüttelt wurden, um die Zellmembranen zu zerstören, wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 13.200 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung, die Bestimmung der Luziferase-Aktivität und die Bestimmung der Glukuronidase-Aktivität verwendet.

#### **2.2.5.1.6 Proteinbestimmung nach Bradford**

(modifiziert nach Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µL des Extraktes mit 200 µL einer 1:5 mit Wasser verdünnten Färbereagenz („Proteinassay-Reagenz“, BioRad) gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption des Protein-Coomassie-Brilliant-Blau-Konjugats bei 595 nm in einem Fluorimeter (Fluostar Optima) ermittelt. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen.

#### **2.2.5.1.7 Bestimmung der Luziferase-Aktivität**

(modifiziert nach Wood, 1991)

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

### 2.2.5.1.8 Bestimmung der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität

(modifiziert nach Jefferson *et al.*, 1986)

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität wurde die Umsetzung von 4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid (4-MUG) in das fluoreszierende Produkt 4-Methyl-Umbelliferon (4-MU) gemessen. Zu 100  $\mu$ L Protoplastenextrakt wurden 100  $\mu$ L 4-MUG-Substratlösung gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. In 20 min Intervallen wurde die Fluoreszenz des 4-MU bei einer Wellenlänge von 455 nm nach Anregung bei 366 nm gemessen (BMG Labtech, Fluostar Optima). Als Standard diente eine 4-MU Eichreihe in GUS-Puffer.

### 2.2.5.1.9 Berechnung von Reporteragenaktivitäten

Jedes Transfektionsexperiment wurde achtmal wiederholt, wobei der höchste und niedrigste Wert jeweils vernachlässigt wurde. Für jede Transfektion wurde der Quotient aus GUS<sub>i</sub>- und LUC<sub>i</sub>-Aktivität sowie der Mittelwert dieser Quotienten (QMW) für die sechs Transfektionsexperimente berechnet. Zur Standardisierung wurde der Mittelwert aller Luziferaseaktivitäten eines experimentellen Blocks bestimmt.

$$QMW = \frac{1}{6} \cdot \sum \frac{GUS_i}{LUC_i}$$

Zur Korrektur variierender Transfektionseffizienzen wurde aus dem Quotienten der mittleren Luziferaseaktivität eines experimentellen Blocks und der Luziferaseaktivität eines einzelnen Transfektionsansatzes LUC<sub>i</sub> ein spezifischer Korrekturfaktor (F<sub>i</sub>) für jede einzelne Transfektion berechnet:

$$F_i = \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum LUC_i}{LUC_i} \quad n = \text{Anzahl der Transfektionen}$$

Der standardisierte, korrigierte GUS-Wert (GUS<sub>ki</sub>) einer Transfektion wurde durch Multiplikation der spezifischen GUS-Aktivität mit dem Korrekturfaktor errechnet:

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

Bei den standardisierten GUS'-Aktivitäten, die in dieser Arbeit angegeben sind, handelt es sich um Mittelwerte der korrigierten, spezifischen GUS<sub>ki</sub>-Werte aus 6x wiederholten Transfektionen mit den gleichen Konstrukten. Die Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Fehler des Mittelwertes.

### 2.2.5.1.10 At7-Transfektion zur Analyse der Fusionsproteine

Die Protoplasten der Zellkultur wurden ebenfalls dazu verwendet, die intrazelluläre Lokalisation und die Bindung von Fusionsproteinen aneinander zu untersuchen. Dazu

wurden je Expressionsplasmid, das für die entsprechenden Proteine kodiert, 10 µg DNA pro 50 µL Ansatz eingesetzt. Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben, jedoch erfolgte keine Ernte der Protoplasten. Es wurden die transfizierten Protoplasten nach der Inkubation über Nacht abgenommen und zur weiteren Analyse am Fluoreszenzmikroskop (2.2.6.1) eingesetzt.

## **2.2.5.2 Tabak BY-2 Zellkultur**

### **2.2.5.2.1 Analyse der Lokalisation von Fusionsproteinen**

Um die Lokalisation von Fusionsproteinen sowie die Interaktion der Transkriptionsfaktoren *in vivo* zu ermitteln, wurden transient eingebrachte Fusionsproteine in BY-2 Tabakprotoplasten überexprimiert. Die PEG (Polyethylenglycol)-vermittelte Transfektion wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Schäfer *et al.* (1991) durchgeführt.

### **2.2.5.2.2 Tabak BY-2 Zellsuspensionskultur**

Die Kultivierung der heterotrophen Tabak BY-2 Zellsuspensionskultur erfolgte nach Merkle *et al.* (1996) in BY-2 Zellkulturmedium bei 26 °C im Dunke In.

### **2.2.5.2.3 Protoplastierung der Tabakzellen**

Für die Protoplastierung wurden 20 mL einer 4 Tage alten, subkultivierten Kultur in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (Hereaus Multifuge 1s, 400 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 25 mL Waschlösung resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) in 13 mL Verdaulösung aufgenommen. In einer Petrischale wurde die Zellsuspension über Nacht im Dunkeln bei 26 °C inkubiert.

### **2.2.5.2.4 Transfektion der BY-2 Protoplasten**

Nach der Inkubation wurden die Protoplasten in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (Hereaus Multifuge 1s, 100 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde bis auf 2 mL entfernt und die Zellen in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden in 25 mL Waschlösung aufgenommen und erneut pelletiert (100 g, 5 min, RT) und in 2 mL Restüberstand resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 mL W5-Lösung und Pelletierung der Zellen (100 g, 5 min, RT) erfolgte eine Resuspendierung der Suspension in 5 mL W5-Lösung mit anschließender Inkubation für 20-30 min im Dunkeln bei 4 °C. Nach der Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet durch schrittweises

Hinzufügen von 10 mL MMM-Lösung resuspendiert und wie oben angegeben wieder zentrifugiert. Etwa 6 mL des Überstandes wurden abgenommen und das Zellpellet in dem restlichen Überstand resuspendiert wodurch eine Protoplastendichte von etwa  $2 \times 10^6/\text{mL}$  erreicht wurde. Als Vorbereitung für die Transfektion wurde 30  $\mu\text{g}$  DNA in Plastikzentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 300  $\mu\text{L}$  Protoplastensuspension gemischt. Nachdem tropfenweise 300  $\mu\text{L}$  PEG zugegeben wurde, wurde der Ansatz durch Invertieren des Röhrchens gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden schrittweise 10 mL W5-Lösung zugegeben und dann zentrifugiert (400 g, 5 min, RT). Das Protoplastenpellet wurde durch schrittweise Zugabe von 700  $\mu\text{L}$  MS + Saccharose resuspendiert und über Nacht in waagerechter Position bei 26 °C in Dunkelheit inkubiert.

#### **2.2.5.2.5 Lokalisation der Fusionsproteine**

Die Analyse der Konstrukte erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop (TCS SP2 AOTF DM-RE 7, Leica, Bensheim). Die Anregung erfolgte mit einem Argonlaser (514 nm) und die Detektion mit einem Photomultiplier (530 nm–560 nm). Verwendet wurden dabei ein 20x und ein 63x Ölimmersionsobjektiv. Die Bilderfassung und die Bearbeitung erfolgte mit der zugehörigen Leica Software. Zusätzlich erfolgte eine weitere Analyse mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie (vgl. 2.2.6.1).

#### **2.2.5.3 BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*)**

BiFC ist eine einfache und relativ schnelle Methode, um Proteininteraktionen und gleichzeitig deren subzelluläre Lokalisation in lebenden (Pflanzen)-Zellen sichtbar zu machen (Hu *et al.*, 2002, Bracha-Drori *et al.*, 2004). Dabei kommt es durch das Zusammenbringen zweier nicht-fluoreszierender YFP-Teilfragmente zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz, wenn zwei Proteine, die mit den jeweiligen YFP-Teilfragmenten fusioniert sind, miteinander interagieren. BiFC besitzt eine hohe Spezifität und die rekonstituierten Chromophorkomplexe haben eine hohe Stabilität (Bracha-Drori *et al.*, 2004).

##### **2.2.5.3.1 Konstruktion der Split-YFP Vektoren und Klonierung der cDNAs**

Die Proteine, die auf ihre Interaktion getestet werden sollten, wurden jeweils mit einem YFP-Teilfragment fusioniert. Dafür wurden die cDNAs über die Restriktionsschnittstellen EcoRI / SacI in die p5'YC2 und p5'YN2 Vektoren kloniert. Der p5'YN2 Vektor enthielt den 530 bp lange N-terminalen Bereich des YFP während der p5'YC2 Vektor den 310 bp langen C-terminalen Bereich des YFP enthielt. Die YFP-Teilfragmente wurden N-terminal

an die cDNAs der zu untersuchenden Proteine fusioniert. Unter dem 35S-Promotor fand in den Zellen eine Überexpression statt. Alle Proteindimere wurden gegenseitig sowohl als YN- als auch als YC-Fusionen getestet. Die Herstellung der BY-2 Protoplasten mit der anschließenden Kotransfektion erfolgte wie in dem Kapitel 2.2.5.2 beschrieben. Pro Konstrukt wurde 20 µg DNA eingesetzt, so dass die Transfektion mit 40 µg DNA stattfinden konnte.

#### **2.2.5.3.2 Analyse der BiFC-Interaktionen**

Die Detektion erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.2.5 beschrieben mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop und wie in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben mit der Weitfeldmikroskopie. Die Anregung durch den Argon-Laser erfolgte bei 514 nm, die Detektion mit dem Photomultiplier im Bereich von 530 nm bis 560 nm.

### **2.2.6 Fluoreszenz-Spektroskopische Methoden**

#### **2.2.6.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Insbesondere die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie macht die Untersuchung der Lokalisation, der Dynamik und der Interaktion von Molekülen in lebenden Zellen (*live cell imaging*) möglich. Neuartige Laser-Scanning-Mikroskope verfügen anstelle eines dichroitischen Spiegels über einen so genannten AOTF (*acousto-optical-beam-filter*) mit dem Vorteil eines größeren Durchgangs von Laserlicht zur Probe und einer größeren Flexibilität bei der Detektion. Dadurch wird eine zeitlich und räumlich hohe Auflösung von morphologischen Details von Zellverbänden in Geweben sowie auf subzellulärer Ebene ermöglicht. Der experimentelle Aufbau spielt eine wichtige Rolle in der Fluoreszenzmikroskopie. Er muss höchsten Anforderungen genügen, um ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu gewährleisten. Dabei ist sowohl die Qualität der optischen Komponenten (Mikroskopobjektiv, dichroitische Strahlteiler und Filter) von entscheidender Bedeutung als auch eine absolut lichtdichte Abschirmung des Detektionsarms und eine spezielle Präparation der Proben.

##### **2.2.6.1.1 Der Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau besteht aus verschiedenen Einzelkomponenten (siehe Abb. 2-3), durch deren Kombination eine Spektroskopieapparatur mit mehreren Anregungslasern entsteht. Der komplette Aufbau befindet sich auf schwingungsisolierten Lasertischen.



**Abbildung 2-3: Versuchsaufbau der konfokalen Spektroskopie** (Kasper, 2004).

Die verwendeten Laser werden nach der Aufweitung auf die Größe der numerischen Apertur des Objektivs, über dichroitische Strahlteiler zusammengeführt. Die Aufweitung gewährleistet eine homogene Ausleuchtung des Objektivs und eine beugungsbegrenzte Abbildung der angeregten Farbstoffmoleküle. Über den hinteren Eingang erfolgt die Einkopplung in das Mikroskop. Über den unteren Mikroskopausgang erfolgt die Auskopplung des Fluoreszenzsignals. Die Auswertung des Signals erfolgt PC-gesteuert über ein in LabVIEW (LabVIEW 6.1; National Instruments, USA) geschriebenes Programm. Als Anregungslichtquelle dient ein herkömmlicher HeNe-Laser bei einer Wellenlänge von 638 nm und einer maximalen Ausgangsleistung von 2 mW.

Benutzt wurde ein Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) mit einer 100-fachen Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,45. Die numerische Apertur gibt das Auflösungsvermögen des Objektivs an. Im Brennpunkt des Objektivs befindet sich ein Raumfilter, ein Pinhole mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$ , durch das das Streulicht vom Fluoreszenzsignal getrennt werden kann. Dadurch wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis signifikant verbessert. Über eine Tubuslinse wird eine 1:1-Abbildung des Anregungsvolumens erreicht. Im Detektionsarm wird das Signal von Störeinflüssen befreit und auf den Detektoren abgebildet. Über einen weiteren dichroitischen Strahlteiler wird das Signal spektral aufgeteilt. Je nach verwendetem Farbstoff erfolgt die Trennung bei 650 oder 680 nm. Dadurch werden die Fluoreszenzsignale etwa in der Mitte der Emissionsspektren spektral getrennt, um so eine hohe spektrale Auflösung zu gewährleisten. Bandpassfilter vor den Detektoren gewährleisten, dass nur das Fluoreszenzlicht des jeweiligen Fluorophors detektiert wird. Für die Detektion der Fluoreszenzsignale werden Avalanche Photodioden (Perkin Elmer Optoelectronics, USA) verwendet.

### 2.2.6.2 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist eine sehr schnelle und dynamische Methode, um Protein-DNA-Wechselwirkungen in Lösung zu analysieren. Bei der FCS-Methode wird Lasertechnologie mit konfokaler Mikroskopie verknüpft. Durch Einführung moderner Mikroskope wurde diese Methode revolutioniert. Es werden Zufallsbewegungen von fluoreszenzmarkierten Molekülen in einem sehr kleinen Volumen (1 Femtoliter), dem Laserfokus, gemessen. Dabei diffundieren einzelne Moleküle aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in der untersuchten Lösung umher. Aus diesen Fluktuationsdaten werden die Diffusionszeiten der Moleküle bestimmt, die mit der Masse der Teilchen korrelieren. Durch Komplexbildung mit einem anderen Molekül verändert sich die Molekülmasse und damit die Diffusionszeit und kann so zur Analyse thermodynamischer oder kinetischer Parameter der Wechselwirkungspartner herangezogen werden. Die zeitliche Auflösung der Methode liegt zwischen einigen Nanosekunden (6,5 ns) bis zu mehreren Sekunden. Für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie war ein fluoreszierender Marker (AlexaFluor<sup>®</sup>488, ATTO655) notwendig, der via PCR an die zu untersuchende DNA gebunden wurde. Die Proteine, die für die Bindungsstudien eingesetzt wurden, wurden nativ in einem *E. coli* Expressionssystem exprimiert und über His-Tag Affinitätschromatographie-Säulen aufgereinigt und später renaturiert (siehe 2.2.4.4).

Die FCS-Experimente wurden an einem von der Abteilung für Laserspektroskopie (Universität Bielefeld) realisierten konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop-Aufbau durchgeführt. Für die Analyse der Promotor-Bindestellen wurden die mit dem fluoreszierenden Marker (ATTO655) markierten DNA-Fragmente auf eine Konzentration von etwa 0,5 nM in PBS-Puffer (pH 7,4) verdünnt, der 0,3 mg/mL BSA und 0,05% Tween20 enthält, um Wechselwirkungen der DNA mit der Oberfläche des Objektträgers zu verhindern. Die Stärke der Anregung wurde an der hinteren Aperturblende auf 250  $\mu$ W angepasst, um mögliche Artefakte wie zum Beispiel Photobleichen oder die Fluoreszenz-Sättigung des Farbstoffes zu vermeiden. Die Messungen fanden in einem Standard-Muldendeckglas mit 100  $\mu$ L Lösung statt, welches mit einem Deckglas abgedeckt wurde. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Korrelationskurve der Fluoreszenzbewegungen von  $N$  frei diffundierenden Molekülen, die mit einer charakteristischen Diffusionszeit  $\tau_D$  durch das Anregungs- und Detektionsvolumen diffundieren, wurde mit einem geeigneten 2-dimensionalen Diffusions-Modell analysiert:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1}.$$

Die charakteristische Diffusionszeit beträgt hier  $\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$  wobei  $\omega_{xy}^2$  den lateralen Radius des Anregungs- und Detektionsvolumens darstellt.  $D$  ist dabei der Diffusionskoeffizient, der durch die Stokes-Einstein Gleichung berechnet wird:  $D = kT / 6\pi\eta R$ , während  $\eta$  die Viskosität des Mediums und  $R$  der hydrodynamische Radius ist. Als eine Annäherung an  $R$  kann ein Molekül mit einem Molekulargewicht  $M_r$  beschrieben werden als ein homogener Bereich mit einer mittleren Dichte  $\rho$ .

$$R = \sqrt[3]{\frac{M_r / N_A}{4\pi\rho}}$$

$R$  ist dafür proportional zu der Kubikwurzel des molekularen Gewichtes.

### 2.2.6.2.1 Verwendete Farbstoffe

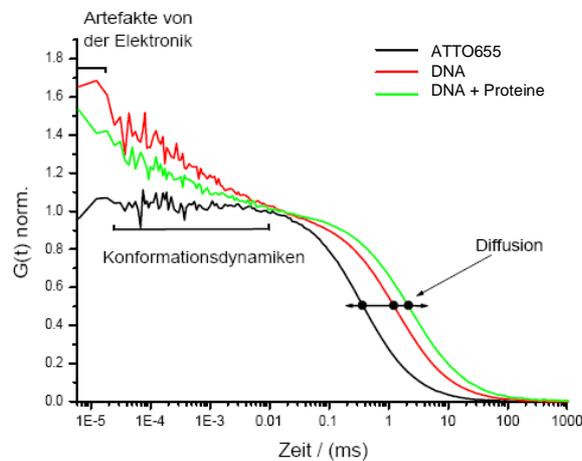
In dieser Arbeit wurde der Farbstoff ATTO655 (ATTO-Tec GmbH, Siegen) der Klasse der Oxazine verwendet. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt laut Herstellerangaben bei 1,9 ns. Das Maximum der Anregungswellenlänge liegt bei 653 nm, während das Maximum der Emissionswellenlänge bei 684 nm liegt. Die Anregung des Farbstoffs erfolgt mit einer Wellenlänge von 633 nm beim HeNe-Laser und mit 635 nm bei der Laserdiode.

### 2.2.6.2.2 Vorbereitung der Proben

Die DNA, die für die Bindungsstudien eingesetzt wurde, musste zuvor mittels PCR amplifiziert und mit dem Farbstoff ATTO655 (ATTO-Tec GmbH, Siegen) verbunden werden. Dazu wurden entsprechend markierte Oligonukleotide von der Firma IBA (GmbH, Göttingen) bezogen. Die modifizierten DNA-Fragmente wurden nach der Amplifikation mittels PCR (2.2.1) mit Hilfe des Amersham GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits aufgereinigt (2.2.2.7) mit anschließender Konzentrationsbestimmung (2.2.2.13). Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden auf eine Konzentration von  $10^{-8}$  M verdünnt. Die Expression der Proteine erfolgte heterolog in *E. coli* BL21(DE3) pLysS (2.2.4.4.1). Die Aufreinigung und Renaturierung erfolgte wie in 2.2.4.4.2 und 2.2.4.4.3 beschrieben. Nach der Renaturierung erfolgte die Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD (2.2.4.1). Die Proteine konnten anschließend für die Bindungsstudien eingesetzt werden. Für Einzelmessungen wurden 100  $\mu$ L Probenlösung, bestehend aus 10  $\mu$ L  $10^{-8}$  M DNA, 1  $\mu$ L etwa  $10^{-5}$  M Proteinen und 89  $\mu$ L PBST-BSA Lösung, auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Für Titrationsmessungen wird die Konzentration der DNA konstant gehalten, während die Konzentration der Proteine kontinuierlich verändert wird. Die Experimente wurden am zuvor beschriebenen konfokalen FCS-Aufbau bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.2.6.2.3 Auswertung der Messdaten

Bei der Auswertung der Messdaten in Form einer Korrelationsanalyse wird die logarithmische Darstellung der Fluktuationen in Abhängigkeit von der Korrelationszeit dargestellt (Abb. 2-4). Befindet sich nur freier Farbstoff in der Lösung, diffundiert dieser mit einer mittleren Diffusionszeit durch das Detektionsvolumen. Ist dieser Farbstoff an eine DNA gebunden, nimmt die Masse und damit auch der hydrodynamische Radius zu, was zu einer Diffusionszeitverlängerung führt. Werden zu dem Probenvolumen ein oder mehrere Proteine gegeben, können diese an die markierte DNA binden. Dieser wesentlich größere Komplex hat eine signifikant längere Diffusionszeit und eine veränderte Konformationsdynamik. Diese Verlängerung der Diffusionszeit kann gemessen werden (Abb. 2-4).



#### Abbildung 2-4: Beispielkurve einer Korrelationsanalyse.

Beispielkurve der Diffusionszeitverlängerung nach Bindung von DNA an den Farbstoff (rote Kurve) bzw. Bindung der Proteine an die markierte DNA (grüne Kurve) (modifiziert nach Peters, 2006).

### 2.2.6.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Diese von Förster 1948 erstmals beschriebene Methode dient dem Nachweis von Bindungen und Interaktionen zwischen Molekülen (Proteinen, Lipiden, Enzymen, DNA, RNA) in lebenden Zellen. Dabei werden fluoreszierende Proteine an die zu untersuchenden Proteine gekoppelt und gemeinsam exprimiert. Es kann so gleichzeitig die Verteilung verschiedener Proteine in der lebenden Zelle beobachtet werden.

Für die Untersuchung von Protein-Protein-DNA-Wechselwirkungen in Protoplasten wurde mit dem At7 und dem BY-2 Zellkulturprotoplastensystem gearbeitet (2.2.5). Die Protoplasten wurden dabei aber nicht geerntet, sondern für weiterführende Mikroskopie-Studien verwendet (2.2.6.1). Für die Analyse der Protein-Protein-DNA-Wechselwirkungen in transgenen Pflanzen wurden die Keimlinge auf Filterpapier mit Norflurazon und 4%

Saccharose unter Langtagbedingungen im Lichtraum angezogen und nach 5-7 Tagen analysiert. Dabei wurden dünne Gewebeschnitte des Hypokotyls, der Wurzel und der Keimblätter mit dem konfokalen Lasermikroskop und mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie untersucht.

#### **2.2.6.3.1 Fluoreszierende Proteine**

Fluoreszenzfarbstoffe liefern ein höchst wirksames Instrument zur Untersuchung von Proteinen in ihrem biologischen Zusammenhang. Bei diesen Protein-Protein-DNA-Interaktionsstudien wurde hauptsächlich mit dem eGFP aus der Curtis und Grossniklaus Gruppe und mit dem mCherry aus dem TsienLab gearbeitet (vgl. 2.1.4). Andere eingesetzte Fluoreszenzproteine waren auch eYFP, mOrange und mRFP.

#### **2.2.6.3.2 *In vivo*-Markierung mit fluoreszierenden Proteinen**

Um die intrazelluläre Lokalisation und Dynamik eines zu untersuchenden Proteins in lebenden Zellen zu registrieren, wurden die zu untersuchenden Gene durch Fusion und anschließende Expression des GFP-Gens fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Vorteil bei chimären Fusionsproteinen ist, dass die Expression in Zellen durch Gentransfer möglich ist und dadurch keine heterologe Produktion, Aufreinigung, *in vitro*-Markierung und Mikroinjektion von rekombinanten Proteinen notwendig ist. Neben GFP wurden in dieser Arbeit ebenfalls Fluoreszenzproteine aus anderen spektralen Bereichen eingesetzt, wie YFP, mCherry, mOrange und mRFP. Für diese Interaktionsstudien wurden die fluoreszierenden Proteine in die binären Vektoren kloniert (vgl. 2.1.4), wodurch Fusionen mit den zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren entstanden. Anschließend wurde der 35S-Promotor der binären Vektoren durch den jeweiligen nativen Promotor des Transkriptionsfaktors ausgetauscht. In den Protoplasten und den transgenen Pflanzen wurden so die Fusionsproteine unter dem nativen Promotor der zu untersuchenden Proteine exprimiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie bzw. mit Weitfeldmikroskopie analysiert (2.2.6.1).

### 3. Ergebnisse

Die Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* ist sowohl räumlich als auch zeitlich während der gesamten pflanzlichen Entwicklung reguliert und wird durch eine Vielzahl von umweltbedingten und endogenen Einflüssen induziert. Ohne das reibungslose und funktionelle Zusammenspiel vieler Proteine ist ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation einer wichtigen Zweigstelle des Anthocyanstoffwechsels näher untersucht. Als Regulatoren des Schlüsselenzyms Dihydroflavonol-Reduktase (DFR) wurden besonders drei Transkriptionsfaktoren in Augenschein genommen, MYB75 sowie BHLH2 und BHLH42 aus der Subgruppe III<sub>f</sub>. Für die Regulation treten diese Transkriptionsfaktoren sowohl miteinander als auch mit dem *DFR*-Promotor in Kontakt. Um diesen Regulationsmechanismus zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Bindung der Transkriptionsfaktoren untereinander sowie an ihre Ziel-DNA mit Hilfe neuer Methoden aus der Physik untersucht und mit Standardmethoden aus der Biologie abgesichert und verglichen. Mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) wurden Bindesequenzen am Ziel-Promotor analysiert. Mit verschiedenen Mikroskopie-Methoden wurde die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren in lebenden Zellen dargestellt. Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren untereinander sowie mit der Ziel-DNA wurde sowohl *in vitro* als auch in pflanzlichen Zellen untersucht. Des Weiteren wurde der Fragestellung nachgegangen, inwiefern die Regulation des *DFR*-Promotors und damit der Anthocyanbiosynthese durch äußere Einflüsse beeinflusst wird.

#### 3.1 Regulation des *DFR*-Promotors durch kombinatorische Interaktion von R2R3-MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren

Es ist bereits aus At7-Kotransfektionsstudien bekannt, dass der *DFR*-Promotor durch die Kombination verschiedener MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann (Zimmermann *et al.*, 2004). Dabei sind in *A. thaliana* Keimlingen wahrscheinlich zwei Transkriptionsfaktor-Komplexe von Bedeutung, MYB75/BHLH42 und MYB75/BHLH2. Mit Hilfe einer neuen Messmethode, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS), sollte die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an dem *DFR*-Promotor nachgewiesen werden. Unterstützt von gängigen molekularbiologischen und biochemischen Methoden wurde der Frage nachgegangen, ob die Proteine einzeln an die Promotor-DNA binden und dann gemeinsam aktivierend wirken, oder ob die Transkriptionsfaktoren zunächst einen Komplex bilden, der dann die Ziel-DNA bindet. Ebenso sollten mit der FCS-Methode die exakten Bindestellen der drei Transkriptionsfaktoren im *DFR*-Promotor identifiziert werden.

### 3.1.1 Die Struktur des *DFR*-Promotors

Ein wichtiges Zielgen für die drei Proteine MYB75, BHLH42 und BHLH2 im Anthocyanbiosyntheseweg ist die *Dihydroflavonol-Reduktase (DFR)*. Die Struktur von anderen Promotoren der Anthocyanbiosynthese wie dem *Chalkonsynthase- (CHS)* oder dem *Banyuls- (BAN)* Gen wurde bereits in der Literatur beschrieben und die darin enthaltenen *cis*-wirkenden Elemente, die die Regulation durch MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren ermöglichen können, sind bekannt (vgl. Einleitung). Anhand von Ergebnissen der PLACE Software (PLACE; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) und Daten aus der Dissertation von M. Heim (2003) wurde die *DFR*-Promotorsequenz auf entsprechende Bindesequenzen untersucht.

Ein verwendetes 520 bp langes *DFR*-Promotorfragment (-473 bis ATG, vgl. Abb. 3-1; im Folgenden als Pro*DFR*<sub>520</sub> bezeichnet) enthält drei putative Bindemotive für bHLH-Faktoren (später als *R Recognition Sequence/RRS* bezeichnet). Zwei dieser putativen Motive werden als G-Box (CACGTG) bezeichnet, wobei es sich um einen speziellen Typus des so genannten E-Box-Motives (CANNTG) handelt. Bei der dritten putativen Bindestelle handelt es sich um ein ACGT-Element (*ACGT-Containing Element/ACE*), welches ebenfalls ein E-Box-Motiv darstellt. An Motive mit dem CACGTG-Konsensus können bHLH-Proteine der Subgruppe III f binden (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Neben den möglichen bHLH-Bindemotiven finden sich ebenso zwei putative MYB-Bindemotive (später als *MYB Recognition Sequence/MRS* bezeichnet) in diesem *DFR*-Promotorfragment. Diese sind weniger einheitlich organisiert. Sie enthalten die Konsensussequenz T/C ACC T/G G, sind in „vorwärts“-Richtung angelegt und liegen in direkter Nähe zu den putativen bHLH-Bindestellen (Abb. 3-1). Eine Häufung der putativen *cis*-wirkenden Elemente findet sich in den 200 Nukleotiden vor dem Startkodon. Insgesamt wurden weitere putative *cis*-wirkende Elemente gefunden, neben weiteren MYB- und bHLH-Bindestellen auch bZIP-Bindestellen oder Motive für WRKY-Transkriptionsfaktoren, die jedoch im Rahmen dieser Analyse nicht weiter betrachtet wurden.

Experimentelle Studien im At7-Kotransfektionssystem haben die Aktivierbarkeit des Pro*DFR*<sub>520</sub> durch die Kombination verschiedener MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren nachgewiesen (Heim, 2003). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass dieses 520 bp *DFR*-Promotorfragment durch die Kombination von MYB75 und BHLH42 bzw. von MYB75 und BHLH2 aktiviert werden kann. Es konnte keine Reporterogenaktivität nachgewiesen werden, wenn kein Effektor oder nur ein MYB bzw. ein bHLH Transkriptionsfaktor als Effektor eingesetzt wurde.

```

TCAAGCTTTTCCAAGATTTATAATTATTTTAGGTGTCTGATTTTGTAGATTTC AATTAAAA -413
TTAAAATATTACTTAAGTAAAATGTATTTCTGTATATATTCTATCAAAAATGTTAATTTGT -352
TTAGACAAAATTTTGATTTATTTTCGTAAAAGTGGGTGGGGAACAAAAACAAAACAAACTG -291
AACTGAAGTCACCCACACGTCTCACCAAACAAAATCGAAGTCAACGTATTTTCACCCACCGG -230
TACAACAACAAAATACACACCTAAGGAAATAATAAATCAACTTACCAGATTGTTACGTA -169
CCACACATCTCTTTAGTCCTTCGTCAACCAACGTTCCCACAGTGCCTTCTCCGGTTGGTAC -108
TCACGTGACCGGCAGCTTCTCGTTCTTATTATCTGTTTTCTTCAATAACGATTTCATAATC -47
TCTAGTGTCTTATTTATAATGTCTTCACATCACAAAGATTTGTACCGAACATACATAGTT +14
GAATCTTTCCCAAAGCACAAATCTATCATATAACCACAAAAATG +57

```

### Abbildung 3-1: Sequenz des verwendeten ProDFR<sub>520</sub> (-473 bp bis ATG).

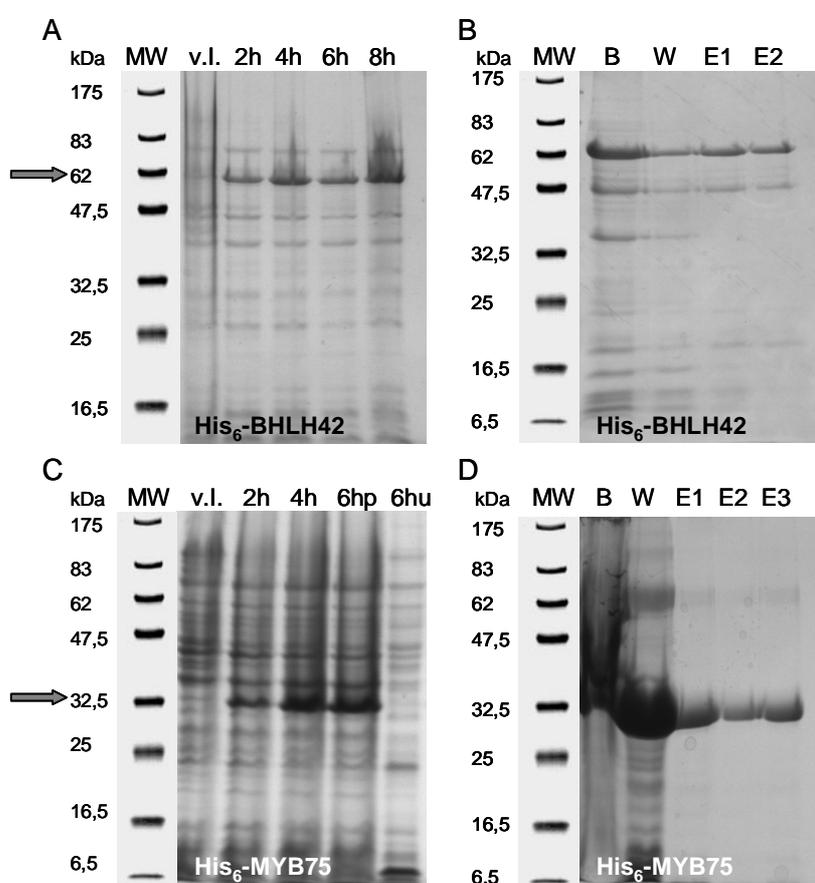
Mittels PLACE-Analyse wurden die putativen *cis*-wirkenden Elemente ermittelt. Grün sind dabei die putativen MYB-Bindestellen und violett sind die putativen bHLH-Bindestellen (E-Box-Elemente). Das blaue „G“ markiert den Transkriptionsstart und das rote „ATG“ den Translationsstart. Die TATA-Box ist hellbraun dargestellt. Die Pfeile zeigen die Leserichtung des Motivs an. Dargestellt ist hier nur der „vorwärts“-Strang. Gelb unterlegt ist der 123 bp Minimalpromotor.

Für die Bindungsstudien an dem *DFR*-Promotor wurde in dieser Arbeit ein doppelsträngiges, 123 bp langes Promotorfragment kloniert, welches die putativen Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren enthielt, und als Minimalpromotor definiert (im Folgenden als ProDFR<sub>123</sub> bezeichnet). Dieses 123 bp lange Promotorfragment (-184 bis -62; Abb. 3-1 gelb unterlegt), welches noch durch die Kombination von MYB75 und BHLH42 im Kotransfektionssystem aktivierbar ist (vgl. Abb. 3-9), wurde sowohl für EMSA als auch für FCS-Analysen eingesetzt, um die Bindung der Transkriptionsfaktoren zu analysieren. Für die Bindungsstudien mit EMSA wurde das Promotorfragment mittels PCR mit modifizierten Biotin-markierten Primern amplifiziert, während das Fragment für die FCS-Analysen mittels PCR mit ATTO655-markierten Primern hergestellt wurde.

### 3.1.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter Transkriptionsfaktoren

Für weiterführende Bindungsstudien der MYB75 und BHLH42 Transkriptionsfaktoren wurden Expressionskonstrukte entworfen, die Derivate des pDEST17-Proteinexpressionsvektors darstellen. Die Konstrukte pDEST17-6xHis:MYB75 und pDEST17-6xHis:BHLH42 enthielten die jeweilige CDS von MYB75 und BHLH42 und

einen N-terminalen Histidinanhang, mit dessen Hilfe sowohl eine affinitätschromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins über Ni-NTA-Säulen, als auch eine Detektion der exprimierten Proteine durch Penta-His HRP (Anti-His-Tag) Antikörper möglich war. Durch den in pDEST17 enthaltenden T7-Promotor konnte die Expression der Proteine durch Zugabe von IPTG induziert werden. Durch die Transformation der Konstrukte in den *E. coli* BL21 pLysS Expressionsstamm wurden die Proteine heterolog exprimiert. Die Analyse erfolgte über eine SDS-PAGE (Abb. 3-2). Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Dabei stieg die Menge des exprimierten Proteins mit der Dauer des Zellwachstums an (Abb. 3-2, A, C).

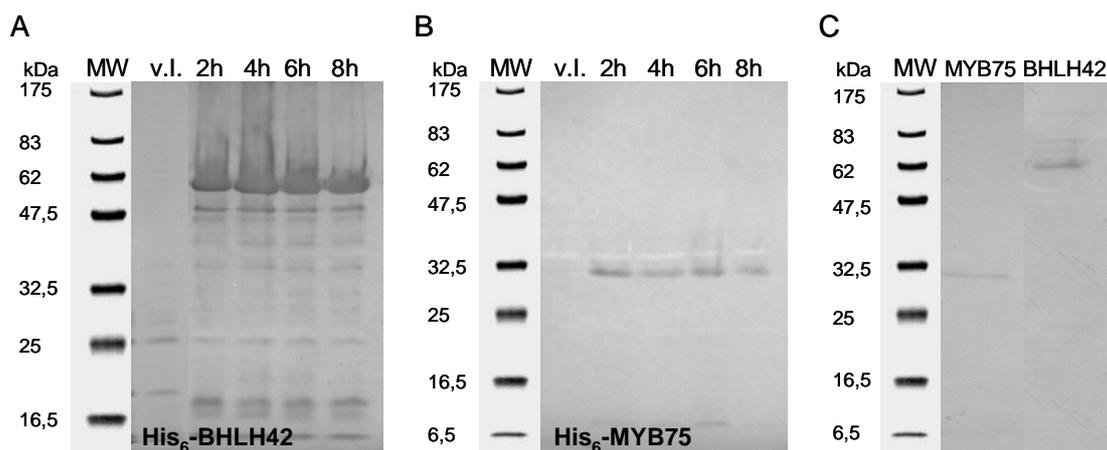


**Abbildung 3-2: Analyse der Expression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>-BHLH42 (A, B) und His<sub>6</sub>-MYB75 (C, D) mittels SDS-PAGE.**

(A) und (C): Die Proteine wurden als 6xHis-Tag Fusionsproteine exprimiert. Die Expression wurde mittels IPTG induziert. Die Proteinextrakte wurden vor und nach der Induktion in regelmäßigen Abständen entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie Blue-Färbung analysiert. Das His<sub>6</sub>-BHLH42-Protein hat etwa eine Größe von 62 kDa (A, Pfeil), während das His<sub>6</sub>-MYB75-Protein etwa 34 kDa groß ist (C, Pfeil). (A) und (C) v.l. = vor Induktion; 2h-8h = Stunden nach der Induktion; p = Pellet-Fraktion; u = Überstand-Fraktion. (B) und (D): Die induzierten Proteine wurden nach 6-8h Expression mittels His-Tag-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörpern aufgereinigt. B = Proteinbindung; W = Waschschritt; E1-E3 = Elutionsschritte. MW = Proteinmolekulargewichtsmarker (*molecular weight*).

Das Molekulargewicht der Proteine konnte aus der Proteinsequenz abgeleitet werden. Für His<sub>6</sub>-MYB75 konnte eine Proteinbande von etwa 34 kDa nachgewiesen werden, während für His<sub>6</sub>-BHLH42 eine Bande in der Größe von etwa 62 kDa gezeigt werden konnte (Abb. 3-2, Pfeile). Die Proteine wurden nach der Expression aus dem Gesamtzellextrakt aufgereinigt. Mittels Polyhistidinanhang konnten die Fusionsproteine über Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) aufgereinigt werden. Nach dem Waschschriff und den Elutionsschritten konnte eine klare Proteinbande in der jeweils richtigen Größe des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3-2, B und D).

Zur Unterstützung der Ergebnisse, dass es sich bei den exprimierten Proteinen tatsächlich um MYB75 und BHLH42 handelte, wurde nach der Analyse mittels SDS-PAGE eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die SDS-PAGE nicht mit Coomassie-Blue gefärbt, sondern auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Mittels Penta-His HRP Antikörper, die eine sehr spezifische und sensible Reaktion mit den Polyhistidinen der Fusionsproteine eingehen, konnten die Fusionsproteine His<sub>6</sub>-MYB75 und His<sub>6</sub>-BHLH42 eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3-3, A und B). Da die Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörpern aufgereinigt wurden, musste anschließend die Funktionalität der Proteine wieder hergestellt werden. Mittels Dialyse wurde die native Konformation der Proteine wieder hergestellt und mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert (Abb. 3-3, C).



**Abbildung 3-3: Analyse der Expression von His<sub>6</sub>-BHLH42 (A) und His<sub>6</sub>-MYB75 (B) mittels Westernblot und der Renaturierung mittels SDS-PAGE (C).**

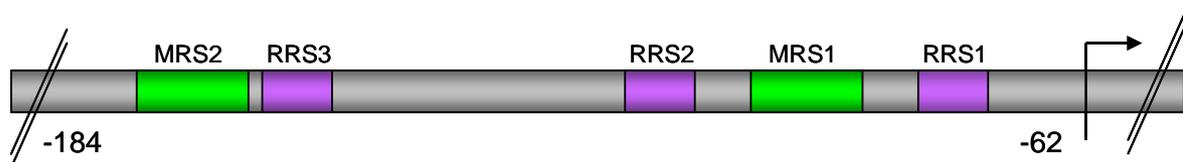
(A) und (B): Nach der Proteinexpression wurden die 6xHis-Tag-Proteine BHLH42 (A) und MYB75 (B) mittels Westernblot-Analyse detektiert. Dabei wurden die Fusionsproteine mittels Penta-His HRP Antikörper auf ihre Expression untersucht; v.l. = vor der Induktion mit IPTG; 2h-8h = Stunden nach der Induktion. (C): Mittels SDS-PAGE erfolgte die Analyse der Proteine nach der Renaturierung. MW = Proteinmolekulargewichtsmarker (*molecular weight*).

Abbildung 3-3 C zeigt für His<sub>6</sub>-MYB75 und His<sub>6</sub>-BHLH42, dass sich noch ausreichend Protein nach der Renaturierung in der Lösung befand und die ursprüngliche Größe noch vorhanden war. Diese heterolog in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Proteine konnten für Bindungsstudien am *DFR*-Promotorfragment eingesetzt werden.

### 3.1.3 Vergleichende Promotoranalyse mit FCS und EMSA

Dass die Proteine MYB75 und BHLH42 das 520 bp lange *DFR*-Promotorfragment gemeinsam aktivieren können, wurde bereits in At7-Kotransfektionsanalysen gezeigt (Zimmermann *et al.*, 2004). Mit dieser sehr aufwendigen Methode, die zudem sehr anfällig für äußere Einflüsse und Tagesbedingungen ist, kann die Aktivierbarkeit bestimmter Promotoren durch verschiedene Effektoren in lebenden Zellen untersucht werden. Eine weitere biologische Methode, die ebenfalls sehr aufwendig ist und zudem noch unter bestimmten Sicherheitsbedingungen stattfinden muss, wenn sie radioaktiv durchgeführt wird, ist *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Beide biologischen Methoden sind effektiv und genau, aber sie haben ebenfalls einige Nachteile, da sie entweder nicht in einer homogenen Phase ablaufen oder nicht schnell in Echtzeit die Bindung detektieren können.

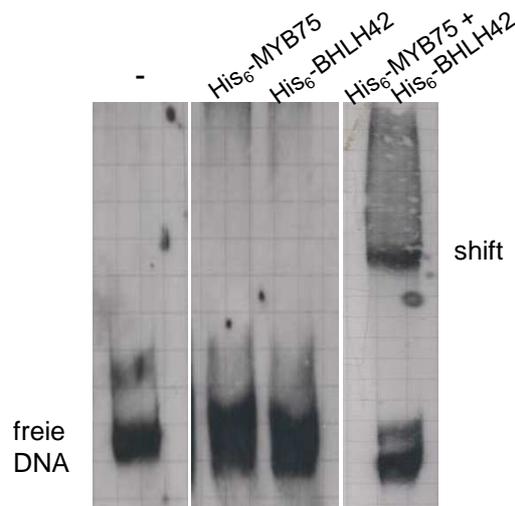
Zunächst sollte mit EMSA die direkte Bindung der MYB75 und BHLH42 Transkriptionsfaktoren an Pro*DFR*<sub>123</sub> untersucht werden, welches die putativen Bindemotive enthält (Abb. 3-1; 3-4). Zudem sollte überprüft werden, ob die isolierten rekombinanten Proteine ihre Funktionsfähigkeit in Bezug auf die DNA-Bindung nach der Aufreinigung und Renaturierung beibehalten haben. Dazu wurde der Pro*DFR*<sub>123</sub> mit Biotin-markierten Primern in einer PCR amplifiziert. Die in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Proteine wurden mit dem Biotin-markierten Pro*DFR*<sub>123</sub> inkubiert und auf einem Agarose/Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel geblottet, um das Laufverhalten der markierten DNA zu analysieren.



**Abbildung 3-4: *DFR*-Minimalpromotor (Pro*DFR*<sub>123</sub>).**

Für die Bindestudien wurde ein 123 bp langer *DFR*-Minimalpromotor kloniert, der die putativen Bindesequenzen der Transkriptionsfaktoren enthält. Die grünen Boxen markieren dabei die putativen MYB-Bindemotive (MRS) und die violetten Boxen markieren die putativen bHLH-Bindemotive (RRS) auf dem Pro*DFR*<sub>123</sub>. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart.

Abbildung 3-5 zeigt, dass die Proteine His<sub>6</sub>-MYB75 und His<sub>6</sub>-BHLH42 einzeln keinen Komplex mit dem Promotorfragment eingingen. Wurden beide Proteine gemeinsam mit dem DNA-Fragment inkubiert und auf das Gel aufgetragen, entstand ein Komplex zwischen den Proteinen und dem markierten Promotor-Fragment, wodurch die DNA langsamer durch das Gel diffundierte. Dieser so genannte *shift* zeigte eindeutig die Bindung der beiden Proteine MYB75 und BHLH42 an das markierte ProDFR<sub>123</sub>. In der Kontrolle ohne Proteine war nur das Promotorfragment zu sehen (freie DNA). Die beiden 6xHis-markierten Proteine MYB75 und BHLH42 konnten folglich nur gemeinsam an ProDFR<sub>123</sub> binden.



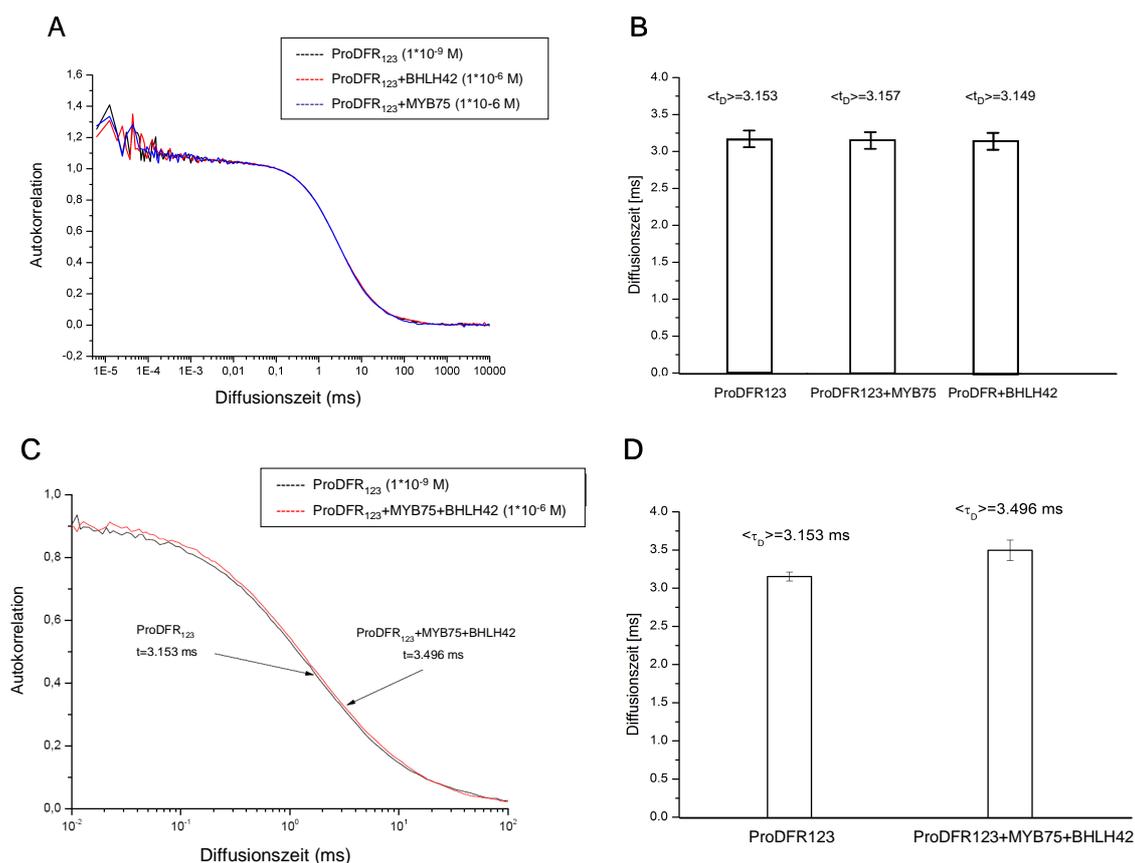
**Abbildung 3-5: EMSA mit rekombinanten Proteinen und Analyse ihrer Bindung an ProDFR<sub>123</sub>.**

Bindungsreaktion des *DFR*-Promotors ohne Zugabe von Proteinen (-) bzw. mit einzelnen und mit beiden Proteinen gemeinsam. Das markierte ProDFR<sub>123</sub> ohne Komplexbildung (= freie DNA). Protein-DNA-Komplex zwischen dem ProDFR<sub>123</sub> und den rekombinanten His<sub>6</sub>-MYB75 und His<sub>6</sub>-BHLH42 Proteinen (= *shift*).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) als innovative und schnelle Methode für Protein-DNA-Bindungsstudien etabliert werden. Die FCS-Messung ist von Vorteil, da sie in einem „offenen System“ stattfindet, das Detektionsvolumen also einen Teil des Gesamtvolumens darstellt. Die Messungen erfolgten zudem in Echtzeit und dauerten daher nur wenige Sekunden bis einige Minuten. Da die Messungen in einer homogenen Phase stattfinden, wurden die physiologischen Gegebenheiten der pflanzlichen Zelle nachgestellt. Mit einer geringen Probenmenge konnten so vielfältige Informationen gesammelt werden, die direkt verfolgt und bewertet werden konnten. Daher wurde diese schnelle und robuste Technik aus der Physik auf ihre Zuverlässigkeit und experimentelle Handhabung im Umgang mit pflanzlichen Proteinen getestet und anschließend mit Ergebnissen aus den Kotransfektionsstudien verglichen.

Mit dem Vergleich zu biologischen Standardmethoden sollte die Effektivität dieser neuen Methode untersucht werden.

Mit FCS wurde ebenfalls die Bindung der Transkriptionsfaktoren, die aus dem *E. coli* Expressionssystem aufgereinigt wurden, an das *ProDFR*<sub>123</sub> untersucht (Abb. 3-6). Das Promotorfragment wurde mittels PCR amplifiziert und dabei mit dem Farbstoff ATTO655 markiert. In je drei unabhängigen Experimenten wurden 15 Messreihen für jedes Konstrukt durchgeführt. Vorab wurde die Diffusion des markierten DNA-Fragments ohne Zugabe von Proteinen gemessen. Im Vergleich dazu wurden die verschiedenen Inkubationsansätze mit je einem und beiden Proteinen vermessen. Nachdem die Proteine zusammen mit der markierten DNA einige Minuten inkubiert wurden, konnte die Diffusion der markierten DNA analysiert werden. Die untersuchte Lösung war dabei so gering konzentriert, dass annähernd Einzelmoleküle gemessen werden konnten, die durch den Laserfokus diffundierten.



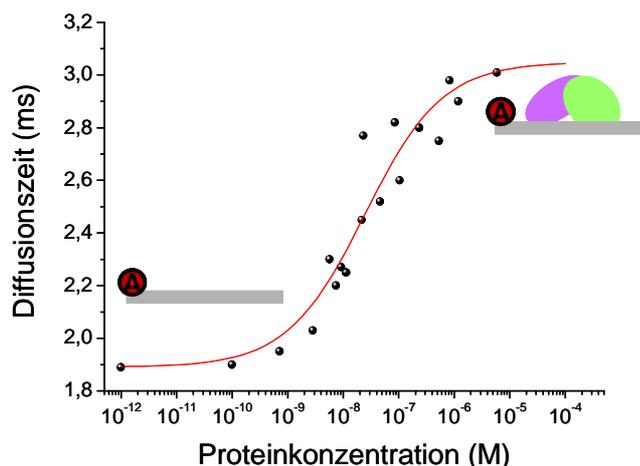
### Abbildung 3-6: FCS mit rekombinanten Proteinen und die Analyse ihrer Bindung an *ProDFR*<sub>123</sub>.

Die Diffusionszeit des markierten DNA-Fragments ändert sich, wenn beide Proteine gemeinsam an das Fragment binden. (A, C): Die Autokorrelationskurve zeigt eine Verschiebung der Diffusionszeit gegenüber dem ungebundenen DNA-Fragment, wenn beide Transkriptionsfaktoren gemeinsam zugegeben werden. (B, D): Die Verschiebung der Diffusionszeit ist dann mit 0,343 ms signifikant unterschiedlich, wenn beide Proteine gemeinsam an *ProDFR*<sub>123</sub> binden.

Der Ansatz mit der markierten DNA und jeweils einem der beiden Proteine zeigte keine Verschiebung der Diffusion im Vergleich zu der Diffusion des markierten DNA-Fragments allein (Abb. 3-6, A und B). Wurden beide Proteine gemeinsam mit der markierten DNA zusammen inkubiert und anschließend gemessen, konnte eine Verschiebung der Diffusion um 0,343 ms gemessen werden (Abbildung 3-6, C und D). Dies kann als klarer Hinweis auf eine Komplexbildung gewertet werden.

Diese, im Vergleich zum EMSA, wesentlich schnellere und effektive Methode, zeigte ebenfalls die Bindung beider Proteine an das kurze Promotorfragment. Das gleiche Ergebnis wurde für die Kombination MYB75 und BHLH2 gefunden. Nur beide Proteine gemeinsam konnten eine Bindung mit dem *DFR*-Promotorfragment eingehen (Daten siehe Anhang, 7.3).

Ein wichtiger Bestandteil für die FCS-Messungen ist die Bestimmung der Bindungskonstanten des MYB75-BHLH42 Komplexes mit der *DFR*-Promotor DNA. Beide Proteine zusammen beeinflussen die Diffusion des Promotorfragments, was durch die Änderung der Diffusionszeit verfolgt wurde. Da diese Änderung von der Proteinkonzentration abhängig ist, konnte aus der Titrationskurve der Diffusionszeit gegen die Proteinkonzentration die Assoziationskonstante  $K_A$  bestimmt werden (Abb. 3-7). Zunächst wurde das Alexa488-markierte *ProDFR*<sub>123</sub> allein vermessen. Danach wurden verschiedene Proteinkonzentrationen zu der DNA gegeben und ebenfalls vermessen. Beide Proteine wurden jeweils in gleichen Konzentrationen eingesetzt.



**Abbildung 3-7: Titrationskurve zur Bestimmung der Bindung von MYB75 und BHLH42 an *ProDFR*<sub>123</sub>.**

Die rekombinanten Proteine (dargestellt in violett und grün) wurden zur Bestimmung der Bindungskonstanten an *ProDFR*<sub>123</sub> (dargestellt in grau, mit Alexa488 markiert) in jeweils gleichen Konzentrationen eingesetzt. Dabei wird die Diffusionszeit der DNA (ms) gegen die Proteinkonzentration (M) gestellt. Aus der Titrationskurve kann im Wendepunkt die Assoziationskonstante  $K_A = 4,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden.

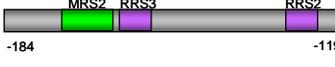
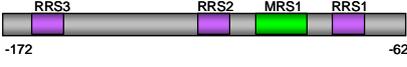
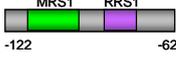
Zu jeder Proteinkonzentration konnte eine spezifische Diffusionszeit gemessen werden. Die Assoziationskonstante konnte mit  $K_A = 4,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Proteine aus *E. coli* Einschlusskörpern aufgereinigt und anschließend renaturiert wurden, so dass die gemessene  $K_A$  einen unteren Grenzwert darstellt, da der Prozentsatz an funktionalem Protein unbekannt ist.

Da mit der schnellen FCS-Methode eindeutig Diffusionszeitverschiebungen gemessen werden konnten, wenn beide Proteine zu der markierten DNA gegeben wurden, konnte diese Methode für weiterführende Bindungsstudien des MYB75-BHLH42 Komplexes mit der *DFR*-Promotor DNA eingesetzt werden. Hierbei wurde die Bindefähigkeit von verschiedenen verkürzten, als auch durch Mutationen veränderten Promotorfragmenten untersucht.

### 3.1.3.1 Identifizierung der Promotorbindestellen anhand einer Deletionsreihe

Aufgrund der Ergebnisse, dass beide Transkriptionsfaktoren gemeinsam an das Promotorfragment binden, sollte die Bindesequenz der Proteine am Promotor näher eingegrenzt werden. In dem *ProDFR*<sub>123</sub> sind drei putative Bindemotive für BHLH42 und zwei putative Bindemotive für MYB75 enthalten (siehe Abb. 3-4). Um die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wurden verkürzte Promotorfragmente hergestellt. Dabei wurden mittels PCR mit ATTO655-markierte verkürzte *DFR*-Promotorfragmente amplifiziert, denen jeweils eine putative Bindesequenz fehlt (Abb. 3-8). Die Proteine wurden für die FCS-Analysen, wie oben beschrieben, exprimiert und aus Einschlusskörpern aufgereinigt. Ein verkürztes Promotorfragment wurde jeweils mit einem und mit beiden Proteinen gemeinsam inkubiert. Für die FCS-Untersuchungen wurde zunächst jedes verkürzte und markierte Promotorfragment einzeln auf dessen eigene Diffusionszeit vermessen. Danach wurde die Diffusionszeit von jedem verkürzten Promotorfragment mit jeweils einem der beiden Proteine gemessen. Aus diesen Untersuchungen ergab sich, dass keines der verkürzten *DFR*-Fragmente, die nur mit einem der beiden Transkriptionsfaktoren inkubiert wurden, eine verlängerte Diffusionszeit aufwies (Abb. 3-8). Wurden die verkürzten Promotorfragmente mit beiden Transkriptionsfaktoren gemeinsam inkubiert und anschließend untersucht, konnte bei einem Teil der DNA-Fragmente eine Diffusionszeitverschiebung festgestellt werden (Abb. 3-8, grüne Schrift). Als Positivkontrolle diente dabei *ProDFR*<sub>123</sub>. Als Negativkontrolle diente ein DNA-Fragment aus einer Nicht-kodierenden Region des Vektors. Hier wurde keine Bindung der Proteine festgestellt. Ist das erste putative Bindemotiv für den BHLH42 Transkriptionsfaktor (RRS1) deletiert, konnte keine Verschiebung der Diffusionszeit festgestellt werden (Abb. 3-8). Das gleiche Ergebnis fand sich, wenn zusätzlich noch das

erste putative Bindemotiv für MYB75 fehlte (MRS1). Fehlte hingegen das RRS2, das RRS3 oder das MRS2, so konnte trotzdem eine Bindung der Proteine an das verkürzte Promotorfragment detektiert werden (Abb. 3-8).

| <i>DFR</i> -Promotor-Elemente   | -             | MYB75         | BHLH42        | MYB75+BHLH42  |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
|  | 12,965 ±0,294 | 12,986 ±0,054 | 12,972 ±0,032 | 14,532 ±0,186 |
|  | 3,349 ±0,034  | 3,352 ±0,008  | 3,325 ±0,006  | 3,335 ±0,138  |
|  | 3,152 ±0,034  | 3,171 ±0,006  | 3,170 ±0,014  | 3,206 ±0,058  |
|  | 4,195 ±0,021  | 4,192 ±0,006  | 4,214 ±0,032  | 4,647 ±0,181  |
|  | 3,733 ±0,027  | 3,730 ±0,011  | 3,734 ±0,007  | 3,822 ±0,059  |
|  | 3,136 ±0,025  | 3,142 ±0,012  | 3,140 ±0,008  | 3,452 ±0,077  |

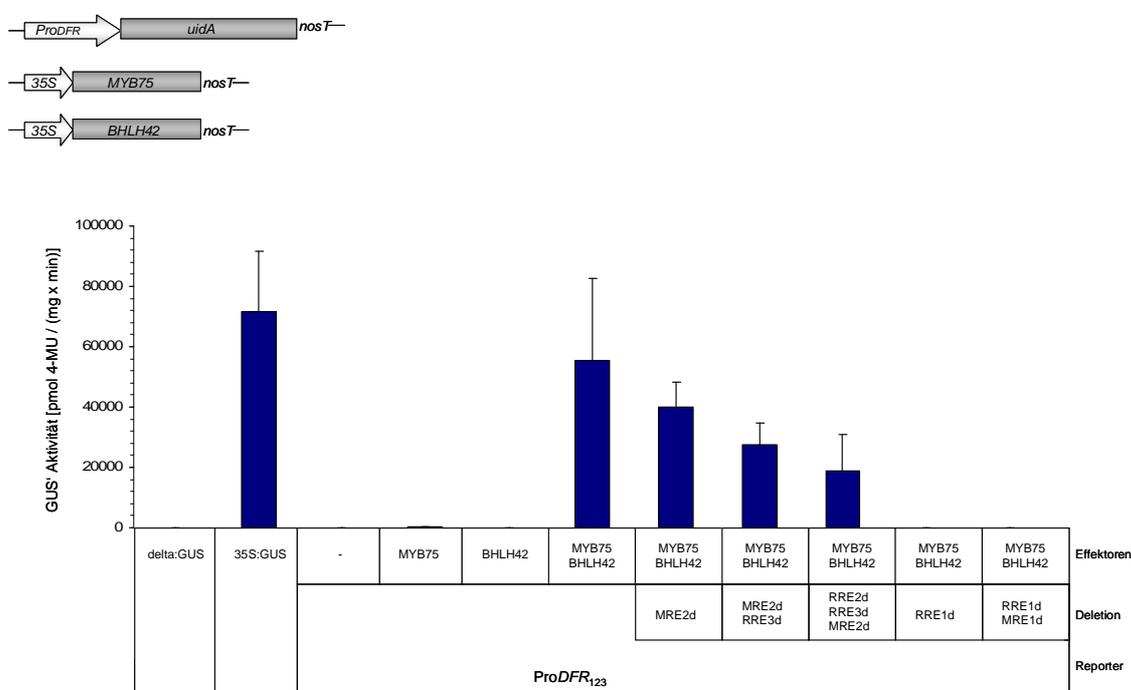
#### Abbildung 3-8: Analyse der Deletionsserie des Pro*DFR*<sub>123</sub> mittels FCS-Studien.

Jedes verkürzte Promotorfragment wurde mittels PCR amplifiziert, mit dem Farbstoff ATTO655 markiert und für die Bindestudien mit FCS eingesetzt. Die grünen Boxen markieren dabei die MRS und die violetten Boxen markieren die RRS auf den Promotor-Elementen. In der Tabelle sind die jeweiligen Diffusionszeiten der Fragmente angegeben, wenn sie ohne Proteine (-), mit einem der beiden Proteine (MYB75 bzw. BHLH42) oder mit beiden Proteinen gemeinsam (MYB75+BHLH42) inkubiert und anschließend vermessen wurden. Die grüne Schrift markiert Diffusionszeitverschiebung. Als Positivkontrolle diente der Pro*DFR*<sub>123</sub>.

Die Ergebnisse zeigen, dass es eine Verschiebung der Diffusionszeit gab, wenn in dem Promotorfragment das MRS1 und das RRS1 noch enthalten waren. War eines der beiden Elemente durch Deletion des Promotorfragments nicht mehr enthalten, konnte keine Verschiebung der Diffusionszeit festgestellt werden. Die gleichen Ergebnisse konnten für die Kombination MYB75 und BHLH2 gezeigt werden (Daten siehe Anhang, 7.3).

Unterstützende Ergebnisse zu dieser Analyse lieferten transiente Expressionsstudien in At7-Protoplasten. Dabei wurden die gleichen verkürzten Promotorfragmente wie in den FCS-Studien eingesetzt und auf ihre Aktivierbarkeit durch MYB75 und BHLH42 getestet. Durch das Erstellen von Promotor/Reporter-Konstrukten können hier in einem vereinfachten System die *in vivo* Funktionen von möglichen koregulatorischen Transkriptionsfaktorkomplexen mittels transientscher Expressionsanalysen effektiv getestet werden. Dazu wurden die verkürzten DNA-Fragmente jeweils mit dem *uidA*-Gen fusioniert (Reporterkonstrukte). Als Effektorstrukturen wurde die CDS von MYB75 und BHLH42 unter der Kontrolle des 35S-Promotors verwendet (Abb. 3-9). Als Positivkontrolle diente

ein 35S::GUS Konstrukt (35S-GUS), während die Negativkontrolle eine TATA-Box (delta::GUS) darstellte. In sechs unabhängigen Transfektionsexperimenten war eine signifikante Aktivierung von Pro*DFR*<sub>123</sub> durch beide Proteine MYB75 und BHLH42 gemeinsam zu beobachten (Abb. 3-9). Wurde als Effektor nur jeweils eines der beiden Proteine eingesetzt, erfolgte keine Aktivierung des Minimalpromotors. Bei den eingesetzten verkürzten Promotorfragmenten war zu beobachten, dass es eine leicht verminderte Aktivierbarkeit gab, sobald eines der putativen Bindemotive fehlte. Eine signifikante Verminderung der Aktivität der *DFR*-Promotorfragmente konnte beobachtet werden, wenn die erste putative MRS (MRS1d (=deletiert)) bzw. die erste putative RRS (RRS1d) im Promotorfragment fehlte. Diese verkürzten Promotorfragmente zeigten keine Aktivierbarkeit mehr durch die beiden Transkriptionsfaktoren (Abb. 3-9).



**Abbildung 3-9: Analyse der Bindung von MYB75 und BHLH42 an Deletionsfragmente des *DFR*-Promotors mittels Protoplasten-Kotransfektionsexperimenten.**

Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials der Proteine in At7-Protoplasten. Schematische Darstellung der Effektor- und der Reporter-Konstrukte. Verschiedene Deletionsfragmente des Pro*DFR*<sub>123</sub> (siehe Abbildung 3-8) wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch MYB75 und BHLH42 als Effektoren getestet. Die Negativkontrolle stellte ein delta::GUS-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein 35S::GUS-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luciferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

Die Kotransfektionsergebnisse bestätigten die Ergebnisse aus den FCS-Untersuchungen. Auch in At7-Protoplasten konnte die Aktivierbarkeit des Pro*DFR*<sub>123</sub> durch die beiden Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Fehlte allerdings das MRS1 bzw. das RRS1, so verminderte sich die Aktivierbarkeit des Promotors signifikant.

### 3.1.3.2 Identifizierung der Bindeelemente anhand einer Mutationsreihe

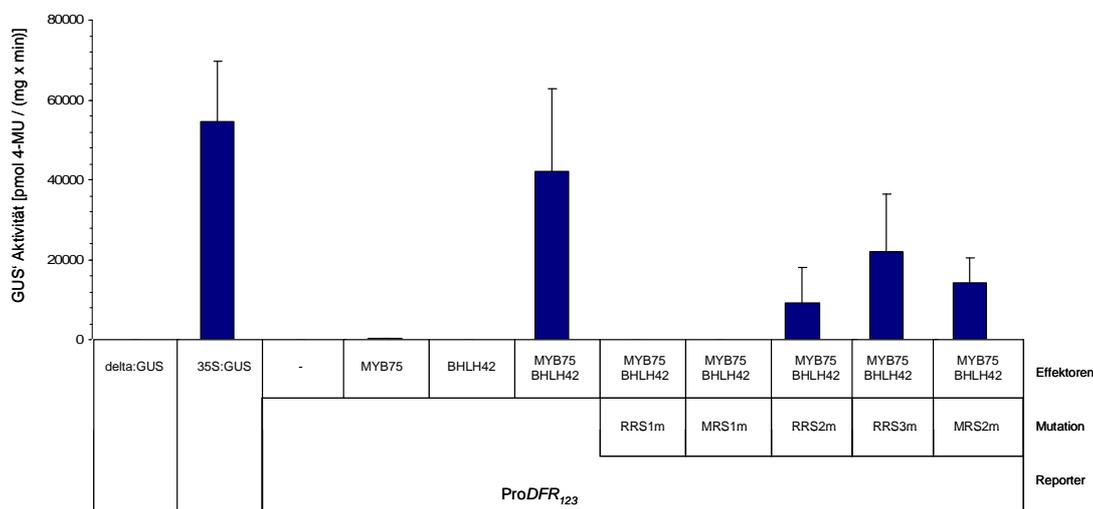
Aufgrund der Ergebnisse, dass das Promotorfragment nicht mehr aktivierbar war, bzw. die Diffusionszeit sich nicht mehr verschob, wenn die putativen Bindemotive MRS1 oder RRS1 fehlten, wurde eine Mutationsreihe des Pro $DFR_{123}$  untersucht. Mittels modifizierter Oligodesoxynukleotide wurden mit PCR jeweils durch *site directed mutagenesis* Blockmutationen in die putativen Bindesequenzen eingefügt. Nach erneuter PCR mit ATTO655-markierten Primern wurden die Fragmente amplifiziert und in FCS-Analysen untersucht (Abb. 3-10). Diese Promotorfragmente, in denen jeweils ein putatives Bindemotiv mutiert war, wurden mit einem bzw. mit beiden Proteinen gleichzeitig inkubiert. Als Referenz wurden die Diffusionszeiten dieser Promotorfragmente jeweils ohne Proteinzugabe gemessen. Keines der Fragmente zeigte eine Diffusionszeitverschiebung, wenn nur eines der beiden Proteine zugegeben wurde. Keine Verschiebung der Diffusionszeit war gegeben, wenn eine Blockmutation im MRS1 oder im RRS1 eingefügt war (Abb. 3-10). Die Fragmente, die eine Blockmutation in einem der anderen putativen Bindemotive hatten, zeigten eine deutliche Verschiebung der Diffusionszeit, wenn beide Proteine zugegeben wurden (Abb. 3-10, grüne Schrift).

| modifizierte $DFR$ -Promotor-Elemente | -            | MYB75+<br>BHLH42    |
|---------------------------------------|--------------|---------------------|
|                                       | 3,772 ±0,012 | 3,792 ±0,026        |
|                                       | 3,756 ±0,012 | <b>3,876 ±0,011</b> |
|                                       | 3,854 ±0,041 | 3,872 ±0,052        |
|                                       | 3,818 ±0,037 | <b>3,936 ±0,013</b> |
|                                       | 3,834 ±0,042 | <b>3,952 ±0,061</b> |

**Abbildung 3-10: Analyse der Mutationserie des Pro $DFR_{123}$  mittels FCS-Studien.**

Jedes mutierte Promotorfragment wurde mittels PCR und modifizierter Primer amplifiziert, mit dem Farbstoff ATTO655 markiert und für die Bindestudien mit FCS eingesetzt. Die grünen Boxen markieren dabei die MRS und die violetten Boxen markieren die RRS. Zu jeder putativen Bindedomäne ist die ursprüngliche Sequenz (grün bzw. violett) angegeben sowie die Sequenz nach der Blockmutation (rot). Die Werte geben die jeweiligen Diffusionszeiten der Fragmente ohne (-) bzw. mit beiden Proteinen (MYB75+BHLH42) an. Die grüne Schriftfarbe markiert eine positive Diffusionszeitverschiebung.

Um diese Ergebnisse in transienten Kotransfektionsstudien bestätigen zu können, wurden diese mutierten Fragmente im At7-Zellkultursystem auf ihre Aktivierbarkeit untersucht. Die Promotorfragmente waren in pBT10-GUS mit dem *uidA*-Gen fusioniert. Als Effektorstrukturen wurden die Proteine MYB75 und BHLH42 verwendet (vgl. Abb. 3-9). Die Kontrollen waren wie in 3.1.3.1 beschrieben. In sechs unabhängigen Transfektionsexperimenten war bei den modifizierten *ProDFR*<sub>123</sub> zu beobachten, dass es eine verminderte Aktivierbarkeit gab, sobald eine Mutation in einem der putativen Bindemotive vorlag. Eine signifikante Verminderung der Aktivität des *DFR*-Promotors konnte beobachtet werden, wenn das MRS1 (MRS1m (=mutiert)) bzw. das RRS1 (RRS1m) durch eine Blockmutation verändert worden war. Diese mutierten Minimalpromotoren zeigten keine Aktivierung mehr durch die beiden Transkriptionsfaktoren (Abb. 3-11).



**Abbildung 3-11: Analyse der Bindung von MYB75 und BHLH42 an modifizierte *ProDFR*<sub>123</sub> mittels Protoplasten-Kotransfektionsexperimenten.**

Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials der Proteine in At7-Protoplasten. Verschiedene modifizierte *ProDFR*<sub>123</sub> (siehe Abbildung 3-10) wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch MYB75 und BHLH42 als Effektoren getestet. Die Negativkontrolle stellt ein delta::GUS-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein 35S::GUS-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luziferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

Sowohl die FCS-Analysen als auch die At7-Kotransfektionsexperimente der Deletionsreihe und der Mutationsreihe des *DFR*-Promotors wurden ebenfalls mit der Kombination MYB75 und BHLH2 durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass BHLH2 zusammen mit MYB75 den Promotor binden und aktivieren kann und an die gleiche Sequenz im Promotor bindet wie BHLH42 (Daten siehe Anhang, 7.3).

## 3.2 R2R3-MYB und bHLH Fusionsproteine komplementieren homozygote Transkriptionsfaktor *knock-out* Pflanzen

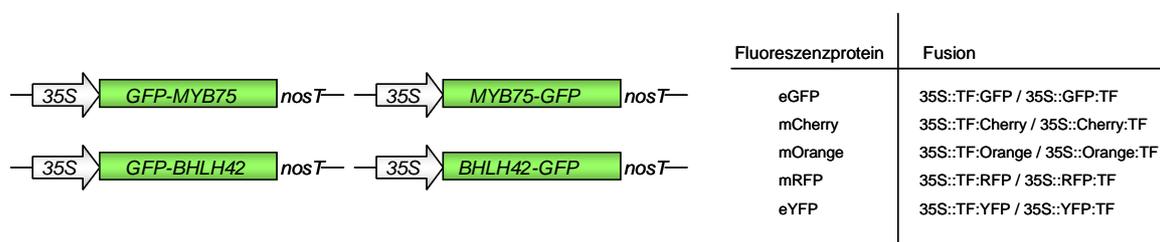
Der Transkriptionsfaktor BHLH42 wird während der Samenentwicklung und in jungen Keimlingen exprimiert. Dies legt eine gewebs- und entwicklungsspezifische Regulation der beiden Flavonoidbiosynthesegene *DFR* und *BAN* nahe, deren Expression in der *bhlh42* Mutante deutlich reduziert ist (Nesi *et al.*, 2000). *Bhlh42 knock-out* Pflanzen zeigen mit gelben Samen einen leicht detektierbaren Phänotyp. Die Proteine BHLH2 und MYB75 haben eine wichtige Funktion in der Regulation der Biosynthese von Anthocyanen. Durch Überexpression von MYB75 kommt es in *A. thaliana* Pflanzen zu einer Erhöhung der Transkriptmenge mehrerer Strukturgene des Phenylpropanoidbiosyntheseweges wie *PAL*, *CHS* und *DFR*. Das führt zu einer erhöhten Akkumulation von Anthocyanen. Die Pflanzen zeigen dabei eine deutlich rötlich-violette Färbung (Borevitz *et al.*, 2000). Als Reaktion auf Saccharose zeigen *bhlh2* und *myb75 knock-out* Pflanzen eine stark reduzierte Anthocyanakkumulation.

Hier wurden Fusionsproteine von den Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen generiert, um die *knock-out* Linien von *MYB75*, *BHLH2* und *BHLH42* zu komplementieren und damit den charakteristischen Mutanten-Phänotyp aufzuheben. In diesen komplementierten *knock-out* Mutanten sollte die Lokalisation der Fusionsproteine und deren Interaktion mit Hilfe verschiedener Mikroskopie-Techniken untersucht werden.

### 3.2.1 R2R3-MYB und bHLH Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen sind in Protoplasten funktionsfähig

Da die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren sowohl in Protoplasten als auch in Pflanzen untersucht werden sollte, mussten sie genetisch mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert werden. Es war aber nicht klar, ob diese Fluoreszenzproteine, die etwa die gleiche Größe aufweisen wie die Transkriptionsfaktoren, als Fusion die Aktivität der Transkriptionsfaktoren negativ beeinflussen würden. Daher wurden diese generierten Fusionsproteine zunächst in At7-Kotransfektionsexperimenten auf ihre Funktionalität getestet. Dazu wurde die CDS der Transkriptionsfaktoren mittels Gateway-Rekombination (vgl. 2.2.2.9) in die Vektoren pMDC43 und pMDC83 (Curtis *et al.*, 2003) kloniert. Dadurch ergab sich entweder eine N-terminale (pMDC43) oder eine C-terminale (pMDC83) Fusion mit dem in dem Vektor vorhandenen GFP-ORF (Abb. 3-12). Die Konstrukte wurden unter der Kontrolle des *cauliflower mosaic virus* (*CaMV*) 35S-Promotors exprimiert. Um später in Protoplasten und in Pflanzen mehrere Proteine gleichzeitig lokalisieren zu können,

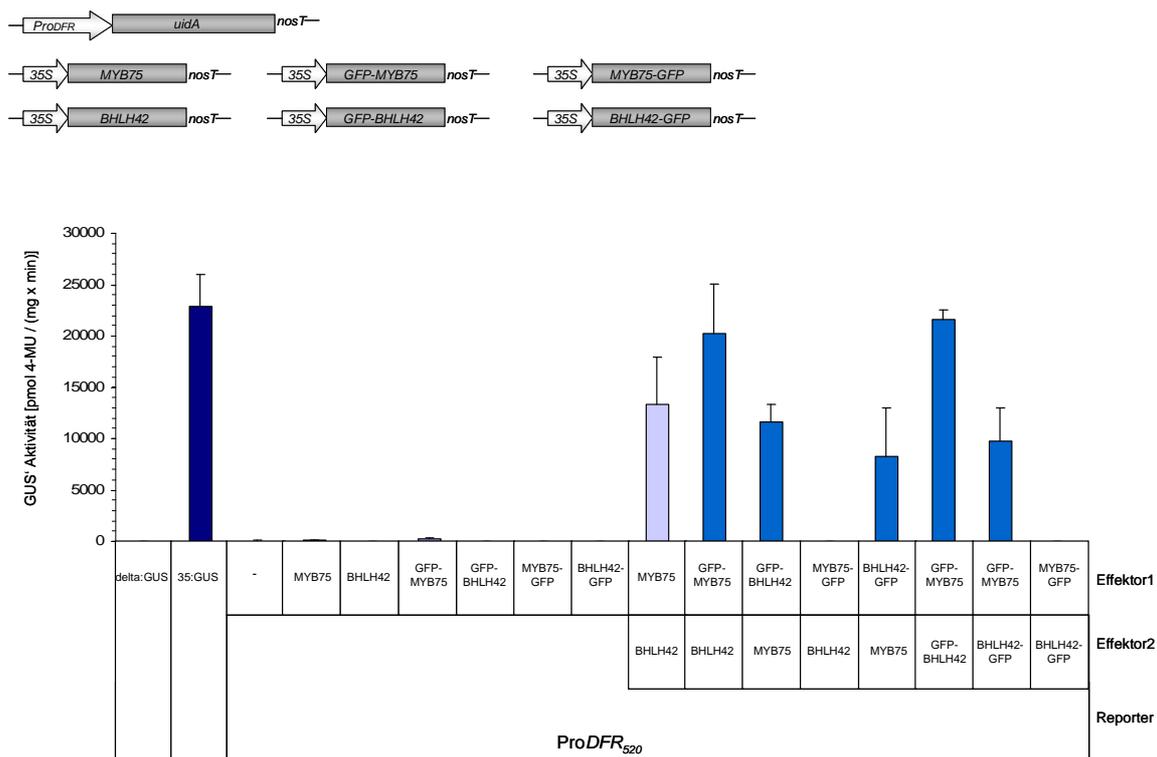
wurden verschiedene Fluoreszenzproteine benötigt, die mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden können. Neben eGFP gibt es eine Reihe neuartiger Fluoreszenzproteine, die für Untersuchungen in Pflanzen geeignet sind. Proteine, die im roten Bereich fluoreszieren, sind etwa mCherry, mOrange oder mRFP. Das Fluoreszenzprotein eYFP dagegen fluoresziert im gelben Spektralbereich. Um den ganzen Spektralbereich nutzen zu können, wurde das GFP-ORF in den Vektoren durch jede kodierende Sequenz der anderen Fluoreszenzproteine ausgetauscht. So entstanden sowohl N-terminale als auch C-terminale Fusionskonstrukte der Transkriptionsfaktoren mit den verschiedenen Fluoreszenzproteinen, die unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert werden (Abb. 3-12).



#### Abbildung 3-12: Generierung der Fusionsproteine.

Die CDS der Transkriptionsfaktoren wurde in die Vektoren pMDC43 und pMDC83 mittels Gateway-Rekombination an ein GFP-ORF fusioniert. Zusätzlich wurde das GFP-ORF durch andere kodierende Sequenzen von fluoreszierenden Proteinen wie mCherry, mOrange, mRFP und eYFP ersetzt. Es entstanden sowohl N-terminale als auch C-terminale Fusionskonstrukte, die unter der Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors exprimiert werden. TF=Transkriptionsfaktor.

Diese verschiedenen Fusionsproteine wurden im At7-Zellsuspensionskultursystem auf ihre Funktionalität getestet. Als Reporter wurde *ProDFR*<sub>520</sub> eingesetzt, das sich vor der kodierenden Region des Reportergens *uidA* befindet. Als Effektoren wurden jeweils die unterschiedlichen Fusionsproteine einzeln und in Kombination eingesetzt (Abb. 3-13). Die Ergebnisse zeigen, dass die Fusionsproteine in der Lage waren, den *ProDFR*<sub>520</sub> zu aktivieren. Der Transkriptionsfaktor BHLH42 konnte sowohl als N-terminale als auch als C-terminale Fusion mit einem Fluoreszenzprotein den Promotor zusammen mit dem MYB75-Protein aktivieren (Abb. 3-13). Dabei war die Aktivierung höher, wenn das fluoreszierende Protein als N-terminale Fusion vorlag. Bei MYB75 war zu erkennen, dass es, in Kombination mit BHLH42, nur als N-terminale Fusion mit einem Fluoreszenzprotein den Promotor aktivieren konnte. Keine der C-terminalen Fusionen von MYB75 mit einem fluoreszierenden Protein konnte den *ProDFR*<sub>520</sub> aktivieren (Abb. 3-13).

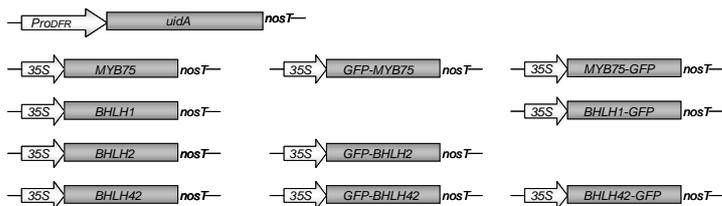


**Abbildung 3-13: Analyse der Aktivierung des ProDFR<sub>520</sub> durch Fusionsproteine mittels Protoplasten-Kotransfektionsexperimente.**

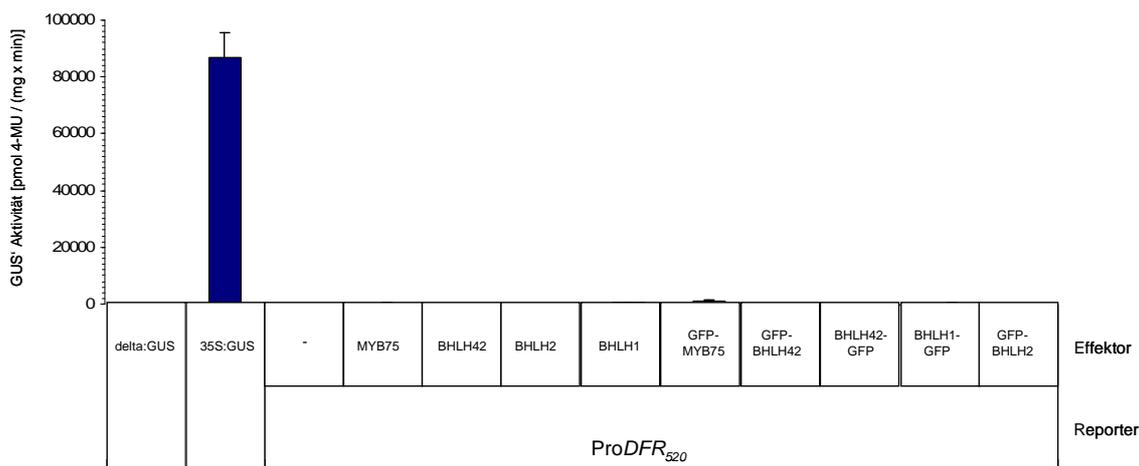
Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials der Proteine in At7-Protoplasten. Schematische Darstellung der Effektoren und des Reportergens. Verschiedene Kombinationen der N- und C-terminalen Fusionen von MYB75 und BHLH42 an GFP wurden auf ihre Funktionalität getestet. Als Reporter wurde ProDFR<sub>520</sub> eingesetzt. Die Negativkontrolle stellt ein delta::GUS-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein 35S::GUS-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luziferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

Beide Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH42 können also auch gemeinsam als Fusion mit einem Fluoreszenzprotein den *DFR*-Promotor aktivieren. In der Abbildung wurde exemplarisch nur die Fusion mit GFP gezeigt. Die Analyse der anderen Fluoreszenzproteine als Fusionsproteine zeigte gleiche Ergebnisse und wird daher nicht extra gezeigt.

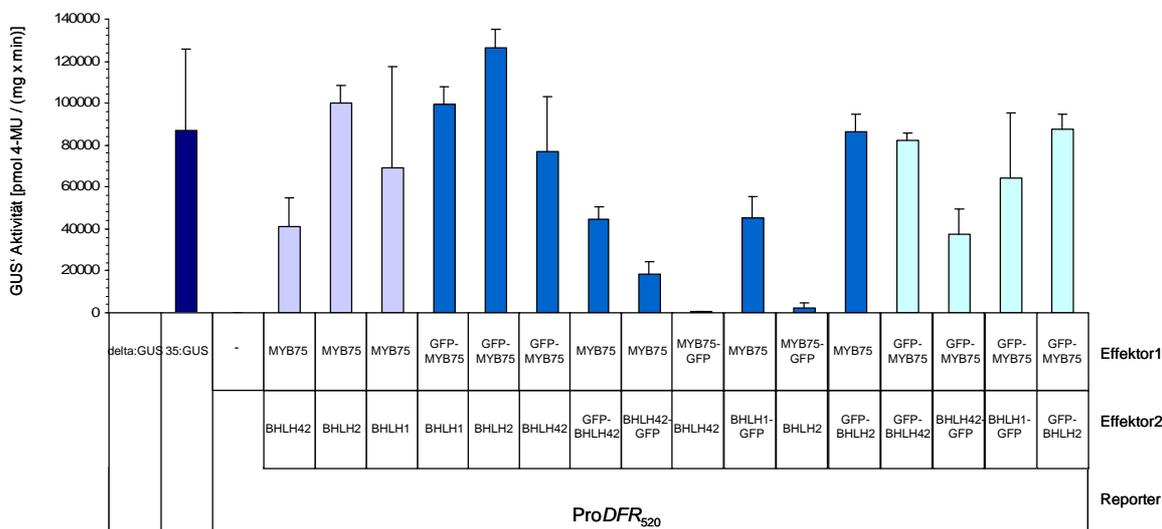
Um zu überprüfen, ob weitere Faktoren aus den jeweiligen Subgruppen von MYB75 und BHLH42 an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, wurden diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert und in der At7-Zellkultur auf ihre Funktionalität getestet. Abbildung 3-14 stellt die Ergebnisse dieser Analyse zusammen. Als Reporter wurde ebenfalls wieder ProDFR<sub>520</sub> verwendet. Als Effektoren wurden die verschiedenen Transkriptionsfaktoren als Fusion mit einem Fluoreszenzprotein unter der Kontrolle des 35S-Promotors eingesetzt (Abb. 3-14). Keiner der Transkriptionsfaktoren war in der Lage, den *DFR*-Promotor allein zu aktivieren.



A



B



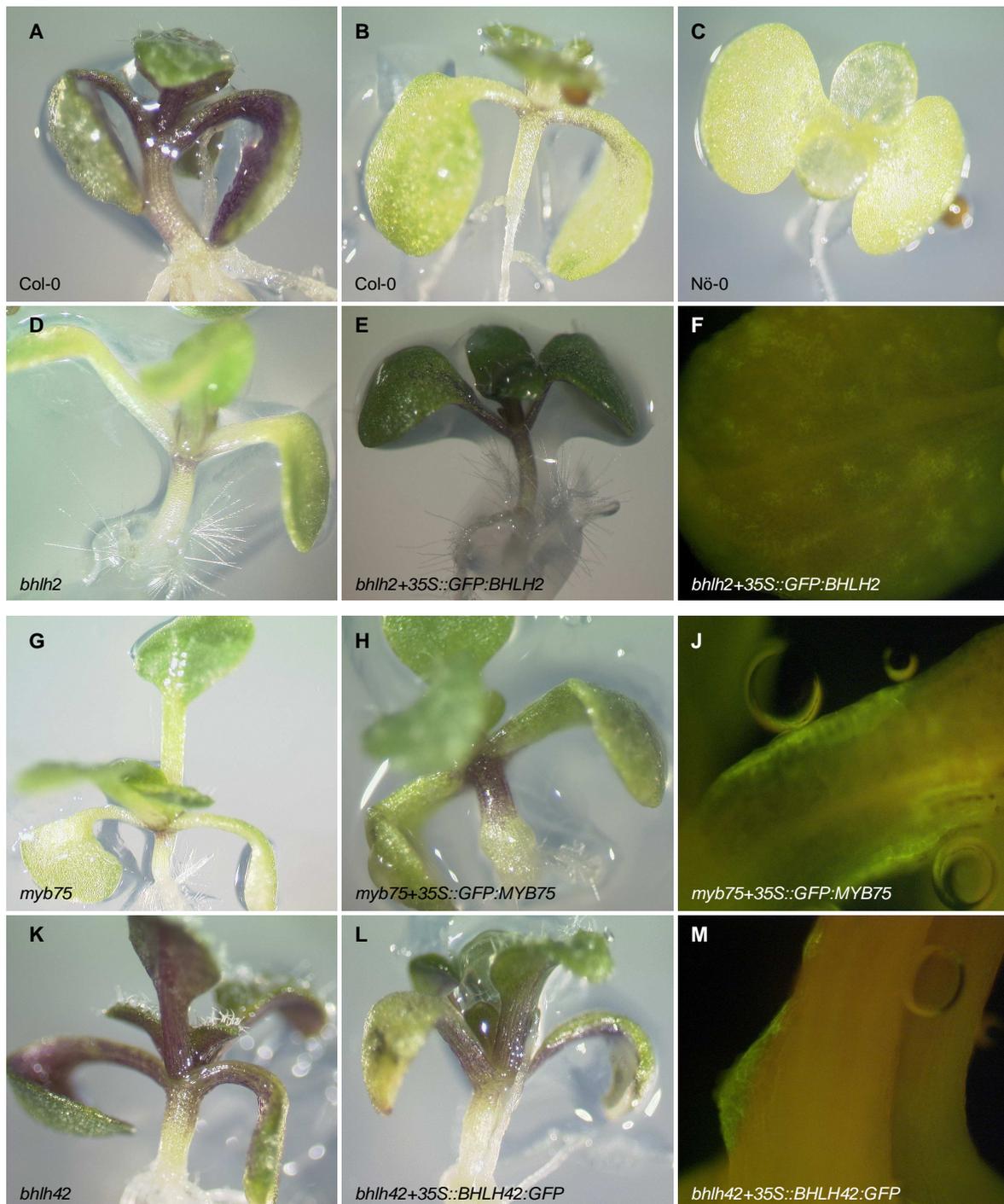
**Abbildung 3-14: Analyse der Aktivierung von ProDFR<sub>520</sub> durch Fusionsproteine mit GFP mittels Protoplasten-Kotransfektionsexperimente.**

Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials der Proteine in At7-Protoplasten. Schematische Darstellung der Effektoren und des Reportergens. (A) und (B) Verschiedene Kombinationen der N- und C-terminalen Fusionen von MYB75 mit BHLH1, BHLH2 und BHLH42 an GFP wurden auf ihre Funktionalität getestet. Als Reporter wurde ProDFR<sub>520</sub> eingesetzt. Die Negativkontrolle stellt ein delta::GUS-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein 35S::GUS-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luziferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

In der Kombination mit MYB75 zeigte sich, dass BHLH1 funktional war, wenn ein Fluoreszenzprotein C-terminal fusioniert war. Das gleiche Ergebnis fand sich für BHLH2, dass als N-terminale Fusion mit einem Fluoreszenzprotein in Kombination mit MYB75 den *DFR*-Promotor aktivieren konnte (Abb. 3-14). Dabei zeigte sich, dass MYB75 sowohl mit BHLH1 als auch mit BHLH2 oder mit BHLH42 in der Lage war, den *DFR*-Promotor zu aktivieren. Die Kombination von MYB75 mit BHLH2 zeigte insgesamt das stärkste Aktivierungspotential, während MYB75 in Kombination mit BHLH42 oder mit BHLH1 den *DFR*-Promotor weniger stark aktivierte (Abb. 3-14). MYB123 und MYB90, die große Ähnlichkeit zu MYB75 besitzen, wurden ebenfalls mit bHLH-Faktoren der Subgruppe III<sub>f</sub> im Zellkultursystem getestet. Diese Transkriptionsfaktoren verhielten sich in den Kotransfektionsstudien wie MYB75 als Fusionsprotein. Die Proteine behielten nur dann ihre Funktionalität, wenn sie N-terminal mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert waren (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse für die weiteren Fluoreszenzproteine als Fusionsproteine sind entsprechend und daher nicht extra angegeben.

Obwohl die Funktionalität der Fusionsproteine *in vivo* bestätigt ist, bedeutet dies nicht, dass diese Fusionskonstrukte auch in Pflanzen richtig exprimiert werden und dass die Proteine die Aufgaben des nativen Transkriptionsfaktors übernehmen können. Um sicher zu gehen, dass die Fusionsproteine in *A. thaliana* Pflanzen funktional sind, wurde zunächst eine transiente Transformation in Transkriptionsfaktor *knock-out* Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden die T-DNA Insertionslinien von *MYB75*, *BHLH42* und *BHLH2* herangezogen, die bereits charakterisiert worden waren (vgl. 3.2.2).

Die Plasmide, die die kodierenden Sequenzen für die Fusionsproteine enthielten, wurden in den hypervirulenten Agrobakterienstamm *EHA105* transformiert. Das jeweilige Plasmid enthielt die Expressionskassette 35S::*GFP:MYB75* für die Transformation der *myb75* Pflanzen, 35S::*GFP:BHLH2* für die Transformation von *bhlh2* Keimlingen und 35S::*BHLH42:GFP* für die Infiltration von *bhlh42* Mutanten. Eine Kultur der transformierten Agrobakterienstämme wurde genutzt, um *A. thaliana knock-out* Pflanzen von *MYB75*, *BHLH2* und *BHLH42*, die vier Tage auf MS-Platten mit 4% Saccharose angezogen wurden, zu infiltrieren. Zwei bis drei Tage nach der Infiltration wurden die Keimlinge phänotypisch analysiert. Wuchsen die *knock-out* Pflanzen oder die Wildtyp-Pflanzen nicht auf Saccharose-haltigem Medium an, zeigten sie keinerlei Anthocyanakkumulation (beispielhaft für alle Pflanzen ist hier nur der jeweilige Wildtyp von *BHLH42* und *MYB75* gezeigt; Abb. 3-15, B und C). Auf Saccharose-haltigem Medium dagegen ist bei Wildtyp-Pflanzen Anthocyanakkumulation erkennbar (Abb. 3-15, A, D, G). Die *myb75* und *bhlh2* Mutanten weisen auf Hochzuckerplatten den charakteristischen anthocyanreduzierten Phänotyp auf (Abb. 3-15, D und G).

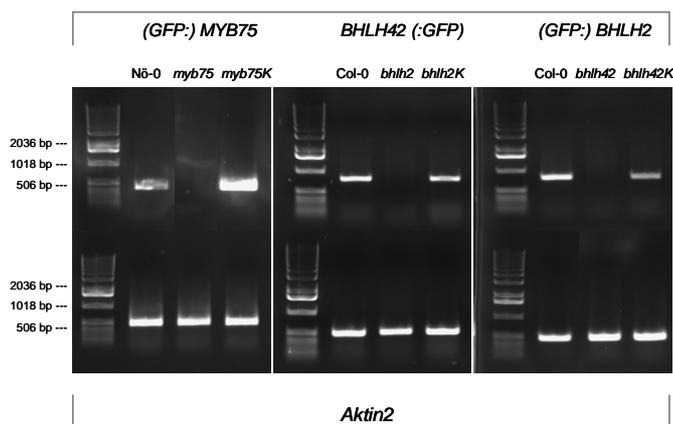


**Abbildung 3-15: Transiente Transformation von *myb75*, *bhlh2* und *bhlh42* Keimlingen zur Analyse der Funktionalität der Fusionsproteine in Pflanzen.**

A. *thaliana* *knock-out* Keimlinge wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, die die kodierenden Sequenzen für die Transkriptionsfaktor-Fusionsproteine enthalten und der Phänotyp vor und nach der Infiltration verglichen. (A) zeigt *Col-0*, als Hintergrund der *bhlh*-Linien, auf 4% Saccharose, (B) *Col-0* auf 0% Saccharose, (C) *Nö-0*, als Hintergrund von *myb75*, auf 0% Saccharose. (D, G, K) zeigen die Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten auf 4% Saccharose und (E, H, L) die komplementierten Mutanten nach der Infiltration auf 4% Saccharose. (F, J, M) zeigen die GFP-Expression in den komplementierten Mutanten.

Die *bhlh42* Mutanten dagegen zeigen auf Hochzucker den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp (Abb. 3-15, K). Nach der Infiltration wiesen die *myb75* und *bhlh2* Keimlinge einen veränderten Phänotyp auf. Die transgenen Mutanten zeigten eine deutlich erhöhte Anthocyanakkumulation im Hypokotyl und in den Keimblättern (Abb. 3-15, E, H). Die *bhlh42* Mutanten zeigten nach der Infiltration einen unveränderten Phänotyp (Abb. 3-15, K und L). Die erfolgreiche Transformation konnte in der komplementierten *bhlh42* Mutante nur über den Nachweis des Transkripts erfolgen (Abb. 3-16).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte ebenso nach der Infiltration an verschiedenen Stellen im Hypokotyl und in den Keimblättern der transgenen Keimlinge eine GFP-Fluoreszenz gezeigt werden (Abb. 3-15, F, J, M). RT-PCR Analysen zeigten ebenfalls die Expression der Transkripte in den transgenen Keimlingen nach der transienten Transformation (*GFP-MYB75* in der komplementierten *myb75* Linie [*myb75K*]; *BHLH42-GFP* in der komplementierten *bhlh42* Linie [*bhlh42K*]; *GFP-BHLH2* in der komplementierten *bhlh2* Linie [*bhlh2K*]). In den Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten konnte dabei keine Transkriptexpression nachgewiesen werden (Abb. 3-16).



**Abbildung 3-16: Nachweis der Expression der Transkripte in transformierten Transkriptionsfaktor *knock-out* Keimlingen.**

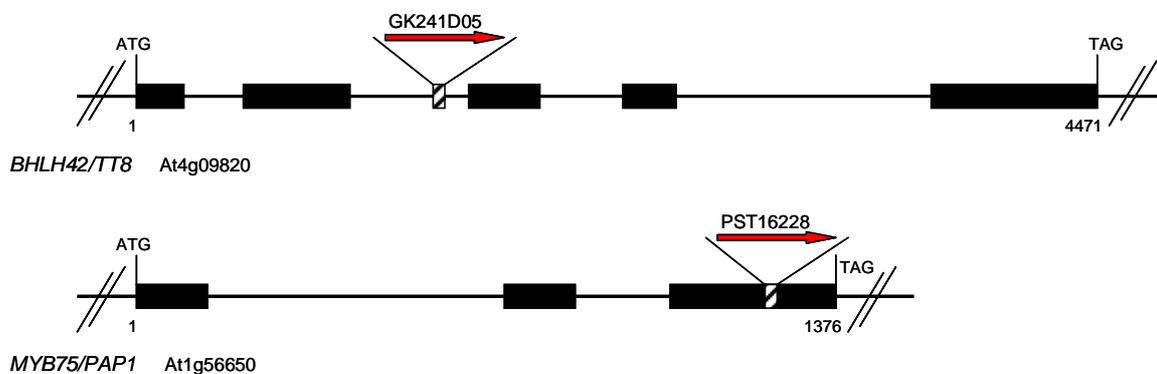
RT-PCR Analysen zeigen, dass die Fusionstranskripte nach der Infiltration der Transkriptionsfaktor-Mutanten *myb75*, *bhlh2* und *bhlh42* in der Pflanze exprimiert werden. In den jeweiligen Wildtyp-Pflanzen kann eine Transkriptexpression gezeigt werden. In den Mutanten wird dagegen kein entsprechendes Transkript exprimiert. *Actin2* dient als Kontrolle der erfolgreichen RT-PCR. K= komplementierte *knock-out* Mutanten.

Die transiente Transformation zeigt durch die Phänotypanalyse und die GFP-Expression die Funktionalität der Fusionsproteine in jungen Keimlingen. Um die transgenen Pflanzen für weitere Analysen vermehren und kreuzen zu können, mussten die Transgene stabil in die *knock-out* Mutanten eingeführt werden. Durch die Kreuzung mehrerer stabil transformierter Pflanzen konnten die Transkriptionsfaktoren gleichzeitig in der Pflanze untersucht werden konnten.

### 3.2.2 Durch stabile Transformation mit Fusionsproteinen können die *knock-out* Pflanzen komplementiert werden

Die stabile Transformation der *knock-out* Mutanten sollte den Wildtyp-Phänotyp der Pflanzen wieder herstellen. Durch die Analyse der Fusionsproteine in den komplementierten Mutanten sollte sowohl die Lokalisation als auch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Zellen untersucht werden. Für die Untersuchung der Interaktion von MYB75 mit einem bHLH Kofaktor wurden zunächst T-DNA Insertionsmutanten charakterisiert.

Die verfügbare T-DNA Insertionslinie *bhlh42/tt8* hat die Akzession Columbia und weist eine Insertion im zweiten Intron auf (Rosso *et al.*, 2003). Aufgrund fehlender kondensierter Tannine in der Samenschale hat die T-DNA Insertionslinie gelbfarbige Samen im Vergleich zu den braunen Wildtyp-Samen. Die verfügbare T-DNA Insertionslinie *myb75/pap1* hat die Akzession Nössen und weist eine Insertion im dritten Exon auf (Teng *et al.*, 2005). Diese T-DNA Insertionslinie zeigt eine stark reduzierte Anthocyanakkumulation beim Wachstum auf zuckerhaltigem Medium. In Abbildung 3-17 ist die genomische Struktur der Insertionslinien schematisch dargestellt. Bei beiden T-DNA Insertionslinien wurde mittels RT-PCR Analysen der *knock-out* bestätigt (vgl. Abb. 3-21).

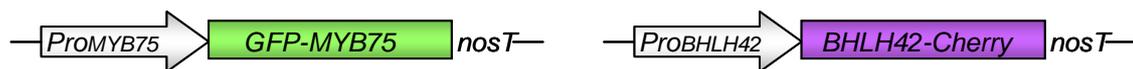


**Abbildung 3-17: T-DNA Insertionslinien der *MYB75* und *BHLH42* Gene.**

Schematische Darstellung der genomischen Struktur. Die schwarzen Boxen stehen für die kodierenden Regionen während die dünnen Linien die nicht-kodierenden Regionen symbolisieren. Die Positionen der T-DNA Insertionen sind durch gestreifte Boxen angedeutet. Die roten Pfeile symbolisieren die jeweilige T-DNA Insertion.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde getestet, ob die Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH42 als Fusionsproteine ihre Funktionalität in Pflanzen behalten (vgl. 3.2.1). Dabei wurden die Fusionsproteine unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimiert. Um die Lokalisation und die Interaktion der Transkriptionsfaktoren

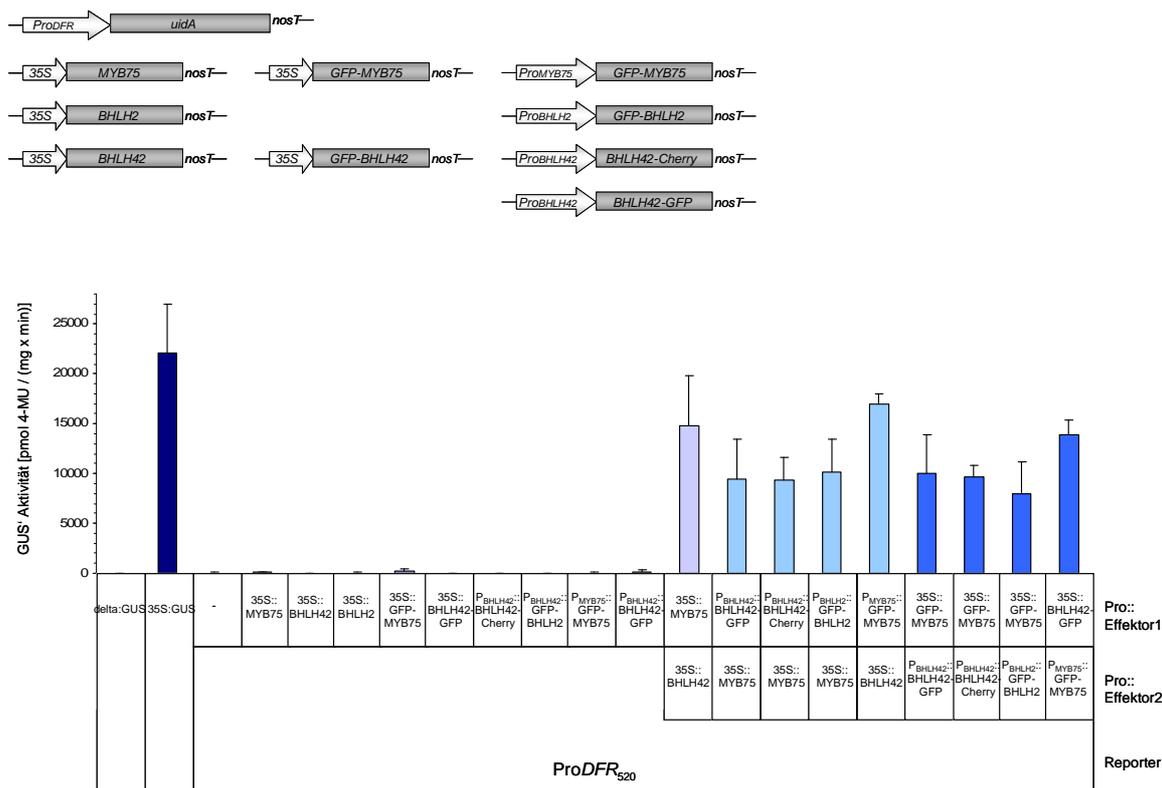
in Keimlingen zu untersuchen, sollten möglichst native Bedingungen geschaffen werden. Dazu war es notwendig, den konstitutiven Promotor durch den nativen Promotor der Proteine zu ersetzen. Da durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des 35S-Promotors Artefakte in den Pflanzen entstehen können, die nicht die natürliche Lokalisation oder Interaktion der Transkriptionsfaktoren wiedergeben könnten, wurde in den vorhandenen Konstrukten der 35S-Promotor durch den jeweiligen nativen Promotor des Transkriptionsfaktors ausgetauscht (Abb. 3-18). Für weiterführende Untersuchungen wurden zwei Fluoreszenzproteine ausgewählt, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Dadurch war es möglich, beide Fluoreszenzproteine in einer Pflanze gleichzeitig zu untersuchen. Da das eGFP im grünen, das mCherry aber im roten Spektralbereich fluoresziert, konnten die Fluoreszenzproteine gut voneinander unterschieden werden. Aufgrund der überlappenden Absorptionsspektren waren ebenfalls weiterführende Interaktionsstudien mit FRET möglich.



**Abbildung 3-18: Generierung der Fusionsproteine unter Kontrolle des nativen Promotors.**

In den pMDC43 und pMDC83 Vektoren stehen die kodierenden Sequenzen für die Transkriptionsfaktor-Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH42-Cherry unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Dieser konstitutive Promotor wurde durch den jeweiligen nativen Promotor des Transkriptionsfaktors (1,7 kb MYB75-Promotor und 2,5 kb BHLH42-Promotor) ersetzt.

In der Pflanze werden die Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des nativen Promotors nicht in so starker Weise exprimiert wie unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Die neuen Konstrukte wurden daher vor der stabilen Transformation in Pflanzen auf ihre Funktionalität getestet. Als nativer Promotor wurde dabei für MYB75 eine 1700 bp und für BHLH42 eine 2500 bp große Region kloniert, die in der genomischen DNA vor der kodierenden Sequenz der Transkriptionsfaktoren liegt. Dabei ist nicht eindeutig, welche Region genau ausreicht oder verantwortlich ist für die Expression der Proteine. In At7-Kotransfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine auch unter der Kontrolle des endogenen Promotors in der Lage sind, den *DFR*-Promotor zu aktivieren (Abb. 3-19, B). Insgesamt ist die Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors durch die Fusionsproteine unter der Kontrolle des endogenen Promotors etwas geringer als jene unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Um ebenfalls die Interaktion der Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH2 in Pflanzen untersuchen zu können, wurde der 35S-Promotor vor der kodierenden Sequenz von GFP:BHLH2 durch den 2,5 kb großen, nativen Promotor von BHLH2 ausgetauscht. Die Kotransfektionsexperimente belegen die Funktionsfähigkeit des Konstruktes (Abb. 3-19).



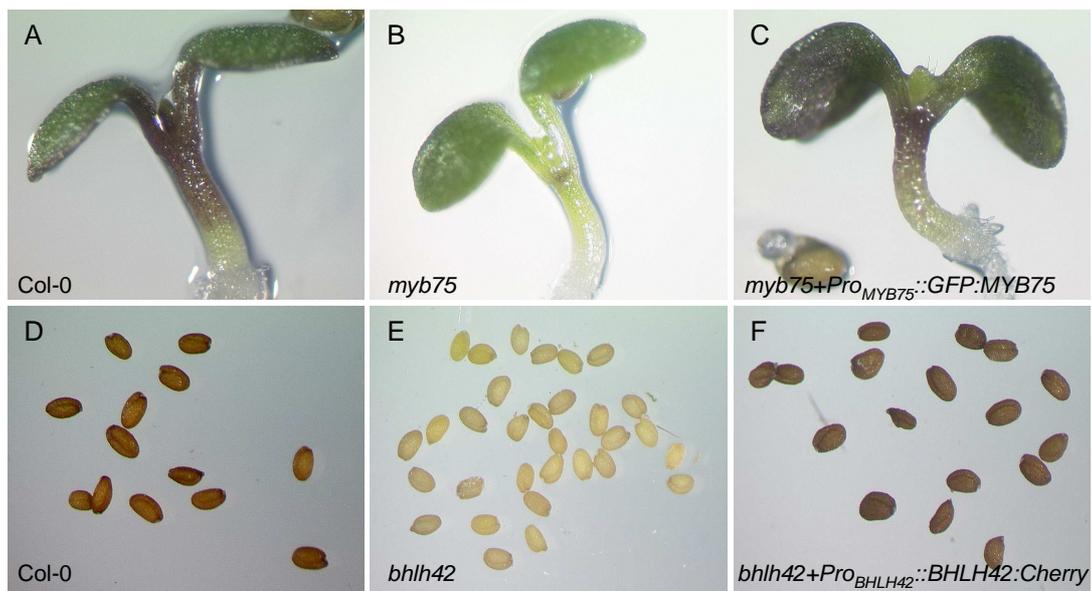
**Abbildung 3-19: Analyse der Aktivierung von ProDFR<sub>520</sub> durch die Fusionsproteine von MYB75 mit BHLH2 bzw. BHLH42 unter der Kontrolle des nativen Promotors mittels Protoplasten-Kotransfektionsexperimenten.**

Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials der Proteine in At7-Protoplasten. Schematische Darstellung der Effektoren und des Reporter gens. Die Fusionsproteine wurden unter der Kontrolle ihres nativen Promotors auf deren Funktionalität bezogen auf die Aktivierung des *DFR*-Promotors getestet. Die Negativkontrolle stellte ein *delta::GUS*-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein *35S::GUS*-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luziferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

Für die stabile Transformation der *knock-out* Mutanten wurden die neu generierten Konstrukte zunächst in Agrobakterien transformiert. Die Transformation erfolgte dann über die „*floral dip*“-Methode, indem adulte Pflanzen mit den offenen Blüten in die hochgewachsene selektive Agrobaktériensuspension getaucht wurden. Dabei wurden *myb75* Mutanten mit dem Konstrukt *Pro<sub>MYB75</sub>::GFP:MYB75* transformiert während *bhlh42* Mutanten entweder mit dem Konstrukt *Pro<sub>BHLH42</sub>::BHLH42:Cherry* oder mit dem Konstrukt *Pro<sub>BHLH42</sub>::BHLH42:GFP* transformiert wurden. Die Samen der transformierten Pflanzen wurden auf Selektionsplatten ausgelegt. Von den transgenen Pflanzen, die resistent auf das Antibiotikum (Kanamycin) waren und bei der Genotypisierung positiv auf das Transgen getestet wurden, wurden Samen geerntet.

Die transgenen Keimlinge der F2-Generation wurden auf ihren Phänotyp hin analysiert. Die *myb75* Mutante zeigte einen eindeutigen Phänotyp, wenn sie auf Hochzucker (MS-Platten mit 4% Saccharose) wuchs. Diese Keimlinge zeigten eine nahezu völlig reduzierte

Anthocyanakkumulation im Hypokotyl und in den Keimblättern (Abb. 3-20, B). Die Wildtyp-Pflanzen dagegen zeigten eine starke Anthocyanakkumulation als Reaktion auf Saccharose (Abb. 3-20, A). Die phänotypische Identifikation der komplementierten *myb75* Pflanzen ergab eine starke Reaktion der Keimlinge auf Saccharose. Die Keimlinge zeigten eine eindeutige Anthocyanakkumulation im Hypokotyl und in den Keimblättern die der Anthocyanakkumulation der Wildtyp-Pflanzen als Reaktion auf Saccharose entsprach (Abb. 3-20, C). Die phänotypische Identifikation der komplementierten *bhlh42* Mutante erfolgte über die Samenfarbe. Die *knock-out* Mutante zeigte eine deutliche Gelbfärbung der Samen aufgrund fehlender Proanthocyanidine in der Samenschale (Abb. 3-20, E). Die Farbe der Samen von Wildtyp-Pflanzen dagegen zeigte eine deutlich dunkelbraune Färbung (Abb. 3-20, D). Die phänotypische Identifikation der komplementierten *bhlh42* Pflanzen ergab eine klare dunkelbraune Färbung der Samen, die der Farbe der Wildtyp-Samen entsprach (Abb. 3-20, F).

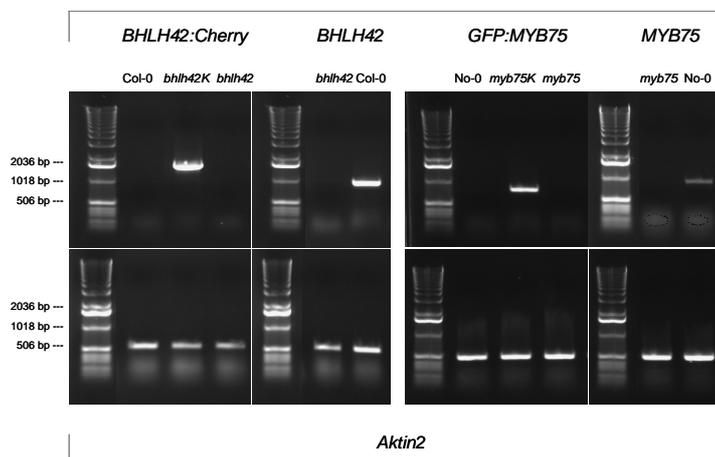


**Abbildung 3-20: Phänotypische Identifikation der komplementierten Transkriptionsfaktor *knock-out* Linien.**

Die phänotypische Identifikation der komplementierten *myb75* Mutante wurde über den Saccharose-vermittelten Phänotyp geprüft. Auf Hochzucker zeigten *myb75* Keimlinge eine stark verminderte Anthocyanakkumulation im Hypokotyl (B). Die komplementierten *myb75* Pflanzen (C) zeigten auf Hochzucker den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp (A). Die phänotypische Analyse der komplementierten *bhlh42* Mutante verlief über die Samenfarbe. Die *bhlh42* Linie zeigte die typische Gelbfärbung der Samen (E), während die komplementierten *bhlh42* Pflanzen braune Samen hervorbrachten (F), die der Samenfarbe des Wildtyps entspricht (D).

Zusätzlich zu der phänotypischen Identifikation der komplementierten *knock-out* Mutanten erfolgte ein Nachweis der Expression der Transkripte in den transformierten Pflanzen. Die RT-PCR Analysen zeigten, dass die Fusionstranskripte *BHLH42:Cherry* und *GFP:MYB75*

unter der Kontrolle der nativen Promotoren in der jeweiligen komplementierten *knock-out* Mutante von *bhlh42* und *myb75* exprimiert wurden (Abb. 3-21, *bhlh42K* und *myb75K*). In Wildtyp-Pflanzen wurde dagegen nicht die Existenz des Fusionstranskripts nachgewiesen, sondern des *MYB75* bzw. *BHLH42* Transkripts. In den *myb75* bzw. *bhlh42* *knock-out* Mutanten wurde kein natives *MYB75* bzw. *BHLH42* Transkript nachgewiesen.



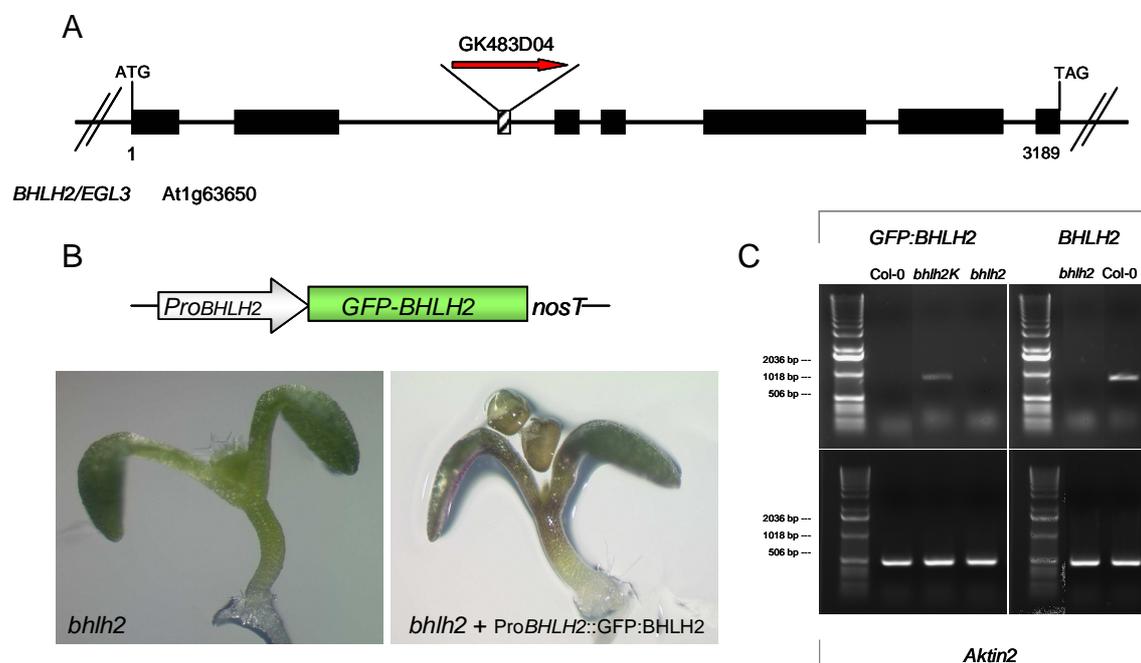
**Abbildung 3-21: Nachweis der Funktionalität der Fusionstranskripte in stabil transformierten *A. thaliana* Keimlingen.**

RT-PCR Analysen zeigen, dass die Transkripte unter der Kontrolle der nativen Promotoren nach der stabilen Transformation der Transkriptionsfaktor-Mutanten *myb75* und *bhlh42* in der Pflanze ähnlich stark exprimiert wurden wie im Vergleich zum Wildtyp (= *myb75K*, *bhlh42K*). In den *knock-out* Mutanten wurde dagegen kein Transkript exprimiert. Im Wildtyp (Col-0) wurde kein Fusionstranskript exprimiert. *Aktin2* dient als Kontrolle der erfolgreichen RT-PCR.

Um zu überprüfen, ob die Komplexbildung von MYB75 mit BHLH2 wichtig für die Aktivierung des *DFR*-Promotors und damit für die Anthocyanakkumulation in *A. thaliana* Keimlingen ist, wurde die *bhlh2* Mutante ebenfalls komplementiert. Der Phänotyp der *bhlh2* *knock-out* Linie ist dem Phänotyp der *myb75* Mutante beim Wachstum auf Saccharose sehr ähnlich. Das lässt darauf schließen, dass auch dem BHLH2 Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Regulation des Anthocyanstoffwechsels zukommt. Die *knock-out* Linie von *BHLH2* ist eine T-DNA Insertionslinie mit einer Insertion im zweiten Intron (Abb. 3-22, A).

Um ebenfalls die Lokalisation von BHLH2 in Keimlingen nachweisen zu können, wurde der 35S-Promotor in dem Plasmidkonstrukt pMDC43-35S::*GFP:BHLH2* bzw. pMDC43-35S::*Cherry:BHLH2* durch den nativen Promotor von BHLH2 ersetzt. At7-Expressionsstudien haben die Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins bestätigt (Abb. 3-19). Das jeweilige Plasmidkonstrukt (*Pro<sub>BHLH2</sub>::GFP:BHLH2* bzw. *Pro<sub>BHLH2</sub>::Cherry:BHLH2*) wurde stabil in die adulte Mutante eingebracht. Nach der Samenreife wurden die transgenen Pflanzen mittels selektiver MS-Platten und

Genotypisierung identifiziert. Die Identifikation der komplementierten *bhlh2* Mutante erfolgte über den Anthocyanphänotyp. Auf Hochzucker (4% Saccharose) zeigten *bhlh2* Keimlinge, ähnlich wie *myb75* Keimlinge, eine deutlich reduzierte Anthocyanakkumulation im Hypokotyl und in den Keimblättern (Abb. 3-22, B). Die komplementierten *bhlh2* Pflanzen zeigten dagegen auf Hochzucker den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp (Abb. 3-22, B). Die Expression des Transgens in der komplementierten *bhlh2* Mutante wurde zusätzlich durch RT-PCR Analysen bestätigt (Abb. 3-22, C). Unter der Kontrolle des nativen Promotors wurde das Fusionstranskript *GFP:BHLH2* (bzw. *Cherry:BHLH2*) in der transgenen Pflanze (*bhlh2K*) ähnlich stark exprimiert wie das native *BHLH2* Transkript in der Wildtyp-Pflanze (Col-0). In der *knock-out* Linie wurde dagegen kein *BHLH2* Transkript exprimiert (Abb. 3-22, C).



**Abbildung 3-22: Phänotypische Identifikation der komplementierten *bhlh2* Mutante und Nachweis der Expression des Transgens in stabil transformierten Keimlingen.**

(A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur der *bhlh2* T-DNA Insertionslinie (vgl. Abb. 3-17). (B) Die phänotypische Identifikation der komplementierten *bhlh2* Mutante wurde über den Saccharose-vermittelten Phänotyp geprüft. Auf Hochzucker zeigten *bhlh2* Keimlinge eine stark verminderte Anthocyanakkumulation im Hypokotyl. Die komplementierten *bhlh2* Pflanzen zeigten dagegen den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp. (C) RT-PCR Analysen zeigten, dass das Fusionstranskript unter der Kontrolle des nativen Promotors nach der stabilen Transformation der *bhlh2* Mutante ähnlich stark exprimiert wird wie das *BHLH2* Transkript im Wildtyp. In der *knock-out* Mutante wird dagegen kein Transkript exprimiert. Im Wildtyp (Col-0) wird kein Fusionstranskript exprimiert. *Aktin2* dient als Positivkontrolle.

Im Anschluss an die Identifizierung der komplementierten Transkriptionsfaktor-Mutanten wurden diese untereinander gekreuzt, um so doppelt komplementierte Doppelmutanten zu generieren. Diese transgenen Pflanzen waren homozygot für beide *knock-out* Allele.

Durch genotypische Analysen der F<sub>2</sub>-Generation wurde gezeigt, dass diese transgenen Pflanzen sowohl *GFP:MYB75* als auch *BHLH42:Cherry* (bzw. *Cherry:BHLH2*) exprimierten (*myb75 bhlh42* + Pro<sub>MYB75</sub>::*GFP:MYB75* / Pro<sub>BHLH42</sub>::*BHLH42:Cherry* bzw. *myb75 bhlh2* + Pro<sub>MYB75</sub>::*GFP:MYB75* / Pro<sub>BHLH2</sub>::*Cherry:BHLH2*). Diese komplementierten Doppelmutanten wurden nach der Selektion und Identifizierung sowohl phänotypisch als auch in Bezug auf die Expression der Fusionsproteine hin untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die transgenen Keimlinge den Wildtyp-Phänotyp zeigen, wenn sie auf Saccharose-haltigem Medium wachsen und die Samenfarbe der Wildtyp-Samenfarbe entspricht (Daten nicht gezeigt). RT-PCR Analysen bestätigten die Expression der Transgene. Damit konnten die Merkmale der *myb75* und *bhlh42* bzw. *bhlh2* Mutanten aufgehoben werden. Diese Pflanzen wurden für weitere Untersuchungen in Bezug auf die Interaktion der Transkriptionsfaktoren genutzt (vgl. 3.3).

### **3.3 Analyse der Lokalisation und Interaktion der Fusionsproteine in Protoplasten und in *A. thaliana* Keimlingen**

Es war bisher nicht bekannt, in welchem Zellkompartiment die Transkriptionsfaktoren nach der Synthese akkumulieren, ob sie also im Cytoplasma verbleiben oder in den Zellkern transportiert werden. Ein nukleäres Import-Signal (NLS) oder Export-Signal (NES) in den Proteinen ist bisher nicht untersucht worden. Es konnte lediglich die Kernlokalisierung von BHLH42 in Protoplasten gezeigt werden (Heim, 2003). Es wird allerdings vermutet, dass MYB75 ein Kernexport-Signal (NES) aufweist, welches dazu beiträgt, dass das Protein ebenfalls in das Cytoplasma transportiert werden kann. Hier sollte mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden die Lokalisation und die Interaktion der Transkriptionsfaktoren in Protoplasten, aber auch in jungen *A. thaliana* Keimlingen nachgewiesen werden.

Für Studien an lebenden Proben (Protoplasten oder ganzen Keimlingen) ist es besonders wichtig, möglichst schnell viele Mikroskopie-Bilder machen zu können, ohne die Zellen dabei zu zerstören. Die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen, wie der Transport von Proteinen, erfordert ein zeitliches Auflösungsvermögen von wenigen Millisekunden bis Sekunden. Daher wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Mikroskopie-Methoden angewandt, um die Lokalisation und die Interaktion von Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen. Die Weitefeldfluoreszenzmikroskopie ermöglichte die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen. Durch eine hochsensitive Detektion auch sehr schwacher Fluoreszenz-Signale konnten die Fluoreszenzproteine detektiert werden, auch wenn sie unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden. Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie dagegen gestattete es,

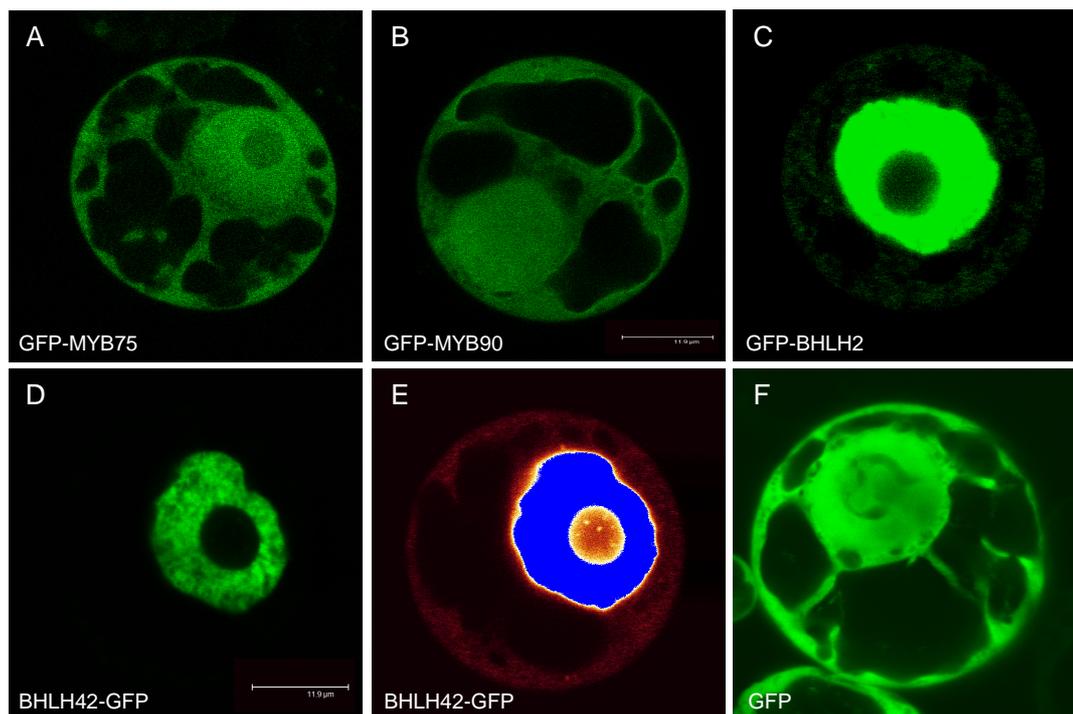
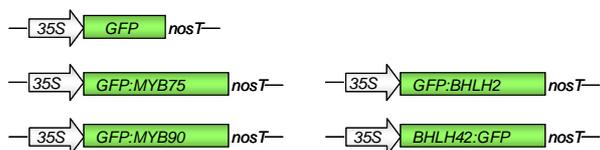
mikroskopische Strukturen aus ausgewählten Schichten einer dreidimensionalen Probe darzustellen, ohne dass das Bild durch Streulicht aus den benachbarten Ebenen des Objekts beeinträchtigt wurde. Mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) konnte die Interaktion zwischen zwei (Fluoreszenz-) Molekülen gemessen werden, wenn diese in eine räumliche Nähe zueinander kamen. Der Energietransfer konnte über die Abnahme der Donor-Fluoreszenz bzw. über die Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz detektiert werden.

### 3.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine

Um die mögliche Interaktion der Fusionsproteine zu analysieren, musste zunächst die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren als Fusion in der pflanzlichen Zelle sichtbar gemacht werden. Für Lokalisationsstudien wurden die Fusionsproteine verwendet, die bereits positiv in At7-Kotransfektionsstudien getestet wurden (vgl. 3.2.1). Dazu wurden Tabakprotoplasten, wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, mit den binären Konstrukten, die die kodierenden Sequenzen für die Fusionsproteine enthielten, transformiert und mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Die Fusionskonstrukte wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Zusätzlich wurden die Konstrukte, die die kodierenden Sequenzen für die Fusionsproteine enthielten, in At7-Protoplasten transformiert, um mit Weitfeldmikroskopie die Lokalisation im homologen System untersuchen zu können. Die Fusionsproteine wurden unter der Kontrolle der endogenen Promotoren exprimiert. Es wurde sowohl die Lokalisation der GFP-MYB75 und GFP-MYB90 Proteine analysiert, als auch der (Cherry-) GFP-BHLH2 und BHLH42-GFP (-Cherry) Proteine.

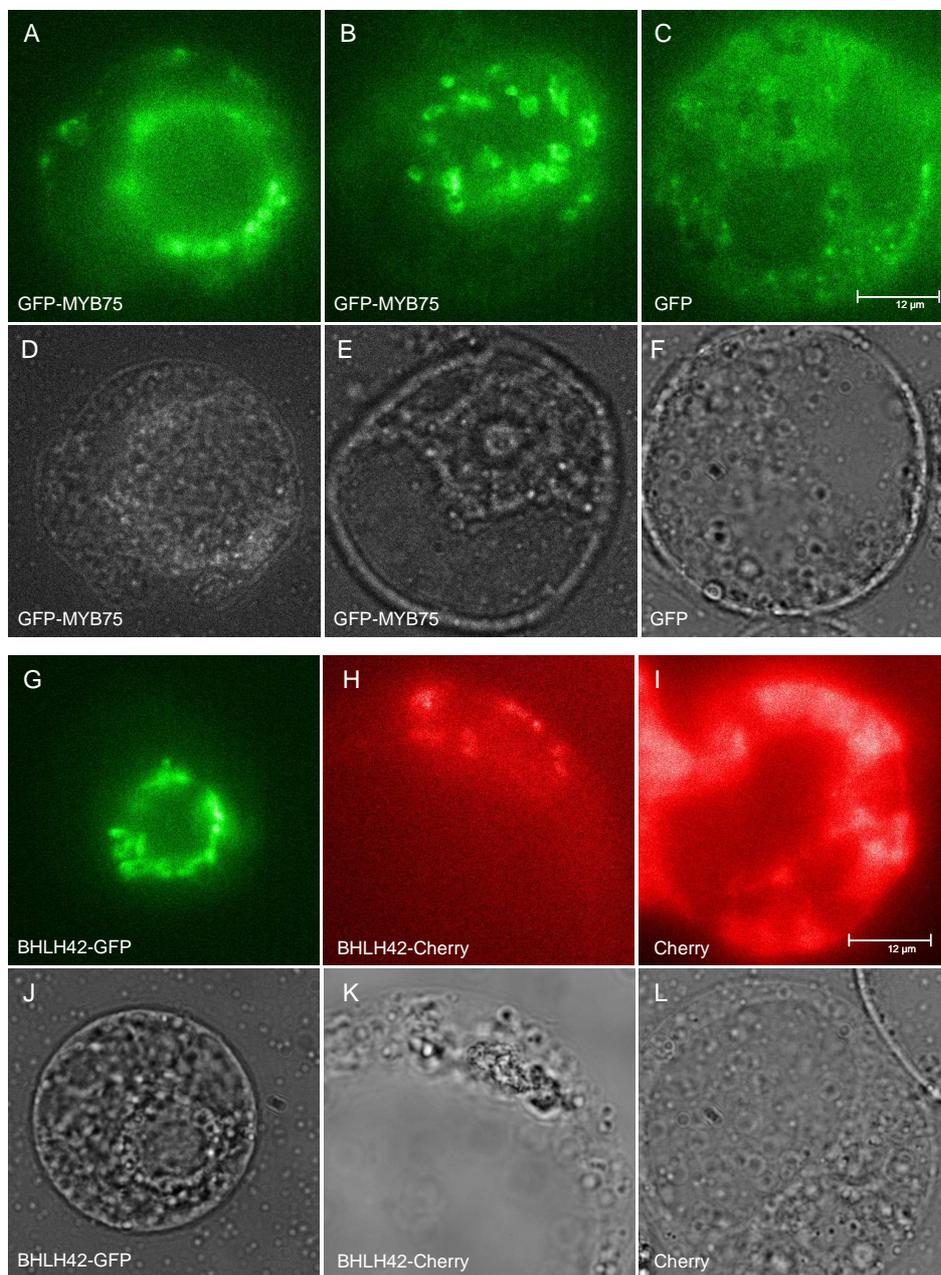
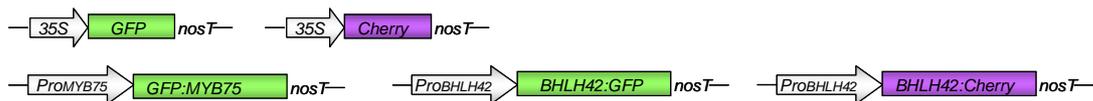
Mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops wurde zunächst die Lokalisation der Fusionsproteine in Tabakprotoplasten analysiert. In Abbildung 3-23 sind die Konstrukte dargestellt, mit denen die Tabakprotoplasten transformiert wurden. Das an GFP fusionierte MYB75 befand sich nach der Expression gleichermaßen verteilt im Cytoplasma und im Kern der Protoplasten (Abb. 3-23, A). MYB90, das ebenfalls an GFP fusioniert war, zeigte die gleiche subzelluläre Verteilung wie GFP-MYB75 im Cytoplasma und im Kern der Tabakprotoplasten (Abb. 3-23, B). Das an GFP fusionierte BHLH2 befand sich dagegen ausschließlich im Kern des Tabakprotoplasten (Abb. 3-23, C). Das BHLH42-GFP Fusionsprotein befand sich ebenfalls nur im Kern der Protoplasten (Abb. 3-23, D). Um die eindeutige Kernlokalisation zu bestätigen ist eine zusätzliche Aufnahme mit Falschfarben und stark erhöhter Laserleistung gezeigt (E). Dabei zeigte sich die Autofluoreszenz des Protoplasten im Cytoplasma neben der starken GFP-Fluoreszenz im Kern. Abbildung 3-23, F zeigt die Positivkontrolle. Dabei wurde die cDNA

von GFP unter die Kontrolle des 35S-Promotors gestellt. In BY-2 Protoplasten zeigt das GFP-Protein eine gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma und im Kern (Abb. 3-23, F).



**Abbildung 3-23: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in Tabakprotoplasten.** BY-2 Protoplasten wurden transient mit den Konstrukten für GFP-Fusionsproteine transfiziert und die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Es werden repräsentative Aufnahmen von (A) GFP-MYB75; (B) GFP-MYB90; (C) GFP-BHLH2; (D, E) BHLH42-GFP; (F) GFP (als Positivkontrolle) gezeigt.

Um zu überprüfen, wo die Fusionsproteine in At7-Protoplasten lokalisiert sind, wenn sie unter der Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors exprimiert werden, wurden Aufnahmen mit der Weitfeldmikroskopie gemacht. Im Gegensatz zur konfokalen Laserscanning-Mikroskopie ist dies eine Einzelmolekülmikroskopie, die eine weite Fläche der Probe anregt. Der Vorteil der Weitfeldmikroskopie besteht darin, dass ein bestimmter Bereich des Protoplasten räumlich und auch dynamisch durch die hochempfindliche Kamera aufgelöst werden kann und somit Aussagen über die Verteilung der fluoreszierenden Moleküle getroffen werden können, auch wenn diese nur schwach exprimiert werden.



**Abbildung 3-24: Die subzelluläre Lokalisation von GFP-MYB75, BHLH42-GFP und BHLH42-Cherry unter der Kontrolle des nativen Promotors in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit den Konstrukten  $\text{Pro}_{\text{MYB75}}::\text{GFP:MYB75}$ ,  $\text{Pro}_{\text{BHLH42}}::\text{BHLH42:GFP}$  bzw.  $\text{Pro}_{\text{BHLH42}}::\text{BHLH42:Cherry}$  transfiziert, um die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP bzw. der roten Fluoreszenz von Cherry mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie zu analysieren. Es werden repräsentative Aufnahmen von (A, B) GFP-MYB75; (D, E) Hellfeld-Aufnahmen des transfizierten Protoplasten; (C, F) GFP (als Positivkontrolle) und (G) BHLH42-GFP; (H) BHLH42-Cherry; (J, K) entsprechende Hellfeld-Aufnahmen; (I, L) Cherry (als Positivkontrolle) gezeigt.

In Abbildung 3-24 ist die subzelluläre Lokalisation von GFP-MYB75 und BHLH42-GFP (-Cherry) in At7-Protoplasten dargestellt. Die Konstrukte, die die kodierenden Sequenzen für die Fusionsproteine enthalten, wurden in vorhergehenden Untersuchungen auf ihre Funktionalität getestet und transient in At7-Protoplasten transfiziert (Abb. 3-19).

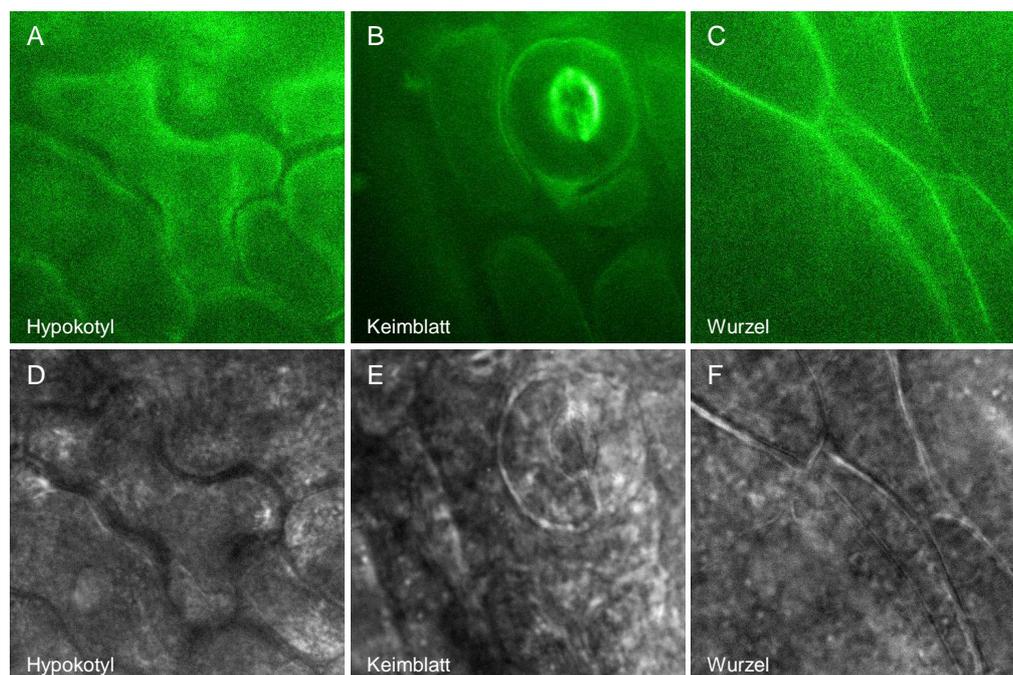
Durch die Expression der Fusionskonstrukte unter der Kontrolle des nativen Promotors akkumulieren diese in sehr geringer Konzentration. Die Lokalisation der Einzelmoleküle konnte in den lebenden Zellen gezeigt werden. Dabei wurde das Fusionsprotein GFP-MYB75 hauptsächlich in der Nähe des Zellkerns detektiert. Die fluoreszierenden Moleküle akkumulierten dabei in direkter Nähe zum Kern und im Kern, waren jedoch in geringer Menge auch im Cytoplasma zu finden (Abb. 3-24, A, B). Als Orientierungshilfe dienen dabei entsprechende Hellfeldaufnahmen der transfizierten Protoplasten (D, E). Die Abbildungen C und F zeigen die Positivkontrolle mit GFP unter der Kontrolle des 35S-Promotors. In At7-Protoplasten zeigt GFP eine gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma und im Kern. Die subzelluläre Lokalisation von BHLH42-GFP bzw. von BHLH42-Cherry in At7-Protoplasten zeigt die Fusionsproteine direkt an bzw. auch in dem Zellkern (Abb. 3-24, G, H). Auch hier scheint die Verteilung des Transkriptionsfaktors an der Zellkernwand ähnlich zu sein wie bei dem MYB75-Fusionsprotein. Die Transkriptionsfaktor-Fusionsproteine akkumulieren um den Zellkern bzw. an der Wand des Zellkerns. Zur besseren Orientierung sind die Hellfeld-Aufnahmen gezeigt (Abb. 3-24, J und K). Die Abbildungen 3-24, I und L zeigen die Positivkontrolle. In At7-Protoplasten zeigt Cherry eine gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma und im Kern. Die Lokalisationsergebnisse für das Fusionsprotein GFP-BHLH2 entsprechen der Akkumulation des BHLH42-Fusionsproteins (Daten siehe Anhang, 7.3).

### 3.3.2 Analyse der *in planta* Lokalisation der Fusionsproteine

In den Protoplasten zeigen die Transkriptionsfaktoren eine deutliche Verteilung im und um den Zellkern herum. Die Detektion der Lokalisation der Fusionsproteine in Pflanzen ist jedoch sehr viel schwieriger als die Detektion in Protoplasten. Für die *in planta* Lokalisation der Fusionsproteine wurden die T1-Linien der komplementierten *myb75*, *bhlh2* bzw. *bhlh42* Mutanten herangezogen, die stabil mit den Konstrukten  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  bzw.  $Pro_{BHLH2}::GFP:BHLH2$  ( $::Cherry:BHLH2$ ) oder  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  ( $::BHLH42:GFP$ ) transformiert wurden (vgl. 3.2.2). Wichtig dabei war, dass die homozygoten *knock-out* Linien komplementiert wurden und damit den Wildtyp-Phänotyp zeigten (vgl. 3.2.2), und dass die Fusionsproteine in Pflanzen unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden. Die Keimlinge wurden auf, mit Norflurazon getränktem, Filterpapier ausgelegt und für fünf Tage unter

Langtagbedingungen angezogen. Durch das Herbizid wurde in den Pflanzen kein Chlorophyll gebildet, was eine Detektion von GFP ohne Autofluoreszenz durch Chlorophyll erlaubt hat. Um einen eventuellen Effekt von Saccharose messen zu können, wurden die Keimlinge sowohl mit als auch ohne Zugabe des Zuckers angezogen.

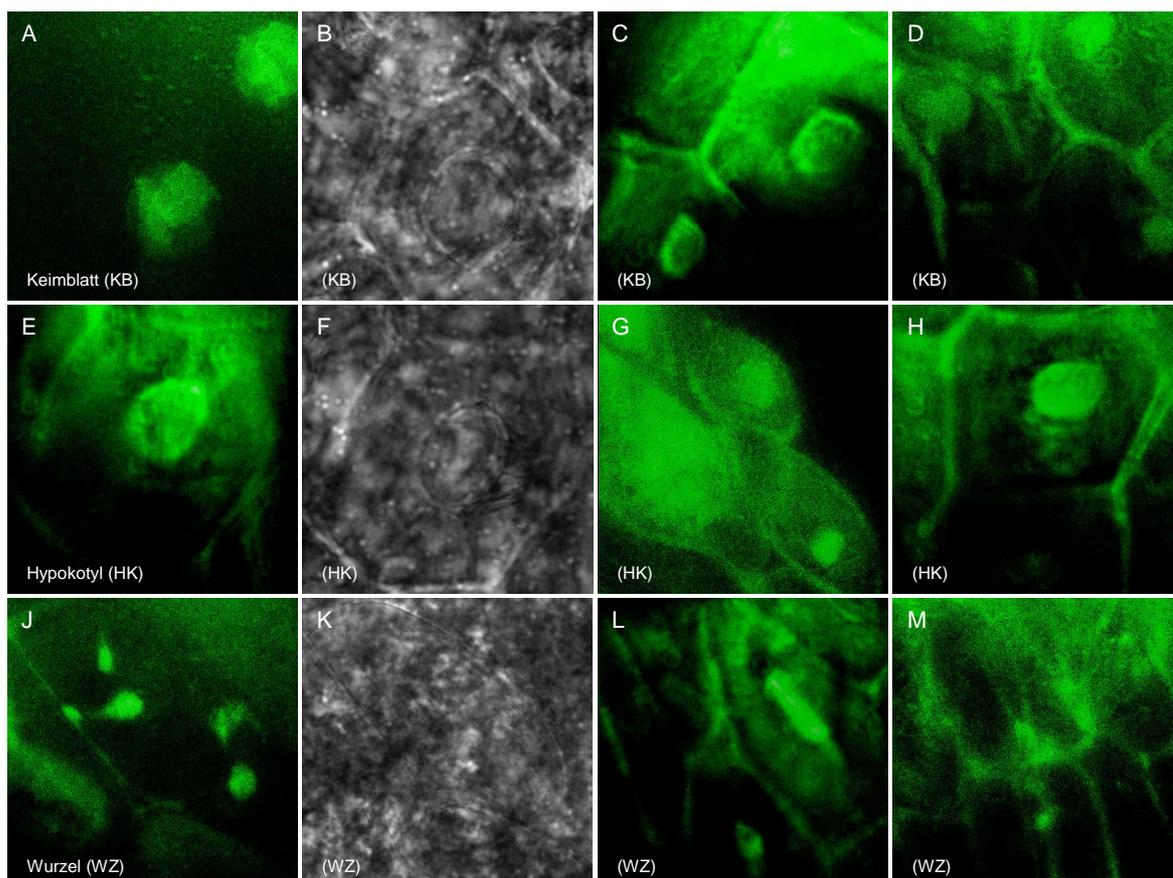
In den transgenen Keimlingen zeigten die Fusionsproteine eine deutliche Verteilung. Dabei lag der Schwerpunkt der Akkumulation im Hypokotyl und in den Keimblättern der transgenen Keimlinge, aber auch in Wurzelzellen konnte Fluoreszenz detektiert werden. Um analysieren zu können, wo die Fusionsproteine in den Zellen akkumulierten, wurden Schnitte angefertigt, um möglichst dünne Zellschichten zu erhalten. Diese wurden mit Hilfe der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 3-25 zeigt die *in planta* Lokalisation der GFP-MYB75 Fusionsproteine in den Zellen verschiedener Organe, wenn die transgenen Keimlinge auf Norflurazon ohne Zucker gewachsen sind. Wuchsen die Pflanzen ohne Zucker an, war kaum eine Akkumulation von GFP-MYB75 in den Zellen zu erkennen (Abb. 3-25, A-C). Nur in den Stomata der Keimblätter konnte eine schwache grüne Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3-25, B).



**Abbildung 3-25: *In planta* Lokalisation von GFP-MYB75 in transgenen *A. thaliana* Keimlingen ohne Saccharose-Zugabe.**

In den komplementierten *myb75* Keimlingen ( $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$ ) wurde die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie analysiert. Repräsentative Aufnahmen von GFP-MYB75 in (A) Hypokotylzellen; (B) Keimblattzellen; (C) Wurzelzellen; (D-F) entsprechende Hellfeld-Aufnahmen.

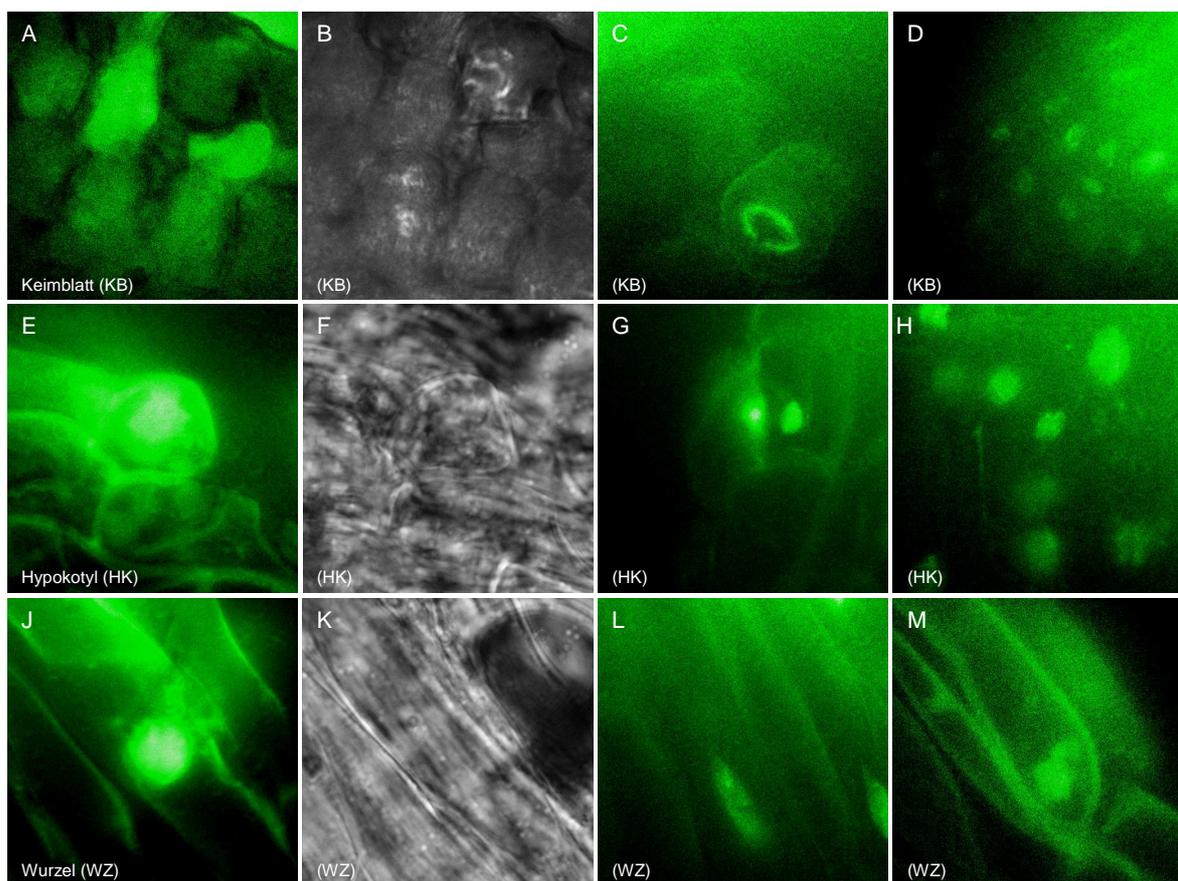
Sind die transgenen Keimlinge mit Saccharose angewachsen, konnte eine deutliche Fluoreszenz in den Zellen detektiert werden (Abb. 3-26). Sowohl in Keimblattzellen, aber auch in Hypokotyl- und Wurzelzellen akkumulierten die Fusionsproteine hauptsächlich im Zellkern. Die Konstrukte wurden dabei unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert. Eine schwache Akkumulation konnte ebenfalls im Cytoplasma detektiert werden. Insgesamt zeigte sich eine sehr differenzierte Expression des GFP-MYB75 Proteins im Keimling. Die stärkste Akkumulation des Fusionsproteins fand sich in den Zellen des Hypokotyls, wobei das Fusionsprotein fast ausschließlich im Zellkern akkumulierte. In den Keimblatt- und Wurzelzellen war nicht in allen Zellen eine GFP-Fluoreszenz zu detektieren. Nur die Zellen, die jeweils an das Hypokotyl angegliedert waren und den Übergang zu diesen Blattorganen darstellten, zeigten eine deutliche GFP-Fluoreszenz in den Zellkernen (Abb. 3-26). In den restlichen Zellen des Keimblattes und der Wurzel konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Die Hellfeldaufnahmen dienen der besseren Orientierung und unterstützen die Theorie der Zellkernakkumulation.



**Abbildung 3-26: In planta Lokalisation von GFP-MYB75 in transgenen *A. thaliana* Keimlingen mit 4% Saccharose-Zugabe.**

In den komplementierten *myb75* Keimlingen ( $\text{Pro}_{\text{MYB75}}::\text{GFP:MYB75}$ ) wurde die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie analysiert. Es werden repräsentative Aufnahmen von MYB75-GFP in (A-D) Keimblattzellen; (E-H) Hypokotylzellen; (J-M) Wurzelzellen gezeigt.

Es wurde ebenfalls die Lokalisation der bHLH Transkriptionsfaktoren in transgenen *A. thaliana* Keimlingen untersucht. Dazu wurden die Keimlinge auf Norflurazon mit und ohne Saccharose für fünf Tage wachsen lassen. Abbildung 3-27 zeigt die *in planta* Lokalisation der BHLH42-GFP Fusionsproteine in den Zellen der verschiedenen Pflanzenorgane. Dabei war eine deutliche Verteilung der Fluoreszenz in den Keimlingen zu erkennen, wenn die Fusionskonstrukte unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden. Sowohl in Hypokotyl-, als auch in Keimblatt- und Wurzelzellen akkumulierten die Fusionsproteine eindeutig in den Zellkernen (Abb. 3-27). Dabei war kein Unterschied zu erkennen, wenn die Keimlinge mit oder ohne Zucker anwuchsen. Es war eine eindeutige, klare und sehr starke Fluoreszenz nur in den Kernen der Zellen zu erkennen. Die Hellfeldaufnahmen dienen der besseren Orientierung innerhalb der Zellen. Die Lokalisation des Fusionsproteins BHLH42-Cherry lieferte entsprechende Ergebnisse, die nicht gezeigt sind.



**Abbildung 3-27: *In planta* Lokalisation von BHLH42-GFP in transgenen *A. thaliana* Keimlingen.**

In komplementierten *bhlh42* Keimlingen ( $Pro_{BHLH42}::BHLH42:GFP$ ) wurde die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie analysiert. Es werden repräsentative Aufnahmen von BHLH42-GFP in (A-D) Blattzellen; (E-H) Hypokotylzellen; (J-M) Wurzelzellen gezeigt.

Die mit  $Pro_{BHLH2}::GFP:BHLH2$  komplementierten *bhlh2* Keimlinge wurden ebenfalls auf die Verteilung der GFP-Fluoreszenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass GFP-BHLH2 in der Pflanze die gleiche Lokalisation aufwies wie BHLH42-GFP in den komplementierten *bhlh42* Keimlingen. Das Fusionsprotein wurde unabhängig von Saccharose im Medium in allen Teilen der Pflanze exprimiert und akkumulierte dabei ausschließlich im Zellkern (Daten siehe Anhang, 7.3).

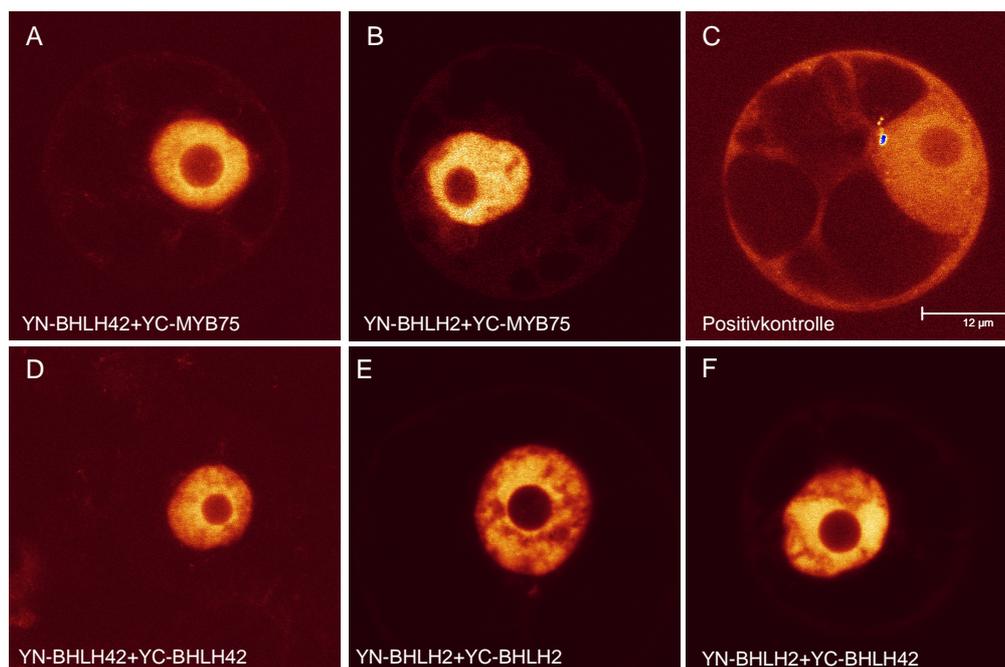
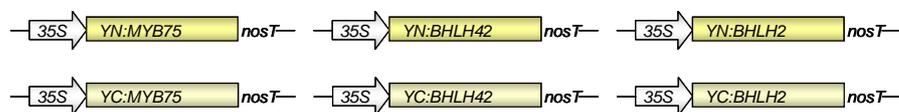
### 3.3.3 Analyse der Protein-Protein-Interaktion in BY-2 und At7-Protoplasten mittels BiFC

Mit Hilfe der FCS-Untersuchungen und der Kotransfektionsergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH42 bzw. MYB75 und BHLH2 nur gemeinsam an den *DFR*-Promotor binden bzw. nur in Kombination den *DFR*-Promotor aktivieren (Abb. 3-6 und 3-9). Diese Methoden zeigen aber nicht, ob die Transkriptionsfaktoren schon vor der Anlagerung an die DNA eine Interaktion im Cytoplasma eingehen oder ob sie erst im Kern interagieren und dann an den Promotor binden. Erste Hinweise hierauf konnten lediglich die FCS-Messungen geben, da keine Verschiebung der Diffusionszeit detektiert werden konnte, wenn nur eines der Proteine zusammen mit der DNA gemessen wurde. Nur mit beiden Proteinen gemeinsam konnte eine Verschiebung der Diffusionszeit detektiert werden. Mit Hilfe der BiFC-Methode sollte geklärt werden, ob und wann die Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Zellen eine Interaktion eingehen. Dabei wurde an jedes der beiden Transkriptionsfaktoren ein nicht-fluoreszierendes Fragment von YFP fusioniert, welches nach Dimerisierung der beiden Interaktionspartner ein fluoreszierendes Chromophor bilden konnte.

Werden die *Split*-YFP-Fusionsproteine YN-BHLH42 und YC-MYB75 in Protoplasten koexprimiert, ist es möglich, die Dimerisierung der pflanzlichen Proteine durch Zusammenführung beider YFP-Teilproteine (YN und YC) in pflanzlichen Zellen, d.h. im homologen System, sichtbar zu machen (vgl. 2.2.5.3). Durch die Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz wird das Dimerisierungsvermögen der an YC bzw. an YN fusionierten Proteine sichtbar (Hu *et al.*, 2002). Die YFP-Teilfragmente wurden N-terminal an die Transkriptionsfaktoren fusioniert und in einen Expressionsvektor kloniert. Jeder Transkriptionsfaktor wurde jeweils mit dem N- und dem C-terminalen YFP-Fragment fusioniert, um alle Kombinationen testen zu können. In den folgenden Abbildungen werden entsprechend repräsentative Aufnahmen gezeigt. Abbildung 3-28, A zeigt, dass die Koexpression von YN-BHLH42 und YC-MYB75 in Tabakprotoplasten zur Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz führte.

Im Gegensatz zum GFP-MYB75 Fusionsprotein, welches in der Zelle gleich verteilt zwischen Cytoplasma und Kern vorlag (Abb. 3-23), befand sich die Lokalisation des Dimers ausschließlich im Kern (Abb. 3-28, A). Abbildung 3-28, B zeigt, dass die Koexpression von YN-BHLH2 und YC-MYB75 in Tabakprotoplasten ebenfalls zur Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz führte. Die Lokalisation des Dimers war ausschließlich im Kern zu finden.

Um zu überprüfen, ob die Proteine in dem Regulationskomplex als Homodimere vorliegen, wurde zusätzlich die Komplexbildung der bHLH und MYB Proteine untereinander analysiert. Die Koexpression von YN-BHLH42 und YC-BHLH42 führte zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz mit einer subzellulären Lokalisation des homodimeren Proteins ausschließlich im Kern (Abb. 3-28, D).

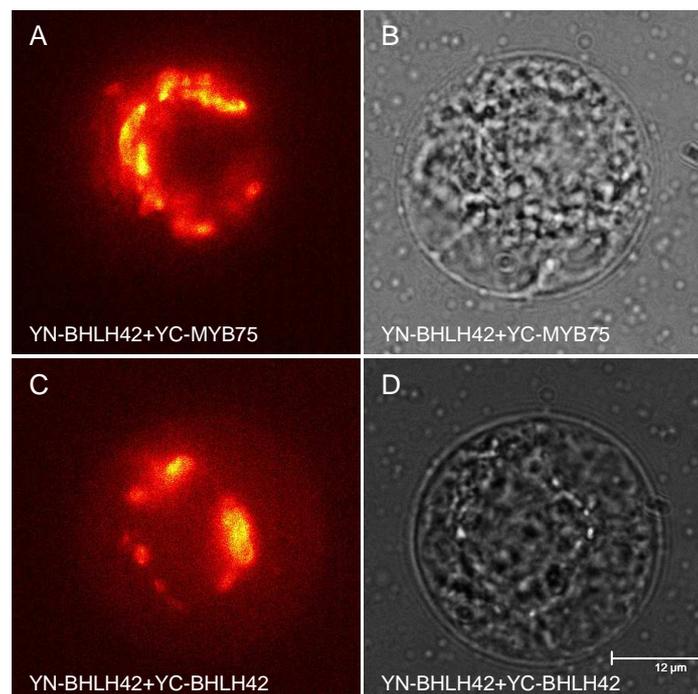


**Abbildung 3-28: Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten *Split*-YFP-Fusionsproteinen in Tabakprotoplasten.**

BY-2 Protoplasten wurden transient mit *Split*-YFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und die Lokalisation der YFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Alle Proteine wurden gegenseitig als YN- und als YC-Fusionen getestet. Es sind nur die Bilder transfizierter Protoplasten gezeigt, wenn eine Rekonstitution der Fluoreszenz stattgefunden hat. Für jede Dimerisierung werden repräsentative Aufnahmen gezeigt: (A) YN-BHLH42 + YC-MYB75; (B) YN-BHLH2 + YC-MYB75; (C) Positivkontrolle; (D) YN-BHLH42 + YC-BHLH42; (E) YN-BHLH2 + YC-BHLH2; (F) YN-BHLH2 + YC-BHLH42.

Die Koexpression von YN-BHLH2 und YC-BHLH2 führte ebenfalls zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz. Die Lokalisation des Homodimers konnte mit einer sehr starken Akkumulation im Kern gezeigt werden (Abb. 3-28, E). Neben der Möglichkeit der Homodimerisierung der bHLH-Proteine wurde zusätzlich getestet, ob die bHLH-Proteine der Subgruppe IIIf ebenfalls untereinander Heterodimere bilden. Abbildung 3-28, F zeigt, dass BHLH2 und BHLH42 gemeinsam interagieren konnten. Eine Rekonstitution der beiden YFP-Teilfragmente war ausschließlich im Kern der Tabakprotoplasten zu finden. Die BiFC-Methode lieferte somit zusätzliche Informationen über den subzellulären Ort der Transkriptionsfaktor-Interaktion. Wurde dagegen YN-MYB75 mit YC-MYB75 koexprimiert, führte dies nicht zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz. Es konnte in keiner Zelle eine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Analog zu der Analyse in Tabakprotoplasten wurden mit den gleichen Konstrukten Analysen in At7-Protoplasten durchgeführt. Mit der Weitfeldmikroskopie ergab sich ein detaillierteres Bild der Dimerisierung. Abbildung 3-29, A zeigt, dass die Koexpression von YN-BHLH42 und YC-MYB75 in At7-Protoplasten zur Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz führte.

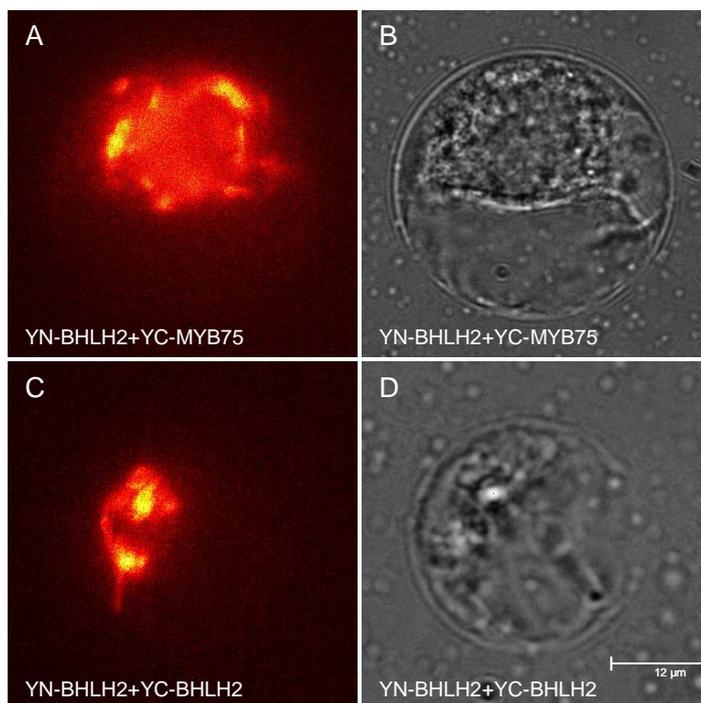


**Abbildung 3-29: Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten Split-YFP-Fusionsproteinen in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit *Split*-YFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und die Lokalisation der YFP-Fluoreszenz mittels Weitfeldmikroskopie analysiert. Es sind nur die Bilder transfizierter Protoplasten gezeigt, wenn eine Rekonstitution der Fluoreszenz stattgefunden hat. Für jede Dimerisierung wurden repräsentative Aufnahmen gezeigt: (A) YN-BHLH42 + YC-MYB75; (B) die dazugehörige Hellfeldaufnahme; (C) YN-BHLH42 + YC-BHLH42; (D) die entsprechende Hellfeldaufnahme.

Wie schon bei der Analyse in BY-2 Protoplasten konnte auch in At7-Protoplasten gezeigt werden, dass eine klare Lokalisation des Dimers ausschließlich im bzw. um den Kern vorlag. Dabei lagerten sich die Dimere ringförmig um den Kern an, was durch die Hellfeldaufnahme bestätigt werden kann (Abb. 3-29, B). Die Koexpression von YN-BHLH42 und YC-BHLH42 führte, wie in Abbildung 3-28 für Tabakprotoplasten gezeigt, auch in At7-Protoplasten, zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz (Abb. 3-29, C). Das Homodimer akkumulierte dabei ringförmig am bzw. um den Zellkern. Die Lokalisation des BHLH42-MYB75 Komplexes konnte also in den lebenden At7-Protoplasten detektiert werden, ebenso wie die Lokalisation des BHLH42-Homodimers. Die Komplexbildung scheint dabei direkt am Kern stattzufinden (Abb. 3-29, C).

Abbildung 3-30 A zeigt, dass die Koexpression von YN-BHLH2 und YC-MYB75 in At7-Protoplasten ebenfalls zur Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz führte. Wie schon bei der Analyse in BY-2 Protoplasten konnte auch in At7-Protoplasten gezeigt werden, dass eine eindeutige Lokalisation des Dimers im bzw. um den Kern vorlag. Die Dimere lagerten sich dabei ringförmig um den Kern an, was durch die Hellfeldaufnahme bestätigt werden kann (Abb. 3-30, B).



**Abbildung 3-30: Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten Split-YFP-Fusionsproteinen in At7-Protoplasten.**

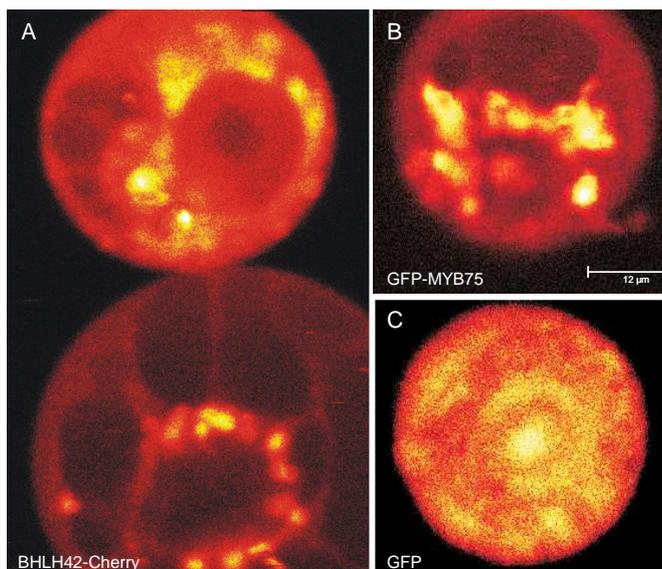
At7-Protoplasten wurden transient mit *Split*-YFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und die Lokalisation der YFP-Fluoreszenz mittels Weitfeldmikroskopie analysiert. Es sind nur die Bilder transfizierter Protoplasten gezeigt, wenn eine Rekonstitution der Fluoreszenz stattgefunden hat. Für jede Dimerisierung wurden repräsentative Aufnahmen gezeigt: (A) YN-BHLH2 + YC-MYB75; (B) die dazugehörige Hellfeldaufnahme; (C) YN-BHLH2 + YC-BHLH2; (D) die entsprechende Hellfeldaufnahme.

Die Koexpression von YN-BHLH2 und YC-BHLH2 führte auch in At7-Protoplasten, zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz (Abb. 3-30, C). Das Homodimer akkumulierte dabei ringförmig am bzw. um den Zellkern. Die Lokalisation des BHLH2-MYB75 Komplexes konnte also ebenfalls in den lebenden At7-Zellen detektiert werden, ebenso wie die Lokalisation des BHLH2-Homodimers. Die Koexpression von YN-MYB75 und YC-MYB75 führte auch in At7-Protoplasten zu keiner Rekonstitution der Fluoreszenz. In keinem transfizierten Protoplasten konnte eine YFP-Fluoreszenz detektiert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass MYB75 nicht in der Lage ist, Homodimere zu bilden.

### **3.3.4 Analyse der Protein-Protein-Interaktion mittels FRET in Protoplasten und in *A. thaliana* Keimlingen**

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) von YFP ist eine effektive Methode, um Protein-Interaktionen wie Dimerisierungen *in vivo* nachzuweisen. Dennoch ist diese Methode nicht authentisch, da die Komplementation der beiden YFP-Teilfragmente irreversibel ist. Die Proteine werden dabei ihrem normalen Gleichgewicht entzogen. Um die dynamische Interaktion der Fluoreszenzproteine im lebenden System zu analysieren, wurde die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)- Methode (Förster, 1948) angewandt. Mit dieser fluoreszenzspektroskopischen Methode können Protein-Protein-Wechselwirkungen im Gleichgewicht der lebenden Zelle untersucht werden. Abbildung 3-31 zeigt exemplarische Abbildungen der Akkumulation von BHLH42-Cherry (A) und GFP-MYB75 (B) um den Zellkern von At7-Protoplasten, wenn die Zellen mit konfokaler Imaging-Mikroskopie gescannt werden. Dabei wurde ähnlich der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie auf einen kleinen Bereich der Probe fokussiert und die Zellen mit einem Laser gescannt. Mit dieser Methode war es möglich, die Fluoreszenz einzelner Moleküle zu messen, die nach Anregung von GFP auf Cherry übertragen werden konnte, wenn sich beide Fluoreszenzmoleküle in geringem Abstand zueinander befanden.

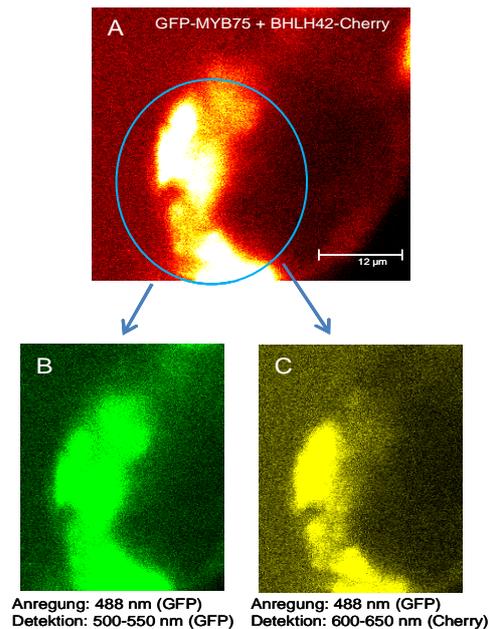
Besonders wichtig bei der FRET-Methode war, dass das zu untersuchende Protein nach der Markierung mit fluoreszierenden Proteinen noch seine biologische Aktivität behielt. Daher wurden für die Messung der Interaktion mittels FRET die Fusionsproteine eingesetzt, die bereits in den At7-Kotransfektionen positiv getestet wurden (vgl. 3.2.1) und ebenfalls in transfizierten Protoplasten nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-31).



**Abbildung 3-31: Die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit den Konstrukten  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  bzw.  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  transfiziert, um die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP bzw. der roten Fluoreszenz von Cherry mit Hilfe der konfokalen Imaging-Mikroskopie zu analysieren. Repräsentative Aufnahmen zeigen (A) BHLH42-Cherry; (B) GFP-MYB75; (C) GFP (als Positivkontrolle).

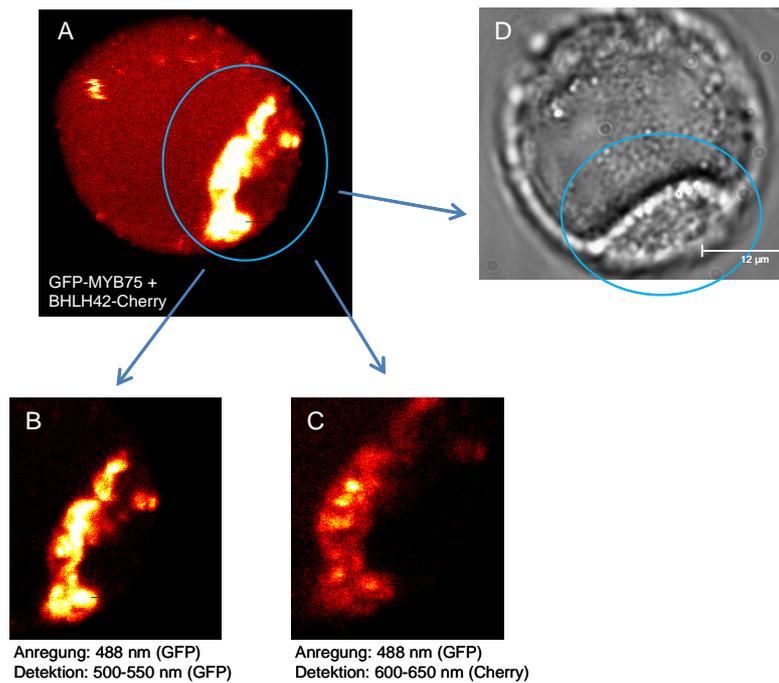
Zunächst wurden die Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH42-Cherry auf ihre Interaktion in At7-Protoplasten getestet, wenn sie unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimiert wurden. Dabei zeigte sich, dass eine starke Akkumulation der Fluoreszenzproteine im Kern der transfizierten Protoplasten auftrat. In Abbildung 3-32 ist ein Ausschnitt des Zellkerns des Protoplasten gezeigt. Wurde GFP mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, konnte die GFP-Fluoreszenz mit 500-550 nm detektiert werden (Abb. 3-32, B). Fand eine Anregung mit 488 nm statt, konnte Cherry-Fluoreszenz bei 600-650 nm (durch Separation der Detektionskanäle) detektiert werden (Abb. 3-32, C). Dort, wo sich die beiden Fluorophore in einem Bereich zwischen 2-10 nm befanden, konnte das GFP-Fluorophor (Donor) seine Anregungsenergie durch den Energietransfer strahlungslos über Dipol-Dipol Kopplung im Nahfeld auf das Akzeptormolekül (Cherry) übertragen (FÖRSTER-Transfer). Hier musste also ein Energieübertrag von GFP auf Cherry stattgefunden haben, da ansonsten bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm keine Detektion der Cherry-Fluoreszenz stattfinden konnte.



**Abbildung 3-32: Die subzelluläre Interaktion der Fusionsproteine BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit 35S::*BHLH42:Cherry* und 35S::*GFP:MYB75* transfiziert, um die Lokalisation der Interaktion mittels FRET zu analysieren. (A) Akkumulation von BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 im Zellkern des Protoplasten; (B) GFP-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 500-550 nm; (C) Cherry-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 600-650 nm (Energieübertrag hat stattgefunden).

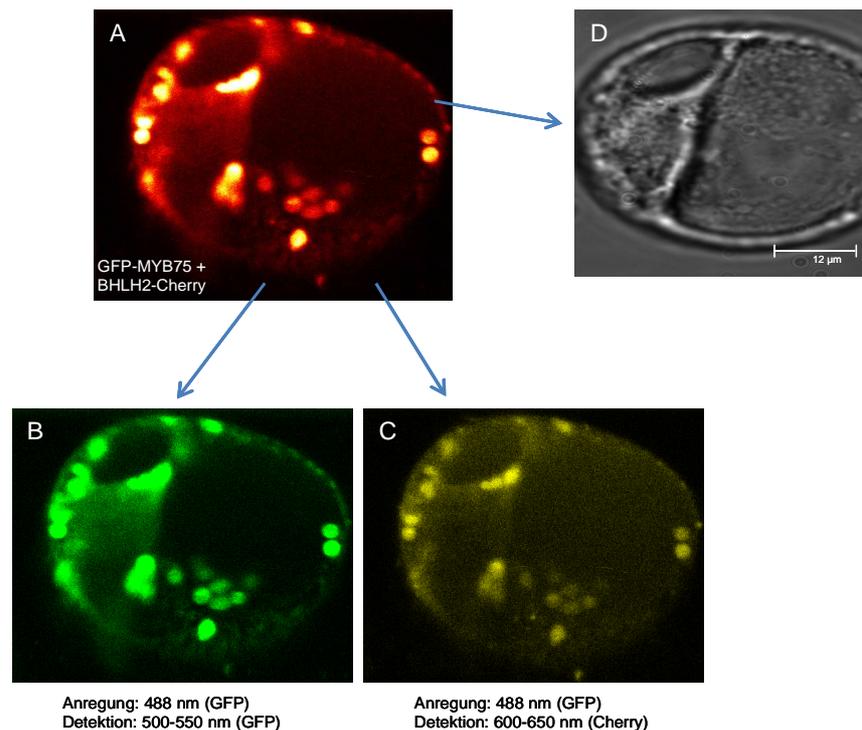
Da die Interaktion unter möglichst natürlichen Bedingungen untersucht werden sollte, wurden Fusionsproteine eingesetzt, die unter der Kontrolle ihrer jeweiligen nativen Promotoren exprimiert wurden. Die Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH42-Cherry wurden auf ihre Interaktion in At7-Protoplasten getestet, wenn sie unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden. Dabei zeigte sich, dass eine starke Akkumulation der Fluoreszenzproteine im bzw. um den Kern der transfizierten Protoplasten auftrat (Abb. 3-33, A). Zur besseren Orientierung ist der transfizierte Protoplast in einer Hellfeldaufnahme gezeigt (Abb. 3-33, D). Wurde der Protoplast mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, konnte eine GFP-Fluoreszenz bei 500-550 nm detektiert werden (Abb. 3-33, B). Durch die Möglichkeit der Separation der Detektionskanäle konnte bei einer Anregung von 488 nm ebenfalls eine Detektion bei einer Wellenlänge von 600-650 nm (Cherry) stattfinden (Abb. 3-33, C). Auch unter nativen Expressionsbedingungen konnte ein Energieübertrag von GFP auf Cherry gemessen werden. Dies konnte nur ermöglicht werden, da sich die beiden Fluoreszenzproteine, auch wenn sie unter der Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors exprimiert wurden, in einer geringen Nähe zueinander befanden.



**Abbildung 3-33: Subzelluläre Lokalisation der Interaktion der Fusionsproteine BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit den Konstrukten  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  und  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  transfiziert um die Lokalisation der Interaktion mittels FRET zu analysieren. (A) Akkumulation von BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 im Zellkern des Protoplasten; (B) GFP-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 500-550 nm; (C) Cherry-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 600-650 nm (Energieübertrag hat stattgefunden). (D) Hellfeld-Aufnahme des Protoplasten.

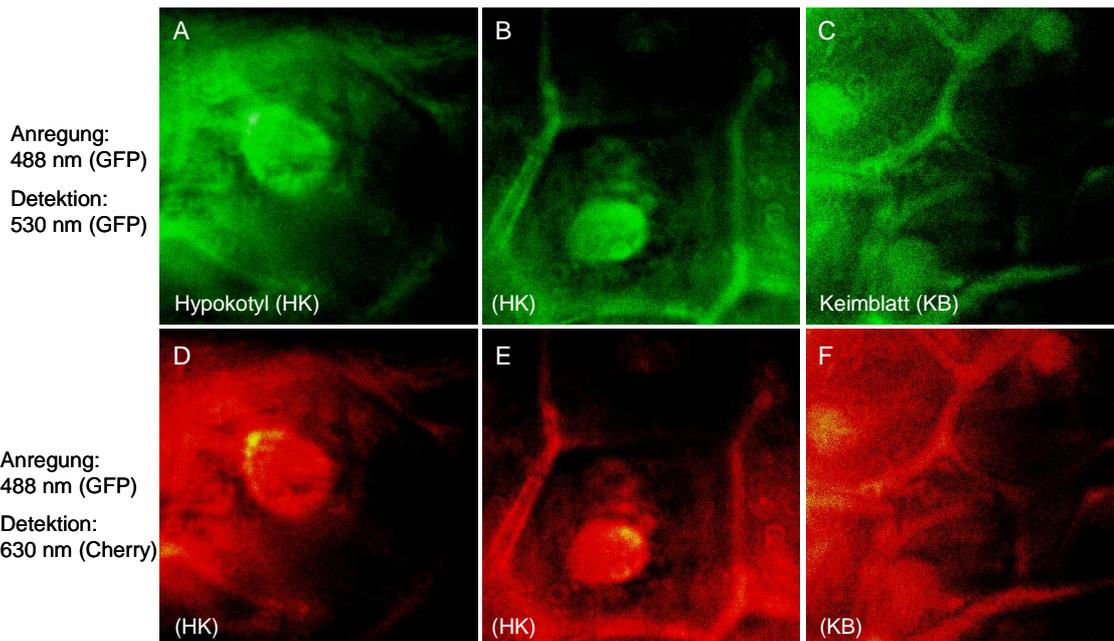
Die Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH2-Cherry wurden ebenfalls auf ihre Interaktion in At7-Protoplasten getestet, wenn sie unter der Kontrolle der nativen Promotoren exprimiert wurden. Dabei zeigte sich, dass eine Akkumulation der Fluoreszenzproteine in vesikelähnlichen Strukturen um den Kern und im Cytoplasma der transfizierten Protoplasten auftrat (Abb. 3-34, A). Zur besseren Orientierung ist der transfizierte Protoplast in einer Hellfeldaufnahme gezeigt (Abb. 3-34, D). Wurde der Protoplast mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, konnte eine GFP-Fluoreszenz bei 500-550 nm an den gleichen Stellen detektiert werden (Abb. 3-34, B). Erfolgte bei einer Anregung von 488 nm eine Detektion der Cherry-Fluoreszenz konnte von einem Energieübertrag ausgegangen werden (Abb. 3-34, C). Die Interaktion der beiden Fusionsproteine fand verstärkt in der Nähe des Zellkerns statt, war aber ebenfalls in vesikelähnlichen Strukturen im Cytoplasma zu finden (Abb. 3-34, C).



**Abbildung 3-34: Subzelluläre Lokalisation der Interaktion der Fusionsproteine BHLH2-Cherry und GFP-MYB75 in At7-Protoplasten.**

At7-Protoplasten wurden transient mit den Konstrukten *Pro<sub>BHLH2</sub>::BHLH2:Cherry* und *Pro<sub>MYB75</sub>::GFP:MYB75* transfiziert, um die Lokalisation der Interaktion mittels FRET zu analysieren. (A) Akkumulation von BHLH2-Cherry und GFP-MYB75 um den Zellkern und im Cytoplasma des Protoplasten; (B) GFP-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 500-550 nm; (C) Cherry-Fluoreszenz detektiert durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 600-650 nm (Energieübertrag hat stattgefunden). (D) Hellfeld-Aufnahme des Protoplasten.

Um zu überprüfen, ob diese Fusionsproteine ebenfalls in Pflanzen miteinander interagieren, wurden die doppelt komplementierten *myb75 bhlh42* Doppelmutanten (vgl. 3.2.2) zur Analyse herangezogen. Analog zu den Lokalisationsstudien wurden die Keimlinge auf Filterpapier mit Norfluorazon und Saccharose angezogen, um die Expression der Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH42-Cherry unter der Kontrolle des nativen Promotors zu stimulieren. Wie in Protoplasten-Analysen wurde der Energietransfer in pflanzlichen Hypokotyl- und Keimblattzellen gemessen (Abb. 3-35). Sowohl in den Zellkernen der pflanzlichen Keimblatt- als auch Hypokotylzellen konnte eine klare Cherry-Fluoreszenz nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm gemessen werden (Abb. 3-35, D-F). In den pflanzlichen Zellen akkumulieren die Fluoreszenzproteine so dicht beieinander, dass demnach ein Energietransfer von GFP nach Cherry ermöglicht wurde.

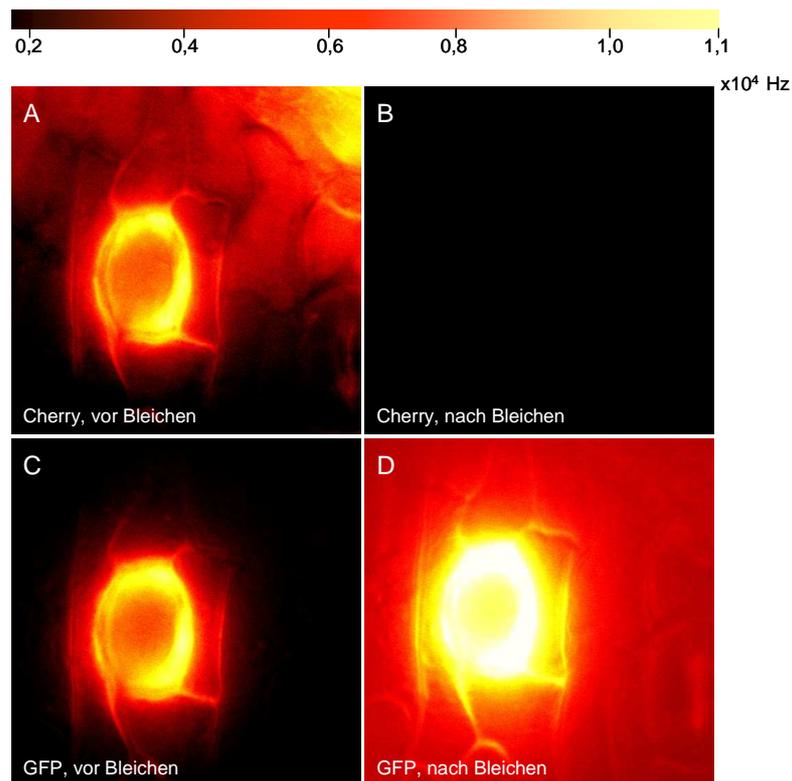


**Abbildung 3-35: In planta Lokalisation der Interaktion der Fusionsproteine BHLH42-Cherry und GFP-MYB75 in transgenen *A. thaliana* Keimlingen.**

Die *A. thaliana* Keimlinge wurden stabil mit den Konstrukten  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  und  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  transformiert, um die Lokalisation der Interaktion mittels FRET zu analysieren. (A-C) Detektion der GFP-Fluoreszenz durch die Anregung mit 488 nm; (D-F) Detektion der Cherry-Fluoreszenz durch Anregung mit 488 nm und Detektion mit 600-650 nm (Energieübertrag hat stattgefunden).

Um kontrollieren zu können, dass der Energieübertrag von dem Donormolekül (GFP) auf das Akzeptormolekül (Cherry) tatsächlich stattgefunden hat, wurde ein Bleichversuch durchgeführt. Der Energieübertrag kann nur ermöglicht werden, wenn das Cherry-Fluorophor funktional ist. Durch den Übertrag von Energie wird die Fluoreszenz des Donormoleküls schwächer. Ist das Cherry-Fluorophor nach dem Bleichen nicht mehr funktional, kann kein Energieübertrag mehr stattfinden und das Donor-Molekül müsste stärker fluoreszieren. Abbildung 3-36 zeigt eine Zelle des Hypokotylgewebes in transgenen *A. thaliana myb75 bhlh42* Doppelmutanten, die mit den Konstrukten  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  und  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  transformiert wurden.

In der pflanzlichen Zelle konnte vor dem Bleichen des Cherry-Fluorophors GFP und Cherry detektiert werden (Abb. 3-36, A und C). Wurden die Cherry-Fluorophore für wenige Minuten mit dem Laser stark gebleicht, war anschließend keine Cherry-Fluoreszenz mehr detektierbar (Abb. 3-36, B). Das Fluoreszenzprotein war demnach nicht mehr funktional. Im Vergleich dazu wurde die Fluoreszenz von GFP nach dem Bleichen des Akzeptormoleküls gemessen (Abb. 3-36, D).



**Abbildung 3-36: Kontrolle der Energieübertragung (FRET) von GFP auf Cherry in transgenen *A. thaliana* Keimlingen.**

Die *A. thaliana* Keimlinge wurden stabil mit den Konstrukten  $Pro_{MYB75}::GFP:MYB75$  und  $Pro_{BHLH42}::BHLH42:Cherry$  transformiert, um die Energieübertragung mittels FRET zu analysieren. (A-B) Detektion der Cherry-Fluoreszenz (Akzeptor) vor und nach dem Bleichen; (C-D) Detektion der GFP-Fluoreszenz (Donor) vor und nach dem Bleichen. Die Skala zeigt farblich die Stärke der Fluoreszenz an ( $0,2-1,1 \times 10^4$  Hz).

Es war zu erkennen, dass die Fluoreszenz der GFP-Moleküle (Donor) nach dem Bleichen der Akzeptormoleküle (Cherry) signifikant stärker detektiert werden konnte als vor dem Bleichen des Akzeptors. Diese Kontrolle zeigt, dass ein Energieübertrag stattgefunden haben muss, der nach dem Verlust der Funktionalität der Cherry-Moleküle nicht mehr möglich war. Dadurch, dass GFP nach dem Bleichen von Cherry keinen Energieübertrag mehr vollziehen konnte, wurde eine stärkere GFP-Fluoreszenz gemessen.

Durch diese Kontrollen konnte gezeigt werden, dass sowohl in Protoplasten als auch in Pflanzen Energietransfer zwischen den fluoreszierenden Proteinen stattgefunden hat. Das bedeutet, dass sich die Fusionsproteine GFP-MYB75 und BHLH42-Cherry in den Zellen in dichter räumlicher Nähe zueinander befunden haben.

### 3.4 Regulation der Saccharose-induzierten Anthocyanakkumulation in jungen *A. thaliana* Keimlingen

Viele Strukturgene, die für die Anthocyanakkumulation verantwortlich sind, sind sowohl entwicklungspezifisch als auch als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren durch die Kombination von MYB und bHLH mit TTG1 Proteinen reguliert (Quattrocchio *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Carey *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006). Wo und zu welchem Entwicklungszeitpunkt die Anthocyane gebildet werden, hängt von den Proteinen ab, die sich zu einem regulierenden Komplex zusammenfügen (Winkel-Shirley *et al.*, 2001; Solfanelli *et al.*, 2006). Ebenso ist die Kombination der Interaktion dafür verantwortlich, ob die Anthocyane als Antwort auf äußere Stressfaktoren gebildet werden und ob es sich um eine positive oder negative Regulation der Strukturgene handelt (Gonzales *et al.*, 2008). Die Zunahme der Pigmentproduktion beruht auf einer Hochregulation des gesamten Anthocyanbiosyntheseweges. Dabei werden hauptsächlich die „späten“ Gene durch die Kombination von R2R3-MYB und bHLH Proteinen zusammen mit TTG1 reguliert (Borevitz *et al.*, 2000; Tohge *et al.*, 2005). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welche Kombination von Transkriptionsfaktoren für die UV- bzw. Saccharose-spezifische Anthocyanakkumulation in jungen *A. thaliana* Keimlingen verantwortlich ist.

#### 3.4.1 Akkumulation von Anthocyanen als Reaktion auf UV- und Saccharose-Stress

Werden Wildtyp Keimlinge von *A. thaliana* auf zuckerhaltigem Medium angezogen, reagieren diese mit erhöhter Akkumulation von Anthocyanen im Hypokotyl und in den Keimblättern (Abb. 3-37, A). Um zu untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren für diese erhöhte Anthocyanakkumulation unter Zuckerstress verantwortlich sind und welche Strukturgene vermehrt exprimiert werden, wurden verschiedene Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten auf Medium mit Saccharose ausgelegt, für sechs Tage unter Langtagbedingungen angezogen und anschließend phänotypisch und photometrisch die Anthocyanmenge bestimmt. Wachsen diese Keimlinge auf Medium ohne Zucker, zeigt keine Pflanze eine Anthocyanakkumulation. Auf Saccharose-haltigem Medium zeigen die *myb90* und *bhlh42* Mutanten den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp (Abb. 3-37, C, E), während die *myb75* und *bhlh2* Mutanten eine deutlich reduzierte Anthocyanakkumulation zeigen (Abb. 3-37, B und D).



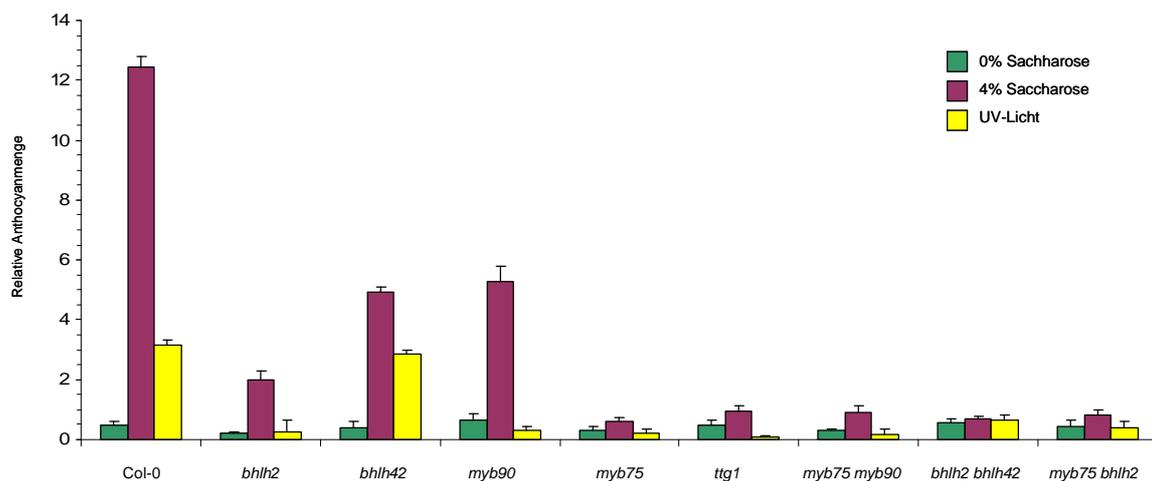
**Abbildung 3-37: Anthocyanakkumulation in jungen *A. thaliana* Keimlingen.**

Beim Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium zeigen *A. thaliana* Keimlinge Unterschiede in der Anthocyanakkumulation. Wildtyp Pflanzen zeigen eine starke Anthocyanakkumulation als Reaktion auf den Zucker (A). Einige *knock-out* Linien dagegen reagieren mit einer stark reduzierten Akkumulation von Anthocyanen. Repräsentative Aufnahmen von (B) *myb75*; (C) *myb90*; (D) *bhlh2*; (E) *bhlh42*; (F) *ttg1*; (G) *myb75 myb90*; (H) *bhlh2 bhlh42*. Bei Wachstum auf Medium ohne Saccharose zeigt kein Keimling eine Rotfärbung durch Anthocyanakkumulation (Daten nicht gezeigt).

Die neu generierten Doppelmutanten *myb75 myb90*, *bhlh2 bhlh42* und *myb75 bhlh2* zeigen beim Wachstum auf saccharosehaltigem Medium gar keine Anthocyane mehr (Abb. 3-37, G, H und J), wie es ebenfalls bei der anthocyanlosen Referenzlinie *ttg1* zu beobachten ist (Abb. 3-37, F).

Abbildung 3-38 zeigt die relative Anthocyanakkumulation als Antwort auf Saccharose und UV-Licht. Dabei wurden aus den verschiedenen Keimlingen nach dem Wachstum auf Saccharose bzw. unter UV-Licht durch eine saure methanolische Extraktion die Anthocyane extrahiert und anschließend die relative Menge durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Als Referenz einer bekanntlich anthocyanlosen Pflanze dient hier die

*ttg1* Mutante. Wachsen die verschiedenen Keimlinge auf Medium ohne Saccharose, so ist bei keiner Pflanze eine Anthocyanakkumulation zu erkennen (Abb. 3-38, grün). Werden die verschiedenen Linien auf saccharosehaltigem Medium angezogen, zeigen vor allem die Wildtyp-Pflanzen, aber auch *myb90* und *bhlh42* eine vermehrte Anthocyanakkumulation als Reaktion auf den abiotischen Stress (Abb. 3-38, violett). Bei *bhlh2* ist eine sehr geringe Menge an Anthocyanen detektiert worden, während bei *myb75*, *ttg1* und den drei generierten Doppelmutanten (fast) keine Anthocyanakkumulation mehr gemessen werden konnte (Abb. 3-38, violett). Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Mutanten ebenfalls auf UV-Stress reagieren, wurde die relative Anthocyanmenge gemessen, nachdem die sechs Tage alten Keimlinge für acht Stunden unter UV-Bestrahlung gewachsen sind. Dabei lässt sich zeigen, dass neben den Wildtyp-Pflanzen nur die *bhlh42* Linie auf die UV-Bestrahlung mit vermehrter Anthocyanakkumulation reagiert hat (Abb. 3-38, gelb).

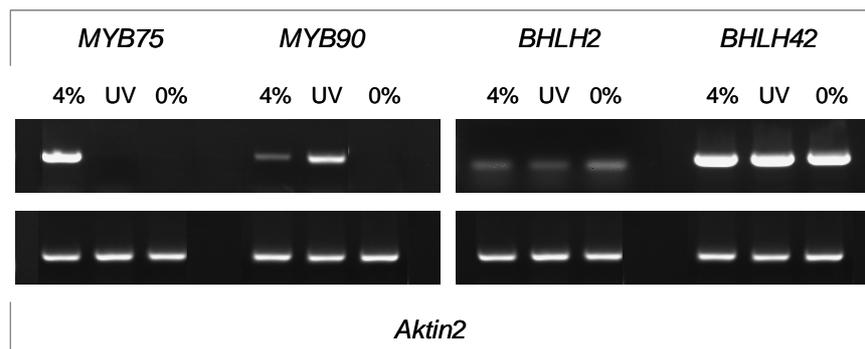


**Abbildung 3-38: Quantifikation der Anthocyanmenge in Keimlingen bei Saccharose- und UV-Stress.**

Relative Anthocyanmenge von sechs Tage alten *A. thaliana* Keimlingen, die auf 0% Saccharose (grün) bzw. auf 4% Saccharose (violett) oder unter UV-Licht (gelb) gewachsen sind.

Die Analyse der mRNA Akkumulation der vier Transkriptionsfaktoren in Wildtyp-Pflanzen zeigt, dass diese in Bezug auf abiotische Stressfaktoren unterschiedlich reguliert sind. Wachsen die Wildtyp-Pflanzen auf Medium ohne Zucker, können keine Transkripte von *MYB75* und von *MYB90* detektiert werden (Abb. 3-39). Wachsen die Keimlinge auf Hochzucker (4% Saccharose), kann eine erhöhte Transkriptmenge von *MYB75* nachgewiesen werden. *MYB90* dagegen wird in geringen Mengen nachgewiesen. Bei den bHLH-Proteinen sieht die Akkumulation der Transkripte in Bezug auf äußere Stressfaktoren anders aus. Sowohl *BHLH2* als auch *BHLH42* Transkripte akkumulieren in

den Pflanzen unabhängig vom Zuckerstress. Dabei kann eine starke Expression von *BHLH42* mit und ohne Saccharose im Medium nachgewiesen werden, während *BHLH2* in geringer Menge, aber stetig, exprimiert wird. Auch in Bezug auf UV-Stress zeigen die bHLH-Proteine keine veränderte Akkumulation. Die *MYB* Transkripte dagegen zeigen eine deutliche Veränderung in Bezug auf UV-Bestrahlung. Die mRNA Akkumulation von *MYB75* kann unter UV-Stress nicht nachgewiesen werden, während *MYB90* eine erhöhte Akkumulation unter UV-Stress zeigt (Abb. 3-39).



**Abbildung 3-39: Expression der Transkriptionsfaktoren als Reaktion auf Saccharose- und UV-Stress.**

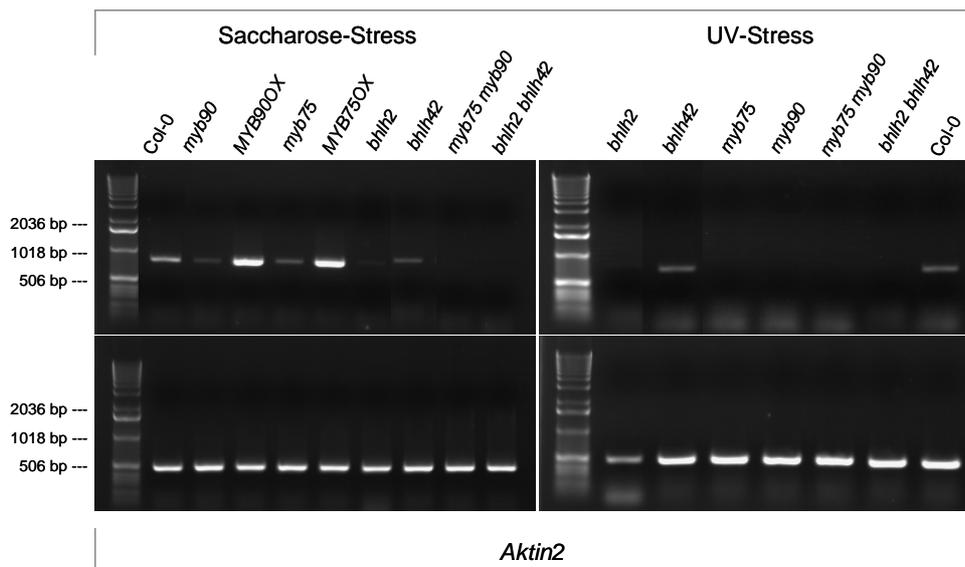
RT-PCR Analysen zeigen die Akkumulation der *MYB* und *bHLH* Transkripte in Wildtyp-Pflanzen als Reaktion auf Saccharose- (4%) und UV-Stress (UV) im Vergleich zum Wachstum ohne Stress (0%). *Aktin2* dient als Positivkontrolle der RT-PCR.

### 3.4.2 Die Regulation des *DFR*-Promotors durch UV- und Saccharose-Stress

Ein wichtiger Zweig in der Anthocyanbiosynthese ist die Regulation des *DFR*-Promotors. Wenn in Transkriptionsfaktor *knock-out* Keimlingen die Anthocyanbiosynthese gestört ist, resultiert das in einer Reduktion der Anthocyanakkumulation. In Abbildung 3-40 ist die Analyse der Expression des *DFR*-Promotors dargestellt. In den verschiedenen Mutanten ist die *DFR*-mRNA Akkumulation in Bezug auf Saccharose- und UV-Stress gezeigt. Eine stark erhöhte Akkumulation des *DFR* Transkripts zeigt sich in den Überexpressionspflanzen von *MYB75OX* (*overexpression*) und *MYB90OX*, wenn diese auf Saccharosehaltigem Medium wachsen (Abb. 3-40, Saccharose-Stress). In den *myb75*, *myb90* und *bhlh42* Mutanten ist die Akkumulation des *DFR* Transkripts, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, in Bezug auf Saccharose-Stress dagegen vermindert (Abb. 3-40). Die *DFR*-Expression in der *bhlh2* Mutante ist, wie die *DFR*-Expression in den beiden

Doppelmutanten, unter Saccharose-Stress ebenfalls so stark vermindert, dass sie kaum detektiert werden kann bzw. nicht mehr vorhanden ist (Abb. 3-40).

Unter UV-Stress zeigt sich ein anderes Muster in der Akkumulation des *DFR* Transkripts. Nur in der *bhlh42* Mutante und in Wildtyp-Pflanzen ist eine Akkumulation des Transkripts zu detektieren (Abb. 3-40, UV-Stress). In keiner der anderen getesteten Pflanzen ist eine Expression des *DFR*-Transkripts zu erkennen.



**Abbildung 3-40: Expression der *DFR* in den Keimlingen als Reaktion auf Saccharose- und UV-Stress.**

RT-PCR Ergebnisse zeigen die Akkumulation der *DFR* Transkripte in den verschiedenen *knock-out* Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen als Reaktion auf Saccharose- (4%) und UV-Stress. *Aktin2* dient als Positivkontrolle der RT-PCR.

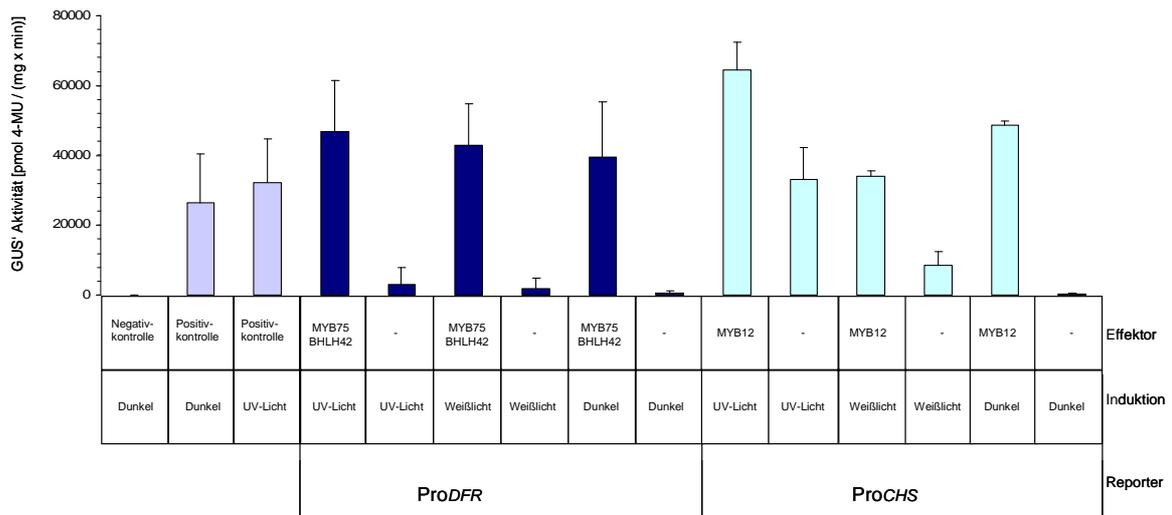
Wurden transgene Keimlinge (35S::*MYB75* (*MYB75OX*) bzw. 35S::*MYB90* (*MYB90OX*)), für sechs Tage auf Saccharose-haltigem Medium wachsen gelassen, zeigten beide Überexpressionspflanzen eine deutlich erhöhte Anthocyanakkumulation im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen (Abb. 3-41). Die entsprechenden *knock-out* Mutanten zeigten dagegen eine deutlich unterschiedliche Anthocyanakkumulation beim Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium. Die *myb75* Mutante akkumulierte fast keine Anthocyane mehr, während *myb90* den anthocyanreichen Wildtyp-Phänotyp zeigte (Abb. 3-37).



**Abbildung 3-41: Anthocyanakkumulation in jungen *A. thaliana* Keimlingen.**

Beim Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium zeigen *A. thaliana* Überexpressionspflanzen von *MYB75* und *MYB90* eine stark erhöhte Anthocyanakkumulation im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen. (A) Col-0; (B) *MYB75OX*; (C) *MYB90OX*.

Aus At7-Kotransfektionsexperimenten ist bereits bekannt, dass der *CHS*-Promotor lichtaktivierbar ist (Hartmann, 1997). Dieses „frühe“ Gen der Anthocyanbiosynthese enthält eine sogenannte lichtregulatorische Einheit, die aus *cis*-wirkenden Elementen besteht (Hartmann, 1997). Diese *cis*-wirkenden Sequenzen finden sich ebenfalls in dem *DFR*-Promotor. Dieses „späte“ Gen der Anthocyanbiosynthese kann dagegen nur durch die Kombination zweier Transkriptionsfaktoren in Kotransfektionsstudien aktiviert werden. In Abbildung 3-42 ist die Analyse der Lichtaktivierbarkeit des *DFR*- und des *CHS*-Promotors in At7-Kotransfektionsstudien gezeigt. Als Reporter wurde ein 520 bp langes *DFR*-Promotorfragment (*ProDFR*<sub>520</sub>) bzw. ein 1972 bp langes *CHS*-Promotorfragment (*ProCHS*<sub>1972</sub>) genutzt, das jeweils die *cis*-wirkenden Sequenzen enthält, die notwendig für die Aktivierung des Promotors sind. Als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors wurden die Effektoren *MYB75* und *BHLH42* eingesetzt. Für den *CHS*-Promotor wurde als Positivkontrolle *MYB12* eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass der *CHS*-Promotor sowohl durch UV-Licht als auch durch Weißlicht aktiviert werden kann, ohne dass ein weiterer Effektor zugesetzt werden musste. Dabei ist die Aktivierung durch UV-Licht wesentlich stärker als durch Weißlicht. In Dunkelheit zeigt der *CHS*-Promotor ohne Effektor keine Aktivierung (Abb. 3-42). Der *DFR*-Promotor ist dagegen weder durch UV-Licht noch durch Weißlicht aktivierbar, wenn keine zusätzlichen Effektoren zugegeben werden. Nur durch Zugabe beider Effektoren kann eine Aktivierbarkeit des *DFR*-Promotors im Kotransfektionssystem beobachtet werden (Abb. 3-42).



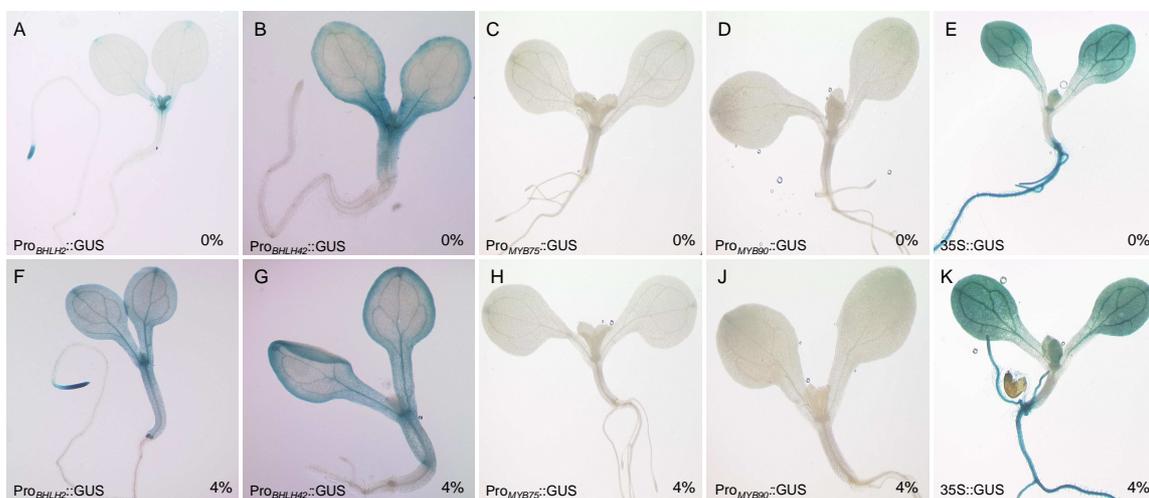
**Abbildung 3-42: Analyse der Lichtaktivierbarkeit des *ProDFR*<sub>520</sub> im Vergleich zum *ProCHS*<sub>1972</sub> durch Protoplasten-Kotransfektionsexperimente.**

Kotransfektionsanalyse des Aktivierungspotentials des *DFR*- und *CHS*-Promotors durch Licht in *At7*-Protoplasten. Als Reporter wurde *ProDFR*<sub>520</sub> bzw. *ProCHS*<sub>1972</sub> eingesetzt. Die Negativkontrolle stellt ein delta::*GUS*-Konstrukt dar und als Positivkontrolle diente ein 35S::*GUS*-Konstrukt. Die zur Standardisierung verwendeten Werte der Luziferaseaktivität sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

### 3.4.3 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktor-Gene in Abhängigkeit von Saccharose

Vorhergehende Analysen haben gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren MYB75, MYB90 bzw. BHLH42 und BHLH2 unterschiedlich an der Saccharose-induzierten Regulation beteiligt sind. Um die gewebsspezifische Expression dieser Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Promotor-GUS Fusionen (*Pro*<sub>MYB75</sub>::*GUS*; *Pro*<sub>MYB90</sub>::*GUS*; *Pro*<sub>BHLH2</sub>::*GUS*; *Pro*<sub>BHLH42</sub>::*GUS*) in *A. thaliana* Pflanzen der Akzession Columbia transformiert. Auf Selektionsmedium wurden transgene Pflanzen ermittelt und durch Genotypisierung auf das entsprechende Transgen analysiert. Positive T2-Samen wurden ausgelegt und nach sechs Tagen einer Analyse der GUS-Aktivität unterworfen. Für jedes Konstrukt wurden zehn Linien ausgewählt von denen jeweils 20 Pflanzen analysiert wurden. Abbildung 3-43 zeigt die unterschiedlichen Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von der Saccharose-Konzentration. Als Positivkontrolle diente ein *uidA*-Gen, welches unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimiert wurde. Dieses Konstrukt zeigte keinen Unterschied in der GUS-Expression in Bezug auf Saccharose im Medium (Abb. 3-43, E und K). Für *BHLH42* konnte ebenfalls kein unterschiedliches Expressionsmuster festgestellt werden. Die

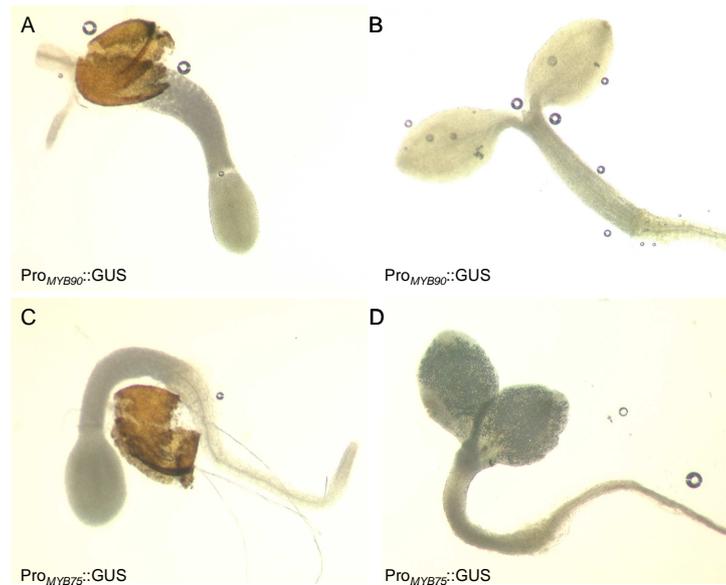
transgenen Pflanzen zeigten sowohl mit als auch ohne Zuckerzugabe eine starke GUS-Expression im ganzen Keimling, außer in der Wurzel (Abb. 3-43, B und G). Für *BHLH2* zeigte sich dagegen ein differenzierteres Expressionsmuster. Wuchsen diese transgenen Pflanzen ohne Saccharose im Medium an, zeigten sie eine schwache GUS-Expression nur im Hypokotyl und in der Wurzelspitze (Abb. 3-43, A). Wuchsen die transgenen Pflanzen dagegen auf Hochzucker an, war die GUS-Expression erhöht (Abb. 3-43, F). Neben einer verstärkten Expression im Hypokotyl und in der Wurzelspitze konnte ebenso eine Expression in der Vaskulatur der Keimblätter detektiert werden. In sechs Tage alten transgenen Pflanzen von *MYB75* und *MYB90* konnte keine GUS-Aktivität beobachtet werden. Dabei war kein Unterschied erkennbar, wenn die Pflanzen mit oder ohne Zucker anwachsen (Abb. 3-43, C, D und H, J).



**Abbildung 3-43: Gewebsspezifische Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktor-Gene als Reaktion auf Saccharose mit Promotor-GUS-Linien.**

GUS-Expression in transgenen Linien als Reaktion auf Saccharose. Die Keimlinge wurden sechs Tage nach der Keimung geerntet und einem GUS-Assay unterzogen. Der *MYB*-Promotor ist je 1,5 kb und der *bHLH*-Promotor ist je 2,5 kb lang. 35S::GUS diente als Positivkontrolle. 0%=Wachstum ohne Saccharose, 4%=Wachstum mit Saccharose. Weitere Erläuterung siehe Text.

Um zu überprüfen, ob die Expression von *MYB75* und *MYB90* zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt stattfindet, wurden die Pflanzen, die transgen sind für *Pro<sub>MYB75</sub>::GUS* und *Pro<sub>MYB90</sub>::GUS* bereits 2-3 Tage nach der Keimung in Bezug auf die GUS-Expression analysiert. Ohne Saccharose im Medium konnte keine GUS-Expression detektiert werden. Auf Saccharose-haltigem Medium (4% Saccharose) gewachsene Keimlinge zeigen eine deutliche GUS-Aktivität (Abb. 3-44). Nach 2-3 Tagen war eine GUS-Expression detektierbar, die im Laufe des 4. und 5. Tages schwächer wurde (Daten nicht gezeigt) und ab dem 6. Tag nicht mehr detektiert werden konnte (Abb. 3-43).



**Abbildung 3-44: Gewebsspezifische Expressionsanalyse von *MYB75* und *MYB90* in 2-3 Tage alten Keimlingen als Reaktion auf Saccharose durch Promotor-GUS-Linien.** *GUS*-Expression in transgenen Linien als Reaktion auf Saccharose. Die Keimlinge wurden 2-3 Tage nach der Keimung gerntet und einem GUS-Assay unterzogen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Regulation der Saccharose- und der Licht-induzierten Anthocyanakkumulation in jungen *A. thaliana* Keimlingen entwicklungs-spezifisch durch eine Kombination mehrerer Transkriptionsfaktoren bedingt ist.

## 4. Diskussion

Die Regulation des *DFR*-Promotors ist ein wichtiger Schritt innerhalb der Anthocyanbiosynthese. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Reihe verschiedener R2R3-MYB Proteine in Kombination mit R/B-ähnlichen bHLH Proteinen den *DFR*-Promotor aktivieren (Nesi *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2003). In *A. thaliana* sind unterschiedliche Komplexe an verschiedenen Regulationsmechanismen beteiligt. So ist der Komplex MYB123+BHLH42 für die Regulation der Biosynthese von kondensierten Tanninen in der Samenschale verantwortlich (Nesi *et al.*, 2000, 2001), MYB90+BHLH12 sind Aktivatoren der Anthocyanbiosynthese (Zimmermann *et al.*, 2003) und MYB75+BHLH42 aktivieren spezifisch die „späten“ Gene der Anthocyanbiosynthese (Borevitz *et al.*, 2000; Thoge *et al.*, 2005), während MYB0+BHLH1 an der Regulation der Trichom- und Wurzelhaarbildung beteiligt sind (Payne *et al.*, 2000). Wie diese Regulationsmechanismen im Einzelnen funktionieren, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Es war nicht bekannt, ob die Transkriptionsfaktoren einzeln an den Promotor binden, ob sie vor der DNA-Bindung einen Komplex bilden oder ob die MYB und bHLH Proteine in diesem Regulationskomplex als Homodimere vorliegen. Dass die Transkriptionsfaktoren auf äußere Stimuli reagieren und damit die Regulation des *DFR*-Promotors beeinflussen war bisher nur vereinzelt dargestellt (Teng *et al.*, 2005). Der generelle Faktor TTG1 spielt neben den R2R3-MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine wichtige Rolle in diesem Regulationsmechanismus (Baudry *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008). Er kann durch die Bindung an den Komplex sowohl als Stabilisator als auch als Regulator fungieren (Walker *et al.*, 1999; Payne *et al.*, 2000). Fehlt dieser Faktor im Regulationskomplex ist der Mechanismus gestört und die Regulation damit nicht mehr funktionell.

### 4.1 MYB75 reguliert zusammen mit bHLH-Proteinen der Subgruppe III den *DFR*-Promotor

In dieser Arbeit wurde der Regulationsmechanismus an dem *DFR*-Promotor durch die Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH42 in großen Teilen aufgeklärt. MYB75 ist ein Hauptregulator der Anthocyanbiosynthese in jungen *A. thaliana* Keimlingen. Der Transkriptionsfaktor besitzt die Fähigkeit, mit den bHLH Regulatoren der Anthocyanbiosynthese (BHLH1, BHLH2, BHLH12, BHLH42) zu interagieren (Zimmermann *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). TTG1 nimmt wahrscheinlich die Funktion des Stabilisators in dem Komplex ein. Um diesen Regulationsmechanismus aufzuklären, wurde hier eine innovative Methode aus der Einzelmolekülspektroskopie (Fluoreszenz-

Korrelationsspektroskopie, FCS) etabliert, die mit Standardmethoden aus der Biologie (EMSA, Protoplasten-Kotransfektion) ergänzt und verglichen wurde. Der Vergleich der ermittelten Daten hat gezeigt, dass mit allen Systemen die gleichen Ergebnisse erzielt werden können. Die in den 1970er Jahren von Madge *et al.* (1972) entwickelte FCS-Methode ist nach der Einführung der konfokalen Mikroskopie (Riegler *et al.*, 1993) und technischen Neuerungen heute also problemlos für routinemäßige Messungen von verschiedensten biomolekularen Wechselwirkungen einsetzbar (Rigler und Elson, 2001; Hess *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002; Schwille und Hausstein, 2005).

#### 4.1.1 Definition des Minimalpromotors

In den Promotoren der „frühen“ Gene der Flavonoidbiosynthese (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*) sind die *cis*-wirkenden Elemente bereits charakterisiert, die notwendig sind für die Bindung der MYB und bZIP Transkriptionsfaktoren (Hartmann, 1997). Dabei wurde jeweils eine so genannte lichtregulatorische Einheit (LRU, „*Light Regulatory Unit*“) definiert, die aus einem ACE-Motiv und einem MRE-Motiv besteht. Trotz dieser Erkenntnisse wurden die entsprechenden Bindestellen für MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren am *DFR*-Promotor als „spätes“ Gen der Flavonoidbiosynthese bisher noch nicht identifiziert. Daher wurde hier der Frage nachgegangen, ob der *DFR*-Promotor ebenfalls durch Licht aktivierbar ist. Diese Hypothese konnte in Kotransfektionsstudien aber nicht bestätigt werden (Abb. 3-45). Das putative ACE-Element im *DFR*-Promotor wird also nicht als Teil einer LRU von bZIP-Transkriptionsfaktoren gebunden. Es wäre ebenfalls interessant zu untersuchen, ob andere „späte“ Gene des Biosynthesweges wie *LDOX* oder *BAN*, die bisher nicht näher charakterisiert wurden, trotz putativer ACE-Elemente ebenfalls nicht mehr durch Licht aktivierbar sind.

Als operationaler Minimalpromotor wird das kürzeste Fragment eines Promotors verstanden, das noch in der Lage ist, durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert zu werden. Um einen Minimalpromotor definieren zu können, mussten zunächst die putativen Bindeelemente für die R2R3-MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren ermittelt werden. Aufgrund der Computeranalyse und der Vorarbeiten von U. Hartmann (Dissertation, 1997) und M. Heim (Dissertation, 2003) wurden fünf putative Bindeelemente festgelegt, die sich innerhalb der 123 bp vor dem Transkriptionsstart befinden (vgl. 3.1.1). Daher wurde in dieser Arbeit das 123 bp langes Fragment des *DFR*-Promotors (-62 bis -184, Pro*DFR*<sub>123</sub>) als Minimalpromotor definiert. Der Pro*DFR*<sub>123</sub> enthält alle Elemente, die für die Regulatoren wichtig sind, um an den Promotor zu binden. Bindungsstudien haben gezeigt, dass sowohl in den FCS-Messungen als auch im EMSA und in der Kotransfektion eine Bindung der Transkriptionsfaktoren an das kurze Promotorfragment möglich war.

#### 4.1.2 Aufgereinigte His-Tag Fusionsproteine binden als Komplex an den Minimalpromotor

Die Expression und Aufreinigung von pflanzlichen Proteinen in einem heterologen System ist schwierig, da die Bakterienzellen artfremde Proteine meist in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) akkumulieren. Das Aufreinigen der Proteine aus den Einschlusskörpern erfolgte dabei unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von Harnstoff in den Puffern. Ein Nachteil ist, dass die Proteine dann in denaturierter Form vorliegen und anschließend wieder in die funktionale Konformation überführt werden müssen. Dies ist gerade bei den in dieser Arbeit verwendeten Transkriptionsfaktoren aufwendig und schwierig, da über einen langen Zeitraum ein stabiler pH-Wert sichergestellt sein musste. Durch eine pH-Wert Abweichung fallen die Proteine aus und können nicht renaturiert werden. Die Assoziationskonstante stellt mit einem Wert von  $4,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  daher einen unteren Grenzwert dar. Nach der Renaturierung konnte nicht bei allen Proteinen durch Rückfaltung die funktionale Konformation wiedergewonnen werden, wodurch sich ebenfalls nicht-funktionales Protein in der Lösung befand.

Es konnte dennoch sowohl mit EMSA als auch mit FCS gezeigt werden, dass diese aufgereinigten Proteine nach der Renaturierung wieder funktional waren in Bezug auf die Bindung an den Pro $DFR_{123}$  (Abb. 3-5 und 3-6). Die Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Formation des Regulationskomplexes. Da die Transkriptionsfaktoren nicht einzeln an das Promotorfragment binden, interagieren sie wahrscheinlich schon vor der DNA-Bindung miteinander. Sie binden also nicht einzeln nacheinander an die Ziel-DNA sondern gehen wahrscheinlich erst untereinander einen Komplex ein und binden dann gemeinsam an die DNA. Aus vorherigen Analysen ist bekannt, dass TTG1 in Kotransfektionsstudien notwendig ist für die Aktivierung des Promotors. Fehlt TTG1, ist keine  $DFR$ -/ $BAN$ -Promotoraktivierung durch MYB75/MYB123 und BHLH42/BHLH2 erkennbar (Heim, 2003; Baudry *et al.*, 2004). Da hier in EMSA und FCS-Studien kein TTG1 zugegeben wurde, kann demnach *in vitro* eine Bindung der Transkriptionsfaktoren als MYB/bHLH Komplex an die DNA auch ohne TTG1 stattfinden. Diese ist *in vivo* möglicherweise ohne TTG1 als Stabilisator zu instabil, um eine Aktivierung des Promotors zu ermöglichen.

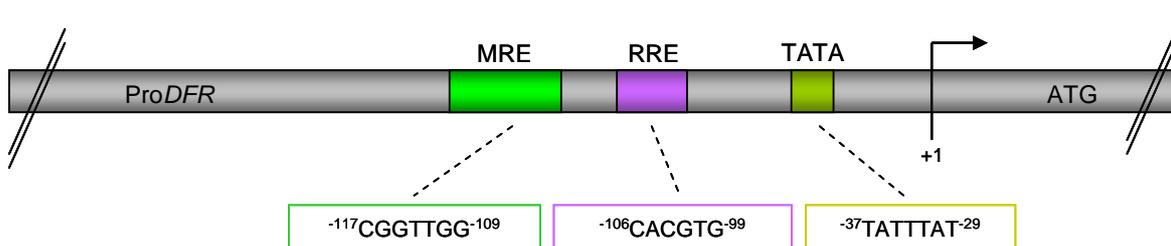
#### 4.1.3 Analyse der $DFR$ -Promotorbindestellen für R2R3-MYB und R/B-ähnliche bHLH Proteine

Es konnte gezeigt werden, dass Pro $DFR_{123}$  ausreicht für die Bindung der Transkriptionsfaktoren. Die Bindestellen für die MYB75 und BHLH2/BHLH42 Proteine wurden anhand von FCS- und Kotransfektionsstudien mit deletierten und mutierten  $DFR$ -

Promotorfragmenten ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die innen liegenden Basen ausgetauscht wurden, die den Kern des Motivs ausmachen und wahrscheinlich für die Spezifität der Bindung verantwortlich sind. Das etablierte Kotransfektionssystem lieferte dabei zuverlässige Daten, die die Daten aus den FCS-Messungen bestätigten. Ein weiterer Vorteil dieser Messdaten war, dass die Messungen der Promotorbindungen zusätzlich in einem lebenden System stattfanden.

Dabei konnte eine Bindedomäne für den R2R3-MYB Faktor und eine Bindedomäne für die R/B-ähnlichen bHLH Faktoren gefunden werden. Die erste putative MYB-Bindedomäne (MRS1) konnte als Bindeelement eines R2R3-MYB (MYB75) Transkriptionsfaktors festgelegt werden und wird im Folgenden als MRE bezeichnet. Für die bHLH Faktoren konnte die erste putative bHLH-Bindedomäne (RRS1) als Bindeelement eines R/B-ähnlichen bHLH Transkriptionsfaktors festgelegt werden. Dabei ist besonders interessant, dass sowohl BHLH2 als auch BHLH42 an die gleiche Bindestelle im *DFR*-Promotor binden.

Aus diesen Ergebnissen stellt sich der *DFR*-Promotor wie folgt dar. MRS1 wird als MRE („MYB Recognition Element“, <sup>-117</sup>CGGTTGG<sup>-109</sup>) bezeichnet und als R2R3-MYB Transkriptionsfaktor Bindeelement beschrieben. RRS1 wird als RRE („R Recognition Element“, <sup>-106</sup>CACGTG<sup>-99</sup>) bezeichnet. Hier binden R/B-ähnliche bHLH Transkriptionsfaktoren. In Abbildung 4-1 ist die in dieser Arbeit identifizierte Struktur des *DFR*-Promotors in Bezug auf die Bindeelemente der Transkriptionsfaktoren zum Transkriptionsstart dargestellt. Die putative TATA-Box wird hier als Bezugspunkt angegeben und ist noch nicht eindeutig identifiziert.



**Abbildung 4-1: Struktur des *DFR*-Promotors bis zum Startkodon.**

Der *DFR*-Promotor enthält die Bindeelemente für den R2R3-MYB Transkriptionsfaktor (MYB75) (MRE, grün) und den R/B-bHLH Transkriptionsfaktor (BHLH2/BHLH42) der Subgruppe IIIf (RRE, violett). Die putative TATA-Box ist in braun dargestellt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart.

#### 4.1.4 Die Regulation der Expression der „frühen“ und „späten“ Gene der Flavonoidbiosynthese erfolgt über ähnliche *cis*-Elemente

Die Promotorstrukturen der „frühen“ Gene der Flavonoidbiosynthese (*CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS*) sind bereits sehr gut charakterisiert. Die Expression dieser Gene erfolgt koordiniert und ihre UV-Induktion ist durch die gleichen Faktoren reguliert (Hartmann, 1997), denn die Akkumulation von UV-absorbierenden Flavonoiden stellt einen Schutzmechanismus der Pflanze dar (Jenkins *et al.*, 2001). Für die lichtinduzierte Promotoraktivität wurde ein Minimalpromotor eingegrenzt, der eine lichtregulatorische Einheit (LRU) beinhaltet (Hartmann, 1997). Für die Lichtinduzierbarkeit verantwortlich ist eine Sequenz mit dem Kernmotiv ACGT, sowie eine Konsensussequenz für MYB-Bindestellen (T/C ACC T/G G; Sablowski *et al.*, 1994). Eine Ausnahme ist die Sequenz des *CHI*-Promotors. Das ACGT-Element stellt hier zugleich eine G-Box dar, die sowohl von bZIP-Faktoren als möglicherweise auch von bHLH-Faktoren gebunden werden kann (Abb. 4-2).

Neben den bZIP-Bindestellen befinden sich in diesen Promotoren ebenfalls putative bHLH- und MYB-Bindestellen. Alle MYB-Bindesequenzen dieser Promotoren beinhalten die Konsensussequenz ACC, die dem P-Box Motiv nach Sablowski *et al.* (1994; CTAAC) entspricht. Diese Kernsequenz von T/C ACC T/G G ist in allen Promotoren der „frühen“ Gene vorhanden (Abb. 4-2). Die Abstände zwischen den LRUs sind dabei nicht streng konserviert, sie betragen in der Regel zwischen 17 und 29 bp, können aber auch bis zu 278 Nukleotide umfassen wie im *F3H*-Promotor (Hartmann, 1997; Sagasser, 2000). Die lichtresponsiven *cis*-Elemente sind dabei so angeordnet, dass das MRE näher am Startkodon liegt, während sich das ACE weiter stromaufwärts befindet. Die *cis*-Elemente können sich dabei ebenfalls auf dem Gegenstrang befinden, wie etwa das MRE im *FLS*-Promotor. Dort liegt das MRE dann weiter stromaufwärts als das ACE. Beim *F3H*-Promotor befinden sich alle *cis*-Elemente auf dem Gegenstrang. Da die bHLH- und bZIP-Proteine wahrscheinlich als Dimere an palindromische Sequenzen binden, ist die Ausrichtung des Motivs nicht von großer Bedeutung.

Die Regulation der Expression der „frühen“ Gene des Flavonoidbiosyntheseweges erfolgt nicht nur durch Licht. So kann *CHS* etwa durch einen einzelnen MYB-Faktor (PFG-MYB-Proteine) aktiviert werden (Mehrtens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007). Auch die Kombination von einem MYB und einem bHLH-Transkriptionsfaktor (MYB75 oder MYB90 zusammen mit BHLH1, BHLH2 oder BHLH42) kann die Expression von *CHS* induzieren (Heim, 2003). Es ist bekannt, dass die Promotoren der „späten“ Gene nur durch die Kombination von einem MYB- und einem bHLH-Faktor aktiviert werden können (Zimmermann *et al.*, 2004; Heim, 2003). Die Tatsache, dass diese Promotoren sowohl z.T. durch die gleichen (MYB75, MYB90, BHLH1, BHLH2, BHLH42) als auch durch

jeweils andere Transkriptionsfaktoren (MYB123) aktiviert werden als die Promotoren der „frühen“ Gene, lässt darauf schließen, dass diese Promotoren sowohl ähnliche als auch unterschiedliche *cis*-Elemente beinhalten müssten. Vermutlich binden die bHLH Transkriptionsfaktoren an RREs, die in allen Promotoren zu finden sind, während MYB Transkriptionsfaktoren an MREs binden, die in den unterschiedlichen Promotoren in der Konsensussequenz ähnlich sind, sich aber im Detail unterscheiden (Abb. 4-2). Es ist erkennbar, dass die Sequenzen der Promotoren der „späten“ Gene statt eines ACGT-Motivs eine G-Box enthalten (CACGTG), die spezifisch von R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren der Subgruppe III<sub>f</sub> gebunden wird. Die MYB-Konsensussequenz in den Promotoren der späten Gene stellt ebenfalls eine Abwandlung der P-Box dar (T/C ACC T/G G; Sablowski et al., 1994). In diesen Promotoren sind mehrere dieser Kernsequenzen in den 200 bp vor dem Startkodon enthalten. Im *DFR*-Promotor konnte eine MRE an der Position -117 charakterisiert werden (Ergebnisse diese Arbeit). Im *BAN*-Promotor wurde mittels PLACE-Analyse und der Eingrenzung durch Promotor-GUS-Analysen eine putative MYB-Bindedomäne an Position -75 (CTGTTG) eingegrenzt (Debeaujon et al., 2003) (Abb. 4-2). Die MYB-Bindedomänen im *DFR*- und im *BAN*-Promotor befinden sich auf dem Gegenstrang. Im *LDOX*-Promotor befinden sich drei putative MRS (AACTA), von denen eine in direkter Nachbarschaft zur einzigen bHLH-Bindedomäne liegt. Diese putative RRS ist zugleich eine putative bZIP-Bindestelle (Abb. 4-2). Die MYB-Domänen aller drei Promotoren der „späten“ Gene ähneln sich sehr, sie differieren nur in Bezug auf ein Nukleotid (Abb. 4-2). Alle MREs beinhalten die Kernsequenz T/C AAC T/G. Die Spezifität der Bindestellen macht möglicherweise ein Nukleotid aus, das in allen Elementen differiert (Abb. 4-2, schwarz hervorgehoben).

|                 |      |           |        |                                      |        |                          |                           |          |       |         |     |
|-----------------|------|-----------|--------|--------------------------------------|--------|--------------------------|---------------------------|----------|-------|---------|-----|
| Pro <i>CHS</i>  | -108 | AACTAGAC  | ACGT   | AGATCTTCATCTGCCCGTCCATC              | TAAC   | CTACCACACTCTCATCT        | -63                       |          |       |         |     |
| Pro <i>CHI</i>  | -99  | GAAAGTAC  | ACGT   | GCTTACACATCCAACACTCGTAATCGTAACTATTGC | TACCT  | ACC                      | -36                       |          |       |         |     |
| Pro <i>F3H</i>  | -400 | ATTTTAAAG | ACGT   | GGCTTTCT                             | -380   | 266nt                    | -110                      | ACCGTGGT | AGGTA | GCTAGCG | -85 |
| Pro <i>FLS</i>  | -93  | TATGTGGT  | AGTTG  | TCTCTATCCAGCGGCCAAGATTTGCC           | ACGT   | CCTCACTTCCTC             | -36                       |          |       |         |     |
| Pro <i>DFR</i>  | -137 | ACGTTCCC  | CACGTG | CTTCTC                               | CGTTG  | GTA                      | CTCACTGACCGGCAGCTTCTCGTTC | -83      |       |         |     |
| Pro <i>LDOX</i> | -476 | AGTAGAAG  | AACTAG | TAGAGGTGAA                           | CACGTG | GAGACACGCTTAAAGCACGCGACG | -422                      |          |       |         |     |
| Pro <i>BAN</i>  | -116 | AAGAT     | CACGTG | CTTACCTTCTAAAACAGCCTTATTGATCTA       | CTGTTG | TACCTAATGA               | -60                       |          |       |         |     |

**Abbildung. 4-2: Sequenzvergleich der bekannten und putativen MYB- und bZIP/bHLH-Bindestellen in den Promotoren der „frühen“ (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*) und „späten“ Gene (*DFR*, *LDOX*, *BAN*) der Flavonoidbiosynthese.**

Die MYB-Bindesequenzen haben eine grüne Schriftfarbe, die Sequenzen der bZIP/bHLH-Bindestellen haben eine violette Schriftfarbe. Alle Bindesequenzen sind grau unterlegt. Unterstrichene Elemente sind bereits charakterisiert.

Wie im Großteil der Sequenzen der Promotoren der „frühen“ Gene liegen im *DFR*- und im *BAN*-Promotor die MREs näher am Startkodon, während sich das RRE weiter stromaufwärts befindet.

Es ist allerdings nicht möglich, allein aus der Anwesenheit der konservierten *cis*-Elemente innerhalb eines Promotors auf dessen Funktionalität zu schließen. Neben dem *DFR*-Promotor kann auch der *BAN*-Promotor durch die Kombination von MYB123, BHLH42 und TTG1 aktiviert werden (Nesi *et al.*, 2002). Aufgrund dessen müsste die *BAN* und *DFR* Expression für die gesamte Proanthocyanidinbiosynthese koordiniert sein. Die Sequenz allein ist aber nicht ausreichend für die ähnliche Regulation der Promotoren, denn auch TT12 wird durch die Kombination dieser Transkriptionsfaktoren reguliert und beinhaltet im Promotor nicht die gleichen *cis*-Elemente wie der *DFR*- und *BAN*-Promotor (Nesi *et al.*, 2002; Debeaujon *et al.*, 2003).

Die MYB und bZIP/bHLH Konsensussequenzen der Promotoren der „frühen“ und „späten“ Gene sind sehr ähnlich. Dennoch gibt es ebenfalls spezifische Unterschiede, die für die Regulation der Promotoren bedeutsam sind. Es lässt sich aber eine Korrelation in dem Aufbau der *cis*-Elemente spezifisch für die „frühen“ Gene und ebenfalls für die „späten“ Gene erkennen (vgl. Abb. 4-2). Die Expression der „frühen“ Gene ist koreguliert, während die „späten“ Gene einer differentiellen Regulation unterliegen. Die bHLH/bZIP-Faktoren sind kontinuierlich exprimiert und können wahrscheinlich an die in allen Promotoren vorhandenen gleichen RREs binden. Daher sind sie möglicherweise nicht spezifisch für die Komplexbildung, sondern stellen eher allgemeine Faktoren dar. Daher sind die ACGT- und RRE-Bindemotive wahrscheinlich in den Promotoren gleich. Die MYB-Faktoren sind dagegen möglicherweise für die spezifische Bildung des Regulationskomplexes an den jeweiligen Promotor verantwortlich. Daher differieren die MRE-Bindemotive in den Promotoren. Es hängt möglicherweise von dem MYB-Faktor in dem Regulationskomplex ab, welcher Komplex an welchen Promotor binden kann. Denn in den Promotoren sind die MYB-Bindesequenzen unterschiedlich. Daher bindet der Regulationskomplex möglicherweise durch die MYB-Bindestellen spezifisch in dem Promotor. Diese unterschiedliche Spezifität der Transkriptionsfaktoren lässt sich auf das Modell des TTG1-abhängigen regulatorischen Netzwerkes übertragen (Zhang *et al.*, 2003). Demnach sind die bHLH Faktoren (BHLH42, BHLH1, BHLH2) die allgemeineren Regulatoren, die mit TTG1 interagieren. Für die spezifische Regulation verschiedener Biosynthesewege und Entwicklungsprozesse interagiert dieser Komplex mit unterschiedlichen MYB Faktoren (MYB75, MYB90, MYB123, MYB61, MYB0, MYB66), die für die Spezifität des Regulationskomplexes verantwortlich sind (Zhang *et al.*, 2003). Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Ergebnisse gestützt, dass die bHLH Faktoren untereinander eine

gewisse Redundanz in Bezug auf die Regulation zeigen, während sich die MYB Faktoren nicht in diesem Ausmaß gegenseitig ersetzen können.

#### **4.1.5 Vergleichende Promotoranalyse mit FCS, EMSA und Protoplasten-Kotransfektion**

Für die Charakterisierung der Promotor-Bindestellen wurde in dieser Arbeit die Methode der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie etabliert. Der Vergleich mit renommierten Methoden aus der Biologie zeigt die Zuverlässigkeit der Daten und ermöglicht damit die Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Dennoch bietet die FCS-Methode wesentliche Vorteile gegenüber dem EMSA. Die mit der FCS-Technologie erzielten Ergebnisse konnten deutlich schneller und automatisierter und damit zuverlässiger gewonnen werden. Die FCS-Methode war ebenso deutlich sensitiver und proteinschonender, wodurch auch „unsichere“ *shifts* beim EMSA mit FCS genau detektiert werden konnten. Entscheidend beim FCS-Verfahren war, dass die Messung in einem „offenen System“ stattgefunden hat. Das Detektionsvolumen war nicht abgeschlossen, sondern hat einen Teil des Gesamtvolumens dargestellt. Ein weiterer Vorteil war die Messung in einer homogenen Phase, was der physiologischen Situation in der Zelle eher Nahe kommt. Dies war beim EMSA nicht möglich, da hier die Messung nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen konnte. Die aufgenommenen Rohdaten wurden außerdem in Echtzeit prozessiert, so dass die Messungen direkt verfolgt und bewertet werden konnten. Die Protoplasten-Kotransfektion hat dagegen im lebenden System von At7-Zellen stattgefunden. Diese Untersuchungen sind unverzichtbar, wenn die Protein-DNA-Bindungen *in vivo* gezeigt werden sollen.

Diese vergleichende Analyse hat dazu beigetragen, das FCS-System zu etablieren und damit wichtige biologische Fragestellungen mit neuen Methoden aus anderen Fachbereichen zu beantworten. Somit konnte diese innovative Methode für weiterführende Untersuchungen neue Impulse für die funktionelle Erforschung von Proteinen liefern. Weiter wurde gezeigt, wie wichtig es ist, dass sich die unterschiedlichen Wissenschaften einander annähern. Durch das Potential, welches so genannte „fachfremde“ Forschungsbereiche bieten, können biologische Fragestellungen aufgeklärt und neue Sichtweisen entwickelt werden.

#### 4.1.6 Strukturelle Basis für die Interaktion der Proteine untereinander

In dieser Arbeit konnten die Bindedomänen für die Transkriptionsfaktoren MYB75 und BHLH2 sowie BHLH42 an dem *DFR*-Promotor ermittelt werden. Dennoch ist wenig darüber bekannt, wie die Interaktionsdomänen auf Seiten der R2R3-MYB und R/B-bHLH Transkriptionsfaktoren aussehen. Denn zum einen interagieren die Proteine untereinander und zum anderen binden diese an ihre Ziel-Promotoren. In vorangegangenen Hefe 2-Hybrid Untersuchungen konnten diese Interaktionsbereiche in den Transkriptionsfaktoren zum Teil eingegrenzt werden (vgl. Einleitung). Durch die Analyse von Deletionsmutanten wurde der Interaktionsbereich auf Seiten der R2R3-MYB-Proteine am Beispiel von MYB75 auf einen Bereich in der R3-Wiederholung eingegrenzt. Die Protein-Interaktionsdomäne in BHLH2 und BHLH42 liegt wahrscheinlich im N-terminalen Teil der HLH-Domäne. Die Kartierung der Interaktionsdomänen von BHLH2 und BHLH42 ergab außerdem, dass die bHLH-Faktoren neben MYB auch TTG1 binden können (Zimmermann, 2003). Zusätzlich besitzen die bHLH Proteine noch eine Interaktionsdomäne im C-terminalen Teil der HLH-Domäne, die der Homo- bzw. Heterodimerisierung mit weiteren bHLH Proteinen dient. TTG1 kann dagegen in diesen Analysen nicht an MYB75 binden (Zimmermann, 2003). Um die Transkriptionsfaktor-Komplexbildung aufzuklären, ist es ebenfalls wichtig, die Protein-Interaktionsdomänen weiter zu charakterisieren. Da vor allem die Interaktionsdomäne in den bHLH Proteinen noch nicht näher charakterisiert ist, könnte durch verschiedene Mutationen in der putativen Interaktionsdomäne die Bindedomäne der bHLH-Proteine durch BiFC-Messungen oder At7-Kotransfektionsanalysen charakterisiert werden.

Für die Komplexbildung interagieren also entweder der bHLH und der WD40 Faktor miteinander oder der bHLH und der MYB Faktor, der WD40 und der MYB Faktor können nicht interagieren (Payne *et al.*, 2000; Zimmermann, 2003). So bindet wahrscheinlich der bHLH Faktor an TTG1 und gemeinsam gehen diese Proteine einen Komplex mit MYB75 ein. Dieses Muster der Komplexbildung ist ebenfalls bei einigen anderen Regulationskomplexen erkennbar. Auch bei der Regulation der Trichomentwicklung erfolgt eine kombinatorische Interaktion von BHLH1 und MYB0 mit TTG1 (Payne *et al.*, 2000). Ein ähnliches Interaktionsmuster tritt bei der Regulation der Synthese der kondensierten Tannine auf. Dabei regulieren MYB123 und BHLH42 gemeinsam die Expression des *BAN*-Gens (Nesi *et al.*, 2000). Auch hier wird für die transkriptionelle Aktivierung ein trimerer Komplex aus TTG1/BHLH42/MYB123 benötigt (Baudry *et al.*, 2004), wobei wiederum nur TTG1 und BHLH42 bzw. BHLH42 und MYB123 interagieren können, nicht aber TTG1 und MYB123.

#### 4.1.7 Schlussfolgerungen

MYB/bHLH/WD40 Komplexe sind in *A. thaliana* an der Regulation vieler Ziel-Gene beteiligt. Die R/B-ähnlichen bHLH und die R2R3-MYB Proteine sind involviert in die Regulation TTG1-abhängiger Biosynthesewege wie der Trichom- und Wurzelhaarproduktion oder der Anthocyanakkumulation (Zhang *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004). In dieser Arbeit sollte der Regulationsmechanismus am Beispiel von MYB75 und BHLH42 bzw. BHLH2 am *DFR*-Promotor näher aufgeklärt werden. Dazu wurden die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren am Ziel-Promotor identifiziert (vgl. Abb. 4-1). Dazu konnte die FCS-Methode als Technik zur Aufklärung von Promotorbindestellen etabliert werden.

Die Reihenfolge der Bindung konnte insofern aufgeklärt werden, dass die beiden Transkriptionsfaktoren niemals einzeln, sondern nur als Komplex an den Promotor binden. Für eine kurze DNA-Bindung scheint TTG1 nicht notwendig zu sein, da in FCS-Messungen eine Bindung des MYB/bHLH-Komplexes gemessen werden kann. Für die Aktivierung des Promotors im Kotransfektionssystem ist TTG1 dagegen notwendig. Innerhalb der Proteine kann die R3-Domäne bei den MYB-Proteinen als Bindedomäne für R/B-ähnliche bHLH-Proteine charakterisiert werden. Die R2R3-MYB-Proteine können nicht einzeln an die DNA binden und ebenfalls nicht mit TTG1 eine Interaktion eingehen. Die Protein-Interaktionsdomäne für die Bindung an die R2R3-MYB-Faktoren ist bei den bHLH-Proteinen die N-terminale Region (Lepiniec *et al.*, 2006). Sie sind ebenfalls nicht in der Lage, einzeln an die DNA zu binden, können aber eine Interaktion mit TTG1 eingehen (Payne *et al.*, 2000). In der pflanzlichen Zelle bindet daher wahrscheinlich zunächst der bHLH-Faktor an TTG1 und bildet dann eine Interaktion mit dem MYB-Protein. Die Interaktion mit TTG1 ist zwar notwendig für die Aktivierung des Ziel-Promotors, ändert aber nicht die Spezifität des Komplexes (Baudry *et al.*, 2006). Als trimärer Komplex kann dieser dann an die Ziel-DNA binden. Ob der Komplex bereits im Cytoplasma ausgebildet wird oder erst im Kern, wird in Kapitel 4.3 aufgezeigt.

#### 4.2 Funktionale Transkriptionsfaktor-Fusionsproteine komplementieren die *knock-out* Mutanten

Um den Regulationsmechanismus *in planta* zu analysieren, wurden die Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten mit funktionalen Fusionsproteinen komplementiert, die aus dem Transkriptionsfaktor und einem Fluoreszenzprotein (eGFP, mCherry) bestehen. Durch die zelleigene Genexpression unter der Kontrolle des nativen Promotors war es möglich, die Lokalisation und Interaktion, sowie dynamische

Bewegungen der Fusionsproteine zu analysieren. Dass die Komplementation der *knock-out* Linien durch die Fusionsproteine erfolgreich war, wurde durch die Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps gezeigt. Die Fusionsproteine haben in den transgenen Pflanzen die Funktion der natürlichen Transkriptionsfaktoren voll übernommen (vgl. 3.2.2).

Im Protoplasten-Kotransfektionsassay wurde zuvor die Funktionalität der Fusionsproteine analysiert. Die verschiedenen MYB Proteine (MYB75, MYB90, MYB123) waren dabei mit einer C-terminalen Fusion nicht mehr funktionell (Abb. 3-13). Durch die genetische Markierung der Transkriptionsfaktoren mit fluoreszierenden Proteinen, kann die Funktionalität der Transkriptionsfaktoren eingeschränkt sein. Es ist bekannt, dass MYB-Proteine C-terminal eine Aktivierungsdomäne enthalten (Lee und Schiefelbein, 2001). Sowohl bei MYB75, als auch bei den sequenzähnlichen WER (MYB66) and GL1 (MYB0) Proteinen konnte solch eine Aktivierungsdomäne charakterisiert werden (Urao *et al.*, 1996; Lee und Schiefelbein, 2001; Zimmermann, 2003; Ruhe, 2007). Deletionsklone, bei denen die letzten 20-60 Aminosäuren fehlten, zeigten keine Aktivierung mehr in Hefe 2-Hybrid Analysen (Urao *et al.*, 1996; Lee und Schiefelbein, 2001). Es ist wahrscheinlich, dass diese Aktivierungsdomäne durch die C-terminale Fusion derart eingeschränkt oder blockiert war, dass keine Aktivierung des *DFR*-Promotors mehr durch diese MYB Fusionsproteine erfolgen konnte.

Es konnte hier ebenfalls gezeigt werden, dass neben MYB75 und BHLH42 auch andere Kombinationen von R2R3-MYB und R/B-bHLH Proteinen in der Lage sind, den *DFR*-Promotor zu aktivieren. Sowohl MYB75 als auch MYB90 waren (als Fusionsprotein) in der Lage, den *DFR*-Promotor im Protoplasten-Kotransfektionssystem zusammen mit einem R/B-bHLH Protein (BHLH1, BHLH2, BHLH42) zu aktivieren. Möglicherweise sind diese Transkriptionsfaktoren redundant in einem Entwicklungsschritt oder in Bezug auf einen externen Stimulus, wie BHLH1 und BHLH2 bei der Trichombildung (Zhang *et al.*, 2003) oder MYB75 und MYB90 bei der Anthocyanakkumulation durch Saccharose-Stress in Keimlingen (Borevitz *et al.*, 2000).

Die strukturelle Redundanz zwischen R2R3-MYB Proteinen wurde häufig untersucht. Bei den MYB Proteinen der Untergruppe 15 (MYB0, WER, MYB123) etwa, die untereinander große Sequenzähnlichkeit zeigen, konnte eine MYB-Domäne charakterisiert werden, die bei allen Faktoren zu 91% übereinstimmte (Oppenheimer *et al.*, 1991; Lee und Schiefelbein, 1999). WER und MYB0 stellen funktionell äquivalente Proteine mit unterschiedlichen biologischen Funktionen in Wurzelhaar- und Trichomformation dar. Dennoch sind sie in der Lage, sich spezifisch funktionell gegenseitig zu ersetzen (Lee und Schiefelbein, 2001). Die konservierten Domänen verleihen den MYB Proteinen anscheinend gemeinsame biochemische Aktivitäten.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und der konservierten Domänen scheinen sich die MYB-Proteine also teilweise in Bezug auf die Aktivierung des *DFR*-Promotors ersetzen zu können. Dennoch haben MYB75 und MYB90 keinen Effekt auf die Wurzelhaar- oder Trichomformation.

Es ist ebenfalls möglich, dass sie in verschiedenen Organen oder Geweben unabhängig voneinander die Regulation des *DFR*-Promotors beeinflussen, wie es zum Beispiel für BHLH42 in Samen und in jungen Keimlingen gezeigt wurde (Nesi *et al.*, 2000, 2001). So wurde eine differentielle Expression auch für die PFGs der Subgruppe 7 gezeigt. Diese R2R3-MYB Faktoren sind flavonolspezifische Regulatoren, die untereinander eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (Stracke *et al.*, 2007). Trotz gleicher Zielgene zeigen die PFGs eine unterschiedliche Expression in den Pflanzen. Während PFG2 in Primärblättern oder im Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel exprimiert wird, wird PFG1 überwiegend in der Wurzel exprimiert und PFG3 in Keimblättern und Primärblättern (Stracke *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass sich diese PFGs in Pflanzen zum Teil gegenseitig funktionell ersetzen können (Ruhe, 2007). Dies zeigt, dass sich verschiedene Transkriptionsfaktoren trotz gleicher Zielgene und organ- oder zelltypspezifischer Expression gegenseitig funktionell ersetzen können.

### **4.3 Nicht alle Transkriptionsfaktoren sind ausschließlich im Zellkern der Pflanzenzellen lokalisiert**

Das Verständnis über das biologische System hängt sehr von der Möglichkeit ab, Moleküle und Abläufe mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung im zellularen Kontext sichtbar zu machen. Die zelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren gibt also erste Hinweise auf deren Funktionalität im Kontext des Regulationsmechanismus'. Sind sie im Kern lokalisiert, können sie an den Promotor binden und als Regulatoren der Zielgene fungieren. Befinden sich die Transkriptionsfaktoren aber im Cytoplasma, stehen sie während dieser Zeit nicht der Aktivierung der Zielgene zur Verfügung.

Der R2R3-MYB Transkriptionsfaktor LAF1 (*long after far-red light1*) zum Beispiel spielt eine Rolle im Phytochrom A Signaltransduktionsweg. Durch ein Kernimportsignal (NLS, *nuclear localization signal*) im N-Terminus ist er im Kern lokalisiert und kann dort als Aktivator vermutlich spezifische Zielgene regulieren (Ballesteros *et al.*, 2001). MYB123, ein R2R3-MYB-Faktor, der gemeinsam mit BHLH42 und TTG1 die Proanthocyanidin-Akkumulation in Samen von *A. thaliana* reguliert, ist ebenfalls durch ein funktionales NLS kernlokalisiert (Nesi *et al.*, 2001).

Bislang wurde die Lokalisation der MYB75 und BHLH2/42 Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Zellen noch nicht gezeigt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Mikroskopie-

Techniken angewandt, um die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren in lebenden Zellen zu analysieren und damit die spezifischen Interaktionen aufzuklären.

#### **4.3.1 MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren sind in pflanzlichen Zellen nicht ausschließlich kolokalisiert**

Über die Lokalisation der MYB Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Zellen war bisher wenig bekannt. In Tabakprotoplasten sind GFP-MYB75 oder GFP-MYB90 sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert (Abb. 3-23). In At7-Protoplasten zeigte sich eine ähnliche Lokalisation des Fusionsproteins in Kernnähe und im Zellkern, aber auch im Cytoplasma (Abb. 3-24). Möglicherweise akkumulieren die Transkriptionsfaktoren nach der Synthese direkt am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) und werden so zum Kern transportiert. Andere MYB-Faktoren liegen ebenfalls gleichverteilt im Protoplasten vor. Von den 1R-MYB-Proteinen LONG HYPOKOTYL (LHY) oder CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) aus *A. thaliana*, die eine Rolle bei der circadianen Rhythmik spielen, ist bekannt, dass sie sequenzspezifisch an die DNA binden können und ebenfalls gleichverteilt im Protoplasten akkumulieren (Schaffer *et al.*, 1998; Carré und Kim, 2002). C-terminal ihrer MYB-Domäne schließt sich ein putatives NLS an, das Ähnlichkeit mit der *monopartite* NLS des Simian-Virus 40 aufweist (PKKKRKVE) (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford *et al.*, 1984).

Da auch MYB75-Proteine im gesamten Protoplasten lokalisiert sind, könnte darauf geschlossen werden, dass sie ebenfalls ein Kernimport-Signal und eventuell ein Kernexport-Signal (NES, *nuclear export signal*) besitzen. Wie alle Proteine werden die MYB Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma synthetisiert. Durch ein mögliches Kernimport-Signal könnte eine schnelle Akkumulation der Proteine im Zellkern erfolgen, wo sie zusammen mit den R/B-ähnlichen bHLH Proteinen an den Promotor binden.

Ein mögliches Kernexport-Signal würde ebenfalls einen schnellen Export der Proteine in das Cytoplasma ermöglichen. Dazu könnte es spezifisch von Kernexport-Proteinen erkannt werden, was zu einem Export des MYB75 Proteins aus dem Zellkern führen würde. Wenn die MYB Proteine sowohl ein Kernimport- (NLS) als auch ein Kernexport-Signal (NES) besäßen, könnte die Menge der Proteine im Zellkern und im Cytoplasma durch die Regulation von Import und Export sehr schnell beeinflusst und verändert werden. Diese so genannte nukleo-cytoplasmatische Partitionierung ist wichtig für die Regulation der Transkriptionsfaktoren durch Umwelteinflüsse oder entwicklungs-spezifische Signale.

So kann der Transkriptionsfaktor CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 (COP1), der eine Rolle bei der Lichtsignaltransduktion spielt, durch nukleo-cytoplasmatische.

Partitionierung als Repressor die Expression lichtabhängiger Gene unterdrücken (Stacey *et al.*, 1999). In Dunkelheit akkumuliert er durch sein bipartites NLS im Kern und interagiert dort z.B. mit dem bZIP-Faktor HYPOCOTYL5 (HY5), wodurch er dessen Aktivität inhibiert. Bei Licht wird COP1 ins Cytoplasma transportiert, wodurch HY5 aktiviert wird (Stacey *et al.*, 2000). Die regulierte Partitionierung von Transkriptionsfaktoren zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern stellt also ein sehr effektives Mittel für die Kontrolle der Genexpression und damit von Signalwegen in Pflanzen dar (Görlich *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 2007).

So ist es eventuell möglich, dass MYB75 im Cytoplasma etwa durch den Einfluss von externer Zuckerzugabe (vor allem Saccharose) beeinflusst werden kann, denn die Transkription von *MYB75* wird in Abhängigkeit von der Konzentration von Saccharose in *A. thaliana* Keimlingen verstärkt (Teng *et al.*, 2005). In *myb75 knock-out* Mutanten ist die Anthocyanakkumulation auf Saccharose-haltigem Medium sehr stark reduziert. Ein weiterführendes Experiment wäre also, ein putatives Kernimport- bzw. Kernexport-Signal von MYB75 zu mutieren, um zu überprüfen, ob MYB75 in Protoplasten dann nur noch im Kern akkumuliert. In entsprechenden transgenen Keimlingen könnte überprüft werden, ob dies dann einen Effekt auf die Anthocyanakkumulation hat. Ist das der Fall, so ist wahrscheinlich die Anwesenheit von MYB75 im Cytoplasma essentiell für die Saccharose-vermittelte Anthocyanakkumulation. In der Aminosäuresequenz von MYB75 findet sich eventuell N-terminal ein putatives NLS (SIKRGKLS), was einer Variante des SV40 NLS ähnelt (PAAKRVKLD). Eine mögliche Sequenz für ein putatives NES konnte nicht gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass MYB75 lediglich ein NLS hat, welches möglicherweise durch einen gebundenen Faktor blockiert ist. Durch einen externen Stimulus wie etwa Saccharose könnte dieser Faktor wegfallen, wodurch das NLS freigelegt ist und MYB75 damit in den Kern transportiert werden kann. So könnte eine Regulation über eine Konformationsänderung des Proteins erfolgen. Dadurch kann es zur Abschirmung oder zur Maskierung des Signals kommen. Zusätzlich kann eine Interaktion mit einem oder mehreren anderen Proteinen einen Einfluss auf die Translokation besitzen. Ein Beispiel für eine konformationsbedingte Maskierung des NLS geben die Phytochrome. Sie regulieren in Pflanzen die Reaktionen auf Licht und sind wichtig bei der Keimung, der Pigmentierung oder der Blühinduktion (Batschauer, 1998; Lin, 2002). Für Phytochrom A und Phytochrom B wurde eine lichtabhängige Kernakkumulation gezeigt (Kircher *et al.*, 1999). Durch einen Lichtimpuls wandelt sich die im Dunkeln vorkommende Rotlicht-absorbierende Form in die Hellrotlicht-absorbierende Form um und gelangt in den Kern. Das am C-Terminus von Phytochrom B lokalisierte NLS wird damit funktional

(Yamaguchi *et al.*, 1999). Der lichtabhängige Kernimport ist also abhängig von einer Konformationsänderung der Proteine.

Von NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) Transkriptionsfaktoren aus Säugetierzellen ist dagegen bekannt, dass deren nukleo-cytoplasmatische Lokalisation durch intrazelluläre Calcium-Konzentrationen reguliert ist. In ruhenden Zellen akkumuliert NF-AT4 im Cytoplasma. Sein NLS ist durch Phosphorylierung angrenzender Serinreste maskiert. Erhöhte Calcium-Konzentrationen während der Stimulation von T-Zellen induzieren die Dephosphorylierung dieser Reste durch eine Kinase, woraufhin das NLS demaskiert wird und damit funktional ist. Dadurch akkumuliert NF-AT4 im Kern (Zhu *et al.*, 1998). Verringert sich die Calcium-Konzentration wieder, fällt die Kinase weg und NF-AT4 wird durch Kerntransport in das Cytoplasma transportiert. Die Regulation der Aktivität eines Transkriptionsfaktors und die Regulation seiner nukleo-cytoplasmatischen Partitionierung werden häufig kombiniert, um die Transkription zu kontrollieren. So kann nicht nur der Transkriptionsfaktor selbst durch nukleo-cytoplasmatischen Transport reguliert werden, sondern auch die Proteine, die dessen Aktivität modulieren.

Eine weitere Möglichkeit für die gleichmäßige Akkumulation des MYB-Proteins in der Zelle wäre, dass es bedingt durch seine geringe Größe (34 kDa) durch die Kernporen diffundieren kann. Dadurch steht es dem Regulationskomplex durchgehend zur Verfügung. Normalerweise diffundieren allerdings Proteine bis zu einer Größe von 20-30 kDa passiv und sehr langsam durch die Kernmembran. Vor allem durch die Fusion mit GFP wird MYB75 aber wahrscheinlich zu groß für passiven Transport, wodurch diese Hypothese eher vernachlässigt werden kann.

In Tabakprotoplasten zeigen BHLH42-GFP oder GFP-BHLH2 eine eindeutige Lokalisation ausschließlich im Zellkern (Abb. 3-25). In At7-Protoplasten sind bHLH-Fusionsproteine ähnlich akkumuliert (Abb. 3-26). Die Fusionsproteine konnten ausschließlich an der Zellkernmembran lokalisiert werden. Es waren aber keine Einzelmoleküle im Cytoplasma zu erkennen. Auch andere bHLH-Faktoren wie BHLH1, sind ausschließlich kernlokalisiert (Zhao *et al.*, 2008). Hier wird bisher nur vermutet, dass diese Faktoren ein Kernimport-Signal besitzen.

Da BHLH42/BHLH2 Proteine ausschließlich im Zellkern detektiert wurden, könnte darauf geschlossen werden, dass diese Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich ein Kernimport-Signal (NLS) aufweisen. In der Aminosäuresequenz ist ein putatives Kernimportsignal mit der Konsensussequenz TCKRKTS für ein putatives NLS des SV40 (Kalderon *et al.*, 1984) zu finden. BHLH Proteine werden wahrscheinlich nach der Synthese im Cytoplasma direkt in den Kern transportiert bzw. akkumulieren an der Kernmembran. Dort stehen sie für die Bindung an andere Proteine und an den Zielpromotor zur Verfügung. Da die bHLH-

Proteine nicht im Cytoplasma zu finden sind, ist wahrscheinlich kein Kernexport-Signal (NES) in der Proteinsequenz enthalten. In der Aminosäuresequenz deutet ebenfalls nichts auf ein putatives NES hin. Diese nukleo-cytoplasmatische Partitionierung ist wichtig für die Regulation der Transkriptionsfaktoren durch Umwelteinflüsse oder entwicklungspezifische Signale. Die bHLH Proteine stehen für diese Regulation im Cytoplasma also nicht zur Verfügung.

Der Vergleich der Expression von *GFP-MYB75* und *BHLH42-GFP/GFP-BHLH2* unter der Kontrolle des nativen Promotors in transfizierten At7-Protoplasten ergibt eine hohe Kolo-kalisation. Diese Proteine akkumulieren vor allem direkt an der Zellkernmembran. Da alle Transkriptionsfaktoren die gleiche Lokalisation im Kern zeigen, wenn sie in lebenden Zellen unter dem nativen Promotor exprimiert werden, kann dies darauf hindeuten, dass sie dort miteinander interagieren (vgl. 3.3).

#### 4.3.2 Die Lokalisation in Pflanzenzellen ist zellkernorientiert

In den Pflanzenzellen war GFP-MYB75 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, befand sich aber ebenfalls zum Teil im Cytoplasma der Hypokotylzellen. Die bHLH Fusionsproteine waren dagegen eindeutig nur im Zellkern lokalisiert (Abb. 3-28, 3-29).

In transgenen Keimlingen ist ein signifikanter Unterschied in der Expression von *MYB75* im Gegensatz zur Expression von *BHLH2/BHLH42* zu erkennen, wenn die transgenen Keimlinge veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt waren. Nur durch ausreichend Saccharose im Medium (min. 1,5%), war eine deutliche *GFP:MYB75* Expression in den Pflanzenzellen zu erkennen. MYB75-Proteine werden in Keimlingen nur in Bezug auf einen speziellen Stimulus (hier zum Beispiel Saccharose) gebildet. Sie werden nicht permanent exprimiert, sondern stehen z.B. im Zusammenhang mit der Regulation des osmotischen Stresses. Wachsen die Keimlinge auf Zucker an, ist der Stimulus von außen gegeben und MYB75 wird in Folge des osmotischen Stresses in den verschiedenen Pflanzenorganen der Keimlinge gebildet (vgl. 3.4). Durch den Reiz von außen steht MYB75 dem Regulationskomplex nun zur Verfügung und kann den *DFR*-Promotor und damit die Anthocyanbiosynthese aktivieren.

Die Expression von *BHLH2* und *BHLH42* ist dagegen unabhängig von der Saccharose-Konzentration (Abb. 3-27). Die *BHLH2* und *BHLH42* Transkriptionsfaktoren wurden in allen Pflanzenorganen der Keimlinge detektiert. In *A. thaliana* Keimlingen sind diese bHLH-Proteine wahrscheinlich eher allgemeinere Faktoren der Regulation. Sie werden permanent von der Pflanze gebildet und sind in allen Zellen vorhanden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass *BHLH42* nicht spezifisch auf einen Reiz hin exprimiert wird (wie *MYB75*), sondern eher einen generelleren Faktor in der Pflanze darstellt, der vielleicht

sogar ständig vorhanden ist. Diese Vermutungen werden durch die Ergebnisse der Promotor-GUS- und Expressions-Analysen bestätigt (vgl. 3.4). Während BHLH42 in jungen Keimlingen permanent exprimiert wird, kann die Expression von MYB75 nur in Bezug auf Saccharose detektiert werden.

### 4.3.3 Schlussfolgerungen

Die Visualisierung der Vorgänge in der pflanzlichen Zelle ist eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der biologischen Zusammenhänge. Die Möglichkeit, einzelne Moleküle im Zellsystem detektieren zu können und deren Interaktion im biologischen Kontext analysieren zu können gibt viele Chancen, die Funktionen dieser Moleküle besser verstehen zu lernen. Dafür sind besonders gute Mikroskopie-Methoden von Bedeutung, mit denen diese Messungen an lebenden Zellen durchgeführt werden können. Mit Hilfe dieser neuen Techniken konnte gezeigt werden, dass sich MYB-Proteine neben der Akkumulation im Kern auch im Cytoplasma befinden, wo sie für die Regulation durch externe Moleküle zur Verfügung stehen. Dagegen sind bHLH-Proteine ausschließlich im Kern lokalisiert. Möglicherweise besitzen die MYB-Proteine daher ein (maskiertes) Kernimport-Signal, um bei eventuellen Einflüssen von außen schnell in das Cytoplasma transportiert werden zu können. Die bHLH-Proteine besitzen wahrscheinlich ein nicht-maskiertes Kernimport-Signal, da sie nicht im Cytoplasma akkumulieren. Die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren lässt auf eine Synthese mit anschließendem Transport am rauen Endoplasmatischen Retikulum schließen. Die Proteine sind deutlich kolokalisiert an der Kernmembran zu finden, wo sie untereinander in Kontakt treten (vgl. 3.3.4). Dass MYB75 erst bei externen Einflüssen wie Saccharose exprimiert wird, lässt darauf schließen, dass dieser Transkriptionsfaktor einer spezifischen Regulation unterliegt, während die bHLH-Faktoren durch die permanente Expression eher generelle Faktoren der Regulation darstellen, die neben der Regulation der Anthocyanbiosynthese noch weitere regulatorische Aufgaben in den Keimlingen erfüllen, wie etwa die Regulation der Trichombildung durch BHLH2 (Zhang *et al.*, 2003).

## 4.4 MYB75 und BHLH42 bilden einen Komplex im Zellkern lebender Pflanzenzellen

Einzelmolekül-Imaging in lebenden Zellen ermöglicht die Visualisierung einzelner, physikalischer Protein-Interaktionen und liefert viele Informationen, die mit herkömmlichen Methoden nicht erfasst werden können. So konnte in dieser Arbeit mit neuen

fluoreszenzspektroskopischen Methoden die Formation des MYB/bHLH-Komplexes in lebenden Zellen untersucht werden. Fluoreszierende Marker dienen dazu, aufzudecken, wo die Transkriptionsfaktoren gebildet werden und zeigen eventuell, in welcher Entwicklungsphase oder als Reaktion auf welchen Stimulus die Transkriptionsfaktoren exprimiert werden.

#### **4.4.1 MYB75 kann mit BHLH42 oder mit BHLH2 einen Komplex eingehen**

Aus Hefe 2-Hybrid Analysen und Protoplasten-Kotransfektionsstudien ist bekannt, dass die Kombination von drei Proteinklassen notwendig ist zur Aktivierung von Promotoren „später“ Gene der Flavonoidbiosynthese (Heim, 2003). Auch die Interaktionsbereiche der Proteine, die notwendig für die Bindung sind, konnten in mehreren Studien bereits eingegrenzt werden (vgl. Einleitung). Dass zwei Transkriptionsfaktoren in der lebenden Pflanzenzelle physikalisch interagieren, konnte dennoch bislang nicht gezeigt werden. Dabei war bisher unklar, ob sie bereits im Cytoplasma interagieren und zusammen in den Kern transportiert werden, um an die DNA zu binden oder ob sie einzeln an den Ziel-Promotor binden und erst nach der DNA-Bindung eine Protein-Interaktion eingehen.

Mit EMSA- und FCS-Messungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren nicht einzeln, sondern als Komplex an die DNA binden, (vgl. 3.1). Die BiFC-Experimente zeigten, dass MYB75 und BHLH42 bzw. BHLH2 im Kern der Protoplasten interagieren. Das bedeutet, dass die Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich einzeln vom Cytoplasma, dem Ort der Synthese, in den Kern transportiert werden. Dort findet die MYB-bHLH-Interaktion statt. Dass die Proteine nicht schon im Cytoplasma eine Interaktion eingehen, könnte daran liegen, dass bHLH-Proteine in der Lage sind, zusätzlich weitere Proteine (etwa kleine, regulatorische MYB-Proteine) zu binden, die die Protein-Interaktionsdomäne eventuell blockieren könnten. Es sind einige kleine, regulatorische Proteine wie CAPRICE (CPC) oder TRIPTYCHON (TRY) bekannt, die als negative Regulatoren der Trichomentwicklung fungieren. Sie stören den TTG1-bHLH-MYB-Komplex durch kompetitive Interaktion mit bHLH (Esch *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Es wäre interessant, zu untersuchen, ob diese regulatorischen Proteine im Cytoplasma ebenfalls mit den bHLH-Faktoren der Anthocyanbiosynthese interagieren können, wodurch die bHLH-Proteine, und somit der ganze Regulationskomplex, reguliert werden könnten. Diese Bindung könnte nach dem Transport in den Kern aufgehoben werden, wodurch eine Interaktion der Transkriptionsfaktoren im Kern ermöglicht wird.

#### 4.4.1.1 FRET als Methode zur Analyse der Interaktion in Protoplasten und in Pflanzen

Eine weitere Methode, die in dieser Arbeit angewandt wurde, ist die *in vivo* Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Methode. Diese Methode ermöglicht es, ebenso wie BiFC, Wechselwirkungen von Proteinen und deren Interaktionspartnern in einem komplexen biologischen System zu charakterisieren. Die FRET-Methode ist im Gegensatz zu BiFC authentisch, da die Interaktion augenblicklich und reversibel ist. Bei BiFC ist diese Rekonstitution der beiden YFP-Fragmente irreversibel, wodurch ein starrer Komplex gebildet wird, der die zu untersuchenden Proteine ihrem normalen Gleichgewicht entzieht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in Protoplasten als auch in pflanzlichen Hypokotylzellen eine Energieübertragung von GFP auf Cherry stattgefunden hat, MYB75 also mit einem bHLH-Faktor interagiert hat (Abb. 3-35). Durch diese Komplexbildung, konnte die physikalische Interaktion zwischen MYB75 und BHLH42 (BHLH2) im Zellkern lebender pflanzlicher Zellen bestätigt werden (3-36, 3-37, 3-38). Durch den Energieübertrag von GFP auf Cherry und einer Detektion der Cherry-Fluoreszenz kann davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenzmoleküle durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren sehr dicht beieinander lagen. Sowohl eine Kolokalisation als auch eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren mittels BiFC-Messungen konnte zuvor bereits bestätigt werden (vgl. 3.3). Da die Transkriptionsfaktoren in Protoplasten und in Hypokotylzellen junger *A. thaliana* Keimlinge (*myb75 bhlh42* + *Pro<sub>MYB75</sub>::GFP:MYB75* / *Pro<sub>BHLH42</sub>::BHLH42:Cherry*) unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden, befanden sich nur sehr wenige Moleküle in der Zelle (vgl. 3.2.2), wodurch FRET-Messungen zusätzlich erschwert wurden. Da die Fluoreszenzmoleküle zudem schnell ausbleichten, war nach kürzester Zeit kaum noch Fluoreszenz zu detektieren. Es konnte mit FRET eine Energieübertragung im lebenden System detektiert werden. Die Positivkontrolle bestätigte zusätzlich die Resultate. Durch das Bleichen des Akzeptors verstärkte sich die Fluoreszenzstärke des Donors, da kein Energieübertrag mehr stattfinden konnte.

#### 4.4.2 Im Gegensatz zu MYB75 können BHLH42 und BHLH2 Proteine Homodimere bilden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BHLH42 und BHLH2 neben der Interaktion mit MYB75 sowohl Homodimere, als auch Heterodimere untereinander bilden können (vgl. 3.3.3). MYB75 dagegen kann lediglich eine Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH Proteinen (BHLH42, BHLH2) eingehen, nicht aber Homodimere bilden. Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass die Bildung der Homo- und der Heterodimere ausschließlich im Zellkern der Protoplasten stattgefunden hat. Die Frage ist, in welcher Konformation der Komplex an die DNA bindet. Es wird vermutet, dass bHLH-Faktoren bereits im Cytoplasma direkt nach der Synthese an TTG1 binden und gemeinsam in den Kern transportiert werden (Zhao *et al.*, 2008). Im Zellkern könnte dieser Komplex dann an den MYB-Faktor binden. Dieser ist wahrscheinlich wichtig für die spezifische DNA-Bindung des Komplexes. Die bHLH-Proteine besitzen in der Aminosäuresequenz unterschiedliche Domänen dafür, Homo- oder Heterodimere auszubilden (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Diese Dimerisierung der bHLH-Faktoren findet ausschließlich im Kern der pflanzlichen Zellen statt (Ergebnisse diese Arbeit). Möglicherweise binden die bHLH-Faktoren als Homodimere an den Regulationskomplex. Es wäre ebenfalls möglich, dass BHLH42 mit BHLH2 zur spezialisierten Regulation einen Komplex eingeht. Jedes der bHLH-Proteine hätte möglicherweise ein TTG1-Protein gebunden und ebenfalls ein MYB-Protein. Dieser Komplex wäre zur spezifischen Regulation, zum Beispiel des *DFR*-Promotors auf den Stimulus Zucker, befähigt.

Es ist zwar bekannt, dass bHLH-Proteine dimerisieren, aber die wichtigen molekularen Bedingungen sind nicht bekannt (Littlewood und Evan 1998). In Säugetieren ist die Aminosäure Leu-27 in den bHLH-Proteinen wichtig für die Dimerisierung (Ciarapica *et al.*, 2003). In allen bHLH-Faktoren von *A. thaliana*, die Dimere bilden können, ist diese Aminosäure ebenfalls als Einzige konserviert. Die Notwendigkeit konnte aber bisher experimentell nicht bestätigt werden. Die Spezifität zur Dimerisierung ist anscheinend beeinflusst durch viele Parameter wie hydrophobe Bindestellen oder Interaktionen zwischen geladenen Aminosäuren in der HLH-Region, aber bisher konnte noch keine genaue Erklärung für die spezifische Partner-Erkennung gefunden werden (Ciarapica *et al.*, 2003). In weiterführenden Versuchen könnte die exakte Bindedomäne in den bHLH-Faktoren durch Blockmutationen charakterisiert werden. Durch den Einsatz dieser veränderten Proteine kann dann ihre Bindefähigkeit an die entsprechenden MYB und bHLH Partner in BiFC-Studien untersucht werden.

Von zwei bHLH-Proteinen, die Phytochrom-Interaktionspartner darstellen (*phytochrome interacting factor*, PIF3 und PIF4), konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl Homo- als auch Heterodimere untereinander bilden können und dabei sowohl als Homo- als auch als Heterodimere an spezifische Sequenzen (G-Box) in der Ziel-DNA binden können (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Die etwa 60 Aminosäuren große bHLH-Domäne ist unterteilt in eine 15 Aminosäuren große N-terminale basische Region, die an der DNA-Bindung beteiligt ist und eine C-terminale HLH-region, die an der Dimerisierung mit Proteinen beteiligt ist (Murre *et al.*, 1989; Ferre D'Amare *et al.*, 1994; Kircher *et al.*, 1998). Diese HLH-Domäne kann dabei sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden. Liegen die

bHLH-Proteine als Dimere vor, können beide Partner mit ihrer basischen Region zur Hälfte an spezifische DNA-Sequenzen binden (Ma *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1997). Die DNA-bindenden bHLH-Proteine können, basierend auf der DNA-Bindesequenz, unterteilt werden in E-Box-Binder und nicht E-Box-Binder. Diese Unterteilung beruht auf der Anwesenheit bzw. Abwesenheit bst. Aminosäuren in der basischen Region: Glu-13 und Arg-16. Diese Aminosäuren bilden das E-Box Erkennungsmotiv, da sie in allen E-Box-bindenden bHLH-Proteinen konserviert sind (Littlewood und Evan, 1998). Die Aminosäure Glu-13 ist wichtig für die Bindung des ersten „C“ im E-Box Motiv (CANNTG) (Fisher und Goding, 1992). Die Aminosäure Arg-16 ist wichtig für die Befestigung und Stabilisierung der Aminosäure Glu-13 an der DNA. Daher können beide bHLH-Proteine des Dimers mit Glu-13 an das DNA-Motiv binden, da dieses palindromisch aufgebaut ist. Die Proteine BHLH2 und BHLH42 besitzen beide diese wichtigen Aminosäuren, weshalb sie als E-Box bindende Proteine bezeichnet werden. Diese E-Box-Binder werden außerdem unterteilt in Subgruppen, je nachdem, welchen Typus der E-Box sie binden. Dabei sind BHLH2 und BHLH42 so genannte G-Box-Binder, da sie an das spezifische G-Box Motiv (CACGTG) in der Promotor-DNA binden können. Neben Glu-13, die wichtig für die DNA-Bindung ist, bindet Arg-17 aus der basischen Region spezifisch das zentrale „G“ in der G-Box während His-9 einen asymmetrischen Kontakt mit der DNA hat und das „G“ bindet, welches komplementär zum ersten „C“ in der G-Box liegt (Fuji *et al.*, 2000). Alle Positionsangaben sind relativ zur basischen Domäne zu sehen (vgl. Toledo-Ortiz *et al.* 2003). Trotz all dieser Vorhersagen wurden die Vermutungen bisher noch nicht experimentell bestätigt. In dieser Arbeit konnte experimentell bestätigt werden, dass BHLH2 und BHLH42 als so genannte G-Box-Binder an die spezifische G-Box des *DFR*-Promotors binden (vgl. 3.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass die bHLH-Proteine im Zellkern untereinander Homo- und Heterodimere bilden (vgl. 3.3). Durch gezielte Mutationen könnten diese für die DNA-Bindung wichtigen Aminosäuren mutiert werden, und so deren Beitrag zur DNA-Bindung in FCS-Studien bestätigt werden.

Die Anwesenheit einer oder mehrerer dieser Motive in dem Promotor liefert das erste Level einer sequenz-selektiven Bindung verschiedener bHLH-Proteine in verschiedenen Promotoren. Auf Seiten der bHLH-Proteine gibt es ebenfalls Spezifitäten für die DNA-Bindung, denn die Varianz bei 6 Nukleotiden der G-Box ist begrenzt. Die bHLH-Proteine sind teilweise redundant bezüglich der DNA-Bindung. Durch die Interaktion mit verschiedenen MYB-Proteinen und dem Vorhandensein von spezifischen MYB-Bindestellen in der DNA steigt die mögliche Spezifität des Komplexes weiter, da immer die Kombination beider Proteine notwendig für die Aktivierung des Zielgens ist (vgl. 4.1). Die Möglichkeit, Heterodimere mit weiteren bHLH-Proteinen der Subgruppe IIIf zu bilden vergrößert die Vielfältigkeit möglicher intermolekularer Interaktionen. Dadurch gewinnen

sie möglicherweise neue funktionale Aktivitäten, wie die Erkennung neuer Hybrid-DNA Bindestellen für die Aktivierung spezifischer Biosynthesewege (Grandori *et al.*, 2000; Massari und Murre, 2000). Durch die Möglichkeit der bHLH-Proteine zur Homo- und Heterodimerisierung, der Erkennung verschiedener Typen von E-Boxen und der Bindung von R2R3-MYB Partnern werden ausreichend Mechanismen geliefert, um viele verschiedene Transkriptionsprogramme mit wenigen Faktoren zu regulieren.

#### **4.4.3 Zur Regulation gehört noch ein dritter Partner: TTG1 als Stabilisator des Transkriptionsfaktor-Komplexes**

Die Funktionen aller bislang charakterisierten R2R3-MYB-Proteine, die R/B-ähnliche bHLH-Faktoren binden, stehen im Zusammenhang mit der Regulation zweier sehr unterschiedlicher Bereiche aus Sekundärstoffwechsel und Zelldifferenzierung. Kombinatorische Interaktionen zwischen R2R3-MYB- und R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen regulieren einerseits verschiedene Schritte der Phenylpropanoid-Biosynthese, andererseits steuern sie die epidermale Zelldifferenzierung in der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung (Nesi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004; Lepiniec *et al.*, 2006). Eine Verbindung zwischen diesen Funktionen stellt das Protein TTG1 her, welches an beiden Regulationswegen beteiligt ist (Walker *et al.*, 1999; Baudry *et al.*, 2006). Es gibt verschiedene Modelle, die die Regulation der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung beschreiben und einen generellen Regulationsmechanismus postulieren, der auf kombinatorischen und kompetitiven Proteininteraktionen basieren könnte (Schiefelbein, 2003; Lepiniec *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008). Dabei interagiert ein R/B-ähnlicher bHLH-Faktor mit einem R2R3-MYB-Faktor und einem TTG1 Protein. Alle drei Komponenten sind notwendig für die Regulation des Biosyntheseweges sowie der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung.

Da die Aktivierbarkeit des *BANYULS-* (*BAN*) Promotors durch MYB123 und BHLH42 durch die Koexpression von TTG1 weiter verstärkt werden kann (Heim, 2003) und ohne TTG1 keine Aktivierung detektiert werden kann, kann darauf geschlossen werden, dass auch MYB75 und BHLH42 auf TTG1 angewiesen sind, um den *DFR*-Promotor zu aktivieren. Diese Interaktion mit TTG1 erhöht zwar die Aktivierbarkeit, ändert aber nicht die Spezifität des Komplexes. Um das zu überprüfen, könnte in *ttg1 knock-out* Mutanten die Formation des MYB/bHLH-Komplexes untersucht werden. Findet keine Komplexbildung und damit Aktivierung des *DFR*-Promotors mehr statt, ist dies ein Hinweis dafür, dass TTG1 notwendig ist für die Komplexbildung. Einen ersten Hinweis dafür geben *ttg1 knock-out* Keimlinge, die auf Saccharose-haltigem Medium keine

Anthocyane mehr akkumulieren. Die Aktivierung des *DFR*-Promotors (durch MYB75 und BHLH42/BHLH2) ist also gestört.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von BHLH42 und BHLH1 direkt durch TTG1 aktiviert wird (Baudry *et al.*, 2006). Die bHLH-Faktoren können direkt an TTG1 binden, wobei MYB-Faktoren und TTG1-Proteine nicht miteinander interagieren können (Payne *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Durch die transkriptionelle Regulation kann TTG1 die Aktivierung des MYB/bHLH-Komplexes positiv beeinflussen. Fehlt TTG1, kann keine Aktivierung durch den Komplex mehr detektiert werden. In Kotransfektionsstudien ohne TTG1 ist ebenfalls keine Aktivierung des *DFR*-Promotors durch MYB/bHLH mehr detektierbar.

Der TTG1-Faktor wirkt also stabilisierend auf den Komplex, wenn dieser an die DNA bindet. Möglicherweise schützt TTG1 durch die Bindung an das bHLH-Protein dieses vor dem Abbau. Wahrscheinlich werden die TTG1-bHLH-Proteine gemeinsam in den Kern transportiert, da TTG1 kein Kernimport-Signal (NLS) aufweist. Dennoch ist das Fusionsprotein YFP-TTG1 ausschließlich kernlokalisiert (Zhao *et al.*, 2008). Mit BiFC-Messungen könnte daher diese Komplexbildung näher untersucht werden. Durch die Bindung von TTG1 an das bHLH Protein kann möglicherweise auch eine Konformationsänderung des bHLH Faktors stattfinden, wodurch der bHLH Faktor erst dann an das MYB Protein binden kann, wenn es an TTG1 gebunden ist. Mit BiFC könnte untersucht werden, ob BHLH42 noch an MYB75 binden kann, wenn TTG1 nicht vorhanden ist, also ob TTG1 aktivierende Funktion hat. Dieser Vermutung spricht entgegen, dass in FCS-Messungen *in vitro* der bHLH Faktor auch ohne die Anwesenheit von TTG1 zusammen mit dem MYB Faktor die DNA binden kann (vgl. 3.1.3). Dennoch ist diese Bindung wahrscheinlich nicht stabil genug, denn in Kotransfektionsstudien konnte gezeigt werden, dass ohne die Anwesenheit von TTG1 der Promotor durch die MYB und bHLH Faktoren nicht aktiviert werden kann (Heim, 2003). TTG1 kann eventuell auch als Brückenelement zu weiteren Faktoren dienen, die zur Aktivierung des Komplexes notwendig sind.

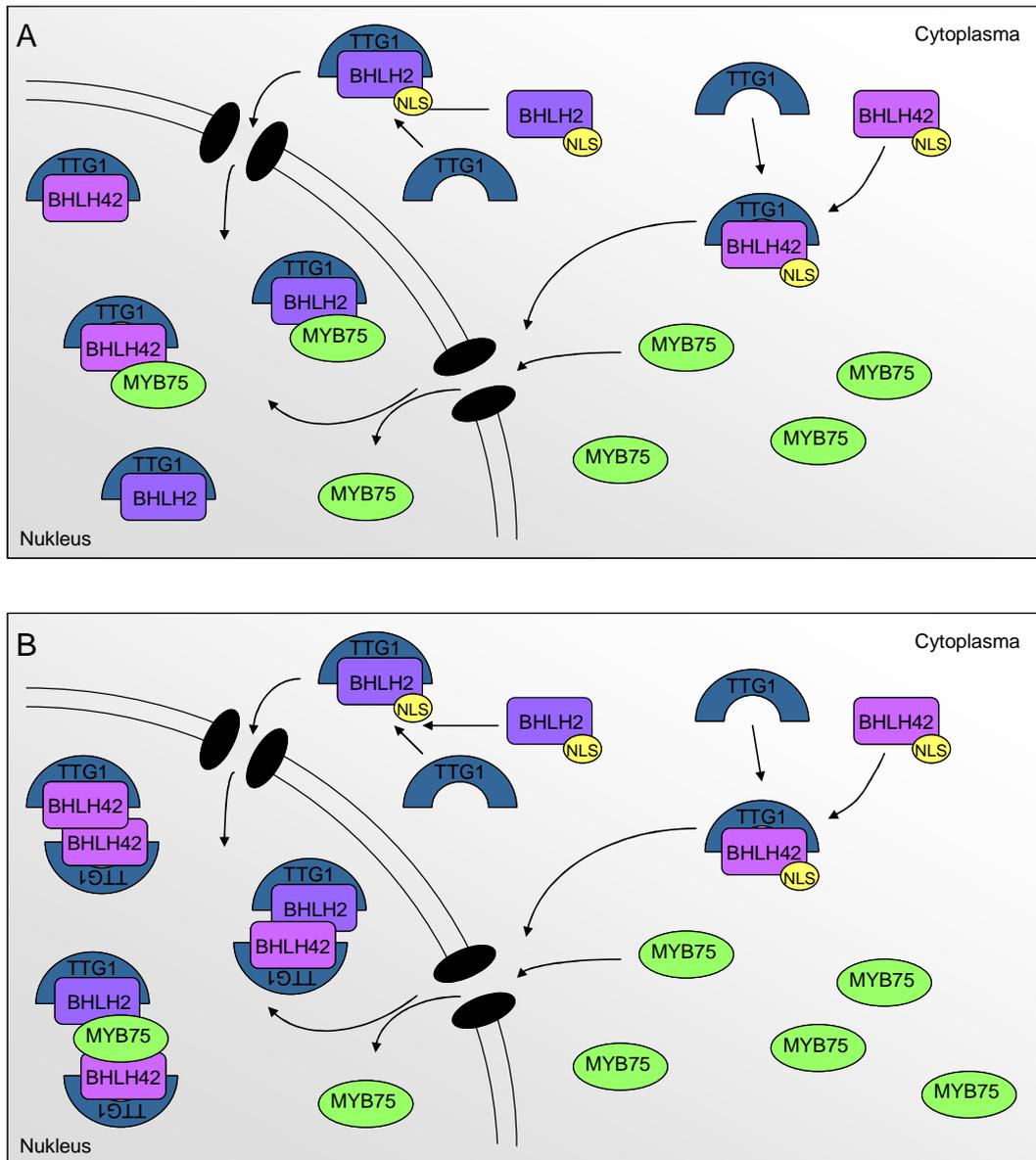
Der WD40-Faktor TTG1 kann sowohl als transkriptioneller Koregulator im Kern der Zelle fungieren als auch als Proteininteraktionsfaktor im Cytoplasma. In subzellularen Lokalisationsstudien wurde die Notwendigkeit von TTG1 für die richtige Verteilung der bHLH-Proteine im Kern der Zelle gezeigt (Zhao *et al.*, 2008). Fehlt das MYB-Protein GL1 oder TTG1, ist der bHLH-Faktor BHLH1 nicht mehr klar kernlokalisiert, sondern ungleichmäßig in „speckles“ im Kern verteilt. Der MYB-Faktor ist wahrscheinlich wichtig für das Anbinden des Komplexes (MYB/bHLH/TTG1) an die Promotor-DNA, während TTG1 wahrscheinlich notwendig für das Verbleiben des Komplexes an der DNA ist. Ohne diese Interaktionen ist keine klare Verteilung des bHLH-Proteins zu erkennen. Das Fehlen

des TTG1-Proteins hat keine Auswirkungen auf die Verteilung der MYB-Proteine im Kern hat. Es wäre interessant, diese Untersuchungen ebenfalls mit dem MYB75/BHLH42/TTG1 Komplex durchzuführen. Um zu untersuchen, ob TTG1 tatsächlich bereits im Cytoplasma mit bHLH interagiert oder ob kleine regulatorische Proteine an bHLH binden, könnten diese möglichen Interaktionen mit BiFC in Protoplasten untersucht werden. Um zu erfahren, in welcher Reihenfolge die Komplexpartner miteinander reagieren könnten alle drei Proteine des Komplexes mit fluoreszierenden Proteinen verbunden werden und *in vitro* durch dreifach-FRET analysiert werden.

#### 4.4.4 Schlussfolgerungen

Aufgrund der Basis der bisherigen Analysen sowie der vorliegenden Ergebnisse kann ein Modell der Bildung des Regulationskomplexes aufgezeigt werden (Abb. 4-3): Direkt nach bzw. während der Synthese wird im Cytoplasma TTG1 an BHLH42 bzw. BHLH2 gebunden und gemeinsam durch das Kernimport-Signals des bHLH-Proteins in den Kern transportiert. Zhao *et al.* (2008) konnten zeigen, dass TTG1 als Fusionsprotein mit YFP ebenfalls im Zellkern von Pflanzen akkumuliert. Da dieser Faktor aber kein Kernimport- oder Kernexport-Signal aufweist und zu groß ist, um allein durch die Kernporen zu diffundieren, muss er durch einen weiteren Faktor gebunden werden, der ein Kernimport-Signal trägt. Dies könnte daher ein bHLH-Faktor sein, der ebenfalls nur im Kern lokalisiert ist. MYB75 wird ebenfalls, wahrscheinlich am rauen Endoplasmatischen Retikulum, im Cytoplasma synthetisiert und entweder aktiv aufgrund eines Kernimportsignals oder eines weiteren Interaktionspartners oder passiv bedingt durch die Größe in den Kern transportiert. Im Kern findet eine Bindung des MYB75-Proteins an den TTG1-bHLH-Komplex statt. Nur gemeinsam ist eine Bindung an spezifische Sequenzen in der Promotor-DNA durch den Komplex möglich. Dabei bindet das bHLH-Protein an eine so genannte G-Box (CACGTG) in der Promotor-DNA, die 100 bp vor dem Transkriptionsstart liegt. Das MYB75 ist wahrscheinlich für die Spezifität der Bindung an den *DFR*-Promotor verantwortlich. Die Bindestelle für das MYB-Protein im Promotor ist im Kern ein P-Box Motiv (CGGTTGG) und befindet sich 5 bp von der G-Box entfernt, ist also 110 bp vom Transkriptionsstart entfernt (Abb. 4-3, A). Es ist durchaus denkbar, dass der Regulationskomplex nicht aus drei Mitgliedern besteht, sondern aus fünf bis sechs Proteinen (Abb. 4-3, B). Da die bHLH-Proteine zusätzlich zu der Bindung an TTG1, an MYB und an die DNA Homodimere eingehen können, bindet eventuell ein TTG1-bHLH-Komplex im Kern über die bHLH-Dimerisierungsdomäne einen weiteren TTG1-bHLH-Komplex. Dieser Komplex kann eventuell gemeinsam ein MYB binden. Es ist auch denkbar, dass jeder TTG1-bHLH-Komplex ein MYB Protein binden kann und dann als

tetramer- oder hexamer-Komplex an die DNA binden kann. Denn es wird vermutet, dass drei Aminosäuren in der basischen Region des bHLH Proteins wichtig für die DNA-Bindung sind. Möglicherweise binden die beiden bHLH-Partner des Dimerisierungskomplexes jeweils zur Hälfte an die palindromische Bindesequenz der DNA. TTG1 dagegen kann nicht direkt an die DNA und ebenfalls nicht an MYB75 binden.



**Abbildung 4-3: Modell zur Bildung des MYB/bHLH/TTG1 Regulationskomplexes.**  
(A) Modell des trimeren Regulationskomplexes. (B) Modell des pentameren Komplexes.

Daher gehen die bHLH- und MYB-Transkriptionsfaktoren eine Bindung mit der DNA ein, während der TTG1-Faktor wahrscheinlich eine Stabilisierung des Komplexes an der DNA bewirkt. Es wurde gezeigt, dass bHLH-Proteine (BHLH2 und BHLH42) auch mit anderen Mitgliedern der Subgruppe interagieren können (vgl. Pif3 und Pif4). Die Möglichkeit, dass

verschiedene bHLH-Proteine im Komplex involviert sind, erhöht die Spezifität des Regulationskomplexes. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass viele Mitglieder der Subgruppe IIIb untereinander teilweise redundante Funktion haben. Eventuell können sie sich im Komplex teilweise gegenseitig ersetzen.

Die Regulation des Komplexes kann möglicherweise auf unterschiedliche Weisen erfolgen. Eine transkriptionelle Regulation des Komplexes erfolgt eventuell über Proteine, die verhindern, dass einer der drei Transkriptionsfaktoren gebildet wird, bzw. welche die Expression erst ermöglichen. Es ist ebenfalls möglich, dass kleine, regulatorische MYB-Proteine durch Bindung an den bHLH-Faktor mit MYB75 kompetieren und so den Komplex negativ regulieren.

TTG1 kann ebenfalls als posttranslationale Regulationskontrolle des Komplexes wirken. So kann durch die Bindung von bHLH an TTG1 direkt nach der Synthese der bHLH-Faktor möglicherweise vor einem negativen Regulator geschützt werden. Durch die Bindung mit TTG1 während der DNA-Bindung könnte der Komplex nicht durch einen negativen Regulator entfernt werden.

## **4.5 Der Regulationskomplex MYB75/BHLH2/TTG1 wird durch Saccharose induziert**

Die Gene für die Anthocyanexpression sind sowohl entwicklungspezifisch als auch als Antwort auf verschiedene Stresse durch die Kombination von MYB- und bHLH- mit TTG1-Proteinen reguliert (Zhang *et al.*, 2003; Carey *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006). Dabei ist die Kombination dieses Komplexes dafür verantwortlich, ob etwa Flavonoide oder Anthocyane gebildet werden oder ob eine positive oder negative Regulation der Strukturgene stattfindet (Baudry *et al.*, 2004; Lepiniec *et al.*, 2006; Solfanelli *et al.*, 2006). Der Regulationskomplex aus MYB75, BHLH2 bzw. BHLH42 und TTG1 aktiviert den Anthocyanbiosyntheseweg zum Beispiel als Reaktion der Pflanze auf eine erhöhte Saccharose-Konzentration im Medium.

### **4.5.1 Anthocyane akkumulieren in *A. thaliana* Keimlingen als Reaktion auf abiotischen Stress**

Die Zunahme der Pigmentproduktion beruht in jungen *A. thaliana* Keimlingen auf der Hochregulation des gesamten Anthocyanbiosyntheseweges. Verschiedene abiotische Stressfaktoren wie Stickstoff- oder Phosphormangel bewirken die Bildung von Anthocyanen. Es ist bekannt, dass viele „späte“ Gene der Flavonoidbiosynthese (*DFR*, *BAN*) bei dem Mangel verstärkt exprimiert werden (Lillo *et al.*, 2008). Bei anderen

abiotischen Stress-Faktoren wie etwa UV-Licht akkumulieren Col-0 Keimlinge Anthocyane, während bei einigen Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten wie *myb90*, *bhlh1* oder *ttg1* die Anthocyanbiosynthese stark reduziert ist (Abb. 3-41). Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Transkriptionsfaktoren entsprechende Regulatoren darstellen.

Saccharose induziert als Signalmolekül speziell den Anthocyanstoffwechsel (Solfanelli *et al.*, 2006). Wachsen *A. thaliana* Keimlinge auf Saccharose-haltigem Medium, akkumulieren die Pflanzen besonders im Hypokotyl und an den unteren Rändern der Keimblätter Anthocyane. Fehlt ein wichtiger Regulator der Anthocyanbiosynthese, ist diese Anthocyanakkumulation entweder stark reduziert oder fehlt völlig (Abb. 3-40). Für die Anthocyanbiosynthese sind die „späten“ Gene *DFR* und *LDOX* verantwortlich. Sie werden durch die Anwesenheit von Saccharose im Medium verstärkt exprimiert (Solfanelli *et al.*, 2006). Um die Funktion der Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die Saccharose-induzierte Anthocyanakkumulation zu untersuchen, wurden die *knock-out* Keimlinge auf zuckerhaltigem Medium angezogen. Die *bhlh2* Mutante zeigte ebenfalls, wie *myb75*, eine stark reduzierte Anthocyanakkumulation. Die *knock-out* Linien von *BHLH42* und *MYB90* zeigten dagegen eine dem Wildtyp vergleichbare Anthocyanakkumulation. Sie könnten als unspezifischere Regulatoren die Abwesenheit von *MYB75* und *BHLH2* zum Teil ersetzen. Denn fehlten beide *MYB*- oder beide *bHLH*-Faktoren in den jeweiligen Doppelmutanten, war keinerlei Rotfärbung in den Keimlingen mehr erkennbar. Die Anthocyanmenge war in der *myb75 bhlh2* Doppelmutante ebenfalls völlig reduziert (Abb. 3-41), was bedeutet, dass diese Transkriptionsfaktoren Hauptregulatoren der Anthocyanbiosynthese darstellen. Diese Einzel- und Doppelmutanten der Transkriptionsfaktoren zeigten, dass eine gewisse Redundanz in Bezug auf die Regulation der Anthocyanakkumulation besteht. Alle vier Transkriptionsfaktoren sind in die Regulation involviert (Borevitz *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

In den Überexpressionspflanzen von *MYB75* und *MYB90* war eine wesentlich erhöhte Anthocyanakkumulation zu erkennen (Abb. 3-42). Saccharose induziert die Expression von *MYB75* und *MYB90*, wobei als Konsequenz der erhöhten *DFR*-Expression der verstärkte Anthocyanbiosyntheseweg ausgelöst wurde. Ob diese Pigment-Überakkumulation in den Überexpressionspflanzen *bHLH*- und *TTG1*-abhängig ist, könnte überprüft werden, indem *MYB75* in entsprechenden *bhlh*- (*bhlh2* und *bhlh42* Einzel- und Doppelmutanten) oder *ttg1-knock-out* Linien überexprimiert wird. Dabei ließe sich zeigen, ob alle drei Mitglieder des Komplexes notwendig sind für die Aktivierung bzw. die Regulation des *DFR*-Promotors, oder ob sie eventuell durch andere Faktoren ersetzt werden können.

Die *ttg1 knock-out Linien* zeigten auch bei Saccharose-Zugabe keine Akkumulation von Anthocyanen (Shirley *et al.*, 1995). TTG1 ist also ebenso involviert und notwendig für den Saccharose-induzierten Anthocyanstoffwechsel (Ramsay und Glover, 2005). Da in den *myb* und *bhlh knock-out* Linien nur „späte“ Gene des Biosyntheseweges eine schwächere Expression im Vergleich zum Wildtyp zeigen, sind nur diese Gene direkte Zielgene des MYB/bHLH/TTG1 Komplexes (Gonzalez *et al.*, 2008).

#### **4.5.2 Abiotische Stressfaktoren induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren**

Die Anthocyanbiosynthese ist sowohl räumlich als auch zeitlich durch den MYB/bHLH/TTG1 Komplex reguliert und reagiert auf biotische und abiotische Faktoren von außen (Debeaujon *et al.*, 2000; Winkel-Shirley *et al.*, 2002). Es ist aber bislang wenig darüber bekannt, welche Kombinationen von MYB- und bHLH-Proteinen die Zielgene der Anthocyanbiosynthese in den verschiedenen Entwicklungsstadien oder in Bezug auf bestimmte Stimuli regulieren. Während *MYB75* eher durch Saccharose induziert wird und damit die Gene der Anthocyanbiosynthese aktiviert, wird die Expression von *MYB90* durch Stickstoff- und Phosphormangel verstärkt (Lea *et al.*, 2007; Morcuende *et al.*, 2007), was ebenfalls zu einer Akkumulation der Anthocyane führt. Zusätzlich ist auch die *BHLH1*-Expression als Antwort auf Stickstoff-Mangel erhöht (Morcuende *et al.*, 2007).

Neben *MYB75* gibt es weitere wichtige Regulatoren des Anthocyanbiosyntheseweges. In reverse transcriptase PCR Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass *MYB75* ausschließlich exprimiert wurde, wenn Wildtyp-Keimlinge auf Hochzucker (4%) anwachsen. Wuchsen sie ohne Zucker an, war keine Expression erkennbar. Das gleiche Ergebnis wurde für den sehr ähnlichen *MYB90*-Faktor gefunden. Dessen Expression wird aber zusätzlich auch bei anderen Stressfaktoren wie UV-Licht induziert. *BHLH2* und *BHLH42* dagegen wurden generell in gleicher Stärke exprimiert, unabhängig von Zucker oder UV-Licht (Abb. 3-42). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die MYB-Faktoren spezialisierter auf bestimmte Stimuli wie Saccharose oder UV-Licht exprimiert werden, während die bHLH-Faktoren über einen langen Zeitraum der Entwicklungsphase stetig exprimiert werden und unabhängig von äußeren Stimuli sind. Die Komplexbildung zur Regulation des *DFR*-Promotors findet daher wahrscheinlich erst in Bezug auf einen äußeren Stimulus statt, denn der MYB-Faktor ist ohne Stimulus nicht in der Zelle vorhanden.

### 4.5.3 Die DFR-Regulation ist in einigen Transkriptionsfaktor *knock-out* Mutanten gestört

Die DFR ist das Enzym, welches im Flavonoidmetabolismus von *A. thaliana* die Umsetzung von Dihydroquercetin in Leucocyanidin katalysiert. Die Expression des *DFR*-Gens wird unter anderem kontrolliert durch das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren MYB123/BHLH42/TTG1 in Samen (Nesi *et al.*, 2000) und ebenso durch den Transkriptionsfaktorkomplex MYB75/BHLH2/TTG1 in jungen Keimlingen. Fehlt eines der drei Mitglieder des Komplexes, ist die Anthocyanbiosynthese in der Pflanze gestört. In all diesen *knock-out* Linien der MYB- und bHLH-Partner ist die *DFR*-Expression vermindert. In den entsprechenden doppel-*knock-out* Mutanten ist keine *DFR*-Expression und auch keine Anthocyanakkumulation mehr detektierbar (Abb. 3-40, 3-43). In den Einzelmutanten von MYB75 oder BHLH2 kann eine Restakkumulation von Anthocyanen detektiert werden. Die fehlenden Transkriptionsfaktoren können wahrscheinlich zum Teil durch die Anwesenheit von MYB90 bzw. BHLH42 ausgeglichen werden. Der Verlust von MYB90 oder von BHLH42 zeigt keine veränderte Anthocyanakkumulation. Das bedeutet, dass wahrscheinlich MYB75 und BHLH2 die Hauptregulatoren der Anthocyanbiosynthese in jungen *A. thaliana* Keimlingen darstellen. Dagegen nehmen MYB90 bzw. BHLH42 eher redundante Funktionen in den Keimlingen in Bezug auf die Anthocyanbiosynthese ein. Fehlen beide MYB-Faktoren (*myb75 myb90*) oder beide bHLH-Faktoren (*bhlh2 bhlh42*) in der Pflanze, ist weder eine *DFR*-Expression noch eine Anthocyanakkumulation detektierbar. Das weist darauf hin, dass MYB90 bzw. BHLH42 redundante Funktionen haben, die verloren gehen beim Verlust dieser Transkriptionsfaktoren. Diese Redundanz ließe sich gezielter untersuchen, wenn *BHLH2* unter der Kontrolle des *BHLH42*-Promotors bzw. *MYB75* unter der Kontrolle des *MYB90*-Promotors den Phänotyp in den jeweiligen Mutanten komplementieren könnte.

Es ist bekannt, dass TTG1-abhängige MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren „späte“ Gene der Anthocyanbiosynthese regulieren. Sowohl *ttg1* als auch die *myb* und *bhlh* *knock-out* Linien zeigen eine reduzierte Expression der „späten“ Gene *DFR* und *LDOX*, aber nicht der „frühen“ Gene *CHS* und *PAL* (Winkel-Shirley *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003). MYB75 Überexpressionspflanzen zeigen eine verstärkte Aktivierung der „späten“ Gene (vor allem von *DFR*), aber nicht der „frühen“ Gene (Borevitz *et al.*, 2000; Tohge *et al.*, 2005). Der Vergleich mit anderen MYB-Proteinen wie MYB11, MYB12 und MYB111 zeigt, dass diese Regulatoren der „frühen“ Gene (*CHS*, *CHI*, *FLS*) der Anthocyanbiosynthese darstellen. Sie brauchen keinen Ko-Aktivator um die Zielgene zu aktivieren und sind zudem unabhängig von TTG1 (Mehrtens *et al.*, 2005; Stracke *et al.*, 2007).

#### 4.5.4 Das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren ist überlappend

Um das Expressionsmuster und die *in planta* Lokalisation der bHLH- und MYB-Faktoren in unterschiedlichen Teilen der Keimlinge in Bezug auf Saccharose-Stress zu analysieren, wurden Promotor-GUS Analysen durchgeführt.

Der *BHLH42*-Promotor war unabhängig von Saccharose in allen Geweben außer der Wurzel der sechs Tage alten Keimlinge aktiv. Der *BHLH2*-Promotor war vor allem im Hypokotyl und den unteren Keimblättern aktiv, wenn die Keimlinge auf Saccharose anwachsen. Ohne Zugabe von Zucker war nur eine schwache GUS-Expression im Hypokotyl zu erkennen. In drei Tage alten *Pro<sub>BHLH2</sub>*-GUS Keimlingen fand sich eine GUS-Expression in der gesamten Pflanze (Gonzalez *et al.*, 2008). Die Analyse der GUS-Expression des *MYB75*- bzw. *MYB90*-Promotors ergab in den sechs Tage alten Keimlingen keine detektierbare Promotoraktivität. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in den RT-PCR erhaltenen Ergebnissen, in denen *MYB75*- und *MYB90*-Transkripte detektiert werden konnten. In drei Tage alten Keimlingen dagegen konnte eine leichte GUS-Expression im Hypokotyl detektiert werden, wenn die Keimlinge auf Saccharose-haltigem Medium wuchsen (Abb. 3-46, vgl. Gonzalez *et al.*, 2008).

Da das Expressionsmuster der bHLH- und der MYB-Faktoren in den Keimlingen zum Teil zeitlich und räumlich überlappt, fungieren diese Transkriptionsfaktoren dort wahrscheinlich gemeinsam als Aktivatoren der Anthocyanbiosynthese (Baudry *et al.*, 2006). Das Expressionsmuster des *MYB75*- und *BHLH2*-Faktors stimmte mit der Anthocyanakkumulation in jungen Keimlingen überein. Beides fand sich zunächst stark im gesamten drei Tage alten Keimling, verblasste in den Geweben aber über die weiteren Tage und befand sich dann in sechs Tage alten Keimlingen nur noch im Hypokotyl und den Keimblättern.

Beim Vergleich der Expression zwischen den Aktivierungspartnern (MYB/bHLH) und dem Zielgen (*DFR*-Promotor), ist eine deutliche Korrelation zu erkennen. Dabei ist eine *DFR*-Promotoraktivität ab dem dritten Tag nach der Keimung in Keimblätter und im oberen Hypokotyl zu erkennen. Diese Promotoraktivität bleibt bis zum fünften Tag konstant, während sie nach dem sechsten Tag wieder abnimmt (Pasch, 2007). Die Aktivität des *DFR*-Promotors beschränkt sich damit auf das Hypokotyl und die unteren Randschichten der Keimblätter. Damit existiert eine Übereinstimmung zwischen der Expression des *DFR*-Gens und der Produktakkumulation (Anthocyane) in diesen Gewebeschichten. Diese Aktivität des *DFR*-Promotors korreliert mit der Aktivität des *BHLH2*- und *MYB75*-Promotors. Die Korrelation überlappt sowohl zeitlich als auch gewebsspezifisch. Dies bestätigt, dass diese Transkriptionsfaktoren in Bezug auf Saccharose im Medium die

Expression des *DFR*-Gens und damit die Akkumulation der Anthocyane in den Hypokotyl- und Keimblattzellen regulieren.

#### 4.5.5 Schlussfolgerungen

Zuckerstoffe sind wichtige Signalmoleküle für die Wachstums- und Entwicklungskontrolle der Pflanze während des gesamten Lebenszyklus'. Viele pleiotropische Effekte gehen mit Saccharose einher. Es wirkt sowohl auf den pflanzlichen Metabolismus, auf Wachstum und Entwicklung, auf die Stressantwort und auf die Genexpression. Daraus ergibt sich ein komplexes Bild Zucker-kontrollierter Regulationsnetzwerke und Interaktionen mit vielen Stoffwechselwegen. Durch Saccharose wird in der Zelle eine Signaltransduktions-Kaskade ausgelöst, die in einer zellulären Antwort in Form einer veränderten Genexpression und Enzymaktivität resultiert (Lillo *et al.*, 2008). In Zucker-regulierten Promotoren (*DFR*) ist die G-Box zu finden. Diese ist involviert in die transkriptionelle Kontrolle durch viele Stimuli, wie die Phytochrom-vermittelte Kontrolle der Genexpression durch die Bindung von Pif3 (Martinez-Garcia *et al.*, 2000) oder HY5 (Chattopadhyay, *et al.*, 1998) Transkriptionsfaktoren oder, wie hier gezeigt, durch die Saccharose-vermittelte Bindung der MYB/bHLH-Faktoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass BHLH2 und BHLH42 gewebespezifisch, aber durchgehend exprimiert werden, während die MYB-Proteine MYB75 und MYB90 stimulus-abhängig exprimiert werden. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der bHLH- bzw. der MYB-Faktoren untereinander haben sie zudem teilweise redundante Funktion in der Flavonoidbiosynthese der *A. thaliana* Keimlinge. Die bHLH-Faktoren sind Kofaktoren der MYB-Proteine mit eher weiter gefassten Funktionen (wie bei TTG1). Der allgemeinen Funktion der gewebespezifischen bHLH Faktoren steht die spezifische Funktion der MYB Proteine gegenüber, die stimulusabhängig in einem Entwicklungsstadium oder einem Gewebe exprimiert werden. Beide Transkriptionsfaktorklassen gehen mit TTG1 einen Regulationskomplex im Kern ein, der das Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese, die *DFR*, aktiviert. MYB75 und BHLH2 bilden also die Hauptfaktoren bei der Regulation der Anthocyanbiosynthese (insbesondere der *DFR*), während MYB90 und BHLH42 redundante Funktionen in der Regulation der Anthocyanbiosynthese in Keimlingen aufweisen.

## 4.6 Ausblick

Die Regulation der Transkription pflanzlicher Gene, insbesondere die Regulation der Gene des Flavonoidbiosyntheseweges, ist in den letzten Jahren sehr gut untersucht worden. Sie wird durch die Interaktion vieler Proteine gesteuert. Dabei ist besonders bei der Reaktion auf biotische und abiotische Faktoren und im Kontext der Pflanzenentwicklung eine exakte Feinregulation der unterschiedlichen Produkte des Biosyntheseweges erforderlich. Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit, die ihren Teil zur Aufdeckung der Regulationsmechanismen beitragen, sind viele weiterführende Fragestellungen entstanden, die meist schon konkret im Verlauf dieser Arbeit angesprochen wurden.

Das Studium der Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren untereinander und mit den Zielpromotoren wurde parallel auf der *in vitro* und der *in vivo* Ebene in Angriff genommen, sowohl mit Methoden aus der Biologie als auch aus der Physik. In weiterführenden Untersuchungen ist neben dem Interesse der Aufklärung der Struktur des Regulationskomplexes eine weitere wichtige Komponente von entscheidender Bedeutung. Es bleibt zu untersuchen, wie genau die Regulation des Komplexes selbst erfolgt, ob durch abiotische Faktoren von außen oder auch entwicklungspezifisch. Dabei kann die Beantwortung dieser Fragestellungen sowohl durch die Anwendung neuer physikalischer Methoden, als auch durch den Einsatz bewährter Methoden aus der Biologie in Angriff genommen werden.

Bisher sind in den Interaktionsstudien nur die R2R3-MYB und R/B-ähnlichen bHLH Faktoren berücksichtigt worden. Der Transkriptionsfaktor TTG1 spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle im Verlauf der Regulation. Mögliche weiterführende Experimente könnten auf die Interaktion der Proteine mit TTG1 hinauslaufen. Zum einen könnte in weiteren BiFC-Experimenten TTG1 als möglicher Partner von MYB75 oder von BHLH2/BHLH42 getestet werden bzw. kann damit der Frage nachgegangen werden, ob TTG1 ebenfalls homodimerisiert. Dies könnte Aufschluss über die exakte Reihenfolge der Komplexbildung geben.

Dieser Frage kann ebenfalls mit dem neu entwickelten dreifach-FRET nachgegangen werden. Die Methode der „dreifach alternierenden Laseranregung“ (*Triple Alternating Laser Excitation* / TrALEx) mit drei spektral separierten Detektionskanälen und drei Anregungswellenlängen, die sukzessive geschaltet sind, gibt Information über komplexe Systeme, indem alle Farbstoffe und der resultierende FRET einzeln vermessen wird. Aus dynamischer Sicht heraus lassen sich mit dieser Methode, im Gegensatz zum FRET mit nur zwei Farbstoffen, Korrelationen zwischen Bewegungen von Molekülen und insbesondere Reihenfolgen von Ereignissen bestimmen. Es kann also damit die Reihenfolge der Bindung der Transkriptionsfaktoren untereinander ermittelt werden.

Durch TrALEx wird der gemessene Energietransfer eindeutig analysierbar und auch die Stöchiometrie des Komplexes zugänglich gemacht (z.B. liegen bHLH-Faktoren im Komplex wahrscheinlich als Dimere vor). Die Übertragung dieser Methode auf das Imaging kann dann auch die Detektion einzelner Transkriptionsfaktorkomplexe *in planta* ermöglichen. Dazu werden alle drei Proteine des Komplexes mit fluoreszierenden Molekülen fusioniert. Durch spezifische Anregung der einzelnen Farbstoffe nacheinander kann durch die Separation der Detektionskanäle die Reihenfolge der Komplexbildung in pflanzlichen Zellen aufgedeckt werden.

Eine interessante Erweiterung zum FRET ist die „fluoreszierende Zeitschaltuhr“ (Zhang *et al.*, 2002). Dabei wird an das zu untersuchende Protein ein verändertes DsRed-Protein fusioniert. Diese Variante verändert sich von grüner zu roter Fluoreszenz über eine Periode von etwa 24 Stunden. Es handelt sich um ein GFP-ähnliches Intermediat, welches sich umwandelt zu einer finalen roten Spezies. In dem Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz kann damit die zeitliche Aktivität eines zum Beispiel eines *MYB*-Promotors in transgenen Pflanzen reflektiert werden. Da die Zeitskala der Fluoreszenzänderung festgelegt und die Auflösung begrenzt ist (nur wenige Stunden), kann das System für Analysen angewandt werden, in denen Gene entwicklungspezifisch oder als Reaktion auf externe Stimuli (wie z.B. der *MYB75* Faktor in Bezug auf Saccharose) kontrolliert werden sollen.

In den letzten Jahren wurde das Verfahren der Zwei-Farben-FCS oder auch Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS) etabliert, was eine wichtige Erweiterung der Ein-Farben-FCS darstellt (Schwille *et al.*, 1997). Mit FCCS können Protein-Protein Wechselwirkungen direkt in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Dabei wären die zu untersuchenden Bindungspartner (*MYB75*, *BHLH42/BHLH2*, *TTG1*) mit autofluoreszierenden Proteinen genetisch markiert. Wichtig bei diesem Verfahren ist nicht die räumliche Nähe der Fluorophore im nm-Bereich wie beim FRET, sondern die korrelierte Bewegung zueinander. Mit dieser Methode ist es möglich, die Bildung und die Interaktion des entstandenen Komplexes zwischen den *MYB*, *bHLH* und *TTG1* Proteinen unter Verwendung von autofluoreszierenden Proteinen im Cytoplasma bzw. im Kern von pflanzlichen Zellen nachzuweisen. Da FCCS Aufschluss über die Mobilität und Dynamik der Protein-Protein-Wechselwirkungen gibt, kann damit untersucht werden, welcher Faktor in welchem Zellkompartiment eine Bindung eingeht. Das Prinzip der FCCS beruht auf der gleichzeitigen Anregung und Detektion von zwei spektral voneinander getrennten Fluorophoren. Zusätzlich zur Autokorrelation für jeden einzelnen Kanal können die Intensitätsfluktuationen beider Kanäle über Kreuz korreliert werden. Zur Kreuzkorrelation tragen dann nur Teilchen bei, die in beiden Kanälen gleichzeitig ein Signal geben, d.h. beide Farben (und damit beide Proteine) diffundieren simultan durch das Messvolumen

der Zelle, wenn sie miteinander in Wechselwirkung treten. Dabei kann untersucht werden, ob beide Partner gemeinsam etwa vom Cytoplasma in den Zellkern transportiert werden (z.B. bHLH mit TTG1, bHLH mit bHLH, bHLH mit MYB). Im Gegensatz zur FCS können dann die Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren direkt in lebenden Zellen detektiert werden. Eventuell könnten mit dieser Methode ebenfalls regulierende Faktoren des Komplexes analysiert werden, ob etwa kleine regulatorische MYB-Proteine an den TTG1-bHLH Komplex binden und damit die Bindung des spezifischen MYB Proteins verhindern, oder ob der Komplex noch zustande kommt, wenn einer der Partner fehlt (z.B. TTG1).

## 5. Zusammenfassung

Die Grundlagen der Regulation der Flavonoidbiosynthese in der Modellpflanze *A. thaliana* sind auf molekularer Ebene bereits seit längerem Gegenstand der Forschung und daher gut untersucht. Die Biosynthese ist sowohl räumlich als auch zeitlich während der gesamten pflanzlichen Entwicklung reguliert und wird durch eine Vielzahl von umweltbedingten und endogenen Einflüssen induziert. Ohne das reibungslose und funktionelle Zusammenspiel vieler variabler Proteine ist daher ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels nicht möglich. Viele regulatorisch wichtige Transkriptionsfaktoren wie die R2R3-MYB und R/B-ähnlichen BHLH Proteine sind gut charakterisiert. Als Regulatoren der Dihydroflavonol-Reduktase (DFR), des Schlüsselenzyms der Anthocyanbiosynthese, wurden im Rahmen dieser Arbeit besonders drei Transkriptionsfaktoren untersucht, MYB75, sowie BHLH2 und BHLH42. Dabei war hier vor allem die Untersuchung des Regulationskomplexes in der lebenden Pflanzenzelle von Bedeutung. Für die Regulation treten diese Transkriptionsfaktoren sowohl miteinander als auch mit dem *DFR*-Promotor in Kontakt. Um diesen Regulationsmechanismus zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Bindung der Transkriptionsfaktoren untereinander und an ihre Ziel-DNA mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) oder der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) untersucht. Zur Absicherung und Erweiterung der Ergebnisse wurde auf das Protoplasten-Kotransfektionssystem und die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zurückgegriffen. Mikroskopisch wurde die Bildung des Regulationskomplexes in pflanzlichen Zellen visualisiert.

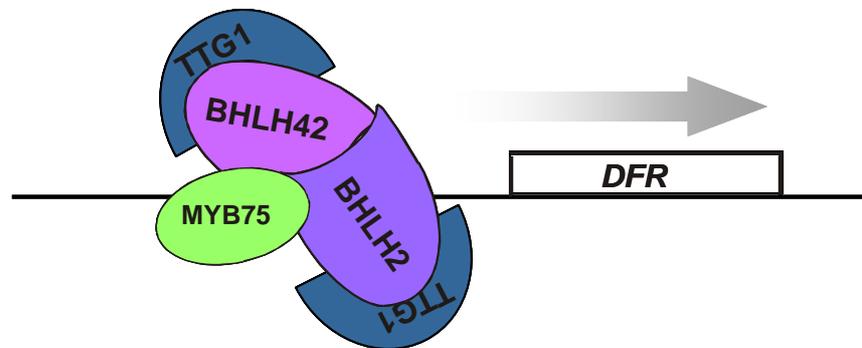
Die Regulation des *DFR*-Promotors erfolgt durch die Kombination von MYB75 mit BHLH42 und von MYB75 mit BHLH2. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *cis*-wirkende Elemente charakterisiert, die als *MYB Recognition Element* (MRE) und *R Recognition Element* (RRE) jeweils den MYB75 bzw. den BHLH2 oder BHLH42 Transkriptionsfaktor binden können. Diese Sequenzen sind notwendig für die Aktivierung des *DFR*-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren. Im Rahmen dieser Bindungsstudie wurde das FCS-System etabliert. Im Gegensatz zu biologischen Standardmethoden wie dem EMSA oder der Protoplasten-Kotransfektion konnte mit der FCS schnell in Echtzeit die spezifische Bindung zwischen zwei und mehr Molekülen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden die Transkriptionsfaktoren genetisch durch Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen markiert, um die Lokalisation in der pflanzlichen Zelle und die Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren bzw. mit der DNA zu analysieren. Es konnte in At7-Kotransfektionsstudien gezeigt werden, dass diese Fusionsproteine in lebenden Protoplasten den *DFR*-Promotor aktivieren können. Dabei sind die MYB-Proteine nur funktional, wenn die Fluoreszenzproteine N-terminal fusioniert sind, während die BHLH-Proteine sowohl als C- als auch als N-terminale Fusionen funktional sind. Diese

fluoreszierenden Varianten wurden eingesetzt, um die entsprechenden Transkriptionsfaktor *knock-out* Linien zu komplementieren. Dabei wurden die Fusionsproteine unter der Kontrolle der jeweiligen nativen Promotoren exprimiert, um die fehlenden Originalfaktoren in natürlicher Weise zu ersetzen. Nach der Transfektion zeigten diese *knock-out* Linien wieder den Wildtyp-Phänotyp. Lokalisationsstudien in Protoplasten und in den Pflanzen zeigten ein differenziertes Bild der Akkumulation der Transkriptionsfaktoren. MYB75 ist ubiquitär im gesamten Protoplasten gleichmäßig verteilt. Das Vorhandensein eines möglichen Kernimport-Signals lässt vermuten, dass seine Regulation über nucleocytoplasmatische Partitionierung gesteuert wird. Im Cytoplasma kann MYB75 möglicherweise durch die Anwesenheit von Saccharose reguliert werden. Durch den Transport in den Kern kann dann die Anthocyanbiosynthese aktiviert werden. Dagegen akkumulieren bHLH-Proteine in Protoplasten ausschließlich im Zellkern. In komplementierten *myb75* Mutanten konnte ausschließlich bei Saccharose-Zugabe im Medium eine Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden. Hauptsächlich war diese Fluoreszenz in den Zellen des Hypokotyls zu detektieren, dort, wo die Wildtyp-Keimlinge nach Saccharose-Zugabe hauptsächlich Anthocyane akkumulieren. Die komplementierten *bhlh2* bzw. *bhlh42* Mutanten zeigten keinen Unterschied in der Fluoreszenz in Bezug auf Zucker. In allen Pflanzenorganen konnte eine starke Fluoreszenz ausschließlich in den Zellkernen der Zellen nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden in verschiedenen Interaktionsstudien die Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren untereinander untersucht. In Protoplasten wurde mittels BiFC gezeigt, dass MYB75 sowohl mit BHLH2 als auch mit BHLH42 einen Komplex im Zellkern eingehen kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass BHLH2 und BHLH42 sowohl Homodimere bilden, als auch untereinander eine Bindung eingehen können. Alle Interaktionen fanden ausschließlich im Kern statt. MYB75 konnte dagegen keine Homodimere bilden. Mit Hilfe der FRET-Methode wurde durch Energietransfer zwischen den Fusionsproteinen die Komplexbildung im Zellkern von Protoplasten und Hypokotylzellen junger Keimlinge gezeigt. Durch die Expression der Fluoreszenzproteine unter der Kontrolle des nativen Promotors konnten Einzelmoleküle gemessen werden.

Mit Hilfe dieser unterschiedlichen Methoden konnte die Komplexbildung des Regulationskomplexes sehr gut analysiert und charakterisiert werden: Wahrscheinlich bindet TTG1 zunächst im Cytoplasma an das bHLH-Protein. Dieser Komplex wandert vermutlich gemeinsam in den Zellkern, wo eine Bindung an den spezifischen MYB-Faktor stattfindet. Dieser ist wahrscheinlich sowohl entwicklungspezifisch als auch durch einen äußeren Stimulus (z.B. Saccharose) reguliert. Gemeinsam bindet dieser Komplex an den Ziel-Promotor (Abb. 5-1). Die Stöchiometrie des Komplexes ist bisher noch unklar. Wahrscheinlich befinden sich jeweils zwei bHLH-Proteine, die je ein TTG1-Protein

gebunden haben, in dem Komplex. Dabei könnte zur spezifischeren Regulation eventuell sogar ein BHLH2 und BHLH42 Protein involviert sein. Beide bHLH-Proteine könnten gemeinsam an ein RRE in der DNA binden, während das MYB-Protein an das MRE bindet. TTG1 kann dagegen weder mit dem MYB-Protein noch mit der DNA eine Bindung eingehen.



**Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Regulation des *DFR*-Promotors durch den MYB75 / BHLH2-BHLH42 / TTG1 Komplex in Bezug auf Saccharose-Stress.**

Zusätzlich zur Untersuchung der Komplexbildung wurde der Frage nachgegangen, inwiefern dieser Regulationskomplex durch äußere Einflüsse reguliert wird. Durch Saccharose oder durch UV-Licht akkumulieren Anthocyane in *A. thaliana* Keimlingen. Die Untersuchung der Frage, welche Transkriptionsfaktoren auf unterschiedliche Stimuli von außen reagieren, ergab, dass wahrscheinlich MYB75 gemeinsam mit BHLH2 spezifisch bei Saccharose-Zugabe die Aktivierung des *DFR*-Promotors und damit die erhöhte Akkumulation von Anthocyanen bewirkt. Fehlt einer der beiden Komponenten, kann dies zum Teil durch die Anwesenheit von MYB90 bzw. BHLH42 ausgeglichen werden, da diese Proteine wahrscheinlich in Bezug auf Saccharose-Stress eine redundante Funktion aufweisen. Diese Vermutungen werden durch entsprechende RT-PCR Ergebnisse und ähnliche Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren in jungen Keimlingen unterstützt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.
- Atchley, W.R., Fitch, W.** (1997). A natural classification of the basic-helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **94**, 5172-5176.
- Avila, J., Nieto, C., Canas, L., Benito, M.J., Paz-Ares, J.** (1993). *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory *C1* gene and to animal *myb* protooncogenes. *Plant J*, **3**, 553-562.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.P., Grossniklaus, U., Chua, N.H.** (2001). LAF1, a MYB transcription factor activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **15**, 2613-2625.
- Batschauer, A.** (1998). Photoreceptors of higher plants. *Planta* **206**, 479-492.
- Baudry, A., Caboche, M., 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., Lepiniec, L.** (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **39**, 366-380.
- Bernhardt, C., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A.M., Schiefelbein, J.W.** (2001). Two bHLH genes are involved in *Arabidopsis* root epidermis cell specification. 12th International Conference on *Arabidopsis* Research, Madison, Wisconsin.
- Bernhardt, C., Lee, M.M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A., 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.
- Benvenuto, G., Formigini, F., Laflamme, P., Malakhov, M., Bowler, C.** (2002). The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. *Curr Biol* **12**, 1529-1534.
- Bernhardt, C., Zhao, M., Gonzalez, A., Lloyd, A., Schiefelbein, J.** (2005). The bHLH genes GL3 and EGL3 participate in an intercellular regulatory circuit that controls the cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* **132**, 291-298.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Britsch, L., Heller, W., Grisebach, H.** (1981). Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with enzyme systems from cell cultures of parsley. *Z. f. Naturforschung* **36c**, 742-750.
- Broun, P.** (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 272-279.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., Martienssen, R.A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien** (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7877-82.

- Carey, C.C., Strahle, J.T., Selinger, D.A., Chandler, V.** (2004). Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotype relative to the functionally similar Transparent Testa Glabra1 gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 450–464.
- Carré, I.A., Kim, J.-Y.** (2002). MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J of Exper. Botany* **53**, 1551-1557.
- Cavrois, M., de Noronah, C., Greene, W.C.** (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1151–1154.
- Chalfie, D., Tu, M.Y., Euskirchen, G., Ward W.W., Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., Wei, N.** (1998). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* **10**, 673-684.
- Ciarapica, R., Rosati, J., Cesareni, G., Nasi, S.** (2003). Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix leucine zipper domains. *J. Biol. Chem.* **278**, 12182-12190.
- Clontech** (2000). BD Living Colors User Manual. Clontech Laboratories Inc., PaloAlto, USA.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H.K., Jenkins, G.I., Tonelli, C.** (2007). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **165**, 886-894.
- Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G., Tonelli, C.** (1993). Molecular homology among members of the *R* gene family in maize. *Plant J* **3**, 335-346.
- Consonni, G., Ronchi, A., Pilu, R., Gavazzi, G., Dellaporta, S. L., Tonelli, C.** (1997). Ectopic anthocyanin pigmentation in maize as a tool for defining interactions between homologous regulatory factors. *Mol General Genetics* **256**, 265-276.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., Conti, E.** (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Anu Rev Biochem* **76**, 647-671.
- Cotlet, M., Hofkens, J., Habuchi, S., Dirix, G., Van Guyse, M., Michiels, J., Vanderleyden, J., De Schryver, F.C.** (2001). Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proc. Nat. Acad. of Sciences (USA)* **98**, 14398-14403.
- Cotlet, M., Hofkens, J., Maus, M., Gensch, T., van der Auweraer, M., Michiels, J., Dirix, G., Van Guyse, M., Vanderleyden, J., Visser A.J.W.G., De Schryver, F.C.** (2001). Excited-State Dynamics in the Enhanced Green Fluorescent Protein Mutant Probed by Picosecond Time-Resolved Single Photon Counting Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **105**, 4999-5006.
- Cotlet, M., Hofkens, J., Köhn, F., Michiels, J., Dirix, G., Van Guyse, M., Vanderleyden, J., De Schryver, F.C.** (2001). Collective effects in individual oligomers of the red fluorescent coral protein DsRed. *Chemical Physics Letters* **336**, 415-423.
- Curtis, M., Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway TM cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plants. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1987). Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J* **6**, 2551-2556.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B., Roby, D.** (1999) A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J* **20** 57-66.

- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., 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., 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., Lepiniec, L.** (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in Arabidopsis testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**, 2514-2531.
- Dixon, R.A., Xie, D.Y., Sharma, S.B.** (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* **165**, 9-28.
- Dynan, W.S.** (1989). Modularity in promoters and enhancers. *Cell* **58**, 1-4.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**, 1349.
- Eigen, M., Rigler, R.** (1994). Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5740-5747.
- Elson, E.L., Magde, D.** (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, **13** (1), 1-27.
- Elson, E.L.** (2001). Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic* **2**, 789-796.
- Enderlein, J., Böhmer, M.** (2003). Fluorescence Spectroscopy of single molecules under ambient conditions, *Chem Phys Chem* **4**, 792-808.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., Harrison, S.C.** (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* **8**, 970-980.
- Ferre-D'Amare, A.R., Pognonec, P., Roeder, R.G., Burley, S.K.** (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.* **13**, 180-189.
- Fisher, F., Goding, C.R.** (1992). Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix-protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. *EMBO J.* **11**, 4103-4109.
- Forkmann, G., De Vlaming, P., Spribille, R., Wiering, H., Schram, A.W.** (1986). Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **41**, 179-186.
- Forkmann, G.** (1991). Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding* **106**, 1-26.
- Förster, T.** (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *A Phys* **437**, 55-75.
- Frankel, A.D., Berg, J.M., Pabo, C.O.** (1987). Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proc of the Nat Acad of Sciences of the USA* **84**, 4841-4845.
- Frankel, A.D., Kim, P.S.** (1991). Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell* **65**, 717-719.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M., Chory, J.** (2002). Three Redundant Brassinosteroid Early Response Genes Encode Putative bHLH Transcription Factors Required for Normal Growth. *Genetics* **162**, 1445-56.

- Fuji, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yaganida, M., Hakoshima, T.** (2000). Structural bases for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* **7**, 889-893.
- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A., Fromageot, P.** (1991). Specific DNA binding by c-Myb: Evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* **253**, 1140-1143.
- Galego, L., Almeida, J.** (2002). Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in Antirrhinum flowers. *Genes Dev* **16**, 880-91.
- Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y.** (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224.
- Goff, S.A., Cone, K.C., Fromm, M.E.** (1991). Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes & Development* **5**, 298-309.
- Goff, S.A., Cone, K.C., Chandler, V.L.** (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development* **6**, 864-675.
- Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J.M., Lloyd, A.M.** (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **53**, 814-827.
- Görlich, D., Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-660.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N.** (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-99.
- Gussow, D., Clackson, T.** (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**, 10.
- Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D.F., Chemla, D.S., Selvin, P.R., Weiss, S.** (1996). Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc of the Nat Acad of Sciences of the USA* **93**, 6264-6268.
- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbiß, H.H., Herrera-Estrella, L., Schell, J.** (1985). Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Molecular General Genetics* **199**, 161-168.
- Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., Kuboi, T.** (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Sci* **164**, 259–265.
- Harborne, J.B., Williams, C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Harborne, J.B., Williams, C.A.** (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *N Pr Rep* **18**, 310-333.
- Hartmann, U., Valentine, W.J., Christie, J.M., Hays, J., Jenkins, G.I., 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.
- Hartmann U., Sagasser M., Mehrrens F., Stracke R., Weißhaar B.** (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol* **57**, 155-171.

- Heim, M.A.** (2003). Basische Helix-Schleifen-Helix Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*: Eine genomweite Studie zu Struktur und Funktion. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P.C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol and Evolution* **20**, 735-747.
- Heldt, H.W.** (2003). Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag.
- Heller, W., Hahlbrock, K.** (1980). Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Archives of biochemistry and biophysics* **200**, 617-619.
- Hess, S.T., Huang, S., Heikal, A., Webb, W.W.** (2002). Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry* **41**, 697-705.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., 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.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schlerport, R.A.** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir-* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens*-Ti plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Holmes, D.S., Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry* **114**, 193-197.
- Hou D.X., Kai K., Li J.J., Lin S., Terahara N., Wakamatsu M., Fujii M., Young M.R., Colburn N.** (2004) Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, **25**, 29-36
- Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.
- Hu, C.D., Kerppola, T.K.** (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 539-545.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M., Hirsh, D.** (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc of the Nat Acad of Sciences of the USA* **83**, 8447-8451.
- Jenkins, G.I., Long, J.C., Wade, H.K., Shenton, M.R., Bibikova, T.N.** (2001). UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **151**, 121-131.
- Jin, H., Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Mol Biol* **41**, 577-585.
- Jin H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrtens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B., Martin C.** (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UVprotecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J* **19**, 6150-6161.
- Johnson, P.F., McKnight, S.L.** (1989). Eucaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 799-839.

- Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R.** (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell* **14**, 1359-1375.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schaffner, A.R., Saito, K.** (2003). UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 43910-43918.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., Smith, A.E.** (1984). Sequence requirements for nuclear location of Simian Virus 40 large T antigen. *Nature* **311**, 33-38.
- Kasper, R.** (2004). Untersuchung und Manipulierbarkeit der Photophysik einzelner Fluorophore mit Hilfe der Zwei-Farben-Einzelmolekülspektroskopie. Diplomarbeit im Fachbereich Physik der Universität Bielefeld.
- Kato, N., Pontier, D., Lam, E.** (2002). Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol* **129**, 931-942.
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E., Frohnmeier, H.** (1998). CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol Gen Genet* **257**, 595-605.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Karter, K., Schäfer, E., Nagy, F.** (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**, 1445-1456.
- Kirik, V., Kollé, K., Misera, S., Baumlein, H.** (1998). Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective *Arabidopsis* mutants. *Plant Mol Biol* **37**, 819-827.
- Koch, K.E.** (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 509-540.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M.** (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* **16**, 123-132.
- Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F.** (2005). Flavonoids : a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* **10**, 236-242.
- Kombrink, E., Hahlbrock, K.** (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol* **81**, 216-221.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z., 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. *EMBO J* **3**, 1029-1037.
- Koncz, C., Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular General Genetics* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Rolff, E., 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.** (1981) The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis Info Service* **18**, 45-51.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Stam, P.** (1998). Genetic Analysis. In *Arabidopsis Protocols*, J. Martinez-Zapater and J. Salinas, eds (Totowa, USA: Humana Press), 105-117.
- Koornneef, M.** (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Info Services* **27**, 1-4.

- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, K., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterization of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 263-276.
- Kranz, H., Scholz, K., Weisshaar, B. (2000). C-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J* **21**, 231-235.
- Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Schilperoort, R.A. (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**, 72-74.
- Krichevsky, O., Bonnet G. (2002); Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251-297.
- Kubasek, W.L., Shirley, B.W., McKillop, A., Goodman, H.M., Briggs, W., Ausubel, F.M. (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- Kuromori, T., Hirayama, T., Kiyosue, Y., Takabe, H., Mizukado, S., Sakurai, T., Akiyama, K., Kamiya, A., Ito, T., Shinozaki, K. (2004). A collection of 11800 single-copy *Ds* transposon insertion lines in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**, 897-905.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanford, R.E., Butel, J.S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**, 801-813.
- Langowski, J. (2008). Protein-Protein Interactions Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Methods Cell Biol* **85C**, 471-484.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., Deffieux G., Merillon J.M. (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell* **17**, 946-950.
- Lea, U.S., Slimestad, R., Smedvig, P., Lillo, C. (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* **225**, 1245-1253.
- Ledent, V., Paquet, O., Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* **3**, research 0030.1-0030.18.
- Lee, M.M., Schiefelbein, J. (1999) WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **24**, 473-483.
- Lee, M.M., Schiefelbein, J. (2001). Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Dev.* **128**, 1539-46.
- Lee, M.M., 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., 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., Last, R.L. (1993). *Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Lillo, C., Lea, U.S., Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment* **31**, 587-601.
- Lin, C. (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14**, 207-225.

- Lipphardt, S., Brettschneider, R., Kreuzaler, F., Schell, J., Dangl, J.L.** (1988). UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Anthrirrhinum majus* chalcone synthase gene. *EMBO Journal* **7**, 4027-4033.
- Lippincott –Schwartz, J., Snapp, E., Kenworthy, A.** (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Mol Cell Biol* **2**, 444-456.
- Littlewood, T.D., Evan, G.I.** (1998). Basic Helix-Loop-Helix transcription factors. Oxf, Uni Press.
- Ludwig, S.R., Wessler, S.R.** (1990). Maize R gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins. *Cell* **62**, 849-851.
- Ma, P.C.M., Rould, M.A., Weintraub, H., Pabo, C.O.** (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* **77**, 451-459.
- Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W.** (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705.
- Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W.** (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **13**, 29-61.
- Maiti, S. Haupts, U., Webb W.W.** (1997). Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules. *Phys Natl Acad Sci* **94**, 11753-11757.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., Mizuno T.** (2002). The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana* : I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol* **43**, 58-69.
- Marles, M.A., Ray, H., Gruber, M.Y.** (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367-383.
- Martin, C., Paz-Ares, J.** (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**, 67-73.
- Martin, T., Oswald, O., Graham, I.A.** (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol* **128**, 472-81.
- Martinez-Garcia, J., Huq, E., Quail, P.H.** (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.
- Massari, M.E., Murre, C.** (2000). Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429-440.
- Matayoshi, E.D., Wang, G.T., Krafft, G.A., Erickson, J.** (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* **247**, 954 – 958.
- Matsui, K., Tanaka, H., Ohme-Takagi, M.** (2004). Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in *Arabidopsis* by a chimeric PAP1 repressor. *Plant Biotech J* **2**, 487-493.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A.** (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotech* **17**, 969-973.
- Massari, M.E., Murre, C.** (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-440.
- McKnight, S., Tjian, R.** (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mamalian cells. *Cell* **46**, 795-805.

- Mehrtens, F.** (1999). Untersuchungen zur Bedeutung von MYB-ähnlichen und bHLH-Faktoren für die Aktivierung der Promotoren von an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgenen in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation an der Universität zu Köln.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., Weisshaar, B.** (2005). The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 1083-1096.
- Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H.D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeeckens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A.F., Bouchez, D., Jones, J.J.D., Pereira, A., Wisman, E., Bevan, M.** (1999). Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**, 1827-1840.
- Melcher, K., Johnston, S. A.** (1995). GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol* **15**, 2839-48.
- Merkle, T., Leclerc, D., Marshalisay, C., Nagy, F.** (1996). A plant in vitro system for the nuclear import of proteins. *Plant J* **10**, 1177-86.
- Minsky, M.** (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128-38.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M., Nakamura, K.** (1997a). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for  $\beta$ -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* **11**, 841-851.
- Mita, S., Hirano, H., Nakamura, K.** (1997b). Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*: A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol* **114**, 575-582.
- Mol, J., Grotewold, E., Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**, 212-217.
- Mol, J., Jenkins, G.I., Schäfer, E., Weiss, D.** (1996). Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Rev in Plant Sciences* **15**, 525-557.
- Moerner, W.E., Kador, L.** (1989). Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett* **62**, 2535-2538.
- Moerner, W.E., Orrit, M.** (1999). Illuminating single molecules in condensed matter. *Science* **283**, 1670-1676.
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y.** (2007). Genome-wide-reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. *Plant, Cell and Environ* **30**, 85-112.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson F. H., Winant J.** (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656-62.
- Morita, M.T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato, T., Nakamura, M., Tasaka, M.** (2006). A C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* **47**, 619-28.
- Mörtelmaier, M., Kögler, E.J., Hesse, J., Sonnleitner M., Huber, L.A., Schutz, J.** (2002). Single molecule microscopy in living cells: subtraction of autofluorescence based on two color recording. *Single Mol* **3**, 225.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., 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., Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D.** (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell* **56**, 777-783.
- Neuffer, M.G., Coe, E.H., Jun., Wessler, S.R.** (1997). *Mutants of Maize*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., Smith, T. F.** (1994). The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., 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., 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., 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.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y.** (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**, 639-648.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., Nakamura, K.** (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 252-261.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien R.Y., Remington, S.J.** (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Pabo, C.O., Rebar, E.J.** (1994). Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* **263**, 671-673.
- Pasch, A.S.** (2007). Analyse von transgenen Promotor-GUS-Linien zur Untersuchung der Genregulation der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.
- Payne, C.T., Zhang, F., 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., 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., 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., 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.

- Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C., Bevan, M.W.** (2001). MYB61 Is Required for Mucilage Deposition and Extrusion in the Arabidopsis Seed Coat. *The Plant Cell* **13**, 2777-2791.
- Petroni, K., Cominelli, E., Consonni, G., Gusmaroli, G., Gavazzi, G., Tonelli, C.** (2000). The developmental expression of the maize regulatory gene Hopi determines germination dependent anthocyanin accumulation. *Genetics* **155**, 323-336.
- Peters, E.** (2006). Bindungsstudie von AtGRP7 an seine eigene RNA mittels schneller FCS. Diplomarbeit im Fachbereich Physik der Universität Bielefeld.
- Pietta, P.G.** (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **67**, 1035-1042.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., 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.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N., Koes, R.** (1999). Analysis of BHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J* **13**, 475-488.
- Quattrocchio, F., Verweij, W., Kroon, A., Spelt, C., Mol, J., Koes, R.** (2006). PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell* **18**, 1274-1291.
- Ramsay, N.A., Glover, B.J.** (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**, 63-70.
- Rigler, R., Mets, U., Widgreen, J., Kasuk, P.** (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Biophysical Journal* **22**, 169-175.
- Rigler, R., Elson, E.S.** (2001). *Fluorescence Correlation Spectroscopy*; Springer Berlin Heidelberg.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, C.L.** (2000) Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Robinson, K.A., Lopes, J.M.** (2000). SURVEY AND SUMMARY: Saccharomyces cerevisiae basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nuc Acids Research* **28**, 1499-1505.
- Rolland, F., Moore, B., Sheen J.** (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *P Cell*, 185–205.
- Romero, I., Fuentes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., Paz-Ares, J.** (1998). More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **14**, 273-284.
- Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Debeaujon, I., Pourcel, L., Caboche, M., Einhorn, J., Lepiniec, L.** (2006). Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **5**, 1-12.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**, 247-259.
- Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Graud, C., Russo, M.** (2001). The open reading frame 1-encoded ('36K') protein of Carnation Italian ringspot virus localizes to mitochondria. *J Gen Virol* **82**, 29–34.
- Ruhe, N.** (2007). Funktionelle Substitutionsanalysen zur Untersuchung von R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Bielefeld.

- Sablowski, R.W.M., Moyano, E., Culianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C., Bevan, M.** (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J* **13**, 128-137.
- 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., Weisshaar, B.** (2002). A. thaliana TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev* **16**, 138-149.
- Sanger, F., Nicklen, S., 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.
- Sauer, M., Herten, D.P.** (2003). Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie; Bunsenmagazin.
- Schäfer, D.G., Zryd, J.P., Knight, C.D., Cove, D.J.** (1991). Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* **226**, 18- 424.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A., Coupland, G.** (1998). LATE ELONGATED HYPOKOTYL, an Arabidopsis gene encoding a MYB transcription factor, regulates circadian rhythmicity and photoperiodic responses. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schiefelbein, J.** (2003). Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 74-8.
- Schmelzer, E., Jahnen, W., Hahlbrock, K.** (1988). In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc of the Nat Acad of Sciences of the USA* **85**, 2989-2993.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F.J., Rigler, R.** (1997). Dual-color fluorescence crosscorrelation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical J* **72**, 1878-1886.
- Schwille, P. Hausstein, E.** (2005). Fluorescence Correlation Spectroscopy. An introduction to ist concepts and applications. Biophysics textbook online.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567-1572.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y.** (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* **2**, 905-909.
- Sharma, S.B., Dixon, R.A.** (2005). Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **44**, 62-75.
- Shera, E.B., Seitzinger, N.K., Davis, L.M., Keller, R.A., Soper, S.A.** (1990). Detection of single fluorescent molecules, *Chem Phys Lett* **174**, 553.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y., Hakoshima, T.** (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *Embo J* **16**, 4689-97.
- Shirley, B., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M., Goodman, H.M.** (1995). Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* **8**, 659-671.
- 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., Goodman, H.M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**, 333-347.
- Singh, H., Clerc, R.G., LeBowitz, J. H.** (1989). Molecular cloning of sequence-specific DNA binding proteins using recognition site probes. *BioTechniques* **7**, 252-261.
- Smeekens, S.** (2000). Sugar-induced signal transduction plants. *Plant Phys Mol Biol* **51**, 49-81.
- Solano, R., Fuertes, A., Sánchez-Pulido, L., Valencia, A., Paz-Arez, J.** (1997). A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity a plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J Biol Chem* **272**, 2889-2895.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata P.** (2006). Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Phys* **140**, 637–646.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., Koes, R.** (2000). anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-1631.
- Sprenger-Haussels, M., Weisshaar, B.** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J* **22**, 1-8.
- Stacey, M.G., Hicks, S.N., Von Arnim, A.G.** (1999). Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localisation of *Arabidopsis* COP1. *Plant Cell* **11**, 349-363.
- Stacey, M.G., Kopp, O.R., Kim, T.H., Von Arnim, A.G.** (2000). Modular domain structure of *Arabidopsis* COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localisation signal in planta. *Plant Physiol* **124**, 979-989.
- Stapleton, A.E., Walbot, V.** (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Phys* **105**, 881-889.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biol* **4**, 447-456.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huel, G., Barsch, A., Mehrrens, F., Niehaus, K., 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.
- Taylor, L.P., Jorgensen, R.** (1992) Conditional male fertility in chalcone synthase deficient petunia. *Journal of Heredity* **83**, 11-17.
- Teng S., Keurentjes J., Bentsink L., Koornneef M., Smeekens S.** (2005) Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Phys* **139**, 1840-1852.
- Thompson, N.L., Lieto, A.M., Allen, N.W.** (2002). Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 634-641.
- Tinnefeld, P.** (2002). Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Tjian, R., Maniatis, T.** (1994). Transcriptional activation : a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**, 5-8.
- Tohge, T., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Yamazaki, M., Saito, K.** (2005). Enhanced radical scavenging activity of genetically modified *Arabidopsis* seeds. *Biotechnol Lett* **27**, 297-303.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-I., Awazu-hara, M., Inoue, E., Tkahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M., Saito, K.** (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* **42**, 218-235.

- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P.H.** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
- Tonelli, C., Dolfini, S., Ronchi, A., Consonni, G., Gavazzi, G.** (1994). Light inducibility and tissue specificity of the *R* gene family in maize. *Genetica* **94**, 225-234.
- Trezzini, G. F., Horrichs, A., 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.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-44.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Shinozaki, K.** (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- Urao, T., Noji, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1996). A transcriptional activation domain of ATMYB2, a drought-inducible Arabidopsis Myb-related protein. *Plant J* **10**, 1145-1148.
- Van Craenenbroeck, E., Engelborghs, Y.** (2000). Fluorescence correlation spectroscopy: molecular recognition at the single molecule level. *J. Mol. Recog* **13**, 93-100.
- de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J., Koes, R.** (1997). The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes and Development* **11**, 1422-1434.
- Wachter, R.M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson G.T., Remington, S. J.** (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Struc* **6**, 1267-1277.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D., Gray, J.C.** (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1350.
- Webb, W.W.** (1976). Applications of fluorescence correlation spectroscopy. *Q Rev Bioph* **9**, 49-68.
- Weiss, S.** (1999). Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science* **283**, 1676-1683.
- Weiss, D.** (2000). Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signalling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol Plant* **100**, 152-157.
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K.** (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J* **10**, 1777-1786.
- Wiedenmann, J., Schenk, A., Rocker, C., Girod, A., Spindler, K.D., Nienhaus, G. U.** (2002). A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc of the Nat Acad of Sciences of the USA* **99**, 11646-11651.
- Wink, M.** (1999). Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. (Sheffield: Sheffield Academic Press).
- Wink M.** (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**, 485-493.

- Wisman E., Hartmann U., Sagasser M., Baumann E., Palme K., Hahlbrock K., Saedler H., Weisshaar B.** (1998). Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc of the Nat Acad of Sciences* **95**, 12432-12437.
- 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., Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science New York* **299**, 396-399.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., Nagatani, A.** (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J. Cell Biol* **145**, 437-445.
- Yip, W.T., Hu, D., Yu, J., Vanden Bout, D.A., Barbara, P.F.** (1998). Classifying the photophysical dynamics of single- and multiple-chromophoric molecules by single molecule spectroscopy. *J Phys Chem A* **102**, 7564.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y.** (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature* **3**, 906-918.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T., Lloyd, A.** (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Dev* **130**, 4859-4869.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., Chua, N.H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* **1**, 641-646.
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E., Lloyd, A.** (2008). The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* **135**, 1991-1999.
- Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., McKeon, F.** (1998). Intramolecular masking of a nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**, 851-861.
- Zhuang, X., Ha, T., Kim, H.D., Centner, T., Labeit, S., Chu, S.** (2000). Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study, *PNAS* **97**, 26.
- Zimmermann, I.** (2003). Systematische Untersuchungen von Proteininteraktionen der MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation an der Universität zu Köln.
- Zimmermann, I.M., Heim, M.A., Weisshaar, B., 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 Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte

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

| Klon-nummer | Insert               | Einzelheiten  | Vektor  | Selektion |
|-------------|----------------------|---|---------|-----------|
| VD001       | <i>MYB123</i>        | 6x His-Tag fusioniert, Gateway                            | pDEST17 | AMP       |
| VD002       | <i>MYB123</i>        | GST-Tag fusioniert, Gateway                               | pDEST15 | AMP       |
| VD003       | <i>BHLH42</i>        | GST-Tag fusioniert, Gateway                               | pDEST15 | AMP       |
| VD004       | <i>MYB75</i>         | GST-Tag fusioniert, Gateway                               | pDEST15 | AMP       |
| VD005       | <i>MYB75</i>         | 6x His-Tag fusioniert, Gateway                            | pDEST17 | AMP       |
| VD006       | <i>MYB90</i>         | GST-Tag fusioniert, Gateway                               | pDEST15 | AMP       |
| VD007       | <i>MYB90</i>         | 6x His-Tag fusioniert, Gateway                            | pDEST17 | AMP       |
| VD008       | <i>MYB75</i>         | 6x His-Tag fusioniert                                     | pRSET-A | AMP       |
| VD009       | <i>MYB75</i>         | 6x His-Tag fusioniert                                     | pRSET-A | AMP       |
| VD010       | Pro <sub>MYB75</sub> | 1700bp, aus Col-0 amplifiziert, BamHI/NcoI Schnittstellen | pANGUS  | AMP       |
| VD011       | <i>GFP:MYB75</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD012       | <i>GFP:BHLH42</i>    | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD013       | <i>MYB75:GFP</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC83  | KAN       |
| VD014       | <i>BHLH42:GFP</i>    | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC83  | KAN       |
| VD015       | <i>GFP:MYB123</i>    | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD016       | <i>MYB123:GFP</i>    | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC83  | KAN       |
| VD017       | <i>GFP:MYB90</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD019       | <i>GFP:BHLH1</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD020       | <i>BHLH1:GFP</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC83  | KAN       |
| VD021       | <i>GFP:BHLH2</i>     | GFP fusioniert, Gateway                                   | pMDC43  | KAN       |
| VD022       | <i>mRFP</i>          | aus pRSET-B, Apal und SacI Schnittstellen                 | pMDC83  | KAN       |
| VD023       | <i>mOrange</i>       | Aus pRSET-B, Apal und SacI Schnittstellen                 | pMDC83  | KAN       |
| VD024       | <i>MYB75:Orange</i>  | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD023, Gateway        | pMDC83  | KAN       |
| VD025       | <i>BHLH1:Orange</i>  | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD023, Gateway        | pMDC83  | KAN       |
| VD026       | <i>MYB123:Orange</i> | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD023, Gateway        | pMDC83  | KAN       |
| VD027       | <i>BHLH42:Orange</i> | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD023, Gateway        | pMDC83  | KAN       |
| VD028       | <i>MYB75:RFP</i>     | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD022, Gateway           | pMDC83  | KAN       |

| Klon-nummer | Insert                | Einzelheiten   | Vektor | Selektion |
|-------------|-----------------------|--|--------|-----------|
| VD029       | <i>BHLH1:RFP</i>      | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD022, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD030       | <i>MYB123:RFP</i>     | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD022, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD031       | <i>BHLH42:RFP</i>     | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD022, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD032       | <i>mCherry</i>        | aus pRSET-B, Apal und SacI Schnittstellen            | pMDC83 | KAN       |
| VD033       | <i>eYFP</i>           | p5'eYFP/pUC)3, Apal und SacI Schnittstellen, Gateway | pMDC83 | KAN       |
| VD034       | <i>MYB75:Cherry</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD032, Gateway   | pMDC83 | KAN       |
| VD035       | <i>BHLH1:Cherry</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD032, Gateway   | pMDC83 | KAN       |
| VD036       | <i>MYB123:Cherry</i>  | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD032, Gateway   | pMDC83 | KAN       |
| VD037       | <i>BHLH42:Cherry</i>  | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD032, Gateway   | pMDC83 | KAN       |
| VD038       | <i>MYB75:YFP</i>      | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD033, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD039       | <i>BHLH1:YFP</i>      | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD033, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD040       | <i>MYB123:YFP</i>     | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD033, Gateway      | pMDC83 | KAN       |
| VD041       | <i>BHLH42:YFP</i>     | eYFP fusioniert, LR- Reaktion mit VD033, Gateway     | pMDC83 | KAN       |
| VD042       | <i>mCherry</i>        | aus pRSET-B, Ascl und KpnI Schnittstellen, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD043       | <i>mOrange</i>        | aus pRSET-B, Ascl und KpnI Schnittstellen, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD044       | Pro <sub>BHLH42</sub> | Aus VD014, SpeI und HindIII Schnittstellen           | pMDC83 | KAN       |
| VD045       | <i>Cherry:BHLH1</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD046       | <i>Cherry:BHLH2</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD047       | <i>Cherry:MYB90</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD048       | <i>Cherry:MYB123</i>  | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD049       | <i>Cherry:MYB75</i>   | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD050       | <i>Cherry:BHLH42</i>  | mCherry fusioniert, LR-Reaktion mit VD042, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD051       | <i>Orange:BHLH1</i>   | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD052       | <i>Orange:BHLH2</i>   | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD053       | <i>Orange:MYB90</i>   | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD054       | <i>Orange:MYB123</i>  | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD055       | <i>Orange:MYB75</i>   | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD056       | <i>Orange:BHLH42</i>  | mOrange fusioniert, LR-Reaktion mit VD043, Gateway   | pMDC43 | KAN       |
| VD057       | <i>mRFP</i>           | aus pRSET-B, Ascl und KpnI Schnittstellen, Gateway   | pMDC43 | KAN       |

| Klon-nummer | Insert                           | Einzelheiten   | Vektor    | Selektion |
|-------------|----------------------------------|--|-----------|-----------|
| VD058       | <i>eYFP</i>                      | aus p5'eYFP/pUC, NcoI und SacI Schnittstellen, Gateway   | pMDC43    | KAN       |
| VD059       | <i>RFP:BHLH1</i>                 | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD060       | <i>RFP:BHLH2</i>                 | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD061       | <i>RFP:MYB90</i>                 | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD062       | <i>RFP:MYB123</i>                | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD063       | <i>RFP:MYB75</i>                 | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD064       | <i>RFP:BHLH42</i>                | mRFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD057, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD065       | <i>YFP:BHLH1</i>                 | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD066       | <i>YFP:BHLH2</i>                 | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD067       | <i>YFP:MYB90</i>                 | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD068       | <i>YFP:MYB123</i>                | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD069       | <i>YFP:MYB75</i>                 | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD070       | <i>YFP:BHLH42</i>                | eYFP fusioniert, LR-Reaktion mit VD058, Gateway  | pMDC43    | KAN       |
| VD073       | <i>Pro<sub>BHLH42</sub></i>      | In VD037, SpeI und HindIII Schnittstellen, Gateway   | pMDC83    | KAN       |
| VD074       | <i>Pro<sub>BHLH2</sub></i>       | In VD021, BamHI und PstI Schnittstellen, Gateway   | pMDC43    | KAN       |
| VD075       | <i>Pro<sub>MYB75</sub></i>       | In VD011, KpnI und HindIII Schnittstellen, Gateway   | pMDC43    | KAN       |
| VD077       | <i>Pro<sub>MYB90</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, BamHI und NcoI Schnittstellen  | pANGUS    | AMP       |
| VD078       | <i>BHLH42:Cherry</i>             | Gateway  | pDONR201  | KAN       |
| VD079       | <i>GFP:MYB75</i>                 | Gateway  | pDONR201  | KAN       |
| VD080       | <i>Pro<sub>BHLH1</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, BamHI und NcoI Schnittstellen  | pANGUS    | AMP       |
| VD081       | <i>Pro<sub>DFR123</sub>::GUS</i> | Minimalpromotor, GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen                               | pBT10-GUS | AMP       |
| VD082       | <i>Pro<sub>DFR103</sub>::GUS</i> | GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen, Deletion – 103 bp / MRS2 deletiert            | pBT10-GUS | AMP       |
| VD083       | <i>Pro<sub>DFR85</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen, Deletion – 85 bp / MRS2 und RRS3 deletiert    | pBT10-GUS | AMP       |
| VD084       | <i>Pro<sub>DFR53</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen, Deletion – 53 bp / MRS2, RRS2, RRS3 deletiert | pBT10-GUS | AMP       |
| VD085       | <i>Pro<sub>DFR77</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen, Deletion – 77 bp / RRS1 deletiert             | pBT10-GUS | AMP       |
| VD086       | <i>Pro<sub>DFR65</sub>::GUS</i>  | GUS-fusioniert, HindIII und NcoI Schnittstellen, Deletion – 65 bp / RRS1 und MRS1 deletiert    | pBT10-GUS | AMP       |

| Klon-nummer | Insert                                   | Einzelheiten  | Vektor           | Selektion |
|-------------|--|---|------------------|-----------|
| VD087       | Pro <sub>DFR123</sub> / <i>-MRS2-GUS</i> | GUS-fusioniert, BamHI Schnittstelle, site directed mutagenesis/MRS2 | pBT10-GUS        | AMP       |
| VD088       | Pro <sub>DFR123</sub> / <i>-RRS3-GUS</i> | GUS-fusioniert, HpaI Schnittstelle, site directed mutagenesis/RRS3  | pBT10-GUS        | AMP       |
| VD089       | Pro <sub>DFR123</sub> / <i>-RRS2-GUS</i> | GUS-fusioniert, NcoI Schnittstelle, site directed mutagenesis/RRS2  | pBT10-GUS        | AMP       |
| VD090       | Pro <sub>DFR123</sub> / <i>-MRS1-GUS</i> | GUS-fusioniert, EcoRI Schnittstelle, site directed mutagenesis/MRS1 | pBT10-GUS        | AMP       |
| VD091       | Pro <sub>DFR123</sub> / <i>-RRS1-GUS</i> | GUS-fusioniert, NcoI Schnittstelle, site directed mutagenesis/RRS1  | pBT10-GUS        | AMP       |
| VD092       | <i>BHLH42:Cherry</i>                     | 6x His-Tag fusioniert, Gateway                                      | pDEST17          | AMP       |
| VD093       | <i>GFP:MYB75</i>                         | 6x His-Tag fusioniert, Gateway                                      | pDEST17          | AMP       |
| VD094       | <i>YN:MYB75</i>                          | Split YFP, MYC-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                   | p5'YN2/pUC<br>19 | AMP       |
| VD095       | <i>YC:MYB75</i>                          | Split YFP, HA-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                    | p5'YC2/pUC<br>19 | AMP       |
| VD096       | <i>YC:BHLH42</i>                         | Split YFP, HA-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                    | p5'YC2/pUC<br>19 | AMP       |
| VD097       | <i>YN:BHLH42</i>                         | Split YFP, MYC-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                   | p5'YN2/pUC<br>19 | AMP       |
| VD098       | <i>YC:BHLH2</i>                          | Split YFP, HA-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                    | p5'YC2/pUC<br>19 | AMP       |
| VD099       | <i>YN:BHLH2</i>                          | Split YFP, MYC-tag, EcoRI und SacI Schnittstellen                   | p5'YN2/pUC<br>19 | AMP       |

## 7.2 Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte transgene Linien

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten transgenen Linien wurden, wie in 2.1.4 bzw. in 2.2.3.5 beschrieben, erzeugt und liegen als T2-Samen vor. Die Sequenzen des Transgens basieren auf der Akzession Columbia-0.

| Hintergrund         | Vektor                         | Transgen  | Eigenschaften  |
|---------------------|--------------------------------|---|--|
| <i>myb75</i>        | VD75 (pMDC43)                  | Pro <sub>MYB75</sub> ::GFP:MYB75  | transkriptionelle Fusion eines MYB75 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein GFP-MYB75  |
| <i>bhlh2</i>        | VD74 (pMDC43)                  | Pro <sub>BHLH2</sub> ::GFP:BHLH2  | transkriptionelle Fusion eines BHLH2 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein GFP-BHLH2  |
| <i>bhlh42</i>       | VD44 (pMDC83)                  | Pro <sub>BHLH42</sub> ::BHLH42:GFP  | transkriptionelle Fusion eines BHLH42 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein BHLH42-GFP  |
| <i>bhlh42</i>       | VD73 (pMDC83)                  | Pro <sub>BHLH42</sub> ::BHLH42:Cherry                                     | transkriptionelle Fusion eines BHLH42 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein BHLH42-Cherry   |
| <i>myb75 bhlh42</i> | VD11 (pMDC43)<br>VD37 (pMDC83) | 35S::GFP:MYB75<br>35S::BHLH42:Cherry                                      | translationale Fusion von GFP mit der MYB75 CDS unter konstitutiver CaMV 35S-Kontrolle und translationale Fusion von Cherry mit der BHLH42 CDS unter konstitutiver CaMV 35S-Kontrolle  |
| <i>myb75 bhlh42</i> | VD75 (pMDC43)<br>VD73 (pMDC83) | Pro <sub>MYB75</sub> ::GFP:MYB75<br>Pro <sub>BHLH42</sub> ::BHLH42:Cherry | transkriptionelle Fusion eines MYB75 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein GFP-MYB75 und transkriptionelle Fusion eines BHLH42 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für das Fusionsprotein BHLH42-Cherry |
| Col-0               | VD10 (pANGUS)                  | Pro <sub>MYB75</sub> ::GUS  | transkriptionelle Fusion eines MYB75 Promotorfragments mit kodierender Sequenz für $\beta$ -Glucuronidase  |
| Col-0               | VD77 (pANGUS)                  | Pro <sub>MYB90</sub> ::GUS  | wie oben mit MYB90 Promotorfragment  |
| Col-0               | mhei131 (pANGUS)               | Pro <sub>BHLH2</sub> ::GUS  | wie oben nur mit BHLH2 Promotorfragment  |
| Col-0               | mhei132 (pANGUS)               | Pro <sub>BHLH42</sub> ::GUS   | wie oben nur mit BHLH42 Promotorfragment   |
| Col-0               | VD80 (pANGUS)                  | Pro <sub>BHLH1</sub> ::GUS  | wie oben nur mit BHLH1 Promotorfragment  |

### 7.3 Wertetabellen und Abbildungen zu BHLH2

**Tabelle 7-1:** Rohdaten für die Experimente zur Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem Zielpromotor zur Überprüfung der FCS-Analysen.

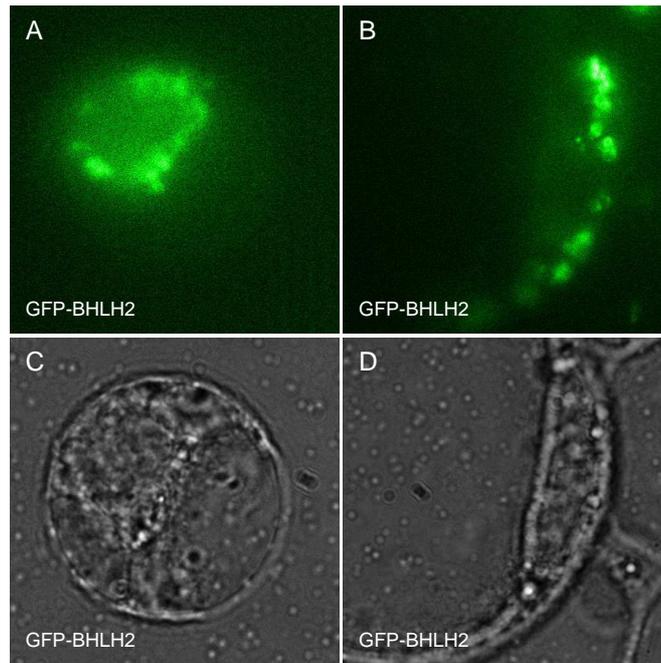
| Reporter                                | Effektor                         | GUS                      | LUC                                       | GUS'                     |
|---|----------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|
|   |                                  | [pmol 4-MU / (mg x min)] | [RLU $\mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] | [pmol 4-MU / (mg x min)] |
| DFR(123 bp)                             | BHLH2 (mhei016)                  | 6,8                      | 2847                                      | 9,4                      |
|   |                                  | 3,8                      | 1364                                      | 11,0                     |
|   |                                  | 9,4                      | 937                                       | 39,7                     |
|   |                                  | 37,5                     | 1946                                      | 76,2                     |
|   |                                  | 8,9                      | 2937                                      | 12,0                     |
|   |                                  | 38,6                     | 1957                                      | 78,0                     |
| DFR(123 bp)                             | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 18465,4                  | 1836                                      | 39750,7                  |
|   |                                  | 28164,5                  | 936                                       | 118928,2                 |
|   |                                  | 28452,9                  | 1827                                      | 61552,6                  |
|   |                                  | 28349,6                  | 2817                                      | 39775,8                  |
|   |                                  | 4638,1                   | 735                                       | 24940,9                  |
|   |                                  | 11345,0                  | 1734                                      | 25859,1                  |
| DFR(123 bp)<br>[RRE1d]                  | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 48,3                     | 12663                                     | 15,1                     |
|   |                                  | 93,3                     | 14827                                     | 24,9                     |
|   |                                  | 100,3                    | 10276                                     | 38,6                     |
|   |                                  | 95,8                     | 14283                                     | 26,5                     |
|   |                                  | 74,1                     | 10927                                     | 26,8                     |
|   |                                  | 85,3                     | 11827                                     | 28,5                     |
| DFR(123 bp)<br>[RRE1d, MRE1d]           | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 1,2                      | 4033                                      | 1,2                      |
|   |                                  | 4,6                      | 7394                                      | 2,5                      |
|   |                                  | 8,4                      | 4937                                      | 6,7                      |
|   |                                  | 2,6                      | 2283                                      | 4,5                      |
|   |                                  | 4,7                      | 4344                                      | 4,3                      |
|   |                                  | 6,3                      | 4599                                      | 5,4                      |
| DFR(123 bp)<br>[RRE2d, RRE3d,<br>MRE2d] | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 3826,6                   | 4937                                      | 3063,4                   |
|   |                                  | 9375                     | 3048                                      | 12156,7                  |
|   |                                  | 11745,7                  | 8394                                      | 5530,6                   |
|   |                                  | 3746,5                   | 4958                                      | 2986,6                   |
|   |                                  | 10384,5                  | 5937                                      | 6913,2                   |
|   |                                  | 30576                    | 4957                                      | 24379,2                  |
| DFR(123 bp)<br>[RRE3d, MRE2d]           | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 38376,5                  | 8394                                      | 18069,9                  |
|   |                                  | 27364,3                  | 2930                                      | 36912,7                  |
|   |                                  | 84634,4                  | 3940                                      | 84900,3                  |
|   |                                  | 18374,9                  | 4593                                      | 15812,0                  |
|   |                                  | 7384,1                   | 2043                                      | 14285,2                  |
|   |                                  | 10923,8                  | 2364                                      | 18263,5                  |
| DFR(123 bp)<br>[MRE2d]                  | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei016) | 19374,5                  | 1847                                      | 41459,3                  |
|   |                                  | 18374,9                  | 1859                                      | 39066,5                  |
|   |                                  | 22834,7                  | 2797                                      | 32267,2                  |
|   |                                  | 18374,2                  | 2667                                      | 27229,8                  |
|   |                                  | 23485,8                  | 1887                                      | 49191,7                  |
|   |                                  | 17636,7                  | 2088                                      | 33384,5                  |
| DFR(123 bp) [RRE1m]                     | MYB75/BHLH2<br>(mhei028/mhei024) | 4,6                      | 2774                                      | 5,2                      |
|   |                                  | 73,6                     | 1856                                      | 124,6                    |
|   |                                  | 94,4                     | 6373                                      | 46,6                     |
|   |                                  | 4,4                      | 2663                                      | 5,2                      |
|   |                                  | 8,7                      | 2934                                      | 9,3                      |
|   |                                  | 3,2                      | 3474                                      | 2,9                      |

|                     |                                   |         |      |         |
|---------------------|-----------------------------------|---------|------|---------|
| DFR(123 bp) [MRE1m] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 22,3    | 4573 | 15,3    |
|                     |                                   | 63,3    | 5374 | 37,0    |
|                     |                                   | 8,4     | 4837 | 5,5     |
|                     |                                   | 6,8     | 8374 | 2,6     |
|                     |                                   | 2,5     | 2837 | 2,8     |
|                     |                                   | 8,4     | 3847 | 6,9     |
| DFR(123 bp) [RRE2m] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 6453,5  | 3746 | 5414,9  |
|                     |                                   | 5746,6  | 2736 | 6601,7  |
|                     |                                   | 4736,8  | 934  | 15940,3 |
|                     |                                   | 8476,4  | 2882 | 9244,4  |
|                     |                                   | 6495,4  | 3947 | 5172,5  |
|                     |                                   | 8364,1  | 4936 | 5326,0  |
| DFR(123 bp) [RRE3m] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 29378,4 | 4747 | 19452,2 |
|                     |                                   | 17465,7 | 5947 | 9231,0  |
|                     |                                   | 14324,5 | 1038 | 43375,2 |
|                     |                                   | 16354,8 | 6274 | 8193,3  |
|                     |                                   | 36345,1 | 1583 | 72164,6 |
|                     |                                   | 26345,9 | 7384 | 11214,5 |
| DFR(123 bp) [MRE2m] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 15536,3 | 3845 | 12700,2 |
|                     |                                   | 39484,4 | 2874 | 43181,5 |
|                     |                                   | 16633,4 | 2766 | 18901,1 |
|                     |                                   | 8383,3  | 9393 | 2805,2  |
|                     |                                   | 27373,9 | 1837 | 46836,7 |
|                     |                                   | 25346,7 | 1836 | 43391,8 |

**Tabelle 7-2:** Deletions- und Mutationsserie des ProDFR<sub>123</sub> für FCS-Studien.

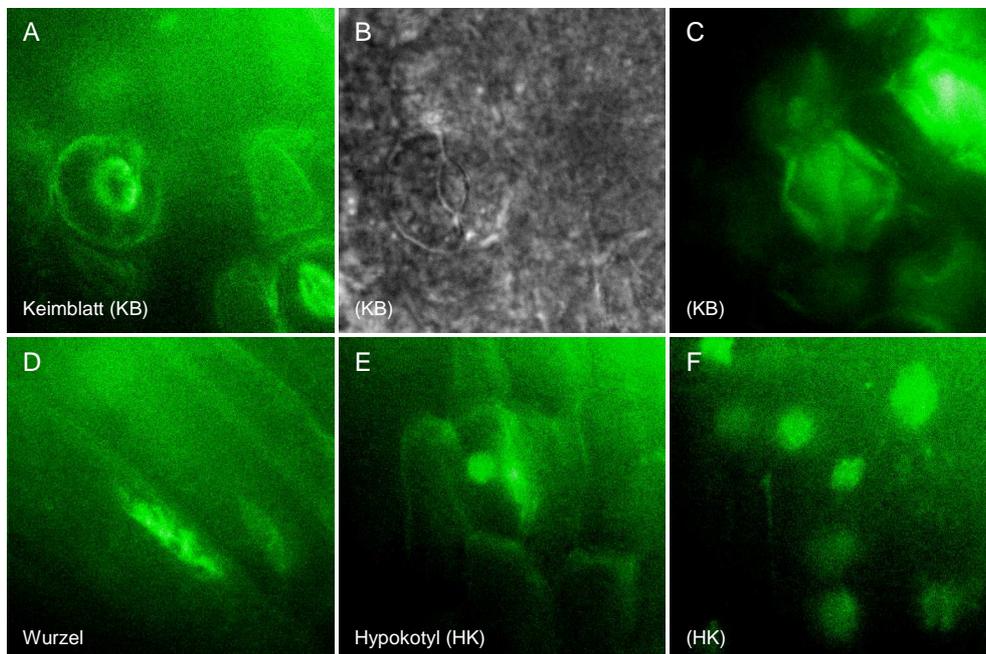
In der Tabelle sind die jeweiligen Diffusionszeiten angegeben, wenn die Promotor-Elemente mit BHLH2 bzw. mit MYB75+BHLH2 inkubiert und gemessen wurden. Grüne Schrift markiert Diffusionszeitverschiebung

| Promotor-Elemente      | BHLH2        | MYB75+BHLH2         |
|------------------------|--------------|---------------------|
| ProDFR123              | 3,174 ±0,023 | <b>3,502 ±0,019</b> |
| RRS1d                  | 3,365 ±0,009 | 3,349 ±0,057        |
| RRS1d; MRS1d           | 3,161 ±0,052 | 3,157 ±0,025        |
| MRS2d                  | 4,208 ±0,083 | <b>4,659 ±0,013</b> |
| MRS2d; RRS3d           | 3,756 ±0,046 | <b>3,942 ±0,009</b> |
| MRS2d; RRS3d;<br>RRS2d | 3,146 ±0,044 | <b>3,418 ±0,021</b> |
| RRS1m                  | 3,846 ±0,031 | 3,862 ±0,047        |
| MRS1m                  | 3,758 ±0,020 | 3,796 ±0,068        |
| RRS2m                  | 3,823 ±0,073 | <b>3,998 ±0,002</b> |
| RRS3m                  | 3,843 ±0,008 | <b>3,972 ±0,004</b> |
| MRS2m                  | 3,775 ±0,011 | <b>3,946 ±0,006</b> |



**Abbildung 7-1: *In vivo* Lokalisation von GFP-BHLH2 in At7-Protoplasten.**

Arabidopsis-Protoplasten wurden transient mit  $Pro_{BHLH2}::GFP:BHLH2$  transfiziert, um die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie zu analysieren. Repräsentative Aufnahmen von (A, B) GFP-BHLH2; (C, D) entsprechende Hellfeldaufnahmen.



**Abbildung 7-2: *In planta* Lokalisation von GFP-BHLH2 in transgenen *A. thaliana* Keimlingen.**

In komplementierten *bhlh2* Mutanten ( $Pro_{BHLH2}::GFP:BHLH2$ ) wurde die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie analysiert. Repräsentative Aufnahmen von GFP-BHLH2 in (A-C) Keimblattzellen; (D) Wurzelzellen; (E, F) Hypokotylzellen.

## 7.4 Wertetabellen zu den Transfektionsexperimenten

**Tabelle 7-3 zu Abb. 3-42:** Rohdaten für die Experimente zur Analyse der Lichtaktivierbarkeit des *DFR*-Promotors im Vergleich zum *CHS*-Promotor.

| 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) [Dunkel]   | -                              | 28149,4                  | 4513                                      | 22198,8                  |
|                                     |                                | 31796,1                  | 2962                                      | 38199,3                  |
|                                     |                                | 26577,0                  | 2557                                      | 36990,1                  |
|                                     |                                | 31074,7                  | 12540                                     | 8819,2                   |
| Negativkontrolle (MS156) [Dunkel]   | -                              | 19,1                     | 10831                                     | 6,2                      |
|                                     |                                | 69,9                     | 1612                                      | 154,3                    |
|                                     |                                | 14,5                     | 5931                                      | 8,7                      |
|                                     |                                | 37,4                     | 12878                                     | 10,3                     |
| DFR (RST633) [Dunkel]               | -                              | 410,2                    | 5727                                      | 254,8                    |
|                                     |                                | 240,5                    | 2709                                      | 315,9                    |
|                                     |                                | 29                       | 2734                                      | 37,7                     |
|                                     |                                | 4331,1                   | 9364                                      | 1646,0                   |
| DFR (RST633) [Dunkel]               | BHLH24/MYB75 (mhei024/mhei028) | 17716,9                  | 3398                                      | 18557,2                  |
|                                     |                                | 14787,4                  | 1173                                      | 44864,7                  |
|                                     |                                | 8900,6                   | 562                                       | 56362,9                  |
|                                     |                                | 43189,7                  | 3998                                      | 38442,9                  |
| DFR (RST633) [Dunkel]               | BHLH2/MYB75 (mhei016/mhei028)  | 19645,4                  | 3098                                      | 22565,1                  |
|                                     |                                | 16991,0                  | 1422                                      | 42512,5                  |
|                                     |                                | 26963,9                  | 2414                                      | 39751,7                  |
|                                     |                                | 58376,1                  | 2646                                      | 78503,7                  |
| DFR (RST633) [Dunkel]               | -                              | 495,5                    | 10393                                     | 169,6                    |
|                                     |                                | 310,2                    | 3532                                      | 312,6                    |
|                                     |                                | 69,6                     | 3214                                      | 77,0                     |
|                                     |                                | 1860,5                   | 7975                                      | 830,2                    |
| DFR (RST633) [Lichtraum]            | -                              | 55,2                     | 3188                                      | 61,6                     |
|                                     |                                | 18,8                     | 4703                                      | 14,2                     |
|                                     |                                | 4933,8                   | 3376                                      | 5200,8                   |
| DFR (RST633) [Lichtraum]            | BHLH42/MYB75 (mhei024/mhei028) | 30458,3                  | 2004                                      | 54088                    |
|                                     |                                | 19078,7                  | 2218                                      | 30612,4                  |
|                                     |                                | 44588,4                  | 3573                                      | 44412,9                  |
| DFR (RST633) [Lichtraum]            | BHLH2/MYB75 (mhei016/mhei028)  | 23998,1                  | 3745                                      | 22806,1                  |
|                                     |                                | 12534,3                  | 1280                                      | 34853,1                  |
|                                     |                                | 3852                     | 515                                       | 26618,9                  |
|                                     |                                | 35214,2                  | 3495                                      | 35861,1                  |
| DFR (RST633) [Lichtraum]            | -                              | 18,3                     | 2294                                      | 28,4                     |
|                                     |                                | 121,1                    | 828                                       | 520,3                    |
|                                     |                                | 4,4                      | 3920                                      | 3,9                      |
|                                     |                                | 2266,8                   | 6556                                      | 1230,4                   |
| Positivkontrolle (MS275) [UV-Licht] | -                              | 23674,8                  | 2113                                      | 39879,5                  |
|                                     |                                | 11871,4                  | 2393                                      | 17655,1                  |
|                                     |                                | 46887,8                  | 4304                                      | 38766,1                  |

|                            |                                   |                              |                      |                               |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| DFR (RST633)<br>[UV-Licht] | -                                 | 33,9<br>17,6<br>5762,6       | 1899<br>3664<br>2367 | 63,4<br>17,1<br>8663,3        |
| DFR (RST633)<br>[UV-Licht] | BHLH42/MYB75<br>(mhei024/mhei028) | 12166,9<br>8592,3<br>50192,3 | 1928<br>670<br>2481  | 22460,2<br>45640<br>72007,1   |
| DFR (RST633)<br>[UV-Licht] | BHLH2/MYB75<br>(mhei016/mhei028)  | 19995,1<br>7212,2<br>40284,5 | 1696<br>734<br>2438  | 41950,1<br>34968,9<br>58800,1 |
| DFR (RST633)<br>[UV-Licht] | -                                 | 29,3<br>17,8<br>1185,9       | 2763<br>1572<br>1943 | 37,7<br>40,2<br>2171,9        |
| CHS (MS)<br>[Dunkel]       | -                                 | 6,7<br>2810                  | 1064<br>17192        | 22,4<br>581,7                 |
| CHS (MS)<br>[Dunkel]       | MYB12                             | 14649,7<br>47581,1           | 1053<br>3556         | 49512,1<br>47613,2            |
| CHS (MS)<br>[Lichtraum]    | -                                 | 2124,9<br>16925,3            | 1303<br>5375         | 5803,7<br>11207,2             |
| CHS (MS)<br>[Lichtraum]    | MYB12                             | 8800<br>38710,7              | 945<br>3904          | 33140,7<br>35291,8            |
| CHS (MS)<br>[UV-Licht]     | -                                 | 2067,1<br>17576,7            | 572<br>1164          | 12861,1<br>53722,6            |
| CHS (MS)<br>[UV-Licht]     | MYB12                             | 9872,1<br>34563              | 596<br>1757          | 58948,7<br>70025,8            |

**Tabelle 7-4 zu Abb. 3-9 und 3-11:** Rohdaten für die Experimente zur Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem Zielpromotor zur Überprüfung der FCS-Analysen.

| Reporter                      | Effektor                          | GUS<br>[pmol 4-MU / (mg x<br>min)] | LUC<br>[RLU $\mu\text{g}^{-1}$ sec <sup>-1</sup> ] | GUS'<br>[pmol 4-MU / (mg x<br>min)] |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Positivkontrolle<br>(MS275)   | -                                 | 20394,4                            | 1882   | 47377,7                             |
|                               |                                   | 26123,8                            | 1297   | 88035,4                             |
|                               |                                   | 28225,8                            | 6341   | 19460,0                             |
|                               |                                   | 38828,1                            | 1332   | 127440,4                            |
|                               |                                   | 20546,5                            | 902  | 99554,1                             |
|                               |                                   | 7742,1                             | 696  | 48653,2                             |
| Negativkontrolle<br>(MS156)   | -                                 | 15,7                               | 6500   | 10,5                                |
|                               |                                   | 4,3                                | 2257   | 8,3                                 |
|                               |                                   | 22,6                               | 11509  | 8,6                                 |
|                               |                                   | 16,1                               | 3200   | 22,0                                |
|                               |                                   | 10,4                               | 1663   | 27,2                                |
|                               |                                   | 1,1                                | 500  | 9,8                                 |
| DFR(123 bp)                   | -                                 | 6,2                                | 967  | 28,0                                |
|                               |                                   | 4,8                                | 2258   | 9,2                                 |
|                               |                                   | 6,1                                | 667  | 39,9                                |
|                               |                                   | 3                                  | 1475   | 8,8                                 |
|                               |                                   | 7,1                                | 2978   | 10,4                                |
|                               |                                   | 28,2                               | 3458   | 35,6                                |
| DFR(123 bp)                   | MYB75 (mhei028)                   | 152,2                              | 3902   | 170,5                               |
|                               |                                   | 127,6                              | 3196   | 174,5                               |
|                               |                                   | 52,7                               | 2328   | 98,9                                |
|                               |                                   | 164,9                              | 1208   | 596,8                               |
|                               |                                   | 90,7                               | 2343   | 169,2                               |
|                               |                                   | 187                                | 1645   | 497,0                               |
| DFR(123 bp)                   | BHLH42 (mhei024)                  | 2,9                                | 2855   | 4,4                                 |
|                               |                                   | 4,3                                | 384  | 48,9                                |
|                               |                                   | 6,2                                | 1571   | 17,2                                |
|                               |                                   | 10,7                               | 2575   | 18,1                                |
|                               |                                   | 29,5                               | 2188   | 58,9                                |
|                               |                                   | 1,3                                | 2060   | 2,7                                 |
| DFR(123 bp)                   | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 14682,9                            | 1780   | 36064,1                             |
|                               |                                   | 15828,9                            | 787  | 87961,8                             |
|                               |                                   | 22844,3                            | 1125   | 88772,1                             |
|                               |                                   | 31508,5                            | 2389   | 57667,4                             |
|                               |                                   | 2945,8                             | 435  | 29607,2                             |
|                               |                                   | 13149,7                            | 1785   | 32207,8                             |
| DFR(123 bp)<br>[RRE1d]        | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 84,8                               | 14224  | 26,1                                |
|                               |                                   | 47,3                               | 18957  | 10,9                                |
|                               |                                   | 90,2                               | 13506  | 29,2                                |
|                               |                                   | 103,6                              | 15416  | 29,4                                |
|                               |                                   | 77,9                               | 13763  | 24,7                                |
|                               |                                   | 71,5                               | 21247  | 14,7                                |
| DFR(123 bp)<br>[RRE1d, MRE1d] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 6,6                                | 3309   | 8,7                                 |
|                               |                                   | 4,1                                | 6059   | 2,9                                 |
|                               |                                   | 4,7                                | 3682   | 3,2                                 |
|                               |                                   | 3,5                                | 6415   | 3,5                                 |

|   |                                   |         |      |         |
|---|-----------------------------------|---------|------|---------|
|   |                                   | 4,7     | 4344 | 3,4     |
|   |                                   | 6,3     | 4599 | 5,9     |
| DFR(123 bp)<br>[RRE2d, RRE3d,<br>MRE2d] | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 24633   | 3195 | 33711   |
|   |                                   | 10181   | 7343 | 6061,8  |
|   |                                   | 12989,6 | 4072 | 13946,7 |
|   |                                   | 21567,4 | 2964 | 31815,4 |
|   |                                   | 10181   | 7343 | 6061,6  |
|   |                                   | 30224   | 6335 | 20859,1 |
| DFR(123 bp)<br>[RRE3d, MRE2d]           | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 24565,3 | 6039 | 17784,6 |
|   |                                   | 25472   | 3141 | 35457,5 |
|   |                                   | 26218,1 | 3378 | 33932,1 |
|   |                                   | 23431,6 | 3254 | 31483,6 |
|   |                                   | 31826,6 | 6024 | 23099,1 |
|   |                                   | 22419   | 4284 | 22880,8 |
| DFR(123 bp)<br>[MRE2d]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 19168,2 | 1739 | 48184,3 |
|   |                                   | 24783,3 | 3003 | 36079,8 |
|   |                                   | 21287,7 | 2526 | 36850,9 |
|   |                                   | 19586,1 | 1666 | 51409,6 |
|   |                                   | 25851,6 | 3786 | 29851,9 |
|   |                                   | 16658,2 | 1883 | 33678,2 |
| DFR(123 bp)<br>[RRE1m]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 1,6     | 1545 | 3,4     |
|   |                                   | 35,2    | 5412 | 21,6    |
|   |                                   | 72,6    | 5795 | 41,5    |
|   |                                   | 7,4     | 3376 | 7,3     |
|   |                                   | 6,6     | 3309 | 6,6     |
|   |                                   | 8       | 3682 | 7,2     |
| DFR(123 bp)<br>[MRE1m]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 13,4    | 5133 | 8,6     |
|   |                                   | 23,5    | 4863 | 16      |
|   |                                   | 5,8     | 5796 | 3,3     |
|   |                                   | 3,5     | 4344 | 2,6     |
|   |                                   | 4,7     | 5998 | 2,6     |
|   |                                   | 6,3     | 4599 | 4,5     |
| DFR(123 bp)<br>[RRE2m]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 5502,8  | 4510 | 4046,2  |
|   |                                   | 6361,3  | 2795 | 7546,8  |
|   |                                   | 5414,2  | 3254 | 5517,6  |
|   |                                   | 5270,5  | 647  | 27002,3 |
|   |                                   | 6026,4  | 3787 | 5277,2  |
|   |                                   | 6368,8  | 8530 | 2475,9  |
| DFR(123 bp)<br>[RRE3m]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 20498,9 | 4540 | 14972   |
|   |                                   | 16288,3 | 5237 | 10313,3 |
|   |                                   | 12989,6 | 4072 | 10578,7 |
|   |                                   | 7889,6  | 1050 | 24908,8 |
|   |                                   | 22057,6 | 1512 | 48392,5 |
|   |                                   | 34775,6 | 4999 | 23069,2 |
| DFR(123 bp)<br>[MRE2m]                  | MYB75/BHLH42<br>(mhei028/mhei024) | 12299,7 | 4148 | 9834,4  |
|   |                                   | 12988,3 | 3072 | 14018,8 |
|   |                                   | 15705,1 | 3844 | 13547,7 |
|   |                                   | 6766,3  | 1553 | 14447,7 |
|   |                                   | 7269,1  | 3356 | 7183,7  |
|   |                                   | 27282,2 | 3512 | 25760,9 |

**Tabelle 7-5 zu Abb. 3-13, 3-14, 3-19:** Rohdaten für die Experimente zur Interaktion der Fusionsproteine mit dem Zielpromotor.

| 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) [Dunkel] | -                 | 20707,8                  | 2691                                      | 14303,6                  |
|                                   |                   | 10002,8                  | 591                                       | 31142,7                  |
|                                   |                   | 42802,8                  | 2198                                      | 36199,6                  |
|                                   |                   | 28680,7                  | 1661                                      | 32088,6                  |
|                                   |                   | 20394,4                  | 1882                                      | 20145,1                  |
|                                   |                   | 10358,3                  | 341                                       | 56415,1                  |
| Negativkontrolle (MS156) [Dunkel] | -                 | 14,9                     | 3496                                      | 7,9                      |
|                                   |                   | 10,7                     | 1164                                      | 17,1                     |
|                                   |                   | 10,4                     | 2565                                      | 7,5                      |
|                                   |                   | 20,7                     | 1940                                      | 19,9                     |
|                                   |                   | 6,4                      | 1365                                      | 8,7                      |
|                                   |                   | 11,0                     | 1573                                      | 12,9                     |
| DFR (RST633)                      | -                 | 6,2                      | 967                                       | 11,9                     |
|                                   |                   | 3,0                      | 1475                                      | 3,7                      |
|                                   |                   | 27,3                     | 1052                                      | 48,3                     |
|                                   |                   | 4,8                      | 2258                                      | 3,9                      |
|                                   |                   | 2,0                      | 508                                       | 7,2                      |
|                                   |                   | 21,5                     | 460                                       | 87,0                     |
| DFR (RST633)                      | BHLH042 (mhei024) | 21,6                     | 2838                                      | 14,1                     |
|                                   |                   | 8,7                      | 604                                       | 26,8                     |
|                                   |                   | 29,5                     | 2188                                      | 25,0                     |
|                                   |                   | 13,7                     | 1518                                      | 16,8                     |
|                                   |                   | 2,5                      | 484                                       | 9,5                      |
|                                   |                   | 10,8                     | 300                                       | 66,9                     |
| DFR (RST633)                      | MYB75 (mhei028)   | 49,6                     | 525                                       | 175,5                    |
|                                   |                   | 9,3                      | 165                                       | 105,2                    |
|                                   |                   | 85,5                     | 1484                                      | 107,1                    |
|                                   |                   | 52,7                     | 2328                                      | 42,1                     |
|                                   |                   | 3,3                      | 696                                       | 8,9                      |
|                                   |                   | 27,9                     | 823                                       | 62,9                     |
| DFR (RST633)                      | BHLH1 (mhei012)   | 129,8                    | 2241                                      | 298,7                    |
|                                   |                   | 53,5                     | 2168                                      | 127,2                    |
|                                   |                   | 24,3                     | 464                                       | 270,2                    |
|                                   |                   | 125,0                    | 880                                       | 140,3                    |
| DFR (RST633)                      | BHLH2 (mhei016)   | 8,3                      | 226                                       | 67,8                     |
|                                   |                   | 4,9                      | 672                                       | 13,6                     |
|                                   |                   | 221,9                    | 32555                                     | 12,7                     |
| DFR (RST633)                      | VD11              | 58,0                     | 282                                       | 382,3                    |
|                                   |                   | 18,6                     | 167                                       | 207,2                    |
|                                   |                   | 3,9                      | 166                                       | 43,0                     |
|                                   |                   | 4,3                      | 480                                       | 16,6                     |
|                                   |                   | 308,4                    | 1081                                      | 530,1                    |
|                                   |                   | 143,1                    | 557                                       | 477,0                    |
| DFR (RST633)                      | VD12              | 11,1                     | 1486                                      | 10,1                     |
|                                   |                   | 7,9                      | 727                                       | 14,7                     |

|              |                                   |         |      |          |
|--------------|-----------------------------------|---------|------|----------|
| DFR (RST633) | VD13                              | 58,3    | 2373 | 33,28    |
|              |                                   | 32,5    | 1994 | 22,1     |
|              |                                   | 3,3     | 1093 | 4,1      |
| DFR (RST633) | VD14                              | 7,7     | 1232 | 11,6     |
|              |                                   | 18,3    | 1577 | 21,6     |
|              |                                   | 9,2     | 2409 | 7,1      |
|              |                                   | 2,7     | 387  | 12,8     |
|              |                                   | 7,6     | 996  | 14,1     |
|              |                                   | 4,6     | 1390 | 6,1      |
| DFR (RST633) | VD20                              | 28,4    | 885  | 165,7    |
|              |                                   | 14,2    | 1714 | 42,8     |
|              |                                   | 11,6    | 980  | 61,0     |
|              |                                   | 10,0    | 225  | 228,8    |
|              |                                   | 8,1     | 2275 | 18,4     |
|              |                                   | 30,1    | 338  | 459,7    |
| DFR (RST633) | VD21                              | 6,9     | 212  | 167,0    |
|              |                                   | 6,4     | 779  | 42,2     |
|              |                                   | 160     | 3208 | 25,7     |
| DFR (RST633) | VD73                              | 8,5     | 676  | 23,4     |
|              |                                   | 2,9     | 319  | 17,1     |
|              |                                   | 16,0    | 1021 | 29,2     |
|              |                                   | 5,9     | 823  | 13,3     |
|              |                                   | 56,9    | 5826 | 18,1     |
| DFR (RST633) | VD74                              | 8,0     | 1973 | 7,5      |
|              |                                   | 1,1     | 434  | 4,5      |
|              |                                   | 20,9    | 725  | 53,7     |
|              |                                   | 4,6     | 1145 | 7,5      |
|              |                                   | 39,5    | 2722 | 26,9     |
| DFR (RST633) | VD75                              | 6,7     | 1505 | 8,2      |
|              |                                   | 1,1     | 336  | 6,3      |
|              |                                   | 44,7    | 560  | 148,3    |
|              |                                   | 15,3    | 1853 | 15,4     |
|              |                                   | 41,0    | 2946 | 25,9     |
| DFR (RST633) | VD44                              | 8,9     | 1119 | 14,7     |
|              |                                   | 2,1     | 362  | 10,9     |
|              |                                   | 10,5    | 1083 | 18,1     |
|              |                                   | 21,9    | 106  | 383,6    |
| DFR (RST633) | BHLH24/MYB75<br>(mhei024/mhei028) | 10760,8 | 1807 | 11068,9  |
|              |                                   | 17920,9 | 1538 | 21656,5  |
|              |                                   | 13149,7 | 1785 | 13689,5  |
|              |                                   | 12810,8 | 1258 | 18922,5  |
|              |                                   | 9713,8  | 2163 | 8347,9   |
|              |                                   | 14682,9 | 1780 | 15332,3  |
| DFR (RST633) | BHLH2/MYB75<br>(mhei016/mhei028)  | 9036,1  | 250  | 186141,8 |
|              |                                   | 8933,4  | 477  | 96580,1  |
|              |                                   | 72424,5 | 2083 | 17927,6  |

|              |   |          |      |          |
|--------------|---|----------|------|----------|
| DFR (RST633) | BHLH1/MYB75<br>(mhei012/mhei028)          | 26554,3  | 2690 | 50909,0  |
|              |   | 15831,8  | 1158 | 70496,0  |
|              |   | 5282,7   | 196  | 138749,0 |
|              |   | 8610,3   | 561  | 79103,4  |
|              |   | 84176,0  | 7784 | 5577,2   |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ BHLH42<br>(VD11/mhei024)       | 17635,6  | 1066 | 22404,6  |
|              |   | 21754,2  | 1499 | 19642,5  |
|              |   | 1278,3   | 149  | 11617,8  |
|              |   | 12851,7  | 544  | 31953,3  |
|              |   | 35347,4  | 2921 | 16383,2  |
|              |   | 6242,0   | 440  | 19196,2  |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/BHLH1<br>(VD11/mhei012)         | 4725,2   | 140  | 174691,7 |
|              |   | 6910,2   | 304  | 117097,6 |
|              |   | 59762,9  | 4697 | 6562,6   |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/BHLH2<br>(VD11+mhei016)         | 5557,8   | 113  | 253225,3 |
|              |   | 9842,3   | 471  | 107837,4 |
|              |   | 81141,3  | 2332 | 17945,4  |
| DFR (RST633) | GFP-BHLH42/ MYB75<br>(VD12/mhei028)       | 12211,3  | 1580 | 10460,8  |
|              |   | 4873,0   | 513  | 12862,2  |
| DFR (RST633) | MYB75-GFP/ BHLH42<br>(VD13/mhei024)       | 20,5     | 2314 | 12,1     |
|              |   | 43,3     | 2468 | 23,8     |
|              |   | 5,0      | 1703 | 16,3     |
| DFR (RST633) | BHLH42-GFP/ MYB75<br>(VD14/mhei028)       | 6245,6   | 1323 | 6389,1   |
|              |   | 10392,0  | 2123 | 6626,5   |
|              |   | 5013,4   | 1759 | 3858,0   |
|              |   | 4069,5   | 1714 | 3213,9   |
|              |   | 15104,1  | 3663 | 3289,3   |
|              |   | 6922,3   | 391  | 5581,8   |
| DFR (RST633) | MYB123-GFP/<br>BHLH42<br>(VD16/mhei024)   | 39,8     | 2461 | 83,4     |
|              |   | 60,7     | 357  | 877,2    |
|              |   | 8,6      | 1400 | 31,5     |
| DFR (RST633) | BHLH1-GFP/MYB75<br>(VD20/mhei028)         | 19731,7  | 1960 | 51925,5  |
|              |   | 7293,0   | 1116 | 33697,4  |
|              |   | 2516,4   | 213  | 61041,9  |
|              |   | 24893,5  | 3274 | 39217,3  |
|              |   | 2234,2   | 273  | 42195,0  |
|              |   | 118475,7 | 4860 | 12573,1  |
| DFR (RST633) | GFP-BHLH2/MYB75<br>(VD21/mhei028)         | 7083,3   | 218  | 167893,0 |
|              |   | 9805,8   | 633  | 79894,8  |
|              |   | 71509,2  | 3240 | 11381,8  |
|              |   | 5529,3   | 642  | 44423,4  |
| DFR (RST633) | BHLH42-<br>Cherry/MYB75<br>(VD73/mhei028) | 9033,5   | 939  | 17883,2  |
|              |   | 3166,7   | 1190 | 4945,6   |
|              |   | 6621,6   | 2725 | 8275,8   |
|              |   | 5760,4   | 2380 | 9984,6   |

|              |  |          |      |         |
|--------------|--|----------|------|---------|
| DFR (RST633) | GFP-BHLH2/MYB75<br>(VD74/mhei028)        | 3406,2   | 326  | 19390,2 |
|              |  | 3177,1   | 981  | 12947,6 |
|              |  | 3843     | 1416 | 16438,2 |
|              |  | 11167    | 530  | 9434,9  |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75 /BHLH42<br>(VD75/mhei024)      | 15187,3  | 562  | 50238,7 |
|              |  | 7218,3   | 1475 | 38047,4 |
|              |  | 19864    | 1242 | 52374,3 |
|              |  | 10467    | 1133 | 14542,7 |
| DFR (RST633) | BHLH42-GFP/MYB75<br>(VD44+mhei028)       | 3261,7   | 1177 | 5150,4  |
|              |  | 4151,9   | 832  | 9269,9  |
|              |  | 5375,4   | 736  | 8364,8  |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ GFP-<br>BHLH42<br>(VD11+VD12) | 17758,2  | 1079 | 22283,9 |
|              |  | 8810,3   | 571  | 20871,1 |
|              |  | 9374,6   | 836  | 21746,5 |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ GFP-<br>BHLH42 (VD11/VD12)    | 17758,2  | 1079 | 84907,8 |
|              |  | 8810,3   | 571  | 79524,3 |
|              |  | 9374,6   | 983  | 83657,5 |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ BHLH1-<br>GFP (VD11/VD20)     | 13819,4  | 983  | 72547,3 |
|              |  | 2836,7   | 182  | 80350,2 |
|              |  | 30139,4  | 1823 | 85289,3 |
|              |  | 6039,2   | 422  | 73826,1 |
|              |  | 429099,9 | 2139 | 10345,0 |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ BHLH2-<br>GFP (VD11+VD21)     | 84957,5  | 846  | 92084,4 |
|              |  | 93745,4  | 937  | 89475,3 |
|              |  | 10334,4  | 836  | 84947,3 |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/<br>BHLH42-GFP<br>(VD11+VD14)  | 6674,8   | 680  | 13295,8 |
|              |  | 8184,11  | 1092 | 10146,5 |
|              |  | 8820,0   | 2354 | 4491,8  |
|              |  | 3886,1   | 516  | 10824,3 |
| DFR (RST633) | MYB75-GFP/<br>BHLH42-GFP<br>(VD13+VD14)  | 49,9     | 2693 | 25,1    |
|              |  | 1,2      | 2143 | 0,7     |
|              |  | 4,6      | 2746 | 3,6     |
|              |  | 6,8      | 1857 | 4,5     |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/<br>BHLH42-GFP<br>(VD11+VD44)  | 3149,1   | 645  | 9069,6  |
|              |  | 3124,0   | 548  | 10600,4 |
|              |  | 9550,2   | 973  | 18235,7 |
| DFR (RST633) | GFP-MYB75/ GFP-<br>BHLH2-<br>(VD11+VD74) | 4958,5   | 834  | 7907,4  |
|              |  | 3847,7   | 493  | 5140,1  |
|              |  | 5846,4   | 684  | 6384,3  |
| DFR (RST633) | BHLH42-GFP/ GFP-<br>MYB75<br>(VD14+VD75) | 9068,6   | 614  | 27445,2 |
|              |  | 2757,3   | 465  | 10196,5 |
|              |  | 9748,5   | 586  | 16485,8 |

## 7.5 Desoxyoligonucleotide (Primer)

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

### Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Desoxyoligonukleotide (Primer)

| Name            | Sequenz  | Verwendungszweck  |
|-----------------|--|---|
| T7term_rev      | GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT                                       | T7-Terminator, reverse Sequenzierprimer                       |
| T7prom_for      | CCATCGGTGATGTCGGCGATATAG                                       | T7-Promotor, forward Sequenzierprimer                         |
| GST_for         | TTGGTGGTGGCGACCATCTCCAA  | GST, forward Sequenzierprimer                                 |
| T7pro-pRSET     | AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG                                       | T7-Promotor, forward Sequenzierprimer, pRSET-Vektoren         |
| T7termrev-pRSET | CTCTTCGCTATTACGCCAGATCCG                                       | T7-Terminator, reverse Sequenzierprimer, pRSET-Vektoren       |
| T7termrev2-pRSE | CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG                                       | T7-Terminator, reverse Sequenzierprimer 2, pRSET-Vektoren     |
| GST-for_pRSE    | TTGGTGGTGGCGACCATCTCCAA  | GST, forward Sequenzierprimer, pRSET-Vektoren                 |
| for_pMYB75-BamH | TTCGGATCCTGATTAGCGATGATCATAACG                                 | Promotor MYB75, forward Primer, BamHI-Schnittstelle           |
| rev_pMYB75-NcoI | CCTCCATGGAACAAAGATAGATACG                                      | Promotor MYB75, reverse Primer, NcoI-Schnittstelle            |
| for_proMYB75-pA | TCTCCGCTCATGATCAGATTGTCTG                                      | Promotor MYB75, forward Primer, pANGUS                        |
| rev_proMYB75-pA | TTCGCGATCCAGACTGAATGCC   | Promotor MYB75, reverse Primer, pANGUS                        |
| GTW-MYB90-2     | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAACGGTGA<br>GAAACACTAATCAAGTTC | Amplification of MYB90/PAP2 (GTW-extensions) , reverse Primer |
| 142-RT-Myb90_fw | ATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGT   | RT-PCR von Myb90, forward Primer                              |
| 143-RT-Myb90_re | CTAATCAAGTTCAACAGTCTCTC  | RT-PCR von Myb90, reverse Primer                              |
| MYB75ed-2       | CACAAACGCAAACAAATGTTTCGAAACACTAATC                             |   |
| pMDC45_for      | TCGCAAGACCGGCAACAGGATTCA                                       | pMDC45-Vektor, aus nosT, forward Primer                       |
| pMDC45_rev      | AGAGACCACATGGTCTTCTTGAG  | pMDC45-Vektor, aus GFP, reverse Primer                        |
| pMDC84_for      | GTTGGCCATGGAACAGGTAG   | pMDC84-Vektor, aus GFP, forward Primer                        |
| pMDC84_rev      | TGGAGAGGACCTCGACTCTAGAAC                                       | pMDC84-Vektor, aus Promotor, reverse Primer                   |
| EYFP_for        | CTCTAGACCCGGGTAGGTACCGCC                                       | p5' EYFP, forward Primer, KpnI-Schnittstelle                  |
| EYFP_rev        | TTGAACGATCGGGGAAATTCGAACT                                      | p5' EYFP, reverse Primer, AsuII-Schnittstelle                 |
| for_eYFP        | GGCCGCCATAGTGAAGTGGATATGT                                      | pMDC45-Vektor, forward Primer, attR1                          |
| rev_eYFP        | TTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTG                                       | pMDC45-Vektor, reverse Primer, aus 35S-Promotor               |

|                 |  |   |
|-----------------|--|---|
| for_eYFP_VD16   | TAATCATCGCAAGACCGGCAACAG                   | pMDC84-Vektor, forward Primer, aus nosT                         |
| rev_eYFP_VD16   | GCGCATGATGACCACCGATATGGC                   | pMDC84-Vektor, reverse Primer, attR2                            |
| pMDC84_YFPfor   | CCGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGATCTGGAGCTGCA    | eYFP in pMDC84, forward Primer, KpnI- and NcoI-Schnittstelle    |
| pMDC84_OrChfor  | CCGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG    | mOrange/mCherry in pMDC84, for. Primer, KpnI- and NcoI-Schnitt. |
| pMDC84_RFP1for  | CCGGTACCGGTAGAAACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTC    | mRFP1 in pMDC84, forward Primer, KpnI- and NcoI-Schnittstelle   |
| pMDC84_OrChrev  | TTCGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT             | mOrange/mCherry in pMDC84, reverse Primer, SacI-Schnittstelle   |
| pMDC84_RFP1rev  | TTCGAGCTCTTAGCGCCGGTGGAGTGGCGG             | mRFP1 in pMDC84, reverse Primer, SacI-Schnittstelle             |
| pMDC43_YFP_for  | CGGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGATCTGGAGCTGCA    | eYFP in pMDC43, for. Primer, KpnI- und NcoI-Schnittst., Gateway |
| pMDC43_OrCh_fo  | CGGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG    | mOrange/mCherry in pMDC43, for. Primer, KpnI- und NcoI-Schnitt. |
| pMDC43_RFP_for  | CGGGTACCGGTAGAAACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTC    | mRFP in pMDC43, forward Primer, KpnI- und NcoI-Schnittstellen   |
| pMDC43_YFP_rev  | TAGCTTGGCGCGCCTTTACTCGAGTAGGATCCTGAA       | eYFP (aus 5'eYFPpUC) in pMDC43, rev. Primer, Ascl-Schnittstelle |
| pMDC43_OrCh_rev | TAGCTTGGCGCGCCTTTACTTGTACAGCTCGTCCAT       | mOrange/mCherry (pRSET-B) in pMDC43, rev., Ascl Schnittstelle   |
| pMDC43_RFP_rev  | TAGCTTGGCGCGCCTTTAGCGCCGGTGGAGTGGCGG       | mRFP in pMDC43, reverse Primer, Ascl- Schnittstelle             |
| pMDC83_YFP_for  | GGGGGCCCGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGATCTGGA    | eYFP in pMDC83, forward Primer, Apal- Schnittstelle             |
|                 | GCTGCA                                     |   |
| pMDC83_OrCh_for | GGGGGCCCGGTACCGGTAGAAACCATGGTGAGCAAGGG     | mOrange/mCherry in pMDC83, forward Primer, Apal-Schnittstelle   |
|                 | CGAGGAG                                    |   |
| pMDC83_RFP_for  | GGGGGCCCGGTACCGGTAGAAACCATGGCCTCCTCCGAG    | mRFP in pMDC83, forward Primer, Apal- Schnittstelle             |
|                 | GACGTC                                     |   |
| GTW-BHLH2_fw    | ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCAACCGGAG   | BHLH2, forward Primer, GTW-extensions                           |
|                 | AAAACAGA                                   |   |
| ProDFR_EMSA_for | (BIO )ACACACCTAAGGAAATAATA                 | DFR min Promotor, EMSA, 5' biotin, forward Primer               |
| ProDFR_EMSA_rev | (BIO )ACACTAGAGATTATGAAT CG                | DFR min Promotor, EMSA, 5' biotin reverse Primer                |
| ProDFR_for      | ACACACCTAAGGAAATAATA                       | DFR- Promotor, forward Primer                                   |
| ProDFR_rev      | ACACTAGAGATTATGAATCG                       | DFR- Promotor, reverse Primer                                   |
| MYB90_for       | TTGGTATAATTAATGTCAAC                       | Genotypisierung At1g66390 (SALK041562), forward Primer          |
| MYB90_for       | ATTGGTGTGCTTAGATTCTT                       | Genotypisierung At1g66390 (SALK041286), forward Primer          |
| DFRpro_EMSA_for | AACGTTCCCCACGTGCTTCTCCGGTTGGTACTCACGTGAC   | DFR min Promotor, EMSA, forward Primer                          |
|                 | CGGCAGCT                                   |   |
| DFRpro_EMSA_rev | AGCTGCCGGTCACGTGAGTACCAACCGGAGAAGCACGTG    | DFR min Promotor, EMSA, reverse Primer                          |
|                 | GGGAACGTT                                  |   |
| DFRproEMSA_for  | (BIO)TTCTCCGGTTGGTACTCACGTGACCGGCAGCTTCTC  | DFR min Promotor, EMSA, 5' biotin forward Primer                |
|                 | GTTCTTATTATCTGTTT                          |   |
| DFRpro_EMSA_rev | (BIO)AAACAGATAATAAGAACGAGAAGCTGCCGGTCACGT  | DFR min Promotor, EMSA, 5' biotin reverse Primer                |
|                 | GAGTACCAACCGGAGAA                          |   |
| DFRpro_EMSA_for | (BIO)AACGTTCCCCACGTGCTTCTCCGGTTGGTACTCACGT | DFR min Promotor, EMSA, forward Primer                          |
|                 | GACCGGCAGCT                                |   |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| DFRpro_EMSA_rev  | (BIO)AGCTGCCGGTCACGTGAGTACCAACCGGAGAAGCAC<br>GTGGGGAACGTT | DFR min Promotor, EMSA, reverse Primer                           |
| VD14_seq_rev     | CAAACACTGATAGTTTAAAC                                      | Sequenzierprimer   |
| VD14_seq_for     | TTGAAGCTCTTTTTCTCAG                                       | Sequenzierprimer   |
| VD44_BHLH42prom  | TTGTGCCTAACCAACCTCTC                                      | BHLH42 Promotor, Kolonie-PCR, forward Primer                     |
| MYB75prom_VD71   | TGTTCCGGCTCATGATTAGCG                                     | MYB75 Promotor, Kolonie-PCR, forward Primer                      |
| MYB75_RT-PCR_for | GCTCTGATGAAGTCGATCTTC                                     | RT-PCR, MYB75, forward Primer                                    |
| MYB75_RT-PCR_rev | CTACCTCTTGGCTTTCCTCT                                      | RT-PCR, MYB75, reverse Primer                                    |
| MYB75_prom       | TTAAGAGCGAGCCTACCATC                                      | MYB75 Promotor, Kolonie-PCR, forward Primer                      |
| BHLH42_prom      | GCTCCTTGTAGCAGTAACAC                                      | BHLH42 Promotor, Kolonie-PCR, forward Primer                     |
| proMYB75_for     | CTTGGCGTGCCTGCAGTTTAAACATCCTGATTAGCGATGA<br>TCATA         | MYB75 Promotor aus VD10, Pmel-Schnittstelle, forward Primer      |
| proMYB75_rev     | ACCCGGGGATCCGACCATGGAACAAAGATA                            | MYB75 Promotor aus VD10, BamHI-Schnittstelle, reverse Primer     |
| VD11_cassette_r  | GCTCTAGCATTGCGCCATTCA                                     | VD11, Gateway Kasette, FspI-Schnittstelle, reverse Primer        |
| VD11_cassette_f  | TTCCGGCTCGTATGTTGTGT                                      | for VD11, Gateway Kasette, EcoRI-Schnittstelle, forward Primer   |
| VD49_Sacl_for    | GAAATTCGAGCTCCACCGCG                                      | In MYB75, Sacl-Schnittstelle, forward Primer                     |
| VD49_KpnI_rev    | ATCCCCGGGTACCATGGTGA                                      | In Cherry, KpnI-Schnittstelle, reverse Primer                    |
| VD49_stop1_rev   | GACGAGCTGTACAAGGGAGGCGGCCAAGCTAT                          | VD49-Vektor, Stopp-Deletiom in Cherry, reverse Primer            |
| VD49_stop2_for   | ATAGCTTGGCGCGCCTCCCTTGTACAGCTCGTC                         | VD49-Vektor, Stopp-Deletiom in Cherry, forward Primer            |
| VD11_cassette_r  | GCTCTAGCATTGCGCCATTCA                                     | VD11-Vektor, Gateway Kasette, FspI-Schnittstelle, reverse Primer |
| VD11_cassette_f  | TTCCGGCTCGTATGTTGTGT                                      | VD11-Vektor, Gateway Kasette, EcoRI-Schnittstelle, forward       |
| VD75_cassette_f  | ATGACCATGATTACGAATTCAGTA                                  | VD75-Vektor, Gateway Kasette, EcoRI-Schnittstelle, forward       |
| VD75_cassette_r  | CATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG                                   | VD75-Vektor, Gateway Kasette, FspI-Schnittstelle, reverse Primer |
| VD75_Xho_rev     | AGCTCAAGCTGCTCGAGCATTCGC                                  | VD75-Vektor, Gateway Kasette, XhoI-Schnittstelle, reverse Primer |
| ProMYB90_BamHI   | TTCGGATCCATTTACGTCCACGC                                   | MYB90 Promotor, forward Primer, BamHI-Schnittstelle              |
| ProMYB90_NcoI    | CCTCCATGGACCAAGAAAAATTA                                   | MYB90 Promotor, reverse primer, NcoI- Schnittstelle              |
| pMDC43_Chwestop  | TAGCTTGGCGCGCCTGGACTTGTACAGCTCGTCCAT                      | mOrange/mCherry in pMDC43, reverse Primer, AscI-Schnittstelle    |
| pLEELA_basta_fo  | CGTCTCGAGCAGATATCAGCTTGC                                  | pLEELA-Vektor, BastaR, forward Primer, XhoI- Schnittstelle       |
| pLEELA_basta_re  | TCTGAGCTCGGGCGCGCCAAACC                                   | pLEELA,-Vektor, BastaR, reverse Primer, XhoI-Schnittstelle       |
| ProDFR_1_for     | TTACGTACCACACATCTCTTTAGT                                  | DFR Promotor, forward Primer, 105bp                              |
| ProDFR_2_for     | TTAGTCCTTCGTCAACCAACGTTT                                  | DFR Promotor, forward Primer, 86bp                               |
| ProDFR_3_for     | TTCCCCACGTGCTTCTCCGGTTGGTAC                               | DFR Promotor, forward Primer, 65bp                               |
| ProDFR_4_for     | TTCTCCGGTTGGTACTCACGTGACCGGACGCTTCTCGTT                   | DFR Promotor, forward Primer, 53bp                               |
| ProDFR_5_rev     | TGCCGGTACGTCGAGTACCAACCGGAG                               | DFR Promotor, reverse Primer, 81bp                               |
| ProDFR_6_rev     | TACCAACCGGAGAAGCAGCTGGGG                                  | DFR Promotor, reverse Primer, 66bp                               |
| ProDFR_7_rev     | AAGCACGTGGGGAACGTTGGTTGACGA                               | DFR Promotor, reverse Primer, 51bp                               |
| ProDFR_8_rev     | AGGACTAAAGAGATGTGTGGTACG                                  | DFR Promotor, reverse Primer, 38bp                               |

|                 |  |  |
|-----------------|--|--|
| VD75_LEELA_rev  | CCACTATCCTTCGCAAGACCTTCC                 | VD75 in pLEELA, BastaR, reverse Primer                           |
| VD75_LEELA_for  | TGTTGGCTGGCTGGTGGCAGGATA                 | VD75 in pLEELA, BastaR, forward Primer                           |
| VD75_LEELA_rev  | TGCACCATCGTCAACCACTACATC                 | VD75 in pLEELA, BastaR, reverse Primer                           |
| pLEELA_basta_re | TCTCTCGAGGGGCGCGCCCAAACC                 | pLEELA, BastaR, reverse Primer, XhoI- Schnittstelle              |
| DFR_sdm1_for    | TTACCAGATTGCTACGTACCACAC                 | site directed mutagenesis, ProDFR 1 forward Primer               |
| DFR_sdm2_for    | TTACCAGATTGTTGCGTACCACAC                 | site directed mutagenesis, ProDFR 1 forward Primer               |
| DFR_sdm3_for    | ACCAACGTTCCCCAGCTGCTTCTC                 | site directed mutagenesis, ProDFR 1 forward Primer               |
| DFR_sdm4_for    | TTCTCCGGCTGGTACTC                        | site directed mutagenesis, ProDFR 1 forward Primer               |
| DFR_sdm5_for    | TACTCACGCGACCGGC                         | site directed mutagenesis, ProDFR 1 forward Primer               |
| DFR_sdm1_rev    | GTGTGGTACGTAGCAATCTGGTAA                 | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_sdm2_rev    | GTGTGGTACGCAACAATCTGGTAA                 | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_sdm3_rev    | GAGAAGCAGCTGGGGAACGTTGGT                 | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_sdm4_rev    | GAGTACCAGCCGGAGAA                        | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_sdm5_rev    | GCCGGTCGCGTGAGTA                         | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_PRO1_for    | TCGAAGTCAACGTATTTACCCAC                  | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_PRO1_rev    | TGAAGACATTATAAATAAGACACT                 | DFR Promotor, 140bp, site directed mutagenesis, reverse Primer   |
| DFR_Promin_for  | CACACCTAAGGAAATAATAAAATC                 | DFRmin- Promotor, 265bp, forward Primer                          |
| Cherry_for      | CCCGGGTACCGGTAGAAAAAATGGTGAGCAAG         | Cherry (pRSET-B), KpnI-Schnittstelle, forward Primer             |
| Cherry_rev      | TGATAGCTTGGCGCGCCCTTGTACAGCTCG           | Cherry (pRSET-B) ohne Stopp, AscI-Schnittstelle, reverse Primer  |
| DFR_minpro_for  | AGGCTAAGCTTCAAATACACACCTAAGGAAATAA       | 123 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, for. Primer, HindIII- Schnitt. |
| DFR_minpro_rev  | TTGGTCCATGGTTGAAGAAAACAGATAATAAGAAC      | 123 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, rev. Primer, NcoI- Schnitt.    |
| DFR_minprodel_r | TTGGTCCATGGTACCAACCGGAGAAGCAC            | 110 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, rev. Primer, NcoI- Schnitt.    |
| DFR_minprodel_r | TTGGTCCATGGGAAGCACGTGGGGAAC              | 100 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, for. Primer, NcoI- Schnitt.    |
| DFR_minprodel_f | AGGCTAAGCTTCGTACCACACATCTCTTTAGTC        | 110 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, for. Primer, HindIII- Schnitt. |
| DFR_minprodel_f | AGGCTAAGCTTCTTCTCCGTTGGTACTCAC           | 60 bp DFR Promotor in pBT10-GUS, for. Primer, HindIII- Schnitt.  |
| GTW-MYB75GFP-fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGTAAA | GFP-MYB75, forward Primer, GTW extensions                        |
|                 | GGAGAAGAAGCTTTTTCAC                      |  |
| GTW-MYB75GFP-re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAATCAAAT | GFP-MYB75, reverse Primer, GTW extensions                        |
|                 | TTCACAGTCTCTCCATCG                       |  |
| GTW-BHLH42Ch-fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGATGAA | BHLH42-Cherry, forward Primer, GTW extensions                    |
|                 | TCAAGTATTATTCCGGC                        |  |
| GTW-BHLH42Ch-re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC                 | BHLH42-Cherry, reverse Primer, GTW extensions                    |
|                 | TGGGTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCG       |  |
| Cherry_for      | ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGA                  | mCherry, forward Primer  |
| Cherry_rev      | TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC                  | mCherry, reverse Primer  |
| GFP_for         | ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC                | eGFP, forward Primer   |
| GFP_rev         | GGCGCGCCTTTGTATAGTTCATC                  | eGFP, reverse Primer   |

|                 |  |   |
|-----------------|--|---|
| p5YN2_MYB75_for | CAAGTTTGTACAAAAAAGGAATTCCCATGGAGGGTTCGTC<br>CA                 | MYB75 in p5YN2, EcoRI-Schnittstelle, forward Primer         |
| p5YN2_MYB75_rev | TACAAGAAAGGAGCTCTCTAATCAAATTTTC                                | MYB75 in p5YN2, SacI-Schnittstelle, reverse Primer          |
| p5YC2_BHLH42_fo | CAAGTTTGTACAAAAAAGGAATTCCCATGGATGAATCAAGT<br>A                 | BHLH42 in p5YC2, EcoRI- Schnittstelle, forward Primer       |
| p5YC2_BHLH42_re | TACAAGAAAGGAGCTCTCTATAGATTAGTATC                               | BHLH42 in p5YC2, SacI-Schnittstelle, reverse Primer         |
| p5YC2_BHLH2_for | CAAGTTTGTACAAAAAAGGAATTCCCATGGCAACCGGAGA<br>AA                 | BHLH2 in p5YC2, EcoRI- Schnittstelle, forward Primer        |
| p5YC2_BHLH2_rev | TACAAGAAAGGAGCTCTCTTAACATATCCATGC                              | BHLH2 in p5YC2, SacI-Schnittstelle, reverse Primer          |
| bhlh2_for_in    | CGACAAGATCAGACTATCAAG  | nested (inner) forward Primer, bhlh2, 650bp                 |
| bhlh2_rev_in    | AGGAACCTCGAAGAGTATCT   | nested (inner) reverse Primer, bhlh2, 650bp                 |
| neST-newGTW     | ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGYA                                  | Stopp-Deletionen in GTW Vektoren                            |
| bhlh1rev        | GCTGGTAATATTGTAGCGTAC  | Exon4, bhlh1, At5g41315, reverse Primer                     |
| bhlh2forw       | TCAGGTCAGTACGAGC   | Exon2, bhlh2, At1g63650, forward Primer                     |
| bhlh2innerrev   | TCGTGCCAATCTCAAGGAC  | bhlh2, At1g63650, reverse Primer                            |
| bhlh2innerfw    | GTACTACTTAGTATGCATGTCT   | Exon2, bhlh2, At1g63650, forward Primer                     |
| MYB75rev        | ATGAGTGTTCAGTAATTCTT   | Exon3, MYB75, reverse Primer                                |
| MYB75revRT      | CTAATCAAATTTTACAGTCTCTC  | MYB75 von cDNA, reverse Primer                              |
| MYB75fwRT       | ATGGAGGGTTCGTCCAAAGG   | MYB75 von cDNA, forward Primer                              |
| bhlh42fw2       | TCAACGTCAGAAGCAAGAG  | 2.Forward Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42rev2      | GCATAGTATAGTTGGTGAATGAA  | 2.Reverse Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42fw3       | CACGTATGGCTAAGTGGTG  | 3.Forward Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42fw1       | ATTTTTAGAGAGAGAGCTACC  | 1.Forward Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42rev6      | GTGGAGTGTTCAGAAAGAGC   | 6.Reverse Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42rev7      | CATTGATCTCAACGTTATGAAT   | 7.Reverse Primer für BHLH42                                 |
| bhlh42fw8       | TTCCTTTCCCTCCATGACAAC  | 8.Forward Primer für BHLH42                                 |
| DFR_RT          | GGCTAGTGATGCGATTACT  | DFR At5g42800, forward Primer, RT-PCR                       |
| DFR_RTrev       | CAACACCTTCAAACGTTGA  | DFR At5g42800, cDNA-spezifischer reverse Primer             |
| Aktin_fwd       | TCCGCTCTTTCTTTCCAAGCTCAT                                       | Actin2 Primer, cDNA spezifisch                              |
| Aktin_rev       | TCCAGCACAATACCGGTTGTACG  | Actin2 reverse Primer, cDNA spezifisch                      |
| DFR             | CCGGTCACGTGAGTACCAACCGGAGAAGCACGTGGGGAA                        | BHLH- and MYB-Bindestellen auf DFR Promotor, reverse Primer |
| GTW-MYB75-2     | (GWR)CTTAAGGAACCAAAATATCTACCT                                  | MYB75, reverse Primer mit attB2 site                        |
| DFR-5'          | GGTTGAAGAAGAAGAAGGAAAGCTTTGAAG                                 | DFR-Promotor  |
| DFR-3'          | CTGACTAACCATGGTTGTGGTTATATG                                    | DFR-Promotor  |
| GTW-MYB90-1     | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGG<br>TTCGTCCAAAGGGTTGAGG | MYB90 (GTW-Extensions), forward Primer                      |

|                 |   |  |
|-----------------|---|--|
| GTW-MYB90-2     | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAACGGTGA<br>GAAACACTAATCAAGTTC  | MYB90 (GTW-extensions), reverse Primer   |
| BHLH2           | GTTGACGACTGAACCGAGTGAG  | Genotypisierung von GK-line 349G11 (BHLH002-ko line)                                   |
| BHLH2_1         | AGAGAAGTGAGCAGCTTAGAGA  | Genotypisierung von GK lines 756G05/483D04 (BHLH002-ko lines)                          |
| MYB75_for       | ATGGAGGGTTCGTCCAAAG   | MYB 75 forward Primer  |
| MYB75_rev       | TCTCCATCGAAAAGACTCCAA   | MYB 75 reverse Primer  |
| Ds3-2a          | CGATTACCGTATTTATCCCGTTC   |  |
| nosT-nosT       | GCAAGACCGGCAACAGGATT  | Standardprimer   |
| P35S-P35S       | ACAATCCCCTATCCTTC   | Standardprimer   |
| 8409            | ATATTGACCATCATACTCATTGC   | GABI-KAT T-DNA LB Primer   |
| 35S-fwd         | CGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTC                                  | 35S Promoter   |
| nosT_rev        | CGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAACTTTATTGC                              | nosT   |
| SALK_LB         | GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG                                  | SALK Standardprimer  |
| BHLH12          | TTCTACACCATCAGCCATTGTC  | Genotypisierung von GK-line 621F09 (BHLH012-ko line), reverse                          |
| GTW-MYB90-1     | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGG<br>TTCGTCCAAAGGGTTGAGG  | MYB90 (GTW-Extensions), forward Primer   |
| Pnos_down       | CGGCTCAGTGGCTCCTTCAA  | Pnos von pATGUS Vektor, forward Primer   |
| MYB90SALK-1     | CTTCTTCTTCGCCTTCATAAGC  | Genotypisierung von SALK-line 058359 (MYB90-ko), forward                               |
| MYB90SALK-2     | CTGTCGTCGCTTCAGGAACAAT  | Genotypisierung von SALK-line 058359 (MYB90-ko), reverse                               |
| GW_Myb90_prom_f | (GWF)CTAGTACTATGTGGAAAGTTGTA                                    | Myb90-Promotor-Region  |
| GW_Myb90_Prom_r | (GWR)CATCAAGTTCAACAGTCTCTCCATC                                  | Myb90-Promotor-Region  |
| RS651           | ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCCATGTTTTTTTTTTTTTTTT<br>TTTTTTTTTTTTTTTTTT | oligo-dT-Primer  |
| rev_L           | CAGGAAACAGCTATGACCATG   | Standardprimer   |
| uni_L           | CGTTGTAACGACGGCCAGT   | Standardprimer   |
| Primer ONE      | TTACCAGATTGTTACGTACCACAC  | Amplification of 123 bp minimal DFR-promoter, forward primer                           |
| Primer TWO      | AAACAGATAATAAGAACGAGAAGC  | Amplification of 123 bp minimal DFR-promoter, reverse primer                           |
| Primer ONE A655 | (ATTO655) TTACCAGATTGTTACGTACCACAC                              | Amplification of 123 bp minimal DFR-promoter, 5'-modified with ATTO655, forward primer |
| Primer TWO A655 | (ATTO655) AAACAGATAATAAGAACGAGAAGC                              | Amplification of 123 bp minimal DFR-promoter, 5'-modified with ATTO655, reverse primer |

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt 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.

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

---

(Verena Düttmann)

---

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen und Posterpräsentationen:

**Düttmann, V., Kasper, R., Stracke, R., Tinnefeld, P., Weisshaar, B.** (2008). Transcription Factor Binding Sites of the *Arabidopsis thaliana* Dihydroflavonol-Reductase promoter. *Manuskript in Vorbereitung.*

**Düttmann, V., Stracke, R., Tinnefeld, P., Weisshaar, B.** (2006). The temporal and spatial analysis of formation and transport of R2R3-MYB / BHLH transcription factor complexes in plant cells. *Präsentation im Rahmen der 19. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ vom 7. bis zum 10. März in Wermelskirchen-Dabringhausen.*

**Düttmann, V., Kasper, R., Stracke, R., Tinnefeld, P., Weisshaar, B.** (2007). Towards *in planta*-visualization of a R2R3-MYB / BHLH transcription factor complex. *Präsentation im Rahmen des 4. Tri-Nationalen Arabidopsis Meetings vom 12. bis zum 15. September in Wien.*

**Bartelniewöhner, L., Düttmann, V., Ruhe, N., Huel, G., Weisshaar, B., 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.*

**Düttmann, V., Kasper, R., Stracke, R., Tinnefeld, P., Weisshaar, B.** (2007). *In planta*-visualization of a transcription factor complex. Präsentation im Rahmen der Tagung „Physik von Einzelmolekülprozessen und molekularer Erkennung in organischen Systemen (SFB 613)“ vom 8. bis zum 9. Oktober in Bielefeld.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Kollegen, mit denen ich während der Erstellung dieser Dissertation das Labor geteilt habe.

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, im Rahmen meines Projektes mit Kooperationspartnern aus anderen Fachbereichen arbeiten zu können, sowie für die wissenschaftliche Betreuung und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Dr. Thorsten Seidel für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Ralf Stracke für die wissenschaftliche Betreuung, die Verbesserungsvorschläge und die Anregungen, die immer wieder zu neuen Ideen und Erkenntnissen geführt haben. Ich danke ihm für die Möglichkeit des eigenverantwortlichen und selbstständigen Arbeitens.

Prof. Dr. Philip Tinnefeld für die Betreuung des Projektes unter physikalischer Sichtweise. Ich danke ihm für die bereitgestellten Mikroskope und für die vielen Hilfen in allen wissenschaftlichen Fragen rund um die Physik. Ich danke ihm für sein Engagement und ausgezeichnete Anregungen.

PD Dr. Thomas Merkle und Dr. Martin Sagasser für ihre Ideen, Anregungen und fachlichen Hilfen während meiner Arbeit im Labor.

Robert Kasper für die unzähligen Stunden, die wir an diversen Mikroskopen verbracht haben und für die vielen Messungen, die er mit mir gemacht hat. Ich danke ihm für vielen guten Gespräche und Hilfen zu allen physikalischen Themen.

Lutz Bartelniewöhner für die vielen guten Ratschläge und Diskussionen, die mir oft weitergeholfen haben. Danke für die guten Ideen, die du immer eingebracht hast und für deine Hilfsbereitschaft bei jedem Problem, auch neben dem Laboralltag. Danke für die freundschaftliche Basis, wodurch das Arbeiten mit dir im Labor sehr viel Spaß gemacht hat.

Melanie Kuhlmann für jegliche Hilfe bei den vielen Zellkulturexperimenten und für die Ratschläge und Hilfestellungen rund um den Laboralltag. Danke für deine liebenswerte Art und die schönen Gespräche. Durch deine positive Energie hast du im Labor immer viel Freude verbreitet.

Meinen weiteren Laborkollegen aus G0-133, Sandra Frank und Oliver Jahns, danke ich herzlich für ein entspanntes Arbeitsklima und eine nette Gemeinschaft, innerhalb und außerhalb des Labors. Danke für eure Hilfsbereitschaft, eure guten Ratschläge und auch fürs Korrekturlesen.

Ute Bürstenbinder danke ich für die ganze Unterstützung bei diversen Transfektionen. Danke für die lieben Gespräche auch neben dem wissenschaftlichen Alltag.

Gunnar Huet danke ich für seine zahlreichen Ideen, Anregungen, guten Hilfen und fürs Korrekturlesen. Danke, dass du dir immer Zeit genommen hast, wenn es um (fachliche) Fragen ging.

Ich danke Nadine Ruhe, Kristina Petkau und Arwa Al-Dilaimi, die ich im Laufe der Zeit bei ihren Arbeiten im Labor betreut habe und die alle sehr liebenswert waren.

Ich danke Julia Starmann und Raimund Hoffrogge für die schönen Stunden und tollen Gespräche während unserer täglichen Fahrten. Mit euch hat es viel Spaß gemacht und war nie langweilig.

Ich danke meinen Eltern für die große Unterstützung in allem und für all das, was sie mir bisher ermöglicht haben. Meinen Schwestern danke ich für den Halt und die Freude, die sie mir geben. Ein großer Dank gilt Dennis, der mir trotz vieler Höhen und Tiefen immer großen Halt gegeben und mich in allem unterstützt hat. Ihr seid so liebevolle Menschen, wie man es sich nur wünschen kann.

## Lebenslauf

Name: Verena Düttmann

Anschrift: Kolpingstraße 9, 49074 Osnabrück

Geburtsdatum: 11.10.1979

Geburtsort: Lingen

Nationalität: deutsch

Schulbildung: 08/1986 – 07/1990 Grundschule Schepsdorf (Lingen)  
08/1990 – 07/1992 Marienschule Lingen (Orientierungsstufe)  
08/1992 – 07/1999 Franziskusgymnasium Lingen

Schulabschluss: 07/1999 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium: 10/1999 – 12/2004 Universität Osnabrück: Studium für das Lehramt an  
Gymnasien (Biologie und Deutsch)

06/2003 – 01/2004 Examensarbeit unter Leitung von Dr. Elisabeth  
Peters in der Abteilung Ethologie der Universität Osnabrück

Abschluss: 12/2004 Abschluss des Studiums mit dem 1. Staatsexamen

Promotion: 04/2005 – heute Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd  
Weißhaar am Institut für Genomforschung der Universität Bielefeld.