

**ChIP-basierter Screen und Untersuchungen
zu Protein-DNA-Interaktionen ausgewählter
Regulatoren der Flavonoidbiosynthese
in *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Oliver Jahns
aus Hamm (Westf.)

angefertigt am Lehrstuhl für Genomforschung
Bielefeld im März 2012

Berichtersteller:

Prof. Dr. Bernd Weißhaar

Tag der mündlichen Prüfung:

für Gesine und Ole

Kurzzusammenfassung

Am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ist unter anderem die Regulation der Flavonoidbiosynthese Gegenstand aktueller Forschung und bereits gut untersucht. Viele an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligte Transkriptionsfaktoren wurden bereits charakterisiert. Trotzdem ist das bestehende Wissen über regulatorische Mechanismen in seiner Gesamtheit bis heute unvollständig. Um für einige an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Transkriptionsfaktoren die *in vivo* Bindestellen zu analysieren wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) etabliert und anschließend zur genomweiten Identifizierung der Protein-Bindestellen mit direkter Sequenzierung gekoppelt (ChIP-seq). Anhand der Anthocyan-spezifischen Regulatoren PAP1, TT8 und EGL3 sollten die *in vivo* Bindestellen im *Arabidopsis thaliana* Genom identifiziert werden. Für die regulatorischen Proteine TT8 und EGL3 konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreiche ChIP-seq Experimente durchgeführt und jeweils putative Ziel-Bindestellen detektiert werden. Des Weiteren konnte die *in vivo* Bindung an regulatorische Elemente bereits bekannter Zielgene der Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. In *Arabidopsis thaliana* wird die Flavonolbiosynthese von den *Production of Flavonol Glycoside* (PFG) Transkriptionsfaktoren reguliert. Zur Identifizierung der *in vivo* Bindestellen dieser Proteine mit Hilfe der ChIP-seq Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Linien generiert, die als Ausgangsmaterial für weitere Experimente dienen sollen. In Transaktivierungsassays konnte die Aktivierung von Promotoren einzelner UDP-Glykosyltransferasen durch die PFG Transkriptionsfaktoren gezeigt und somit das Wissen über die regulatorische Vielfältigkeit dieser Proteine erweitert werden. Des Weiteren wurde ein bereits bekanntes Zielgen der PFG Proteine weiterführend charakterisiert. Mit Hilfe von *transparent testa* (*tt*) oder *tannin deficient seed* (*tds*) Nullallele sind viele Strukturgene der Flavonoidbiosynthese identifiziert worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter anderem die Mutation im *tt17*-Lokus identifiziert und *TT17* als ein weiteres *LDOX*-Allel charakterisiert werden.

Abstract

Using the model organism *Arabidopsis thaliana* the regulation of flavonoid biosynthesis is subject of current research and has already been studied to a large extend. Many in the regulation of flavonoid biosynthesis involved transcription factors have been characterized. Yet the existing knowledge about regulatory mechanisms is still incomplete. In order to analyze the *in vivo* binding sites of selected flavonoid biosynthesis transcription factors the method of chromatin immunoprecipitation (ChIP) was established and subsequently used to identify the genome-wide protein-binding sites with a direct sequencing technique (ChIP-seq). ChIP-seq experiments for the regulatory proteins PAP1, TT8 and EGL3 should be performed in this work to identify putative target-binding sites. ChIP-seq experiments for the regulatory proteins TT8 and EGL3 could be performed successfully and putative target binding sites could be identified. Furthermore, *in vivo* binding to regulatory elements of known target genes could be demonstrated. In *Arabidopsis thaliana*, the flavonol biosynthesis is regulated by production of flavonol glycoside (PFG) transcription factors. To identify the *in vivo* binding sites for these proteins using the ChIP-seq approach, transgenic lines were generated which will serve as a starting material for further experiments. In transactivation assays, promoter activation of individual UDP-glycosyltransferases by PFG transcription factors has been demonstrated broadening the knowledge of the diversity of target genes controlled by these regulatory proteins. Furthermore, a previously known target gene of the PFGs has been characterized in more detail. With the help of *transparent testa (tt)* and *tannin deficient seed (tds)* null alleles, many structural genes of the flavonoid biosynthesis have been identified. In another part of this work the mutation in *tt17* could be identified and *TT17* characterized as another *LDOX* allele.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	
Abstract	
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis.....	
1. Einleitung.....	1
1.1. Flavonoide	1
1.1.1. Die Flavonoidbiosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.2. Regulation der Flavonoidbiosynthese.....	7
1.2.1. Die bHLH-Transkriptionsfaktorfamilie	8
1.2.2. Die MYB-Transkriptionsfaktorfamilie.....	10
1.2.3. Die transkriptionelle Regulation der Flavonoidbiosynthes in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.3. Die Chromatin Immunopräzipitation.....	16
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	23
2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen.....	23
2.1.2.1. Medien für die Anzucht von Bakterien.....	24
2.1.2.2. Medien für die Anzucht von <i>A. thaliana</i>	25
2.1.2.3. Medien für die <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskultur At7	26
2.1.2.4. Medien für die <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskultur CK_UK	26
2.1.2.5. Medien für die <i>Nicotiana tabacum</i> Zellsuspensionskultur BY2.....	27
2.1.2.6. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	28
2.1.2.7. Puffer und Lösungen für die Chromatin Immunoprecipitation	31
2.1.3. Desoxyoligonukleotide (Primer)	32
2.1.4. Bakterienstämme und DNA-Vektoren.....	35
2.1.5. Reagenzienansätze	38

Inhaltsverzeichnis

2.1.6.	Zellkulturen und Pflanzen	38
2.1.6.1.	Zellsuspensionskultur	39
2.1.7.	Pflanzen	40
2.2.	Methoden	40
2.2.1.	Pflanzenkultivierung	40
2.2.1.1.	Anzucht auf Erde	40
2.2.1.2.	Oberflächensterilisation von Samen	41
2.2.1.3.	Anzucht auf MS-Platten	41
2.2.2.	Histochemische Analyse der β -Glucoronidase (GUS) Aktivität und <i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP) Detektion in pflanzlichen Geweben.....	41
2.2.3.	Herstellung methanolischer Extrakte für die Dünnschichtchromatographie (HPTLC).....	42
2.2.4.	Dünnschichtchromatographie	42
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.5.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.2.5.2.	Kolonie-PCR	44
2.2.5.3.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	44
2.2.5.4.	Restriktionsverdau von DNA.....	45
2.2.5.5.	Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese	46
2.2.5.6.	Aufreinigung und Elution von DNA	46
2.2.5.7.	Ligation	46
2.2.5.8.	Erzeugung von Plasmidkonstrukten mittels Gateway [®] Rekombination	47
2.2.5.9.	Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte.....	48
2.2.5.10.	DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial.....	49
2.2.5.11.	Ethanol-Fällung von DNA.....	50
2.2.5.12.	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	50
2.2.5.13.	ExoSAP Verdau von DNA	50
2.2.5.14.	DNA-Sequenzierung	50
2.2.5.15.	Modellierung homologer Proteinstrukturen	51

Inhaltsverzeichnis

2.2.5.16.	RNA-Präparation.....	51
2.2.5.16.1.	Isolierung von Gesamt-RNA	51
2.2.5.16.2.	Probenvorbereitung für die RT-PCR	51
2.2.5.16.3.	Semiquantitative RT-PCR	52
2.2.6.	Mikrobiologische Methoden	53
2.2.6.1.	Kultivierung von Bakterien	53
2.2.6.2.	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation.....	53
2.2.6.2.1.	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen.....	53
2.2.6.2.2.	Herstellung chemokompenter Bakterienzellen.....	54
2.2.6.2.3.	Herstellung elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i>	54
2.2.6.3.	Transformation von Bakterienzellen	55
2.2.6.3.1.	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Bakterienzellen.....	55
2.2.6.3.2.	Transformation chemokompenter <i>E. coli</i> Bakterienzellen.....	55
2.2.6.3.3.	Transformation elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> Bakterienzellen	56
2.2.6.4.	Glyzerindauerkulturen von transformierten Bakterien	56
2.2.7.	Herstellung transgener Pflanzen.....	56
2.2.7.1.	Transformation durch „floral dipping“	56
2.2.7.2.	Selektion transgener T1-Pflanzen	57
2.2.8.	Zellkulturen	58
2.2.8.1.	At7-Zellkultur.....	58
2.2.8.1.1.	Vorbereitung der Transfektions-DNAs	58
2.2.8.1.2.	Kultivierung der AT7-Zellsuspensionskultur.....	59
2.2.8.1.3.	Gewinnung von At7-Protoplasten	59
2.2.8.1.4.	Transfektion von At7-Protoplasten.....	59
2.2.8.1.5.	Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten	60
2.2.8.1.6.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
2.2.8.1.7.	Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....	61
2.2.8.1.8.	Bestimmung der β -Glukoronidase-Aktivität.....	61

Inhaltsverzeichnis

2.2.8.1.9.	Berechnung der Reporterogenaktivität	61
2.2.8.1.10.	At7 Transfektion zur Analyse von <i>GFP</i> -Fusionsproteinen	62
2.2.8.2.	<i>N. tabacum</i> BY-2 Zellsuspensionkultur.....	62
2.2.8.2.1.	Kultivierung der BY-2 Zellsuspensionkultur	63
2.2.8.2.2.	Gewinnung von BY-2 Protoplasten	63
2.2.8.2.3.	Transfektion von BY-2 Protoplasten	63
2.2.8.2.4.	Analyse von <i>GFP</i> -Fusionsproteinen	64
2.2.8.3.	<i>A. thaliana</i> CK_UK Zellsuspensionskultur	64
2.2.8.3.1.	Kultivierung der CK_UK Zellsuspensionskultur.....	64
2.2.8.3.2.	Agrobakterien-vermittelte Transformation der CK-UK Zellsuspensionskultur.....	64
2.2.9.	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	65
2.2.10.	ChIP- <i>Sequencing</i> : Genomweite Identifizierung DNA-assoziierter Proteine	65
2.2.10.1.	Herstellung der DNA-Bibliothek	65
2.2.10.2.	<i>Cluster</i> -Generierung.....	67
2.2.10.3.	<i>Single-Read</i> Sequenzierung mit dem Genome Analyzer _{IIx}	67
2.2.10.4.	Analyse der ChIP-seq Daten.....	67
3.	Ergebnisse.....	69
3.1.	ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter <i>in vivo</i> DNA-Bindestellen von PAP1, TT8 und EGL3	69
3.1.1.	Etablierung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	69
3.1.1.1.	Etablierung der Formaldehydfixierung des Pflanzenmaterials (<i>Crosslinking</i>).....	72
3.1.1.2.	Etablierung der Sonifizierungseffizienz des isolierten Chromatins	73
3.1.1.3.	Versuchsdurchführung der Chromatin-Immunopräzipitation	74
3.1.1.3.1.	Formaldehydfixierung.....	74
3.1.1.3.2.	Kernextraktion	74
3.1.1.3.3.	Sonifizierung des isolierten Chromatins.....	75
3.1.1.3.4.	Überprüfung der Sonifizierungseffizienz	75

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.3.5.	Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen	75
3.1.1.3.6.	Decrosslinking und DNA-Extraktion	77
3.1.2.	ChIP-PCR: Analyse präzipitierter DNA mit Hilfe der PCR	77
3.1.2.1.	ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus <i>Pro_{PAP1}::GFP:PAP1</i> transgenen Keimlingen	78
3.1.2.2.	ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus <i>Pro_{TT8}::TT8:GFP</i> und <i>Pro_{CaMV35S}::TT8:GFP</i> transgenen Keimlingen	80
3.1.2.3.	ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus <i>Pro_{EGL3}::GFP:EGL3</i> und <i>Pro_{CaMV35S}::GFP:EGL3</i> transgenen Keimlingen	82
3.1.3.	Genomweite Identifizierung von DNA-Zielbindestellen der <i>Arabidopsis thaliana</i> Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3	84
3.1.3.1.	Genomweite Identifizierung von TT8 DNA-Zielbindestellen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
3.1.3.2.	Genomweite Identifizierung von EGL3 DNA-Zielbindestellen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
3.2.	Vorbereitende Experimente zur Identifizierung von <i>in vivo</i> DNA-Bindestellen der PFG Transkriptionsfaktoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
3.2.1.	Komplementationsanalyse transgener Linien (<i>Pro_{35S}::GFP:PFGx</i> und <i>Pro_{PFGx}::GFP:PFGx</i>)	102
3.3.	Die Mutation in <i>Transparent Testa 17 (TT17)</i> - ein neues <i>Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX)</i> Allel in <i>Arabidopsis thaliana</i>	105
3.4.	Identifizierung von UDP-abhängigen Glykosyltransferase Zielgenen der PFG Transkriptionsfaktoren durch Transaktivierungs Assays	108
3.5.	PFG Zielgen <i>PFT1</i>	111
4.	Diskussion	114
4.1.	ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter <i>in vivo</i> DNA-Bindestellen von PAP1, TT8 und EGL3	114
4.1.1.	Die Chromatin Immunopräzipitation konnte erfolgreich etabliert werden ..	115
4.1.2.	Eine PAP1-bekannte Zielsequenz konnte mittels ChIP nicht angereichert werden	117
4.1.3.	ChIP-Seq: Genomweite Identifizierung von Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3	118

Inhaltsverzeichnis

4.1.4.	Ein ChIP-seq Experiment konnte für TT8 erfolgreich durchgeführt werden	119
4.1.4.1.	Der Transkriptionsfaktor TT8 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ist an der Regulation eines Anthocyan-spezifischen Regulons beteiligt	121
4.1.4.2.	In der Saccharose-induzierten Anthocyanbiosynthese bindet der Transkriptionsfaktor TT8 unterschiedliche regulatorische Bereiche ...	123
4.1.5.	Ein ChIP-seq Experiment konnte für EGL3 erfolgreich durchgeführt werden..	124
4.1.5.1.	Der Transkriptionsfaktor EGL3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ist an der Regulation eines Anthocyan-spezifischen Regulons beteiligt	126
4.1.5.2.	Innerhalb der Anthocyanbiosynthese bindet der Transkriptionsfaktor EGL3 unterschiedliche regulatorische Bereiche	127
4.2.	PFG Protein <i>tagging</i> für die ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter <i>in vivo</i> Zielbindestellen.....	128
4.3.	<i>Transparent Testa 17 (TT17)</i> – ein neues <i>Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX)</i> Allel in <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
4.3.1.	<i>tt17</i> trägt eine Punktmutation in <i>LDOX</i>	130
4.4.	Identifizierung von UDP-abhängigen Glykosyltransferase Zielgenen der PFG Transkriptionsfaktoren	132
4.5.	PFG Zielgen <i>PFT1</i>	134
4.5.1.	Charakterisierung des <i>pft1-1</i> Phänotyps in unterschiedlichen Keimlingsgeweben und subzelluläre Lokalisation von PFT1	134
4.5.2.	Ist PFT1 an der Ausbildung eines Enzymkomplexes innerhalb der Flavonoidbiosynthese beteiligt?	136
4.6.	Ausblick.....	137
5.	Zusammenfassung	139
6.	Literaturverzeichnis.....	141
7.	Anhang	160
7.1.	<i>pDISCO</i> Vektorkarte	160
7.2.	Vorbereitung der ChIP DNA-Proben: Bestimmung der DNA Konzentration und Größenverteilung	161

Inhaltsverzeichnis

7.3. Auflistung der identifizierten putativen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3 mit Hilfe von CHIP-seq Experimenten in elektronischer Form.	162
7.4. Wertetabelle zu dem Transaktivierungsassay	163
7.5. Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen, Posterpräsentationen und Vorträge	166
Danksagung	167
Erklärung	168

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Coumarat:CoA-Ligase
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferon-Glukuronid
A	Adenin
Å	Angström
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACE	<i>ACGT containing element</i>
AHA10	Autoinhibierte H ⁺ -ATPase Isoform10
AMV	<i>Avian Myoblastosis Virus</i>
ANR	Anthocyanidin-Reduktase
BAN	BANYULS
bHLH	basische Helix-Schleife-Helix Domäne
bp	Basenpaar€
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CHI	Chalkon-Isomerase
ChIP	Chromatin Immunopäzipitation
ChIP-chip	ChIP gefolgt von Microarrays
ChIP-PCR	ChIP gefolgt von PCR
ChIP-seq	ChIP gefolgt von direkter Sequenzierung
CHS	Chalkon-Synthase
CoA	CoenzymA
Col	Columbia
DAG	<i>Days After Germination</i>
DC	<i>Decrosslinking</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGL	<i>Enhancer of GLABRA</i>
Est	Estland
F3H	Flavanon-3-Hydroxylase
F3'H	Flavanon-3'_Hydroxylase
FLS	Flavonol-Synthase
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GL	GLABRA
GST	Glutathion-S-Transferase
GT(n)	Glykosyltraserase(n)
GUS	β-Glukoronidase
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

HPTLC	Dünnschichtchromatographie
HTH	Helix-Turn-Helix
IgG	Immunglobulin G
L	Liter
LDOX	Leucoanthocyanidin-Dioxygenase
Ler	Landsberg erecta
LUC	Luciferase
MATE	<i>Multi-drug and Toxic Compound Extrusion Transporter</i>
Mbp	Megabasenpaar€
MBW	MYB-bHLH-WD40
min	Minute(n)
MRE	<i>MYB Recognition Element</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Nö	Nössen
OD	Optische Dichte
OMT	O-Methyltransferase
ORF	Offenes Leseraster
PA(s)	Proanthocyanidin€
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAP	<i>Production Of Anthocyanin Pigment</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGF	<i>Production Of Flavonol Glycoside</i>
PFT	<i>Production Of Flavonol Glycoside Target</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase PCR
RLU	Relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RRE	<i>R Responsive Element</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TDS	<i>Tanin Deficient Seed</i>
TT	Transparent Testa
U	Enzymeinheit
UGT	UDP-abhängige GT
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
WD40	40 Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholungen
Ws	Wassilewskija
X-Gluc	5'-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-Glukuronat

Anmerkung zum Stil der vorliegenden Arbeit:

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

1. Einleitung

Einer der grundlegendsten Unterschiede zwischen pflanzlichen und tierischen Organismen ist in der sessilen Lebensweise der Landpflanzen begründet. Als Folge dieser Standortbindung müssen Pflanzen in der Lage sein einen Schutz gegen biotische oder abiotische Stressoren aufzubauen und mit ihrer Umgebung in Interaktion treten. Hierbei kommt dem pflanzenspezifischen Sekundärmetabolismus eine entscheidende Aufgabe zu teil. Die strikte Trennung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel scheint allerdings überholt, da diesem heute eine gleichwertige Relevanz wie z.B. der Photosynthese und dem Zitrat-Zyklus zugesprochen wird (Hartmann, T. 2007). Pflanzliche Sekundärmetabolite können beispielsweise Schutz gegen Pathogene oder Herbivoren bieten, sowie UV-Schutz vermitteln oder Fremdbestäuber und samenverbreitende Organismen anlocken (Tsuji *et al.* 1992; Li, Jiayang *et al.* 1993; Winkel-Shirley 2001). Bis heute sind mehr als 10.000 pflanzliche Sekundärmetabolite beschrieben (Wink 1999). Diese werden weiter in drei große Gruppen eingeteilt, die Alkaloide, die Isoprenoide und die Phenylpropanoide. Die Gruppe der Phenylpropanoide kann weiter in Lignine, Stilbene und Flavonoide unterteilt werden, wobei Flavonoide hinsichtlich ihrer Biosynthese bis heute am besten untersucht sind.

1.1. Flavonoide

Flavonoide (abgeleitet von *flavus*, gelb) sind niedermolekulare, von der C₆-C₃-C₆-Struktur des Flavangerüsts abgeleitete Sekundärmetabolite. Bis heute sind über 9000 Flavonoid-Molekülvarianten beschrieben worden (Williams und Grayer 2004). Die Flavonoide können je nach Oxidationszustand des als Heterozyklus bezeichneten mittleren C-Rings in weitere Untergruppen, wie Flavanone, Flavone, Isoflavone, Flavonole, Flavanole und Anthocyanidine eingeteilt werden (siehe Abb. 1.1.).

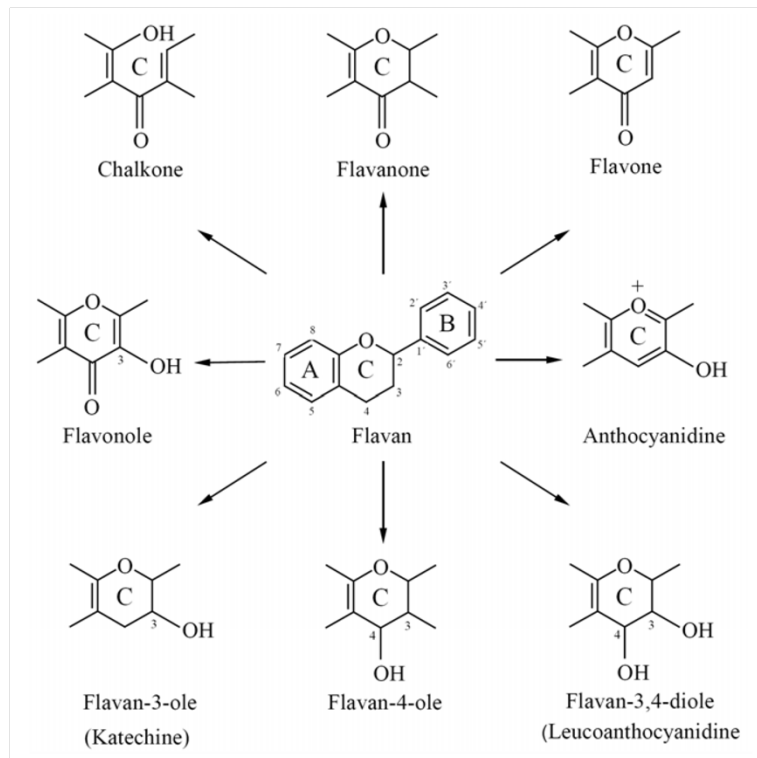


Abbildung 1.1. Untergruppen der Flavonoide. Dargestellt ist die Ableitung der unterschiedlichen Flavonoid-Klassen vom Flavan-Grundgerüst durch Modifikation des zentralen Heterozyklus (verändert nach Richter 1988).

Flavonoide besitzen facettenreiche Funktionen innerhalb des Pflanzenreiches. So üben sie unter anderem einen bedeutenden Einfluss auf den Transport des pflanzlichen Hormons Auxin aus (Peer und Murphy 2007), oder spielen eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr (Treutter 2005), bei der pflanzlichen Interaktionsfähigkeit (Allelopathie) (Bais *et al.* 2006) und der Umwandlung von reaktiven Sauerstoff Formen (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (Taylor und Grotewold 2005; Bais *et al.* 2006). Flavonoide vermitteln zusätzlich die Pigmentierung von Pflanzen, vor allem der Blüten, zur Anlockung von Pollinatoren (Mol *et al.* 1998). Neben der Rolle als Entwicklungsregulator und den Funktionen im Rahmen biotischer und abiotischer Interaktionen sind Flavonoide in der Lage UV-Licht zu absorbieren, was bedingt, dass Flavonol-defiziente Mutanten sensitiver gegenüber UV-Bestrahlung sind (Li, Jiayang *et al.* 1993). In neueren Publikationen wird allerdings die These, dass Flavonoide hauptsächlich als UV-B Schutzpigmente wirken in Frage gestellt. Vielmehr wird durch den Einfluss von Lichtstress, unabhängig von der Wellenlänge, durch die Anreicherung von ROS

die Biosynthese von Flavonol-Glykosiden angeregt (Fini *et al.* 2011). Die Blüten- und Fruchtfarbe vieler Pflanzen wird unter anderem von den Anthocyanen hervorgerufen, die eine große Anzahl von roten und blauen Pigmenten bilden (Koes *et al.* 2005). Diese plastidär gelagerte Stoffklasse der Flavonoide vermittelt des Weiteren auch Mesophyllzellen Schutz vor zu hoher Lichteinstrahlung. Eine weitere, auf die Samenschale in *Arabidopsis thaliana* begrenzte Stoffklasse stellen die Proanthocyanidine dar. Sie dienen unter anderem dazu, den Embryo vor Herbivoren und Pathogenen zu schützen (Shirley 1998). Weiterhin spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der Samenschale und beeinflussen somit auch die Dormanz des Samens (Debeaujon, I. *et al.* 2000; 2003).

Biotechnologisch sowie medizinisch sind Flavonoide heute von großem Interesse, da ihnen eine bedeutende gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen wird. Hier stehen vor allem die anti-invasiven und anti-metastatischen Eigenschaften im Vordergrund (Weng und Yen 2012). Aber auch der Anthocyanidin-vermittelte Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird weiterhin diskutiert (zusammengefasst in Wallace 2011; Drossard *et al.* 2012). Industriell werden Anthocyane unter anderem als natürliche Farbstoffe in der Lebensmittelindustrie verwendet. Aufgrund der leicht identifizierbaren Mutantenphänotypen hat sich die Flavonoidbiosynthese als ein weitverbreitetes Modellsystem für Untersuchungen der Genexpression und deren Regulation etabliert.

1.1.1. Die Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit wurde der Fokus vor allem auf die Flavonol- und Anthocyanbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) gelegt. Aufgrund der kurzen Generationszeit und des relativ kleinen (125 Mbp), vollständig sequenzierten Genoms ist *Arabidopsis thaliana* in der Pflanzenforschung ein nützliches Modellsystem. Im Folgenden soll die Flavonoidbiosynthese, im Besonderen der Flavonol- und Anthocyanzweig, in *Arabidopsis thaliana* beschrieben werden (siehe Abb. 1.2.).

In *Arabidopsis thaliana* werden innerhalb der Flavonoidbiosynthese drei phenolische Stoffklassen synthetisiert, die farblosen Flavonole, die roten bis violetten Anthocyane und die braunen Proanthocyanidine (im Weiteren als PAs bezeichnet). Grundsätzlich erfolgt die Biosynthese der Flavonole und Anthocyane in epidermalen Gewebeschichten an der Innenseite des rauhen endoplasmatischen

Retikulums (Winkel-Shirley 2001). Im Gegensatz dazu werden im Samen Flavonole und PAs in den äußeren bzw. inneren Integumenten der Samenschale gebildet (Mol *et al.* 1998; Debeaujon, I. *et al.* 2003). Für die Flavonolsynthese wird für die entsprechenden Enzyme eine Anordnung in Multiproteinkomplexen, die ein *metabolic channeling* ermöglichen, postuliert (Winkel-Shirley 1999; Jorgensen *et al.* 2005). So konnten für einige Enzyme der Flavonoidbiosynthese Proteininteraktionen gezeigt werden, die diese Hypothese unterstützen (Burbulis und Winkel-Shirley 1999). Grundsätzlich sind Flavonole, Anthocyane und Proanthocyanidine bis zu ihrer Einlagerung in die Vakuole instabil und besitzen keine bisher bekannte funktionelle Aktivität (Winkel-Shirley 2001).

Ausgehend vom Shikimatstoffwechselweg wird die aromatische Aminosäure Phenylalanin, die Ausgangsverbindung aller Flavonoide, gebildet. Diese wird im generellen Phenylpropanoidstoffwechsel desaminiert, hydroxyliert und durch Bindung von CoenzymA (CoA) zu einem aktivierten C₆-C₃-Zimtsäurederivat umgesetzt. Die drei initialen Schritte des Phenylpropanoidstoffwechsels werden durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), die Zimtsäure-4-Hydroxylase (*cinnamate 4-hydroxylase*, C4H) und die 4-Coumarat:CoA-Ligase (*4-coumaroyl CoA-ligase*, 4CL) katalysiert. Diese Syntheseschritte liefern die Substrate für alle nachfolgenden Stoffwechselwege und die entstehenden Metabolite, wie z.B. die Flavonoide, Coumarine, Stilbene, Aurone und Lignine dar (zusammengefasst in Vogt 2010).

Die Chalkon-Synthase (CHS) stellt hier den Übergang zwischen generellem Phenylpropanoidstoffwechsel und der Flavonoidbiosynthese dar. Das Enzym katalysiert die Synthese des zweiten aromatischen Rings (B-Ring) aus drei Molekülen Malonyl-CoA zu Tetrahydroxychalkon. Der für die Flavonoide typische C₆-C₃-C₆-Heterozyklus wird anschließend durch die Isomerisierung zum Naringenin durch die Chalkon-Flavanon-Isomerase (CHI) etabliert. Durch Hydroxylierungsreaktionen an der Position 3 und an der Position 3' des Heterozyklus durch die Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) und der Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) entstehen die Zwischenprodukte Dihydrokämpferol und Dihydroquercitin (Britsch *et al.* 1981). Diese Dihydroflavonol-Intermediate können sowohl zur Synthese von Flavonolen auf der einen Seite als auch zur Synthese von Anthocyanen und PAs auf der anderen Seite führen. Bis heute werden die Syntheseschritte bis einschließlich F3H und

F3'H häufig als „frühe Syntheseschritte“ und die weiteren als „späte Syntheseschritte“ bezeichnet. Durch die Flavonol-Synthase1 (FLS1) werden Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin zu Kämpferol und Quercetin umgesetzt (Forkmann *et al.* 1986). Durch verschiedene Glykosyltransferasen werden diese weiter zu Flavonolglykosiden umgesetzt, die als Endprodukte in die Vakuolen der Pflanzenzellen transportiert werden (Jones *et al.* 2003; Tohge *et al.* 2005; Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2007, 2008; Stracke, R. *et al.* 2010).

Durch die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) Aktivität werden Flavanone zu Flavan-3,4-diolen (Leucoanthocyanidine - Leucocyanidin und Leucopelargonidin) reduziert, die wiederum durch die Leucoanthocyanidin-Dioxygenase (LDOX) zu 3-OH-Anthocyanidinen (Cyanidin und Pelargonidin) oxidiert werden. In *Arabidopsis thaliana* stellen diese Intermediate eine weitere Abzweigung innerhalb der Flavonoidbiosynthese dar, indem diese als Substrate für die Anthocyan- oder PA-Biosynthese eingesetzt werden kann (hier stellt nur Cyanidin das Substrat für die die PA-Biosynthese dar). Anthocyanidine verbleiben in der pflanzlichen Zelle als Monomere und werden in weiteren Kaskaden durch Glykosylierungen, Methylierungen und andere Acylierungen modifiziert und anschließend als Anthocyane bezeichnet (Bowles *et al.* 2005; Luo *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2009; Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2012). Für die Synthese der polymeren PAs wird der Heterozyklus durch die Anthocyanidin-Reductase (ANR), welche vom *BANYULS*-Gen (*BAN*) kodiert wird, zu Flavan-3-olen reduziert. Diese Monomere werden anschließend zu den PAs polymerisiert (Xie *et al.* 2003). Die genauen Kondensationsschritte der Monomere zu PA-Polymeren ist bis heute nicht gänzlich verstanden (Zhao *et al.* 2010).

Loss-of-function Mutationen in den in einfacher Kopie vorliegenden Strukturgenen können einen Effekt auf die Anthocyanbiosynthese ausüben und zeigen oft ein Ausbleiben oder eine Reduktion der PA-Pigmente. Dieses führt meist zu einem *transparent testa (tt)* oder *tannin deficient seed (tds)* Phänotyp. Bis heute sind 18 *tt*- bzw. *tds*-Loci beschrieben worden (zusammengefasst in Lepiniec *et al.* 2006). In einigen Fällen hat die unterschiedliche Nomenklatur bisweilen zu Doppelbenennungen geführt. So ist zum Beispiel der *ldox*-Lokus als *tt11* und *tt18* (Debeaujon, I. *et al.* 2000; Shikazono *et al.* 2003), sowie als *tds4* (Abrahams *et al.* 2003) benannt worden. Bis heute sind eine Reihe von weiteren *tt*- und *tds*-Mutanten isoliert worden, für die die eindeutige Zuordnung zu einem bekannten

oder neuen *tt*-Lokus noch nicht erfolgt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter anderem die Mutation im *tt17*-Lokus identifiziert und *tt17* als ein weiteres *ldox*-Allel charakterisiert werden (Appelhagen, I., Jahns, O. *et al.* 2011).

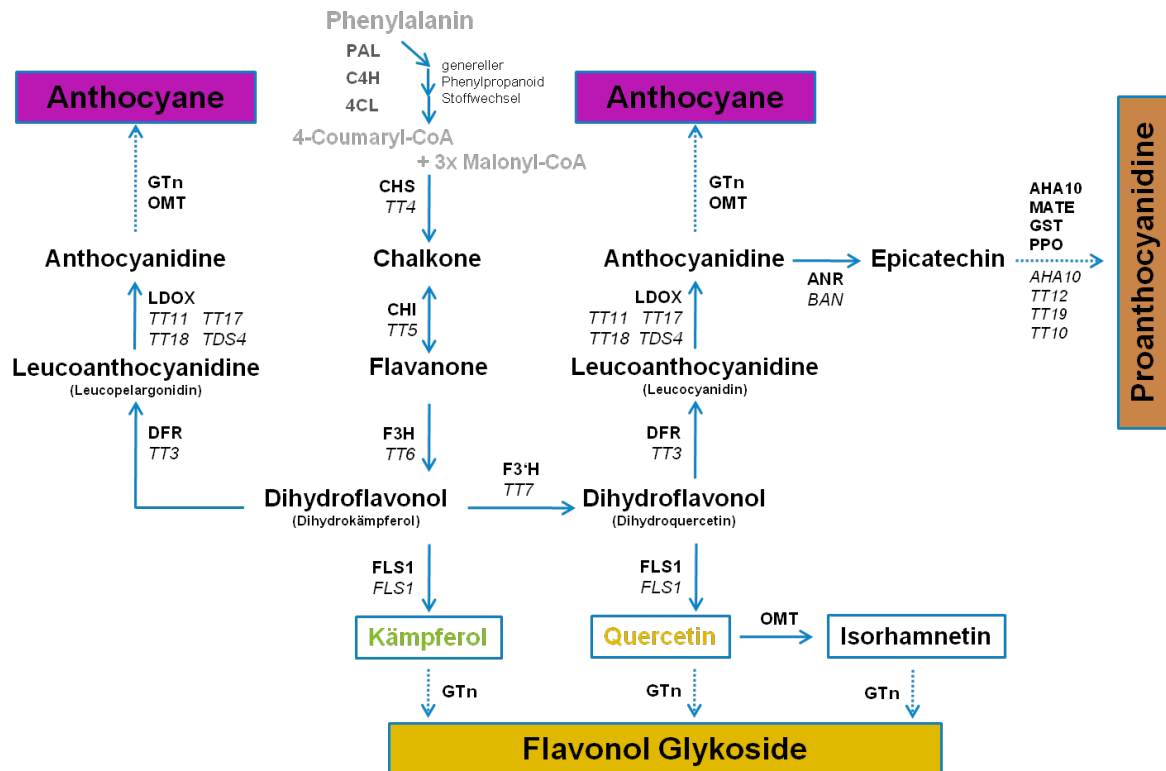


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Die wichtigsten Intermediate und beteiligte Enzyme durch Abkürzung sind schwarz gekennzeichnet. Die drei Flavonoidklassen sind farblich hinterlegt. Flavonol Glykoside sind in gelb, Anthocyanine in violett und PAs in braun dargestellt. Intermediate und Enzyme des generellen Phenylpropanoidstoffwechsels sind zur Abkürzung in grau gekennzeichnet. Chalkon-Synthase, CHS; Chalkon-Isomerase, CHI; Flavanon-3-Hydroxylase, F3H; Flavonoid-3'-Hydroxylase, F3'H; Flavonol-Synthase1, FLS1; Dihydroflavonol-4-Reduktase, DFR; Leucoanthocyanidin-Dioxygenase, LDOX; Anthocyanidin-Reduktase, ANR; UDP-Glykosyltransferasen, GTn; O-Methyltransferase, OMT. Kodierende Gene sind kursiv dargestellt. *BANYULS*, *BAN*; *TRANSPARENT TESTA*, *TT*.

1.2. Regulation der Flavonoidbiosynthese

Die Flavonoidbiosynthese wird hauptsächlich auf Ebene der Transkription reguliert (Weisshaar und Jenkins 1998). So wird eine gezielte gewebes- und entwicklungspezifische Synthese der Flavonoide, aber auch die Reaktion auf externe Stimuli wie etwa UV-Strahlung, Trockenheit, unterschiedliche Temperaturen oder osmotische Stresse gewährleistet (Mol *et al.* 1998; Koes *et al.* 2005). Von entscheidender Bedeutung ist hier die Initiation der Transkription, welche durch zahlreiche, an bestimmte Abschnitte der DNA bindende Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Die im Promotorbereich eines Gens gebundenen Transkriptionsfaktoren treten dabei mit der DNA als auch untereinander in Wechselwirkung. Die von den Faktoren sequenzspezifisch gebundenen DNA-Bereiche werden als *cis*-regulatorische Elemente bezeichnet (McKnight und Tjian 1986; Dynan 1989; Johnson und McKnight 1989). In den Promotoren Protein-kodierender Gene finden sich häufig eine Reihe verschiedener *cis*-Elemente, wobei eine Kombination dieser Elemente die Spezifität des Promotors bestimmt. Für die Identifizierung von *cis*-regulatorischen Elementen wurde zum Teil auch die Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* als Modellsystem verwendet. So wurde mit Hilfe von Kotransfektionsstudien putative *cis*-Elemente im *CHS* Promotor charakterisiert. Von diesen Elementen sind das *ACGT Containing Element* (ACE) und das *MYB Recognition Element* (MRE) an der Lichtinduktion des Promotors beteiligt (Hartmann, U. *et al.* 2005). In einer weiteren Untersuchung konnte das MRE und das *R Recognition Element* (RRE) im Anthocyan-spezifischen Promotor des *DFR* Gens identifiziert werden (Düttmann 2008).

Es wird vermutet, dass ca. 1700 (6 %) der annotierten Gene in *Arabidopsis thaliana* für Transkriptionsfaktoren kodieren (TAIR10, <http://arabidopsis.org>). Aufgrund ihrer Sequenz-spezifischen DNA-Bindung werden sie verschiedenen Familien zugeordnet. Innerhalb dieser Transkriptionsfaktorfamilien sind hauptsächlich WD40-, bHLH- und R2R3-MYB-Proteine an der Regulation der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* beteiligt (Übersicht in Feller *et al.* 2011). Die bHLH- und R2R3-MYB-Faktoren zählen in *Arabidopsis thaliana* zu den größten Gruppen von Transkriptionsfaktoren (Heim *et al.* 2003; Dubos *et al.* 2010).

1.2.1. Die bHLH-Transkriptionsfaktorfamilie

Basische Helix-Schleife-Helix (bHLH) Proteine stellen eine große, ubiquitäre Proteinfamilie in Eukaryoten (Berben *et al.* 1990) dar. Dabei stellt die bHLH Domäne ein hoch konserviertes Aminosäure-Motiv dar, welches die Klasse der bHLH-Transkriptionsfaktoren definiert. Ursprünglich wurde sie in tierischen DNA-Bindeproteinen identifiziert (Murre *et al.* 1989), und folglich als bHLH Domäne bezeichnet. Seitdem konnten von den im *Arabidopsis thaliana* Genom vorhandenen 158 bHLH Proteine ca. 30% funktionell charakterisiert werden (Toledo-Ortiz *et al.* 2003; Pires und Dolan 2010). Sie sind vor allem an der Regulation des Sekundärmetabolismus, der Zelldifferenzierung und an der Reaktion auf Umwelteinflüsse beteiligt (Ramsay und Glover 2005; Castillon *et al.* 2007). Die hoch konservierte bHLH Domäne besteht aus ca. 60 Aminosäuren, die in zwei unterschiedliche funktionelle Regionen aufgeteilt werden. Der basische N-Terminus der Domäne beinhaltet 13-17 hauptsächlich basische Aminosäuren und kann an das Hexanukleotid E-Box DNA-Bindemotiv (CANNTG, N = beliebige Nukleinsäure) binden. bHLH-Domänen mit mindestens fünf basischen Aminosäuren und dem konservierten HER-Motif (His5-Glu9-Arg13) besitzen die Fähigkeit DNA zu binden (Atchley und Fitch 1997; Massari und Murre 2000; Toledo-Ortiz *et al.* 2003). Die HLH-Region (C-Terminus) umfasst zwei amphipatische α -Helices, welche durch eine Aminosäureschleife variabler Länge getrennt sind (Murre *et al.* 1989). Proteine mit HLH-Motif sind zum Teil an der Formierung von Homo- und Heterodimeren mit anderen bHLH Proteinen beteiligt, welche eine Voraussetzung für die Erkennung der DNA darstellt und zur DNA-Bindenspezifität beiträgt.

Die Einteilung der bHLH Proteine basierte zum Teil auf unterschiedlichen Charakteristika. Ursprünglich wurden tierische bHLH Proteine aufgrund ihrer Gewebslokalisation, Dimerisierungsfähigkeit und DNA-Bindenspezifität klassifiziert (Murre *et al.* 1994). In Pflanzen basierte die phylogenetische Einteilung der bHLH Proteine vorrangig auf der Genomsequenz von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* (Buck und Atchley 2003; Heim *et al.* 2003; Toledo-Ortiz *et al.* 2003; Li, X. *et al.* 2006). In einer aktuellen Arbeit wurden mehr als 500 pflanzliche bHLH-Proteine aufgrund ihrer evolutiönären Verwandtschaft in 26 Untergruppen phylogenetisch aufgeteilt (Pires und Dolan 2010).

Mitglieder einer Verwandtschaftsgruppe (Untergruppe) sind oft an den gleichen biologischen Prozessen beteiligt. Zu den bHLH Proteinen mit Relevanz für diese Arbeit gehören Mitglieder der Untergruppe IIIf (bHLH42/TRANSPARENT TESTA8, TT8; bHLH1/GLABRA3, GL3; bHLH2/ENHANCER OF GLABRA3, EGL3 und bHLH12/MYC1, siehe Abb. 1.3.). Die Mitglieder dieser Gruppe sind Orthologe der R-ähnlichen Transkriptionsfaktoren aus *Zea mays*. Die Faktoren TT8 und EGL3 sind funktionell redundant und stellen Regulatoren der Anthocyanbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* dar (Nesi *et al.* 2000; Zhang, F. *et al.* 2003). Gleichzeitig sind sie auch Transkriptionsfaktoren in der PA-Biosynthese (TT8), der Trichomentwicklung (GL3, EGL3 und MYC1) und der Synthese von pektinartigen Kohlenhydraten in der Samenschale (TT8 und EGL3) (Nesi *et al.* 2000; Zhang, F. *et al.* 2003; Baudry *et al.* 2004; Zimmermann, I. M. *et al.* 2004). Die Regulation dieser Prozesse erfolgt zusammen mit R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) in MBW-Komplexen.

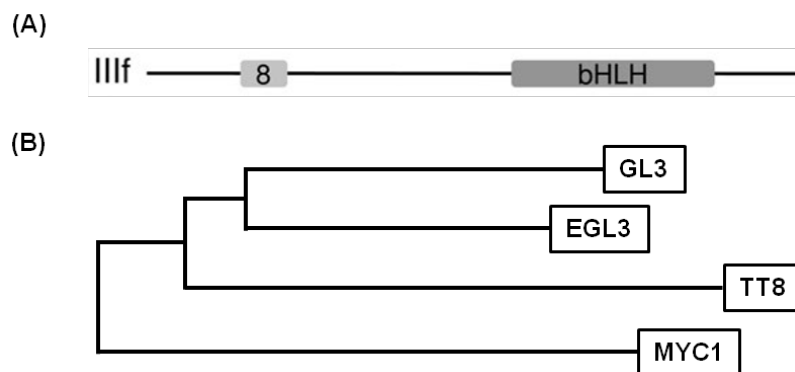


Abbildung 1.3. Die Untergruppe IIIf der bHLH Proteine in *Arabidopsis thaliana*. (A) Schematische Darstellung der bHLH Domäne und des konservierten DNA-Motivs der Untergruppe IIIf bHLH Proteine (modifiziert nach (Pires und Dolan 2010)). (B) Phylogenetische Darstellung der Mitglieder der Untergruppe IIIf aus *Arabidopsis thaliana* (modifiziert nach Heim *et al.* 2003).

1.2.2. Die MYB-Transkriptionsfaktorfamilie

Als erstes Gen mit MYB-Domäne wurde *v-myb* aus dem tumorverursachendem Virus (*Avian Myoblastosis Virus, AMV*) in Hühnern beschrieben (Klempnauer *et al.* 1982). Neben der Charakterisierung des menschlichen c-MYB Proto-Onkogens wurden MYB-Proteine in allen bis heute untersuchten Eukaryoten identifiziert (Lipsick 1996; Kranz *et al.* 2000). Vor mehr als 20 Jahren wurde in *Zea mays* das erste MYB-Transkriptionsfaktor kodierende Gen *COLORED1 (C1)* entdeckt. Der Transkriptionsfaktor ist in Mais an der Anthocyanbiosynthese in der äußeren Aleuronschicht des Korns beteiligt (Paz-Ares, J. *et al.* 1986; 1987). Das paraloge Protein *ZmPL* fungiert als Anthocyanbiosynthese-Regulator in der restlichen Pflanze (Martin und Paz-Ares 1997).

MYB Proteine werden anhand ihrer konservierten DNA-Bindedomäne, der MYB-Domäne, charakterisiert. Die Domäne besteht aus bis zu vier imperfekten Aminosäure *Repeats* (R) mit 51-53 hochkonservierten Aminosäuren, wobei jede drei α -Helices bildet. Die zweite bzw. dritte Helix der *Repeats* bilden eine Helix-Turn-Helix (HTH) Struktur mit drei charakteristischen Tryptophan Aminosäureresten. Diese bilden den hydrophoben Bereich in der HTH Tertiärstruktur (Ogata *et al.* 1996). Die dritte *Repeat*-Helix vermittelt die DNA-Bindung in der großen Furche der DNA-Doppelhelix (Jia *et al.* 2004) (siehe Abb.1.4.A.). Aufgrund der Ähnlichkeit zum MYB-Prototyp c-MYB werden die in den MYB-Proteinen vorhandenen *Repeats* ebenfalls als R1, R2 und R3 bezeichnet. Danach werden alle MYB-Faktoren anhand ihrer *Repeats* in unterschiedliche Klassen eingeteilt. In Pflanzen lassen sich Mitglieder dieser Klassen finden und stellen das Taxon mit der höchsten Diversität an MYB-Proteinen dar. Die größte Gruppe bilden hier die R2R3-MYB Proteine, von denen bis heute 126 Mitglieder in *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurden (Stracke, R *et al.* 2001; Dubos *et al.* 2010). Zahlreiche Mitglieder dieser Gruppe sind an der Regulation des Sekundärmetabolismus beteiligt (siehe Abb.1.4.B.). So bilden die Mitglieder der Untergruppe 7 (PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES; PFG1/MYB12, PFG2/MYB11 und PFG3/MYB111) Regulatoren der Flavonolglykosid-Biosynthese (Mehrtens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007, 2010). Die Regulation der Zielgene durch die PFGs erfolgt TTG1-unabhängig. Bis heute ist das Wissen über die Regulation der Flavonolbiosynthese in seiner Gesamtheit noch unvollständig und das Wissen über regulatorische Netzwerk der PFG-Transkriptionsfaktoren wird,

auch in der Zukunft, um weitere Zielgene erweitert werden. Neben der Regulation der Flavonol- wird auch die Anthocyan- und PA-Biosynthese durch R2R3-MYB Proteine kontrolliert. In vegetativem Gewebe wird die Akkumulation von Anthocyanen durch die Faktoren der Untergruppe 6 (MYB75/PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1, PAP1; MYB90/PAP2; MYB113 und MYB114) beeinflusst (Gonzalez *et al.* 2008). Das MYB-Protein MYB123 (TRANSPARENT TESTA2, TT2; Subgruppe 5) hingegen ist der PA-Regulator in der Samenschale von *Arabidopsis thaliana* (Nesi *et al.* 2001) (siehe Abb.1.4.B.). Die Regulation der Anthocyan-spezifischen Gene, historisch oft auch als „späte“ Gene der Flavonoidbiosynthese bezeichnet, erfolgt TTG1-abhängig in MBW-Komplexen. Neben der Funktion innerhalb der Flavonoidbiosynthese sind Mitglieder anderer Untergruppen an vielfältigen Stoffwechselprozessen beteiligt. So fungiert MYB0 (GLABRA, GL1) aus Untergruppe 15 als Regulator in der Differenzierung der Epidermiszellen und der Trichom- und Wurzelhaar-Bildung (Payne *et al.* 2000; Zhang, F. *et al.* 2003). Diese zellulären Prozesse werden ebenfalls TTG1-abhängig von MBW-Komplexen reguliert.

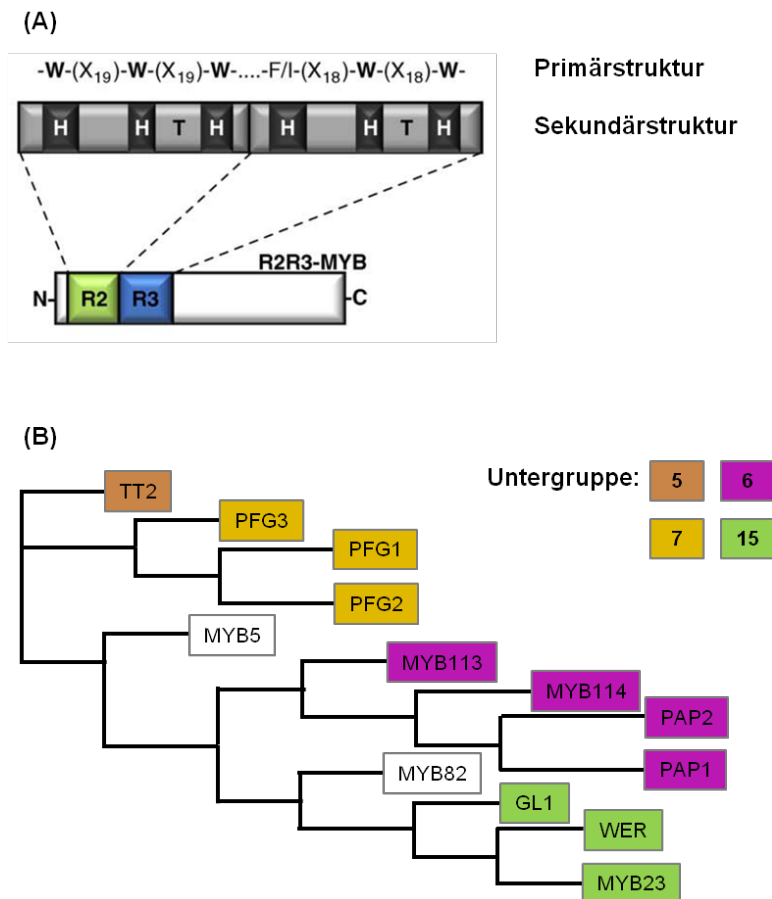


Abbildung 1.4. R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* mit Relevanz für die Flavonoidbiosynthese. (A) Schematische Darstellung der Struktur eines R2R3-MYB Proteins mit farblich markierten *Repeats* (R) und der Primär- und Sekundärstruktur. H, Helix; T, *Turn*; W, Tryptophan; X, Anzahl von Aminosäuren. (modifiziert nach (Dubos *et al.* 2010)). (B) Phylogenetische Darstellung einiger Mitglieder der R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. WER, WEREWOLF (MYB66). (modifiziert nach Dubos *et al.* 2010).

1.2.3. Die transkriptionelle Regulation der Flavonoidbiosynthes in *Arabidopsis thaliana*

Vor allem in *Zea mays* ist die Regulation der Flavonoidbiosynthesegene ausführlich untersucht worden (Singh *et al.* 1989; Ludwig und Wessler 1990; Consonni *et al.* 1993). So wurden kombinatorische Interaktionen für die MYB-Proteine der C1-Unterfamilie (C1, PL1 und P) zusammen mit bHLH-Proteinen der R/B-Familie (nach *ZmBOOSTER1* und *ZmRED1*), die in unterschiedlichen Organen räumlich und zeitlich koordiniert exprimiert werden, beschrieben (Paz-Ares, Javier *et al.* 1987; Chandler *et al.* 1989; Consonni *et al.* 1993; Neuffer *et al.* 1997).

Auch in *Arabidopsis thaliana* werden einige Schritte der Flavonoidbiosynthese durch die kombinatorische Wirkung von MBW-Komplexen reguliert. Innerhalb des MBW-Komplexes übernimmt jede einzelne Proteinklasse andere Aufgaben, wie zum Beispiel die DNA-Bindung, die Aktivierung der Expression der Zielgene oder die Stabilisierung des Komplexes. Es wird weiter vermutet, dass die Interaktion der Komplexpartner einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Komplexes an sich ausübt. So konnte gezeigt werden, dass die Protein-Protein-Interaktion von bHLH Proteinen und TTG1 notwendig für den Kernimport des TTG1 in *Arabidopsis thaliana* ist (Düttmann 2008). Durch *in vitro Pull-Down* Experimente wurde eine direkte Interaktion zwischen bHLH Proteinen der Untergruppe IIIf und R2R3-MYB Faktoren der Untergruppen 5 und 6 bestätigt (Melcher und Johnston 1995; Zimmermann, Ilona 2003).

In *Arabidopsis thaliana* konnten bis heute unterschiedliche MBW-Komplexe, die an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, identifiziert werden. So ist der MBW-Komplex aus PAP1/PAP2, EGL3/GL3/TT8 und TTG1 an der Regulation der Anthocyanbiosynthese im vegetativem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* beteiligt (Übersicht in Feller *et al.* 2011; Hichri *et al.* 2011).

Unter anderem kann durch abiotische Einflüsse wie Licht und unterschiedliche Nährstoffe die Aktivität bestimmter Promotoren gesteigert werden. Zum Beispiel spielen Zuckermoleküle im Stoffwechsel von Pflanzen eine wichtige Rolle. Sie üben unter anderem verschiedenste Funktionen als Botenstoffe, in der Regulation der Photosynthese aus, oder sind an der Mobilisierung anderer Nährstoffe oder an der Wachstumsstimulation beteiligt (Koch 1996; Smeekens, S. und Rook 1997; Smeekens, Sjef 1998). Durch unterschiedliche Arbeiten der letzten 20 Jahre konnte ein stimulierender Effekt von Zuckern auf die Anthocyanbiosynthese in verschiedensten Pflanzen gezeigt werden. Dieser Effekt wird häufig unter Laborbedingungen zur Induktion der Anthocyanbiosynthese genutzt. Zum Beispiel kommt es in sich entwickelnden Blüten von *Petunia hybrida* durch eine Saccharose-induzierte gesteigerte Expression von Strukturgenen der Anthocyanbiosynthese zur Akkumulation von Anthocyanen (Weiss 2000). In sich entwickelnden Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* kommt es nach Saccharose-Induktion vier bis fünf Tage nach Keimung zur Akkumulation von Anthocyanen in den Kotyledonen und Teilen des Hypokotyls (Kubasek *et al.* 1992). Ältere Pflanzen zeigen Anthocyan-Pigmente in den Blattstielen, den Blättern und dem

Stängel nach Stress-Induktion (Dixon und Paiva 1995). In 2005 konnte von Teng *et al.* gezeigt werden, dass Saccharose im Gegensatz zur Maltose oder Glukose die Akkumulation von Anthocyanen in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* am stärksten induzieren kann. Gleichzeitig konnte der mitverantwortlich Regulator der Saccharose-induzierten Synthese von Anthocyanen, PAP1 identifiziert werden (Teng *et al.* 2005). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Saccharose-induziert Synthese der Anthocyane durch MBW-Komplexe aus PAP1/PAP2, EGL3/TT8 und TTG1 reguliert wird (siehe Abb. 1.5., Gonzalez *et al.* 2008; Appelhagen, I., Jahns, O. *et al.* 2011)

Ein weiterer MBW-Komplex, der als Regulator der PA-Biosynthese fungiert, besteht aus TT2, TT8 und TTG1. Diese Komplex aktiviert die Expression einiger verifizierter Strukturgene, wie *DFR*, *LDOX*, *BAN* und *TT12*, welches für ein Transportprotein, das verantwortlich für die Vakuolenlokalisierung von PAs ist, kodiert (siehe Abb. 1.5.; Übersicht in Feller *et al.* 2011).

Aber auch in anderen Stoffwechselprozessen spielen MBW-Komplexe eine entscheidende Rolle. So hat die Interaktion von GL1, GL3/EGL3/TT8 und TTG1 einen Einfluss auf die Kontrolle der Trichomentwicklung in *Arabidopsis thaliana* (Payne *et al.* 2000; Zhang, F. *et al.* 2003; Maes *et al.* 2008). Innerhalb der Komplexpartner haben die einzelnen Proteinklassen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zielgen-Spezifität. Der Phänotyp des *ttg1* Null-Allels bestätigt die Funktion von TTG1 in den unterschiedlichsten physiologischen Prozessen (zusammengefasst in Ramsay und Glover 2005). Auch die bHLH-Interaktionsproteine zeigen untereinander eine große regulatorische Redundanz (Zhang, F. *et al.* 2003). So scheint es, dass die MYB-Proteine die verantwortlichen Faktoren für die Zielgen-Spezifität darstellen. Wie schon weiter oben erwähnt sind PAP1 und PAP2 Anthocyan-spezifische Faktoren, TT2 der PA-spezifisch Faktor und GL1 und WER an der Ausbildung der Trichome und Wurzelhaare beteiligt (Zhang, F. *et al.* 2003; Baudry *et al.* 2004). Die Funktion der Flavonoid-spezifischen MBW-Komplexe scheint nicht ausschließlich auf die Regulation von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese beschränkt zu sein. Durch *PAP1 gain-of-function* Experimente konnten zum Teil auch Zielgene außerhalb der Flavonoidbiosynthese identifiziert werden (Tohge *et al.* 2005). Es gibt aber auch Hinweise auf eine MBW-Komplex Regulation die einen Einfluss auf die eigene Genexpression ausübt. Zum Beispiel ist TT8 in der Lage zusammen

mit TTG1 und PAP1/TT2 die eigene Regulation mittels *feedback* zu kontrollieren (Tohge *et al.* 2005; Baudry *et al.* 2006).

Die Flavonolbiosynthese hingegen wird unabhängig von TTG1 transkriptionell reguliert. Hier sind die R2R3-MYB Faktoren PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDE (PFG1/MYB12, PFG2/MYB11 und PFG3/MYB111) verantwortlich für die Flavonol-spezifische Expression der Strukturgene *CHS*, *CHI*, *F3H* und *FLS1* (siehe Abb. 1.5., Mehrrens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007). Diese vier Gene können Ko-reguliert werden (Hartmann, U. *et al.* 2005) und werden für die Synthese der Flavonolglykon Grundstruktur benötigt. Ähnlich wie das orthologe Protein P aus *Zea mays* benötigen die PFGs keine bHLH Interaktionspartner und es wird vermutet, dass sie verwandte *cis*-Elemente in den Promotoren ihrer Zielgene binden können (Mehrrens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007). Mit Hilfe von *pfg loss-of-function* konnte die Akkumulation bestimmter Flavonolglykoside mit der Expression der unterschiedlichen PFGs korreliert werden (Stracke, R. *et al.* 2007). Diese Experimente geben Hinweise auf eine direkte Regulation von Flavonol-spezifischen Glykosyltransferasen (GTn), welche an der Biosynthese der Flavonolglykosid Endprodukte beteiligt sind. In *Arabidopsis thaliana* wurden mehrere Flavonol-spezifische GTn identifiziert und mit Hilfe von *loss-of-function* Mutanten charakterisiert (Jones *et al.* 2003; Tohge *et al.* 2005; Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2007, 2008). Bis heute ist die Flavonolglykosid-Biosynthese in ihrer Vollständigkeit nicht verstanden. In dieser Arbeit konnte unter anderem die Aktivierung von Promotoren der UDP-abhängigen Glykosyltransferasen (UGT)78D1, UGT78D4 und UGT89C1 durch PFG Transkriptionsfaktoren gezeigt und somit das Wissen über regulatorische Netzwerke der PFGs erweitert werden (Stracke, R. *et al.* 2010).

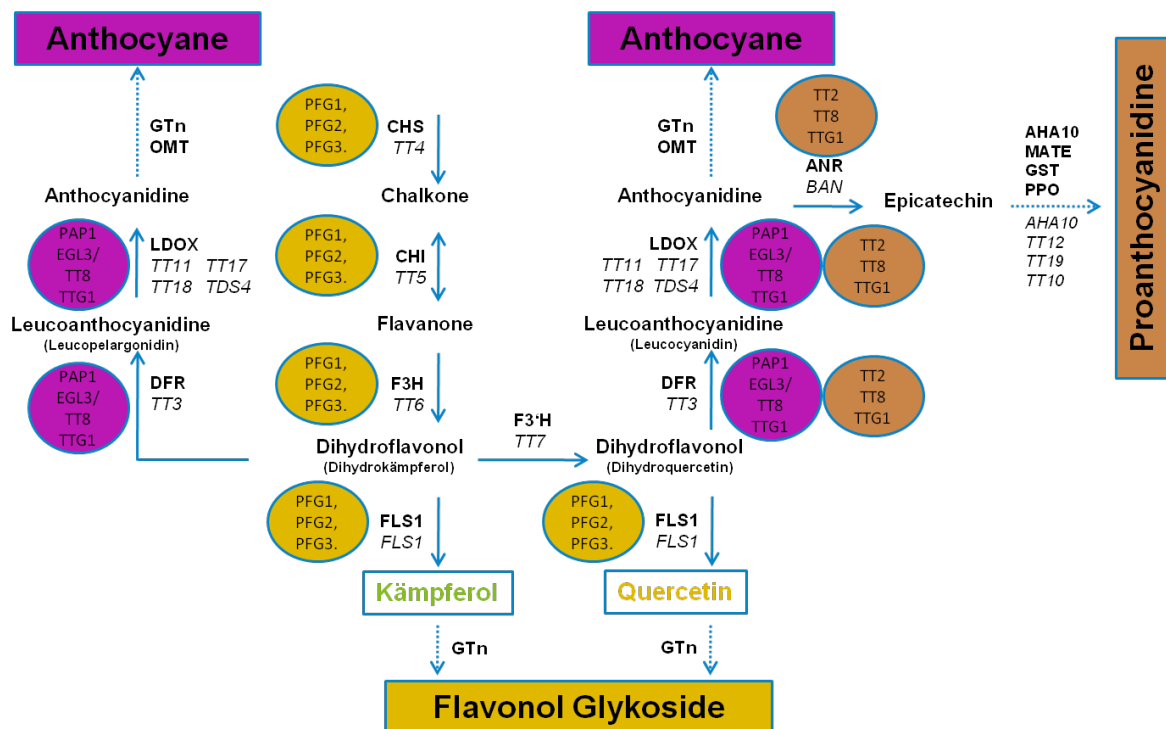


Abbildung 1.5. Regulation der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Darstellung und Abkürzungen wie in Abbildung 1.2. Bekannte Regulatoren sind den Endprodukten, deren Biosynthese sie hauptsächlich beeinflussen, durch entsprechende Farbkodierung zugeordnet.

1.3. Die Chromatin Immunopräzipitation

Viele biologische Prozesse beruhen auf einer koordinierten Genexpression. Dabei vermitteln die entstehenden Genprodukte zusammen die zellulären Funktionen. Um verschiedenste Entwicklungsprozesse oder unterschiedliche Einflüsse von Umweltfaktoren auf Pflanzen besser zu verstehen, ist es unbedingt notwendig die Regulation der Genexpression in ihrer Vollständigkeit zu begreifen. Dieses wird vor allem deutlich an der Tatsache das ca. 1700 verschiedene Transkriptionsfaktoren (6 % der annotierten Gene) im *Arabidopsis thaliana* Genom kodiert sind (TAIR10, <http://arabidopsis.org>). Unter anderem hat sich aus dieser Notwendigkeit vor mehr als 20 Jahren die Methode der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) entwickelt (Orlando *et al.* 1997; Kuo und Allis 1999). Seitdem hat sich die ChIP als mehrfach angewandte Methode zur Analyse von *in vivo* Transkriptionsfaktor Bindestellen (Weinmann und Farnham 2002; Kaufmann

et al. 2009; Ouyang *et al.* 2011), Histonen (Spencer *et al.* 2003) und anderer Proteine (Ren *et al.* 2000) in Pflanzen und anderen Organismen entwickelt. Ein großer Vorteil der ChIP ist die Kombinierbarkeit mit mehreren *down stream* Analysen, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der quantitativen Reversen-Transkriptase PCR (qRT-PCR), sowie der *Southern Blot* Analyse zur Analyse von bekannten Ziel-Bindestellen (Orlando *et al.* 1997; Wells und Farnham 2002). Microarrays (ChIP-chip) und Sequenzierung (ChIP-seq) werden heute zur Identifizierung von genomweiten Ziel-DNA-Bindestellen eingesetzt (Morohashi und Grotewold 2009; Kaufmann *et al.* 2010; Ouyang *et al.* 2011). Durch diese vielseitige Einsetzbarkeit erhöht sich das Potential der Methode an sich.

Die methodische Herangehensweise der ChIP beinhaltet die chemische Fixierung der Protein-DNA-Interaktionen durch Formaldehyd (Kuo und Allis 1999), gefolgt von einer Ultraschallbehandlung zur Generierung von kleineren DNA-Abschnitten. Durch die anschließende Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern können die Protein-gebundenen DNA-Abschnitte angereichert werden. Die Fixierung zwischen den Proteinen und der DNA wird gelöst und die angereicherten DNA-Fragmente können anschließend mittels unterschiedlicher *down stream* Ansätze analysiert werden (siehe Abb. 1.6.).

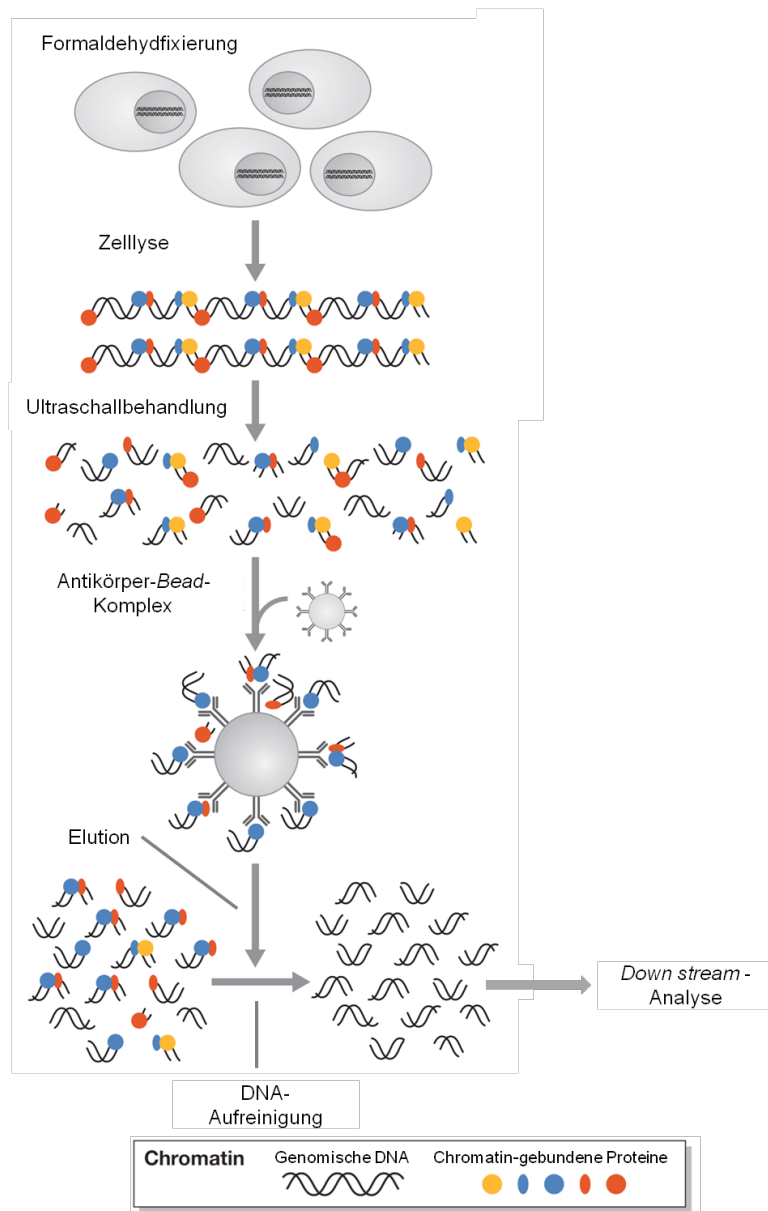


Abbildung 1.6. Schematische Darstellung des methodischen Ablaufs der Chromatin Immunopräzipitation. (modifiziert nach (Massie und Mills 2008).

Als einer der entscheidenden Parameter gilt die Auswahl des richtigen Antikörpers. So muss für jeden Antikörper die Fähigkeit der spezifischen Bindefähigkeit an das jeweilige Protein im Voraus analysiert werden. Zusätzlich ist es wichtig, die Aktivität des Antikörpers in den zu verwendenden Puffern zur Immunopräzipitation zu testen. Gleichzeitig sollte bedacht werden polyklonale Antikörper gegenüber monoklonalen zu bevorzugen um einer Maskierung der zu erkennenden Epitope zuvorzukommen. Der Antikörper-Titer zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration für seine maximale Bindefähigkeit bedarf auch sorgfältiger Vorarbeiten (zusammengefasst in Das *et al.* 2004; Haring *et al.* 2007).

Durch die Notwendigkeit einen spezifischen Antikörper für jedes zu untersuchende Protein zu verwenden haben sich alternative Strategien entwickelt. So sind mehrfach Tags in Fusion mit dem zu untersuchenden Protein verwendet worden, da sie die Möglichkeit einer universellen Anwendung bieten. Das *Green Flourescent Protein* (GFP) ist bis heute mehrfach als Protein-Tag in ChIP Experimenten verwendet worden (de Folter *et al.* 2007; Morohashi *et al.* 2007). Ein weiterer Vorteil des GFP als Protein-Tag ist die kommerzielle Verfügbarkeit von ChIP-getesteten Antikörpern. Da die ChIP eine Reihe von kritischen Parametern beinhaltet muss für die erfolgreiche Durchführung jeder einzelne Versuchsschritt optimiert werden. In einem ersten Schritt werden die Protein-DNA Interaktionen chemisch mit Formaldehyd fixiert (Orlando *et al.* 1997). Ein großer Vorteil bei der Verwendung von Formaldehyd besteht darin, dass Verbindungen mit einer Entfernung von ca. 2 Angström ausgebildet werden und die Fixierung wieder gelöst werden kann (Dedon *et al.* 1991). Bei der Fixierung reagiert das Formaldehyd mit Amino- und Iminogruppen (z.B. die Seitenketten von Lysin und Arginin) von Proteinen und Nukleinsäuren (z.B. Cytosin) unter Formierung einer Schiff-Base (McGhee und von Hippel 1975a). Dieses Intermediat reagiert in einer zweiten Reaktion mit einer weiteren Aminogruppe und kondensiert (McGhee und von Hippel 1975b). Die Formaldehyd-Fixierung sollte für jedes pflanzliche Ausgangsmaterial optimiert werden, da auf der einen Seite eine zu geringe Fixierung zu einer ineffizienten Verbindung der DNA-gebundenen Proteine führt, auf der anderen Seite eine Überfixierung die spätere Immunopräzipitation stören kann. Der genaue Grund einer geringeren Fähigkeit zur Immunopräzipitation nach Formaldehyd-Überfixierung ist bis heute nicht verstanden. Es wird aber vermutet, dass Formaldehyd Protein-Entfaltung begünstigt und es somit zum Verlust der Antigen-Bindestellen kommen kann (Das *et al.* 2004). Der nächste kritische Schritt ist die Ultraschallbehandlung des isolierten Chromatins. Hier wird vor allem durch das Scheeren des Chromatins in kleinere DNA-Fragmente die Auflösung der ChIP festgelegt. In der publizierten Literatur gibt es keine eindeutigen Aussagen zu den passenden Fragmentgrößen. Sie variieren in den Angaben von 100-500 bp (Das *et al.* 2004), 250-750 bp (Haring *et al.* 2007) und 200-1200 bp (Kaufmann *et al.* 2010). Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden zur Fragmentierung des Chromatins. Zum einen wird die Ultraschallbehandlung (Sonifizierung) oder ein Verdau mit *Micrococcus* Nuclease (MNase) verwendet, wobei beide Methoden

ihre Vorteile bezüglich der Präferenz für die Fragmentierung bestimmter chromosomaler Regionen besitzen (Dingwall *et al.* 1981; Reneker und Brotherton 1991). Wurde das Chromatin mit Formaldehyd fixiert, ist die Fragmentierung mit Ultraschall unbedingt dem Verdau durch die MNase vorzuziehen, da die Fixierung die Zugänglichkeit der MNase zum Chromatin erschwert (Bellard *et al.* 1989). Die optimalen Einstellungen für die Sonifizierung müssen für jedes Gerät und Ausgangsmaterial optimiert werden. Wichtig ist hier, auf die Kühlung (4-10°C) der Proben zu achten, da höhere Temperaturen zu einer Lösung der Fixierung führen können. Die Verwendung von Detergenzien in den Puffern zur Ultraschallbehandlung erhöht die Effizienz dieses Schrittes, führt aber oftmals auch zur Schaumbildung. Nach einer Schaumbildung ist das isolierte Chromatin für die ChIP meist unbrauchbar, da durch die hervorgerufene Oberflächenspannung des Schaums, die Proteinkonformation entfaltet werden kann (Clarkson *et al.* 1999).

Die anschließende Immunopräzipitation stellt den bedeutendsten Schritt der Methode dar. Der spezifische Antikörper bindet in diesem Schritt an die fixierten Protein-DNA Fragmente und wird dann als Komplex bei 4°C über Nacht immunopräzipitiert. Für die Etablierung der Methode werden häufig Antikörper gerichtet gegen eine invariante Domäne der Histone als vorbereitende Tests verwendet (Ng *et al.* 2006; Offermann *et al.* 2006). Wie bereits weiter oben erwähnt kommt der Auswahl des spezifischen Antikörpers einer besonderen Rolle zu Teil. Unterschiedliche Antikörper können sich zum Beispiel in ihrer Sensitivität gegenüber des fixierten Materials unterscheiden (Hanlon und Lieb 2004). Zur Anreicherung der Antigen-Antikörper-Komplexe aus dem Lysat wird häufig Protein A- oder G-Sepharose als Immunosorbant verwendet. Hier ist vor allem wichtig darauf zu achten welche Organismen als Wirte für die Herstellung der Antikörper fungiert haben. Antikörper aus Kaninchen habe eine gleiche Bindeaffinität für A und G Proteine, wohingegen Antikörper aus Ziege G Proteine bevorzugen (Spencer *et al.* 2003). Um unspezifische Bindungen zu vermeiden werden die Protein A- oder G-Agarosebeads häufig vorher mit Lachsperma abgesättigt und mit Niedrigsalz- oder Hochsalz-Puffer, Lithiumchloridpuffer und Tris-EDTA (TE) gewaschen (Spencer *et al.* 2003). Nach der Immunopräzipitation wird die Verbindung zwischen den Antikörper-Bead-Komplexen und den fixierten Protein-DNA-Verbindungen gelöst. Anschließend werden die präzipitierten Protein-DNA-

Komplexe durch Hitze und Proteinase-Verdau voneinander getrennt und angereicherte DNA kann isoliert werden und für weitere *down stream*-Analysen eingesetzt werden. Eine gängige Methode ist hierbei die zum Beispiel die PCR zur Analyse von Bindestellen der Transkriptionsfaktoren. Allerdings ist die Verwendung eingeschränkt, da hier nur bekannte Zielbindestellen analysiert werden können.

Um genomweite Bindestellen von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren werden heute ungerichtete Ansätze wie Microarrays (ChIP-chip) und direkte Sequenzierung (ChIP-seq) eingesetzt. ChIP-chip beinhaltet die Amplifikation von ChIP Proben, die Fluoreszenzmarkierung der ChIP-angereicherten DNA und die Hybridisierung an genomische Microarrays. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre *in vivo* Zielbindestellen werden bei dieser Methode als Regionen mit einer signifikant höheren Fluoreszenz im Vergleich zu einer Kontrolle definiert (zusammengefasst in Massie und Mills 2008). Im Gegensatz zur ChIP-chip Anwendung wird bei dem ChIP-seq Ansatz die angereicherte DNA zunächst begrenzt amplifiziert, zur Festlegung der Bindestellen-Auflösung die DNA-Fragmente grössenselektioniert und anschließend direkt sequenziert (Robertson *et al.* 2007). Die Definition der Bindestellen erfolgt anhand einer signifikanten Anreicherung von Sequenz-*Reads* gegenüber dem Hintergrundsignal am selben Locus. Der ChIP-seq Ansatz besitzt gegenüber der ChIP-chip Anwendung einige Vorteile. Die vorbereitenden Arbeitsschritte sind im Vergleich zu den Microarrays stark vereinfacht und es wird eine geringere DNA Ausgangskonzentration benötigt. Der größte Vorteil scheint im Hochdurchsatz der Illumina Technologie bei ChIP-seq begründet. Aber auch andere Plattformen wie die 454-Technologie werden zum Teil für die Sequenzierung eingesetzt. Aber auch der ChIP-seq Ansatz ist bis heute keine robuste Methode. So kann vor allem neben der korrekten Durchführung der ChIP die Sequenzierung aber auch die Analyse der Sequenz-*Reads* stark fehlerbehaftet sein. Die geringsten Fehler bei der Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung (Adapter-Ligation, PCR Amplifikation oder die Hybridisierung auf die *Flowcell*) kann sich zu einem Plattform-abhängigen systemischen Fehler im Datensatz mit 10 Millionen *Reads* und mehr entwickeln (Liu *et al.* 2010). Das *Mapping* der Sequenz-*Reads* auf ein Referenzgenom stellt eine weitere erhebliche Fehlerquelle dar. Die kurzen *Reads* können gerade in stark repetitiven Bereichen im Genom mehrfach an die Referenz

in silico angelagert werden. Durch dieses Phänomen ist es nicht unüblich, dass nur 50% oder weniger *Reads* auf ein Referenzgenom *gemappt* werden können (diskutiert in Liu *et al.* 2010). Um Zielbindestellen der untersuchten Transkriptionsfaktoren im Datensatz zu identifizieren wird sogenannte *Peak Calling* Software verwendet. Die *Peak-calling* Algorithmen suchen nach signifikant angereicherten Sequenz-*Reads*, die folglich als Transkriptionsfaktorbindestellen angenommen werden. Unterschiedliche freie und kommerzielle *Peak-Caller* sind heute erhältlich die sich in ihrer Anwendung und Arbeitsweise zum Teil deutlich unterscheiden (Übersicht in Leleu *et al.* 2010; Rye *et al.* 2010; Feng *et al.* 2011).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in ihrer analytischen Qualität eingesetzt und von folgenden, soweit nicht anders vermerkt, Firmen bezogen: Alfa Aesar (Karlsruhe), Amersham Biosciences (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRad (München), Biozym (Hameln), Fluka (Firma Sigma), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und VWR (Darmstadt).

Es wurden Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A (RNase A), DNaseI, ExoSAP-IT, Proteinase K, Lysozym und *Protease Inhibitor Cocktail* der Firmen Ambion (Austin, TX, USA), Applichem (Darmstadt), Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius), Invitrogen (Paisley, GBR), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisendorf), Stratagene (Heidelberg) und USB (Staufen) verwendet. Taq-DNA-Polymerase wurde von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und TaKaRa (Saint-Germain-en-Laye, FRA) bezogen. *PHUSION™ HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE* wurde von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und *Superscript™II RNase H Reverse Transkriptase* von Invitrogen (Paisley, GBR) verwendet. Weiterhin wurden Zellulase („Onozuka R-10“) und Mazerozym (R-10) der Firma Serva (Heidelberg) benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden von der Firma Abcam® (Cambridge, GBR) bezogen.

2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen für die Anzucht von Bakterien und Pflanzen, sowie Zellkulturmedien und Lösungen für die Chromatin Immunopräzipitation wurden unter Verwendung von MilliQ (Millipore Entsalzungsanlage, Millipore, Billerica, MA, USA) Wasser angesetzt. Die Sterilisierung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, durch Autoklavieren bzw. bei hitzelabilen Substanzen durch Filtration (Flaschenfilter, Millipore, Billerica, MA, USA, 0,22 µm Porengröße).

Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

2.1.2.1. Medien für die Anzucht von Bakterien

<u>LB-Medium:</u>	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		H ₂ O ad 1000 mL
<u>LB-Platten:</u>		siehe LB-Medium
	18 g	Bacto Agar / 1000 mL
<u>SOC-Medium:</u>	20 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	2,5 mL	1 M KCl
	3,6 g	Glukose
	5 mL	2 M MgCl ₂
		H ₂ O ad 1000 mL
		sterilfiltrieren
<u>TB I:</u>	23 g	KH ₂ PO ₄
	164 g	K ₂ HPO ₄
		H ₂ O ad 1000 mL
<u>TB II:</u>	12 g	Bacto Trypton
	24 g	Bacto Hefeextrakt
	4 mL	Glycerin
		H ₂ O ad 1000 mL
<u>TB-Medium:</u>		TBI und TBII im Verhältnis 1:10 mischen
<u>YEP-Medium:</u>	10 g	Bacto Pepton
	10 g	Bacto Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		H ₂ O ad 1000 mL
<u>YEP-Platten:</u>		siehe YEP-Medium
	15 g	Bacto Agar / 1000 mL

Für Selektionsmedien wurden die benötigten Antibiotika (Duchefa Biochemie, Haarlem, NL) unter sterilen Bedingungen, wenn nicht anders angegeben, zu folgenden Konzentrationen zugesetzt.

Ampicillin:	100 µg/mL
Kanamycin:	50 µg/mL
Carbenicillin:	100 µg/mL
Rifampicin:	100 µg/mL
Gentamycin:	40 µg/mL
Hygromycin B	20 mg/mL

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

<u>½ MS-Platten:</u>	2,15 g	Murashige-Skoog Basal Mixture Salze pH 5,7 mit KOH einstellen
	8 g	Pflanzenagar H ₂ O ad 1000 mL
<u>Germination Medium- Platten:</u>	2,15 g	Murashige-Skoog Basal Mixture Salze (Sigma)
	5 g	Saccharose
	4 g	Pflanzenagar
	0,5 mL	1000x <i>Gamborg's Vitamin Solution</i> (Sigma)
	0,5 g/L	MES-KOH (pH 5,7)

Für Selektionsplatten (½ MS-Platten) wurden 50 µg/mL Kanamycin zugesetzt. Vor dem Gebrauch der Selektionsplatten „*Germination Medium-Platten*“ wurde diesen 20 mg/mL HygromycinB und 100 mg/mL *Cefotaxim Sodium Salt* zugegeben.

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

<u>B5-Medium:</u>	3,2 g	<i>Gamborg's B5-Medium</i> (Sigma)
<u>(Kombrink und Hahlbrock</u>	1 mg	2,4-D-Dichlorphenoxyessigsäure
<u>1986)</u>	136 g	Saccharose
		pH 5,7 mit NaOH einstellen
		H ₂ O ad 1000 mL
		sterilfiltrieren
<u>Enzym-Lösung:</u>	1,4 g	Zellulase „Onozuka R-10“
	0,325 g	Mazerozym R-10
	240 mM	CaCl ₂ ad 120 mL
		Alle Komponenten werden in einem Becherglas über einen Zeitraum von einer Stunde gelöst und anschließend sterilfiltriert.
<u>MS-Medium:</u>	4,3 g	Murashige-Skoog Basal Mixture Salze
<u>(Murashige und Skoog</u>	1 mg	2,4-D-Dichlorphenoxyessigsäure
<u>1962)</u>	1 mL	1000x <i>Gamborg's Vitamin Solution</i> (Sigma)
	30 g	Haushaltszucker (Kölner, Köln)
		pH 5,7 mit KOH einstellen
		H ₂ O ad 1000 mL
		Die Leitfähigkeit des Medium sollte 6,7 mS/cm betragen. 40 mL Aliquots werden in einem Erlenmeyer-Kolben autoklaviert.

2.1.2.4. Medien für die *A. thaliana* Zellsuspensionskultur CK_UK

<u>AT-Medium:</u>	4,3 g	Murashige-Skoog Basal Mixture Salze
	1 mg	2,4-D-Dichlorphenoxyessigsäure
	4 mL	<i>Gamborg's B5-Medium</i> (Sigma)
	30 g	Saccharose
		pH 5,7 mit NaOH einstellen
		H ₂ O ad 1000 mL
		sterilfiltrieren

2.1.2.5. Medien für die *Nicotiana tabacum* Zellsuspensionskultur BY2

<u>MMM-Lösung:</u>	15 mM	MgCl
	0,1 %	(w/v) MES-KOH (pH 5,8)
	0,5 M	Mannitol
		sterilfiltrieren
<u>MS + Saccharose:</u>		MS Zellkulturmedium
	0,4 M	Saccharose
		sterilfiltrieren
<u>PEG-Lösung:</u>	40 %	(w/v) PEG 4000
	0,4 M	Mannitol
	0,1 M	Ca(NO ₃) ₂
		pH 8,0 - 9,0 (pH-Wert nach dem Autoklavieren auf einem physiologischem Wert)
<u>Verdaulösung:</u>	1 %	Zellulase „Onozuka RS“
	0,5 %	Mazerozym RS
	0,5 %	BSA
	0,01 %	β-Mercaptoethanol
	50 mM	CaCl ₂
	10 mM	Na-Acetat (pH5,8)
	0,25 M	Mannitol
		sterilfiltrieren
<u>Waschlösung:</u>		siehe Verdaulösung, jedoch ohne Zellulase „Onozuka RS“ und Mazerozym RS
		sterilfiltrieren
<u>W5-lösung:</u>	154 mM	NaCl
	125 mM	CaCl ₂
	5 mM	KCl
	5 mM	Glukose
		pH 5,8 - 6,0
		sterilfiltrieren

2.1.2.6. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

<u>Alkalische-Lyse Puffer 1:</u>	25 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glukose
<u>Alkalische-Lyse Puffer 2:</u>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
<u>Alkalische-Lyse Puffer 3:</u>	3 M	Na-Acetat pH 4,8
<u>240 mM CaCl₂:</u>	240 mmol	CaCl ₂ H ₂ O ad 1000 mL autoklavieren
<u>275 mM Ca(NO₃)₂:</u>	275 mmol	Ca(NO ₃) ₂ H ₂ O ad 1000 mL pH 6,0 mit 1 M KOH autoklavieren
<u>DEPC-Wasser:</u>	1,5 mL	Diethylpyrocarbonat (DEPC) H ₂ O ad 1000 mL ü/N Schütteln Inaktivierung des DEPC durch zweimaliges autoklavieren
<u>Edward-Extraktionspuffer:</u>	200 mM	Tris-HCl pH 7,5
	250 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
	0,5 %	(v/v) SDS
<u>Fixans:</u>	0,3 %	(v/v) Formaldehyd
	10 mM	MES-KOH (pH 5,6)
	300 mM	Mannitol
<u>GUS-Puffer:</u>	50 mL	100 mM Natriumphosphatpuffer
	200 µL	0,5 M EDTA pH 8,0
	100 µL	Triton X-100
	71 µL	β-Mercaptoethanol
		H ₂ O ad 100 mL

<u>100 mM Natriumphosphat-</u>	16 mL	0,2 M NaH ₂ PO ₄
<u>puffer:</u>	84 mL	0,2 M Na ₂ HPO ₄
	100 mL	H ₂ O
		pH-Wert beträgt 7,5
<u>Luziferase-</u>	100 mM	Kaliumphosphatpuffer
<u>Extraktionspuffer:</u>	1 mM	Dithiothreitol (DTT)
<u>Luziferase-Substratlösung:</u>	75,75 mL	2x Stocklösung
	33,3 mM	DTT
	270 µM	CoA Lithiumsalz
	470 µM	Luziferin
	570 µM	ATP
		ad 151,15 mL H ₂ O
		sterilfiltrieren, Aliquots bei -80°C lagern
<u>Lysozym-Lösung:</u>	10 mg/mL	Lysozym
	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	0,1 mM	EDTA
<u>4-MUG-Substratlösung:</u>	100 mL	GUS-Puffer
	0,07046 g	4-Methylumbelliferyl-β-D-glukuronid (4-MUG)
		sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
<u>NaP_i-Puffer:</u>	50 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen
<u>100 mM Natrium-</u>	39 mL	0,2 M NaH ₂ PO ₄
<u>phosphatpuffer:</u>	61 mL	0,2 M Na ₂ HPO ₄
		H ₂ O ad 100 mL
		(pH-Wert beträgt 7,0)
<u>PEG-Lösung:</u>	25 %	(w/v) PEG 6000
	100 mM	Ca(NO ₃) ₂
	450 mM	Mannitol
		pH 9,0 mit KOH einstellen
<u>5x Probenpuffer:</u>	20 mM	EDTA (pH 8,0)
	50 %	(v/v) Glycerin
	0,02 %	(w/v) Bromphenolblau
	0,02 %	(w/v) Xylencyanol

<u>5x Probenpuffer Xc:</u>	20 mM	EDTA (pH 8,0)
	50 %	(v/v) Glycerin
	0,02 %	(w/v) Xylencyanol
<u>Proteinase K-Lösung:</u>	10 mg/mL	Proteinase K in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
<u>RNase-Lösung:</u>	10 mg/mL	RNaseA 10 min auf 100°C erhitzen
<u>Saures Methanol:</u>	1 %	(v/v) HCl zu MeOH zugeben
<u>2x Stocklösung:</u>	40 mM	Tricine
	2,14 mM	Mg(CO ₃) · Mg(OH) ₂ · 5H ₂ O
	5,34 mM	Mg(SO ₄) ₂
	0,2 mM	EDTA
<u>50x TAE-Puffer:</u>	242 G	Tris
	57,1 mL	Eisessig
	40 mL	0,5 M EDTA (pH 8,0) H ₂ O ad 1000 mL
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA (TE 10/1)
	0,1 mM	EDTA (TE 10/0,1)
<u>TELT-Puffer:</u>	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	62,5 mM	EDTA
	2,5 mM	LiCl
	0,4 %	Triton X-100
<u>X-Gluc-Lösung:</u>	0,5 mg/mL	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Glukoron (X-Gluc) X-Gluc in 50 µL DMF lösen, ad 10 mL NaPi-Puffer

2.1.2.7. Puffer und Lösungen für die Chromatin Immunoprecipitation

<u>Glycin:</u>	2 M	Glycin H ₂ O ad 200 mL
<u>HEPES:</u>	0,5 M	HEPES H ₂ O ad 50 mL pH 7,4 mit 10 M NaOH einstellen
<u>Nukleus-Isolierungs-Puffer</u>	50 mM	0,5 M HEPES (NaOH) pH 7,4
<u>(NIB):</u>	5 mM	1 M MgCl ₂
	25 mM	5 M NaCl
	5 %	(w/v) Saccharose
	30 %	(v/v) Glycerin
	0,25 %	(v/v) Triton X-100
	0,1 %	(v/v) β-Mercaptoethanol
	0,1 %	(v/v) <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (Sigma)
<u>3x Wasch-Puffer:</u>	50 mM	0,5 M HEPES (NaOH) pH 7,4
	20 mM	1 M MgCl ₂
	100 mM	5 M NaCl
	40 %	(w/v) Saccharose
	40 %	(v/v) Glycerin
<u>1x Wasch-Puffer</u>	60 mL	3x Wasch-Puffer
	120 mL	H ₂ O
	450 μL	Triton X-100
	180 μL	(v/v) β-Mercaptoethanol
	180 μL	(v/v) <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (Sigma)
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris-HCl pH 7,4
	1 mM	EDTA pH 8,0
<u>IP-Verdünnungspuffer:</u>	80 mM	Tris-HCl pH 7,4
	230 mM	NaCl
	1,7 %	Nonidet P 40
	0,17 %	Deoxycholat
<u>RIPA:</u>	60 mL	IP-Verdünnungspuffer
	1 mL	10 % SDS
	39 mL	H ₂ O

<u>Glycin-Elutions-Puffer:</u>	0,1 M	Glycin pH 2,5
	0,5 M	NaCl
	0,05 %	(v/v) Tween 20
<u>37% Formaldehyd:</u>		37% Formaldehyd (Applichem)
<u>Proteinase K-Lösung:</u>	10 mg/mL	Proteinase K in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
<u>DTT-Lösung:</u>	1 M	DTT
<u>RNaseA-Lösung:</u>	10 mg/mL	RNaseA 10 min auf 100°C erhitzen
<u>Glycogen-Lösung:</u>	10 mg/mL	Glycogen in H ₂ O

2.1.3. Desoxyoligonukleotide (Primer)

Der Entwurf der verwendeten Desoxyoliginukleotide erfolgte mit Abschätzung der Schmelztemperatur T_m . Die Berechnung erfolgte gemäß der Formel

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

Wurden Desoxynukleotide mit Gateway[®] *attB*-Überhängen entworfen wurde auf die Abschätzung der T_m verzichtet. Die verwendeten Desoxynukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Paisley, GB) und Metabion (Martinsried) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Desoxyoligonukleotide sind in 5'- 3'-Orientierung angegeben:

8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Sequenzierprimer
B012	AGGAACCTCGAAGAGTATCT	EGL3
B023	AAGATGACAGGATGGGTAAGAA	DFR
B040	ATCATTTTCATATCATTTTGCCAA	DFR
B041	TATTTATAATGTCTTCACATCACA	DFR
B042	TCGTGCCAATCTCAAGGAC	EGL3
B043	GTACTACTTAGTATGCATGTCT	EGL3
B047	ATCAAACACACAAATTAAGG	PAP1
B054	TCAACGTCAGAAGCAAGAG	TT8

B055	GCATAGTATAGTTGGTGAATGAA	<i>TT8</i>
B078	TTCCCCTGTTTTAAGTTTATTT	<i>LDOX</i>
B079	AGAAAGACACAAACACATTATAAA	<i>LDOX</i>
B080	CAGAGAGAGCCTTGAAGAC	<i>LDOX</i>
B081	ATCCTGAAGAGAAGAGAGAT	<i>LDOX</i>
BTtG	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG	<i>pBT10 (GUS ORF)</i>
FM1	ATGGGAAGAGCGCCATGTTGC	<i>PFG1</i>
FM84	CGACGCATCGTTAACTTGGTGGTC	<i>pfg1 (Footprint)</i>
FW389	ATTCTAGAGCTAATACGTGCAAC	<i>18SrRNA</i>
GD113	ATGGAGGGTTCGTCCAAAG	<i>PAP1</i>
GD114	TCTCCATCGAAAAGACTCCAA	<i>PAP1</i>
HK46	GGAAGCCATCCATCTCTCAAGACG	<i>MYB12</i>
I041	CACTCCCAATCCAAAGATG	<i>LDOX</i>
K074	TGGGATAACATCATAGGATTTTCG	<i>18SrRNA</i>
K075	CGACTGTCCCTGTTAATCATTACTC	<i>18SrRNA</i>
nosT	GCAAGACCGCAACAGGATT	<i>Sequenzierprimer</i>
O133	CTGTCACTGTAATACGCTGC	<i>pDISCO</i>
O158	TAAAAGTGGGTGGGGAACAA	<i>DFR (ChIP-PCR)</i>
O159	GTACCGGTGGGTGAAATACG	<i>DFR (ChIP-PCR)</i>
O160	ATTTACCCACCGGTACAAC	<i>DFR (ChIP-PCR)</i>
O161	TGAATCGTTATTGAAGAAAACAGA	<i>DFR (ChIP-PCR)</i>
O168	attB1-AAGCTTCTCTCAATACAGAGTTTCAGTAAC	<i>UGT89C1 (Promotor)</i>
O169	attB2-CCATGGTTGATGTTTTTTCTTTCTTTCTGG	<i>UGT89C1 (Promotor)</i>
O171	attB1-GGGTCCATGGTTAGTGTCGTGAGTGAATGATAAGAAGG	<i>UGT78D1 (Promotor)</i>
O172	attB1-AAGCTTCAGTGATAACTTTCACTTCTG	<i>UGT73C6 (Promotor)</i>
O173	attB2-CCATGGCGATGCAACTTTAGTAAGAACC	<i>UGT73C6 (Promotor)</i>
O174	attB1-AAGCTTGCTGCTAAACCATGAAGCAATGGG	<i>UGT78D3 (Promotor)</i>
O175	attB2-CCATGGTGCAGGCAATGCTAAGGAGAG	<i>UGT78D3 (Promotor)</i>
O176	attB1-AAGCTTAAAAGTCTCATGAAATTCAGTG	<i>UGT78D2 (Promotor)</i>
O177	attB2-CCATGGTGCAGTAATGAAGAAGAAGAC	<i>UGT78D2 (Promotor)</i>
O178	CTAGTCAAGCTTCGAAAGTACCAAACCATACG	<i>PFG1 (Promotor)</i>
O179	TAGATGGGTACCCCCATTTTCTCCGGCGGTTATATGTG	<i>PFG1 (Promotor)</i>
O180	CTAGTCAAGCTTCGATTA AAAACCCTAGGTTAC	<i>PFG2 (Promotor)</i>
O181	TAGATGGGTACCCCCATTCTCTCGGCCGCGATTA	<i>PFG2 (Promotor)</i>
O182	CTAGTCAAGCTTCCACATTAACGTCTATG	<i>PFG3 (Promotor)</i>
O183	TAGATGGGTACCCCCATTGCTTCTCGGTCTCTTCTGTC	<i>PFG3 (Promotor)</i>
O186	TCATGACAGAAGCCAAGCGA	<i>PFG1</i>
O187	CAGGGAGAACAGACAACGAA	<i>PFG1</i>
O188	TCAAGACAAAAGCCAAGCAG	<i>PFG2</i>
O189	CATTGTTAAACTGCATTCCA	<i>PFG2</i>
O190	TCACTCCAATGTTATCTCTC	<i>PFG3</i>
O191	ATAATCGTCAAGTTGCATTG	<i>PFG3</i>
O197	attb1-AAGCTTCATCGATGAATTCCTGCAGG	<i>CaMV35S</i>
O198	attB2-CCATGGTGGCCACTCGAGGTCCTCTCC	<i>CaMV35S</i>
O199	attB1-AAGCTTGTGACCGCAAGACCCTTCC	<i>TATA-Box</i>

O200	attB2-CCATGGTGGCCACTCGAGCGTGTCTC	TATA-Box
O201	CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT	ACT2/7 (ChIP-PCR)
O202	AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTT	ACT2/7 (ChIP-PCR)
O205	ACAAGAATTGGGACAACCTCC	<i>pMDC43</i>
O207	GGGTTTTCCCAGTCACGACG	<i>pMDC43</i>
O221	GGATCACAGACATTGAGATC	<i>At5g05270</i>
O223	CTCAAACCCGATCTTCCACC	<i>At5g05270</i>
O255	attb1-AAGCTTCGAGCCGATCATTTTTCTCTGTG	<i>UGT78D1</i> (Promotor)
O260	GATAACCAGGTGGTCGCACC	<i>PFT1</i>
O261	CACAGCCGCAAACGCAAAC	<i>PFT1</i>
O262	attB1-AAGCTTGTGTTGGAGAGTGTATCGGC	<i>UGT78D3</i> (Promotor)
O263	attB1-AAGCTTAACTCTAAAATGAGAACTGC	<i>UGT89C1</i> (Promotor)
O264	attb1-AAGCTTGGATTTGAATTTAAGGTGTGC	<i>UGT78D2</i> (Promotor)
O265	attb1-AAGCTTGATTCATCTAAATCAAGATTAGGG	<i>UGT75C1</i> (Promotor)
O266	attB2-CCATGGTAGAATGTTTTGAAGATGTTATAAG	<i>UGT75C1</i> (Promotor)
O271	CCCACCGGTACAACAACAA	<i>DFR</i> (ChIP-PCR)
O272	GGTACAAATCTTTGTGATGTGAAGAC	<i>DFR</i> (ChIP-PCR)
P35S	ACAATCCCCTATCCTTC	<i>CaMV35S</i>
REV389	CTCGTTAAGGGATTTAGATTGTAC	18SrRNA
revl	CAGGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierprimer
RS314	GTTGTGAGAAAATCGGGTTGAAGAG	<i>PFG3</i>
RS316	AATCTATGCCTTCACTGCCGTTTCC	<i>PFG3</i>
RS469	TCCGCTCTTTCTTTCCAAGCTCAT	<i>Actin2</i>
RS470	TCCAGCACAATACCGGTTGTACG	<i>Actin2</i>
RS537	TACAGTACTCTGTCTCTCGACTATC	<i>PFG2</i> (SALK)
RS538	TCTCCCTCTCCATTCTCTATTGTC	<i>PFG2</i> (SALK)
RS546	CCAACAAGCTACTACAAAACCACA	<i>PFG3</i>
RS630	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG	T-DNA LB Primer (SALK)
RS645	CCGGATCGTATCGGTTTTCCG	Ds3-2a (RIKEN)
RS651	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCCATGT-T(31)	Oligo dT Primer
RS738	TCACTCCAATGTTATCTCTCCAATATC	<i>PFG3</i>
S249	AGAAAGCTTGAAGATTAGATATATATCATGT	<i>LDOX</i> (Promotor)
S365	GAGCGCCCAATACGCAAAC	<i>pANGUS</i>
SeLA	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	SeqL-A
SeIB	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	SeqL-B
unil	CGTTGTAACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer
V016	TCGCAAGACCGGCAACAGGATTCA	VD01 und VD012
V017	AGAGACCACATGGTCCTTCTTGAG	VD011 und VD012
V018	GTTGGCCATGGAACAGGTAG	VD013 und VD014
V019	TGGAGAGGACCTCGACTCTAGAAC	VD013 und VD014
V057	GCTCTGATGAAGTCGATCTTC	<i>PAP1</i>
V058	CTACCTCTTGGCTTTCCTCT	<i>PAP1</i>

2.1.4. Bakterienstämme und DNA-Vektoren

Zur Herstellung von dam- und dcm-methylierter Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* XL1 blue Bakterienstamm verwendet. Für die Herstellung nicht methylierter DNA wurde der *E. coli* Stamm K12 ER2925 eingesetzt. Zur Retransformation von Gateway[®] Plasmid-DNA wurden *E. coli* DB3.1-Zellen benutzt. Für die Herstellung transgener Pflanzen und die transiente Transformation der *A. thaliana* Zellsuspensionskultur CK_UK wurden verschiedene Stämme des *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Die *A. tumefaciens* Stämme GV3101 pMP90 und GV3101 pMP90RK wurden für die stabile Transformation in Pflanzen und die Stämme LBA4404.pBBR1MCS.virGN54D, LBA4404.pBBR1MCS-5.virGN54D sowie der *antisilencing*-Stamm RK19 für die transiente Transformation der *A. thaliana* Zellsuspensionskultur CK_UK verwendet.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Fa. Stratagene
K12 ER2925	Ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galk2 galT2 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 mcrB1 hsd1 hsdR2	Fa. New England Biolabs
DB3.1 [™]	F ⁻ gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB ⁻ , mB ⁻) supE44 ara-14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl-5 λ ⁺ leu mtl-1	Fa. Invitrogen

A.	<i>tumefaciens</i>	Genotyp	Referenz
	Stamm		
GV3101	C58C1	Rif ^r Kan ^r Carb ^r	(Koncz <i>et al.</i> 1984) (Virulenzplasmid pMP90)
GV3101	C58C1	Rif ^r Kan ^r Gm ^r	(Koncz <i>et al.</i> 1984) (Virulenzplasmid pMP90RK)
LBA4404	[pAL4404]:	Ach5 pTiAch5ΔT	(Hoekema <i>et al.</i> 1983; Kovach <i>et al.</i> 1994; Scheeren-Groot <i>et al.</i> 1994)
LBA4404	[pAL4404]:	Ach5 pTiAch5ΔT (Virulenzplasmid pBBR1MCS- 5.virGN54D)	(Hoekema <i>et al.</i> 1983; Scheeren-Groot <i>et al.</i> 1994; Kovach <i>et al.</i> 1995)

In Promotoraktivierungsstudien wurden Vektoren (Reporter- und Effektorstrukture) eingesetzt, die Derivate von pBT2 sind (Weisshaar *et al.* 1991) sind. Für die Herstellung eines Gateway[®]-fähigen Reporter-*Destination*-Vektors wurden Vektoren eingesetzt, die sich von pBT2 ableiten (Weisshaar *et al.* 1991). Vektoren die für die Pflanzentransformation verwendet wurden sind Derivate von pMDC (Curtis und Grossniklaus 2003) und pANGUS (Brueggemann *et al.* 2010). Die übrigen verwendeten Vektoren, die als Ausgangsmaterial dienten, wurden von Ingo Appelhagen, Verena Düttmann, Martin Sagasser und Ralf Stracke zur Verfügung gestellt.

Plasmid	Wesentliche Merkmale	Referenz
pANGUS (SA164)	Vektor zur Pflanzentransformation, Amp ^r zu Vermehrung in Bakterien, zwischen LB (<i>left border</i>) und RB (<i>right border</i>) des T-DNA Bereiches eine Kan ^r (<i>nptII</i>), Minimal-TATA Promotor, MCS (<i>multiple cloning site</i>), <i>uidA</i> -ORF (<i>open reading frame</i>) und <i>nosPA</i>	(Brueggemann <i>et al.</i> 2010)
pBT10-GUS	<i>colE1ori</i> , Amp ^r , -46 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> , <i>uidA</i> -ORF, <i>nosPA</i> , MCS, Deletionen im Vektorrückgrat	(Sprenger-Haussels und Weisshaar 2000)
pBTdest	pBT2 basierter Vektor, <i>colE1ori</i> , Amp ^r , -417 bis +8 des 35S Promotors aus <i>CaMV</i> , <i>nosPA</i> , MCS und <i>attB1-ccdB-Cm^r-attB2</i> -Kassette	(Baudry <i>et al.</i> 2004)
pDISCO	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen, Vektorrückgrat aus pBT10-GUS, Austausch der Position von 1993-3932 BP des Rückgrates mit der <i>attR1-ccdB-Cat^r-attR2</i> -Kassette aus pGWB3i-GUS	(Stracke, R. <i>et al.</i> 2010)
pDONR™ 201	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Kan ^r zur Vermehrung in Bakterien, <i>attP1-ccdB-Cm^r-attP2</i> -Kassette	http://www.invitrogen.com
pDONR™ zeo	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Zeocin ^r zur Vermehrung in Bakterien, <i>attP1-ccdB-Cm^r-attP2</i> -Kassette	http://www.invitrogen.com
pMDC43	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie	(Curtis und Grossniklaus 2003)
pMDC83	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie	(Curtis und Grossniklaus 2003)
pMDC107	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie	(Curtis und Grossniklaus 2003)
pMDC163	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie	(Curtis und Grossniklaus 2003)

2.1.5. Reagenzienansätze

Es wurden folgende Reagenzienansätze und Fertig-Präparationshilfen (*Kits*) der Firmen Amersham Biosciences (Buckinghamshire, GBR), Genomed (Bad Oeynhausen), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren) und Qiagen (Hilden) verwendet.

JETstar Plasmid Purification MIDI Kit	Plasmid-DNA Präparation im MIDI-Maßstab
GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit	Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarosegelen
QIAquick PCR Purification Kit	Entfernung von DNA-Fragmenten (z.B. Desoxyoligonukleotide) und anderen unerwünschten Bestandteilen aus DNA-Lösungen
QIAGEN Plasmid Mega Kit	Plasmid-DNA Präparation im Mega-Maßstab
Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA Plant	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterialien
Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix	in vitro Rekombination von PCR-Produkten (mit attB-Sequenzen) und einem Donor-Vektor (mit attP-Sequenzen) zur Herstellung von Entry-Klonen
Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix	in vitro Rekombination von Entry-Vektoren (mit attL-Sequenzen) und einem Destination-Vektor (mit attR-Sequenzen) zur Herstellung von Expressions-Klonen
Invitrogen Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Reagenzien-Mix (Amplifikations- und Detektionsreagenzien) für die quantitative real-time PCR

2.1.6. Zellkulturen und Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedenen Zellsuspensionskulturen verwendet. Die At7 Zellsuspensionskultur wurde für Promotorinteraktionsstudien sowie für die Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen eingesetzt. Die BY2 und die CK_UK Zellsuspensionskulturen wurden ausschließlich für die Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen verwendet.

2.1.6.1. Zellsuspensionskultur

At7 Zellsuspensionskultur

Die *A. thaliana* Zellsuspensionskultur At7 (Ökotyp Columbia) ist eine aus Hypokotylzellen hervorgegangene Zellsuspensionskultur. Die Kultivierung, Protoplastengewinnung, sowie die Analyse von Promoterinteraktionsstudien ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Sprenger-Haussels und Weisshaar 2000; Mehrrens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007; 2010).

BY2 Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung sowie die Protoplastierung der heterotrophen *N. tabacum* BY-2 Zellsuspensionskultur erfolgte wie beschrieben in Merkle *et al.* (1996).

CK_UK Zellsuspensionskultur

Die *A. thaliana* Zellsuspensionskultur CK_UK (Ökotyp Columbia) ist eine aus Keimlingswurzeln hervorgegangene Zellsuspensionskultur (Mathur *et al.* 1998). Die Kultivierung und die transiente Agrobakterien-vermittelte Transformation erfolgte wie beschrieben in Koroleva *et al.* (2005), Berger *et al.* (2007), Jahns (2007).

2.1.7. Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Ökotypen von *A. thaliana* gearbeitet (Ökotypen: Columbia (Col-0), Estland (Est-1), Landsberg *erecta* (Ler), Nössen (Nö-0) und Wassilewskija (Ws-4)). Linien, die nicht im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

Gen	Art der Mutation	Allel	Referenz
<i>MYB11</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>myb11/pfg2</i> (SALK077068)	(Stracke, R. <i>et al.</i> 2007)
<i>MYB12</i>	<i>Footprint</i> -Allel	<i>myb12/pfg1</i> (DQ224277)	(Mehrtens <i>et al.</i> 2005)
<i>MYB111</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>myb111/pfg3</i> (GK291D01)	(Stracke, R. <i>et al.</i> 2007)
<i>MYB11</i> , <i>MYB12</i> , <i>MYB111</i>	Homozygote Tripel-Mutante	<i>myb11/pfg2</i> (SALK077068), <i>myb12/pfg1</i> (DQ224277), <i>myb111/pfg3</i> (GK291D01)	(Stracke, R. <i>et al.</i> 2007)
<i>MYB75</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>myb75/pap1</i> (PST16228)	(Teng <i>et al.</i> 2005)
<i>bHLH42</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>bhlh42/tt8</i> (GK241D05)	(Kleinboelting <i>et al.</i> 2012)
<i>bHLH2</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>bhlh2/egl3</i> (GK483D04)	(Kleinboelting <i>et al.</i> 2012)
<i>PFT1</i>	T-DNA Insertionslinie	<i>At5g62210/pft1-1</i> (GK243D08)	(Kleinboelting <i>et al.</i> 2012)

2.2. Methoden

2.2.1. Pflanzenkultivierung

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte auf Erde oder steril auf ½ MS-Platten. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung der Pflanzen sowohl unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit / Tag) als auch unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit / Tag).

2.2.1.1. Anzucht auf Erde

Die *A. thaliana* Samen wurden auf einem wasserdurchfeuchtetem Gemisch aus Pflanzenerde und ⅓ Vermekulit ausgesät und anschließend für 2-3 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Folgend wurden sie 2-4 Wochen unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus, in einem Klimaraum oder einem Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry, IA, USA) kultiviert. Durch Überführung in Langtagbedingungen wurde nach dieser Zeit das Schossen der

Pflanzen induziert. Sollten Samen der Pflanzen gesammelt werden, wurden diese noch weitere 4-6 Wochen kultiviert und anschließend, sobald die Schoten gelblich geworden sind, mit Papiertüten eingetütet. Nach 1-2 weiteren Wochen konnten die Samen geerntet werden.

2.2.1.2. Oberflächensterilisation von Samen

Zur Oberflächensterilisierung von *A. thaliana* – Samen wurden diese in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend zweimal mit je 500 µL 70%igem Ethanol versetzt und jeweils für zehn Sekunden sorgfältig durch *Vortexen* gemischt und abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R, 30 sek, 13.200 upm). Anschließend wurden die Samen mit 100%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Danach wird das Ethanol unter sterilen Bedingungen abgenommen und die Samen unter der Sterilbank getrocknet. Die Samen können bei 4°C gelagert werden.

2.2.1.3. Anzucht auf MS-Platten

Für die sterile Anzucht von Keimlingen stand ein Lichtraum der Langtagbedingungen durch Kunstlicht simuliert zur Verfügung. Die hier angezogenen Samen wurden auf ½ MS-Platten (mit z.T. unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen (1,5 % und 4 %) oberflächensteril ausgelegt und zur Stratifikation für zwei Tage bei 4°C und Dunkelheit gelagert. Anschließend erfolgte die Anzucht der Keimlinge im Klimaraum.

2.2.2. Histochemische Analyse der β -Glucoronidase (GUS) Aktivität und *Green Fluorescent Protein* (GFP) Detektion in pflanzlichen Geweben

Das Reporterogen *uidA* aus *E. coli*, das für die β -Glucoronidase (GUS) kodiert und das grün-fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein* (GFP)) aus *Aequorea victoria* werden in der molekularbiologischen Analyse von Pflanzen häufig verwendet. Als transkriptionelle Fusionen dienen sie unter anderem der Detektion der gewebsspezifischen Promotoraktivität. Der Nachweis der GUS-Aktivität in transgenen Pflanzen erfolgt über eine Hydrolyse des synthetischen Substrats 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronat (X-Gluc) in Glukoronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Unter Luftsauerstoff oxidiert das

5-Brom-4-chlor-indoxyl zu einem Indigofarbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo), dessen Dimere blau gefärbte Präzipitate bilden. Zur Analyse wurden z.B. Keimlinge direkt von ½ MS-Platten geerntet und sofort in Fixans überführt und für 45 min inkubiert. Anschließend wurde das fixierte Pflanzenmaterial für weitere 45 min unter mehrmaligem Pufferwechsel in NaP_i -Puffer gewaschen. Weiter wurde der NaP_i -Puffer gegen X-Gluc-Lösung getauscht und das Pflanzenmaterial im Exsikkator mehrfach mit Vakuum infiltriert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Die X-Gluc-Lösung wurde verworfen und durch NaP_i -Puffer ersetzt. Zur Klärung wurde das Pflanzenmaterial für mehrere Stunden mit technischem Ethanol behandelt. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in 50%igem Glycerin. Die Dokumentation erfolgte am Binokular (Zeiss).

Der Nachweis der *GFP*-Aktivität in transgenen Pflanzen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 5500B) unter Verwendung eines *GFP* spezifischen Filters.

2.2.3. Herstellung methanolischer Extrakte für die Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Zur Herstellung methanolischer Extrakte wurde je 50 – 150 mg Pflanzenmaterial von 5-DAG alten Keimlingen geerntet, in 2 mL Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µL 80%igem Methanol und mit 10-15 Zirconia Kugeln (Durchmesser 1 mm) versetzt. Die Proben wurden anschließend im Ribolyser (Qbiogene, 6,5 msek, 2x 45 sek) homogenisiert und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.200 upm, 4 min). Die Überstände wurden in neue 2 mL Schraubdeckel-Reaktionsgefäße und anschließend bei 60 °C in einer SpeedVac eingedampft. Die getrockneten Pellets wurden 1 µL 80%igem Methanol mg^{-1} Ausgangsmaterial gelöst.

2.2.4. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie mit anschließender Naturstoff-Reagenz A (DPBA) -Färbung wurde nach (Wagner und Blatt 1995) durchgeführt. Je zwei mL der methanolischen Extrakte (2.2.4.) wurden auf 10 cm x 10 cm Silica-60 HPTLC-Platten (Merck) als stationäre Phase aufgetragen. Die Chromatographie wurde mittels Ethylacetat, Ameisensäure, Essigsäure und H_2O (100:12:12:26) als mobile Phase in geschlossenen Chromatographiekammern durchgeführt. Aufgetrennte

Phenylpropanoide wurden mittels einer aufgespritzten 1%igen DPBA-Lösung (w/v) (Roth 9920-1) in Methanol und anschließend aufgespritzter 5%igen methanolischen Polyethylen Glykol (PEG) 400 Lösung gefärbt. Die behandelten Chromatogramme wurden unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und mittels Fotografie dokumentiert.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

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

Für die PCR wurden, je nach Verwendungszweck, Ansätze mit *Taq*-DNA-Polymerase (aus Eigenherstellung oder der Firma TaKaRa) oder *PHUSION*TM *HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE* (mit *proof reading* Aktivität) verwendet. Bei einem Gesamtvolumen von 25 µL enthielten die PCR-Ansätze in der Regel 25-500 ng Matrizen-DNA, 10 pmol gegenläufige Desoxyoligonukleotide (Primer), 2 nmol (*Taq*-Polymerase) bzw. 5 nmol (*PHUSION*TM-Polymerase) dNTP-Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase bzw. 0,5 U *PHUSION*TM *HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE* in einem entsprechendem 1x Puffer. Die DNA-Amplifikation wurde in einem *Mastercycler epigradient* (Eppendorf) oder MJ Research PTC-200 (Biozym) Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt	<i>Taq</i> -Polymerase			TaKaRa- <i>Taq</i>			<i>PHUSION</i> TM -Polymerase		
	Zeit	Temp	Zyklen	Zeit	Temp	Zyklen	Zeit	Temp	Zyklen
Aktivierung	5 min	94°C	1	5 min	98°C	1	30 sec	98°C	1
Denaturierung	30 sec	94°C		10 sec	98°C		10 sec	98°C	
Annealing	30 sec	50-65°C	30-35	30 sec	50-65°C	30-35	30 sec	50-65°C	30-35
Elongation	1min/kb	72°C		1min/kb	72°C		30sec/kb	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1	7 min	72°C	1	7 min	72°C	1
Kühlen	∞	16°C		∞	4-16°C		∞	4-16°C	

2.2.5.2. Kolonie-PCR

(modifiziert nach Gussow und Clackson 1989)

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle Methode um Wirtsbakterien nach erfolgter Transformation auf das erfolgreich inserierte rekombinante Plasmid zu untersuchen. Für diese Art von PCR wird ein fast identischer Ansatz wie bei der Standard-PCR (siehe 2.2.4.1., *Taq*-Polymerase und *TaKaRa-Taq*) verwendet. Allerdings wurde hier auf die Zugabe von aufgereinigter Template-DNA verzichtet. Mittels eines sterilen Zahnstochers wurden die zu analysierenden Bakterienkolonien von einer Agar-Platte gekratzt, auf eine neue Agar-Platte übertragen und der Zahnstocher in den PCR-Ansatz überführt. Durch Drehbewegungen des Zahnstochers wurden noch vorhandene Bakterien in den PCR-Ansatz gelöst. Somit dienen Bakterien als *Template* für die Kolonie-PCR. Das Primerpaar für diese Art der PCR wurde so gewählt, dass ein Insert-spezifischer Primer und Vektor-spezifischer Primer verwendet wurden, um die rekombinanten Bakterien als richtig oder falsch identifizieren zu können.

2.2.5.3. Isolierung von Plasmid-DNA

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

(modifiziert nach Holmes und Quigley 1981)

Für die Plasmid-Isolierung wurden 1,5 mL einer 3 mL *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 2 min), der Überstand entfernt und das Pellet in 200 µL *TELT*-Puffer mit 20 µL Lysozym-Lösung [10 mg/mL] unter *vortexen* resuspendiert. Die Suspension wurde unter leichtem Schütteln (Eppendorf Thermomixer compact, 800 upm) für 3-5 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 15 min) wurde das Pellet entweder mit einem Zahnstocher entfernt, oder der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µL Isopropanol wurde die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA präzipitiert und anschließend pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet

für 15 min bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50 µL TE-Puffer (10/0,1) mit *RNase* [10 µg/mL] gelöst.

Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (Alkalische Lyse)

Für die alkalische Lyse wurde eine 3 mL *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 2 min), der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µL Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µL Lösung 2 wurde die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150 µL Lösung 3 zugegeben und die Suspension zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und diesem zur Plasmid-DNA Präzipitation 1 mL eiskaltes 100%iges Ethanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 10 min) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 3 min) und anschließend bei RT für ca. 15 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µL TE-Puffer (10/0,1) mit *RNase* [50 µg/mL] gelöst.

Plasmid-DNA Präparation im MIDI- und MEGA-Maßstab

Für die Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA wurde die alkalische Lyse gefolgt von einer säulenchromatographischen Aufreinigung eingesetzt. Hierfür wurden, je nach benötigter Plasmidmenge das *JETstar Plasmid Purification MIDI Kit* (Genomed) oder das *QIAGEN Plasmid MEGA Kit* (Qiagen) verwendet. Die Durchführung der Plasmid-DNA Isolierung erfolgte jeweils nach Anweisungen des Herstellers. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10/1) gelöst.

2.2.5.4. Restriktionsverdau von DNA

Abhängig von der Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes gewählt. Wichtig hierbei ist, dass das eingesetzte Volumen der Restriktionsenzyme nicht den Anteil von 10 % des Gesamtvolumens überschreitet, da die Restriktionsenzyme in glyzerinhaltigen Puffer vorgelegt werden und viele Enzyme bei zu hohen Konzentrationen von Glycerin eine Staraktivität zeigen. Die Durchführung der Restriktionsspaltungen richtet sich nach den Angaben der Herstellungsfirma der jeweiligen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs). Pro µg zu spaltender DNA wurden ca. 5 U an Enzym und 2 µl 10-fach Puffer eingesetzt. Teilweise wurde dem Restriktionsansatz auch BSA

(*bovine serum albumin*) zugesetzt, falls die Restriktionsendonukleasen dieses erforderten. Die Restriktionsansätze wurden, wenn nicht vom Hersteller anders angegeben, bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert

2.2.5.5. Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in 1 bis 2%igen Agarosegelen (in 1x TAE-Puffer) durchgeführt. Um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen wurde dem Agarosegel 0,04 µg Ethidiumbromid pro mL Gelvolumen zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei einer Spannung von ca. 10 Volt/cm. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht-Bestrahlung an einem Videodokumentationssystem (INTAS). Für die Größenabschätzung wurde eine *1 kb Ladder* (Invitrogen) oder eine *100 bp Ladder* (NEB) verwendet. Für präparative Anwendungen wurde Agarose der Firma Invitrogen benutzt.

2.2.5.6. Aufreinigung und Elution von DNA

Die Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurden mit dem *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) oder dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Hersteller Angaben. DNA-Fragmente die aus einem Agarosegel isoliert werden sollten wurden mit dem *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* aufgereinigt. Die Elution von DNA aus wässrigen Lösungen und *geChIPter* DNA erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*.

2.2.5.7. Ligation

Die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor wurde jeweils in einem Reaktionsvolumen von 10 µL durchgeführt. Es wurde jeweils ein Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Für die Ligation wurden 400 U T4 DNA Ligase (NEB) in einem entsprechenden 1x Puffer eingesetzt. Die Inkubationszeiten für eine „*sticky-end*“ Ligation betrug 30 min bei 25°C und für eine „*blunt-end*“ Klonierung über Nacht bei 16°C. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend für die Transformation in *E. coli* Zellen eingesetzt.

2.2.5.8. Erzeugung von Plasmidkonstrukten mittels Gateway® Rekombination

Die Klonierung von PCR-Produkten, welche durch die *PHUSION™ HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE* amplifiziert wurden, erfolgte mit der Gateway® Technologie der Firma Invitrogen (*Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix* und *Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix*). Diese Technologie erlaubt einen schnellen und effizienten Transfer von DNA-Sequenzen in unterschiedliche Vektorsysteme. Als Voraussetzung für dieses System werden PCR-Produkte mit flankierenden spezifischen Sequenzen (*attB Sites*) und ein Donorvektor mit spezifischen Sequenzen (*attP Sites*) benötigt. Durch den *BP Clonase® II Enzyme Mix* (Int, IHF), der eine Intergrase (Int) des Bakteriophagen λ und den „*Integration Host Factor*“ (IHF) aus *E.coli* enthält, wird die Rekombination eines *attB*-Substrates (z.B. *attB*-PCR Produkt) mit einem *attP*-Substrates (z.B. pDONR201) zu einem *attL*-tragendem *Entry*-Klon katalysiert (Überblick in Abb.2.1.).



Abb. 2.1. Vereinfachte Darstellung des molekularen Ablaufs einer BP-Reaktion. Aus Gateway Technology, Version E, 22 September 2003, 25-0522

Die folgende LR-Reaktion wird durch die *LR Clonase® Enzyme Mix* (Int, Xis, IHF) katalysiert. Dieser Mix besitzt die enzymatischen Funktionen der Intergrase (Int) und Exzisionase (Xis) des Bakteriophagen λ , sowie ebenfalls den „*Integration Host Factor*“ (IHF) aus *E.coli*. In diesem Teil der Klonierung erfolgt die Rekombination eines *attL* Substrates (*Entry*-Vektor) mit einem *attR* Substrat (*Destination*-Vektor) zu einem *attB*-tragendem Expressionsvektor und einem *attP*-tragendem Nebenprodukt (Überblick in Abb.2.2.).



Abb. 2.2. Vereinfachte Darstellung des molekularen Ablaufs einer LR-Reaktion. Aus Gateway Technology, Version E, 22 September 2003, 25-0522

Die Anwesenheit des *ccdB*-Gens erlaubt eine negative Selektion der Donor- und *Destination*-Vektoren in *E. coli* nach erfolgter Rekombination und Transformation.

2.2.5.9. Für diese Arbeit erstellte, relevante Plasmidkonstrukte

Plasmidkonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt. Die Sequenzen basieren auf dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0.

<u>Klon-Nr.</u>	<u>Plasmid</u>	<u>Eigenschaften und Einzelheiten zur Klonierung</u>
OJ003	pDISCO	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen, Vektorrückgrat aus pBT10-GUS, Austausch der Position von 1993-3932 BP des Rückgrates mit der <i>attR1-ccdB-Cat^r-attR2</i> -Kassette aus pGWB3i-GUS
OJ004	pDISCO- <i>Pro_{FLS1}</i>	wie OJ003, LR-Reaktion mit Rst650
OJ008	pDISCO- <i>Pro_{CHS}</i>	wie OJ003, LR-Reaktion mit Rst649
OJ010	pMDC43- <i>Pro_{35S}::GFP:MYB11</i>	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit Rst620
OJ011	pMDC43- <i>Pro_{35S}::GFP:MYB12</i>	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit Rst622
OJ012	pMDC43- <i>Pro_{35S}::GFP:MYB111</i>	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit Rst584
OJ013	pMDC43- <i>Pro_{MYB11}::GFP:MYB11</i>	wie OJ010, Insert über Amplifikation mit O180/O181 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über KpnI/HindIII
OJ014	pMDC43- <i>Pro_{MYB12}::GFP:MYB12</i>	wie OJ011, Insert über Amplifikation mit O178/O179 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über KpnI/HindIII
OJ015	pMDC43- <i>Pro_{MYB111}::GFP:MYB111</i>	wie OJ012, Insert über Amplifikation mit O182/O183 und Col-0 gDNA als Matrize, Klonierung über KpnI/HindIII
OJ017	pDISCO- <i>Pro_{TATA}</i>	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ018
OJ018	pDONR201- <i>Pro_{TATA}</i>	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O199/O200 und MS23 als Matrize, BP-Reaktion
OJ019	pDONR201- <i>Pro_{35S}</i>	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O197/O198 und MS83 als Matrize, BP-Reaktion
OJ020	pDISCO- <i>Pro_{35S}</i>	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ019
OJ021	pDONRzeo- <i>Pro_{PFT1}</i>	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O234/O235 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ022	pMDC163- <i>Pro_{PFT1}::GUS</i>	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit OJ021
OJ023	pMDC107- <i>Pro_{PFT1}::GFP</i>	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit OJ021
OJ024	pDONR201- <i>Pro_{UGT78D1}</i>	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O255/O171 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion

OJ025	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT78D3}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O174/O175 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ026	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT78D4}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O195/O196 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ027	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT89C1}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O168/O169 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ028	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT73C6}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O172/O173 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ029	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT78D1}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ024
OJ030	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT78D3}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ025
OJ031	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT78D4}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ026
OJ032	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT89C1}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ027
OJ033	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT73C6}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ028
OJ034	pMDC43- <i>Pro</i> _{2x35S::GFP:PFT1}	Destinations Vektor für rekombinatorisches Klonen zur Pflanzentransformation aus der pMDC Gateway Vektor Serie, LR-Reaktion mit LB033
OJ036	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT78D2}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O264/O177 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ037	pDONR201- <i>Pro</i> _{UGT75C1}	Donor Vektor für rekombinatorisches Klonen, Insert über Amplifikation mit O265/O266 und Col-0 gDNA als Matrize, BP-Reaktion
OJ040	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT78D2}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ036
OJ042	pDISCO- <i>Pro</i> _{UGT75C1}	wie OJ003, LR-Reaktion mit OJ037

2.2.5.10. DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Die Isolation kleiner Mengen genomischer DNA aus *A.thaliana*-Blättern als *Template*-DNA für PCR-Ansätze erfolgte nach der Methode von (Edwards *et al.* 1991). Hierzu wurden 100-500 mg *A. thaliana*-Blätter in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 500 µl Extraktionspuffer und 1-2 Spatellöffeln SilicaBeads ca. 45 sek im *Tissue Lyser* (Qiagen) zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 3 min) und 400 µL des Überstandes in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 300 µL Isopropanol und zwei minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die genomische DNA präzipitiert. Das DNA-Präzipitat wurde zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 13.000 upm, RT, 5 min), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL TE-Puffer (10/1) aufgenommen. 2 µL dieser DNA wurden als Matrizen für die PCR verwendet.

2.2.5.11. Ethanol-Fällung von DNA

DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde vorher durch eine Ethanol-Fällung mit Ammoniumacetat als Kation aufgereinigt. Die DNA wurde durch Zugabe von einem Volumenanteil Ammoniumacetat (4 M) und sechs Volumenteilen Ethanol (100%) gefällt. Das Präzipitat wurde anschließend durch Zentrifugation pelletiert (Eppendorf Zentrifuge, 13.000 upm, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10 mM Tris/HCl pH8,0 aufgenommen.

2.2.5.12. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über photometrische Messung. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA-, RNA- bzw. Oligonukleotid-spezifischem Multiplikationsfaktor. Eine Extinktion von 1,0 entspricht dabei 50 µg/mL doppelsträngiger DNA, 40 µg/mL RNA, 35 µg/mL einzelsträngiger DNA und 20 µg/mL Oligonukleotiden. Eine Angabe zur Reinheit der Lösung erhält man über das Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm}. Die photometrische Bestimmung der Konzentration erfolgte im Biophotometer (Eppendorf) oder mit dem mikro-volumen Spectrophotometer NanoDrop 1000 (ND 1000, Nanodrop). Als Nullabgleich diente der jeweilige Puffer in dem die DNA aufgenommen wurde.

2.2.5.13. ExoSAP Verdau von DNA

Sollte PCR-amplifizierte DNA direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden, wurde zunächst eine Behandlung dieser mit *ExoSAP-IT* durchgeführt. Hierzu wurden 6,5 µL PCR-Amplifikat mit 0,5 µL *ExoSAP-IT* gemischt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Bei einer folgenden 15-minütigen Inkubationszeit bei 80°C erfolgte die Enzyminaktivierung.

2.2.5.14. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der zu sequenzierenden DNA wurde jeweils eine Probe mit einer Konzentration von 250 ng/µL von der *Sequencing Core Facility* der Universität Bielefeld unter Verwendung der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) und

Big Dye-terminator Chemistry auf einem Abi Prism 3730x1 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert. Zur anschließenden Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm *Sequencher* (GeneCodes Corporation, USA) verwendet.

2.2.5.15. Modellierung homologer Proteinstrukturen

(detailliert beschrieben in Appelhagen, I., Jahns, O. *et al.* 2011)

Für die Modellierung homologer Proteinstrukturen wurden zunächst die erhaltenen Nukleotidsequenzdaten *in silico* translatiert. Das Proteinstruktur-Modell wurde mit Hilfe des webbasierten *SWISS-Model Workspace* (Arnold *et al.* 2006; Kiefer *et al.* 2009) generiert. Die Visualisierung erfolgte mit der *PyMOL Molecular Graphics System* Software (Version 1.3r1, Schrödinger, LLC, New York, USA; <http://www.pymil.org>).

2.2.5.16. RNA-Präparation

2.2.5.16.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Aus kleinen Mengen pflanzlichen Ausgangsmaterials (ca. 50 µg) wurde die Gesamt-RNA mit dem *NucleoSpin[®] RNA Plant Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben extrahiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -70°C gelagert.

2.2.5.16.2. Probenvorbereitung für die RT-PCR

Zur Eliminierung von Verunreinigungen genomischer DNA in Gesamt-RNA-Präparationen wurde zunächst eine DNaseI-Restriktion (*DNA-free[™]*; Ambion) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg Gesamt-RNA mit H₂O_{DEPC} auf ein Volumen von 8,8 µL gebracht. Anschließend wurden 0,2 µL rDNaseI und 1 µL 10x Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der rDNaseI erfolgte mit dem *DNase inactivation reagent* (*DNA-free[™]*; Ambion). Der Ansatz wurde für zwei Minuten bei RT inkubiert und genomische DNA durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 2 min) pelletiert. Der RNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zu einem Volumen von 100 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt. Anschließend folgte eine Lithiumchlorid-Präzipitation um RNA spezifisch zu fällen. Die Präzipitation erfolgte mit 1 Volumen Lithiumchlorid (5M, H₂O_{DEPC}) für

mindestens zwei Stunden bei -20°C . Der Fällung folgte eine Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 14.000 upm, 4°C , 30 min). Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet mit 100 μL (3M) Natriumacetat gewaschen und erneut zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 14.000 upm, 4°C , 30 min). Dieser Waschschrift wurde noch zweimal mit 300 μL 70%igem Ethanol (auf -20°C gekühlt) wiederholt. Nach Trocknung des RNA-Präzipitats wurde dieses in 8 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ resuspendiert. Zur Erststrang-cDNA-Synthese wurden 8 μL aufgereinigte Gesamt-RNA mit 0,5 μL *Random-Hexamere* [50 ng/ μL], 0,5 μL oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] und 1 μL 10mM dNTPs für 5 min bei 65°C und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 4 μL 5x *First Strand Buffer*, 2 μL 50mM MgCl_2 , 2 μL 0,1 M DTT, 0,5 μL BSA (nukleasefrei, [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]), 0,5 μL RNase *Inhibitor* (Fermentas) sowie 1 μL Reverse Transkriptase (Invitrogen, *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*) zugesetzt. Zur Erststrang-Synthese wurden die Ansätze 5 min bei 25°C , 1 h bei 42°C und 15 min bei 70°C inkubiert. Wurde die cDNA für eine qPCR eingesetzt, wurde diese 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ verdünnt, zu 16 μL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Verwendung in einer RT-PCR wurde die cDNA unverdünnt bei -20°C gelagert.

2.2.5.16.3. Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet um auf die vorhandene Expression der untersuchten Gene zwischen einem Wildtyp (z.B. Col-0) und einer *Knock out*-Mutante abzuschätzen. Es wurde je 1 μL der cDNA als Matrizen-DNA mit spezifischen Primern für die 18S-rRNA (FW389 und REV389) in der PCR eingesetzt. Die 18S-rRNA wird in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert und diente hier als Kontrollgen. Als ungefähres Maß für die Expressionsstärke diente die Bandenstärke nach Agarosegel-Elektrophorese. Das Volumen der Matrizen-DNA wurde daraufhin gegebenenfalls so angepasst, dass nach der 18S-rRNA-PCR eine vergleichbare Bandenstärke im Agarosegel in den zu vergleichenden Proben beobachtet werden konnte. Das ermittelte Matrizen-DNA-Volumen wurden dann in einer PCR mit genspezifischen Primern für die zu untersuchenden Gene eingesetzt, wobei die Zyklenzahl gegebenenfalls noch so angepasst wurde, dass die Reaktion in der exponentiellen Amplifikationsphase gestoppt wurde. Es wurde im Allgemeinen das folgende Schema für die PCR mit Taq-DNA-Polymerase verwendet:

Schritt	Zeit	Temp	Zyklen
Aktivierung	3 min	94°C	1
Denaturierung	30 sec	94°C	
Annealing	30 sec	50-65°C	25-35
Elongation	1min/kb	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1
Kühlen	∞	16°C	

2.2.6. Mikrobiologische Methoden

2.2.6.1. Kultivierung von Bakterien

Zur Herstellung methylierter Plasmid-DNA wurde der *E.coli* Stamm XL1 blue, zur Herstellung unmethylierter Plasmid-DNA der *E. coli* Stamm K12 ER2925 verwendet. Die Bakterien wurden grundsätzlich auf selektiven LB-Platten bei 37°C angezogen. Flüssigkulturen wurden entweder mit selektivem LB- oder TB-Medium kultiviert. Plasmide, die für die Pflanzentransformation verwendet werden sollten, wurden zunächst in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und anschließend sowohl auf selektiven YEP-Platten als auch in selektivem YEP-Flüssigmedium bei 28°C angezogen.

2.2.6.2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation

2.2.6.2.1. Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen (Stamm XL1 blue; K12 ER2925) wurde eine 5 mL Übernachtskultur in selektivem LB-Medium angeimpft. Am Folgetag wurde 500 mL selektives LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) mit 1 ml dieser Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 kultiviert. Anschließend wurde diese in einen Zentrifugenbecher überführt, auf Eis heruntergekühlt und abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde restlos entfernt und die Zellen in 250 mL eiskaltem autoklaviertem Wasser (ddH₂O) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und erneut zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g, 4°C, 15 min). Anschließend wurden die Zellen in 20 mL eiskaltem 10% Glycerin

resuspendiert und wiederum zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g, 4°C, 15 min). Abschließend wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 2-3 mL eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und 50 µL der Suspension in vorgekühlte sterile 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

2.2.6.2.2. Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (Stamm XL1 blue; K12 ER2925) wurde eine 3 mL Übernachtskultur in selektivem LB-Medium angeimpft. Am Folgetag wurde 100 mL selektives LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) mit 1 mL dieser Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 kultiviert. Anschließend wurde diese in zwei 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt, auf Eis heruntergekühlt und abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde restlos entfernt und die Zellen in 2 mL eiskaltem TFB1-Medium resuspendiert und in einem Reaktionsgefäßm vereinigt. Anschließend wurde mit TFB1-Medium auf 40 mL aufgefüllt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis gefolgt von einer erneuten Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3SR, 1500g, 4°C, 10 min). Anschließend wurden die Zellen in 4 mL eiskaltem TFB2-Medium resuspendiert und wiederum für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf 100 µL Aliquots in vorgekühlten 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäßen verteilt. Die chemokompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

2.2.6.2.3. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV3101; LBA4404) wurde am Vortag eine 5 mL Übernachtskultur in selektivem YEP-Medium angeimpft und bei 28°C kultiviert. Am Folgetag wurde mit dieser Übernachtskultur eine Hauptkultur in 250 mL selektivem YEP-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) angeimpft und bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur in vorgekühlte 500 mL Zentrifugenbecher überführt und pelletiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g, 4°C, 15 min) und das Pellet danach in mehreren Schritten in folgender Reihenfolge 500 mL eiskaltes ddH₂O (steril), 500 mL eiskaltes ddH₂O (steril) und 50 mL eiskaltes 10%iges Glycerin gewaschen und abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR, 4000g,

4°C, 15 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 1-2 mL eiskaltem 10% Glyzerin, je nach Pelletgröße, resuspendiert und die Zellsuspension zu je 100 µl in vorgekühlte sterile 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

2.2.6.3. Transformation von Bakterienzellen

2.2.6.3.1. Transformation elektrokompenter *E. coli* Bakterienzellen

Ein Aliquot der elektrokompenten *E. coli* Zellen (Stamm XL1 blue; K12 ER2925) wurde auf Eis aufgetaut und mit 50 pg Plasmid-DNA vermischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, PeqLab) überführt und anschließend eine Minute auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach in einem *Micropulser* (BioRad) bei 1,8 kV und einer mittleren Entladungszeit von ca. 5 msec gepulst. Nach unmittelbarer Zugabe von 1 mL SOC-Medium wurden die Zellen anschließend in sterile 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für ca. 45 min bei 37°C und 800 upm in einem *Thermomixer compact* (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (Eppendorf Zentrifuge, 7000 upm, RT, 3 min) und in 50 µL des Überstandes resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6.3.2. Transformation chemokompenter *E. coli* Bakterienzellen

Ein Aliquot der chemokompenten *E. coli* Zellen (Stamm XL1 blue; K12 ER2925) wurde auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA vermischt (ca. 50 pg bei Retransformationen, 10 µL bei Ligationsansätzen). Anschließend wurde der Transformationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec. Weiter wurde nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Nach unmittelbarer Zugabe von 1 mL SOC-Medium wurden die Zellen anschließend in sterile 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für ca. 45 min bei 37°C und 800 upm in einem *Thermomixer compact* (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (Eppendorf Zentrifuge, 7000 upm, RT, 3 min) und im Regelfall in 50 µL des Überstandes resuspendiert (bei Ligationen wurde gegebenenfalls der Gesamtansatz ausgestrichen). Die

Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6.3.3. Transformation elektrokompenter *A. tumefaciens* Bakterienzellen

Ein Aliquot der elektrokompenten *A. tumefaciens* Zellen (Stamm GV3101; LBA4404) wurde auf Eis aufgetaut und mit 50 pg zu transformierender DNA vermischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, PeqLab) überführt und anschließend eine Minute auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach in einem *Micropulser* (BioRad) bei 1,8 kV und einer mittleren Entladungszeit von ca. 5 msec gepulst. Nach unmittelbarer Zugabe von 1 mL YEP-Medium wurden die Zellen anschließend in sterile 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für ca. 2 h bei 28°C und 900 upm in einem *Thermomixer compact* (Eppendorf) inkubiert. Folgend wurden die Zellen pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 7000 upm, RT, 5 min) und im Regelfall in 150 µl des Überstandes resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf YEP-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für 2-5 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.6.4. Glyzerindauerkulturen von transformierten Bakterien

Zur dauerhaften Lagerung transformierter Bakterien wurden 850 µL der entsprechenden Übernachtskultur der Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase mit 375 µL autoklaviertem 80%igem Glycerin vermischt. Die Suspension wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Wurde der Klon für weitere Experimente benötigt, wurde ein Teil der Glyzerindauerkultur mit Hilfe einer Pipettenspitze oder eines sterilen Zahnstochers abgekratzt und auf eine Agarplatte ausgestrichen oder in eine Flüssigkultur überimpft.

2.2.7. Herstellung transgener Pflanzen

2.2.7.1. Transformation durch „floral dipping“

Die Herstellung transgener *A. thaliana* Pflanzen erfolgte über Agrobakterien vermittelten DNA-Transfer (An *et al.* 1986). Hierzu wurden die binären Vektoren pMDC (Curtis und Grossniklaus 2003) verwendet, die sich sowohl in *E. coli* als

auch in *A. tumefaciens* propagieren lassen. Die auf pMDC basierenden, zu transformierenden Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* XL1 blue amplifiziert und anschließend in *A. tumefaciens* GV3101 pMP90 transformiert. Eine erfolgreiche Transformation in *A. tumefaciens* wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert. Hierbei wurden Konstrukt-spezifische Primer verwendet und eine Bakterienkultur als Matrize eingesetzt, mit der im weiteren Verlauf eine 5 mL *A. tumefaciens* Flüssigvorkultur mit selektivem YEP-Medium (Rifampicin, Kanamycin, Gentamycin) inokuliert wurde. Die Vorkultur wurde nach 2-3 Tagen Inkubation bei 28 °C zum Animpfen einer selektiven 500 mL YEP Hauptkultur verwendet. Nach Anwachsen der Hauptkultur (weitere 1-2 Tage) wurde die Pflanzentransformation nach der „*floral dipping*“ Methode durchgeführt (Clough und Bent 1998, Zhang, X. *et al.* 2006). Hierzu wurden die zu transformierenden Pflanzen zuvor so angezogen, dass nach ca. 30 Tagen die Primärfloreszenzen abgetrennt wurden und sich im Verlauf (ca. 7-10 Tage) Sekundärfloreszenzen bilden konnten. Die oben beschriebene 500 mL Hauptkulturen, in denen sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, wurden mit 5 % Saccharose und 0,02 % Silwet L-77 versetzt und in ein Becherglas überführt. Die zu transformierenden Pflanzen wurden anschließend mit den Infloreszenzen für 30 sec in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend für einen Tag in einem verschlossenen Plastikbeutel im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.2.7.2. Selektion transgener T1-Pflanzen

Positive Transformationsereignisse wurden über das Aussäen der T1-Samen auf *Germination Media*-Platten (mit HygromycinB als Selektionsmarker) (Nakazawa und Matsui 2003) identifiziert. Die Samen wurden zur Keimung und folgender Pflanzenaufzucht unter Kunstlicht (24 h kontinuierliches Licht, 22°C, Percival Scientific) kultiviert. Transgene, resistente T1-Pflanzen ließen sich dadurch erkennen, dass sie nach 10 Tagen eine normale Wurzelentwicklung zeigten, während nicht-transgene, nicht-resistente T1-Pflanzen ein verkürztes Wurzelwachstum zeigten. Transgene Keimlinge wurden anschließend auf Erde pikiert und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen weiterkultiviert. Zur weiteren Analyse wurde das Vorhandensein des Transgens über PCR mit Konstrukt-spezifischen Primern und DNA aus T1-Pflanzenmaterial überprüft.

2.2.8. Zellkulturen

2.2.8.1. At7-Zellkultur

Untersuchungen der Promotoraktivierungspotentiale von Transkriptionsfaktoren, als auch der Lokalisation von *GFP*- Fusionsproteinen wurden in der, ursprünglich von *A. thaliana* Hypokotylzellen abstammenden, Zellsuspensionskultur At7 unternommen (Sprenger-Haussels und Weisshaar 2000). Das Prinzip des Transaktivierungsassays beruht auf Kotransfektion mehrerer unterschiedlicher Konstrukte in Protoplastenzellen. Ein Effektor-Konstrukt kodiertes DNA-Bindeprotein kann spezifisch an *cis*-regulatorische Elemente im Zielpromotor-Bereich des Reporterkonstruktes binden, wodurch die Expression des transkriptionell fusionierten *uidA*-ORF induziert wird. Diese hervorgerufene Reporterogenaktivität kann fluorimetrisch bestimmt werden. Zur Korrektur wurde ein zusätzliches Plasmid (pBT10-*Pro_{ubi}*::*LUCm3* – MS129), welches ein Luciferase-Reportergen unter Ubiquitinpromotorkontrolle codiert, kotransfiziert. Zusätzlich wurde ein weiteres Plasmid („Auffüllplasmid“; pBT10- Δ ::*LUCm3* – MS47) transfiziert, welches dazu dient, in jedem Transfektionsansatz die gleiche DNA Menge einzusetzen. Für die Lokalisation von *GFP*- Fusionsproteinen wurde die jeweilige Expressionsplasmid-DNA zur Transfektion eingesetzt und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dokumentiert. Die für die Transfektionsexperimente benötigte DNA wurde im *E. coli* Stamm K12 ER2925 hergestellt und ist somit Dam- und Dcm-methylierungsnegativ.

2.2.8.1.1. Vorbereitung der Transfektions-DNAs

Ein Transfektions-DNA Ansatz enthielt 10 μ g Reporterplasmid-DNA, 5 μ g Kontrollplasmid-DNA (MS129), null bis drei Mal je 1 μ g unterschiedliche Effektorplasmid-DNA und „Auffüllplasmid“-DNA (MS47) bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 25 μ g pro Transfektion. Das Gesamt-Volumen wurde mit Wasser auf 50 μ L eingestellt. Zur Kontrolle wurde zu jedem Transfektionsexperiment eine Positivkontrolle, das konstitutiv GUS-exprimierende Plasmid pBT4-*Pro_{35S}*::*GUS* (MS275) ohne weitere Effektoren, mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pBT4- Δ ::*GUS* (MS156; ohne weitere Effektoren) eingesetzt.

2.2.8.1.2. Kultivierung der AT7-Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung der At7-Zellsuspensionskultur erfolgte wie beschrieben in (Sprenger-Haussels und Weisshaar 2000). Die At7-Zellen wurden bei 26°C im Dunkeln unter Schütteln (INFORS, 105 upm) in jeweils 40 mL MS-Medium in Erlenmeyer-Kolben für 7 Tage kultiviert. Nach 7 Tagen wurden 3 g der Zell-Linie mit einem Sieblöffel steril in neues MS-Medium überführt und für weitere 7 Tage inkubiert.

2.2.8.1.3. Gewinnung von At7-Protoplasten

Die Gewinnung von Protoplasten erfolgte in modifizierter Weise nach (Dangl *et al.* 1987). Hierzu wurden 40 mL einer 5 Tage kultivierten Zell-Linie sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 upm, RT, 5 min, Beschleunigung Stufe 5, Bremse Stufe 3). Das Pellet wurde anschließend in 25 mL 240 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die gewaschenen Zellen erneut sedimentiert. Die pelletierten Zellen wurden in steriler Enzymlösung (mit Zellulase und Mazerozym) in einem Gesamtvolumen von 40 mL aufgenommen und resuspendiert. Je 20 mL dieser Suspension wurde auf eine Petrischale (Ø 14,5 cm), mit 10 mL Enzymlösung, überführt, gefolgt von einer Inkubation bei 26°C und 20 upm im Dunkeln über Nacht. Anschließend wurden die Suspensionen in je ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 1300 upm, RT, 6 min). Das Zell-Pellet wurde je mit 25 mL 240 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und anschließend in je 5,5 mL B5-Medium resuspendiert. Die beiden Ansätze wurden in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereinigt und die Protoplasten flotiert (Heraeus Multifuge 1s, 800 upm, RT, 6 min). Die lebenden Protoplasten wurden mit einer weitlumigen Pipette abgenommen und in einem Gesamtvolumen von 14,5 mL mit B5-Medium wiederholt flotiert. Die lebenden Protoplasten wurden weiter in eine neues 15 mL Reaktionsgefäß überführt und zur Durchmischung invertiert. Die gewonnen Protoplasten wurden direkt zur Transfektion eingesetzt.

2.2.8.1.4. Transfektion von At7-Protoplasten

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

Die Aufnahme von DNA in At7 Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. Hierzu wurden je 200 µL Protoplastensuspension in 10 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die vorbereitete DNA zur Transfektion und 200 µL PEG-Lösung wurde

hinzugegeben und vermischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei RT wurde zu jedem Transfektionansatz 5 mL 275 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung pipettiert und die Protoplasten sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 800 upm, RT, 8 min). Die Protoplasten wurden anschließend in je 7 mL B5-Medium aufgenommen und bei 26°C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Zur Analyse der Lokalisation von von *GFP*-Fusionsproteinen wurden die Protoplasten am Folgetag unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Sollten die transfizierten Protoplasten für einen Transaktivierungsassay eingesetzt werden wurden sie in je 20 mL auf 4°C vorgekühlte 240 mM CaCl_2 -Lösung gegeben und pelletiert (Heraeus Multifuge 3S-R, 1200 upm, 4°C, 10 min). Die Protoplasten wurden in einem Restvolumen von je 1 mL resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Transfektionsansätze wurden pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, 13.000 upm, RT, 1 min), der Überstand entfernt und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert.

2.2.8.1.5. Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten

Für die Extraktion der in transfizierten Protoplasten enthaltenen Proteine wurden die sedimentierten Protoplasten in einem gekühlten Metallbrett aufgetaut und in 750 μL Luziferase-Extraktionspuffer resuspendiert. Die Protoplasten wurden anschließend mechanisch aufgeschlossen (*Vortexen*, 30 sec). Die Zelltrümmer wurden pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 10 min) und der Überstand weiter für die Proteinquantifizierung, die Luziferase-Aktivitäts- und die Glukoronidase-Aktivitäts-Bestimmung verwendet.

2.2.8.1.6. Proteinbestimmung nach Bradford

(nach Bradford 1976)

Für die Messung der Proteinkonzentration wurden 10 μL des Proteinextraktes mit 200 μL des *Proteinassay-Reagenz* (BioRad; 1:5 mit Wasser verdünnt) in einer Mikrotiterplatte vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption des resultierenden Protein-Coomassie-Brilliant-Blau-Konjugates erfolgte bei 595 nm in einem Fluorimeter (BMG Labtech, Fluostar Optima). Die gemessenen Proteinkonzentrationen wurden durch einen Vergleich mit einer gleichbehandelten BSA-Eichreihe ermittelt.

2.2.8.1.7. Bestimmung der Luziferase-Aktivität

(nach Wood 1991)

Für die Luziferase-Aktivitäts-Bestimmung wurden 10 µL des Proteinextraktes mit 100 µL Luziferase-Substratlösung in einer weißen Mikrotiterplatte vermischt. Die Luminenszenz wurde direkt nach Substratzugabe über ein Zeitintervall von 10 sec in einem Fluorimeter (BMG Labtech, Fluostar Optima) bestimmt (Summe emittierter Photonen, RLU = *relative light units*).

2.2.8.1.8. Bestimmung der β-Glukoronidase-Aktivität

(nach Jefferson *et al.* 1986)

Die Bestimmung der β-Glukoronidase-Aktivität beruht auf der Umsetzung des Substrats 4-MUG (4-Methyl-Umbelliferyl-Glukoronid) und Messung des resultierenden fluoreszierenden Produkts 4-MU (4-Methyl-Umbelliferon). Für die Messung wurden 100 µL des Proteinextraktes mit 100 µL 4-MUG-Substratlösung in einer schwarzen Mikrotiterplatte vermischt und für 1 h im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die resultierende Fluoreszenz des 4-MU wurde in einem Fluorimeter (BMG Labtech, Fluostar Optima) in 20 minütigen Zeitintervallen bei 455 nm nach Anregung bei 366 nm bestimmt. Die umgesetzte Substrat-Menge wurde anhand einer 4-MU Eichreihe in GUS-Puffer verglichen.

2.2.8.1.9. Berechnung der Reporterogenaktivität

Zu Beginn wurde der Proteingehalt pro µL Protoplastenextrakt mit Hilfe einer BSA-Eichreihe bestimmt. Die gemessenen Werte der Luziferase-Aktivitäts-Bestimmung wurden in Bezug zur Proteinmenge im Protoplastenextrakt gesetzt und die spezifisch gemessene Luziferase-Aktivität LUC_i in $RLU \mu g^{-1} sec^{-1}$ angegeben. Die Berechnung der spezifischen β-Glukoronidase-Aktivität GUS_i [$\mu mol mg^{-1} min^{-1}$] erfolgte nach Formel (1).

$$(1) \quad GUS_i = \Delta A_{460nm} - ba \times 1100 \times 120 \text{ min} \times 1 \mu g \text{ Protein} \times 1000$$

ΔA_{460nm} = Mittelwert der Fluoreszenzänderung (20 – 40 min und 40 – 60 min)
a = Steigung, b = Ordinatenabschnitt der 4-MU Eichreihe

Zur Berechnung unterschiedlicher Transfektionseffizienzen, Protoplastenzahlen und weitere unbestimmbarer Faktoren wurde für jede einzelne Messung ein Korrekturfaktor F_i bestimmt (siehe Formel 2).

$$(2) \quad F_i = 1/n \times \text{LUC}_i / \text{LUC}_i \quad n = \text{Anzahl der Transfektionen}$$

Zur Berechnung der spezifischen β -Glukoronidase-Aktivität (spezifische korrigierte GUS-Aktivität GUS_{ki}) wurde Formel (3) angewendet.

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

Die einzelnen Transfektionsexperimente wurden bis zu sechsmal wiederholt, als spezifisch korrigierte GUS-Aktivität GUS' wurden hierfür die Mittelwerte der einzelnen GUS_{ki} -Werte berechnet. Der jeweils höchste und der niedrigste Wert eines Transfektionsexperiment-Blocks wurde für die Berechnung nicht berücksichtigt. Die GUS' -Werte ergeben sich aus Formel (4).

$$(4) \quad GUS' = 1/n \times GUS_{ki} \quad n = \text{Anzahl der Transfektionen}$$

Die Berechnung des Fehlers zwischen den Einzel-Messungen erfolgte gemäß der Standardabweichung.

2.2.8.1.10. At7 Transfektion zur Analyse von GFP-Fusionsproteinen

Wie oben bereits beschrieben wurde die At7-Zellsuspensionkultur auch verwendet um intrazelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen zu untersuchen. Für die Analyse wurden 10 μg des DNA-Expressionsplasmids in einem 50 μL Gesamtvolumen zur Transfektion eingesetzt. Die Gewinnung der Protoplasten und die Durchführung der Transfektionen erfolgte wie oben beschrieben. Die transfizierten Protoplasten wurden in B5-Medium und nicht in CaCl_2 -Lösung, wie bei Ko-Transfektionsexperimenten beschrieben, aufgenommen und direkt zur weiteren Analyse an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 5500 B) unter Verwendung eines GFP spezifischen Filters dokumentiert.

2.2.8.2. *N. tabacum* BY-2 Zellsuspensionkultur

Zur Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen wurde Expressionsplasmid-DNA transient, PEG vermittelt, in *N. tabacum* BY-2 Protoplasten transfiziert (modifiziert nach Schaefer *et al.* 1991).

2.2.8.2.1. Kultivierung der BY-2 Zellsuspensionkultur

Die Kultivierung der heterotrophen *N. tabacum* BY-2 Zellsuspensionskultur erfolgte wie beschrieben in Merkle *et al.* (1996) bei 26°C im Dunkeln unter Schütteln (Infors, 105 upm).

2.2.8.2.2. Gewinnung von BY-2 Protoplasten

Zur Protoplastierung wurden 20 mL einer 4 Tage kultivierten Zelllinie in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen anschließend sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 400 g, RT, 5 min). Die sedimentierten Zellen wurden in 25 mL Waschlösung aufgenommen und erneut sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 400 g, RT, 5 min) und folgend in 13 mL Verdaulösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine Petrischale überführt und anschließend im Dunkeln bei 26°C inkubiert.

2.2.8.2.3. Transfektion von BY-2 Protoplasten

Die Aufnahme von DNA in BY-2 Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. Hierzu wurden die inkubierten Protoplasten in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 100 g, RT, 5 min). Der Überstand wurde bis zu einem Volumen von 2 mL entfernt und die Protoplasten in diesem resuspendiert. Anschließend wurden die Protoplasten in 25 mL Waschlösung aufgenommen und erneut sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 100 g, RT, 5 min). Wiederholt wurde der Überstand bis zu einem Volumen von 2 mL entfernt und die Protoplasten in diesem resuspendiert. Nach Zugabe von 10 mL W5-Lösung wurden die Protoplasten sedimentiert (Heraeus Multifuge 1s, 100 g, RT, 5 min) und erneut in 5 mL W5-Lösung aufgenommen und anschließend für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (Heraeus Multifuge 1s, 100 g, RT, 5 min) wurden die sedimentierten Protoplasten in 10 mL MMM-Lösung, durch schrittweises pipettieren, aufgenommen gefolgt von einer erneuten Zentrifugation. Die sedimentierten Protoplasten wurden in ca. 4 mL Überstand resuspendiert (ungefähre Protoplastendichte: $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Für die Transfektion wurde 30 µg Plasmid-DNA in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 300 µL Protoplastensuspension vermischt. Anschließend wurde 300 µL PEG zugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Weiter wurden 10 mL W5-Lösung zugegeben, gefolgt von einer

Zentrifugation (Heraeus Multifuge 1s, 400 g, RT, 5 min). Die sedimentierten Protoplasten wurden in einem Volumen von 700 µL MS + Saccharose resuspendiert und anschließend über Nacht (waagrecht) im Dunkeln bei 26°C inkubiert.

2.2.8.2.4. Analyse von GFP-Fusionsproteinen

Die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen wurde unter Öl mit einem 63x Objektiv und einem *Laserscanning* Mikroskop (Leica, DM RE TCS4D), ausgestattet mit einem Argon-Krypton Laser (Absorption 488 nm, *Beam Splitter* 510nm, Detektion GFP 500 – 560 nm) und der Leica Scanware dokumentiert.

2.2.8.3. A. thaliana CK_UK Zellsuspensionskultur

Die ursprünglich aus *A. thaliana* Wurzelzellen generierte CK_UK Zellsuspensionskultur wurde für die Analyse von GFP-Fusionsproteinen verwendet. Die Transformation der Zellsuspensionskultur mit entsprechenden Expressionsplasmiden wurde transient durch *A. tumefaciens* vermittelt.

2.2.8.3.1. Kultivierung der CK_UK Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung der CK_UK Zellsuspensionskultur erfolgte wie in Jahns (2007) beschrieben. Die Zellen wurden bei 22,5°C im Dunkeln unter Schütteln (Infors, 105 upm) 1:4 mit MS-Medium (Gesamtvolumen 50 mL) verdünnt in Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Einmal wöchentlich wurde jede Zell-Linie 1:4 in neues MS-Medium überführt.

2.2.8.3.2. Agrobakterien-vermittelte Transformation der CK-UK Zellsuspensionskultur

Für die transiente Transformation der CK_UK Zellsuspensionskultur wurde zunächst eine Übernackkultur (selektives YEP-Medium) mit einer *A. tumefaciens* Einzelkolonie (mit jeweiligem Expressionsplasmid) inokuliert. Die Bakterienzellen wurden sedimentiert (Eppendorf Zentrifuge, 3000 upm, RT, 15 min) und anschließend in 1 mL MS-Medium resuspendiert. Parallel wurden je 3 mL der 3 bis 7 Tage zuvor 1:4 verdünnten Zellsuspension in *6-well-plates* (Greiner) überführt. Für die Ko-Kultivierung wurden die in MS-Medium resuspendierten *A. tumefaciens* Bakterien und die Zellsuspensionskultur in einem Verhältnis von ca. 1:50 vermischt und 3 bis 5 Tage bei 22,5°C im Dunkeln unter Schütteln

(Heidolph, Unimax 1010, 120 upm) kultiviert. Die transient transformierten CK_UK Zellen wurden zur Dokumentation der GFP-Fusionsproteine mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 5500 B) unter Verwendung eines GFP-spezifischen Filters analysiert.

2.2.9. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Zur Analyse von *in vivo* Protein-DNA-Bindungen wurde im Laufe dieser Arbeit ein Protokoll für die Chromatin-Immunopräzipitation in *A. thaliana* etabliert. Die Etablierung sowie die Durchführung der Chromatin-Immunopräzipitation werden daher im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.10. ChIP-Sequencing: Genomweite Identifizierung DNA-assoziierter Proteine

Zur Identifizierung von *in vivo* Protein-DNA-Bindungen wurde die Chromatin-Immunopräzipitation mit massiver paralleler DNA Sequenzierung (Solexa[®] *Sequencing Technology*) kombiniert. ChIP angereicherte DNA Fragmente und somit die Protein-DNA-Bindestellen wurden mit dieser Sequenziertechnik und dem Illumina[®] Genome Analyzer_{II} identifiziert und quantifiziert. Nach der Chromatin-Immunopräzipitation wurden die erhaltenen DNA-Fragmente anhand einer PCR zunächst verifiziert indem diese auf die Amplifikation bekannter Bindestellen und Nicht-Bindestellen der zu untersuchenden Proteine analysiert wurden. Nach der Verifizierung wurde mit der Vorbereitung der Proben für die DNA-Sequenzierung begonnen.

2.2.10.1. Herstellung der DNA-Bibliothek

Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben mit Veränderungen durchgeführt (*Preparing Samples for ChIP Sequencing of DNA, Part #11257047 Rev. A, Illumina[®]*) Die „Enden“ der ChIP-angereicherten DNA-Fragmente wurden zunächst „repariert“. Die jeweiligen überstehenden 5'- und 3'-Enden der DNA-Fragmente wurden zu phosphorylierten glatten Enden konvertiert. Mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase, dem *E.coli* DNA Pol I Großem Fragment (Klenow Polymerase) und der T4 Polynukleotid-Kinase werden die Überstehenden 3'-Enden durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität entfernt und die 5'-Überhänge durch die Polymerase-Aktivität aufgefüllt. Für die Enzymreaktionen wurden 30 µL ChIP-angereicherte

DNA mit 10 µL Wasser, 5 µL T4 DNA Ligase Puffer (mit 10 mM ATP), 2 µL dNTP Mix, 1 µL T4 DNA Polymerase, 1 µL Klenow DNA Polymerase und 1 µL T4 Polynukleotid-Kinase vermischt und für 30 min bei 20°C inkubiert. Anschließend wird die DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 34 µL EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Für die Vorbereitung der Adapter-Ligation müssen weiter „A“-Nukleotide an die glatten phosphorylierten 3'-Überhänge gekoppelt werden. Dieses wird durch die Polymerase-Aktivität des Klenow Fragments 3'-5' *exo minus* katalysiert. Die zuvor in 34 µL eluierte DNA wurde hierzu mit 5 µL Klenow Puffer, 10 µL dATP und 1 µL Klenow Fragment 3'-5' *exo minus* vermischt, für 30 min bei 37°C inkubiert (Thermoblock, BIOER) und anschließend mit dem Qiagen *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 10 µL EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Als Vorbereitung der Hybridisierung der DNA-Fragmente mit der *flow cell* müssen die „Adapter“ an die DNA-Fragmente ligiert werden. Die zuvor in 10 µL eluierte DNA wird mit 15 µL DNA Ligase Puffer, 1 µL 1:10 verdünntem Adapter Oligo Mix und 4 µL DNA Ligase vermischt, für 15 min bei RT inkubiert und weiter mit dem Qiagen *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 10 µL EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Um überschüssige „Adapter“ zu entfernen und eine Größenselektion der DNA-Fragmente durchzuführen wird die DNA auf ein 2%iges Agarosegel (*Certified™ Low Range Ultra Agarose*, BioRad; in 1x TAE; mit *SYBR® SAFE DNA gel stain*, Invitrogen) aufgetragen und elektrophoretisch für 2 h bei 120 V aufgetrennt. Die zuvor in 10 µL eluierte DNA wird hierzu mit 5 µL 5x *GelPilot Loading Dye* (Qiagen) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde die 100 bp DNA Leiter (Roche Marker XIV) verwendet. Anschließend wurde das Agarosegel auf einem *Dark Reader Transilluminator* betrachtet und 3 unterschiedliche Größenfraktionen (200-300 bp, 300-400 bp und 400-500 bp) aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde weiter mit dem Qiagen *Gel Extraction Kit* extrahiert und in 36 µL EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Die eluierte DNA wurde folgend in eine PCR eingesetzt, indem sie mit 10 µL 5x *PHUSION™* Puffer, 1,5 µL dNTP Mix, 1 µL PCR Primer 1.1, 1 µL PCR Primer 2.1 und 0,5 µL *PHUSION™ HIGH FIDELITY DNA POLYMERASE* vermischt und dem gezeigten Schema amplifiziert wurde:

Schritt	PHUSION™-Polymerase		
	Zeit	Temp	Zyklen
Aktivierung	30 sec	98°C	1
Denaturierung	10 sec	98°C	
<i>Annealing</i>	30 sec	65°C	20
Elongation	30 sec	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1
Kühlen	∞	4°C	

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit dem Qiagen *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 15 µL EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Zur Validierung der hergestellten DNA-Bibliothek wurde 1 µL mit dem 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) und dem *High Sensitivity DNA Assay* auf die Größenverteilung, die Reinheit und die Konzentration der DNA untersucht. Zusätzlich wurde die Konzentration der DNA mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit und einem Tecan Infinite® 200 Pro Plattenlesegerät für die exakte Konzentrationseinstellung der DNA bestimmt.

2.2.10.2. Cluster-Generierung

Für die *Cluster*-Generierung wurde isolierte DNA der Größenfraktion 400-500 bp eingesetzt. Die Hybridisierung der hergestellten DNA-Bibliothek auf die *Flow Cell* und die Amplifizierung der Proben für die spätere Sequenzierung auf dem *Genome Analyzer_{IIx}* wurde mit dem *Cluster Generation Kit v5* (Illumina) auf der *Cluster Station* (Illumina) laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden für die Sequenzierung auf 9 pM eingestellt.

2.2.10.3. Single-Read Sequenzierung mit dem Genome Analyzer_{IIx}

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde mit dem *TrueSeq SBS Kit v5* nach Herstellerangaben (Rezept-Version 8) für einen Standard 36 bp *Single-Read*-Lauf auf dem *Genome Analyzer_{IIx}* (Illumina) durchgeführt.

2.2.10.4. Analyse der ChIP-seq Daten

Die Sequenz *Reads* der einzelnen *Lanes* wurden mit SARUMAN (Blom *et al.* 2011) gegen die TAIR9 *Arabidopsis thaliana* Genom-Annotation von Tobias Jakobi und Jochen Blom mit einem zugelassenen Fehler von bis zu 2 falschen Nukleotiden gemappt. Nur einmalig im Genom gemappte *Reads* wurden für die weiteren Analysen eingesetzt. Der Output der Analyse-Pipeline wurde in das

Wiggle Dateiformat konvertiert um Bindeprofile im *Intergrative Genomics Viewer* zu visualisieren (Robinson *et al.* 2011).

Die *Peak Finder* Software PeakRanger (v1.14) wurde mit geänderten Parametern (P value $1e^{-10}$ und einer *Read Extension Length* von 600 bp) für die *Peak* Detektion verwendet (Feng *et al.* 2011).

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden regulatorische Netzwerke von Flavonoidbiosynthese-assoziierten Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Hierbei handelt es sich um die Kofaktor unabhängige Regulation der Flavonolbiosynthese durch PFG Transkriptionsfaktoren, sowie die MBW-abhängige Regulation der Anthocyanbiosynthese. Ein Ziel dieser Arbeit war es die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation zu etablieren um die Basis für die genomweite Analyse der *in vivo* DNA-Bindungsstellen von PAP1 (*At1g56650*), TT8 (*At4g09820*) und EGL3 (*At1g63650*) sowie PFG1 (*At2g47460*), PFG2 (*At3g62610*) und PFG3 (*At5g49330*) in Kombination mit massiver paralleler Sequenzierung (ChIP-seq) zu schaffen. In Kooperation mit Herrn Dr. Ingo Appelhagen wurde der Locus *TT17* charakterisiert und als ein weiteres *AtLDOX* Allel beschrieben. Des Weiteren wurde das bekannte regulatorische Netzwerk der PFG Transkriptionsfaktoren durch *in vitro* Promotorbindungsstudien an Promotoren von UDP-abhängigen Glykosyltransferasen erweitert. Ein bereits bestätigtes PFG Zielgen (*PFT1*, *At5g62210*) wurde in ersten Pilotexperimenten weiterführend charakterisiert.

3.1. CHIP-seq basierte Identifizierung genomweiter *in vivo* DNA-Bindestellen von PAP1, TT8 und EGL3

3.1.1. Etablierung der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation hat in den letzten Jahren eine immer größere Anwendung erfahren um die Lokalisation von *in vivo* Bindestellen von Transkriptionsfaktoren, Histonen oder anderen Proteinen zu untersuchen. Obwohl die Methode im Prinzip einer simplen Vorgehensweise folgt besitzt sie jedoch mehrere limitierende Eigenschaften und muss für jedes biologische Material optimiert werden um ChIP angereicherte DNA zu extrahieren. So kommt der Wahl eines entsprechenden Antikörpers eine besondere Rolle zuteil, indem

vor allem die Affinität für das zu erkennende Protein als auch die Qualität des Antikörpers ausschlaggebend für ein erfolgreiches ChIP-Experiment sind. Aber auch die Fixierung der Protein-DNA-Bindungen durch Formaldehyd, sowie die Chromatin-Extraktion, die Sonifizierung des isolierten Chromatins und die abschließende Immunopräzipitation stellen keine trivialen Versuchsdurchführungen dar. Nach einer langwierigen Optimierungsphase der unterschiedlichen Versuchsschritte wurde ein Protokoll für die Chromatin Immunopräzipitation entwickelt und etabliert. Spezifische Antikörper für PAP1, TT8 und EGL3 standen kommerziell nicht zur Verfügung und auch eine Herstellung spezifischer Antikörper wurde ausgeschlossen. Um die *in vivo* Protein-DNA-Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren auf genomweiter Ebene zu untersuchen wurden GFP-Transkriptionsfaktor Fusionen generiert und ein universell einsetzbarer polyklonaler α -GFP Antikörper (ab290, Abcam) für die Immunopräzipitation verwendet. Durch den Einsatz eines polyklonalen α -GFP Antikörpers wurde einerseits sichergestellt, dass mehrere Epitope des GFP erkannt und gebunden werden und weiter das eine Optimierung durch die Verwendung dieses Antikörpers für die ChIP vereinfacht wurde. Das benutzte Pflanzenmaterial, welches nicht in dieser Arbeit generiert wurde ist in Abschnitt 2.1.6.4. aufgelistet. Zusätzlich zu diesen transgenen Pflanzen, die die GFP-Transkriptionsfaktor Fusionen unter dem jeweiligen nativem Promotor exprimieren wurden weitere Pflanzen generiert die die Fusionsproteine unter einem *CaMV 35S* Überexpressionspromotor exprimieren, um die Transkriptmengen zu erhöhen und dadurch indirekt die Effizienz der Immunopräzipitation zu steigern. Hierzu wurde der ORF des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors in translationaler Fusion mit dem ORF des mGFP6 unter der Kontrolle des konstitutiven 35S Überexpressionspromotors aus *CaMV* in das korrespondierende Nullallel stabil transformiert. Die entsprechenden T1-Pflanzen wurden auf hygromycinhaltigen Germinations Medium- (GM) Platten für das Transgen selektioniert, wobei die Anwesenheit des Transgens zusätzlich durch eine Polymerasekettenreaktion bestätigt wurde (nicht gezeigt). Die aus der Selektion hervorgegangenen T2-Linien wurden auf eine Komplementation des Wildtyps phänotypisch analysiert (Abb. 3.1.).

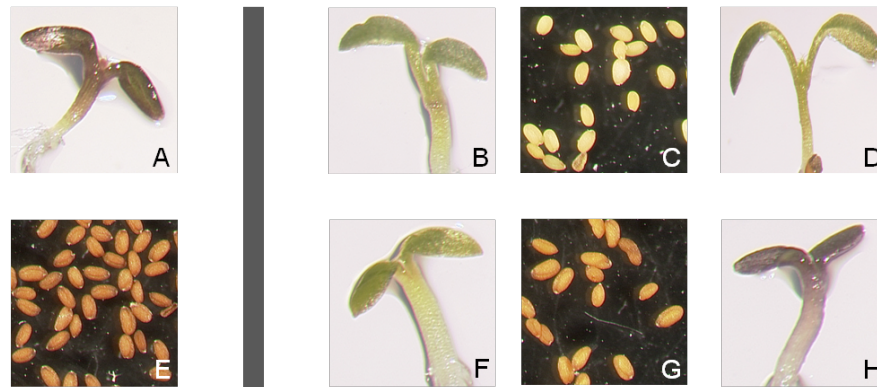


Abbildung 3.1. Phänotypische Komplementationsanalyse transgener Linien. Die Abbildung zeigt Col-0 Samen und Keimlinge (5 DAG) sowie T2-Samen und -Keimlinge (5 DAG) transgener Linien. Bild A und E: Col-0 Keimlinge und Samen. B: *pap1* (PST16228), F: *pap1-CaMVPro_{35S}::GFP:PAP1*, C: *tt8-1* (GK241D05), G: *tt8-1-CaMVPro_{35S}::TT8:GFP*, D: *egl3* (GK483D04), H: *egl3-CaMVPro_{35S}::GFP:EGL3*.

Zur Kontrolle der phänotypischen Komplementationsanalyse wurden jeweils Keimlinge und Samen des Wildtyps und der Null-Allele mit angezogen. Der Wildtyp-Phänotyp von Col-0 Keimlingen, angezogen auf Saccharose-haltigem Medium (4%), zeigte die typische Anthocyanakkumulation fünf Tage nach Keimung (siehe Abb. 3.1.A). Die Wildtyp Samen zeigten den normalen braunen Samenphänotyp (siehe Abb. 3.1.E.). Die angezogen Transkriptionsfaktor Null-Allele zeigten jeweils das Ausbleiben der Anthocyane im Keimling oder einen gelben (*Transparent Testa*) Samenphänotyp (siehe Abb. 3.1.B, C und D). Nach erfolgter Transformation und Selektion der T1-Pflanzen konnten die Null-Allele *tt8-1* und *egl3* erfolgreich komplementiert werden. Transgene Samen (*tt8-1-CaMVPro_{35S}::TT8:GFP*) zeigten wie Wildtypen einen braunen Samenphänotyp (siehe Abb. 3.1.G.). Bei transgenen Keimlingen (*egl3-CaMVPro_{35S}::GFP:EGL3*) konnte hingegen wieder die Saccharose-induzierte Anthocyanakkumulation fünf Tage nach Keimung beobachtet werden. Das Null-Allel *pap1* (Nössen (Nö) Hintergrund; zeigt nur in einem schmalen Ring um das Hypokotyl eine Saccharose-induzierte Anthocyanakkumulation; Nö in Abb. 3.1. nicht gezeigt) konnte mit dem transformierten Fusionskonstrukt unter *CaMV 35S* Überexpressionskontrolle nicht komplementiert werden (siehe Abb. 3.1.F). Für die Durchführung eines ChIP Experiments stehen somit transgene Linien für Fusionskonstrukte mit TT8 und EGL3 unter *CaMV 35S* Überexpressionskontrolle zur Verfügung.

3.1.1.1. Etablierung der Formaldehydfixierung des Pflanzenmaterials (*Crosslinking*)

Um die Protein-DNA-Bindungen in lebenden Zellen zu fixieren (*Crosslinking*) werden Keimlinge mit einer Formaldehydlösung durch Vakuum infiltriert. Um das *Crosslinking* zu optimieren wurden unterschiedliche Mengen Formaldehyd für die Fixierung eingesetzt und die Fixierung der Proben anschließend wieder gelöst oder nicht (*Decrosslinking*, DC). Anschließend wurde die DNA mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die Proben mit und ohne *Decrosslinking* der unterschiedlichen Formaldehydkonzentrationen wurde anhand eines 1%igen Agarosegels semi-quantitativ auf die isolierte DNA-Mengen untersucht (Abb 3.2.).

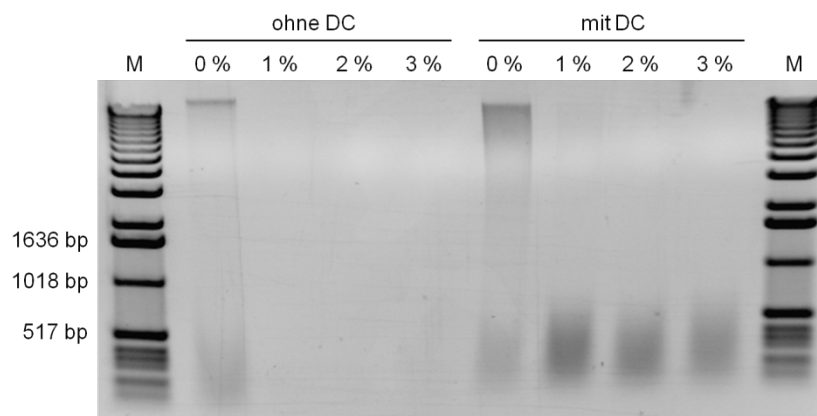


Abbildung 3.2. Untersuchung der *Crosslinking*-Effizienz. 6 Tage alte Col-0 Keimlinge wurden in 1xPBS Puffer mit unterschiedlicher Formaldehydkonzentration (0 – 3 %) unter Vakuuminfiltration fixiert und die isolierte genomische DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Analyse wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert. Die Fixierung wurde gelöst (mit DC) oder nicht (ohne DC). M: 1 kb Größenstandard.

Die Abbildung 3.2. zeigt das DNA aus den Proben die ohne Formaldehyd (0%) fixiert wurden isoliert werden konnte. In beiden Proben, mit und ohne DC, ist deutlich die isolierte Gesamt-DNA zu erkennen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass ein DC für die Isolierung von DNA aus Formaldehyd-fixiertem Keimlingen (1 % - 3 %) essentiell ist. In allen Proben (1 % - 3 %) mit DC konnte DNA isoliert werden. Mit zunehmender Formaldehydkonzentration (2 % - 3 %) nimmt die Effizienz der DNA-Isolierung im Vergleich zur Fixierung mit einer 1 %igen Formaldehydlösung ab.

3.1.1.2. Etablierung der Sonifizierungseffizienz des isolierten Chromatins

Ein weitere wichtiger Schritt bei der ChIP ist die Ultraschallbehandlung (Sonifizierung) des isolierten Chromatins. Die Sonifizierung wurde mit dem Bioruptor™ UCD-200 TM mit Wasserkühlung (Temperatur $\leq 10^{\circ}\text{C}$; BioAcc-Cool) (Diagenode) in 1,5 mL *Micro Tubes TPX* (Diagenode) durchgeführt. Für die Optimierung wurden unterschiedliche Einstellungen getestet. So wurde zum einen mit unterschiedlichen Intensitäten, Zeitintervallen und Zyklenanzahlen sonifiziert. Nach Abschluß der Optimierungsphase wurden folgende Einstellungen für die Sonifizierung des isolierten Chromatins festgelegt (*Power: High*, *Zeit: 12 min*, *0,5 min ON / 1 min OFF* (8 Zyklen), siehe Abbildung 3.3.)

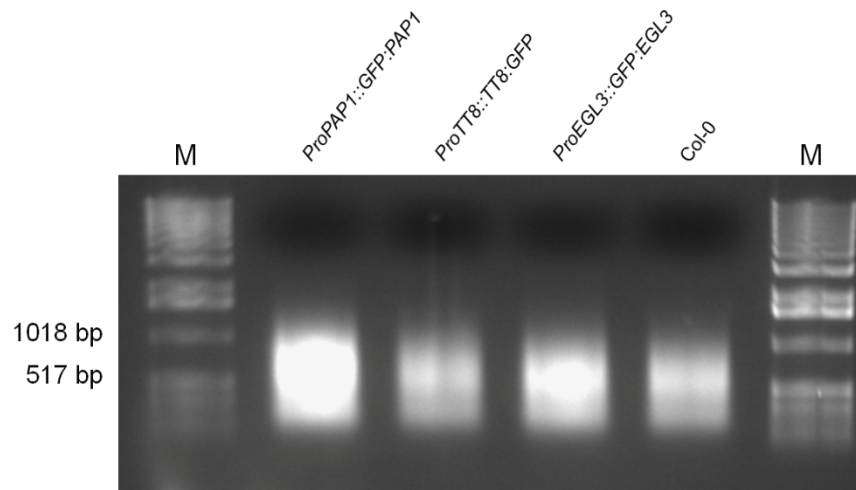


Abbildung 3.3. Sonifizierung des isolierten Chromatins. Isoliertes Chromatin aus transgenem Keimlingsgewebe (*Pro_{PAP1}::GFP:PAP1*, *Pro_{TT8}::TT8:GFP* und *Pro_{EGL3}::GFP:EGL3*) sowie Col-0 Keimlingen wurde mit dem Bioruptor™ UCD-200 TM zu Fragmenten mit einer Größe von 200 – 800 bp geschert. Die gescherte DNA wurde isoliert und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. M: 1 kb Größenstandard.

Wie in Abbildung 3.3. gezeigt wurde isoliertes Chromatin aus unterschiedlichen Keimlingsgeweben mit oben genannten Einstellungen auf einen Größenbereich zwischen 200 und 800 bp sonifiziert.

3.1.1.3. Versuchsdurchführung der Chromatin-Immunopräzipitation

3.1.1.3.1. Formaldehydfixierung

Für die Formaldehydfixierung wurden Keimlinge (5 DAG) geerntet (4-6 ½ MS-Platten, vollständig mit Keimlingen überzogen) und sofort in 50 mL 1x PBS überführt. Eine 37 %ige Formaldehydlösung wurde zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Die Keimlinge in 50 mL PBS mit 1 % Formaldehyd wurden im Exsikator für 5 min Vakuuminfiltiert. Anschließend wurde der Exsikator belüftet, die Keimlinge vermischt und wiederum für 5 min Vakuuminfiltiert. Nach erneutem Belüften wurde Glycin zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugegeben, die Keimlinge vermischt und für weitere 3 min Vakuuminfiltiert. Nach diesem *Quenching* wurde das Formaldehydfixierte Pflanzenmaterial gefiltert (2-lagige Faltenfilter; MN 615 ¼ Ø 185 mm, Macherey-Nagel), mit einem weiteren Faltenfilter getrocknet, in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.1.3.2. Kernextraktion

Das fixierte Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in einen vorgekühlten 50er Falcon mit 30 mL NIB überführt und sofort mehrmals invertiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein 70 µm (obere Lage) und 20 µm (untere Lage) Nylongewebe (Hartenstein) in einen neuen vorgekühlten 50er Falcon gefiltert. Das Volumen wurde wieder auf 30 mL mit NIB aufgefüllt. Die Suspension wurde anschließend sedimentiert (Heraeus Multifuge 3SR, 1790g, 4°C, 20 min, *Swing-Out-Rotor*). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 mL Wasch-Puffer resuspendiert und mit Wasch-Puffer auf 20 mL aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3SR, 1790g, 4°C, 20 min, *Swing-Out-Rotor*) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1 mL TE mit 0,5 % SDS resuspendiert und in ein vorgekühltes 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend für 20 min auf einem *Bohemian Wheel* im Kühlraum (4°C) inkubiert.

3.1.1.3.3. Sonifizierung des isolierten Chromatins

Zur Sonifizierung wurden die Proben auf drei vorgekühlte 1,5 mL TPX Reaktionsgefäße (je 300 µL) aufgeteilt und bis zur Sonifizierung auf Eis gehalten. Die Sonifizierung wurde mit dem Bioruptor™ UCD-200 TM mit Wasserkühlung (Temperatur $\leq 10^{\circ}\text{C}$; BioAcc-Cool) (Diagenode) mit den Einstellungen *POWER: High*, Zeit: 12 min, 0,5 min *ON* / 1 min *OFF* durchgeführt. Es wurde während der Sonifizierung des isolierten Chromatins Schaumbildung vermieden. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C , 15 min). Die Überstände der auf drei 1,5 mL TPX Reaktionsgefäße aufgeteilten Proben wurden in einem neuen vorgekühlten 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt. Für die Überprüfung der Sonifizierungseffizienz wurden 50 µL des Chromatins in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß mit 150 µL TE überführt. Anschließend wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese können für mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

3.1.1.3.4. Überprüfung der Sonifizierungseffizienz

Zur Überprüfung der Sonifizierungseffizienz wurden zu den zuvor abgenommen 50 µL des Chromatins in 150 µL TE zum *Decrosslinking* 2,5 µL Proteinase K [10 mg/mL] zugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden für 6-8 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert. DNA wurde mit Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanolfällung isoliert. Die isolierte DNA wurde in 100 µL Lichrosolv (Merck) gelöst und 20 µL der Probe, vermischt mit 5 µL Ladepuffer), auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei einer Spannung von ca. 10 Volt/cm. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht-Bestrahlung an einem Videodokumentationssystem (INTAS). Für die Größenabschätzung wurden eine *1 kb Ladder* (Invitrogen) und eine *100 bp Ladder* (NEB) verwendet.

3.1.1.3.5. Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen

Für die Immunopräzipitation der fixierten Protein-DNA Komplexe wurde das gelagerte (-70°C) Chromatin zunächst auf Eis aufgetaut. 50 – 200 µL des sonifizierten Chromatins (Volumen ggf. mit TE auf 200 µL auffüllen) wurden mit 300 µL IP Verdünnungspuffer vermischt und je 1 µL 1 M DTT, 1 µL *Plant*

Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) und 1 μL RNase [10 mg/mL] zugegeben. Je nach verwendetem Antikörper wurden 1 - 5 μL Antikörpersuspension zugegeben ($\alpha\text{-GFP}$ Antikörper (ab290, Abcam): 1 μL , $\alpha\text{-IgG}$ Antikörper (ab46540, Abcam): 5 μL , $\alpha\text{-H3}$ Antikörper (ab1791, Abcam): 5 μL). Anschließend wurden die Proben über Nacht im Kühlraum (4°C) auf einem *Bohemian Wheel* inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 15 min) und der Überstand, ohne das kleine Präzipitat, in neue vorgekühlte 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt. In der Zwischenzeit wurden die *Salmon Sperm DNA / Protein A Agarose Beads* (# 16-157, Millipore) vorbereitet. Hierzu wurden 20 μL der *Beads* pro Probe in ein vorgekühltes 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß gegeben (Pipettenspitze mit weiter Öffnung). Die *Beads* wurden anschließend dreimal mit je 1 mL RIPA gewaschen (Pipettenspitze mit weiter Öffnung) (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 3.000 upm, 4°C, 1 min). Anschließend wurden die *Beads* in einem Volumen RIPA aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Je 30 μL der vorbereiteten *Beads* wurden zu den Proben gegeben (Pipettenspitze mit weiter Öffnung) und diese für 1 – 2 h im Kühlraum (4°C) auf einem *Bohemian Wheel* inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 4°C, 1 min) und der Überstand der Probe, behandelt mit dem $\alpha\text{-IgG}$ Antikörper (ab 46540, Abcam), wurde in ein neues vorgekühltes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten (= *Input* Kontrolle). Die Überstände der restlichen Proben wurde verworfen. Die Proben (=“*Beads*“: *Beads*-Antikörper-Protein/DNA-Komplexe) wurden weiter 4x mit je 1 mL eiskaltem RIPA gewaschen (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 3.000 upm, 4°C, 1 min). Die gewaschen „*Beads*“ wurden in je 800 μL RIPA aufgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Pipettenspitze mit weiter Öffnung) überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 3.000 upm, 4°C, 1 min) und der Überstand wurde entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 3.000 upm, 4°C, 1 min) wurde der restliche Überstand verworfen und zu den „*Beads*“ jeweils 200 μL Glycin Elutionspuffer gegeben, gevortext und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13.000 upm, 1 min). 1,5 mL Reaktionsgefäße mit je 100 μL Tris-HCl (pH 9,7) wurden währenddessen vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Die „*Beads*“ wurden anschließend wieder mit

200 μ L Glycin Elutionspuffer vermischt, gevortext und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 3.000 upm, 1 min). Der Überstand wurde jeweils zu den schon fertigen Proben gegeben (Endvolumen = 500 μ L).

3.1.1.3.6. Decrosslinking und DNA-Extraktion

Zur Isolierung der DNA aus immunopräzipitierten Protein-DNA Komplexen und der *Input*-Kontrollen wurde zunächst ein Decrosslinking über Nacht durchgeführt. Hierzu wurden die immunopräzipitierten Proben zunächst mit 10 μ L 10%iger SDS-Lösung vermischt. Anschließend wurden je 2,5 μ L Proteinase K [10 mg/mL] zugegeben und die Proben für 6-8 h bei 37°C inkubiert. Weiter folgte eine Inkubation über Nacht bei 65°C. Für das DC der *Input*-Kontrollen wurden je 200 μ L des *Inputs* in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und mit je 2,5 μ L Proteinase K [10 mg/mL] vermischt. Die Proben wurden 6-8 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert. Die DNA aus den Proben wurde mittels Phenol/Chloroform Extraktion mit folgender Ethanol-Fällung isoliert und in 50 μ L Lichrosolv (Merck) aufgenommen.

3.1.2. CHIP-PCR: Analyse präzipitierter DNA mit Hilfe der PCR

Um zu Überprüfen welche DNA Fragmente präzipitieren, wurde zunächst die vom präzipitierten Chromatin isolierte DNA mittels PCR analysiert. Hierzu wurde als bekannte Zielsequenz ein Teil des *DFR* Promotors gewählt. Diese Teilsequenz enthält die *cis*-regulatorischen Elemente *MRE* und *RRE*, welche die DNA-Bindemotive für die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren PAP1 und TT8 darstellen (in Abb.3.4. nur für den *DFR* Promotor gezeigt). Ein *RRE* für EGL3 wurde bisher nicht identifiziert. Während des Primerdesigns wurde darauf geachtet eine Amplikongröße von ≤ 250 bp einzuhalten um die Primer auch für eine quantitative *real-time* PCR einsetzen zu können. Als Kontrollregion (*ACT2/7*, *At5g09810*) wurde ein Sequenzabschnitt gewählt der nicht im Zusammenhang mit der regulatorischen Wirkung von PAP1, TT8 und EGL3 verbunden ist (nicht gezeigt).

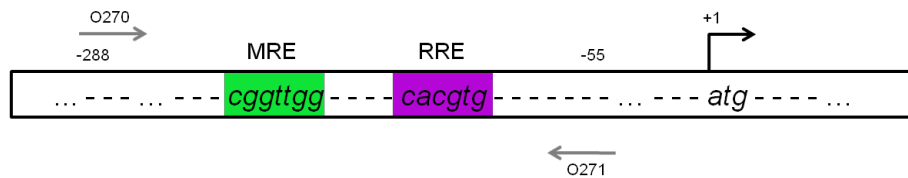


Abbildung 3.4. Struktur des *DFR* Promotors. Die Abbildung zeigt die Struktur des *DFR* Promotors. Der Translationsstart des Gens ist mit einem schwarzen abknickenden Pfeil und +1 gekennzeichnet. Das PAP1 *cis*-regulatorische Element (MRE) ist grün markiert und zeigt die DNA-Bindesequenz. Das TT8 *cis*-regulatorische Element (RRE) ist violett markiert und zeigt ebenfalls die spezifische DNA-Bindesequenz. Durch die gegenläufigen grauen Pfeile wird die Lage der Oligonukleotid-Primer (O270 und O271) und somit das zu amplifizierende *PCR*-Produkt gekennzeichnet.

3.1.2.1. ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus *Pro_{PAP1}::GFP:PAP1* transgenen Keimlingen

Um präzipitierte DNA-Fragmente nach der Chromatin-Immunopräzipitation auf das Vorhandensein von bekannten Zielsequenzen des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktors PAP1 mittels PCR zu untersuchen, wurde geChIPte DNA der unterschiedlich präzipitierten Fraktionen und *Input*-Kontrollen als Probe eingesetzt. Hierzu wurden je 5 μL DNA der Proben präzipitiert mit dem α -H3, dem α -GFP und dem α -IgG Antikörper sowie der *Input*-Fraktion und einer Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) aus dieser eingesetzt. Als interne Negativkontrolle wurde zu gleichen Volumenanteilen Wasser dem *PCR*-Ansatz zugesetzt. Die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines Promotorabschnittes des *DFR* Gens, welcher das PAP1 *cis*-regulatorische Element als bekannte Zielsequenz des Transkriptionsfaktors enthält, sind in Abbildung 3.5. dargestellt.

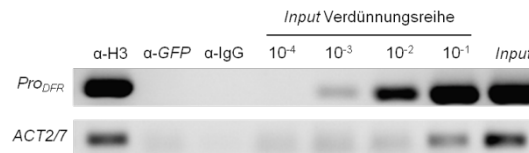


Abbildung 3.5. ChIP-PCR für *Pro_{PAP1}::GFP:PAP1*. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines *DFR* Promotorabschnitts und eines Bereiches des Gens *ACT2/7* unterschiedlich *geChIPter* DNA-Proben und *Input*-Kontrollen aus *Pro_{PAP1}::GFP:PAP1* transgenen Keimlingen. Je 5 μ L der PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. α -H3: DNA-Probe der ChIP-internen Positivkontrolle präzipitiert mit einem α -H3 Antikörper. α -GFP: DNA-Probe präzipitiert mit einem α -GFP Antikörper. α -IgG: DNA-Probe der ChIP-internen Negativkontrolle präzipitiert mit einem α -IgG Antikörper. *Input* und *Input*-Verdünnungsreihe: DNA Probe nicht präzipitierter ChIP-DNA und Verdünnungsreihe aus dieser Probe.

Die PCR interne Negativkontrolle (*NTC*) zeigte wie zu erwarten kein Produkt für den gewählten Promotorabschnitt des *DFR* Gens (nicht gezeigt). Die *Input*-Kontrollen (*Input* und *Input*-Verdünnungsreihe) zeigten jeweils bis auf die *Input*-Verdünnung 10^{-4} eine spezifische DNA-Bande von 233 bp für den amplifizierte Promotorabschnitt des *DFR* Gens. Mit Zunahme der Verdünnungsstufe ($10^{-1} > 10^{-2} > 10^{-3} > 10^{-4}$) nimmt die Akkumulation des zu amplifizierenden Promotorabschnittes ab. Die positiv Kontrolle für die ChIP (α -H3 Kontrolle) zeigte eine spezifische Bande von 233 bp. Das Experiment (DNA präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper), die Identifizierung einer bekannten Zielsequenz des Transkriptionsfaktors PAP1 lieferte ein negatives Ergebnis, hier wurde kein Produkt mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die unspezifische Negativ-Kontrolle (α -IgG) zeigte ebenfalls kein PCR-Produkt bei 233 bp. Um Kontaminationen während der ChIP-Versuchsdurchführung auszuschließen wurde eine weitere PCR durchgeführt in welcher ein DNA-Bereich (*ACT2/7*, *At5g09810*) amplifiziert wurde der nicht mit der regulatorischen Wirkung des Transkriptionsfaktors in Verbindung steht (siehe Abbildung 3.5.). Die positiv Kontrolle für die ChIP (α -H3 Kontrolle) zeigte eine spezifische Bande von 233 bp. Die PCR für *ACT2/7* auf der DNA-Probe präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper lieferte kein Amplifikat. Dieser Locus ist mit der regulatorischen Wirkung von PAP1 nicht assoziiert. Für die ChIP unspezifische α -IgG Kontrolle wurde ebenfalls keine Bande detektiert. Die *Input*-DNA Probe und die *Input*-Verdünnung (10^{-1}) zeigten je Banden für *ACT2/7* mit abnehmender Intensität in Übereinstimmung mit zunehmender Verdünnungsstufe.

Amplifikate von *ACT2/7* können in den Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.2. **ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus *Pro_{TT8}::TT8:GFP* und *Pro_{CaMV35S}::TT8:GFP* transgenen Keimlingen**

Für die Identifizierung einer bekannten Zielsequenz des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktors TT8 wurde ein Promotorabschnitt des *DFR* Gens amplifiziert, der das TT8 *cis*-regulatorische Element RRE enthält gewählt. Für die Identifizierung dieser TT8 Zielsequenz wurden geChIPte DNA-Proben der unterschiedlich präzipitierten Fraktionen und *Input*-Kontrollen mittels ChIP-PCR analysiert. Je 5 μ L geChIPte DNA (α -H3, α -GFP und α -IgG) sowie DNA der *Input*-Kontrolle und einer Verdünnungsreihe (10^{-1} – 10^{-4}) aus dieser wurden als Matrizen-DNA eingesetzt. Als PCR interne Negativkontrolle wurde zu gleichen Volumenanteilen Wasser dem PCR-Ansatz zugesetzt. Die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Identifizierung einer bekannten TT8 Zielsequenz aus *Pro_{TT8}::TT8:GFP* transgenen Keimlingen sind in Abbildung 3.6. dargestellt. Die durchgeführte interne PCR Negativkontrolle (*NTC*) zeigte kein Amplifikat bei 233 bp (nicht gezeigt). Die *Input*-Kontrolle zeigte für die amplifizierte Promotorsequenz des *DFR* Gens eine Bande bei 233 bp. Für die *Input*-Verdünnungsreihe waren ebenfalls Banden bei 233 bp zu erkennen. Mit zunehmender Verdünnungsstufe ($10^{-1} > 10^{-2} > 10^{-3} > 10^{-4}$) nimmt die Menge an amplifizierten PCR-Produkten ab, welches in einer abnehmenden Bandenintensität in den einzelnen Verdünnungsstufen resultiert. Die ChIP interne Positivkontrolle (α -H3) zeigte ein deutliches Amplifikat bei 233 bp. Die spezifische Probe, präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper, zeigte eine Bande (233bp) mit einer leicht höheren Intensität im Vergleich zur Verdünnungsstufe 10^{-3} . Die ChIP unspezifische α -IgG Kontrolle zeigte eine schwache Bande (233 bp) in etwa der Intensität der 10^{-4} Verdünnungsstufe. Im Vergleich zur spezifischen α -GFP Probe ist die Bandenintensität (=Amplifikatmenge) der unspezifischen α -IgG Kontrolle 10-fach erniedrigt.

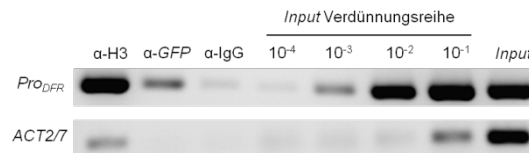


Abbildung 3.6. ChIP-PCR für *Pro_{TT8}::TT8:GFP*. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines *DFR* Promotorabschnitts und eines Bereiches des *ACT2/7* Gens unterschiedlich geChIPter DNA-Proben und *Input*-Kontrollen aus *Pro_{TT8}::TT8:GFP* transgenen Keimlingen. Je 5 μ L der PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. α -H3: DNA-Probe der ChIP-internen Positivkontrolle präzipitiert mit einem α -H3 Antikörper. α -GFP: DNA-Probe präzipitiert mit einem α -GFP Antikörper. α -IgG: DNA-Probe der ChIP-internen Negativkontrolle präzipitiert mit einem α -IgG Antikörper. *Input* und *Input*-Verdünnungsreihe: DNA Probe nicht präzipitierter ChIP-DNA und Verdünnungsreihe aus dieser Probe.

Um Kontaminationen während der ChIP-Versuchsdurchführung auszuschließen wurde eine weitere PCR durchgeführt in welcher ein DNA-Bereich (*ACT2/7*, *At5g09810*) amplifiziert wurde der nicht mit der regulatorischen Wirkung des Transkriptionsfaktors in Verbindung steht (siehe Abbildung 3.6.). Die interne PCR Negativkontrolle (*NTC*) zeigte keine Bande (nicht gezeigt). Ein DNA-Fragment des Gens *ACT2/7*, präzipitiert mit α -H3 Antikörper lässt sich amplifizieren. Die PCR für *ACT2/7* auf der DNA-Probe präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper lieferte kein Amplifikat. Dieser Locus ist mit der regulatorischen Wirkung von TT8 nicht assoziiert. Für die ChIP unspezifische α -IgG Kontrolle wurde ebenfalls keine Bande detektieren. Die *Input*-DNA Probe und die *Input*-Verdünnung (10^{-1}) zeigten je Banden für *ACT2/7* mit abnehmender Intensität in Übereinstimmung mit zunehmender Verdünnungsstufe. Amplifikate von *ACT2/7* können in den Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} nicht nachgewiesen werden.

Als weiteres Pflanzenmaterial für ein ChIP-Experiment dienten transgene Keimlinge die das Fusionsprotein von TT8 und GFP unter Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus-Promotors *CaMv35S* exprimieren. Die Ergebnisse der ChIP-PCR sind in Abbildung 3.7. dargestellt.

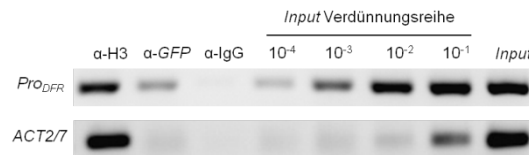


Abbildung 3.7. ChIP-PCR für *CaMvPro_{35S}::TT8:GFP*. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines *DFR* Promotorabschnitts und eines Bereiches des *ACT2/7* Gens unterschiedlich geChIPter DNA-Proben und *Input*-Kontrollen aus *CaMvPro_{35S}::TT8:GFP* transgenen Keimlingen. Je 5 μ L der PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. α -H3: DNA-Probe der ChIP-internen Positivkontrolle präzipitiert mit einem α -H3 Antikörper. α -GFP: DNA-Probe präzipitiert mit einem α -GFP Antikörper. α -IgG: DNA-Probe der ChIP-internen Negativkontrolle präzipitiert mit einem α -IgG Antikörper. *Input* und *Input*-Verdünnungsreihe: DNA Probe nicht präzipitierter ChIP-DNA und Verdünnungsreihe aus dieser Probe.

Die technischen PCR Negativkontrollen (*NTC*) zeigten keine Amplifikate für die durchgeführten PCR-Reaktionen (nicht gezeigt). Die Ergebnisse gleichen den in Abb 3.6. für *Pro_{TT8}::TT8:GFP* dargestellten. Abweichend zeigte die ChIP unspezifische α -IgG Kontrolle kein Amplifikat. Die spezifische Probe, präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper, zeigte eine Bande (233bp) mit einer leicht höheren Intensität im Vergleich zur Verdünnungsstufe 10^{-4} .

3.1.2.3. ChIP-PCR: Analyse geChIPter DNA aus *Pro_{EGL3}::GFP:EGL3* und *Pro_{CaMV35S}::GFP:EGL3* transgenen Keimlingen

Für die Identifizierung eines bekannten Zielgens des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktors EGL3 wurde ein Promotorabschnitt -288 bis -55 nt relativ zum Translationsstart des *DFR* Gens gewählt. Für die Identifizierung wurden geChIPte DNA-Proben der unterschiedlich präzipitierten Fraktionen und *Input*-Kontrollen mittels ChIP-PCR analysiert. Je 5 μ L geChIPte DNA (α -H3, α -GFP und α -IgG) sowie DNA der *Input*-Kontrolle und einer Verdünnungsreihe (10^{-1} – 10^{-4}) aus dieser wurden als Matrizen-DNA eingesetzt. Als PCR interne Negativkontrolle wurde zu gleichen Volumenanteilen Wasser dem PCR-Ansatz zugesetzt. Die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Identifizierung eines bekannten EGL3 Zielgens sind in Abbildung 3.8. dargestellt.

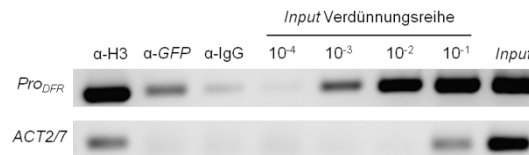


Abbildung 3.8. ChIP-PCR für *Pro_{EGL3}::GFP:EGL3*. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines *DFR* Promotorabschnitts und von *ACT2/7* unterschiedlich geChIPter DNA-Proben und *-Input*-Kontrollen aus *Pro_{EGL3}::GFP:EGL3* transgenen Keimlingen. Je 5 μ L der PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. α -H3: DNA-Probe der ChIP-interne Positivkontrolle präzipitiert mit einem α -H3 Antikörper. α -GFP: DNA-Probe präzipitiert mit einem α -GFP Antikörper. α -IgG: DNA-Probe der ChIP-internen Negativkontrolle präzipitiert mit einem α -IgG Antikörper. *Input* und *Input*-Verdünnungsreihe: DNA Probe nicht präzipitierter ChIP-DNA und Verdünnungsreihe aus dieser Probe.

Die interne PCR Negativkontrolle (*NTC*) zeigte kein Amplifikat bei 233 bp (nicht gezeigt). Die *Input*-Kontrolle zeigte für die amplifizierte Promotorsequenz des *DFR* Gens eine Bande bei 233 bp. Für die *Input*-Verdünnungsreihe waren ebenfalls Banden bei 233 bp zu erkennen. Mit zunehmender Verdünnungsstufe ($10^{-1} > 10^{-2} > 10^{-3} > 10^{-4}$) nimmt die Menge an amplifizierten PCR-Produkten ab, welches in einer abnehmenden Bandenintensität in den einzelnen Verdünnungsstufen resultiert. Die ChIP interne Positivkontrolle (α -H3) zeigte ein deutliches Amplifikat bei 233 bp. Die spezifische Probe, präzipitiert mit dem α -GFP Antikörper, zeigte eine Bande (233bp) mit einer geringeren Intensität im Vergleich zur Verdünnungsstufe 10^{-3} . Die ChIP unspezifische α -IgG Kontrolle zeigt eine schwache Bande (233 bp) in etwa der Intensität der 10^{-4} Verdünnungsstufe. Im Vergleich zur spezifischen α -GFP Probe ist die Amplifikatmenge der unspezifischen α -IgG Kontrolle 10-fach erniedrigt. Als Kontrolle wurde für die gleichen DNA-Proben PCR Reaktionen für *ACT2/7* durchgeführt (siehe Abb. 3.8.). Die durchgeführte interne Negativkontrolle zeigte keine Band (nicht gezeigt). Der Bereich des Gens kann auf DNA, präzipitiert mit dem α -H3 Antikörper und auf der nicht-präzipitierten Input-DNA und der 10^{-1} Verdünnung aus dieser, amplifiziert werden. Die PCRs für die DNAs präzipitiert mit dem α -GFP und α -IgG Antikörper zeigen kein sichtbares Produkt. Für die *Input*-Verdünnungsstufen ($10^{-2} - 10^{-4}$) konnte ein Fragment des *ACT2/7* Gens ebenfalls nicht detektiert werden.

Als weiteres Pflanzenmaterial für ein ChIP-Experiment dienten transgene Keimlinge die das Fusionsprotein von EGL3 und GFP unter Kontrolle des 35S Überexpressionspromotors aus *CaMV* exprimieren. Für diese Linien wurde

ein ChIP-Experiment durchgeführt und die präzipitierten DNAs mit Hilfe der PCR analysiert. Die Ergebnisse der ChIP-PCR sind in Abbildung 3.9. gezeigt.

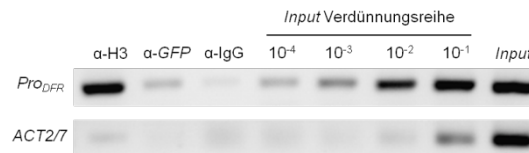


Abbildung 3.9. ChIP-PCR für *CaMVPro_{35S}::GFP:EGL3*. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der ChIP-PCR zur Amplifizierung eines *DFR* Promotorabschnitts und von *ACT2/7* unterschiedlich geChIPter DNA-Proben und *-Input*-Kontrollen aus *CaMVPro_{35S}::GFP:EGL3* transgenen Keimlingen. Je 5 µL der PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. α-H3: DNA-Probe der ChIP-interne Positivkontrolle präzipitiert mit einem α-H3 Antikörper. α-GFP: DNA-Probe präzipitiert mit einem α-GFP Antikörper. α-IgG: DNA-Probe der ChIP-internen Negativkontrolle präzipitiert mit einem α-IgG Antikörper. *Input* und *Input*-Verdünnungsreihe: DNA Probe nicht präzipitierter ChIP-DNA und Verdünnungsreihe aus dieser Probe.

Die technischen PCR Negativkontrollen (*NTC*) zeigten für die untersuchten genomischen Bereiche keine Amplifikate (nicht gezeigt). Die ChIP-PCR Ergebnisse gleichen den in Abb 3.8. für *Pro_{EGL3}::GFP:EGL3* dargestellten. Abweichend zeigte die ChIP unspezifische α-IgG Kontrolle kein Amplifikat für den *DFR* Promotorabschnitt. Die spezifische Probe, präzipitiert mit dem α-GFP Antikörper, zeigte eine Bande (233bp) mit einer ähnlichen Intensität im Vergleich zur Verdünnungsstufe 10⁻⁴. Die technische Positivkontrolle, DNA präzipitiert mit einem α-H3 Antikörper, zeigte ein schwaches Amplifikat für den amplifizierten Bereich des *ACT2/7* Gens.

3.1.3. Genomweite Identifizierung von DNA-Zielbindestellen der *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3

Um die *in vivo* DNA-Bindefähigkeit von TT8 und EGL3 genomweit zu untersuchen wurde die angewendete ChIP mit massiver paralleler Sequenzierung gekoppelt (ChIP-seq). Die per ChIP-PCR überprüften präzipitierten DNAs (siehe Tabelle 3.1.) wurden für die Sequenzierung auf dem *Genome Analyzer_{ix}* (Illumina) wie in Abschnitt 2.2.12. beschrieben vorbereitet (Konzentrationsbestimmung und Größenverteilung siehe Anhang 7.2.) und in einem Standard 36 bp *Single-Read*-Lauf sequenziert (*Flowcell ID*: 70C6NAAXX). Für das *Mapping* wurde der SARUMAN- (*Semiglobal Alignment of short Reads Using CUDA and NeedleMAN-Wunsch*, Blom *et al.* 2011) Ansatz gewählt. Das *Mapping* wurde mit

allen *Reads* gegen Sequenzen der Einzelchromosomen von *Arabidopsis thaliana* von Tobias Jakobi und Jochen Blom durchgeführt. Die erste bzw. letzte Base der 36er *Reads* wurden vor dem *Mapping in silico* entfernt. Für die Identifizierung von angereicherten Regionen wurde die *PeakRanger* Software (v.1.4.) verwendet (Feng *et al.* 2011). Der *cut-off* P-Wert wurde so gewählt, dass bereits bekannte Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren als signifikant identifiziert wurden. Die von der Software errechneten Bindeprofile im Wigggle Dateiformat wurden mit dem *Integrated Genomics Viewer* (IGV, Robinson *et al.* 2011) visualisiert.

Tabelle 3.1.: CHIP DNA Proben der zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren und die jeweilige Zuordnung auf der Flow-Cell.

Transkriptionsfaktor	DNA Probe	Flow-Cell Lane #
<i>PRO_{TT8}::TT8:GFP</i>	α-GFP	1
<i>PRO_{TT8}::TT8:GFP</i>	α-IgG	2
<i>PRO_{EGL3}::GFP:EGL3</i>	α-GFP	3
<i>PRO_{EGL3}::GFP:EGL3</i>	α-IgG	4
<i>PRO_{CaMV35S}::TT8:GFP</i>	α-GFP	6
<i>PRO_{CaMV35S}::TT8:GFP</i>	α-IgG	7
<i>PRO_{CaMV35S}::GFP:EGL3</i>	α-GFP	8

Die CHIP-seq Analyse der TT8- und EGL3-Bindestellen lieferte insgesamt zwischen 0,8 und 11,2 Millionen *Reads* die ohne Fehler einmalig im Referenzgenom gemappt wurden (siehe Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2.: Anzahl perfekt gemappter Reads und einmalig perfekt gemappter Reads im Referenzgenom der durchgeführten CHIP-seq Experimente. Die Daten beziehen sich jeweils auf eine Lane einer 8-Lane Flow-Cell.

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 6	Lane 7	Lane 8
# perfect mapped reads	27,7 x 10 ⁶	27,2 x 10 ⁶	49,1 x 10 ⁶	9,3 x 10 ⁶	87,1 x 10 ⁶	65,3 x 10 ⁶	94,7 x 10 ⁶
# uniquely mapped reads	3,2 x 10 ⁶ (12%)	2,5 x 10 ⁶ (9%)	6,1 x 10 ⁶ (12%)	0,8 x 10 ⁶ (9%)	11,2 x 10 ⁶ (13%)	6,1 x 10 ⁶ (9%)	9,7 x 10 ⁶ (10%)

Eine Visualisierung der *Read*-Verteilungen im *Arabidopsis thaliana* Genom für die perfekt *gemappten* Reads ($Pro_{TT8::TT8:GFP}$, α -GFP und α -IgG) zeigte im Bereich der Zentromerregionen massive *Read* alignments (siehe Abb 3.10.A). Diese Bereiche waren für die Identifizierung von *Peaks* mit dem *PeakRanger* (v.1.4., Feng *et al.* 2011) nicht analysierbar, daher wurde *in silico* im Datensatz mit allen perfekt *gemappten* Reads nach allen einmalig perfekt *gemappten* Reads gesucht und diese zu einem neuen Datensatz zusammengeführt. Eine Visualisierung der einmalig perfekt *gemappten* Reads im *Arabidopsis thaliana* Genom zeigte nur eine vereinzelte massive *Read*-Anreicherung in den Zentromerregionen (siehe Abb 3.10.B).

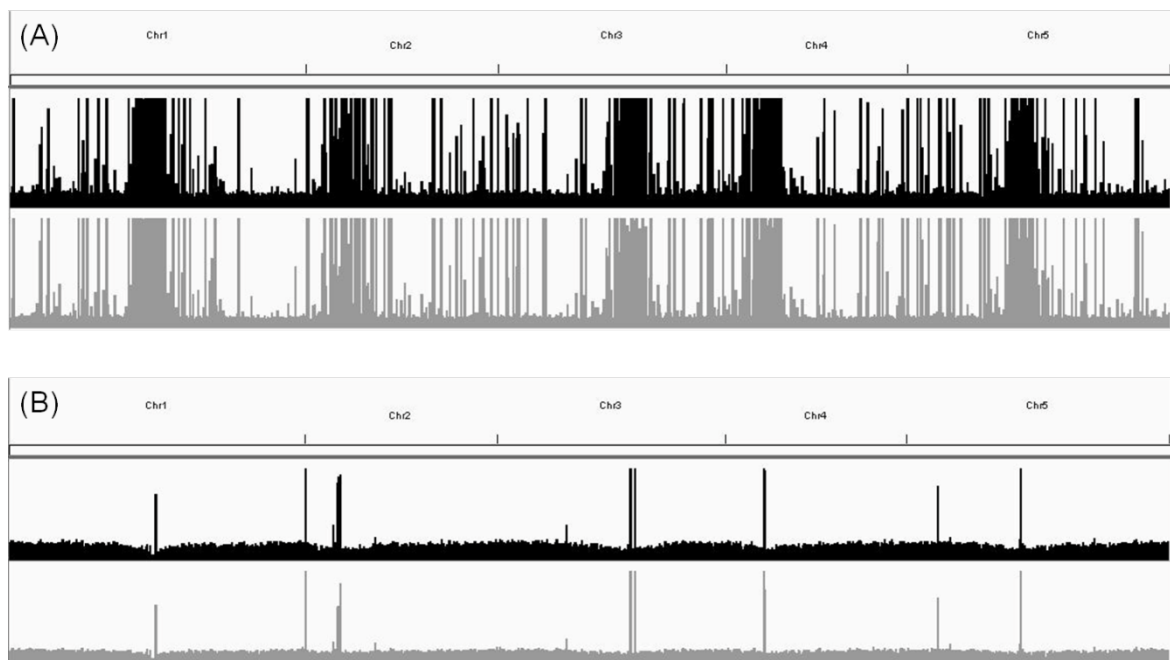


Abbildung 3.10. Genomweite TT8-Bindeprofile in *Arabidopsis thaliana*. ChIP-seq Profile (.wig Dateiformat) ($Pro_{TT8::TT8:GFP}$) von TT8 sind für alle Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle). (A) Perfekt *gemappte* Reads. (B) Einmalig perfekt *gemappte* Reads.

Die Visualisierung der perfekt *gemappten* und einmalig perfekt *gemappten* Reads aus dem Versuch mit dem Pflanzenmaterial $Pro_{EGL3::GFP:EGL3}$ zeigte die gleichen Unterschiede in der *Read*-Verteilung im *Arabidopsis thaliana* Genom (siehe Abb. 3.11.) wie zuvor dargestellt. Allerdings ist hier auffällig das die α -IgG Kontrolle im Vergleich zur α -IgG Kontrolle ($Pro_{TT8::TT8:GFP}$) eine deutlich geringere Anzahl von Reads enthält (siehe Abb. 3.10.B. und 3.11.B.).

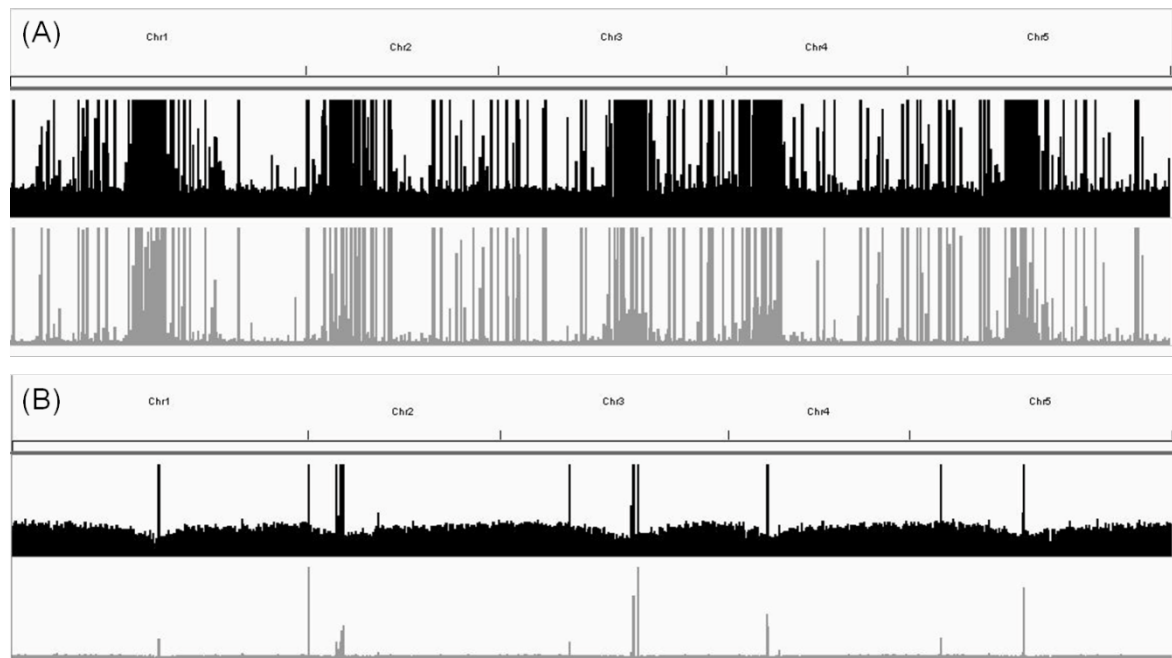


Abbildung 3.11. Genomweite EGL3-Bindeprofile in *Arabidopsis thaliana*. ChIP-seq Profile (.wig Dateiformat) ($Pro_{EGL3}::GFP:EGL3$) von EGL3 sind für alle Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle). (A) Perfekt gemappte Reads. (B) Einmalig perfekt gemappte Reads.

Die Visualisierung der TT8- und EGL3-Bindeprofile und die Identifizierung der genomweiten putativen *in vivo* Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren wurden alle mit dem Datensatz für einmalig perfekt gemappte Reads durchgeführt.

3.1.3.1. Genomweite Identifizierung von TT8 DNA-Zielbindestellen in *Arabidopsis thaliana*

TT8 bindet an hunderte Regionen innerhalb des *Arabidopsis thaliana* Genoms. Mit Hilfe des PeakRanger (v.1.4., Feng *et al.* 2011) konnten 1441 angereicherte Regionen durch eine putative TT8-Bindung identifiziert werden. Eine Verteilung der identifizierten Bindestellen im *Arabidopsis thaliana* Genom ist in Abbildung 3.12. dargestellt. Die Analyse aller TT8 Bindestellen zeigte eine Bindung des Transkriptionsfaktors zu 59% (857 Loci) in kodierenden Bereichen (Exon) von *Arabidopsis thaliana*. 18% (261 Loci) der möglichen Bindestellen liegen in nicht-kodierten Bereichen (Intron). Auf den 5'UTR und 3'UTR entfallen 1% (18 Loci) bzw. 3% (42 Loci) der putativen TT8-Bindestellen. In 5% (66 Loci) der Fälle erfolgt eine mögliche Bindung des Transkriptionsfaktors in intergenischen Bereichen von *Arabidopsis thaliana* und zu 1% (5 Loci) in Bereichen die als *Transcription Start To Transcription End* (TS2TE, diese

Einteilung bezieht sich auf nicht Protein-kodierende Gene) bezeichnet werden. In Promotorbereichen finden sich 13% (192 Loci) der identifizierten Bindestellen für TT8. Die durchschnittliche *Peak*-Breite betrug 315 bp.

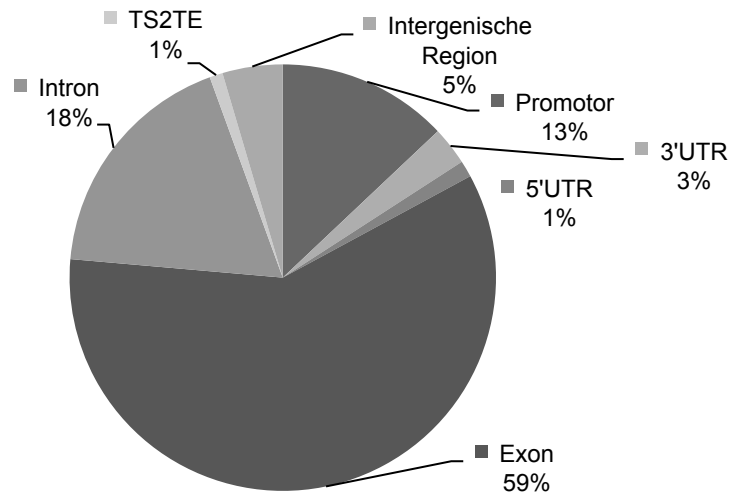


Abbildung 3.12. Verteilung von TT8 Bindestellen im *Arabidopsis thaliana* Genom. Dargestellt ist die Verteilung der TT8 Bindestellen für das ChIP-seq Experiment mit dem Pflanzenmaterial ($Pro_{TT8}::TT8::GFP$).

Einige putative Zielgene von TT8 wurden anhand ihrer Signifikanz (P-Wert, errechnet durch den *PeakRanger*) und thematischen Bedeutung aus allen möglichen Zielbindestellen (siehe Anhang 7.3.) ausgewählt und sollen hier kurz dargestellt werden (siehe Tabelle 3.3.).

Tabelle 3.3. Auflistung putativer Zielgene des Transkriptionsfaktors TT8. In der Tabelle sind ausgewählte mögliche Zielgene des Transkriptionsfaktors TT8 aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Die putativen Bindestellen wurden mit dem *PeakRanger* (v.1.4., Feng *et al.* 2011) identifiziert. Angegeben ist jeweils der Locus Code (AGI Code), der P-Wert (aus *PeakRanger*) und die TAIRv10 Annotation.

AGI Code	P-Wert	Annotation
At1g14080	8,0E-16	Fucosyltransferase 6
At1g17650	3,1E-22	Glyoxylat Reduktase 2
At1g21100	7,2E-20	O-Methyltransferase (Proteinfamilie)
At1g22340	7,1E-12	UDP-Glycosyltransferase 85A7
At1g64190	3,1E-25	6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (Proteinfamilie)
At2g25240	5,7E-29	Serine Protease Inhibitor (Proteinfamilie)
At2g43100	1,4E-25	Isopropylmalat Isomerase 2
At3g02540	3,3E-37	Rad23 UV Reparatur (Proteinfamilie)
At3g11670	1,6E-14	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At3g18100	8,1E-13	MYB4R1
At3g45100	2,3E-15	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At3g54100	7,3E-16	O-Fucosyltransferase (Proteinfamilie)
At4g00550	1,1E-24	Digalactosyl Diacylglycerol Deficient 2
At4g00800	2,6E-06	WD40 (Proteinfamilie)
At4g01070	5,5E-13	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At4g02290	9,8E-13	Glycosylhydrolase 9B13
At4g05100	1,1E-13	MYB 74
At4g17250	2,1E-35	unbekanntes Protein
At4g20360	3,1E-29	RAB GTPase Homolog E1B
At4g30440	1,1E-33	UDP-D-Glucuronate 4-Epimerase 1
At4g34850	4,5E-15	Chalkon / Stilben Synthase (Proteinfamilie)
At5g04130	1,0E-20	DNA Gyrase B2
At5g04480	5,5E-13	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At5g08130	2,3E-08	bHLH 46
At5g12110	3,4E-23	Glutathion S-Transferase-ähnlich
At5g17040	3,9E-10	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At5g18410	2,2E-24	Transkription Aktivator
At5g25260	4,6E-26	SPFH/Band 7/PHB Domäne (Proteinfamilie)
At5g54060	2,3E-21	UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (UGT79B1)
At5g59250	5,3E-23	Zucker Transporter (Proteinfamilie)

Die Auswahl von möglichen TT8 Bindestellen zeigt, dass der Transkriptionsfaktor an der Regulation unterschiedlicher Prozesse in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sein könnte. 7 Gene kodieren für (putative) UDP-Glykosyltransferasen. Aber auch Gene die an der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind (DNA-Gyrase, Transkription Aktivator) stellen möglich Zielgene von TT8 dar. Unter anderen finden sich auch Regulatoren wie MYB74 und bHLH46 unter den putativen Zielgenen.

Zur weiteren Analyse wurden für ausgewählte Strukturgen-Loci der Anthocyan-Biosynthese die TT8 Bindeprofile mit dem IGV visualisiert und auf angereicherte Sequenz-*Reads* untersucht (siehe Abb. 3.13.). Sequenz-*Read*-Anreicherung können für Promotor- bzw. genomische Bereiche der Loci *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* und *LDOX* beobachtet werden. So zeigen sich für den 5'-UTR des *CHS* Gens auf einem Bereich von 2000 Nukleotiden *Read*-Anreicherungen durch eine mögliche TT8 Bindung. Über den gesamten Bereich sind allerdings auch Sequenz *Read*-Anreicherungen in der Kontrolle zu finden. Innerhalb der genomischen Organisation des *CHI* Gens lässt sich eine signifikante *Read*-Anreicherung durch eine putative Bindung des TT8 Transkriptionsfaktors erkennen. Der Scheitelpunkt des vom *PeakRanger* identifizierten *Peaks* ($8,53e^{-9}$) liegt im 2. Intron des Gens. Weiterhin finden sich *Read*-Anreicherungen im Promotor bzw. 5'-UTR von *F3H*. Für die genomischen Bereiche der Anthocyan-Biosynthese Loci *F3'H* und *GST*, zeigten sich über die gesamten dargestellten Abschnitte zum Teil geringe nicht signifikante *Read*-Anreicherungen innerhalb des Experiments sowie in der Kontrolle. Als ein Nicht-Zielgen von TT8 wurde der Flavonol-spezifische *FLS1* Locus visualisiert und auf *Read*-Anreicherungen untersucht. Hier konnten keine signifikanten *Read*-Anreicherungen beobachtet werden. In den Promotor-Bereichen der Loci *DFR* und *LDOX* lassen sich durch eine mögliche Bindung von TT8 *Peaks* visualisieren. Beide *Peaks* wurden mit Hilfe des *Peak Finders PeakRanger* (v.1.4., Feng *et al.* 2011) als signifikant identifiziert mit p-Werten von $9,99e^{-34}$ für *DFR* und $5,41e^{-14}$ für *LDOX*.

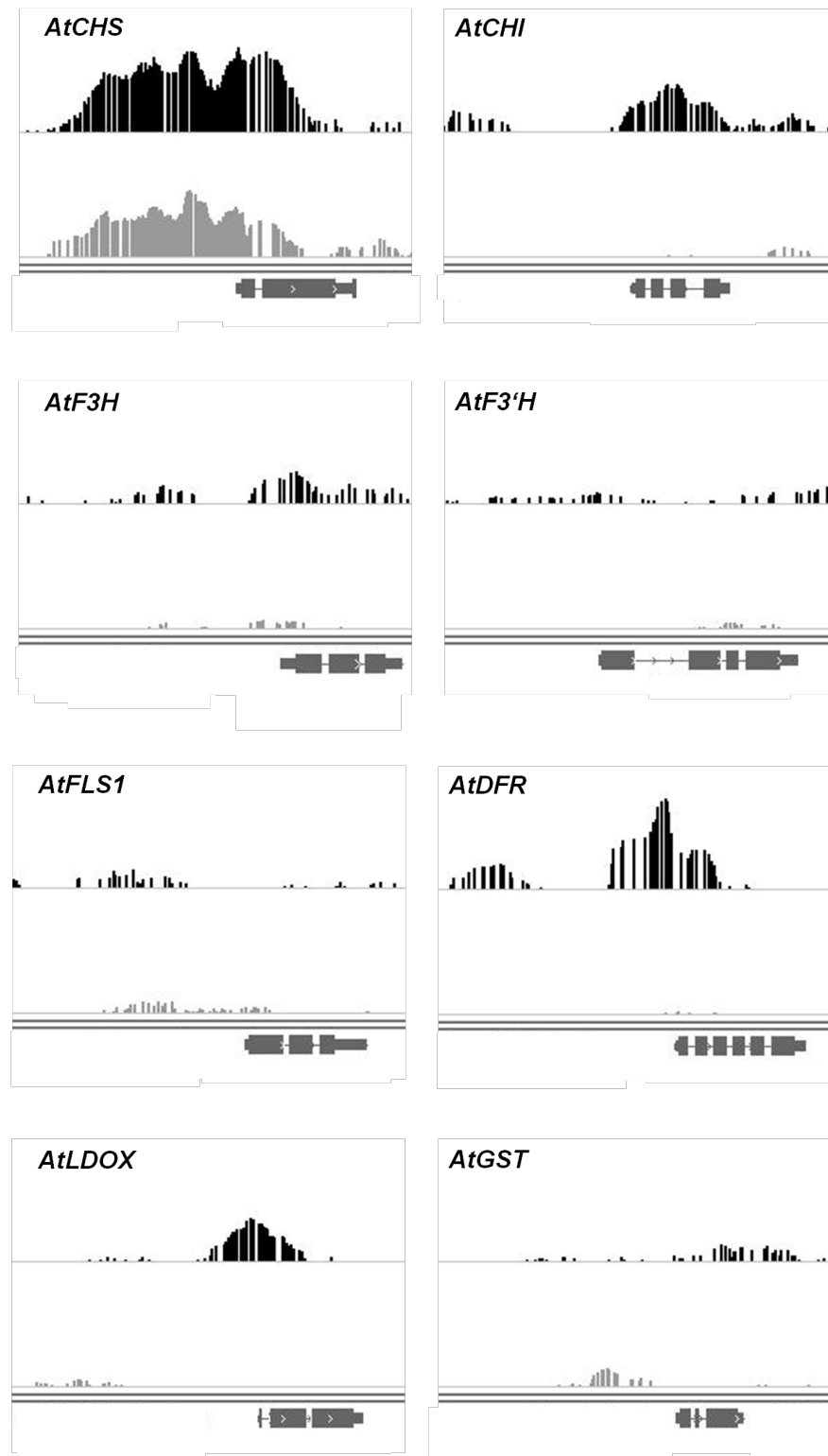


Abbildung 3.13. TT8-Bindeprofile von Strukturgenen der Anthocyan-Biosynthese. Für jeden Locus sind CHIP-seq Profile ($Pro_{TT8}::TT8:GFP$) von TT8 dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle) Die Exon/Intron Strukturen der genomischen Loci sind jeweils im unteren Teil der Abbildungen gezeigt. Pfeile kennzeichnen die Orientierung des jeweiligen Locus. Die einzelnen Abbildungen zeigen je einen Bereich von 5 kb.

Anhand des TT8 Bindeprofils im *DFR* Promotor konnte in dieser Arbeit durch die genomweite Identifizierung mittels CHIP-seq die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an einen Bereich der das TT8 RRE enthält bestätigt und erstmals *in vivo* gezeigt werden (siehe Abb. 3.14.).

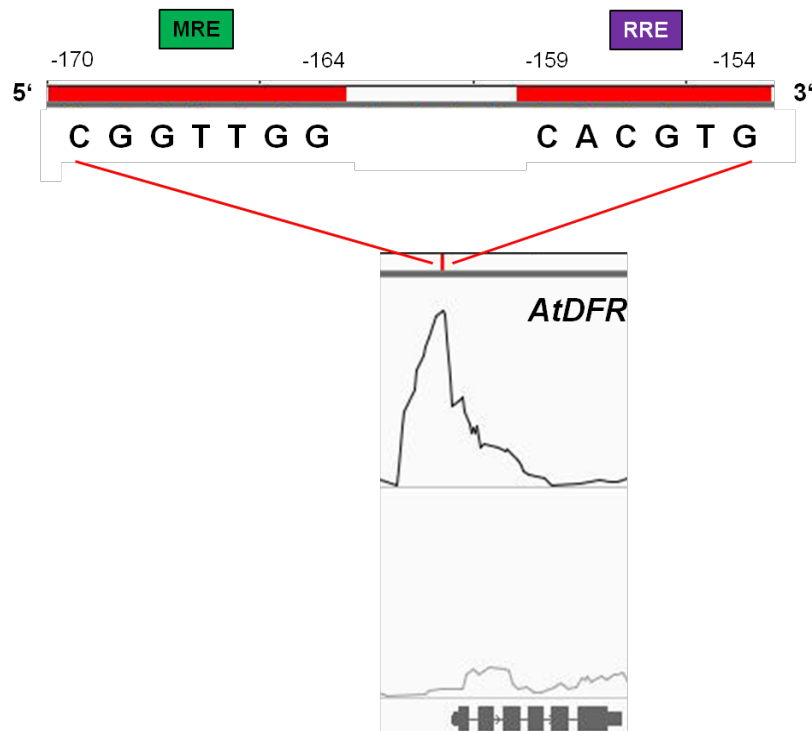


Abbildung 3.14. TT8-Bindeprofile im Promotor des *DFR* Gens. Für den Locus ist das CHIP-seq Profile (*Pro_{TT8}::TT8:GFP*) von TT8 dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle) Die Exon/Intron Struktur des genomischen Locus ist im unteren Teil der Abbildungen gezeigt. Pfeile kennzeichnen die Orientierung des Locus. Die rote Markierung zeigt die Position der *cis*-regulatorischen Elemente (MRE und RRE). Als Vergrößerung ist die genomische Position und Sequenz des MRE und RRE dargestellt.

Um eine *in vivo* Bindung von TT8 an einen genomischen Bereich des *TT8* Locus und weiterer Saccharose-abhängiger Anthocyanbiosynthese regulatorischer Gen-Loci zu überprüfen wurde die Sequenz-*Read*-Verteilung im IGV visualisiert und auf *Read*-Anreicherungen in diesen Bereichen analysiert (siehe Abb. 3.15.).

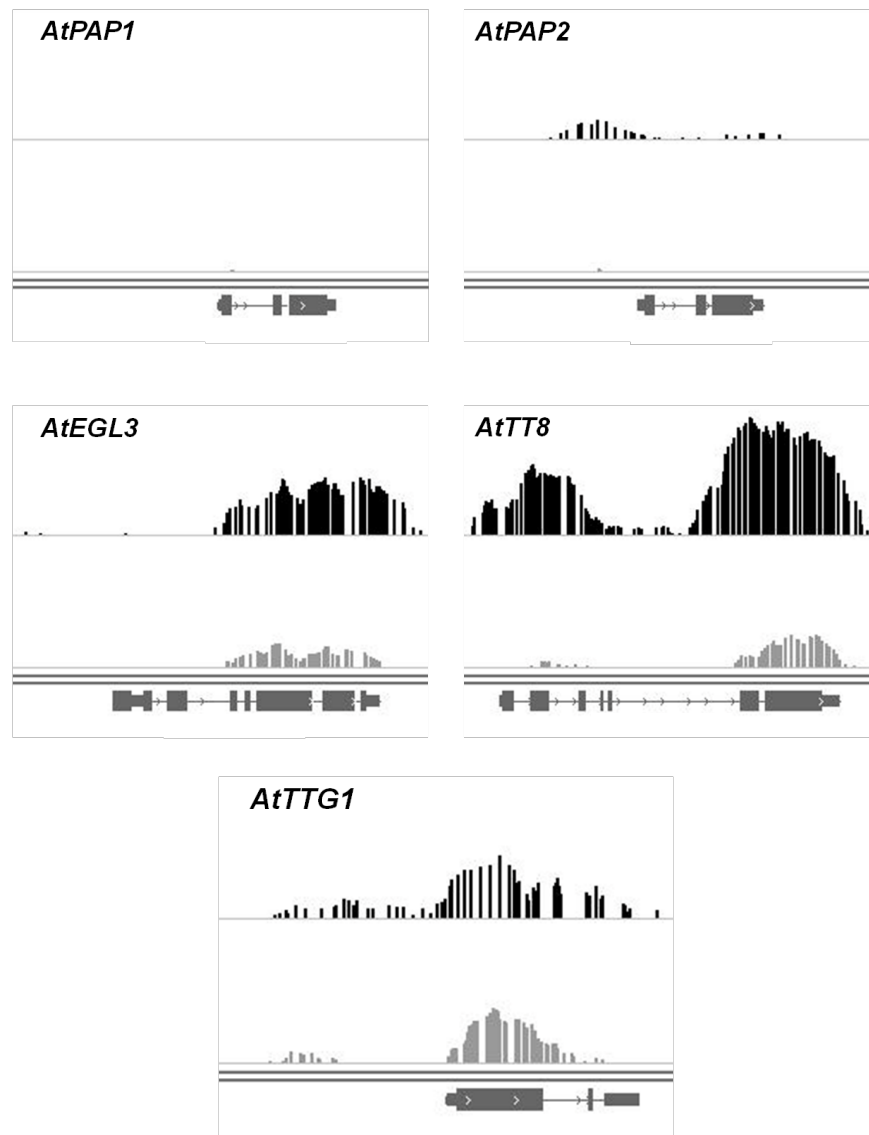


Abbildung 3.15. TT8-Bindeprofile von Regulatoren der Sukrose-abhängigen Anthocyan-Biosynthese. Für jeden Locus sind ChIP-seq Profile ($Pro_{TT8}::TT8:GFP$) von TT8 dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle) Die Exon/Intron Strukturen der genomischen Loci sind jeweils im unteren Teil der Abbildungen gezeigt. Pfeile kennzeichnen die Orientierung des jeweiligen Locus.

Die Analyse der TT8-Bindeprofile an genomischen Bereichen bekannter Regulatoren der Saccharose-abhängigen Anthocyan-Biosynthese zeigten ein anderes Muster der Protein-DNA-Wechselwirkung zwischen TT8 und transkriptionellen Regulatoren im Vergleich zu den in Abbildung 3.13. gezeigten Bindeprofilen. Der Anthocyan-Regulator TT8 zeigte eine mögliche Bindefähigkeit für die Loci *EGL3*, *TT8*, *PAP2* und *TTG1* innerhalb der jeweiligen genomischen Organisation. Eine Sequenz-Anreicherung im Bereich von *PAP1* konnte nicht beobachtet werden. Im Promotor von *PAP2* zeigten sich geringe *Read*-Anreicherungen, die in der Visualisierung eine *Peak*-Form aufweisen. Innerhalb

der genomischen Organisation von *TT8* kommt es durch eine putative *TT8* Bindung zu signifikanten *Read*-Anreicherungen im Promotor und im Bereich des zweiten und siebten Exons ($5,91e^{-35}$). Für *EGL3* konnte ein signifikanter *Peak* im 3'-Bereich des Locus beobachtet werden ($9,87e^{-11}$). Am Gen-Lokus *TTG1* zeigte sich eine Anreicherung im ersten Exon, allerdings waren *Read*-Anreicherungen auch in der α -IgG Kontrolle sichtbar.

Bis heute ist die Auswertung der hier vorgestellten ChIP-seq Daten für das Pflanzenmaterial (*Pro_{TT8}::TT8:GFP* und *Pro_{CaMV35S}::TT8:GFP*) nicht vollständig abgeschlossen. Die Darstellung der hier gezeigten Ergebnisse soll nur eine Momentaufnahme wiedergeben. Der ChIP-seq Datensatz für das Pflanzenmaterial *Pro_{CaMV35S}::TT8:GFP* ist noch nicht analysiert. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet. Die Listen der identifizierten putativen *TT8*-Zielbindestellen (*Pro_{TT8}::TT8:GFP* und *Pro_{CaMV35S}::TT8:GFP*) befinden sich im Anhang (7.3.) in elektronischer Form.

3.1.3.2. Genomweite Identifizierung von *EGL3* DNA-Zielbindestellen in *Arabidopsis thaliana*

EGL3 besitzt die Fähigkeit an hunderte Regionen innerhalb des *Arabidopsis thaliana* Genoms zu binden. Mit Hilfe des PeakRanger (v.1.4., Feng *et al.* 2011) wurden 5653 angereicherte Regionen für *EGL3* detektiert. Eine Verteilung der identifizierten *EGL3*-Bindestellen im *Arabidopsis thaliana* Genom ist in Abbildung 3.16. dargestellt. Die Analyse aller *EGL3* Bindestellen zeigte eine Bindung des Transkriptionsfaktors zu 48% in kodierenden Bereichen (Exon) von *Arabidopsis thaliana*. 21% der Bindestellen liegen in nicht kodierten Bereichen (Intron). 1% der Bindestellen befinden sich in intergenischen Regionen. 3% bzw. 2% der Bindestellen finden sich in 3'- bzw. 5'-UTR Regionen. 5% der identifizierten Bindestellen liegen in Bereichen die als *Transcriptionstart To Transcription End* (TS2TE, diese Einteilung bezieht sich auf nicht Protein-kodierende Gene) bezeichnet werden. In Promotorbereichen finden sich 20% der identifizierten Bindestellen für *EGL3*.

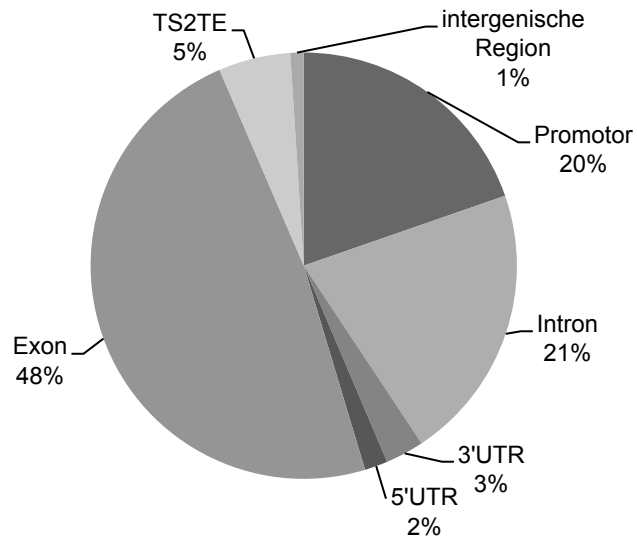


Abbildung 3.16. Verteilung von EGL3 Bindestellen im *Arabidopsis thaliana* Genom. Dargestellt ist die Verteilung der EGL3 Bindestellen für das ChIP-seq Experiment mit dem Pflanzenmaterial (*PRO_{EGL3}::GFP:EGL3*).

Einige putative Zielgene von EGL3 wurden anhand ihrer Signifikanz (P-Wert, errechnet durch *PeakRanger*) und zum Teil nach ihrer thematischen Bedeutung aus allen identifizierten Zielbindestellen (siehe Anhang 7.3.) ausgewählt und sollen hier kurz dargestellt werden (siehe Tabelle 3.4.).

Tabelle 3.4. Auflistung putativer Zielgene des Transkriptionsfaktors EGL3. In der Tabelle sind ausgewählte mögliche Zielgene des Transkriptionsfaktors EGL3 aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Die putativen Bindestellen wurden mit dem *PeakRanger* (v.1.4., Feng *et al.* 2011) identifiziert. Angegeben ist jeweils der Locus Code (AGI Code), der P-Wert (aus PeakRanger) und die TAIRv10 Annotation.

AGI Code	P-Wert	Annotation
At1g01420	1,8E-38	UDP-Glucosyltransferase 72B3
At1g01790	1,6E-44	K ⁺ Efflux Antiporter 1
At1g05560	8,4E-27	UDP-Glucosyltransferase 75B1
At1g10400	5,7E-33	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At1g12910	3,9E-30	WD40 repeat-like (AtAN11)
At1g18700	1,1E-24	DNAJ Hitzeschock-Domäne
At1g22950	4,8E-18	2-Oxoglutarat und Fe(II)-abhängige Oxygenase (Proteinfamilie)
At1g26570	2,4E-25	UDP-Glucose Dehydrogenase 1
At1g33030	4,1E-23	O-Methyltransferase (Proteinfamilie)
At1g45545	6,8E-32	unbekanntes Protein
At1g48880	8,1E-48	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 7
At1g55010	3,8E-35	Plant Defensin 1.5
At1g75680	1,3E-63	Glycosyl Hydrolase 9B7
At2g44550	1,3E-19	Glycosyl Hydrolase 9B10
At2g47310	1,2E-28	Flowering Time Control protein-related
At3g02040	2,1E-40	Senescence-related Gene 3
At3g14980	2,3E-24	Acyl-CoA N-Acyltransferase
At3g24140	2,4E-28	bHLH 97
At3g44330	8,5E-63	unbekanntes Protein
At3g53630	2,1E-62	unbekanntes Protein
At4g09740	2,4E-25	Glycosyl Hydrolase 9B14
At4g10120	1,0E-16	Sucrose-Phosphate Synthase (Proteinfamilie)
At4g16650	2,0E-18	O-Fucosyltransferase (Proteinfamilie)
At4g16760	1,7E-79	Acyl-CoA Oxidase 1
At5g05900	1,1E-22	UDP-Glycosyltransferase (Proteinfamilie)
At5g22580	5,8E-21	Stress responsive Domain
At5g37050	1,7E-75	unbekanntes Protein
At5g54060	4,8E-38	UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (UGT79B1)
At5g58100	3,5E-59	unbekanntes Protein
At5g60740	2,0E-16	ABC Transporter (Proteinfamilie)

Zur weiteren Analyse wurden für ausgewählte Strukturgen-Loci der Saccharose-abhängigen Anthocyan-Biosynthese die putativen EGL3-Bindeprofile mit dem IGV visualisiert und auf angereicherte *Peaks* untersucht (siehe Abb. 3.17.).

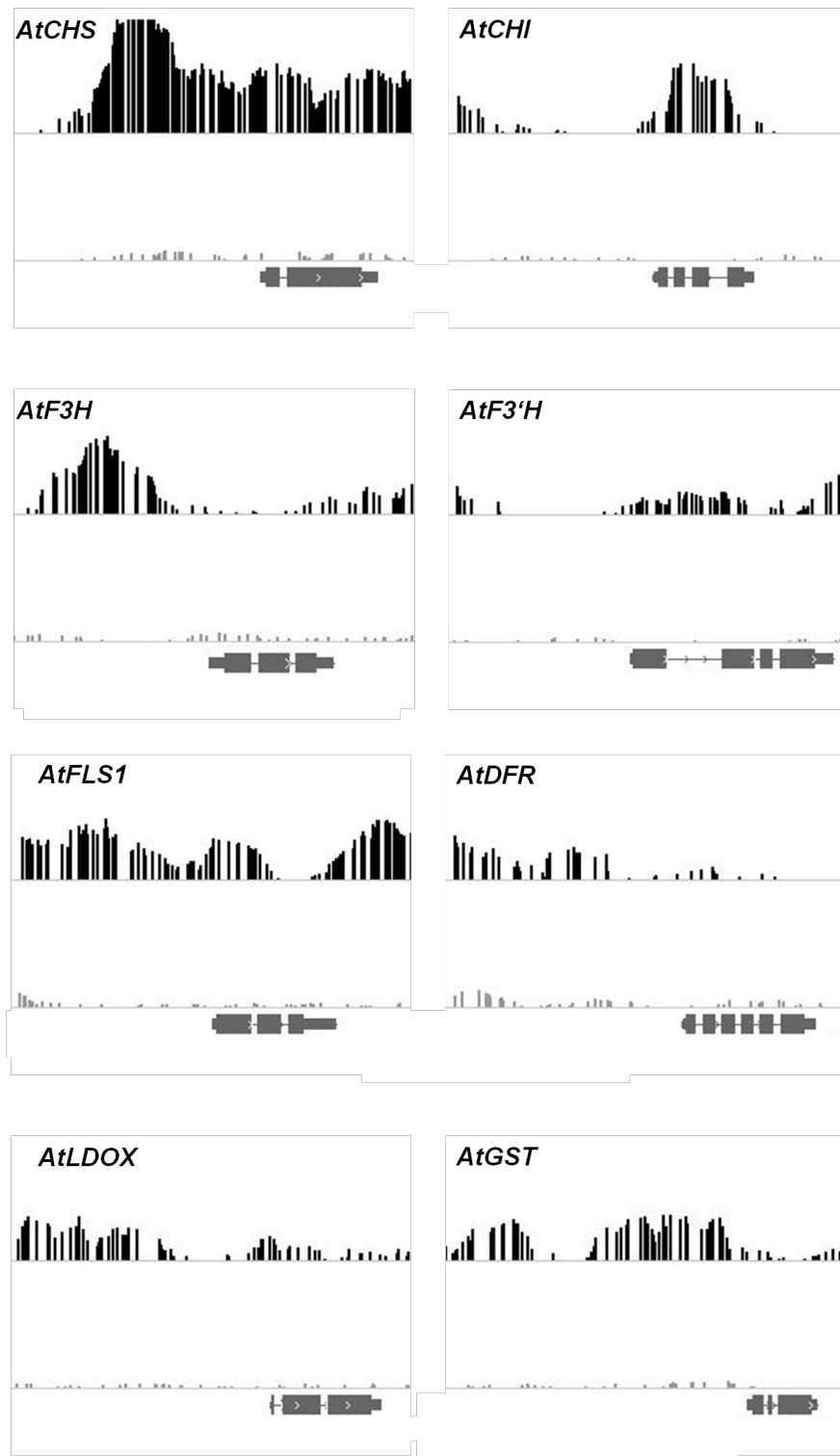


Abbildung 3.17. EGL3-Bindeprofile von Strukturgenen der Anthocyan-Biosynthese. Siehe nächste Seite.

Abbildung 3.17. EGL3-Bindeprofile von Strukturgenen der Anthocyan-Biosynthese. Für jeden Locus sind ChIP-seq Profile (*Pro_{EGL3}::GFP:EGL3*) von EGL3 dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle) Die Exon/Intron Strukturen der genomischen Loci sind jeweils im unteren Teil der Abbildungen gezeigt. Pfeile kennzeichnen die Orientierung des jeweiligen Locus. Die einzelnen Abbildungen zeigen je einen Bereich von 5 kb.

Für die in Abbildung 3.17. dargestellten genomischen Bereiche zeigte sich in der ChIP-internen α -IgG Kontrolle nur ein geringes Hintergrundsignal. Eine signifikante *Read*-Anreicherung durch EGL3 zeigte die mögliche Bindefähigkeit des Transkriptionsfaktors an Promotor- und/oder genomische Bereiche der Loci *CHS*, *CHI*, *F3H*, *LDOX* und *GST*. Innerhalb der gezeigten genomischen Bereiche für *F3'H*, *FLS1* und *DFR* sind keine signifikanten *Read*-Anreicherungen durch eine Bindung von EGL3 identifizierbar. Im 5'-UTR und dem Promotor von *CHS* und der kodierenden Sequenz sind über den gesamten Bereich *Read*-Anreicherungen zu erkennen. 2000 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart zeigt sich eine *Read*-Anreicherung durch eine mögliche EGL3 Bindung. Die signifikante *Read*-Anreicherung ($2,35e^{-33}$) durch eine putative EGL3-Bindung an das *CHI* Gen zeigt ein anderes Bindungsprofil. Hier lässt sich der *Peak* innerhalb eines genomischen Bereichs der die ersten drei Exons des Gens umfasst erkennen. Der Scheitelpunkt des vom *PeakRanger* identifizierten *Peaks* liegt im 2. Intron des Gens. Des Weiteren sind angereicherte *Reads* im 5'-UTR von *F3H* sichtbar. Ein signifikanter *Peak* kann für *F3H* in einem Bereich von 1500 - 1000 nt vor dem Transkriptionsstart beobachtet werden. Innerhalb der gezeigten genomischen Bereiche von *F3'H*, *FLS1*, *DFR*, *LDOX* und *GST* lässt sich eine geringe wellenförmig-verlaufende Sequenz-*Read*-Verteilung für die spezifische ChIP-Probe (α -GFP, schwarz) erkennen. Allerdings zeigte sich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart von *LDOX* eine *Peak*-ähnliche Anordnung von Sequenz-*Reads*. Das Muster einer unspezifischen *Read*-Verteilung war für große genomische Bereiche der ChIP-seq Daten für EGL3 zu verzeichnen und ist beispielhaft in Abbildung 3.18. dargestellt.

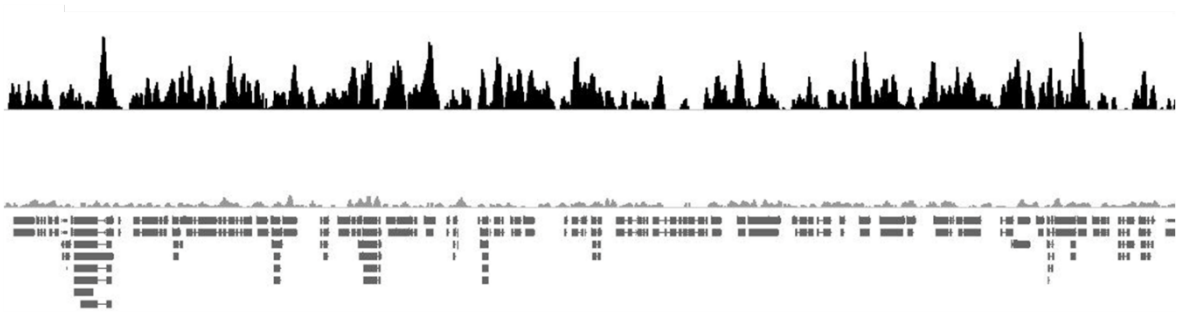


Abbildung 3.18. EGL3-Bindeprofile eines 22,6 kb Bereichs des Chromosoms 4 von *Arabidopsis thaliana*. ChIP-seq Profile ($Pro_{EGL3}::GFP:EGL3$) von EGL3 sind für einen 22,6 kb Bereich von Chromosom 4 (9.193 – 9.419 kb) dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle). In dunkelgrau sind die Exon/Intron Strukturen dargestellt.

Um zu überprüfen ob EGL3, im Vergleich zur TT8 *feedback* Regulation einen Einfluss auf die eigene Expression ausübt, ist der regulatorische *EGL3* Locus auf ein mögliches Bindeprofil durch EGL3-Bindung untersucht worden. Gleichzeitig wurde eine mögliche Sequenz-Read-Anreicherung ausgewählter weiterer Anthocyanbiosynthese-assoziiertes regulatorischer Gen-Loci im IGV visualisiert und auf *Peaks* untersucht (siehe Abb. 3.19.).

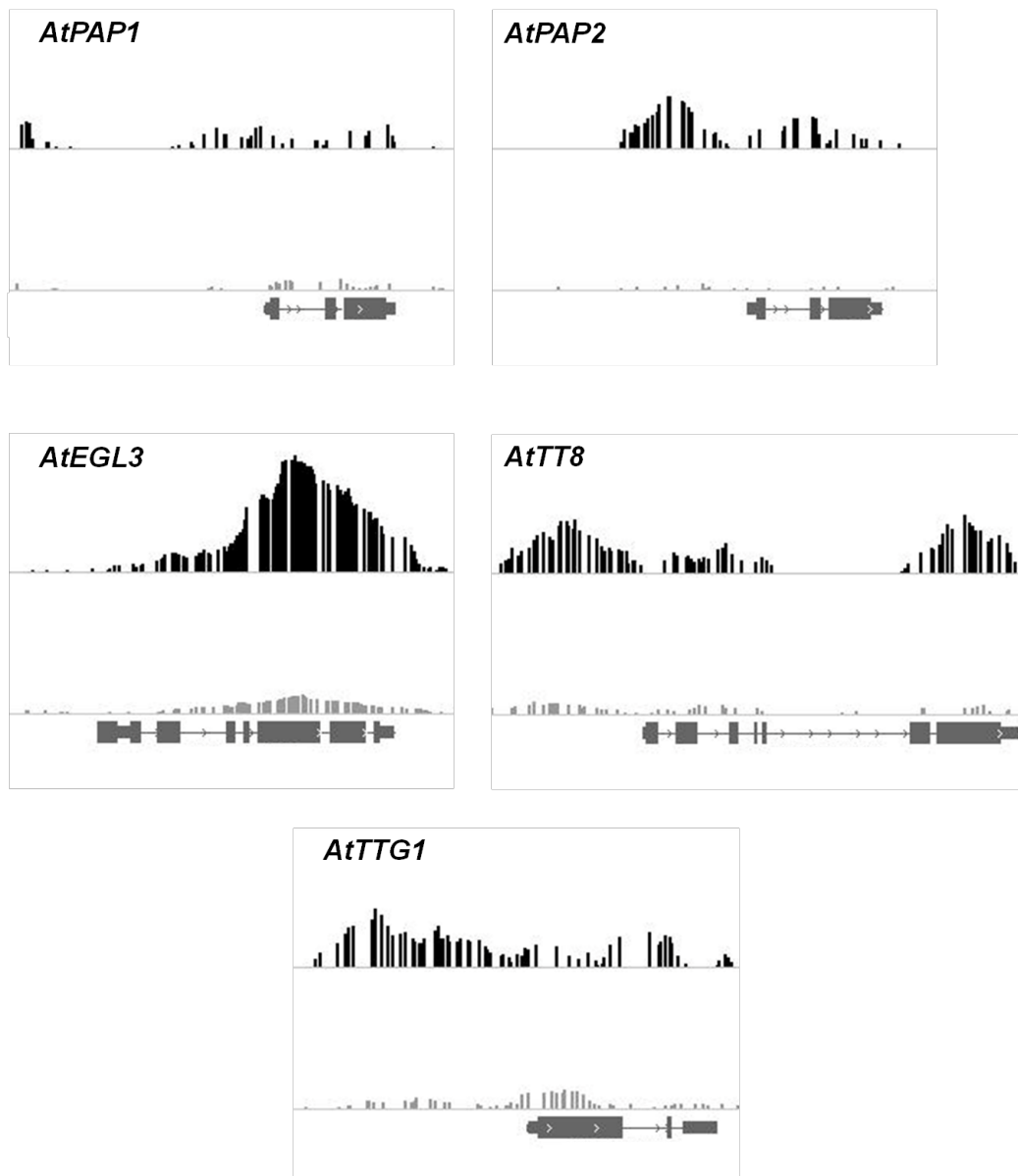


Abbildung 3.19. EGL3-Bindeprofile ausgewählter Regulatoren der Sukrose-abhängigen Anthocyan-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Für jeden Locus sind ChIP-seq Profile (*Pro^{EGL3}::GFP:EGL3*) von EGL3 dargestellt. Schwarz: α -GFP IP. Grau: α -IgG IP (Kontrolle) Die Exon/Intron Struktur der genomischen Loci sind jeweils im unteren Teil der Abbildungen gezeigt. Pfeile kennzeichnen die Orientierung des jeweiligen Locus.

Die Analyse der EGL3-Bindeprofile an genomischen Bereiche bekannter Regulatoren der Saccharose-abhängigen Anthocyanbiosynthese zeigte ein anderes Muster der Protein-DNA-Wechselwirkung zwischen EGL3 und den transkriptionellen Regulatoren im Vergleich zu den in Abbildung 3.17. gezeigten Bindeprofilen. Der Anthocyan-Regulator EGL3 zeigte eine mögliche Bindefähigkeit für die Loci *EGL3*, *TT8* innerhalb der jeweiligen genomischen Organisation. *Read*-Anreicherungen können auch für *PAP2* und *TT8* in den Promotor- bzw.

5'-UTR-Regionen beobachtet werden. Eine Bindung an genomische Bereiche von *PAP1* und *TTG1* konnte nicht gezeigt werden. Innerhalb der genomischen Organisation von *EGL3* kommt es durch eine putative *EGL3* Bindung zu signifikanten *Read*-Anreicherungen im Bereich des sechsten und siebten Exons. Für *TT8* konnte eine signifikante Anreicherung von *Reads* im Bereich des siebten Exons beobachtet werden. Der Locus *TTG1* zeigte eine ungleichmäßige Sequenz-*Read*-Verteilung über den gesamten genomischen Bereich.

Die Auswertung der hier vorgestellten ChIP-seq Daten für das Pflanzenmaterial (*Pro_{EGL3}::GFP:EGL3* und *Pro_{CaMV35S}::GFP:EGL3*) ist bis heute nicht vollständig abgeschlossen. Die Darstellung der hier gezeigten Ergebnisse soll nur eine Momentaufnahme wiedergeben. Der ChIP-seq Datensatz für das Pflanzenmaterial *Pro_{CaMV35S}::GFP:EGL3* ist noch nicht analysiert und auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet. Die Listen der identifizierten putativen *EGL3*-Zielbindestellen (*Pro_{EGL3}::GFP:EGL3* und *Pro_{CaMV35S}::GFP:EGL3*) befinden sich im Anhang (7.3.) in elektronischer Form.

3.2. Vorbereitende Experimente zur Identifizierung von *in vivo* DNA-Bindestellen der PFG Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Identifizierung der *in vivo* DNA-Bindestellen der PFG Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* wurde wie in Abschnitt 3.1. für die Faktoren *TT8* und *EGL3* beschrieben der gleiche experimentelle Ansatz gewählt. Durch eine stabile Transformation der *pfG* Tripelmutante mit PFG-GFP-Fusionsproteinen sollte der jeweilige PFG Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden. Über den GFP-Tag sollten weiter in einem ChIP-seq Experiment mit α -GFP Antikörper die *in vivo* Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren angereichert und mittels massiver paralleler Sequenzierung genomweit identifiziert werden. Bis heute wurde das generierte Pflanzenmaterial für erste Vorversuche für ChIP Experiment eingesetzt.

3.2.1. Komplementationsanalyse transgener Linien (*Pro_{35S}::GFP:PFG_x* und *Pro_{PFG_x}::GFP:PFG_x*)

In Vorbereitung auf ein ChIP-seq Experiment wurden zunächst transgene Linien hergestellt, die den ORF des zu untersuchenden PFG Transkriptionsfaktors in translationaler Fusion mit dem ORF des *mGFP6* unter der Kontrolle des jeweiligen nativen *PFG*-Promotors in der *pfg1 pfg2 pfg3* Tripelmutante (Stracke, R. *et al.* 2007) exprimieren (*Pro_{PFG_x}::GFP:PFG_x*) (siehe Abb. 3.20.). Um die Transkriptmengen der *GFP*-Transkriptionsfaktor-Fusionen zu erhöhen wurden zusätzlich transgene Linien generiert die das zuvor beschriebene Fusionskonstrukt unter einem konstitutivem Promotor (*Pro_{35S}* aus *CaMV*) exprimieren (siehe Abb. 3.20.).

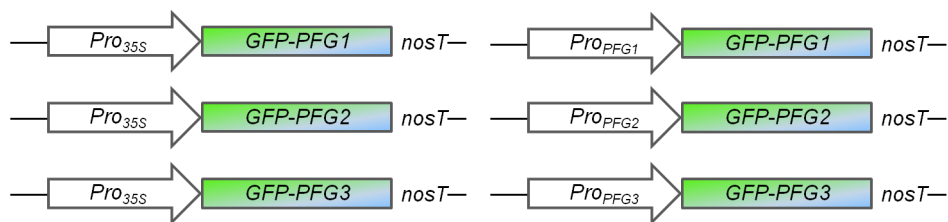


Abbildung 3.20. Schematische Darstellung der PFG-Fusionsprotein Konstrukte unter konstitutiver und nativer Promotorkontrolle (*Pro_{35S}::GFP:PFG₁₋₃* und *Pro_{PFG_s}::GFP:PFG₁₋₃*). Die Abbildung zeigt schematisch die Organisation der zur stabilen Pflanzentransformation hergestellten Expressionskonstrukte. Der ORF des zu untersuchenden PFG Transkriptionsfaktors wurde in translationaler Fusion mit dem ORF des *mGFP6* unter der Kontrolle eines konstitutiven oder des jeweiligen nativen *PFG*-Promotors in die *pfg1 pfg2 pfg3* Tripelmutante stabil transformiert.

Die entsprechenden T1-Pflanzen wurden auf hygromycinhaltigen GM-Platten für das Transgen selektioniert, wobei die Insertion des Transgens zusätzlich durch eine PCR bestätigt wurde (nicht gezeigt). Die aus der Selektion hervorgegangenen T2-Linien wurden zur phänotypischen Analyse der Keimlinge mittels Dünnschichtchromatographie verwendet (Abb.3.21.).

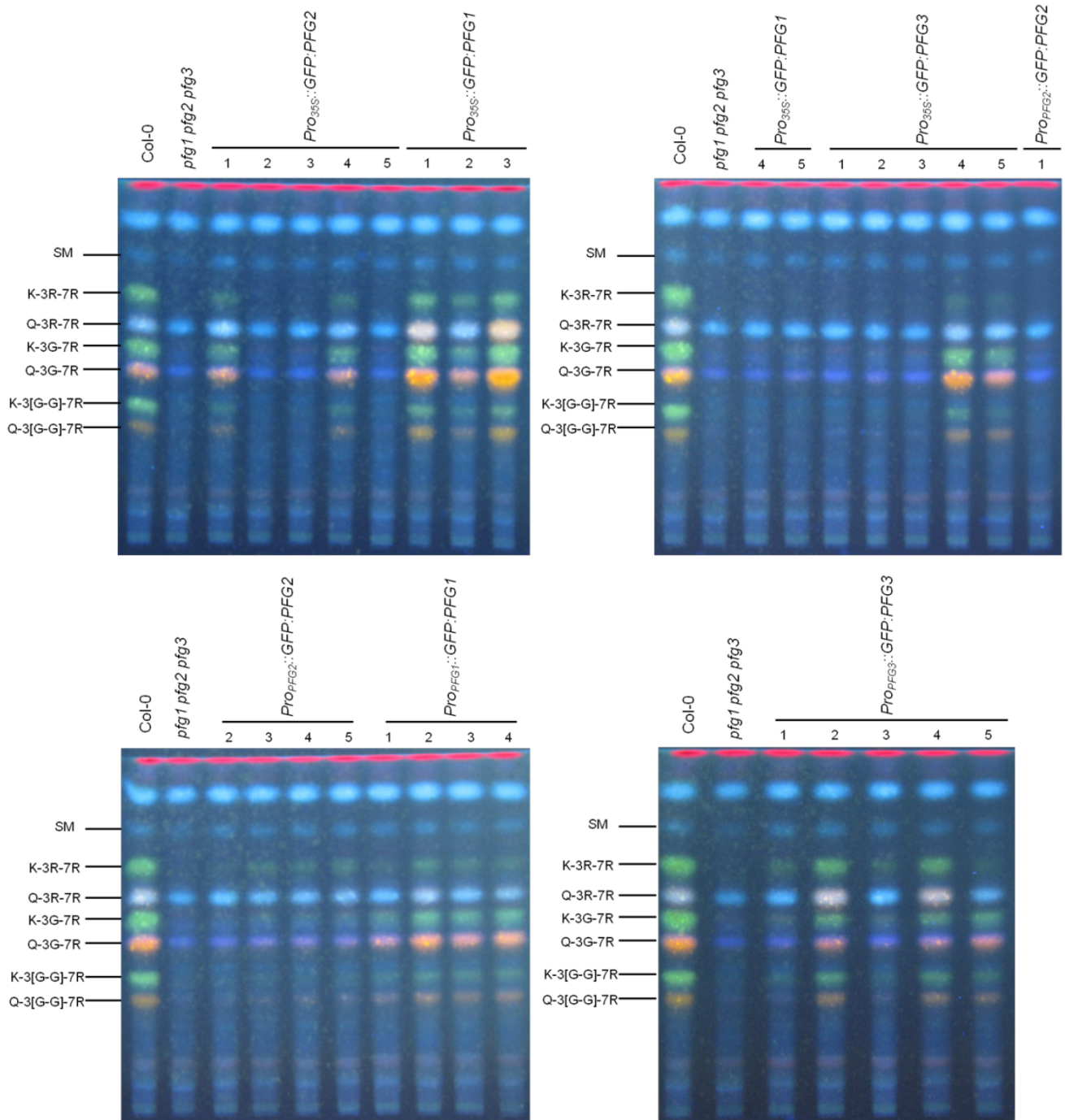


Abbildung 3.21. Flavonolakkumulation in komplementierten *pfg* Mutanten. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse methanolischer Extrakte aus 6 Tage alten Wildtyp-, Mutanten- und transgenen Keimlingen nach Auftrennung durch HPTLC gefolgt von DPBA-Färbung und anschließender Dokumentation unter UV-Licht. Der Col-0 Wildtyp und die *pfg1 pfg2 pfg3* Tripelmutante wurden als Kontrolle für die natürliche Flavonol Glykosid-Akkumulation sowie das Ausbleiben dieser *in planta* eingesetzt. Farbschlüssel: Grün = Kämpferol Derivate, Orange = Quercitin Derivate, Hellblau = Sinapat Derivate, Rosa = Quercitin und Sinapat Derivate (überlagert), Rot = Chlorophyll. Buchstabencode: G = Glukose, K = Kämpferol, Q = Quercitin, R = Rhamnose, SM = Sinapoyl Malat.

Methanolische Extrakte aus 6-Tage altem Keimlingsgewebe der *pfg* Tripelmutante (Stracke, R. *et al.* 2007) zeigten in der HPTLC ein komplettes Ausbleiben der Flavonolglykoside im Vergleich zum Col-0 Wildtyp (siehe Abb. 3.21.) Die phänotypische Identifikation der komplementierten *pfg1 pfg2 pfg3* Keimlinge mit PFG-GFP-Fusionsproteinen unter nativer und konstitutiver Promotorkontrolle zeigte für einzelne Linien eine eindeutige Akkumulation von Flavonolglykosiden (siehe Abb. 3.21.)

Zusätzlich zur phänotypischen Identifikation komplementierter PFG Tripelmutanten erfolgte der Nachweis der GFP Funktionalität, sowie die subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in der *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskultur At7 *in vivo* (siehe Abb. 3.22.).

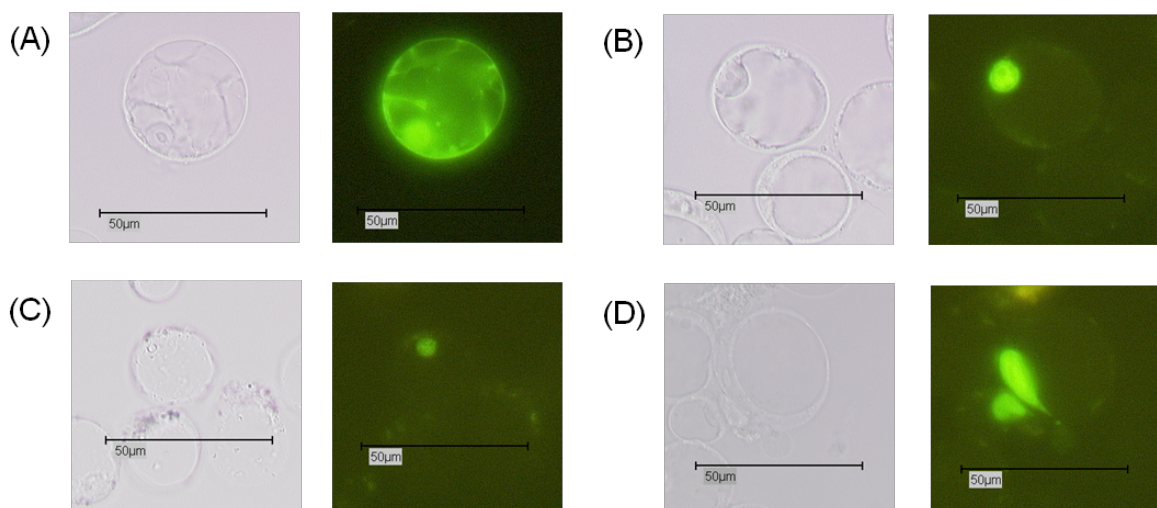


Abbildung 3.22. Funktionalität und subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in At7-Protoplasten ($Pro_{35S}::GFP:PFGx$). At7-Protoplasten wurden transient mit Konstrukten für GFP-Fusionsproteine unter konstitutiver Promotorkontrolle transfiziert und die *in vivo* Funktionalität und subzelluläre Lokalisation des mGFP6 mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Leica DM 5500 B) unter Verwendung eines GFP spezifischen Filters dokumentiert (rechts). Links: Hellfeldbilder derselben Protoplasten. (A) $Pro_{35S}::GFP$ als Positivkontrolle. (B) $Pro_{35S}::GFP:PFG2$. (C) $Pro_{35S}::GFP:PFG1$. (D) $Pro_{35S}::GFP:PFG3$.

Für alle GFP-Fusionsprotein Konstrukte wurde eine GFP Funktionalität in At7 Protoplasten nachgewiesen (siehe Abb 3.22.). Anhand der Positivkontrolle ($Pro_{35S}::GFP$) zeigte sich eine Verteilung des GFP-Signals im gesamten Protoplasten. Die jeweils mit anderen GFP-Fusionsprotein-Konstrukten

transfizierten At7 Protoplasten zeigten je eine Kernlokalisierung für die Fusionsproteine GFP:PFG1, GFP:PFG2 und GFP:PFG3.

3.3. Die Mutation in *Transparent Testa 17* (*TT17*) - ein neues *Leucoanthocyanidin Dioxygenase* (*LDOX*) Allel in *Arabidopsis thaliana*

In Kooperation mit Herrn Dr. Ingo Appelhagen wurde im Laufe dieser Arbeit der *Arabidopsis thaliana* Locus *TT17* charakterisiert. Hierzu wurde zunächst eine Charakterisierung des *tt17* Samen-Phänotyps im Vergleich mit unterschiedlichen Mutanten, die einen veränderten Proanthocyanidingehalt im Samen aufweisen, durchgeführt. Bisher wurden für *tt17* trotz der großen Ähnlichkeit zu *ldox* Mutanten keine Allelitäten zu bekannten *tt*-Loci angenommen. Weiterhin wurde durch Kreuzungsexperimente von *tt17* Pflanzen mit verschiedenen *ldox*-Allelen gezeigt, dass *tt17* ein neues bisher unbekanntes *ldox* Allel darstellt. Um Unterschiede innerhalb der Nukleotidsequenz des *Arabidopsis thaliana* *LDOX* Gens zu untersuchen wurde der Locus in *tt17*, dem korrespondierenden Wildtyp Est-1 und ausgewählter anderer Linien (*tds4-1*, *Ws-4*, *tt11-2* und *Ler*, Abb.3.1.) sequenziert.

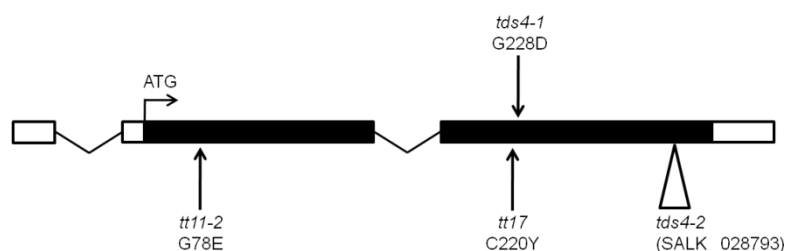


Abbildung 3.23. Der *LDOX* Locus aus *Arabidopsis thaliana*. Schematische Darstellung des *LDOX* Locus mit Mutationen in *tds4-1*, *tds4-2*, *tt11-2* und *tt17*. Die Boxen zeigen Exons, Introns sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Der Translationsstart ist durch einen abgewinkelten Pfeil markiert. Das Dreieck markiert eine T-DNA Insertion.

Durch einen Vergleich der aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten *LDOX* Aminosäuresequenzen zeigten sich innerhalb der verschiedenen Wildtyp Accessionen natürliche Variationen. Insgesamt wurden vier Einzel-Aminosäure-Polymorphismen (*Single Aminoacid Polymorphism*, *SAAPs*) zwischen Est-1 und

Ws-4 bzw. *Ler* identifiziert (Q53K, S65N, D151E und I189V). Die Aminosäuresequenz von LDOX innerhalb der Accession Ws-4 unterscheidete sich zu den anderen Varianten durch den SAAP I157J (Abb.3.24.).

<i>Ler</i>	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLKNIESDDE	60
<i>tt11-2</i>	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLKNIESDDE	60
Ws-4	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLKNIESDDE	60
<i>tds4-1</i>	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLKNIESDDE	60
Est-1	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLQNIESDDE	60
<i>tt17</i>	MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLQNIESDDE	60
<i>Ler</i>	KIRENCIEELKKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
<i>tt11-2</i>	KIRENCIEELKKASLDWVMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
Ws-4	KIRENCIEELKKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
<i>tds4-1</i>	KIRENCIEELKKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
Est-1	KIRESCIEELKKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
<i>tt17</i>	KIRESCIEELKKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEKYANDQATG	120
<i>Ler</i>	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEEKRDLSLWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
<i>tt11-2</i>	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEEKRDLSLWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
Ws-4	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEEKRDLSIWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
<i>tds4-1</i>	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEEKRDLSIWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
Est-1	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEDKRDLSLWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
<i>tt17</i>	KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEDKRDLSLWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLLA	180
<i>Ler</i>	TKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF	240
<i>tt11-2</i>	TKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF	240
Ws-4	TKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF	240
<i>tds4-1</i>	TKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALVEAHTDVSALTF	240
Est-1	TKVFKALSIGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF	240
<i>tt17</i>	TKVFKALSIGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF	240
	△ ● △ ● ● △	
<i>Ler</i>	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
<i>tt11-2</i>	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
Ws-4	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
<i>tds4-1</i>	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
Est-1	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
<i>tt17</i>	ILHNMVPGQLQFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLEILSNGKYKSILRGLVNKEKVRIS	300
	● △ △	
<i>Ler</i>	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	356
<i>tt11-2</i>	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	356
Ws-4	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	356
<i>tds4-1</i>	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	355
Est-1	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	356
<i>tt17</i>	WAVFCEPPKDKIVLKPLPEMVSVESPAKFPPrTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND-	356
	△ △ △ △ △ △	

Abbildung 3.24. Multiples Alignment von LDOX Aminosäuresequenzen verschiedener Ökotypen und Mutantenallele. Die Aminosäuren H232, D234 und H288 repräsentieren das Motif des Aktiven Zentrums (HXD...H) und sind in grün und durch schwarze Kreise gekennzeichnet. Aminosäurereste, welche an der Substratbindung von 2-Oxoglutarat, Dihydroquercitin und Askorbat beteiligt sind, sind durch Dreiecke markiert. Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz, die einen phänotypischen Effekt hervorrufen sind rot hervorgehoben. Die konservierte Aminosäure Cystein 220 ist durch die dunkelblaue Farbe markiert. Natürliche Variationen innerhalb der analysierten Accessionen sind in hellblau dargestellt.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz von *LDOX* zwischen Est-1 und *tt17* bestätigte einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) G → A innerhalb der *LDOX* kodierenden Region. Dieser *SNP* führte zu einem Aminosäureaustausch in räumlicher Nähe zum aktivem Zentrum des Proteins innerhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenz (C220Y, Abb. 3.24. und Abb.3.25.A). Innerhalb der meisten Flavonoid 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ist der Cysteinrest an Position 220 konserviert. Unter Zuhilfenahme der PyMOL Software (Schrodinger 2010) wurde der Abstand zu anderen Cysteinresten innerhalb der berechneten Proteinstruktur ermittelt. Die räumliche Entfernung zwischen C66 und C220 beträgt 39,69 Å und 32,35 Å zwischen C220 und C305. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es unwahrscheinlich, dass die C220Y Mutation einen Einfluss auf die strukturelle Enzymkonformation durch veränderte Cysteinbrückenausbildung nimmt. Die Mutation an Position 220 in der abgeleiteten *tt17* Aminosäuresequenz hat möglicherweise einen Einfluss auf die Positionierung der Substrate 2-Oxoglutarat, Dihydroquercitin und Ascorbat im aktiven Zentrum des Enzyms.

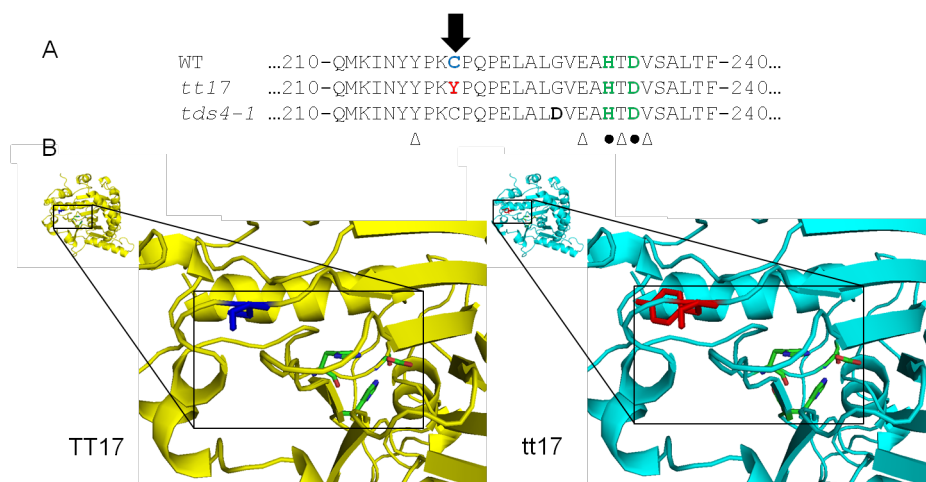


Abbildung 3.25. Die *tt17* Mutation. (A) Ausschnitt eines multiplen Alignment des LDOX Proteins mit der C220Y Mutation in *tt17* (Pfeil). Aminosäuren des HXD...H Motifs sind grün dargestellt und zusätzlich durch ausgefüllte Kreise gekennzeichnet. Aminosäuren die an der Substratbindung beteiligt sind werden durch Dreiecke markiert. Die G228D Mutation in *tds4-1* ist fettgedruckt dargestellt. (B) Räumliche Darstellung der LDOX Protein dreidimensionalen Struktur von *tt17* und der zugehörigen Accession Est-1 (TT17). Die Abbildung zeigt einen Überblick über die vollständige Proteinstruktur und jeweils einen vergrößerten Ausschnitt des aktiven Zentrums. Das Cystein 220 im Wildtyp Protein (TT17) ist blau eingefärbt. Tyrosin 220 in *tt17* ist in rot dargestellt.

Weiterhin zeigt das multiple Alignment der LDOX Sequenzen von *tt17*, *tt11-2*, *tds4-1* und den korrespondierenden Wildtypen *Est-1*, *Ler* und *WS-4* ein Aminosäureaustausch (G78E) in *tt11-2* erkennen. Ein Einzel-Aminosäureaustausch G228D in *tds4-1* ist ebenso wie der Austausch C220Y in *tt17* in der Nähe des aktiven Zentrums von LDOX lokalisiert und die Phänotypen nicht zu unterscheiden. Die Ergebnisse Modellierung der *tt17* Protein-Struktur und die durchgeführten Komplementationsanalysen, welche bestätigen das der *tt17* Locus für ein nichtfunktionelles LDOX Protein kodiert, zeigen das der *SNP* im *LDOX* ORF einen guten Kandidaten für den *tt*-Phänotyp der *tt17* Mutante darstellt. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind in (Appelhagen, I., Jahns, O., *et al.* 2011) veröffentlicht. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von LDOX im *tt17*-Allel sind unter der Nummer JF681791.1 bei GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegt.

3.4. Identifizierung von UDP-abhängigen Glykosyltransferase Zielgenen der PFG Transkriptionsfaktoren durch Transaktivierungs Assays

Das regulatorische Netzwerk von R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren der Subgruppe 7 (PFGs) ist bis heute noch nicht vollständig. Um zu untersuchen ob die drei PFG Transkriptionsfaktoren die Expression von UDP-abhängigen Glykosyltransferasen regulieren, wurden *in vivo* Transaktivierungs Assays durchgeführt. Das Aktivierungspotential der PFGs wurde in Ko-Transfektions Experimenten in *Arabidopsis thaliana* At7 Protoplasten durchgeführt. Hierzu wurden Promotor-Fragmente der UDP-abhängigen Glykosyltransferasen (*UGT78D1*, *UGT78D3*, *UGT78D4*, *UGT89C1* und *UGT73C6* mit dem ORF der β -Glukoronidase (GUS) mittels Gateway[®] Technologie in den Reportervektor *pDISCO* (Vektorkarte siehe Anhang 7.1.) rekombiniert und die spezifische β -Glukoronidase Aktivität (GUS') als Maß der Zielpromotoraktivität gemessen

(Rodaten im Anhang 7.4.). Als Reporterkontrolle diente ein 738 bp großes Fragment des *FLS1* Promotors in Fusion mit dem GUS ORF. Die untersuchten Promotor-Fragmente von *UGT78D1* (1229 bp, relativ zum Translationsstart), *UGT78D4* (961 bp) und *UGT89C1* (1089 bp) zeigten ohne Zugabe der PFG-Konstrukte keine Reporteragenaktivität. Lediglich eine GUS' Aktivität im Bereich der Hindergrundsignalstärke konnte detektiert werden. Des Weiteren zeigten die untersuchten Promotor-Fragmente durch die ermittelten GUS'-Werte alle eine Aktivität durch die PFG Transkriptionsfaktoren. Die stärkste Aktivierung zeigte der Promotor Pro_{UGT89C1}, gefolgt von Pro_{UGT78D4} und Pro_{UGT78D1}. Für die untersuchten Promotoren von *UGT78D1* und *UGT78D4* lässt sich eine deutlich höhere Transaktivierung durch PFG1 erkennen im Vergleich zu PFG2 und PFG3. Für Pro_{UGT89C1} lässt sich hier ein umgekehrter Effekt erkennen. Die Transaktivierungsfähigkeit im Vergleich zu PFG2 und PFG3 ist für PFG1 geringer. Für die Promotor-Fragmente von *UGT78D3* (992 bp, relativ zum Translationsstart) und *UGT73C6* (1018 bp) konnte keine Transaktivierung durch die PFG MYB-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Die Ergebnisse bestätigen, dass die Promotoren der analysierten *UGT* Gene *in vivo* durch die PFG Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind in Stracke, R. *et al.* (2010) veröffentlicht.

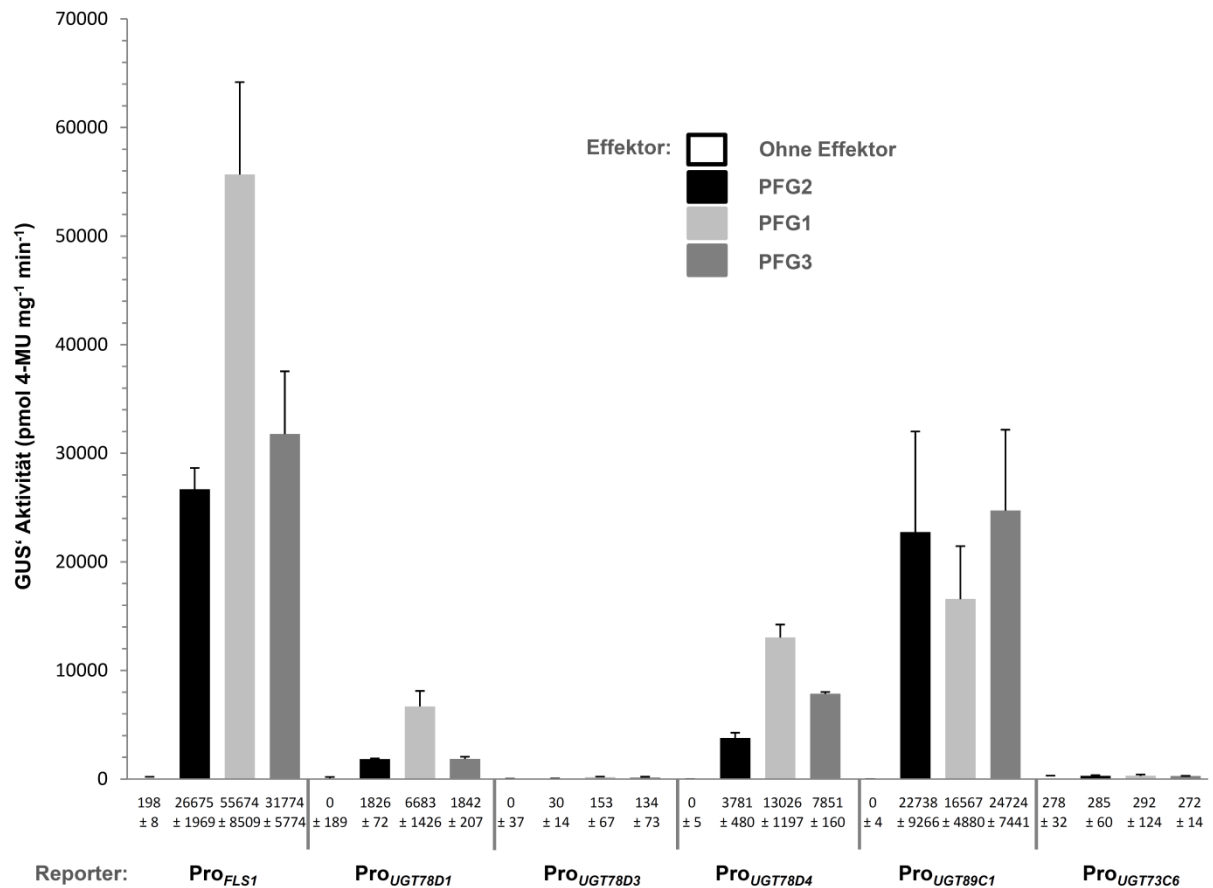


Abbildung 3.26. Ko-Transfektionsanalysen von putativen PFG Zielgenen in *Arabidopsis thaliana* At7 Protoplasten. Die Balken des Graphen repräsentieren Mittelwerte der spezifischen β -Glukoronidase Aktivität (GUS') von vier unabhängigen Transfektionsexperimenten. Promotor-Fragmente der Gene *UGT78D1*, *UGT78D3*, *UGT78D4*, *UGT89C1* und *UGT73C6* und des *Flavonol Synthase* Gens (*FLS*) als transkriptionelle β -Glukoronidase-Fusion wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch die PFG Transkriptionsfaktoren als Effektoren analysiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n = 4$).

3.5. PFG Zielgen *PFT1*

Im Laufe dieser Arbeit wurden erste Pilotexperimente zur Funktionsaufklärung des PFG Zielgens *Production of Flavonol Glycosides Target 1 (PFT1, At5g62210)* begonnen. *PFT1* wurde in 2007 als ein putatives Zielgen der PFG Transkriptionsfaktoren beschrieben und durch *loss-of-function* Experimente bestätigt (Stracke, R. *et al.* 2007; Jahns 2007). Die molekulare Funktion von *PFT1* ist weiterhin unbekannt. Für die Untersuchung möglicher Auswirkungen eines Funktionsverlustes des *PFT1*-Gens wurde eine GABI-Kat T-DNA Insertionslinie (GK243D08, *pft1-1*) isoliert. Es wurde für die Analysen das Allel gewählt, welches die Insertion innerhalb eines kodierenden Bereichs (2. Exon) enthält. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *PFT1* in *pft1-1* und dem Wildtyp (Col-0) analysiert (Abb. 3.27.A). Homozygote Pflanzen von *pft1-1* wurden generiert und die nächste Generation phänotypisch analysiert. Innerhalb der phänotypischen Untersuchungen konnten keine wesentlichen Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp (Col-0) festgestellt werden (nicht gezeigt). Zur Untersuchung des *in planta* Expressionsmusters von *PFT1* wurden transgene Pflanzen hergestellt die unter der Kontrolle des *PFT1* Promotors das *Green Fluorescent Protein (GFP)* exprimieren. Anhand der hergestellten transgenen GFP-Reporterlinien (*Pro_{PFT1}::GFP*) konnte die *in planta* Aktivität des *PFT1* Promotors in Wurzelspitzen Gewebe von 6 Tage alten Keimlingen nachgewiesen werden (Abb. 3.27.B). Andere Gewebe innerhalb der untersuchten transgenen Keimlinge zeigten keine GFP-Fluoreszenz (nicht gezeigt). Ein möglicher Einfluss von *PFT1* auf die Akkumulation von Flavonolglykosiden wurde mittels HPTLC untersucht. Hierzu wurden methanolische Extrakte aus ganzen Keimlingen und Wurzelgewebe von Wildtyp- (Col-0) und *pft1-1*-Keimlingen analysiert (Abb. 3.27.C). Ein Unterschied innerhalb der Flavonolglykosid-Akkumulation zwischen dem Wildtyp und dem Null-Allel *pft1-1* konnte nicht festgestellt werden.

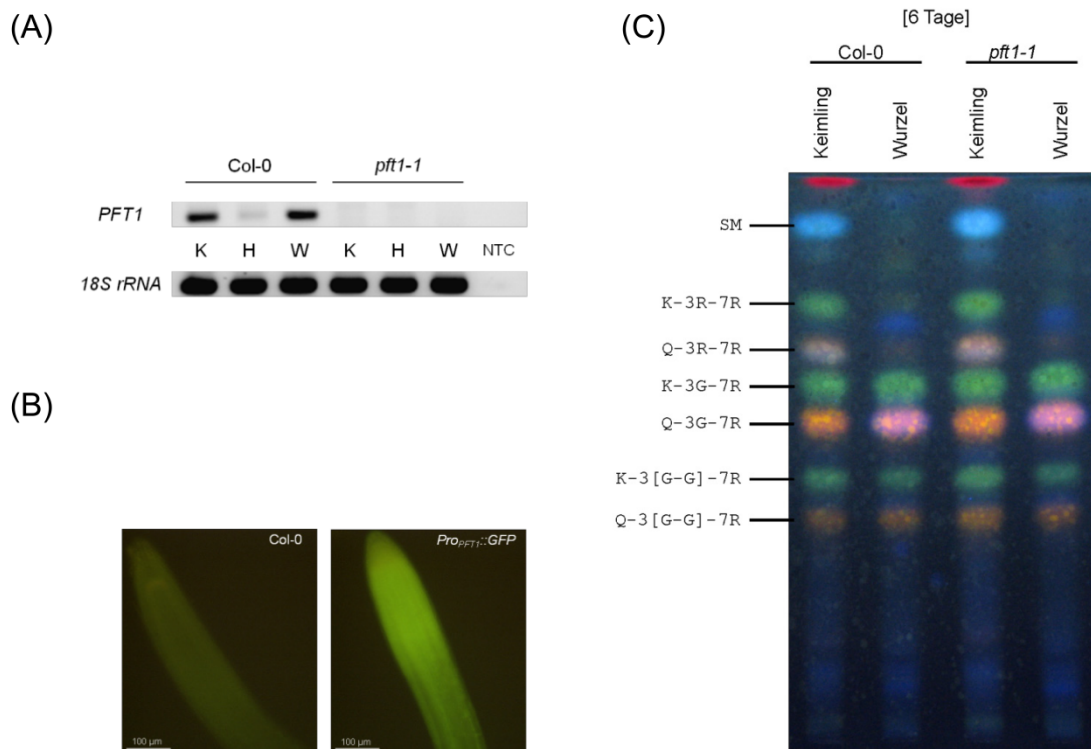


Abbildung 3.27. Analysen von *PFT1* in Keimlingsgeweben. (A) Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen die Expression von *PFT1* und *18SrRNA* in unterschiedlichen Keimlingsgeweben (K = Keimling, H = Hypokotyl und W = Wurzel) 6 Tage alter *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *pft1-1* knock out (GK243D08) Keimlinge. *PFT1* ist hauptsächlich im Wurzelgewebe von *A. thaliana* Keimlingen exprimiert. Die GABI-Kat T-DNA Insertionslinie GK243D08 (*pft1-1*) rapresentiert ein Nullallel. (B) Expressionsanalyse des *PFT1* Gens durch Promotor-*GFP* Linien. 6 Tage alte Wildtyp (Col-0) und transgene Keimlinge (*ProPFT1::GFP*) wurden auf *GFP* Fluoreszenz mikroskopisch analysiert. Eine *GFP* Expression in den transgenen Keimlingen wurde nur in der Wurzelspitze beobachtet. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen. (C) Metabolitanalyse methanolischer Extrakte von Wildtyp und *pft1-1* Keimlingen. Repräsentative Ergebnisse aus 80% methanolischer Extrakte von 6 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *pft1-1* Keimlingen nach Auftrennung durch HPTLC-Kieselgel 60 Platten und anschließender DPBA Färbung. Die Platte wurde unter UV Belichtung fotografiert. Farbschlüssel: Grün = Kämpferol Derivate, Orange = Quercitin Derivate, Hellblau = Sinapat Derivate, Rosa = Quercitin und Sinapat Derivate (überlagert), Rot = Chlorophyll. Buchstabencode: G = Glukose, K = Kämpferol, Q = Quercitin, R = Rhamnose, SM = Sinapoyl Malat.

In weiteren Experimenten zur Funktionsaufklärung von *PFT1* wurde die subzelluläre Lokalisation von *PFT1* in *Arabidopsis thaliana* At7- und *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten analysiert. Hierzu wurde die *PFT1*-cDNA in einen Expressionsvektor translational an einen GFP-kodierenden ORF mittels GATEWAY[®]-Technology rekombiniert (Abb. 3.28.A.). Das Konstrukt wurde jeweils in Protoplasten der Zellsuspensionskulturen At7 und BY-2 transfiziert und die Protoplasten jeweils anschließend mikroskopisch auf GFP-Fluoreszenz untersucht

(Abb. 3.28.B.). PFT1 ist exklusiv des Zellkerns im Cytoplasma der Protoplasten lokalisiert, hier konnte eine membranassoziierte Lokalisation innerhalb der At7- und BY-2-Protoplasten nicht ausgeschlossen werden.

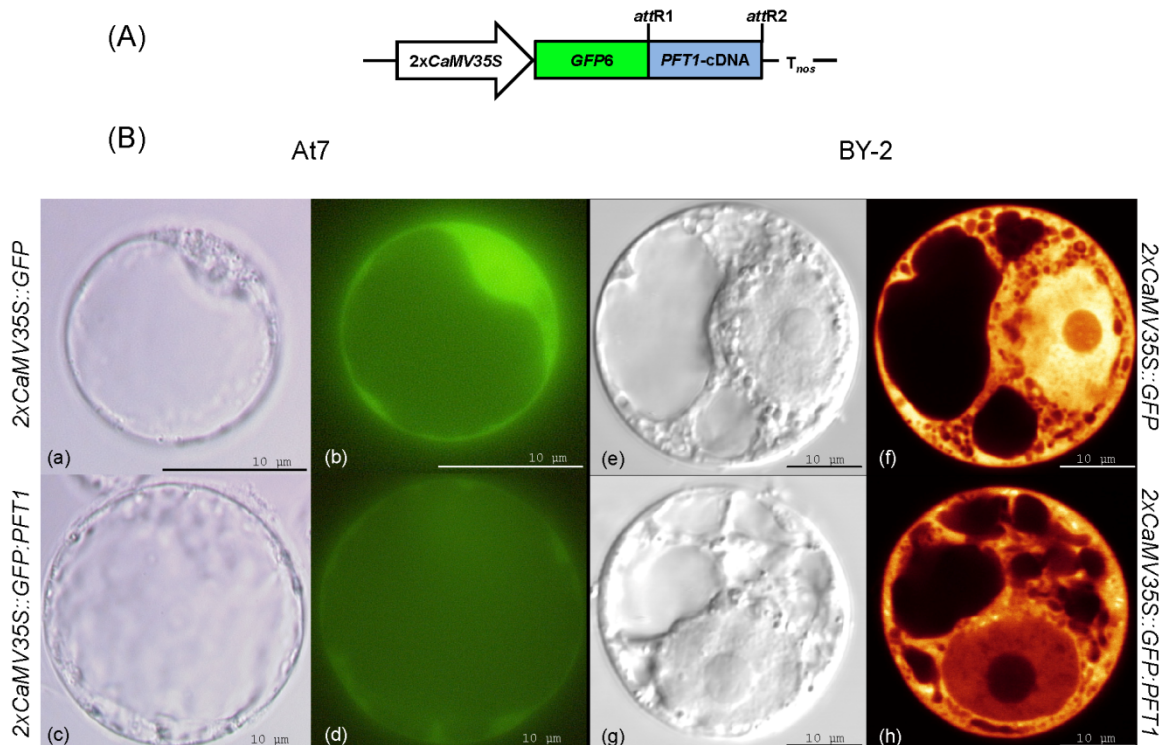


Abbildung 3.28. Subzelluläre Lokalisation von PFT1-GFP Fusionsproteinen.

(A) Schematische Darstellung des zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation verwendeten Konstrukts. (B) Protoplastenzellen der At7- und BY-2-Zellsuspensionskulturen, transfiziert mit *2xCaMV35S::GFP* Kontrollkonstrukten und mit *2xCaMV35S::GFP6:PFT1-cDNA*. Das PFT1-cDNA Fusionsprotein ist im Gegensatz zur GFP-Kontrolle (im gesamten Protoplasten lokalisiert) nicht im Kern lokalisiert. Für das PFT1-cDNA Fusionsprotein wurde eine membranassoziierte Lokalisation beobachtet. Die Aufnahmen wurden mittels eines GFP-spezifischen Filters an einem Fluoreszenzmikroskop (At7) und an einem *Laserscanning* Mikroskop (BY-2) angefertigt.

4. Diskussion

4.1. **ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter *in vivo* DNA-Bindestellen von PAP1, TT8 und EGL3**

Die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) hat sich zu einer häufig angewandten Technik zur *in vivo* Bindestellen Identifizierung von Transkriptionsfaktoren und anderer Chromatin-assoziierten Proteinen entwickelt (Kuo und Allis 1999). Die Methode beinhaltet mehrere aufeinander abgestimmte Versuchsschritte. Die an das Chromatin gebundenen Proteine werden durch Formaldehyd fixiert (Kuo und Allis 1999) und durch Sonifizierung anschließend in kürzere DNA-Fragmente geschnitten. Um das zu isolierende Chromatin höher zu konzentrieren wird vor der Sonifizierung eine Isolierung der Zellkerne durchgeführt. Für die Immunopräzipitation wird ein spezifischer α -GFP Antikörper gegen einen GFP Protein-Tag eingesetzt. Anschließend werden die Protein-DNA-Bindungen gelöst und die eluierte DNA kann in weiteren nachfolgenden Analysen eingesetzt werden, wie z.B. ChIP-PCR oder ChIP-seq. Im Rahmen dieser Arbeit sollte als ein Ziel die Methode der Chromatin Immunopräzipitation etabliert werden. Hierzu mussten zunächst einige kritische Parameter, wie die Formaldehyd-Fixierung, die Sonifizierung und die eigentliche Immunopräzipitation in langwierigen Versuchen optimiert werden. Als pflanzliches Ausgangsmaterial dienten transgene Keimlinge die die TF-cDNA (je PAP1, TT8 und EGL3) mit dem fusioniertem ORF des GFP unter nativen aber auch unter Überexpressionsbedingungen exprimieren (siehe Abschnitt 3.1.). Nachdem die durchgeführten ChIP-Experimente mit Hilfe der PCR auf die Amplifizierung eines bekannten Ziel-DNA-Zielbereichs der Transkriptionsfaktoren überprüft wurden, konnten die DNAs für die Sequenzierung auf dem *Genome Analyzer_{IIx}* (Illumina) vorbereitet und in einem Standard 36 bp *Single-Read*-Lauf sequenziert werden. Nach dem Mapping der Sequenz-*Reads* gegen das nukleare *Arabidopsis thaliana* Genom wurden die putativen Bindeprofile der zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3 (unter nativer Promotorkontrolle) in einer ersten Analyse mit Hilfe des *Integrative Genomics Viewer* (IGV) visualisiert und dokumentiert.

4.1.1. Die Chromatin Immunopräzipitation konnte erfolgreich etabliert werden

Die Isolierung von pflanzlichem Chromatin benötigt eine besondere Herangehensweise. Pflanzliche Zellen sind umgeben von Zellwänden und beinhalten große Vakuolen, welche zu einer relativ geringen Anzahl von Zellkernen im Vergleich zum Gesamt-Ausgangsmaterial führen. Zusätzlich stellen pflanzliche Vakuolen eine Quelle proteolytischer Aktivität dar, die den Abbau Chromatin-assoziiertes Proteine bewirken könnten (Boller und Kende 1979). Daher wurde darauf geachtet nur frisch-herangezogene Keimlinge zu verwenden und diese bis zur Formaldehyd-Fixierung maximal 1 Stunde in 1x PBS zu lagern. Das geerntete Material wurde durch Vakuuminfiltration mit einer 1%igen Formaldehydlösung (in 1x PBS) fixiert. Die Etablierung der Formaldehydfixierung hat gezeigt, dass nach der Fixierung mit 1% Formaldehyd die Effizienz der anschließenden DNA-Isolierung im Vergleich zu höheren Formaldehydkonzentrationen am höchsten ist (siehe Abschnitt 3.1.1.1.). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Formaldehydkonzentration zur Fixierung finden sich unter anderem bei (Das *et al.* 2004; Haring *et al.* 2007; Kaufmann *et al.* 2010). Die Sonifizierung des isolierten Chromatins wurde so gewählt das die höchste DNA-Konzentration in einem Längenbereich von 200–800 bp liegt (siehe Abschnitt 3.1.1.2.). In der publizierten Literatur lassen sich keine exakten Angaben für einen optimalen DNA-Längenbereich nach der Sonifizierung für die CHIP finden. Unterschiedliche Angaben variieren von 100-500 bp (Das *et al.* 2004), 250-750 bp (Haring *et al.* 2007) und 200-1200 bp (Kaufmann *et al.* 2010) für den DNA-Längenbereich nach Sonifizierung.

Ein entscheidender Nachteil der Chromatin Immunopräzipitation ist die Notwendigkeit für jedes zu untersuchende Protein einen spezifischen Antikörper zu benutzen. Eine Möglichkeit dieser Schwierigkeit zu entgehen ist der Einsatz eines Protein-Tags. Dieser wird mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert und somit können unterschiedliche Proteine mit nur einem Antikörper präzipitiert werden. Bis heute sind mehrere Proteintags zur Affinitätsaufreinigung von Protein-DNA Komplexen beschrieben (Hearn und Acosta 2001; Terpe 2003; Lichty *et al.* 2005). Ein gängiger Protein-Tag ist das GFP, für den kommerziell Antikörper erhältlich sind. Der Einsatz von GFP-Fusionsproteinen für die Chromatin Immunopräzipitation ist bis heute vereinzelt beschrieben (de Folter *et al.* 2007;

Morohashi und Grotewold 2009). Die spezifische Affinität des hier benutzten Antikörpers (ab290, Abcam) wurde in Kombination mit dem Protein-Tag (mGFP6, in *pMDC43* und *pMDC83*) bereits in einer ChIP erfolgreich von (de Folter *et al.* 2007) gezeigt.

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden transgene Keimlinge eingesetzt die eine GFP-Transkriptionsfaktorfusion mit PAP1, TT8 und EGL3 unter der nativen Promotorkontrolle exprimieren verwendet (Düttmann 2008). Um die Transkriptmengen der GFP-Fusionsproteine zu erhöhen wurden transgene Linien erzeugt die die Fusion unter dem stark konstitutiven 35S Promotor aus *CaMV* exprimieren. Die phänotypische Analyse (siehe Abb. 3.1.) zeigt für die transgenen Linien *Pro_{35S}::TT8:GFP* und *Pro_{35S}::GFP:EGL3* die Fähigkeit das jeweilige Nullallel zu komplementieren. Einzig die *Pro_{35S}::GFP:PAP1* T2-Keimlinge zeigten keine Komplementierung für den Wildtyp Phänotyp. Die N-terminale Fusion von GFP an PAP1 ist in transgenen Linien mit nativer Promotorkontrolle funktional, so dass eine gestörte Proteinfunktion durch Fehlfaltung ausgeschlossen werden kann (Düttmann 2008). Die durch das Transgen-vermittelte Hygromyzinresistenz zeigte auf hygromyzin-haltigen GM-Platten für transgene Keimlinge im Gegensatz zu nicht-transgenen ein normales Wurzelwachstum. Das Transgen wurde mit spezifischen Oligonukleotidprimern in einzelnen T1-Pflanzen nachgewiesen. Allerdings zeigten diese auf hygromyzin-haltigem Medium eher den Wurzelphänotyp einer hygromyzin-sensitiven Pflanze. Positionseffekte ausgelöst durch die T-DNA Insertion in transkriptionell inaktiven Bereichen könnten für eine ausbleibende Expression des Fusionsproteins verantwortlich sein und somit der Wildtyp Phänotyp nicht komplementiert werden.

Die aus dem präzipitierten Chromatin isolierte DNA wurde mit Hilfe der Amplifizierung durch PCR auf das Vorhandensein von DNA-Fragmenten untersucht. In diesem Fall wurden spezifische Oligonukleotidprimer für eine bekannte Zielsequenz im Promotor des *DFR* Gens der Transkriptionsfaktoren PAP1, TT8 und EGL3 eingesetzt um die Amplifikatmenge relativ zu einem nicht-assoziierten, nicht-angereicherten genomischen Bereich (*ACT2/7*) zu untersuchen. Konnte das zu amplifizierende *DFR* Promotorfragment nachgewiesen werden wurde die jeweiligen Transkriptionsfaktor-angereicherte DNA und α -IgG angereicherte DNA für die Identifizierung von *in vivo*

Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren mittels Illumina Sequenzierung eingesetzt.

4.1.2. Eine PAP1-bekannte Zielsequenz konnte mittels CHIP nicht angereichert werden

Eine Immunopräzipitation mit dem verwendeten α -GFP Antikörper sollte das GFP-PAP1 Fusionsprotein binden und somit die von PAP1 unter den gegebenen Bedingungen gebundenen DNA-Zielbindestellen anreichern. Als eine identifizierte Bindestelle ist der Promotor des *DFR* Gens in Transaktivierungsassays durch Aktivierung mit Hilfe eines MBW-Komplexes bekannt, der PAP1 beinhaltet (Zimmermann, I. M. *et al.* 2004). Darüber hinaus konnte das PAP1 spezifische *cis*-regulatorische Element, das MRE, in 2008 von Düttmann beschrieben werden. Wie in Abschnitt 3.1.2.1. dargestellt kann mit der α -GFP Antikörper präzipitierten DNA der MRE-beinhaltende *DFR* Promotorbereich in einer PCR nicht amplifiziert werden. Die Bindung des Transkriptionsfaktors unter den gegebenen Bedingungen konnte somit mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden. Eine Amplifikation von DNA präzipitiert mit dem α -H3 Antikörper bestätigt die Funktionalität der ChIP, allerdings kann eine generelle Durchführbarkeit *per se* hierdurch nicht angenommen werden. Durch die Fixierung mit Formaldehyd kann es zu Proteinentfaltungen und zur Beeinflussung der Binefähigkeit des Antigens, und somit zu herabgesetzter Immunoreaktivität kommen (Das *et al.* 2004). Somit könnte das Fusionsprotein teilweise entfaltet und somit inaktiv nicht an alle *in vivo* Zielbindestellen binden. Ein weiterer Grund für die Komplementationsfähigkeit der transgenen Pflanzen aber die Nicht-Funktionalität in der ChIP besteht darin, dass eine gleichbleibende Effizienz der Formaldehydfixierung zwischen einzelnen Versuchsdurchführungen nicht gewährleistet werden kann. Es ist bekannt, dass die Formaldehydfixierung des Pflanzenmaterials nicht vollständig alle DNA-Protein-, RNA-Protein- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen fixiert. Würde das Material vollständig fixiert wäre eine anschließende Lösung der fixierten nuklearen DNA-Fragmente nach Sonifizierung nicht möglich (Das *et al.* 2004). Es ist weiterhin möglich, dass eine Bindung von PAP1 an das MRE im *DFR* Promotor nicht durch Formaldehyd fixiert wurde. Des Weiteren könnte die Bindung an diesen Lokus überfixiert sein, was dazu führen würde dass dieser DNA-Bereich nicht aufgereinigt werden kann. Durch die

Analyse weiterer putativer Bindestellen von PAP1 hätte auch eine erfolgreiche Versuchsdurchführung bestätigt werden können. Allerdings gibt es bis heute keine validierten Daten zu *in vivo* DNA-Bindestellen des Transkriptionsfaktors PAP1 aus *Arabidopsis thaliana*. Auch kann der Antikörper vereinzelt nicht alle Antigene erfolgreich immunopräzipitieren. Es ist auch möglich, dass durch das Waschen der *Beads* die Antikörper oder die gebundenen Antigene entfernt wurden. Die Konzentration an Fusionsprotein, die Konzentration an aufgereinigtem Chromatin und somit die Menge des Ausgangsmaterial könnte für diesen Versuch unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Hierdurch könnte ebenfalls die bestehende Komplementationsfähigkeit der transgenen Keimlinge unter nativer Promotorkontrolle und die gleichzeitige Nicht-Funktionalität in der ChIP erklärt werden. Es ist bekannt, dass *Arabidopsis thaliana* Keimlinge die auf stark Saccharose-haltigem Medium (4%) wachsen die höchste Konzentration an Anthocyanen in den Kotyledonen und dem oberen Teil des Hypokotyls vier bis fünf Tage nach Keimung erreichen (Kubasek *et al.* 1992) Obwohl darauf geachtet wurde die transgenen Keimlinge fünf Tage nach Keimung zu ernten könnte es aufgrund von Variationen innerhalb der Expression von Anthocyanbiosynthese-beteiligten Regulatoren und Strukturgenen zu zeitlichen Verschiebungen der Anthocyanakkumulation, ausgelöst durch eine zeitliche Veränderung der Expression der Regulatoren (z.B. PAP1), gekommen sein. Eine zu langwierige Erntedauer und Zwischenlagerung der transgenen Keimlinge in 1xPBS könnte durch eine stressbedingte Lösung der PAP1-DNA-Bindungen *in planta* ebenso an der nicht-erfolgreichen Durchführung eines ChIP-Experimentes zur Identifizierung der Ziel-DNA-Bindestellen von PAP1 beteiligt sein.

4.1.3. ChIP-Seq: Genomweite Identifizierung von Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3

Zwischen 0,8 und 11,2 Millionen Sequenz-*Reads* konnten einmalig perfekt auf die Einzelchromosomen von *Arabidopsis thaliana* gemappt werden. Anhand der Visualisierung der perfekt gemappten *Reads* (siehe Abb. 3.10. und 3.11.) und der einmalig perfekt gemappten *Reads* zeigte sich eine erhöhte Sequenz-Abdeckung an den Zentromerregionen der Einzelchromosomen. Dieses Phänomen ist unter anderem bei Kaufmann *et al.* (2010) beschrieben. Um auch diese Regionen auf mögliche Bindestellen der untersuchten Transkriptionsfaktoren zu untersuchen

wurde, wie bereits mehrfach beschrieben (Kaufmann *et al.* 2009; Ouyang *et al.* 2011), die weitere Analyse nur mit den einmalig perfekt gemappten Sequenz-*Reads* durchgeführt. Des Weiteren zeigten sich auch außerhalb der Zentromerregionen Bereiche mit massiv angereicherten Sequenz-*Reads* (perfekt gemappte *Reads*). Eine hohe Anzahl von Sequenz-*Reads* die eine gleiche Sequenz repräsentieren zeigen oftmals Fehler bzw. Artefakte während der PCR Amplifikation auf. Die Visualisierung der einmalig perfekt gemappten Sequenz-*Reads* zeigte allerdings nur die bereits beschriebene erhöhte Sequenz-Abdeckung in Zentromerregionen der Einzelchromosomen. Auffällig ist der große Unterschied in der Verteilung der einmalig perfekt gemappten Sequenz-*Reads* für EGL3 zwischen dem Experiment (α -GFP) und der unspezifischen Kontrolle (α -IgG) (siehe Abb. 3.11.). Die automatisierte Identifizierung mit Hilfe des PeakRangers (v.1.4., Feng *et al.* 2011) scheint durch den großen Unterschied deutlich unpräziser zu funktionieren, welches sich auch in der hohen Anzahl an putativen Bindestellen zeigt. Eine Validierung der möglichen Bindestellen von EGL3 ist durch die hohe Anzahl erschwert aber daher auch zwingend notwendig.

4.1.4. Ein ChIP-seq Experiment konnte für TT8 erfolgreich durchgeführt werden

Bis heute sind die *in vivo* Zielbindestellen von TT8 innerhalb der Flavonoidbiosynthese, aber auch weitere mögliche Bindestellen weitestgehend unbekannt. Wie bereits weiter oben dargestellt konnte die Aktivierung des *DFR* Promotors durch einen Komplex aus PAP1, TT8 und TTG1 in Transaktivierungsassays gezeigt werden (Zimmermann, I. M. *et al.* 2004). Des Weiteren wurde das von TT8 gebundene RRE *cis*-regulatorische Element im *DFR* Promotor in 2008 von Verena Düttmann identifiziert (Düttmann 2008). Zusätzlich konnte kürzlich die Aktivierung des *LDOX* Promotors durch einen Komplex aus PAP1, TT8 und TTG1 gezeigt werden (Appelhagen, I., Jahns, O., *et al.* 2011). Der RRE-enhaltene genomische Bereich des *DFR* Promotors konnte mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation (α -GFP Antikörper Immunopräzipitation für das TT8:GFP Fusionsprotein) angereichert und in einer PCR amplifiziert werden (siehe Abb 3.7.). Im Vergleich zur unspezifischen Kontrollregion des Gens *ACT2/7* ist das amplifizierte Promotorfragment durch die Immunopräzipitation angereichert worden. Eine 8- bis 16-fache Anreicherung einer bekannten Zielsequenz

gegenüber einem nicht-angereicherten, mit der regulatorischen Wirkweise des untersuchten Proteins nicht-assoziierten genomischen Bereich wird als eine Voraussetzung für die Identifizierung von „echten“ Zielsequenzen angenommen (Kaufmann *et al.* 2010). Durch den Nachweis des *DFR* Promotorbereiches konnte die erfolgreiche Etablierung der Chromatin Immunopräzipitation gezeigt werden. Um genomweite *in vivo* Ziel-DNA-Bindestellen des TT8 Transkriptionsfaktors zu identifizieren wurde diese DNA zusammen mit α -IgG präzipitierter DNA in einem *Next Generation Sequencing* Ansatz sequenziert. Die genomweiten TT8 Bindestellen zeigten eine Verteilung der möglichen Bindestellen zu 13% in Promotorbereichen in *Arabidopsis thaliana*. Der größte Teil der Bindungen scheint in Exons (59%) und Introns (18%) für TT8 stattzufinden. Aus anderen, vergleichbaren ChIP-seq Experimenten wird von einer Verteilung von TF-Bindestellen zu 90% in Bereichen Protein-kodierender Gene (Promotor und kodierter Bereich) berichtet (Kaufmann *et al.* 2009). Allerdings liegt in vergleichbaren Studien der Anteil der TF-Bindungen in Promotoren (~ 30%) von Genen (Ouyang *et al.* 2011). Da TT8 einen transkriptionellen Regulator der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* darstellt scheint eine Bindung von nur 13% in Gen-Promotoren einen sehr geringen Wert darzustellen. Es wäre möglich, dass die Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor und der RNA-Polymerase während der Transkription nicht gelöst wird und das Protein daher in Exon- oder Intronsequenzen fixiert wurde. Aus den 1441 putativen Ziel-Bindestellen wurden 30 Gene ausgewählt (siehe Tabelle 3.3.). Anhand dieser Liste sollen in Zukunft weitere Experimente zu Validierung, wie Transaktivierungsassays oder Expressionsstudien durchgeführt werden. Als ein mögliches TT8-Zielgen gilt *At5g54060 (UGT79B1)*. Das Gen konnte vor kurzem mit Hilfe von Transkriptomdaten als Anthocyan-assoziiert eingestuft und als eine Anthocyan-3-O-Glukosid: 2“-O-xylosyltransferase charakterisiert werden (Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2012). Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ChIP-seq Experimentes konnte somit ein „neues“ *in vivo* Zielgen von TT8 identifiziert werden. Für die Einstufung der identifizierten putativen Bindestellen als „echte“ Zielgene sind noch weitere langwierige Datenqualitätsanalysen gefolgt von Validierungsexperimenten notwendig. So könnten für einige putativen Zielgene zur Validierung Promotoraktivierungsstudien in At7 Protoplasten durchgeführt werden. Des Weiteren könnten anhand von

Expressionsstudien die Transkriptmengen ausgewählter Zielgene im *tt8-1* Null-Allel im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Hier müsste allerdings die mögliche Redundanz mit anderen bHLH Proteinen der Untergruppe IIIf in Betracht gezogen werden. Zusätzlich könnte eine mögliche Protein-DNA-Wechselwirkung *in vitro* mit Hilfe von *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) oder *in vivo* mit *Yeast-1-Hybrid* (Y1H) Experimenten untersucht werden.

4.1.4.1. Der Transkriptionsfaktor TT8 aus *Arabidopsis thaliana* ist an der Regulation eines Anthocyan-spezifischen Regulons beteiligt

Mit Hilfe der Visualisierung der TT8-Bindeprofile an Strukturgenloci der Saccharose-induzierten Anthocyanbiosynthese wurde eine *in vivo* Bindung des Transkriptionsfaktors analysiert. Für die untersuchten Loci zeigte sich für TT8 eine mögliche Bindefähigkeit in den Promotoren von *CHS*, *F3H*, *DFR* und *LDOX*. Anhand des TT8 Bindeprofils im *DFR* Promotor konnte in dieser Arbeit durch die genomweite Identifizierung mittels ChIP-seq die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an einen Bereich der das TT8 RRE enthält bestätigt und erstmals *in vivo* gezeigt werden. Der *CHI* Locus zeigte hier eine Besonderheit. Hier scheint die Bindung des Transkriptionsfaktors nicht im Promotor, sondern innerhalb der genomischen Organisation des Locus statt zu finden. Obwohl bis heute angenommen wird das *cis*-regulatorische Elemente, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sind, vorrangig im Promotor von Zielgenen lokalisiert sind gibt es mehrere Beispiele für regulatorische Sequenzen in Introns, vor allem im 5'-Bereich eines Gens (Rose *et al.* 2008). Die Sequenzverteilung am Flavonol-spezifischen *FLS1* Locus zeigte, dass TT8 weder regulatorische Bereiche des Gens noch an das Gen selbst bindet und somit vermutlich keine regulatorische Wirkung auf die Flavonolbiosynthese ausübt. Ursprünglich wurde die Flavonoidbiosynthese in „frühe“ und „späte“ Schritte aufgrund der Einteilung der Ko-Expression von beteiligten Genen und die Licht-abhängige Regulation der jeweiligen Promotoren eingeteilt (Kubasek *et al.* 1992; Pelletier *et al.* 1997). Hierbei wird davon ausgegangen, dass „frühe“ Biosynthese-Schritte (bis *F3H*) TTG1-unabhängig und „späte“ Schritte (der Anthocyan- und PA-Biosynthese) ab *DFR* TTG1-abhängig von MBW-Komplexen in *Arabidopsis thaliana* kontrolliert werden. Eine TTG1-abhängige MBW-Komplex-kontrollierte Regulation der Anthocyanbiosynthese ist bis heute mehrfach beschrieben (zusammengefasst in

Feller *et al.* 2011). Die Regulation unterschiedlicher Stoffwechselwege erfolgt in *Arabidopsis thaliana* zum Teil über die Kombination der MBW-Komplexpartner (Übersicht in Broun 2005). Für die Anthocyanbiosynthese ist die Kombination aus PAP1, TT8/EGL3 und TTG1, und für die Anthocyan- und PA-Biosynthese eine Kombination aus TT2, TT8 und TTG1 mehrfach publiziert (zusammengefasst in Feller *et al.* 2011). Der regulatorische Komplex mit TT2 als R2R3-MYB Transkriptionsfaktor spielt allerdings für die Anthocyanbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* Keimlingsgewebe keine Rolle, da dieser nicht in Keimlingen exprimiert wird (Nesi *et al.* 2001). Im Gegensatz zur TTG1-abhängigen Regulation der Anthocyan- und PA-Biosynthese durch MBW-Komplexe erfolgt die Regulation der Flavonolbiosynthese TTG1-unabhängig. Die Synthese der Flavonole und Flavonolglykoside wird durch verschiedene PFG Transkriptionsfaktoren in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* reguliert (Mehrtens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007; 2010). Trotzdem gibt es in der publizierten Literatur Hinweise für eine gemeinsame Aktivierung von frühen und späten Schritten der Flavonoidbiosynthese. In *gain-of-function* Experimenten konnten gesteigerte Expressionswerte von frühen und späten Flavonoidbiosyntheseschritten beobachtet werden (Borevitz *et al.* 2000; Tohge *et al.* 2005). Auch konnte kürzlich anhand von Transaktivierungsassays gezeigt werden, dass frühe Biosynthesegene, wie die *CHS* grundsätzlich durch MBW-Faktoren aktiviert werden können (Appelhagen, Ingo 2011). Durch die gezeigten TT8-Bindeprofile konnte erstmals eine *in vivo* Bindung auch an frühe Gene der Flavonoidbiosynthese mit Hilfe von ChIP-seq Experimenten gezeigt werden. Daher ergeben sich neue Hinweise auf einzelne Regulons innerhalb der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. So scheint es denkbar, dass neben einem Regulon für die Flavonolbiosynthese, kontrolliert durch die PFG Transkriptionsfaktoren, auch ein Anthocyanbiosynthese-Regulon in *Arabidopsis thaliana* existiert.

4.1.4.2. In der Saccharose-induzierten Anthocyanbiosynthese bindet der Transkriptionsfaktor TT8 unterschiedliche regulatorische Bereiche

Wie in Abbildung 3.15. dargestellt, wurden die TT8-Bindeprofile für bekannte Regulatoren der Anthocyanbiosynthese in Keimlingsgewebe visualisiert und analysiert. Sequenz-*Read*-Anreicherungen wurden in Bereichen von *EGL3*, *TT8* und *TTG1* beobachtet. In 2006 konnten Baudry *et al.* zeigen dass die *TT8* Expression durch unterschiedliche Kombinationen von MBW-Komplexpartnern *in planta* kontrolliert wird. Die Sequenzanreicherungen im Promotor von *TT8* zeigen hier den möglichen Bereich des cis-regulatorischen Elements. Die hier gezeigte putative Bindung von TT8 an den eigenen Locus (Exon) steht allerdings im Kontrast zu den Ergebnissen von Baudry *et al.* (2006). Bei einer histochemischen Analyse der GUS-Aktivität eines *Pro_{TT8}::uidA* Konstrukts in *TT2*- und *PAP1*-Überexpressionslinien konnte hier eine GUS-Expression in 3 Tage alten Keimlingen beobachtet werden. Durch die Überexpression von *TT2* und *PAP1* in allen Gewebeschichten der transgenen Linien könnte es jeweils zusammen mit TT8 und TTG1 in einem Komplex zur Bindung von regulatorischen Elementen innerhalb des *TT8* Promotors kommen, die unter den hiergewählten Bedingungen von TT8 nicht gebunden werden. Des Weiteren zeigen *PAP1 gain-of-function* Experimente eine erhöhte Expression von *TT8* (Tohge *et al.* 2005). Unter Annahme, dass diese gesteigerte Expression auch durch MBW-Komplexe reguliert wird lassen sich allerdings durch diesen Vergleich keinerlei Rückschlüsse auf die Bindung an regulatorische Elemente ziehen. Eine Validierung der durch die ChIP-seq Analyse gezeigten TT8-Bindung innerhalb des eigenen Locus ist daher unbedingt notwendig. Ein ähnliches TT8-Bindeprofil zeigt sich im 3'-Bereich von *EGL3*. *EGL3* gehört ebenso wie *TT8* zur Subgruppe III_f der bHLH Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* und ist an der Regulation der Anthocyanbiosynthese beteiligt (zusammengefasst in Feller *et al.* 2011). Es ist nicht auszuschließen, dass TT8 auch an der Regulation eines „homologen“ Regulators beteiligt ist.

Der dargestellte genomische Bereich des *PAP1* Locus zeigte keine durch eine TT8 Bindung hervorgerufene Sequenzanreicherung in den hier beschriebenen ChIP-seq Experimenten. Unter Annahme einer MBW-abhängigen Regulation mit *PAP1* als Komplexpartner und den gegebenen Bedingungen scheint eine *in vivo*

Bindung von TT8 an diesen Locus nicht stattgefunden zu haben. In *PAP1 gain-of-function* Experimenten wurde eine gesteigerte *PAP1* Expression beobachtet (Tohge *et al.* 2005). Eine Formaldehydfixierung aller Protein-DNA-Wechselwirkungen kann durch den Versuch nicht gewährleistet werden. So könnte eine Bindung von TT8 an Bereiche von *PAP1* stattgefunden, aber nicht fixiert und somit durch eine ChIP nicht angereichert worden sein. Die Ergebnisse von Tohge *et al.* (2005) wurden bis heute nicht validiert, so dass es sich bei diesen auch um ein Artefakt handeln könnte und eine *in vivo* Interaktion nicht stattfindet. Anders als für die TT8-Bindeprofile an Strukturgen-Loci in Promotorbereichen scheint das Bindeverhalten an Loci für Regulatoren der Anthocyanbiosynthese einem anderen Muster zu unterliegen. Hier scheint die Bindung des Transkriptionsfaktors vorrangig in kodierten Regionen der Gene zu erfolgen. Für das MADS-Box Gen *AGAMOUS* (*AG*) ist die Bindung von mehreren Transkriptionsfaktoren im zweiten Exon des Gens mehrfach beschrieben (Sieburth und Meyerowitz 1997; Deyholos und Sieburth 2000; Gomez-Mena *et al.* 2005). So scheint es möglich, dass eine TT8 Bindung an den eigenen Locus und die Bindung an andere Regulatoren ebenfalls durch eine mögliche Interaktion in kodierten Bereichen der Gene denkbar ist.

4.1.5. Ein ChIP-seq Experiment konnte für EGL3 erfolgreich durchgeführt werden

Der bHLH Transkriptionsfaktor EGL3 aus *Arabidopsis thaliana* ist an der Regulation mehrerer Stoffwechselwege wie der Anthocyanbiosynthese, der Epidermis-Zelldifferenzierung, der Trichom- und Wurzellhaarentwicklung und der Samenschalenentwicklung beteiligt (zusammengefasst in Feller *et al.* 2011). Innerhalb der Flavonoidbiosynthese ist EGL3 an der TTG1-abhängigen MBW-Komplex-Regulation der Anthocyanbiosynthese beteiligt. So konnte die Promotoraktivierung der Anthocyanbiosynthese-beteiligten Gene *DFR* und *LDOX* durch einen MBW-Komplex mit EGL3 in Transaktivierungsassays gezeigt werden (Zimmermann, I. M. *et al.* 2004; Appelhagen, I., Jahns, O., *et al.* 2011). Nach der Durchführung eines ChIP Experimentes konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors an einen Bereich des *DFR* Promotors mit Hilfe einer PCR für die unterschiedlichen transgenen Keimlinge nachgewiesen werden. Der Vergleich mit einem unspezifischen, nicht-angereichertem Kontrollgen bestätigt die

erfolgreiche Durchführung des ChIP Experimentes für EGL3 (siehe Abb. 3.8. und 3.9.). Um die genomweiten *in vivo* Ziel-DNA-Bindestellen des Transkriptionsfaktors zu identifizieren wurde die überprüfte DNA zusammen mit der α -IgG präzipitierten DNA mit der Illumina Technologie sequenziert. Die genomweiten putativen EGL3 Bindestellen zeigte eine mögliche Verteilung zu 20% in Promotorbereichen. Der größte Teil der Bindungen scheint in Exons (48%) und Introns (21%) für den Transkriptionsfaktor stattzufinden. Da EGL3 einen transkriptionellen Regulator der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* darstellt scheint eine Bindung von 20% in Promotorbereichen einen geringen Wert darzustellen. 30 putative Zielgene wurden aus den identifizierten Ziel-Bindestellen ausgewählt (siehe Tabelle 3.4.). Anhand dieser Liste sollen in Zukunft weitere Experimente zu Validierung, wie Transaktivierungsassays oder Expressionsstudien durchgeführt werden. Als ein mögliches Zielgen von EGL3 konnte *At5g54060 (UGT79B1)* identifiziert werden. *UGT79B1* scheint von beiden Faktoren, TT8 und EGL3 kontrolliert zu werden. Beide Transkriptionsfaktoren gehören zur Untergruppe IIIf der bHLH-Proteine und zeigen in ihrer Ziel-Spezifität oftmals Redundanz (Pires und Dolan 2010; Feller *et al.* 2011). Ob die identifizierten putativen EGL3-Zielgene als „echt“ eingestuft werden können ist aber noch fraglich und weitere Datenqualitätsanalysen gefolgt von Validierungsexperimenten sind notwendig. Für einige ausgewählte putative Zielgene könnten zur Validierung Promotoraktivierungsstudien in At7 Protoplasten durchgeführt werden. Des Weiteren könnten anhand von Expressionsstudien die Transkriptmengen ausgewählter Zielgene im *tt8* Null-Allel im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Hier müsste allerdings die mögliche Redundanz mit anderen bHLH Proteinen der Untergruppe IIIf in Betracht gezogen werden. Zusätzlich könnten mögliche EGL3-DNA-Wechselwirkungen *in vitro* mit Hilfe von *Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)* und *in vivo* mit *Yeast-1-Hybrid (Y1H)* Experimenten für einige putative EGL3 Zielbindestellen analysiert werden.

4.1.5.1. Der Transkriptionsfaktor EGL3 aus *Arabidopsis thaliana* ist an der Regulation eines Anthocyan-spezifischen Regulons beteiligt

Anhand der visualisierten EGL3-Bindemotive an Strukturgenloci der Anthocyanbiosynthese wurden putative *in vivo* Bindungen des Transkriptionsfaktors für die Promotoren von *CHS*, *F3H*, *LDOX* und *GST* gezeigt. Der Locus für *CHI* scheint durch ein verändertes Bindeprofil an einen genischen Bereich durch EGL3 reguliert zu werden. Wie bereits weiter oben beschrieben gibt es in der publizierten Literatur mehrere Beispiele für regulatorische Sequenzen in Introns (Rose *et al.* 2008). Es scheint daher möglich, dass die Regulation von *CHI* durch den Transkriptionsfaktor EGL3 über die Bindung eines *cis*-Elements im Intron kontrolliert werden könnte. Anhand der EGL3-Bindemotive lässt sich vermuten, dass der Transkriptionsfaktor an der Kontrolle eines Anthocyan-spezifischen Regulons in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen beteiligt ist. Bis heute wird eine Teilung der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene in „frühe“ und „späte“ Gene angenommen. Die TTG1-abhängige Regulation mit Beteiligung von PAP1 und EGL3 in einem MBW-Komplex der Anthocyanbiosynthese ist bis heute mehrfach beschrieben worden (zusammengefasst in Feller *et al.* 2011). Mit Hilfe von *PAP1 gain-of-function* Experimenten wurden allerdings auch gesteigerte Expressionswerte von „frühen“ Genen nachgewiesen (Tohge *et al.* 2005). In der Arbeit von Dr. Ingo Appelhagen konnte zusätzlich unter anderem die *CHS* Promotoraktivierung durch einen MBW-Komplex (PAP1, EGL3 und TTG1) mittels Transaktivierungsassays erstmals gezeigt werden (Appelhagen, Ingo 2011). Die in dieser Arbeit präsentierten putativen *in vivo* EGL3-Bindeprofile liefern somit einen weiteren Hinweis für die Beteiligung des Transkriptionsfaktors an der Kontrolle eines Anthocyan-spezifischen Regulons in *Arabidopsis thaliana*.

4.1.5.2. Innerhalb der Anthocyanbiosynthese bindet der Transkriptionsfaktor EGL3 unterschiedliche regulatorische Bereiche

In *egl3 loss-of-function* Experimenten konnte eine reduzierte *TT8* Expression beobachtet werden (Baudry *et al.* 2006). Beide Transkriptionsfaktoren gehören zur Subgruppe IIIf der bHLH Proteine in *Arabidopsis thaliana* und sind an der Regulation der Anthocyanbiosynthese beteiligt. Daher wurde, wie schon für den Transkriptionsfaktor *TT8* vermutet, dass *EGL3* auch an der Regulation bekannter Anthocyanbiosynthese-Regulatoren beteiligt ist. Anhand der visualisierten *EGL3*-Bindemotive wurden Sequenz-Read-Anreicherungen in Bereichen von *EGL3*, *TT8*, *PAP2* und *TTG1* beobachtet. Die Bindeprofile an den Loci von *EGL3* und *TT8* zeigen eine ähnliche Sequenzanreicherung wie für den Transkriptionsfaktor *TT8* weiter oben gezeigt beschrieben. Durch die dargestellten putativen *in vivo* Bindestellen ergeben sich somit für *EGL3* neue Hinweise auf eine *TT8*-ähnliche Bindung an den eigenen Locus und die Regulation von homologen bHLH Proteinen. Zusammenfassend zeigen die Bindeprofile von *EGL3* an Regulatoren der Anthocyanbiosynthese ein von den Strukturgen-Loci abweichendes Muster der Protein-DNA-Interaktion. Hieraus ergeben sich Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Regulation von Anthocyanbiosynthese-beteiligten Genklassen.

4.2. PFG Protein *tagging* für die ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter *in vivo* Zielbindestellen

Für die ChIP-seq basierte Identifizierung genomweiter Bindestellen der PFG Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* wurde eine ähnliche Vorgehensweise wie in Abschnitt 3.1. beschrieben gewählt. Ein bekannter Nachteil der ChIP ist die Notwendigkeit spezifischer Antikörper für die zu untersuchenden Proteine. Ein möglicher Ansatz dieses Problem zu umgehen ist der Einsatz eines fusionierten Protein-Tags. Der Einsatz des GFP als Protein-Tag in ChIP Experimenten ist bis heute mehrfach beschrieben (de Folter *et al.* 2007; Morohashi und Grotewold 2009) und wurde auch in dieser Arbeit erfolgreich verwendet. Ein großer Vorteil des hier verwendeten Protein-Tags ist die kostengünstige Verfügbarkeit von ChIP-getesteten α -GFP Antikörper.

Der jeweilige ORF der drei PFGs wurde in translationaler Fusion mit dem ORF des GFP (N-Terminal) unter nativer und konstitutiver Promotorkontrolle mittels *floral dip* in die *pfg1 pfg2 pfg3* Tripelmutante (Stracke, R. *et al.* 2007) transformiert (siehe Abschnitt 3.2.1.). Durch die Herstellung anderer GFP - R2R3-MYB-Fusionen war bekannt das eine N-terminale GFP-Fusion *in planta* funktional ist (Düttmann 2008). Nach erfolgreicher Selektion der transgenen Linien wurden die hervorgegangenen T2-Keimlinge mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf ihre Komplementationfähigkeit analysiert. Die Auswertung der dokumentierten Chromatographieplatten zeigte für die unterschiedlichen transgenen Keimlinge (*Pro_{CaMV35S}::GFP:PFG₁₋₃* und *Pro_{PFGs}::GFP:PFG₁₋₃*) einzelne Linien, die die natürliche Favonol Glykosid-Akkumulation aufweisen (siehe Abb.3.21.). Die generierten Protein-Fusionen sind somit sowohl unter nativer als auch unter konstitutiver Promotorkontrolle *in planta* funktional. Des Weiteren wurde die GFP Funktionalität an sich und die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine unter konstitutiver Promotorkontrolle in der Zellsuspensionskultur At7 untersucht. Für alle getesteten Plasmidkonstrukte zeigte sich ein GFP-Signal im Zellkern der Protoplasten. Die Funktionalität des GFP ist somit *in vivo* gegeben und die Fusionsproteine im nativem Kompartiment lokalisiert (Blümke 2008). Um Zielbindestellen der PFG Transkriptionsfaktoren *in*

vivo mit Hilfe der ChIP-seq Methode zu untersuchen stehen transgene Linien mit GFP-PFG Fusionsproteinen zur Verfügung.

4.3. *Transparent Testa 17 (TT17) – ein neues Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX) Allel in Arabidopsis thaliana*

Die Bildung von Anthocyanen und Proanthocyanidinen wird in *Arabidopsis thaliana* zum Teil von den gleichen enzymatischen Reaktionen katalysiert. Unterschiedliche Mutationen in diesen Enzym-kodierten Genen können die Bildung von Anthocyanen beeinflussen und führen zu einem Ausbleiben oder einer Reduktion von Proanthocyanidinen, welches in einem *transparent testa* (*tt*) oder einem *tanin deficient seed* (*tds*) Phänotyp resultiert (Überblick in (Lepiniec *et al.* 2006). Alle an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene liegen in *Arabidopsis thaliana* in einfacher funktionaler Kopienzahl vor. In einigen Fällen wurde der gleiche Gen-Locus allerdings anhand unterschiedlich isolierter Null-Allele verschiedenartig benannt. Hierzu zählen zum Beispiel die allelischen Gen-Loci *TT11*, *TT18* und *TDS4*, die für die Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX; auch bezeichnet als Anthocyanidin Synthase, ANS) kodieren (Abrahams *et al.* 2003; Shikazono *et al.* 2003; Lepiniec *et al.* 2006). Allerdings konnten noch nicht alle bis heute beschriebene *tt*-Nullallele einem Locus zugewiesen werden, dazu zählen unter anderem *TT9*, *TT13* und *TT17* (Lepiniec *et al.* 2006). Wie 2003 von (Bharti und Khurana 2003) beschrieben, zeigten *tt17* Pflanzen einen reduzierten PA-Gehalt, welcher in einem hellbraunen Samenphänotyp resultiert. Zusätzlich zeigten *tt17* Pflanzen eine fehlende Anthocyan Akkumulation, welche sich nicht durch Naringenin Zugabe kompensieren lässt. Die Flavonolbiosynthese hingegen ist in diesen Pflanzen nicht beeinflusst (Bharti und Khurana 2003). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, das *TT17* eine funktionelle Rolle innerhalb der Anthocyan- bzw PA-Biosynthese besitzt. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit Herrn Dr. Ingo Appelhagen unter anderem durch Kreuzungsexperimente gezeigt werden, dass *tt17* ein neues bisher

unbekanntes *ldox* Allel aber keinen neuen distinkten *tt*-Lokus darstellt. Die Ergebnisse aus dieser Kooperation wurde in einer gemeinsamen Veröffentlichung im Gene Journal publiziert (Appelhagen, I., Jahns, O., *et al.* 2011).

4.3.1. *tt17* trägt eine Punktmutation in *LDOX*

Die von (Bharti und Khurana 2003) beschriebene *tt17* Mutante stammt aus einer Neutronen-mutagenisierten Population. Um Unterschiede innerhalb der Nukleotidsequenz des *LDOX* Gens aus *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen wurde der Locus in *tt17*, Est-1 und anderer Linien (*tds4-1*, WS-4, *tt11-2* und Ler) sequenziert (siehe Abschnitt 3.3.). Die aus dem Vergleich der Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen natürlichen Variationen zwischen den einzelnen Wildtyp Akzessionen. So wurden vier SAAPs zwischen Est-1 und Ws-4 bzw. Ler identifiziert (Q53K, S65N, D151E und I189V). *LDOX* in Ws-4 unterscheidet sich von den anderen *LDOX* Varianten durch den SAAP I157J (siehe Abschnitt 3.3.). Diese natürlichen Variationen scheinen keinen offensichtlichen Einfluss auf die *LDOX* Funktion *in planta* zu besitzen, da hier weder innerhalb der Anthocyan noch der PA Akkumulation Unterschiede in den analysierten *Arabidopsis thaliana* Akzessionen beobachtet werden konnten.

Ein Nukleinsäurevergleich von *LDOX* zwischen Est-1 und *tt17* zeigte einen *SNP* (G → A) in der *LDOX* kodierenden Region. Dieser Nukleinsäureaustausch resultiert in einem Aminosäureaustausch in der abgeleiteten Proteinsequenz (C220Y). Neutronen Mutagenese führt normalerweise zu chromosomalen Deletionen in der Größenordnung von einigen Basenpaaren bis zu mehreren Kilobasen (Li, X. und Zhang 2002). Allerdings konnten Deletionen dieser Art im hier beschriebenen *tt17* Locus nicht bestätigt werden. Es ist daher möglich, dass die gefundene *tt17* Mutation nicht durch die Mutagenese hervorgerufen wurde. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die *tds4-1* Mutation beschrieben (Abrahams *et al.* 2003). Das *tsd4-1* Allel stammt aus einer T-DNA Population. Allerdings resultiert der gefundene Phänotyp hier ebenfalls aus einer Punktmutation. Der identifizierte *tt17* *SNP* in der *LDOX* kodierenden Region, als Auslöser für den Phänotyp, stimmt mit der Beobachtung der unveränderten *LDOX* Expression in *tt17* Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp (Est-1) überein (Bharti und Khurana 2003). Der Austausch des Cysteinrestes 220 in Est-1 durch die hydrophobe Aminosäure Tyrosin in *tt17* führt möglicherweise zu Konformationsänderungen

innerhalb der Enzym Tertiärstruktur. Der beschriebene *tt17* Phänotyp ist dahermöglicherweise auf eine reduzierte LDOX Enzymaktivität zurückzuführen. Der Cysteinrest an Position 220 ist in den meisten Flavonoid-2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen konserviert. Anhand der PyMol Software wurde analysiert, ob der Cysteinrest an Position 220 mit anderen Cysteinresten in LDOX *in silico* in der Lage ist Cystein-Brücken auszubilden. Es scheint aber aufgrund der großen räumlichen Entfernung zu anderen Cysteinresten (C66-C220: 39,69 Å und C220-C305: 32,35 Å) unwahrscheinlich das der C220Y Austausch einen Einfluss auf die Ausbildung von Cystein-Brücken hat und es daher zu Änderungen in der strukturellen Enzymintegrität kommt. Die Substratbindung in 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen wird unter anderem durch einen Tyrosinrest an Position 217 vermittelt (Wilmouth *et al.* 2002). Die Mutation an Position 220 könnte daher auch einen möglichen Einfluss auf die Substratpositionierung von 2-Oxoglutarat, Dihydroquercitin und Askorbat im aktivem Zentrum (H232, D234 und H228; HXD...H) des Enzyms besitzen (Turnbull *et al.* 2001; Wilmouth *et al.* 2002; Abrahams *et al.* 2003). Ähnlich wie die gezeigte *tt17* Mutation führt ein SAAP in *tds4-1* in der Nähe des aktiven Zentrums an Position 228 (G → D) zu einem Phänotyp der im Vergleich zu *tt17* nicht zu unterscheiden ist. Auch hier lässt sich spekulieren, ob die ausgetauschte Aminosäure einen Einfluss auf die Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum ausübt und somit in einer reduzierten Enzymaktivität resultiert. Die Flavonol Synthase (FLS) gehört ebenso wie LDOX zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Britsch *et al.* 1981). 2009 konnten Preuss *et al.* zeigen, dass eine Aminosäureaustausch an Position 219 (R → K) in der FLS5 einen negativen Einfluss auf die Wasserstoffbrückenbindung zu den Substraten besitzt und somit zur Inaktivität des Enzyms führen. Anhand dieser Beobachtungen zusammen mit den Kreuzungsexperimenten (Appelhagen, I. *et al.* 2011) lässt sich schlussfolgern, dass der *tt17* Locus ein nicht funktionales LDOX Protein kodiert. Die identifizierte Punktmutation in der kodierenden LDOX Region in *tt17* stellt somit einen guten Kandidaten für die Ausbildung des *tt*-Phänotyps in *tt17* dar.

4.4. Identifizierung von UDP-abhängigen Glykosyltransferase Zielgenen der PFG Transkriptionsfaktoren

Bis heute sind regulatorische Netzwerke der Flavonoidbiosynthese im Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* noch nicht in ihrer Gesamtheit aufgeklärt. Variationen des Flavonolmusters in unterschiedlichen pflanzlichen Organen werden *in planta* durch PFG Transkriptionsfaktoren reguliert (Stracke, R. *et al.* 2007). Diese gilt nicht nur für die Regulation von Biosynthese der entsprechenden Flavonoid-Aglyken sondern auch für ihre Zielgene (z.B. Glykosyltransferasen, GTn) die an der Modifikation von Flavonolen beteiligt sind. Obwohl einige Flavonoid- bzw. Flavonol-GTn mit spezifischer Substratspezifität charakterisiert wurden (Jones *et al.* 2003; Tohge *et al.* 2005; Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2007; Yonekura-Sakakibara, K *et al.* 2008) ist die funktionale Charakterisierung der 107 im *Arabidopsis* Genom annotierten GTn (Ross *et al.* 2001) bis heute unvollständig. Eine regulatorische Beteiligung der PFGs aus *Arabidopsis thaliana* an der Expression von GTn wurde mittels transienter Transaktivierungsassays für *UGT84A1* (*At4g15480*) und *UGT91A1* (*At2g22590*) von Jahns (2007) und Stracke, R. *et al.* (2007) beschrieben. Auch bestätigen PFG-GT Ko-Expressionsanalysen (Tohge *et al.* 2005; Yonekura-Sakakibara, K *et al.* 2008) das Potential der PFG Transkriptionsfaktoren die Expression von GTn zu aktivieren. Um das regulatorische Netzwerk der PFG Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* zu erweitern, und weiter die Frage welcher PFG die Expression welcher GT kontrolliert zu beantworten, wurden *in vivo* Transaktivierungsassays durchgeführt.

Die Ergebnisse des Assays sind in Abschnitt 3.4. dargestellt. Es konnte bestätigt werden, dass die Promotoren der Flavonol-3-O-Rhamnosyltransferase *UGT78D1* (Jones *et al.* 2003), der Flavonol-7-O-Rhamnosyltransferase *UGT89C1* (Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2007) und der bisher unbeschriebenen *UGT78D4* von den PFG Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können (Stracke, R. *et al.* 2010). Das Aktivierungspotential der PFGs nimmt für Promotoren von *UGT78D1* und *UGT78D4* von PFG1 über PFG2 zu PFG3 ab. Dieser Effekt stimmt mit den Beobachtungen von Stracke, R. *et al.* (2007) überein. Hier wurde das gleiche Muster der unterschiedlichen PFG Aktivierungspotentiale für die Regulation von

Flavonoidbiosynthese Strukturgenen, als auch Glykosyltransferase-kodierender Gene (*UGT91A1* und *UGT84A1*) beschrieben. Ein abweichendes Muster zeigt sich für die Aktivierung des Promotors von *UGT89C1*. Hier nimmt das Aktivierungspotential von PFG3, über PFG2 zu PFG1 ab (Stracke, R. *et al.* 2010). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in 2007 von Jahns beschrieben. Die PFGs sind in *Arabidopsis thaliana* räumlich getrennt exprimiert und können somit in den einzelnen Geweben ihre Zielgene spezifisch regulieren (Stracke, R. *et al.* 2007). Die spezifische Responsivität der getesteten GTn könnte mit der Notwendigkeit einer speziellen Flavonolausstattung zum Beispiel als pflanzliche Schutzpigmente in unterschiedlichen Geweben in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen begründet werden.

Die untersuchten Promotoren der Flavonol-3-Arabinosyltransferase *UGT78D3* (Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* 2007) und der 7-O-GT *UGT73C6* (Jones *et al.* 2003) zeigten keine Aktivierung durch die PFG Transkriptionsfaktoren (Stracke, R. *et al.* 2010). Ein mögliches Aktivierungspotential der PFGs *in planta* aber kann hier nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Limitierung spielt hier die aus Hypokotyl-Gewebe abstammende Zellsuspensionskultur At7 (Sprenger-Haussels und Weisshaar 2000), aber auch ein in diesem System fehlender bzw. unbekannter zur Aktivierung benötigter (Ko-) Faktor kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist die bekannte regulatorische Aktivität der PFGs in der Literatur als Ko-Faktor unabhängig beschrieben, so dass diese Vermutung einen weiteren bisher unbekanntem Wirkmechanismus der Transkriptionsfaktoren bedeuten würde. Zusammenfassend lässt sich erklären, dass die in Abschnitt 3.4. beschriebenen Ergebnisse der direkten Aktivierung von Promotorsequenzen der Flavonolglykosid-bildenden *UGT* Gene durch PFG Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte. Die hier diskutierten Ergebnisse wurden 2010 in Stracke, R. *et al.* veröffentlicht.

4.5. PFG Zielgen *PFT1*

Das Gen *PFT1* (*At5g62210*, auch bezeichnet als *Embryo-specific protein 3*) wurde 2007 von (Stracke, R. *et al.* 2007) in Rahmen einer genomweiten Suche nach weiteren Zielgenen der PFG Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von Affymetrix ATH1 GeneChips (<http://www.affymetrix.com/>) durch einen Vergleich der Expression in Col-0 und PFG Nullallel (*pfg1 pfg2 pfg3*) Keimlingen identifiziert. Mittels qPCR- und Ko-Transfektionsanalysen in At7 Protoplasten wurde das Aktivierungspotential des *PFT1* Promotors durch die PFG-Transkriptionsfaktoren bestätigt. (Jahns 2007; Stracke, R. *et al.* 2007). Ein relativer Vergleich der Expressionswerte mittels qPCR in Wurzelgewebe von 6-Tage alten Keimlingen zwischen Col-0 und PFG-Überexpressionsmutanten zeigte mögliche Unterschiede der *PFT1* Promotor Spezifität für die einzelnen Mitglieder der PFG Transkriptionsfaktoren. Während die relative *PFT1* Expression in PFG3-Überexpressionsmutanten um das 17-Fache der Wildtyp Expression erhöht ist zeigt sich für PFG2 und PFG1 jeweils eine 3,5- bzw. 2-fach erhöhte Expression (Jahns 2007). Eine molekulare Funktion für *PFT1* ist bis heute nicht beschrieben. Zur Funktionsaufklärung von *PFT1* wurden in dieser Arbeit erste Pilotexperimente begonnen (siehe Abschnitt 3.5.).

4.5.1. Charakterisierung des *pft1-1* Phänotyps in unterschiedlichen Keimlingsgeweben und subzelluläre Lokalisation von *PFT1*

Um die Auswirkungen eines *PFT1* Funktionsverlustes zu analysieren wurde eine GABI-Kat T-DNA Insertionslinie (GK243D08, *pft1-1*) isoliert. *pft1-1* konnte als Nullallel in einem Expressionsvergleich mit dem Wildtyp (Col-0) bestätigt werden. Weiter konnte gezeigt werden das *PFT1* in *Arabidopsis thaliana* vorrangig im Wurzelgewebe exprimiert wird. Ein phänotypischer Vergleich zwischen Col-0 und *pft1-1* Pflanzen (Keimlinge und adulte Pflanzen) zeigte keinen offensichtlichen Unterschiede bezüglich der Morphologie (nicht gezeigt). Die molekulare Funktion von *PFT1* scheint somit keine offensichtlich bedeutenden Auswirkungen auf die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* zu haben. Auch wenn diesbezüglich noch weitere Analysen notwendig sind. Um den *in planta* Expressionsort von *PFT1* zu analysieren wurden transgene Pflanzen mit einem GFP-Reporter unter nativer *PFT1* Promotorkontrolle generiert. Transgene Keimlinge wurden anschließend

mikroskopisch auf GFP Fluoreszenz untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz im Wurzelspitzen Gewebe von 6 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. Diese Ergebnisse decken sich mit den zuvor dargestellten Expressionsanalysen. Eine Fluoreszenz in anderen Organen bzw. Geweben wurde nicht beobachtet. Der *PFT1*-Promotor scheint ausschließlich in 6 Tage alten Keimlingen in der Wurzelspitze aktiv zu sein.

In 2007 wurde *PFT1* als Zielgen der PFG Transkriptionsfaktoren bestätigt (Jahns 2007; Stracke, R. *et al.* 2007). Die PFG Transkriptionsfaktoren sind bekannt als positive Regulatoren der Flavonolbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* (Mehrtens *et al.* 2005; Stracke, R. *et al.* 2007; 2010) Um eine mögliche Funktion von *PFT1* innerhalb der Flavonolbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen wurden Metabolitanalysen mittels HPTLC methanolischer Extrakte von Col-0 und *pft1-1* Keimlingen durchgeführt. Innerhalb der Flavonol-Zusammensetzung in 6 Tage alten Col-0 und *pft1-1* Keimlingen konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Da *PFT1* vorrangig in Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen exprimiert wird, wurde die Flavonol Akkumulation auch spezifisch in Wurzeln analysiert. Auch hier konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Nullallel festgestellt werden. *PFT1* scheint daher keinen direkten Einfluß auf die Synthese von Flavonolen zu besitzen.

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von *PFT1* wurde die *PFT1*-cDNA translational an den GFP-kodierenden ORF in einen Expressionsvektor rekombiniert, das Konstrukt jeweils in Protoplasten der Zellsuspensionskulturen At7 und BY-2 transfiziert und die Protoplasten anschließend mikroskopisch auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *PFT1* exklusiv des Zellkerns im Cytoplasma der Protoplasten lokalisiert ist. Ein Vergleich mit einer hervorgesagten *PFT1* Lokalisation (Cell eFP Browser, (Heazlewood *et al.* 2007) zeigt hier eine Übereinstimmung der vorgestellten Ergebnisse. So wurde die Lokalisation durch unterschiedliche Algorithmen (Subloc: (Hua und Sun 2001), Predotar: (Small *et al.* 2004), TargetP: (Emanuelsson *et al.* 2000)) im Cytoplasma, dem Endoplasmatischen Retikulum sowie extrazellulär vorhergesagt.

4.5.2. Ist PFT1 an der Ausbildung eines Enzymkomplexes innerhalb der Flavonoidbiosynthese beteiligt?

Im kodierten Bereich des Gens befinden sich Sequenzabschnitte für putative Lipase- bzw. Lipoxygenase-Domänen (PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin) /LH2 (Lipoxygenase Homolog); InterPro: IPR008976). PLAT- bzw. LH2-Domänen sind in vielen Membran- oder Lipidverankerten Proteinen beschrieben. Die Domänen formen ein β -Sandwich bestehend aus 2 Faltblättern (Bateman und Sandford 1999; Tomchick *et al.* 2001; Delrieu *et al.* 2002). Zusätzlich beinhaltet die Sequenz auch Abschnitte für eine putative *Embryo-specific 3* Domäne (InterPro: IPR010417). *Embryo-specific 3* Domänen gehören zu pflanzlichen samenspezifischen Proteinen in *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis* findet sich ein homologes Protein zu PFT1, welches als *Seed Gene 3 (At5g07190, ATS3)* bezeichnet wird. *ATS3* beinhaltet ebenfalls eine *Embryo-specific 3* Domäne und wurde erstmals 1999 von Nuccio und Thomas beschrieben. Eine molekulare Funktion ist allerdings auch für dieses Gen bis heute nicht bekannt.

Die Organisation von Multienzymkomplexen scheint eine gängige Form des zellulären Metabolismus in allen Organismen darzustellen. Die Ausbildung eines Metaboloms ist vor allem innerhalb des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes, aber auch für Enzyme der Glykolyse, der Fettsäure Oxidation und für die Biosynthese von Makromolekülen (Fettsäuren, Nukleinsäuren und Proteine) beschrieben (Srere 1987; Ovadi und Srere 1996). Die Interaktion von Enzymen mit Membranen, dem Zytoskelett und anderen Enzymen stellt hier die Grundlage für die Organisation von Enzymkomplexen dar (Winkel-Shirley 1999). In den 1990er Jahren wurden einige Beispiele für die Ausbildung von Enzymkomplexen im Primärstoffwechsel innerhalb der Pflanzen beschrieben. Zu diesen gehören Komplexe von Enzymen des Calvin Zyklus (Suss *et al.* 1993), Enzyme der Serin- (Prabhu *et al.* 1996), und Cystein-Biosynthese (Saito *et al.* 1995) und Proteine des Glycin Carboxylase Systems (Oliver und Raman 1995). Von (Winkel-Shirley 1999) wird aber auch die Formierung von Enzymkomplexen an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums innerhalb des Sekundär Metabolismus postuliert. Als ein mögliches Bindeglied für die Ausbildung von membranverankerten Multienzymkomplexen innerhalb der Flavonoidbiosynthese könnte PFT1 wirken. Für die PLAT bzw. LH2 Domäne, von der sich Sequenzabschnitte innerhalb der PFT1 kodierenden Region finden wird eine

mögliche Membranverankerung über andere Proteinbindpartner diskutiert. Allerdings müsste die Lokalisation von PFT1 an Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, sowie eine Interaktion mit Enzymen der Flavonoidbiosynthese und somit auch eine Ko-Lokalisation mit diesen *in vivo* bestätigt werden.

4.6. Ausblick

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen oder Vorarbeiten ergeben sich weiterführende Experimente und Fragestellungen, welche bereits zum Teil weiter oben angesprochen wurden.

Generell liefern gerade die Etablierung der Chromatin Immunopräzipitation und die präsentierten ChIP-seq Daten für putative Zielbindestellen der Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3 die Basis für weitreichende Analysen. Durch eine zukünftige Validierung der möglichen Zielbindestellen als *in vivo* Ziele der untersuchten Transkriptionsfaktoren kann das Wissen über die regulatorischen Netzwerke der Proteine erweitert und somit deren Einfluß auf Stoffwechselprozesse in *Arabidopsis thaliana* genomweit analysiert werden. Eine mögliche Bindung der Faktoren an unterschiedliche genomische Bereiche in den Promotoren von bekannten Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese und in Bereichen des eigenen Lokus zeigen mögliche unbekannte regulatorische Eigenschaften der untersuchten Proteine auf. Auch diese Erkenntnisse liefern neue Ansatzpunkte für Untersuchungen der Genkontrolle. Des Weiteren wurde mit der Generierung von transgenen Linien mit GFP-PFG Fusion Ausgangsmaterial für die genomweite *in vivo* Identifizierung von Zielbindestellen der PFG-Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der ChIP-seq Methode geschaffen. Diese weiteren Experimente können helfen, das bestehende umfassende Wissen eines PFG-regulierten Netzwerks zu erweitern und in seiner Gesamtheit besser zu verstehen. Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Experimente zur Aktivierung von *UGT*-Promotoren durch PFG-Transkriptionsfaktoren werden dazu beitragen, die vielfältigen Funktionen dieser Proteine im Flavonolglykosidstoffwechsel

aufzuklären. Diese durch Transaktivierungsassays identifizierten bisher unbekanntes Zielgene der PFGs zeigen darüber hinaus eine Berechtigung für die genomweite Identifizierung von Zielgenen mit Hilfe von ChIP-seq.

Unter anderem konnte mit Hilfe der präsentierten Ergebnisse der bisher nicht zugeordnete *TT17*-Lokus als weiteres *LDOX*-Allel beschrieben werden. Diese Daten liefern somit einen Beitrag zur funktionellen Aufklärung bisher unbekannter oder neuer *TT*-Loci.

Die Durchführung von Pilotexperimenten zur Charakterisierung und Funktionsaufklärung von *PFT1* liefern mögliche Ansätze für weitere Analysen. So könnte durch weitere Experimente die Membranverankerung von *PFT1* entweder bestätigt oder auch verworfen werden. Durch Protein-Protein-Interaktionsstudien (*Yeast-2-Hybrid*, *Y2H*) von *PFT1* mit Enzymen der Flavonolbiosynthese könnte eine mögliche Interaktion der Proteine untersucht werden. Vielleicht liefern die diskutierten Ergebnisse zu *PFT1* die möglichen Anstöße zur Identifizierung von Multi-Enzymkomplexen innerhalb der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*.

5. Zusammenfassung

Die grundlegenden Mechanismen der Genregulation sind in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, vor allem anhand des Modells der Flavonoidbiosynthese, bereits seit längerem Gegenstand der aktuellen Forschung und gelten als bestens untersucht. Viele an der Kontrolle der Genexpression beteiligte Transkriptionsfaktoren sind gut charakterisiert. Vor allem die MYB- und bHLH-Proteinklassen sind als Transkriptionsfaktoren in der Flavonoidbiosynthese bekannt. Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen innerhalb dieses Stoffwechselprozesses beschrieben. Die Kofaktor- bzw. TTG1-unabhängige Regulation der Flavonoidbiosynthese durch die PFGs und die TTG1-abhängige Regulation der Anthocyan- und PA-Biosynthese durch MBW-Komplexe. Die Expression des Schlüsselenzyms der Anthocyanbiosynthese, die Dihydroflavonol-Reduktase (DFR), wird durch die kombinatorische Wirkung aus PAP1, EGL3/TT8 und TTG1 kontrolliert. Die cis-regulatorischen Elemente für PAP1 und TT8 im Promotor von *DFR* konnten bereits charakterisiert werden. Bis heute sind für die Faktoren PAP1, EGL3 und TT8 die *in vivo* Bindestellen im Genom von *Arabidopsis thaliana* zum Großteil noch unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methode der Chromatin Immunopräzipitation etabliert und für die genomweite Identifizierung von DNA-Zielbindestellen von PAP1, EGL3 und TT8 mit Hilfe von ChIP-seq angewendet werden. Für die regulatorischen Proteine EGL3 und TT8 konnte jeweils ein ChIP-seq Experiment durchgeführt und putative Zielgene identifiziert werden. Gleichzeitig konnte die *in vivo* Bindung an Promotoren bereits bekannter Strukturgene der Anthocyanbiosynthese erstmals gezeigt werden. Zusätzlich wurden weitere Hinweise für das Vorhandensein eines EGL3- und TT8-regulierten Anthocyan-spezifischen Regulons präsentiert. Die Bindung der untersuchten Proteine an den jeweiligen eigenen Locus und an weitere Loci bekannter Anthocyanregulatoren lieferte erste Hinweise für weitere mögliche regulatorische Mechanismen von EGL3 und TT8. Mit der Generierung von transgenen Pflanzen mit GFP-PFG Fusion wurde wichtiges Ausgangsmaterial für weitere ChIP-seq Experimente geschaffen. Hiermit kann zukünftig durch die Analyse der *in vivo* Zielbindestellen der PFG-Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von ChIP-seq Experimenten das Verständnis der regulatorischen Mechanismen dieser Proteine erweitert werden.

Loss-of-function Mutationen in den in einfacher Kopie vorliegenden Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese können einen Effekt auf die Anthocyanbiosynthese ausüben und zeigen oft ein Ausbleiben oder eine Reduktion der PA-Pigmente. Dieses führt meist zu einem *transparent testa (tt)* oder *tannin deficient seed (tds)* Phänotyp. In einigen Fällen hat die unterschiedliche Nomenklatur bisweilen zu Doppelbenennungen geführt. So ist zum Beispiel der *ldox*-Lokus als *tt11* und *tt18* sowie als *tds4* kartiert worden. Bis heute sind eine Reihe von weiteren *tt*- und *tds*-Mutanten isoliert worden, für die die eindeutige Zuordnung zu einem bekannten oder neuen *tt*-Lokus noch nicht erfolgt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter anderem die Mutation im *tt17*-Lokus identifiziert und *TT17* als ein weiteres *LDOX*-Allel charakterisiert werden.

Wie bereits weiter oben erwähnt wird die Flavonolbiosynthese TTG1-unabhängig von den PFG-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* kontrolliert. Von früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die PFGs auch einen regulatorischen Einfluss auf Flavonol-spezifische Glykosyltransferasen in Keimlingsgewebe besitzen und somit die Akkumulation von unterschiedlichen Flavonolglykosiden kontrollieren. Die in dem Rahmen dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Promotoraktivierung von UDP-abhängigen Glykosyltransferasegenen durch die PFGs liefern einen Beitrag zur Vervollständigung des Wissens über ein regulatorisches Netzwerk dieser Proteine.

Des Weiteren wurde anhand von Pilotexperimenten an einem bekannten PFG-Zielgen (*PFT1*) ein anfänglicher Versuch unternommen die molekulare Funktion dieses Gens zu charakterisieren.

6. Literaturverzeichnis

Abrahams, S., E. Lee, A. R. Walker, G. J. Tanner, P. J. Larkin und A. R. Ashton (2003). "The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development." The Plant Journal **35**(5): 624-636.

An, G., B. D. Watson und C. C. Chiang (1986). "Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and Arabidopsis thaliana Using a Binary Ti Vector System." Plant Physiol **81**(1): 301-5.

Appelhagen, I. (2011). Charakterisierung von Regulatoren der Proanthocyanidinbiosynthese in Samen von *Arabidopsis thaliana*. Fakultät für Biologie. Bielefeld, Universität Bielefeld. **PhD**.

Appelhagen, I., O. Jahns, L. Bartelniewoehner, M. Sagasser, B. Weisshaar und R. Stracke (2011). "Leucoanthocyanidin Dioxygenase in Arabidopsis thaliana: characterization of mutant alleles and regulation by MYB-BHLH-TTG1 transcription factor complexes." Gene **484**(1-2): 61-8.

Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp und T. Schwede (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.

Atchley, W. R. und W. M. Fitch (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(10): 5172-5176.

Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy und J. M. Vivanco (2006). "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms." Annu Rev Plant Biol **57**: 233-66.

Bateman, A. und R. Sandford (1999). "The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle." Curr Biol **9**(16): R588-90.

Baudry, A., M. Caboche und L. Lepiniec (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." The Plant Journal **46**(5): 768-79.

- Baudry, A., M. A. Heim, B. Dubreucq, M. Caboche, B. Weisshaar und L. Lepiniec** (2004). "TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **39**(3): 366-380.
- Bellard, M., G. Dretzen, A. Giangrande und P. Romain** (1989). "Nuclease digestion of transcriptionally active chromatin." Methods Enzymol **170**: 317-46.
- Berben, G., M. Legrain, V. Gilliquet und F. Hilger** (1990). "The Yeast Regulatory Gene Pho4 Encodes a Helix-Loop-Helix Motif." Yeast **6**(5): 451-454.
- Berger, B., R. Stracke, R. Yatusovich, B. Weisshaar, U.-I. Flügge und T. Gigolashvili** (2007). "A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation." The Plant Journal **50**(5): 911-916.
- Bharti, A. und J. Khurana** (2003). "Molecular characterization of *transparent testa (tt)* mutants of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Estland) impaired in flavonoid biosynthetic pathway." Plant Science **165**: 1321-1332.
- Blom, J., T. Jakobi, D. Doppmeier, S. Jaenicke, J. Kalinowski, J. Stoye und A. Goesmann** (2011). "Exact and complete short-read alignment to microbial genomes using Graphics Processing Unit programming." Bioinformatics **27**(10): 1351-8.
- Blümke, A.** (2008). Weitergehende Untersuchungen zur Funktion der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe 7. Fakultät für Biologie. Bielefeld, Universität Bielefeld. **Msc.**
- Boller, T. und H. Kende** (1979). "Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells." Plant Physiol **63**(6): 1123-32.
- Borevitz, J. O., Y. J. Xia, J. Blount, R. A. Dixon und C. Lamb** (2000). "Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis." The Plant Cell **12**(12): 2383-2393.
- Bowles, D., J. Isayenkova, E. K. Lim und B. Poppenberger** (2005). "Glycosyltransferases: managers of small molecules." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 254-63.
- 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., W. Heller und H. Grisebach (1981). "Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with enzyme systems from cell cultures of parsley." Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences **36**: 742-750.

Broun, P. (2005). "Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 272-9.

Brueggemann, J., B. Weisshaar und M. Sagasser (2010). "A WD40-repeat gene from *Malus x domestica* is a functional homologue of Arabidopsis thaliana TRANSPARENT TESTA GLABRA1." Plant Cell Reports **29**(3): 285-94.

Buck, M. J. und W. R. Atchley (2003). "Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins." Journal of Molecular Evolution **56**(6): 742-750.

Burbulis, I. E. und B. Winkel-Shirley (1999). "Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(22): 12929-12934.

Castillon, A., H. Shen und E. Huq (2007). "Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks." Trends Plant Sci **12**(11): 514-21.

Chandler, V. L., J. P. Radicella, T. P. Robbins, J. Chen und D. Turks (1989). "Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of *B* utilizing *R* genomic sequences." The Plant Cell **1**: 1175-1183.

Clarkson, J. R., Z. F. Cui und R. C. Darton (1999). "Protein Denaturation in Foam." J Colloid Interface Sci **215**(2): 333-338.

Clough, S. J. und A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **16**(6): 735-743.

Consonni, G., F. Geuna, G. Gavazzi und C. Tonelli (1993). "Molecular homology among members of the *R* gene family in maize." The Plant Journal **3**(2): 335-346.

Curtis, M. D. und U. Grossniklaus (2003). "A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta." Plant Physiology **133**(2): 462-469.

Dangl, J. L., K.-D. Hauffe, S. Lipphardt, K. Hahlbrock und D. Scheel (1987). "Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor." The EMBO Journal **6**: 2551-2556.

Das, P. M., K. Ramachandran, J. vanWert und R. Singal (2004). "Chromatin immunoprecipitation assay." Biotechniques **37**(6): 961-9.

de Folter, S., S. L. Urbanus, L. G. van Zuijlen, K. Kaufmann und G. C. Angenent (2007). "Tagging of MADS domain proteins for chromatin immunoprecipitation." BMC Plant Biol **7**: 47.

Debeaujon, I., K. Leon-Kloosterziel und M. Koornneef (2000). "Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis." Plant Physiology **122**(2): 403-413.

Debeaujon, I., N. Nesi, P. Perez, M. Devic, O. Grandjean, M. Caboche und L. Lepiniec (2003). "Proanthocyanidin-accumulating cells in Arabidopsis testa: regulation of differentiation and role in seed development." The Plant Cell **15**(11): 2514-31.

Dedon, P. C., J. A. Soultz, C. D. Allis und M. A. Gorovsky (1991). "A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions." Anal Biochem **197**(1): 83-90.

Delrieu, I., C. C. Waller, M. M. Mota, M. Grainger, J. Langhorne und A. A. Holder (2002). "PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in Plasmodium falciparum gametocytes." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 11-20.

Deyholos, M. K. und L. E. Sieburth (2000). "Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the AGAMOUS second intron." Plant Cell **12**(10): 1799-810.

Dingwall, C., G. P. Lomonosoff und R. A. Laskey (1981). "High sequence specificity of micrococcal nuclease." Nucleic Acids Res **9**(12): 2659-73.

Dixon, R. A. und N. L. Paiva (1995). "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." The Plant Cell **7**: 1085-1097.

Drossard, C., B. Frohling, K. Bolzenius, H. Dietrich, C. Kunz und M. Kersting (2012). "Liking of anthocyanin-rich juices by children and adolescents." Appetite **58**(2): 623-628.

Dubos, C., R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin und L. Lepiniec (2010). "MYB transcription factors in Arabidopsis." Trends in Plant Science **15**: 573-581.

Düttmann, V. (2008). Analyse und Visualisierung eines R2R3-MYB / bHLH Transkriptionsfaktorkomplexes aus *Arabidopsis thaliana*. Fakultät für Biologie, Bielefeld, Universität Bielefeld. **PhD**.

Dynan, W. S. (1989). "Modularity in promoters and enhancers." Cell **58**: 1-4.

Edwards, K., C. Johnstone und C. Thompson (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucleic Acids Research **19**(6): 1349.

Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak und G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**(4): 1005-16.

Feller, A., K. Machemer, E. L. Braun und G. E. (2011). "Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors." The Plant Journal **66**(1): 94-116.

Feng, X., R. Grossman und L. Stein (2011). "PeakRanger: a cloud-enabled peak caller for ChIP-seq data." BMC Bioinformatics **12**: 139.

Fini, A., C. Brunetti, M. Di Ferdinando, F. Ferrini und M. Tattini (2011). "Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants." Plant Signal Behav **6**(5): 709-11.

Forkmann, G., P. De Vlaming, R. Spribille, H. Wiering und A. W. Schram (1986). "Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*." Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences **41**(1-2): 179-186.

Gomez-Mena, C., S. de Folter, M. M. Costa, G. C. Angenent und R. Sablowski (2005). "Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis." Development **132**(3): 429-38.

Gonzalez, A., M. Zhao, J. M. Leavitt und A. M. Lloyd (2008). "Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings." The Plant Journal **53**(5): 814-27.

Gussow, D. und T. Clackson (1989). "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res **17**(10): 4000.

Hain, R., P. Stabel, A. P. Czernilofsky, H. H. Steinbiß, L. Herrera-Estrella und J. Schell (1985). "Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts." Molecular & General Genetics **199**: 161-168.

Hanlon, S. E. und J. D. Lieb (2004). "Progress and challenges in profiling the dynamics of chromatin and transcription factor binding with DNA microarrays." Curr Opin Genet Dev **14**(6): 697-705.

Haring, M., S. Offermann, T. Danker, I. Horst, C. Peterhansel und M. Stam (2007). "Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization." Plant Methods **3**: 11.

Hartmann, T. (2007). "From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism." Phytochemistry **68**(22-24): 2831-46.

Hartmann, U., M. Sagasser, F. Mehrtens, R. Stracke und B. Weisshaar (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 Molecular Biology **57**(2): 155-171.

Hearn, M. T. und D. Acosta (2001). "Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins." J Mol Recognit **14**(6): 323-69.

Heazlewood, J. L., R. E. Verboom, J. Tonti-Filippini, I. Small und A. H. Millar (2007). "SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D213-8.

Heim, M. A., M. Jakoby, M. Werber, C. Martin, B. Weisshaar und P. C. Bailey (2003). "The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity." Molecular Biology and Evolution **20**(5): 735-747.

Hichri, I., F. Barrieu, J. Bogs, C. Kappel, S. Delrot und V. Lauvergeat (2011). "Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway." Journal of Experimental Botany.

- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas und R. A. Schilperoort** (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. und M. Quigley** (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Analytical Biochemistry **114**: 193-197.
- Hua, S. und Z. Sun** (2001). "Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction." Bioinformatics **17**(8): 721-8.
- Jahns, O.** (2007). Analyse putativer Zielgene der „Production of Flavonol Glycosides“ Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Biology, Chair of Genome Research. Bielefeld, Bielefeld. **Diplom**: 116.
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess und D. Hirsh** (1986). " β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**: 8447-8451.
- Jia, L., M. T. Clegg und T. Jiang** (2004). "Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies *indica* and *japonica* genomes." Plant Physiology **134**(2): 575-85.
- Johnson, P. F. und S. L. McKnight** (1989). "Eukaryotic transcriptional regulatory proteins." Annual Review of Biochemistry **58**: 799-839.
- Jones, P., B. Messner, J. Nakajima, A. R. Schaffner und K. Saito** (2003). "UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." Journal of Biological Chemistry **278**(45): 43910-43918.
- Jorgensen, K., A. V. Rasmussen, M. Morant, A. H. Nielsen, N. Bjarnholt, M. Zagrobelny, S. Bak und B. L. Moller** (2005). "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 280-291.
- Kaufmann, K., J. M. Muino, R. Jauregui, C. A. Airoldi, C. Smaczniak, P. Krajewski und G. C. Angenent** (2009). "Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower." PLoS Biol **7**(4): e1000090.

- Kaufmann, K., J. M. Muino, M. Osteras, L. Farinelli, P. Krajewski und G. C. Angenent** (2010). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP)." Nat Protoc **5**(3): 457-72.
- Kiefer, F., K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli und T. Schwede** (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." Nucleic Acids Research **37**(Database issue): D387-92.
- Kleinboelting, N., G. Huet, A. Kloetgen, P. Viehoveer und B. Weisshaar** (2012). "GABI-Kat SimpleSearch: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D1211-5.
- Klempnauer, K. H., T. J. Gonda und J. M. Bishop** (1982). "Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene." Cell **31**: 453-463.
- Koch, K. E.** (1996). "Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 509-540.
- Koes, R., W. Verweij und F. Quattrocchio** (2005). "Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways." Trends in Plant Science **10**(5): 236-42.
- Kombrink, E. und K. Hahlbrock** (1986). "Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi." Plant Physiology **81**: 216-221.
- Koncz, C., F. Kreuzaler, Z. Kalman und J. Schell** (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**(5): 1029-37.
- Koroleva, O. A., M. L. Tomlinson, D. Leader, P. Shaw und J. H. Doonan** (2005). "High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions." The Plant Journal **41**(1): 162-74.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd und K. M. Peterson** (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.

- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop, 2nd und K. M. Peterson** (1994). "pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector." Biotechniques **16**(5): 800-2.
- Kranz, H., K. Scholz und B. Weisshaar** (2000). "c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages." The Plant Journal **21**(2): 231-235.
- Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullems und R. A. Schilperoort** (1982). "In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA." Nature **296**: 72-74.
- Kubasek, W. L., B. W. Shirley, A. McKillop, H. M. Goodman, W. Briggs und F. M. Ausubel** (1992). "Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings." The Plant Cell **4**: 1229-1236.
- Kuo, M. H. und C. D. Allis** (1999). "In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment." Methods **19**(3): 425-33.
- Leleu, M., G. Lefebvre und J. Rougemont** (2010). "Processing and analyzing ChIP-seq data: from short reads to regulatory interactions." Brief Funct Genomics **9**(5-6): 466-76.
- Lepiniec, L., I. Debeaujon, J. M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi und M. Caboche** (2006). "Genetics and biochemistry of seed flavonoids." Annual Review of Plant Biology **57**: 405-30.
- Li, J., T.-M. Ou-Lee, R. Raba, R. G. Amundson und R. L. Last** (1993). "Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation." The Plant Cell **5**: 171-179.
- Li, X., X. Duan, H. Jiang, Y. Sun, Y. Tang, Z. Yuan, et al.** (2006). "Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis." Plant Physiol **141**(4): 1167-84.
- Li, X. und Y. Zhang** (2002). "Reverse genetics by fast neutron mutagenesis in higher plants." Functional & Integrative Genomics **2**(6): 254-8.
- Lichty, J. J., J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz und S. Tan** (2005). "Comparison of affinity tags for protein purification." Protein Expr Purif **41**(1): 98-105.

Lipphardt, S., R. Brettschneider, F. Kreuzaler, J. Schell und J. L. Dangl (1988). "UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Anthirrhinum majus* chalcone synthase gene." The EMBO Journal **7**(13): 4027-4033.

Lipsick, J. S. (1996). "One billion years of Myb." Oncogene **13**: 223-235.

Liu, E. T., S. Pott und M. Huss (2010). "Q&A: ChIP-seq technologies and the study of gene regulation." BMC Biol **8**: 56.

Ludwig, S. R. und S. R. Wessler (1990). "Maize *R* gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins." Cell **62**: 849-851.

Luo, J., Y. Nishiyama, C. Fuell, G. Taguchi, K. Elliott, L. Hill, et al. (2007). "Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **50**(4): 678-95.

Maes, L., D. Inze und A. Goossens (2008). "Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in *Arabidopsis* rosette leaves." Plant Physiol **148**(3): 1453-64.

Martin, C. und J. Paz-Ares (1997). "MYB transcription factors in plants." Trends in Genetics **13**(2): 67-73.

Massari, M. E. und C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Molecular and Cellular Biology **20**(2): 429-40.

Massie, C. E. und I. G. Mills (2008). "ChIPping away at gene regulation." EMBO Rep **9**(4): 337-43.

Mathur, J., L. Szabados, S. Schaefer, B. Grunenberg, A. Lossow, E. Jonas-Straube, J. Schell, C. Koncz und Z. Koncz-Kalman (1998). "Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension." The Plant Journal **13**(5): 707-716.

McGhee, J. D. und P. H. von Hippel (1975a). "Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases." Biochemistry **14**(6): 1281-96.

McGhee, J. D. und P. H. von Hippel (1975b). "Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases." Biochemistry **14**(6): 1297-303.

McKnight, S. und R. Tjian (1986). "Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells." Cell **46**: 795-805.

Mehrtens, F., H. Kranz, P. Bednarek und B. Weisshaar (2005). "The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis." Plant Physiology **138**(2): 1083-1096.

Melcher, K. und S. A. Johnston (1995). "GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators." Molecular and Cellular Biology **15**(5): 2839-48.

Merkle, T., D. Leclerc, C. Marshallsay und F. Nagy (1996). "A plant in vitro system for the nuclear import of proteins." Plant J **10**(6): 1177-86.

Mol, J., E. Grotewold und R. Koes (1998). "How genes paint flowers and seeds." Trends in Plant Science **3**(6): 212-217.

Morohashi, K. und E. Grotewold (2009). "A systems approach reveals regulatory circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors." PLoS Genet **5**(2): e1000396.

Morohashi, K., M. Zhao, M. Yang, B. Read, A. Lloyd, R. Lamb und E. Grotewold (2007). "Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events." Plant Physiol **145**(3): 736-46.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **51**: 263-273.

Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods in Enzymology **155**: 335-350.

Murashige, T. und F. Skoog (1962). "A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." Plant Physiology **15**: 473-497.

Murre, C., G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, et al. (1994). "Structure and function of helix-loop-helix proteins." Biochimica et Biophysica Acta **1218**(2): 129-135.

Murre, C., P. S. McCaw und D. Baltimore (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins." Cell **56**: 777-783.

Nakazawa, M. und M. Matsui (2003). "Selection of hygromycin-resistant Arabidopsis seedlings." Biotechniques **34**(1): 28-30.

Nesi, N., I. Debeaujon, C. Jond, G. Pelletier, M. Caboche und L. Lepiniec (2000). "The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in Arabidopsis siliques." The Plant Cell **12**(10): 1863-1878.

Nesi, N., C. Jond, I. Debeaujon, M. Caboche und L. Lepiniec (2001). "The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed." The Plant Cell **13**(9): 2099-2114.

Neuffer, M. G., E. H. Coe, Jun. and S. R. Wessler (1997). Mutants of Maize. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ng, D. W., M. B. Chandrasekharan und T. C. Hall (2006). "Ordered histone modifications are associated with transcriptional poising and activation of the phaseolin promoter." Plant Cell **18**(1): 119-32.

Nuccio, M. L. und T. L. Thomas (1999). "ATS1 and ATS3: two novel embryo-specific genes in Arabidopsis thaliana." Plant Molecular Biology **39**(6): 1153-1163.

Offermann, S., T. Danker, D. Dreytmüller, R. Kalamajka, S. Topsch, K. Weyand und C. Peterhansel (2006). "Illumination is necessary and sufficient to induce histone acetylation independent of transcriptional activity at the C4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase promoter in maize." Plant Physiol **141**(3): 1078-88.

Ogata, K., C. Kanei-Ishii, M. Sasaki, H. Hatanaka, A. Nagadoi, M. Enari, et al. (1996). "The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation." Nature Structural Biology **3**(2): 178-87.

Oliver, D. J. und R. Raman (1995). "Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria." J Bioenerg Biomembr **27**(4): 407-14.

Orlando, V., H. Strutt und R. Paro (1997). "Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking." Methods **11**(2): 205-14.

Ouyang, X., J. Li, G. Li, B. Li, B. Chen, H. Shen, et al. (2011). "Genome-wide binding site analysis of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 reveals its novel function in Arabidopsis development." Plant Cell **23**(7): 2514-35.

Ovadi, J. und P. A. Sreere (1996). "Metabolic consequences of enzyme interactions." Cell Biochem Funct **14**(4): 249-58.

Payne, C. T., F. Zhang und A. M. Lloyd (2000). "GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1." Genetics **156**(3): 1349-1362.

Paz-Ares, J., D. Ghosal, U. Wienand, P. A. Peterson und H. Saedler (1987). "The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators." The EMBO Journal **6**(12): 3553-3558.

Paz-Ares, J., U. Wienand, P. A. Peterson und H. Saedler (1986). "Molecular cloning of the *c1* locus of *Zea mays*: a locus regulating the anthocyanin pathway." The EMBO Journal **5**: 829-834.

Peer, W. A. und A. S. Murphy (2007). "Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?" Trends in Plant Science **12**(12): 556-63.

Pelletier, M. K., J. R. Murrell und B. W. Shirley (1997). "Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in arabidopsis." Plant Physiology **113**(4): 1437-1445.

Pires, N. und L. Dolan (2010). "Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants." Molecular Biology and Evolution **27**(4): 862-874.

Prabhu, V., K. B. Chatson, G. D. Abrams und J. King (1996). "¹³C nuclear magnetic resonance detection of interactions of serine hydroxymethyltransferase with C1-tetrahydrofolate synthase and glycine decarboxylase complex activities in Arabidopsis." Plant Physiol **112**(1): 207-16.

Preuss, A., R. Stracke, B. Weisshaar, A. Hillebrecht, U. Matern und S. Martens (2009). "*Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase." FEBS Letters **583**: 1981–1986.

Ramsay, N. A. und B. J. Glover (2005). "MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity." Trends in Plant Science **10**(2): 63-70.

Ren, B., F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, et al. (2000). "Genome-wide location and function of DNA binding proteins." Science **290**(5500): 2306-9.

Reneker, J. S. und T. W. Brotherton (1991). "Discrete regions of the avian beta-globin gene cluster have tissue-specific hypersensitivity to cleavage by sonication in nuclei." Nucleic Acids Res **19**(17): 4739-45.

Richter, G. (1988). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Stuttgart; New York.

Robertson, G., M. Hirst, M. Bainbridge, M. Bilenky, Y. Zhao, T. Zeng, et al. (2007). "Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing." Nat Methods **4**(8): 651-7.

Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz und J. P. Mesirov (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-6.

Rose, A. B., T. Elfersi, G. Parra und I. Korf (2008). "Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression." Plant Cell **20**(3): 543-51.

Ross, J., Y. Li, E. Lim und D. J. Bowles (2001). "Higher plant glycosyltransferases." Genome Biology **2**(2): reviews3004.1–reviews3004.6.

Rye, M. B., P. Saetrom und F. Drablos (2010). "A manually curated ChIP-seq benchmark demonstrates room for improvement in current peak-finder programs." Nucleic Acids Res **39**(4): e25.

Saito, K., H. Yokoyama, M. Noji und I. Murakoshi (1995). "Molecular cloning and characterization of a plant serine acetyltransferase playing a regulatory role in cysteine biosynthesis from watermelon." J Biol Chem **270**(27): 16321-6.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**(12): 5463-5467.

Schaefer, D., J. P. Zryd, C. D. Knight und D. J. Cove (1991). "Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*." Mol Gen Genet **226**(3): 418-24.

Scheeren-Groot, E. P., K. W. Rodenburg, A. den Dulk-Ras, S. C. Turk und P. J. Hooykaas (1994). "Mutational analysis of the transcriptional activator VirG of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **176**(21): 6418-26.

Schrodinger, LLC (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.

Shikazono, N., Y. Yokota, S. Kitamura, C. Suzuki, H. Watanabe, S. Tano und A. Tanaka (2003). "Mutation rate and novel tt mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions." Genetics **163**(4): 1449-1455.

Shirley, B. W. (1998). "Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis." Seed Science Research **8**(4): 415-422.

Sieburth, L. E. und E. M. Meyerowitz (1997). "Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically." Plant Cell **9**(3): 355-65.

Singh, H., R. G. Clerc und J. H. LeBowitz (1989). "Molecular cloning of sequence-specific DNA binding proteins using recognition site probes." BioTechniques **7**: 252-261.

Small, I., N. Peeters, F. Legeai und C. Lurin (2004). "Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences." Proteomics **4**(6): 1581-90.

Smeekens, S. (1998). "Sugar regulation of gene expression in plants." Current Opinion in Plant Biology **1**: 230-234.

Smeekens, S. und F. Rook (1997). "Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants." Plant Physiology **115**(1): 7-13.

Spencer, V. A., J. M. Sun, L. Li und J. R. Davie (2003). "Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding." Methods **31**(1): 67-75.

Sprenger-Haussels, M. und B. Weisshaar (2000). "Transactivation properties of parsley proline rich bZIP transcription factors." The Plant Journal **22**(1): 1-8.

Srere, P. A. (1987). "Complexes of sequential metabolic enzymes." Annu Rev Biochem **56**: 89-124.

Stracke, R., H. Ishihara, G. Huel, A. Barsch, F. Mehrrens, K. Niehaus und B. Weisshaar (2007). "Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling." The Plant Journal **50**(4): 660-677.

Stracke, R., O. Jahns, M. Keck, T. Tohge, K. Niehaus, A. R. Fernie und B. Weisshaar (2010). "Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation." New Phytologist **188**(4): 985-1000.

Stracke, R., M. Werber und B. Weisshaar (2001). "The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*." Current Opinion in Plant Biology **4**: 447-456.

Suss, K. H., C. Arkona, R. Manteuffel und K. Adler (1993). "Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5514-8.

Taylor, L. P. und E. Grotewold (2005). "Flavonoids as developmental regulators." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 317-323.

Teng, S., J. Keurentjes, L. Bentsink, M. Koornneef und S. Smeekens (2005). "Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene." Plant Physiology **139**(4): 1840-1852.

Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-33.

Tohge, T., Y. Nishiyama, M. Y. Hirai, M. Yano, J. Nakajima, M. Awazuhara, et al. (2005). "Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor." The Plant Journal **42**(2): 218-235.

Toledo-Ortiz, G., E. Huq und P. H. Quail (2003). "The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family." The Plant Cell **15**(8): 1749-1770.

Tomchick, D. R., P. Phan, M. Cymborowski, W. Minor und T. R. Holman (2001). "Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1." Biochemistry **40**(25): 7509-17.

Treutter, D. (2005). "Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis." Plant Biol (Stuttg) **7**(6): 581-91.

Tsuji, J., E. P. Jackson, D. A. Gage, R. Hammerschmidt und S. C. Somerville (1992). "Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*." Plant Physiol **98**(4): 1304-9.

Turnbull, J. J., A. G. Prescott, C. J. Schofield und R. C. Wilmouth (2001). "Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*." Acta Crystallography Section D Biological Crystallography **57**(Pt 3): 425-7.

Vogt, T. (2010). "Phenylpropanoid biosynthesis." Molecular Plant **3**(1): 2-20.

Wagner, H. und S. Bladt (1995). Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas. Berlin, Springer.

Wallace, T. C. (2011). "Anthocyanins in cardiovascular disease." Adv Nutr **2**(1): 1-7.

Weinmann, A. S. und P. J. Farnham (2002). "Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation." Methods **26**: 37-47.

Weiss, D. (2000). "Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals." Physiologia Plantarum **110**(2): 152-157.

Weisshaar, B., G. A. Armstrong, A. Block, O. da Costa e Silva und K. Hahlbrock (1991). "Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness." The EMBO Journal **10**(7): 1777-1786.

Weisshaar, B. und G. I. Jenkins (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." Current Opinion in Plant Biology **1**: 251-257.

- Wells, J. und P. J. Farnham** (2002). "Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation." Methods **26**(1): 48-56.
- Weng, C. J. und G. C. Yen** (2012). "Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities." Cancer Metastasis Rev.
- Williams, C. A. und R. J. Grayer** (2004). "Anthocyanins and other flavonoids." Natural Product Reports **21**(4): 539-573.
- Wilmouth, R. C., J. J. Turnbull, R. W. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott und C. J. Schofield** (2002). "Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*." Structure **10**(1): 93-103.
- Wink, M.**, Ed. (1999). Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Annual Plant Reviews. Sheffield, Sheffield Academic Press.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). "Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways." Physiologia Plantarum **107**: 142-149.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." Plant Physiology **126**: 485-493.
- Wood, K. V.** (1991). Recent advances and prospects for use of beetle luciferase as genetic reporters. Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status. P. Stanley, Kricka, L. Chichester, John Wiley and Sons. **1**.
- Xie, D. Y., S. B. Sharma, N. L. Paiva, D. Ferreira und R. A. Dixon** (2003). "Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis." Science **299**(5605): 396-9.
- Yonekura-Sakakibara, K., A. Fukushima, R. Nakabayashi, K. Hanada, F. Matsuda, S. Sugawara, et al.** (2012). "Two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification delineated by transcriptome independent component analysis in *Arabidopsis thaliana*." Plant J **69**(1): 154-67.
- Yonekura-Sakakibara, K., T. Tohge, F. Matsuda, R. Nakabayashi, H. Takayama, R. Niida, A. Watanabe-Takahashi, E. Inoue und K. Saito** (2008). "Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*." The Plant Cell **20**: 2160-2176.

Yonekura-Sakakibara, K., T. Tohge, R. Niida und K. Saito (2007). "Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics." Journal of Biological Chemistry **282**(20): 14932-41.

Yoshida, K., M. Mori und T. Kondo (2009). "Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology." Nat Prod Rep **26**(7): 884-915.

Zhang, F., A. Gonzalez, M. Zhao, C. T. Payne und A. M. Lloyd (2003). "A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*." Development **130**(20): 4859-4869.

Zhang, X., R. Henriques, S. S. Lin, Q. W. Niu und N. H. Chua (2006). "Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method." Nat Protoc **1**(2): 641-6.

Zhao, J., Y. Pang und R. A. Dixon (2010). "The Mysteries of Proanthocyanidin Transport and Polymerization." Plant Physiology **153**: 437-443.

Zimmermann, I. (2003). Systematische Untersuchungen von Proteininteraktionen der MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. Mat.-Nat. Fak. Köln, Universität zu Köln.

Zimmermann, I. M., M. A. Heim, B. Weisshaar und J. F. Uhrig (2004). "Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins." The Plant Journal **40**: 22-34.

7. Anhang

7.1. *pDISCO* Vektorkarte

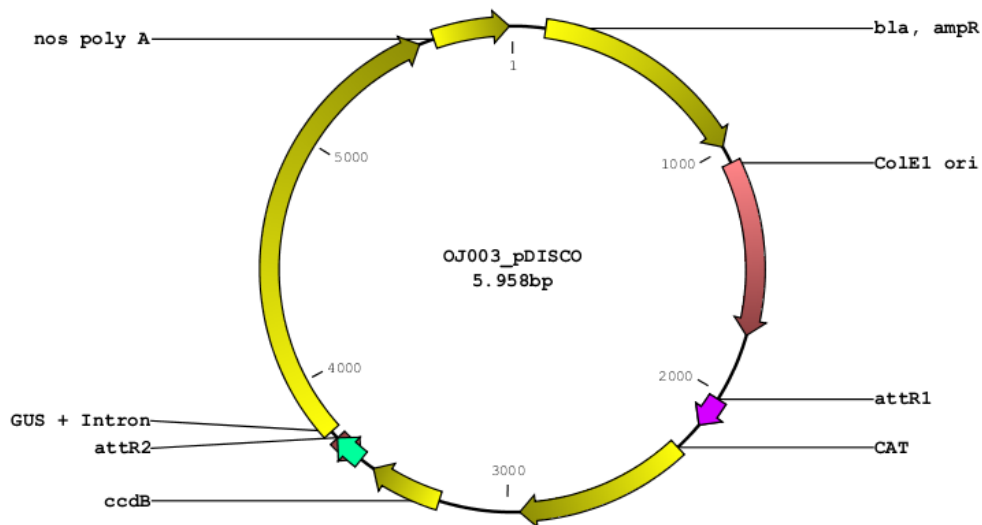


Abbildung 7.1.: *pDISCO* Vektorkarte. Schematische Darstellung der *pDISCO Gateway*[®] Destination Vector Plasmidstruktur. Bla, ampR: Ampicillin Resistenz ORF. ColE1 ori: Origin of Replication. attR1: Gateway[®] attachment site. CAT: Chloramphenicol Acetyltransferase ORF. ccdB: ccdB ORF. attR2: Gateway[®] attachment site. GUS+Intron: β-Glukoronidase ORF mit Intron. Nos poly A: Nopaline Synthase Poly(A)

7.2. Vorbereitung der CHIP DNA-Proben: Bestimmung der DNA Konzentration und Größenverteilung

Tabelle 7.1.: Konzentrationsbestimmung der CHIP DNA Proben.

Name d. Probe	Mean	mean - blank	ng/ml (über log Steigung)	Vorverdü	Verdünnungsfal	unverdünn(n _g /μl)	Volumen ng	Gesamt
G1 (ProTT8::TT8:GFP a-GFP)	369	346,0	14,0	1	200	2,8093	13	36,5
G2 (ProTT8::TT8:GFP a-IgG)	758	735,0	29,8	1	200	5,9677	13	77,6
G3 (ProEGL3::GFP:EGL3 a-GFP)	903	880,0	35,7	1	200	7,1449	13	92,9
G4 (ProEGL3::GFP:EGL3 a-IgG)	837	814,0	33,0	1	200	6,6091	13	85,9
G5 (35S::TT8:GFP a-GFP)	207	184,0	7,5	1	200	1,4939	13	19,4
G6 (35S::TT8:GFP a-IgG)	348	325,0	13,2	1	200	2,6388	13	34,3
G7 (35S::GFP:EGL3 a-GFP)	392	369,0	15,0	1	200	2,9960	13	38,9
M1	23	0,0	0,0	1	200	0,0000		
M2	23	0,0	0,0	1	200	0,0000		
M3	660	637,0	25,9	1	200	5,1720		
M4	1416	1393,0	56,6	1	200	11,3101		
M5	88	65,0	2,6	1	200	0,5278		
M6	285	262,0	10,6	1	200	2,1272		
M7	929	906,0	36,8	1	200	7,3560		
Standard 500	5895	5872,0	238,4	1	2	476,7627		
Standard 1000	12995	12972,0	526,6	1	2	1053,2298		
Blank	23	0,0	0,0	1	2	0,0000		

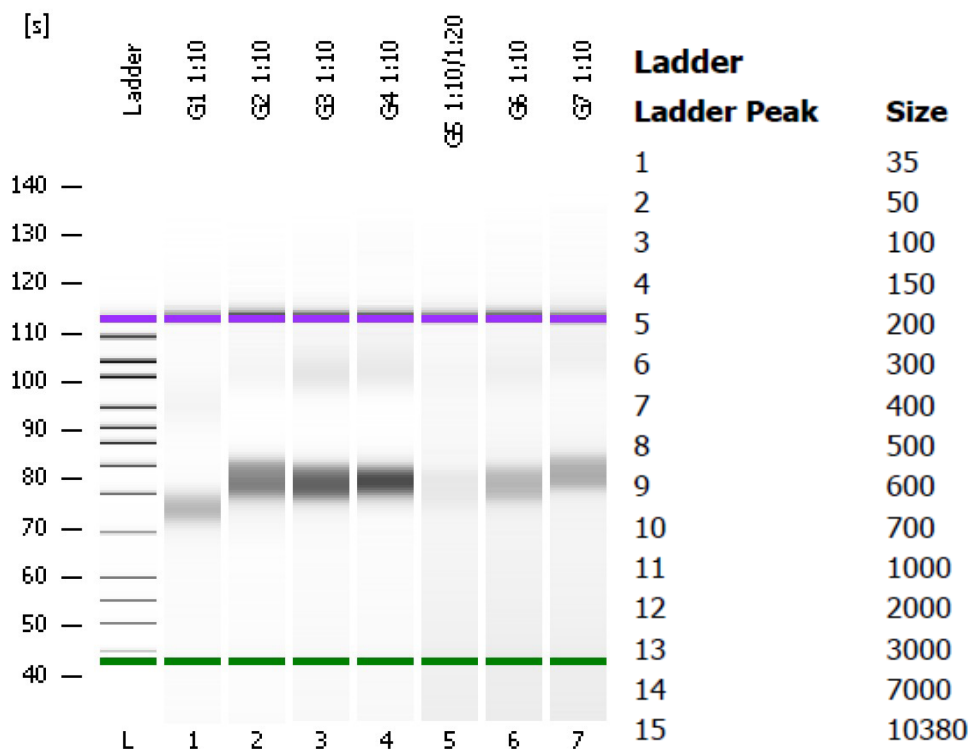


Abbildung 7.2.: Auszug der Analyse zur Größenverteilung der CHIP DNA-Proben mit dem Agilent *High Sensitivity DNA Assay*. Dargestellt ist ein Auszug des Analyseprotokolls mit elektronisch abgebildeter Größenverteilung der untersuchten DNA-Proben G1 bis G7 (Abkürzung siehe Tabelle 7.1.).

7.3. Auflistung der identifizierten putativen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren TT8 und EGL3 mit Hilfe von CHIP-seq Experimenten in elektronischer Form

7.4. Wertetabelle zu dem Transaktivierungsassay

Tabelle 8.1. zu Abb. 3.26. Rohdaten der Transfektionsexperimente

Bezeichnung		spez.-GUS-Aktivität	spez. LUC-Aktivität	korr. Spez GUS-Aktivität
Reporter	Effektor	[pmol/(min*mg)]	[RLU/(/sec*µg)]	
OJ004 ProFLS1	-, -,	251	7027	195
OJ004 ProFLS1	-, -,	364	9639	207
OJ004 ProFLS1	-, -,	14	2696	23
OJ004 ProFLS1	-, -,	296	6559	192
OJ004 ProFLS1	-, -,	-11	569	-13
OJ004 ProFLS1	PFG2, -,	25954	5809	24432
OJ004 ProFLS1	PFG2, -,	31229	4835	27475
OJ004 ProFLS1	PFG2, -,	32386	6298	28118
OJ004 ProFLS1	PFG2, -,	7881	1825	18401
OJ004 ProFLS1	PFG2, -,	2662	989	1744
OJ004 ProFLS1	PFG1, -,	38522	3368	62537
OJ004 ProFLS1	PFG1, -,	30756	1375	95151
OJ004 ProFLS1	PFG1, -,	37347	3501	58331
OJ004 ProFLS1	PFG1, -,	22153	2046	46153
OJ004 ProFLS1	PFG1, -,	6770	708	6197
OJ004 ProFLS1	PFG3, -,	32506	5305	33504
OJ004 ProFLS1	PFG3, -,	34781	4055	36485
OJ004 ProFLS1	PFG3, -,	19925	4535	24024
OJ004 ProFLS1	PFG3, -,	27611	4645	25332
OJ004 ProFLS1	PFG3, -,	7967	1399	3689
OJ029 ProUGT78D1	-, -,	-10	1908	-27
OJ029 ProUGT78D1	-, -,	-14	3309	-23
OJ029 ProUGT78D1	-, -,	-60	751	-340
OJ029 ProUGT78D1	-, -,	0	886	0
OJ029 ProUGT78D1	PFG2, -,	1079	3149	1873
OJ029 ProUGT78D1	PFG2, -,	744	2335	1743
OJ029 ProUGT78D1	PFG2, -,	553	1264	1861
OJ029 ProUGT78D1	PFG2, -,	375	1177	206
OJ029 ProUGT78D1	PFG1, -,	2532	1666	8312
OJ029 ProUGT78D1	PFG1, -,	2281	2052	6079
OJ029 ProUGT78D1	PFG1, -,	1202	904	5657
OJ029 ProUGT78D1	PFG1, -,	571	526	703
OJ029 ProUGT78D1	PFG3, -,	1054	3086	1867
OJ029 ProUGT78D1	PFG3, -,	561	1892	1623
OJ029 ProUGT78D1	PFG3, -,	474	990	2036
OJ029 ProUGT78D1	PFG3, -,	173	690	163
OJ030 ProUGT78D3	-, -,	-46	5064	-39
OJ030 ProUGT78D3	-, -,	-67	3146	-90
OJ030 ProUGT78D3	-, -,	-45	10777	-18

OJ030 ProUGT78D3	-,-,	-12	3046	-3
OJ030 ProUGT78D3	-,-,	-100	1638	-103
OJ030 ProUGT78D3	-,-,	-54	2514	-36
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	25	5021	21
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	95	8805	46
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	19	3676	22
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	21	1314	10
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	-21	2561	-14
OJ030 ProUGT78D3	PFG2,-,	27	2666	17
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	203	4330	200
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	55	2226	106
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	853	4603	789
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	33	653	33
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	317	1479	362
OJ030 ProUGT78D3	PFG1,-,	226	863	443
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	115	5578	88
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	172	7585	97
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	305	5947	218
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	-5	946	-3
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	64	2043	53
OJ030 ProUGT78D3	PFG3,-,	68	2041	56
OJ031 ProUGT78D4	-,-,	-5	6166	-4
OJ031 ProUGT78D4	-,-,	-2	7843	-1
OJ031 ProUGT78D4	-,-,	-20	7933	-11
OJ031 ProUGT78D4	-,-,	10	2163	3
OJ031 ProUGT78D4	PFG2,-,	2808	4313	3560
OJ031 ProUGT78D4	PFG2,-,	3180	5039	3451
OJ031 ProUGT78D4	PFG2,-,	6856	6734	4332
OJ031 ProUGT78D4	PFG2,-,	260	879	192
OJ031 ProUGT78D4	PFG1,-,	5157	2397	11766
OJ031 ProUGT78D4	PFG1,-,	9705	3751	14147
OJ031 ProUGT78D4	PFG1,-,	13560	4382	13165
OJ031 ProUGT78D4	PFG1,-,	844	831	658
OJ031 ProUGT78D4	PFG3,-,	19416	13760	7715
OJ031 ProUGT78D4	PFG3,-,	11692	8185	7810
OJ031 ProUGT78D4	PFG3,-,	11906	6309	8028
OJ031 ProUGT78D4	PFG3,-,	1276	1749	473
OJ032 ProUGT89C1	-,-,	-3	4836	-3
OJ032 ProUGT89C1	-,-,	-9	4039	-9
OJ032 ProUGT89C1	-,-,	-1	4507	-1
OJ032 ProUGT89C1	-,-,	-14	598	-15
OJ032 ProUGT89C1	PFG2,-,	19180	4690	17429
OJ032 ProUGT89C1	PFG2,-,	8603	2114	17347
OJ032 ProUGT89C1	PFG2,-,	31328	3986	33438
OJ032 ProUGT89C1	PFG2,-,	1937	868	1446
OJ032 ProUGT89C1	PFG1,-,	5869	1886	13265
OJ032 ProUGT89C1	PFG1,-,	11087	3313	14264

OJ032 ProUGT89C1	PFG1, -,	24832	2610	40476
OJ032 ProUGT89C1	PFG1, -,	2590	483	3475
OJ032 ProUGT89C1	PFG1, -,	11777	728	27300
OJ032 ProUGT89C1	PFG1, -,	26526	2020	22173
OJ032 ProUGT89C1	PFG3, -,	19026	4760	17036
OJ032 ProUGT89C1	PFG3, -,	30960	5227	25244
OJ032 ProUGT89C1	PFG3, -,	32065	4277	31891
OJ032 ProUGT89C1	PFG3, -,	1363	500	1766
OJ033ProUGT73C6	-, -,	369	6485	243
OJ033ProUGT73C6	-, -,	312	4370	304
OJ033ProUGT73C6	-, -,	226	3336	288
OJ033ProUGT73C6	-, -,	47	894	34
OJ033ProUGT73C6	PFG2, -,	201	3437	249
OJ033ProUGT73C6	PFG2, -,	267	4532	251
OJ033ProUGT73C6	PFG2, -,	288	3470	354
OJ033ProUGT73C6	PFG2, -,	34	971	23
OJ033ProUGT73C6	PFG1, -,	103	2285	193
OJ033ProUGT73C6	PFG1, -,	172	2905	252
OJ033ProUGT73C6	PFG1, -,	277	2737	431
OJ033ProUGT73C6	PFG1, -,	18	435	27
OJ033ProUGT73C6	PFG3, -,	232	3731	265
OJ033ProUGT73C6	PFG3, -,	247	3988	264
OJ033ProUGT73C6	PFG3, -,	223	3286	289
OJ033ProUGT73C6	PFG3, -,	39	767	33

7.5. Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen, Posterpräsentationen und Vorträge

Stracke R., Jahns O., Keck M., Tohge T., Niehaus K., Fernie A.R. und Weisshaar B. (2010) Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent Flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent Flavonol glycoside accumulation. *New Phytologist*, 188:985-1000

Appelhagen I¹, Jahns O¹, Bartelniewöhner L., Sagasser M., Weisshaar B. und Stracke R. (2011) Leucoanthocyanidin Dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*: Characterization of mutant alleles and regulation by MYB-BHLH-TTG1 transcription factor complexes. *Gene*, 484:1-2:61-68, ¹Diese Autoren haben den gleichen Anteil an dieser Arbeit.

Jahns O., Düttmann V., Weisshaar B. und Stracke R. (2009) Identification of *in vivo* target genes of *Arabidopsis thaliana* flavonoid pathway regulators. *Posterpräsentation im Rahmen des 6. Tri-Nationalen Arabidopsis Meetings vom 16. bis zum 19. September in Köln.*

Jahns O., Düttmann V., Turck F., Weisshaar B. und Stracke R. (2010) Identification of *in vivo* target genes of *Arabidopsis thaliana* flavonoid pathway regulators. *Posterpräsentation im Rahmen der 21. International Conference on Arabidopsis Research vom 6. bis zum 10. Juni in Yokohama (Japan).*

Jahns O., Düttmann V., Turck F., Weisshaar B. und Stracke R. (2010) Identification of *in vivo* target genes of phenylpropanoid pathway regulators. *Vortrag im Rahmen der 23. Tagung zur Pflanzenmolekularbiologie vom 23. bis zum 26. Februar in Wermelskirchen-Dabringhausen.*

Jahns O. (2011) Flavonoid biosynthesis pathway control in *Arabidopsis thaliana*. *Vortrag im Rahmen der 28. Wallenfels Rundgespräche zur Pflanzenbiochemie vom 20. bis zum 22. Mai in Wallenfels.*

Jahns O., Düttmann V., Weisshaar B. und Stracke R. (2012) ChIP-seq based genome-wide identification of *Arabidopsis thaliana* Transparent Testa 8 binding sites. *Vortrag im Rahmen der 25. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen vom 28. Februar bis zum 2. März in Wermelskirchen-Dabringhausen.*

Danksagung

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Genomforschung für die tolle Zeit während meiner Promotion bedanken.

Für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren und für die Bereitstellung des interessanten Themas gilt mein besonderer Dank Bernd Weißhaar. Für die weitere wissenschaftliche Betreuung danke ich Ralf Stracke. Hier möchte ich mich vor allem für die Möglichkeit im Rahmen an von ihm initiierten Projekten mitarbeiten zu können bedanken. Die wissenschaftliche Arbeit, gerade die Etablierung der Chromatin Immunopräzipitation war nicht immer gradlinig und zum Teil mit Mißerfolgen verbunden. Ich hatte aber immer das Gefühl, großes Vertrauen entgegengebracht zu bekommen. Für die Geduld und die Freiheit, selbstständig unterschiedlichste Lösungsansätze probieren zu können, die zum Teil eine längere Zeit in anspruch genommen haben, bedanke ich mich herzlich.

Ich möchte mich auch besonders bei Ingo Appelhagen und Gunnar Huep für die tolle Zeit, die unglaubliche Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bedanken. Ihr seid einfach großartig!

Weiterhin geht mein Dank an Prisca Viehöver, die mir einen Einblick in die Illumina Sequenzierung gegeben hat und einfach eine tolle Kollegin ist, genauso wie Tobias Jakobi und Jochen Blom für das Mapping und Nils Kleinbölting für den Computersupport.

Besonders möchte ich mich auch bei Melanie Kuhlmann und Ute Bürstenbinder für die großartige Unterstützung im Labor bedanken. Gerade meine Laborpartnerin Melli hat oft für eine super Atmosphäre gesorgt. Wir sind ein tolles Team!

Ganz besonders Danke ich meiner Frau Gesine, die in der Zeit meiner Promotion oft auf ihre geliebten Urlaube verzichten musste und immer viel Geduld mit mir gehabt hat. Du hast mir immer Rückhalt gegeben und mich unterstützt. Ich liebe Dich sehr! Meinem kleinen Sohn Ole danke ich für seine uneingeschränkte Liebe. Ich freue mich, dass Du da bist!

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Quellen entnommen sind, kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass Sie – abgesehen von den angegebenen Publikationen (Anhang 7.5.) – 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 (Lehrstuhl für Genomforschung, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld) betreut worden.

Datum

(Oliver Jahns)