

**Funktionelle Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen  
in der Blühregulation und der vegetativen Entwicklung  
von *Arabidopsis thaliana***

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Universität Bielefeld

Fakultät für Biologie

vorgelegt von

Alexander Steffen (M.Sc.)

Oktober 2014

Betreut durch

Prof. Dr. D. Staiger

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Die Blühregulation in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
2.2	Der photoperiodische Signalweg der Blühinduktion .....	6
2.3	Der Vernalisierungs-Signalweg der Blühinduktion .....	8
2.4	Der Gibberellin-abhängige Signalweg der Blühinduktion .....	10
2.5	Der autonome Signalweg der Blühinduktion .....	11
2.6	Temperaturabhängige Regulation der Blühinduktion .....	14
2.7	Der altersabhängige Signalweg der Blühinduktion .....	17
2.8	Integratoren der Blühsignalwege .....	18
2.9	Die RNA-Bindeproteine <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> .....	20
2.10	Zielsetzung .....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1	Verwendete <i>Arabidopsis</i> Genotypen und ihre molekulargenetische Identifizierung ..	23
3.1.1	<i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> Überexpressionslinien .....	23
3.1.2	Die Linien <i>atgrp7-1</i> und <i>atgrp7-1 8i</i> .....	23
3.1.3	Mutationen in der photoperiodischen Blühinduktion: <i>co-9</i> und <i>gi-2</i> .....	23
3.1.4	Mutationen des autonomen Signalwegs: <i>fca-9</i> , <i>flk-1</i> , <i>fpa-3</i> und <i>fld-3</i> .....	24
3.1.5	Mutationen bei Blührepressoren: Die Allele <i>flc-3</i> , <i>flm-3</i> und <i>svp-41</i> .....	25
3.2	Pflanzenanzucht .....	26
3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde .....	26
3.2.2	Behandlung gegen Trauermückenlarven ( <i>Bradysia paupera</i> ) .....	26
3.2.3	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur auf Agarplatten .....	27
3.3	Bestimmung des Blühzeitpunktes bei <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
3.4	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
3.5	Isolierung von Gesamt-RNA .....	28
3.6	Reverse Transkription von Gesamt-RNA .....	29
3.7	Quantitative real time PCR .....	30
3.8	RNA-Immunpräzipitation .....	31
3.9	Immunologischer Nachweis der Proteine <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> .....	31
3.9.1	Proteinextraktion und Bestimmung des Gesamtproteingehalts .....	31
3.9.2	Western Blot Analyse .....	31

---

3.10	Automatisierte Phänotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
4.1	Auswirkungen einer Misexpression von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> auf das Blühverhalten von <i>Arabidopsis</i> .....	33
4.1.1	Blühverhalten der Doppelmutante <i>atgrp7-1 8i</i> .....	33
4.1.2	Blühverhalten von <i>AtGRP7</i> -ox Pflanzen .....	35
4.1.3	Blühverhalten von <i>AtGRP8</i> -ox Pflanzen .....	36
4.2	Komplementation der T-DNA Insertionsmutante <i>atgrp7-1</i> .....	39
4.2.1	Komplementation von <i>atgrp7-1</i> mit dem Wildtyp-Allel von <i>AtGRP7</i> .....	39
4.2.2	Komplementation von <i>atgrp7-1</i> mit dem Allel <i>AtGRP7</i> R <sup>49</sup> Q.....	40
4.3	Interaktion von <i>AtGRP7</i> mit Komponenten des photoperiodischen Signalwegs der Blühinduktion.....	42
4.3.1	Untersuchung der genetischen Interaktion mit <i>CONSTANS</i> .....	42
4.3.2	Untersuchung der genetischen Interaktion mit <i>GIGANTEA</i> .....	45
4.4	Interaktionen von <i>AtGRP7</i> mit anderen Mitgliedern des autonomen Signalwegs der Blühinduktion .....	47
4.4.1	Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in <i>fca-9 atgrp7-1 8i</i> ....	48
4.4.2	Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in <i>fpa-3 atgrp7-1 8i</i> ...	51
4.4.3	Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in <i>flk-1 atgrp7-1</i> und <i>flk-1 atgrp7-1 8i</i> .....	53
4.4.4	Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in <i>fld-3 atgrp7-1</i> .....	55
4.5	Temperaturabhängige Expression von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> .....	58
4.5.1	Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Proteinlevel von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> .....	58
4.5.2	Einfluss eines Temperatursprungs von 20 °C zu 27 °C auf das <i>AtGRP7</i> Proteinlevel .....	59
4.5.3	Kinetik der <i>AtGRP7</i> -Reduktion bei Erhöhung der Umgebungstemperatur .....	61
4.6	Blühverhalten von Pflanzen mit einer Misexpression von <i>AtGRP7</i> bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen .....	62
4.6.1	Expression von Blühregulatoren bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen .....	66
4.6.2	Der späte Blühzeitpunkt von <i>atgrp7-1</i> und <i>atgrp7-1 8i</i> ist nur bei höheren Umgebungstemperaturen <i>FLC</i> -abhängig .....	69
4.7	Reaktion von Pflanzen mit Misexpression von <i>AtGRP7</i> auf einen Temperatursprung von 16 °C auf 27 °C .....	70
4.8	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Interaktion von <i>AtGRP7</i> mit <i>FLC</i> und <i>FLM</i> .....	73
4.9	Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>AtGRP7</i> und <i>FLM</i> .....	74
4.9.1	Erhöhte Expression des Blührepressors <i>MAF4</i> in <i>AtGRP7</i> -ox.....	75
4.10	Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen <i>AtGRP7</i> und <i>SVP</i> .....	75

4.11	Phänotypische Auswirkungen der Misexpression von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> auf die vegetative Entwicklung von <i>Arabidopsis</i> .....	77
4.11.1	Der Wuchsphänotyp von <i>AtGRP7-ox</i> im Kurztag.....	77
4.11.2	Die Blattentwicklung und die relative Wachstumsrate sind geringer in <i>AtGRP7-ox</i> .....	78
4.11.3	Der Wuchsphänotyp von <i>atgrp7-1</i> und <i>atgrp7-1 8i</i> im Kurztag.....	82
4.11.4	Der Wuchsphänotyp von <i>AtGRP8-ox</i> Pflanzen im Kurztag.....	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
5.1	Das Zusammenspiel von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> in der Blühinduktion .....	88
5.2	Die Komplementation des Blühphänotyps von <i>atgrp7-1</i> .....	90
5.3	<i>AtGRP7</i> ist nicht an der photoperiodischen Blühinduktion beteiligt .....	92
5.4	Untersuchungen zur genetischen Interaktion von <i>AtGRP7</i> und Mitgliedern des autonomen Signalwegs der Blühinduktion.....	93
5.5	Wirkungsweisen der RNA-Bindeproteine im autonomen Signalweg.....	94
5.6	Phänotypische Besonderheiten der Doppelmutanten des autonomen Signalwegs ...	97
5.7	Die Proteinkonzentration von <i>AtGRP7</i> wird durch die Umgebungstemperatur reguliert .....	98
5.8	Pflanzen mit einer Misexpression von <i>AtGRP7</i> reagieren unterschiedlich auf veränderte Umgebungstemperaturen .....	99
5.9	<i>AtGRP7</i> beeinflusst nicht die Reaktion auf einen Temperatursprung von 16 °C auf 27 °C .....	101
5.10	In <i>AtGRP7-ox</i> ist das alternative Splicing von <i>FLM</i> misreguliert.....	102
5.11	Phänotypische Auswirkungen der Misexpression von <i>AtGRP7</i> und <i>AtGRP8</i> .....	104
5.12	Schlussbetrachtung.....	106
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>124</b>
	<b>Publikationen</b> .....	<b>125</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>126</b>
	<b>Erklärung</b> .....	<b>127</b>

## 1 Zusammenfassung

Das RNA-Bindeprotein *AtGRP7* (*Arabidopsis thaliana* glycine-rich RNA binding protein) steht unter circadianer Kontrolle und reguliert seine eigene Expression und die des nahe verwandten *AtGRP8* durch einen negativen Rückkopplungskreis auf post-transkriptioneller Ebene. Zieltranskripte von *AtGRP7* werden ebenfalls auf post-transkriptioneller Ebene über den Mechanismus des alternativen Splicings reguliert. Das Protein ist an der Regulation des pflanzlichen Blühzeitpunktes beteiligt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der beiden RNA-Bindeproteine *AtGRP7* und *AtGRP8* auf den Blühzeitpunkt von *Arabidopsis thaliana* auf molekulargenetischer und physiologischer Ebene analysiert, um eine genaue Einordnung in das Netzwerk der Blühregulation vornehmen zu können. Durch den Einsatz einer automatisierten Phänotypisierungsplattform wurden außerdem Einflüsse einer Misexpression der beiden Proteine auf die phänotypische Entwicklung während der vegetativen Wachstumsphase der Pflanze charakterisiert.

Der späte Blühphänotyp sowie die erhöhte Expression des Blührepressors FLOWERING LOCUS C (*FLC*) in der T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1* konnten durch Expression eines genomischen *AtGRP7*-Fragments aufgehoben werden, die Expression eines *AtGRP7*-Fragments mit reduzierter RNA-Bindfähigkeit erzielte jedoch keine vollständige Komplementation, was auf die Wichtigkeit einer intakten *in vivo* RNA-Bindung hinweist.

Der Blühzeitpunkt der Mutante *atgrp7-1 8i*, die kein detektierbares *AtGRP7* aufweist und nur reduzierte Level von *AtGRP8* auf Grund eines RNAi-Konstruktes exprimiert, ist gegenüber der Mutante *atgrp7-1* weiter verspätet. *AtGRP8*-Überexpressionsmutanten zeigen dosisabhängig einen frühen Blühphänotyp. Ein Effekt auf *FLC* ist nur bei älteren Pflanzen zu sehen. *AtGRP8* beeinflusst damit den Blühzeitpunkt in ähnlicher Weise wie *AtGRP7*, der Effekt ist jedoch dosis- und entwicklungsabhängig.

Untersuchungen von Doppelmutanten haben gezeigt, dass *AtGRP7* genetisch unabhängig von *CONSTANS* (*CO*) und *GIGANTEA* (*GI*) wirkt und damit nicht in den photoperiodischen Signalweg der Blühinduktion einzuordnen ist. Das Protein wirkt parallel zu *FCA*, *FPA* und *FLK* im autonomen Signalweg der Blühinduktion, genetische Interaktion besteht jedoch mit der Histon Demethylase FLOWERING LOCUS D (*FLD*). Eine direkte *in vivo* Bindung von *FLC* durch *AtGRP7* kann nicht festgestellt werden, so dass eine indirekte Regulation wahrscheinlich ist.

Warme Umgebungstemperaturen von 27 °C bewirken eine starke Reduktion des *AtGRP7*-Levels, die nicht über eine Regulation der Promotoraktivität verläuft, sondern translationelle oder post-translationelle Mechanismen einschließt. Für *AtGRP8* konnte keine Abhängigkeit von moderaten Änderungen der Umgebungstemperatur festgestellt werden.

Blühversuche bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen zeigen, dass der späte Blühzeitpunkt

von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* bei 16 °C aufgehoben wird, fehlendes AtGRP7 scheint also nur bei höheren Temperaturen einen verzögernden Effekt auf die Blühinduktion zu haben. Kreuzungen mit der Mutante *flc-3* zeigen, dass der Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* bei 20 °C und 27 °C FLC-abhängig ist, bei 16 °C jedoch FLC-unabhängig.

In Pflanzen, die AtGRP7 überexprimieren (*AtGRP7-ox*) ist die FLC-Expression verringert, was allgemein mit einem frühen Blühzeitpunkt in Verbindung gebracht wird. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in *AtGRP7-ox* jedoch der Blührepressor *MADS AFFECTING FLOWERING4 (MAF4)* verstärkt exprimiert wird und das Verhältnis der beiden *FLOWERING LOCUS M (FLM)* Isoformen *FLM-β* und *FLM-δ* stark zugunsten der Variante *FLM-β* verschoben ist, die als Blührepressor wirkt. Der resultierende Blühphänotyp von *AtGRP7-ox* ist daher ein Produkt aus reduzierter FLC- und verstärkter MAF4- und FLM-β-Expression, die Pflanzen können so nicht pauschal als frühblühend bezeichnet werden. AtGRP7 kann ein erster identifizierter Kandidat eines Splicing-Regulators von FLM sein.

Die Phänotypisierung von Pflanzen mit veränderter Expression von AtGRP7 und AtGRP8 zeigt, dass vor allem *AtGRP7-ox* einen dramatischen Effekt auf den Wuchsphänotyp von *Arabidopsis thaliana* ausübt und die vegetative Entwicklung verlangsamt. Es ist daher anzunehmen, dass die Rolle von AtGRP7 und AtGRP8 nicht auf die Blühregulation beschränkt ist, sondern die Proteine auch die vegetative Entwicklung beeinflussen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass AtGRP7 den Blühzeitpunkt über den autonomen Signalweg der Blühinduktion reguliert und auch Funktionen im temperaturabhängigen Signalweg erfüllt. AtGRP8 übt in vielen Fällen redundante Funktionen aus, wird jedoch nicht durch moderate Änderungen der Umgebungstemperatur reguliert. Beide Proteine beeinflussen auch die vegetative Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* und nehmen daher eine weitreichende Rolle während der gesamten pflanzlichen Entwicklung ein.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Blühregulation in *Arabidopsis thaliana*

Die reproduktive Phase von höheren Pflanzen zeichnet sich durch die Bildung von Blüten als spezialisierten Reproduktionsorganen aus. Die Bestäubung der Blüten geschieht auf vielfältigen Wegen, oft durch Insekten, durch den Wind, aber auch durch Wirbeltiere wie z.B. Vögel. Nach der erfolgreichen Bestäubung der Samenanlagen bilden die Pflanzen Früchte aus, die der Verbreitung der in ihnen enthaltenen Samen dienen. Diese sichern für die Pflanze den Fortbestand der Art, für Tiere und Menschen bilden sie eine wichtige Grundlage ihrer Ernährung. Als sessile Organismen sind Pflanzen in besonderem Maße wechselnden Umweltbedingungen an ihren Wachstumsstandorten ausgesetzt. Für ihren Reproduktionserfolg ist es daher unerlässlich, dass der Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase nur dann erfolgt, wenn die Umweltbedingungen so günstig sind, dass sichergestellt ist, dass das gesamte Reproduktionsprogramm von der Blütenbildung bis hin zur Reifung der Samen und Früchte ablaufen kann. Dafür haben Pflanzen ein umfangreiches Netzwerk von Regulationsmechanismen entwickelt, das abhängig von exogenen Faktoren wie Licht und Temperatur, aber auch von endogenen Faktoren wie dem Entwicklungszustand der Pflanze, die Blütenbildung reguliert.

Schon früh konnte über physiologische Versuche der Einfluss einzelner Umweltfaktoren auf die Blütenbildung nachgewiesen werden. So beeinflusst die Tageslänge ganz wesentlich die Blühregulation bei vielen Pflanzen (Garner und Allard, 1920). In gemäßigten klimatischen Breiten blühen viele Pflanzen im Frühling und im Sommer, wenn die Lichtperiode am Tag länger ist als die Dunkelperiode in der Nacht. Diese Pflanzen werden als Langtagpflanzen bezeichnet. Zu ihnen gehören Getreidearten wie Weizen (*Triticum aestivum*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Roggen (*Secale cereale*), aber auch die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

Im Gegensatz dazu blühen die Kurztagpflanzen dann, wenn die Tageslänge kürzer ist als die Nachtlänge. Zu ihnen gehören viele Spezies der subtropischen Klimazonen, in denen kurze Tageslängen den Beginn der Regenzeit ankündigen. Bekannte Kurztagpflanzen sind z.B. Reis (*Oryza sativa*), Kaffee (*Coffea arabica*) und der als Zierpflanze kultivierte Weihnachtsstern (*Euphorbia pulcherrima*).

Bei den Lang- und Kurztagpflanzen gibt es jeweils unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktionen auf die Tageslänge. Qualitative Kurz- oder Langtagpflanzen sind obligat auf die jeweilige Photoperiode angewiesen, um die Blüte einzuleiten. Bei fakultativen Kurz- oder Langtagpflanzen hat die Länge der Photoperiode einen stark begünstigenden Effekt auf die Blühinduktion, die Pflanzen blühen aber auch in nicht präferierten Tageslängen nach einer gewissen Zeit. *Arabidopsis* ist eine fakultative



Langtagpflanze, bei der lange Tage zu einer schnellen Blütenbildung führen, die jedoch auch nach längerer Zeit im Kurztag blüht.

Eine dritte Klasse schließlich bilden die tagneutralen Pflanzen, deren Blühzeitpunkt unabhängig von der Tageslänge ist, wie z.B. die Tomate (*Solanum lycopersicum*).

Erste Hypothesen, wie Pflanzen die Tageslänge messen, um den richtigen Blühzeitpunkt zu bestimmen, wurden in den 1930er Jahren von Erwin Bünning aufgestellt (Kobayashi und Weigel, 2007). Bünning ging dabei von einer inneren Uhr der Pflanzen aus, die den 24 h Tag in zwei Phasen einteilt, eine photophile Phase und eine scotophile Phase. Die Anwesenheit von Licht während dieser beiden Phasen zeigt der Pflanze an, ob sie sich im Langtag oder Kurztag befindet. Diese Hypothese, bei der ein interner Rhythmus zusammen mit dem externen Faktor Licht über die Blühinduktion entscheidet, wurde später durch Pittendrigh als „externes Koinzidenzmodell“ bekannt gemacht (Pittendrigh, 1960). Er stellte ebenso ein weiteres Modell auf, das als „internes Koinzidenzmodell“ bekannt wurde (Pittendrigh, 1972). Dieses besagt, dass das Tageslicht dazu benötigt wird, die Oszillation zweier interner Rhythmen zu synchronisieren. Schwingen beide Rhythmen in Phase, kann die Blühinduktion ausgelöst werden.

Ein weiterer offensichtlicher Faktor, der den pflanzlichen Blühzeitpunkt beeinflusst, ist die Temperatur. Diese wirkt in zwei unterschiedlichen Arten auf die Blühinduktion ein. Zum einen hat eine wärmere oder kühlere Umgebungstemperatur einen deutlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Blühinduktion, zum anderen benötigen viele Pflanzen eine ausgedehnte Kälteperiode, um die Blüte einleiten zu können. Während der Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Blühinduktion erst in neuerer Zeit zunehmend verstanden wird, ist der Effekt von längeren Kälteperioden auf die Blühinduktion bereits gut erforscht.

Von Getreidearten wie Gerste und Weizen ist die Existenz von sog. Sommer- und Wintergetreide bekannt. Im Gegensatz zum Sommergetreide, das im Frühjahr gesät und im selben Jahr im Hochsommer geerntet wird, wird Wintergetreide im Herbst gesät und im darauf folgenden Jahr im Sommer geerntet. Wintergetreide benötigt also eine lange andauernde Kälteperiode, um die Blütenbildung einleiten zu können. Dieser Effekt wurde von Gassner 1918 zum ersten Mal beschrieben (Gassner, 1918) und später als „Vernalisierung“ bekannt (Song et al., 2012a). Längere Kälteperioden von je nach Spezies 1-3 Monaten bei Temperaturen nur wenig über 0 °C, wie sie im Winter auftreten, müssen von den Pflanzen durchlebt werden, um den Vernalisierungsbedarf zu sättigen. Steigende Temperaturen danach zeigen schließlich das Ende des Winters an und leiten die Reproduktion in einer günstigen klimatischen Phase ein. Dabei kann durchaus einige Zeit zwischen dem Ende der Kälteperiode und dem Blühbeginn vergehen, die von den Pflanzen genutzt wird, um genügend Biomasse für eine erfolgreiche Reproduktion aufzubauen. Die Vernalisierungsinformation

bleibt jedoch während dieser Zeit in den Pflanzen gespeichert und stellt daher heute das am besten untersuchte Beispiel eines „epigenetischen Gedächtnisses“ in Pflanzen dar (Song et al., 2012a).

Neben Tageslänge und Temperatur können auch Phytohormone die Blühinduktion in Pflanzen beeinflussen. Besonders Gibberellinsäure (GA) zeigt einen positiven Effekt auf die Blühinduktion bei verschiedenen Pflanzenarten. Erste Versuche mit GA wurden in den 1950er Jahren durch Anton Lang durchgeführt und zeigten einen stark verfrühenden Effekt auf die Blütenbildung in *Hyoscyamus niger*. In den folgenden Jahren zeigte sich jedoch, dass der verfrühende Effekt auf die Blütenbildung auf einige Pflanzenspezies beschränkt ist und in anderen Spezies GA keinen oder sogar einen gegenteiligen Effekt zeigt. Demgegenüber ist der Effekt von GA auf die eigentliche Blütenentwicklung, die der Blühinduktion folgt, jedoch konserviert (Mutasa-Göttgens und Hedden, 2009). In *Arabidopsis* ist GA als Aktivator der Blühinduktion wirksam.

Neben diesen drei klassischen Signalwegen der Blühinduktion, die schon früh durch physiologische Experimente bekannt wurden, existiert ein weiterer, der als „autonomer Signalweg“ der Blühinduktion bekannt ist. Dieser steuert die Blühinduktion in Abhängigkeit des Entwicklungszustandes der Pflanze, weitgehend unabhängig von exogenen Faktoren. Bekannt wurde dieser Signalweg erst, nachdem es möglich war, auf genetischer Ebene Mutationsallele in *Arabidopsis* zu erzeugen und diese systematisch auf ihren Einfluss auf die Blühinduktion zu überprüfen (Srikanth und Schmid, 2011).

Am Beispiel *Arabidopsis* werden im Folgenden die genetischen Grundlagen der Blühinduktion näher erläutert. Neben den „klassischen“ Signalwegen (Abb. 2.1) werden dies auch der erst in jüngster Zeit definierte „altersabhängige Signalweg“ und der „thermosensorische Signalweg“ sein. Die Einteilung in distinkte Signalwege wird dabei aus Gründen der Übersichtlichkeit vorerst beibehalten, obwohl immer mehr deutlich wird, dass es sich bei der Blühregulation um ein kompliziertes Netzwerk von Regulationsmechanismen handelt, bei dem die einzelnen Signalwege an vielen Stellen ineinander verwoben sind.

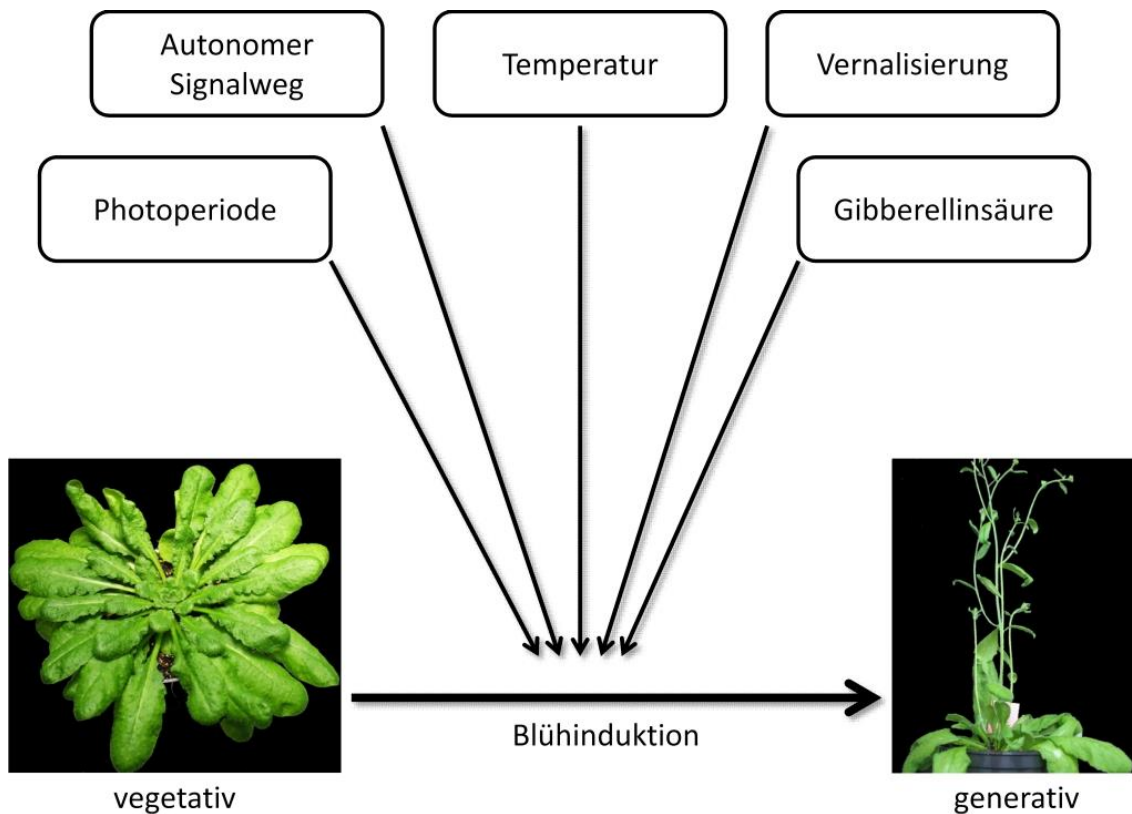


Abb. 2.1: Schematische Übersicht über Regulationswege der Blühinduktion in *Arabidopsis*.

## 2.2 Der photoperiodische Signalweg der Blühinduktion

Pflanzen sind in der Lage, Unterschiede in der Tageslänge wahrzunehmen und die Blüte zu einem Zeitpunkt zu induzieren, der günstige Umweltbedingungen für die Reproduktion bietet. In den gemäßigten Klimazonen der nördlichen Hemisphäre, in denen *Arabidopsis* heimisch ist, kündigen sich die warmen Frühjahrs- und Sommermonate durch eine längere Tageslichtperiode an. Um die Tageslänge zu messen, verfügen Pflanzen über eine Innere Uhr, die einen Rhythmus von etwa 24 Stunden generiert, weswegen sie auch als „circadiane Uhr“ (von lat. *circa diem* = etwa ein Tag) bezeichnet wird. Dieser Taktgeber steuert die Transkription der mRNA des Zink-Finger Proteins *CONSTANS* (*CO*) (Putterill et al., 1995), dessen Expression bei vorhandenem Licht im Langtag (LT) schließlich die Blühinduktion auslöst. *CO* oszilliert mit einer Phase von 24 h und einem Expressionsmaximum bei etwa 20 h nach Sonnenaufgang im LT (Abb. 2.2 A). Zwei Proteine der Inneren Uhr, *GIGANTEA* (*GI*) und die Ubiquitin-Ligase *FLAVIN-BINDING, KLECH REPEAT, F-BOX1* (*FKF1*) sind für die Regulation von *CO* verantwortlich. Beide erreichen ihr Expressionsmaximum im LT etwa 13 Stunden nach Sonnenaufgang (Imaizumi et al., 2003; Sawa et al., 2007). Die Proteine formen einen Komplex, der durch Licht, das von *FKF1* wahrgenommen wird, stabilisiert wird (Sawa et al., 2007). Zusammen sorgen sie für die Degradation von *CYCLING DOF FACTOR* (*CDFs*) Proteinen, die die Transkription von *CO* reprimieren (Fornara et al., 2009). So kommt es zu einem zusätzlichen Peak der *CO* mRNA etwa nach 16 h zum Ende des Tages.

Auf posttranslatationaler Ebene wird CO durch CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) und SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A (SPA1) reguliert. Dieser Komplex ubiquitinyliert CO und sorgt für dessen Degradierung im 26S Proteasom (Liu et al., 2008b; Laubinger et al., 2006). Im LT jedoch wird der Komplex durch aktiviertes CRYPTOCHROM 2 (CRY2) reprimiert, so dass CO nicht abgebaut wird und es zu einer lichtabhängigen Stabilisierung von CO kommt. Auch PHYTOCHROM A (PHYA) trägt zu diesem Prozess bei (Briggs und Olney, 2001). In der Nacht, wenn die Photorezeptoren nicht aktiviert sind, wird CO durch den COP1-SPA1-Komplex für den Abbau markiert. Eine Akkumulation von CO am Morgen wird durch PHYTOCHROM B (PHYB) und HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (HOS1) verhindert (Valverde et al., 2004; Lazaro et al., 2012). Die Expression des CO Proteins zum Ende der Lichtperiode sorgt schließlich für die Aktivierung der Transkription von FLOWERING LOCUS T (FT). Es konnte gezeigt werden, dass CO an *cis*-Elemente des FT -Promotors *in vivo* bindet (Tiwari et al., 2010). Dabei wird die Stabilität von CO durch FKF1 in einem blaulichtabhängigen Mechanismus unterstützt (Song et al., 2012b). FT löst letztendlich im Sprossapikalmeristem (SAM) das Blühen aus.

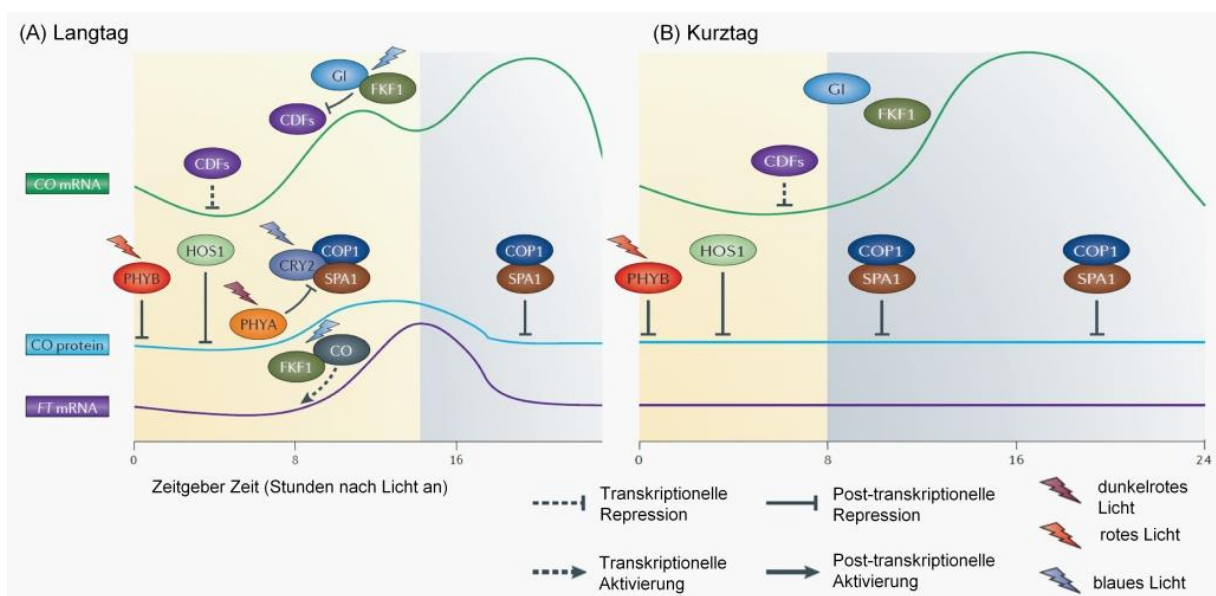


Abb. 2.2: Der photoperiodische Signalweg der Blühinduktion in *Arabidopsis* (verändert nach Andrés und Coupland, 2012). (A) Unter LT-Bedingungen akkumuliert CO, wodurch die FT-Transkription induziert wird. (B) Im Kurztag wird CO reprimiert, es kommt zu keiner Blühinduktion.

Im Kurztag (KT) (Abb. 2.2 B) werden die CDFs nicht durch den GI-FKF1-Komplex degradiert, da unter diesen Bedingungen kein Licht mehr zur Stabilisierung des Komplexes zur Verfügung steht (Sawa et al., 2007). So kommt es zur Repression von CO durch die CDFs und zu keinem Peak der CO mRNA nach 16 Stunden. Lediglich das nächtliche Expressionsmaximum von CO, das nicht zu einer Blühinduktion führt, ist detektierbar. Zusätzlich wird das CO Protein während der langen Dunkelperiode durch den COP1-SPA1-Komplex dem proteasomalen Abbau zugeführt, da die Aktivität

von COP1-SPA1 nicht durch aktivierte Photorezeptoren reprimiert wird. So kommt es unter KT-Bedingungen zu keiner CO-abhängigen Aktivierung der *FT*-Transkription.

### 2.3 Der Vernalisierungs-Signalweg der Blühinduktion

Viele Pflanzen benötigen zur Blühinduktion die Vernalisierung, also eine länger andauernde Kälteperiode. Während dieser Zeit wird ein Repressor, der die Blühinduktion verhindert, sukzessive herunterreguliert. Die Blütenbildung erfolgt dann, wenn andere Faktoren wie die Photoperiode und die Umgebungstemperatur günstige Verhältnisse zur Reproduktion anzeigen. In *Arabidopsis* handelt es sich bei diesem Repressor um *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, der für einen Transkriptionsfaktor mit MADS-Domänen codiert (Michaels und Amasino, 1999; Sheldon et al., 2000). Die Transkription von *FLC* wird während einer Kälteperiode von 6 Wochen immer weiter herab reguliert. Dies geschieht durch stabile Chromatinmodifikationen am *FLC*-Locus, welche die DNA unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie machen („epigenetisches Silencing“) und so die Transkription des Blührepressors verhindern (Song et al., 2012a).

Abhängig von ihrem Verbreitungsgebiet haben Ökotypen von *Arabidopsis* zwei unterschiedliche Lebenslauf-Strategien entwickelt. Die „Sommer-Annualen“-Typen zeigen eine rasche Blühinduktion unter LT-Bedingungen und vollenden einen ganzen Generationszyklus von der Keimung bis zur Samenreife innerhalb einer Vegetationsperiode. Sie zeigen also keinen Vernalisierungsbedarf. Diese Ökotypen (z.B. Columbia, Wassilewskija oder Landsberg) werden aufgrund ihres kurzen Generationszyklusses auch als Laborpflanzen bevorzugt.

„Winter-Annuelle“-Typen dagegen können für lange Zeit unter LT-Bedingungen wachsen, ohne dass die Blütenbildung induziert wird. Erst wenn die Pflanzen einer Vernalisierung ausgesetzt werden, kommt es nach der Winterperiode zur Blütenbildung. Diese Pflanzen brauchen also verhältnismäßig lange, um einen Generationszyklus zu vollenden. Bekannte Ökotypen, die diese Lebenslaufstrategie verfolgen, sind z.B. San Feliu oder Stockholm. Vergleichende genetische Untersuchungen an Ökotypen beider Lebenslaufstrategien konnten viele der am Vernalisierungsprozess beteiligten Gene identifizieren.

In „Winter-Annualen“-Typen werden aktive Allele von *FLC* und *FRIGIDA (FRI)* gefunden, während bei „Sommer-Annualen“-Typen diese Gene oft Mutationen tragen (Johanson et al., 2000; Michaels et al., 2003). *FLC* bindet als Transkriptionsfaktor direkt an Gene der Blühinduktion wie *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* und *FT* und reprimiert die Transkription (Helliwell et al., 2006). Für eine starke Aktivierung der *FLC*-Expression sorgt wiederum *FRI*. *FRI* ist ein Protein mit „coiled-coil“-Domänen, das mit dem „cap-binding-complex“ der Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Expression von *FLC* positiv beeinflusst (Geraldo et al., 2009). Mutationen in *FRI*

und *FLC* führen zu einem frühen Blühphänotyp und der Vernalisierungsbedarf wird aufgehoben. Die Repression von *FLC* lässt sich in zwei Phasen einteilen, die genetisch voneinander getrennt werden können. Zum einen die zunehmende aktive Repression während der Kälteperiode (Abb. 2.3), zum anderen die Aufrechterhaltung dieses Zustands nach der Kälteperiode. Relativ früh während der Kälteexposition lässt sich eine Reduktion von *FLC* mRNA beobachten, die mit einem transienten Anstieg eines nicht Protein-codierenden *FLC* antisense-Transkripts, als *COOLAIR* bezeichnet, korreliert (Swiezewski et al., 2009). Der *COOLAIR* Promotor kann ein GFP-Reporterkonstrukt kälteabhängig herabregulieren (Swiezewski et al., 2009), es scheint also möglich, dass die frühe Reduktion von *FLC* durch den Anstieg von antisense-Transkripten begünstigt wird. Allerdings konnten Helliwell und Kollegen zeigen, dass bei Pflanzen, die keine *COOLAIR* RNA aufgrund einer T-DNA Insertion im Gen exprimieren, die Vernalisierungsantwort trotzdem intakt ist (Helliwell et al., 2011). Ein weiteres nicht-codierendes Transkript wird in sense-Richtung von einem Promotor in Intron 1 von *FLC* exprimiert und als *COLDAIR* bezeichnet. *COLDAIR* mRNA erreicht ihr Expressionsmaximum nach etwa drei Wochen Kälte. Das Transkript interagiert mit dem hochkonservierten Multienzymkomplex PRC2 (Polycomb repressive complex 2), der für die epigenetischen Chromatinmodifikationen am *FLC*-Locus verantwortlich ist (Heo und Sung, 2011).

Zusätzlich ist für die aktive Repression *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) erforderlich. Die Expression wird im späten Stadium der Kälteexposition induziert und *VIN3* assoziiert mit PRC2. Dieser Komplex sorgt für eine Trimethylierung von Lysin 27 in Histon H3 (*H3K27me3*) und somit für epigenetisches silencing von *FLC* (Sung und Amasino, 2004; De Lucia et al., 2008; Schubert et al., 2006).

Das Einsetzen von wärmeren Temperaturen erfordert die Aufrechterhaltung des epigenetisch reprimierten Zustands von *FLC*. Zwei für diesen Schritt wichtige Gene sind *VERNALIZATION 1* und *2* (*VIN1* und *VIN2*) (Gendall et al., 2001; Levy et al., 2002). In *vin1* und *vin2* Mutanten ist zwar die frühe Reduktion von *FLC* in der Kälte zu beobachten, nach Rückkehr zu wärmeren Temperaturen steigt die *FLC*-Transkription in diesen Mutanten jedoch wieder an, der reprimierte Zustand wird also nicht mehr aufrechterhalten. Außerdem findet sich nach der Rückkehr zu warmen Temperaturen *H3K27me3* über den gesamten *FLC*-Locus verteilt, während diese Modifikation vorher hauptsächlich auf die Region von Intron 1 beschränkt ist (De Lucia et al., 2008).

Das Silencing von *FLC* ist stabil und wird auch durch Zellteilung und die damit einhergehende DNA-Replikation nicht beeinflusst. Es wird jedoch nicht an die nachfolgende Generation weitergegeben, so dass sichergestellt ist, dass die Nachkommen vernalisierter Pflanzen erst wieder eine Kälteperiode durchleben müssen, um die Blütenbildung einzuleiten (Sheldon et al., 2008).

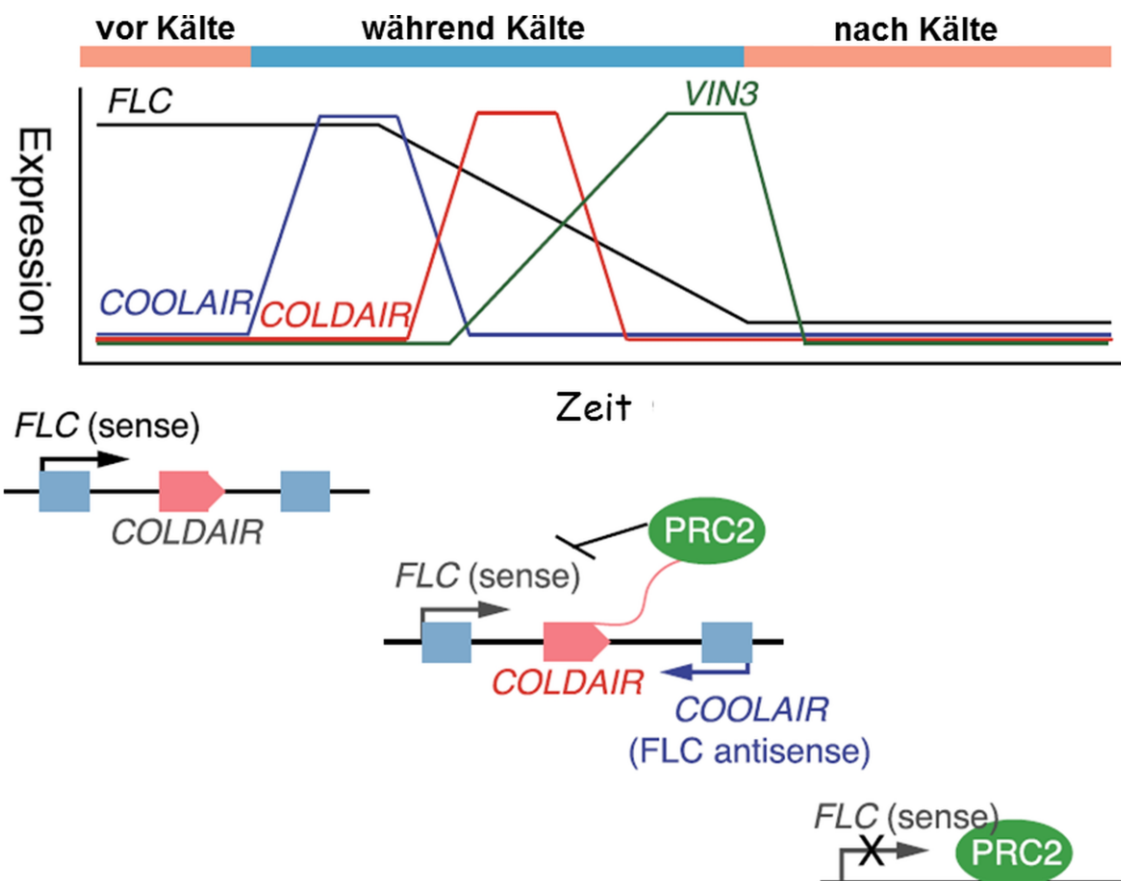


Abb. 2.3: Regulation der *FLC*-Expression während der Vernalisierung (verändert nach Yamaguchi und Abe, 2012)

In der frühen Phase kommt es zur Expression der *COLDAIR* antisense RNA, danach folgt die Expression der *COLDAIR* sense RNA, die PRC2 zum *FLC*-Locus rekrutiert. Zuletzt sorgt *VIN3* für eine aktive Repression von *FLC*.

## 2.4 Der Gibberellin-abhängige Signalweg der Blühinduktion

Gibberelline (GAs) sind Phytohormone, die viele Aspekte der pflanzlichen Entwicklung regulieren, wie z.B. Keimung, Blühinduktion und Blütenbildung (Schwechheimer, 2012). Zudem sind sie an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt (Navarro et al., 2008). Von den über einhundert in Pflanzen identifizierten GAs zeigen GA1, GA3 und GA4 die höchste Bioaktivität (Yamaguchi, 2008).

Der erste Schritt der GA-Biosynthese wird durch das Enzym *ent-Copalyl Diphosphat Synthase* (GA1) katalysiert. Die *ga1-3* Mutante zeigt in *Arabidopsis* einen leicht verspäteten Blühzeitpunkt im LT, blüht aber nicht im KT (Wilson et al., 1992), was dazu führte, dass der GA-Signalweg als spezifisch für die Blühinduktion im KT interpretiert wurde. GAs werden durch Pflanzenzellen über den Rezeptor GIBBERELLIC INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) wahrgenommen, von dem *Arabidopsis* drei Isoformen besitzt. Die *gid1* Tripelmutante zeigt einen verspäteten Blühzeitpunkt auch im LT, der Effekt von GA auf die Blühinduktion ist also nicht auf den KT beschränkt (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). GA wird zur Kontrolle der FT-Expression benötigt und wirkt im LT unabhängig von CO (Hisamatsu und King, 2008; Putterill et al., 1995).

Die Signaltransduktion von GA wird über GID1 durch Interaktion mit der DELLA Proteinfamilie vermittelt, die als Repressoren der GA-Signale fungieren. Der GA-GID1 Komplex bindet an den N-Terminus der DELLA Proteine und führt diese dem proteasomalen Abbau zu (Harberd et al., 2009). DELLAs interagieren z.B. mit PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), die somit sowohl durch Licht als auch durch GA reguliert werden, was den GA-Signalweg mit dem photoperiodischen Signalweg verknüpft (Schwechheimer und Willige, 2009). Zwei Zielgene der PIFs sind die Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL*, die somit GA-abhängig reguliert werden (Richter et al., 2010). GA fördert die Blühinduktion durch Aktivierung der „floral integrator“-Gene *SOC1* und *LEAFY* (*LFY*) im Apikalmeristem (Blázquez und Weigel, 1999; Moon et al., 2003). Die Aktivität des *LFY*-Promotors wird durch GA induziert, indem der repressive Effekt der DELLA Proteine auf den MYB Transkriptionsfaktor MYB33 aufgehoben wird. Zugleich wird jedoch auch die microRNA 159 (miRNA 159) durch GA stimuliert, die für einen post-transkriptionellen Abbau von MYB33 sorgt, was eine Feinregulation der *LFY*-Aktivierung bewirkt (Achard et al., 2004). Kürzlich konnten Porri et al. die Funktionen von GA gewebespezifisch eingrenzen, indem sie ein Enzym des GA-Katabolismus, GIBBERELLIN 2 OXIDASE 7 (*GA2ox7*), unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimierten. Es zeigte sich, dass im LT GAs in den Leitgeweben zur Aktivierung von FT und TWIN SISTER OF FT (*TSF*) benötigt werden. Im Meristem wird *SOC1* durch GA spezifisch im KT aktiviert, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROMOTER LIKE (*SPL*) Transkriptionsfaktoren jedoch sowohl im LT als auch im KT (Porri et al., 2012). Zusammengefasst zeigt sich, dass GAs die Blühinduktion also sowohl im LT als auch im KT auf unterschiedlichsten Ebenen regulieren.

## 2.5 Der autonome Signalweg der Blühinduktion

Der autonome Signalweg der Blühinduktion ist unabhängig von externen Faktoren wie der Tageslänge oder der Umgebungstemperatur. Er reguliert die Blühinduktion in Abhängigkeit des Entwicklungszustands der Pflanze. So ist sichergestellt, dass auch beim Ausbleiben externer Stimuli die Blühinduktion eingeleitet wird, wenn die Pflanze sich in einem geeigneten Zustand befindet. Mutationen im autonomen Signalweg führen in *Arabidopsis* zu einem verspäteten Blühzeitpunkt unabhängig von der Tageslänge. Die Reaktionen auf Vernalisierung und GA-Zugabe sind jedoch intakt. Dem autonomen Signalweg werden die Gene *LUMINIDEPENDENS* (*LD*), *FCA*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS D* (*FLD*), *FLK*, *FVE* und *FY* zugeordnet (Simpson, 2004). Allen gemein ist, dass sie den Blührepressor *FLC* reprimieren und so beschleunigend auf die Blühinduktion wirken. Obwohl zwischen einigen Genen des autonomen Signalwegs Interaktionen nachgewiesen werden konnten und alle auf dasselbe Zielgen *FLC* wirken, befinden diese sich nicht in einer hierarchisch geordneten Signalkaskade. Abhängig von ihrer Funktion lassen sie sich aber in zwei größere Klassen einteilen: Proteine, die die Chromatinstruktur modifizieren und Proteine, die an der RNA-Prozessierung



beteiligt sind. Zur letzteren Gruppe gehören FCA, FPA, FLK und FY, zu den Chromatinmodifikatoren die Proteine LD, FVE und FLD.

FCA ist ein pflanzenspezifisches RNA-Bindeprotein (RBP) mit zwei RNA-recognition motifs (RRM) und einer WW-Domäne für Protein-Protein Interaktionen (Macknight et al., 1997). Es unterliegt einer komplexen Autoregulation, bei der durch alternative RNA-Prozessierung und -Polyadenylierung vier unterschiedliche Transkriptvarianten gebildet werden, von denen nur eine für ein funktionsfähiges Protein codiert (Quesada et al., 2003). Außerdem enthält der 5' untranslatierte Bereich (UTR) Sequenzen, die eine Translation von einem nicht-kanonischen CUG-Startcodon begünstigen, was eine zusätzliche Regulationsebene eröffnet (Simpson et al., 2010). FCA interagiert mit dem RNA-Prozessierungsfaktor FY. Diese Interaktion ist nötig für die korrekte Prozessierung der *FCA* mRNA und für die Herabregulation der *FLC*-Expression (Simpson et al., 2003). FCA ist mit *FLC* an Intron 6 und Exon 6 assoziiert, wo es die proximale Polyadenylierung des *FLC*-antisense Transkripts COOLAIR (zwei Splicevarianten werden auch als *FLC* antisense class I und class II bezeichnet) reguliert (Liu et al., 2007).

Bei FY handelt es sich um eine hochkonservierte Kernkomponente des Polyadenylierungskomplexes in *Arabidopsis* (Simpson et al., 2003). Die entsprechenden Homologe sind PFS2p in Hefe (Ohnacker et al., 2000) und WDR33 im Menschen (Shi et al., 2009). FY besitzt eine N-Terminale WD-Domäne. Eine Mutation dieser Domäne, wie sie bei dem Allel *fy-4* vorliegt, ist lethal in *Arabidopsis* (Henderson et al., 2005). Das zeigt, dass es sich bei FY um eine essenzielle Komponente der RNA-Prozessierung handelt. Die Interaktion von FCA und FY ist ein Beispiel dafür, wie der konstitutiv arbeitende Polyadenylierungsapparat, vermittelt durch FCA, auch eine spezialisierte Funktion in der Blühinduktion ausführen kann.

Ein weiteres pflanzenspezifisches RBP ist FPA. FPA enthält drei RRM und eine SPOC-Interaktionsdomäne (Schomburg et al., 2001). Wie schon FCA beeinflusst auch FPA die Polyadenylierung von mRNAs im 3'-Bereich, unter anderem auch das *FLC*-antisense Transkript COOLAIR. Ebenfalls analog zu FCA unterliegt FPA einer negativen Autoregulation durch Polyadenylierung der eigenen mRNA in einem promotor-proximalen Bereich, was zu einer nicht translatierten mRNA führt. Trotz dieser Gemeinsamkeiten ist FPA weder auf FCA noch auf FY für seine Funktion angewiesen (Hornyk et al., 2010a). Wie genau FPA also die Polyadenylierung beeinflusst, ist noch unbekannt. In Abwesenheit von funktionellem FPA kommt es an einigen Loci im Genom zu nicht korrekter Terminierung der Transkription, was zur Entstehung von chimären Transkripten führt, die sich aus zwei Genen und intergenischen Bereichen zusammensetzen (Hornyk et al., 2010a). Kürzlich konnte für FPA außerdem eine Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr nachgewiesen werden (Lyons et al., 2013).

Das Protein FLK besitzt drei RNA-Bindedomänen, die dem K-homology (KH) Typ angehören (Lim et al.,

2004). Es übt seine Funktion unabhängig von den anderen Mitgliedern des autonomen Signalwegs aus (Bäurle und Dean, 2008; Ripoll et al., 2009). Eine *flk*-Mutante akkumuliert höhere Transkriptmengen sowohl an korrekt gespleißtem *FLC*, als auch an *FLC*-Varianten, die noch Introns enthalten und weist somit einen verspäteten Blühzeitpunkt auf (Ripoll et al., 2009). Da über die Funktionsweise von FLK sonst nichts bekannt ist, wird angenommen, dass es *FLC* auf transkriptioneller Ebene reguliert (Ripoll et al., 2009; Velej und Michaels, 2008). Diese Art der Genregulation ist auch für andere KH-Proteine bekannt (Cheng et al., 2003). Mit PEPPER (PEP) existiert ein FLK verwandtes Protein, das ebenfalls über drei KH-Domänen verfügt. Im Gegensatz zu FLK ist PEP jedoch ein Blührepressor, denn eine *pep*-Mutante weist niedrigere *FLC*-Level auf als der Wildtyp. Außerdem ist die *pep*-Mutation in der Lage, den spätblühenden Phänotyp der *flk*-Mutante zum Teil aufzuheben (Ripoll et al., 2006, 2009).

Zur zweiten Gruppe der Proteine des autonomen Signalwegs, den Chromatin modifizierenden Enzymen, gehört FLD. FLD ist das *Arabidopsis*-Homolog der menschlichen LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1 (LSD1) und hemmt die *FLC*-Expression durch H3K4 Demethylierung des Chromatins (Liu et al., 2007). Zusätzlich wird in der Mutante *fld-3* auch ein Anstieg von Histon H4 Acetylierung beobachtet, daher erscheint es möglich, dass FLD auch eine Deacetylierungsfunktion ausübt (He et al., 2003). In *Arabidopsis* sind mit LSD1-LIKE 1-3 (LDL1-3) noch drei weitere Homologe von FLD bekannt, von denen LDL1 und LDL2 redundante Funktionen zu FLD ausführen (Jiang et al., 2007). Analysen einer *fca fld* Doppelmutante haben gezeigt, dass sich FCA epistatisch zu FLD verhält. Beide Proteine könnten also in einem gemeinsamen Signalweg wirken (Liu et al., 2007).

Ebenfalls auf Chromatinebene übt FVE seinen Einfluss auf *FLC* aus. Das Protein ist homolog zu MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) und zu zwei humanen Retinoblastom-assoziierten Proteinen. In *Arabidopsis* wurde es als Teil eines Histon Deacetylase-Komplexes gefunden (Ausín et al., 2004), außerdem interagiert FVE mit Proteinen des PRC2-Komplexes (Pazhouhandeh et al., 2011). FVE spielt auch eine Rolle in der Temperaturregulation der Blühinduktion. Es fördert die Blühinduktion bei erhöhter Umgebungstemperatur in einem Mechanismus, der unabhängig von *FLC* ist, aber FCA benötigt (Blázquez et al., 2003). Zusätzlich zeigt eine *fve*-Mutante eine konstitutiv erhöhte Expression von kälteinduzierten Genen und ist insensitiv gegenüber kurzen Kälteperioden während der Lichtphase (Kim et al., 2004).

Das Protein LD schließlich reguliert *FLC* ebenfalls über Histon-Demethylierung und -Acetylierung (Domagalska et al., 2007). Darüber hinaus übt LD eine negative Regulation auf den *FLC*-Transkriptionsaktivator SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 (SUF4) aus (Kim et al., 2006).

## 2.6 Temperaturabhängige Regulation der Blühinduktion

Die pflanzliche Blühinduktion ist in starkem Maße von der im natürlichen Umfeld herrschenden Umgebungstemperatur abhängig. Die Verbreitung vieler Pflanzen ist auf bestimmte Lebensräume mit definierten klimatischen Bedingungen begrenzt. Daher ist es von besonderem Interesse, aufzuklären, wie Pflanzen Temperatur wahrnehmen und ihre Entwicklung entsprechend steuern. Während die pflanzlichen Reaktionen auf Hitze- und Kältestress sowie auf längere Kälteperioden (Vernalisierung) bereits seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Forschung sind (Penfield, 2008), rückt die pflanzliche Reaktion auf moderate Veränderungen der Umgebungstemperatur erst seit kurzem, vor allem vor dem Hintergrund der globalen Klimaveränderung, in den Fokus.

Für Pflanzen wie *Arabidopsis*, die an die gemäßigten Klimazonen der Erde angepasst sind, wird angenommen, dass Umgebungstemperaturen zwischen 12 °C und 27 °C die Entwicklung und die Blühinduktion stark beeinflussen, ohne jedoch eine Stressreaktion hervorzurufen (Samach und Wigge, 2005). Hohe Umgebungstemperaturen wirken sich beschleunigend auf das Blühverhalten aus, während kühlere Temperaturen die Blüte stark verzögern. Dies konnte bei *Arabidopsis* gezeigt werden, indem die Pflanzen unterschiedlicher Ökotypen im KT bei erhöhten Umgebungstemperaturen angezogen wurden. Diese führten zu einer Verfrühung des Blühzeitpunktes, ähnlich wie sonst nur das Wachstum im LT (Balasubramanian et al., 2006).

Auf molekularer Ebene korreliert die Expression von HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP70) mit der graduellen Erhöhung der Umgebungstemperatur (Balasubramanian et al., 2006; Kumar und Wigge, 2010). Durch Mutagenese einer Population von HSP70::LUC-Pflanzen und anschließender Temperaturinduktion konnten in Pflanzen mit erhöhter Luciferaseaktivität Kernkomponenten der Temperaturwahrnehmung identifiziert werden, darunter ACTIN RELATED PROTEIN 6 (ARP6) (Kumar und Wigge, 2010). ARP6 ist ein Blührepressor, der auf FLC wirkt (Choi et al., 2005) und Teil eines Chromatinmodifizierenden Komplexes, der für den Einbau der Histonvariante H2A.Z anstelle von H2A in die Nucleosomen verantwortlich ist. Mutationen in ARP6 führen zu verfrühtem Blühen im KT und zu einem Phänotyp, welcher dem gleicht, der bei erhöhter Temperatur ausgebildet wird. H2A.Z Histone sorgen für eine sehr dichte Packung des Chromatins, so dass Loci, die diese Histonvariante enthalten, schlechter von RNA Pol II abgelesen werden können. Eine Analyse temperaturabhängiger Loci ergab, dass diese H2A.Z-Histone enthalten, welche jedoch mit Erhöhung der Temperatur entfernt und durch H2A ersetzt werden, was die Expression der betreffenden Gene ermöglicht. Diese Regulation auf Chromatinebene führt schließlich zur Ausbildung eines „Wärme-Transkriptoms“, das wesentlich durch ARP6 beeinflusst wird (Kumar und Wigge, 2010).

Zentral für die Blühinduktion bei erhöhter Umgebungstemperatur ist außerdem der Transkriptionsfaktor PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4). Die Mutante *pif4-101* zeigt keinen frühen Blühphänotyp im KT bei 27 °C (Kumar et al., 2012). Außerdem weist sie kein

verlängertes Hypokotyl auf, wie es Wt-Pflanzen bei 27 °C im KT zeigen (Koini et al., 2009). PIF4 bindet an den Promotor von *FT*, welches auch bei erhöhter Umgebungstemperatur maßgeblich an der Blühinduktion beteiligt ist. Die Bindestelle ist jedoch bei kühleren Temperaturen mit H2A.Z-Nucleosomen besetzt, die erst bei warmen Temperaturen abnehmen und so die PIF4-abhängige Transkription von *FT*, unabhängig von CO, ermöglichen (Kumar et al., 2012). Da PIF4 außerdem durch die innere Uhr und diverse andere Parameter auf transkriptioneller, post-translationeller und Chromatinebene reguliert wird, und seinerseits eine ganze Reihe von Faktoren der pflanzlichen Entwicklung beeinflusst (eine Übersicht liefern Proveniers und van Zanten, 2013 sowie Franklin et al., 2014), wird der Transkriptionsfaktor als zentraler Integrator von Temperatursignalwegen in *Arabidopsis* angesehen.

Der bereits erwähnte Blührepressor FLC scheint ebenfalls eine Rolle in der temperaturabhängigen Blühregulation zu spielen. Ökotypen mit funktionellen *FRI/FLC*-Allelen reagieren sehr viel schwächer auf eine erhöhte Umgebungstemperatur von 27 °C als Ökotypen mit *fri/flc*-Mutationen (Balasubramanian et al., 2006). FLC reprimiert also die thermale Induktion des Blühens. Ein anderer Blührepressor, SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), scheint jedoch noch eine größere Rolle in diesem Zusammenhang zu spielen. Bei SVP handelt es sich analog zu FLC ebenfalls um einen MADS-Box Transkriptionsfaktor, der die Blühinduktion durch Bindung an CARG-Motive in den Promotoren der Blühaktivatoren *FT* und *SOC1* reprimiert (Hartmann et al., 2000; Lee et al., 2007). Mittels Co-Immunoprecipitation konnte gezeigt werden, dass FLC und SVP auf Proteinebene einen Repressorkomplex bilden und so gemeinsame Zieltranskripte regulieren (Li et al., 2008). Die Mutante *svp-32* besitzt einen temperaturinsensitiven frühen Blühphänotyp.

Für die temperaturabhängige Steuerung der Blühinduktion über SVP ist dessen Interaktion mit dem MADS-Box Transkriptionsfaktor FLOWERING LOCUS M (FLM) verantwortlich (Scortecci et al., 2003; Posé et al., 2013; Lee et al., 2013). Vom *FLM*-Transkript existieren im Ökotyp Columbia zwei Splicevarianten, *FLM-β* und *FLM-δ*, deren Bildung temperaturabhängig gesteuert wird (Abb. 2.4). Bei kühleren Temperaturen überwiegt die Splicevariante *FLM-β*, die aufgrund ihrer Domänenstruktur als Blührepressor wirkt, während bei warmen Temperaturen die Bildung von *FLM-β* stark vermindert wird und der Transkriptpool zum Großteil aus *FLM-δ* besteht, welches als Aktivator fungiert (Balasubramanian et al., 2006; Severing et al., 2012).



Abb. 2.4: Intron/Exon-Struktur der beiden Varianten *FLM-β* und *FLM-δ*

Die Variante *FLM-β*, die als Repressor aktiv ist, enthält Exon 2. Die Variante *FLM-δ*, die nicht als Repressor aktiv ist, enthält Exon 3.

Beide Isoformen können mit SVP interagieren, wobei der Komplex SVP/FLM- $\beta$ , der als aktiver Blührepressor wirkt, bei warmen Temperaturen stark reduziert wird. Zusätzlich verringert sich auch die Stabilität des SVP-Proteins bei warmen Temperaturen, so dass die Blühinduktion ausgelöst wird (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013). Die temperaturabhängige Regulation alternativer Splicevarianten eines Transkripts ist somit ein eleganter Mechanismus, um die Blühinduktion in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur zu steuern.

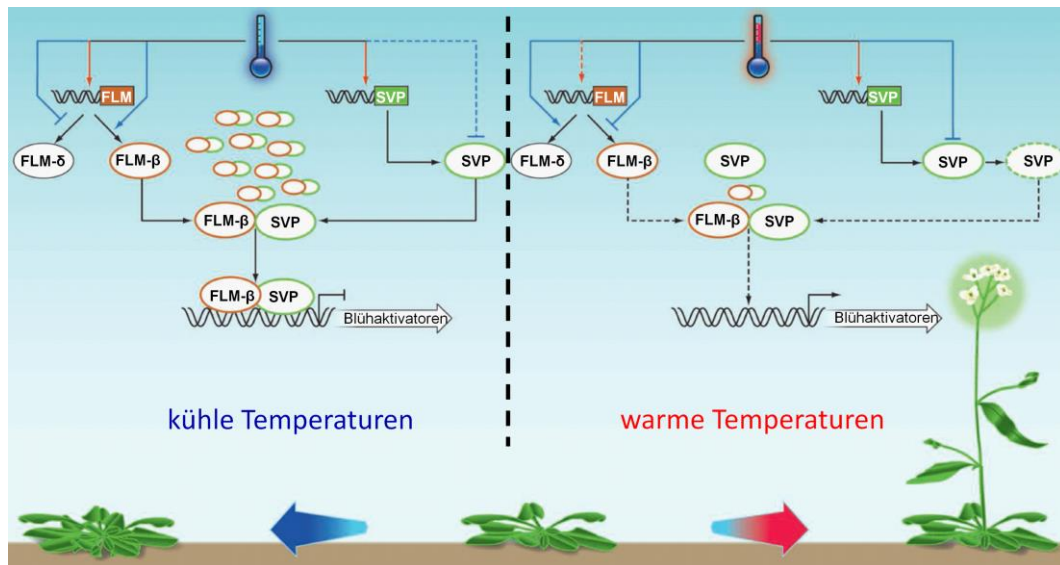


Abb. 2.5: Schema der temperaturabhängigen Blühinduktion (verändert nach Nilsson, 2013)

Bei kühlen Temperaturen (links) akkumuliert SVP/FLM- $\beta$  und reprimiert die Blühaktivatoren. Bei warmen Temperaturen (rechts) sinkt die Konzentration von SVP/FLM- $\beta$  und die Blüte wird induziert. Rote Linien zeigen transkriptionelle Regulation, blaue Linien zeigen post-transkriptionelle Regulation (FLM) bzw. Regulation der Proteinstabilität (SVP).

Auch zwei Komponenten des autonomen Signalwegs, die Proteine FVE und FCA, sind mit der temperaturabhängigen Blühinduktion in Verbindung gebracht worden (Blázquez et al., 2003). Mutationen in *FVE*, *FCA* und *ARP6* sind epistatisch zueinander (Blázquez et al., 2003; Martin-Trillo et al., 2006), was die Möglichkeit eröffnet, dass FVE und FCA über *ARP6* die Verteilung der Histonvariante H2A.Z beeinflussen könnten und so den Blühzeitpunkt kontrollieren.

Die Umgebungstemperatur hat zudem einen großen Einfluss auf die innere Uhr von *Arabidopsis*, deren Komponenten wiederum vor allem über den photoperiodischen Signalweg in die Blühinduktion eingreifen. Temperatur beeinflusst dabei über zwei Mechanismen die innere Uhr. Zum einen beeinflusst die Temperatur den endogenen Rhythmus von Uhr-Transkripten („entrainment“), zum anderen können Uhr-Transkripte ihren Rhythmus jedoch über eine weite Spanne von Temperaturen beibehalten (Temperaturkompensation). Während das thermale entrainment der Uhr vor allem über EARLY FLOWERING 3 (ELF3) wirkt (Thines und Harmon, 2010), spielen für die Temperaturkompensation PSEUDORESPONSE REGULATOR 7 und 9 (PRR7/9) sowie CIRCADIAN CLOCK

ASSOCIATED 1 (CCA1) und LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) eine entscheidende Rolle (Portoles und Mas, 2010; Salomé et al., 2010).

## 2.7 Der altersabhängige Signalweg der Blühinduktion

Pflanzen sind nicht von Beginn ihres Wachstums an in der Lage, auf blühstimulierende Signale zu reagieren. Diese sog. juvenile Phase, in der ausschließlich vegetatives Wachstum vorherrscht, ist besonders bei perennierenden Pflanzen ausgeprägt und kann z.B. bei Bäumen viele Jahre oder sogar Jahrzehnte betragen. Auch *Arabidopsis* weist eine, wenn auch entsprechend kurze, juvenile Phase auf, in der die Pflanze nicht auf Blühstimuli reagiert. Sie ist durch die Bildung kurzer, rundlich-eiförmiger Blätter gekennzeichnet, die nur auf der adaxialen Seite Trichome aufweisen. Mit zunehmendem Alter weisen die später gebildeten Blätter die typisch lanzettliche Form mit gesägten Blatträndern auf und besitzen auch auf der abaxialen Blattseite Trichome (Telfer et al., 1997). In diesem Zustand hat die Pflanze ein Alter erreicht, in dem sie unter induzierenden Bedingungen das reproduktive Wachstum einleitet. Der diesem altersabhängigen Signalweg zugrunde liegende Mechanismus wird im Wesentlichen durch die Aktivität zweier microRNAs (miRNAs) reguliert. Bei miRNAs handelt es sich um kleine 21-22 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die spezifisch an ihre Ziel-mRNA binden und so transkriptionelle als auch translationelle Kontrolle ausüben können. Zuerst in *C. elegans* entdeckt, wurden sie bald darauf auch in Pflanzen beschrieben (Reinhart et al., 2000, 2002). Sie entstehen aus doppelsträngigen Vorläuferstrukturen über eine Reihe von Prozessierungsschritten (Xie et al., 2010).

In der Blühinduktion kommt der sequenziellen Expression von miR156 und miR172 besondere Bedeutung zu. Die Expression von miR156 ist besonders in Keimlingen und jungen Pflanzen hoch und nimmt immer weiter ab, je älter die Pflanze wird (Wang et al., 2009). Konstitutive Überexpression von miR156 führt zu einem verspäteten Blühzeitpunkt, die gebildeten Blätter weisen juvenile Merkmale auf (Schwab et al., 2005; Wu und Poethig, 2006). Ein hoher Level von miR156 scheint also für die Aufrechterhaltung des juvenilen Zustandes nötig. Zu ihren Zieltranskripten gehört die große Familie der SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL) Transkriptionsfaktoren, von denen 11 direkt durch miR156 beeinflusst werden (eine umfassende Übersicht liefern Huijser und Schmid (2011)) und die als Aktivatoren der Blühinduktion wirken, deren Expression mit dem Alter der Pflanze zunimmt. Keiner der bekannten anderen Signalwege der Blühinduktion beeinflusst die Expression der miR156 und auch die Phytohormone GA und Auxin zeigen keinen Effekt auf ihre Abundanz (Wang et al., 2009). Die Regulation der miR156 scheint also strikt altersabhängig zu sein und über bisher nicht identifizierte Faktoren zu verlaufen.

Im Gegensatz zum abnehmenden Level der miR156 nimmt der Level der miR172 mit steigendem

Pflanzenalter immer mehr zu (Abb. 2.6). MiR172 wird durch den photoperiodischen Signalweg in einem CO-unabhängigen Prozess kontrolliert, der durch GI vermittelt wird (Jung et al., 2007), sowie direkt durch den Transkriptionsfaktor SPL9 (Wu et al., 2009). Zu den Genen, die durch miR172 reguliert werden, gehören die APETALA2-ähnlichen Gene *AP2*, TARGET OF EAT 1-3 (*TOE1-3*), SCHLAFMÜTZE (*SMZ*), SCHNARCHZAPFEN (*SNZ*) sowie TEMPRANILLO1 und 2 (*TEM1*, *TEM2*), bei denen es sich sämtlich um Blührepressoren handelt (Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010).

Eine miR172-Überexpressionsmutante blüht konsequenterweise extrem früh (Aukerman und Sakai, 2003). MiR172 verhält sich also sowohl im Expressionsverhalten als auch bei den regulierten Zieltranskripten antagonistisch zu miR156. Durch die sequentielle Abfolge ihrer Expression definieren sie daher einen eigenen, altersabhängigen Signalweg der Blühinduktion.

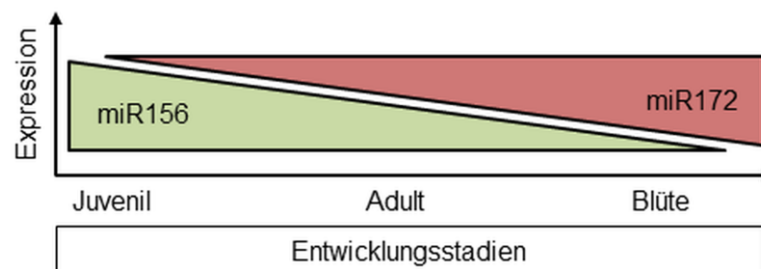


Abb. 2.6: Zeitliche Abfolge in der Expression von miR156 und miR172 im altersabhängigen Signalweg. Während der juvenilen Phase ist die Expression von miR156 hoch. Über den Entwicklungszeitraum nimmt sie immer weiter ab, gleichzeitig steigt die Expression der miR172, die in der Blühinduktion ihren Höchststand erreicht.

## 2.8 Integrioren der Blühsignalwege

Die Untersuchung der Blühregulation in *Arabidopsis* führte wie oben beschrieben zur Identifizierung einer ganzen Reihe von Signalwegen, die alle das Ziel haben, die Blütenbildung der Pflanze nur dann auszulösen, wenn für die Reproduktion günstige Umweltbedingungen vorherrschen. Obwohl die Wirkung vieler Komponenten auf genetischer Ebene voneinander getrennt werden kann, wird doch immer mehr deutlich, dass zwischen den einzelnen Signalwegen ein kompliziertes Netzwerk gegenseitiger Regulation besteht. Um die Blütenbildung koordiniert auslösen zu können, münden jedoch alle bekannten Signalwege in der Regulation eines überschaubaren Sets von Regulatorproteinen, den Blühintegratoren FT, SOC1 und LEAFY (LFY), für die sich der Terminus „floral pathway integrators“ durchgesetzt hat.

Wie bereits beschrieben, wird *FT* durch den photoperiodischen Signalweg über CO reguliert. Auch der altersabhängige Signalweg mit seinen AP2-Domänen-Transkriptionsfaktoren reguliert *FT* (Castillejo und Pelaz, 2008; Mathieu et al., 2009). Schließlich wird *FT* auch durch FLC und SVP

reguliert, womit also auch Vernalisierung, der autonome Signalweg und der thermosensorische Signalweg in die Regulation integriert werden (Helliwell et al., 2006; Lee et al., 2007).

FT wurde durch den extrem frühen Blühphänotyp bei Überexpression als prominenter Blühregulator identifiziert (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Die molekulare Funktion des Proteins ist nicht genau bekannt. Zwar ähnelt es Raf-Kinase-Inhibitoren und Phosphatidyl-Ethanolamid-Bindeproteinen, es fehlen jedoch wichtige konservierte Seitenketten (Ahn et al., 2006). Detaillierte Transkriptanalysen zeigen, dass *FT* vor allem im LT mit einem Expressionsmaximum am Abend in Phloem-Geleitzellen exprimiert wird (Harmer et al., 2000; Suárez-López et al., 2001; Takada und Goto, 2003). *FT* wirkt jedoch nicht in Blättern, sondern interagiert mit dem Transkriptionsfaktor *FD*, der spezifisch im Sprossapikalmeristem (SAM) exprimiert wird (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). Dort sorgt der Komplex dafür, dass die Blütenbildung in Gang gesetzt wird. Da lange bekannt ist, dass die Blühinduktion über die Blätter wahrgenommen wird, die Blüten aber am SAM gebildet werden, wurde ein als „Florigen“ bezeichnetes mobiles Signal angenommen, welches die Blühinduktion von den Blättern zum SAM weiterleitet. Mit seiner Expression in Blättern und seiner Wirkung im SAM scheint *FT* dieses Florigen oder mindestens ein Teil davon zu sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine ganze Reihe von Hinweisen, dass das *FT*-Protein von den Blättern über das Phloem zum SAM transportiert wird (Corbesier et al., 2007; Jaeger und Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007; Notaguchi et al., 2008).

*SOC1* ist ein MADS-Box Transkriptionsfaktor, der von CO reguliert wird und dessen Mutation eine Verspätung des Blühzeitpunkts bewirkt (Borner et al., 2000; Samach et al., 2000). *SOC1* ist ein Zielgen des GA-Signalwegs und des altersabhängigen Signalwegs (Moon et al., 2003; Wang et al., 2009). Auch der Blührepressor *FLC* bindet direkt an *SOC1* Chromatin (Helliwell et al., 2006). *SOC1* benötigt für seine Funktion den Transkriptionsfaktor *AGAMOUS LIKE 24* (*AGL24*). Beide Proteine regulieren wechselseitig ihre Expression und bilden Heterodimere (Yu et al., 2002; Liu et al., 2008a; Lee et al., 2008).

Dem Protein *LFY* kommt schließlich eine Doppelrolle zu. Es ist sowohl ein „floral pathway integrator“, spielt jedoch auch in der Entwicklung der Blütenorgane eine wichtige Rolle, was auch zu seiner Identifizierung führte (Weigel et al., 1992). Erst später stellte sich heraus, dass *LFY* auch eine Funktion in der Integration von Blühsignalen erfüllt. Die Überexpression von *LFY* hat einen späten Blühphänotyp zur Folge (Blázquez et al., 1997; Weigel und Nilsson, 1995). Die Expression wird durch *SOC1* und den GA-Signalweg reguliert (Blázquez et al., 1998; Lee et al., 2008).

Die Blütenbildung wird schließlich eingeleitet über die „floral meristem identity“ Gene, zu denen *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *LFY* gehören und die Aktivität homöiotischer Gene wie *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*), *AGAMOUS* (*AG*) und *SEPALATA 3* (*SEP3*). Diese bestimmen letztlich



die Organidentität in den einzelnen Wirteln der Blüte nach dem „ABCE-Modell“ der Blütenbildung. Eine detaillierte Übersicht über diesen Prozess liefern Wagner (2009) sowie Liu und Mara (2010).

## 2.9 Die RNA-Bindeproteine *AtGRP7* und *AtGRP8*

In *Arabidopsis* konnten bei der Suche nach circadian regulierten Transkripten zwei rhythmisch exprimierte RBPs, ARABIDOPSIS THALIANA GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7 und 8 (*AtGRP7* und *AtGRP8*), aufgrund ihrer Homologie zu den in *Sinapis alba* identifizierten Proteinen *SaGRP1* und *SaGRP2* gefunden werden (Heintzen et al., 1994, 1997). Beide wurden zuvor bereits als Proteine beschrieben, deren Transkripte durch Kälte induziert werden und dementsprechend als COLD AND CIRCADIAN REGULATED 1 und 2 (CCR1 = *AtGRP8*; CCR2 = *AtGRP7*) bezeichnet (van Nocker und Vierstra, 1993; Carpenter et al., 1994). Sie weisen im N-terminalen Bereich jeweils ein RNA RECOGNITION MOTIF (RRM) auf, während der C-terminale Bereich überwiegend aus glycinreichen Wiederholungen besteht. Im RRM befinden sich zwei RIBONUCLEOPROTEIN CONSENSUS SEQUENCES (RNPs), die mit ihrer konservierten Struktur für die RNA-Bindung sorgen (Lorković und Barta, 2002). Arginin 49 im RNP1 von *AtGRP7* konnte als essentiell für die Bindung an RNA identifiziert werden (Schöning et al., 2007).

Die Transkription der Gene unterliegt circadianer Kontrolle und erreicht ihr Konzentrationsmaximum acht bis zwölf Stunden nach dem subjektiven Tagesbeginn. Zwei minimale Promotorelemente, die für die rhythmische Expression von *AtGRP7* verantwortlich sind, konnten durch Deletionsanalysen identifiziert werden (Staiger und Apel, 1999). Außerdem enthält der Promotor ein EVENING ELEMENT-Motiv (Harmer et al., 2000). Die Transkription wird während des Tages vermutlich durch CCA1 und LHY gehemmt (Wang und Tobin, 1998; Schaffer et al., 1998). *AtGRP7* unterliegt einer negativen Autoregulation, was durch konstitutive Überexpression von *AtGRP7* (*AtGRP7-ox*) bewiesen werden konnte, denn diese Pflanzen zeigten ein stark vermindertes Level des endogenen *AtGRP7* Transkriptes. Diese Regulation findet nicht über den Promotor statt, wie eine Fusion des GUS-Reportergens mit dem Promotor von *AtGRP7* zeigt, denn dieses Konstrukt oszilliert auch weiterhin in *AtGRP7-ox* Pflanzen. Vielmehr bindet *AtGRP7* bei ansteigender Konzentration während des Tages sein eigenes Transkript, was zur bevorzugten Verwendung einer kryptischen 5'-Splicesite im ersten Intron führt. Dadurch entsteht ein vorzeitiges Stopcodon, wodurch es schließlich zum Abbau über den „nonsense-mediated decay-Pathway“ (NMD) kommt (Abb. 2.7). In gleicher Weise findet auch eine negative Kreuzregulation auf post-transkriptioneller Ebene zwischen *AtGRP7* und *AtGRP8* statt (Staiger et al., 2003a; Schöning et al., 2007, 2008). Die rhythmische Expression sowie der Mechanismus der wechselseitigen Regulation sind durch ein mathematisches Modell beschrieben

worden (Schmal et al., 2013). Die Bindung des eigenen Transkripts durch das Protein konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Schüttpelz et al., 2008; Streitner et al., 2012).

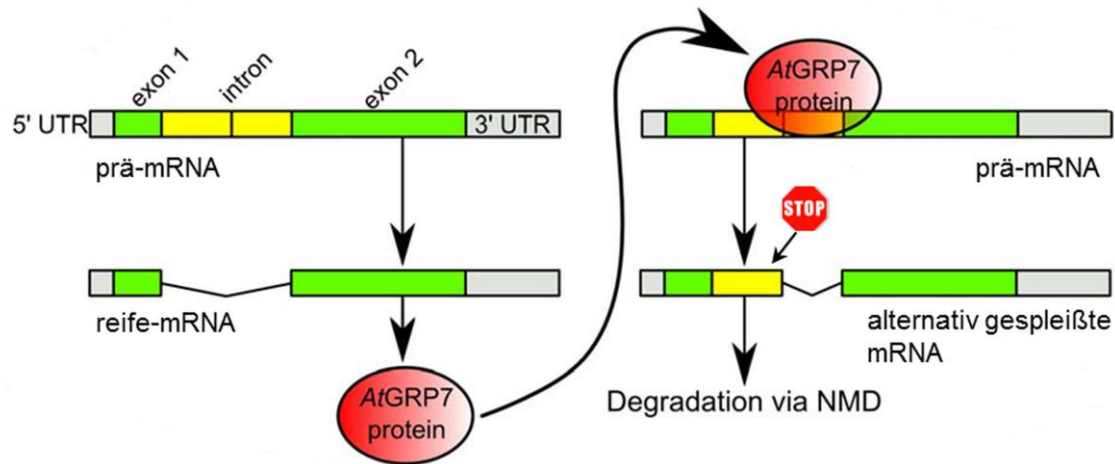


Abb. 2.7: Mechanismus der Autoregulation von AtGRP7 durch alternatives Splicing

Die *AtGRP7* prä-mRNA besteht aus zwei Exons (grün), einem Intron (gelb) und den 5'- und 3'-UTRs (grau). Aus der reifen RNA, bei der das Intron komplett gespleißt wird, kann funktionelles Protein translatiert werden. *AtGRP7* bindet seine prä-mRNA und induziert alternatives Splicing, bei dem ein Teil des Introns mit einem vorzeitigen Stoppcodon in der reifen mRNA verbleibt. Diese Splicevariante produziert kein funktionelles Protein und wird über den „NMD-Pathway“ abgebaut (Abbildung verändert nach Schmal et al., 2013).

*AtGRP7* reguliert eine ganze Reihe von rhythmischen und nicht rhythmischen Zieltranskripten und beeinflusst das alternative Splicing von mRNAs (Streitner et al., 2010, 2012). Es ist Ziel des bakteriellen Effektorproteins HopU1 des Pflanzenpathogens *Pseudomonas syringae* und beeinflusst die pflanzliche Immunabwehr sowohl über Salizylsäure-abhängige als auch -unabhängige Signalwege (Fu et al., 2007; Hackmann et al., 2014). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Rolle, die *AtGRP7* in der Blühinduktion einnimmt. *AtGRP7-ox* Pflanzen zeigen Merkmale eines verfrühten Blühphänotyps, während die T-DNA Mutante *atgrp7-1* gegenüber dem Wt verspätet blüht. Dieser Effekt ist besonders im KT ausgeprägt und ist zurückzuführen auf ein verändertes Expressionslevel des Blührepressors *FLC*. Das Allel *flc-3* hebt den späten Blühzeitpunkt auf. Die Reaktion auf Vernalisierung ist intakt und *CO* zeigt in *atgrp7-1* keine Veränderungen der Transkriptionszillation (Streitner et al., 2008). In *AtGRP7-ox* ist die Akkumulation bioaktiver GA-Isoformen verringert. Da die Pflanzen trotzdem mit weniger Blättern blühen als der Wt, scheint der GA-unabhängig wirkende blühfördernde Effekt von *AtGRP7* dies zu kompensieren (Löhr et al., 2014). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das RBP *AtGRP7* möglicherweise im autonomen Signalweg der Blühinduktion eingeordnet werden kann. Kürzlich konnte jedoch ein Effekt der Überexpression von *AtGRP7* auf die Prozessierung einer definierten Zahl von pri-miRNAs nachgewiesen werden. Darunter befindet sich auch die pri-miR172b, so dass es in *AtGRP7-ox* zu einer verringerten Expression der reifen miR172 kommt (Köster et al., 2014a). Es ist daher möglich, dass die Funktion

von *AtGRP7* nicht auf einen einzelnen definierten Signalweg in der Blühinduktion begrenzt ist, sondern multiple Aspekte der Blühinduktion beeinflusst werden.

## 2.10 Zielsetzung

Das RBP *AtGRP7* beeinflusst die Blühinduktion von *Arabidopsis*. Die T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1* weist einen moderat verspäteten Blühzeitpunkt und damit einhergehend eine erhöhte Expression des Blührepressors *FLC* auf. Die konstitutive Überexpression von *AtGRP7* führt zu einer Verringerung des *FLC*-Levels und einem Phänotyp, der sich durch eine geringe Anzahl an Rosettenblättern zum Zeitpunkt der Blüte auszeichnet. Das Protein wurde als ein Aktivator in der Blühinduktion beschrieben, dessen Eigenschaften denen anderer Proteine im autonomen Signalweg der Blühinduktion ähnlich sind (Streitner et al., 2008).

In dieser Arbeit soll die Funktion von *AtGRP7* im komplexen Netzwerk der Blühregulation von *Arabidopsis* genau eingeordnet werden. Einen Schwerpunkt bildet dabei die Erzeugung und Analyse von Doppelmутanten, um genetische Interaktionen von *AtGRP7* mit den Schlüsselkomponenten des photoperiodischen Signalwegs und des autonomen Signalwegs der Blühinduktion zu untersuchen. Auch für das Funktionsparalog *AtGRP8* soll eine Einordnung in die Blühzeitpunktregulation vorgenommen werden.

Des Weiteren soll der Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Expression des Proteins *AtGRP7* aufgeklärt werden. Es soll untersucht werden, ob Pflanzen ohne funktionelles *AtGRP7* oder mit konstitutiver Überexpression von *AtGRP7* mit Veränderungen in ihrem Blühverhalten auf unterschiedliche Temperaturen reagieren. Damit soll aufgeklärt werden, ob *AtGRP7* an der pflanzlichen Temperaturwahrnehmung beteiligt ist, bzw. ob das Protein in den temperaturabhängigen Signalweg der Blühinduktion eingeordnet werden kann.

Besonders die konstitutive Überexpression von *AtGRP7* führt zu dramatischen Veränderungen im Wuchsphänotyp von *Arabidopsis*. Durch den Einsatz der automatisierten Phänotypisierungsplattform „GrowScreen Fluoro“ sollen die Auswirkungen unterschiedlicher Expression von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf den Phänotyp der Pflanzen während der vegetativen Entwicklungsphase beobachtet und quantifiziert werden. So soll geklärt werden, ob die Funktion der beiden Proteine auf Aufgaben in der Blühinduktion beschränkt ist, oder ob sie auch an Regulationswegen der vegetativen pflanzlichen Entwicklung beteiligt sind.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete *Arabidopsis* Genotypen und ihre molekulargenetische Identifizierung

##### 3.1.1 *AtGRP7* und *AtGRP8* Überexpressionslinien

Die *AtGRP7*-ox Linien D, G und 23c zeigen konstitutive, ektopische Überexpression von *AtGRP7*. Die kodierende Region von *AtGRP7* wurde in den Vektor Bin19 kloniert und steht unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors mit doppeltem Enhancer (Heintzen et al., 1997). Die Identifizierung der Linien erfolgt über die durch das Konstrukt vermittelte Kanamycinresistenz oder die Quantifizierung der Überexpression im Immunoblot.

Die *AtGRP8*-ox Linien 26a4, 2b/4a und 3/4c weisen eine Überexpression von *AtGRP8* ebenfalls unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors auf (Schöning et al., 2008). Der eingesetzte Vektor ist in diesem Fall HPT, der zusätzlich eine Hygromycinresistenz vermittelt, über die die Pflanzen identifiziert werden können. Der Grad der Überexpression kann mittels Immunoblot quantifiziert werden.

##### 3.1.2 Die Linien *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*

Die Linie *atgrp7-1* (SALK\_039556) trägt eine T-DNA Insertion im 5'-UTR von *AtGRP7* (Fu et al., 2007). Die Pflanzen zeigen keine detektierbare *AtGRP7*-RNA und kein detektierbares Protein. Das Proteinniveau von *AtGRP8* ist in *atgrp7-1* erhöht. Die Identifizierung der T-DNA erfolgte mittels der Primerkombination *AtGRP7F1* und *LbB1*. Das Wt-Allel wurde mit der Primerkombination *AtGRP7F1* und *AGRP54* detektiert. Die Mutante *atgrp7-1* wurde von James Alfano zur Verfügung gestellt.

Um dem erhöhten Niveau von *AtGRP8* in *atgrp7-1* entgegen zu wirken, wurde *atgrp7-1* mit der RNA Interferenz (RNAi) Linie *AtGRP8i-l71* gekreuzt, die ein RNAi Konstrukt gegen *AtGRP8* exprimiert. In beiden erhaltenen Linien *atgrp7-1 8i* 6.1 und *atgrp7-1 8i* 9.9 sind die *AtGRP8* Level reduziert (Streitner et al., 2008, 2012). Der Nachweis des RNAi-Konstrukts erfolgte über die vermittelte BASTA-Resistenz.

In einigen Abbildungen im Ergebnisteil wird *atgrp7-1 8i* 6.1 mit 6.1 abgekürzt, analog dazu wird *atgrp7-1 8i* 9.9 mit 9.9 abgekürzt.

##### 3.1.3 Mutationen in der photoperiodischen Blühinduktion: *co-9* und *gi-2*

Die Mutante *co-9* (SAIL 24 H04) trägt eine T-DNA Insertion in *CO* (Balasubramanian et al., 2006) und wurde von Detlef Weigel zur Verfügung gestellt. Das T-DNA Allel wurde mit der Primerkombination *LeftBorder* und *CO\_183* nachgewiesen. Das Wt-Allel wurde mit den Primern *CO\_183* und *CO\_469*

detektiert. Die Pflanzen tragen außerdem eine BASTA-Resistenz. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 co-9* erhalten. Durch Transformation mit dem *AtGRP7-ox* Konstrukt wurden die Mutanten *AtGRP7-ox co-9* erhalten.

Die Mutante *gi-2* weist eine 8 bp Deletion in Exon 4 von *GI* auf. Dieses Allel zeigt unter zahlreichen weiteren *gi*-Allelen einen der stärksten Effekte auf den Blühzeitpunkt auf (Rédei, 1962; Fowler et al., 1999). Die Identifikation erfolgte mittels PCR mit den Primern *gi-2\_genot\_for* und *gi-2\_genot\_rev*. Die Mutante wurde vom Arabidopsis Biological Resource Center bezogen. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 gi-2* und *atgrp7-1 8i gi-2* erzeugt.

### 3.1.4 Mutationen des autonomen Signalwegs: *fca-9*, *flk-1*, *fpa-3* und *fld-3*

Die Mutante *fca-9* weist eine durch Ethylmethansulfonat (EMS) generierte Punktmutation auf, die zu einem trunkierten Protein führt (Page et al., 1999). Die Identifizierung der Mutation erfolgte mittels dCAPS-Primern wie beschrieben (Liu et al., 2007). Das PCR-Produkt aus *fca-9* besitzt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Syl*, wodurch es vom *Wt*-Allel nach Restriktionsverdau unterschieden werden kann. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1 8i* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 8i fca-9* erzeugt. Die Mutante *fca-9* wurde von Caroline Dean zur Verfügung gestellt.

Die Mutante *flk-1* (SALK\_112850) weist eine T-DNA Insertion in Intron 1 von *FLK* auf (Lim et al., 2004). Die T-DNA in *FLK* wurde durch PCR-Amplifikation mit der Primerkombination *FLK+* und *LBB1* nachgewiesen. Entsprechend wurde das *Wt*-Allel von *FLK* mit der Primerkombination *FLK+* und *FLK-rev* detektiert. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 flk-1* und *atgrp7-1 8i flk-1* erzeugt. Die Mutante *flk-1* wurde vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) bezogen.

Die spätblühende Mutante *fpa-3* wurde durch  $\gamma$ -Bestrahlung erzeugt, wodurch es zu einer 1 bp Deletion in Exon 6 kam (Hornyik et al., 2010a; Meier et al., 2001). Durch den Einsatz der dCAPS Primer *FPA\_mut\_for* und *FPA\_mut\_rev* wird in die *Wt*-Sequenz eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AluI* eingefügt, die in der Sequenz von *fpa-3* nicht vorkommt. Beide Sequenzen enthalten jedoch noch eine weitere Schnittstelle für *AluI*, so dass das Amplifikat aus *FPA* zweimal von *AluI* geschnitten wird, das Amplifikat aus *fpa-3* nur einmal (G. Simpson, persönliche Mitteilung). Durch Kreuzung mit *atgrp7-1 8i* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 8i fpa-3* erzeugt. Die Mutante *fpa-3* wurde von Gordon Simpson zur Verfügung gestellt.

Bei *fld-3* handelt es sich um eine spätblühende Mutante mit einer T-DNA Insertion im 3'-Bereich von Exon 1 von *FLD* (He et al., 2003). Der Nachweis der T-DNA erfolgte mittels PCR mit der Primerkombination *fld-3\_genot\_rev* und *LBB1*. Das *Wt*-Allel von *FLD* wurde mit den Primern *fld-3\_genot\_for* und *fld-3\_genot\_rev* nachgewiesen. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*

wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 fld-3* und *atgrp7-1 8i fld-3* erzeugt. Die Mutante *fld-3* wurde von Richard Amasino zur Verfügung gestellt.

### 3.1.5 Mutationen bei Blührepressoren: Die Allele *flc-3*, *flm-3* und *svp-41*

Die Mutante *flc-3* ist durch „fast neutron“ Mutagenese entstanden und trägt eine Deletion von 104 bp in Exon 1, die zum Verlust des Startcodons führt (Michaels und Amasino, 1999). Nach einer PCR mit den Primern FLC\_up ATG und FLC\_down ATG kann das *flc-3* Allel aufgrund des Größenunterschieds leicht vom Wt-Allel unterschieden werden. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox G* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 flc-3*, *atgrp7-1 8i flc-3* und *AtGRP7-ox G flc-3* erzeugt. Die Mutante *flc-3* wurde von Richard Amasino zur Verfügung gestellt.

Die T-DNA Mutante *flm-3* (SALK\_141971C) enthält eine T-DNA Insertion in Exon 4 des MADS Box Transkriptionsfaktors FLM (Balasubramanian et al., 2006). Der Nachweis der T-DNA erfolgte mit der Primerkombination *flm-3\_genot\_rev* und *LBB1.3*. Das Wt-Allel ohne T-DNA Insertion wurde mit der Primerkombination *flm-3\_genot\_for* und *flm-3\_genot\_rev* nachgewiesen. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wurden die Doppelmutanten *atgrp7-1 flm-3* und *atgrp7-1 8i flm-3* erzeugt. Die Mutante *flm-3* wurde vom NASC bezogen.

Die Mutante *svp-41* trägt eine Deletion von 2 bp in *SVP*, die das Ergebnis einer Exzision eines EN-1 Transposons ist. Durch die Deletion kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Das resultierende Protein weist eine Länge von 68 Aminosäuren auf (Hartmann et al., 2000). Durch die Deletion wird eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NlaIV* in die Sequenz eingefügt. Nach Amplifikation mit den Primern *SVP\_I1\_for* und *SVP\_E2\_rev* konnte *svp-41* geschnitten werden, die Wt-Sequenz nicht. Durch Kreuzung mit *atgrp7-1 8i* wurde die Doppelmutante *atgrp7-1 8i svp-41* erzeugt. Die Mutante *svp-41* wurde von Peter Huijser zur Verfügung gestellt.

Eine Übersicht über alle zur Genotypisierung verwendeten Primerkombinationen gibt Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Zur Genotypisierung verwendete Oligonukleotid-Primer

Primer	AGI	Sequenz 5' → 3'	Anmerkungen
AtGRP7F(1)TDS	At2g21660	CGTGATATGTCCCCAACCACTACGA	Genotyping <i>atgrp7-1</i>
AGRP54	At2g21660	AGATGAACGTACCGATTTGGGA	Genotyping <i>atgrp7-1</i>
CO_183	At5g15840	GGTCTGCGAGTCATGTGAGC	Genotyping <i>co-9</i>
CO_469	At5g15840	GGAACAGCCACGAAGCAACC	Genotyping <i>co-9</i>
GSO379	At4g16280	TGTTGAGATGGTGAAACTGTG	Genotyping <i>fca-9</i> (Liu et al., 2007)
Rlfca9	At4g16280	TCTTTGGCTCAGCAAACC	Genotyping <i>fca-9</i> (Liu et al., 2007)
FLC_up ATG	At5g10140	TCGTCATGCGGTACACGTGG	Genotyping <i>flc-3</i>
FLC_down ATG	At5g10140	CGTACTTATCGCCGGAGGAG	Genotyping <i>flc-3</i>
fld-3_genot_for	At3g10390	AGGATCCGAACTATCGAGGT	Genotyping <i>fld-3</i>
fld-3_genot_rev	At3g10390	GTCAGACGCTAGCATCAACT	Genotyping <i>fld-3</i>
FLK+	At3g04610	CTGCACAGAAAGTGGGTAGCATC	Genotyping <i>flk-1</i>
FLK_rev	At3g04610	GGCCTGCTGGTTACTATATTCC	Genotyping <i>flk-1</i>
flm-3_genot_for	At1g77080	CGGAGAAACCTCAATGTTTTG	Genotyping <i>flm-3</i> (Posé et al., 2013)
flm-3_genot_rev	At1g77080	GGTTTTGTGGAGTAATTGGTTG	Genotyping <i>flm-3</i> (Posé et al., 2013)
FPA_mut_For	At2g43410	ATAATTGATTTATAGCCTGAGC	Genotyping <i>fpa-3</i>
FPA_mut_Rev	At2g43410	ATCATCTAATTTGGCAACACCCG	Genotyping <i>fpa-3</i>
gi-2_genot_for	At1g22770	TTCGGAGCAATGGGCTTTGG	Genotyping <i>gi-2</i>
gi-2_genot_rev	At1g22770	TGTTGGTGATCCAGCCTTAG	Genotyping <i>gi-2</i>
SVP_I1_for	At2g22540	GGACATACACACTTTCACAG	Genotyping <i>svp-41</i>
SVP_E2_rev	At2g22540	CTGTAACTCAAGAGATGGCT	Genotyping <i>svp-41</i>
LBb1		GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	left border SALK T-DNA Linien
LBb1.3		ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	left border SALK T-DNA Linien
left border SAIL		AAAACCACCCAGTACATTA AAAAC	left border SAIL T-DNA Linien

## 3.2 Pflanzenanzucht

### 3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Samen von *Arabidopsis* wurden auf Töpfe mit feuchter Anzuchterde aufgebracht und für drei Tage im Dunklen bei 4 °C im Kühlraum stratifiziert. Die weitere Anzucht erfolgte in Klimaschränken (Percival Scientific, USA) oder in Klimakammern im Kurztag (KT = 8 h Licht, 16 h Dunkel) oder im Langtag (LT = 16 h Licht, 8 h Dunkel) bei den jeweils angegebenen Temperaturen und einer rel. Luftfeuchtigkeit von 70 %. Nachdem die Pflanzen das erste echte Blattpaar gebildet hatten, wurden sie auf Töpfe mit gedüngter Erde (Mischung MPIZ Köln) vereinzelt (pikiert). Die Verteilung der Pflanzen in den Klimaschränken erfolgte nach dem Zufallsprinzip, um bei Blühversuchen Effekte einer evtl. vorhandenen inhomogenen Licht- und Temperaturverteilung auszugleichen.

### 3.2.2 Behandlung gegen Trauermückenlarven (*Bradysia paupera*)

Um einem Befall mit Trauermückenlarven vorzubeugen, wurden die Pflanzen auf Erde 2 Wochen nach dem Pikieren mit Nematoden der Art *Steinernema feltiae* behandelt. Dazu wurden einige Spatel Nematodenkultur (Katz Biotech AG) in 1 l lauwarmem Wasser gelöst und die Suspension mit einer

Spritzflasche auf die Töpfe verteilt. Die Behandlung wurde bei Auftreten von Fraßspuren an den Blättern der Pflanzen wiederholt.

### 3.2.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur auf Agarplatten

Die verwendeten Samen wurden durch Waschen mit 70 % Ethanol und Bleach-Lösung oberflächensterilisiert und anschließend für 3 bis 4 Tage bei 4 °C im Dunklen stratifiziert. Die sterilen Samen wurden auf ½ MS-Agar-Platten mit 0,5 g/l MES und 0,5 % Sucrose (Murashige und Skoog, 1962) ausplattiert. Die Selektion hygromycinresistenter Pflanzen erfolgte durch Zugabe von 30 mg/l Hygromycin B (Duchefa, Niederlande) in das Medium. Kanamycinresistente Pflanzen wurden durch Zugabe von 30 mg/l Kanamycin selektioniert. Pflanzen, die gegen das Herbizid Phosphinotricin resistent sind, wurden auf Erde durch Besprühen mit einer 0,2 mM Phosphinotricin-Lösung selektioniert. Für die Selektion von Pflanzen nach der Transformation mit Agrobakterien (Primärtransformanten) wurde zusätzlich das Breitbandantibiotikum Augmentan in einer Konzentration von 200 mg/l in das Medium gegeben, um ein Wachstum von Agrobakterien auf den Platten zu verhindern. Die Anzucht aller Pflanzen auf Agarplatten erfolgte in Klimaschränken im LT.

*Bleach*            6 % Natriumhypochlorit in H<sub>2</sub>O; 0,01 % Triton X-100

### 3.3 Bestimmung des Blühzeitpunktes bei *Arabidopsis thaliana*

Die Bestimmung des Blühzeitpunktes und die anschließende statistische Auswertung der Daten erfolgte wie beschrieben (Steffen et al., 2014). Zur Analyse des Blühzeitpunktes wurden die Rosettenblätter von Pflanzen im KT und im LT gezählt, wenn die Infloreszenz eine Höhe von 0,5 cm erreicht hatte. Zusätzlich wurde die Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur beginnenden Blüte als weiterer Parameter aufgenommen. Zur Ermittlung der Blattbildungsrate der untersuchten Linien wurde die Anzahl der Rosettenblätter über die gesamte Wachstumsperiode alle zwei bis drei Tage gezählt.

Die statistische Analyse hinsichtlich unterschiedlicher Blühzeitpunkte erfolgte mit dem Programm Statistica 8.0 (Statsoft, USA), nachdem zunächst die Rohdaten mit Microsoft Excel ausgewertet wurden. Für jede Linie wurde der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) von Blattzahl und Tagen bis zur Blüte berechnet. Die Werte wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mit dem Levene's Test auf die Homogenität der Varianzen überprüft. Waren diese gegeben, wurden die Daten mittels einer ANOVA (Analysis of Variance) auf signifikante Unterschiede geprüft und die einzelnen Linien mit dem Dunnett-Test oder einem Tukey-Test verglichen. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein H-Test nach Kruskal-Wallis als nichtparametrischer Test verwendet.



Als signifikant unterschiedlich wurden Werte betrachtet, deren Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  war.

### 3.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Um transgene Pflanzen zu erzeugen, die AtGRP7 unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors überexprimieren (Heintzen et al., 1997), wurden Pflanzen der T-DNA Insertionslinie *co-9* transformiert. Die Mutante *atgrp7-1* wurde zur Komplementation mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment von AtGRP7 inkl. 1,4 kb Promotorregion transformiert (Staiger und Apel, 1999). Um *atgrp7-1* mit einem AtGRP7-Konstrukt mit eingeschränkter RNA-Bindefähigkeit zu komplementieren, wurde ein 2,9 kb AtGRP7-Fragment mit einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 49 verwendet (Schöning et al., 2007).

Zur Transformation wurden Agrobakterien, die bereits mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert waren, zunächst als Vorkultur in 5 ml LB-Medium mit  $MgSO_4$  und den Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Rifampicin für 2 Tage bei einer Temperatur von 28 °C angezogen. Als Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft und die Bakterien bis zu einer  $OD_{600nm}$  von  $\sim 2,0$  bei 28 °C angezogen. Die Suspension wurde mit 500 ml Transformationsmedium vereint und die zuvor von unreifen Schoten und bereits aufgeblühten Blüten befreiten Pflanzen wurden für 1 min. in die Suspension getaucht („floral dip“, Clough und Bent, 1998).

<i>LB-Medium</i>	1 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
	0,05 % (w/v) $MgSO_4$

<i>Transformationsmedium</i>	$\frac{1}{2}$ MS-Medium
	5 % (w/v) Sucrose
	44 nM Benzylaminopurin
	200 $\mu$ l/l Silwet L-77

### 3.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Pflanzen von *A. thaliana* wurden direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Etwa 300 mg wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Tri-Reagenz versetzt und gründlich homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min. wurde die Suspension für 10 min. bei 4 °C und 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen

und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach Schütteln bei 1400 rpm für 3 min. erfolgte eine Zentrifugation für 15 min. bei 4 °C und 12000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und erneut mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol gewaschen. Die RNA wurde anschließend durch Versetzen mit Isopropanol für 20 min. bei Raumtemperatur gefällt, und durch Zentrifugation für 10 min. bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit –20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der Proben wurde mit einem NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) bestimmt und auf einen Wert von 1,1 µg/µl eingestellt.

*Tri-Reagenz*                    0,4 M Ammoniumthiocyanat  
    0,8 M Guanidinthiocyanat  
    4,35 % (w/v) Glycerin  
    0,1 M Natriumacetat; pH 5,2  
    38 % Phenol sauer (Roth)

### 3.6 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die isolierte RNA wurde mit dem SuperScript II Reverse Transcriptase-Kit (Invitrogen, USA) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden zunächst Verunreinigungen mit genomischer DNA durch Verdau mit RQ1 DNase (Promega, USA) beseitigt. Dafür wurde in einem 10 µl-Ansatz 2,2 µg RNA mit 2,2 µl RQ1 DNase und 1 µl 10x Puffer versetzt und für 50 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde pro Ansatz 1 µl RQ1-Stop Solution zugegeben und für 10 min. auf 65 °C erhitzt. 1 µl des Ansatzes wurde abgenommen und zu 19 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt, um per PCR den Erfolg des Verdaus überprüfen zu können. Für die reverse Transkription (RT) wurden 2 µg RNA mit 2 µl oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern versetzt und für 10 min. bei 70 °C inkubiert. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte die RT in folgendem Ansatz:

6 µl    5 x single strand buffer  
 2 µl    5 mM dNTP  
 2 µl    0,1 M DTT  
 0,4 µl RNase-Inhibitor (RiboLock, Fermentas)  
 2 µl    SuperScript II Reverse Transcriptase 1:1 in H<sub>2</sub>O

Die RT erfolgte für alle Proben exakt 60 min. bei 42 °C und wurde dann durch Erhitzen auf 95 °C für die Dauer von 5 min. abgestoppt. Die Ansätze wurden 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die RT wurde mittels PCR-Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens *PP2A* (At1g13320) auf Erfolg überprüft.

### 3.7 Quantitative real time PCR

Für die real time PCR wurden folgende kommerzielle Produkte jeweils nach Herstellerangabe verwendet: Real Master Mix Kit (5 Prime), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Kit (Fermentas), FastStart SYBR Green Master Mix (Roche), iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad). Die Detektion erfolgte mit Opticon DNA Engine Thermocycler (MJ Research) oder dem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Zur Auswertung wurde die PCR-Effizienz für jede Primerkombination mit dem Programm LinReg PCR (Ramakers et al., 2003) und anschließend die relative Transkriptmenge nach Normalisierung auf das Referenzgen *PP2A* berechnet (Pfaffl, 2001; Czechowski et al., 2004, 2005). Die verwendeten Primerkombinationen sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

Tab. 3.2: Oligonukleotid-Primer für quantitative real time PCR

Primer	AGI	Sequenz 5' → 3'	Anmerkungen
AGRP140	At2g21660	ACATCTCACTGCTCACTACTC	qRT-PCR <i>AtGRP7</i>
AGRP121	At2g21660	ATCGTTAATGATCTTGAATC	qRT-PCR <i>AtGRP7</i>
CO #2 For	At5g15840	CCTCAGGGACTCACTACAACGAC	qRT-PCR <i>CO</i>
CO #2 Rev	At5g15840	GGTCAGGTTGTTGCTCTACTGTCC	qRT-PCR <i>CO</i>
FCA for	At4g16280	CAC TCT CAC AGA ATG GCC GA	qRT-PCR <i>FCA</i>
FCA rev	At4g16280	GCA CAT AGC TCA CTG GTG TC	qRT-PCR <i>FCA</i>
FLC_295	At5g10140	CTTGTGGATAGCAAGCTTGTGGG	qRT-PCR <i>FLC</i> (Halliday et al., 2003)
FLC_417	At5g10140	CATGAGAGTTCGGTCTTCTTGGCTC	qRT-PCR <i>FLC</i> (Halliday et al., 2003)
FLD_2261	At3g10390	CTGTTTCAGCAGCTTCAGTCTC	qRT-PCR <i>FLD</i>
FLD_2370	At3g10390	TCATCACACCTCTGACTTCTC	qRT-PCR <i>FLD</i>
FLK_3999	At3g04610	CCAGAGCAGCAAGGCTATAAC	qRT-PCR <i>FLK</i>
FLK_4094	At3g04610	GCTGTAATCCGTAGCGTATCC	qRT-PCR <i>FLK</i>
FLM- $\beta$ _for	At1g77080	CATGCTGATGAACTTAGAGCCTTAGATC	qRT-PCR <i>FLM-<math>\beta</math></i> (Posé et al., 2013)
FLM- $\delta$ _for	At1g77080	GATAGAAGCGCTGTTCAAGC	qRT-PCR <i>FLM-<math>\delta</math></i> (Posé et al., 2013)
FLM_rev	At1g77080	CAGCAACGTATTCTTTCCCAT	qRT-PCR <i>FLM <math>\beta/\delta</math></i> (Posé et al., 2013)
FPA_774	At2g43410	CCAATGCAAGGAAGGCCTAC	qRT-PCR <i>FPA</i>
FPA_1191	At2g43410	TCTGACCAACTGAGCAGGAT	qRT-PCR <i>FPA</i>
FT_3'utr_for	At1g65480	TTGCATACTCTGATGAGATT	qRT-PCR <i>FT</i>
FT_3'utr_rev	At1g65480	CGCATCACACACTATATAAG	qRT-PCR <i>FT</i>
MAF1_4197	At1g77080	GCTGCTCAATTAGCCACCATC	qRT-PCR <i>FLM</i> alle Isoformen
MAF1_4392	At1g77080	TGTCTCCGAAGGAGGTACAAC	qRT-PCR <i>FLM</i> alle Isoformen
MAF4_for	At5g65070	AGAAGCTGCTGAGAGAGGAG	qRT-PCR <i>MAF4</i>
MAF4_rev	At5g65070	TCCGGTGGCTTGTGTCAGA	qRT-PCR <i>MAF4</i>
PP2A_for	At1g13320	CGATAGTCGACCAAGCGTT	qRT-PCR Referenztranskript <i>PP2A</i>
PP2A_rev	At1g13320	TACCGAACATCAACATCTGG	qRT-PCR Referenztranskript <i>PP2A</i>
fGFP		ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	RT-PCR <i>GFP</i>
rGFP		TTGTACAGCTCGTCCATGCC	RT-PCR <i>GFP</i>

### 3.8 RNA-Immunpräzipitation

Die Identifizierung von *in vivo* Zieltranskripten von AtGRP7 mittels RNA-Immunpräzipitation (RIP) wurde wie beschrieben durchgeführt (Köster et al., 2014b). Dafür wurden Pflanzen im KT auf ½ MS-Agar-Platten angezogen, die ein AtGRP7-GFP Fusionsprotein unter Kontrolle des AtGRP7-Promotors in *atgrp7-1* exprimierten. Durch Infiltration von Formaldehyd wurden RNAs mit ihren interagierenden Bindeproteinen vernetzt. Die RNA-Protein-Komplexe wurden anschließend mit GFP-Trap® Beads (Chromotek, Martinsried) spezifisch präzipitiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen der RNA-Protein-Komplexe an die Antikörpermatrix wurde eine Präzipitation mit RFP-Trap® Beads (Chromotek, Martinsried) durchgeführt, die kein GFP binden. Die präzipitierten RNAs wurden in cDNA umgeschrieben und mittels real time PCR detektiert. Die RIP wurde in Zusammenarbeit mit Maike Haas durchgeführt.

### 3.9 Immunologischer Nachweis der Proteine AtGRP7 und AtGRP8

#### 3.9.1 Proteinextraktion und Bestimmung des Gesamtproteingehalts

30 mg tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurden in ein Reaktionsgefäß eingewogen, mit 250 µl Protein-Extraktionspuffer versetzt und für 10 min. auf 95 °C erhitzt. Nach Zentrifugation für 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Pierce 660 nm Proteinassay (Thermo Scientific) nach Herstellerangabe photometrisch bei 660 nm an einem GloMax®-Multi+ Detection System (Promega) bestimmt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Rinderserum Albumin (BSA) in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml.

#### 3.9.2 Western Blot Analyse

Zur immunologischen Detektion von AtGRP7 wurde eine 20 µg Gesamtprotein entsprechende Menge Proteinextrakt 1:1 mit Ladepuffer versetzt und 5 min. auf 95 °C erhitzt. Sollte AtGRP8 detektiert werden, wurden 30 µg Proteinextrakt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) bestehend aus 5 % Sammelgel und 15 % Trenngel bei 120 V, bis die Bromphenolblau Lauffront das Ende des Gels erreichte. Die separierten Proteine wurden mittels Tankblot über Nacht bei 30 V auf eine PVDF-Membran (Roth) geblottet. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 1 h abgesättigt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde der primäre anti-Peptidantikörper anti-AtGRP7 aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1:2500 in TBS-T + 5 % Milchpulver für eine Stunde auf die Membran gegeben. Der Antikörper gegen AtGRP8 wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Es folgten 3 zehnmütige Waschschrte mit TBS-T, bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen konjugiert mit Meerrettichperoxidase in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T + 5 % Milchpulver für 30 min. inkubiert wurde. Nach viermaligem Waschen für je 15 min. in TBS-T wurde eine Peroxidase-Substratlösung auf die Membran gegeben und das Lichtsignal mit einem Röntgenfilm oder einer CCD-Kamera (Stella 3200, Raytest Isotopenmessgeräte) detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Membran entweder mit einem Antikörper gegen LHCP hybridisiert oder mit Amidoblack permanent gefärbt.

<i>Ladepuffer</i>	185 mM Tris-HCl pH 6,8; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 1 M $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,015% (w/v) Bromphenolblau
<i>SDS-Laufpuffer</i>	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,01 % SDS
<i>Transferpuffer</i>	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,05 % SDS; 20 % Methanol
TBS-T	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween20
Luminollösung	99 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,2 mM Cumarsäure; 1,25 mM Luminol; 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid

### 3.10 Automatisierte Phänotypisierung von *Arabidopsis thaliana*

Die automatisierte Aufnahme phänotypischer Parameter erfolgte mit der Phänotypisierungs-Plattform „GrowScreen Fluoro“ (Jansen et al., 2009). Pflanzen wurden dafür auf Erde ausgesät, 5 Tage bei 4 °C stratifiziert und nach 14 Tagen auf einzelne Töpfe pikiert. Die weitere Anzucht erfolgte in Klimakammern bei 20 °C im KT (8h Licht/16h Dunkel). Mittels eines beweglichen Kamerasystems wurden die Parameter Blattfläche, Kompaktheit, Exzentrizität, Rotationssymmetrie, Flächenbedeckung und Rosettendurchmesser über einen Zeitraum von 21 Tagen aufgenommen. Am Ende des Experiments wurden die Pflanzen geerntet und es wurde das Frisch- und Trockengewicht bestimmt. Die Versuche wurden am Jülich Plant Phenotyping Centre/Forschungszentrum Jülich in Zusammenarbeit mit Chryssa Dimaki, Silvia Braun, Fabio Fiorani und Prof. Ulrich Schurr durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswirkungen einer Misexpression von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf das Blühverhalten von *Arabidopsis*

#### 4.1.1 Blühverhalten der Doppelmutante *atgrp7-1 8i*

Die T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1* weist einen moderat verspäteten Blühphänotyp sowohl im LT als auch im KT auf. Weder auf Transkript- noch auf Proteinebene kann in diesen Pflanzen *AtGRP7* detektiert werden. Die Pflanzen zeigen dagegen ein erhöhtes Level an *AtGRP8*, da keine negative Regulation durch *AtGRP7* mehr stattfindet. Um zu überprüfen, ob das erhöhte Level von *AtGRP8* einen Einfluss auf den Blühzeitpunkt der Mutante *atgrp7-1* hat, wurde in die Mutante ein RNAi-Konstrukt gegen *AtGRP8* eingebracht, das dem erhöhten Level von *AtGRP8* entgegenwirken soll. Es wurden zwei unabhängige Linien von Doppelmutanten erzeugt, *atgrp7-1 8i* 6.1 und *atgrp7-1 8i* 9.9. Der Blühzeitpunkt dieser Linien wurde im KT analysiert. Während der Wt Col mit 57 Blättern blühte, bildete *atgrp7-1* 61 Blätter bis zur Blüte. Die beiden *atgrp7-1 8i* Linien bildeten 67 bzw. 65,7 Blätter bis zur Blüte und blühten somit deutlich später als der Wt und *atgrp7-1* (Abb. 4.1 A).

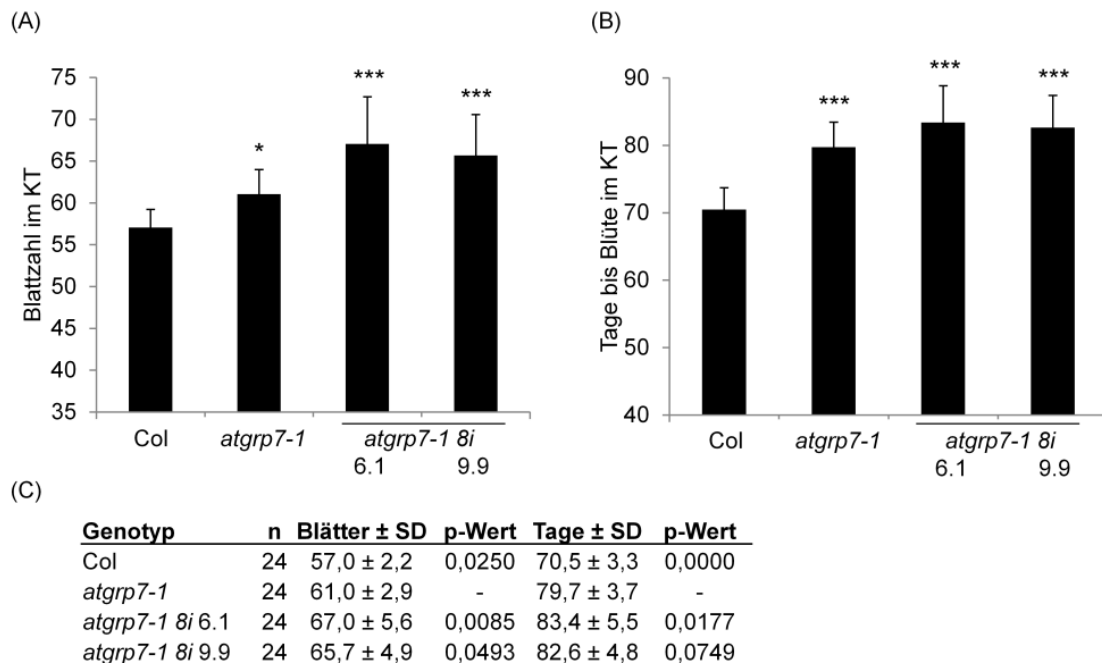


Abb. 4.1 Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im KT

(A) Anzahl der Rosettenblätter, (B) Tage von der Aussaat bis zur Blüte (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Daten von n=24 Pflanzen bezogen auf *atgrp7-1* als Kontrolllinie. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Linien wurde im Falle der Blattzahl ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, für die Anzahl der Tage bis zur Blüte wurde ein Dunnett-Test verwendet.

Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn die Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte betrachtet wurde (Abb. 4.1 B). Hier benötigte der Wt 70,5 Tage, während *atgrp7-1* etwa 10 Tage später blühte. Die Doppelmutanten *atgrp7-1 8i* blühten nach 83,4 und 82,6 Tagen und damit nochmals später als *atgrp7-1*. Alle Linien im *atgrp7-1* Hintergrund blühten signifikant später als der Wt. Vergleich man *atgrp7-1 8i* mit *atgrp7-1* (Abb. 4.1 C), so war die höhere Blattanzahl bei beiden *atgrp7-1 8i*-Linien signifikant unterschiedlich zu *atgrp7-1*. Für die Tage bis zur Blüte traf das jedoch nur auf *atgrp7-1 8i* 6.1 zu. Die zusätzliche Herabregulation von AtGRP8 führt also zu einer weiteren Verzögerung des Blühzeitpunktes.

Auf Proteinebene zeigte sich die erhöhte Konzentration von AtGRP8 in *atgrp7-1* verglichen mit dem Wt (Abb. 4.2 A). In beiden Linien *atgrp7-1 8i* gelang es durch das RNAi-Konstrukt, das Niveau von AtGRP8 unter das des Wt zu drücken. In 6.1, der Linie mit dem spätesten Blühzeitpunkt, war die AtGRP8-Konzentration am geringsten, in 9.9 dagegen war das Protein noch deutlich nachzuweisen.

Der verspätete Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* ging einher mit einem um das 3,5-fache erhöhten Transkriptlevel des Blührepressors *FLC* (Abb. 4.2 B). In den *atgrp7-1 8i* Linien 6.1 und 9.9 zeigte sich eine weitere moderate Erhöhung des *FLC*-Levels auf etwa den 5-fachen Wert des Wt, die mit dem späteren Blühzeitpunkt korrelierte.

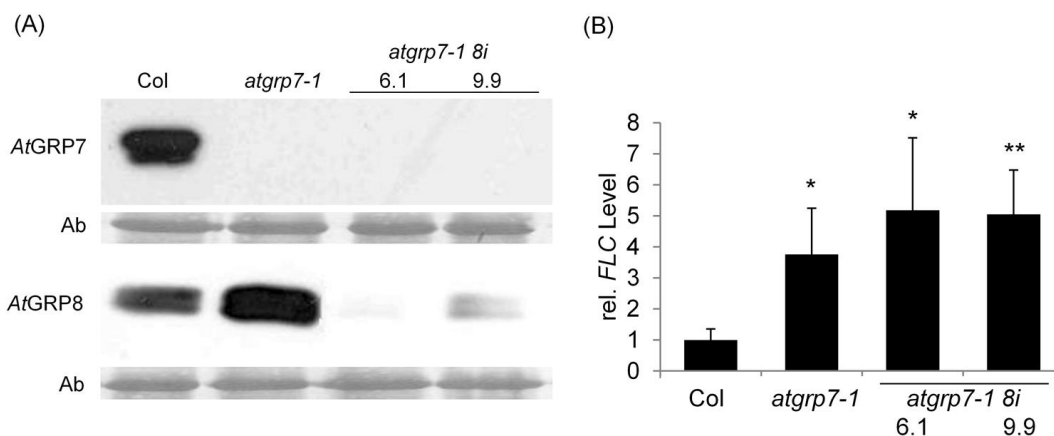


Abb. 4.2: (A) Expression von AtGRP7 und AtGRP8 in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*

Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 7 Wochen zum Zeitpunkt zt8 geerntet. Für den Immunoblot wurde jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion von AtGRP7 und AtGRP8 erfolgte mittels spezifischer Anti-Peptid-Antikörper. Ab=Amidoblack-Färbung der Membran als Ladekontrolle.

(B) *FLC*-Transkriptlevel in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* relativ zum Wt Col. Die Pflanzen sind im gleichen Alter wie in (A). Mittelwerte ± SD von drei biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (\*\* p < 0,01).

Blühphänotyp und Transkriptdaten von *atgrp7-1 8i* lassen den Schluss zu, dass ein verringertes Level von AtGRP8 im Hintergrund von *atgrp7-1* zu einer weiteren Verspätung des Blühzeitpunktes und einer Erhöhung des *FLC*-Levels führt. Umgekehrt kann die hohe Konzentration von AtGRP8 in der

Einzelmutante *atgrp7-1* mögliche Effekte des Fehlens von *AtGRP7* kompensieren. Es ist daher erforderlich, auch den Einfluss einer erhöhten Expression von *AtGRP8* auf den Blühzeitpunkt zu untersuchen, um zu klären, ob diese einen ähnlich blühhördernden Effekt besitzt wie die Überexpression von *AtGRP7*.

#### 4.1.2 Blühverhalten von *AtGRP7-ox* Pflanzen

Ein verfrühter Blühzeitpunkt der zwei unabhängigen *AtGRP7-ox* Linien D und G wurde bereits beschrieben (Streitner et al., 2008). In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine dritte unabhängige Linie, *AtGRP7-ox* 23c, verwendet. Alle drei Linien wurden im KT auf ihren Blühzeitpunkt untersucht (Abb. 4.3). Die drei Linien blühten mit 43,1, 44,9 und 47,2 Blättern und bildeten somit deutlich weniger Blätter bis zur Blüte als Col (Abb. 4.3 A). Bis zur Blüte benötigten die drei *AtGRP7-ox* Linien im Schnitt etwa 70 Tage, während der Wt 74 Tage benötigte (Abb. 4.3 B). Damit blühten sie tendenziell etwas früher als Col, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 4.3 C). *AtGRP7-ox* Pflanzen bilden also in der gleichen Zeit weniger Blätter aus, verglichen mit dem Wt.

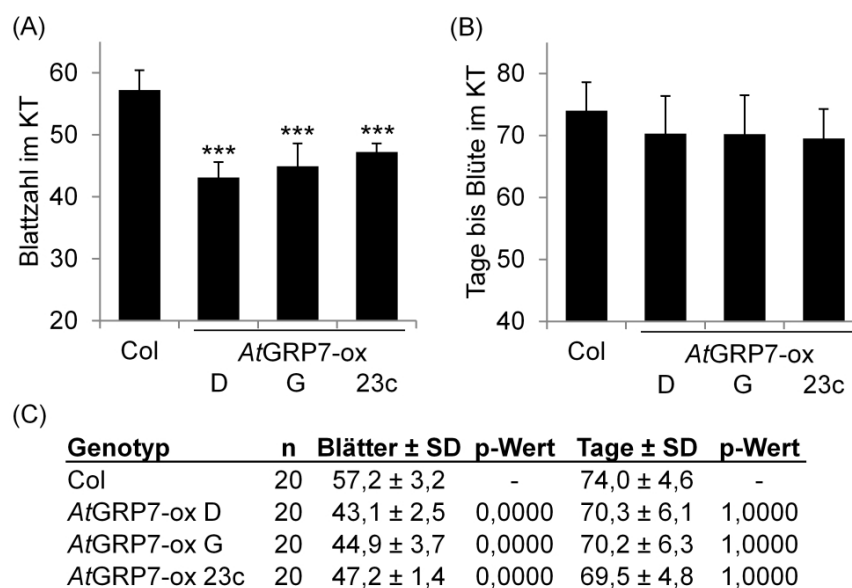


Abb. 4.3: Blühzeitpunkt von *AtGRP7-ox* im KT

(A) Anzahl der Rosettenblätter, (B) Tage von der Aussaat bis zur Blüte (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Daten von  $n=20$  Pflanzen bezogen auf Col als Kontrolllinie. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Linien wurde im Falle der Blattzahl ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, für die Anzahl der Tage bis zur Blüte wurde ein Dunnett-Test verwendet.

Die Analyse auf molekularer Ebene bestätigte für alle drei Linien eine Überexpression von *AtGRP7* und die gleichzeitige Herabregulation von *AtGRP8* (Abb. 4.4 A). Das für die Linien *AtGRP7-ox* D und G bereits publizierte niedrige *FLC*-Niveau konnte auch für *AtGRP7-ox* 23c bestätigt werden (Abb. 4.4 B).



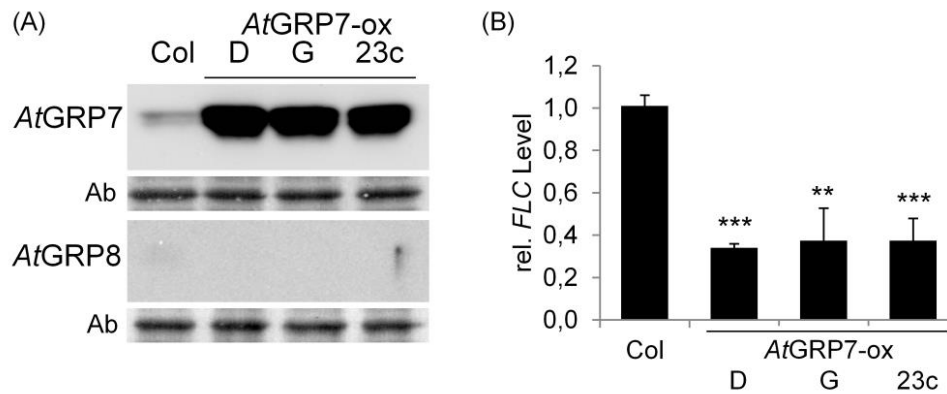


Abb. 4.4: (A) Expression von AtGRP7 und AtGRP8 in AtGRP7-ox.

Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 7 Wochen zum Zeitpunkt zt8 geerntet. Für den Immunoblot wurde jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion von AtGRP7 und AtGRP8 erfolgte mittels spezifischer Anti-Peptid-Antikörper. Ab=Amidoblack-Färbung der Membran als Ladekontrolle.

(B) *FLC*-Transkriptlevel in AtGRP7-ox relativ zum Wt Col. Die Pflanzen sind im gleichen Alter wie in (A). Mittelwerte  $\pm$  SD von drei biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.1.3 Blühverhalten von AtGRP8-ox Pflanzen

Da AtGRP8 starke Ähnlichkeiten zu AtGRP7 aufweist, könnten beide Proteine ähnliche Funktionen in der Blühinduktion erfüllen. Daher wurden drei unabhängige AtGRP8-ox Linien mit starker Überexpression durch den CaMV 35S Promotor auf ihren Blühphänotyp im KT überprüft (Abb. 4.5). Die Linien 26a4 und 2b/4a blühten mit 48,3 bzw. 50,8 Blättern und somit mit signifikant weniger Blättern als der Wt, der mit 57 Blättern blühte (Abb. 4.5 A). Die Linie 3/4c blühte mit 54,4 Blättern und damit nicht signifikant unterschiedlich zum Wt. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Anzahl Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Abb. 4.5 B). Hier benötigte Col 70,5 Tage, AtGRP8-ox 26a4 und 2b/4a 64,9 bzw. 64,1 Tage und die Linie 3/4c 68,4 Tage. Damit wiesen nur die Linien 26a4 und 2b/4a signifikante Unterschiede im Blühverhalten gegenüber Col auf (Abb. 4.5 C). Eine Analyse der Proteinkonzentration von AtGRP7 und AtGRP8 zeigte, dass in allen drei Linien die Konzentration von AtGRP7 weit unter der des Wt lag. AtGRP8-ox 26a4 und 2b/4a zeigten eine starke Überexpression von AtGRP8, die bei 3/4c deutlich schwächer ausfiel (Abb. 4.5 D). Diese Linie zeigte auch kein signifikant unterschiedliches Blühverhalten verglichen mit Col. Der stimulierende Effekt von AtGRP8 auf die Blühinduktion ist also in hohem Maße dosisabhängig.

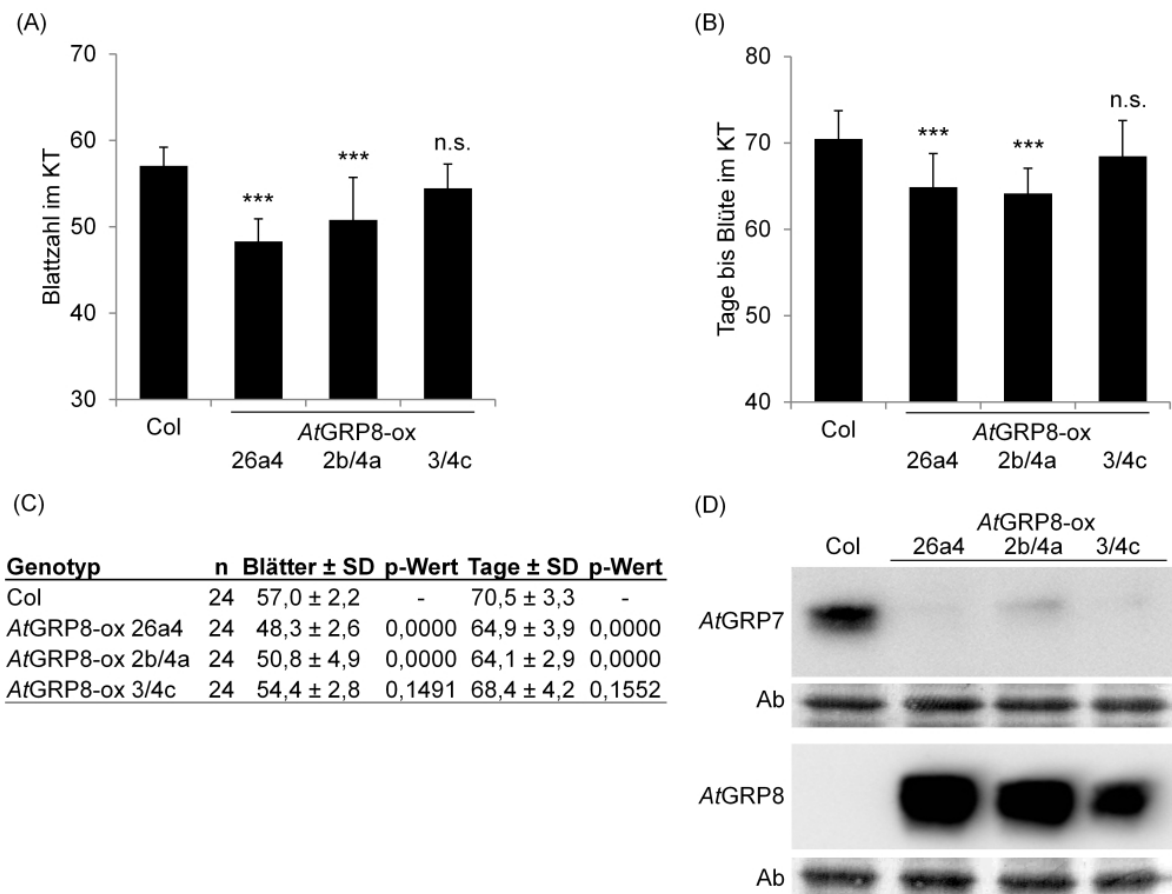


Abb. 4.5: Blühverhalten von AtGRP8-ox Pflanzen

(A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte, (B) Tage von der Aussaat bis zur Blüte (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant). (C) Statistische Auswertung der Daten von  $n=24$  Pflanzen bezogen auf Col als Kontrolllinie. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Linien wurde im Falle der Blattzahl ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, für die Anzahl der Tage bis zur Blüte wurde ein Dunnett-Test verwendet.

(D) Expression von AtGRP7 und AtGRP8 in AtGRP8-ox. Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 7 Wochen zum Zeitpunkt zt8 geerntet. Für den Immunoblot wurde jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion von AtGRP7 und AtGRP8 erfolgte mittels spezifischer Anti-Peptid-Antikörper. Ab=Amidoblack-Färbung der Membran als Ladekontrolle.

Da *FLC* ein Zieltranskript von AtGRP7 ist, wurde überprüft, ob dies in gleicher Weise auch für AtGRP8 gilt. In 4 Wochen alten KT-Pflanzen zeigte sich kein geringeres *FLC*-Level in allen AtGRP8-ox Linien verglichen mit Col. Bei 26a4, der Linie mit dem höchsten Grad an Überexpression, war das Level um das 1,7-fache erhöht, bei 2b/4a und 3/4c zeigte sich kein Unterschied zu Col (Abb. 4.6 A). Erst bei älteren Pflanzen, in diesem Fall nach 7 Wochen im KT, war bei allen Linien eine auf etwa die Hälfte gegenüber dem Wt verringerte *FLC*-Transkriptmenge nachzuweisen (B). Im Gegensatz dazu haben Transkriptanalysen bei AtGRP7-ox gezeigt, dass bei diesen Pflanzen auch schon im juvenilen Stadium ein geringeres *FLC*-Niveau als im Wt vorliegt (o. Abb.). Die Überexpression von AtGRP8 übt ihren Einfluss auf *FLC* demnach erst spät in der Entwicklung der Pflanze aus.

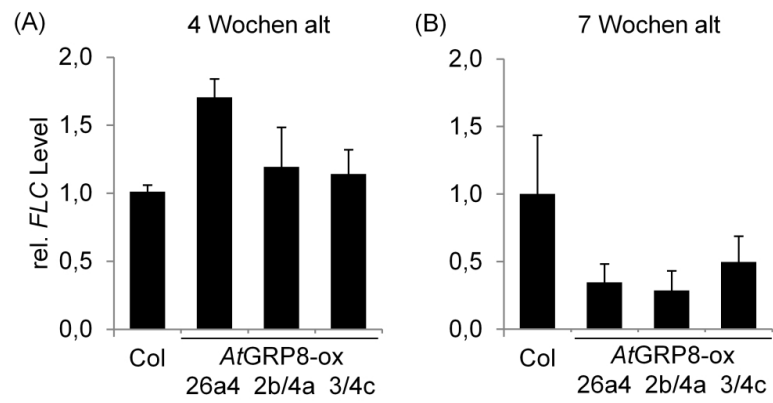


Abb. 4.6: Altersabhängige Regulation des *FLC*-Transkriptlevels in *AtGRP8-ox*

Drei unabhängige *AtGRP8-ox* Linien und der Wt Col wurden im KT angezogen und nach 4 Wochen (A) und 7 Wochen (B) geerntet, um das *FLC*-Level mittels realtime PCR zu bestimmen. Mittelwerte  $\pm$  SD von drei biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt.

## 4.2 Komplementation der T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1*

### 4.2.1 Komplementation von *atgrp7-1* mit dem Wildtyp-Allel von *AtGRP7*

Um zu zeigen, dass der späte Blühzeitpunkt der T-DNA Mutante *atgrp7-1* das direkte Resultat des Verlustes von *AtGRP7* ist, wurde die Mutante *atgrp7-1* mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment komplementiert, das die komplette genomische Sequenz von *AtGRP7* sowie 1,4 kb der Promotorregion enthält (Staiger und Apel, 1999). Die drei unabhängigen Linien *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1* 4, 10 und 11 wurden in einem Blühversuch im KT auf ihren Blühzeitpunkt getestet. Die Linien blühten mit 55,4, 58,8 und 57,0 Blättern und somit mit signifikant weniger Blättern als *atgrp7-1*, die in diesem Experiment mit 64,0 Blättern blühte (Abb. 4.7 A, C). Von der Aussaat bis zur Blüte vergingen bei den drei *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1* Linien 72,8, 74,9 und 69,2 Tage. Auch dies war signifikant weniger als die 84,3 Tage, die *atgrp7-1* bis zur Blüte benötigte. Das genomische Fragment von *AtGRP7* unter der Kontrolle des endogenen Promotors ist somit in der Lage, den Blühphänotyp von *atgrp7-1* zu komplementieren.

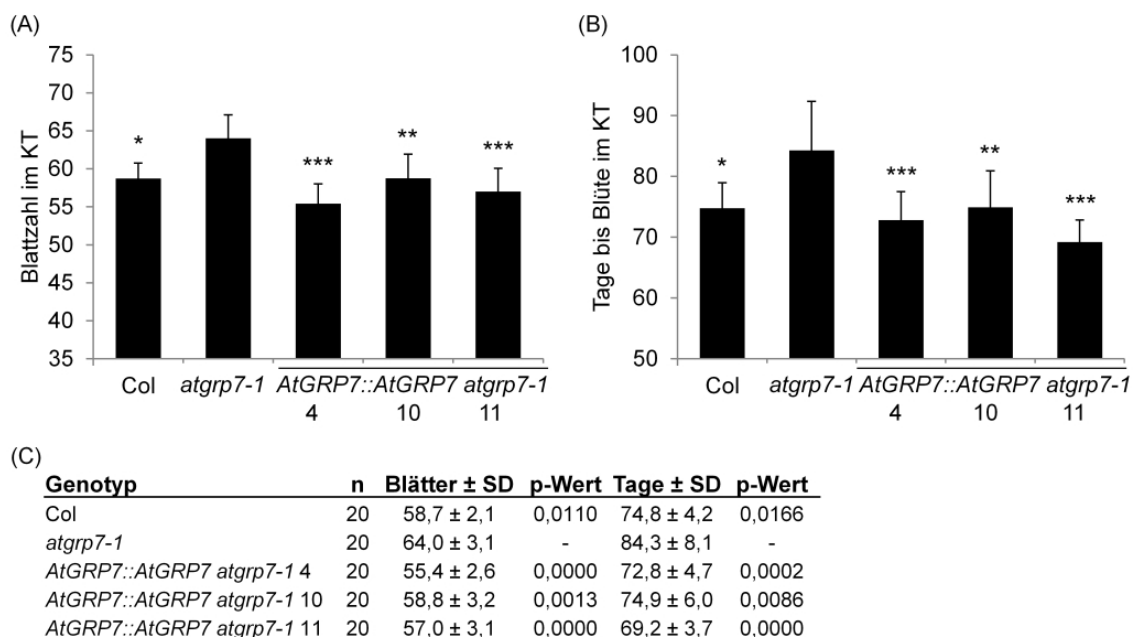


Abb. 4.7: Komplementation des Blühphänotyps von *atgrp7-1*

Wt (Col), *atgrp7-1* und drei Linien *atgrp7-1* komplementiert mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment von *AtGRP7* (*AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1*) wurden im KT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten von  $n=20$  Pflanzen. Signifikante Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

Auf molekularer Ebene ließ sich erkennen, dass das Komplementationskonstrukt funktionell war und alle drei Linien wieder über *AtGRP7*-Protein verfügten (Abb. 4.8 A). Sie exprimierten das Protein jedoch stärker als der Wt. Das Level von *AtGRP8* war dementsprechend auch geringer als im Wt,

während es in *atgrp7-1*, die kein *AtGRP7* exprimiert, stark erhöht war, da keine negative Kreuzregulation stattfand. Im Vergleich zur Überexpression in *AtGRP7-ox D* waren die Level von *AtGRP7* in *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1* jedoch nur moderat erhöht, was erklären kann, warum die Pflanzen nicht deutlich früher als der Wt blühten. Das Transkriptlevel von *FLC* war in allen drei Linien deutlich niedriger als im Wt und vergleichbar niedrig wie bei konstitutiver Überexpression von *AtGRP7* (Abb. 4.4 B), trotzdem blühten die Pflanzen nicht deutlich früher als der Wt. Die konstitutive Überexpression von *AtGRP7* unter der Kontrolle des 35S-Promotors muss also zusätzliche, *FLC*-unabhängige Effekte auf den Blühphänotyp haben.

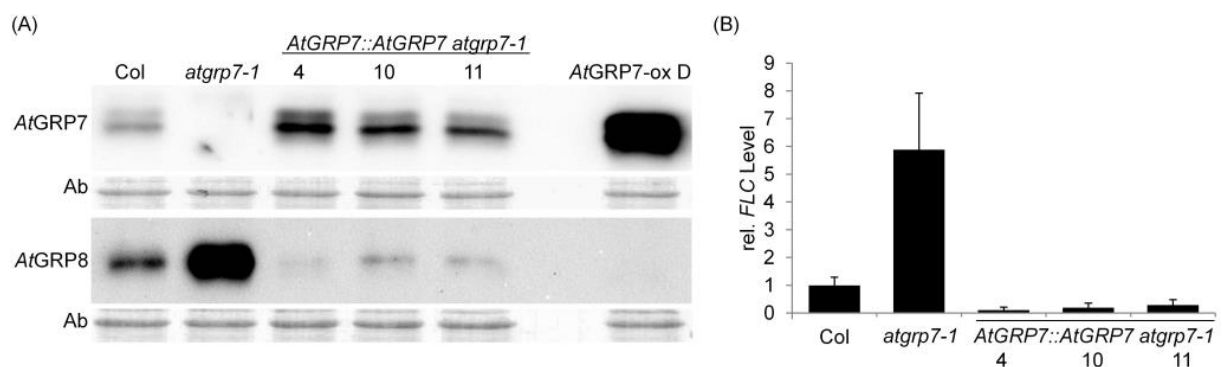


Abb. 4.8: Komplementation von *atgrp7-1* auf molekularer Ebene

Wt (Col), *atgrp7-1* und drei Linien *atgrp7-1* komplementiert mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment von *AtGRP7* (*AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1*) wurden im KT angezogen und nach 7 Wochen geerntet. (A) Expression von *AtGRP7* und *AtGRP8* in *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1*. Um die Expressionsstärke abzuschätzen, ist zusätzlich *AtGRP7-ox D* mit aufgetragen. Ab=Amidoblack-Färbung der Membran als Ladekontrolle. (B) *FLC*-Transkriptlevel in *atgrp7-1* und *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1* relativ zum Wt Col. Die Pflanzen sind im gleichen Alter wie in (A). Mittelwerte  $\pm$  SD von drei biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt.

#### 4.2.2 Komplementation von *atgrp7-1* mit dem Allel *AtGRP7 R<sup>49Q</sup>*

Um zu überprüfen, ob die RNA-Bindfähigkeit von *AtGRP7* für die Ausbildung des Blühphänotyps verantwortlich ist, wurde die T-DNA Mutante *atgrp7-1* mit einem genomischen Fragment von *AtGRP7* transformiert, dessen RRM einen Aminosäureaustausch am konservierten Arginin 49 zu Glutamin aufweist. Dadurch wird die RNA-Bindungsaffinität herabgesetzt (Schöning et al., 2007). Die vier erzeugten Linien *AtGRP7::AtGRP7 R<sup>49Q</sup> atgrp7-1* wurden in einem Blühversuch im KT auf ihr Blühverhalten getestet. Die Linien 8, 9, 12 und 19 blühten mit 60,8, 62,9, 61,9 und 64,5 Blättern und damit nicht signifikant unterschiedlich zu *atgrp7-1* (Abb. 4.9 A, C). Während die *AtGRP7::AtGRP7 R<sup>49Q</sup> atgrp7-1* Linien 75,1, 75,8, 76,6 und 81,3 Tage bis zur Blüte benötigten, blühte *atgrp7-1* erst nach 84,3 Tagen. Damit blühte nur die Linie 19 nicht signifikant früher als *atgrp7-1* (Abb. 4.9 B, C).

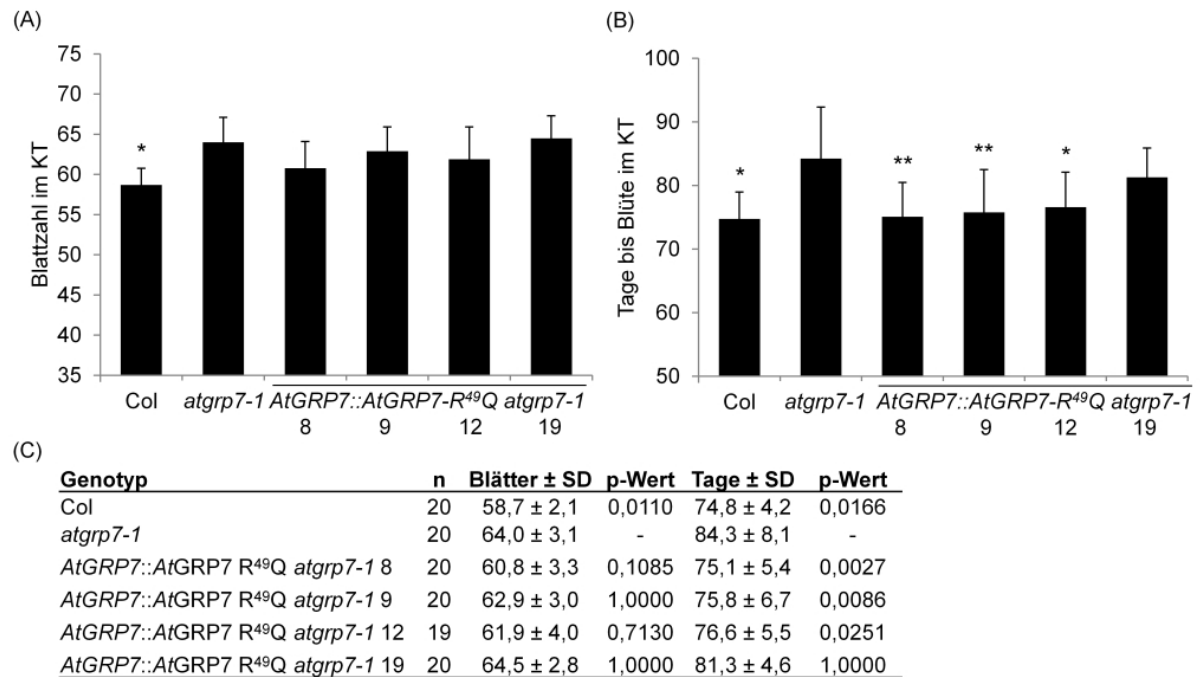


Abb. 4.9: Der Blühphänotyp von *AtGRP7::AtGRP7 R<sup>49</sup>Q atgrp7-1*

Wt (Col), *atgrp7-1* und vier Linien *atgrp7-1* komplementiert mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment von *AtGRP7* mit eingeschränkter RNA-Bindfähigkeit (*AtGRP7::AtGRP7 R<sup>49</sup>Q atgrp7-1*) wurden im KT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\* p ≤ 0,01). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten von n=19-20 Pflanzen. Signifikante Unterschiede bei der Blattzahl wurden mittels ANOVA und Dunnett-Test ermittelt, bei der Tagesanzahl wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Die beiden *AtGRP7::AtGRP7 R<sup>49</sup>Q atgrp7-1* Linien 9 und 12 exprimierten *AtGRP7 R<sup>49</sup>Q* auf Wt-Niveau, während die Linien 8 und 19 *AtGRP7 R<sup>49</sup>Q* sehr viel stärker exprimierten (Abb. 4.10 A ; zum Vergleich ist *AtGRP7-ox D* mit aufgetragen). In allen Linien war jedoch das Proteinlevel von *AtGRP8* deutlich höher als im Wt. Es fand also nur eine stark eingeschränkte negative Regulation von *AtGRP8* durch *AtGRP7 R<sup>49</sup>Q* statt. Eine Analyse des Blührepressors *FLC* zeigte bei Linie 9 und 12 erhöhte Transkriptlevel, während die Linien 8 und 19 bei starker Expression von *AtGRP7 R<sup>49</sup>Q* ein deutlich verringertes *FLC*-Level aufwiesen (Abb. 4.10 B). Das weist darauf hin, dass eine starke Expression von *AtGRP7 R<sup>49</sup>Q* trotz des Amonisäureaustausches einen Resteffekt auf Zieltranskripte wie *FLC* haben kann. Obwohl die *FLC*-Transkriptmenge in den Linien 8 und 19 geringer war als im Wt, blühten diese Linien jedoch nicht früher. Daher können noch andere, *FLC*-unabhängige Effekte in *atgrp7-1* zusätzlich für den späten Blühphänotyp verantwortlich sein.

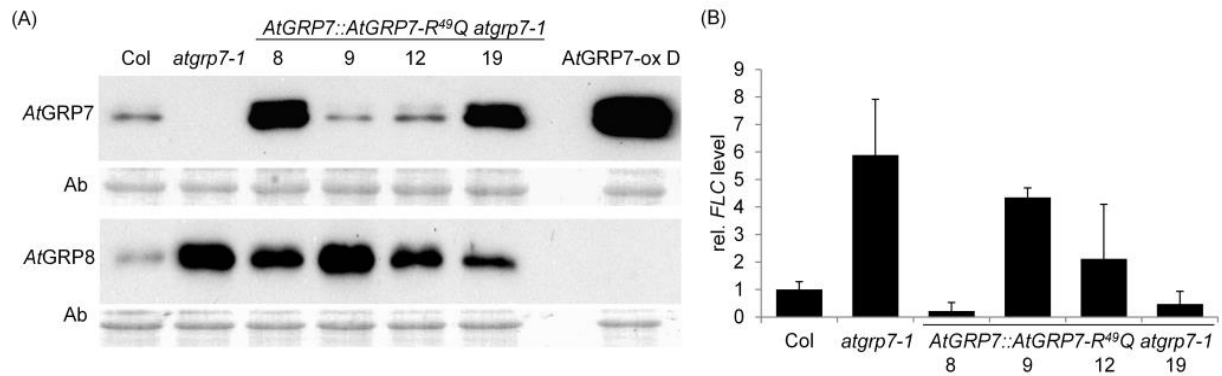


Abb. 4.10: Komplementation von *atgrp7-1* mit *AtGRP7::AtGRP7<sup>R49Q</sup>* auf molekularer Ebene

Wt (Col), *atgrp7-1* und vier Linien *atgrp7-1* komplementiert mit einem 2,9 kb großen genomischen Fragment von *AtGRP7* mit eingeschränkter RNA-Bindfähigkeit (*AtGRP7::AtGRP7<sup>R49Q</sup> atgrp7-1*) wurden im KT angezogen und nach 7 Wochen geerntet. (A) Expression von *AtGRP7* und *AtGRP8* in *AtGRP7::AtGRP7<sup>R49Q</sup> atgrp7-1*. Um die Expressionsstärke abzuschätzen, ist zusätzlich *AtGRP7-ox D* mit aufgetragen. Ab=Amidoblack-Färbung der Membran als Ladekontrolle. (B) *FLC*-Transkriptlevel in *atgrp7-1* und *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1* relativ zum Wt Col. Die Pflanzen sind im gleichen Alter wie in (A). Mittelwerte  $\pm$  SD von drei biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt.

### 4.3 Interaktion von *AtGRP7* mit Komponenten des photoperiodischen Signalwegs der Blühinduktion

Die Ergebnisse der Blühversuche und die Transkriptanalysen in *AtGRP7-ox* sowie in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* zeigten, dass die Misexpression von *AtGRP7* den Blühzeitpunkt von *Arabidopsis* beeinflusst. Da *AtGRP7* unter der Kontrolle der inneren Uhr der Pflanze steht (Heintzen et al., 1994; Staiger, 2001) und diese wesentlich in die Kontrolle der photoperiodischen Blühinduktion eingebunden ist (Andrés und Coupland, 2012), sollte untersucht werden, ob auch *AtGRP7* eine Funktion in diesem Regulationsweg erfüllt. Dazu wurden Doppelmutanten von *atgrp7-1* bzw. *atgrp7-1 8i* mit *co*- und *gi*-Mutanten erzeugt, um die mögliche genetische Interaktion zwischen *AtGRP7* und den beiden Kernkomponenten der photoperiodischen Blühinduktion, CO und GI, zu überprüfen.

#### 4.3.1 Untersuchung der genetischen Interaktion mit CONSTANS

Der Blühphänotyp von zwei reziproken Kreuzungen von *atgrp7-1* mit der CO T-DNA Insertionsmutante *co-9* wurde in Blühversuchen im LT und KT ermittelt (Abb. 4.11). Im LT blühte *atgrp7-1* mit 16,5 Blättern signifikant später als der Wt, der 13,1 Blätter bis zur Blüte ausbildete. Die Mutante *co-9* war insensitiv gegenüber der langen Photoperiode und blühte mit 43,1 Blättern deutlich verspätet. Die Doppelmutanten *co-9 atgrp7-1* und *atgrp7-1 co-9* blühten mit 48,3 bzw. 49,9 Blättern und damit signifikant später als *co-9* (Abb. 4.11 A, C).

Die Untersuchungen zum Blühzeitpunkt im KT stellten sich wie folgt dar: Col blühte hier mit 58,7

Blättern und *atgrp7-1* mit 64 Blättern. Die T-DNA Mutante *co-9* blühte mit 60 Blättern und damit nicht unterschiedlich zum Wt, da sich der Verlust der CO-Aktivität im KT nicht auswirkt. Die Doppelmutanten *co-9 atgrp7-1* und *atgrp7-1 co-9* blühten mit 64,1 bzw. 64,3 Blättern und damit später als *co-9*, aber mit der gleichen Anzahl an Blättern wie *atgrp7-1* (Abb. 4.11 B, D).

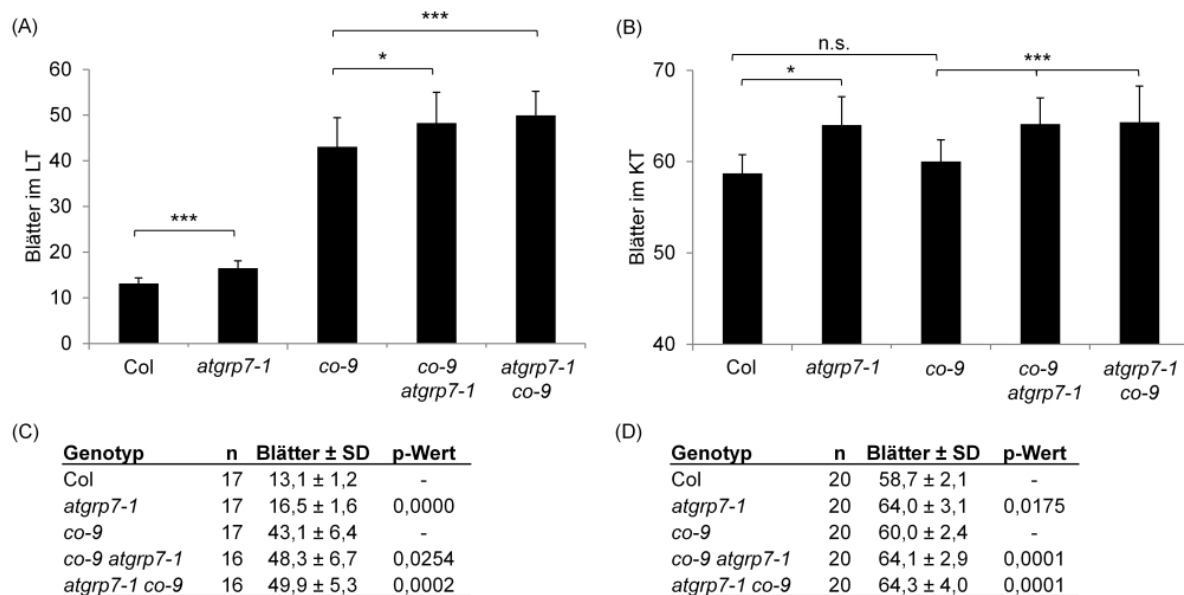


Abb. 4.11: Blühphänotyp der *co-9 atgrp7-1*-Doppelmutanten

Wt (Col), *atgrp7-1*, *co-9*, *co-9 atgrp7-1* und *atgrp7-1 co-9* wurden im LT (A) und im KT (B) angezogen und die Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte bestimmt (Mittelwerte ± SD; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant). (C) Statistische Auswertung von  $n=16-17$  Pflanzen im LT mittels Kruskal-Wallis-Test. (D) Statistische Auswertung von  $n=20$  Pflanzen im KT mittels Kruskal-Wallis-Test.

In einem komplementären Ansatz wurde *co-9* mit einem *AtGRP7*-Überexpressionskonstrukt transformiert. Von der erhaltenen Linie *AtGRP7-ox co-9* wurde das Blühverhalten von zwei Geschwisterpflanzenlinien im LT und KT ermittelt. Im LT blühte *AtGRP7-ox* 23 mit 12,1 gebildeten Blättern nur wenig früher als der Wt, der mit 14,1 Blättern blühte. Die Mutante *co-9* blühte deutlich später mit 46,1 Blättern. Die Doppelmutanten *AtGRP7-ox co-9* 10/1 und 10/4 blühten mit 34 und 34,6 Blättern. Damit war der Blühzeitpunkt in *AtGRP7-ox co-9* deutlich verfrüht gegenüber *co-9* (Abb. 4.12 A, C).

Im KT blühte *AtGRP7-ox* D mit 46,9 Blättern deutlich früher als Col. *Co-9* dagegen blühte mit 58,8 ausgebildeten Blättern und damit nicht signifikant unterschiedlich zum Wt. Die beiden *AtGRP7-ox co-9* Geschwisterlinien blühten mit 48,8 und 46,4 Blättern. Dies war signifikant früher als *co-9* (Abb. 4.12 B, D).



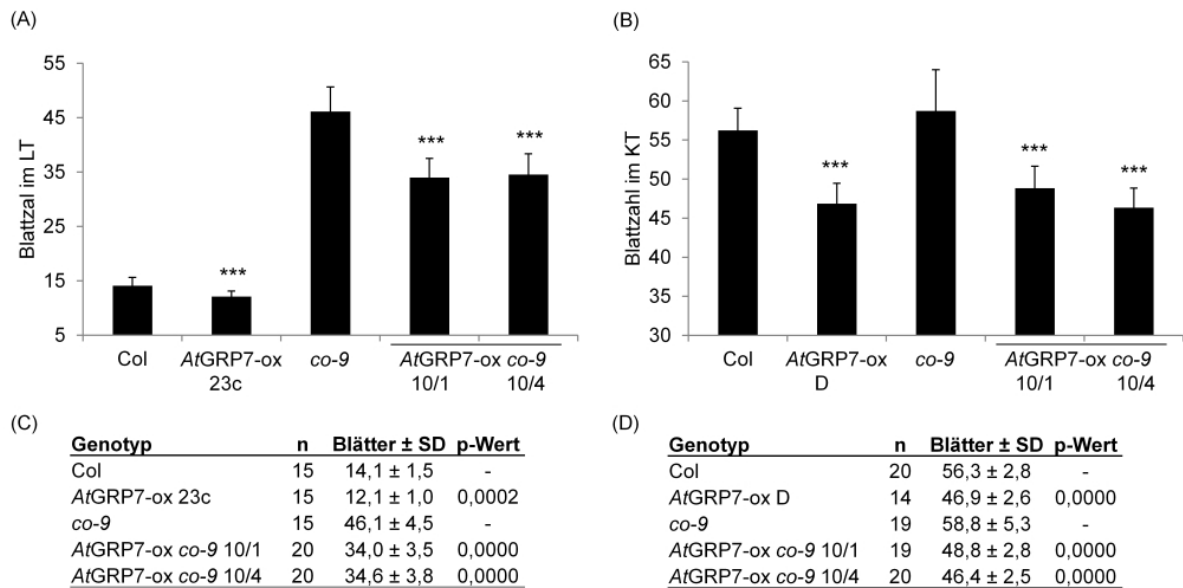


Abb. 4.12: Blühphänotyp von *AtGRP7-ox co-9*

Wt (Col), *AtGRP7-ox 23c* bzw. *AtGRP7-ox D*, *co-9* und zwei Linien *AtGRP7-ox co-9* wurden im LT (A) und im KT (B) angezogen und die Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn bestimmt (Mittelwerte ± SD; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Daten im LT. Um das Signifikanzniveau des Unterschieds zwischen Col und *AtGRP7-ox* zu ermitteln, wurde ein t-Test verwendet. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen *co-9* und *AtGRP7-ox co-9* zu ermitteln, wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. (D) Statistische Auswertung der Daten im KT. Um statistisch signifikante Unterschiede zu ermitteln, wurde eine ANOVA mit einem Dunnett-Test verwendet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich sowohl das Fehlen als auch die konstitutive Überexpression von *AtGRP7* im Hintergrund der *co-9* Mutation phänotypisch auswirkte und *AtGRP7* somit den Blühphänotyp genetisch unabhängig von CO beeinflusst.

Die Transkriptszillation von CO im Tagesverlauf wurde in Col und *AtGRP7-ox G* im LT und KT verglichen. Sie wies bei beiden Photoperioden keine starken Unterschiede zwischen Wt und *AtGRP7-ox* auf (Abb. 4.13 A, B). *AtGRP7-ox* beeinflusst die Oszillation von CO also auch nicht auf Transkriptebene, was ebenfalls dafür spricht, dass *AtGRP7* nicht über CO die Blüte reguliert.

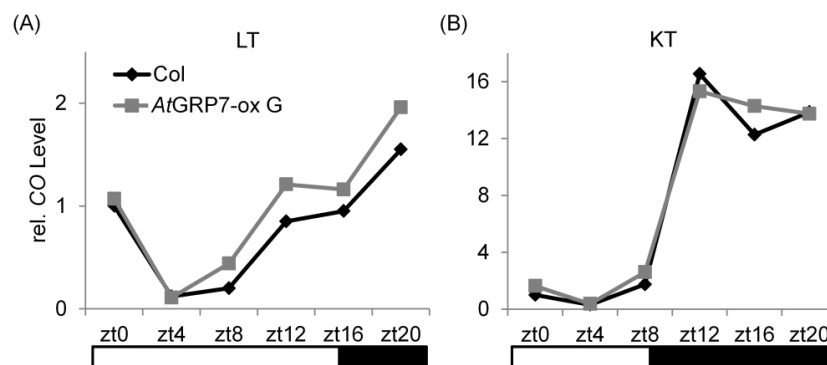


Abb. 4.13: CO-Transkriptszillation in *AtGRP7-ox*

Wt (Col) und *AtGRP7-ox G* wurden auf MS-Agarplatten im LT (A) und im KT (B) angezogen und im 4 h-Abstand geerntet. Das Transkriptlevel von CO wurde mittels realtime PCR quantifiziert. Der Wert von Col zu zt0 wurde jeweils auf 1 gesetzt. Mittelwerte aus zwei techn. Replikaten.

### 4.3.2 Untersuchung der genetischen Interaktion mit GIGANTEA

Um auch den GI-abhängigen Signalweg in der photoperiodischen Blühinduktion zu untersuchen, der unabhängig von CO wirkt (Jung et al., 2007), wurden Doppelmutanten zwischen der spätblühenden Mutante *gi-2* und *atgrp7-1* bzw. *atgrp7-1 8i* durch Kreuzung hergestellt. Eine *atgrp7-1 gi-2* Mutante, sowie jeweils reziproke Kreuzungen von *atgrp7-1 8i 6.1* mit *gi-2* und *atgrp7-1 8i 9.9* mit *gi-2* wurden auf ihr Blühverhalten im LT und im KT untersucht (Abb. 4.14).

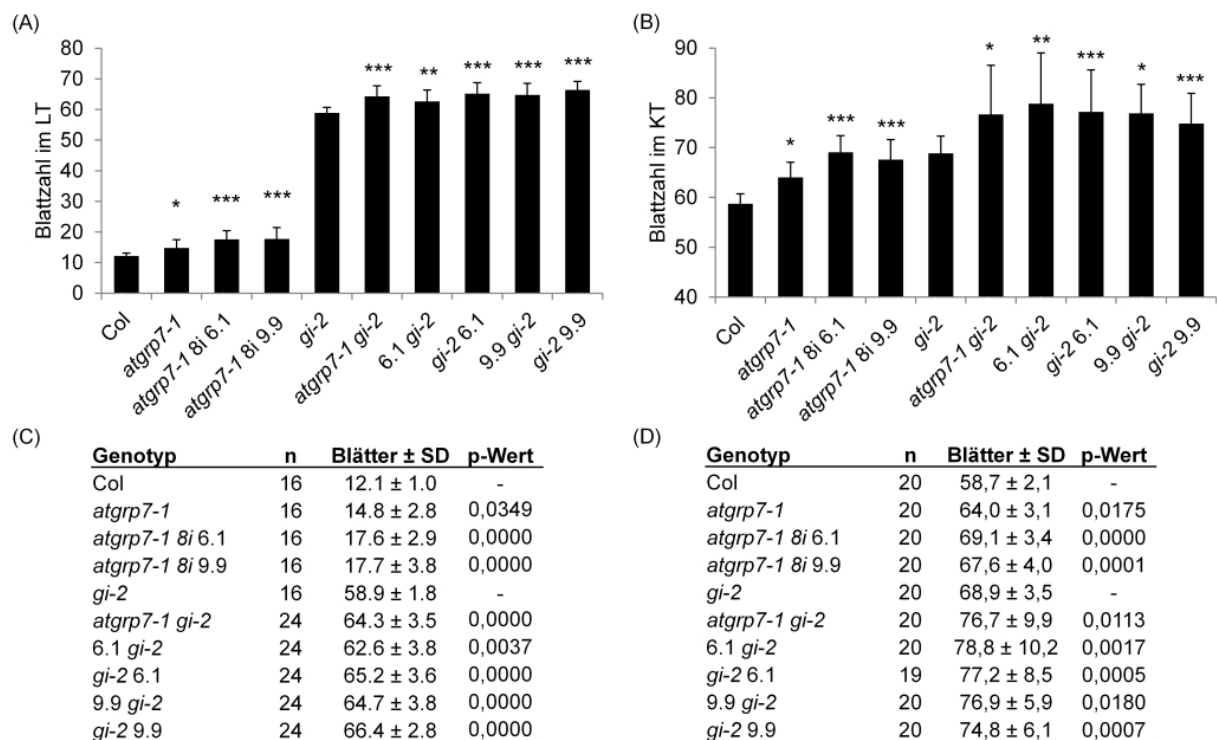


Abb. 4.14: Blühphänotyp der Doppelmutanten *atgrp7-1 gi-2* und *atgrp7-1 8i gi-2*

Wt (Col), *atgrp7-1*, zwei Linien *atgrp7-1 8i*, *gi-2*, *atgrp7-1 gi-2* sowie jeweils zwei reziproke Kreuzungen der Linien *atgrp7-1 8i gi-2* (*6.1 gi-2* und *9.9 gi-2*) wurden im LT (A) und im KT (B) angezogen und die Anzahl der Rosettenblätter wurde zum Zeitpunkt der Blüte bestimmt (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten im LT. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen Col, *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* zu überprüfen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen *gi-2*, *atgrp7-1 gi-2* und *atgrp7-1 8i gi-2* zu überprüfen, wurde ein Dunnett-Test durchgeführt.

(D) Statistische Auswertung der Blühdaten im KT. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zu ermitteln.

Im LT blühte Col mit 12,1 Blättern, während *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wenig später mit 14,8 bzw. 17,6 und 17,7 Blättern blühten. *Gi-2* blühte mit 58,9 Blättern deutlich verspätet. Die Doppelmutante *atgrp7-1 gi-2* blühte mit 64,3 Blättern und somit signifikant später als *gi-2*. Die Doppelmutanten *atgrp7-1 8i 6.1 gi-2* blühten mit 62,6 und 65,2 Blättern, die Pflanzen der Linien *atgrp7-1 8i 9.9 gi-2* mit 64,7 und 66,4 Blättern. Es war kein deutlicher zusätzlicher Effekt eines reduzierten *AtGRP8* Levels auf den Blühzeitpunkt in *gi-2* zu beobachten. Unabhängig davon blühten alle Doppelmutanten

signifikant später als *gi-2* (Abb. 4.14 A, C). Diese additiven Effekte auf den Blühzeitpunkt weisen darauf hin, dass *AtGRP7* unabhängig von GI die Blühinduktion beeinflusst.

Ein identisches Bild bot sich im KT. Auch hier blühten alle Kombinationen aus Doppelmutanten signifikant später als die Einzelmutanten (Abb. 4.14 B, D). Der Verlust von *AtGRP7* verzögert daher unabhängig von der Photoperiode die Blühinduktion in *gi-2*. Zusammengenommen legen die Ergebnisse nahe, dass *AtGRP7* seine Funktion auch nicht im GI-abhängigen Zweig des photoperiodischen Signalwegs der Blühinduktion ausübt.

#### 4.4 Interaktionen von *AtGRP7* mit anderen Mitgliedern des autonomen Signalwegs der Blühinduktion

Um zu überprüfen, ob *AtGRP7* in einen Signalweg mit anderen Mitgliedern des autonomen Signalwegs eingeordnet werden kann, wurden Kreuzungen von *atgrp7-1* mit den spätblühenden Mutanten *fca-9*, *fpa-3*, *flk-1* und *fld-3* durchgeführt. Um einer möglichen Abschwächung der Effekte durch die verstärkte Expression von *AtGRP8* in *atgrp7-1* zu begegnen, wurden die Kreuzungen auch mit *atgrp7-1 8i* durchgeführt. In segregierenden F<sub>2</sub>-Populationen wurden durch Genotypisierung homozygote Doppelmutanten identifiziert, die in der F<sub>3</sub>-Generation auf ihren Blühzeitpunkt im LT untersucht wurden. Dafür wurde zunächst der Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im LT bestimmt (Abb. 4.15 A, B, D). Col blühte mit 13,9 Blättern, während *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* mit 17,5 bzw. 21,2 Blättern signifikant mehr Blätter bis zur Blüte ausbildeten. Auch gemessen nach Tagen blühten die beiden Linien später als der Wt, der nach 30,9 Tagen blühte. *AtGRP7* und *AtGRP8* beeinflussen also den Blühzeitpunkt auch im LT. Da alle Proteine des autonomen Signalwegs *FLC* als Zieltranskript besitzen, wurde dessen Abundanz ebenfalls bestimmt (Abb. 4.15 C). Sowohl *atgrp7-1* als auch *atgrp7-1 8i* zeigten ein um etwa den Faktor 3,5 erhöhtes *FLC*-Level. Ein zusätzlicher Effekt auf *FLC* durch die Herabregulation von *AtGRP8* in *atgrp7-1 8i* war im LT nicht erkennbar.

Alle Ergebnisse aus den nun folgenden Untersuchungen der Doppelmutanten beziehen sich auf die Daten aus Abb. 4.15, aus Gründen der Übersichtlichkeit werden jedoch Col, *atgrp7-1*, und *atgrp7-1 8i* 9.9 in den folgenden Abbildungen nicht jedes Mal wieder mit aufgeführt.

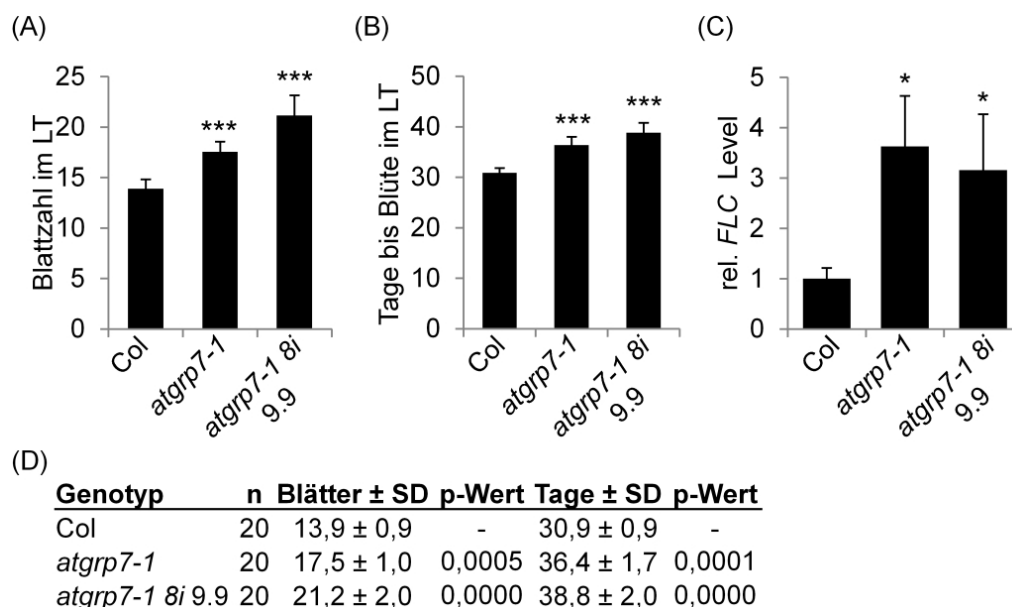


Abb. 4.15: Blühverhalten von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im LT-Blühexperiment

Wt (Col), *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* 9.9 wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\*\* p<0,001). (C) *FLC*-Transkriptlevel in 19 Tage alten Pflanzen. Mittelwert ± SD aus drei biologischen Replikaten. Bestimmung signifikanter Unterschiede mittels t-Test. (D) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in der Blattzahl und in der Tagesanzahl zu bestimmen.

#### 4.4.1 Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in *fca-9 atgrp7-1 8i*

Der Blühzeitpunkt von jeweils zwei unabhängigen, reziproken Kreuzungen der spätblühenden Mutante *fca-9* mit *atgrp7-1 8i* wurde im LT analysiert. *Fca-9* blühte nach 58 Tagen mit einer Blattzahl von 46. Die vier analysierten Linien der Doppelmutanten *fca-9 atgrp7-1 8i 9.9* blühten erst nach etwa 100 Tagen und damit signifikant später als *fca-9* (Abb. 4.16 B, C). Die Pflanzen bildeten keine normale Blattrosette aus, so dass die Anzahl der Blätter bei Blühbeginn nicht bestimmt werden konnte. Alle eingesetzten Linien wurden genotypisiert, um sicherzustellen, dass die Mutationsallele homozygot vorlagen. In allen Linien waren die Allele *atgrp7-1* und *fca-9* homozygot nachzuweisen (Abb. 4.16 D).

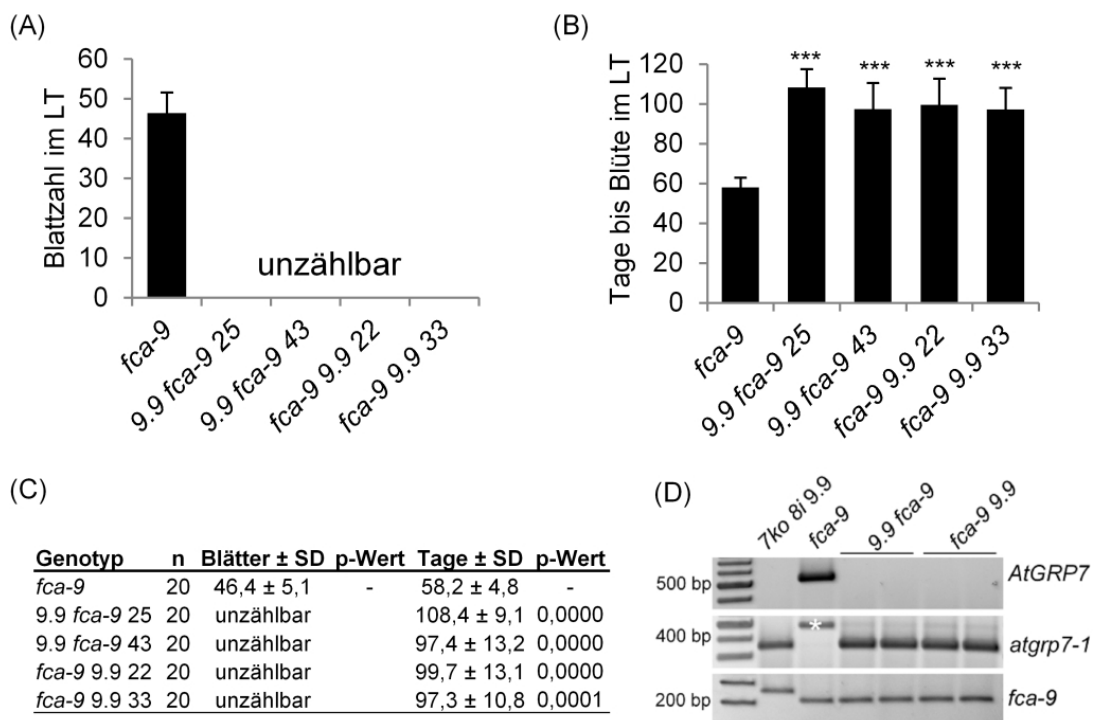


Abb. 4.16: Blühverhalten der Doppelmutanten *fca-9 atgrp7-1*

Die spätblühende Mutante *fca-9* sowie jeweils zwei Linien der reziproken Kreuzungen *fca-9 atgrp7-1 8i* (9.9 *fca-9* und *fca-9* 9.9) wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in der Tagesanzahl zu bestimmen. (D) Überprüfung des korrekten Genotyps aller verwendeten Linien (Asterisk markiert eine unspezifische Bande).

Während *fca-9* zwar spät im LT blühte, formten die Pflanzen dennoch normal ausgebildete Blätter und Blattrosetten und blühten aus dem zentralen SAM (Abb. 4.17 A). Die Pflanzen der Kreuzungen *atgrp7-1 8i fca-9* bildeten keine normale Rosette aus, so dass die Blattzahl nicht ermittelt werden konnte. Vielmehr starben alle Rosettenblätter mit der Zeit ab und aus den Lateralmeristemen wuchsen neue Blätter nach, die wieder eigenständige Rosetten formten. Dadurch bekam die ganze Pflanze ein buschiges Aussehen (Abb. 4.17 B). Erst nach langer Zeit wurden aus diesen Rosetten auch wieder Infloreszenzen ausgebildet, die Pflanzen waren nicht infertil. Ein Verlust von *AtGRP7*

zusätzlich zu *fca-9* wirkt sich also stark synergistisch aus und verlängert die vegetative Phase unter ansonsten induktiven Bedingungen ganz erheblich.

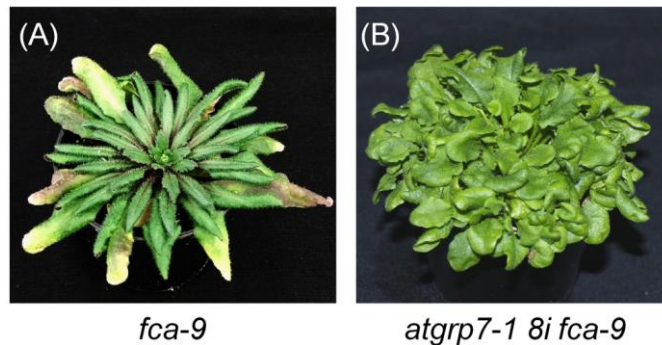


Abb. 4.17: Phänotyp von *fca-9* und *atgrp7-1 8i fca-9* im LT. Beide Pflanzen sind 8 Wochen alt.

Der synergistische Effekt der Doppelmutationen *fca-9* und *atgrp7-1 8i* auf den Blühphänotyp legt nahe, dass die beiden Gene unabhängig voneinander in der Blühinduktion wirken. Um dieses auch auf Transkriptebene zu bestätigen, wurde das Transkriptlevel von *FCA* in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* sowie in den drei *AtGRP7*-ox Linien bestimmt. In keiner der Pflanzenlinien mit Misexpression von *AtGRP7* zeigte sich eine wesentliche Veränderung gegenüber dem Wt Col (Abb. 4.18 A), *FCA* scheint also auch nicht auf Transkriptebene durch *AtGRP7* beeinflusst zu werden. Eine Analyse des *FLC*-Levels zeigte, dass für die Ausbildung des Blühphänotyps ein erhöhtes *FLC* Level verantwortlich sein könnte. In *fca-9* war dieses um den Faktor 35 gegenüber dem Wt erhöht, was mit dem späten Blühzeitpunkt korrelierte. In allen vier Linien der Doppelmutanten war *FLC* noch einmal zusätzlich erhöht, teilweise um den Faktor 50 (Abb. 4.18 B).

*FCA* fördert die Polyadenylierung von *FLC* Antisensetranskripten an einer Promotor-proximalen poly(A)-Sequenz (Liu et al., 2010). Entsprechend wirkt sich der Verlust der *FCA*-Funktion in *fca-9* in einer Bevorzugung der Promotor-distalen poly(A)-Sequenz aus. Das daraus resultierende Transkript wird auch als *FLC* antisense class II bezeichnet und geht einher mit einer Erhöhung der *FLC*-sense Transkription. Um zu überprüfen, ob *AtGRP7* die antisense-Transkription von *FLC* in *fca-9* zusätzlich erhöht, wurde das Level von *FLC* antisense class II in Pflanzen aus LT Blühversuchen bestimmt (Abb. 4.18 C). Für *fca-9* konnte die publizierte starke Erhöhung bestätigt werden, für *atgrp7-1 8i* war jedoch nur eine minimale Erhöhung gegenüber Col zu sehen. Weder in 9.9 *fca-9* noch in *fca-9 9.9* war eine zusätzliche Erhöhung verglichen mit *fca-9* zu beobachten. Das erhöhte *FLC*-Level in den Doppelmutanten wird also nicht über vermehrte antisense-Transkription vermittelt. Da auch in *atgrp7-1 8i* keine höhere antisense-Transkription festgestellt werden konnte, erscheint es unwahrscheinlich, dass *FLC* durch *AtGRP7* oder *AtGRP8* über die Beeinflussung der antisense-Transkription reguliert wird.

Die Doppelmutanten 9.9 *fca-9* sind durch eine Verlängerung der vegetativen Wachstumsphase gekennzeichnet. Ein Regulationsweg, der die Transition zwischen vegetativem und reproduktivem Wachstum steuert, ist der altersabhängige Signalweg, der gekennzeichnet ist durch die sequenzielle Expression der beiden miRNAs 156 und 172. Eine Überexpression von miR156 bewirkt eine Verlängerung der vegetativen Phase und die Pflanzen bilden einen Wuchstyp aus, der dem hier erzeugten 9.9 *fca-9* Doppelmutanten sehr ähnlich ist (Schwab et al., 2005). Um zu überprüfen, ob der Wuchstyp der Doppelmutanten tatsächlich auf eine konstitutive Expression der miR156 zurückgeht, wurde in einem indirekten Ansatz das Transkriptlevel des miR156 Zieltranskripts *SPL9* überprüft (Abb. 4.18 D).

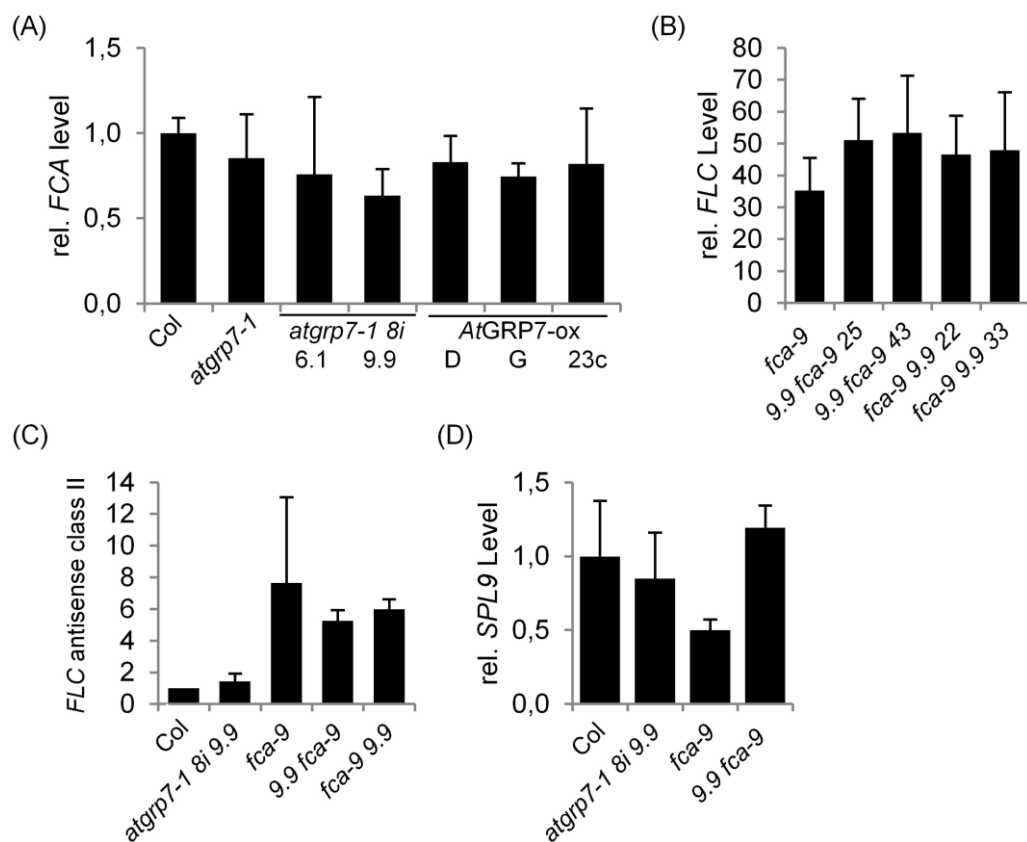


Abb. 4.18: Transkriptanalysen in *fca-9 atgrp7-1 8i*

(A) FCA-Transkriptlevel in Col, *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Die Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 5 Wochen geerntet. Das FCA-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biologischen Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt. (B-D) Transkriptlevel von *FLC*, *FLC antisense class II* und *SPL9* in *fca-9* und *fca-9 atgrp7-1 8i*. Mittelwerte  $\pm$  SD von drei biol. Replikaten im LT. Der Wert von Col ist jeweils auf 1 gesetzt.

In Col und *atgrp7-1 8i* 9.9 war die *SPL9* Abundanz gleich hoch, in *fca-9* war sie niedriger als im Wt. Dies weist auf die verlängerte vegetative Phase von *fca-9* und somit auf eine verstärkte Aktivität der miR156 hin. In der Doppelmutante 9.9 *fca-9* war *SPL9* jedoch um etwa den doppelten Wert gegenüber *fca-9* erhöht und somit wieder auf Wt-Niveau. Dies weist indirekt auf eine geringe Aktivität der miR156 hin und erklärt somit nicht den veränderten Wuchstyp der Pflanzen. Ein

gleiches Ergebnis wurde auch bei einem anderen Zieltranskript der miR156, *SPL3*, beobachtet (o. Abb.). Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die Kombination der beiden Mutationen *fca-9* und *atgrp7-1 8i* eine konstitutive Expression der miR156 bewirkt. Der beobachtete Wuchsphänotyp der Doppelmutanten muss daher unabhängig von der miR156-Expression sein.

#### 4.4.2 Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in *fpa-3 atgrp7-1 8i*

Der Blühzeitpunkt von jeweils zwei unabhängigen Linien der reziproken Kreuzungen *atgrp7-1 8i fpa-3* und *fpa-3 atgrp7-1 8i* wurde im LT ermittelt. *Fpa-3* blühte mit 55 Blättern, während die Pflanzen der Kreuzungen *atgrp7-1 8i 9.9 fpa-3* mit etwa 65 Blättern deutlich später blühten. Die zwei weiteren Linien *fpa-3 atgrp7-1 8i 9.9*, bei deren Kreuzung *fpa-3* die Mutterpflanze war, bildeten keine normal ausgeformte Blattrosette unter LT-Bedingungen aus, so dass die Blattzahl nicht bestimmt werden konnte (Abb. 4.19 A, C).

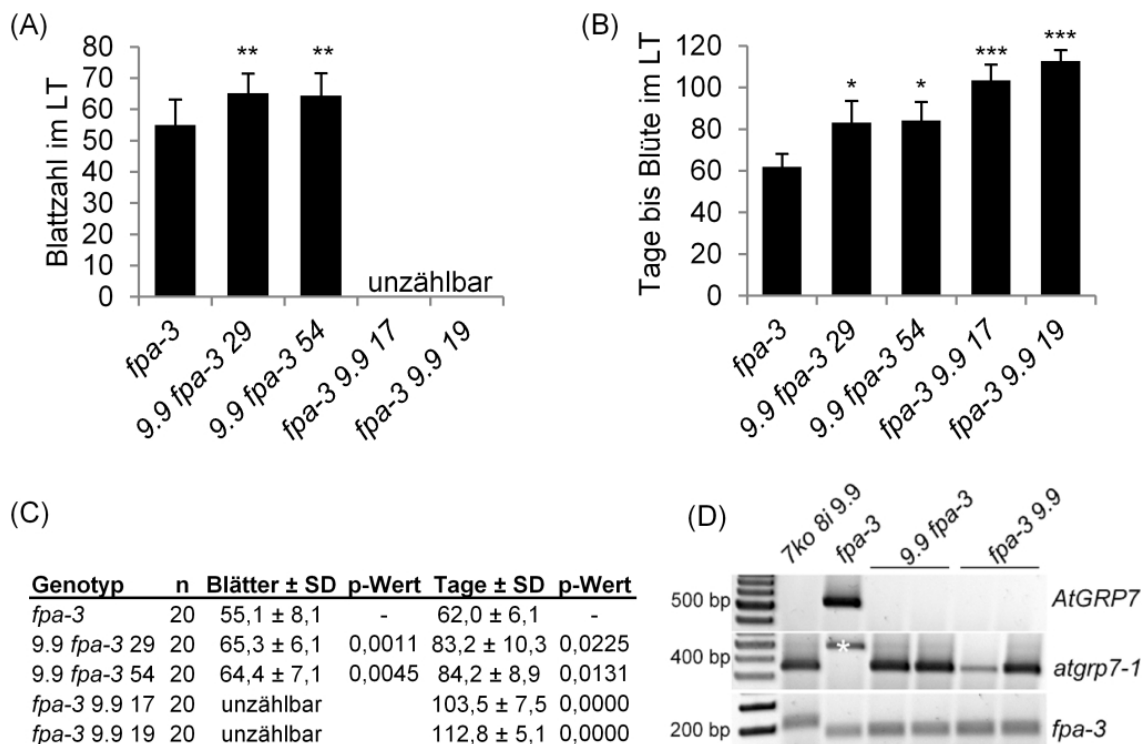


Abb. 4.19: Blühverhalten der Doppelmutanten *fpa-3 atgrp7-1 8i*

Die spätblühende Mutante *fpa-3* sowie jeweils zwei Linien der Kreuzungen *fpa-3 atgrp7-1 8i* (9.9 *fpa-3* und *fpa-3* 9.9) wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in den Daten zu bestimmen. (D) Überprüfung des korrekten Genotyps aller verwendeten Linien (Asterisk markiert eine unspezifische Bande).

Die Ausprägung des Phänotyps hing also von der Richtung der Kreuzung und somit vom epigenetischen Hintergrund der Pflanzen ab. Dies äußerte sich auch, wenn man die Tage von der



Aussaat bis zum Blühbeginn betrachtete (Abb. 4.19 B, C). Die Mutante *fpa-3* blühte nach 62 Tagen, während die beiden *atgrp7-1 8i fpa-3* Doppelmutanten nach 83 und 84 Tagen im LT blühten. Die Kreuzungslinien *fpa-3 atgrp7-1 8i* blühten nach 104 bzw. 113 Tagen und damit nochmals deutlich später. Es ist also ein klarer additiver Effekt der Doppelmutanten auf den Blühzeitpunkt im LT zu sehen, der allerdings stärker ausgeprägt ist, wenn *fpa-3* die Mutterpflanze und *atgrp7-1 8i* der Pollendonor ist.

In allen Linien wurde die Abwesenheit der Wt-Allele von *AtGRP7* und *FPA*, sowie das homozygote Vorliegen der Allele *atgrp7-1* und *fpa-3* durch Genotypisierung bestätigt (Abb. 4.19 D).

Auch der Blühphänotyp der *atgrp7-1 8i fpa-3* Doppelmutanten lässt vermuten, dass beide Proteine parallel auf die Blühinduktion einwirken. Um dies auch auf Transkriptebene zu bestätigen, wurde die Expression von *FPA* in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und in *AtGRP7-ox* untersucht (Abb. 4.20 A). In *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* zeigte sich kein verändertes Transkriptniveau gegenüber dem Wt Col. Die zwei *AtGRP7-ox* Linien D und G zeigten jedoch ein erhöhtes *FPA*-Level. Die dritte *AtGRP7-ox* Linie 23c, die gleichzeitig auch das geringste Maß an *AtGRP7-ox* zeigt, wies nur ein leicht erhöhtes *FPA*-Level auf. *AtGRP7-ox* scheint also einen moderat positiven Einfluss auf die Expressionsstärke von *FPA* zu besitzen. Eine Messung des *FLC*-Transkriptlevels (Abb. 4.20 B) zeigte für die Doppelmutanten *atgrp7-1 8i fpa-3* 29 und 54, bei denen *fpa-3* der Pollendonor war, keine Veränderungen verglichen mit *fpa-3*. Die Linien 17 und 19, bei denen *fpa-3* der Pollenrezipient war, zeigten jedoch ein höheres *FLC*-Transkriptlevel als *fpa-3*. Der Effekt prägte sich also wieder stärker aus, wenn *fpa-3* über die maternale Seite vererbt wurde. Trotz des späten Blühzeitpunktes bildeten die Linien 29 und 54 eine noch zählbare Anzahl von Blättern aus, während dies bei den Linien 17 und 19 nicht der Fall war. Dies korreliert mit den unterschiedlich hohen *FLC*-Levels dieser Pflanzen.

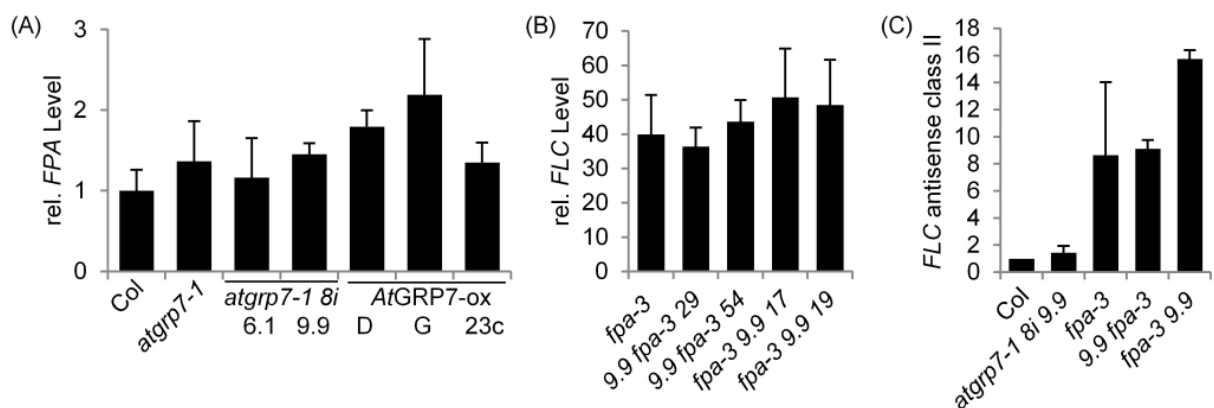


Abb. 4.20: Transkriptanalysen in *fpa-3 atgrp7-1 8i* Doppelmutanten

(A) *FPA*-Transkriptlevel in Col, *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Die Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 5 Wochen geerntet. Das *FPA*-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten. Der Wert von Col wurde auf 1 gesetzt. (B+C) Transkriptlevel von *FLC* und *FLC antisense class II* in *fpa-3* und *fpa-3 atgrp7-1 8i*. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten im LT. Der Wert von Col wurde auf 1 gesetzt.

FPA ist ebenfalls an der alternativen Polyadenylierung von *FLC* antisense Transkripten beteiligt (Hornyk et al., 2010a). Um zu überprüfen, ob der Verlust von *AtGRP7* einen zusätzlichen Effekt auf die Polyadenylierung der antisense Transkripte in *fpa-3* ausübt, wurde das Transkriptlevel des Promotor-distal polyadenylierten class II antisense Transkripts bestimmt (Abb. 4.20 C). In *fpa-3* war dieses um den Faktor 8 gegenüber dem Wt erhöht. In der Doppelmutante *atgrp7-1 8i fpa-3* zeigte sich keine Veränderung gegenüber *fpa-3*, erfolgte die Kreuzung jedoch wie bei der Linie *fpa-3 atgrp7-1 8i* in die andere Richtung, war das Transkriptlevel des class II antisense Transkripts um das 16-fache erhöht. Damit korrelierte es mit der erhöhten *FLC* sense Transkription in diesen Pflanzen. Die Doppelmutation *atgrp7-1 8i fpa-3* scheint demnach insgesamt einen stärkeren Effekt auf die Blühregulation auszuüben, wenn *fpa-3* der Pollenempfänger ist.

#### 4.4.3 Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in *flk-1 atgrp7-1* und *flk-1 atgrp7-1 8i*

Der Blühzeitpunkt von zwei unabhängigen Linien der Kreuzung *atgrp7-1 flk-1*, einer Linie der reziproken Kreuzung *flk-1 atgrp7-1* sowie zwei Linien der Kreuzung *flk-1 atgrp7-1 8i* 9.9 wurde im LT untersucht (Abb. 4.21 A,B,C).

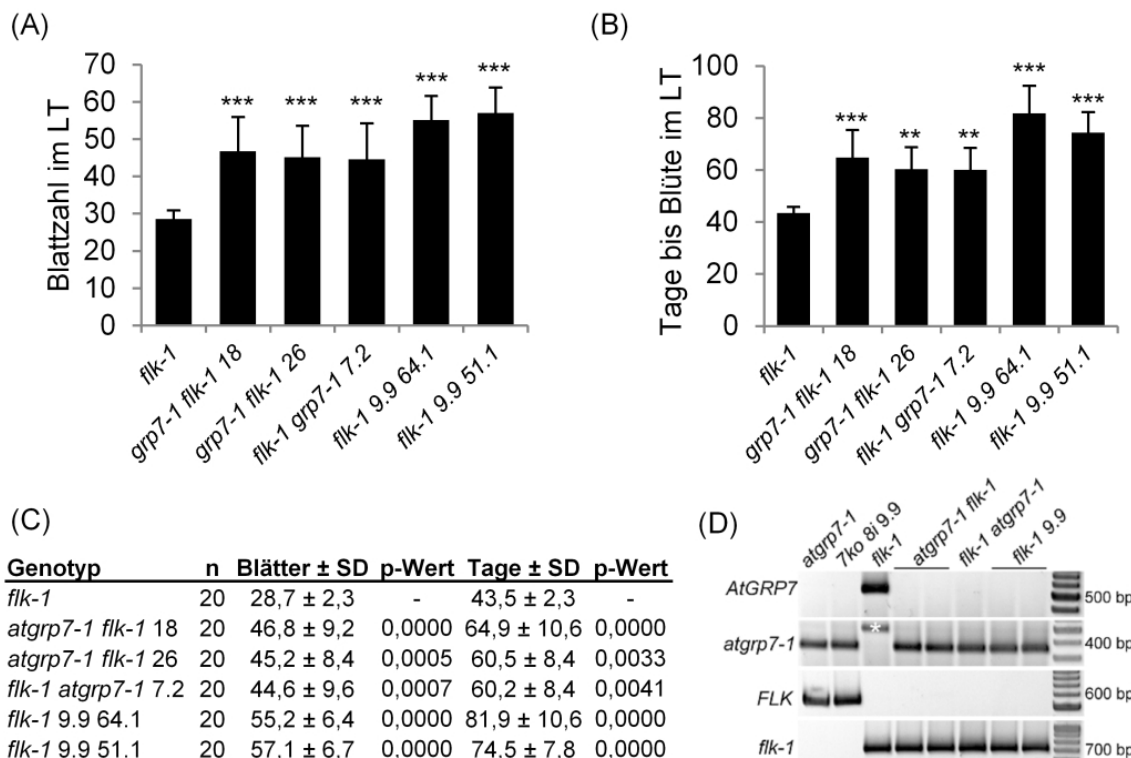


Abb. 4.21: Blühverhalten der Doppelmutanten *flk-1 atgrp7-1* und *flk-1 atgrp7-1 8i*

Die spätblühende Mutante *flk-1*, drei Linien reziproker Kreuzungen *flk-1 atgrp7-1* (*atgrp7-1 flk-1* und *flk-1 atgrp7-1*) sowie zwei Linien *flk-1 atgrp7-1 8i* 9.9 wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in den Daten zu bestimmen. (D) Überprüfung des korrekten Genotyps aller verwendeten Linien (Asterisk markiert eine unspezifische Bande).

*FLK-1* blühte im LT mit 28,7 Blättern und zeigte damit den am geringsten verspäteten Blühzeitpunkt von allen Mutanten des autonomen Signalwegs. Die Pflanzen der beiden Kreuzungen *atgrp7-1 flk-1* blühten mit 46,8 und 45,2 Blättern und somit signifikant später als *flk-1*. Auch die Linie *flk-1 atgrp7-1* blühte mit 44,6 Blättern signifikant später als *flk-1*. Die Pflanzen der Kreuzungen *flk-1 atgrp7-1 8i* 9.9 blühten mit 55,2 und 57,1 Blättern im LT. Dies war noch einmal deutlich später als die Doppelmutanten *atgrp7-1 flk-1*. Die zusätzliche Herabregulation von *AtGRP8* verstärkt also in *flk-1* die Verspätung des Blühzeitpunkts zusätzlich. Alle Linien der Doppelmutanten benötigten auch einen längeren Zeitraum bis zur Blüte. Alle eingesetzten Pflanzen waren homozygot für die T-DNA Allele *atgrp7-1* und *flk-1*, entsprechend konnten die Wt-Allele *AtGRP7* und *FLK* nicht detektiert werden (Abb. 4.21 D).

Das Transkriptlevel von *FLK* wurde in den Linien *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und in *AtGRP7-ox* überprüft (Abb. 4.22 A). In *atgrp7-1* und beiden *atgrp7-1 8i* Linien zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber Col. Auch in den *AtGRP7-ox* Linien zeigte sich keine starke Veränderung, tendenziell war hier jedoch das *FLK*-Niveau höher als in Col. Es ist daher davon auszugehen, dass *FLK* auf Transkriptebeine nicht durch *AtGRP7* reguliert wird. Das leicht höhere Niveau von *FLK* in *AtGRP7-ox* könnte durch seine Rolle in der Blühinduktion erklärt werden, die bei *AtGRP7-ox* auf Grund der reduzierten *FLC*-Expression früher ablaufen könnte, und wäre somit ein indirekter Effekt. Für *FLK* ist zudem eine alternative Splicevariante beschrieben, bei der Intron 1 retendiert wird. Dieses führt zu einem nicht funktionellen Protein, das *FLC* nicht herabregulieren kann (Deng et al., 2010). Die Expression dieser Splicevariante wurde in den *AtGRP7* Misexpressionslinien untersucht, es konnte jedoch keine Veränderung gegenüber dem Wt festgestellt werden (o. Abb.).

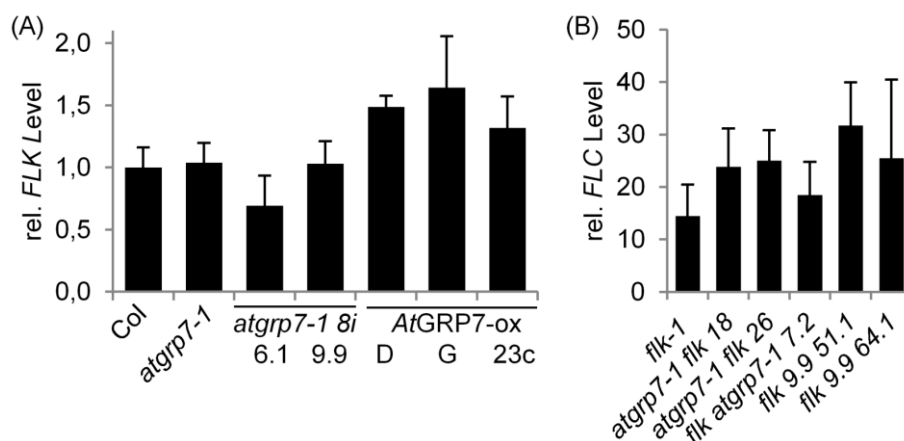


Abb. 4.22: *FLK*- und *FLC*-Transkriptanalysen

(A) *FLK*-Transkriptlevel in Col, *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Die Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 5 Wochen geerntet. Das FPA-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt. (B) *FLC*-Transkriptlevel in *flk-1*, *flk-1 atgrp7-1* und *flk-1 atgrp7-1 8i*. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten im LT. Der Wert von Col wurde auf 1 gesetzt.

Das *FLC*-Transkriptlevel wurde bestimmt, um zu überprüfen, ob der additive Effekt auf den Blühzeitpunkt der *atgrp7-1 flk-1* und *atgrp7-1 8i flk-1* Doppelmutanten mit einer Erhöhung des *FLC*-Levels einher geht (Abb. 4.22 B). In *flk-1* war *FLC* um den Faktor 14 gegenüber dem Wt erhöht. Alle Doppelmutanten zeigten ein im Mittel höheres Level von *FLC*. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass ein erhöhtes *FLC*-Level mit verantwortlich für den verspäteten Blühzeitpunkt von *atgrp7-1 flk-1* und *atgrp7-1 8i flk-1* Doppelmutanten ist

#### 4.4.4 Analyse von Blühzeitpunkt und Transkripten der Blühregulation in *fld-3 atgrp7-1*

Neben den RBPs bilden Chromatin-Modifikatoren die zweite Klasse der an der autonomen Blühregulation beteiligten Proteine. Um die genetische Interaktion von AtGRP7 auch mit einem Vertreter dieses Zweigs des autonomen Signalwegs zu überprüfen, wurde *atgrp7-1* mit der T-DNA Insertionslinie *fld-3* gekreuzt, bei der die Histon Demethylase FLD funktionslos ist. Der Blühzeitpunkt vier unabhängiger Linien der Doppelmutanten wurde im LT ermittelt (Abb. 4.23 A-C).

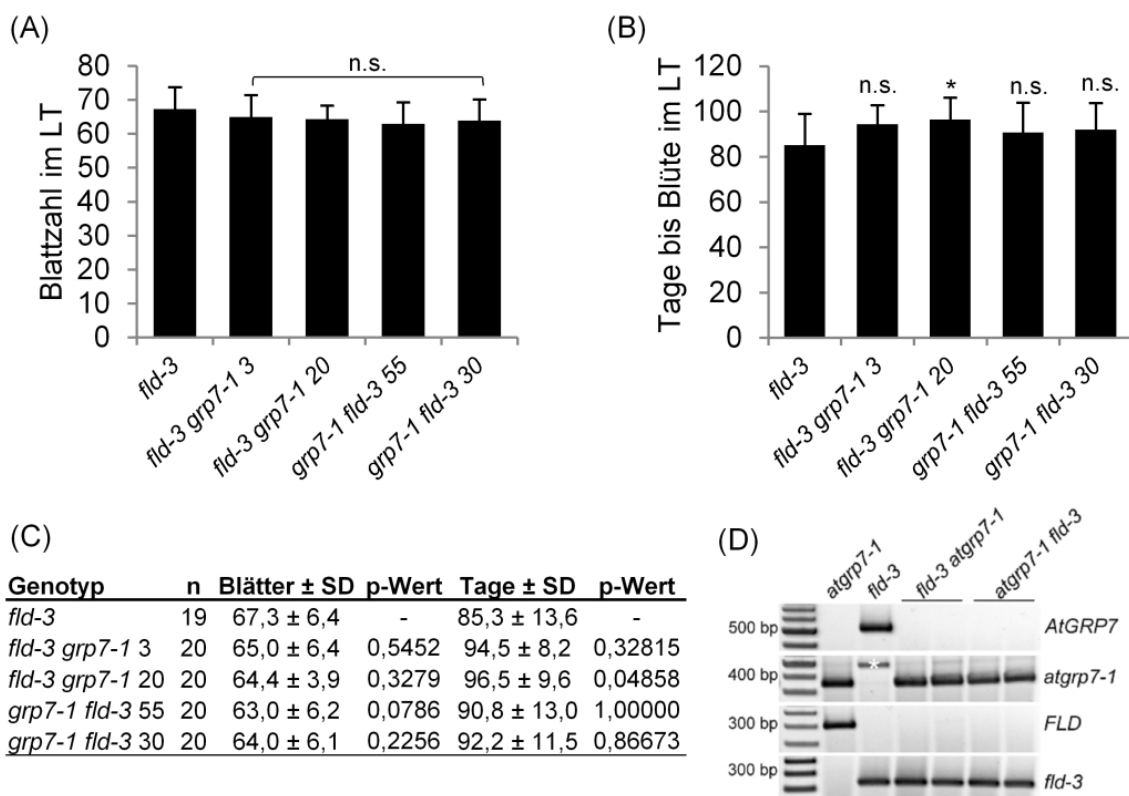


Abb. 4.23: Blühverhalten der Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1*

Die spätblühende Mutante *fld-3* sowie jeweils zwei Linien der Kreuzungen *fld-3 atgrp7-1* (*fld-3 atgrp7-1* und *atgrp7-1 fld-3*) wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; n.s.=nicht signifikant). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in den Daten zu bestimmen. (D) Überprüfung des korrekten Genotyps aller verwendeten Linien (Asterisk markiert eine unspezifische Bande).

Die Mutante *fld-3* blühte im Experiment mit 67,3 Blättern und 85,3 Tage nach der Aussaat. Alle Linien der Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1* bzw. *atgrp7-1 fld-3* blühten mit 63 bis 65 Blättern und damit nicht signifikant unterschiedlich zu *fld-3*. Die Doppelmutanten blühten nach einem Zeitraum von 91 bis 96 Tagen nach der Aussaat. Dies ist geringfügig später als *fld-3*, der Unterschied ist jedoch nur bei der am spätesten blühenden Linie *fld-3 atgrp7-1* 20 statistisch signifikant. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich *fld-3* auf genetischer Ebene epistatisch zu *atgrp7-1* verhält, so dass sich ein Fehlen von *AtGRP7* nicht weiter additiv auf den Blühphänotyp von *fld-3* auswirkt. Um sicher zu gehen, dass der beobachtete Effekt real ist und die Linien auch wirklich kein funktionsfähiges *AtGRP7* enthalten, wurden sie auf das homozygote Vorliegen der T-DNA Allele *atgrp7-1* und *fld-3* überprüft, das aber in allen Fällen gegeben war (Abb. 4.23 C).

Das FLD Transkriptlevel wurde in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und in den drei *AtGRP7-ox* Linien analysiert (Abb. 4.24 A). Es zeigte sich eine leichte Reduktion in *atgrp7-1 8i* 6.1 und 9.9, die zum verspäteten Blühzeitpunkt dieser Linien beitragen könnte. In allen anderen Linien war das Transkriptlevel unbeeinflusst. In den Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1* wurde zudem *FLC* als gemeinsames Ziel von *AtGRP7* und FLD untersucht (Abb. 4.24 B). In *fld-3* war *FLC* um den Faktor 42 erhöht. Alle Doppelmutanten zeigten gegenüber der *fld-3* Einzelmutante keine Veränderung im *FLC*-Level. Somit kann auch ein additiver Effekt der beiden Mutationen auf die *FLC*-Expression ausgeschlossen werden. Zudem korreliert das unveränderte *FLC*-Transkriptlevel mit dem unveränderten Blühzeitpunkt der Doppelmutanten gegenüber *fld-3*.

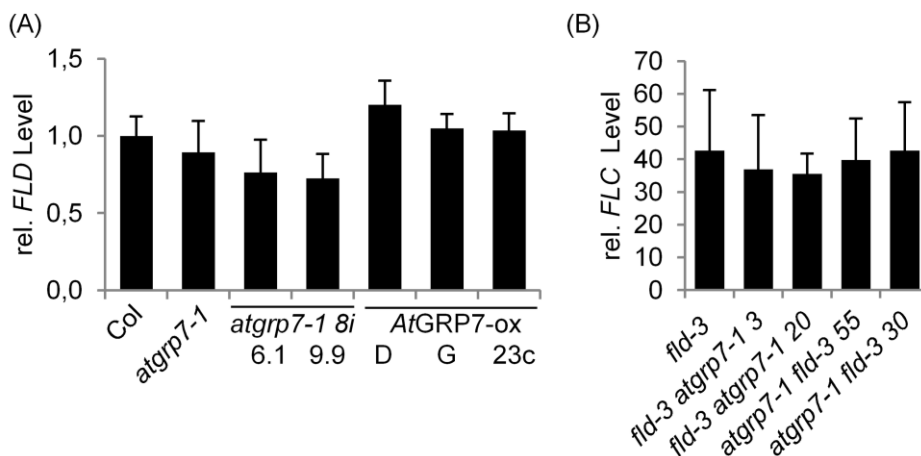


Abb. 4.24: FLD- und *FLC*-Transkriptanalysen

(A) FLD-Transkriptlevel in Col, *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Die Pflanzen wurden im KT angezogen und nach 5 Wochen geerntet. Das FPA-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten. Der Wert von Col im ersten Experiment wurde auf 1 gesetzt. (B) *FLC*-Transkriptlevel in *fld-3* und den *fld-3 atgrp7-1* Doppelmutanten. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 biol. Replikaten im LT. Der Wert von Col wurde auf 1 gesetzt.

Zunächst standen für die Analyse der Interaktion zwischen *AtGRP7* und FLD nur die Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1* zur Verfügung. Im weiteren Verlauf der Experimente konnten jedoch auch

Doppelmutanten aus Kreuzungen von *atgrp7-1 8i 9.9* mit *fld-3* identifiziert werden. Bei diesen wurde ebenfalls der Blühzeitpunkt im LT bestimmt (Abb. 4.25 A-C). In diesem Experiment blühte *fld-3* mit 59 Blättern und 83,7 Tage nach der Aussaat. Alle Linien der Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1 8i* bzw. *atgrp7-1 8i fld-3* blühten mit Blattzahlen zwischen 56,5 und 59,2 sowie in einem Zeitraum zwischen 82,6 und 89,2 Tagen nach Aussaat. Sie verhielten sich damit nicht signifikant unterschiedlich zu *fld-3*. Dies bestätigt die bereits bei der Analyse der *atgrp7-1 fld-3* Doppelmutanten gewonnenen Ergebnisse. Die Kombination der Mutationen *atgrp7-1 8i* und *fld-3* führt zu keinem additiven Effekt auf den Blühzeitpunkt im LT. Die Mutation *fld-3* verhält sich epistatisch zu *atgrp7-1*. Auch das reduzierte Level von AtGRP8 in *atgrp7-1 8i* gegenüber *atgrp7-1* führt zu keiner Veränderung im Blühzeitpunkt der Doppelmutanten mit *fld-3*. Somit ist ausgeschlossen, dass ein erhöhtes Level von AtGRP8 in *atgrp7-1 fld-3* mögliche additive Effekte des Verlustes von AtGRP7 auf den Blühzeitpunkt wieder maskiert.

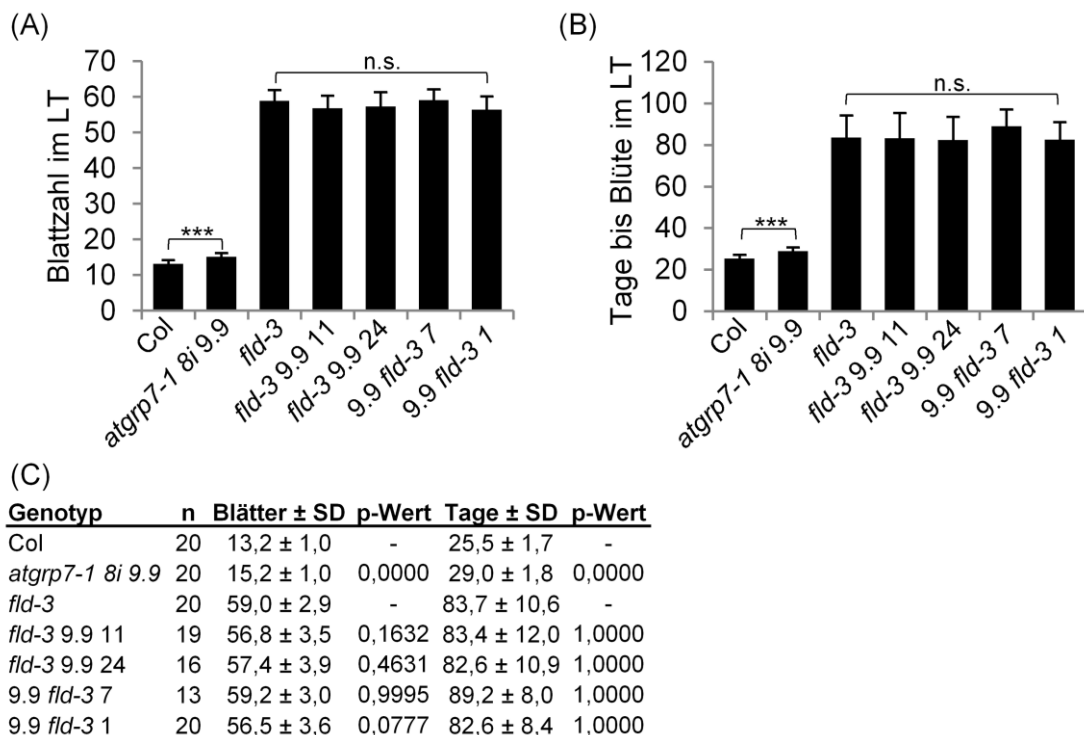


Abb. 4.25: Blühverhalten der Doppelmutanten *fld-3 atgrp7-1 8i*

Wt (Col), *atgrp7-1 8i 9.9*, *fld-3* sowie jeweils zwei Linien der reziproken Kreuzungen *fld-3 atgrp7-1 8i* (*fld-3 9.9* und *9.9 fld-3*) wurden im LT angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter bei Blühbeginn. (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte (Mittelwerte ± SD; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant). (C) Statistische Auswertung der Blühdaten. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede in den Daten zu bestimmen.

## 4.5 Temperaturabhängige Expression von *AtGRP7* und *AtGRP8*

### 4.5.1 Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Proteinlevel von *AtGRP7* und *AtGRP8*

Die beiden RBPs *AtGRP7* und *AtGRP8* reagieren auf diverse externe Stimuli. Die Transkripte sind ursprünglich als kälteinduziert beschrieben worden (Carpenter et al., 1994) und für *AtGRP7* konnte eine Erhöhung des Proteinlevels nach Kälteexposition festgestellt werden (Schöning et al., 2008). Es wurde daher überprüft, wie die Proteinlevel von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf unterschiedliche Umgebungstemperaturen reagieren und ob sich unterschiedliche Proteinlevel auf den Blühzeitpunkt bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen auswirken. Dazu wurden zunächst Col Wt Pflanzen, *AtGRP7-ox* D und G sowie *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im KT bei Temperaturen von 16 °C, 20 °C und 27 °C angezogen. Da sich die Pflanzen bei den unterschiedlichen Temperaturen auch unterschiedlich schnell entwickelten, wurden sie geerntet, nachdem sie 6 Blätter gebildet hatten, um einen vergleichbaren Entwicklungszustand zu gewährleisten. Die Proteinlevel von *AtGRP7* und *AtGRP8* wurden anschließend mittels Immunoblot ermittelt (Abb. 4.26). In Col zeigte sich eine starke Abnahme von *AtGRP7* zu 27 °C verglichen mit 20 °C. Bei 16 °C zeigte sich kein Unterschied zu 20 °C. Die gleiche Abnahme des Proteinlevels zu 27 °C war auch in *AtGRP7-ox* D und G zu beobachten, der Effekt bestand also unabhängig davon, ob das Protein unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurde oder unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Bei 16 °C war keine Veränderung des Proteinlevels gegenüber 20 °C festzustellen. Insgesamt reagiert also sowohl das endogene Protein als auch das ektopisch überexprimierte Protein in gleicher Weise auf die Umgebungstemperatur, wenn auch die Proteinlevel in *AtGRP7-ox* insgesamt höher sind. In *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* war erwartungsgemäß kein *AtGRP7* zu detektieren.

Das Protein *AtGRP8* reagiert wesentlich weniger auf Temperaturveränderungen. In Col zeigte sich eine geringe Zunahme bei 27 °C, die vermuten lässt, dass sie auf die Verminderung der negativen Regulation durch *AtGRP7* zurück zu führen ist. In *AtGRP7-ox* war das Proteinlevel von *AtGRP8* durch diese negative Regulation unter der Nachweisgrenze. Durch Aufhebung der negativen Regulation in *atgrp7-1* war *AtGRP8* stärker zu detektieren als im Wt. Es zeigte sich jedoch kein starker Temperatureinfluss auf die Proteinmengen. In *atgrp7-1 8i* war das Level von *AtGRP8* durch das RNAi-Konstrukt vermindert. Die geringste Konzentration zeigten die Pflanzen, die bei 20 °C wuchsen, zu 16 °C und 27 °C war das *AtGRP8*-Level jeweils erhöht. Trotz der großen Ähnlichkeit der beiden Proteine zeigt nur *AtGRP7* eine ausgeprägte Temperaturreaktion.

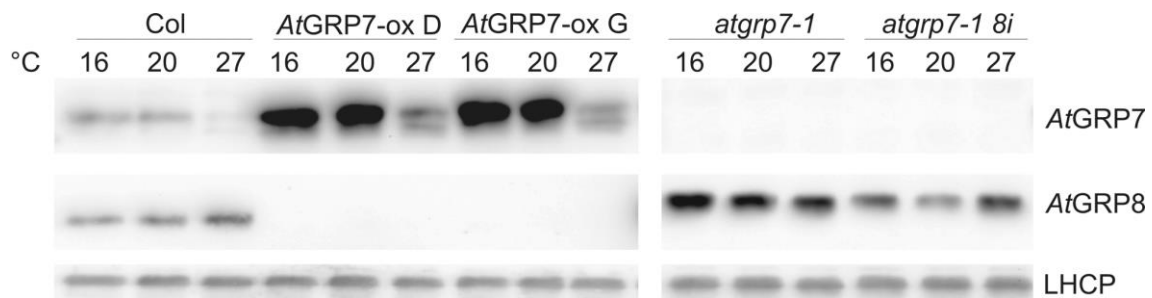


Abb. 4.26: Proteinlevel von AtGRP7 und AtGRP8 bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen Wt (Col), AtGRP7-ox D und G, *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wurden im KT bei 16 °C, 20 °C und 27 °C bis zum 6-Blatt Stadium angezogen. Die Detektion von AtGRP7 und AtGRP8 mittels Immunoblot erfolgte mit spezifischen Anti-Peptid-Antikörpern. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion von LHCP diente als Ladekontrolle.

#### 4.5.2 Einfluss eines Temperatursprungs von 20 °C zu 27 °C auf das AtGRP7 Proteinlevel

AtGRP7 reagiert auf höhere Umgebungstemperaturen mit einer Abnahme des Proteinlevels. Um sicherzugehen, dass ein verringertes Proteinlevel unmittelbar mit der Temperaturveränderung zusammenhängt und nicht die Folge einer veränderten pflanzlichen Entwicklung bei der jeweiligen Temperatur ist, wurde *Arabidopsis* für 14 Tage bei 20 °C im LT angezogen und dann die Temperatur auf 27 °C umgestellt, um nach 24 h das AtGRP7-Level zu bestimmen. Zugleich wurde überprüft, ob die Temperaturreaktion des Proteins über die Promotoraktivität vermittelt wird oder ob die Regulation am Protein selbst auf translationeller oder post-translationeller Ebene ansetzt. Dazu wurden neben den AtGRP7-Levels in Wt und AtGRP7-ox D auch die Proteinlevel eines AtGRP7-GFP Fusionsproteins im Wt und in *atgrp7-1* bestimmt (*AtGRP7::AtGRP7-GFP* in Col und *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in *atgrp7-1*). Als Kontrolle diente GFP-Protein, das unter der Kontrolle des AtGRP7-Promotors im Wt exprimiert wurde (*AtGRP7::GFP*). Abb. 4.27 (A) zeigt die Reaktion von AtGRP7 auf einen Temperatursprung von 20 °C zu 27 °C, detektiert mit dem gegen AtGRP7 gerichteten Antikörper. In Col war das Proteinlevel 24 h nach dem Transfer unter das Detektionslimit gefallen. Auch in AtGRP7-ox D hatte die AtGRP7 Konzentration bei 27 °C deutlich gegenüber 20 °C abgenommen. Trotzdem war verglichen mit Col noch eine starke Expression zu erkennen. Die Linie *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in Col exprimiert ein AtGRP7-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des AtGRP7 Promotors im Wt-Hintergrund. Das endogene AtGRP7 (bei ca. 16 kDa) zeigte daher die gleiche Reaktion wie in Col. Das etwa 45 kDa große Fusionsprotein AtGRP7-GFP dagegen wurde stärker exprimiert als das endogene AtGRP7, zeigte aber auch eine deutliche Konzentrationsabnahme bei 27 °C. Das gleiche Bild zeigte sich bei *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in *atgrp7-1*. Die Expression des Fusionsproteins war hier noch stärker, doch die Temperaturreaktion war gleich ausgeprägt wie in allen anderen Linien. Endogenes AtGRP7 war in dieser Linie wie erwartet nicht zu detektieren. *AtGRP7::GFP* zeigte die gleiche Temperaturreaktion wie der Wt. Mit dem Antikörper gegen AtGRP7



konnte hier kein *AtGRP7*-GFP Fusionsprotein detektiert werden, da einzig GFP unter der Kontrolle des *AtGRP7* Promotors exprimiert wurde.

Abb. 4.27 (B) zeigt den gleichen Immunoblot wie zuvor, der diesmal mit einem gegen GFP gerichteten monoklonalen Antikörper detektiert wurde. Col und *AtGRP7-ox D* exprimierten erwartungsgemäß kein GFP. Bei den Linien *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in Col und *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in *atgrp7-1* wurde mit dem anti-GFP-Antikörper die gleiche Abnahme des *AtGRP7*-GFP Fusionsproteins bei 27 °C detektiert, wie zuvor mit dem gegen *AtGRP7* gerichteten Antikörper. In *AtGRP7::GFP* dagegen war das reine GFP-Level bei 27 °C gegenüber 20 °C unverändert..

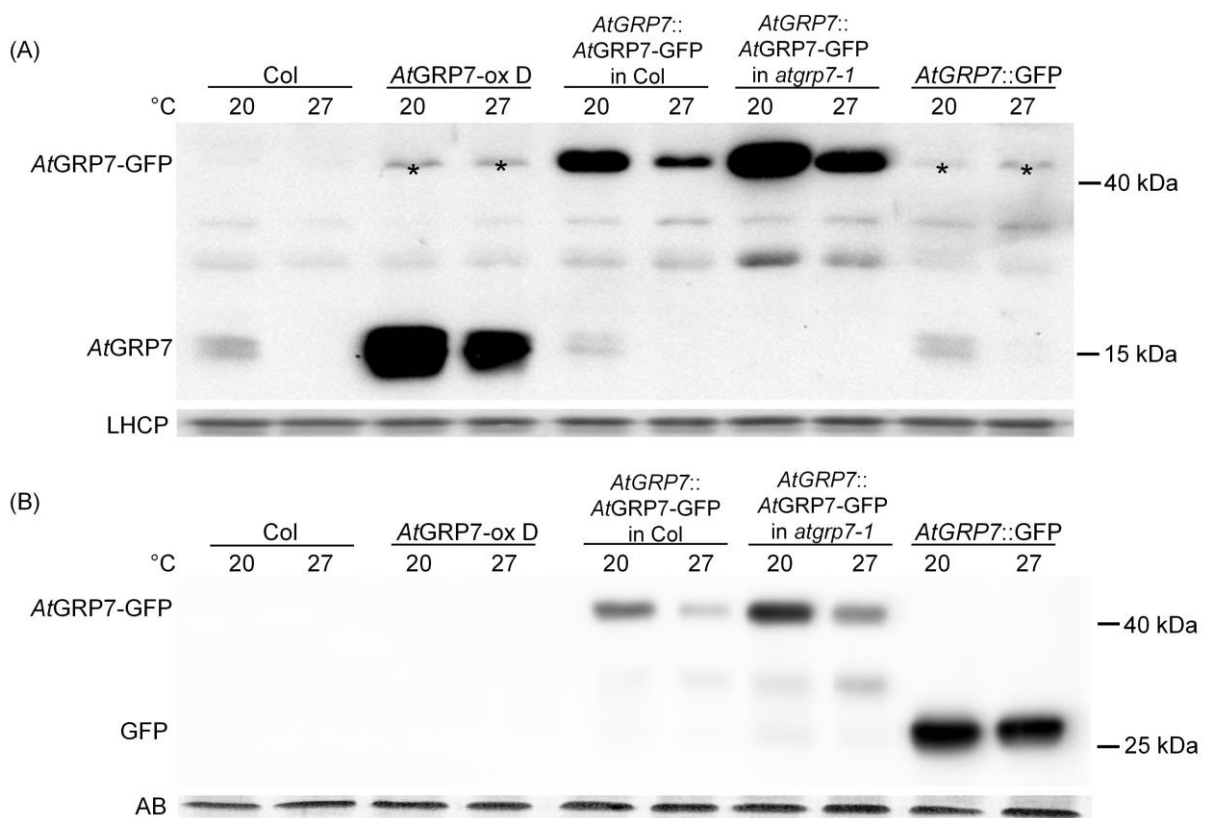


Abb. 4.27: Reaktion von *AtGRP7* auf einen Temperatursprung von 20 °C zu 27 °C

Wt (Col), *AtGRP7-ox D*, Pflanzen, die ein *AtGRP7*-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *AtGRP7*-Promotors exprimieren (*AtGRP7::AtGRP7-GFP* in Col und *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in *atgrp7-1*) sowie Pflanzen, die nur GFP unter Kontrolle des *AtGRP7*-Promotors exprimieren (*AtGRP7::GFP*), wurden im LT auf MS-Agarplatten für 14 Tage bei 20 °C angezogen und anschließend 24 h zu 27 °C gestellt. (A) Detektion von *AtGRP7* und *AtGRP7*-GFP mit einem Anti-Peptid-Antikörper gegen *AtGRP7*. Asterisken markieren unspezifische Banden. Als Ladekontrolle dient LHCPII. (B) Detektion von *AtGRP7*-GFP und GFP mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFP. AB=Amidoblackfärbung der Membran als Ladekontrolle.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass die Verringerung von *AtGRP7* bei höherer Umgebungstemperatur durch eine Regulation auf Proteinebene erfolgt. Das Protein in *AtGRP7-ox* zeigt die gleiche Temperaturreaktion wie im Wt, obwohl es unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors exprimiert wird. Ein *AtGRP7*-GFP Fusionsprotein zeigt ebenfalls diese Reaktion, während reines GFP im Gegensatz dazu temperaturstabil bleibt, auch wenn es unter Kontrolle des *AtGRP7*

Promotors exprimiert wird. *AtGRP7* kann also die Verminderung von GFP temperaturabhängig vermitteln.

Um eine differentielle Aktivität des *AtGRP7*-Promotors bei 20 °C und 27 °C definitiv auszuschließen, wurde zudem sowohl das *GFP*-Transkript, als auch das *AtGRP7*-Transkript mittels RT-PCR bzw. real time PCR quantifiziert. Weder in *AtGRP7::AtGRP7-GFP* in *atgrp7-1* noch in *AtGRP7::GFP* zeigte sich eine temperaturabhängige Veränderung der *GFP*-Expressionsstärke (Abb. 4.28 A, B). Auch das *AtGRP7*-Transkriptlevel wurde in beiden Linien nicht durch den Temperatursprung beeinflusst (Abb. 4.28 C). Die Abnahme der Proteinmenge bei 27 °C ist also keine Folge einer verringerten Promotoraktivität.

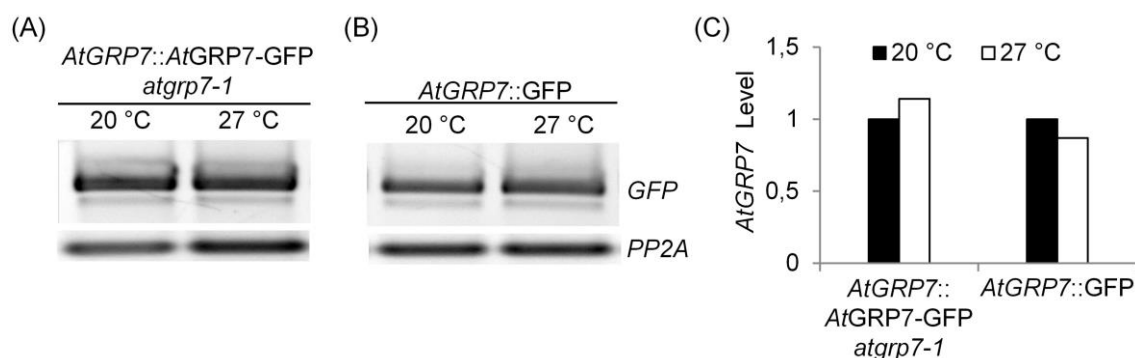


Abb. 4.28: Transkriptabundanz von *GFP* und *AtGRP7* bei 20 °C und 27 °C

*AtGRP7::AtGRP7-GFP* *atgrp7-1* und *AtGRP7::GFP* wurden im LT auf MS-Agarplatten für 14 Tage bei 20 °C angezogen und anschließend 24 h zu 27 °C gestellt. *GFP*-Transkriptlevel wurden mittels RT-PCR bei *AtGRP7::AtGRP7-GFP* *atgrp7-1*(A) und *AtGRP7::GFP* (B) bestimmt. Als Ladekontrolle diente PP2A. (C) Bestimmung von *AtGRP7*-Transkript mittels real time PCR. Mittelwerte aus zwei techn. Replikaten.

#### 4.5.3 Kinetik der *AtGRP7*-Reduktion bei Erhöhung der Umgebungstemperatur

Um den zeitlichen Ablauf zu ermitteln, mit dem die Reduktion von *AtGRP7* bei steigender Umgebungstemperatur abläuft, wurden Pflanzen im LT bei 20 °C für 14 Tage angezogen. Zum Zeitpunkt *zt* 8 wurde die Temperatur im Anzuchtschrank auf 27 °C erhöht. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle 4 h über einen Zeitraum von 24 h Proben genommen und das *AtGRP7*- und *GFP*-Level bestimmt. In *Col* zeigte sich bereits nach 4 h eine deutliche Reduktion des *AtGRP7*-Levels, die sich immer weiter fortsetzte, bis die Proteinmenge nach 24 h unter das Detektionsniveau fiel. Auch in *AtGRP7-ox* D war bereits nach 4 h eine Abnahme des Proteins zu erkennen, die sich über den weiteren Tagesverlauf fortsetzte. Zu allen Zeitpunkten war hier das Proteinniveau jedoch höher als in *Col* (Abb. 4.29 A). Die Linie *AtGRP7::AtGRP7-GFP* *atgrp7-1* exprimiert ein Fusionsprotein aus *AtGRP7* und *GFP* unter der Kontrolle des Promotors sowie des 3'- und 5'-UTRs von *AtGRP7*. Auch in dieser Linie konnte mit einem gegen *GFP* gerichteten Antikörper eine Reduktion von *AtGRP7-GFP* beobachtet werden, die aber erst 20 h nach dem Temperatursprung auf 27 °C einsetzte. Die

Reduktion des Fusionsproteins AtGRP7-GFP verläuft also sehr viel langsamer als die Reduktion von AtGRP7. In *AtGRP7::GFP atgrp7-1* wird nur GFP unter der Kontrolle des AtGRP7-Promotors exprimiert. Das GFP Level blieb über die gesamte Dauer des Experiments konstant. GFP ist bei diesen Temperaturen also stabil und auch der AtGRP7-Promotor scheint keine temperaturabhängige Expression von GFP zu vermitteln (Abb. 4.29 B).

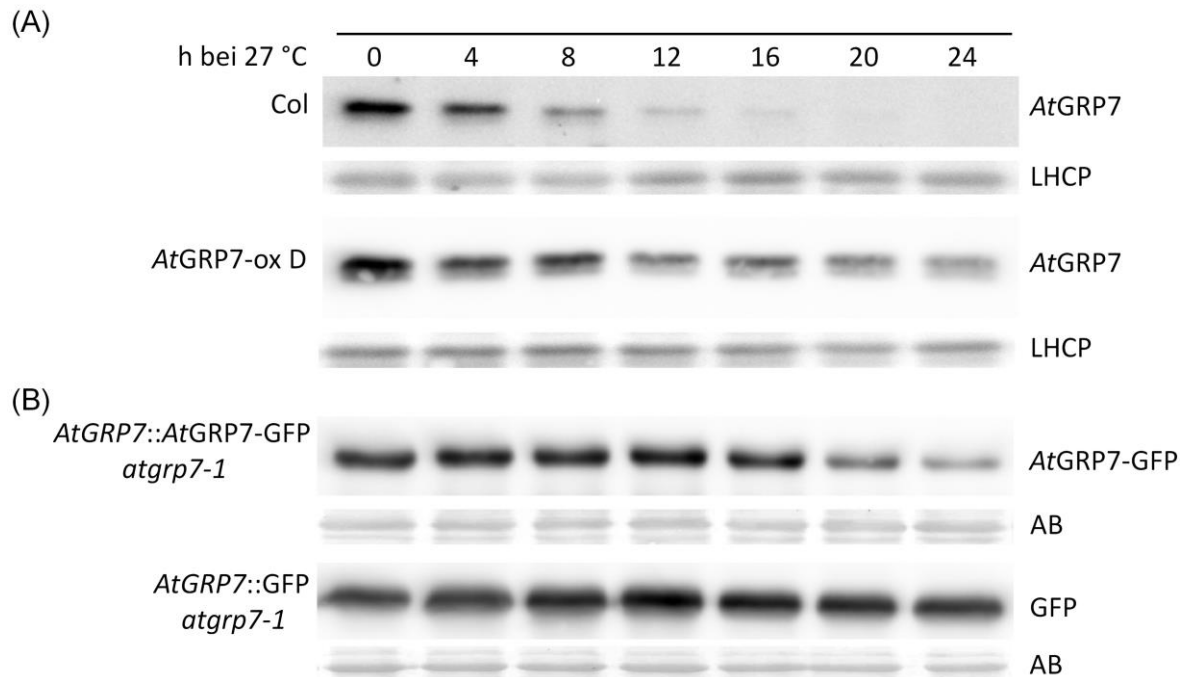


Abb. 4.29: Kinetik der Reduktion des AtGRP7-Proteinlevels bei 27 °C

Wt (Col), *AtGRP7-ox D*, Pflanzen, die ein AtGRP7-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des AtGRP7-Promotors exprimieren (*AtGRP7::AtGRP7-GFP atgrp7-1*) sowie Pflanzen, die nur GFP unter Kontrolle des AtGRP7-Promotors exprimieren (*AtGRP7::GFP atgrp7-1*), wurden im LT auf MS-Agarplatten für 14 Tage bei 20 °C angezogen und anschließend für 24 h zu 27 °C gestellt. Die Probennahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. (A) Detektion von AtGRP7 mit einem spezifischen Anti-Peptid-Antikörper gegen AtGRP7. LHCP dient als Ladekontrolle. (B) Detektion von AtGRP7-GFP und GFP mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFP. AB=Amidoblackfärbung der Membran als Ladekontrolle.

#### 4.6 Blühverhalten von Pflanzen mit einer Misexpression von AtGRP7 bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen

Die vorhergehenden Ergebnisse haben gezeigt, dass AtGRP7 ein Protein ist, dessen Konzentration temperaturabhängig reguliert wird und zu höheren Umgebungstemperaturen stark abnimmt. Um zu überprüfen, ob die AtGRP7-Konzentration Einfluss auf den Blühzeitpunkt von *Arabidopsis* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen hat, wurden *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und die *AtGRP7-ox* Linien unter nicht induktiven KT-Bedingungen bei konstanten Umgebungstemperaturen von 16 °C, 20 °C und 27 °C angezogen und der Blühzeitpunkt bestimmt (Abb. 4.30 und Tab. 4.1). Dabei haben kühlere Temperaturen eine verzögernde Auswirkung, während bei 27 °C die Blühinduktion

beschleunigt wird und die Pflanze mit einer geringen Anzahl von Blättern, ähnlich wie im LT, blüht (Balasubramanian et al., 2006).

Bei 20 °C blühte Col mit 57,2 Blättern, während *atgrp7-1* mit 63,6 Blättern und die beiden *atgrp7-1 8i*-Linien mit 68,6 und 67,2 Blättern signifikant später blühten. Die drei *AtGRP7-ox* Linien blühten mit 43,1, 44,9 und 47,2 Blättern und damit mit signifikant weniger Blättern als Col, so wie es auch in ähnlichen Blühversuchen vorher beobachtet worden war (Abb. 4.30 A).

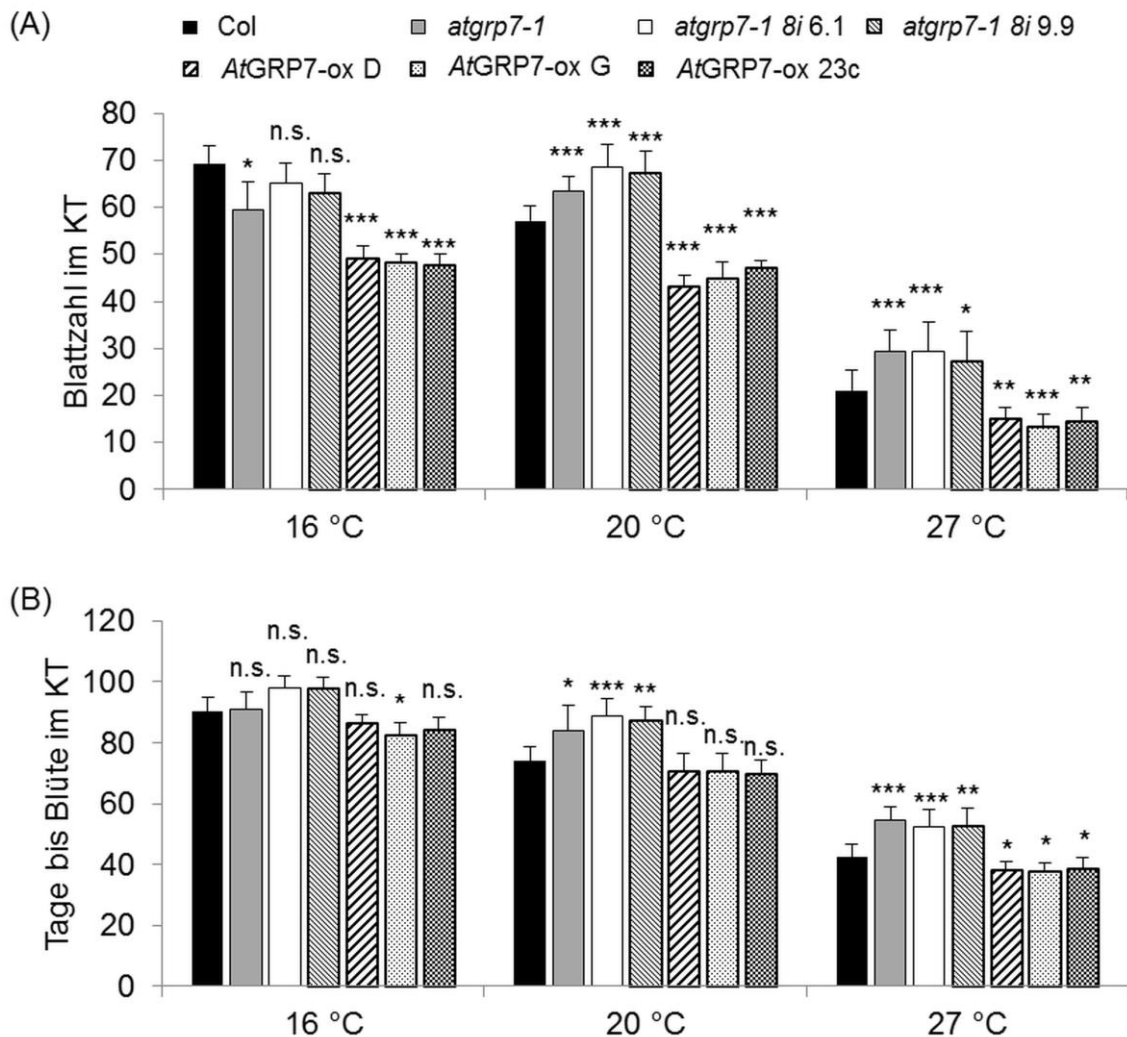


Abb. 4.30: Blühverhalten von *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen

Wt (Col), *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i 6.1* und 9.9 sowie *AtGRP7-ox D*, G und 23c wurden im KT auf Erde bis zur Blüte angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte, Mittelwerte  $\pm$  SD. Statistische Analyse mittels ANOVA und Dunnett-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant). (B) Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte, Mittelwerte  $\pm$  SD. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test.

Auch bei der Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte zeigte sich das erwartete Bild. Die Linien ohne funktionelles *AtGRP7* blühten signifikant später als Col, während der Unterschied zwischen *AtGRP7-ox* und Col nicht signifikant war. Die *AtGRP7-ox* Linien bildeten also in gleicher Zeit weniger Blätter (Abb. 4.30 B).

Eine wärmere Umgebungstemperatur von 27 °C wirkte sich bei allen Linien stark beschleunigend auf den Blühzeitpunkt aus, die generellen Unterschiede zwischen den Linien ohne *AtGRP7* und *AtGRP7-ox* blieben jedoch erhalten. Col blühte mit 21 Blättern, während *atgrp7-1* mit 29 Blättern blühte. Die beiden *atgrp7-1 8i* Linien blühten mit 29 und 27 Blättern und somit ebenfalls später als Col, jedoch nicht mehr unterschiedlich zu *atgrp7-1*. Die *AtGRP7-ox* Linien D, G und 23c blühten mit 15, 13 und 14 Blättern und damit mit deutlich weniger Blättern als Col (Abb. 4.30 A). Die Anzahl der Tage bis zur Blüte war für *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wieder signifikant höher als für Col, die *AtGRP7-ox* Linien blühten bei 27 °C jedoch nach einer signifikant kürzeren Anzahl von Tagen als Col (Abb. 4.30 B). Obwohl die Konzentration von *AtGRP7* auch in *AtGRP7-ox* bei 27 °C deutlich geringer als bei 20 °C war (vgl. Abb. 4.26), war die Proteinmenge noch ausreichend hoch, um ein verfrühtes Blühen einzuleiten. Bei 27 °C scheinen also schon geringe Mengen des Proteins einen deutlich positiven Effekt auf die Blühinduktion zu haben.

Bei 16 °C trat eine Verzögerung der Blühinduktion im Wt ein, denn Col blühte mit einer Anzahl von 69 Blättern. Bei *atgrp7-1* war jedoch keine Verzögerung zu erkennen. Die Pflanzen blühten mit 59 Blättern signifikant früher als Col und sogar mit weniger Blättern als bei 20 °C. Auch *atgrp7-1 8i* 6.1 und 9.9 blühten mit 65 bzw. 63 Blättern und somit mit einer geringeren Blattzahl als Col, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Die drei *AtGRP7-ox* Linien blühten mit einer Blattanzahl von 49, 48 und 48 signifikant früher als Col (Abb. 4.30 A). Für alle Linien außer *AtGRP7-ox* G konnte in der Anzahl der Tage von Aussaat bis Blühbeginn kein Unterschied zu Col festgestellt werden. *AtGRP7-ox* G blühte nach 82 Tagen und damit leicht früher als der Wt, der nach 90 Tagen blühte (Abb. 4.30 B). Der späte Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* ist also bei 16 °C aufgehoben, während der frühe Blühphänotyp von *AtGRP7-ox* (bei Betrachtung der Blattzahl) auch bei 16 °C ausgebildet ist. Betrachtet man jedoch die Anzahl der Tage von der Aussaat bis zum Blühbeginn bei 16 °C, zeigt sich, dass *atgrp7-1* in der gleichen Zeit wie der Wt weniger Blätter bildet. Die beiden *atgrp7-1 8i*-Linien unterscheiden sich in beiden Parametern dagegen nicht vom Wt. In *atgrp7-1* scheint daher die Blattentwicklung bei 16 °C verlangsamt zu sein, was zu dem beobachteten Blühphänotyp mit weniger Blättern als Col führt.

Tab. 4.1: Statistische Auswertung der Blühversuche bei 16 °C, 20 °C und 27 °C

## Blühzeitpunkt bei 16 °C

Genotyp	n	Blätter ± SD	p-Wert	Verhältnis		Tage ± SD	p-Wert
				16 °C/20 °C			
Col	15	69,3 ± 3,7	-	1,21		90,3 ± 4,6	-
<i>atgrp7-1</i>	15	59,4 ± 6,0	0,0173	0,93		90,8 ± 6,0	1,0000
<i>atgrp7-1 8i 6.1</i>	15	65,3 ± 4,0	1,0000	0,95		98,1 ± 3,9	0,0980
<i>atgrp7-1 8i 9.9</i>	15	63,0 ± 4,0	0,7832	0,94		97,6 ± 4,2	0,1614
<i>AtGRP7-ox D</i>	14	49,1 ± 2,7	0,0000	1,14		86,0 ± 3,3	1,0000
<i>AtGRP7-ox G</i>	14	48,1 ± 1,8	0,0000	1,07		82,4 ± 4,1	0,0389
<i>AtGRP7-ox 23c</i>	14	47,7 ± 2,4	0,0000	1,01		83,9 ± 4,3	0,2340

## Blühzeitpunkt bei 20 °C

Genotyp	n	Blätter ± SD	p-Wert	Tage ± SD	p-Wert
Col	20	57,2 ± 3,2	-	74,0 ± 4,6	-
<i>atgrp7-1</i>	20	63,6 ± 3,1	0,0002	84,1 ± 8,4	0,0114
<i>atgrp7-1 8i 6.1</i>	20	68,6 ± 3,9	0,0000	88,6 ± 6,0	0,0010
<i>atgrp7-1 8i 9.9</i>	20	67,2 ± 4,8	0,0000	87,0 ± 9,5	0,0020
<i>AtGRP7-ox D</i>	20	43,1 ± 2,5	0,0000	70,3 ± 6,1	1,0000
<i>AtGRP7-ox G</i>	20	44,9 ± 3,7	0,0000	70,2 ± 6,3	1,0000
<i>AtGRP7-ox 23c</i>	20	47,2 ± 1,4	0,0000	69,5 ± 4,8	1,0000

## Blühzeitpunkt bei 27 °C

Genotyp	n	Blätter ± SD	p-Wert	Verhältnis		Tage ± SD	p-Wert
				27 °C/20 °C			
Col	16	21,0 ± 4,4	-	0,37		42,4 ± 4,4	-
<i>atgrp7-1</i>	18	29,3 ± 4,7	0,0004	0,46		54,4 ± 4,7	0,0000
<i>atgrp7-1 8i 6.1</i>	18	29,4 ± 5,9	0,0005	0,43		52,2 ± 5,7	0,0010
<i>atgrp7-1 8i 9.9</i>	16	27,3 ± 6,3	0,0300	0,41		52,3 ± 6,0	0,0013
<i>AtGRP7-ox D</i>	18	14,9 ± 2,7	0,0035	0,35		37,8 ± 3,0	0,0182
<i>AtGRP7-ox G</i>	16	13,4 ± 2,6	0,0000	0,30		37,5 ± 2,9	0,0134
<i>AtGRP7-ox 23c</i>	16	14,4 ± 3,1	0,0013	0,31		38,2 ± 4,1	0,0307

#### 4.6.1 Expression von Blühregulatoren bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen

Die unterschiedliche Expression von *AtGRP7* hat Auswirkungen auf das Expressionsniveau des Blührepressors *FLC*. Dieser wird in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* verstärkt exprimiert, in *AtGRP7-ox* ist die Expression dagegen geringer als im Wt. Da gezeigt werden konnte, dass Pflanzen, die ein erhöhtes *FLC*-Level aufweisen, in ihrem Blühverhalten weniger sensitiv auf Temperaturveränderungen reagieren als Pflanzen mit niedrigem *FLC*-Level (Balasubramanian et al., 2006), wurde die *FLC*-Transkriptabundanz bei 16 °C, 20 °C und 27 °C untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der differentiellen Regulation von *FLC* und dem veränderten Blühzeitpunkt bei den unterschiedlichen Umgebungstemperaturen herzustellen (Abb. 4.31 A-C).

Bei 20 °C zeigte sich das bereits aus anderen Blühversuchen bekannte Bild. Das *FLC*-Level war in *atgrp7-1* und den beiden *atgrp7-1 8i*-Linien um den Faktor 4-6 höher als im Wt, während es in *AtGRP7-ox* deutlich niedriger war (Abb. 4.31 B). Auch bei der wärmeren Temperatur von 27 °C war *FLC* in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* erhöht, allerdings nur um den Faktor 1,5 bis 2 und damit deutlich weniger als bei 20 °C. In den drei *AtGRP7-ox* Linien war *FLC* deutlich niedriger als im Wt (Abb. 4.31 C). Damit korreliert der Blühphänotyp sowohl bei 20 °C als auch bei 27 °C mit der *FLC*-Expression in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Auch bei 16 °C war *FLC* in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* um den Faktor 4-6 höher als in Col, während es in *AtGRP7-ox* deutlich geringer war (Abb. 4.31 A). Es zeigte sich keine wesentliche Veränderung zu der Situation bei 20 °C. Damit korreliert bei 16 °C der Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* nicht mit der erhöhten *FLC*-Transkriptmenge, denn diese Pflanzen blühen bei 16 °C mit einer geringeren Blattzahl als der Wt (vgl. Abb. 4.30 A).

Erst seit kurzem ist bekannt, dass der zur *FLC*-Familie gehörende Blührepressor *FLM* an der temperaturabhängigen Blühregulation beteiligt ist. *FLM* tritt in Col in den beiden Splicevarianten *FLM-β* und *FLM-δ* auf, von denen die als Repressor wirksame Variante *FLM-β* bevorzugt bei 16 °C gebildet wird, während die als Repressor inaktive Variante *FLM-δ* bevorzugt bei 27 °C gebildet wird und so das Blühen bei höheren Temperaturen begünstigt (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013). Um zu überprüfen, ob neben *FLC* auch das verwandte *FLM*-Transkript durch *AtGRP7* beeinflusst wird, wurde das Transkriptlevel von *FLM-β* und *FLM-δ* und das Verhältnis der beiden Splicevarianten zueinander bei 16 °C, 20 °C und 27 °C ermittelt (Abb. 4.31 D-F). Bei 16 °C wurde in Col bevorzugt die Splicevariante *FLM-β* gebildet, so dass das Verhältnis *FLM-β/FLM-δ* etwa 8 betrug. In *atgrp7-1* war das Transkriptlevel von *FLM-δ* gegenüber Col erhöht, was in einem Verhältnis der Splicevarianten zueinander von 5,5 resultierte. Noch stärker ausgeprägt war der Effekt in *atgrp7-1 8i*, so dass hier das Verhältnis *FLM-β/FLM-δ* nur noch 2,1 bzw. 1,6 betrug. Das gegensätzliche Bild bot sich bei *AtGRP7-ox*. Hier war *FLM-δ* in allen drei Linien nur äußerst gering exprimiert, so dass das Verhältnis *FLM-β/FLM-δ* für *AtGRP7-ox D* einen Wert von 104 ergab, für *AtGRP7-ox G* 54 und für *AtGRP7-ox 23c* immer noch 28. *FLM-β* war nur in *AtGRP7-ox D* deutlich stärker exprimiert als im Wt.

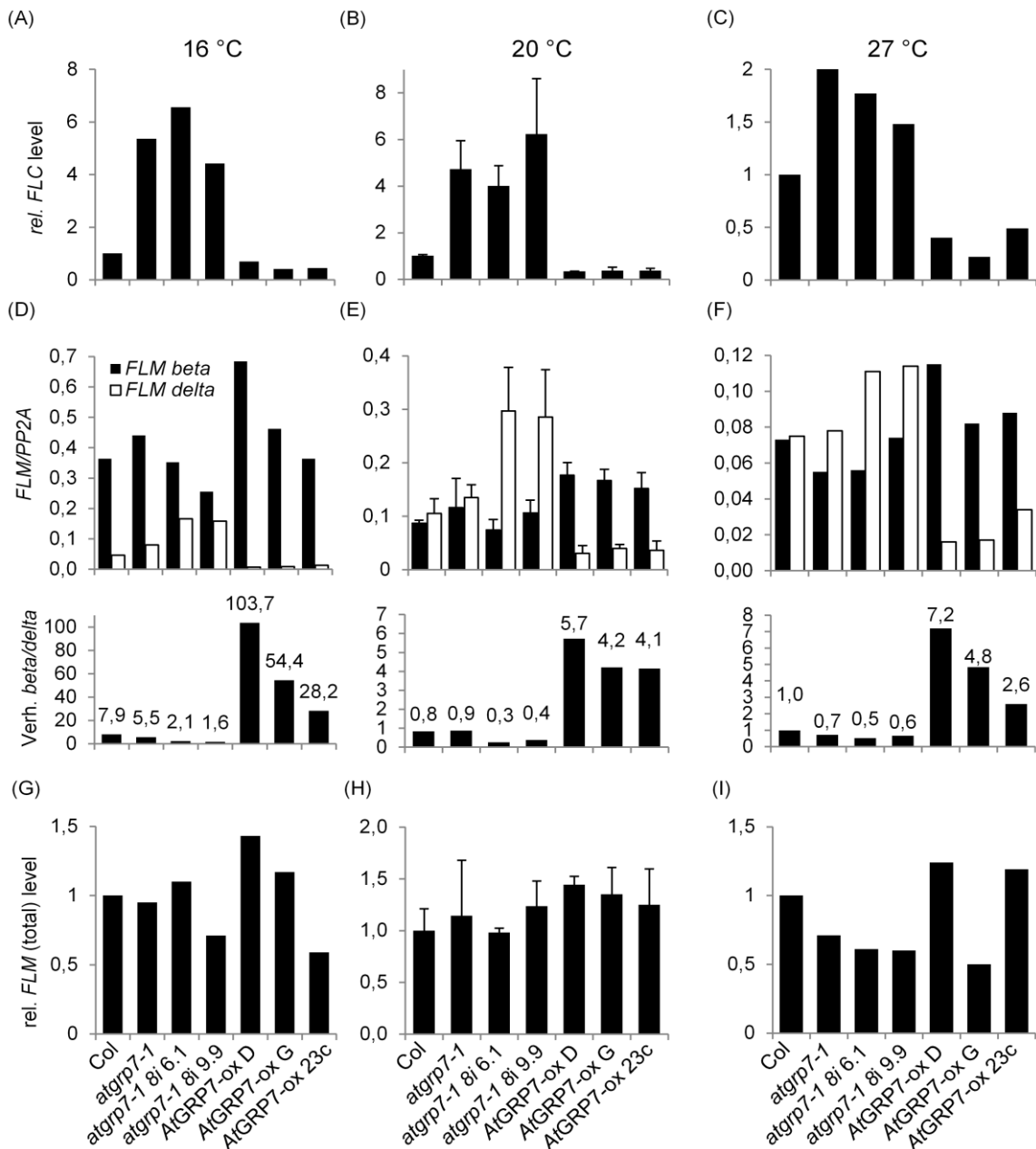


Abb. 4.31: Transkriptanalysen bei 16 °C, 20 °C und 27 °C

Wt (Col), *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i 6.1* und 9.9 sowie AtGRP7-ox D, G und 23c wurden im KT auf Erde bei 16 °C, 20 °C und 27 °C bis zum 10-Blatt Stadium angezogen und für Transkriptanalysen geerntet. (A-C) FLC-Transkriptlevel, (D-F) FLM- $\beta$ /FLM- $\delta$  Isoformen, (G-I) FLM (total)-Transkriptlevel. Daten bei 16 °C und 27 °C sind Mittelwerte aus 2 technischen Replikaten. Daten bei 20 °C sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 biol. Replikaten.

Bei 20 °C nahm die Bildung von FLM- $\delta$  zu, während FLM- $\beta$  abnahm, was zu einem Verhältnis der beiden Splicevarianten zueinander von etwa 1:1 in Col und *atgrp7-1* führte. In beiden *atgrp7-1 8i*-Linien war jedoch das Level von FLM- $\delta$  wieder deutlich erhöht, was zu einem Verhältnis FLM- $\beta$ /FLM- $\delta$  von 0,3 und 0,4 führte. In allen drei AtGRP7-ox Linien war FLM- $\delta$  deutlich geringer, FLM- $\beta$  dafür höher exprimiert als in Col. Auch bei 27 °C blieb dieses Bild konsistent.

Während sich *atgrp7-1* nur wenig von Col unterschied, zeigten beide *atgrp7-1 8i*-Linien ein erhöhtes Level an FLM- $\delta$ . In AtGRP7-ox war dieses in allen drei Linien geringer als in Col. Eine Untersuchung



des *FLM*-Transkriptes mittels einer Primerkombination, die nicht zwischen den Splicevarianten unterscheidet, zeigte bei keiner der untersuchten Temperaturen große Unterschiede der totalen *FLM*-Transkriptmenge (Abb. 4.31 G-H). Die differentielle Regulation von *FLM* in *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* findet daher nicht über eine Veränderung in der totalen Transkriptmenge statt, sondern über die Veränderung des Splicemusters von *FLM*, die hauptsächlich auf die Variante *FLM- $\delta$*  abzielt.

Eine Beschleunigung der Blühinduktion von *Arabidopsis* bei 27 °C wird maßgeblich durch die Induktion des Blühaktivators *FT* eingeleitet (Balasubramanian et al., 2006; Kumar et al., 2012). Um zu überprüfen, ob auch der Blühphänotyp von *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* mit der Expression von *FT* korreliert, wurde das Transkriptlevel bei 27 °C im KT bestimmt (Abb. 4.32). Tatsächlich konnte bei 27 °C *FT*-Expression im KT detektiert werden, was bei 20 °C und 16 °C aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus nicht verlässlich möglich war (o. Abb.). In zwei Experimenten war für *atgrp7-1* eine leichte Reduktion des *FT*-Levels zu beobachten, bei *atgrp7-1 8i* 9.9 war sie deutlich stärker ausgeprägt. Für *AtGRP7-ox* D konnte ein um den Faktor 2,5 gegenüber dem Wt erhöhtes Transkriptlevel beobachtet werden (Abb. 4.32 A). Ein drittes Experiment zeigte für *atgrp7-1* keine Veränderung des *FT*-Niveaus gegenüber *Col*, während beide *atgrp7-1 8i*-Linien ein deutlich geringeres Niveau zeigten. Bei allen drei *AtGRP7-ox* Linien war *FT* wieder um den Faktor 2-2,5 erhöht (Abb. 4.32 B). Der frühe Blühphänotyp von *AtGRP7-ox* bei 27 °C korreliert also mit einem erhöhten Transkriptlevel des Blühaktivators *FT*.

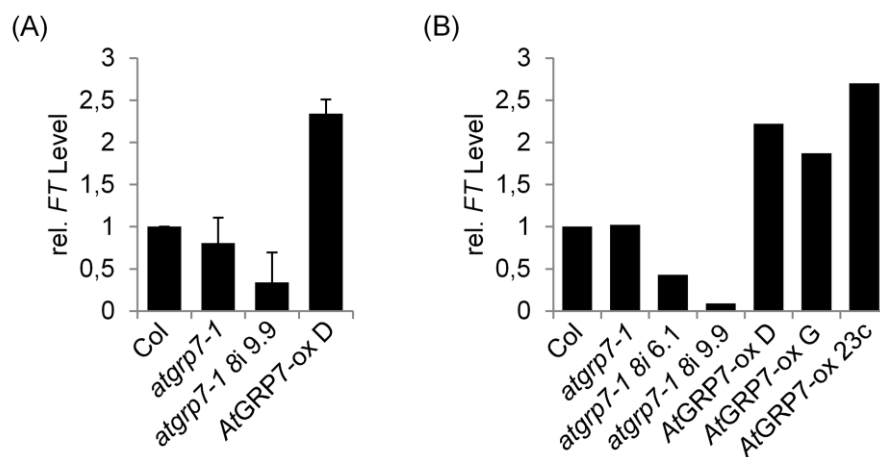


Abb. 4.32: *FT*-Transkriptlevel bei 27 °C

Wt (*Col*), *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* wurden im KT bei 27 °C angezogen und das *FT*-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. (A) Mittelwert  $\pm$  SD von 2 biol. Replikaten. (B) Mittelwerte eines dritten Experiments mit zwei technischen Replikaten.

Im Gegensatz dazu zeigt *atgrp7-1 8i* korrespondierend zum späten Blühzeitpunkt ein reduziertes *FT*-Level. Lediglich *atgrp7-1* zeigte trotz des späten Blühzeitpunktes keine Veränderung des *FT*-Levels verglichen mit dem Wt. Es ist daher anzunehmen, dass der Blühphänotyp von *atgrp7-1* unabhängig

von FT ist. Die unterschiedliche Situation in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* ist möglicherweise auf das erhöhte Level von AtGRP8 in *atgrp7-1* zurück zu führen, das einen positiven Einfluss auf FT aufweisen kann.

#### **4.6.2 Der späte Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* ist nur bei höheren Umgebungstemperaturen FLC-abhängig**

Arabidopsispflanzen mit einer erhöhten Expression von *FLC* blühen auch bei höheren Umgebungstemperaturen wie 27 °C verspätet (Balasubramanian et al., 2006). Da die Linien *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* über ein erhöhtes *FLC*-Level verfügen, und bereits durch Blühversuche bei 20 °C gezeigt werden konnte, dass der späte Blühzeitpunkt von Pflanzen mit reduzierter AtGRP7-Expression *FLC*-abhängig ist, sollte überprüft werden, ob der Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* bei 27 °C ebenfalls durch die erhöhte *FLC*-Expression vermittelt wird. Dazu wurden die drei Linien mit der Mutante *flc-3* gekreuzt, die über kein funktionsfähiges FLC mehr verfügt. Zusätzlich wurde auch AtGRP7-ox G mit *flc-3* gekreuzt, um zu überprüfen, ob ein kompletter Verlust von FLC den Blühzeitpunkt von AtGRP7-ox noch stärker verfrüht als das ohnehin schon geringe Expressionsniveau in diesen Pflanzen. Die Pflanzen wurden im KT bei 27 °C angezogen und die Blattanzahl zum Blühzeitpunkt bestimmt. Zum Vergleich ist auch die Blattzahl der jeweiligen Ausgangspflanzen mit intaktem FLC aufgetragen (Abb. 4.33 A). Der Wt Col blühte nach Bildung von 21 Blättern, während *flc-3* bereits nach der Bildung von 8 Blättern blühte. Der Verlust von FLC in *flc-3* wirkte sich also in einem stark beschleunigten Blühphänotyp verglichen zu Col mit intaktem FLC aus. In gleicher Weise reagierten auch *flc-3 atgrp7-1* und *flc-3 atgrp7-1 8i*. In allen drei Fällen konnte der späte Blühphänotyp durch Einführen der *flc-3* Mutation aufgehoben werden und komplett auf das Niveau der *flc-3* Einzelmutante reduziert werden. Der späte Blühzeitpunkt bei 27 °C ist demnach auf die erhöhte *FLC*-Expression zurück zu führen. Auch in AtGRP7-ox G konnte die Blattzahl leicht von 13 auf 10 durch *flc-3* gesenkt werden. Damit blühte *flc-3 AtGRP7-ox G* jedoch immer noch mit signifikant mehr Blättern als *flc-3*. Unabhängig von FLC beeinflussen also auch andere Faktoren die Blühinduktion in AtGRP7-ox.

Auch bei einer Umgebungstemperatur von 16 °C wirkte sich der Verlust von FLC verfrühend auf den Blühzeitpunkt im KT aus (Abb. 4.33 B). Col blühte nach der Bildung von 69 Blättern, *flc-3* bildete noch 61 Blätter aus, der beschleunigende Effekt war somit schwächer ausgeprägt als bei 27 °C. Sowohl *flc-3 atgrp7-1* als auch *flc-3 atgrp7-1 8i* blühten nicht signifikant unterschiedlich zu ihren Ursprungslinien mit intaktem FLC. Auch zur *flc-3* Einzelmutante bestand kein signifikanter Unterschied. Da der Verlust von FLC den verfrühten Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* nicht noch weiter verfrüht, ist davon auszugehen, dass der Phänotyp dieser Linien bei 16 °C unabhängig von FLC ist.

Die Überexpressionsmutante *AtGRP7-ox G* blühte bei 16 °C nach der Bildung von 48 Blättern, während *flc-3 AtGRP7-ox G* 47 Blätter bildete. Auch hier war kein weiterer beschleunigender Effekt von *flc-3* zu beobachten. Trotzdem blühten beide Linien mit signifikant weniger Blättern als Col und auch als *flc-3*. Der frühblühende Phänotyp von *AtGRP7-ox* bei 16 °C ist also zu einem Großteil unabhängig von FLC.

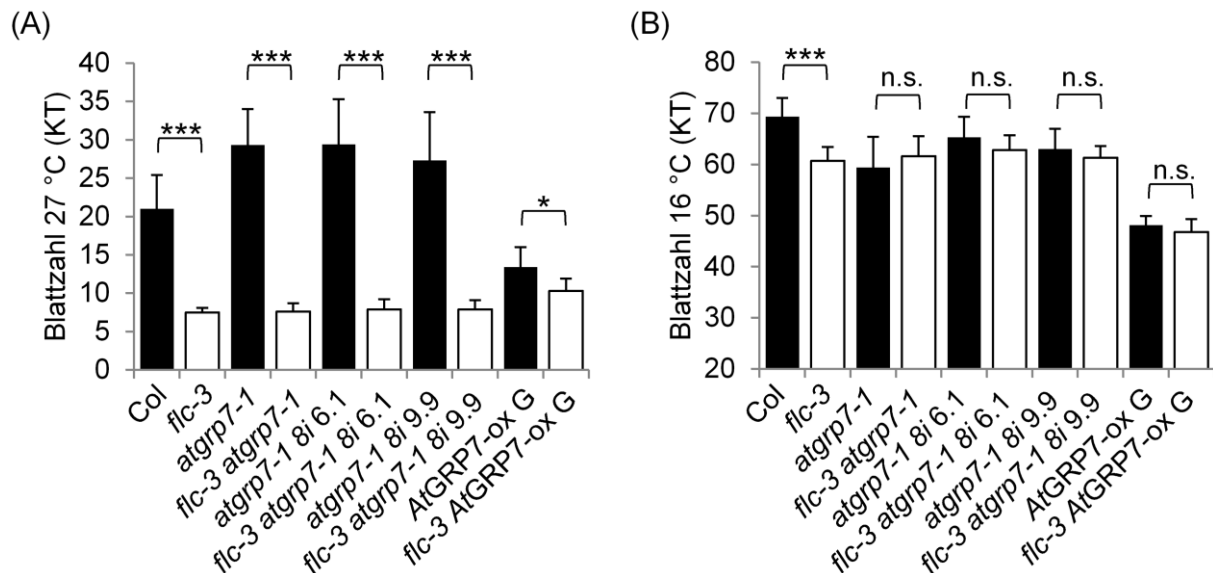


Abb. 4.33: Blühverhalten von *flc-3*-Kreuzungen bei 16 °C und 27 °C

Die Mutante *flc-3*, *flc-3 atgrp7-1*, *flc-3 atgrp7-1 8i* sowie *flc-3 AtGRP7-ox G* wurden im KT auf Erde bei 27 °C (A) und 16 °C (B) bis zur Blüte angezogen und die Anzahl der Rosettenblätter bestimmt. Zum Vergleich sind auch die Blattzahlen der jeweiligen Linien mit intaktem FLC mit aufgetragen. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test (Mittelwerte  $\pm$  SD; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant).

#### 4.7 Reaktion von Pflanzen mit Misexpression von *AtGRP7* auf einen Temperatursprung von 16 °C auf 27 °C

Pflanzen mit abweichender Expression des RBPs *AtGRP7* zeigen einen unterschiedlichen Blühphänotyp bei moderat veränderten Umgebungstemperaturen. Um zu überprüfen, ob *AtGRP7* auch an der unmittelbaren Reaktion auf eine Veränderung der Umgebungstemperatur beteiligt ist, wurden Pflanzen unter nicht induktiven KT Bedingungen zunächst bei 16 °C angezogen. Nach 5 Wochen wurde die Umgebungstemperatur auf 27 °C erhöht. Um den Blühzeitpunkt zu bestimmen, wurde die Anzahl der Blätter sowohl zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung als auch zum Blühbeginn ermittelt. Als weiterer Parameter wurde die Anzahl der Tage von der Erhöhung der Temperatur bis zum Blühbeginn aufgenommen (Abb. 4.34 A, B). Nach 5 Wochen im KT hatten alle Linien außer *atgrp7-1* zwischen 10 und 11 Blätter gebildet. Die Mutante *atgrp7-1* hatte nur 9 Blätter gebildet. Das war signifikant weniger als Col ( $p < 0,001$ ). Alle Linien mit Ausnahme von *AtGRP7-ox G* blühten bei 27 °C, nachdem sie insgesamt 25 Blätter gebildet hatten. *AtGRP7-ox G* blühte mit 24

Blättern, was jedoch auch nicht signifikant unterschiedlich zu Col war ( $p=0,807$ ). Damit zeigten alle Linien eine einheitliche Reaktion auf den Temperaturanstieg. Die beobachteten minimalen Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant. Auffällig war jedoch, dass sowohl *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* als auch *AtGRP7-ox* mit einem zeitlich deutlich verzögerten Blühbeginn auf die gestiegene Umgebungstemperatur reagierten. So blühte Col 16 Tage nach der Temperaturerhöhung, während *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* nach 19 Tagen blühten. Auch *AtGRP7-ox* D und G blühten nach 19 Tagen, *AtGRP7-ox* 23c benötigte 20 Tage von der Umstellung bis zur Blüte.

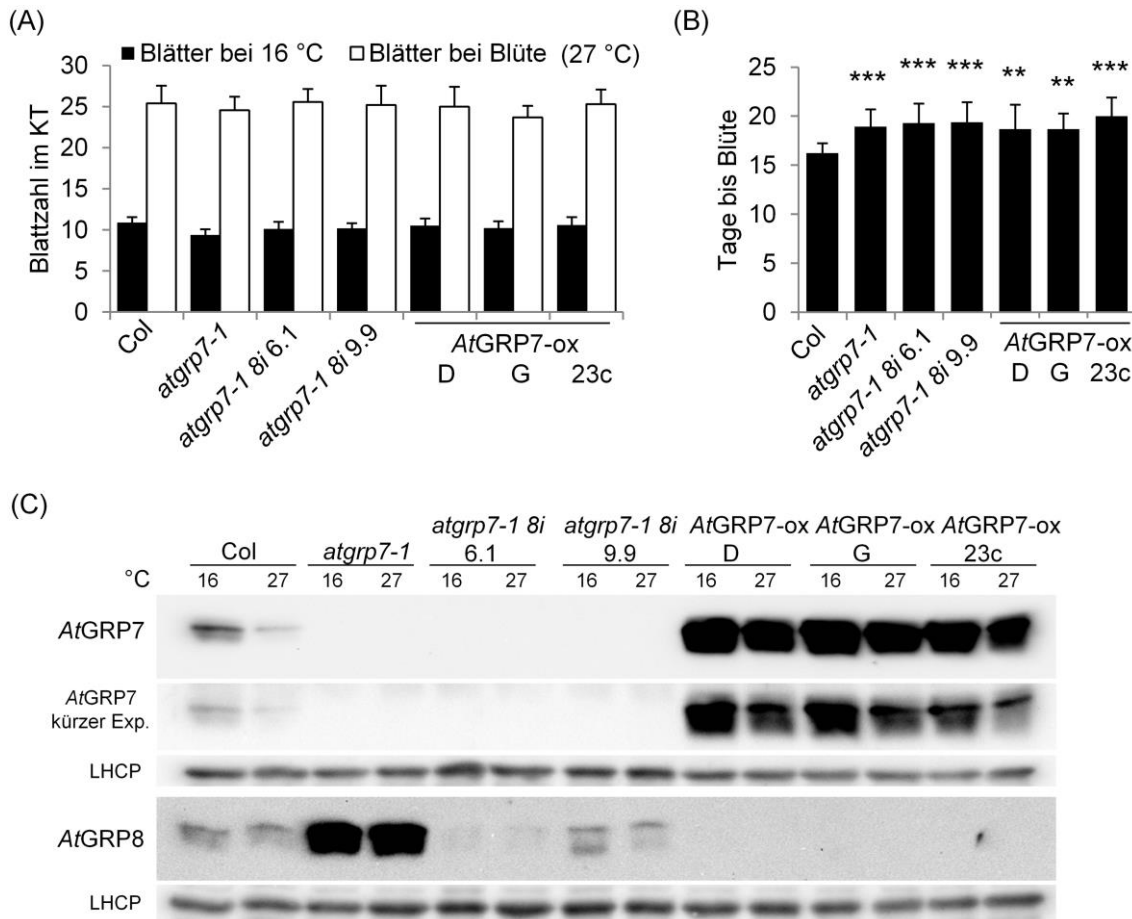


Abb. 4.34: Reaktion von Pflanzen mit Misexpression von *AtGRP7* auf einen Temperatursprung von 16 °C zu 27 °C

Wt (Col), *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* wurden im KT auf Erde für 5 Wochen bei 16 °C angezogen und anschließend zu 27 °C umgestellt. (A) Anzahl der Rosettenblätter vor dem Temperatursprung bei 16 °C und beim Blühbeginn bei 27 °C. (B) Anzahl der Tage von der Temperaturerhöhung bis zum Beginn der Blüte. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test. (C) Proteinlevel von *AtGRP7* und *AtGRP8* bei 16 °C und 24 h nach dem Umstellen zu 27 °C. Für den Immunoblot wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Detektion von *AtGRP7* und *AtGRP8* mittels spezifischer Anti-Peptid-Antikörper. Für *AtGRP7* sind zwei unterschiedlich lange Expositionszeiten abgebildet. Die Detektion von LHCP diente als Ladekontrolle.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Expression von *FLC* in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* die Temperaturreaktion beeinflusst, wurde der gleiche Versuch mit den Linien im *flc-3*-Hintergrund durchgeführt (Abb. 4.35 A, B). Nach 5 Wochen im KT bei 16 °C hatten Col und *flc-3 atgrp7-1 8i* 6.1 11 Blätter gebildet, *flc-3*, *flc-3 atgrp7-1* und *flc-3 atgrp7-1 8i* 9.9 12 Blätter. Die

Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Die Linie *flc-3 AtGRP7-ox G* hatte nur 9 Blätter gebildet, was signifikant weniger war als die Vergleichslinie *flc-3*. Der Blühbeginn erfolgte bei Col nach der Bildung von 25 Blättern und damit mit signifikant weniger Blättern als bei der Mutante *flc-3*, die 28 Blätter bis zur Blüte bildete. Die Doppelmutanten *flc-3 atgrp7-1* und *flc-3 atgrp7-1 8i* bildeten 30 bzw. 27 Blätter bis zur Blüte, was nicht signifikant unterschiedlich zu *flc-3* war. Die Linie *flc-3 AtGRP7-ox G* bildete nur 25 Blätter bis zur Blüte, da sie jedoch bereits weniger Blätter bei der Umstellung auf 27 °C aufwies, war die Temperaturreaktion auch hier nicht unterschiedlich zur Vergleichslinie *flc-3*. Wurde die Anzahl der Tage von der Umstellung von 16 °C zu 27 °C bis zur Blüte ermittelt, zeigte sich, dass sowohl Col als auch *flc-3* nach 16 Tagen blühten. Der Unterschied in der Blattzahl zwischen beiden Linien ist also auf eine raschere Blattbildung in *flc-3* zurück zu führen. Der späte Blühzeitpunkt von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*, der im vorherigen Experiment beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.34 B), war im Hintergrund der *flc-3*-Mutation komplett aufgehoben. Die Pflanzen blühten wieder wie der Wt. Nicht aufgehoben war der späte Blühzeitpunkt jedoch in *flc-3 AtGRP7-ox G*, die nach 21 Tagen blühten und damit sogar später als die entsprechende Linie *AtGRP7-ox G* mit intaktem FLC. Der spätblühende Phänotyp (nach Tagen) von *AtGRP7-ox* bei 27 °C ist demnach unabhängig von FLC.

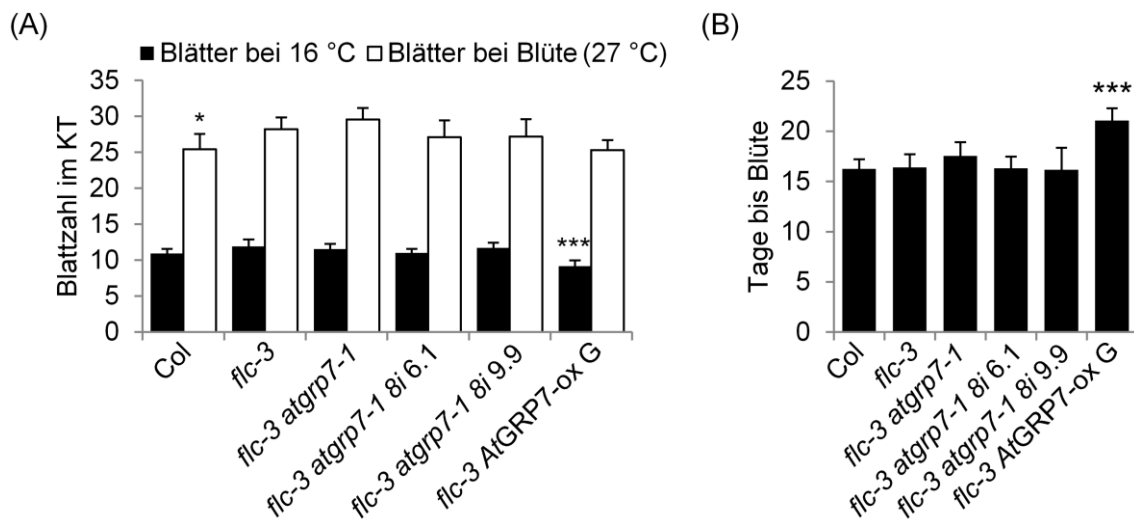


Abb. 4.35: Temperaturreaktion von Linien im *flc-3*-Hintergrund

Wt (Col), *flc-3*, *flc-3 atgrp7-1*, *flc-3 atgrp7-1 8i* sowie *flc-3 AtGRP7-ox G* wurden im KT auf Erde für 5 Wochen bei 16 °C angezogen und anschließend zu 27 °C umgestellt. (A) Anzahl der Rosettenblätter vor dem Temperatursprung bei 16 °C und beim Blühbeginn bei 27 °C. (B) Anzahl der Tage von der Temperaturerhöhung bis zum Beginn der Blüte. Mittelwerte  $\pm$  SD (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test, als Kontrolllinie diente *flc-3*.

#### 4.8 Untersuchung der *in vivo*-Interaktion von *AtGRP7* mit *FLC* und *FLM*

Die vorherigen Blühversuche haben gezeigt, dass der Blühphänotyp von Pflanzen mit einer Misexpression vor allem mit einem veränderten Transkriptlevel von *FLC* korreliert. Zudem konnten Kreuzungen mit der Mutante *flc-3* die Veränderungen in der Blühzeit bei 20 °C und bei 27 °C aufheben. Die Untersuchung unterschiedlicher Splicevarianten des Blührepressors *FLM*, der an der temperaturabhängigen Blühzeitregulation beteiligt ist (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013) zeigte, dass auch diese in Pflanzen mit unterschiedlicher *AtGRP7*-Expression verändert sind. Es sollte daher untersucht werden, ob *FLC* und *FLM* direkte Interaktionspartner des RBPs sind. Dazu wurde eine RNA-Immunpräzipitation (RIP) durchgeführt. Pflanzen, die *AtGRP7*-GFP im Hintergrund der *atgrp7-1* Mutation exprimierten, wurden auf MS-Agarplatten im KT für 21 Tage angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen mit Formaldehyd infiltriert, um eine Quervernetzung zwischen RBPs und den von ihnen gebundenen RNAs herbeizuführen. Die *AtGRP7*-GFP/RNA-Komplexe wurden mit GFP-Trap® Beads spezifisch präzipitiert (IP+). Als Negativkontrolle wurde *AtGRP7*-GFP mit RFP-Trap® Beads präzipitiert. Diese binden kein GFP und ein späteres Amplifikat aus diesen Proben weist auf unspezifische Bindungen hin (IP-). Anschließend wurde die gebundene RNA isoliert und mittels realtime PCR wurden die gesuchten Transkripte *FLC* und *FLM* relativ zum eingesetzten Startmaterial (Input=IN) quantifiziert. Als Positivkontrolle diente dabei die *AtGRP7*-RNA, die durch das *AtGRP7*-GFP-Protein gebunden wird. Wie Abb. 3.35 A zeigt, konnte *AtGRP7* in IP+ signifikant angereichert werden, während in IP- nur sehr geringe Mengen *AtGRP7* detektiert werden konnten. Die Bindung von *AtGRP7*-mRNA durch *AtGRP7*-GFP war also spezifisch.

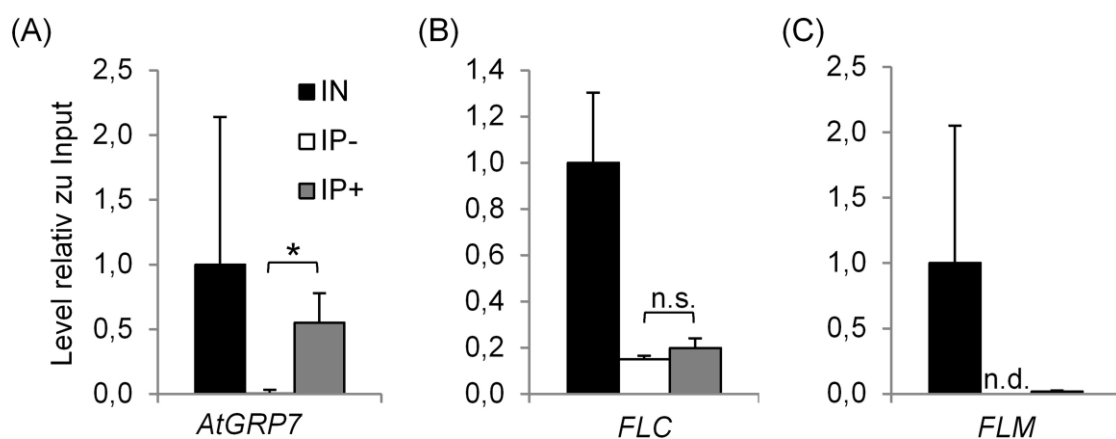


Abb. 4.36: *In vivo* Interaktion von *AtGRP7*-GFP mit *AtGRP7*, *FLC* und *FLM*

RIP von Pflanzen, die *AtGRP7*-GFP unter Kontrolle des *AtGRP7*-Promotors und 5'-UTR, 3'-UTR sowie dem Intron von *AtGRP7* in *atgrp7-1* exprimieren. Die Pflanzen wurden im KT bei 20 °C für 21 Tage angezogen. Transkriptlevel von Präzipitaten mit GFP-Trap® Beads (IP+) und RFP-Trap® Beads als Kontrolle für unspezifische Bindungen (IP-) wurden mit realtime PCR bestimmt und relativ zum Input (IN) angegeben. (A) *AtGRP7* diente als Positivkontrolle, (B) *FLC* und (C) *FLM*. Mittelwerte aus 3 biol. Replikaten  $\pm$  SD. Statistische Auswertung mittels t-Test (n.s.= nicht signifikant, n.d.=nicht detektierbar).

Für *FLC* konnte keine signifikante Anreicherung in IP+ verglichen mit IP- detektiert werden (Abb. 4.36 B). Unter den getesteten Bedingungen wird *FLC* also nicht spezifisch von *AtGRP7* gebunden. *FLM* konnte in IP- nicht detektiert werden, doch auch in IP+ kam es zu keiner starken Anreicherung, so dass nur ein äußerst geringer Teil des Input-Materials detektiert werden konnte (Abb. 4.36 C). Dies weist darauf hin, dass *FLM* entweder unter den gewählten Anzuchtbedingungen nur sehr schwach durch *AtGRP7* gebunden wird, oder dass auch *FLM* kein direktes Zieltranskript von *AtGRP7* ist.

#### 4.9 Untersuchung der genetischen Interaktion von *AtGRP7* und *FLM*

Um die Interaktion von *AtGRP7* mit *FLM* näher zu untersuchen, wurde die T-DNA Mutante *atgrp7-1* mit der frühblühenden Mutante *flm-3* gekreuzt. Zwei unabhängige Linien der Doppelmutante *flm-3 atgrp7-1* wurden auf ihren Blühphänotyp im LT untersucht (Abb. 4.37). Die T-DNA Mutante blühte im LT, nachdem sie 10,8 Blätter gebildet hatte. Der Wt Col und *atgrp7-1* blühten mit 14,7 und 19,4 Blättern signifikant später. Die beiden *flm-3 atgrp7-1* Doppelmutanten bildeten 14,8 und 13,9 Blätter aus und blühten damit mit mehr Blättern als *flm-3*, aber weniger Blättern als *atgrp7-1* (Abb. 4.37 A+C).

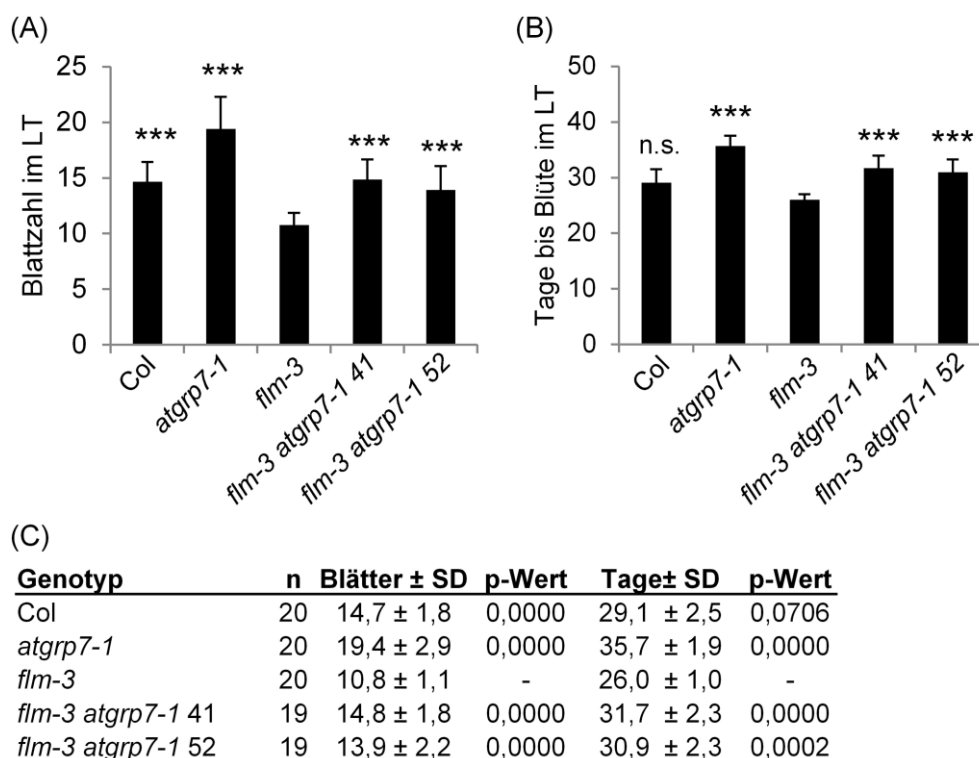


Abb. 4.37: Blühphänotyp von *flm-3 atgrp7-1* Doppelmutanten im LT

Wt (Col), *atgrp7-1*, *flm-3* und 2 Linien *flm-3 atgrp7-1* wurden im LT bei 20 °C bis zur Blüte angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte. (B) Tage von der Aussaat bis zur Blüte. (C) Statistische Auswertung der Daten. Mittelwerte ± SD von n=19-20 Pflanzen. ANOVA und ein Dunnett-Test wurden verwendet, um signifikante Unterschiede der Blattzahl zu bestimmen. Zur statistischen Analyse der Tage wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; n.s.=nicht signifikant).

Dieses intermediäre Blühverhalten zeigte sich auch, wenn die Tage von der Aussaat bis zur Blüte berechnet wurden. Hier blühte *flm-3* nach 26 Tagen, während *atgrp7-1* nach 35,7 Tagen blühte. Die beiden *flm-3 atgrp7-1* Doppelmutanten blühten nach 31,7 und 30,9 Tagen, was signifikant später war als *flm-3* (Abb. 4.37 B+C). Die Mutation *flm-3* führte zu einem verfrühten Blühzeitpunkt, während die Mutation *atgrp7-1* den Blühzeitpunkt verspätete. Der intermediäre Blühzeitpunkt der Doppelmutanten *flm-3 atgrp7-1* weist daher darauf hin, dass beide Gene unabhängig voneinander auf die Blühzeitregulation wirken.

#### 4.9.1 Erhöhte Expression des Blührepressors *MAF4* in *AtGRP7-ox*

Neben *FLM*, dessen Splicing durch *AtGRP7* beeinflusst wird, wirken auch die anderen Mitglieder aus der Familie der *MADS AFFECTING FLOWERING* (MAF)-Transkriptionsfaktoren als Blührepressoren (Ratcliffe et al., 2003). Bei Anzucht im KT war die Abundanz von *MAF4* in drei *AtGRP7-ox* Linien signifikant höher als im Wt, in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* war keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wt zu beobachten (Abb. 4.38). Somit ist neben *FLM* (auch als *MAF1* bekannt), bei dem die als Blührepressor aktive Variante *FLM-β* in *AtGRP7-ox* überrepräsentiert ist (vgl. Abb. 4.31 E), mit *MAF4* ein weiterer Repressor verstärkt in *AtGRP7-ox* exprimiert.

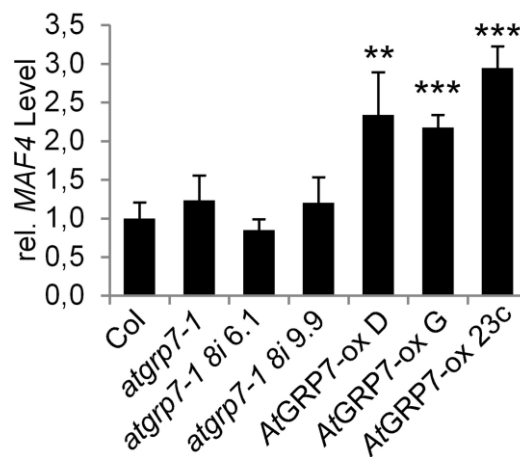


Abb. 4.38: *MAF4*-Transkriptlevel in im KT

Wt (Col), *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* wurden im KT für 5 Wochen angezogen und das *MAF4*-Level wurde mittels realtime PCR bestimmt. Mittelwerte aus 3 biol. Replikaten  $\pm$  SD. Statistische Auswertung mittels t-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.10 Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen *AtGRP7* und *SVP*

Der Transkriptionsfaktor *SVP* spielt eine wichtige Rolle in der temperaturabhängigen Kontrolle des Blühzeitpunktes (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013). Es sollte daher untersucht werden, ob eine genetische Interaktion von *AtGRP7* mit *SVP* besteht, die möglicherweise für den veränderten Blühphänotyp von Pflanzen mit Misexpression von *AtGRP7* verantwortlich ist. Dazu wurde die extrem



frühblühende Mutante *svp-41* mit *atgrp7-1 8i* 6.1 gekreuzt. Die Doppelmutanten *svp-41 atgrp7-1 8i* wurden im Blühversuch im KT auf ihren Blühphänotyp untersucht (Abb. 4.39 A+B). Col blühte in diesem Versuch mit 57,5 Rosettenblättern, während *atgrp7-1 8i* mit 68,7 Blättern deutlich mehr Blätter als der Wt ausbildete. *Svp-41* blühte im KT bereits mit 17,1 Blättern. Zwei untersuchte Linien der Doppelmutanten *svp-41 atgrp7-1* blühten, nachdem 25,1 bzw. 25,8 Rosettenblätter gebildet wurden. Die Mutation in *SVP* hat also auch in *atgrp7-1 8i* einen stark verfrühenden Einfluss auf den Blühzeitpunkt. Beide Doppelmutanten blühten jedoch mit signifikant mehr Blättern als *svp-41* und benötigen deutlich mehr Zeit bis zur Blüte. Dies weist wieder darauf hin, dass beide Gene unabhängig voneinander den Blühzeitpunkt kontrollieren. Auch die *SVP*-Transkriptmenge ist weder in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* noch in *AtGRP7-ox* wesentlich unterschiedlich zum Wt, was ebenfalls dafür spricht, dass *SVP* auf Transkriptebene nicht durch *AtGRP7* reguliert wird (Abb. 4.39 C).

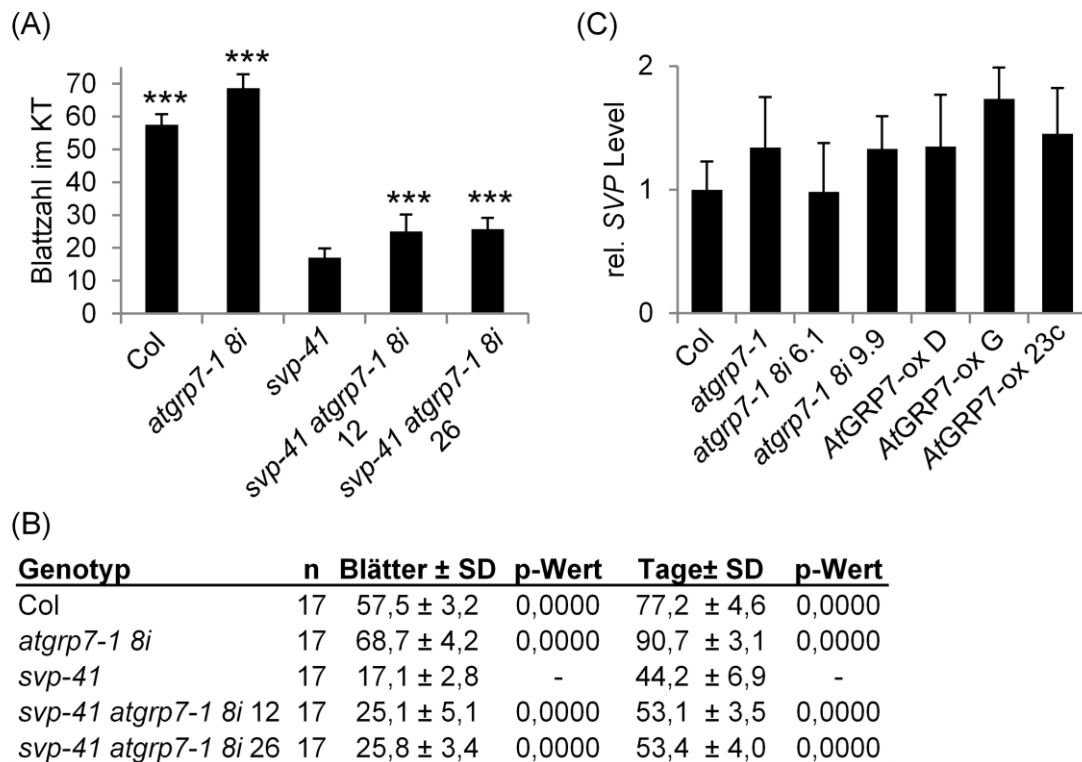


Abb. 4.39: Blühphänotyp von *svp-41 atgrp7-1 8i* Doppelmutanten im KT

Wt (Col), *atgrp7-1 8i*, *svp-41* und 2 Linien *svp-41 atgrp7-1 8i* wurden im KT bei 20 °C bis zur Blüte angezogen. (A) Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blüte. (B) Statistische Auswertung der Blühdaten Mittelwerte ± SD von n=17 Pflanzen. ANOVA und ein Dunnett-Test wurden verwendet, um signifikante Unterschiede der Blattzahl zu bestimmen. Zur statistischen Analyse der Tage wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet (\*\*\*)p<0,001). (C) Transkriptlevel von *SVP* in Col, *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox*. Mittelwerte ± SD aus 3 biol. Replikaten.

## **4.11 Phänotypische Auswirkungen der Misexpression von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf die vegetative Entwicklung von *Arabidopsis***

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt, bewirkt der Verlust von *AtGRP7* eine Verspätung des Blühzeitpunktes, während die Überexpression des Proteins dazu führt, dass die Pflanzen mit weniger gebildeten Blättern als der Wt blühen. Diese Effekte sind besonders im KT ausgeprägt und beruhen auf einer differentiellen Regulation des Blührepressors *FLC* und des Blühaktivators *FT*. Wird jedoch bei den *AtGRP7-ox* Linien die Anzahl der Tage von der Aussaat bis zur Blüte gezählt, so zeigt sich, dass der Blühzeitpunkt nicht vom Wt abweicht. Die Pflanzen bilden also in ähnlicher Zeit wie der Wt weniger Blätter und sind damit möglicherweise auch in ihrer vegetativen Entwicklung beeinträchtigt. Daher sollte der Einfluss einer Überexpression und eines Verlustes von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf den Phänotyp der Pflanzen untersucht werden.

### **4.11.1 Der Wuchsphänotyp von *AtGRP7-ox* im Kurztag**

Bei den Anzuchten der verschiedenen Linien für die Blühexperimente im KT fielen vor allem die *AtGRP7-ox* Linien durch ihren dramatisch veränderten Phänotyp gegenüber dem Wt auf. Abb. 4.40 zeigt exemplarisch den Wt Col sowie die beiden Überexpressionslinien D und G im KT, einmal im Alter von 6 Wochen und einmal nach 11 Wochen, in bereits blühendem Zustand. Während bei Col die Blattrosette und die Infloreszenz normal ausgebildet waren, zeigten beide *AtGRP7-ox* Linien einen wesentlich geringeren Rosettendurchmesser und innerhalb der Rosette bereits abgestorbene Blätter. Die Elongation der Internodien entlang der Infloreszenz war beeinträchtigt, so dass die Pflanzen gestaucht wirkten. An den Nodien traten Infloreszenzreversionen auf, die zur Bildung von Rosettenblättern entlang der Infloreszenz führten. Die eigentliche Blattrosette war zu diesem Zeitpunkt bei *AtGRP7-ox* zum Großteil abgestorben.

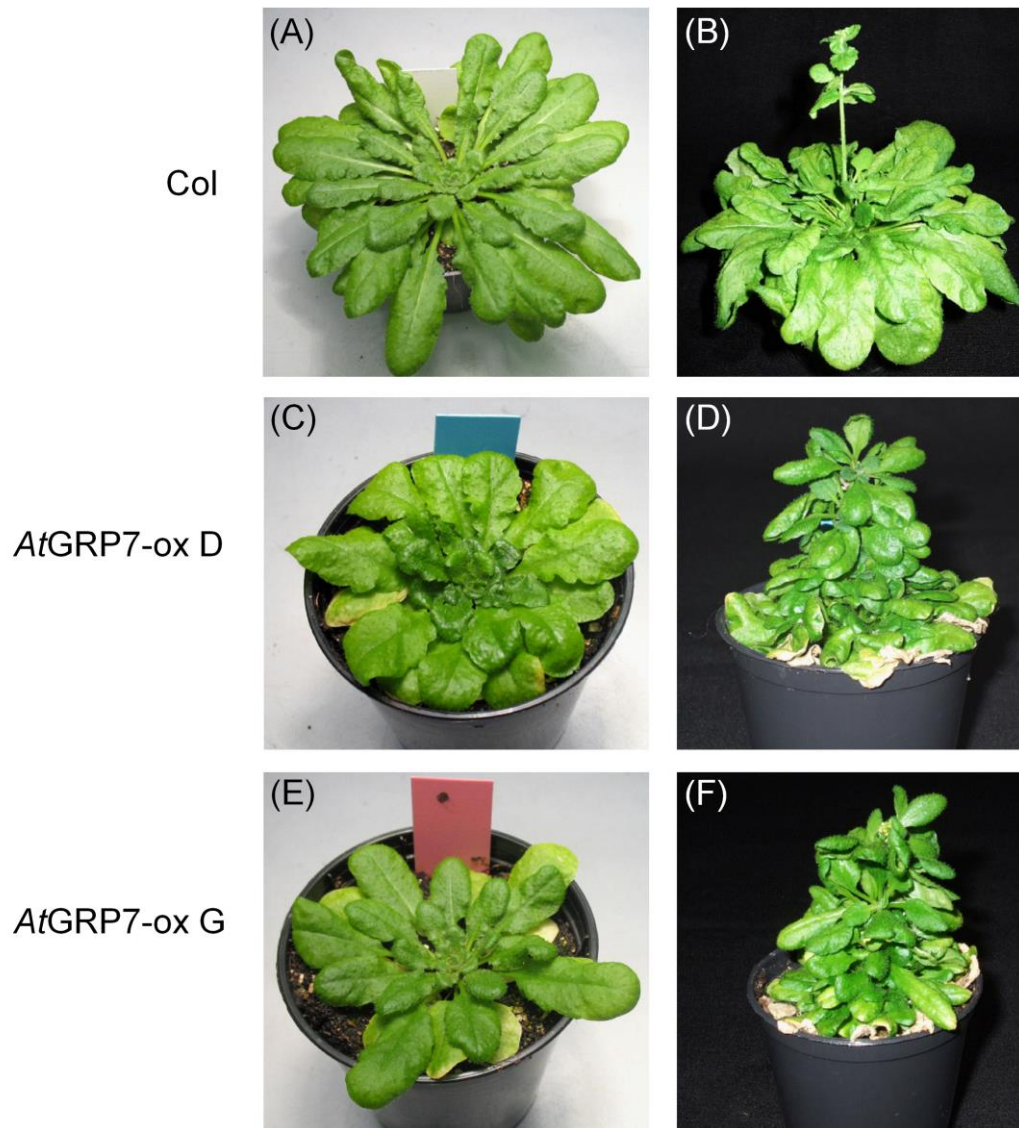


Abb. 4.40: Wuchsphänotyp von *AtGRP7-ox* im KT

Wt (Col), *AtGRP7-ox* G und *AtGRP7-ox* D wurden im KT auf Erde angezogen. (A, C, E) Phänotyp nach 6 Wochen, die Pflanzen sind noch im vegetativen Stadium. (B, D, F) Phänotyp nach 11 Wochen, die Pflanzen befinden sich bereits im blühenden Stadium.

#### 4.11.2 Die Blattentwicklung und die relative Wachstumsrate sind geringer in *AtGRP7-ox*

Um den Entwicklungsphänotyp von *AtGRP7-ox* näher zu charakterisieren, wurden die Linien *AtGRP7-ox* D, G und 23c sowie der Wt Col im KT angezogen. Beginnend 23 Tage nach Aussaat wurde 2- bis 3-mal pro Woche die Anzahl der sichtbaren Blätter gezählt, bis die Pflanzen blühten (Abb. 4.41 A). Bei allen drei *AtGRP7-ox* Linien war die Blattentwicklung über die Wachstumsperiode gegenüber Col verlangsamt, besonders deutlich wurde der Effekt ab einem Alter von 42 Tagen nach Aussaat. Hier hatte Col 27 Blätter gebildet, während *AtGRP7-ox* erst 23 Blätter gebildet hatte. Sowohl bei Col als auch bei *AtGRP7-ox* blühten die jeweils letzten Pflanzen zeitlich identisch nach 74 Tagen, Col

hatte durchschnittlich 57 Blätter gebildet, *AtGRP7-ox* nur 46.

Mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform „GrowScreen Fluoro“ wurde die relative Wachstumsrate von Col und *AtGRP7-ox* D und G bestimmt. Diese berechnet sich aus dem Logarithmus naturalis der Zunahme an Blattfläche von einem Messpunkt zum nächsten. Bestimmt wurde diese in einem Zeitrahmen von 21 bis 39 Tagen nach Aussaat. Wie Abb. 4.41 (B) zeigt, betrug sie für Col anfangs 27 % und fiel über den Messzeitraum auf 17 % ab. Beide *AtGRP7-ox*-Linien zeigen über den Messzeitraum eine deutlich geringere Wachstumsrate als Col. *AtGRP7-ox* beeinflusst demnach nicht nur die Bildung neuer Blätter, sondern auch die Zunahme an Blattfläche. Auffällig sind die beiden Messpunkte Tag 29 und Tag 36, an denen nur eine sehr geringe Wachstumsrate in allen Linien gemessen werden konnte. Dies beruhte auf dem Bewässerungssystem der Plattform, das die Töpfe nicht kontinuierlich mit Wasser versorgte, sondern nur Wasser zuführte, wenn die Erde ausgetrocknet war. Dies sollte unerwünschtes Algenwachstum auf dem Substrat verhindern, welches die Messergebnisse verfälschen kann. Die geringe Wachstumsrate zu den beiden Zeitpunkten war die Folge der starken Austrocknung des Substrates.

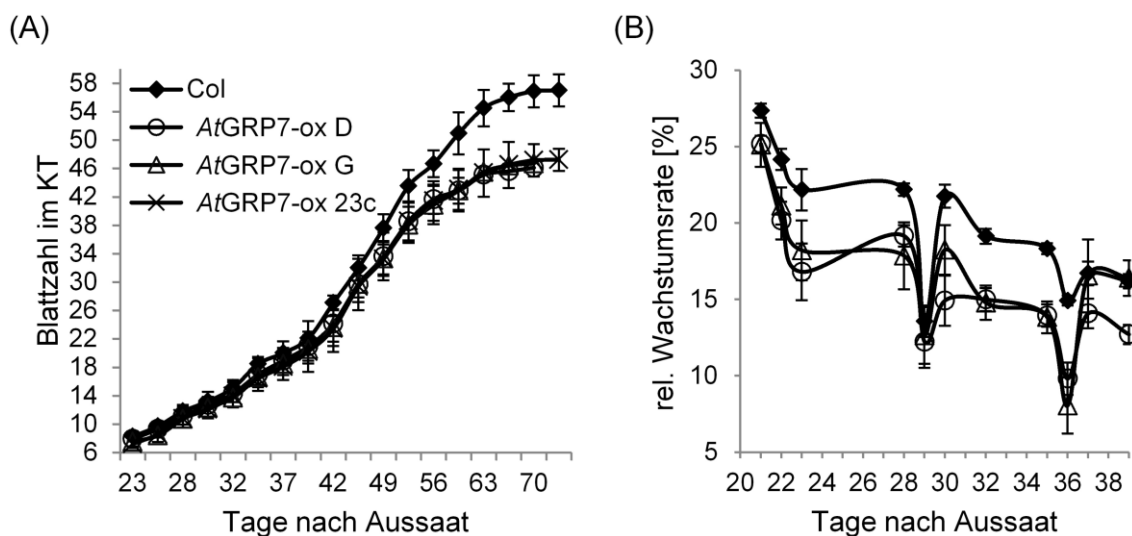


Abb. 4.41: Blattentwicklung und rel. Wachstumsrate von *AtGRP7-ox*

(A) Wt (Col), *AtGRP7-ox* D, G und 23c wurden im KT auf Erde angezogen. Beginnend 23 Tage nach Aussaat wurde die Blattzahl von n=15 Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt, bis die Pflanzen blühten. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD.

(B) Rel. Wachstumsrate von Col, *AtGRP7-ox* D und *AtGRP7-ox* G. Quantifiziert wurde jeweils die rel. Zunahme der Blattfläche im Vergleich zum vorherigen Messpunkt. Die Daten wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform GrowScreen Fluoro aufgenommen. Mittelwerte  $\pm$  SE von n=18-20 Pflanzen.

Als zusätzliche phänotypische Parameter wurden durch „GrowScreen Fluoro“ die absolute Blattfläche, der Rosettendurchmesser, die Kompaktheit der Rosette sowie das Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen aufgenommen (Abb. 4.42). Die Blattfläche in Col betrug zunächst

0,2 cm<sup>2</sup> und nahm über den Zeitraum des Experiments auf 13,9 cm<sup>2</sup> zu. *AtGRP7-ox* D und G wiesen zum Start eine Blattfläche von 0,2 cm<sup>2</sup> bzw. 0,1 cm<sup>2</sup> auf. Bis zu Tag 30 verlief die Zunahme der Fläche in allen Linien ähnlich. Im späteren Entwicklungsverlauf war jedoch die Flächenzunahme in *AtGRP7-ox* deutlich geringer, so dass die gesamte Blattfläche zum Ende des Experiments bei *AtGRP7-ox* D 6,9 cm<sup>2</sup> und bei *AtGRP7-ox* G 4,8 cm<sup>2</sup> betrug (Abb. 4.42 A). Die beiden Linien bildeten signifikant kleinere Blätter aus als der Wt ( $p=0,001$  und  $p=0,0000$ ).

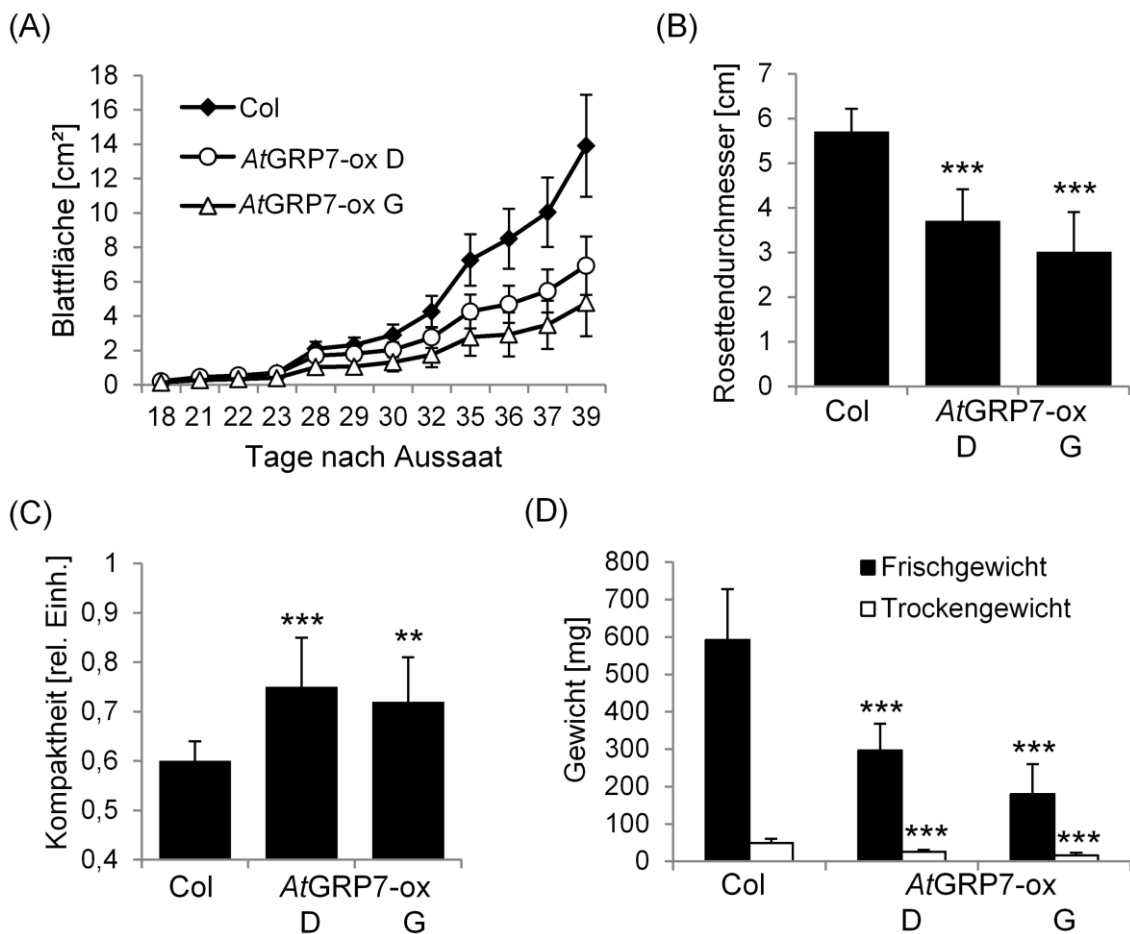


Abb. 4.42: Phänotypische Parameter von *AtGRP7-ox*

Wt (Col) und *AtGRP7-ox* D und G wurden im KT angezogen und die phänotypischen Parameter Blattfläche (A), Rosettendurchmesser (B) und Kompaktheit (C) wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform GrowScreen Fluoro aufgenommen. Nach Ende des Experiments wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt (D). Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=18-20$  Pflanzen. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

Der Rosettendurchmesser am letzten Tag der Messungen betrug bei Col 5,7 cm, bei *AtGRP7-ox* D 3,7 cm und bei *AtGRP7-ox* G 3,0 cm (Abb. 4.42 B). Beide Linien hatten eine signifikant kleinere Rosette ausgebildet als der Wt ( $p=0,0002$  und  $p=0,0000$ ).

Die Kompaktheit der Rosette beschreibt, wie weit die Blätter vom Mittelpunkt der Pflanze entfernt sind. Je näher der Wert an 1 liegt, desto dichter befinden sich die Blätter am Mittelpunkt der Pflanze.

Kleinere Werte bedeuten, dass die Blätter weiter vom Mittelpunkt der Pflanze entfernt sind, da sie z.B. längere Blattstiele aufweisen. In Col betrug das Maß für die Kompaktheit am letzten Tag der Messungen 0,6, während *AtGRP7-ox* D und G mit Werten von 0,75 und 0,7 eine signifikant kompaktere Rosette ausgebildet hatten (Abb. 4.42 C;  $p=0,0000$  und  $p=0,0012$ ).

Das insgesamt reduzierte Wachstum in *AtGRP7-ox* spiegelte sich auch in Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen wieder (Abb. 4.42 D). Das Frischgewicht in Col betrug direkt nach der Ernte 590 mg, in *AtGRP7-ox* D 300 mg und in *AtGRP7-ox* G 180 mg. Die *AtGRP7-ox*-Linien hatten signifikant weniger Biomasse gebildet ( $p=0,0004$  und  $p=0,0000$ ). Auch das Trockengewicht war bei *AtGRP7-ox* mit 25 mg bzw. 16 mg signifikant geringer als bei Col, wo es 49 mg betrug ( $p=0,0003$  und  $p=0,0000$ ). Die Überexpression von *AtGRP7* beeinflusst also nicht nur das Blühverhalten, sondern auch die gesamte vegetative Entwicklung der Pflanze. Obwohl *AtGRP7-ox* Pflanzen viele Merkmale frühblühender Mutanten zeigen, wie weniger Blätter zum Blühbeginn, ein reduziertes *FLC*-Transkriptlevel oder ein erhöhtes *FT*-Level, wirkt sich die Überexpression auf die vegetativen Entwicklungsmerkmale wie Wachstumsrate, Blattfläche oder Rosettendurchmesser negativ aus.

#### 4.11.3 Der Wuchstyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im Kurztag

Die Überexpression von *AtGRP7* führt zu einer teilweise dramatischen Veränderung des Wuchstyps von *Arabidopsis*. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl *atgrp7-1* als auch *atgrp7-1 8i* bis auf den verspäteten Blühzeitpunkt keine weiteren auffälligen phänotypischen Unterschiede im Vergleich zum Wt Col (Abb. 4.43). Um jedoch möglicherweise nicht sofort auffällige Auswirkungen eines Verlustes von *AtGRP7* auf den Wuchstyp von *Arabidopsis* zu charakterisieren, wurden *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* ebenfalls genauer auf phänotypischer Ebene untersucht.

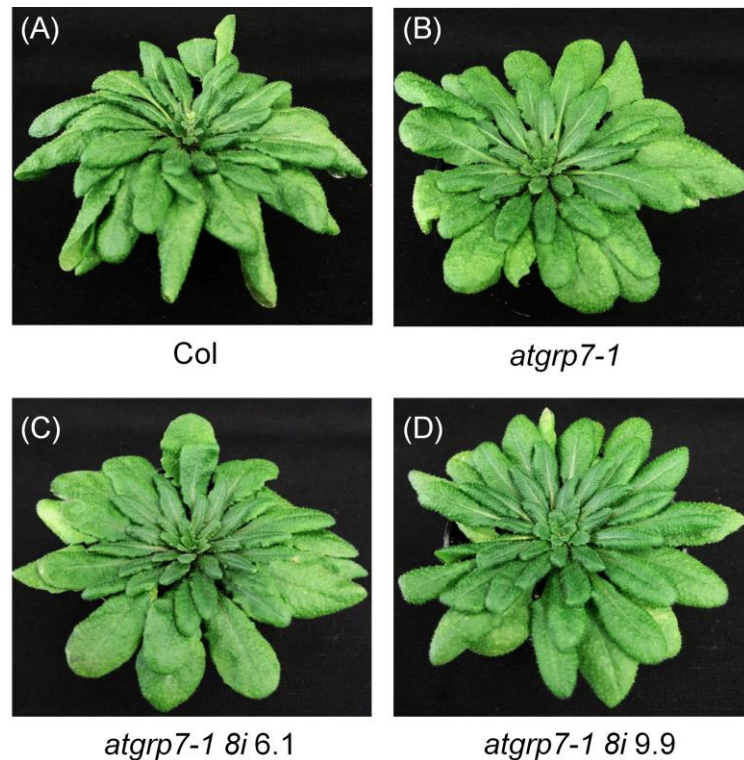


Abb. 4.43: Wuchstyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im KT

Col (A), *atgrp7-1* (B), *atgrp7-1 8i* 6.1 (C) und *atgrp7-1 8i* 9.9 (D) wurden im KT auf Erde angezogen. Das Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Aufnahme war 10 Wochen.

Die Rate der Blattbildung wurde für Col, *atgrp7-1* sowie für *atgrp7-1 8i* 6.1 und 9.9 im KT gemessen. Beginnend 23 Tage nach Aussaat wurden 2- bis 3-mal pro Woche die Rosettenblätter der Pflanzen gezählt, bis diese blühten (Abb. 4.44 A+B). Alle Linien wiesen zu Beginn des Experiments 8 Blätter auf. Col blühte nach 74 Tagen mit 57 Blättern. Die T-DNA Mutante *atgrp7-1* blühte nach 81 Tagen mit 62 Blättern. Auch die beiden *atgrp7-1 8i*-Linien blühten nach 81 Tagen, sie hatten jedoch 66 Blätter ausgebildet. Die Rate der Blattbildung war in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* geringer als im Wt. Der Unterschied war jedoch nur für *atgrp7-1* signifikant und betrug z.B. zum Zeitpunkt 53 Tage nach Aussaat 5 Blätter zwischen *atgrp7-1* und Col (Abb. 4.44 B zeigt den relevanten Ausschnitt aus dem Diagramm). Die Linien *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* blühen also auf Grund einer Verlängerung der vegetativen Phase zu einem späteren Zeitpunkt als der Wt, während die Rate der Blattbildung

unverändert bzw. bei *atgrp7-1* sogar langsamer ist als im Wt.

Die rel. Wachstumsrate der Linien im KT wurde mit „GrowScreen Fluoro“ über einen Zeitraum von 18 bis 41 Tagen nach der Aussaat als Zunahme der Blattfläche ermittelt (Abb. 4.44 C). Sie betrug zu Anfang des Experiments zwischen 27 % und 20 % und fiel zum Ende des Messzeitraums auf 13 % Zunahme ab. Zwar zeigten beide *atgrp7-1 8i*-Linien teilweise eine leichte Tendenz zu geringerem Wachstum (Tag 20, 24 und 31), über den Gesamtzeitraum war die Wachstumsrate bei allen Linien jedoch nicht unterschiedlich zu Col.

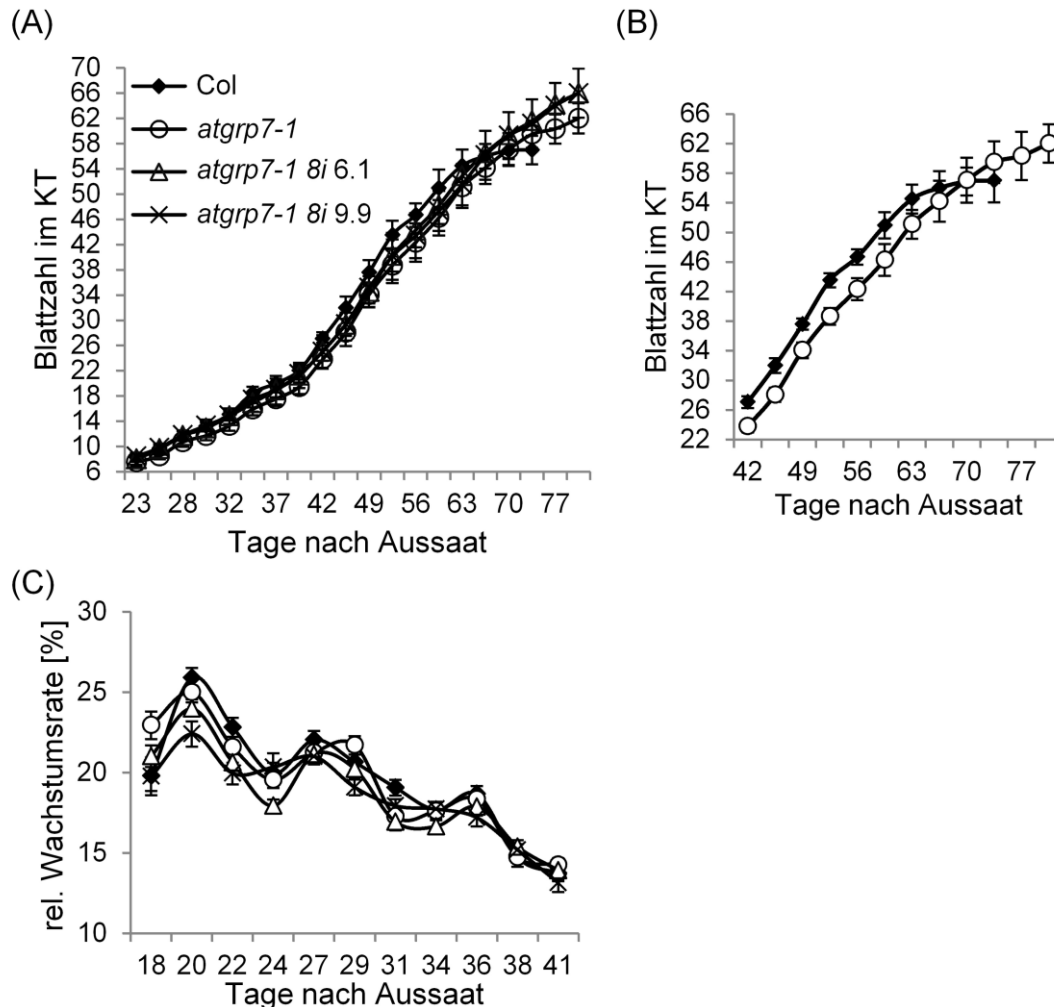


Abb. 4.44: Blattentwicklung und rel. Wachstumsrate von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*

(A) Wt (Col), *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i 6.1* und *9.9* wurden im KT auf Erde angezogen. Beginnend 23 Tage nach Aussaat wurde die Blattzahl von n=15 Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt, bis die Pflanzen blühten. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD. (B) Ausschnitt aus (A) für die beiden Linien Col und *atgrp7-1*.

(C) Rel. Wachstumsrate von Col, *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i 6.1* und *9.9*. Quantifiziert wurde jeweils die rel. Zunahme der Blattfläche im Vergleich zum vorherigen Messpunkt. Die Daten wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform GrowScreen Fluoro aufgenommen. Mittelwerte  $\pm$  SE von n=18-22 Pflanzen.



Auch die sonstigen phänotypischen Parameter wiesen keine großen Unterschiede zum Wt auf. Die Blattfläche entwickelte sich zunächst über einen Zeitraum von Tag 17 bis Tag 35 in allen Linien gleich, zu späteren Zeitpunkten entwickelte sie sich jedoch bei *atgrp7-1 8i 6.1* langsamer, so dass die Blattfläche nur 8,4 cm<sup>2</sup> betrug, was signifikant weniger war als die 11,9 cm<sup>2</sup> von Col (Abb. 4.45 A;  $p=0,0016$ ). Dieser Trend setzte sich auch im Rosettendurchmesser und bei Frisch- und Trockengewicht fort. Der Rosettendurchmesser betrug am letzten Messtag bei Col 5,8 cm. Bei *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i 9.9* war er mit 6,3 cm und 5,6 cm nicht signifikant unterschiedlich zu Col. Lediglich *atgrp7-1 8i 6.1* wies mit 4,9 cm einen signifikant kleineren Rosettendurchmesser auf (Abb. 4.45 B;  $p=0,0029$ ). Das Frischgewicht betrug 347 mg für Col, 331 mg für *atgrp7-1* und 311 mg für *atgrp7-1 8i 9.9*. Bei *atgrp7-1 8i 6.1* war es mit 257 mg signifikant geringer als bei Col (Abb. 4.45 C;  $p=0,0020$ ). Dementsprechend war auch das Trockengewicht dieser Linie mit 21 mg signifikant geringer als im Wt, wo es 28 mg betrug ( $p=0,0050$ ). Bei *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i 9.9* betrug das Trockengewicht 27,7 mg bzw. 27,1 mg, was nicht unterschiedlich zum Wt war.

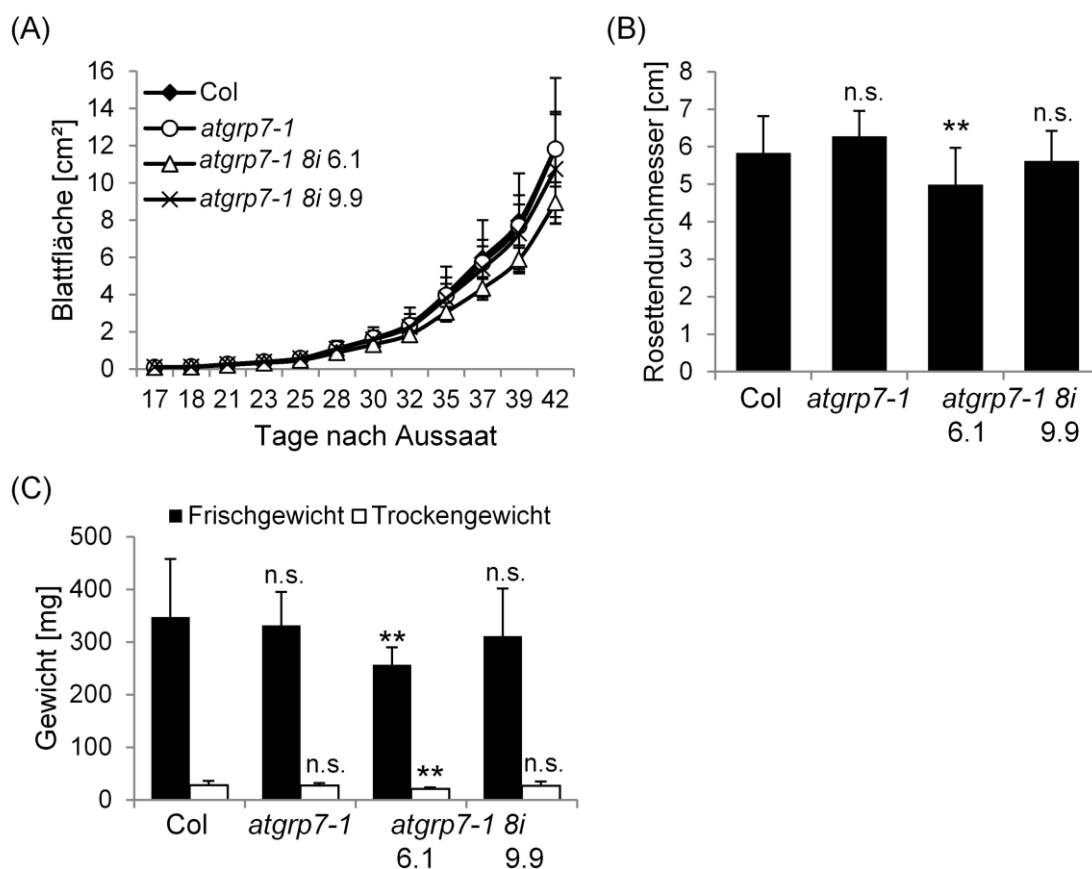


Abb. 4.45: Phänotypische Parameter von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*

Wt (Col), *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i 6.1* und 9.9 wurden im KT angezogen und die phänotypischen Parameter Blattfläche (A) und Rosettendurchmesser (B) wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform GrowScreen Fluoro aufgenommen. Nach Ende des Experiments wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt (C). Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=18-22$  Pflanzen. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test (\*\* $p \leq 0,01$ ; n.s.=nicht signifikant).

#### 4.11.4 Der Wuchsphänotyp von *AtGRP8-ox* Pflanzen im Kurztag

Die konstitutive Überexpression von *AtGRP8* führte zu einem verfrühten Blühzeitpunkt im KT, der allerdings stark dosisabhängig war. Auch der sonstige Wuchsphänotyp von *AtGRP8-ox* Pflanzen zeigte eine dosisabhängige Ausprägung. Im Vergleich zum Wt Col, der im KT eine kräftige Rosette ausbildete, zeigten *AtGRP8-ox* 26a4 und 2b/4a eine viel kleinere Rosette, deren Blätter früh abstarben. Aus den Lateralmeristemen trieben dagegen neue Rosettenblätter aus. Auch die Stängelblätter glichen Rosettenblättern. Bei *AtGRP8-ox* 3/4c waren die Unterschiede zum Wt geringer ausgeprägt. Der Rosettendurchmesser war nur wenig geringer als der von Col und nur wenige Rosettenblätter waren bereits abgestorben. Entlang der Infloreszenz wuchsen normal ausgebildete Stängelblätter.

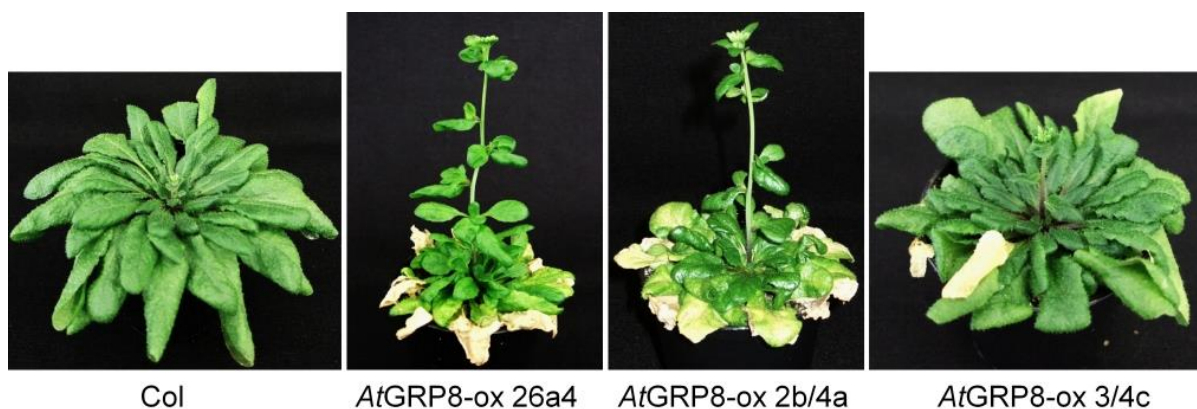


Abb. 4.46: Wuchsphänotyp von *AtGRP8-ox* im KT

Wt (Col), *AtGRP8-ox* 26a4, 2b/4a und 3/4c wurden im KT auf Erde angezogen. Phänotyp nach 11 Wochen, die Pflanzen befinden sich bereits im blühenden Stadium.

Die Rate der Blattbildung wurde für den Wt Col und die *AtGRP8-ox* Linie 26a4 im KT ermittelt (Abb. 4.47 A). Beginnend 25 Tage nach Aussaat wurden alle zwei bis drei Tage die sichtbaren Rosettenblätter gezählt, bis die Pflanzen blühten. Dies war bei Col nach 70 Tagen und einer Blattzahl von 62 der Fall. Die Entwicklung von Wt und *AtGRP8-ox* verlief zunächst weitgehend parallel. Erst in der späteren Entwicklungsphase, beginnend 56 Tage nach Aussaat, entwickelten sich neue Blätter in *AtGRP8-ox* deutlich langsamer als im Wt, was dazu führte, dass die Pflanzen zwar ebenfalls spätestens nach 70 Tagen blühten, jedoch erst 52 Blätter ausgebildet hatten. Dieser Unterschied war signifikant ( $p=0,0000$ ).

Für die Analyse der Wachstumsrate mit „GrowScreen Fluoro“ standen neben *AtGRP8-ox* 26a4 noch zusätzlich die unabhängigen Linien 21a6 und 2b/4a zur Verfügung. Zu Beginn der Datenaufnahme betrug die Wachstumsrate für alle Linien etwa 27 % pro Tag und fiel bis zum Ende des Messzeitraums auf etwa 17 % ab. Für den Zeitraum von 21 Tagen bis 30 Tagen nach Aussaat war kein Unterschied in der Wachstumsrate zwischen Col und den *AtGRP8-ox*-Linien zu beobachten. Erst nach 32 Tagen

verringerte sich die Wachstumsrate in *AtGRP8-ox 26a4* deutlich, die anderen Linien verhielten sich jedoch weiterhin identisch zum Wt (Abb. 4.47 B).

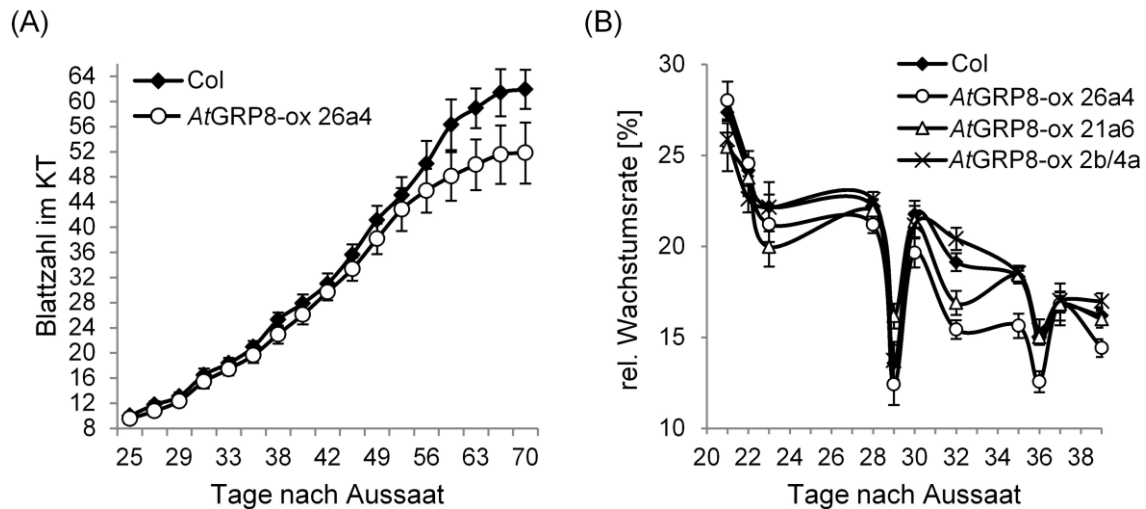


Abb. 4.47: Blattentwicklung und rel. Wachstumsrate von *AtGRP8-ox*

(A) Wt (*Col*) und *AtGRP8-ox 26a4* wurden im KT auf Erde angezogen. Beginnend 25 Tage nach Aussaat wurde die Blattzahl von  $n=15$  Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt, bis die Pflanzen blühten. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD.

(B) Rel. Wachstumsrate von *Col* und *AtGRP8-ox 26a4*, *21a6* und *2b/4a*. Quantifiziert wurde jeweils die rel. Zunahme der Blattfläche im Vergleich zum vorherigen Messpunkt. Die Daten wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform *GrowScreen Fluoro* aufgenommen. Mittelwerte  $\pm$  SE von  $n=18-20$  Pflanzen.

Als weitere phänotypische Parameter wurden durch „*GrowScreen Fluoro*“ die Blattfläche, der Rosettendurchmesser, die Kompaktheit und Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen aufgenommen (Abb. 4.48).

Die Blattfläche erhöhte sich bei allen Linien außer *AtGRP8-ox 26a4* über den Messzeitraum von  $0,2 \text{ cm}^2$  auf  $14 \text{ cm}^2$ . Auch *AtGRP8-ox 26a4* verhielt sich zunächst wie *Col*, ab Tag 32 nach Aussaat nahm die Blattfläche jedoch weniger schnell zu, so dass die Pflanzen an Tag 39 mit  $8,6 \text{ cm}^2$  Blattfläche signifikant kleiner waren als der Wt (Abb. 4.48 A;  $p=0,0001$ ). Der Rosettendurchmesser betrug für *Col* und *AtGRP8-ox 21a6* und *2b/4a*  $5,7 \text{ cm}$  am letzten Tag der Messungen. Bei *AtGRP8-ox 26a4* war er mit  $4,1 \text{ cm}$  signifikant geringer (Abb. 4.48 B;  $p=0,0000$ ). Die Kompaktheit der Rosette wies bei *Col* einen Wert von  $0,60$  auf. *AtGRP8-ox 21a6* und *2b/4a* zeigten mit  $0,63$  keinen signifikanten Unterschied. Lediglich *AtGRP8-ox 26a4* zeigte mit einem Wert von  $0,71$  eine signifikant kompaktere Rosette (Abb. 4.48 C;  $p=0,0000$ ). Der insgesamt kleinere und gedrungene Wuchstyp von *AtGRP8-ox 26a4* spiegelte sich auch in Frisch- und Trockengewicht wider. Während *Col* und die beiden Linien *21a6* und *2b/4a* jeweils  $590 \text{ mg}$  Frischmasse bildeten, waren es bei *AtGRP8-ox 26a4* nur  $340 \text{ mg}$  ( $p=0,0000$ ). Dementsprechend war auch die Trockenmasse in *26a4* mit  $30 \text{ mg}$  signifikant geringer als bei *Col* mit  $49 \text{ mg}$  (Abb. 4.48 D;  $p=0,0000$ ).

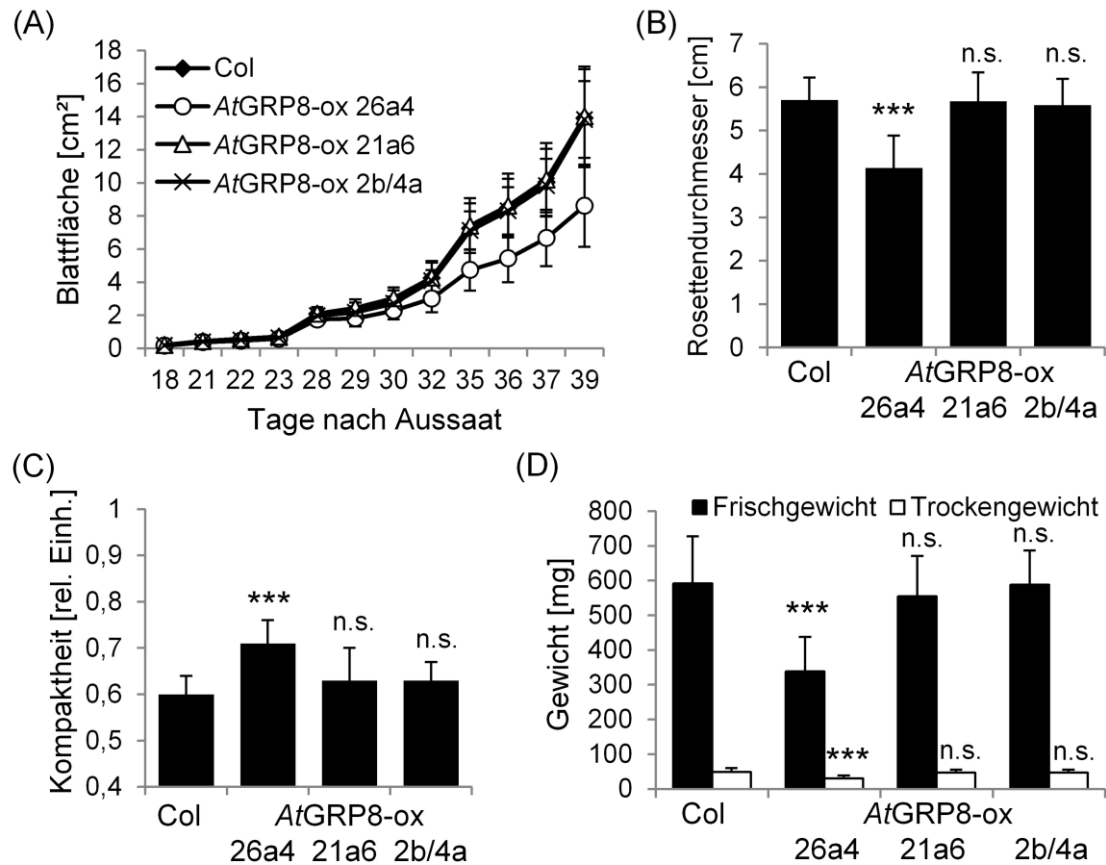


Abb. 4.48: Phänotypische Parameter von AtGRP8-ox

Wt (Col) und AtGRP8-ox 26a4, 21a6 und 2b/4a wurden im KT angezogen und die phänotypischen Parameter Blattfläche (A), Rosettendurchmesser (B) und Kompaktheit (C) wurden mit der automatisierten Phänotypisierungsplattform GrowScreen Fluoro aufgenommen. Nach Ende des Experiments wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt (D). Mittelwerte  $\pm$  SD von n=18-20 Pflanzen. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant).

## 5 Diskussion

### 5.1 Das Zusammenspiel von AtGRP7 und AtGRP8 in der Blühinduktion

Die T-DNA Mutante *atgrp7-1*, bei der weder Transkript noch Protein von AtGRP7 nachgewiesen werden können, zeigt einen moderat verspäteten Blühzeitpunkt im LT und im KT. Im Gegensatz dazu zeigen Pflanzen, die das Protein verstärkt exprimieren (*AtGRP7-ox*), Merkmale eines frühblühenden Phänotyps. Als eine der Ursachen für die Ausprägung des Blühphänotyps konnte die veränderte Expression des Blührepressors *FLC* identifiziert werden (Streitner et al., 2008). Als Folge des Verlustes der negativen Kreuzregulation durch AtGRP7 steigt jedoch in *atgrp7-1* das Level des verwandten AtGRP8 stark an. Da angenommen werden muss, dass AtGRP8 ähnliche Funktionen wie AtGRP7 erfüllt, könnte also die verstärkte Expression von AtGRP8 in *atgrp7-1* mögliche Effekte in der Blühregulation, die durch den Verlust von AtGRP7 ausgelöst werden, abmildern oder maskieren. Für weitere Analysen wäre daher eine *atgrp7/atgrp8* Doppelmutante hilfreich. Da jedoch für AtGRP8 bis heute keine *null*-Mutante identifiziert werden konnte, wurde ein RNAi-Konstrukt gegen AtGRP8 erstellt, um die Expression auf post-transkriptioneller Ebene zu verringern. Durch Kreuzung wurde dieses Konstrukt auch in *atgrp7-1* eingebracht, um die Doppelmutante *atgrp7-1 8i* zu erhalten (Streitner et al., 2008, 2012). Die so erzeugten Pflanzen weisen nicht mehr die erhöhte Expression von AtGRP8 auf, wie sie in *atgrp7-1* beobachtet wird.

Vergleichende Analysen des Blühzeitpunkts von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* konnten in der vorliegenden Arbeit nun den Effekt von AtGRP8 auf die Blühregulation näher aufklären. Tatsächlich zeigte *atgrp7-1 8i* verglichen mit *atgrp7-1* eine zusätzliche Verspätung des Blühzeitpunktes. AtGRP8 mildert also den Effekt auf die Verspätung des Blühzeitpunktes ab. Auch auf Transkriptebene konnte dieser abmildernde Einfluss nachgewiesen werden. So war das *FLC*-Level in *atgrp7-1 8i* gegenüber *atgrp7-1* nochmals erhöht. Eine Analyse der zwei vorhandenen *atgrp7-1 8i*-Linien auf Proteinebene zeigte jedoch, dass immer noch AtGRP8-Protein gebildet wurde und das RNAi-Konstrukt die Menge lediglich reduzierte. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Effekte bei einem gänzlichen Verlust von AtGRP8 noch stärker ausgeprägt wären. Da keine AtGRP8 *null*-Mutante zur Verfügung steht, und zudem in einer solchen Mutante vermutlich erhöhte AtGRP7-Level durch die nicht mehr stattfindende negative Kreuzregulation der beiden Proteine (Schöning et al., 2008) auftreten würden, die wiederum mögliche Effekte auf den Blühphänotyp maskieren könnten, wurde der Ansatz gewählt, den Blühphänotyp von *AtGRP8-ox* zu untersuchen. Blühversuche im KT zeigten, dass die Überexpression von AtGRP8 dazu führte, dass die Pflanzen weniger Blätter bis zur Blüte ausbilden und auch eine geringere Anzahl an Tagen von der Aussaat bis zur Blüte benötigten. Allerdings zeigte sich dieser Effekt nur in zwei der drei analysierten unabhängigen Linien. Eine Analyse der AtGRP8-Proteinlevels zeigte, dass die Linie mit dem höchsten Grad an Überexpression den stärksten

Blühphänotyp ausbildete und der Effekt auf den Blühzeitpunkt mit sinkender *AtGRP8*-Konzentration immer geringer wurde. Daher ist davon auszugehen, dass die Auswirkungen auf den Blühphänotyp stark dosisabhängig sind. Unabhängig davon war jedoch in allen drei Linien das Proteinniveau von *AtGRP7* bedingt durch die Überexpression von *AtGRP8* nahezu gleich niedrig. *AtGRP7* scheint daher auch schon bei geringer Überexpression von *AtGRP8* herabreguliert zu werden, was darauf hinweist, dass es eines der Transkripte ist, die bevorzugt durch *AtGRP8* gebunden werden. Erste RIP-Analysen mit einem *AtGRP8*-GFP Fusionsprotein bestätigen dies (Köster et al., 2014a).

Der Einfluss von *AtGRP8-ox* auf das *FLC*-Expressionslevel stellte sich als entwicklungsabhängig dar. So konnte in vier Wochen alten Pflanzen keine Veränderung gegenüber dem Wt festgestellt werden, bzw. war das *FLC*-Level bei der Linie mit dem höchsten Grad an Überexpression sogar höher als im Wt. In sieben Wochen alten Pflanzen war jedoch in allen drei Linien *FLC* deutlich niedriger als im Wt. Somit scheint ein niedriges *FLC*-Level auch ursächlich für den früheren Blühzeitpunkt von *AtGRP8-ox* zu sein. Der Einfluss von *AtGRP8* auf *FLC* scheint jedoch erst bei älteren Pflanzen stattzufinden, was möglicherweise den verhältnismäßig milden Effekt auf eine Verfrühung des Blühphänotyps bewirkt. Im Gegensatz dazu lässt sich bei *AtGRP7-ox* unabhängig vom Alter der Pflanzen immer ein geringes *FLC*-Level beobachten.

Die beiden RBPs *AtGRP7* und *AtGRP8* weisen eine Identität von 80 % in ihrer Aminosäuresequenz auf. Beide zeigen die gleiche Form von Autoregulation und sind zudem in eine wechselseitige Kreuzregulation eingebunden (Heintzen et al., 1997; Staiger et al., 2003a; Schöning et al., 2007, 2008; Schmal et al., 2013). Darüber hinausgehende Analysen haben bisher immer die Rolle von *AtGRP7* in den Mittelpunkt gestellt, so etwa in der pflanzlichen Stressantwort (Cao et al., 2006; Kim et al., 2007, 2008; Schmidt et al., 2010; Kwak et al., 2011), in der Pathogenabwehr (Fu et al., 2007; Nicaise et al., 2013; Hackmann et al., 2014) oder in der Blühregulation (Streitner et al., 2008). Auf Grund der großen Ähnlichkeit der beiden Proteine ist davon auszugehen, dass *AtGRP8* analoge Funktionen erfüllt. Die hier durchgeführten Analysen für den Bereich der Blühinduktion zeigen, dass *AtGRP8*, ähnlich wie *AtGRP7*, als Aktivator der Blühinduktion wirkt:

- Die Überexpression von *AtGRP8* führt zu einem verfrühten Blühzeitpunkt, während die Herabregulation von *AtGRP8* in *atgrp7-1 8i* dagegen den Blühzeitpunkt weiter verspätet.
- Während in *AtGRP8-ox* das Level des Blührepressors *FLC* gering ist, ist es in *atgrp7-1 8i* höher als im Wt und in der Einzelmutante *atgrp7-1*. Die Beeinflussung von *FLC* ist jedoch nur bei älteren Pflanzen nachzuweisen.

Beide Proteine beeinflussen die Blühinduktion nicht gleichberechtigt, sondern *AtGRP7* scheint hierarchisch über *AtGRP8* zu stehen. Folgende Ergebnisse untermauern dies:

- Die Überexpression von *AtGRP7* führt dazu, dass die Pflanzen weit weniger Blätter bis zur Blüte ausbilden. Die Zeit, die sie bis zur Blüte benötigen, ist jedoch nicht unterschiedlich zum Wt. Der Effekt

von *AtGRP7-ox* auf den Phänotyp ist stärker als bei *AtGRP8-ox* und weniger dosisabhängig.

- In *atgrp7-1* ist *AtGRP8* durch den Verlust der negativen Kreuzregulation hochreguliert, die Pflanzen blühen aber trotzdem spät.

- In *AtGRP7-ox* ist auch bei jungen Pflanzen ein geringeres *FLC*-Level als im Wt nachzuweisen, in *AtGRP8-ox* nur in älteren Pflanzen.

Der nur leicht verfrühte Blühzeitpunkt von *AtGRP8-ox* könnte auch durch das geringe *AtGRP7*-Level in diesen Pflanzen begründet sein, das den Blühzeitpunkt verspätet und durch *AtGRP8-ox* so kompensiert wird, dass es zu einem moderaten frühblühenden Phänotyp kommt. Vorstellbar ist zudem, dass eine zeitliche Hierarchie in der Wirkung der beiden Proteine existiert. Während *AtGRP7* in jungen Pflanzen bis zur Blühinduktion aktiv ist, könnte *AtGRP8* seine Funktionen vornehmlich in älteren Pflanzen erfüllen, was den geringeren Einfluss auf den Blühzeitpunkt erklären würde. So lässt sich z.B. auch im LT, wo die Pflanzenentwicklung sehr viel schneller beendet ist als im KT, kein zusätzlich erhöhtes *FLC*-Level in *atgrp7-1 8i* verglichen mit *atgrp7-1* beobachten, was für den nicht stattfindenden Einfluss von *AtGRP8* während dieser kurzen Entwicklungsperiode spricht.

Weitergehende Untersuchungen zur genauen Funktion der beiden Proteine werden jedoch dadurch erschwert, dass bisher keine *null*-Mutante für *AtGRP8* zur Verfügung steht. Um hier Abhilfe zu schaffen, könnte in einem gezielten Ansatz mit dem CRISPR/Cas9-System (Barrangou et al., 2007) ein funktionsloses *AtGRP8*-Allel erzeugt werden. In *Arabidopsis* wurde diese Methode des „genome editing“ bereits erfolgreich eingesetzt (Feng et al., 2013; Hyun et al., 2014). Weiter zur Aufklärung beitragen könnte zudem eine Doppelmutante, die sowohl *AtGRP7* als auch *AtGRP8* überexprimiert. Zahlreiche Versuche, derartige Pflanzen durch Kreuzung oder Transformation zu erzeugen, blieben jedoch ohne Erfolg. Entweder kam keine Überexpression des einen oder anderen Proteins zustande, oder die Pflanzen waren nicht vital (Streitner, Staiger unpubliziert). Die Aufrechterhaltung des Regulationsmechanismus scheint also von großer Bedeutung für die Pflanze zu sein.

## 5.2 Die Komplementation des Blühphänotyps von *atgrp7-1*

Um zu überprüfen, ob der späte Blühphänotyp von *atgrp7-1* direkt auf das Fehlen von *AtGRP7* zurück zu führen ist, wurde eine Komplementationsanalyse der Mutante durchgeführt. Dazu wurde ein 2,9 kb großes genomisches Fragment von *AtGRP7* verwendet, das neben den regulatorischen Elementen in 5'-UTR, 3'-UTR und Intron auch 1,4 kb der Promotorregion beinhaltet (Staiger und Apel, 1999), um eine dem Wt-Allel möglichst ähnliche Regulation zu erzielen. In drei unabhängigen transgenen Linien konnte eine Aufhebung des spätblühenden Phänotyps von *atgrp7-1* erzielt werden. Die Analyse der Proteinlevel zeigte, dass das eingebrachte Konstrukt in allen Linien exprimiert wurde und funktionell in der Lage war, das erhöhte *AtGRP8*-Level, das normalerweise in *atgrp7-1* vorliegt, zu reprimieren.

Das Expressionslevel war in allen Linien höher als im Wt, dennoch blühte keine der Pflanzen merklich früher als Col. Entweder reicht also die Dosis dafür nicht aus (sie war immer noch bedeutend geringer als in *AtGRP7-ox*), oder die signifikante Verringerung der Blattzahl in *AtGRP7-ox* ist zumindest zum Teil eine Folge der ektopischen Überexpression unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors. Diese These wird dadurch bestärkt, dass das Komplementationskonstrukt zwar in der Lage war, die *FLC*-Transkriptlevel auf ein ähnliches Niveau wie in *AtGRP7-ox* zu verringern, was sich aber nicht in einer gleichermaßen reduzierten Blattzahl zum Blühzeitpunkt äußerte.

Um zu überprüfen, ob die RNA-Bindefähigkeit von *AtGRP7* direkt mit der Ausbildung des Blühphänotyps zusammenhängt, wurde *atgrp7-1* mit einem genomischen Klon von *AtGRP7* komplementiert, bei dem das Arginin an Position 49 durch Glutamin ersetzt wurde (*AtGRP7* R<sup>49</sup>Q). Die Mutation befindet sich im RRM von *AtGRP7* und vermindert die RNA-Bindefähigkeit (Schöning et al., 2007). In vier komplementierten Linien war die Blattzahl zum Blühzeitpunkt nicht unterschiedlich zu *atgrp7-1*. Auf Proteinebene war ersichtlich, dass bei einem Wt-Expressionslevel von *AtGRP7* R<sup>49</sup>Q keine Reduktion von *AtGRP8* stattfand. Bei starker Expression des Transgens war jedoch ein reduziertes *AtGRP8*-Level zu beobachten. In gleicher Weise zeigte sich auch eine Reduktion des *FLC*-Transkriptlevels bei starker Expression von *AtGRP7* R<sup>49</sup>Q, während Wt-Level des Proteins das erhöhte *FLC*-Level in *atgrp7-1* nicht reduzieren konnten. Die RNA-Bindefähigkeit von *AtGRP7* ist daher von großer Bedeutung für die Regulation von Zieltranskripten und die Ausbildung des Blühzeitphänotyps. Die Mutation von Arginin zu Glutamin im RRM verhindert die RNA-Bindung allerdings nicht vollständig, so dass bei starker Expression die Restaktivität ausreichend ist, um die Effekte auf *AtGRP8* und *FLC* herbeizuführen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Analysen des Pathogen-Phänotyps von *atgrp7-1* erzielt. Die Mutante *atgrp7-1* zeigt eine höhere Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Pseudomonas syringae*, die durch Expression von Wt-*AtGRP7* korrigiert wird, nicht jedoch durch Expression von *AtGRP7*, bei dem Arginin 49 durch Lysin ersetzt wurde (Jeong et al., 2011; Nicaise et al., 2013). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer intakten RNA-Bindefähigkeit auch für andere physiologische Prozesse.

Trotz der im Vergleich zu Col erhöhten Expression des Wt-*AtGRP7* Transgens in *atgrp7-1* gelang es nur, den Blühzeitpunkt etwa auf Wt-Niveau zu verfrühen, obwohl *FLC* auf ein ähnliches Niveau wie in *AtGRP7-ox* reduziert war. Auch im sonstigen Wuchsphänotyp glichen die Pflanzen eher dem Wt als *AtGRP7-ox*. Für die Ausbildung des *AtGRP7-ox* Phänotyps müssen daher entweder noch wesentlich höhere Konzentrationen von *AtGRP7* vorliegen, oder der Phänotyp beruht zumindest zum Teil auf pleiotropen Effekten, die auf die ektopische Expression zurückgehen und die durch die Expression unter Kontrolle der endogenen regulatorischen Elemente nicht gegeben sind.



### 5.3 AtGRP7 ist nicht an der photoperiodischen Blühinduktion beteiligt

Die photoperiodische Blühinduktion wird wesentlich durch die innere Uhr der Pflanze gesteuert (Andrés und Coupland, 2012). *AtGRP7* ist der inneren Uhr nachgeschaltet und wird durch diese reguliert (Schmal et al., 2013). Daher wurde überprüft, ob *AtGRP7* über den photoperiodischen Signalweg auf die Blühinduktion wirkt.

Eine Schlüsselrolle in diesem Signalweg nimmt das Protein CO ein (Putterill et al., 1995; Suárez-López et al., 2001; An et al., 2004). An der CO-Regulation beteiligt ist das Protein GI (Sawa et al., 2007), das jedoch auch unabhängig von CO die photoperiodische Blühinduktion beeinflusst (Jung et al., 2007; Sawa und Kay, 2011). Daher wurden Doppelmutanten von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* mit den photoperiodisch insensitiven Mutanten *co-9* und *gi-2* erzeugt, um sowohl CO-abhängige wie auch CO-unabhängige Effekte auf die Blühinduktion zu untersuchen. Der Blühzeitpunkt wurde im LT und im KT analysiert. Sowohl *co-9 atgrp7-1* als auch *gi-2 atgrp7-1* und *gi-2 atgrp7-1 8i* blühten mit einer höheren Blattzahl als die jeweiligen Einzelmutanten *co-9* und *gi-2*. Da sich die Mutationen additiv verhalten, wirken sie demnach unabhängig voneinander auf den Blühzeitpunkt. Wurde *AtGRP7* im *co-9*-Hintergrund überexprimiert (*AtGRP7-ox co-9*), führte dies zu einem frühen Blühzeitpunkt sowohl im LT als auch im KT. Auch *AtGRP7-ox* beeinflusst den Blühzeitpunkt also unabhängig von CO. Eine Analyse der Transkriptszillation von CO zeigte im LT und im KT keine Unterschiede zwischen Col und *AtGRP7-ox G*, so dass auch hier davon auszugehen ist, dass CO nicht durch *AtGRP7* beeinflusst wird.

Charakteristisch für Mutationen im photoperiodischen Signalweg ist, dass für die Pflanze keine Unterscheidung der Photoperiode mehr möglich ist, und sich der Blühphänotyp sowohl im LT als auch im KT ähnlich ausprägt (Koornneef et al., 1991). So blühen *co-9* und *gi-2* auch in den hier durchgeführten Experimenten im LT und im KT mit annähernd gleicher Blattzahl, was dazu führt, dass sie im LT wesentlich später blühen als der Wt, im KT aber kein Unterschied zum Wt festzustellen ist. Die Wahrnehmung der Photoperiode ist demnach gestört. Im Gegensatz dazu blühen sowohl *AtGRP7-ox* als auch *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* im LT mit deutlich weniger Blättern als im KT. Die Wahrnehmung der Photoperiode ist intakt. Die analysierten Doppelmutanten zeigen, dass *AtGRP7* genetisch unabhängig von Co und GI den Blühzeitpunkt beeinflusst. Die CO-Oszillation ist in *AtGRP7-ox* unverändert zum Wt. Auch in *atgrp7-1* konnte keine veränderte CO-Oszillation beobachtet werden (Streitner et al., 2008). Obwohl *AtGRP7* unter der Kontrolle der inneren Uhr in *Arabidopsis* steht und Transkript und Protein mit hoher Amplitude oszillieren, erfüllt es weder eine Funktion im CO-abhängigen noch im CO-unabhängigen Signalweg der photoperiodischen Blühinduktion. Ähnliches konnte für das Protein SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED (*SRR1*) gefunden werden, dessen Verlust einen starken Einfluss auf den Rhythmus der Oszillatorkomponenten *TOC1* und *CCA1* aufweist (Staiger et al., 2003b). Trotz dieses regulatorischen

Einflusses auf die innere Uhr kontrolliert SRR1 den Blühzeitpunkt unabhängig vom photoperiodischen Signalweg (Johansson und Staiger, 2014). Wie genau sich die circadiane Regulation von *AtGRP7* auf seine Funktion in der Blühinduktion, aber auch auf andere Prozesse wie die Pathogenabwehr auswirkt, bleibt aufzuklären.

#### 5.4 Untersuchungen zur genetischen Interaktion von *AtGRP7* und Mitgliedern des autonomen Signalwegs der Blühinduktion

Die T-DNA Mutante *atgrp7-1* zeigt einen verspäteten Blühzeitpunkt im LT und im KT, der über die Beeinflussung des Blührepressors *FLC* vermittelt wird, die Unterscheidung zwischen den Photoperioden ist jedoch intakt. Auch die Reaktion auf Vernalisierung und das Phytohormon GA ist nicht beeinträchtigt (Streitner et al., 2008). Damit besitzt *atgrp7-1* alle Merkmale, die Mutanten im autonomen Signalweg der Blühregulation auszeichnen (Koornneef et al., 1998; Simpson, 2004). Um *AtGRP7* in diesem Signalweg näher einzuordnen und mögliche Interaktionen zwischen *AtGRP7* und den anderen beteiligten Genen des Signalwegs aufzuklären, wurden Doppelmutanten von *atgrp7-1* bzw. *atgrp7-1 8i* mit *fca-9*, *fpa-3*, *flk-1* und *fld-3* erzeugt und ihr Blühzeitpunkt im LT analysiert. Die Doppelmutationen *atgrp7-1 8i fca-9*, *atgrp7-1 8i fpa-3* und *atgrp7-1 8i flk-1* wiesen starke additive bis synergistische Effekte auf den Blühzeitpunkt auf, was darauf schließen lässt, dass *AtGRP7* genetisch unabhängig von *FCA*, *FPA* und *FLK* in der Blühregulation wirkt. Im Gegensatz dazu zeigten *atgrp7-1 fld-3* und *atgrp7-1 8i fld-3* Doppelmutanten keinen additiven Effekt auf den Blühzeitpunkt. Die Doppelmutanten zeigten keinen signifikant unterschiedlichen Blühzeitpunkt zur *fld-3* Einzelmutante. Die Mutation in *fld-3* verhält sich epistatisch zu *atgrp7-1* und es ist daher von einer genetischen Abhängigkeit auszugehen, so dass beide Gene mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem gemeinsamen Regulationsweg innerhalb des autonomen Signalwegs eingeordnet werden können. Da sich in den Doppelmutanten *atgrp7-1 fld-3* und *atgrp7-1 8i fld-3* der Blühzeitphänotyp der *fld-3* Einzelmutante ausprägt, ist davon auszugehen, dass *FLD* stromabwärts von *AtGRP7* agiert. Ein Modell für diesen Signalweg ist in Abb. 5.1 angegeben und zeigt drei alternative Möglichkeiten der Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Der erste Fall geht von einer direkten Interaktion der beiden Proteine aus. In diesem Fall wird *FLD* durch *AtGRP7* positiv beeinflusst, so dass es seine Funktion in der Herabregulation der *FLC*-Transkription ausführen kann. Die beiden anderen Fälle gehen von einer indirekten Interaktion aus. *AtGRP7* übt hier entweder einen aktivierenden Einfluss auf einen unbekanntem Faktor X aus, welcher wiederum seinerseits *FLD* aktiviert, oder *AtGRP7* hemmt einen Repressor, der im weiteren Verlauf die Aktivität von *FLD* hemmen würde. Durch diese Art der negativen Regulation eines Repressors kommt es ebenfalls zur Aktivierung der *FLD*-Funktion und zu einer Herabregulation von *FLC*.

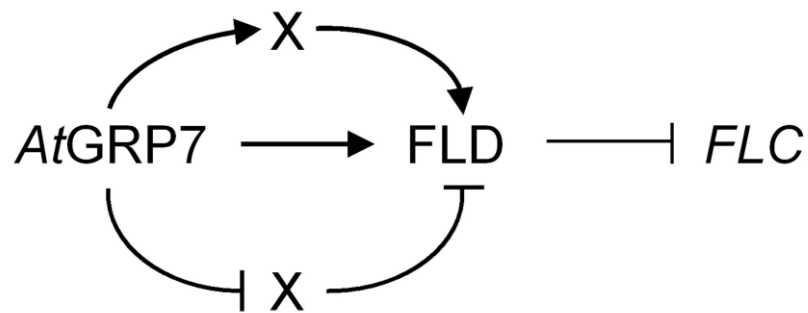


Abb. 5.1: Modell der Interaktion zwischen *AtGRP7* und *FLD*

Drei Wege der Interaktion zwischen *AtGRP7* und *FLD* erscheinen möglich. 1. Eine direkte Interaktion, bei der *AtGRP7* *FLD* aktiviert. 2. Eine indirekte Interaktion, bei der *AtGRP7* einen unbekanntem Faktor X aktiviert, der wiederum *FLD* aktiviert. 3. Eine indirekte Interaktion, bei der *AtGRP7* einen Faktor X reprimiert, der als Repressor von *FLD* fungiert.

## 5.5 Wirkungsweisen der RNA-Bindeproteine im autonomen Signalweg

Im autonomen Signalweg der Blühinduktion sind RBPs und Chromatin-modifizierende Proteine eingeordnet. Extensive Analysen von Doppelmutanten haben gezeigt, dass die Proteine dieses Signalwegs größtenteils unabhängig voneinander die Blühinduktion indirekt über die Repression von *FLC* beeinflussen. Eine Ausnahme bildet das Protein *FY*, das ein konservierter Faktor des Polyadenylierungskomplexes ist, und das physikalisch mit *FCA* interagiert (Quesada et al., 2003; Simpson et al., 2003). Des Weiteren bestehen Hinweise darauf, dass sowohl *FCA* als auch *FPA* die Histon Demethylase *FLD* zur Ausprägung ihrer vollen Funktion benötigen, denn *fca fld* und *fpa fld* Doppelmutanten zeigen keinen additiven Blühphänotyp, allerdings ist die Überexpression von *FCA* in der Lage, den Blühzeitpunkt einer *fld*-Mutante zu verfrühen (Liu et al., 2007; Bäurle und Dean, 2008). Da auch *atgrp7-1 fld-3* Doppelmutanten keinen additiven Blühphänotyp zeigen, nimmt *FLD* scheinbar eine zentralere Rolle innerhalb des autonomen Signalwegs ein und integriert möglicherweise die Signale der ansonsten parallel arbeitenden RBPs *FCA*, *FPA* und *AtGRP7*. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, bedarf es jedoch weiterer Analysen. So sollte zunächst überprüft werden, ob auch *AtGRP7-ox* in *fld-3* zu keiner Veränderung des Blühzeitpunktes führt, oder ob es analog zur Überexpression von *FCA* in *fld* auch hier zu *FLD*-unabhängigen Effekten auf den Blühzeitpunkt kommt. Eine direkte *in vivo* Interaktion von *AtGRP7* mit *FLD* mRNA könnte mittels RIP überprüft werden, jedoch zeigt sich weder in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* noch in *AtGRP7-ox* eine nennenswerte Beeinflussung des Transkriptlevels, so dass es fraglich erscheint, ob *FLD* auf Transkriptebene durch *AtGRP7* reguliert wird. Möglich wäre jedoch, dass *AtGRP7* alternatives Splicing von *FLD* vermittelt, da die mRNA über vier Introns verfügt. Alternatives Splicing von *FLD* ist jedoch bisher nicht beschrieben worden und es sind keine Splicevarianten annotiert. Nicht auszuschließen ist auch eine Beeinflussung

der FLD-Translation durch *AtGRP7*. Dieser Effekt würde sich in einem veränderten Proteinlevel bemerkbar machen.

Die RBPs FCA, FPA, FLK und *AtGRP7* wirken nach den Daten dieser Arbeit unabhängig voneinander auf das gemeinsame Zieltranskript *FLC*. Von FCA und FPA ist bekannt, dass sie die 3'-Prozessierung von Transkripten beeinflussen. Beide Proteine zeigen Autoregulationsmechanismen, die die Wahl der bevorzugten poly(A)-Sequenz beeinflussen und schließlich zu verkürzten Transkripten führen, die nicht mehr für funktionelle Proteine codieren (Quesada et al., 2003; Simpson et al., 2003; Hornyk et al., 2010b). Besonders detailliert ist dieser Mechanismus bisher für FPA beschrieben worden. In *fpa*-Mutanten kommt es bei einer ganzen Reihe von Loci zu veränderter Terminierung von Transkripten und somit zu einem „read through“ der RNA-Polymerase in benachbarte Gene, was zur Bildung chimärer mRNAs führt (Duc et al., 2013). Wie jedoch FCA und FPA die *FLC*-Transkription genau regulieren, ist unbekannt. Zwar können beide Proteine an *FLC* Chromatin gefunden werden (Liu et al., 2007; Hornyk et al., 2010b), doch weder wird die prä-mRNA von *FLC* in besonderem Maße alternativ gespliced, noch lässt sich alternative Polyadenylierung des Transkripts messen (Duc et al., 2013). Einziger Hinweis ist eine veränderte Regulation von *FLC*-Antisense RNAs in *fca* und *fpa*. Antisense RNAs werden von einem Promotor im 3'-UTR von *FLC* in geringer Abundanz transkribiert, und bei diesen Transkripten kann sowohl alternatives Splicing als auch alternative Polyadenylierung detektiert werden, wobei es sowohl in *fca* als auch in *fpa* verstärkt zur Wahl einer Promotor-distalen poly(A)-Site kommt (Liu et al., 2007; Swiezewski et al., 2007; Hornyk et al., 2010b). In diesen Mutanten mit erhöhter *FLC*-sense Expression lässt sich also auch verstärkte antisense-Expression messen. Wie jedoch die Antisense-Transkripte wiederum genau die Sense-Transkription beeinflussen, ist nicht geklärt. Spekuliert wird, dass ein „read through“ der antisense-Transkripte, wie er in *fca* und *fpa* stattfindet, zur Ausbildung einer langen antisense-RNA führt, die wiederum die Sense-Transkription stimuliert (Rataj und Simpson, 2013). Ein selbstverstärkender Rückkopplungskreis dieser Art ist auch von *ARG1* aus *S. cerevisiae* bekannt (Crisucci und Arndt, 2012). Auch in *Arabidopsis* identifizierten Duc und Kollegen (2013) weitere vier Loci, bei denen Sense- und Antisense-Transkription positiv korreliert sind. In *fca* und *fpa* scheint die Misregulation von *FLC* daher eher auf transkriptioneller Ebene zu funktionieren. Die beiden Proteine regulieren *FLC* indirekt, indem sie Antisense-Transkripte regulieren, die wiederum die Sense-Transkription stimulieren (Liu et al., 2010).

Auch *AtGRP7* zeigt einen ausgeprägten Autoregulationsmechanismus. Anders als FCA und FPA reguliert sich das Protein jedoch nicht über die Wahl der poly(A)-Site, sondern durch alternatives Splicing des Introns, was letztlich zum Abbau der trunkierten mRNA über den NMD führt (Schöning et al., 2007). Auch eine Reihe weiterer Transkripte wird durch *AtGRP7* über alternatives Splicing beeinflusst, was die Vermutung nahe legt, dass *AtGRP7* ein post-transkriptioneller Regulator der

Genexpression ist (Streitner et al., 2012). Das Transkript von *FLC* ist jedoch kein Ziel aber alternativen Splicings (Duc et al., 2013) und so zeigte auch die hier durchgeführte RIP keine *in vivo* Interaktion von *AtGRP7* mit *FLC* unter den gewählten Anzuchtbedingungen. Ebenfalls war kein Einfluss auf die Abundanz von *FLC* antisense Transkripten zu erkennen. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass *FLC* von *AtGRP7* indirekt über andere Faktoren reguliert wird.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist neben *AtGRP7* auch das verwandte *AtGRP8* in die Blühregulation mit eingebunden, wenn auch der Effekt schwächer ausgeprägt zu sein scheint als bei *AtGRP7*. Eine Kreuzregulation, wie sie zwischen den beiden Proteinen auftritt, wird dabei zum ersten Mal im autonomen Signalweg beobachtet. Für die RBPs *FCA* und *FPA* sind keine weiteren Kopien im *Arabidopsis*-Genom bekannt, von *FLK* existiert jedoch das Funktionsparalog *PEP*, das antagonistisch zu *FLK* wirkt. Beide Proteine regulieren sich jedoch nicht gegenseitig auf post-transkriptioneller Ebene (Ripoll et al., 2006, 2009). Von den Histon-Modifikatoren *FLD* und *FVE* existieren zwei bzw. vier weitere Paralogue, die teilweise funktionelle Redundanzen aufweisen, aber keine wechselseitige gegenseitige Beeinflussung zeigen (Jiang et al., 2007; Gu et al., 2011). Kürzlich konnte das *FVE*-Paralog *MSI1* in den photoperiodischen Signalweg der Blühinduktion eingeordnet werden, was dafür spricht, dass dieser Proteinklasse eine breitere Rolle in der Blühregulation zukommt (Steinbach und Hennig, 2014). Im Gegensatz zu *AtGRP7/AtGRP8* ist allen Proteinen des autonomen Signalwegs gemein, dass bereits die jeweiligen Einzelmutanten einen stark ausgeprägten spätblühenden Phänotyp zeigen, während dieser bei *atgrp7-1* nur moderat ausgeprägt ist und erst in der Doppelmutante *atgrp7-1 8i* deutlicher zutage tritt. *AtGRP7* und *AtGRP8* erzeugen somit die mildesten Phänotypen in diesem Regulationsweg.

Bisher unbekannt sind auch immer noch die Eingangssignale des autonomen Signalwegs (Rataj und Simpson, 2013). Da *AtGRP7* immer wieder mit der Reaktion auf externe Stimuli in Verbindung gebracht wird (Cao et al., 2006; Fu et al., 2007; Kim et al., 2008; Streitner et al., 2010; Yang et al., 2014), könnte es eine mögliche Schnittstelle zwischen der Wahrnehmung externer Signale und deren Integration in die Blühregulation darstellen. Zwar scheinen auch die Proteine *FPA* und *FLD* Reaktionen auf externe Stimuli in Form von Pathogenbefall zu vermitteln (Lyons et al., 2013; Singh et al., 2014) und *FVE* ist an der kälteabhängigen Signaltransduktion beteiligt (Kim et al., 2004; Jeon und Kim, 2011), doch diese Funktionen wurden bisher immer als parallel zur Funktion im autonomen Signalweg angesehen, und nicht mit Eingangssignalen in Verbindung gebracht.

## 5.6 Phänotypische Besonderheiten der Doppelmutanten des autonomen Signalwegs

Bei den Doppelmutanten *atgrp7-1 8i fca-9* und *atgrp7-1 8i fpa-3* traten extreme Verzögerungen im Blühzeitpunkt auf. Zwar gelangten auch diese Pflanzen im LT nach teilweise deutlich über 100 Tagen zur Blüte, vor allem jedoch bei *atgrp7-1 8i fca-9* sowie bei *fpa-3 atgrp7-1 8i*, bei denen *fpa-3* die Mutterpflanze und *atgrp7-1 8i* der Pollendonator war, waren die phänotypischen Auswirkungen so dramatisch, dass keine normale Rosettenpflanze mehr zu erkennen war. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass die Einzelmutante *atgrp7-1 8i* nur einen im Vergleich sehr milden Effekt auf den Blühzeitpunkt aufweist und auch der Wuchsphänotyp kaum beeinflusst wird. Ebenfalls weisen die Einzelmutanten *fca-9* und *fpa-3* bis auf ihren späten Blühzeitpunkt nur geringe phänotypische Abweichungen auf. In Kombination wirken sich die Mutationen jedoch dramatisch aus. Ein Grund könnte das erhöhte *FLC*-Level in den Doppelmutanten sein. *FLC* beeinflusst nicht nur den Übergang zur Blühinduktion, sondern erfüllt auch eine Rolle in der Regulation der vegetativen Phase (Willmann und Poethig, 2011). So inhibiert *FLC* z.B. die Expression des Transkriptionsfaktors *SPL15* und verlängert damit die vegetative Phase der Pflanze (Deng et al., 2011).

In den Doppelmutanten korrelierte die Stärke der *FLC*-Expression mit der Schwere der phänotypischen Anomalitäten. Dies spricht dafür, dass ein *FLC*-abhängiger Effekt auf den Phänotyp vorliegt. Allerdings war die *FLC*-Expression in den Doppelmutanten nicht dramatisch höher als in den Einzelmutanten *fca-9* oder *fpa-3*. Ob daher allein das *FLC*-Level für den Phänotyp verantwortlich ist, ließe sich nur durch zusätzliches Einkreuzen des Allels *flc-3* in die Doppelmutanten überprüfen.

Beachtet werden sollte auch, dass das Probenmaterial für die Transkriptanalysen zu einem Zeitpunkt geerntet wurde, als alle Pflanzen noch eine normal ausgeprägte Blattrosette aufwiesen, um die Expression mit dem Wt und *atgrp7-1 8i* zu vergleichen, die sich zum Zeitpunkt an dem die Doppelmutanten Wuchsanomalien zeigten, schon längst in der Blüte befanden. Es ist daher möglich, dass die *FLC*-Expression in den Lateralmeristemen von *atgrp7-1 8i fca-9* und *fpa-3 atgrp7-1 8i* nicht mit erfasst wurde und diese ursächlich für die beobachteten Phänotypen ist.

Funktionelle Redundanz, wie sie hier zwischen den RBPs vom RRM-Typ *FCA*, *FPA* und *AtGRP7* beobachtet wurde, ist ein häufiges Phänomen im autonomen Signalweg. So beobachteten Veley und Michaels (2008), dass Doppelmutanten von *fpa* mit *ld*, *fld* oder *fve* ebenfalls starke phänotypische Anomalien und eine reduzierte Fertilität aufwiesen.

## 5.7 Die Proteinkonzentration von AtGRP7 wird durch die Umgebungstemperatur reguliert

Die Transkripte von *AtGRP7* und dem nahe verwandten *AtGRP8* wurden ursprünglich als kälterereguliert beschrieben und für *AtGRP7* wurde eine funktionelle Charakterisierung als RNA-Chaperon bei Kälte, sowie eine Erhöhung der Kältetoleranz von *Arabidopsis* publiziert (Carpenter et al., 1994; Kim et al., 2007, 2008). Im Zusammenhang mit den Blühphänotypen der T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1* auf der einen und *AtGRP7-ox* auf der anderen Seite sollte daher untersucht werden, ob sich unterschiedliche Umgebungstemperaturen in diesen Mutanten auf die Ausbildung des Blühphänotyps auswirken, und ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen Umgebungstemperatur und der Rolle von *AtGRP7* in der Blühinduktion besteht. Dazu wurde zunächst das Proteinlevel von *AtGRP7* und *AtGRP8* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen bestimmt.

Sowohl extrem kalte, wie auch extrem warme Temperaturen lösen in der Pflanze Stressreaktionen aus. Zudem wird die Blühinduktion bei kühlen Temperaturen (die noch nicht die Schwelle der Vernalisierung erreichen) stark verzögert. Für die hier durchgeführten Experimente wurden daher neben den Standardbedingungen von 20 °C im KT die Umgebungstemperaturen von 16 °C und 27 °C gewählt, bei denen noch keine Stressreaktionen auftreten.

Pflanzen, die im KT bei 16 °C angezogen wurden, zeigten nur eine sehr geringe Zunahme des *AtGRP7*-Proteinlevels. Das Transkript von *AtGRP7* wurde als kälterereguliert beschrieben und auch für das Proteinlevel wurde eine Erhöhung bei Transfer zu 4 °C festgestellt (Schöning et al., 2008). Die Ergebnisse legen daher nahe, dass *AtGRP7* erst bei Temperaturen tiefer als 16 °C signifikant positiv reguliert wird. Die Anzucht von *Arabidopsis* bei 27 °C führte dazu, dass das Proteinlevel von *AtGRP7* sehr stark herabreguliert wurde. Diese Beobachtung wurde bisher noch nicht beschrieben und daher genauer untersucht. Wie sich zeigte, reagierte das Protein nicht nur bei konstanter Anzucht der Pflanzen bei 27 °C mit einer Reduktion, sondern auch, wenn die Pflanzen zunächst bei 20 °C angezogen und dann zu 27 °C transferiert wurden. Die Verringerung ist demnach eine direkte Folge der veränderten Umgebungstemperatur und nicht etwa auf eine entwicklungsabhängig unterschiedliche Expression von *AtGRP7* zurück zu führen.

Eine Kinetik der Proteinlevel zeigte, dass bereits nach 4 h bei 27 °C eine deutliche Reduktion des Proteinlevels stattfand. Dieser Effekt konnte nicht nur in Wt-Pflanzen beobachtet werden, sondern auch in *AtGRP7-ox*. Da diese Linien *AtGRP7* unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren und trotzdem eine ähnliche Reaktion wie der Wt zeigen, bei dem das Protein unter Kontrolle des nativen Promotors steht, scheint die Regulation nicht durch eine temperaturabhängige Beeinflussung der Promotoraktivität und damit nicht auf transkriptioneller Ebene stattzufinden. Um dies genauer zu überprüfen, wurden ein *AtGRP7*-GFP Fusionsprotein sowie nur GFP alleine unter

Kontrolle des *AtGRP7*-Promotors exprimiert und die Proteinlevel von *AtGRP7*-GFP und GFP bestimmt. Während das Level des *AtGRP7*-GFP Fusionsproteins bei 27 °C stark abnahm und damit die gleiche Reaktion wie natives *AtGRP7* zeigte, wurde das GFP-Proteinlevel nicht durch die Temperaturerhöhung beeinflusst. Eine gleichzeitige Überprüfung der Transkriptlevel von *AtGRP7*-GFP und *GFP* in diesen Pflanzen zeigte keine Veränderungen der Transkriptabundanz. Es ist daher anzunehmen, dass die Reduktion von *AtGRP7* bei 27 °C auf Proteinebene stattfindet und nicht durch den Promotor reguliert wird. Die Regulation kann entweder auf translationeller Ebene durch eine verringerte Translation der *AtGRP7* mRNA erfolgen, oder auf post-translationeller Ebene durch einen aktiven proteasomalen Abbau des Proteins. Ein starker Einfluss der Temperatur auf die Translationseffizienz in *Arabidopsis* konnte bereits durch „Polysome-Profilings“ funktionell relevanter Transkripte festgestellt werden (Matsuura et al., 2010; Yángüez et al., 2013), beide Studien beziehen sich jedoch auf Hitzestressbedingungen. Auch ein direkter Einfluss auf den Proteinabbau bei erhöhter Umgebungstemperatur konnte nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration des Blührepressors SVP nahm bei einer Temperaturerhöhung von 23 °C auf 27 °C ab, dies konnte jedoch durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 verhindert werden (Lee et al., 2013). Ähnliche Experimente würden sich anbieten, um den genauen Mechanismus der *AtGRP7*-Reduktion bei 27 °C zu untersuchen.

Für das *AtGRP8*-Proteinlevel konnte keine dezidierte Temperaturabhängigkeit beobachtet werden, es kam weder zu einer Zunahme bei 16 °C noch zu einer Reduktion bei 27 °C. Tatsächlich zeigte sich bei 27 °C eher eine leichte Zunahme der Proteinkonzentration, was die Vermutung zulässt, dass *AtGRP8* durch den Wegfall der negativen Regulation von *AtGRP7* hochreguliert wird. *AtGRP7* hätte also einen stärkeren Effekt auf die Regulation von *AtGRP8* als die Umgebungstemperatur. Obwohl für beide Proteine auf Grund ihrer Ähnlichkeit und ihrer wechselseitigen Regulation eine funktionelle Redundanz angenommen wird, zeigten sie hier in Bezug auf ihre Temperaturreaktion ein unterschiedliches Verhalten, was eine vollständige Redundanz unwahrscheinlich erscheinen lässt. Auch auf wesentlich kühlere Temperaturen wie z.B. 4 °C reagiert *AtGRP8* nicht mit erhöhter Transkriptabundanz (Schöning et al., 2008).

## **5.8 Pflanzen mit einer Misexpression von *AtGRP7* reagieren unterschiedlich auf veränderte Umgebungstemperaturen**

Der Blühzeitpunkt von *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und *AtGRP7-ox* wurde im KT bei 16 °C, 20 °C und 27 °C ermittelt, um zu überprüfen, ob moderate Veränderungen der Umgebungstemperatur den Blühphänotyp von *Arabidopsis* abhängig von der *AtGRP7*-Expression beeinflussen. Als Ausgangsbedingungen dienten die bei 20 °C beobachteten Veränderungen des Blühzeitpunktes: Die T-DNA Mutante *atgrp7-1* sowie die beiden Doppelmutanten *atgrp7-1 8i* blühten im Vergleich zum Wt



Col verspätet, während die Überexpression von *AtGRP7* in *AtGRP7-ox* dazu führte, dass die Pflanzen mit weniger Blättern als der Wt blühten.

Eine moderate Erhöhung der Umgebungstemperatur wirkt sich im KT stark beschleunigend auf die Blühinduktion aus (Balasubramanian et al., 2006). Dies konnte auch hier bei allen eingesetzten Linien und dem Wt beobachtet werden. Trotzdem blieben die individuellen Unterschiede der Linien mit Misexpression von *AtGRP7* im Vergleich zum Wt vorhanden. Die T-DNA Insertionslinie *atgrp7-1* sowie die beiden Doppelmutanten *atgrp7-1 8i* zeigten einen späten Blühphänotyp, während die Blühinduktion in *AtGRP7-ox* beschleunigt war. Bei 27 °C trat eine deutliche Reduktion der *AtGRP7*-Proteinlevel im Wt und auch in *AtGRP7-ox* auf, doch die verbliebenen Mengen des Proteins in *AtGRP7-ox* reichten für eine beschleunigte Blühinduktion aus. Möglich ist auch, dass nicht nur die Konzentration des Proteins ausschlaggebend für den Blühphänotyp der Pflanzen ist, sondern auch dessen Expression in Geweben, in denen es ansonsten unter der Kontrolle des endogenen Promotors nicht exprimiert wird.

Transkriptanalysen zeigten, dass das Level des Blührepressors *FLC* in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* analog zur Situation bei 20 °C gegenüber dem Wt erhöht war. In *AtGRP7-ox* war das *FLC*-Level geringer als im Wt. Dass *FLC* in der Lage ist, die Blühinduktion bei 27 °C zu verzögern, zeigen AP-Mutanten mit erhöhter *FLC*-Expression, die auch bei 27 °C spät blühen (Balasubramanian et al., 2006). In hier durchgeführten Blühexperimenten mit Kreuzungen von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* mit der Mutante *flc-3* konnte gezeigt werden, dass der späte Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* bei 27 °C vollständig durch *flc-3* aufgehoben wird und somit *FLC*-abhängig ist. In *AtGRP7-ox flc-3* dagegen kam es zwar zu einer Reduktion der Blattzahl verglichen mit *AtGRP7-ox*, jedoch wurde nicht die geringe Blattzahl der Einzelmutante *flc-3* erreicht. Der Phänotyp von *AtGRP7-ox* wird also nicht vollständig durch *FLC* bestimmt.

Die Blühinduktion durch warme Umgebungstemperaturen im KT wird über die Induktion des Blühaktivators *FT* vermittelt (Halliday et al., 2003; Balasubramanian et al., 2006). Tatsächlich konnte auch in den hier durchgeführten Versuchen *FT* bei 27 °C im KT detektiert werden, was bei 20 °C im KT nicht verlässlich möglich war. Die Transkriptlevel zeigten, dass *FT* in *AtGRP7-ox* verstärkt exprimiert wird, was die Blühinduktion beschleunigt. In den spätblühenden Mutanten *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* war *FT* dagegen im Vergleich zum Wt reduziert, was mit dem späten Blühzeitpunkt bei 27 °C korreliert. *FT* trägt also auch in Pflanzen mit unterschiedlicher Expression von *AtGRP7* maßgeblich zur temperaturabhängigen Blühinduktion bei.

Im Gegensatz zu hohen Umgebungstemperaturen wie 27 °C führt eine vergleichsweise geringe Reduktion der Umgebungstemperatur auf 16 °C zu einer verzögerten Blühinduktion (Blázquez et al., 2003). Dies konnte auch in den hier durchgeführten Versuchen für den Wt und alle Linien mit unterschiedlicher *AtGRP7*-Expression bestätigt werden, denn die Pflanzen benötigten bei 16 °C etwa

10 bis 14 Tage länger von der Aussaat bis zur Blüte als bei 20 °C. Die drei *AtGRP7-ox* Linien blühten auch bei 16 °C mit deutlich weniger Blättern als der Wt, benötigten jedoch in etwa die gleiche Anzahl an Tagen. Im Gegensatz zur Situation bei 20 °C war die Blattanzahl bei *atgrp7-1* bei der Blüte deutlich reduziert, so dass die Pflanzen signifikant weniger Blätter bildeten als der Wt. Auch beide *atgrp7-1 8i*-Linien bildeten bei 16 °C nicht mehr Blätter als der Wt. Alle drei Linien benötigten dafür die gleiche Anzahl an Tagen wie der Wt. Der späte Blühphänotyp von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* wurde also bei 16 °C aufgehoben. Transkriptanalysen zeigten, dass nach wie vor das *FLC*-Level in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* gegenüber dem Wt erhöht und somit der Blühphänotyp dieser Linien also *FLC*-unabhängig verfrüht war. Tatsächlich zeigen Blühversuche mit *flc*-Mutanten, dass *FLC* seine Funktion eher bei Temperaturen über 16 °C ausübt (Blázquez et al., 2003; Lee et al., 2013). Somit machen sich erhöhte *FLC*-Level bei kühleren Temperaturen weniger stark bemerkbar. Dies zeigen auch die hier durchgeführten Blühversuche mit *flc-3* Mutanten. Zwar blüht *flc-3* auch bei 16 °C mit weniger Blättern als der Wt, der Unterschied ist jedoch bei 27 °C sehr viel stärker ausgeprägt. Die Doppelmutanten *flc-3 atgrp7-1* und *flc-3 atgrp7-1 8i* wiederum zeigen bei 16 °C den gleichen Blühphänotyp wie die Einzelmutanten *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*, was zeigt, dass *FLC* den Phänotyp dieser Mutanten bei dieser Temperatur nicht beeinflusst. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass die Probennahme für die Transkriptanalysen bei 16 °C im 10-Blatt Stadium und somit sehr früh in der Entwicklung stattgefunden hat. Eine mögliche Verringerung der *FLC*-Level in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* während der späteren Entwicklung kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die Doppelmutante *flc-3 AtGRP7-ox* zeigte ebenfalls keine weitere Beschleunigung des Blühzeitphänotyps bei 16 °C verglichen mit der Einzelmutante *AtGRP7-ox*. Beide Linien blühten bei 16 °C mit deutlich weniger Blättern als *flc-3*, was wieder darauf hinweist, dass der Phänotyp von *AtGRP7-ox* nicht allein *FLC*-abhängig ist. Da die Pflanzen zwar mit deutlich weniger Blättern blühten als der Wt, dafür jedoch in etwa die gleiche Anzahl an Tagen benötigten, scheint vielmehr die Blattentwicklung in *AtGRP7-ox* verlangsamt zu sein, was ursächlich für den beobachteten Phänotyp ist.

## **5.9 *AtGRP7* beeinflusst nicht die Reaktion auf einen Temperatursprung von 16 °C auf 27 °C**

Wie bereits die Blühversuche bei konstanten Umgebungstemperaturen von 16 °C und 27 °C gezeigt haben, sind Pflanzen mit veränderter Expression von *AtGRP7* grundsätzlich dazu in der Lage, veränderte Temperaturen wahrzunehmen. Dies zeigte sich auch, wenn Pflanzen zunächst bei 16 °C für 5 Wochen angezogen wurden, um dann die Temperatur auf 27 °C zu erhöhen. Sowohl in *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* als auch in *AtGRP7-ox* konnte dadurch die Blüte induziert werden und die Linien

blühten mit der gleichen Anzahl Blätter wie der Wt. Alle Linien benötigten dafür jedoch längere Zeit als der Wt. Die Wahrnehmung der Temperatur ist also in allen Linien intakt und *AtGRP7* ist trotz seiner Temperaturabhängigkeit nicht an der initialen Temperaturwahrnehmung beteiligt. Unabhängig davon beeinflusst *AtGRP7* jedoch die Blattentwicklung der Pflanze.

In AP-Mutanten mit erhöhtem *FLC*-Level ist die Sensitivität auf einen Temperaturanstieg deutlich vermindert (Balasubramanian et al., 2006). Dieses Verhalten zeigen *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* jedoch nicht. AP-Mutanten wie *fve*, *fca* oder *fpa* weisen jedoch wesentlich höhere *FLC*-Level als *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* auf, so dass hier möglicherweise dosisabhängige Effekte eine Rolle spielen.

### 5.10 In *AtGRP7-ox* ist das alternative Splicing von *FLM* misreguliert

Die Transkriptanalysen von *FLC* sowie die Blühversuche mit Doppelmutanten im *flc-3* Hintergrund haben gezeigt, dass *FLC* einen maßgeblichen Anteil an der Ausbildung des Blühphänotyps von *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* sowie *AtGRP7-ox* hat. Die Daten zeigen jedoch auch, dass der Einfluss bei geringeren Temperaturen abnimmt und bestätigen damit die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen von Blázquez et al. (2003) und Lee et al. (2013). Neben *FLC* existiert jedoch noch eine Gruppe von MADS-Box Transkriptionsfaktoren mit hoher Sequenzhomologie zu *FLC*, die ebenfalls als Blührepressoren wirken. Diese Proteine sind als MAF1 bis MAF5 bekannt, wobei MAF1 zumeist als *FLM* bezeichnet wird (Ratcliffe et al., 2001; Scortecci et al., 2001; Balasubramanian et al., 2006; Gu et al., 2013). Untersuchungen von unterschiedlichen Ökotypen, die unabhängig von der bekannten *FRI/FLC* Kombination nicht auf eine thermische Induktion des Blühens reagierten, führten zur Identifikation von *FLM* als temperaturabhängigem Repressor der Blühinduktion (Werner, 2005). Balasubramanian et al. (2006) beobachteten alternative Spliceformen von *FLM* in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur, doch erst Untersuchungen von Lee et al. (2013) und Posé et al. (2013) konnten die Funktionen der beiden Splicevarianten *FLM-β* und *FLM-δ* und ihrer Interaktion mit dem Blührepressor *SVP* näher aufklären. Kühlere Umgebungstemperaturen führen zu vermehrter Bildung von *FLM-β*, warme Temperaturen führen zur Reduktion von *FLM-β* (beobachtet von Lee et al.) bzw. zur Induktion von *FLM-δ* (beobachtet von Posé et al.). Die Überexpression beider Varianten zeigte, dass *FLM-β* als Blührepressor fungiert, während *FLM-δ* als Blühaktivator wirkt. Beide weisen ähnliche Bindungsaffinitäten für Protein/Protein Interaktionen mit *SVP* auf. Mit steigender Umgebungstemperatur verringert sich die Konzentration an aktivem *FLM-β/SVP* Repressorkomplex, inaktiver *FLM-δ/SVP*-Komplex überwiegt und ermöglicht so die Transkription von Blühaktivatoren wie *SOC1*.

Bisher sind keine Kandidatengene bekannt, die diesen Splicingmechanismus temperaturabhängig kontrollieren. Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptuntersuchungen

zeigte sich, dass in Pflanzen, die *AtGRP7* überexprimieren eine starke Reduktion der *FLM-δ* Splicevariante stattfand. Dieser Vorgang war unabhängig von der Umgebungstemperatur. Umgekehrt zeigte sich in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* eine Erhöhung der *FLM-δ* Spliceform, ebenfalls temperaturunabhängig. Die Transkriptlevel von *FLM-β* waren in *AtGRP7-ox* nur geringfügig höher als im Wt, in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* zeigte sich keine Veränderung zum Wt. Auch die Summe an *FLM*-Transkript, ohne Berücksichtigung individueller Splicevarianten, war in allen Linien nicht unterschiedlich zum Wt. Eine Misexpression von *AtGRP7* beeinflusst daher selektiv die Abundanz von *FLM-δ*. In Übereinstimmung mit beiden Veröffentlichungen (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013) fand auch in den hier durchgeführten Versuchen eine vermehrte Bildung von *FLM-β* bei 16 °C statt. Bei 27 °C wurde dagegen keine verstärkte Bildung von *FLM-δ* beobachtet, wie in Posé et al. geschildert. Tatsächlich kam es eher zu einer Reduktion der *FLM-β* Transkription bei gleichbleibendem Level an *FLM-δ* und somit zu einer Angleichung des Verhältnisses der beiden Splicevarianten. Dies bestätigt wiederum die Beobachtungen von Lee et al., die zu ähnlichen Ergebnissen kamen und dies mittlerweile in einer weiteren Veröffentlichung anhand absoluter Quantifizierungen der Kopienzahl der beiden Splicevarianten belegen (Lee et al., 2014a).

Als RBP käme *AtGRP7* als Regulator für alternatives Splicing von *FLM* in Frage. Mittels RIP konnte jedoch unter den gewählten Anzuchtbedingungen keine direkte *in vivo* Interaktion von *AtGRP7-GFP* mit *FLM* nachgewiesen werden. Auch eine Analyse des Blühzeitpunktes von *atgrp7-1 flm-3* Doppelmutanten zeigte einen klaren additiven Effekt der beiden Mutationen, der in einem intermediären Blühphänotyp resultierte und somit eine genetische Unabhängigkeit der beiden Allele anzeigt. Es ist daher davon auszugehen, dass *AtGRP7* das Splicing von *FLM* indirekt über andere, noch zu identifizierende Faktoren beeinflusst, und nicht direkt an *FLM* bindet.

Als Interaktionspartner von *FLM* konnte in den beiden vorher benannten Studien der Blührepressor *SVP* identifiziert werden. Hier durchgeführte Analysen von Doppelmutanten *atgrp7-1 svp-41* zeigten, dass zwar der Blühzeitpunkt von *atgrp7-1 8i* durch funktionsloses *SVP* stark verfrüht werden kann, die Pflanzen jedoch nicht so früh blühten wie die *svp-41* Einzelmutante. Daher beeinflusst *AtGRP7* den Blühzeitpunkt zumindest teilweise unabhängig von *SVP*. Entsprechend zeigen sich auch keine Veränderungen der *SVP*-Transkriptabundanz bei Misexpression von *AtGRP7* verglichen mit dem Wt. Die Kontrolle von *SVP* findet jedoch auf post-translationeller Ebene statt (Lee et al., 2013; Posé et al., 2013; Lee et al., 2014a), so dass sich hier Untersuchungen auf Proteinebene anschließen müssten, um diese Ergebnisse abzusichern.

Eine Betrachtung der Phänotypen von *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* zeigt, dass diese nicht mit der erhöhten Expression von *FLM-δ* korrelieren, die eigentlich zu einem verfrühten Blühzeitpunkt führen sollte. Da die Pflanzen bei 20 °C und 27 °C deutlich spätblühend sind, muss *FLC* hier einen wesentlich größeren Einfluss auf den Blühzeitpunkt dieser beiden Linien besitzen als *FLM*. Auch in den

Doppelmutanten *flc-3 atgrp7-1* und *flc-3 atgrp7-1 8i*, bei denen erhöhte *FLC*-Level nicht mehr mit der Wirkung von *FLM* interferieren können, zeigt sich keine signifikante Verfrühung des Blühzeitpunktes. Entweder reicht also der *FLM-δ* Konzentrationsunterschied zwischen Wt und Mutanten nicht aus, um signifikante Änderungen im Blühzeitpunkt zu bewirken, oder andere Mechanismen kompensieren den verfrühenden Effekt der *FLM-δ* Expression in *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i*.

Anzeichen einer solchen Kompensation zeigen sich in *AtGRP7-ox*. Hier wird *FLM-δ* so gering exprimiert, dass ein spätblühender Phänotyp zu erwarten wäre, da die repressive *FLM-β* Variante überwiegt. Gleichzeitig ist aber das Level des Blührepressors *FLC* stark erniedrigt. Als Folge davon blühen die Pflanzen daher nach der gleichen Anzahl Tage wie der Wt. Dass *AtGRP7-ox* trotzdem mit weniger Rosettenblättern als der Wt blüht, hängt nur zum Teil mit der verringerten *FLC*-Expression zusammen und ist vielmehr ein Effekt einer insgesamt verlangsamten vegetativen Entwicklung.

Das zeigt sich auch daran, dass *AtGRP7-ox* Pflanzen mit deutlich weniger gebildeten Blättern blühen als *flc-3* Pflanzen, obwohl sie im Gegensatz zu *flc-3* noch über *FLC*-Transkript verfügen.

### 5.11 Phänotypische Auswirkungen der Misexpression von *AtGRP7* und *AtGRP8*

Pflanzen, die *AtGRP7* verstärkt exprimieren, weisen vor allem im KT starke phänotypische Veränderungen gegenüber dem Wt auf. Bereits bei visueller Inspektion ist auffällig, dass der Durchmesser der Blattrosette verkleinert ist, die Infloreszenz wesentlich kürzer ist und die Pflanzen insgesamt gedrungen wirken. Zudem treten entlang des Blütenstandes Infloreszenzreversionen auf, so dass Rosettenblätter entlang der Infloreszenz ausgebildet werden. Die Pflanzen wirken insgesamt kleiner und gedrungen im Vergleich zum Wt. Betrachtet man den Blühphänotyp von *AtGRP7-ox*, fällt auf, dass die Pflanzen zwar weniger Blätter bilden als der Wt, die Blüte jedoch nach der gleichen Anzahl an Tagen eingeleitet wird. Die Zählung der sichtbaren Blätter über den Entwicklungszeitraum zeigte, dass in *AtGRP7-ox* wesentlich langsamer neue Blätter gebildet werden als im Wt. Auch die Wachstumsrate, gemessen als Zunahme der Blattfläche, fällt in *AtGRP7-ox* geringer aus. Die sonstigen phänotypischen Parameter Rosettendurchmesser, Kompaktheit, Frisch- und Trockengewicht fallen ebenfalls alle geringer aus. Die Überexpression von *AtGRP7* bewirkt also neben ihrem Effekt auf die Blühinduktion starke phänotypische Veränderungen, die zu einer Verzögerung der Entwicklung und zur Ausbildung eines Zwergwuchs-Phänotyps führen.

Mit bloßem Auge sind bei *atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* keine auffallenden phänotypischen Unterschiede zum Wt erkennbar. Die Analyse der Blattentwicklung zeigte nur bei *atgrp7-1* eine leichte Verlangsamung gegenüber dem Wt. Dies könnte eine Folge des erhöhten *AtGRP8*-Levels sein, denn in *atgrp7-1 8i* traten diese Verzögerungen nicht mehr auf. Die langsamere Blattbildung kann auch den nur geringen Unterschied in der Blattzahl zwischen *atgrp7-1* und Wt trotz des erhöhten *FLC*-

Levels erklären. Bei den sonstigen phänotypischen Parametern zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i 9.9* und Wt. Lediglich *atgrp7-1 8i 6.1* weist bei Blattfläche, Rosettendurchmesser und Frisch- und Trockengewicht signifikante Abweichungen nach unten auf. Diese Linie zeigt ein deutlich geringeres AtGRP8-Niveau als *atgrp7-1 8i 9.9*, was ursächlich für die phänotypischen Unterschiede zwischen beiden Linien sein könnte.

Im Gegensatz zu *AtGRP7-ox*, bei denen alle Linien eine ähnliche Ausprägung des Phänotyps zeigen, sind phänotypische Veränderungen bei *AtGRP8-ox* nur bei Linien mit einem hohen Grad an Überexpression zu beobachten. Dann gleicht der Phänotyp jedoch dem, der bei Überexpression von *AtGRP7* entsteht. So zeigt auch nur die bei der automatisierten Phänotypisierung eingesetzte Linie *AtGRP8-ox 26a4* signifikante Abweichungen in Blattfläche, Rosettendurchmesser etc. verglichen mit dem Wt. Nur eine starke Überexpression von *AtGRP8* führt demnach zur Ausbildung phänotypischer Veränderungen. Dies ist in Übereinstimmung mit den sonstigen molekularen Untersuchungen, bei denen sich immer wieder ähnliche Funktionen von *AtGRP7* und *AtGRP8* zeigen, jedoch keine vollständige Redundanz beider Proteine vorliegt.

Die Wuchsphänotypen von *AtGRP7-ox* zeigen einen starken Einfluss von *AtGRP7* auf die vegetative Entwicklung der Pflanze. Bei Überexpression bildet sich ein Zwergwuchs-Phänotyp aus und neue Rosettenblätter entwickeln sich langsamer als im Wt. Bekannt sind solche Zwergwuchs-Phänotypen unter anderem von Mutanten, die auf Grund erhöhter SA-Level eine höhere Resistenz gegen bakterielle Pathogene aufweisen (Rate und Greenberg, 2001). Tatsächlich weisen auch *AtGRP7-ox* Pflanzen eine erhöhte Pathogenresistenz und erhöhte Konzentrationen an freier SA auf, die zur Ausprägung dieses Phänotyps beitragen könnten (Nicaise et al., 2013; Hackmann et al., 2014). Doppelmutanten, die neben *AtGRP7-ox* die bakterielle Salizylhydroxylase *NahG* exprimieren, oder eine Punktmutation in *ISOCHORISMATE SYNTHASE1 (ICS1)* aufweisen, und deshalb keine erhöhten SA-Level zeigen, besitzen jedoch noch immer den typischen *AtGRP7-ox* Phänotyp, der daher unabhängig von SA sein muss.

Bisher konnte nur über zwei Wege eine teilweise Komplementation des Phänotyps erzielt werden. Zum einen konnte durch exogene Applikation von GA die Länge und die Internodienzahl der Infloreszenz an den Wt angeglichen werden, der Phänotyp ist also teilweise eine Folge reduzierter GA-Level (Löhr et al., 2014). Zum anderen führte eine Reduktion der in *AtGRP7-ox* stark exprimierten BAHD Acyltransferase *At1g78990* mittels artifizieller miRNA zu einer teilweisen Angleichung des Rosettendurchmessers an den Wt (Hackmann, 2014). Beide Ansätze führten jedoch nicht zu einer vollständigen Aufhebung der phänotypischen Unterschiede. Anhand der hier vorgestellten Daten zeigt sich, dass der Verlust von *AtGRP7* in *atgrp7-1* nicht zur Ausprägung eines gegensätzlichen Phänotyps zu *AtGRP7-ox* führt, also z.B. zu einer vergrößerten Blattrosette oder rascherer Blattbildung. Auch die Komplementationslinien *AtGRP7::AtGRP7 atgrp7-1*, die *AtGRP7* teilweise

deutlich stärker als der Wt exprimieren, sind in ihrem Wuchstyp *AtGRP7-ox* nicht ähnlich. Daher muss davon ausgegangen werden, dass der Wuchstyp von *AtGRP7-ox* ein pleiotroper Effekt der Überexpression des Proteins ist.

*AtGRP7* übt somit auf zwei Ebenen Effekte auf die pflanzliche Entwicklung aus: Durch die Reduktion des Blührepressors *FLC* ist eine frühere Blühinduktion möglich. Gleichzeitig wird dieser Effekt jedoch abgeschwächt durch die Reduktion der Spliceform *FLM- $\delta$* , so dass der überwiegende Teil des *FLM*-Transkriptpools aus der als Blührepressor wirksamen Isoform *FLM- $\beta$*  besteht. Zusätzlich sind die Wachstumsrate und die Bildung neuer Blätter in *AtGRP7-ox* verlangsamt. Das führt schließlich zur Ausprägung des beobachteten Blühphänotyps, also Pflanzen, die mit einer geringeren Anzahl an Blättern als der Wt blühen, dafür jedoch die gleiche Anzahl an Tagen benötigen.

## 5.12 Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die beiden RNA-Bindeproteine *AtGRP7* und *AtGRP8* die Blühinduktion von *Arabidopsis* beeinflussen. Die T-DNA Insertionsmutante *atgrp7-1* sowie die Doppelmutante *atgrp7-1 8i* zeigen einen moderaten, aber signifikant verzögerten Blühzeitphänotyp, der abhängig von *FLC* ist. In *AtGRP7-ox* stellt sich die Situation nicht ganz so klar dar. Zwar ist die Expression von *FLC* reduziert und die Pflanzen leiten die Blüte mit weniger ausgebildeten Rosettenblättern als der Wt ein, zeitlich gesehen tritt jedoch kein verfrühtes Blühen auf. Ein Grund dafür ist, dass in *AtGRP7-ox* die Expression der Blührepressoren *FLM- $\beta$*  und *MAF4* erhöht ist. Zudem wird die pflanzliche Entwicklung während der vegetativen Phase negativ beeinflusst, so dass die Wachstumsrate geringer ausfällt. Es kann daher im Fall von *AtGRP7-ox* nicht pauschal von einem frühen Blühzeitpunkt gesprochen werden.

Komplementationsanalysen und Analysen von Doppelmutanten haben gezeigt, dass die RNA-Bindfähigkeit von *AtGRP7* wichtig für die Ausprägung des Blühphänotyps ist, und dass das Protein unabhängig von CO und GI und somit nicht im photoperiodischen Signalweg der Blühinduktion wirkt. *AtGRP7* wirkt parallel zu den RBPS *FCA*, *FPA* und *FLK*, aber ist genetisch abhängig von *FLD*, da sich in der Mutante *fld-3* keine zusätzliche Beeinflussung von Blühzeitpunkt oder *FLC*-Level durch *atgrp7-1* oder *atgrp7-1 8i* zeigt.

Hohe Umgebungstemperaturen von 27 °C bewirken eine starke Reduktion des Proteinlevels von *AtGRP7*, während *AtGRP8* keine Reaktion zeigt. Die Reduktion der Proteinmenge ist keine Folge veränderter Promotoraktivität, sondern findet auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene statt.

Blühversuche bei unterschiedlichen Temperaturen haben gezeigt, dass Pflanzen mit einer Misexpression von *AtGRP7* Veränderungen in der Umgebungstemperatur wahrnehmen können, die initialen Temperaturreaktionen also intakt sind. Bei kühlen Temperaturen von 16 °C zeigen jedoch

*atgrp7-1* und *atgrp7-1 8i* keinen verspäteten Blühzeitpunkt mehr. Für einen angepasst späten Blühzeitpunkt bei dieser Temperatur wird also funktionelles AtGRP7 benötigt. Bei 27 °C zeigt sich eine starke Beschleunigung der Blühinduktion, die individuellen Unterschiede zwischen *atgrp7-1*, *atgrp7-1 8i* und AtGRP7-ox prägen sich jedoch genauso wie bei 20 °C aus. Das lässt den Schluss zu, dass die Blühregulation bei 20 °C und 27 °C über zum Teil gleiche Regulationswege verläuft, während bei 16 °C jedoch andere Faktoren involviert sind.

Phänotypische Untersuchungen schließlich zeigen, dass dramatische Änderungen des Wuchsphänotyps während der vegetativen Phase auf AtGRP7-ox beschränkt sind, bzw. bei AtGRP8 nur bei sehr hoher Überexpression auftreten. Es handelt sich hier also möglicherweise um pleiotrope Effekte der Überexpression. In *atgrp7-1* ist lediglich die Blattentwicklung leicht verlangsamt, was ein Grund für die nur geringen Unterschiede in der Blattzahl zum Blühzeitpunkt zwischen *atgrp7-1* und dem Wt sein kann. Da sich die beiden *atgrp7-1 8i*-Linien phänotypisch unterschiedlich verhalten, ist keine Aussage darüber möglich, ob die Entwicklungsverzögerung von *atgrp7-1 8i 6.1* tatsächlich auf ihrem gegenüber *atgrp7-1 8i 9.9* stärker reduzierten AtGRP8-Level beruht, oder ob es sich um eine Eigenheit dieser einen Linie handelt. Um dies abzusichern, wären phänotypische Analysen einer echten AtGRP8 *null*-Mutante nötig.

Die unterschiedlichen Regulationswege, über die AtGRP7 und AtGRP8 auf die Blühinduktion sowie die pflanzliche Entwicklung während der vegetativen Phase wirken, sind in Abb. 5.2 dargestellt. Das Schema lässt erkennen, dass eine Vielzahl von Regulationswegen durch AtGRP7 und AtGRP8 beeinflusst wird, was die Einordnung der beiden Proteine in einen einzelnen klassischen Regulationsweg erschwert. Jedoch werden auch für andere Proteine, die bisher im autonomen Signalweg eingeordnet sind, mittlerweile vielfältige Funktionen außerhalb ihrer Rolle in der Blühinduktion beschrieben. So ist FCA an der Kälteperzeption beteiligt und reguliert die Prozessierung von miRNAs (Blázquez et al., 2003; Jung et al., 2012), außerdem ist es an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies bei Hitzestress beteiligt (Lee et al., 2014b). FPA und FLD übernehmen Rollen in der Pathogenabwehr (Lyons et al., 2013; Singh et al., 2014) und FVE ist ebenfalls an der pflanzlichen Kälteantwort beteiligt (Kim et al., 2004). Vor diesem Hintergrund der diversen Funktionen der Mitglieder des autonomen Signalwegs können auch AtGRP7 und AtGRP8 hier eingeordnet werden.



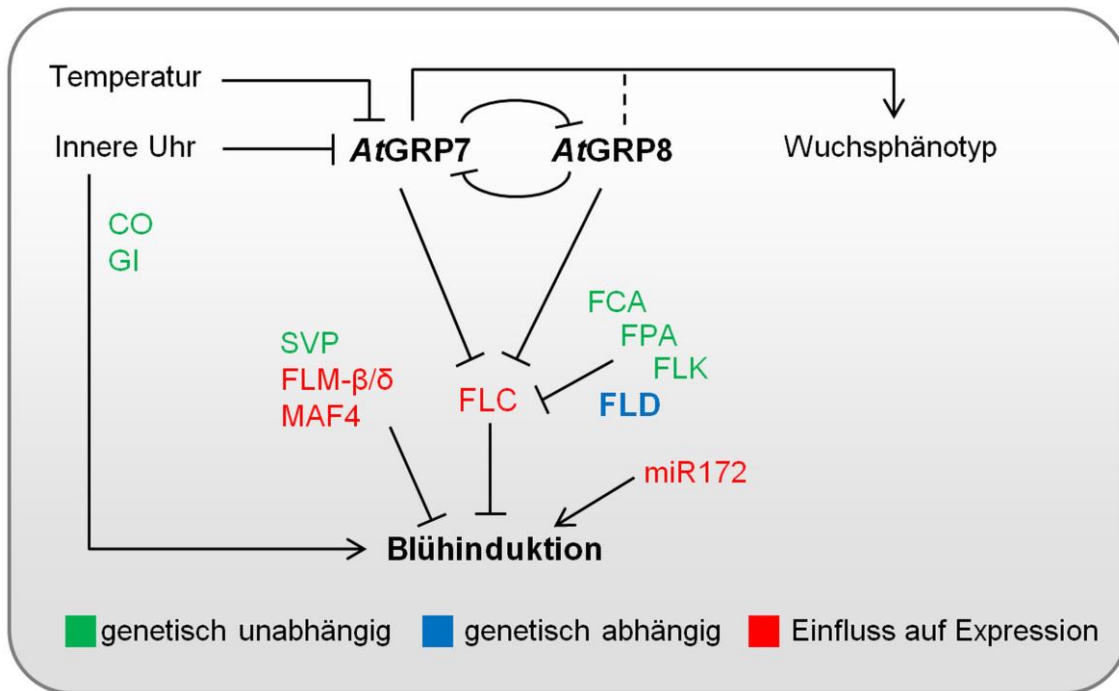


Abb. 5.2: Einfluss von *AtGRP7* und *AtGRP8* auf die Blühregulation und die vegetative Entwicklung  
 Dargestellt sind die unterschiedlichen Wege, über die die beiden Proteine die Blühinduktion und die vegetative Entwicklung beeinflussen. Faktoren, zu denen genetische Unabhängigkeit besteht, sind grün gekennzeichnet, die genetische Abhängigkeit zwischen *AtGRP7* und *FLD* ist blau dargestellt. Faktoren, deren Expression beeinflusst wird, sind rot gekennzeichnet. Informationen über den Einfluss auf *miR172* stammen aus Köster et al., (2014a).

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., und Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052–1056.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., und Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*. 131, 3357–3365.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., und Weigel, D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* 25, 605–614.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., et al. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*. 131, 3615–3626.
- Andrés, F., und Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13, 627–639.
- Aukerman, M.J., und Sakai, H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *Plant Cell* 15, 2730–2741.
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J.A., Ruiz-García, L., und Martínez-Zapater, J.M. (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet.* 36, 162–166.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., und Weigel, D. (2006). Potent Induction of Arabidopsis thaliana Flowering by Elevated Growth Temperature. *PLoS Genet.* 2, e106.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., und Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Bäurle, I., und Dean, C. (2008). Differential Interactions of the Autonomous Pathway RRM Proteins and Chromatin Regulators in the Silencing of Arabidopsis Targets. *PLoS ONE* 3, e2733.
- Blázquez, M.A., und Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 120, 1025–1032.
- Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., und Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* 10, 791–800.
- Blázquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I., und Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development*. 124, 3835–3844.
- Blázquez, M.A., Ahn, J.H., und Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nat. Genet.* 33, 168–171.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., und Melzer, S. (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 24, 591–599.

- Briggs, W.R., und Olney, M.A. (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* *125*, 85–88.
- Cao, S., Jiang, L., Song, S., Jing, R., und Xu, G. (2006). AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in Arabidopsis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *11*, 526–535.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., und Simon, A.E. (1994). Genes encoding glycine-rich Arabidopsis thaliana proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.* *104*, 1015–1025.
- Castillejo, C., und Pelaz, S. (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr. Biol. CB* *18*, 1338–1343.
- Cheng, Y., Kato, N., Wang, W., Li, J., und Chen, X. (2003). Two RNA Binding Proteins, HEN4 and HUA1, Act in the Processing of AGAMOUS Pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Dev. Cell* *4*, 53–66.
- Choi, K., Kim, S., Kim, S.Y., Kim, M., Hyun, Y., Lee, H., Choe, S., Kim, S.-G., Michaels, S., und Lee, I. (2005). SUPPRESSOR OF FRIGIDA3 Encodes a Nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN6 Required for Floral Repression in Arabidopsis. *Plant Cell* *17*, 2647–2660.
- Clough, S.J., und Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *16*, 735–743.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* *316*, 1030–1033.
- Crisucci, E.M., und Arndt, K.M. (2012). Paf1 Restricts Gcn4 Occupancy and Antisense Transcription at the ARG1 Promoter. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1150–1163.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.-R., und Udvardi, M.K. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *38*, 366–379.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., und Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *139*, 5–17.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., und Dennis, E.S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 6680–6685.
- Deng, X., Gu, L., Liu, C., Lu, T., Lu, F., Lu, Z., Cui, P., Pei, Y., Wang, B., Hu, S., et al. (2010). Arginine methylation mediated by the Arabidopsis homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 19114.
- Domagalska, M.A., Schomburg, F.M., Amasino, R.M., Vierstra, R.D., Nagy, F., und Davis, S.J. (2007). Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering. *Development* *134*, 2841–2850.
- Duc, C., Sherstnev, A., Cole, C., Barton, G.J., und Simpson, G.G. (2013). Transcription Termination and Chimeric RNA Formation Controlled by Arabidopsis thaliana FPA. *PLoS Genet* *9*, e1003867.

- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., et al. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* *23*, 1229–1232.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C.S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A., und Coupland, G. (2009). Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. *Dev. Cell* *17*, 75–86.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., und Putterill, J. (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* *18*, 4679–4688.
- Franklin, K.A., Toledo-Ortiz, G., Pyott, D.E., und Halliday, K.J. (2014). Interaction of light and temperature signalling. *J. Exp. Bot.* eru059.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., und Alfano, J.R. (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* *447*, 284–288.
- Garner, W.W., und Allard, H.A. (1920). EFFECT OF THE RELATIVE LENGTH OF DAY AND NIGHT AND OTHER FACTORS OF THE ENVIRONMENT ON GROWTH AND REPRODUCTION IN PLANTS. *Mon. Weather Rev.* *48*, 415–415.
- Gassner, G. (1918). Beiträge zur physiologischen Charakteristik sommer- und winterannueller Gewächse, insbesondere der Getreidepflanzen. *Z Bot* *10*, 417–480.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A., und Dean, C. (2001). The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell* *107*, 525–535.
- Geraldo, N., Baurle, I., Kidou, S., Hu, X., und Dean, C. (2009). FRIGIDA Delays Flowering in Arabidopsis via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding Complex. *Plant Physiol.* *150*, 1611–1618.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., et al. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* *18*, 3399–3414.
- Gu, X., Jiang, D., Yang, W., Jacob, Y., Michaels, S.D., und He, Y. (2011). Arabidopsis Homologs of Retinoblastoma-Associated Protein 46/48 Associate with a Histone Deacetylase to Act Redundantly in Chromatin Silencing. *PLoS Genet.* *7*, e1002366.
- Gu, X., Le, C., Wang, Y., Li, Z., Jiang, D., Wang, Y., und He, Y. (2013). Arabidopsis FLC clade members form flowering-repressor complexes coordinating responses to endogenous and environmental cues. *Nat. Commun.* *4*, 1947.
- Hackmann, C. (2014). Analysen zum Einfluss von RNA-Bindeproteinen auf die Salizylsäure-vermittelte Genexpression in Arabidopsis thaliana (Dissertation, Univ.Bielefeld).
- Hackmann, C., Korneli, C., Kutyniok, M., Köster, T., WiedenlÜbbert, M., Müller, C., und Staiger, D. (2014). Salicylic acid-dependent and -independent impact of an RNA-binding protein on plant immunity. *Plant Cell Environ.* *37*, 696–706.

- Halliday, K.J., Salter, M.G., Thingnaes, E., und Whitelam, G.C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33, 875–885.
- Harberd, N.P., Belfield, E., und Yasumura, Y. (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21, 1328–1339.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., und Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290, 2110–2113.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., und Huijser, P. (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.* 21, 351–360.
- He, Y., Michaels, S.D., und Amasino, R.M. (2003). Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis. *Science* 302, 1751–1754.
- Heintzen, C., Melzer, S., Fischer, R., Kappeler, S., Apel, K., und Staiger, D. (1994). A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J.* 5, 799–813.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., und Staiger, D. (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8515–8520.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., James Peacock, W., und Dennis, E.S. (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* 46, 183–192.
- Helliwell, C.A., Robertson, M., Finnegan, E.J., Buzas, D.M., und Dennis, E.S. (2011). Vernalization-Repression of Arabidopsis FLC Requires Promoter Sequences but Not Antisense Transcripts. *PLoS ONE* 6, e21513.
- Henderson, I.R., Liu, F., Drea, S., Simpson, G.G., und Dean, C. (2005). An allelic series reveals essential roles for FY in plant development in addition to flowering-time control. *Development* 132, 3597–3607.
- Heo, J.B., und Sung, S. (2011). Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science* 331, 76–79.
- Hisamatsu, T., und King, R.W. (2008). The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *J. Exp. Bot.* 59, 3821–3829.
- Hornyik, C., Terzi, L.C., und Simpson, G.G. (2010a). The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Dev. Cell* 18, 203–213.
- Hornyik, C., Terzi, L.C., und Simpson, G.G. (2010b). The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Dev. Cell* 18, 203–213.
- Huijser, P., und Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138, 4117–4129.

- Hyun, Y., Kim, J., Cho, S.W., Choi, Y., Kim, J.-S., und Coupland, G. (2014). Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*. Epub ahead of print.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., und Kay, S.A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* *426*, 302–306.
- Jaeger, K.E., und Wigge, P.A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr. Biol. CB* *17*, 1050–1054.
- Jansen, M., Gilmer, F., Biskup, B., Nagel, K.A., Rascher, U., Fischbach, A., Briem, S., Dreissen, G., Tittmann, S., Braun, S., et al. (2009). Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Funct. Plant Biol.* *36*, 902–914.
- Jeon, J., und Kim, J. (2011). FVE, an *Arabidopsis* homologue of the retinoblastoma-associated protein that regulates flowering time and cold response, binds to chromatin as a large multiprotein complex. *Mol. Cells* 1–8.
- Jeong, B., Lin, Y., Joe, A., Guo, M., Korneli, C., Yang, H., Wang, P., Yu, M., Cerny, R.L., Staiger, D., et al. (2011). Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity. *J. Biol. Chem.* *286*, 43272–43281.
- Jiang, D., Yang, W., He, Y., und Amasino, R.M. (2007). *Arabidopsis* Relatives of the Human Lysine-Specific Demethylase1 Repress the Expression of FWA and FLOWERING LOCUS C and Thus Promote the Floral Transition. *Plant Cell* *19*, 2975–2987.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., und Dean, C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* *290*, 344–347.
- Johansson, M., und Staiger, D. (2014). SRR1 is essential to repress flowering in non-inductive conditions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* eru317.
- Jung, J.-H., Seo, Y.-H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.-H., und Park, C.-M. (2007). The GIGANTEA-Regulated MicroRNA172 Mediates Photoperiodic Flowering Independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE* *19*, 2736–2748.
- Jung, J.-H., Seo, P.J., Ahn, J.-H., und Park, C.-M. (2012). The *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *J. Biol. Chem.*
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., und Weigel, D. (1999). Activation Tagging of the Floral Inducer FT. *Science* *286*, 1962–1965.
- Kim, H.-J., Hyun, Y., Park, J.-Y., Park, M.-J., Park, M.-K., Kim, M.D., Kim, H.-J., Lee, M.H., Moon, J., Lee, I., et al. (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* *36*, 167–171.
- Kim, J.S., Park, S.J., Kwak, K.J., Kim, Y.O., Kim, J.Y., Song, J., Jang, B., Jung, C.-H., und Kang, H. (2007). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *35*, 506–516.

- Kim, J.S., Jung, H.J., Lee, H.J., Kim, K.A., Goh, C.-H., Woo, Y., Oh, S.H., Han, Y.S., und Kang, H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *55*, 455–466.
- Kim, S., Choi, K., Park, C., Hwang, H.-J., und Lee, I. (2006). SUPPRESSOR OF FRIGIDA4, Encoding a C2H2-Type Zinc Finger Protein, Represses Flowering by Transcriptional Activation of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* *18*, 2985–2998.
- Kobayashi, Y., und Weigel, D. (2007). Move on up, it's time for change—mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* *21*, 2371–2384.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., und Araki, T. (1999). A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* *286*, 1960–1962.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., und Franklin, K.A. (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Curr. Biol.* *19*, 408–413.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., und van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* *MGG* *229*, 57–66.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J., und Peeters, A.J. (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* *148*, 885–892.
- Köster, T., Meyer, K., Weinholdt, C., Smith, L.M., Lummer, M., Speth, C., Grosse, I., Weigel, D., und Staiger, D. (2014a). Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9925–9936.
- Köster, T., Haas, M., und Staiger, D. (2014b). The RIPper case: identification of RNA-binding protein targets by RNA immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* *1158*, 107–121.
- Kumar, S.V., und Wigge, P.A. (2010). H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in *Arabidopsis*. *Cell* *140*, 136–147.
- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N.P., und Wigge, P.A. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* *484*, 242–245.
- Kwak, K.J., Park, S.J., Han, J.H., Kim, M.K., Oh, S.H., Han, Y.S., und Kang, H. (2011). Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *J. Exp. Bot.* *62*, 4003–4011.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Gentilhomme, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., et al. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development*. *133*, 3213–3222.
- Lazaro, A., Valverde, F., Piñeiro, M., und Jarillo, J.A. (2012). The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell* *24*, 982–999.

- Lee, J., Oh, M., Park, H., und Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 55, 832–843.
- Lee, J.H., Yoo, S.J., Park, S.H., Hwang, I., Lee, J.S., und Ahn, J.H. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev.* 21, 397–402.
- Lee, J.H., Ryu, H.-S., Chung, K.S., Posé, D., Kim, S., Schmid, M., und Ahn, J.H. (2013). Regulation of Temperature-Responsive Flowering by MADS-Box Transcription Factor Repressors. *Science* 342, 628–632.
- Lee, J.H., Chung, K.S., Kim, S.-K., und Ahn, J.H. (2014a). Post-translational regulation of SHORT VEGETATIVE PHASE as a major mechanism for thermoregulation of flowering. *Plant Signal. Behav.* 9, e28193.
- Lee, S., Lee, H.-J., Jung, J.-H., und Park, C.-M. (2014b). The Arabidopsis thaliana RNA-binding protein FCA regulates thermotolerance by modulating the detoxification of reactive oxygen species. *New Phytol.*
- Levy, Y.Y., Mesnage, S., Mylne, J.S., Gendall, A.R., und Dean, C. (2002). Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* 297, 243–246.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Meyerowitz, E., und Yu, H. (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis. *Dev. Cell* 15, 110–120.
- Lim, M.-H., Kim, J., und Kim, Y.-S. (2004). A New Arabidopsis Gene, FLK, Encodes an RNA Binding Protein with K Homology Motifs and Regulates Flowering Time via FLOWERING LOCUS C. *PLANT CELL ONLINE* 16, 731–740.
- Liu, Z., und Mara, C. (2010). Regulatory mechanisms for floral homeotic gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 80–86.
- Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J.-H., Liou, Y.C., und Yu, H. (2008a). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development.* 135, 1481–1491.
- Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swiezewski, S., und Dean, C. (2007). The Arabidopsis RNA-Binding Protein FCA Requires a Lysine-Specific Demethylase 1 Homolog to Downregulate FLC. *Mol. Cell* 28, 398–407.
- Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., und Dean, C. (2010). Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers Arabidopsis FLC chromatin silencing. *Science* 327, 94–97.
- Liu, L.-J., Zhang, Y.-C., Li, Q.-H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.-L., Wang, L., und Yang, H.-Q. (2008b). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 292–306.
- Löhr, B., Streitner, C., Steffen, A., Lange, T., und Staiger, D. (2014). A glycine-rich RNA-binding protein affects gibberellin biosynthesis in Arabidopsis. *Mol. Biol. Rep.* 41, 439–445.
- Lorković, Z.J., und Barta, A. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* 30, 623–635.



- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A.M.E., Greb, T., und Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16831–16836.
- Lyons, R., Iwase, A., Gänsewig, T., Sherstnev, A., Duc, C., Barton, G.J., Hanada, K., Higuchi-Takeuchi, M., Matsui, M., Sugimoto, K., et al. (2013). The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Sci. Rep.* *3*.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., et al. (1997). FCA, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. *Cell* *89*, 737–745.
- Martin-Trillo, M., Lázaro, A., Poethig, R.S., Gómez-Mena, C., Piñeiro, M.A., Martínez-Zapater, J.M., und Jarillo, J.A. (2006). EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1) encodes ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (AtARP6), a putative component of chromatin remodelling complexes that positively regulates FLC accumulation in Arabidopsis. *Development* *133*, 1241–1252.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., und Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Curr. Biol. CB* *17*, 1055–1060.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Mürdter, F., Küttner, F., und Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol.* *7*, e1000148.
- Matsuura, H., Ishibashi, Y., Shinmyo, A., Kanaya, S., und Kato, K. (2010). Genome-Wide Analyses of Early Translational Responses to Elevated Temperature and High Salinity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* *51*, 448–462.
- Meier, C., Bouquin, T., Nielsen, M.E., Raventos, D., Mattsson, O., Rocher, A., Schomburg, F., Amasino, R.M., und Mundy, J. (2001). Gibberellin response mutants identified by luciferase imaging. *Plant J.* *25*, 509–519.
- Michaels, S.D., und Amasino, R.M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* *11*, 949–956.
- Michaels, S.D., He, Y., Scortecci, K.C., und Amasino, R.M. (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10102–10107.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C.B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., und Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *35*, 613–623.
- Murashige, T., und Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* *15*, 473–497.
- Mutasa-Göttgens, E., und Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* *60*, 1979–1989.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., und Jones, J.D.G. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol. CB* *18*, 650–655.

- Nicaise, V., Joe, A., Jeong, B., Korneli, C., Boutrot, F., Westedt, I., Staiger, D., Alfano, J.R., und Zipfel, C. (2013). Pseudomonas HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO J.* *32*, 701–712.
- Nilsson, O. (2013). A Pathway to Flowering—Why Staying Cool Matters. *Science* *342*, 566–567.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., und Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* *49*, 1645–1658.
- Ohnacker, M., Barabino, S.M., Preker, P.J., und Keller, W. (2000). The WD-repeat protein pfs2p bridges two essential factors within the yeast pre-mRNA 3'-end-processing complex. *EMBO J.* *19*, 37–47.
- Page, T., Macknight, R., Yang, C.-H., und Dean, C. (1999). Genetic interactions of the Arabidopsis flowering time gene FCA, with genes regulating floral initiation. *Plant J.* *17*, 231–239.
- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., und Genschik, P. (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4–DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3430.
- Penfield, S. (2008). Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol.* *179*, 615–628.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *25*, 159–184.
- Pittendrigh, C.S. (1972). Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 2734–2737.
- Porri, A., Torti, S., Romera-Branchat, M., und Coupland, G. (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of Arabidopsis under long photoperiods. *Development* *139*, 2198–2209.
- Portoles, S., und Mas, P. (2010). The Functional Interplay between Protein Kinase CK2 and CCA1 Transcriptional Activity Is Essential for Clock Temperature Compensation in Arabidopsis. *PLoS Genet.* *6*.
- Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G.C., Immink, R.G.H., und Schmid, M. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature* *503*, 414–417.
- Proveniers, M.C.G., und van Zanten, M. (2013). High temperature acclimation through PIF4 signaling. *Trends Plant Sci.* *18*, 59–64.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., und Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* *80*, 847–857.
- Quesada, V., Macknight, R., Dean, C., und Simpson, G.G. (2003). Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. *EMBO J.* *22*, 3142–3152.

- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., und Moorman, A.F.M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66.
- Rataj, K., und Simpson, G.G. (2013). Message ends: RNA 3' processing and flowering time control. *J. Exp. Bot.* ert439.
- Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber, T.L., und Riechmann, J.L. (2001). Regulation of flowering in Arabidopsis by an FLC homologue. *Plant Physiol.* 126, 122–132.
- Ratcliffe, O.J., Kumimoto, R.W., Wong, B.J., und Riechmann, J.L. (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell Online* 15, 1159.
- Rate, D.N., und Greenberg, J.T. (2001). The Arabidopsis aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 27, 203–211.
- Rédei, G.P. (1962). Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* 47, 443–460.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., und Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., und Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626.
- Richter, R., Behringer, C., Müller, I.K., und Schwechheimer, C. (2010). The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev.* 24, 2093–2104.
- Ripoll, J.J., Ferrándiz, C., Martínez-Laborda, A., und Vera, A. (2006). PEPPER, a novel K-homology domain gene, regulates vegetative and gynoecium development in Arabidopsis. *Dev. Biol.* 289, 346–359.
- Ripoll, J.J., Rodríguez-Cazorla, E., González-Reig, S., Andújar, A., Alonso-Cantabrana, H., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., Martínez-Laborda, A., und Vera, A. (2009). Antagonistic interactions between Arabidopsis K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C. *Dev. Biol.* 333, 251–262.
- Salomé, P.A., Weigel, D., und McClung, C.R. (2010). The Role of the Arabidopsis Morning Loop Components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in Temperature Compensation. *Plant Cell Online* 22, 3650–3661.
- Samach, A., und Wigge, P.A. (2005). Ambient temperature perception in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 483–486.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., und Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288, 1613–1616.
- Sawa, M., und Kay, S.A. (2011). GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 11698.

- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., und Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in Arabidopsis. *Science* 318, 261–265.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A., und Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219–1229.
- Schmal, C., Reimann, P., und Staiger, D. (2013). A Circadian Clock-Regulated Toggle Switch Explains AtGRP7 and AtGRP8 Oscillations in Arabidopsis thaliana. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1002986.
- Schmidt, F., Marnef, A., Cheung, M.-K., Wilson, I., Hancock, J., Staiger, D., und Lodomery, M. (2010). A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced Arabidopsis thaliana RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. *Mol. Biol. Rep.* 37, 839–845.
- Schomburg, F.M., Patton, D.A., Meinke, D.W., und Amasino, R.M. (2001). FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell Online* 13, 1427–1436.
- Schöning, J.C., Streitner, C., Page, D.R., Hennig, S., Uchida, K., Wolf, E., Furuya, M., und Staiger, D. (2007). Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J.* 52, 1119–1130.
- Schöning, J.C., Streitner, C., Meyer, I.M., Gao, Y., und Staiger, D. (2008). Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 36, 6977–6987.
- Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp, A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T., und Goodrich, J. (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* 25, 4638–4649.
- Schüttpelz, M., Schöning, J.C., Doose, S., Neuweiler, H., Peters, E., Staiger, D., und Sauer, M. (2008). Changes in conformational dynamics of mRNA upon AtGRP7 binding studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9507–9513.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., und Weigel, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Dev. Cell* 8, 517–527.
- Schwechheimer, C. (2012). Gibberellin signaling in plants – the extended version. *Front. Plant Physiol.* 2, 107.
- Schwechheimer, C., und Willige, B.C. (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 57–62.
- Scortecci, K., Michaels, S.D., und Amasino, R.M. (2003). Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 52, 915–922.
- Scortecci, K.C., Michaels, S.D., und Amasino, R.M. (2001). Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 26, 229–236.
- Severing, E.I., van Dijk, A.D.J., Morabito, G., Busscher-Lange, J., Immink, R.G.H., und van Ham, R.C.H.J. (2012). Predicting the Impact of Alternative Splicing on Plant MADS Domain Protein Function. *PLoS ONE* 7, e30524.

- Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J., und Dennis, E.S. (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3753–3758.
- Sheldon, C.C., Hills, M.J., Lister, C., Dean, C., Dennis, E.S., und Peacock, W.J. (2008). Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2214–2219.
- Shi, Y., Di Giammartino, D.C., Taylor, D., Sarkeshik, A., Rice, W.J., Yates, J.R., 3rd, Frank, J., und Manley, J.L. (2009). Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. *Mol. Cell* *33*, 365–376.
- Simpson, G.G. (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 570–574.
- Simpson, G.G., Dijkwel, P.P., Quesada, V., Henderson, I., und Dean, C. (2003). FY Is an RNA 3' End-Processing Factor that Interacts with FCA to Control the Arabidopsis Floral Transition. *Cell* *113*, 777–787.
- Simpson, G.G., Laurie, R.E., Dijkwel, P.P., Quesada, V., Stockwell, P.A., Dean, C., und Macknight, R.C. (2010). Noncanonical Translation Initiation of the Arabidopsis Flowering Time and Alternative Polyadenylation Regulator FCA. *Plant Cell Online* *22*, 3764.
- Singh, V., Roy, S., Singh, D., und Nandi, A.K. (2014). Arabidopsis FLOWERING LOCUS D influences systemic-acquired-resistance-induced expression and histone modifications of WRKY genes. *J. Biosci.* *39*, 119–126.
- Song, J., Angel, A., Howard, M., und Dean, C. (2012a). Vernalization - a cold-induced epigenetic switch. *J. Cell Sci.* *125*, 3723–3731.
- Song, Y.H., Smith, R.W., To, B.J., Millar, A.J., und Imaizumi, T. (2012b). FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* *336*, 1045–1049.
- Srikanth, A., und Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 2013–2037.
- Staiger, D. (2001). RNA-binding proteins and circadian rhythms in Arabidopsis thaliana. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* *356*, 1755–1759.
- Staiger, D., und Apel, K. (1999). Circadian clock-regulated expression of an RNA-binding protein in Arabidopsis: characterisation of a minimal promoter element. *Mol. Gen. Genet. MGG* *261*, 811–819.
- Staiger, D., Zecca, L., Kirk, D.A.W., Apel, K., und Eckstein, L. (2003a). The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.* *33*, 361–371.
- Staiger, D., Allenbach, L., Salathia, N., Fiechter, V., Davis, S.J., Millar, A.J., Chory, J., und Fankhauser, C. (2003b). The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev.* *17*, 256–268.
- Steffen, A., Fischer, A., und Staiger, D. (2014). Determination of photoperiodic flowering time control in Arabidopsis and barley. *Methods Mol. Biol.* *1158*, 285–295.

- Steinbach, Y., und Hennig, L. (2014). Arabidopsis MSI1 functions in photoperiodic flowering time control. *Front. Plant Sci.* *5*, 77.
- Streitner, C., Danisman, S., Wehrle, F., Schöning, J.C., Alfano, J.R., und Staiger, D. (2008). The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *56*, 239–250.
- Streitner, C., Hennig, L., Korneli, C., und Staiger, D. (2010). Global transcript profiling of transgenic plants constitutively overexpressing the RNA-binding protein AtGRP7. *BMC Plant Biol.* *10*, 221.
- Streitner, C., Köster, T., Simpson, C.G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J.W.S., und Staiger, D. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11240–11255.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., und Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* *410*, 1116–1120.
- Sung, S., und Amasino, R.M. (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* *427*, 159–164.
- Swiezewski, S., Crevillen, P., Liu, F., Ecker, J.R., Jerzmanowski, A., und Dean, C. (2007). Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the *Arabidopsis* gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3633–3638.
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., und Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* *462*, 799–802.
- Takada, S., und Goto, K. (2003). Terminal flower2, an *Arabidopsis* homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* *15*, 2856–2865.
- Telfer, A., Bollman, K.M., und Poethig, R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* *124*, 645.
- Thines, B., und Harmon, F.G. (2010). Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core *Arabidopsis* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3257–3262.
- Tiwari, S.B., Shen, Y., Chang, H.-C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S.F., McPartland, M., Hymus, G.J., Adam, L., Marion, C., et al. (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytol.* *187*, 57–66.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., und Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* *303*, 1003–1006.
- van Nocker, S., und Vierstra, R.D. (1993). Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains. *Plant Mol. Biol.* *21*, 695–699.
- Veley, K.M., und Michaels, S.D. (2008). Functional Redundancy and New Roles for Genes of the Autonomous Floral-Promotion Pathway. *PLANT Physiol.* *147*, 682–695.
- Wagner, D. (2009). Flower Morphogenesis: Timing Is Key. *Dev. Cell* *16*, 621–622.

- Wang, Z.Y., und Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* *93*, 1207–1217.
- Wang, J.-W., Czech, B., und Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* *138*, 738–749.
- Weigel, D., und Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* *377*, 495–500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., und Meyerowitz, E.M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* *69*, 843–859.
- Werner, J.D. (2005). FRIGIDA-Independent Variation in Flowering Time of Natural *Arabidopsis thaliana* Accessions. *Genetics* *170*, 1197–1207.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., und Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* *309*, 1056–1059.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A., und Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 1209–1220.
- Willmann, M.R., und Poethig, R.S. (2011). The effect of the floral repressor FLC on the timing and progression of vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Development* *138*, 677–685.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., und Somerville, C.R. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. *Plant Physiol.* *100*, 403–408.
- Wu, G., und Poethig, R.S. (2006). Temporal Regulation of Shoot Development in *Arabidopsis Thaliana* By Mir156 and Its Target SPL3. *Development.* *133*, 3539–3547.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., und Poethig, R.S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* *138*, 750–759.
- Xie, Z., Khanna, K., und Ruan, S. (2010). Expression of MicroRNAs and Its Regulation in Plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 790–797.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 225–251.
- Yamaguchi, A., und Abe, M. (2012). Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *J. Plant Res.* *125*, 693–704.
- Yang, D.H., Kwak, K.J., Kim, M.K., Park, S.J., Yang, K.-Y., und Kang, H. (2014). Expression of *Arabidopsis* glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2 or AtGRP7 improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions. *Plant Sci.* *214*, 106–112.
- Yángüez, E., Castro-Sanz, A.B., Fernández-Bautista, N., Oliveros, J.C., und Castellano, M.M. (2013). Analysis of Genome-Wide Changes in the Translatome of *Arabidopsis* Seedlings Subjected to Heat Stress. *PLoS ONE* *8*, e71425.

Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., und Schmid, M. (2010). Orchestration of the Floral Transition and Floral Development in Arabidopsis by the Bifunctional Transcription Factor APETALA2. *Plant Cell* 22, 2156–2170.

Yu, H., Xu, Y., Tan, E.L., und Kumar, P.P. (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16336–16341.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus (Blumenkohlmosaikvirus)
cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
KT	Kurztag
LT	Langtag
min.	Minuten
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RBP	RNA-Bindeprotein
RNAi	RNA-Interferenz
RRM	RNA recognition motif
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
zt	Zeitgeber time

## Publikationen

**Steffen, A., Fischer, A., und Staiger, D.** (2014). Determination of photoperiodic flowering time control in *Arabidopsis* and barley. *Methods Mol. Biol.* *1158*, 285–295.

**Löhr, B., Streitner, C., Steffen, A., Lange, T., und Staiger, D.** (2014). A glycine-rich RNA-binding protein affects gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Rep.* *41*, 439–445.

## Abstracts

**Steffen, A., Johansson, M., Fischer, A., Danisman, S., Stein, N., und Staiger, D.** (2014). Comparative analysis of *Arabidopsis* and barley glycine-rich RNA binding proteins in flowering time control. Symposium on Genetic Variation of Flowering Time Genes and Applications for Crop Improvement. Bielefeld, Germany, 24.03-26.03.2014.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit und während der letzten Jahre im Labor unterstützt haben:

Frau Professor Staiger danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation an ihrem Lehrstuhl anzufertigen und für die engagierte Betreuung während dieser Zeit.

Den Kooperationspartnern am Forschungszentrum Jülich, Dr. Chryssa Dimaki, Dr. Fabio Fiorani, Silvia Braun sowie Professor Schurr danke ich für die Möglichkeit, ihre Phänotypisierungsplattform nutzen zu dürfen und die nette Aufnahme an ihrem Institut.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Molekulare Zellphysiologie danke ich für die gute Zeit im Labor und die nette Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich Elisabeth Detring, Barbara Fuchs und Kristina Neudorf für hervorragende technische Unterstützung, den Kollegen Christin, Martina, Florian, Christian und Matthias für viel Spaß bei der Arbeit und Maïke für die Unterstützung bei der RIP. Besonderer Dank geht an Corinna, die einen Teil des Projekts betreut hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dank gebührt ebenfalls den Gärtnern der Fakultät für die Betreuung von Unmengen von Pflanzen und besonders Nils Köhler aus der Bio-Werkstatt für unermüdlichen Einsatz bei der Reparatur von Anzuchtschränken.

Das allergrößte Dankeschön geht an Julia für ihre unendliche Geduld mit mir und natürlich an meine Eltern für die Unterstützung während dieser Zeit.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Funktionelle Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen in der Blühregulation und der vegetativen Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*“ selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Bielefeld, den 09.10.2014

Alexander Steffen