

**Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsfaktors
AtMYB12 als Regulator des Phenylpropanoidstoffwechsels in
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Frank Mehrrens

aus Bensberg

angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Köln 2002

Berichtersteller:

Priv. Doz. Dr. Bernd Weißhaar

Prof. Dr. Martin Hülkamp

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Gottfried Weissenböck

Tag der Disputation: 13. Januar 2003

Für meine Eltern

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors MYB12 als Regulator des Phenylpropanoidstoffwechsels untersucht. Dazu wurden Pflanzen einer *myb12*-Knockout- sowie einer *MYB12*-Überexpressionlinie mit Wildtyp-Pflanzen auf der Ebene der Genexpression, durch quantitative Echtzeit-RT-PCR, als auch auf biochemischer Ebene mittels HPLC-Analyse, verglichen. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch transiente Expressionsstudien in Protoplasten kultivierter *A. thaliana*-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass MYB12 ein flavonolspezifischer Aktivator der Flavonoidbiosynthese ist. Die Expressionsanalysen in Keimlingen der drei Linien haben gezeigt, dass die Gene *CHS* und *FLS* die Zielgene von MYB12 sind. Bei Überexpression des Faktors fallen zusätzlich auch die Gene *CFI* und *F3H* unter dessen transkriptionelle Kontrolle. Ein Effekt der Änderung der *MYB12*-Expression auf die Expression der beiden anderen untersuchten Gene der Flavonoidbiosynthese, *F3'H* und *DFR*, konnte nicht festgestellt werden.

Wie aus den Resultaten der Expressionsanalysen zu erwarten, konnte ein „biochemischer“ *myb12*-Phänotyp detektiert werden. Die HPLC-Analyse junger Keimlinge zeigte, dass der Flavonolgehalt direkt von der *MYB12*-Expression abhing. In Keimlingen der Knockout-Linie war die Flavonolmenge, sowohl von Quercetin- als auch Kämpferolderivaten im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert, in der Überexpressionlinie entsprechend deutlich erhöht. Die Anthocyanmenge ist, wie aus der *MYB12*-unabhängigen Regulation von *DFR* zu vermuten, nicht mit dem *MYB12*-Expressionsniveau korreliert.

Die *MYB12*-Expression, ebenso wie die der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese mit Ausnahme von *F3'H* und *DFR*, war licht-, bzw. von der De-Etiolierung abhängig und konnte durch Bestrahlung mit UV-Licht induziert werden. Diese Befunde machen eine Rolle des Faktors an der stimulusabhängigen Signaltransduktion zur Aktivierung der Flavonoidbiosynthese wahrscheinlich. Die Expression von *MYB12* war nicht auf Keimlinge beschränkt, sondern konnte auch in adulten Pflanzen, besonders in Blüten und Schoten, nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Transfektionsanalysen ließen auf weitere MYB12-Zielgene auch im allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus schließen, die Strukturgene der Sinapinsäuresynthese waren hingegen keine Ziele von MYB12.

MYB12 und der zur selben Verwandtschaftsgruppe gehörende Faktor MYB111 zeigten identische Zielgen-Spezifitäten, die *MYB111*-Expression war jedoch nicht UV-induzierbar. Beide Faktoren sind folglich nicht redundant.

Abstract

In this work the function of MYB12 as a regulator of phenylpropanoid metabolism was investigated using *myb12*-knockout and overexpressing plants in comparison to wildtype plants with regard to gene expression, by quantitative Realtime RT-PCR, and their biochemical properties by HPLC analysis. Additionally, transient expression studies using protoplasts of cultured *A. thaliana* cells were performed.

It was shown that MYB12 is a flavonol specific activator of flavonoid biosynthesis. Expression analyses in seedlings of the three lines demonstrated that the MYB12 target genes are *CHS* and *FLS*. When the factor is overexpressed the genes *CFI* and *F3H* also fall under the transcriptional control by MYB12. No effect of altered *MYB12* expression could be observed for *F3'H* and *DFR*.

As expected from the results of the expression analyses, a "biochemical" *myb12* phenotype was detected. The HPLC analysis of young seedlings showed that their flavonol content was strictly dependent on the level of *MYB12* expression, being strongly reduced in the knockout line and heavily increased in the overexpressor plants. The anthocyanin content, as to be expected from the MYB12 independent *DFR* expression, did not correlate with *MYB12* expression levels.

The expression of *MYB12*, like that of the structural flavonoid genes except *F3'H* and *DFR* was de-etiolation dependent and UV inducible. This indicates a role for MYB12 in the stimulus dependent signal transduction pathway leading to the transcriptional activation of flavonoid biosynthesis. *MYB12* expression was not restricted to seedlings, but could readily be detected in adult plants as well, especially in flowers and siliques.

Based on the transfection results the existence of additional MYB12 target genes also within the general phenylpropanoid metabolism could be deduced. However, the structural genes involved in the synthesis of sinapic acid were no MYB12 targets.

MYB12 and MYB111, both belonging to the same similarity subgroup within the *A. thaliana* MYB transcription factor family, showed identical target gene specificities, but in contrast to MYB12 the expression of MYB111 was not induced by UV light. Hence, the two factors are non-redundant.

1. Einleitung	1
1.1. Die Biosynthese der Flavonoide	1
1.2. Die Funktionen der Flavonoide	5
1.3. Die Expression eukaryotischer Gene	7
1.4. Pflanzliche MYB-Transkriptionsfaktoren und deren Funktion in der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels	8
1.5. Die lichtregulatorische Einheit des <i>CHS</i> -Minimalpromotors	13
1.6. Die Grundlagen des 5'-Exonuklease Assays in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR	16
1.6.1. Das Prinzip des 5'-Exonuklease Assays	16
1.6.2. Die Instrumentierung der Echtzeit-PCR: Das ABI PRISM [®] Sequence Detection System	18
1.6.3. Das Konzept der relativen Quantifizierung der Genexpression	19
1.6.3.1. Die Berechnung von PCR-Effizienzen in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR	21
1.6.3.2. Die Berechnung der relativen Genexpression	23
1.6.4. Alternative Quantifizierungsstrategien	24
1.6.4.1. Die Standardkurven-Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression	24
1.6.4.2. Die absolute Quantifizierung der Genexpression	25
1.7. Ziele der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Material	28
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	28
2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen	28
2.1.3. Desoxyoligonukleotide	30
2.1.4. TaqMan [®] -Systeme	34
2.1.5. Bakterienstämme und DNA-Vektoren	34
2.1.6. Zellkulturen und Pflanzen	39
2.1.7. Weiteres biologisches Material	39
2.2. Methoden	40
2.2.1. Ammonium-Acetat-Fällung von DNA	40
2.2.2. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	40
2.2.3. Restriktionsspaltung von DNA	41
2.2.4. Agarosegelelektrophorese	41

2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten	41
2.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten	41
2.2.6.1. Klonierung mit Hilfe von T4-Ligase	41
2.2.6.2. TOPO TA Cloning [®]	42
2.2.7. Kultivierung von Bakterien	43
2.2.8. Transformation von Bakterienzellen	43
2.2.9. Schnelle Transformation von Bakterienzellen	43
2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.11. Zielgerichtete Mutagenese mittel PCR	44
2.2.12. Isolierung von DNA	44
2.2.12.1. Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA	44
2.2.12.2. Quantitative Plasmidpräparationen über Säulenchromatographie	44
2.2.12.3. Isolierung genomischer DNA	45
2.2.13. Herstellung bestimmter Reporterkonstrukte für Transfektionsexperimente	46
2.2.13.1. Deletionsserie des <i>MYB12</i> -Promotors	46
2.2.13.2. <i>PAL</i> -Reporterkonstrukte	46
2.2.13.3. <i>F3'H</i> -Reporterkonstrukt	47
2.2.13.4. <i>F5H</i> -Reporterkonstrukt	47
2.2.13.5. <i>OMT</i> -Reporterkonstrukt	47
2.2.14. Automatische DNA-Sequenzierung	47
2.2.15. Computergestützte Auswertung von Sequenzdaten	47
2.2.16. Gewinnung von <i>A. thaliana</i> Protoplasten	47
2.2.17. Transfektion von <i>A. thaliana</i> Protoplasten	48
2.2.18. Ernte transfizierter Protoplasten	49
2.2.19. Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten	49
2.2.20. Proteinbestimmung nach Bradford	49
2.2.21. Bestimmung der Luziferase-Aktivität	49
2.2.22. Bestimmung der β -Glukoronidase-Aktivität	50
2.2.23. Auswertung der Transfektionsexperimente	51
2.2.24. Kreuzungen bei <i>A. thaliana</i>	52
2.2.25. Gewinnung ein En-1-Transposon-freien <i>myb12</i> -Knockout-Linie	53
2.2.26. Kartierung des <i>MYB12</i> -Gens unter Verwendung von RI-Linien	55
2.2.27. Quantitative Echtzeit-RT-PCR	56
2.2.27.1. Probenvorbereitung für die quantitative Echtzeit-RT-PCR	56

2.2.27.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA	56
2.2.27.1.2. DNaseI-Restriktion von Gesamt-RNA	57
2.2.27.1.3. LiCl-Fällung der DNaseI-behandelten Gesamt-RNA	57
2.2.27.1.4. Erststrang-cDNA-Synthese	58
2.2.27.2. Quantifizierung der endogenen 18S-rRNA-Referenz	58
2.2.27.3. Quantifizierung der relativen Genexpression spezifischer Zielgene	59
2.2.27.4. Bestimmung der PCR-Effizienzen der verwendeten TaqMan [®] -Systeme	60
2.2.28. HPLC-Analyse methanolischer Pflanzenextrakte	61
2.2.28.1. Gewinnung methanolischer Extrakte aus Pflanzenmaterial	61
2.2.28.2. HPLC-Analyse	61
2.2.28.3. Auswertung der HPLC-Ergebnisse	62
2.2.29. Färbereaktion mit Naturstoffreagenz A	63
2.2.30. Photometrische Anthocyan-Bestimmung	63
3. Ergebnisse	65
3.1. Transfektionsanalysen zur funktionellen Charakterisierung von MYB12	65
3.1.1. MYB12 ist kein Aktivator der <i>F3'H</i> -Reporter-Expression	65
3.1.2. MYB12 als Aktivator des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels	66
3.1.3. MYB12 als Regulator der Sinapinsäuresynthese	68
3.1.4. Identifizierung der an der MYB12-vermittelten Aktivierung des <i>CHS</i> - Minimalpromotors beteiligten <i>cis</i> -Elemente	69
3.1.5. Das <i>myb12</i> -Knockout-Allel ist nicht funktionell	71
3.1.6. Die UV-Induzierbarkeit der <i>F3'H</i> - und <i>DFR</i> -Reporterkonstrukte	72
3.1.7. Die UV-Induzierbarkeit des <i>MYB12</i> -Reporterkonstrukts und Definition eines <i>MYB12</i> -Minimalpromotors ⁷²	72
3.1.8. MYB111 aktiviert die gleichen Promotorkonstrukte wie MYB12	74
3.1.9. Das MYB111-Reporterkonstrukt ist nicht UV-induzierbar	75
3.2. Quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse der Expression der an der Flavonoid- biosynthese beteiligten Strukturgene in <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	76
3.2.1. PCR-Effizienzen der verwendeten TaqMan [®] -Systeme	76
3.2.2. Relative Genexpression in belichteten Keimlingen	79
3.2.2.1. <i>MYB12</i> -Expression	79
3.2.2.2. <i>CHS</i> -Expression	80
3.2.2.3. <i>CFI</i> -Expression	81
3.2.2.4. <i>F3H</i> -Expression	82

3.2.2.5. <i>FLS</i> -Expression	83
3.2.2.6. <i>F3'H</i> -Expression	84
3.2.2.7. <i>DFR</i> -Expression	85
3.2.3. Relative Genexpression in etiolierten Keimlingen	86
3.2.3.1. <i>MYB12</i> -Expression	86
3.2.3.2. <i>CHS</i> -Expression	87
3.2.3.3. <i>CFI</i> -Expression	88
3.2.3.4. <i>F3H</i> -Expression	89
3.2.3.5. <i>FLS</i> -Expression	90
3.2.3.6. <i>F3'H</i> -Expression	91
3.2.3.7. <i>DFR</i> -Expression	92
3.2.4. Relative Genexpression in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen	93
3.2.4.1. <i>MYB12</i> -Expression	94
3.2.4.2. <i>CHS</i> -Expression	95
3.2.4.3. <i>CFI</i> -Expression	96
3.2.4.4. <i>F3H</i> -Expression	97
3.2.4.5. <i>FLS</i> -Expression	98
3.2.4.6. <i>F3'H</i> -Expression	99
3.2.4.7. <i>DFR</i> -Expression	100
3.3. HPLC-Analyse zur Detektion des <i>myb12</i> -Phänotyps	101
3.3.1. HPLC-Analyse methanolischer Extrakte aus Weißlicht-bestrahlten Keimlingen	101
3.3.1.1. Relative Quantifizierung der Quercetinderivate	101
3.3.1.2. Relative Quantifizierung der Kämpferolderivate	103
3.3.1.3. Relative Quantifizierung der Sinapate	104
3.3.2. HPLC-Analyse methanolischer Extrakte aus etiolierten Keimlingen	105
3.3.2.1. Relative Quantifizierung der Quercetinderivate	105
3.3.2.2. Relative Quantifizierung der Kämpferolderivate	107
3.3.2.3. Relative Quantifizierung der Sinapate	108
3.4. Naturstoffreagenz A-Färbung von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	109
3.4.1. Flavonoid-Akkumulation in belichteten Keimlingen	109
3.4.2. Flavonoid-Akkumulation in etiolierten Keimlingen	111
3.5. Bestimmung des Anthocyangehaltes von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	113
3.6. Lokalisation des <i>MYB12</i> -Gens im Genom von <i>A. thaliana</i>	114

4. Diskussion	116
4.1. Transiente Expressionstudien zur Funktion von MYB12	116
4.1.1. Transiente Expressionsanalysen identifizieren die „frühen“ Flavonoidgene als potentielle MYB12-Zielgene	116
4.1.2. MYB12 als Regulator des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels und der Sinapinsäurebiosynthese	118
4.1.3. Die MYB12-Aktivierung des <i>CHS</i> -Minimalpromotors wird durch das MRE der LRU ^{AtCHS} vermittelt	120
4.1.4. Das <i>myb12</i> -Knockout-Allel ist nicht funktionell	121
4.1.5. Die Gene <i>F3'H</i> und <i>DFR</i> sind in der At7-Zellkultur nicht UV-induzierbar	122
4.1.6. Der MYB12-Promotor ist durch UV-Licht induzierbar/Definition eines MYB12-Minimalpromotors	122
4.1.7. Die Zielgene von MYB12 und MYB111 sind identisch	124
4.2. Expressionsanalyse von <i>MYB12</i> und seinen potentiellen Zielgenen mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR	126
4.2.1. Die verwendeten TaqMan [®] -Systeme sind für die relative Quantifizierung der Genexpression optimiert	127
4.2.2. Die Expressionsanalyse in belichteten Keimlingen identifiziert <i>CHS</i> und <i>FLS</i> als die primären MYB12-Zielgene	127
4.2.2. Das MYB12-Transaktivierungspotential ist in etiolierten Keimlingen reguliert	131
4.2.3. Die Expression von <i>MYB12</i> ist in allen Geweben adulter Pflanzen nachweisbar	134
4.3. HPLC-Detektion des „biochemischen“ <i>myb12</i> -Phänotyps	136
4.3.1. In belichteten Keimlingen korreliert die <i>MYB12</i> -Expression mit dem Flavonolgehalt	137
4.3.2. Die <i>MYB12</i> -Überexpression in etiolierten Keimlingen kompensiert den fehlenden Lichtstimulus zur Synthese von Quercetin	138
4.4. Naturstoffreagenz A-Färbung von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	140
4.5. Der Anthocyanengehalt in den drei <i>MYB12</i> -Linien ist unverändert	142
4.6. Hypothetisches Modell der MYB12-Wirkung in Keimlingen	143
4.7. Ausblick	146
5. Zusammenfassung	148
6. Literaturverzeichnis	152
7. Anhang	185

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarat-CoA-Ligase
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl-Glukuronid
aa	Aminosäure
A	Adenin
ACE	ACGT-Element
ACS	ACGT-Sequenz, funktionell nicht charakterisiertes ACE
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
bZIP	basisches Leuzin-Reißverschluß-Protein
C	Cytosin
C3H	Zimtsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	komplementäre DNA
CFI	Chalkon-Flavanon-Isomerase
CHR	Chalkon-Reduktase
CHS	Chalkon-Synthase
cM	centi Morgan
Col	Columbia
C _t	Threshold cycle
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure (acetic acid)
EGTA	Ethylen-glykol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N' tetraessigsäure
F3H	Flavanon-3-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
F5H	Ferulat-5-Hydroxylase
FLS	Flavonol-Synthase
FNS	Flavon-Synthase
G	Guanin
GUS	β-Glukuronidase
GUS'	spezifische, standardisierte GUS-Aktivität
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
K	Kämpferol(-derivat)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
ko	<i>myb12</i> -Knockout-Linie
l	Liter
LAC-Z	β-Galaktosidase

LCR	Leucoanthocyanidin-Reduktase
LDOX	Leucoanthocyanidinoxidase
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LRU	Lichtregulatorische Einheit
LUC	Luciferase
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
MRE	MYB-Erkennungselement
MRS	MYB-Erkennungssequenz, funktionell nicht charakterisiertes MRE
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NOS	Nopalins-Synthase
OD	optische Dichte
OMT	O-Methyltransferase
ORF	offenes Leseraster
Ox	<i>MYB12</i> -Überexpressionslinie
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Q	Quercetin(-derivat)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RI	Rekombinante Inzuchtlinien
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	bHLH-Erkennungselement
RRS	bHLH-Erkennungssequenz, funktionell nicht charakterisiertes RRE
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
S	Sinapinsäure(-derivat)
s	Sekunde
SD	mittlerer Fehler des Mittelwertes
SDS	Natriumdodecylsulfat
STS	Stilben-Synthase
T	Thymin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UBI	Polyubiquitin
ün	über Nacht
UV	ultraviolett
UWGCG	University of Wisconsin, Computer Group Genetics
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Glukuronat

1. Einleitung

1.1. Die Biosynthese der Flavonoide

Flavonoide sind Sekundärmetabolite, die in allen bisher untersuchten vaskulären Pflanzen gefunden wurden. Die Zahl der bis heute identifizierten Flavonoide beträgt mehr als 8000 (Pietta, 2000) und es wird geschätzt, dass etwa 2% allen von Pflanzen assimilierten Kohlenstoffs in Flavonoide oder eng verwandte Verbindungen umgesetzt wird (Smith, 1972). Trotz ihrer großen Vielfalt besitzen sie einen relativ einfachen Grundaufbau (Abbildung 1). Das C₁₅-Gerüst der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem sauerstofftragenden Heterozyklus (C). Die unterschiedliche Gestaltung des letzteren liefert die Grundlage für eine Aufteilung der Flavonoide in eine Reihe von Untergruppen.

In der Pflanze unterliegen Flavonoide allgemein mannigfaltigen Modifikationen. Durch Hydroxylierung des A- und besonders des B-Ringes, Methylierung von Hydroxylgruppen sowie Glykosylierungs- und Acylierungsreaktionen, entsteht die enorme Bandbreite der natürlich vorkommenden Flavonoide.

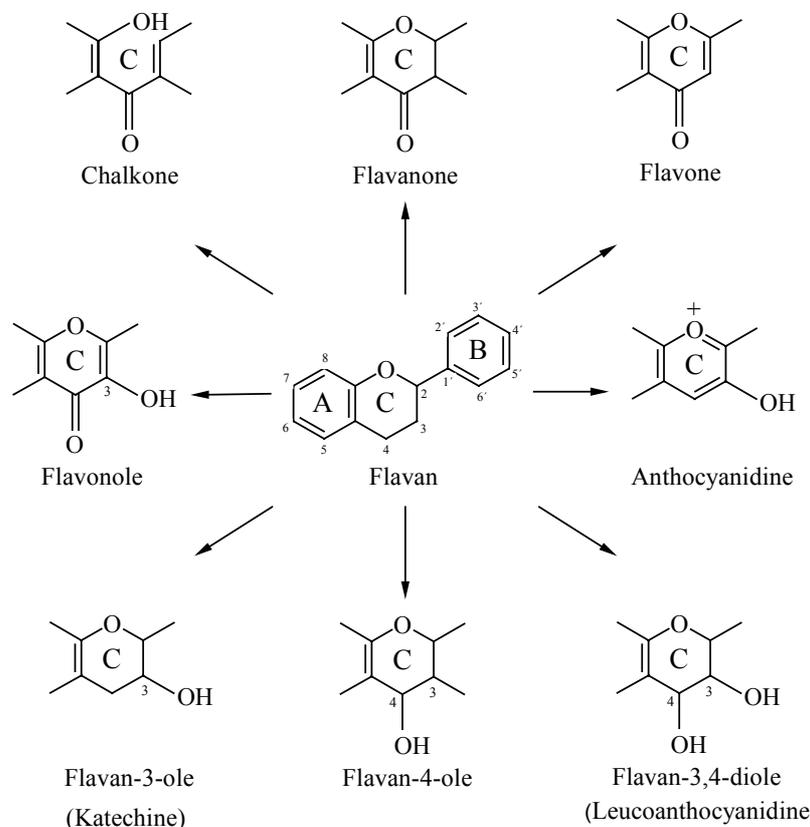


Abb. 1: Untergruppen der Flavonoide. Dargestellt ist die Ableitung der einzelnen Flavonoid-Klassen vom Flavan-Grundgerüst durch Modifikation des zentralen Heterozyklus (verändert nach Richter, 1988).

Die Ausgangssubstrate für die Biosynthese der Flavonoide sind Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA. Die Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA und CO₂ wird durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert (Heller, 1988). 4-Cumaroyl-CoA ist das Endprodukt einer als „allgemeiner Phenylpropanoidstoffwechsel“ bezeichneten Reaktionsfolge (Abbildung 2). Dieser Stoffwechselweg beginnt mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin. In einer Serie aufeinanderfolgender Reaktionen wird durch die Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H, cinnamate-4-hydroxylase) und 4-Cumarat-CoA-Ligase (4CL) die Bildung von 4-Cumaroyl-CoA katalysiert (Hahlbrock und Ragg, 1975), welches die unmittelbare Vorstufe der Flavonoide darstellt. Daneben werden eine große Anzahl weiterer Hydroxyzimtsäurederivate von der Pflanze hergestellt. Die Synthese eines dieser Derivate, der Sinapinsäure, ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie erfolgt in drei Schritten, zwei Methylierungen, durch das Enzym OMT (O-Methyltransferase) katalysiert, sowie einer durch F5H (Ferulat-5-Hydroxylase) vermittelten Hydroxylierung.

Das Enzym CHS (Chalkonsynthase), das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, katalysiert durch die schrittweise Kondensation von drei Malonyl-CoA-Molekülen (Ring A) mit einem Molekül 4-Cumaroyl-CoA (Ring B und Teile des Heterozyklus) die Bildung des C₁₅-Körpers Naringenin-Chalkon (4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon). In einer sehr ähnlich verlaufenden Reaktion kann die Aktion des Enzyms STS (Stilbensynthase) alternativ zur Bildung von Stilbenen (in Abbildung 2 Resveratrol) führen, wobei, anders als im Falle der Chalkone, vier anstatt drei Decarboxylierungen erfolgen. CHS ist in der Lage in Kooperation mit einer NADPH-abhängigen Reduktase (CHR, Chalkonreduktase) die Synthese von 4,2',4''-Trihydroxychalkon zu katalysieren. Dieses bildet, ebenso wie das Tetrahydroxychalkon, die Vorstufe für die Synthese von Auronen und Isoflavonoiden. Als Produkt der stereospezifischen Isomerisierung des Tetrahydroxychalkons durch CFI (Chalkon-Flavanon-Isomerase) entsteht das Flavanon Naringenin. Die Umsetzung des Naringenins durch FNS (Flavonsynthase) bzw. DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase) resultiert in der Bildung von Flavonen bzw. Flavan-4-olen. Letztere stellen das Ausgangssubstrat für die Phlobaphensynthese dar. Naringenin kann auch durch F3H (Flavanon-3-Hydroxylase) an Position 3 hydroxyliert werden, was zur Bildung von Dihydrokämpferol führt. Dihydrokämpferol ist die Vorstufe sowohl der Flavonole als auch der Anthocyane. Durch Hydroxylierungen an Position 3' (durch F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase) bzw. an den Positionen 3' und 5' (durch F3',5'H, Flavonoid-3',5'-Hydroxylase) entstehen die Dihydroflavonole Dihydroquercetin respektive Dihydromyricetin (in Abbildung 2 nicht

gezeigt). Das Enzym FLS (Flavonolsynthase) katalysiert die Umwandlung der Dihydroflavonole in die entsprechenden Flavonole (Kämpferol, Quercetin bzw. Myricetin) durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen dem C2- und C3-Atom (Forkmann, 1991). Alternativ kann die Carbonylgruppe am C4 durch DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase) reduziert werden, es entstehen so die Flavan-3,4-diole, auch Leucoanthocyanidine genannt, welche die direkten Vorläufer der Anthocyane darstellen. Eine Hydroxylierung und zwei Dehydrierungen der Leucoanthocyanidine, katalysiert durch das Enzym LDOX (Leucoanthocyanidinoxidase), führt zur Bildung von 3-Hydroxy-Anthocyaninen (Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin). Deren instabile Flavylumstruktur wird durch eine Glykosylierung der Hydroxylgruppe an Position 3 stabilisiert (Enzym: UDP-Glukose-Flavonol-3-O-Glykosyltransferase, in Abbildung 2 nicht gezeigt). Die Leucoanthocyanidine sind auch die Vorläufer der Katechine, die ihrerseits die Vorstufen der kondensierten Tannine bilden.

Abbildungsunterschrift zu Abbildung 2 (siehe bitte nächste Seite).

Neben den wichtigsten Schritten der Flavonoidbiosynthese ist der Abbildung auch die Reaktionsfolge des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels und der Sinapinsäuresynthese zu entnehmen. Abkürzungen: 4CL, 4-Cumarat-CoA-Ligase; C3H, Zimtsäure-3-Hydroxylase (Cinnamate-3-Hydroxylase); C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase (Cinnamate-4-Hydroxylase); CFI, Chalkon-Flavanon-Isomerase; CHR, Chalkonreduktase; CHS, Chalkonsynthase; DFR, Dihydroflavonol-4-Reduktase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; F5H, Ferulat-5-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; FNS, Flavonsynthase; LCR, Leucoanthocyanidinreduktase; LDOX, Leucoanthocyanidinoxidase; OMT, O-Methyltransferase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; STS, Stilbensynthese.

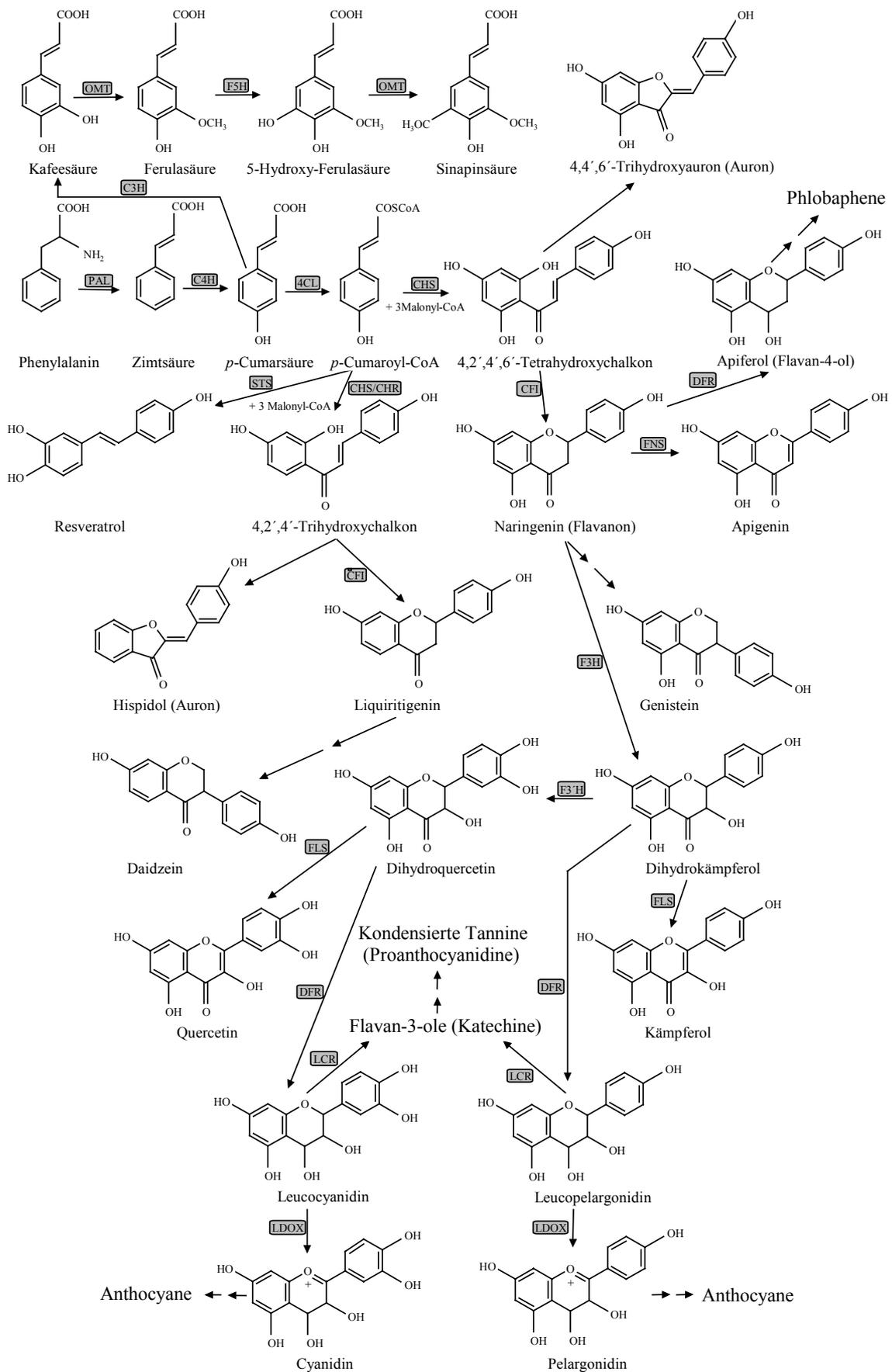


Abb. 2: Überblick über die Biosynthese der Flavonoide. Abbildungsunterschrift siehe bitte vorherige Seite.

1.2. Die Funktionen der Flavonoide

Die auffälligste Funktion der Flavonoide, besonders der Anthocyane, zusammen mit Flavonen und Flavonolen als Kopigmenten, ist ihr Beitrag zur Blüten- und Fruchtfärbung. Diese spielen in der Reproduktion der Pflanzen eine wichtige Rolle, die in der Anlockung von Tieren zur Bestäubung oder zur Weiterverbreitung der Samen besteht. Speziell die Flavonole sind darüber hinaus in *Zea Mays* und *Petunia hybrida* für eine normale Pollenkeimung notwendig (Taylor und Jorgensen, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Ylstra *et al.*, 1994), nicht jedoch in *Arabidopsis thaliana* (Burbulis *et al.*, 1996). Die herbstliche Färbung des Laubes ist ebenfalls im wesentlichen auf Anthocyanin-Pigmente zurückzuführen, deren Aufgabe dort möglicherweise im Schutz der Zellen vor photo-oxidativem Stress besteht, was die Effektivität der Nährstoff-Rückgewinnung durch die Pflanze während der Seneszenz verbessert (Feild, *et al.*, 2001). Flavonoide können auch als Reaktion auf abiotischen oder biotischen Stress produziert werden (Dixon und Paiva, 1995; Chalker-Scott, 1999). DNA-schädigendes UV-Licht induziert die Akkumulation UV-absorbierender Flavonoide vorwiegend in den dermalen, UV-exponierten Pflanzenteilen (Li *et al.*, 1993; Stapleton und Walbot, 1994). Ferner sind die *Arabidopsis-thaliana-transparent-testa*-Mutanten *tt4* und *tt5* (mit Läsionen der Gene *CHS* bzw. *CFI*) hypersensitiv gegenüber der Bestrahlung mit UV-Licht. Andere phenolische Substanzen, wie etwa Sinapatester, sind für einen wirksamen UV-Schutz der Pflanze jedoch mindestens genauso bedeutsam wie Flavonoide (Li *et al.*, 1993; Sheahan, 1996). Es wird derzeit diskutiert, und die Hinweise darauf verdichten sich, dass Flavonoide auch durch ihre antioxidativen Eigenschaften, auf bisher allerdings ungeklärte Weise, an der Antwort auf UV-Stress mitwirken (Ryan *et al.*, 2001, 2002; Smith und Markham, 1998; Smith *et al.*, 2000). Verschiedene auf Pathogeneinwirkung hin induzierte Klassen von Flavonoiden wirken antimikrobiell, sind also Phytoalexine. Dazu gehören u.a. Isoflavonoide, Stilbene, Aurone, 3-desoxy-Anthocyanidine und Flavonole (Bailey und Mansfield, 1982; Dixon *et al.*, 1995). Die Konzentrationen dieser Verbindungen erhöhen sich an der Infektionsstelle rasch auf Werte, die in *In-vitro*-Experimenten toxisch für Pathogene sind. Auch als Signalmoleküle in Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen treten Flavonoide in Erscheinung, z.B. bei der Symbiose stickstofffixierender Bakterien (*Rhizobiaceae*) mit Leguminosen (Long, 1989) oder in der arbuskulären Mykorrhiza, z.B. bei der Kolonisation der Wurzel von *Medicago truncatula* mit dem obligat symbiotischen Pilz *Glomus versiforme* (Harrison und Dixon, 1994). Eine weitere Funktion der Flavonoide scheint in der Regulation des endogenen, polaren Transportes des Pflanzenhormons Auxin zu bestehen. Flavonoide ähneln strukturell dem synthetischen Auxin-

Transport-Inhibitor Naphthylphthalsäure (NPA, engl. naphthylphthylamic acid). NPA und insbesondere das Flavon Apigenin sowie das Flavonol Quercetin können *in vitro* zueinander um die Hemmung des Auxin-Transports in Konkurrenz treten (Jacobs und Rubery, 1988). Weitere Anhaltspunkte für Flavonoide als negative Regulatoren des Auxin-Transports kommen aus der Analyse von *Arabidopsis tt4*-Mutanten. *tt4*-Pflanzen, wegen des defekten *CHS*-Gens nicht in der Lage Flavonoide zu synthetisieren, zeigen einen gesteigerten Auxin-Transport. Dieser Effekt kann durch die Gabe von Naringenin, dem fehlenden Intermediat der Flavonoidbiosynthese in der Mutante, komplementiert werden (Brown *et al.*, 2001). Schließlich besitzen Flavonoide auch das Potential als pharmakologisch wirksame Substanzen in der Medizin zur Anwendung zu gelangen (zusammengefasst in Harborne und Williams, 2000). So ist nachgewiesen, dass Flavonoide aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften eine Schutzfunktion gegen cytotoxische Radikale besitzen, Koronarerkrankungen vorbeugen können und entzündungshemmend wirken. Cytotoxische Wirkungen gegen Tumoren machen einige Flavonoide zu potentiellen Wirkstoffen gegen Krebs.

Die Manipulation des Flavonidgehalts von Pflanzen kann also u.a. zur Erzeugung medizinisch bedeutender Substanzen, zur Erhöhung der Resistenz gegenüber Pathogenen oder ultravioletter Strahlung genutzt werden. Die hierfür notwendige simultane Beeinflussung möglichst vieler Schritte der Flavonoidbiosynthese könnte etwa durch die Überexpression eines allgemeinen Aktivators dieses Stoffwechselweges erreicht werden. Die Identifikation solcher Faktoren bildet die Grundlage für eine effektive und damit auch ökonomische Produktion von Flavonoiden, wie auch anderen pflanzlichen Wirkstoffen. Das umfassende Verständnis pflanzlicher Biosynthesewege sowie deren Regulation bildet somit die Voraussetzung für alle bio- bzw. gentechnischen Ansätze zur gezielten Veränderung des pflanzlichen Stoffwechsels.

1.3. Die Expression eukaryotischer Gene

Die Regulation der eukaryotischen Genexpression erfolgt häufig auf der Ebene der Transkription, speziell die Initiation der Transkription ist dabei von entscheidender Bedeutung. Für die Regulation sind neben kurzen DNA-Sequenzen, den *cis*-aktiven Elementen, auch an diese Sequenzen spezifisch bindende regulatorische Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, verantwortlich. Die im Promotorbereich eines Gens gebundenen Transkriptionsfaktoren treten sowohl miteinander als auch mit dem basalen Transkriptionsapparat in Wechselwirkung. Diese Interaktion erhöht die Stabilität des Präinitiationskomplexes, bestehend aus RNA-Polymerase II und sogenannten „allgemeinen Transkriptionsfaktoren“ (TBP, TATA-Box-bindendes Protein; TAFs, TBP-assoziierte Faktoren) bzw. katalysiert dessen Zusammenbau. Die Folge ist eine gesteigerte Transkriptionsrate und daraus resultierend eine erhöhte Proteinsynthese.

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren sind im allgemeinen modular strukturiert, d.h. dass Funktionen wie die Bindung der DNA oder die Aktivierung der Transkription in getrennten Domänen des Proteins lokalisiert sind (Frankel und Kim, 1991).

Anhand gemeinsamer Struktur- und/oder Sequenzmerkmale werden Transkriptionsfaktoren in Familien unterteilt (Pabo und Sauer, 1992; Nelson 1995). Beispiele hierfür sind etwa die, sowohl in Tieren als auch Pflanzen vorkommenden, bHLH-, bZIP- oder MYB-Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren dieser drei Klassen sind u.a. in der Pflanze an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt.

1.4. Pflanzliche MYB-Transkriptionsfaktoren und deren Funktion in der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels

Die Mitglieder der MYB-Familie von Transkriptionsfaktoren zeigen Sequenzähnlichkeiten zum Produkt des retroviralen Onkogens *v-MYB* des „avian myeloblastosis virus“ (AMV) und dessen zellulärem Gegenstück, dem Protoonkogen, *c-MYB*. MYB-Proteine wurden in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen von Pilzen (Tice-Baldwin, 1989; Stober-Grässer, 1992; Ohi *et al.*, 1994) über Pflanzen (zusammengefasst in Martin und Paz-Ares, 1997; Jin und Martin, 1999; Stracke *et al.*, 2001) bis hin zu Säugetieren (Gonda *et al.*, 1998; Slamon *et al.*, 1986; Nomura *et al.*, 1988) identifiziert. Sie stellen eine Klasse von Transkriptionsregulatoren mit stark konservierter DNA-Bindungsdomäne, der sogenannten MYB-Domäne, dar (zusammengefasst in Thompson *et al.*, 1995; Martin und Paz-Ares, 1997; Jin und Martin, 1999; Stracke *et al.*, 2001).

Tierische MYB-Proteine besitzen eine aus drei, jeweils 51 bis 53 Aminosäuren langen, unvollkommenen Sequenzwiederholungen (R1, R2 und R3) bestehende DNA-bindende Domäne (Frampton, 1991). Diese weist im regelmäßigen Abstand von 18 bis 19 Aminosäuren konservierte Tryptophanreste auf, die den hydrophoben Kern der MYB-Bindungsdomäne bilden (Ogata, 1992 und 1994). Jede der drei Sequenzwiederholungen kodiert für drei α -Helices, von denen die zweite und die dritte eine Helix-Turn-Helix (HTH)-Struktur, ähnlich zu dem im λ -Repressor und Homeodomänen-Proteinen gefundenen Motiv, ausbilden (Frampton *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1992 und 1994). Die Wiederholungen R2 und R3 von *c-MYB* sind für eine sequenzspezifische Bindung der DNA ausreichend; R1 hat auf die Bindungsspezifität keinen Einfluss (Gabrielsen *et al.*, 1991; Saikumar *et al.*, 1990; Tanikawa, 1993). Die NMR-Struktur der *cMYB*-R2/R3-Domäne zeigt, dass die MYB-Wiederholungen R2 und R3 eng gepackt in der großen Furche der DNA liegen, wobei jeweils die dritte Helix jeder Wiederholung in Kontakt mit der DNA als auch mit der Erkennungshelix der anderen Wiederholung tritt, so dass die DNA-Bindung kooperativ erfolgt (Ogata, 1994). Die MYB-Proteine der Tiere binden spezifisch an sogenannte TYP I-Sequenzen: C_TAAACNG (N steht für A, C, G oder T) (Grotewold *et al.*, 1994, Howe *et al.*, 1991; Weston, 1992).

In Tieren spielen MYB-Faktoren u.a. eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen und dem programmierten Zelltod (zusammengefasst in Oh und Reddy, 1999; Ganter und Lipsick, 1999).

Anders als in Tieren, wo nur ein bis drei Mitglieder der MYB-Familie in den verschiedenen untersuchten Organismen vorhanden sind (Lipsick, 1996; Graf, 1992; Lüscher und

Eisenmann, 1990; Thompson und Ramsay, 1995), sind in Pflanzen eine große Zahl von MYB-Faktoren identifiziert worden (zusammengefasst in Martin und Paz-Ares, 1997; Romero *et al.*, 1998; Kranz *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Je nach der Anzahl der in der MYB-Domäne vorhandenen Sequenzwiederholungen (ein, zwei oder drei) lassen sich pflanzliche MYB-Proteine in drei Unterfamilien einteilen (Jin und Martin, 1999; Rosinski und Atchley, 1998).

MYB-ähnliche Proteine mit einer Sequenzwiederholung (manchmal ist diese auch nur partiell vorhanden) stellen eine divergente Gruppe dar. Diese umfasst neben Telomer-bindenden Faktoren (Yu *et al.*, 2000) auch Transkriptionsfaktoren wie z.B. MYBSt1 aus *Solanum tuberosum* (Baranowskij *et al.*, 1994). Andere, z.B. CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) und LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) sind eng mit der Funktion der circadianen Uhr assoziiert und, so wird aufgrund ihrer Fähigkeit DNA zu binden vermutet, fungieren ebenfalls als Transkriptionsregulatoren (Wang *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1998). Der Faktor CPC (CAPRICE) ist hingegen an der Steuerung des Differenzierungsprozesses epidermaler Zellen in *Arabidopsis thaliana* beteiligt (Wada *et al.*, 1997).

Die mit Abstand größte MYB-Unterfamilie stellen die MYB-Proteine mit zwei Sequenzwiederholungen dar (Paz-Ares, 1987, Marocco *et al.*, 1989; Cone *et al.*, 1993; Wissenbach *et al.*, 1995). In *A. thaliana* beispielsweise beträgt die Anzahl der bisher identifizierten R2/R3-MYB-Gene mehr als 125 (Stracke *et al.*, 2001, Stracke und Weisshaar, persönliche Mitteilung). R2/R3-MYB-Transkriptionsfaktoren binden sequenzspezifisch an Sequenzen vom Typ II: $C_{/T}AACA_{/T}A^C_{/A}C$ oder vom Typ IIC: $C_{/T}ACCA_{/T}A^C_{/A}C$. Eine Ausnahme ist der Faktor MYB3 aus *Petunia hybrida*, der neben Typ II- auch Typ I-Sequenzen erkennen kann (Grotewold *et al.*, 1994; Sablowski *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1995a; Solano *et al.*, 1997). Pflanzliche MYB-Proteine enthalten, besonders in der Nähe des C-Terminus, oft mehrere Serin- und Threonin-Reste. Diese sind potentielle Substrate für Proteinkinasen, so dass vermutet werden kann, dass die Aktivität und/oder Stabilität pflanzlicher MYB-Transkriptionsfaktoren posttranskriptional durch Phosphorylierung steuerbar ist, wie dies für c-MYB der Fall ist (Lüscher und Eisenmann, 1990; Jackson *et al.*, 1991; Bies *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte für MYB340 aus *Anthriscum majus* gezeigt werden, dass für eine effektive DNA-Bindung das Protein im dephosphorylierten Zustand vorliegen muss (Moyano *et al.*, 1996).

Zu den bekannten Funktionen der R2/R3-MYB-Faktoren gehören neben der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels, die Kontrolle der Zelldifferenzierung und -morphogenese

(Oppenheimer *et al.*, 1991; Lee und Schiefelbein, 1999; Byrne *et al.*, 2000), die Beteiligung an hormoninduzierten Signaltransduktionsprozessen (zusammengefasst in Jin und Martin, 1999), die Steuerung der Tryptophanbiosynthese (Bender und Fink, 1998) und die Mitwirkung bei der Abwehr von Phytopathogenen (Daniel *et al.*, 1999; Sugimoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001).

Das C1-Protein aus *Zea mays* (Paz-Ares, 1987) aktiviert die Transkription von an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Genen in der Aleuronschicht des Maiskorns. *ZmC1* induziert die Expression von *C2* (= *CHS*), *A1* (= *DFR*), *A2* (= *LDOX*), *Bz1* (= UDP-Glukose-Flavonol-3-O-glykosyltransferase, UGFT) und *Bz2* (= Glutathion-S-Transferase, GST). Das Protein *ZmPl* ist das funktionelle Äquivalent zu *ZmC1* und wird für die Pigmentierung bestimmter vegetativer und reproduktiver Gewebe benötigt (Cone *et al.*, 1993). *ZmC1/ZmPL* sind zur Transaktivierung auf die Anwesenheit eines bHLH-Faktors aus der R-Familie (R, Lc, Sn, B) angewiesen (Cone *et al.*, 1986; Cone *et al.*, 1993; Chandler *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1989). Diese Abhängigkeit wird durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Goff, 1992). In *Z. mays* wird die Phlobaphensynthese, ein Zweig der Flavonoidbiosynthese (Abbildung 2), durch das MYB-Homolog *ZmP* reguliert. Die roten Phlobaphene kommen in *Z. mays*, anders als Anthocyane, die in den meisten Pflanzenteilen vorkommen, hauptsächlich im Samen-Perikarp und bestimmten Blütenteilen vor. Genetische Studien ergaben, dass *ZmP* der einzige Faktor in *Z. mays* ist, der die Phlobaphensynthese reguliert (Styles und Ceska, 1977). Die Aminosäuresequenz der DNA-Bindungsdomänen von *ZmP* und *ZmC1* sind zu 80% identisch (Grotewold *et al.*, 1991a). Signifikante Übereinstimmungen im C-Terminus der beiden Proteine fehlen. *ZmP* kontrolliert die Expression von *CHS*, *CFI* und *DFR*, die für die Bildung von 3-Deoxy-Flavonoiden und Phlobaphenpigmenten benötigt werden. Die anthocyanspezifischen Gene für *LDOX*, *UGFT* und *GST* werden nicht durch *ZmP* aktiviert (Dooner *et al.*, 1991; van der Meer *et al.*, 1992). Anders als *ZmC1* ist *ZmP* zur Transaktivierung nicht von der Interaktion mit einem bHLH-Protein abhängig (Grotewold *et al.*, 1994). Dieser differenzielle Effekt könnte die unterschiedlichen Zielgenspezifitäten der beiden MYB-Faktoren erklären.

Auch aus anderen Pflanzen sind MYB-Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die an der Steuerung des Phenylpropanoidmetabolismus beteiligt sind. So führt die Überexpression von PAP1 (Production of Anthocyanin Pigment 1 = *AtMYB75*) und PAP2 (*AtMYB90*) zur verstärkten Produktion von Anthocyaninen in *A. thaliana*, aber auch in transgenen *Nicotiana*-Pflanzen (Borevitz *et al.*, 2000). Die MYB75-Überexpression, so konnte gezeigt werden, resultiert in einer erhöhten Expression der Gene *PAL*, *CHS*, *DFR* und *GST* (Glutathione-S-

Transferase). Interessanterweise ist die MYB75-Wirkung von der Anwesenheit des WD40-Proteins TTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1) abhängig, welches u.a. auch an der Regulation der Trichombildung in *A. thaliana* beteiligt ist (Walker *et al.*, 1999). Der samenspezifische MYB-Faktor TT2 (TRANSPARENT TESTA 2 = *AtMYB123*) spielt bei der transkriptionellen Kontrolle der Proanthocyanidinsynthese eine fundamentale Rolle (Nesi *et al.*, 2001). Wie *ZmC1*, so ist auch TT2 auf die Interaktion mit einem bHLH-Faktor, in diesem Fall dem TT8-Protein (= *AtbHLH42*), zur Aktivierung seiner Zielgene *BAN* (BANYULS; kodiert vermutlich für das Enzym Leucoanthocyanidin-Reduktase) und *TT12* (TRANSPARENT TESTA 12; kodiert für einen Transporter des MATE [Multidrug And Toxic Compound Extrusion]-Typs) angewiesen. Kotransfektionsexperimente in Protoplasten der *A. thaliana*-Zellkulturlinie At7 weisen auf den Transkriptionsfaktor MYB12, der Gegenstand dieser Arbeit ist, als möglichen flavonolspezifischen Regulator der Flavonoidbiosynthese hin (Mehrtens, 1999). Das Protein MYB12 ist in der Lage die Expression von *CHS*-, *CFI*-, *F3H*- und *FLS*-Reporterkonstrukten (Promotor-GUS-Fusionen) zu aktivieren. Ein *DFR*-Promotorkonstrukt zeigt hingegen keine gesteigerte Reporteraktivität. MYB12 ist, zumindest im At7-Zellkultursystem, für seine Funktion als Transaktivator, anders als *ZmC1* oder TT2 und genauso wie *ZmP*, nicht auf einen bHLH-Partner angewiesen. Interessanter Weise zeigt der *Z. mays*-Faktor *ZmP* in transienten Genexpressionsstudien das gleiche Aktivierungsmuster der Reporterexpression wie MYB12. Die MYB-Domäne beider Proteine weist eine 88%ige Identität auf, den größten Wert im Vergleich zu allen anderen MYB-Faktoren aus *A. thaliana*. Im C-Terminus hingegen ist die Primärstruktur der beiden Faktoren wesentlich weniger stark konserviert, die Sequenzidentität liegt hier bei etwa 25%. Wahrscheinlich spiegeln die Transfektionsdaten die Bindung beider Transkriptionsfaktoren an die selben *cis*-Elemente in den Promotoren der aktivierten Gene wider. Die beiden, ebenfalls zueinander sehr ähnlichen, MYB-Proteine *AmMYB305* und *AmMYB340* aus *Anthirrhinum majus* aktivieren die Expression der Gene *PAL*, *CFI* und sehr schwach *F3H*. Die Promotoren von *CHS*, *DFR* und *AS* werden zwar durch *AmMYB305* und *AmMYB340* *in vitro* gebunden, jedoch nicht aktiviert (Sablowski *et al.*, 1994; Moyano *et al.*, 1996). Dies zeigt, dass die Bindung eines Transkriptionsfaktors im Promotorbereich eines Gens eine notwendige, nicht aber zwingend hinreichende, Bedingung für dessen Aktivierung ist. *AmMYB305* und *AmMYB340* fördern die Expression ihrer Zielgene, wie *ZmP* und MYB12, ohne das Mitwirken eines bHLH-Faktors. Das Aktivierungsmuster der beiden Proteine lässt vermuten, dass auch sie Regulatoren der Flavonolsynthese sind. Dies setzt jedoch voraus, dass das Schlüsselenzym *CHS* für diesen Biosyntheseweg unter *AmMYB305/AmMYB340*-unabhängiger Kontrolle

steht. Möglicherweise reguliert ein anderes MYB-Protein diesen Schritt der Flavonolbiosynthese, so wie es für *PhMYB3* aus *P. hybrida* vorgeschlagen wird (Solano *et al.*, 1995a). Weitere Beispiele für MYB-Transkriptionsfaktoren, die speziell einzelne Zweige des Phenylpropanoidstoffwechsels regulieren, sind *AmMYB308* und *AmMYB330*. Sie kontrollieren die Produktion von Phenolestern und Lignin in transgenen Tabakpflanzen (Tamagone *et al.* 1998). Beide Faktoren sind schwache Aktivatoren/Repressoren, die mit stärkeren MYB-Aktivatoren in Konkurrenz treten, ähnlich wie es für B-MYB der Tiere gezeigt worden ist. (Foos, 1992; Watson, 1993). Das Genprodukt des *AmMYB308*-Orthologs aus *A. thaliana*, *AtMYB4*, wirkt als negativer Regulator des Hydroxyzimtsäure-Metabolismus (Jin *et al.*, 2000) durch die Repression des *C4H*-Gens. Die Einwirkung von UV-Licht verursacht eine Reduzierung der *AtMYB4*-Expression und somit die De-Repression von *C4H*, was zu einer erhöhten Produktion von Sinapinsäureestern führt, denen eine Schutzfunktion gegenüber schädigenden UV-Strahlen zugeschrieben wird (Landry *et al.*, 1995; Sheahan, 1996; Booij-James *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor *AtMYB4* wirkt sowohl als direkter als auch, durch kompetitive Verdrängung bislang nicht identifizierter MYB-Aktivatoren, indirekter Repressor der *C4H*-Expression.

1.5. Die Licht-regulatorische Einheit des *CHS*-Minimalpromotors aus *A. thaliana*

Durch Deletionsanalysen konnte ein 164bp umfassender operationaler Minimalpromotor des *CHS*-Gens definiert werden (Hartmann *et al.*, 1998). Transiente Expressionsstudien in *A. thaliana*-Protoplasten belegen, dass dieses Promotorfragment die lichtabhängige Aktivierung des β -Glukuronidase-Reportergens (GUS) vermittelt. Im *CHS*-Minimalpromotor befinden sich zumindest drei unterschiedliche *cis*-aktive Elemente (Abbildung 3). Die funktionelle Relevanz des ACE (ACGT containing element) und des MRE (MYB recognition element) für die Lichtinduktion konnte durch Transfektionsexperimente mit unterschiedlich mutierten Varianten des *CHS*-Minimalpromotors nachgewiesen werden (Hartmann *et al.*, 1998). Blockmutationen im ACE bzw. MRE führen zur Reduktion der gemessenen GUS'-Aktivitäten auf ca. 3% der Wildtypaktivität. Noch drastischer fällt der Effekt bei Doppelmutationen in beiden Elementen aus, hier sinkt die Reporteraktivität auf 0,1% im Vergleich zum Wildtyp. Eine verfeinerte Analyse des MRE^{*AtCHS*} durch Verwendung einer in diesem Promotorbereich liegenden Punktmutationsserie zeigt, dass jede Nukleotidsubstitution in der MRE-Kernsequenz teilweise äußerst starke, negative Effekte auf die lichtinduzierte Expression des β -Glukuronidase-Reportergens in transfizierten Protoplasten hat (Sagasser, unveröffentlicht). Diese Daten machen deutlich, dass für eine effektive lichtabhängige Induktion der *CHS*-Expression beide Elemente benötigt werden. Gemeinsam bilden das ACE^{*AtCHS*} und das MRE^{*AtCHS*} die LRU (Light responsive unit), also die Promotorregion, die Lichtwirkungen auf die Genexpression vermittelt. Funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten der LRU^{*AtCHS*} und der bereits charakterisierten LRU^{*PcCHS*} aus *Petroselinum crispum* sprechen dafür, dass beide Elemente mit denselben Transkriptionsfaktoren interagieren. Dieses sind bZIP-Faktoren, die das ACE (Armstrong *et al.*, 1992 ; Feldbrügge *et al.*, 1994) und MYB-Proteine, die das MRE erkennen (Feldbrügge *et al.*, 1997). Tatsächlich binden bZIP-Faktoren aus *A. thaliana* an das ACE^{*AtCHS*} (Hartmann und Weisshaar, unveröffentlicht) und MYB44 bindet sequenzspezifisch an das MRE^{*AtCHS*} (Hartmann, 1998). Das dritte im *CHS*-Minimalpromotor gefundene *cis*-Element ist das zwischen ACE und MRE lokalisierte RRE (R recognition element), das eine mögliche Bindungsstelle für bHLH-Transkriptionsfaktoren darstellt. Transfektionsexperimente zum Einfluss einer RRE-Blockmutation zeigen, dass das RRE nicht an der lichtregulierten Expression des *CHS*-Gens beteiligt ist; die ermittelten GUS'-Aktivitäten stimmen mit denen für das Wildtyp-Reporterkonstrukt erhaltenen überein (Hartmann, unveröffentlicht). Kotransfektionsanalysen mit den heterologen

Transkriptionsfaktoren *ZmC1* und *ZmSn* weisen nach, dass auch das *CHS*-Gen aus *A. thaliana*, wie das aus *Z. mays*, durch das Zusammenwirken eines MYB- mit einem bHLH-Faktor aktiviert wird. Dabei resultiert eine Blockmutation im MRE in einer ~11 fachen und eine Blockmutation im RRE in einer ~4,5 fachen Reduktion der gemessenen GUS'-Aktivitäten. Die Ausschaltung beider Elemente schließlich führt zu GUS'-Werten, die nur noch der Hintergrundaktivität entsprechen. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl ein intaktes MRE als auch RRE für die Interaktion mit dem *ZmC1/ZmSn*-Komplex zur Transaktivierung der *CHS*-Expression benötigt werden, wobei der Einfluss des MRE größer als der des RRE ist (Hartmann, unveröffentlicht). LRUs finden sich auch in den Promotorbereichen der anderen Flavonoidstrukturgene *CFI*, *F3H* und *FLS* (Hartmann, 1998; Sagasser, unveröffentlicht). Diese stimmen in den Kernsequenzen von ACE und MRE mit der im *CHS*-Promotor gefundenen LRU überein. Die LRUs der einzelnen Promotoren unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des Abstands der beiden *cis*-Elemente sowie deren Orientierung voneinander. ACE und MRE der LRU^{AtFLS} und der LRU^{AtF3H} liegen in reverser Orientierung im Vergleich zu den LRUs des *CHS*- und *CFI*-Promotors vor. Dabei ist das MRE des *FLS*-Promotors stromaufwärts des ACE lokalisiert. Im Promotor des *F3H*-Gens ist die relative Lage der beiden *cis*-aktiven Elemente zueinander nicht geändert, das MRE befindet sich stromabwärts vom ACE. Der Funktionalitätsnachweis für die verschiedenen LRUs wurde, wie für den Fall der LRU^{AtCHS} bereits dargestellt, mittels Transfektionsanalysen von mutierten Promotorversionen durchgeführt. Während sich in allen Promotoren ACE und MRE identifizieren lassen, ist der Fall für das die bHLH-Konsensussequenz umfassende RRE weniger eindeutig. Im *F3H*-Minimalpromotor findet sich, zwischen MRE und ACE liegend, eine Sequenz, die dem bHLH-Konsensus CANNTG entspricht (RRS = R recognition sequence, potentiell RRE für das die funktionelle Charakterisierung fehlt). Auch diese liegt invertiert, wie schon das ACE und MRE, vor. Die einzige bHLH-Erkennungssequenz im *CFI*-Minimalpromotor überschneidet sich mit der ACE-Kernsequenz (CACGTG □ CANNTG). Erste, vorläufige Ergebnisse von Transfektionsexperimenten zur Funktion dieser potentiellen bHLH-Bindungsstelle bestätigen die Hypothese, dass es sich um ein funktionelles RRE handelt. Eine mutierte Version des ACE^{AtCFI}, bei der die bHLH-Konsensussequenz zerstört, die des ACE jedoch intakt geblieben ist, ist nicht länger durch die Kombination der Faktoren C1 und Sn aktivierbar. Umgekehrt, ersetzt man das ACE^{AtCHS} in einer *CHS*-Promotorvariante mit einer Blockmutation im RRE durch das ACE^{AtCFI}, so wird die Aktivierbarkeit des Promotors durch *ZmC1/ZmSn* wiederhergestellt (Mehrtens, unveröffentlicht). Vorstellbar wäre also, dass das ACE^{AtCFI} eine duale Funktion ausübt: bei der lichtregulierten

Genexpression wirkt es durch die Bindung von bZIP-Proteinen als ACE, bei der Transaktivierung durch MYB-/bHLH-Proteine als RRE. Das den *FLS*-Minimalpromotor darstellende DNA-Fragment schließlich, beinhaltet keine dem CANNTG-Konsensus exakt entsprechende Sequenz, jedoch treten einige diesem Konsensus sehr ähnliche Sequenzen auf, die möglicherweise als RRE-Analog funktionieren könnten. Untersuchungen dazu stehen noch aus. Tatsache ist aber, dass der *FLS*-Minimalpromotor ebenso wie durch Licht auch durch *ZmC1/ZmSn* zu aktivieren ist (Hartmann, unveröffentlicht).

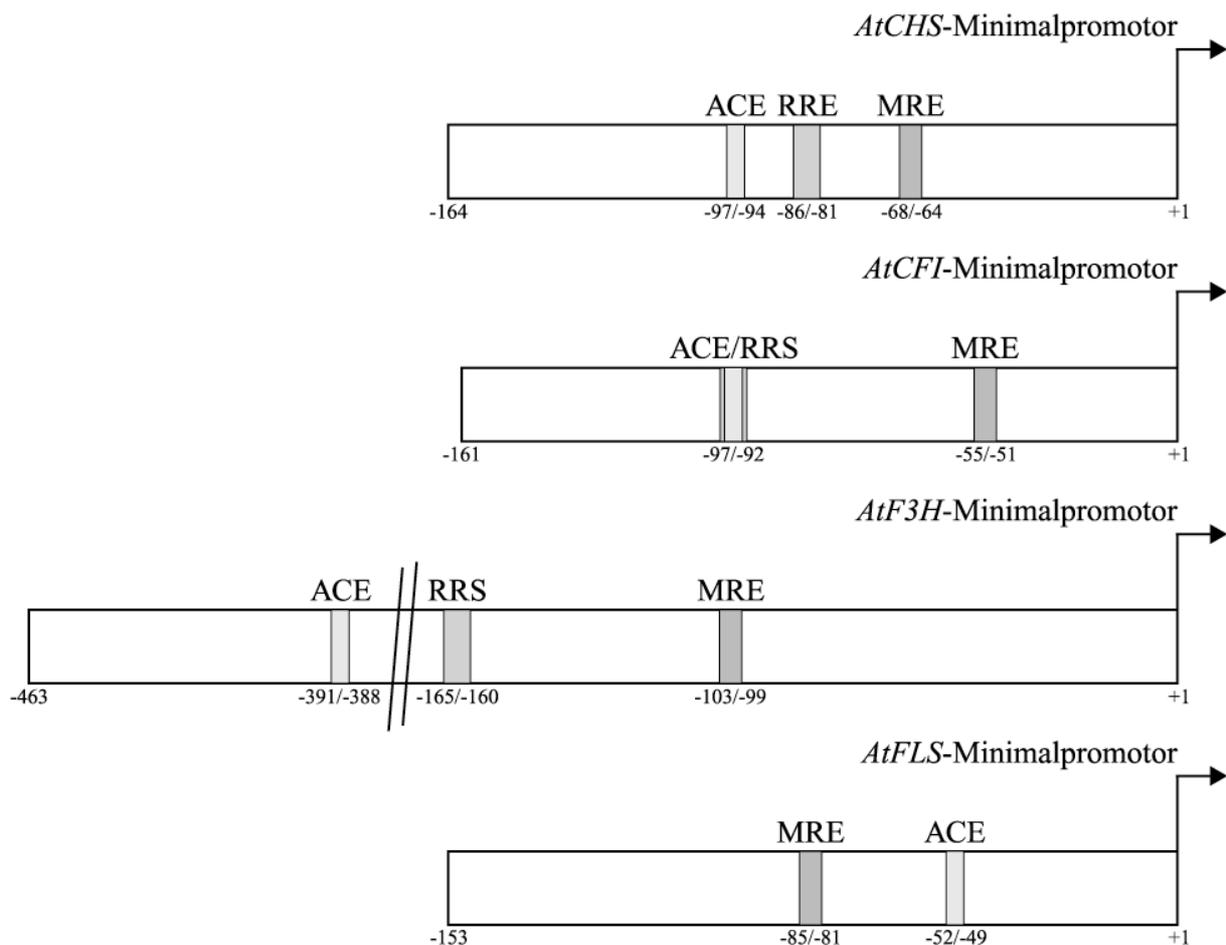


Abb. 3: Schematische Darstellung der vier bislang charakterisierten Minimalpromotoren der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene. Angegeben sind die Nukleotidpositionen der Kernsequenzen der gekennzeichneten *cis*-Elemente bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt, sowie die Gesamtlänge der Minimalpromotoren. Im Falle des *CFI*-Minimalpromotors ist das ACE Bestandteil einer RRS. Der *F3H*-Minimalpromotor ist im gewählten Maßstab verkürzt dargestellt. Abkürzungen: ACE (ACGT containing element), MRE (MYB recognition element), RRE (R recognition element), RRS (R recognition sequence)

1.6. Die Grundlagen des 5'-Exonuklease Assays in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Änderungen in der Genexpression spiegeln viele zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Adaption an sich ändernde Umwelteinflüsse wider. Die Fähigkeit das Transkriptionsniveau spezifischer Gene zu quantifizieren spielt folglich eine zentrale Rolle in der Erforschung von Genfunktionen. Der Ansatz der quantitativen Echtzeit-RT-PCR (Holland *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1993) ist die spezifische Amplifikation einer cDNA-Matrize und die simultane Quantifizierung des gebildeten Amplifikats in ein und demselben Reaktionsgefäß. Aus dem Vergleich der Amplifikationskinetik eines Zielgens und eines zur Standardisierung verwendeten, unter den gewählten Versuchsbedingungen invariant expremierten, Referenzgens kann dann mittels mathematischer Methoden auf die zu Beginn der Reaktion vorgelegene Matrizenmenge zurückgeschlossen werden. Diese ist ein Maß für das Expressionsniveau des betrachteten Gens in der untersuchten biologischen Probe, da die Menge der in der PCR vorangehenden Reversen Transkription gebildeten cDNA-Matrize und die in der Probe vorhandene mRNA-Menge direkt korrelieren.

1.6.1. Das Prinzip des 5'-Exonuklease Assays

Der 5'-Exonuklease Assay zur Detektion von PCR-Produkten bedient sich einer fluorogenen Oligonukleotid-Sonde („TaqMan™-Sonde“) zur Hybridisierung an die gewünschte Zielsequenz (Holland *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993). Der 5'-Terminus der Sonde ist mit einem Fluoreszein-Derivat (Reporter-Farbstoff) markiert, wohingegen das 3'-Ende der Sonde kovalent mit einem Rhodamin-Derivat („Quencher“, engl. soviel wie Dämpfer) verbunden ist (siehe Abbildung 4). Durch das Vorhandensein einer Phosphatgruppe anstelle einer Hydroxylgruppe am 3'-Terminus kann die Sonde in der PCR-Reaktion nicht als Starter-Oligonukleotid für die Polymerisation dienen. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt (Livak *et al.*, 1995; Förster, 1948). Während der PCR hybridisiert die Sonde zusammen mit dem 5'- und dem 3'-Primer zunächst an die DNA-Matrize. In der Extensionsphase wird die Sonde durch die Taq-Polymerase verdrängt und dabei durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms hydrolysiert. Die Sonden-Hydrolyse ist auf mit der Matrize hybridisierte Sonden beschränkt und erfolgt nicht mit freien, in Lösung befindlichen, Sondenmolekülen. Die Folge der Hydrolyse ist die Aufhebung der räumlichen Nähe von Reporter- und Quencher-Fluorophor und damit die

Unterbrechung des FET zwischen beiden Gruppen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt nimmt also die Reporter-Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus zu. Das so generierte Fluoreszenz-Signal ist strikt sequenzspezifisch, da fehlgepaarte Sonden wesentlich schneller von der Taq-Polymerase verdrängt als hydrolysiert werden.

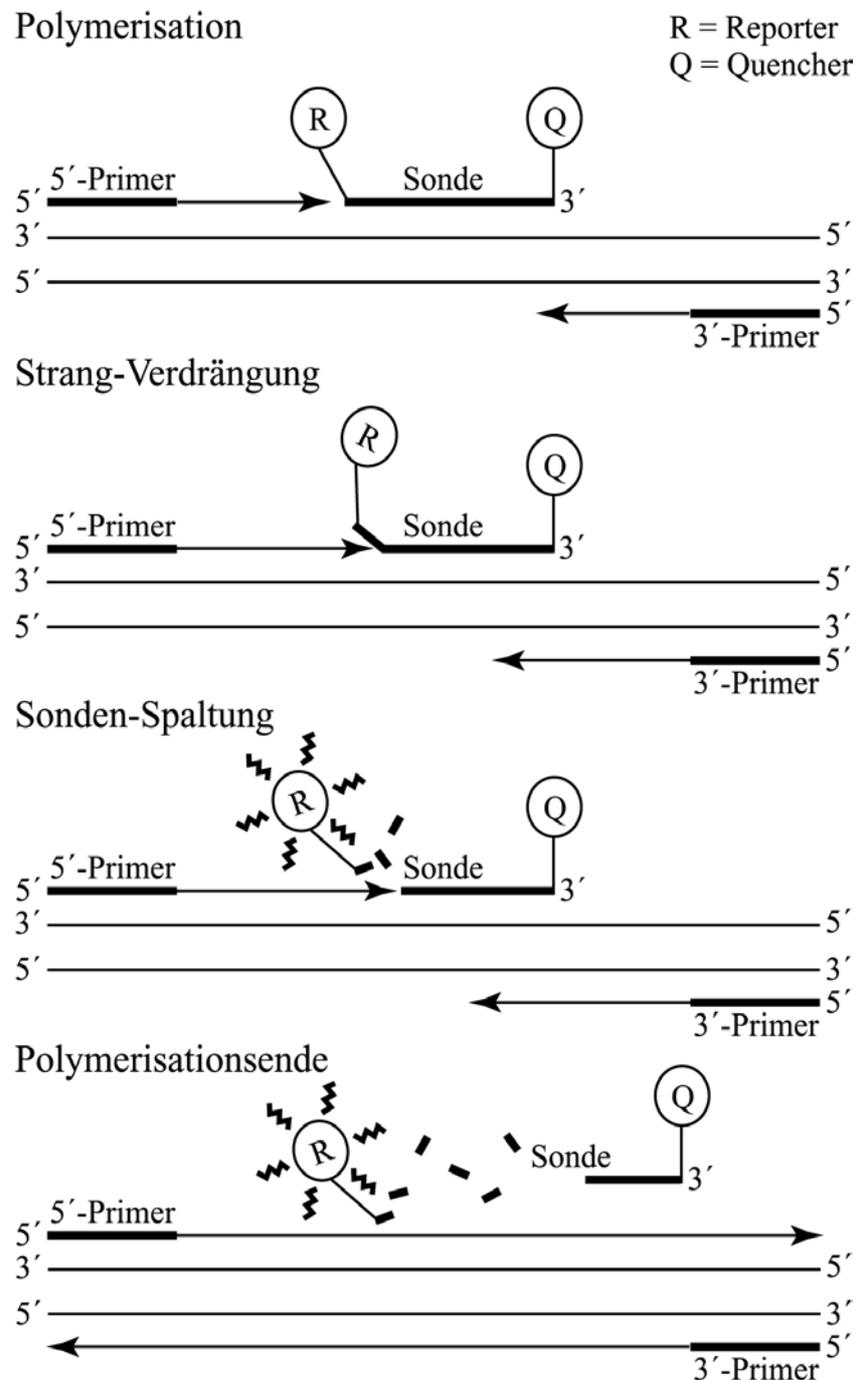


Abb. 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des 5'-Exonuklease Assays. Ein der Amplifikat-Menge direkt proportionales Fluoreszenz-Signal wird durch Spaltung einer fluorogenen Oligonukleotid-Sonde im Verlauf der PCR-Reaktion erzeugt.

1.6.2. Die Instrumentierung der Echtzeit-PCR: Das ABI PRISM[®] 7700 Sequence

Detection System

Die Komponenten des verwendeten Echtzeit-PCR-Systems, des ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Systems der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland), sind in Abbildung 5 in einer schematischen Übersicht gezeigt. Im Verlaufe der PCR-Reaktion leitet der Multiplexer einen Argon-Ionen-Laserstrahl durch optische Glasfaserleiter, die über jeder der 96 Vertiefungen einer PCR-Platte enden. Das Laser-Licht dringt durch die die PCR-Platte versiegelnde Klebefolie und für eine Zeit von in der Regel 10 Millisekunden regt es die Fluoreszenz der vorhandenen fluorogenen Farbstoffe an. Die Fluoreszenz-Emission im Wellenlängenbereich zwischen 500 nm und 600 nm aus jeder Vertiefung wird durch die optischen Glasfasern gebündelt und über ein System von Linsen, Filtern und einem dichroitischen Spiegel in einen Spektrographen weitergeleitet. Der Spektrograph zerlegt das einfallende Licht entsprechend der eingestrahelten Wellenlängen. Die so erzeugten Muster werden von einer CCD (engl. charge-coupled device)-Kamera aufgenommen und die gesammelten Daten nachfolgend von der Systemsoftware analysiert.

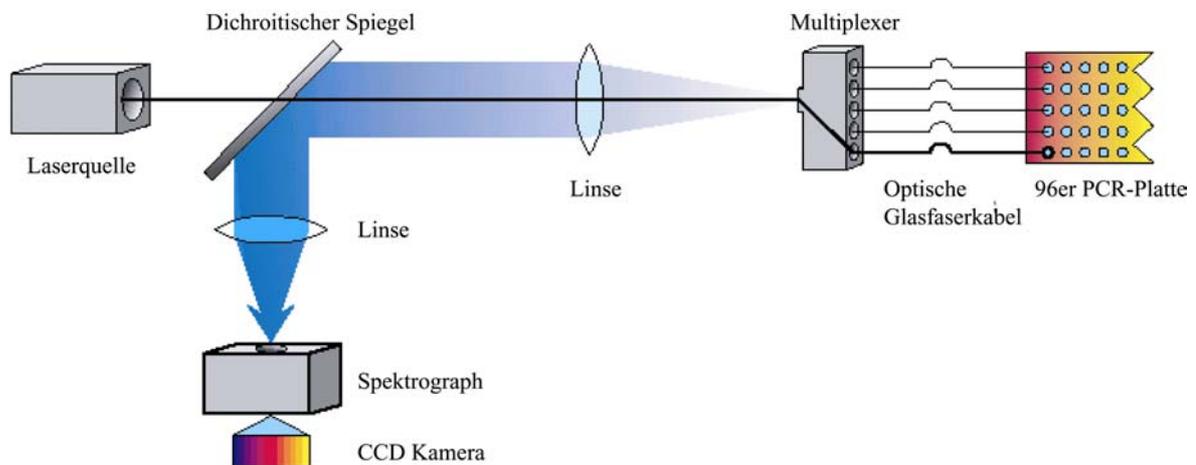


Abb. 5: Schematische Ansicht der Komponenten des ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Systems (verändert nach Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Der gezeigte Aufbau ermöglicht die qualitative, quantitative, simultane und in Echtzeit ablaufende Erfassung der Fluoreszenzen von maximal 96 Proben.

1.6.3. Das Konzept der relativen Quantifizierung der Genexpression

Abbildung 6 zeigt den typischen Verlauf einer PCR-Amplifikation.

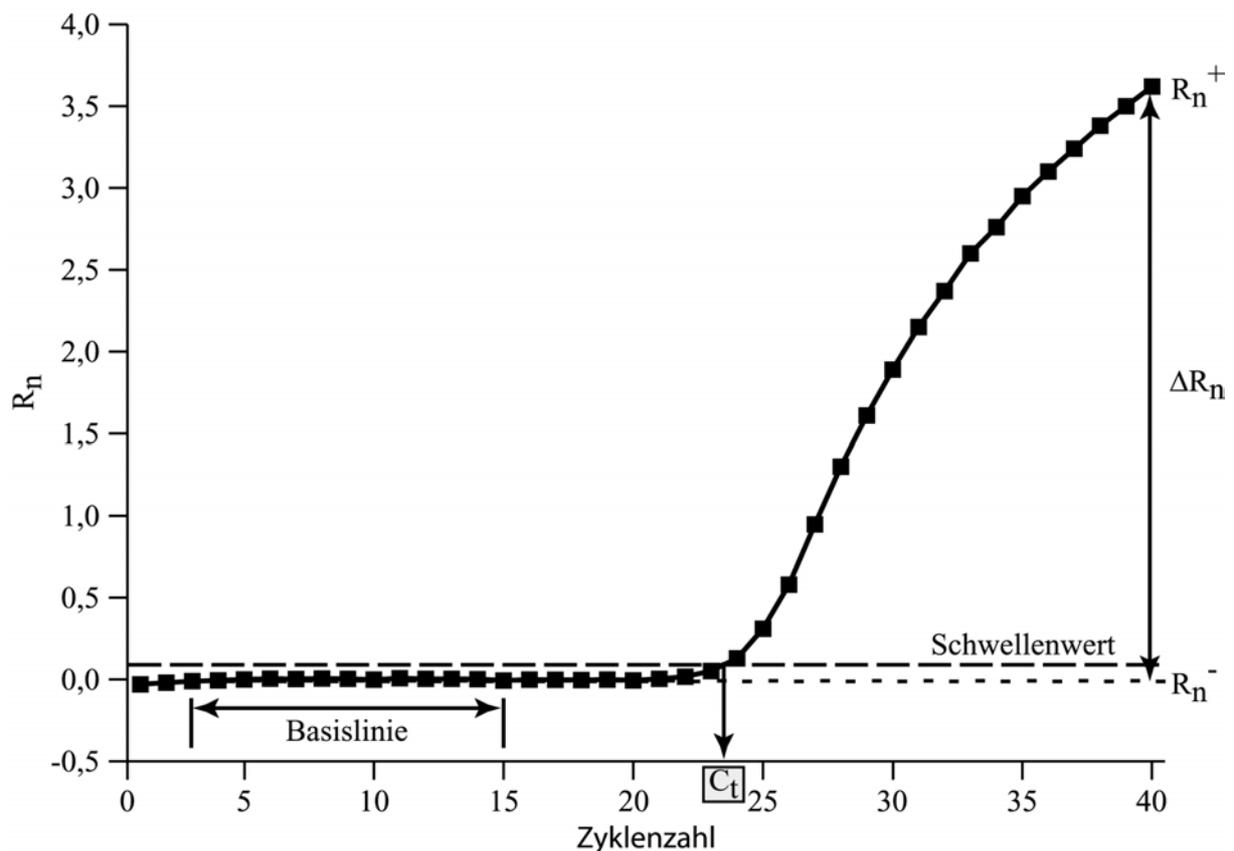


Abb. 6: Darstellung eines typischen Amplifikationsverlaufs. Aufgetragen ist das normalisierte Fluoreszenzsignal des Reporterfluorophors (R_n) gegen die Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen. Die gebrochene Zykluszahl, bei welcher der Amplifikationsgraph den Schwellenwert schneidet, ist der sogenannte C_t -Wert.

Die vom System gemessenen Reporterfluoreszenzen werden mittels des stets in den PCR-Reaktionsansätzen vorhandenen passiven Referenzfarbstoffs ROX (5-Carboxy-X-Rhodamin) normalisiert. Diese wird passive Referenz genannt, da sie nicht an der eigentlichen 5'-Exonuklease Reaktion partizipiert. Eine Normalisierung der Reporter-Signale ist notwendig, um unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Volumenschwankungen in den PCR-Ansätzen (Pipettierfehler) zu korrigieren. Die Normalisierung wird erreicht, indem die Emissionsintensität des Reporters durch die Emissionsintensität der passiven Referenz dividiert wird:

$$(1) R_n = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz}}$$

mit:

R_n : normalisiertes Reportersignal

Weitere Variablen, die den Amplifikationsverlauf beschreiben sind der R_n^+ - und der R_n^- -Wert, die als normalisierte Reporterfluoreszenz einer PCR-Probe mit Matrizen-DNA bzw. ohne solche definiert sind. Der R_n^- -Wert kann alternativ auch aus dem Fluoreszenzniveau zu frühen Zeitpunkten des Amplifikationsvorgangs, bei denen noch keine messbare Zunahme der Fluoreszenz auftritt (Basislinie), bestimmt werden. Die Größe, welche letztendlich den wahren Betrag, des auf die Hydrolyse von fluorogenen Oligonukleotid-Sonden während der PCR zurückzuführenden Reportersignals wiedergibt, ist ΔR_n , welche sich aus der Differenz von R_n^+ - und R_n^- - Wert ergibt:

$$(2) \Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

mit:

ΔR_n : normalisiertes und Nullwert-korrigiertes Reporter-Signal

R_n^+ : normalisiertes Reporter-Signal bei Anwesenheit von Matrizen-DNA

R_n^- : normalisiertes Reporter-Signal ohne die Anwesenheit von Matrizen-DNA

Mit anderen Worten, die Variable ΔR_n ist das Maß für die Amplifikation der Matrizen-DNA in einer gegebenen PCR-Reaktion. Der sogenannte C_t (engl. *threshold cycle*) ist der PCR-Zyklus, bei dem erstmalig eine statistisch signifikante Zunahme von ΔR_n detektiert werden kann (Gibson *et al.*, 1996). Der Schwellenwert zur Definition einer solchen wird festgelegt durch die Standardabweichung des Mittelwertes von R_n während der frühen Phase der PCR (Basislinie, siehe Abbildung 5) multipliziert mit einem justierbaren Faktor (der Standardmultiplikator ist 10). Je höher die Anzahl von Matrizen-Molekülen zu Beginn der PCR, desto eher erfolgt ein Überschreiten des Schwellenwertes, desto niedriger ist also der resultierende C_t -Wert der Probe. Da der C_t stets in der exponentiellen Phase der Amplifikation auftritt, wird die Matrizen-Quantifizierung über die Bestimmung des C_t -Wertes nicht durch die Limitierung von Reaktionskomponenten wie in der Plateau-Phase der Amplifikationsreaktion beeinflusst. Dies führt zur systematischen Unterschätzung insbesondere von größeren Matrizen-Mengen und macht so jede Quantifizierung am Endpunkt einer PCR zwangsläufig unzuverlässig (Raeymaekers, 1995).

Die Anwendung der quantitativen Echtzeit-RT-PCR für vergleichende Expressionsstudien macht es erforderlich, neben der Expression der zu untersuchenden Zielgene auch immer die (mindestens) eines, unter den gewählten Versuchsbedingungen invariant expremierten, Haushaltsgens zu analysieren. Die Expression der Zielgene wird dann gegen dieses normalisiert, um fluktuierende Parameter wie die eingesetzte Menge an cDNA/RNA, Effizienz der cDNA-Synthese oder unterschiedlich starke Kontamination mit PCR-Inhibitoren

zu korrigieren (Karge *et al.*, 1998). Haushaltsgene dienen also als endogene, aktive Referenzen in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR.

Die Auswahl geeigneter Referenzgene ist für jedes experimentelle System neu zu treffen. Häufig verwendete endogene Standards sind neben der Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Winer *et al.*, 1999), β -Actin (Kreuzer *et al.*, 1999) und ribosomale RNA-Spezies (Mansur *et al.*, 1993; Zhong und Simons, 1999), aber auch das Histon H3 (Kelley *et al.*, 1993), Cyklophilin (Haendler *et al.*, 1987) sowie die mitochondriale ATP-Synthase 6 (Gerard *et al.*, 2000) wurden für diesen Zweck benutzt. Eine relative Quantifizierung der Genexpression erfolgt, indem die normalisierten Expressionswerte auf einen festgelegten Referenzpunkt bzw. Referenzprobe, den Kalibrator, bezogen werden. Als Kalibrator kommen zum Beispiel unbehandelte Proben, spezifische Gewebeproben oder die Nullpunktwerte von Kinetiken in Frage. Das Ergebnis ist eine dimensionslose Zahl, die das Expressionsverhältnis von Probe und Kalibrator beschreibt. Durch dieses Verfahren wird es möglich Genexpressionsmuster zu erstellen oder den Effekt von Gendefekten oder der Fehlexpression eines Gens zu quantifizieren, was fundamental zur Aufklärung von Genfunktionen beiträgt. Die Vorteile der Methode liegen dabei in dem hohen Automatisierungsgrad der Prozedur, der außerordentlich hohen Sensitivität (die Detektionsgrenze für DNA liegt im Femtogramm-Bereich) und der Reproduzierbarkeit der Quantifizierung, welche bei der Anwendung anderer, z.B. auf Nukleinsäure-Hybridisierung basierenden, Methoden nicht in diesem Maße gegeben sind.

1.6.3.1. Die Berechnung von PCR-Effizienzen in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Die Amplifikat-Akkumulation während der exponentiellen Phase der PCR lässt sich mathematisch beschreiben durch die Gleichung:

$$(3) N_n = N_0 \cdot (1 + E)^n$$

mit:

n: Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen

N_n : Amplifikat-Menge nach n PCR-Zyklen

N_0 : Matrizen-Menge zu Beginn der Amplifikation (PCR-Zyklus 0)

E: Effizienz der Amplifikation ($0 < E < 1$)

Speziell zum Zeitpunkt der Quantifizierung gilt:

$$(4) N_t = N_0 \cdot (1 + E)^{C_t} = \text{const.}$$

mit:

C_t : Schwellenwert-Zyklus („threshold cycle“)

N_t : Amplifikat-Menge bei Erreichen des C_t
 In ihrer logarithmierten Form lautet die Gleichung dann:

$$(5) \ln N_t = \ln N_0 + C_t \cdot \ln(1 + E)$$

Durch Umformung erhält man:

$$(6) C_t = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln(1 + E)} = -\frac{1}{\ln(1 + E)} \ln N_0 + \frac{1}{\ln(1 + E)} \ln N_t$$

Aus Gleichung (6) ist ersichtlich, dass es sich bei der Funktion $f(\ln N_0) = C_t$ um eine lineare Funktion handelt. Die Geradensteigung des Funktionsgraphen ist Gleichung (6) folgend gegeben durch:

$$(7) m = -\frac{1}{\ln(1 + E)}$$

mit:
 m: Geradensteigung

Durch Auflösen der Gleichung (7) nach E erhält man den Term:

$$(8) E = e^{-\frac{1}{m}} - 1$$

Die PCR-Effizienz (E) eines TaqMan[®]-Systems lässt sich also relativ einfach bestimmen, wenn die für jedes System charakteristische Funktion $f(\ln N_0) = C_t$ bekannt ist. Dazu werden lediglich serielle Verdünnungen einer geeigneten DNA-Matrize hergestellt (Standardkurve) und die korrespondierenden C_t -Werte, wie in Abschnitt 2.2.27.3. erläutert, bestimmt. Die gemessenen C_t -Werte werden in einem Koordinaten-System (Ordinate) gegen den *Logarithmus naturalis* der Verdünnungsfaktoren (Abszisse) aufgetragen (Abbildung 7). Das Verfahren der linearen Regression liefert schließlich $f(\ln N_0)$ und die entsprechende PCR-Effizienz kann nun mittels Gleichung (8) aus der Steigung der Regressionsgerade berechnet werden.

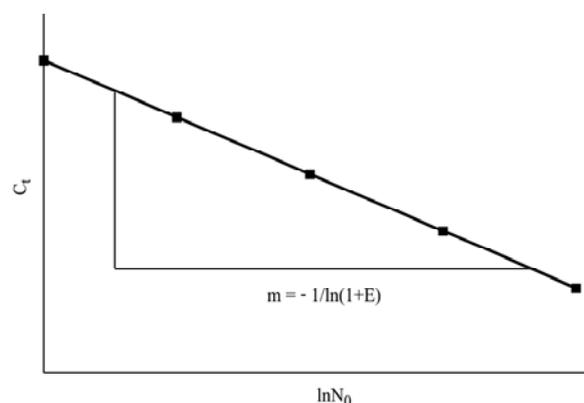


Abb. 7: Idealisierte Darstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der PCR-Effizienz. Werden die C_t -Werte als Funktion von $\ln N_0$ aufgetragen, so lässt sich die PCR-Effizienz aus der Geradensteigung berechnen.

1.6.3.2. Die Berechnung der relativen Genexpression

Unter relativer Genexpression (R) versteht man die dimensionslose Zahl, die dem Quotienten aus der Anzahl von mRNA-Molekülen eines Gens in einer biologischen Probe und der Kopienzahl der gleichen mRNA-Spezies in einer willkürlich als Kalibrator gewählten zweiten Probe entspricht. Die für PCR-Zwecke ungeeignete mRNA wird dabei in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR durch die nach der Reversen Transkription aus ihr hervorgehende cDNA repräsentiert. Die Berechnung von R basiert auf Gleichung (4). Diese lässt sich durch Äquivalenz-Umformung auch schreiben als:

$$(9) N_0 = \frac{N_t}{(1+E)^{C_t}} = \frac{\text{const.}}{(1+E)^{C_t}}$$

Zunächst erfolgt die Normalisierung der Zielgen-Expression auf das für die Untersuchung gewählte, invariant expremierte Referenzgen („housekeeping gene“):

$$(10) R_{\text{Norm}} = \frac{N_0^{\text{Ziel}}}{N_0^{\text{Ref}}} = \frac{\frac{N_t}{(1+E)^{C_t^{\text{Ziel}}}}}{\frac{N_t}{(1+E)^{C_t^{\text{Ref}}}}} = \frac{\frac{\text{const.}}{(1+E)^{C_t^{\text{Ziel}}}}}{\frac{\text{const.}}{(1+E)^{C_t^{\text{Ref}}}}} = \frac{(1+E)^{C_t^{\text{Ref}}}}{(1+E)^{C_t^{\text{Ziel}}}}$$

mit:

R_{Norm} : auf Referenz normalisierte, relative Expression

$C_t^{\text{Ref}}, C_t^{\text{Ziel}}$: C_t des Referenz- bzw. des Zielgens

$N_0^{\text{Ref}}, N_0^{\text{Ziel}}$: cDNA-Startkopienzahl für das Referenz- bzw. das Zielgen

Unter der Voraussetzung, dass $E_{\text{Ref}} = E_{\text{Ziel}} = E \approx 1$, folgt:

$$(11) R_{\text{Norm}} = (1+E)^{C_t^{\text{Ref}} - C_t^{\text{Ziel}}} = (1+E)^{\Delta C_t} = 2^{\Delta C_t}$$

Abschließend werden alle so ermittelten R_{Norm} -Werte auf den gewählten Kalibrator normalisiert, d.h. der R_{Norm} -Wert des Kalibrators wird willkürlich gleich 1 gesetzt:

$$(12) R = \frac{R_{\text{Norm}}^{\text{P}}}{R_{\text{Norm}}^{\text{K}}} = \frac{2^{\Delta C_t^{\text{P}}}}{2^{\Delta C_t^{\text{K}}}} = 2^{\Delta C_t^{\text{P}} - \Delta C_t^{\text{K}}} = 2^{\Delta \Delta C_t}$$

mit:

$R_{\text{Norm}}^{\text{K}}, R_{\text{Norm}}^{\text{P}}$: auf Referenz normalisierte, relative Expression des Kalibrators K bzw. einer anderen beliebigen biologischen Probe P

$\Delta C_t^{\text{K}}, \Delta C_t^{\text{P}}$: C_t des Kalibrators K bzw. einer anderen biologischen Probe P

Die relative Expression eines Gens, z.B. in verschiedenen Geweben, unter variierenden Umwelteinflüssen oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Individualentwicklung, wird also bestimmbar allein durch die Messung der zugehörigen C_t -Werte. Darüber hinaus ist es

durch die oben beschriebene Methode auch möglich die Expression von prinzipiell beliebig vielen verschiedenen Genen miteinander zu vergleichen. Zu beachten ist dabei jedoch, dass die PCR-Effizienzen der unterschiedlichen zur Anwendung kommenden TaqMan[®]-Systeme annähernd identisch sind und idealerweise den Wert 1 besitzen, was allerdings nicht zwingend notwendig ist, denn die Formeln (11) und (12) können prinzipiell auch angewandt werden, wenn dies nicht der Fall ist. Effizienzen kleiner 1 bewirken lediglich, dass die Basis des resultierenden Potenzterms für R kleiner als 2 wird.

1.6.4. Alternative Quantifizierungsstrategien

Die Verwendung von Standardkurven, basierend z.B. einer Verdünnungsserie einer geeigneten cDNA-Präparation, macht eine relative Quantifizierung der Genaktivität auch dann möglich, wenn die Effizienzen der eingesetzten TaqMan[®]-Systeme stark voneinander abweichende Werte aufweisen. Die Anwendung von Standardkurven macht es ferner auch möglich, mRNA- (bzw. cDNA-) Spezies absolut zu quantifizieren.

1.6.4.1. Die Standardkurven-Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression

Die Expression mehrerer Gene, auch wenn die zu deren Detektion verwendeten TaqMan[®]-Systeme sehr unterschiedliche PCR-Effizienzen aufweisen, kann relativ zueinander quantifiziert werden, indem eine Serie externer Standards zur Normalisierung der Messwerte benutzt wird. Die Standards sind dabei, wie schon in Abschnitt 1.5.3.1. beschrieben, Verdünnungen einer cDNA-Präparation, die für alle zu untersuchenden Zielgene inklusive des gewählten Referenzgens positiv sein muss, d.h., alle Gene müssen in der biologischen Probe, aus welcher der cDNA-Standard gewonnen wurde, expremiert sein. Kenntnis der absoluten cDNA-Konzentrationen der Standards spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle; sie sind in der Regel ohnedies unbekannt. Bei der Durchführung der Normalisierung ist die Verwendung der relativen cDNA-Quantitäten, gegeben durch die Verdünnungsfaktoren, völlig hinreichend. Die Standardkurve (eigentlich Standardgerade) wird, wie oben (Abschnitt 1.5.3.1.) dargestellt, generiert und zu den gemessenen C_T -Werten aller Gene in den verschiedenen biologischen Proben die entsprechenden N_0 -Werte aus der Gleichung der Regressionsgeraden ermittelt:

$$(13) f(\ln N_0) = C_t = m \cdot \ln N_0 + b \Leftrightarrow \ln N_0 = \frac{C_t - b}{m} \Rightarrow N_0 = e^{\frac{C_t - b}{m}}$$

mit:

b: Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden

Die Normalisierung der Genexpression für eine bestimmte biologische Probe erfolgt durch die Division der Startkopienzahl (N_0) des jeweiligen Zielgens durch die des Referenzgens:

$$(14) R_{\text{Norm}}(P) = \frac{N_0^{\text{Ziel}}(P)}{N_0^{\text{Ref}}(P)}$$

mit:

$R_{\text{Norm}}(P)$: auf Referenz normalisierte, relative Expression eines Zielgens in einer biologischen Probe P

$N_0^{\text{Ziel}}(A)$: cDNA-Startkopienzahl des Zielgens in der biologischen Probe P

$N_0^{\text{Ref}}(A)$: cDNA-Startkopienzahl des Referenzgens in der biologischen Probe P

Schließlich wird ein zweites Mal, diesmal auf den Kalibrator, normalisiert:

$$(15) R = \frac{R_{\text{Norm}}(A)}{R_{\text{Norm}}(K)}$$

mit:

$R_{\text{Norm}}(K)$: auf Referenz normalisierte, relative Expression eines Zielgens in einer biologischen, als Kalibrator ausgewählten Probe

Neben dem schon angesprochenen großen Vorteil der Standardkurven-Methode, der universellen Anwendbarkeit, besitzt die Vorgehensweise aber in der Praxis schwerwiegende Nachteile. Diese liegen in der Notwendigkeit begründet sowohl für alle Zielgene als auch das Referenzgen stets eine eigene Standardkurve generieren zu müssen. Dies reduziert einerseits den möglichen Probendurchsatz und steigert andererseits die Kosten pro analysierter Probe beträchtlich.

1.6.4.2. Die absolute Quantifizierung der Genexpression

Neben der relativen Quantifizierung der in einer biologischen Probe vorliegenden mRNA- bzw. cDNA-Menge eines bestimmten Gens, erlaubt die quantitative Echtzeit-RT-PCR auch die Messung absoluter mRNA/cDNA-Quantitäten. Angewendet wird dazu die im vorangehenden Abschnitt erläuterte Standardkurven-Methode. Für die absolute Quantifizierung ist es allerdings notwendig die Matrizen-Menge in den Standards genau zu kennen, z.B. durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm. Häufig werden Plasmid-DNA oder *in vitro* transkribierte RNA zur absoluten Standardisierung verwendet. An die Qualität der Standards werden dabei besonders hohe Anforderungen gestellt, denn sie müssen unbedingt aus einer einzigen, reinen Nukleinsäure-Spezies bestehen, da jede Kontamination mit Fremd-DNA bzw. -RNA systematische Messfehler bei ihrer Konzentrationsbestimmung verursachen und damit zu falschen Gesamtergebnissen führen würde. Dieser besondere Aspekt macht die absolute Quantifizierung der Genexpression überaus diffizil und die bereits geschilderten Nachteile der Standardkurven-Methode im Allgemeinen machen sie zusätzlich noch überproportional teuer. Es sollte also genau abgewägt werden, ob die wissenschaftliche Aussage, die mittels der quantitativen Echtzeit-RT-PCR getroffen werden soll, einer absoluten Quantifizierung der Genexpression bedarf, oder ob auf sie zu Gunsten einer relativen Quantifizierung verzichtet werden kann.

1.7. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Transkriptionsfaktor MYB12 aus *A. thaliana* funktionell charakterisiert werden. Frühere, während meiner Diplomarbeit durchgeführte, Transfektionsanalysen in *A. thaliana*-Protoplasten lieferten erste Hinweise auf eine regulatorische Rolle von MYB12 innerhalb des Phenylpropanoidmetabolismus, speziell als flavonolspezifischer Regulator der Flavonoidbiosynthese. Weitergehende Transfektionsexperimente sollten diese Ergebnisse erweitern, u.a. indem die Analyse auch auf die Strukturgene des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels sowie der Sinapinsäuresynthese ausgeweitet und der *CHS*-Minimalpromotor eingehender zur Identifikation der für die Regulation durch MYB12 relevanten *cis*-aktiven Elemente untersucht wurde. Die Grundlage der funktionellen Charakterisierung von MYB12 *in planta* war das Vorhandensein einer *myb12*-Knockout- sowie einer *MYB12*-Überexpressionslinie, weil durch diese die Möglichkeit eröffnet wurde eine direkte Korrelation zwischen der *MYB12*-Expression und der Expression möglicher MYB12-Zielgene innerhalb des Flavonoidbiosyntheseweges einerseits und der Menge an gebildetem Endprodukt andererseits nachzuweisen. Zur Untersuchung der Genexpression sollte die Methode der quantitativen Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung sogenannter TaqMan[®]-Sonden zum Einsatz kommen. Die Etablierung dieser Methode zur sensitiven und spezifischen Quantifizierung der Genexpression war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit und umfasste neben dem Design geeigneter TaqMan[®]-PCR-Systeme insbesondere auch die Optimierung der Probenherstellung und -vorbereitung.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen BioRad (München), Biozym (Hameln), Merck (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Eine Probe des Herbizids Norfluorazon (Zorial[®], interne Bezeichnung A-6283A) wurde von M. Schulte, Novartis Agro, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuklease A (RNaseA), DNaseI und Lysozym wurden von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius, Litauen), Invitrogen (Paisley, GB), Promega (Madison, WI, USA), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Serva und Stratagene (Heidelberg) geliefert. Verwendet wurden weiterhin Taq-DNA-Polymerase (Roche), Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene), SuperscriptTMII RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen) und Terminale Desoxynukleotid-Transferase (Roche). Zellulase („Onozuka R-10“) und Mazerozym (R-10) wurden von der Firma Serva bezogen.

2.1.2. Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von deionisiertem Wasser hergestellt. Die Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren bzw., bei hitzelabilen Substanzen, durch Sterilfiltration.

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Bactotrypton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

Zur Herstellung von Selektionsplatten wurden dem Medium noch 12,5 g/l Bactoagar hinzugefügt.

TB-Medium: TBI: 12 g/l Bactotrypton
 24 g/l Hefeextrakt
 4 ml Glycerin

TBII: 23 g/l KH_2PO_4
164 g/l K_2HPO_4

Beide Komponenten wurden getrennt autoklaviert und erst unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 (TBI) zu 1 (TBII) gemischt. Bei Selektionsmedien oder -platten wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 60° C zugefügt. Die Endkonzentration betrug für Ampicillin 80 µg/ml und für Kanamycin 25 µg/ml. Zur Durchführung der α-Komplementation (Blau/Weiß-Selektion) wurden dem Medium zusätzlich 2ml einer 100 mM IPTG-Lösung und 2 ml einer 2 %igen X-Gal-Lösung (in DMF) hinzugefügt (Endkonzentration 0,2 mM IPTG und 0,004 % X-Gal).

B5-Medium: 1 Packung Gamborg´s B5-Medium für 1 l (Sigma)
 1 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pH 7,5
 136 g Saccharose

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat pH 7,5
 1 mM EDTA

Stop-Mix: 200 mM EDTA
 50 % Glycerin
 10 % SDS
 0,5 % Bromphenolblau

2.1.3. Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen AppliedBiosystems (Weiterstadt), Metabion (Martinsried), Eurogentec (Herstal, Belgien) und MWG-Biotech GmbH (München) geliefert. Die untenstehenden Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Standard-Primer:

Name	Oligo-ID	Sequenz
H227	20667	CCTCTATATAAGGAAGTTC
H228	10768	CGCAAGACCGGCAACAGG
H755	2900	GAGTCAGTGAGCGAGGAA
H1690	1114	CGCGATCCAGACTGAATGC
uni	12294	CGTAAAACGACGGCCAGT
rev	12295	GGAAACAGCTATGACCATG

MYB12-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At2g47460

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM1	-	ATAGGTACCTCCGGAACCATGGGAAGAGCGCCATGTTGC
FM2	-	TATGGATCCACCGGTTGACAGAAGCCAAGCGACCAAAGC
FM33	9529	CGACCAAGTAAGTGGAGATTCG
FM36	9786	GTCACATATGTATTGCAAG
FM48	12238	CTCCCCAAAAATGCCCGATTAAAAAGGTGTGG
FM49	12429	GACCCGCGATTAGTGACCACCTG
FM81	19646	CTCATGAGCATTAAATGGCGATAATG
FM82	19647	CGTTTGATGATGATATCATCGATC
FM83	19648	GATGGACAAGACTGAAGAAGACAG
FM84	19649	CGACGCATCGTTAACTTGGTGGTC
FM85	19693	GTGTGTGGTTGGTAAGCTTTAAATTAGCTAGTG
FM86	19694	GGCGCTCTTCCCATGGTCTCCGGCGGTTATATGTG
FM94	21273	ATCCATTGTATTTAAGCTTGAATATTGAATAGTATG
FM95	21274	CCTGTGAAGCTTTATTTCTCAAAGATTCCG
FM96	21275	GTAACGTCAAGCTTCTCGGCACACACTAG
FM139	23636	AACCAAGGGAATCTCGACTGTCT
FM140	23637	CCCAATCGATAAACTCATCCGT

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM171	36142	ACGTGTCATCATAAGCTTCTCCCTCGAAC
FM172	36143	AGATGACCAAGCTTTCTTGAACATATACTTG
FM173	36144	GAACGCACACGTGTTAAGCTTCTCGAGCAA
FM174	36145	CCTTTATATAAGCTTTATCAAAATTATAAGAAGAAC
TM_MYB12	30530	ACGACCACCAAGTTAACGATGCGTTCG

CHS spezifische Desoxynukleotide:

AGI-Gen-Code: At5g13930

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM39	12229	GTTCAAGCGCATGTGCGACAAGTC
FM77	17171	CCCAAGTTGGTGTATACTACCATGGTGATG
FM78	17172	GAAGGCAAGCGTACCGGTTAGAGAGGAACG
FM141	24228	CGCATCACCAACAGTGAACAC
FM142	24229	TCCTCCGTCAGATGCATGTG
FM151	25333	TGGTGCTTCTTCTTTGGATGAGA
FM152	25334	ACCAAGAAGCTTGGTGAGCTG
FM177	38760	CGGTGTAGGATTTGAGAGGACAA
FM178	38761	AGAAGGAGAATGTTTCGACGAATG
TM-CHS	30531	CGACTTGTCGCACATGCGCTTGAA

CFI-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At3g55120

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM40	12230	CTCGGCGGCGCCGGTGCGTTTGAG
FM41	12231	CGCAACCGTAAGAGAGCCGGTAG
FM161	25765	CGAAAGATGATAGTATCCCTGAAACC
FM162	25766	TGATCACTAACTTCCTTTTCGTCCTT
FM185	39555	CCGGTTCATCGATCCTCTTC
FM186	39556	ATCCCGGTTTCAGGGATACTATC
TM-CFI	39554	CCTACCGGCTCTCTTACGGTTGCGTT

F3H-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At3g51240

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM42	12232	CTAGTCACCTCCAGGGAGAGGCTGTGC
FM43	12233	CTCCCATGCTCAAAAAATGAACCGTGGTCGCCGAG
FM50	12430	GTCTCTAGTCACCTCCAGGGAG
FM51	12431	GAACCTCCCATGCTCAAAAAATGACC
FM149	24236	CAGATCGTTGAGGCTTGTGAGA
FM150	24237	GACGAGTCATATCCGCCACTAAGT
FM155	25337	TGGCTCCAGGAACTTTGACTG
FM156	25338	CTCTGTTTCTCACCGGGTACG
TM-F3H	30534	TCCAAGTGGTCGATCACGGCGTC

FLS-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At5g08640

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM46	12236	CCTGAATACAGGGAGGTGAATGAAGAG
FM47	12237	CTCAACCTCAGAATCTGATCGCCG
FM52	12432	GAATCCACCTGAATACAGGGAG
FM53	12433	CCTCCCATTAACCTCAG
FM147	24234	CCGTCGTCGATCTAAGCGAT
FM148	24235	CGTCGGAATCCCGTGGT
FM157	25339	ATGGAGGTCGAAAGAGTCCAAG
FM158	25340	TCTGTAATTGACGCATGACGGT
TM-FLS	30535	ACCGCGCGCCTCACGCTT

DFR-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At5g42800

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM31	418	GGTTGAAGAAGAAGAAGGAAAGCTTTGAAG
FM32	417	CTGACTAACCATGGTTGTGGTTATATG
FM44	12234	GTCCGAGATCCCGGTAATTTGAAG
FM45	12235	CACGAAATACATCCATCCTGTCATC

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM75	16697	CCACAAAAATGGTTAGTCAGAAAGAGACCGTGTGTG
FM76	16946	CACACACGGTCTCTTTCTGACTAACCATTTTTGTGG
FM79	17280	CTATCATATAACCACACAACCATGGTTAGTCAG
FM80	17281	GATAACGGTTGAACCGGTTAGGCACACATCTGTTG
FM89	19737	CAATCCATATCGGAGATCAAGAC
FM145	24232	TGGTCGGTCCATTCATCACA
FM146	24233	AGCGTTGCATAAGTCGTCCAA
FM153	25335	GATAATGAAAGCATGTGTTAAGGCA
FM154	25336	AATGGTTGCATCATGAGAGGAAC
TM-DFR	30533	CTCCTATCACTCGGAACGAGGCGCATTAC

F3'H-spezifische Desoxyoligonukleotide:

AGI-Gen-Code: At5g07990

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM143	24230	GCTCTCGCCGGAGTATTCAA
FM144	24231	CCAGCGACGCCTTGTAATC
FM179	39557	CTCTTGCTAAGCTTGACTGTATAATAACCTC
FM180	39558	CTGTAAGTTAGAAAGCTTGGTTGTGG
FM181	39559	GACCACTATATAATAAGCTTTGAAGTGTTAGG
FM182	39560	CATTACTCCTCGAGAAGCTTAGGCGCTTAAG
FM183	39561	CAACATCAAACCAAGCTTGTAATAAACTGTC
FM184	39562	GAGAAATAGAGTTGCCATGGTGTGG
TM-F3'H	30532	TCGGAGACTTCGTGCCGTCCACTTGA

Diverse genspezifische Desoxyoligonukleotide:

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM37	11662	GGAACACTCATATTAAGAGG
FM38	11663	CATCACCGGGTCGCACCACGG
FM56	13517	CATAGTCACTAAAAGCTTTTATAAG
FM57	13518	GTTAATCTCCATGGAGACTTTTGATC
FM58	13519	CTTGATAGAGAAGCTTATTTGG
FM59	13520	GATCCATGGGTTTTCAAGAAG

Name	Oligo-ID	Sequenz
FM60	13521	CCACATATATACGCCAAGCTTGTAATC
FM61	13522	CTCCATGGTCACAAAATCTGAC
FM62	14311	CGTTGAACCCATGGTAGTGAGGTTTCTTG
FM63	14312	GTTTAAGATTGTCAAGCTTAATGACCATCC
FM64	14313	GGCAAAGTTCTCCATGGTGGGATGTG
FM65	14314	GAAAAGTCATGCACAAGCTTCATCTTGGC
FM66	14363	GATTGCATAGCTCCATGGGCGCCGACTCGG
FM67	14364	CCCATTTTCAAGCTTCTAATTTTTTCTCATC
FM68	14474	AAGCTTTTATAAGTAATTA
FM69	14475	GATGGATTTTAGTGGTGG
FM70	14476	AAGCTTGTAATCTTTTAG
FM71	14477	AAGCTTATTTGGAAACG
FM72	14478	CCATGGGTTTTCAAGAAG
FM73	14479	AAGCTTCTAATTTTTTCTCATC
FM74	14480	CCATGGGCGCCGACTC
FP-EN	29678	GACTTCACCGGTCAAACCAA
RP-EN	29679	GCCGACTCTCAGATCCACTTG
TM-EN	29680	CTTTGTGATCGTCCGCACCTTGAGC

2.1.4. TaqMan[®]-Systeme

Zielgen	Sonde	5'-Mod.	3'-Mod.	Primer	Amplikon- Größe	cDNA-spezifisch?
18S	nicht bekannt	VIC	TAMRA	nicht bekannt	187bp	Nein
<i>MYB12</i>	TM-MYB12	FAM	TAMRA	FM139, FM140	107bp	Nein
<i>CHS</i>	TM-CHS	FAM	TAMRA	FM141, FM142	100bp	Ja
<i>CFI</i>	TM-CFI	FAM	TAMRA	FM185, FM186	87bp	Ja
<i>F3H</i>	TM-F3H	FAM	TAMRA	FM149, FM150	87bp	Nein
<i>FLS</i>	TM-FLS	FAM	TAMRA	FM147, FM148	106bp	Nein
<i>F3'H</i>	TM-F3'H	FAM	TAMRA	FM143, FM144	73bp	Nein
<i>DFR</i>	TM-DFR	FAM	TAMRA	FM145, FM146	133bp	Ja
En-1	TM-EN	FAM	TAMRA	FP-EN, RP-EN	111bp	Nein

Tab.1 : Tabellenunterschrift siehe bitte nächste Seite.

Tab. 1: Eigenschaften der zur quantitativen Echtzeit-PCR eingesetzten TaqMan[®]-Systeme. Angegeben sind neben dem jeweiligen Zielgen, der Name der Hybridisierungssonde, die 5'- und die 3'-Modifikation der Sonde, die Namen der Primer, die Größe des resultierenden Amplikons und ob dieses cDNA-spezifisch ist. Das TaqMan[®]-System für das 18S-Referenzgen wurde von der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) in Form eines PDAR-Kits (Predeveloped TaqMan[®] Assay Reagent Kit) erworben. Die Firma macht keine Angaben zur Sequenz der Primer oder der verwendeten Sonde.

2.1.5. Bakterienstämme und DNA-Vektoren

<u>E.coli-Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz</u>
XL1-Blue MRF ⁺ Kan ^r	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, \{F'proAB, lacI^q, Z\Delta M15, Tn5(Kan^r)$	Firma Stratagene
GM2163	$F-arar14, leuB6, thi-1, fhuA31, lacY1, tsx-78, galT22, supE44, hisG4, rpsL136(Strr), Xyl-5, mtl-1, dam13, Tn9(Cam^r), dcm6, mcrB1, hsdR2 (rk^- mk^+), mcrA$	Woodcock <i>et al.</i> , 1989 (Firma Biolabs)
TOP10	$F-, mcrA, \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC), \Phi80lacZ\Delta M15, \Delta lacX74, recA1, deoR, araD139, \Delta(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Strr), endA1, nupG$	Firma Invitrogen
<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT10-GUS	$colE1ori, Amp^r, -46 bis +8$ des 35S-Promotor aus CaMV, <i>uidA</i> ORF, <i>nosPA</i> , MCS, Deletionen im Vektorrückgrat	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000

<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT10-UBI-LUCm3	wie pBT10-GUS, <i>Luc</i> -ORF mit drei stillen Mutationen in den Erkennungsstellen für EcoRI, ClaI und XbaI statt <i>uidA</i> -ORF	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000
pBT10-AtMYB111-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 1112bp-Fragment des <i>AtMYB111</i> -Promotors ersetzt	Stracke, unveröffentlicht
pBT10-AtC4H-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 1024bp-Fragment des <i>AtMYB111</i> -Promotors ersetzt	Jin, 2000
pBT10-At4CL1-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 1098bp-Fragment des <i>At4CL1</i> -Promotors ersetzt	Sagasser, unveröffentlicht
pBT10-At4CL2-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 821bp-Fragment des <i>At4CL2</i> -Promotors ersetzt	Sagasser, unveröffentlicht
pBT10-At4CL3-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 640bp-Fragment des <i>At4CL3</i> -Promotors ersetzt	Sagasser, unveröffentlicht
pBT10-AtCHS164-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtCHS</i> -Minimalpromotor ersetzt	Hartmann, 1998

<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT10-AtCHS164-MRE-mut-GUS	wie pBT10-UBI-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtCHS</i> -Minimalpromotor mit Blockmutation im MRE ersetzt	Hartmann, 1998
pBT10-AtCHS164-ACE-mut-GUS	wie pBT10-UBI-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtCHS</i> -Minimalpromotor mit Blockmutation im ACE ersetzt	Hartmann, 1998
pBT10-AtCHS164-RRE-mut-GUS	wie pBT10-UBI-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtCHS</i> -Minimalpromotor mit Blockmutation im RRE ersetzt	Hartmann, unveröffentlicht
pBT10-AtCFI161-GUS	wie pBT10-GUS, den 35S-Promotor ersetzt der <i>AtCFI</i> -Minimalpromotor	Hartmann, 1998
pBT10-AtF3H463-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtF3H</i> -Minimalpromotor ersetzt	Sagasser, unveröffentlicht
pBT10-AtFLS153-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtFLS</i> -Minimalpromotor ersetzt	Hartmann, 1998
pBT10-AtDFR520-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch ein 520bp-Fragment des <i>AtDFR</i> -Promotors ersetzt	Mehrtens, unveröffentlicht

<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT10-ΔGUS	wie pBT10-GUS, jedoch ohne 35S-Promotor	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000
pBT8-35S-AtMYB12	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>AtMYB12</i> -ORF ersetzt	Mehrtens, unveröffentlicht
pBT8-35S-AtMYB111	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>AtMYB111</i> -ORF ersetzt	Stracke, unveröffentlicht
pBT8-35S-ZmC1	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>Cl</i> -ORF ersetzt	Hartmann, unveröffentlicht
pBT8-35S-ZmP	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>P</i> -ORF ersetzt	Hartmann, unveröffentlicht
pBT8-35S-ZmSn	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>Sn</i> -ORF ersetzt	Hartmann, unveröffentlicht
pBT4-Δ-LUC	<i>colE1ori</i> , Amp ^r , <i>Luc</i> -ORF, <i>nosPA</i>	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000
PCR [®] 2.1.TOPO	<i>flori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, T7-Promotor, Kan ^r , Amp ^r	Firma Invitrogen

2.1.6. Zellkulturen und Pflanzen

Die für diese Arbeit verwendete *A. thaliana*-Zellsuspensionskultur At7 (Accession Columbia, Col) wurde wie von Trezzini *et al.* (1993) beschrieben im Dunkeln kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink und Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962). Die Zellen wurden fünf Tage nach der Subkultivierung zur Protoplastengewinnung eingesetzt. Die Betreuung der At7-Zellkultur erfolgte durch L. Bollenbach.

Die Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte gewöhnlich im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel). Zur Anzucht von Keimlingen für HPLC- und quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analysen sowie photometrische Anthocyan-Quantifizierungen wurden durch Ethanol-Behandlung oberflächen-sterilisierte Samen in Petrischalen auf mit MS-Medium getränktem Whatman-Papier ausgelegt und für 5 Tage bei 4° C im Dunkeln stratifiziert. Danach erfolgte die Überführung in einen Licht-Thermostat der Firma RUMED-Rubarth Apparate GmbH (Laatzen), wo die Pflanzen bei 21° C Lufttemperatur, 60 % relativer Luftfeuchte und kontinuierlicher Bestrahlung mit Weißlicht ($100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) inkubiert wurden. Zur Gewinnung etiolierter Keimlinge wurden die Petrischalen lichtdicht in Aluminiumfolie verpackt und wie oben beschrieben inkubiert.

Die Lichtinduktion von *A. thaliana*-Protoplasten erfolgte in einem Klimaschrank HT (Infors, Bottmingen, CH) mit 9 Phillips Leuchtstoffröhren: 4x „warm white Light“, 3x „blue TLD“ und 2x „Silvana black light blue“, bei einer Quantenstromdichte von ca. $1000 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$.

2.1.7. Weiteres biologisches Material

Verschiedene für die Kotransfektionsexperimente eingesetzte Plasmide wurden von U. Hartmann, H. Jin, M. Sagasser, M. Sprenger-Haussels und R. Stracke hergestellt (siehe 2.1.4.). Die für die Kartierung von *AtMYB12* verwendeten 100 „Recombinant Inbred“-Linien (RI-Linien; Lister und Dean, 1993), wurden vom „Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre“ (Nottingham, UK) bezogen. Genomische DNA der RI-Linien wurde von E. Bongartz und U. Tartler isoliert.

Pflanzen mit einer En1-Insertion im *MYB12*-Gen (Linie AT123) wurden durch H. Kranz mittels eines PCR-Screenings in einer mutagenisierten *A. thaliana*-Population (Baumann *et al.*, 1998; Wismann *et al.*, 1998) identifiziert (Meissner *et al.*, 1998). Aus den Nachkommen dieser Pflanzen konnte H. Kranz eine homozygote *myb12*-Footprint-Linie (siehe 2.2.25.) isolieren. Diese Linie wurde dann für die vorliegende Arbeit verwendet.

Eine transgene *MYB12*-Überexpressionslinie wurde ebenfalls von H. Kranz zur Verfügung gestellt. Diese resultierte aus einer *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen der Accession Col mit einem auf dem binären Vektor pGPTV-TATA (Sprenger-Haussels und Weißhaar, 2000) basierenden Vektorkonstrukt, welches anstelle der ursprünglich vorhandenen TATA-GUS-Kassette eine Fusion des CaMV-35S-Promotors und des *MYB12*-ORF trug. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden nur bezüglich der T-DNA-Insertion homozygote Pflanzen dieser Überexpressionslinie verwendet.

2.2. Methoden

Soweit nicht anders angegeben basierten alle molekularbiologischen Methoden auf den von Sambrook *et al.* (1989) veröffentlichten Protokollen.

Alle Berechnungen zur Auswertung von Experimenten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel[®] der Firma Microsoft (Unterschleißheim) ausgeführt.

2.2.1. Ammonium-Acetat-Fällung von DNA

DNA, die zur automatischen Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde durch Zugabe von 1 Volumenteil 4 M Ammonium-Acetat und 6 Volumenteilen absolutem Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf, 14000 rpm, 20 min) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Eppendorf, 14000 rpm, 5 min). Nach der Trocknung des Sediments wurde dieses in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

2.2.2. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Abnahme der Lichtintensität der Schichtdicke des absorbierenden Mediums und der Konzentration der absorbierenden Verbindungen proportional. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA, 35 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 20 µg/ml Oligonukleotiden. Die photometrische Messung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte in einer Quarzküvette gegen bidest. Wasser als Blindwert.

Alternativ wurden Nukleinsäure-Konzentrationen auch durch Anwendung des „PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit“ bzw. „RiboGreen® RNA Quantitation Kit“ der Firma MolecularProbes (Leiden, Niederlande) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.3. Restriktionsspaltung von DNA

Die Durchführung der restriktionendonukleolytischen Spaltung richtet sich nach den Angaben der Hersteller der Restriktionendonukleasen. Verwendet wurden die mitgelieferten Puffer. Pro μg zu spaltender DNA wurden 3 U an Enzym eingesetzt. Die Enzymmenge sollte 1/10 des Gesamtansatzes nicht übersteigen, da das in den Lagerungspuffern der Restriktionsenzyme enthaltene Glycerin sonst die Spaltungsreaktion beeinträchtigt. Die Ansätze wurden bei 37° C für mindestens 1 h inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch die Zugabe von 0,2 Volumenteilen Stop-Mix.

2.2.4. Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden je nach Größe der Fragmente 0,8 bis 2,0 %ige Agarosegele hergestellt. Die entsprechenden Mengen Agarose wurden in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 60° C mit 0,3 μg Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass diese unter UV-Licht sichtbar wird. Das noch flüssige Gel wurde in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels, wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresen fand bei einer Feldstärke von 5 bis 15 V/cm bis zur gewünschten Auftrennung statt. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach einer Agarosegelelektrophorese mittels des „QIAquick-Gelextraktions-Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.6.1. Klonierung mit Hilfe von T4-Ligase

Ein Ligationsansatz von 30 µl enthielt die folgenden Komponenten: 1 µl geschnittener Vektor-DNA (~100 ng), 5 µl (~100 ng) geschnittenes DNA-Fragment, 3 µl 10x Ligasepuffer (500 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 20 mM DTT), 3 µl rATP (10 mM), 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) und 17 µl doppelt destilliertes Wasser. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei RT für mindestens 1,5 h. Anschließend wurden 15 µl der Ligationsreaktion zur Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

2.2.6.2. TOPO TA Cloning[®]

Die direkte Klonierung von mittels *Taq*-Polymerase hergestellten PCR-Fragmenten erfolgte mit dem „TOPO TA Cloning[®]-Kit“ der Firma Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. *Taq*-Polymerase besitzt eine nicht von der Matrize abhängige Terminale-Transferase-Aktivität, die zum Anfügen von einzelnen Desoxyadenosin-Nukleotiden an die 3'-Enden von PCR-Produkten führt. Der linearisierte Klonierungsvektor pCR[®] 2.1-TOPO[®], der Bestandteil des Kits ist, verfügt über einzelne 3'-Desoxythymidin-Überhänge, was durch komplementäre Basenpaarung eine effiziente Ligation zwischen PCR-Produkt und Vektor ermöglicht. *Vaccinia*-Topoisomerase I, die kovalent an die Desoxythymidin-Überhänge gebunden vorliegt, bindet Duplex-DNA und spaltet auf einem DNA-Strang die Phosphodiesterbindung nach der Sequenz CCCTT. Deren Energie wird durch die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen DNA-Stranges und eines Tyrosylrestes (Tyr-274) der Topoisomerase konserviert. Diese Phospho-Tyrosyl-Bindung kann nachfolgend durch die freie 5'-Hydroxylgruppe des ursprünglich gespaltenen DNA-Stranges angegriffen und die Reaktion so umgekehrt werden, was zur Freisetzung der Topoisomerase führt. Eine schematische Darstellung dieser Vorgänge ist in Abbildung 8 wiedergegeben. Die Vorteile der Methode liegen neben dem geringen zeitlichen Aufwand von nur wenigen Minuten, wegen der Vermeidung von Ligasereaktionen (2.2.6.1.) oder anderen Post-PCR-

Manipulationen, auch in darin begründet, dass sie universell zur Klonierung aller mit *Taq*-Polymerase hergestellten PCR-Produkten einsetzbar ist.

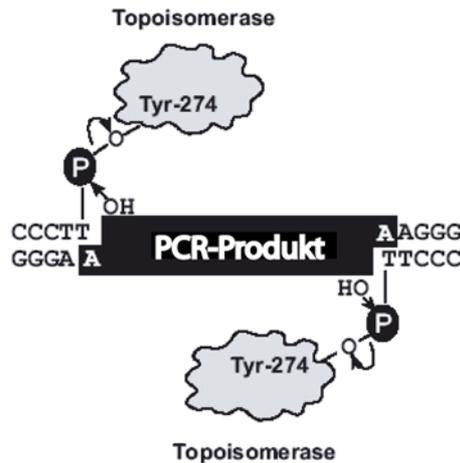


Abb. 8: Schematische Darstellung der Topoisomerase-Reaktion beim TOPO TA Cloning[®]. Verändert nach Firma Invitrogen.

2.2.7. Kultivierung von Bakterien

Zur Herstellung methylierter Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm XL-1 Blue MRF' Kan^r mit dem Genotyp *dam*⁺, *dcm*⁺ der Firma Stratagene und für die Produktion unmethylierter Plasmid-DNA der Stamm GM2163 mit dem Genotyp *dam*⁻, *dcm*⁻ (Woodcock *et al.*, 1989) verwendet. Bei 4° C behielten transformierte Bakterien des Stammes XL-1 Blue MRF' Kan^r auf Agarplatten ihre Vitalität für etwa 4 Wochen, die des Stammes GM2163 für 1 bis 2 Wochen.

2.2.8. Transformation von Bakterienzellen

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Zur Transformation von XL-1 Blue Zellen wurden 15 µl eines Ligationsansatzes zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot kompetenter Zellen hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1,5 min bei 42° C wurden die Bakterien weitere 10 bis 30 min auf Eis inkubiert und dann auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen. Für eine Blau-/Weißselektion müssen die Platten zusätzlich IPTG und X-Gal enthalten. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte bei 37° C über Nacht.

2.2.9. Schnelle Transformation von Bakterienzellen

Zu einem auf Eis aufgetauten 50 µl Aliquot kompetenter GM2163-Bakterien wurden 200 bis 500 ng Plasmid-DNA zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf Eis stehen gelassen, und nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42° C erneut 5 min auf Eis inkubiert. Zum Schluß wurden die Bakterien wie in 2.2.8. beschrieben ausplattiert.

2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl folgende Komponenten: 200 bis 500 ng Matrizen-DNA, jeweils 100 ng zweier verschiedener Desoxyoligonukleotide als Primer, 5 µl 10x PCR-Puffer (vom jeweiligen Hersteller mitgeliefert), 4 µl eines dNTP-Gemisches (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 1,25 mM) und 2,5 U Taq- oder Pfu-Polymerase. Für die DNA-Amplifikation mittels PCR wurde ein Thermocycler GeneAmp[®] PCR System 9700 (AppliedBiosystems) verwendet.

2.2.11. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde die Sequenz von DNA-Molekülen gezielt verändert, z.B. um die zur Klonierung von DNA-Fragmenten benötigten Restriktionsschnittstellen zu erzeugen. Dazu wurden zwei synthetisch hergestellte, zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs komplementäre, Desoxyoligonukleotide als Primer für die Polymerasereaktion verwendet. Die Sequenz der Primer wies dabei die zur Originalsequenz gewünschte Abweichung auf. In der PCR entstanden so DNA-Bruchstücke, deren 5'- bzw. 3'-Regionen, die neuen Restriktionsstellen enthielten. Diese konnten zur anschließenden Klonierung der PCR-Fragmente benutzt werden.

2.2.12. Isolierung von DNA

2.2.12.1. Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA

(modifiziert nach Goode und Feinstein, 1992)

1,5 ml einer 3 ml Übernachtskultur (in TB-Medium, 80 mg/l Ampicillin) wurden abzentrifugiert (Biofuge, 13000 rpm, 2 min, RT). Die sedimentierten Bakterien wurden anschließend in 200 µl TELT-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 mM LiCl, 0,4 % Triton X-100) und 20 µl Lysozymbilösung (1 mg/ml) resuspendiert. Nach 3-minütiger Inkubation der Bakteriensuspension bei 95° C wurde diese für 5 min auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (Sigma, 13000 rpm, 15 min, 4° C) wurden die Zelltrümmer der Bakterienlyse pelletiert und mittels eines Zahnstochers verworfen. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 100 µl Isopropanol gefällt und durch erneutes Zentrifugieren (Sigma, 13000 rpm, 10 min, 4° C) sedimentiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Präzipitat mit 200 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Wieder wurde zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4° C) und das Pellet in 50 µl TE-Puffer mit 40 µg/ml Rnase gelöst.

2.2.12.2. Quantitative Plasmidpräparation über Säulenchromatographie

(modifiziert nach Herstellerangaben der Firma Qiagen)

Diese Technik diente vor allem der Isolierung hochreiner, unmethylierter Plasmid-DNA für den Einsatz in Transfektionsexperimenten. 200 ml einer Übernachtskultur des Bakterienstammes GM2163, in amplicillinhaltigem TB-Medium herangezogen, wurden zur Sedimentation der Bakterien zentrifugiert (Kontron, Centrikon H-401, Rotor A6.14, 6000 rpm, 10 min, 4° C). Das Pellet wurde in 50 ml Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und zur Lyse der Zellen mit 50 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt. Die Zugabe von 50 ml Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) erfolgte nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis. Danach wurde der Ansatz weitere 30 min auf Eis gehalten und dann erneut zentrifugiert (Kontron Centrikon H-401, Rotor A6.14, 12000 rpm, 20 min, 4° C). Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde zur weiteren Verwendung zunächst, um ein Verstopfen der Chromatographie-Säulen zu vermeiden, durch einen Faltenfilter filtriert. Die Säulen (Qiagen Mega Tip 2500) wurden vor dem Probenauftrag mit 35 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0, 0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Nach der Bindung der Plasmid-DNA an das

Säulenmaterial wurde viermal mit jeweils 50 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Eluiert wurde die DNA mit 35 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5). Durch die Zugabe von 17,5 ml Isopropanol zum Eluat erfolgte die Fällung der DNA. Das DNA-Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation (Minifuge, 5000 rpm, 30 min, 4° C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (Sigma, 13000 rpm, 15 min, 4° C). Nach der Trocknung des Sediments wurde dieses in 500 µl TE-Puffer gelöst. Eventuell im Ansatz verbliebene unlösliche Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation (Sigma, 13000 rpm, 15 min, 4° C) sedimentiert und der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA in ein steriles 2-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-Konzentration im Überstand wurde photometrisch (2.2.2.) bestimmt und durch Verdünnung mit TE-Puffer auf einen Wert von 1 µg/µl eingestellt.

2.2.12.3. Isolierung genomischer DNA

Die Isolation kleiner Mengen genomischer DNA aus *A. thaliana*-Blättern für PCR-Zwecke erfolgte nach der Methode von Edwards (1991). Dazu wurden ein bis zwei kleine Blätter (20-40 mg) mit 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) ca. 15 s gemörsert und anschließend für 5 s auf einem Vortex-Mischer auf höchster Stufe geschüttelt. Das Pflanzenmaterial wurde durch Zentrifugation pelletiert (14000 rpm, 3 min, RT) und 150 µl des Überstandes für eine Isopropanolfällung der DNA eingesetzt, welche durch Zugabe von 150 µl Isopropanol und 2 min Inkubation bei RT durchgeführt wurde. Das DNA-Präzipitat wurde pelletiert (14000 rpm, 5 min, RT), mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. 2 µl dieser DNA wurden als Matrize in der PCR verwendet.

Größere Mengen, hochqualitativer, als Matrize für quantitative Echtzeit-PCR-Analysen geeigneter, genomischer DNA wurde mit Hilfe des „Nucleon PhytoPure Kits“ der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.13. Herstellung bestimmter Reporterkonstrukte für Transfektionsexperimente

Zur Verwendung in Transfektionsexperimenten wurden verschiedene Reporterkonstrukte (Promotor-GUS-Fusionen) hergestellt. Die Klonierung der mittels PCR amplifizierten Promotorfragmente erfolgte in allen Fällen in den pBT10-GUS-Vektor, wo sie den 35S-Minimalpromotor ersetzen. Zur Klonierung wurden die im pBT-GUS-Vektor vorhandenen HindIII- und NcoI-Restriktionsschnittstellen verwendet, die durch zielgerichtete Mutagenese (2.2.11.) auch in die Promotor-Amplifikate eingeführt wurden. Durch entsprechende Restriktionsspaltung mit HindIII und NcoI und nachfolgende Ligation (2.2.6.1.) der Spaltprodukte wurden die verschiedenen Reporterkonstrukte generiert. Sämtliche klonierte Promotorfragmente entstammen der Accession Col, da zur PCR ausschließlich genomische DNA dieser Accession als Matrize eingesetzt wurde.

2.2.13.1. Deletionsserie des *MYB12*-Promotors

Insgesamt 7 Promotorfragmente unterschiedlicher Länge wurden zur Herstellung von Reporterkonstrukten verwendet (Deletionsserie). Die unten angegebenen Fragmentlängen sind auf den Transkriptionsstart bezogen. Als Primer wurden dabei eingesetzt:

FM85/FM86 ⇒ 1219 bp Fragment

FM95/FM86 ⇒ 792 bp Fragment

FM172/FM86 ⇒ 592 bp Fragment

FM173/FM86 ⇒ 467 bp Fragment

FM174/FM86 ⇒ 403 bp Fragment

FM96/FM86 ⇒ 259 bp Fragment

FM171/FM86 ⇒ 108 bp Fragment

2.2.13.2. *PAL*-Reporterkonstrukte

Kloniert wurden unmittelbar stromaufwärts vom Translationsstart liegende, Teile des Promotors beinhaltende PCR-Fragmente der unten angegebenen, auf den Translationsstart bezogenen, Längen. Als Primer kamen folgende Desoxyoligonukleotide zum Einsatz:

PAL1 (At2g37040): FM56/FM57 ⇒ 1229 bp Fragment

PAL2 (At3g53260): FM58/FM59 ⇒ 1032 bp Fragment

PAL3 (At5g04230): FM60/FM61 ⇒ 1012 bp Fragment

PAL4 (At3g10340): FM65/FM66 ⇒ 1248 bp Fragment

2.2.13.3. *F3'H*-Reporterkonstrukt

Ein 1287 bp langes, Teile des *F3'H*-Promotors beinhaltendes, PCR-Fragment wurde durch die Verwendung der Desoxyoligonukleotide FM179 und FM184 als PCR-Primer amplifiziert.

2.2.13.4. *F5H*-Reporterkonstrukt

Ein 991 bp langes, Teile des Promotors des für das Enzym Ferulat-5-Hydroxylase kodierenden *F5H*-Genes (At4g36220) umfassendes PCR-Fragment wurde mit Hilfe der Primer FM65 und FM64 generiert.

2.2.13.5. *OMT*-Reporterkonstrukt

Die Verwendung der Primer FM62 und FM63 ermöglichte die Amplifikation eines 1136 bp langen und unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts des für das Enzym O-Methyltransferase kodierenden *OMT*-Genes liegenden Fragmentes, welches auch Teile des *OMT*-Promotors beinhaltete.

2.2.14. Automatische DNA-Sequenzierung

Die automatische DNA-Sequenzierung erfolgte durch die zentrale Einrichtung ADIS des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung. Für die Sequenzierreaktion wurde das „Ready Reaction DyeDeoxyTerminator AmpliTaq[®] FS-Kit“ der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte auf dem ABI PRISM[®]-System 377 bzw. 3700 ebenfalls der Firma Applied Biosystems.

2.2.15. Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten

DNA- und Aminosäuresequenzen werden mit Hilfe des UWGCG-Programmpaketes (University of Wisconsin Genetics Computer Group) auf einer „UNIX“-Workstation ausgewertet (Devereux *et al.*, 1984).

2.2.16. Gewinnung von *A. thaliana*-Protoplasten

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

Der erste Schritt zur Gewinnung von Protoplasten der Zelllinie At7 bestand in der Zentrifugation (Minifuge RF, 1500 rpm, 5 min, RT) von 40 ml einer fünf Tage alten Zellsuspensionskultur. Das Pellet wurde in 30 ml 240 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut zentrifugiert (Minifuge RF, 1500 rpm, 5 min, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die sedimentierten Zellen in 60 ml sterilfiltrierter Enzymlösung folgender Zusammensetzung aufgenommen: 0,7 g Zellulase „Onozuka R-10“ (SERVA) und 0,1625 g Mazerozym R-10 (SERVA) gelöst in 60 ml 240 mM CaCl₂. Verteilt auf zwei Petrischalen (Durchmesser 14,5 cm) wurde die Zellsuspension über Nacht bei 26° C und 20 rpm im Dunkeln geschüttelt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Protoplasten für 20 min bei 40 rpm geschüttelt und dann abzentrifugiert (Minifuge RF, 1500 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde mit 240 mM CaCl₂ gewaschen und nochmals wie vorher zentrifugiert. Zu dem Sediment wurden bis zu einem End-volumen von 15 ml B5 + 0,4 M Saccharose (2.1.2.) hinzugegeben und dieses dann resuspendiert. Lebende Protoplasten wurden durch Zentrifugation (Minifuge RF, 800 rpm, 6 min, RT) flotiert und behutsam mit einer sterilen Pipette abgenommen. Der Flottierungsschritt wurde mit diesen Protoplasten noch einmal in gleicher Weise durchgeführt. Die so gewonnenen Protoplasten wurden direkt für die Transfektionen eingesetzt. Für alle Pipettierschritte mit Protoplasten wurden Falcon-Einmalpipetten mit großer Öffnung der Firma Becton Dickinson Labware, N.J., USA verwendet.

2.2.17. Transfektion von *A. thaliana*-Protoplasten

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

Die DNA-Aufnahme in die *A. thaliana*-Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. In 10 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) wurden 200 µl Protoplastensuspension vorgelegt. Dieser wurden die Transfektions-DNA (10 µg Reporterplasmid, eventuell ein oder zwei Effektorplasmide (je 0,5 µg), 5 µg Standardisierungsplasmid (pBT10-UBI-LUCm3), aufgefüllt mit pBT4-Δ-LUC auf eine DNA-Gesamtmenge von 25 µg) und 200 µl sterilfiltrierter PEG-Lösung (25 % PEG₆₀₀₀, 100 mM Ca(NO₃)₂, 450 mM Mannitol, pH 9,0) hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde nach vorsichtigem Schütteln für exakt 15 min bei RT inkubiert. Die PEG-vermittelte DNA-Aufnahme wurde anschließend durch die Zugabe von 5 ml 275 mM Ca(NO₃)₂-Lösung (pH 6,0) abgestoppt. Durch eine weitere Zentrifugation (Minifuge RF, 800 rpm, 8 min, RT) wurden die Protoplasten erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in 7 ml B5 + Saccharose aufgenommen und der Transfektionsansatz zu gleichen Teilen

auf zwei Petrischalen (Durchmesser 5 cm) verteilt. Die Inkubation beider erfolgte bei 26° C für 20 h im Dunkeln (Doppelwerte). Bei Transfektionsexperimenten zur Lichtinduktion von Promotoren betrug die Inkubationszeit 8 h. Die eine Hälfte der Ansätze wurde unter UV-haltigem Weiß-licht und die andere als Kontrolle der Lichtinduktion im Dunkeln jeweils bei 26° C inkubiert. Für alle Pipettierschritte mit Protoplasten wurden Falcon-Einmalpipetten mit großer Öffnung der Firma Becton Dickinson Labware, N.J., USA verwendet.

2.2.18. Ernte transfizierter Protoplasten

In 50 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, N.J., USA) wurden 20 ml 240 mM CaCl₂-Lösung vorgelegt, in die die Transfektionsansätze vom Vortage überführt wurden. Die Protoplasten wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand dann mit einer Vakuumpumpe bis auf einen Rest von ca. 1 ml abgesaugt. Die Protoplasten wurden in dem verbliebenen Überstand vorsichtig resuspendiert und mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette unter Verwendung von „Cell saver“-Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik, 1000 µl Kapazität, mit großer Öffnung) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei –80° C gelagert.

2.2.19. Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten

Zur Extraktion der in den transfizierten Protoplasten enthaltenen Proteine wurden die Protoplasten-Pellets zunächst auf Eis aufgetaut und dann in 800 µl Luziferase-Extraktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5, 1 mM DTT) aufgenommen. Die Proben wurden für 30 s auf einem Vortex-Mischer bei maximaler Drehzahl geschüttelt, um so die Zellmembranen zu zerstören. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand für die Proteinbestimmung (2.2.20.), den Luziferase-Test (2.2.21.) und den β-Glukuronidase-Test (2.2.22.) eingesetzt.

2.2.20. Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

10 µl des Proteinextraktes wurden mit 1 ml 1:5 verdünntem Färbereagenz („Protein assay“, Bio Rad) versetzt und 20 min lang bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 595 nm ermittelt. Als Standard diente eine BSA-Eichkurve.

2.2.21. Bestimmung der Luziferase-Aktivität

(Wood *et al.*, 1991)

Zu 10 μl des Protoplastenextraktes wurden 100 μl auf RT erwärmte Luziferase-Substrat-Lösung (20 mM Tricine, 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2,67 mM MgSO_4 , 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 μM CoenzymA, 470 μM Luciferin, 530 μM ATP, pH 7,8) hinzugegeben. In der sich unmittelbar anschließenden Messung im Luminometer (MiniLum, Firma BioScan, Washington DC, USA) wurde die Summe der über einem Zeitintervall von 10 s emittierten Photonen integriert. Die erhaltenen Meßwerte in der Einheit LRU/10 s (relativ light units) wurden zur Berechnung der spezifischen Luziferase-Aktivität durch die in 10 μl Extrakt enthaltene Proteinmenge (μg) und 10 s dividiert. Die spezifische Luziferase-Aktivität hat die Einheit $\text{RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

2.2.22. Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität

(modifiziert nach Jefferson *et al.*, 1987; Gallagher, 1993)

β -Glukuronidasen katalysieren u.a. die Umsetzung von 4-MUG (4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid) in das fluoreszierende Produkt 4-MU (4-Methyl-Umbelliferon). Zur Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität wurden 100 μl Proteinextrakt mit dem gleichen Volumen 4-MUG-Substrat (2 mM 4-MUG in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol) auf Eis in einer MicroAmp[®]-PCR-Platte (AppliedBiosystems) zusammenpipettiert und dann bei 37° C im Thermocycler (GeneAMP[®] PCR System 9700, AppliedBiosystems) inkubiert. Nach 20, 40 und 60 min wurden jeweils 20 μl des Ansatzes in 200 μl 200 mM Na_2CO_3 -Lösung pipettiert, welche zuvor in einer 96 MicroWell[®] Platte (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden) vorgelegt worden waren. Durch dessen alkalischen pH-Wert wird die Enzymreaktion gestoppt und gleichzeitig die Fluoreszenz des Produktes 4-MU verstärkt. Mittels eines „FluoroCount[™] Microplate Readers“ der Firma Packard Biosciences (Dreieich) wurde die Fluoreszenz der Proben bestimmt (Wellenlänge Anregung: 360 nm, Wellenlänge Emission: 460 nm, Signalverstärkung („Gain“) 1,0; Spannungswert des Photomultipliers: 1100 mV; Messdauer pro Probe: 1,0 s). Parallel dazu wurde zur Kalibrierung des Systems stets auch die Fluoreszenz einer 4-MU-Eichkurve gemessen. Die Lichtemission bei 460 nm ist der Menge des vorliegenden 4-MU proportional. Die Differenz der Meßwerte (60 min - 40 min, 40 min - 20 min) wurde bestimmt und deren Mittelwert ($\Delta E_{460}/20 \text{ min}$) gebildet. Die in 100 μl Extrakt enthaltenen Proteinmenge wurde

aus den Ergebnissen der Proteinbestimmung (2.2.20.) abgeleitet. Die Berechnung der spezifischen GUS-Aktivität erfolgte nach der folgenden Formel:

$$(16) E_A(GUS) = \frac{\Delta E_{460} \cdot 1000 \mu\text{g} / \text{mg} \cdot 200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l}}{20 \text{min} \cdot \text{m} / \text{pMol} \cdot \mu\text{g Protein}}$$

mit:

m: Steigung der 4-MU-Eichgeraden

2.2.23. Auswertung der Transfektionsexperimente

Jedes Transfektionsexperiment wurde achtmal wiederholt (acht Transfektionen mit vier unabhängigen Protoplastenpräparationen). Für jede Transfektion wurde der Quotient aus GUS- und LUC-Aktivität (Q) sowie der Mittelwert dieser Quotienten (Q_{MW}) für die acht Transfektionsexperimente berechnet.

$$(17) Q_{\text{MW}} = \frac{1}{8} \cdot \sum \frac{\text{GUS}_i}{\text{LUC}_i}$$

mit:

GUS_i , LUC_i : spezifische GUS- bzw. LUC-Aktivität eines Transfektionsansatzes

Zwei der acht Transfektionen, deren Quotient am stärksten nach oben bzw. nach unten von Q_{MW} abwich, wurden für die weiteren Berechnungen nicht mehr berücksichtigt, da die Erfahrung gezeigt hat, daß die Einbeziehung von Resultaten von Transfektionen mit stark abweichenden Q_{MW} -Werten über verfälschte Korrekturfaktoren F_i (s.u.) zu verfälschten standardisierten GUS_{ki} -Werten (s.u.) führen. Insbesondere bei niedrigen Transfektionseffizienzen, repräsentiert durch niedrige spezifische Luziferase-Aktivitäten, besteht die Gefahr, dass durch die Standardisierungsprozedur die gemessenen, ebenfalls kleinen GUS-Werte systematisch überschätzt werden.

Zur Standardisierung wurde der Mittelwert aller Luziferaseaktivitäten eines experimentellen Blocks bestimmt (LUC_{MW}):

$$(18) \text{LUC}_{\text{MW}} = \frac{1}{n} \cdot \sum \text{LUC}_i$$

mit:

n: Summe aller Transfektionen

Der Quotient aus dem Mittelwert der LUC-Aktivität (LUC_{MW}) und der spezifischen Luziferase-Aktivität einer Transfektion (LUC_i) ergab einen für jede Transfektion spezifischen Korrekturfaktor (F_i):

$$(19) F_i = \frac{LUC_{MW}}{LUC_i}$$

Der spezifische GUS-Wert (GUS_i) einer Transfektion wurde mit dem zugehörigen spezifischen Korrekturfaktor F_i multipliziert, so dass ein standardisierter, korrigierter GUS-Wert (GUS_{ki}) erhalten wurde:

$$(20) GUS_{ki} = F_i \cdot GUS_i$$

Der Mittelwert von GUS_{ki} einer Transfektionsreihe (die Werte von 6 Transfektionen mit dem gleichen Konstrukt) war die spezifische, standardisierte GUS'-Aktivität.

$$(21) GUS' = \frac{1}{6} \cdot \sum GUS_{ki}$$

Schließlich wurden die gemessenen GUS'-Werte auf einen Kalibratorwert normalisiert, so dass als Ergebnis der Transfektionsanalysen relative GUS'-Aktivitäten angegeben wurden:

$$(22) GUS'_{rel} = \frac{GUS'_i}{GUS'_K}$$

mit:

GUS'_i und GUS'_K : GUS'-Wert einer Probe bzw. des Kalibrators

Als Kalibrator fungierten dabei in der Regel Kontrollen ohne Effektorplasmid (Kotransfektionsexperimente) oder, bei Transfektionsexperimenten zur Lichtinduktion, die entsprechenden Dunkelproben. Der Fehler der relativen GUS'-Werte wurde mittels der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der absoluten GUS'-Werte wie folgt berechnet:

$$(23) \Delta GUS'_{rel} = \sqrt{\left(\frac{\Delta GUS'_i}{GUS'_K}\right)^2 + \left(\frac{GUS'_i \cdot \Delta GUS'_K}{(GUS'_K)^2}\right)^2}$$

mit:

$\Delta GUS'_i$, $\Delta GUS'_K$: Standardabweichung der absoluten GUS'-Aktivitäten

2.2.24. Kreuzungen bei *A. thaliana*

(Koornneef *et al.*, 1998)

Für Kreuzungen wurden Pflanzen ausgewählt, die gerade begonnen hatten zu blühen. Von einer Infloreszenz der Mutterpflanze wurden bis auf drei großen Knospen, deren Öffnung unmittelbar bevorstand, alle jüngeren Knospen sowie bereits geöffneten Blüten mit einer feinen Pinzette entfernt. Die verbliebenen Knospen wurden vorsichtig geöffnet und bis auf das Gynoëceum alle weiteren Blütenorgane entfernt. Von der als männlicher Elternteil fungierenden Pflanze wurde eine Blüte ausgewählt, die sich am selben Tag geöffnet hatte. Die Öffnung der Blüte wurde durch Quetschen mit der Pinzette an der Basis vergrößert, so dass die Antheren hervortraten. Durch leichtes Auftupfen der Staubbeutel auf die Narbe der Mutterpflanze wurde der Pollen auf diese übertragen. Die Gynoëceen wurden am folgenden Tag noch einmal mit Pollen versehen. Einsetzendes Streckungswachstum und eine leichte Rotfärbung zeigten die erfolgreiche Befruchtung an. Bei beginnender Gelbfärbung der Schoten wurden über diese kleine Papiertüten gestülpt, um so später die Samen ernten zu können.

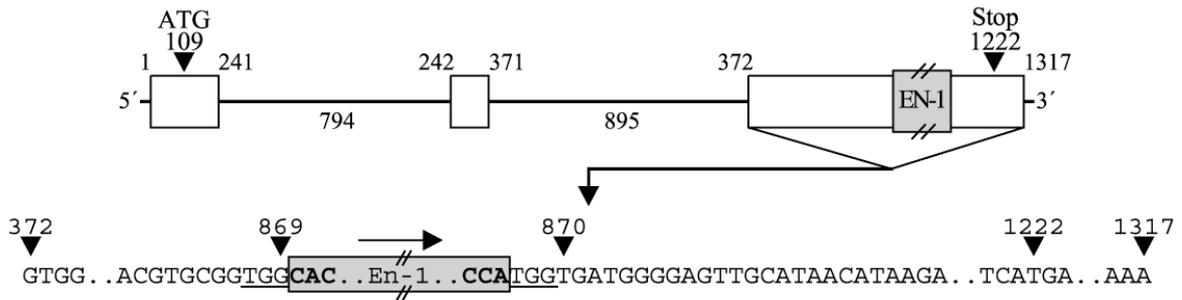
2.2.25. Gewinnung einer En-1-Transposon-freien *myb12*-Knockout-Linie

Die von H. Kranz isolierte und zu Beginn der Arbeit vorliegende homozygote *myb12*-Knockout-Linie (AT123, Abbildung 9) besaß neben einer 1-bp-Deletion im dritten Exon des Gens, welche aus der erneuten Mobilisierung des ursprünglich dort befindlichen En-1 Transposons resultierte (sogenannter Footprint), darüber hinaus im restlichen Genom weitere En-Insertionen. Die Aktivität dieser zusätzlichen Transposon-Elemente verlieh der Linie genetische Instabilität. Durch wiederholte Rückkreuzungen gegen den Col-Wildtyp (jeweils als männlicher Kreuzungspartner) konnte eine En-freie, stabile AT123-Linie generiert werden. Die Heterozygoten einer jeden Filialgeneration nach der F₁ (diese war, Mendels' erstem Gesetz folgend, uniform heterozygot) wurden mittels PCR (2.2.10.) identifiziert. Dazu wurde von mindestens 12 Pflanzen aus ca. 20 – 40 mg Blattmaterial nach dem in Abschnitt 2.2.12.3. beschriebenen Verfahren genomische DNA isoliert und als Matrize für die anschließende PCR-Analyse verwendet. Für diese wurden die, den Footprint flankierenden, Primer FM81 und FM84 eingesetzt. Das resultierende Amplikon hatte eine Größe von 260 bp. Verwendet wurde das folgende PCR-Profil: 3,5 min 94° C; 35 Zyklen: 20 s 94° C, 30 s 55° C, 30 s 72° C; 5 min 72° C. Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte (2.2.14.) konnten bezüglich des Footprints heterozygote Pflanzen an Hand der überlappenden Sequenzen von Wildtyp und Footprint-Allel identifiziert werden. Diese konnten dann für weitere Rückkreuzungen ver-

wendet werden. Nach insgesamt 5 Rückkreuzungen wurden die Pflanzen geselbstet und homozygote AT123-Pflanzen, wie oben beschrieben, mittels PCR identifiziert. Durch quantitative Echtzeit-PCR-Analysen (2.2.27.3.) unter Verwendung der Oligonukleotide FP-EN, RP-EN (PCR-Primer) und TM-EN (TaqMan[®]-Sonde) konnten im Genom dieser Pflanzen keine Kopien des En-1-Transposons mehr nachgewiesen werden.

A

MYB12-Knockout-Allel (AT123):



B

Vergleich zwischen Wildtyp- und stabilem *MYB12*-Footprint-Allel:

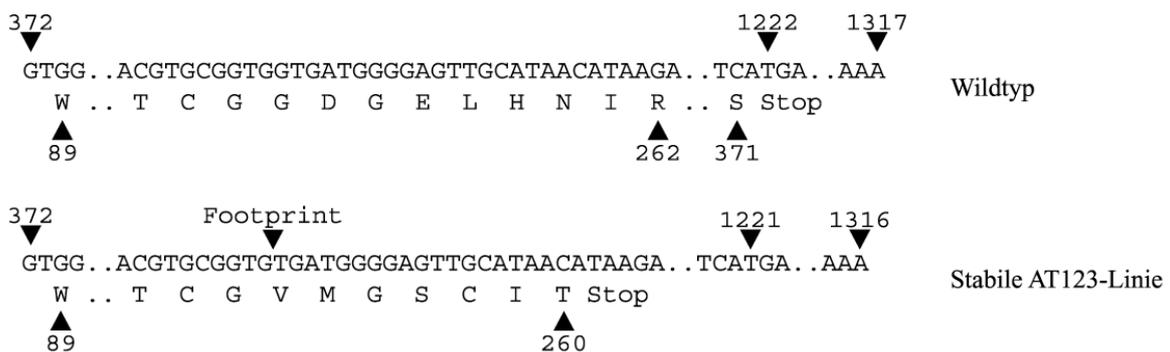


Abb. 9: Genomische Struktur des *myb12*-Knockout-Allels. A: Schematische Gesamtübersicht und partielle Struktur des dritten Exons der ursprünglich isolierten *myb12*-Knockout-Linie AT123. Weiße Balken symbolisieren Exons, die sie verbindenden Linien Introns. Die Zahlenangaben oberhalb der Exons geben die Nukleotidposition, gerechnet vom Transkriptionsstart, an. Den Zahlen unterhalb der Introns ist deren Länge zu entnehmen. Die En-1-Transposon-Insertion fand zwischen den Nukleotiden 869 und 870 statt. Die duplizierten Nukleotide der 3 bp-Zielsequenz des En-1-Transposons sind durch Unterstreichung markiert. Der Pfeil oberhalb des Transposons gibt dessen Orientierung an. B: Vergleich der Nukleotid- und Proteinsequenz von Wildtyp und *myb12*-Footprint-Linie. Die Darstellung beschränkt sich auf das dritte Exon. In der stabilen *myb12*-Knockout-Linie AT123 führt die Deletion des Guanyls an Position 869 zur vorzeitigen Termination der Proteinsynthese. Das *myb12*-Knockout-Protein umfasst lediglich 260 Aminosäuren gegenüber den 371 des Wildtyps. Außerdem ist die Sequenz der letzten 7 Aminosäuren auf insgesamt 6 Positionen im Vergleich zur Wildtypsequenz verändert.

2.2.26. Kartierung des MYB12-Gens unter Verwendung von RI-Linien

(Lister und Dean, 1993)

Die für diese Kartierung benutzten RI-Linien wurden durch die Kreuzung der Accessionen Col und Landsberg *erecta* (*Ler*) von C. Lister und C. Dean (1993) hergestellt. Die Samen einer F₁-Pflanze wurden ausgesät und die Nachkommen der F₂-Generation selbstbestäubt. Die hieraus resultierenden Samen wurden wieder ausgesät und anschließend die Mitglieder der dritten Filialgeneration geselbstet. Diese Prozedur wurde bis zur F₈ wiederholt durchgeführt. 100 der aus Samen dieser Generation stammenden F₉-Pflanzen wurden dann hinsichtlich der Segregation von 64 vorher veröffentlichten RFLP-Markern (Chang *et al.*, 1988; Nam *et al.*, 1989) charakterisiert. Die Segregationsmuster wurden mit Hilfe des Computerprogramms MapMaker analysiert und so die Reihenfolge der einzelnen Marker auf den fünf Chromosomen von *A. thaliana* identifiziert.

Ausgehend von den die Kartierungspopulation darstellenden 100 RI-Linien sollte im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation des *MYB12*-Gens im Genom von *A. thaliana* bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ein im zweiten Intron des *MYB12*-Genes auftretender AFLP („Amplified fragment length polymorphism“) zwischen den Accessionen Col und *Ler* verwendet. Das von den Primern FM35 und FM36 definierte Amplikon war für die Accession Col 47 bp kürzer (508 bp) als für die Accession *Ler* (555 bp). Jeweils 1 µl genomischer DNA von insgesamt 100 RI-Linien sowie der beiden Wildtyp-Linien (Accession Col bzw. *Ler*) dienten als Matrize für eine spezifische PCR-Amplifikation des Bereichs des zweiten Introns des *MYB12*-Gens, welcher den AFLP aufwies. Verwendet wurde folgendes PCR-Profil: 3,5 min 94° C; 35 Zyklen: 30 s 94° C, 30 s 55° C, 1,5 min 72° C; Finale Extension: 7 min 72° C. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. So konnte für die einzelnen RI-Linien bezüglich des *MYB12*-Intronfragmentes das Vorliegen entweder der Sequenz der Accession Col oder die der Accession *Ler* festgestellt werden. Heterozygoten wurden durch die Anwesenheit sowohl der Col- als auch der *Ler*-spezifischen Amplifikate identifiziert. Die so gewonnenen RI-Daten wurden zur Auswertung auf elektronischem Wege an die Arbeitsgruppe von Sean May an der Universität von Nottingham übermittelt. Die Genlokalisierung wurde durch die Verwendung des MapMaker-Computerprogramms berechnet.

2.2.27. Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die relative Quantifizierung spezifischer mRNA-Spezies und damit der Expression der entsprechenden Gene erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Systems der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). Design und Auswahl der verwendeten Sonden-/Primer-Systeme wurden nach Herstellerangaben mittels des Software-Pakets PrimerExpress[®] (Version 1.5.) derselben Firma durchgeführt. Für die Post-PCR-Datenanalyse wurde die SDS (Sequence Detection System) Software Version 1.7. (Applied Biosystems) sowie das Tabellen-Kalkulationsprogramm Excel[®] der Firma Microsoft (Unterschleißheim) verwendet.

2.2.27.1. Probenvorbereitung für die quantitative Echtzeit-RT-PCR

Der äußerst sorgfältigen Probenvorbereitung kommt im Rahmen der quantitativen Echtzeit-RT-PCR eine besondere, zentrale Bedeutung für die Generierung aussagekräftiger, reproduzierbarer Ergebnisse zu. Insbesondere ist es notwendig zu gewährleisten, dass eventuelle Kontaminationen der RNA-Matrize für die Reverse Transkription mit genomischer DNA vermieden bzw. beseitigt werden. Dieser Punkt ist auch bei der Verwendung cDNA-spezifischer Sonden relevant, da, eigenen Beobachtungen zufolge, auch in diesen Fällen nicht immer eine Signalgenerierung auf genomischen DNA-Matrizen unterbleibt. Außerdem kann die TaqMan[®]-Sonde für die als endogene Referenz gewählte 18S-rRNA natürlich nicht cDNA-spezifisch sein, was bei Anwesenheit genomischer DNA-Kontaminationen zu systematischen Fehlern bei der Standardisierung führt.

2.2.27.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Aus kleinen Mengen pflanzlichen Ausgangsmaterials (< 500 mg) wurde die Gesamt-RNA mittels des „RNeasy-Midi-Kits“ der Firma Qiagen[®] (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Stünden größere Mengen Pflanzenmaterial zur Verfügung, wurde auf die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Dunsmuir *et al.* (1988) zurückgegriffen. Dabei wurden ca. 5 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in ein Kunststoff-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 50 ml (Firma Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland), in dem 10 ml RNA-Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,5; 100 mM NaCl; 20 mM EGTA; 2 % SDS) und 10 ml Phenol vorgelegt worden waren, überführt. Nach 5-minütigem Mischen auf einem Überkopf-Schüttler wurden 5 ml Chloroform hinzugegeben und erneut 5 min wie vorher geschüttelt. Nach Zentrifugation

(Minifuge, 5000 rpm, 10 min, 4° C) zur Trennung der Phasen wurde der die RNA enthaltende, wässrige Überstand in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt, welches bereits 10ml Phenol enthielt. Extraktion und Phasentrennung erfolgten wie zuvor und wurden noch ein weiteres Mal wiederholt. Die wässrige RNA-Phase wurde zur Beseitigung von Phenol-Resten einmal mit 10ml Chloroform extrahiert. Nach der Zentrifugation zur Phasentrennung wurde der Überstand zur Fällung der Nukleinsäuren mit 2,5 Vol. absolutem Ethanol und 0,1 Vol. 3 M NaAc pH 5,2 versetzt und 20 min bei -80° C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Minifuge, 5000 rpm, 30 min, 4° C) wurde der Überstand verworfen und das RNA-haltige Pellet in 5 ml DEPC-Wasser gelöst. Zur Präzipitation der RNA wurde die Lösung mit 5 ml 4 M LiCl-Lösung versetzt, mindestens 3 h auf Eis inkubiert und die RNA durch Zentrifugation wie zuvor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 2ml DEPC-Wasser gelöst und die RNA durch Ethanol/Salz-Behandlung wie zuvor gefällt. Die RNA wird durch erneute Zentrifugation pelletiert und das Pellet in 200 µl DEPC-Wasser gelöst. RNA-Quantität und -Qualität wurden photometrisch bestimmt. Alternativ zur photometrischen Quantifizierung wurden RNA-Konzentrationen auch mittels des fluorogenen Farbstoffs RiboGreen[®] (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt (2.2.2.).

2.2.27.1.2. DNaseI-Restriktion von Gesamt-RNA

Zur Eliminierung von Verunreinigungen genomischer DNA in Gesamt-RNA-Präparationen wurde eine DNaseI-Restriktion durchgeführt:

10 µl Gesamt-RNA (max. 10 µg RNA)

4 µl Erststrang-Puffer (250 mM Tris/HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; Invitrogen)

5 µl DNaseI (2,7 Kunitz-Einheiten/µl; Qiagen)

1 µl RNase-freies Wasser

= 20 µl Gesamtvolumen

Die Ansätze wurden bei 37° C für 45 min inkubiert. Die Hitze-Inaktivierung des DNaseI-Enzyms erfolgte durch Inkubation bei 65° C für 20 min.

2.2.27.1.3. LiCl-Fällung der DNaseI behandelten Gesamt-RNA

Um die Gesamt-RNA-Präparationen von letzten Resten verunreinigender genomischer DNA zu befreien, wurde die wie in 2.2.27.1.2. behandelte Gesamt-RNA einer LiCl-Fällung unterzogen. LiCl präzipitiert spezifisch RNA, DNA und Proteine werden nur sehr ineffektiv gefällt. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. LiCl (5 M, sterilfiltriert) zu den Gesamt-RNA-Proben. Nach kurzem Mischen erfolgte die Fällung für mindestens 30 min bei -20°C . Der Fällung folgte ein Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C , 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 3 M NaAc pH 5,6 gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 4°C , 5 min). Dieser Wasch-Schritt wurde mit 70 %igen EtOH (auf -20°C temperiert) wiederholt. Abschließend wurde das RNA-Präzipitat im Vakuum getrocknet und dann in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.27.1.4. Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Synthese des cDNA-Erststranges wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

RNA (max. 5 μg)

4 μl Erststrang-Puffer

2 μl MgCl_2 (50m M)

1 μl dNTPs (je 10m M)

2 μl DTT (0,1 M)

1 μl Superscript™ II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (200 Einheiten)

0,5 μl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

0,5 μl "Random"-Hexamere (50 ng/ μl)

RNase-freies Wasser ad 20 μl

Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 10 min bei RT und dann 30 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Hitzebehandlung inaktiviert (10 min 70°C).

2.2.27.2. Quantifizierung der endogenen 18S-rRNA-Referenz

Als endogene Referenz zur Normalisierung der Genexpression diene in allen Fällen die in den Proben enthaltene Menge an 18S-rRNA. Nach Herstellerangaben wurden hierzu die fertig vorgemischten, sogenannten 18S-PDAR (18S-rRNA-Pre-developed TaqMan[®] Assay Reagents) der Firma Applied Biosystems verwendet. Diese beinhalten neben der für die 18S-rRNA bzw. deren reversen Transkript spezifischen TaqMan[®]-Sonde (am 5'-Ende mit dem Farbstoff VIC[®] und am 3'-Ende mit TAMRA markiert) auch die für die PCR-Reaktion benötigten 5'- und 3'-Primer. Angaben des Herstellers zufolge, besitzt das 18S-rRNA-Amplikon eine Länge von 187 bp und kann, wegen seines hohen Konservierungsgrades, für quantitative Echtzeit-RT-PCR-Experimente bei allen höheren Eukaryoten zur Standardisierung eingesetzt werden.

Für die PCR-Reaktionen wurde stets folgender Ansatz pipettiert:

12,5 µl Platinum[®]-Quantitative PCR SuperMix-UDG (2fach konzentriert)

1,25 µl 18S-PDAR (20fach konzentriert)

0,5 µl ROX (5-Carboxy-X-Rhodamin; 25µM)

5 µl cDNA-Matrize

5,75 µl Wasser

= 25 µl Gesamtvolumen

Folgendes PCR-Profil wurde verwendet:

2 min 50° C

2 min 95° C

30 Zyklen á

15 s 95° C

1 min 60° C

2.2.27.3. Quantifizierung der relativen Genexpression spezifischer Zielgene

Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

12,5 µl Platinum[®]-Quantitative PCR SuperMix-UDG

5'-PCR-Primer: 900 nM Endkonzentration

3'-PCR-Primer: 900 nM Endkonzentration

TaqMan[®]-Probe: 200 nM Endkonzentration

5 µl DNA-Matrize

0,5 µl ROX

RNase-freies Wasser ad 25 µl

Folgendes PCR-Profil wurde verwendet:

2 min 50° C

2 min 95° C

40 Zyklen á

15 s 95° C

1 min 60° C

Die Anwendung des Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf Gleichung (11) und (12) lieferte die zugehörigen Fehlerwerte:

$$(24) \Delta R_{\text{Norm}} = \sqrt{\left(\frac{\partial R_{\text{Norm}}}{\partial C_t^{\text{Ref}}} \cdot \Delta C_t^{\text{Ref}}\right)^2 + \left(\frac{\partial R_{\text{Norm}}}{\partial C_t^{\text{Ziel}}} \cdot \Delta C_t^{\text{Ziel}}\right)^2} = \ln 2 \cdot R_{\text{Norm}} \cdot \sqrt{\left(\Delta C_t^{\text{Ref}}\right)^2 + \left(\Delta C_t^{\text{Ziel}}\right)^2}$$

mit:

ΔC_t^{Ref} , ΔC_t^{Ziel} : Standardabweichung der Mittelwerte von C_t^{Ref} bzw. C_t^{Ziel}

∂ : partielle Ableitung

Daraus folgt für den Fehler der relativen Genexpression (R):

$$\Delta R = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial R_{\text{Norm}}^{\text{P}}} \cdot \Delta R_{\text{Norm}}^{\text{P}}\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial R_{\text{Norm}}^{\text{K}}} \cdot \Delta R_{\text{Norm}}^{\text{K}}\right)^2} =$$

$$(25) \ln 2 \cdot R \cdot \sqrt{\left(\Delta C_t^{\text{P(Ziel)}}\right)^2 + \left(\Delta C_t^{\text{P(Ziel)}}\right)^2 + \left(\Delta C_t^{\text{K(Ref)}}\right)^2 + \left(\Delta C_t^{\text{K(Ziel)}}\right)^2}$$

2.2.27.4. Bestimmung der PCR-Effizienz der verwendeten TaqMan[®]-Systeme

Die Effizienz der verwendeten TaqMan[®]-Systeme wurde ermittelt, indem serielle Verdünnungen einer geeigneten cDNA-Matrize zur Generierung einer Standardkurve verwendet wurden. Die Zahl der eingesetzten Verdünnungen betrug stets 4. Die gemessenen C_t-Werte wurden in einem Koordinaten-System (Ordinate) gegen den *Logarithmus naturalis* der Verdünnungsfaktoren (Abszisse) aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgerade durch die Messpunkte wurde mit Hilfe von Gleichung (8) (Abschnitt 1.5.3.1.) die PCR-Effizienz des Systems berechnet. Die Fehlerberechnung erfolgte mittels des Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes:

$$(26) \Delta E = \sqrt{\left(\frac{\partial E}{\partial m} \cdot \Delta m\right)^2} = \frac{e^{\frac{1}{m}}}{m^2} \cdot \Delta m$$

mit:

Δm : Fehler der Steigung der Regressionsgeraden (mit Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet)

2.2.28. HPLC-Analyse methanolischer Pflanzenextrakte

2.2.28.1. Gewinnung methanolischer Extrakte aus Pflanzenmaterial

Zu 100 – 200 mg Pflanzenmaterial wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäßen 300 µl 80 %igen Methanols sowie einige Zirkonium-Kügelchen (Ø 1 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugefügt. Die Proben wurden in einem Mini Beads Beater (BioSpec Products Inc., Bartlesville, USA) auf höchster Stufe für mindestens 1min homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für mindestens 15 min bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut mit 300 µl 80 %igen Methanols versetzt und wie zuvor zentrifugiert. Die Überstände wurden dann mittels einer „SpeedVac“ (ThermoSavant, Holbrook, USA) im Vakuum getrocknet. Die trockenen Pellets wurden daraufhin in 100 µl 80 %igen Methanols, welches 0,02 % (=200 µg/ml) Naringenin enthielt, pro 100 mg Ausgangsmaterial gelöst. Das Naringenin diente als interner Standard zur relativen Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Phenylpropanoide (insbesondere Flavonole und Sinapatester).

2.2.28.2. HPLC-Analyse

Die Analyse methanolischer Pflanzenextrakte erfolgte unter Verwendung des HPLC Systems 522 sowie dem „Diode Array Detektor“ 540 der Firma Bio-Tek Kontron (Winooski, USA). Eine sogenannte „Reversed Phase“-Chromatographie-Säule der Bezeichnung Nucleosil® 120-5 C18 250/2mm, der Firma Macherey-Nagel (Düren) wurde zur analytischen HPLC eingesetzt. Das Gradientenprofil für die beiden verwendeten Lösungsmittel Wasser (0,1 % TFA) und 98 % Acetonitril (0,1 % TFA) hatte folgendes Aussehen:

Zeit [min]	% Acetonitril
3	6
12	18
25	25
35	100
40	100

Die Flussrate betrug 0,35 ml/min. Die Säule war konstant auf 30° C temperiert.

Die Bedienung der HPLC-Anlage wurde von P. Bednarek durchgeführt.

2.2.28.3. Auswertung der HPLC-Ergebnisse

Anhand ihrer UV-Spektren konnten verschiedene Sinapatester, sowie Derivate der Flavonole Quercetin und Kämpferol in den Chromatogrammen identifiziert werden. Die Fläche eines Peaks in einem HPLC-Chromatogramm ist proportional zur Menge der durch ihn repräsentierten Substanz. Durch die Verwendung des internen Standards Naringenin war es möglich die Peakflächen und damit die Substanzmengen aus verschiedenen Proben miteinander in Relation zu setzen, war die Menge an zugesetztem Naringenin in jeder Probe gemessen an dem zur Extraktion eingesetzten Pflanzenmaterial doch konstant. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen. Zudem wurde die komplette Analyse ein zweites Mal mit unabhängig von der ersten Analyse gewonnenem Material wiederholt („biologisches Replikat“). Die HPLC-Ergebnisse repräsentieren folglich insgesamt 6 Messungen. Die relative Substanzmenge S_R errechnete sich für die verschiedenen identifizierten Substanzen wie folgt:

$$(27) S_R = \frac{\overline{A}_i}{\overline{A}_{\text{Nar}_i}} = \frac{\frac{1}{6} \cdot \sum_{i=1}^6 A_i}{\frac{1}{6} \cdot \sum_{i=1}^6 A_{\text{Nar}_i}}$$

mit:

S_R : Relative Substanzmenge

\overline{A}_i : Mittelwert der Peakflächen für eine identifizierte Substanz

$\overline{A}_{\text{Nar}_i}$: Mittelwert der Peakflächen für den Naringenin-Standard

A_i : Peakfläche für eine identifizierte Substanz

A_{Nar_i} : Peakfläche für den Naringenin-Standard

Der Fehler von S_R (ΔS_R) ergab sich durch Anwendung des Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes:

$$(28) \Delta S_R = \sqrt{\left(\frac{\partial S_R}{\partial \overline{A}_i} \cdot SD(\overline{A}_i) \right)^2 + \left(\frac{\partial S_R}{\partial \overline{A}_{\text{Nar}_i}} \cdot SD(\overline{A}_{\text{Nar}_i}) \right)^2}$$

somit:

$$(29) \Delta S_R = \sqrt{\left(\frac{SD(\overline{A}_i)}{\overline{A}_{\text{Nar}_i}} \right)^2 + \left(\frac{\overline{A}_i \cdot SD(\overline{A}_{\text{Nar}_i})}{(\overline{A}_{\text{Nar}_i})^2} \right)^2}$$

mit:

ΔS_R : Fehler von S_R

∂ : partielle Ableitung

SD: Standardabweichung des Mittelwertes

2.2.29. Färbereaktion mit Naturstoffreagenz A

(Sheahan und Rechnitz, 1992; Sheahan und Rechnitz, 1993)

Die spezifische Fluoreszenz, welche die Interaktion von Naturstoffreagenz A mit Flavonoiden hervorruft, wird durch Chlorophyllfluoreszenz überdeckt. Um diese Störung zu vermeiden, wurden die zu untersuchenden Pflanzen auf einem Herbizid angezogen, das die Karotinoidbiosynthese behindert. Durch das Fehlen dieser Schutzpigmente des Photosyntheseapparates ergrünen entsprechend behandelte Keimlinge nicht. *A. thaliana*-Samen wurden 6 Tage lang in Petrischalen in einem Licht-Thermostat (Firma RUMED-Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) bei 21° C Lufttemperatur, 60 % relativer Luftfeuchte und kontinuierlicher Bestrahlung mit Weißlicht (100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) auf Whatman-Papier gekeimt, das mit einer 3 ppm Lösung des Herbizids Norflurazon (Novartis, Frankfurt) getränkt war. Die gebleichten

Keimlinge wurden für 2 h in eine 0,25 %ige Lösung von Naturstoffreagenz A (Diphenylbor-säure-2-Aminoethylester) in $3,75 \cdot 10^{-3}$ % Triton X-100 überführt. Nach dieser Behandlung wurden sie an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot; Zeiss, Oberkochen; Anregung, 365 nm; Filterteiler, 395 nm; Emission, 420 nm) betrachtet und fotografiert.

2.2.30. Photometrische Anthocyan-Bestimmung

(modifiziert nach Kubasek *et al.*, 1992; Rabino und Mancinelli, 1986)

Keimlinge wurden wie beschrieben (2.1.5.) angezogen. Nach 5-tägiger Inkubation erfolgte die Extraktion der Anthocyane. Ca. 300 mg frischen Pflanzenmaterials wurden eingewogen und mit 1 ml sauren Methanol (1 % HCl, w/v) versetzt. Die Extraktion erfolgte für 18 h unter mäßigem Schütteln bei Raumtemperatur. Zur Sedimentation des Pflanzenmaterials wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 20° C, 1 min). Zu jeweils 400 µl des Überstandes wurden 600 µl des zur Extraktion verwendeten sauren Methanols gegeben. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionen der Proben bei 530 und 657 nm Wellenlänge mittels eines Spektral-Photometers (UVIKON922, Firma Bio-Tek Kontron). Die Messungen wurden gegen das Extraktionsmittel als Nullwert ausgeführt. Mit folgender Formel wurden die Anthocyane quantifiziert (Mancinelli und Schwartz, 1984):

$$(30) Q_{\text{Ant}} = \frac{A_{530} - 0,25 \cdot A_{657}}{M}$$

mit:

Q_{Ant} : Maß für den auf die Menge eingesetzten Pflanzenmaterials normalisierten Anthocyan-Gehalt

A_{530} : Absorption bei 530 nm

A_{657} : Absorption bei 657 nm

M: Einwaage frischen Pflanzenmaterials [g]

Alle Proben wurden als Triplikate und zwar von zwei unabhängigen biologischen Replikaten gemessen. Der Mittelwert aus diesen 6 Einzelmessungen wurde als Endergebnis für den Anthocyan-Gehalt angegeben. Die zugehörigen Standardabweichungen wurden als Fehlerwerte eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Transfektionsanalysen zur funktionellen Charakterisierung von MYB12

Die transiente Genexpression in transfizierten At7-Protoplasten stellt ein leistungsfähiges System zur Funktionsanalyse von Transkriptionsregulatoren, insbesondere Aktivatoren, dar. Bereits früher gemachte erste Beobachtungen zur MYB12-Funktion konnten durch die Anwendung dieses experimentellen Ansatzes erweitert und vertieft werden.

3.1.1. MYB12 ist kein Aktivator der *F3'H*-Reporter-Expression

Die Kotransfektionsexperimente zur MYB12-Funktion als Aktivator der *F3'H*-Expression zeigten, dass dieses Reporterkonstrukt (1291 bp-Promotorfragment fusioniert an den *uidA*-ORF des β -Glucuronidase-Gens) nicht durch das MYB12-Protein aktivierbar war. Damit waren alle getesteten Promotoren der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene mit Ausnahme von *DFR* und *F3'H* durch MYB12 induzierbar. Die Ergebnisse der *F3'H*-Kotransfektionsexperimente, sowie zum Vergleich bereits früher erzielte Resultate (Mehrrens; 1999) für die anderen Promotorkonstrukte, sind in Abbildung 10 dargestellt. Neben MYB12 kamen auch die heterologen, aus *Z. mays* stammenden, MYB-Transkriptionsfaktoren *ZmP* und *ZmC1* sowie das zur Klasse der bHLH-Faktoren gehörende Protein *ZmSn* als Effektoren zum Einsatz. In *Z. mays* sind diese Faktoren bekanntermaßen an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt und können diese Funktion prinzipiell auch im *A. thaliana*-Zellkultursystem ausüben. Wie MYB12, so konnten auch diese Effektoren keine Aktivierung des *F3'H*-Reporters bewirken.

Die Analyse des *F3'H*-Promotors vervollständigt das Bild über die Regulation der Flavonoidbiosynthese im *A. thaliana*-Zellkultursystem durch MYB12. Die bereits früher von mir gemachte Beobachtung, dass MYB12 und *ZmP* nicht nur strukturell, sondern auch funktionell, sehr ähnlich sind, wurde durch die Tatsache, dass beide Faktoren nicht als Aktivator der *F3'H*-Expression wirkten, noch verstärkt. Tatsächlich bestand vollständige Kongruenz in den Aktivierungsmustern beider Effektoren. Auch die Kombination von *ZmC1* und *ZmSn* brachte keinerlei Aktivierung der *F3'H*-Transkription. Das Gen *F3'H* scheint also innerhalb des Flavonoid-Stoffwechselwegs ein Punkt differentieller Regulation zu sein, ebenso wie das *DFR*-

und *FLS*-Gen. Ersteres war unter den gewählten experimentellen Bedingungen ausschließlich durch *ZmC1/ZmSn*, letzteres praktisch nicht durch diese Faktoren aktivierbar.

Diese Ergebnisse waren in voller Übereinstimmung mit der Rolle von *ZmC1/ZmSn* als Regulatoren der Anthocyanbiosynthese, für welche weder die *FLS*- noch die *F3'H*-Funktion (zumindest zur Produktion von Pelargonidin-Derivaten) benötigt werden.

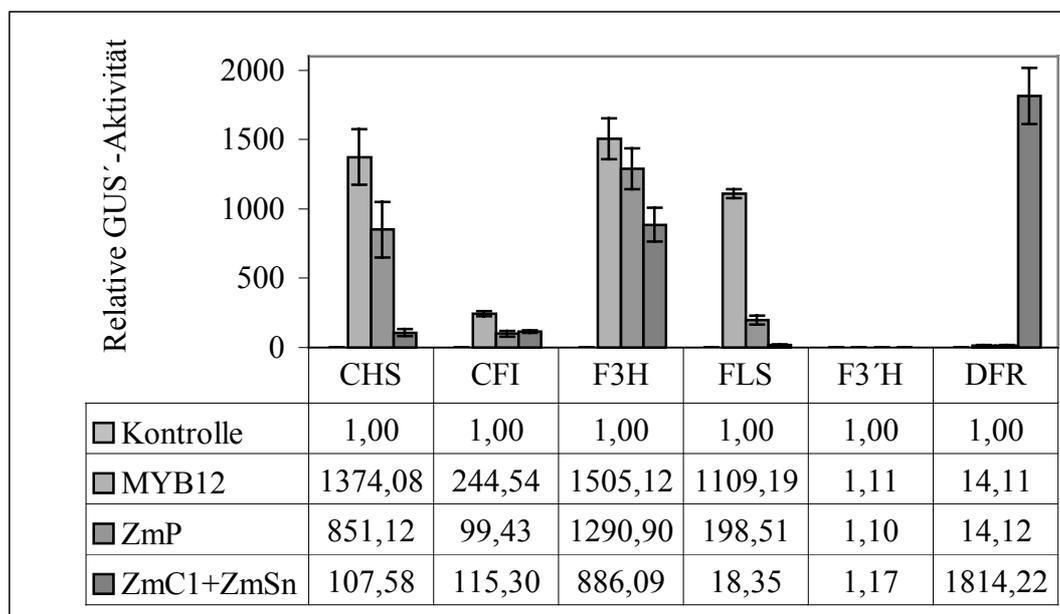


Abb. 10: Übersicht der Kotransfektionsergebnisse für MYB12 als Regulator der Flavonoidbiosynthese. Keiner der getesteten Effektoren war in der Lage die Expression des *F3'H*-Reporterkonstrukts zu aktivieren. Die Abszissenbeschriftung verweist auf die den einzelnen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese entsprechenden Promotorkonstrukte; die verwendeten Effektorstrukture sind ebenfalls der Datentabelle zu entnehmen. Als Kontrolle wurden solche Kotransfektionsansätze bezeichnet, die keinerlei Effektorplasmid beinhalteten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 20 h und erfolgte im Dunkeln. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug $6800 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Die Ergebnisse für alle Promotoren außer dem des *F3'H*-Genes sind bereits in meiner Diplomarbeit (1999) beschrieben und sind zu Übersichtszwecken hier mitaufgeführt.

3.1.2. MYB12 als Aktivator des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels

Eine Rolle von MYB12 auch in anderen Abschnitten des Phenylpropanoidstoffwechsels neben der Flavonoidbiosynthese im engeren Sinne wurde bereits durch die MYB12-Aktivierbarkeit des *4CL3*-Promotors in, während meiner Diplomarbeit durchgeführten, transienten Expressionsstudien belegt. Die Promotoren der weiteren am sogenannten allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel beteiligten Gene sollten gleichfalls auf ihre MYB12-Aktivierbarkeit hin untersucht werden. Abbildung 11 zeigt zusammengefasst die Resultate dieser Kotransfektionsexperimente. Wie sich zeigte, waren auch andere Promotoren von Strukturgenen des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels durch MYB12 aktivierbar. Dieses waren neben dem *4CL3*-Promotor die Promotoren des *PAL1*, *PAL2*, *PAL4* und des *C4H*-Gens. Keine MYB12-Aktivierung war für die Promotorkonstrukte des *PAL3*, *4CL1* sowie des *4CL2*-Gens nachweisbar. Die anscheinend extrem starke Aktivierung des *4CL3*-Promotors durch MYB12 bzw. die relativ dazu schwächer ausgeprägte Induktion der anderen Gene, erklärt sich durch die unterschiedlichen absoluten GUS'-Werte der jeweiligen Kontrollen. Insbesondere die *PAL1*-, *PAL2*-, *PAL4*- und die *C4H*-Kontrolle wiesen eine um den Faktor 20 – 30 höhere Hintergrundaktivität als die *4CL3*-Kontrolle auf, was zu den drastisch unterschiedlichen relativen GUS'-Werten führte. *ZmC1/ZmSn* zeigten generell ein ähnliches Aktivierungsmuster wie MYB12, jedoch war das Ausmaß der Induktion wesentlich schwächer ausgeprägt als für MYB12 beobachtet. Aufgrund der oben beschriebenen sehr niedrigen Hintergrundaktivität des *4CL3*-Promotorkonstruktes scheint eine tatsächliche Aktivierung dieses Promotors durch *ZmC1/ZmSn* nicht vorzuliegen.

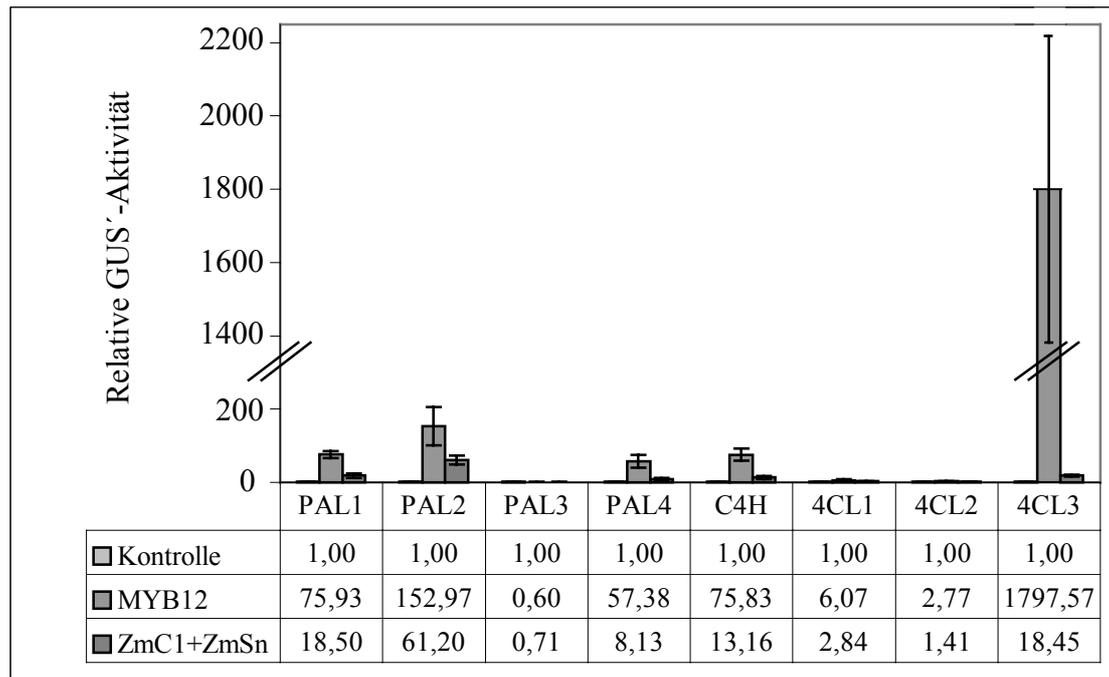


Abb. 11: Ergebnisübersicht der Kotransfektionsanalysen zur Aktivierbarkeit der Promotoren der Strukturgene des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels. Die Abszissenbeschriftung verweist auf die den einzelnen Strukturgenen des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels entsprechenden Promotorkonstrukte; die verwendeten Effektorstrukturen sind ebenfalls der Datentabelle zu entnehmen. Als Kontrolle dienten Kotransfektionsansätze, die keinerlei Effektorplasmid enthielten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 20 h und erfolgte im Dunkeln. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug $6300 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Die Ergebnisse für den *4CL3*-Promotor sind bereits früher in meiner Diplomarbeit beschrieben worden und sind hier zu Vergleichszwecken mitaufgeführt.

3.1.3. MYB12 als Regulator der Sinapinsäuresynthese

Ein weiterer Abschnitt des Phenylpropanoidmetabolismus sollte mit der Transfektionsanalyse zweier an der Synthese von Sinapinsäure bzw. deren Derivaten, wie Sinapinsäureestern, beteiligten Genen auf eine mögliche regulatorische Rolle von MYB12 hin untersucht werden. Die beiden aus diesem Biosyntheseweg ausgesuchten Vertreter waren *F5H* sowie *OMT* (Abbildung 2). Wie die Abbildung 12 zeigt, wurden beide Promotorkonstrukte weder von MYB12 noch von der Kombination *ZmC1/ZmSn* in nennenswertem Umfang aktiviert.

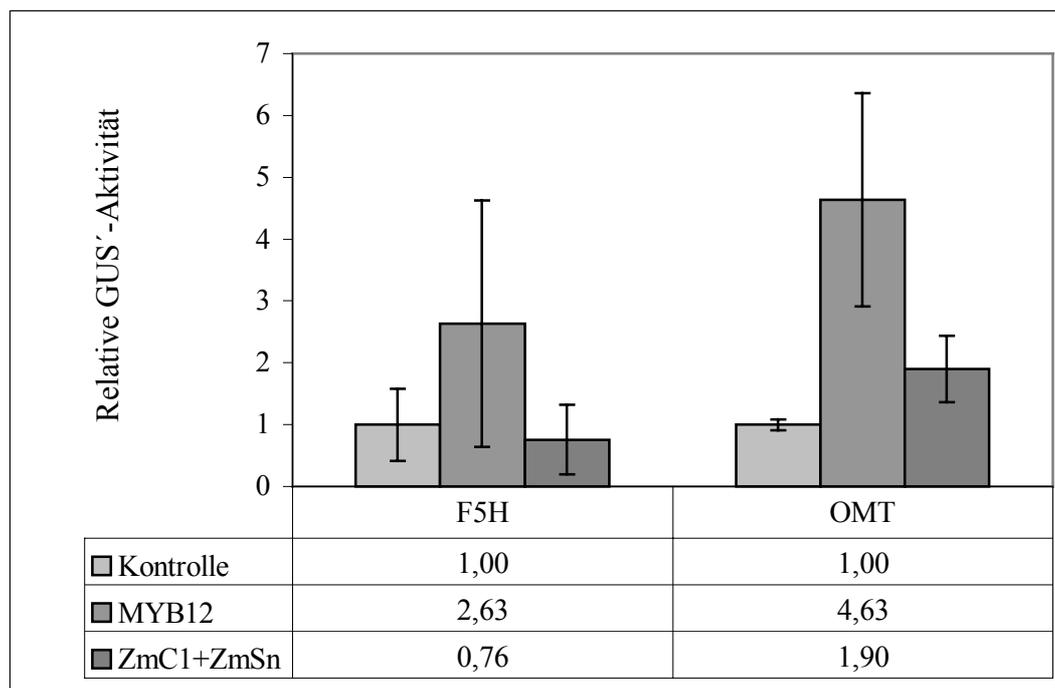


Abb. 12: Kotransfektionsanalyse zweier an der Sinapinsäure-Synthese beteiligter Gene. Die hier gezeigten Resultate waren das Ergebnis von lediglich vier und nicht wie sonst üblich sechs Versuchswiederholungen. Die Abszissenbeschriftung verweist auf die den beiden getesteten Strukturgenen der Sinapinsäure-Synthese entsprechenden Promotorkonstrukte; die verwendeten Effektorstrukture sind ebenfalls der Datentabelle zu entnehmen. Als Kontrolle dienen Kotransfektionsansätze, die keinerlei Effektorplasmid enthielten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 20 h und erfolgte im Dunkeln. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug $49600 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

3.1.4. Identifizierung der an der MYB12-vermittelten Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors beteiligten *cis*-Elemente

Ziel dieser Transfektionsanalysen war die Identifikation von für die MYB12-Funktion relevanten Promotor-Elementen. Die Untersuchungen wurden beispielhaft am gut charakterisierten *CHS*-Minimalpromotor durchgeführt. Eingesetzt wurden vier verschiedene Promotorvarianten, der Wildtyp-Minimalpromotor, sowie drei Varianten mit Blockmutationen in MRE, ACE oder RRE. Getestet wurde nicht allein die MYB12-Reponsivität der verschiedenen Promotorkonstrukte, sondern auch deren Induzierbarkeit durch UV-Licht, sind ACE und MRE doch die Konstituenten der sogenannten „Light regulatory unit“ (LRU), welche die UV-abhängige Aktivierung des *CHS*-Promotors vermitteln (vergl. Abschnitt 1.5.).

Wie Abbildung 13 zeigt, war für eine Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors durch MYB12 das Vorhandensein eines intakten MRE absolut notwendig. Die Ausschaltung dieses Elements ließ die Induktion auf Werte unter 1 % des Wildtyp-Niveaus fallen, wurde also praktisch komplett eliminiert. Der gleiche Effekt konnte auch für *ZmP* beobachtet werden. Da das MRE die Bindungsstelle für MYB-Faktoren innerhalb des Minimalpromotors ist, entsprachen diese Resultate den Erwartungen. Die Blockmutationen in den beiden anderen untersuchten *cis*-Elementen zeigten dagegen keine vergleichbaren Auswirkungen, allerdings ging auch hier die relative GUS'-Aktivität etwas zurück, blieb aber mit Werten um 1000 noch immer sehr hoch. Die Bedingung für die Aktivierung des *CHS*-Promotors durch *ZmC1/ZmSn* war, ebenfalls der Erwartung entsprechend, die Anwesenheit von einem funktionierenden MRE als auch RRE. Die Blockierung der C1-Bindung an das MRE, genauso wie die Verhinderung der Sn-Bindung an das RRE, führten zum fast vollständigen Verlust der Aktivierung. Die Mutation des ACE (Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der bZIP-Klasse) hatte hingegen keine Auswirkung auf die Induktion durch *ZmC1/ZmSn*. Eine Steigerung der Reporteraktivität als Folge einer Bestrahlung der Proben mit UV-Licht konnte nur dann festgestellt werden, wenn sowohl MRE als auch ACE intakt waren, was auf die Beteiligung von MYB- und bZIP-Faktoren an der UV-Antwort schließen lässt. Das RRE spielte in diesem Zusammenhang keinerlei Rolle. Interessanter Weise war die Promotorvariante mit dem defekten MRE durch eine Kombination von MYB12 und Licht in begrenztem, aber signifikantem Umfang aktivierbar, was durch MYB12 oder den Lichtstimulus allein nicht möglich war. Der gleiche Trend zeigte sich auch bei dem zu MYB12 sehr ähnlichen Faktor *ZmP*, nicht aber bei *ZmC1/ZmSn*.

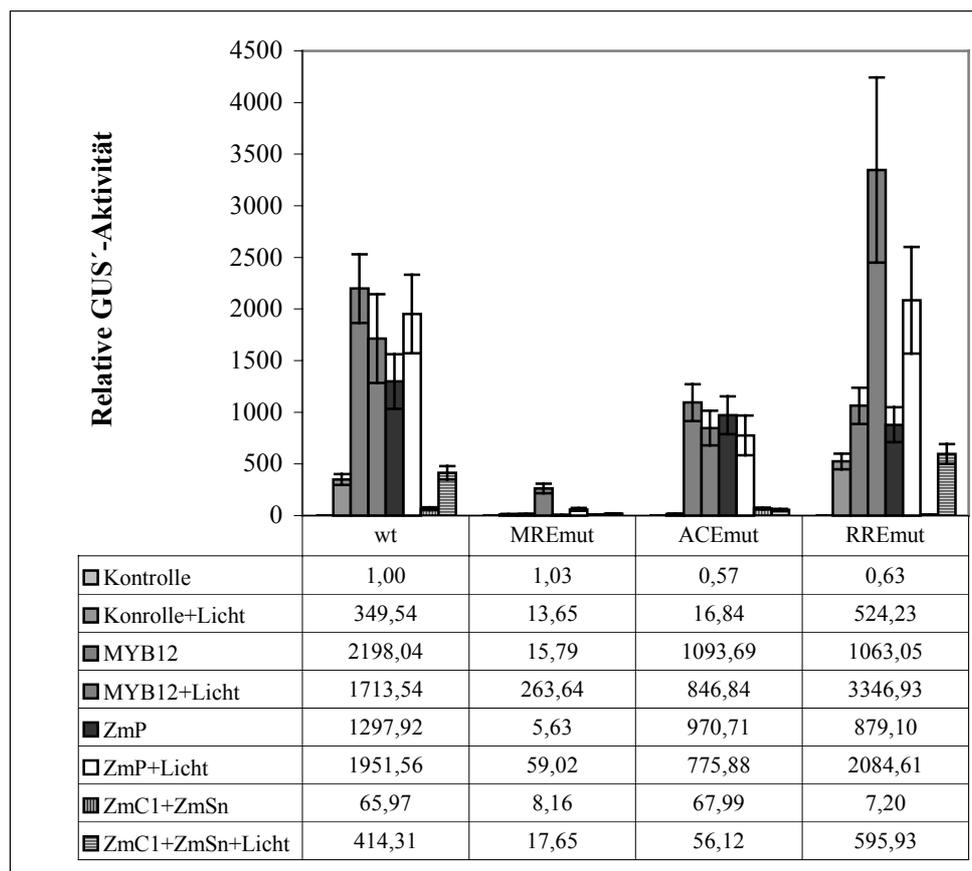


Abb. 13: Zusammenfassung der Transfektionsresultate zur Identifikation relevanter *cis*-aktiver Elemente für die Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors durch MYB12. Die Abszissenbeschriftung gibt die jeweils in den Reporterkonstrukten verwendete Promotorvariante an. Der Datentabelle sind die zugehörigen Effektoren für die einzelnen Transfektionen zu entnehmen. Dabei bedeutet der Zusatz „+Licht“, dass die Proben unter UV-haltigem Weißlicht, und nicht wie die anderen in Dunkelheit, inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Kotransfektionsansätze, die keinerlei Effektorplasmid enthielten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 8 h. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug im Dunkeln $7600 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ und im Licht $7400 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Abkürzungen: wt, Wildtyp-Version des *CHS*-Minimalpromotors; MREmut, Promotorvariante mit Blockmutation im MRE; ACEmut, Promotorvariante mit Blockmutation im ACE; RREmut, *CHS*-Minimalpromotor mit Blockmutation im RRE.

3.1.5. Das *myb12*-Knockout-Allel ist nicht funktionell

Gezeigt werden sollte, dass die für diese Arbeit verwendete Knockout-Variante des *MYB12*-Gens (*AT123*) nicht länger für einen aktiven Transkriptionsfaktor kodiert. Ein Effektor-konstrukt, welches den *AT123*-ORF enthielt (Abbildung 9) wurde deshalb auf seine Transaktivierungseigenschaften für die Strukturgene der Flavonoidbiosynthese parallel zum Wildtyp-Allel getestet. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse in der Übersicht.

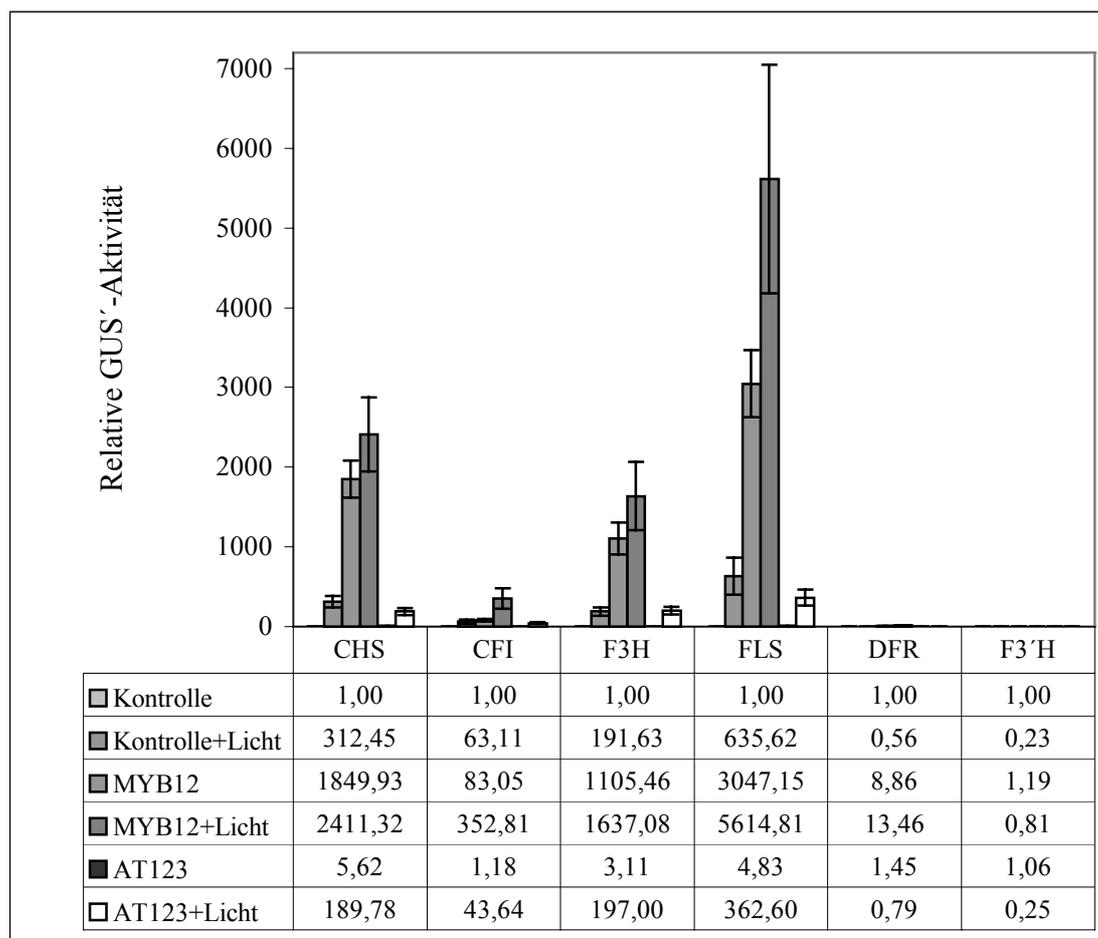


Abb. 14: Das *myb12*-Knockout-Allel (*AT123*) ist nicht funktionell. Die Abszissenbeschriftung verweist auf die den einzelnen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese entsprechenden Promotorkonstrukte; die verwendeten Effektorstrukture sind ebenfalls der Datentabelle zu entnehmen. Dabei bedeutet der Zusatz „+Licht“, dass die Proben unter UV-haltigem Weißlicht, und nicht wie die anderen in Dunkelheit, inkubiert wurden. Die Bezeichnung AT123 steht für das Effektor-konstrukt, welches den *myb12*-Knockout-ORF trägt. Als Kontrolle dienten Kotransfektionsansätze, die keinerlei Effektorplasmid enthielten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 8 h. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug im Dunkeln $4500 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$ und im Licht $7300 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

Das AT123-Protein wirkte auf keines der getesteten Promotorkonstrukte aktivierend. Die relativen GUS'-Werte bewegten sich dabei für alle MYB12-responsiven Promotoren nur minimal über denen der entsprechenden Kontrollen ohne Zugabe von Effektorplasmiden. Damit

konnte die Transaktivierungsdomäne von MYB12 im C-terminalen Drittel des Proteins lokalisiert werden, welches in der Knockout-Variante des Faktors fehlt (Abbildung 9). Weiterhin fiel auf, dass die Induktion durch UV-Licht bei Anwesenheit des AT123-Proteins für die Promotoren von *CHS*, *CFI* und *FLS* um 30-40 % geringer ausfiel als ohne Effektor.

3.1.6. Die UV-Induzierbarkeit der *F3'H*- und *DFR*-Reporterkonstrukte

Obiger Abbildung 14 ist auch zu entnehmen, dass weder die Promotorkonstrukte von *F3'H*, noch von *DFR*, im Gegensatz zu denen der sogenannten „frühen“ Gene innerhalb des Flavonoidbiosyntheseweges, im At7-Zellkultursystem UV-induzierbar waren. *F3'H* und *DFR* zeigten also auch hier die schon für die Aktivierung durch MYB12 beobachtete differentielle Regulation.

3.1.7. Die UV-Induzierbarkeit des *MYB12*-Reporterkonstrukts und Definition eines

MYB12-Minimalpromotors

Pilot-Experimente zeigten, dass ein 1219 bp-Promotorfragment des *MYB12*-Gens eine starke Erhöhung der Reporterexpression nach Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht vermittelte. Eine Deletionsserie basierend auf diesem ursprünglichen Promotorfragment sollte verwendet werden, um einen operationalen, für die UV-Induktion hinreichenden, *MYB12*-Minimalpromotor zu definieren. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Die erste signifikante UV-Induktion war bei dem Promotorfragment von 403 bp Länge festzustellen. Die relativen GUS'-Aktivitäten der längeren Promotor-Varianten änderten sich in Vergleich zu diesem kaum noch. Als operationaler Minimalpromotor des *MYB12*-Gens wurde aus diesem Grund das 403 bp-Fragment definiert. Die für die UV-Induzierbarkeit des *MYB12*-Promotors hinreichenden *cis*-aktiven Elemente konnten folglich im Bereich zwischen 259 bp und 403 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert werden.

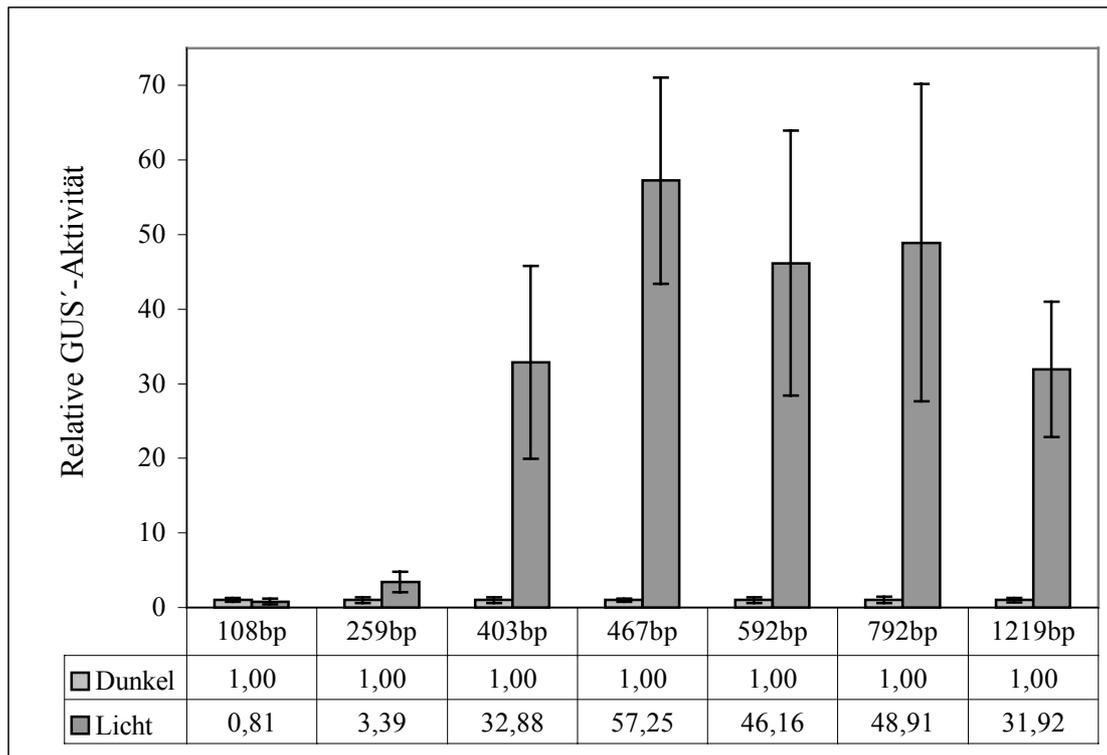


Abb. 15: Induktion einer Serie von *MYB12*-Promotordeletionskonstrukten durch Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht. Die Abszissenbeschriftung gibt die Länge, gerechnet ab dem Translationsstart, der verwendeten Promotorfragmente an. Die Inkubationszeit der Proben betrug 8 h. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug im Dunkeln $1600 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$ und im Licht $2000 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

3.1.8. MYB111 aktiviert die gleichen Promotorkonstrukte wie MYB12

Es wurde untersucht, ob der Transkriptionsfaktor MYB111, der wie MYB12 zur selben phylogenetischen Untergruppe (Abbildung 51, Untergruppe 7; Stracke *et al.*, 2001) innerhalb der *A. thaliana*-MYB-Familie gehört, neben seiner strukturellen Verwandtschaft auch funktionelle Ähnlichkeiten zu MYB12 zeigt. Getestet wurden die Reporterkonstrukte sämtlicher Flavonoid-Strukturgene sowie das *C4H*-Gen aus dem allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel. Wie Abbildung 16 zeigt, stimmte das Aktivierungsmuster von beiden Faktoren grundsätzlich überein. Wie MYB12, war auch MYB111 in der Lage die Promotorkonstrukte aller getesteten Gene mit Ausnahme von *F3'H* und *DFR* zu aktivieren. Der Umfang der erreichten Induktion war jedoch gegenüber MYB12 deutlich vermindert, aber dennoch signifikant. Selbst hinter der anscheinend sehr niedrigen relativen GUS'-Aktivität für das *C4H*-Reporterkonstrukt verbarg sich bei genauerer Betrachtung eine erhebliche Aktivierung, denn die Hintergrundaktivität dieses Promotor war, wie schon erwähnt, relativ hoch.

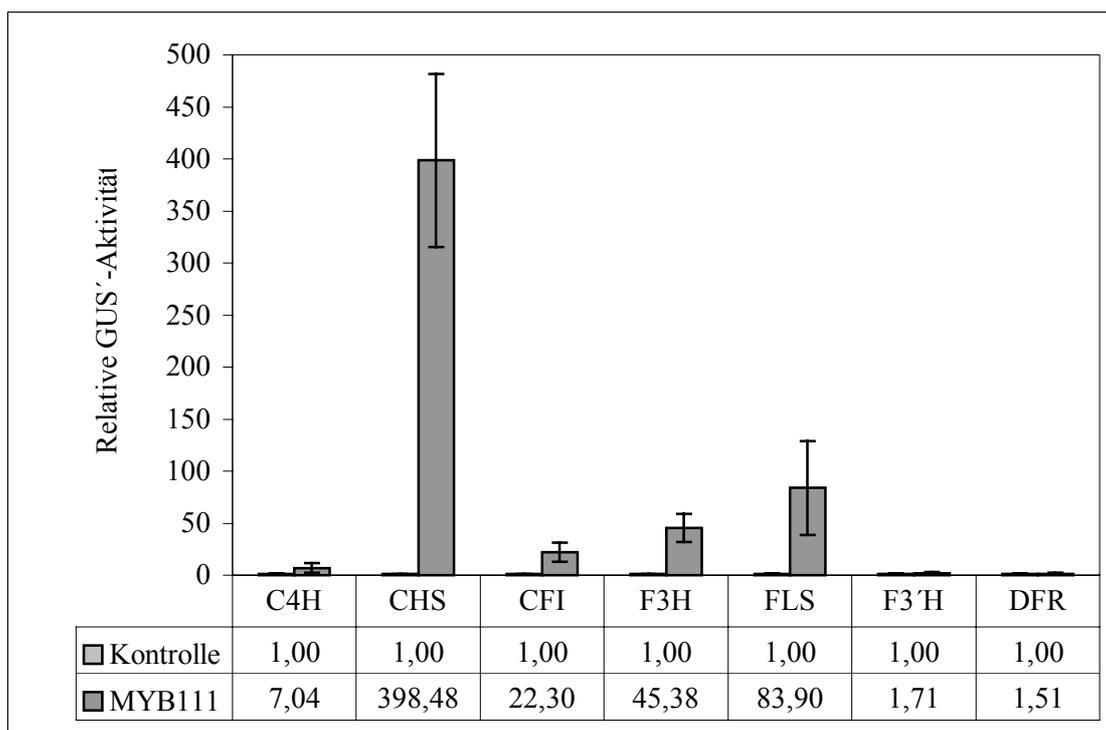


Abb. 16: MYB111 als Aktivator der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Gene. Die Abszissenbeschriftung verweist auf die den einzelnen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese entsprechenden Promotorkonstrukte. Als Kontrolle dienen Kotransfektionsansätze, die keinerlei Effektorplasmid enthielten. Die Inkubationszeit der Proben betrug 20 h und erfolgte im Dunkeln. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug $1700 \text{ RLU } \mu\text{g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

3.1.9. Das *MYB111*-Reporterkonstrukt ist nicht UV-induzierbar

Im Gegensatz zu seinem Paralog *MYB12* war die Reporteraktivität des *MYB111*-Promotorkonstrukts nicht durch UV-Einwirkung zu induzieren. Hinsichtlich der transkriptionellen Kontrolle der beiden Faktoren selbst konnte also, obwohl wie in Abschnitt 3.1.8. gezeigt, Hinweise auf gleiche Zielgen-Spezifität gefunden wurden, Unterschiede festgestellt werden. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der UV-Induktion des *MYB111*-Promotorkonstrukts.

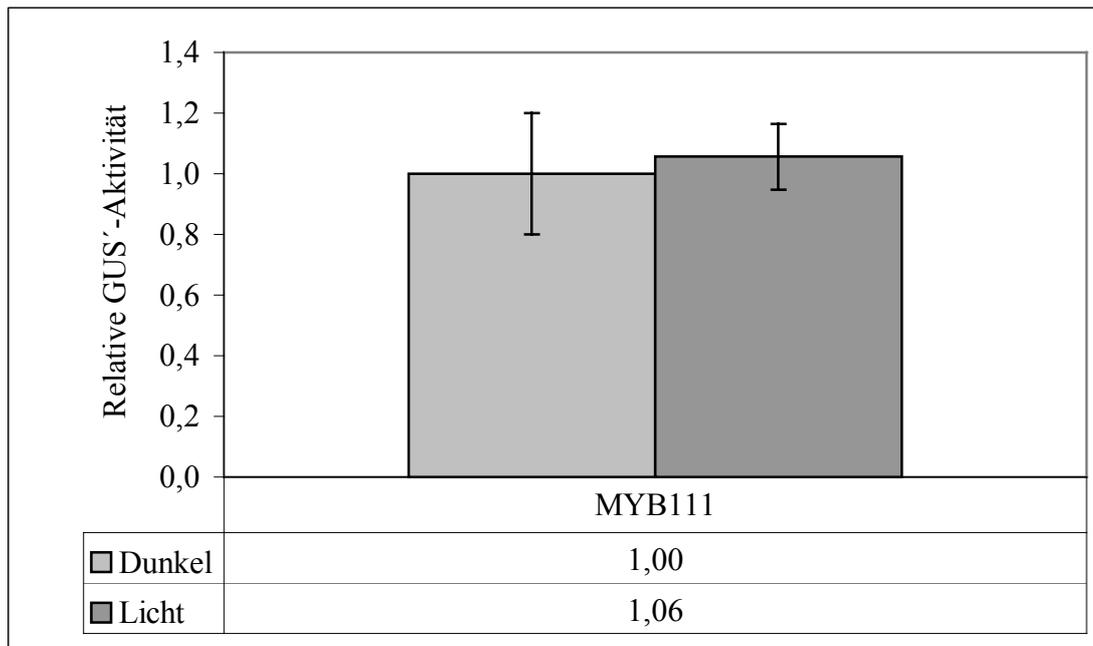


Abb. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionsanalyse zur UV-Induzierbarkeit des *MYB111*-Promotorkonstruktes. Eine UV-Induktion des Reporterkonstruktes war nicht nachweisbar. Die Inkubationszeit der Proben betrug 8 h. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivitäten betrug im Dunkeln $1900 \text{ RLU} \mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$ und im Licht $2200 \text{ RLU} \mu\text{g}^{-1} \text{sec}^{-1}$.

3.2. Quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse der Expression der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene in *A. thaliana*-Keimlingen

Die Resultate der Transfektionsexperimente bezüglich der Funktion von MYB12 als Aktivator der Flavonoidbiosynthese sollten *in planta* verifiziert werden. Dazu wurde die Genexpression der potentiellen MYB12-Zielgene in der *myb12*-Knockout-, der MYB12-Überexpressionslinie sowie in Wildtyp-Pflanzen analysiert. Verwendet wurden junge, unter Weißlicht angezogene, als auch etiolierte Keimlinge. Die Verwendung von Keimlingen erschien zweckmäßig, da in einer vorangegangenen Studie, bei der die Expressionsmuster von insgesamt 74 *A. thaliana*-MYB-Genen bestimmt wurden, eine MYB12-Expression auf signifikantem Niveau allein in belichteten Keimlingen detektiert werden konnte (Kranz *et al.*, 1998). Von Vorteil war auch die Tatsache, dass die Regulation der Flavonoidbiosynthese in sich entwickelnden Keimlingen bereits gut untersucht war.

3.2.1. PCR-Effizienzen der verwendeten TaqMan[®]-Systeme

Die Effizienzen der TaqMan[®]-Systeme zur Messung der relativen Genexpression der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene wurden wie in Abschnitt 2.2.27.4. beschrieben bestimmt. Abbildung 18 zeigt die dabei generierten Standardkurven für alle getesteten TaqMan[®]-Systeme. Aus den Geradengleichungen wurden wie beschrieben (2.2.27.4.) die Werte der PCR-Effizienzen berechnet. Abbildung 19 ist zu entnehmen, dass die PCR-Effizienzen aller getesteten Systeme, mit Werten sehr nahe 1, innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmten. Dies ermöglichte die Anwendung der in Abschnitt 1.6.3.2. erläuterten Methode zur Berechnung der relativen Genexpression für alle untersuchten Zielgene. Das TaqMan[®]-System zur Quantifizierung der En-Transposon-Kopienzahl wurde ebenfalls getestet, da es aber nicht zur relativen Quantifizierung der Genexpression, sondern lediglich zur Kontrolle der Abwesenheit von En-Transposons nach der Rückkreuzung der AT123-Linie (2.2.25.) verwendet wurde, wurde es in den beiden untenstehenden Abbildung 18 und 19 nicht mit aufgeführt. Die Effizienz dieses Systems lag mit $92,9 \% \pm 2,1 \%$ etwas unter denen der anderen Echtzeit-PCR-Systeme, was aber für den Zweck seines Einsatzes keine Rolle spielte.

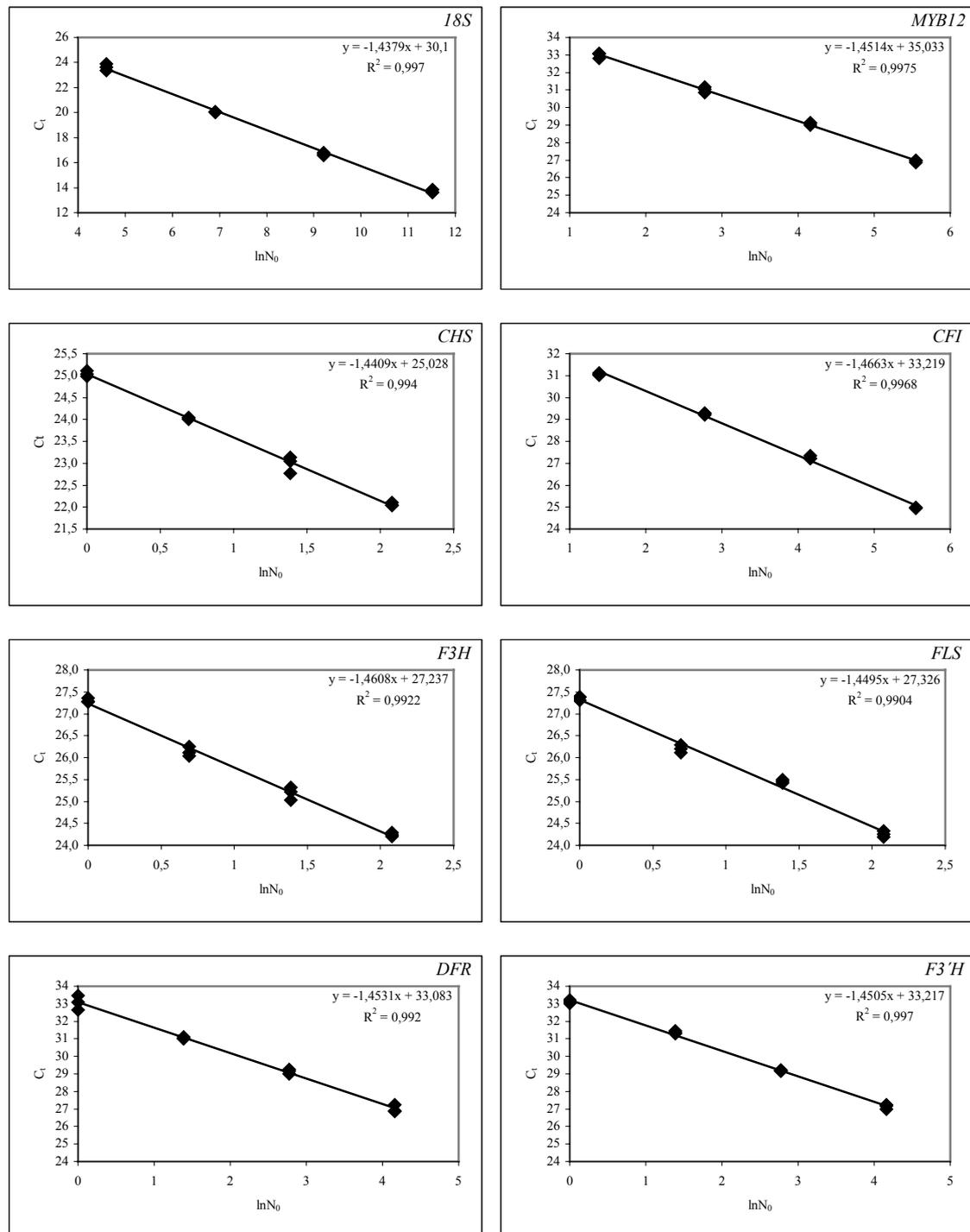


Abb. 18: Standardkurven zur Berechnung der PCR-Effizienzen der getesteten TaqMan[®]-Systeme. Für jede Gerade ist neben der Geradengleichung auch der Korrelationskoeffizient R^2 angegeben, der das Maß für die Güte der linearen Regression ist. Die Geradenanpassungen erfolgten nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

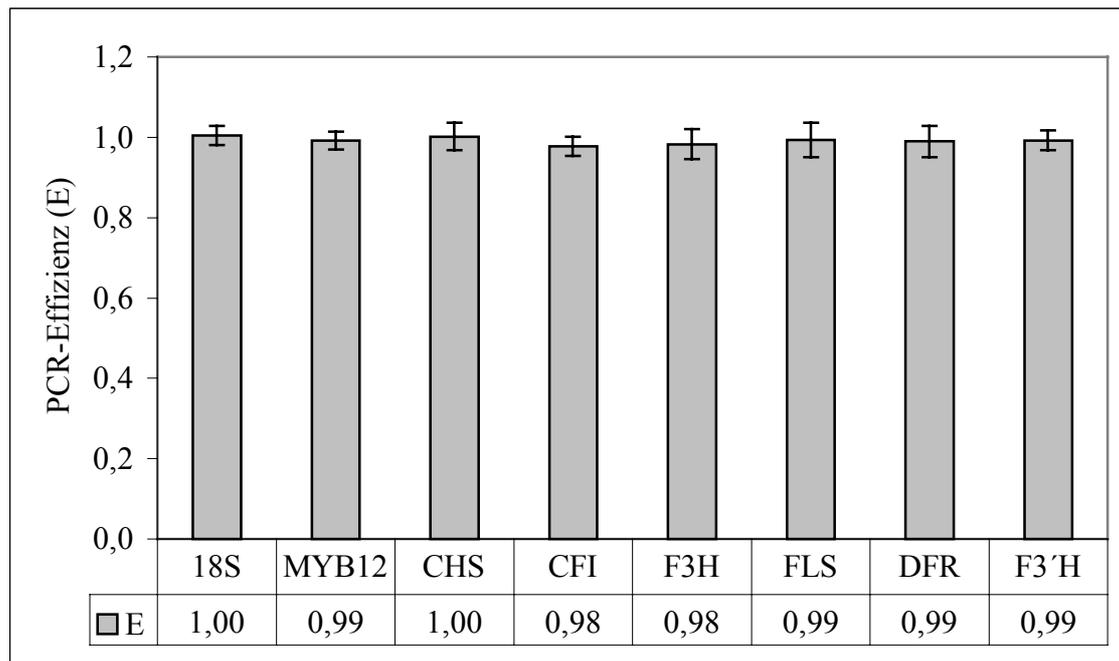


Abb. 19: PCR-Effizienzen der in der quantitativen Echtzeit-RT-PCR zur Bestimmung relativer Genexpressionen verwendeten TaqMan[®]-Systeme. Die Effizienzen errechneten sich aus den in Abbildung 16 angegebenen Steigungen der Regressionsgeraden nach der in Abschnitt 2.2.27.4. beschriebenen Methode. Die Abszissenbeschriftung gibt die Zielgene der jeweiligen PCR-Systeme an. Abkürzungen: 18S, TaqMan[®]-System des zur Normalisierung verwendeten *18S-rRNA*-Referenzgenes; E, PCR-Effizienz

3.2.2. Relative Genexpression in belichteten Keimlingen

3.2.2.1. *MYB12*-Expression

Zunächst wurde das *MYB12*-Expressionsniveau in den drei verschiedenen *MYB12*-Linien untersucht. Die Expression von *MYB12* in Wildtyp-Keimlingen variierte über den gesamten Verlauf der Kinetik in relativ engen Grenzen. Der Faktor der Schwankungsbreite betrug lediglich 2. Am 4./5. Tag der Entwicklung erreichte die relative Expression ein Maximum und fiel am letzten Tag wieder deutlich ab. Die Entwicklung der Werte für die *myb12*-Knockout-Linie war mit der des Wildtyps identisch. Auch die relativen Expressionswerte stimmten, mit Ausnahme des ersten und des letzten Wertes der Kinetik, innerhalb der Fehlergrenzen überein. Die Abweichung für Tag 2 und Tag 6 unter Berücksichtigung der Fehlerwerte war allerdings minimal. Da die gewählte *MYB12*-TaqMan[®]-Sonde nicht zwischen Wildtyp- und Knockout-Allel unterschied, waren für beide Linien von vornherein gleiche Ergebnisse erwartet worden. Sehr deutlich zu erkennen war das stark gesteigerte Expressionsniveau des Faktors in der Überexpressionslinie. Die Werte lagen bei dem 50-80 fachen des Kalibratorwerts, was die Funktionstüchtigkeit dieser Linie eindeutig belegte. Abbildung 20 fasst die *MYB12*-Expressionsdaten zusammen.

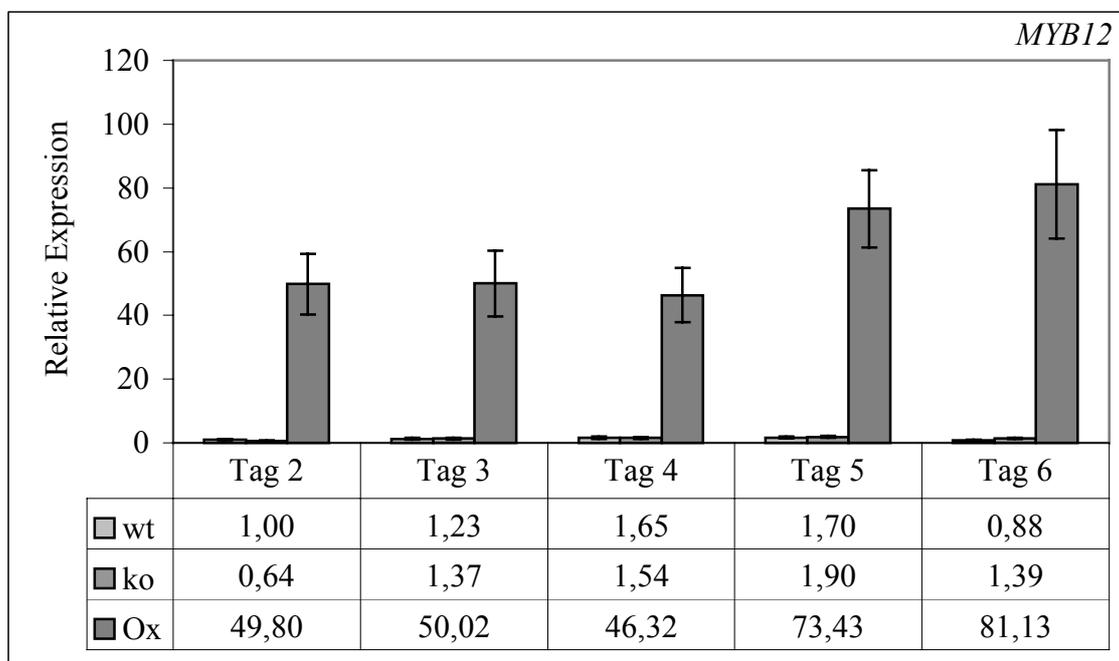


Abb. 20: Relative *MYB12*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.2. *CHS*-Expression

Die Expression des *CHS*-Gens in Wildtyp-Keimlingen folgte einem ähnlichen Verlauf wie bereits im Falle von *MYB12* festgestellt. Das Maximum lag an Tag 4 der Entwicklung. Dabei war die Steigerung der relativen Genexpression deutlicher ausgeprägt als noch für *MYB12* beobachtet (2,8 facher Kalibratorwert im Maximum). Auch in diesem Experiment fiel die *CHS*-Expression zum Ende der Kinetik wieder ab, allerdings nicht ganz auf das Kalibratorniveau. Die Unterschiede zur Wildtyp-Situation waren für die beiden Linien mit geänderter Expression von (funktionellem) *MYB12*-Protein klar erkennbar. In der *myb12*-Knockout-Linie war die detektierbare *CHS*-mRNA-Menge stark reduziert (im Durchschnitt auf etwa 25 % des Kalibratorwerts), in der Überexpressionslinie hingegen stark erhöht (ca. 4 bis 8 faches Kalibratorniveau). Interessant war auch, dass die Werte der Überexpressionslinie durchaus nicht über den gesamten Zeitraum der Kinetik konstant blieben, sondern insbesondere an Tag 4 der Entwicklung, dem Zeitpunkt, an dem die Expression in Wildtyp-Keimlingen maximal war, ein Rückgang in der relativen *CHS*-Expression zu verzeichnen war. Eine ähnliche Schwankung konnte ebenfalls im Falle der Knockout-Linie, wenn auch die Werte der relativen Genexpression von *CHS* auf sehr niedrigem Niveau lagen, bemerkt werden. Abbildung 21 gibt die gemessenen relativen Expressionswerte für das *CHS*-Gen in den drei untersuchten Linien wieder.

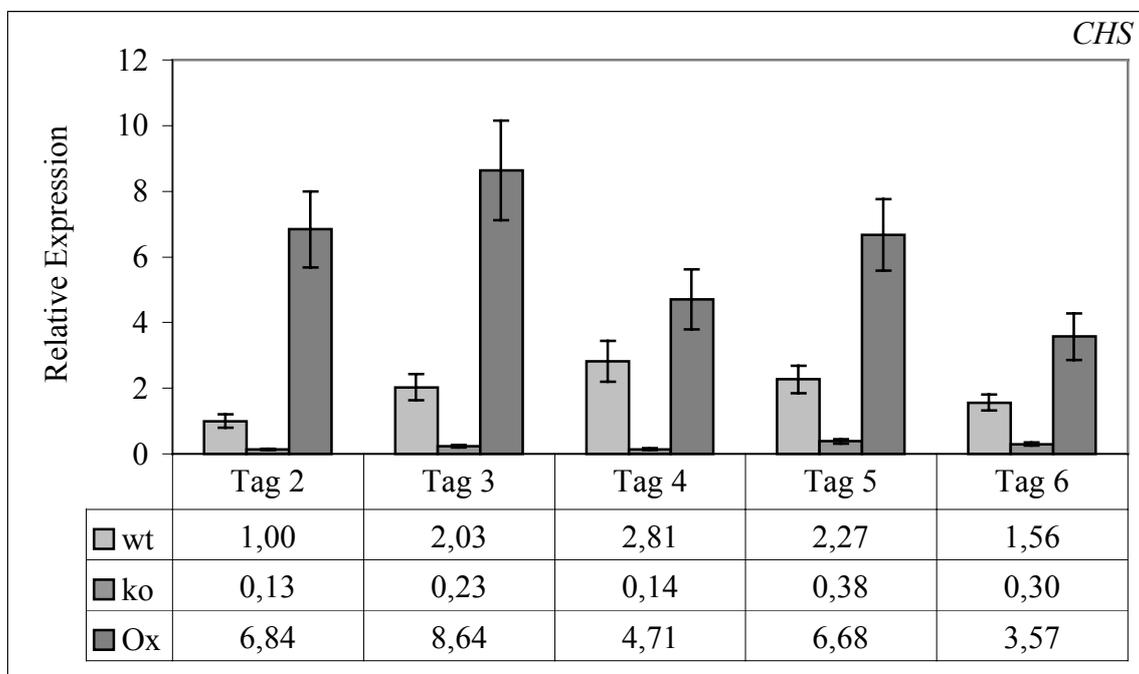


Abb. 21: Relative *CHS*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.3. CFI-Expression

Die Auswertung der in Abbildung 22 gezeigten Daten ergab, dass zur oben beschriebenen CHS-Expression einige Unterschiede, insbesondere in der myb12-Knockout-Linie, bestanden. In Wildtyp-Keimlingen konnte zunächst wieder ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der relativen CFI-Genexpression wie schon für CHS festgestellt werden. Das Maximum der Expression war für CFI jedoch um einen Tag auf den 5. Tag nach Inkubationsbeginn verschoben. Das Ausmaß der Expressionssteigerung im Vergleich zum Kalibrator (um einen Faktor 3) war praktisch identisch mit dem für CHS beobachteten Wert. Deutlichere Unterschiede zeigten sich bei der Analyse der Knockout-Linie. Die CFI-Expression war hier gegenüber dem Wildtyp nur geringfügig verändert. Der Wert für Tag 2 lag dabei unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen, nur minimal unter dem Wildtypniveau. Bis einschließlich Tag 5 konnten keinerlei signifikante Differenzen zur CFI-Expression im Wildtyp festgestellt werden, jedoch überstieg die relative Expression am letzten Tag der Kinetik den entsprechenden Wildtyp-Wert sogar. Für CFI- und CHS-Expression in der MYB12-Überexpressionslinie zeigten dagegen wieder klare Übereinstimmungen. Die relative Expression des CFI-Gens war zu allen Zeitpunkten der Kinetik erheblich gegenüber dem Wildtyp gesteigert. Der Umfang dieser Erhöhung war sogar noch wesentlich ausgeprägter als im Falle von CHS (ca. 7-17 fache Kalibratorwerte wurden erreicht). Die relativen mRNA-Mengen von CFI zeigten die gleiche zeitliche Oszillation, die zuvor schon bei der Expression von CHS in der MYB12-Überexpressionslinie zu beobachten war.

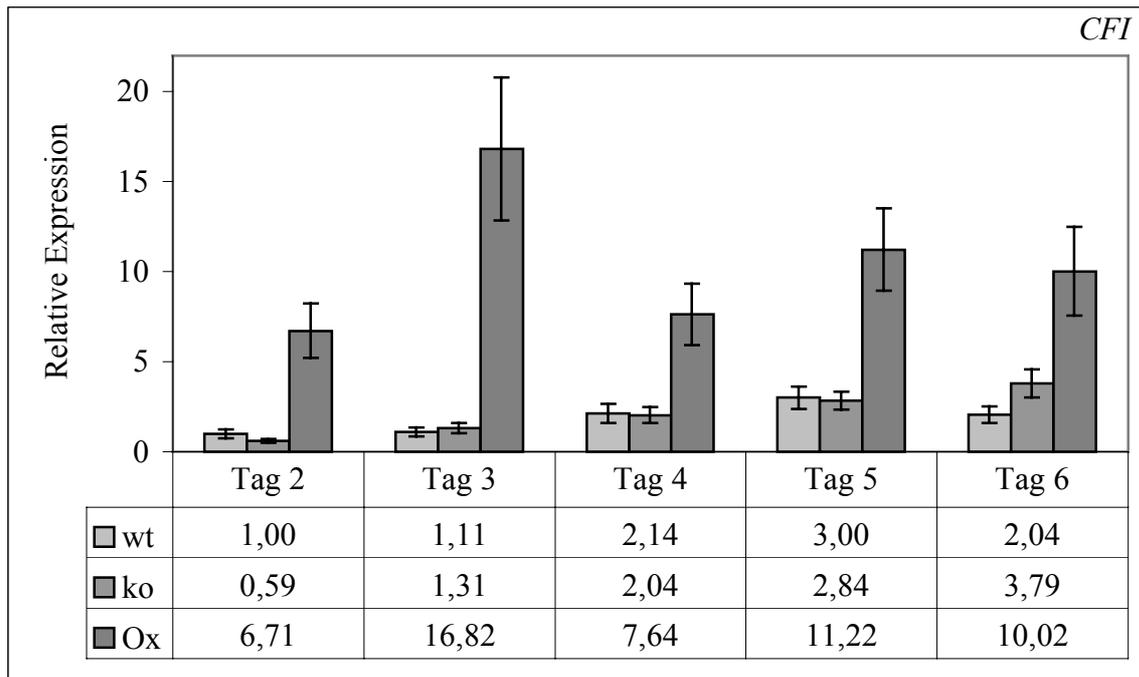


Abb. 22: Relative *CFI*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.4. *F3H*-Expression

Der Verlauf der *F3H*-Expressionskinetik gleicht im Wildtyp-Fall denen der zuvor beschriebenen Gene. Der Maximalwert lag am 5. Tag nach Inkubationsbeginn. Die *F3H*-Expression variierte hier, ähnlich zur der von *MYB12*, nur wenig (ca. 1,9 fach bezogen auf den Kalibratorwert). Wie für *CFI*, war ebenfalls kein eindeutiger Zusammenhang zwischen *MYB12*- und *F3H*-Expression in der Knockout-Linie zu beobachten. Nur die Werte an Tag 2 und 4 waren definitiv reduziert, zu allen anderen Zeitpunkten jedoch lagen sie auf Wildtypniveau. Sowohl für die Knockout- als auch die Überexpressions-Werte konnte die gleiche zeitliche Oszillation beobachtet werden. Das Minimum an Tag 4 war diesmal in der Überexpressionslinie besonders stark ausgeprägt, erreichte die relative *F3H*-Expression doch nur den Stand des Wildtyps. Ansonsten war die *F3H*-Expression in *MYB12*-überexpmierenden Keimlingen durchgängig erhöht. Die Ergebnisse der *F3H*-Expressionsanalyse sind Abbildung 23 zu entnehmen.

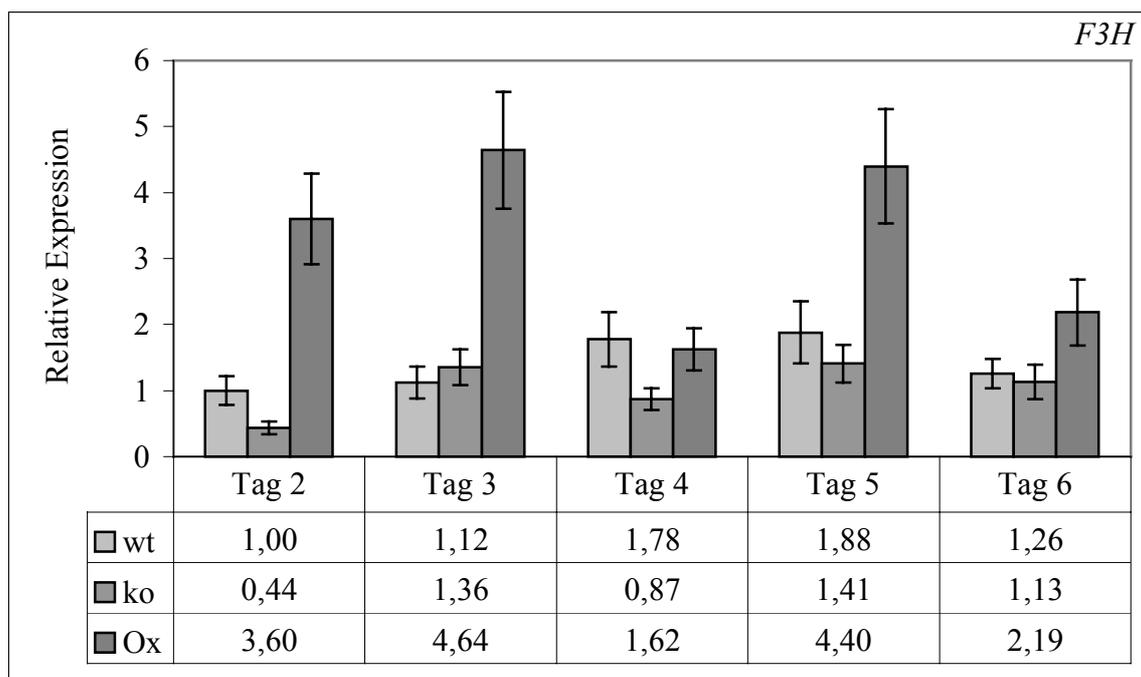


Abb. 23: Relative *F3H*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.5. *FLS*-Expression

Die Werte der *FLS*-Expression zeigten eine sehr große Übereinstimmung mit denen von *CHS*. Der Verlauf der Wildtyp-Kinetiken war in beiden Fällen beinahe identisch. Insbesondere konnte auch wieder ein Kausalnexus zwischen *MYB12*- und *FLS*-Expression festgestellt werden. Die *FLS*-Expression war in den Keimlingen der Knockout-Linie über die gesamte Zeitskala hinweg auf durchschnittlich ca. 30-40 % des Kalibratorwerts reduziert, in der *MYB12*-Überexpressionslinie jedoch erheblich erhöht, stärker sogar als für *CHS* gemessen. Die Schwankungen der Überexpressionswerte wurden in gleicher Weise wie zuvor für die anderen getesteten Gene auch für *FLS* beobachtet. Abbildung 24 zeigt den Verlauf der *FLS*-Expressionskinetiken.

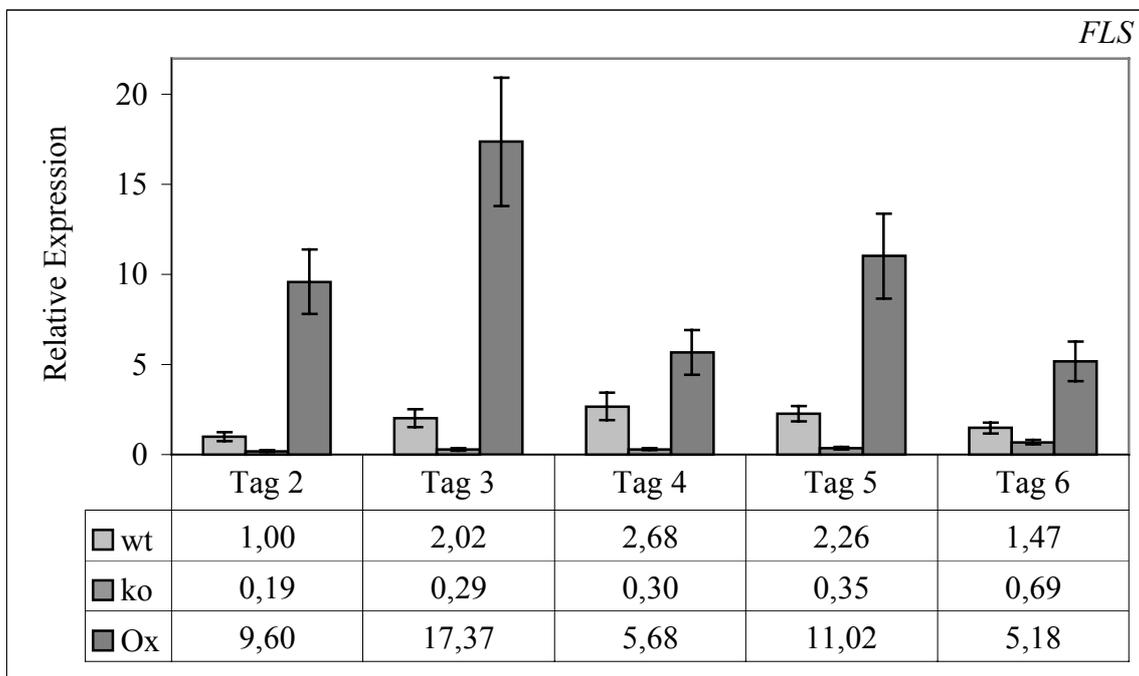


Abb. 24: Relative *FLS*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.6. *F3'H*-Expression

Die Wildtyp-Expression von *F3'H* zeigte die gleiche zeitliche Entwicklung wie die des Gens *CFI*. Das Maximum der relativen Expression war mit etwa 2,5 facher Kalibratorexpression an Tag 5 erreicht. Die Werte der Kinetik für die *myb12*-Knockout-Linie wichen mit Ausnahme von Tag 4, wo die Fehlerbalken von Wildtyp und Knockout-Wert nur sehr knapp nicht überlappten, nicht signifikant voneinander ab. Das Ausmaß des Effektes der *MYB12*-Überexpression auf die *F3'H*-Expression war der kleinste bislang beobachtete. Die relative *F3'H*-Expression erreichte hier maximal 3-4 faches Kalibratorniveau (Tag 3 und 5). An Tag 4 und an Tag 6 hingegen war keinerlei Steigerung der Genexpression messbar. Wie zuvor schon wiederholt beschrieben, zeigte auch die *MYB12*-Überexpressionskinetik von *F3'H* eine ausgeprägte wellenförmige Oszillation. In Abbildung 25 sind die *F3'H*-Expressionskinetiken für die verschiedenen *MYB12*-Linien dargestellt.

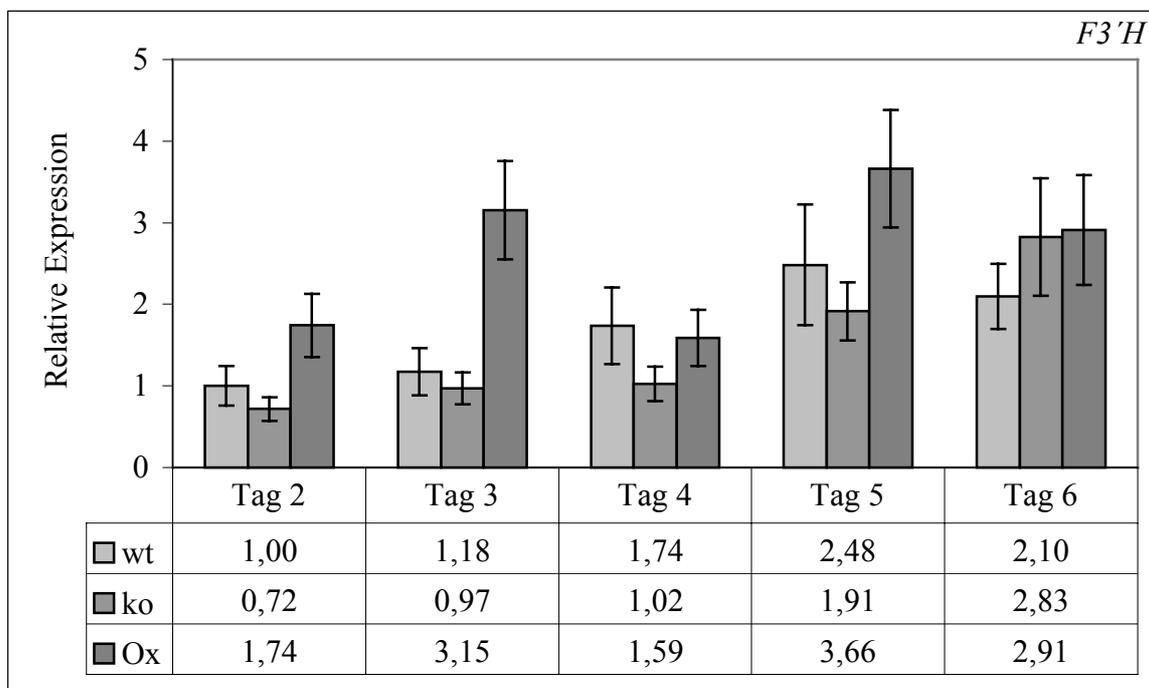


Abb. 25: Relative *F3'H*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Als Kalibrator diente die Wildtyp-Probe von Tag 2. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.2.7. *DFR*-Expression

Die Ergebnisse der *DFR*-Expressionsanalysen bedürfen einer besonderen Erläuterung. Anders als bei den übrigen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese konnte die Kalibrierung der relativen Genexpression nicht mittels der Wildtyp-Probe vom Anfang der Kinetik erfolgen. Der Grund hierfür lag in der äußerst geringen, an der Detektionsgrenze der Messmethode liegenden, Expression von *DFR* in dieser Probe. Eine Kalibrierung auf einen Wert nahe Null würde aber zur systematischen Überschätzung selbst sehr kleiner Schwankungen im Expressionsniveau führen. Um dennoch ein realistisches Bild der *DFR*-Expression wiedergeben zu können, erfolgte die Kalibrierung an Hand des *CHS*-Kalibrators (Expressionswert am Tag 2 nach der Inkubation). In Wildtyp-Keimlingen war keine messbare *DFR*-Expression vorhanden. Gleiches galt auch während der ersten drei Tage der Kinetik für die Knockout- und die *MYB12*-Überexpressionslinie. Am Tag 5 der Keimlingsentwicklung jedoch war eine signifikante, im Falle der Überexpressionslinie wesentlich ausgeprägtere, transiente Expression des *DFR*-Gens zu verzeichnen. Die Werte für beide Linien fielen nur einen Tag später wieder drastisch ab, jedoch nicht ganz zurück auf das Niveau der ersten Tage der Kinetik. Der Abbildung 26 sind die Ergebnisse der relativen *DFR*-Expression zu entnehmen.

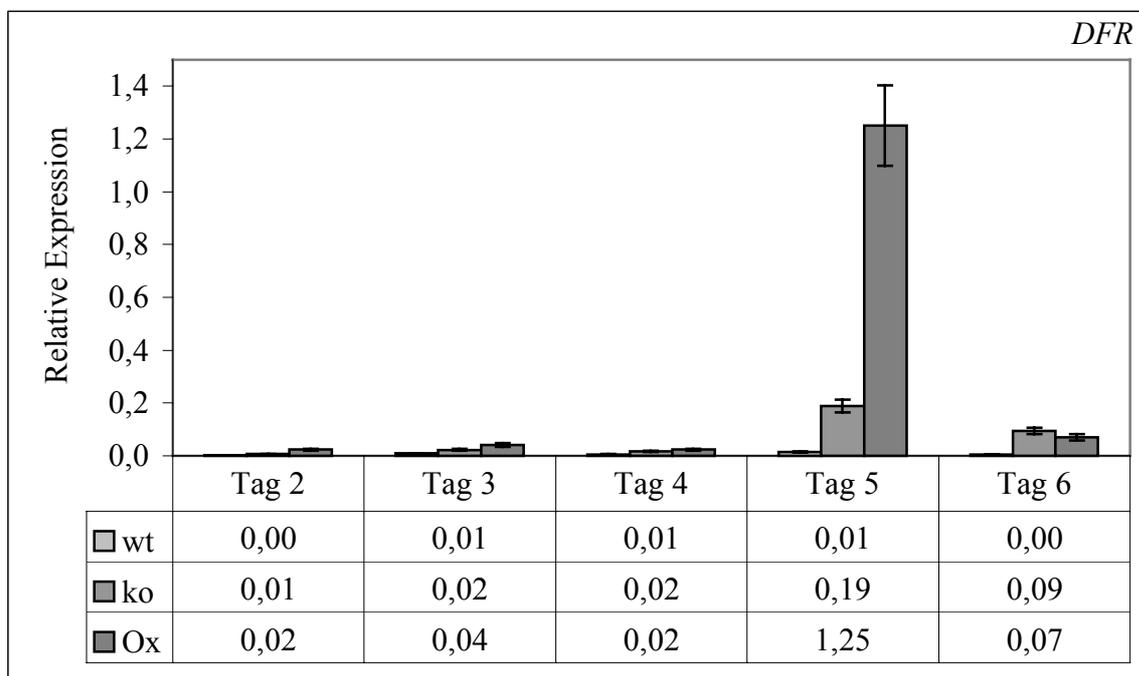


Abb. 26: Relative *DFR*-Expression in belichteten, jungen Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Wegen des äußerst geringen *DFR*-Expressionsniveaus wurden alle Werte auf die *CHS*-Expression in 2 Tage alten Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3. Relative Genexpression in etiolierten Keimlingen

Die Frage, ob die Aktivierung der Genexpression durch MYB12 auch in etiolierten Keimlingen stattfindet, oder ob diese ein lichtabhängiges Phänomen ist, sollte durch die Analyse der Genexpression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in etiolierten Keimlingen beantwortet werden. Die quantitativen Echtzeit-RT-PCR-Experimente hierzu wurden parallel zu denen mit im Licht angezogenen Keimlingen durchgeführt. Die verwendeten Kalibratoren der relativen Genexpression waren identisch mit denen vorher bei der Analyse der belichteten Keimlinge eingesetzt. Dadurch wurde es möglich die Expressionswerte für belichtete und etiolierte Keimlinge direkt miteinander zu vergleichen.

3.2.3.1. MYB12-Expression

Wie sich zeigte, war die Expression von *MYB12* in jungen Keimlingen von der Präsenz eines Lichtstimulus abhängig. Das Expressionsniveau von *MYB12* in etiolierten Wildtyp- bzw. Knockout-Keimlingen war gegenüber ihren im Licht gewachsenen Gegenstücken stark reduziert. Dies galt auch für die Überexpressionslinie, die zwar immer noch eine substantielle Überexpression von *MYB12* aufwies, diese erreichte jedoch nur noch etwa 25 % des Wertes der unter Licht-Exposition angezogenen Keimlinge. Die Werte der relativen Expression von *MYB12* in etiolierten Keimlingen sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

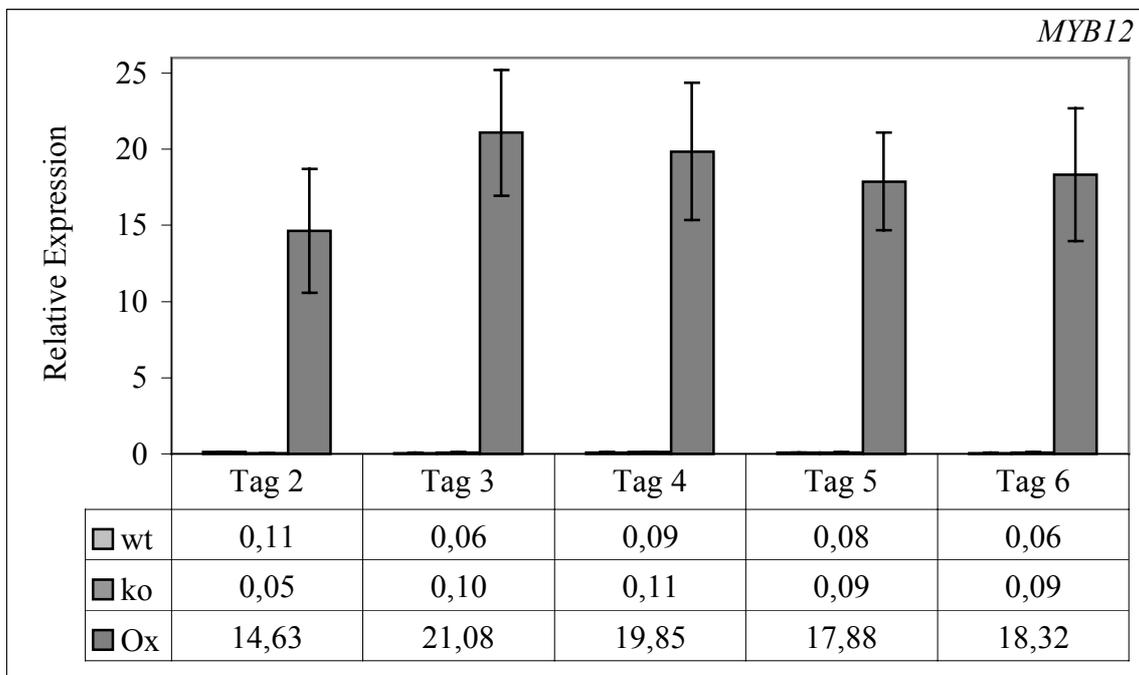


Abb. 27: Relative *MYB12*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.2. *CHS*-Expression

In etiolierten Wildtyp- und *myb12*-Knockout-Keimlingen konnte keine signifikante *CHS*-Expression festgestellt werden, was mit der ebenfalls drastisch reduzierten *MYB12*-Expression übereinstimmte. Die relative *CHS*-Expression in Keimlingen der Überexpressionslinie zeigte einen ungewöhnlichen zeitlichen Verlauf. Mit steigendem Alter der untersuchten Keimlinge nahm diese exponentiell zu, so dass am Ende der Kinetik das Expressionsniveau des Kalibrators erreicht wurde. Abbildung 28 zeigt die relative Expression von *CHS* in etiolierten Keimlingen der drei verschiedenen *MYB12*-Linien.

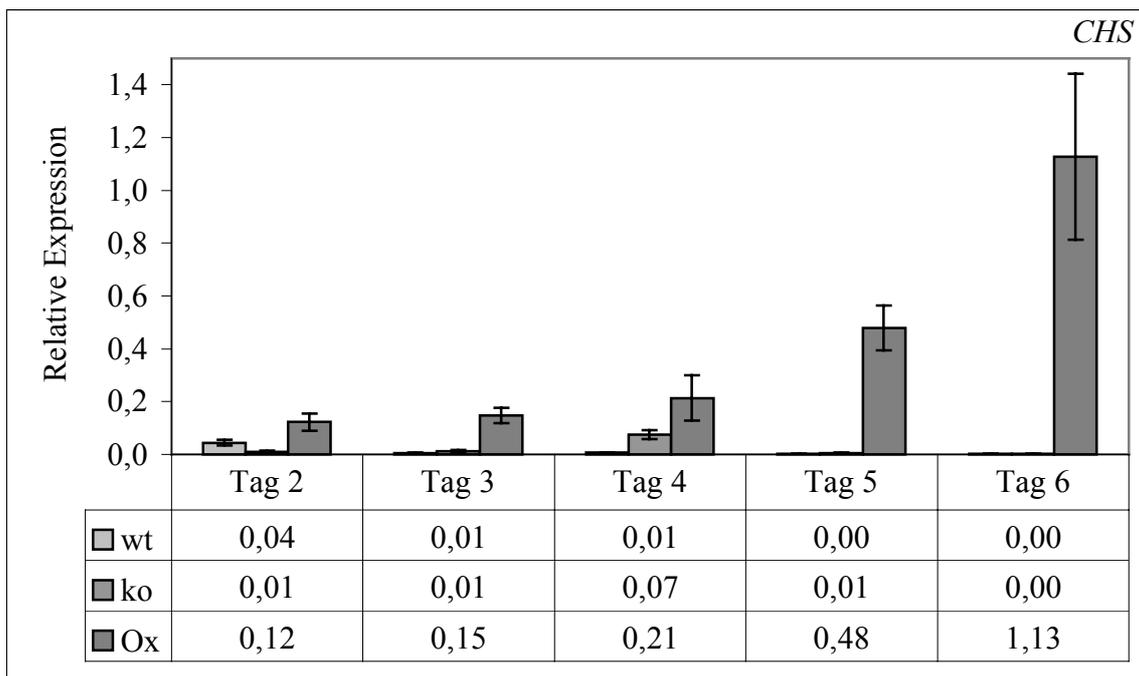


Abb. 28: Relative *CHS*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.3. *CFI*-Expression

Auch die *CFI*-Expression war in etiolierten Keimlingen reduziert. Jedoch konnte in Wildtyp-Keimlingen zu Beginn der Kinetik und dann in deren weiteren Verlauf mit stetig abnehmender Tendenz eine zwar schwache, aber deutlich messbare *CFI*-Expression beobachtet werden. Die Expressionswerte in Keimlingen der *myb12*-Knockout-Linie ließen eine ähnliche Entwicklung erkennen, allerdings auf einem äußerst niedrigen Niveau, so dass die Signifikanz dieser Beobachtung fraglich erscheint. Wie schon im Falle von *CHS* dokumentiert, ließ sich auch für *CFI* in der Überexpressionslinie zum Ende der Kinetik hin ein exponentieller Anstieg der relativen Genexpression feststellen. Dieser begann mit dem 4. Tag der Keimlingsentwicklung; die Werte an den beiden vorangegangenen Tagen des Versuchsablaufes zeigten keine Steigerung der *CFI*-Expression. Festzuhalten ist weiterhin, dass die relative Reduktion der Expressionswerte insgesamt weniger stark ausgeprägt war als für *CHS* beobachtet. Entsprechend lag der Endwert am Tag 6 der Kinetik mit 1,66 auch über der zu diesem Zeitpunkt gemessenen relativen *CHS*-Expression (Wert 1,13). Abbildung 29 stellt die *CFI*-Expressions-ergebnisse zusammengefasst dar.

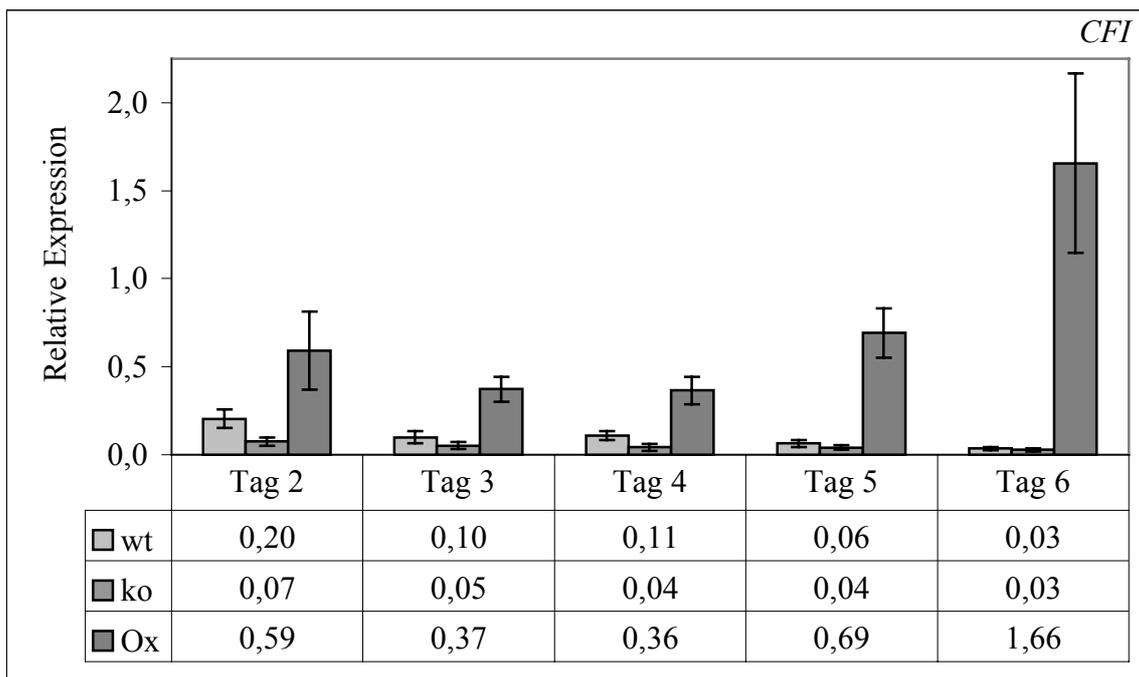


Abb. 29: Relative *CFI*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.4. *F3H*-Expression

In Wildtyp- als auch in Knockout-Keimlingen war die *F3H*-Expression auf ein Minimum reduziert. Auch die Überexpression von *MYB12* konnte diesen Tatbestand, zumindest während der ersten drei Tage des Experimentes, nicht beseitigen. Allerdings änderte sich dies, wie auch schon für *CHS* und *CFI* beobachtet, ab Tag 4 der Kinetik, von wo ab eine klare Steigerung der relativen *F3H*-Expression zu verzeichnen war. Insgesamt war das *F3H*-Expressionsniveau, auch in den *MYB12* überexpremierenden Keimlingen, jedoch relativ niedrig, mit der Folge, dass am Ende der Messreihe die *F3H*-Expressionswerte nicht, wie bei den beiden vorangegangenen Genen, den Stand des Kalibrators erreichten. Die Werte der relativen *F3H*-Expression sind Abbildung 30 zu entnehmen.

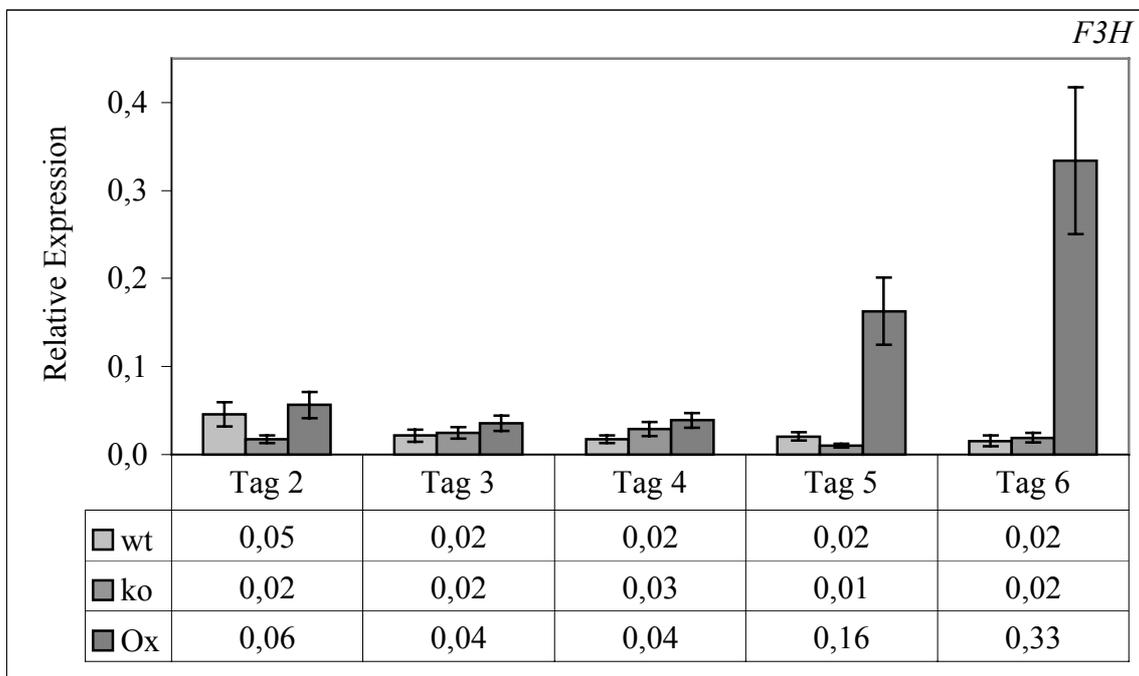


Abb. 30: Relative *F3H*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.5. *FLS*-Expression

Die Expressionsanalyse von *FLS* in etiolierten Keimlingen erbrachte zu denen der weiter stromaufwärts in der Flavonoidbiosynthese positionierten Strukturgenen *CHS*, *CFI* und *F3H* sehr ähnliche Ergebnisse. Wiederum war sowohl in Wildtyp-Keimlingen als auch in denen der *myb12*-Knockout-Linie nur eine schwache *FLS*-Restexpression festzustellen. Ebenso war wieder eine kontinuierliche Erhöhung der relativen Expressionswerte ab Tag 4 der Kinetik für die *MYB12*-Überexpressionslinie zu erkennen. Der Endwert der *FLS*-Expression lag dabei fast doppelt so hoch wie der des Kalibrators. Abbildung 31 zeigt die zur *FLS*-Expressionsanalyse in etiolierten Keimlingen zugehörigen Daten in einer Übersicht.

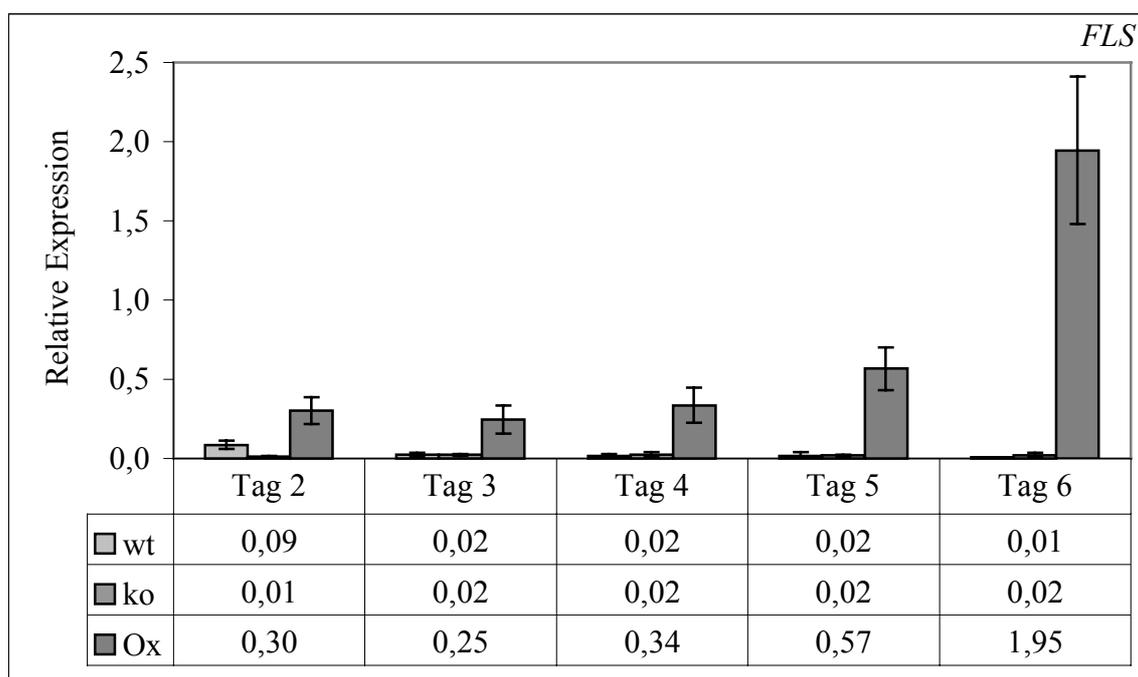


Abb. 31: Relative *FLS*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.6. *F3'H*-Expression

Anders als bei den bislang untersuchten Flavonoid-Strukturgenen bestanden zwischen den drei *MYB12*-Linien bezüglich der relativen Expression von *F3'H* keine signifikanten Unterschiede. Es konnte also in etiolierten Keimlingen kein Effekt einer geänderten *MYB12*-Expression auf die *F3'H*-Expression beobachtet werden. Zu allen Zeitpunkten war eine nicht unerhebliche, etwa im Bereich des Kalibrators liegende, relative *F3'H*-Expression messbar. Bemerkenswert war, dass quasi in Umkehrung der Beobachtungen für *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS*, in der *MYB12*-Überexpressionslinie die relative *F3'H*-Expression ab dem 4. Tag der Kinetik zum Ende der Kinetik hin ab- und nicht zunahm. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der *F3'H*-Expressionsanalyse in etiolierten Keimlingen zusammengefasst wiedergegeben.

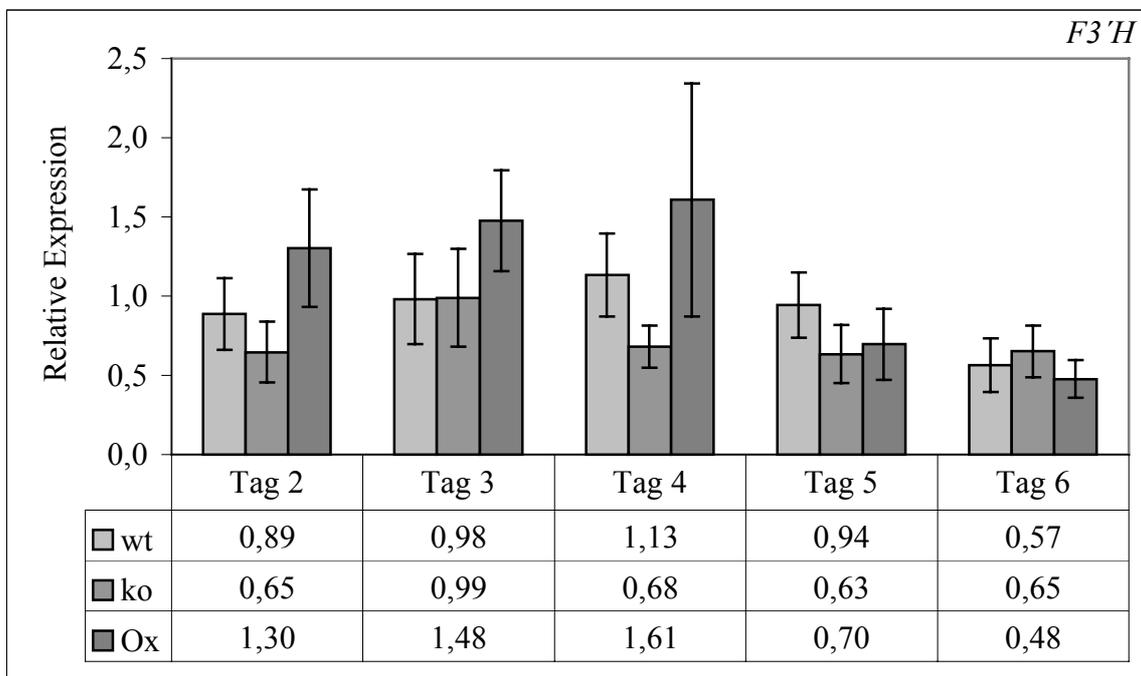


Abb. 32: Relative *F3'H*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Sämtliche Expressionswerte wurden auf die Expression in 2 Tage alten, unter Licht angezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.3.7. *DFR*-Expression

Wie Abbildung 33 zeigt, war das Gen *DFR* in etiolierten Keimlingen nicht expremiert. Folglich konnte also, wie schon für im Licht angezogene Keimlinge, keine Korrelation der *DFR*- und der *MYB12*-Expression nachgewiesen werden. Zu beachten ist, dass auch hier die Expression des *DFR*-Gens relativ zum *CHS*-Gen, durch die Verwendung des entsprechenden Kalibratorwerts, bestimmt wurde, da wegen der insgesamt sehr niedrigen *DFR*-Expression, auch in belichteten Keimlingen, die Verwendung des *DFR*-Kalibrators zu irreführenden Resultaten geführt hätte.

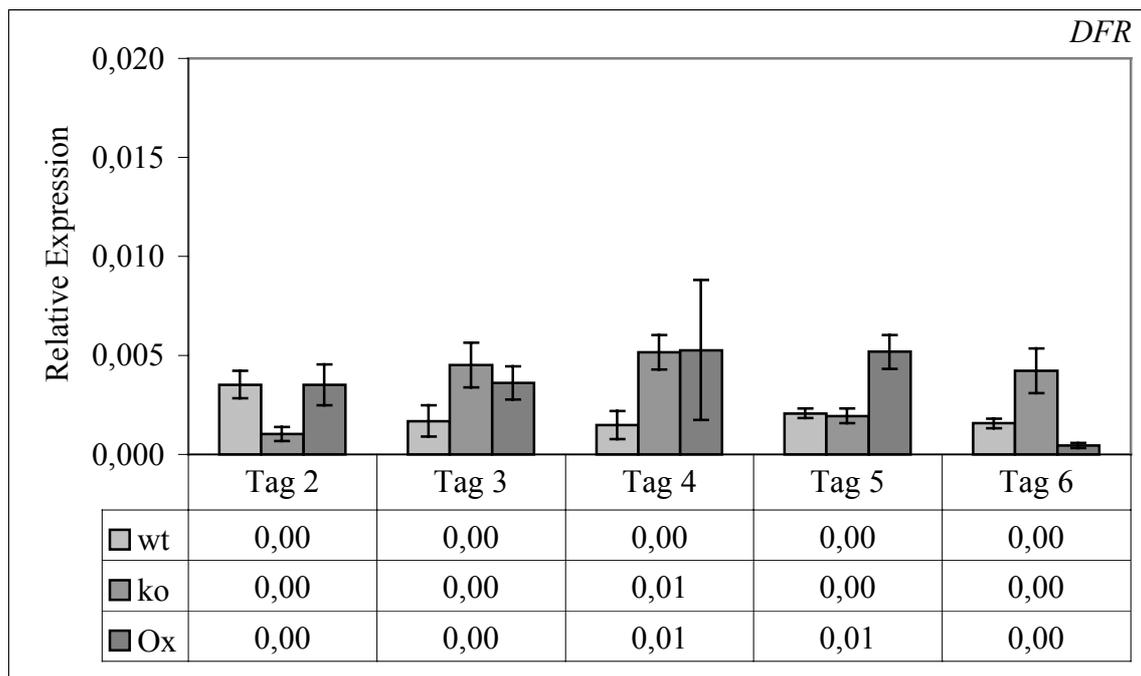


Abb. 33: Relative *AtDFR*-Expression in etiolierten Keimlingen. Die Abszisse gibt den zeitlichen Verlauf nach Inkubationsbeginn an. Wegen des äußerst geringen *DFR*-Expressionsniveaus wurden alle Werte auf die *CHS*-Expression in 2 Tage alten, im Licht gezogenen Keimlingen kalibriert. Abkürzungen: wt: Wildtyp; ko: *myb12*-Knockout-Linie; Ox: *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.2.4. Relative Genexpression in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen

Eine frühere Untersuchung des *MYB12*-Expressionsmusters in adulten Pflanzen konnten die Expression des Faktors nur im Stengel nachweisen und zwar auf einem sehr niedrigen Niveau (Kranz *et al.*, 1998). Mit dem Mittel der quantitativen Echtzeit-RT-PCR sollte dieses Ergebnis überprüft werden. Außerdem wurde zusätzlich auch die Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese und damit der potentiellen MYB12-Zielgene bestimmt. Verwendet wurden 6 Wochen alte, im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) angezogene, adulte Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator der relativen Genexpression diente die Expression in Rosettenblättern. Um zumindest eine grobe Vergleichsmöglichkeit zwischen der Expressionsstärke in adulten Pflanzen und den zuvor untersuchten Keimlingen für die einzelnen betrachteten Gene zu ermöglichen, wurden die Kalibratorwerte beider Messreihen in Relation gesetzt und dieser Wert unter der Kategorie „Keimling“ mit aufgenommen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei diesen Relativ-Werten nicht um exakte Rechengrößen handelt, da die verwendeten Schwellenwerte zur Festlegung der C_t -Werte in beiden Messreihen differierten und somit diese nur eingeschränkt miteinander zu vergleichen waren. Aus diesem Grunde ist auf die Abgabe eines Fehlerwertes verzichtet worden. Für das Gen *DFR* wurde hier als Keimlingskalibrator, wie für die anderen Gene auch, der *DFR*-Expressionswert in 2 Tage alten, belichteten Keimlingen verwendet. In der Expressionsanalyse der Keimlinge war für *DFR* noch der *CHS*-Kalibrator verwendet worden, weil eine Kalibrierung auf die sehr geringe *DFR*-Expression dort zu irreführenden relativen Expressionswerten geführt hätte.

3.2.4.1. Relative *MYB12*-Expression

Die Expressionsanalyse von *MYB12* in adulten Wildtyp-Pflanzen zeigte, dass die Expression des Faktors in allen untersuchten Geweben nachweisbar war. Die relative Expression war in Blüten und in Schoten am höchsten, in Rosettenblättern dagegen am niedrigsten. Die relative Expression in Wurzeln und Stengeln war praktisch identisch und lag nur wenig über dem in Rosettenblättern vorgefundenen Niveau. In Stengelblättern wurde eine mäßig starke *MYB12*-Expression detektiert, die etwa den siebenfachen Kalibratorwert erreichte. Das Expressionsniveau in lichtgewachsenen Keimlingen war in etwa vergleichbar mit dem in Stengelblätter vorgefundenen. Daraus folgt, dass die *MYB12*-Expression in Blüten und Schoten adulter Pflanzen deutlich über der in Keimlingen liegt, in Wurzeln, Rosettenblättern und Stengeln hingegen liegt sie klar darunter. Abbildung 34 fasst die Resultate für die relative *MYB12*-Expression in adulten Pflanzen zusammen.

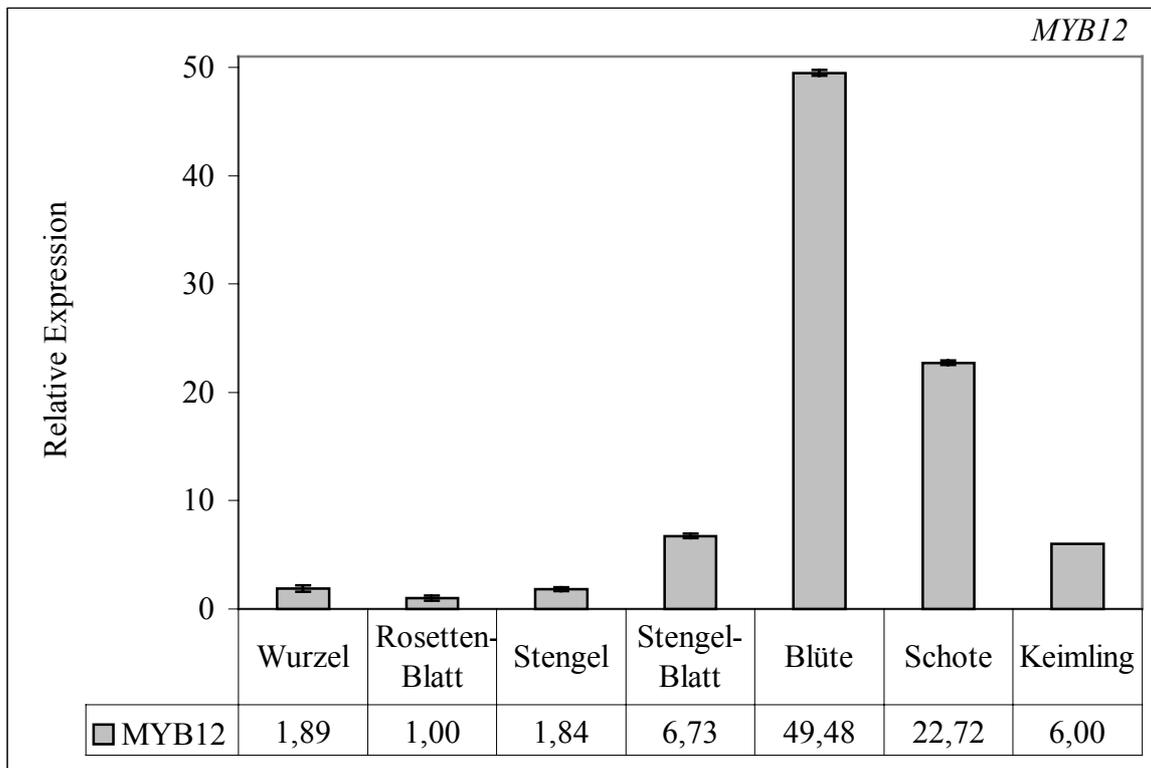


Abb. 34: Relative Expression von *MYB12* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_t -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.4.2. Relative *CHS*-Expression

Die relative *CHS*-Expression war in Schoten, Stengel-Blättern und Blüten, den Organen, in denen auch die höchsten Werte der relativen *MYB12*-Expression beobachtet werden konnten, am stärksten. Im Vergleich dazu waren die Werte für Rosettenblätter und Stengel sehr niedrig. In Wurzeln schließlich war das *CHS*-Gen kaum noch expremiert. Die Unterschiede in der Genexpression waren sehr ausgeprägt. Der relative Unterschied zwischen dem Organ der maximalen (Schote) und dem der minimalen Expression (Wurzel) betrug mehr als das 1000 fache. *CHS* wurde in Stengelblättern, Blüten und Schoten sehr viel stärker, in Wurzeln, Rosettenblättern und Stengeln dagegen wesentlich schwächer expremiert als es in (belichteten) Keimlingen der Fall war. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der *CHS*-Expressionsanalyse in adulten Wildtyp-Pflanzen.

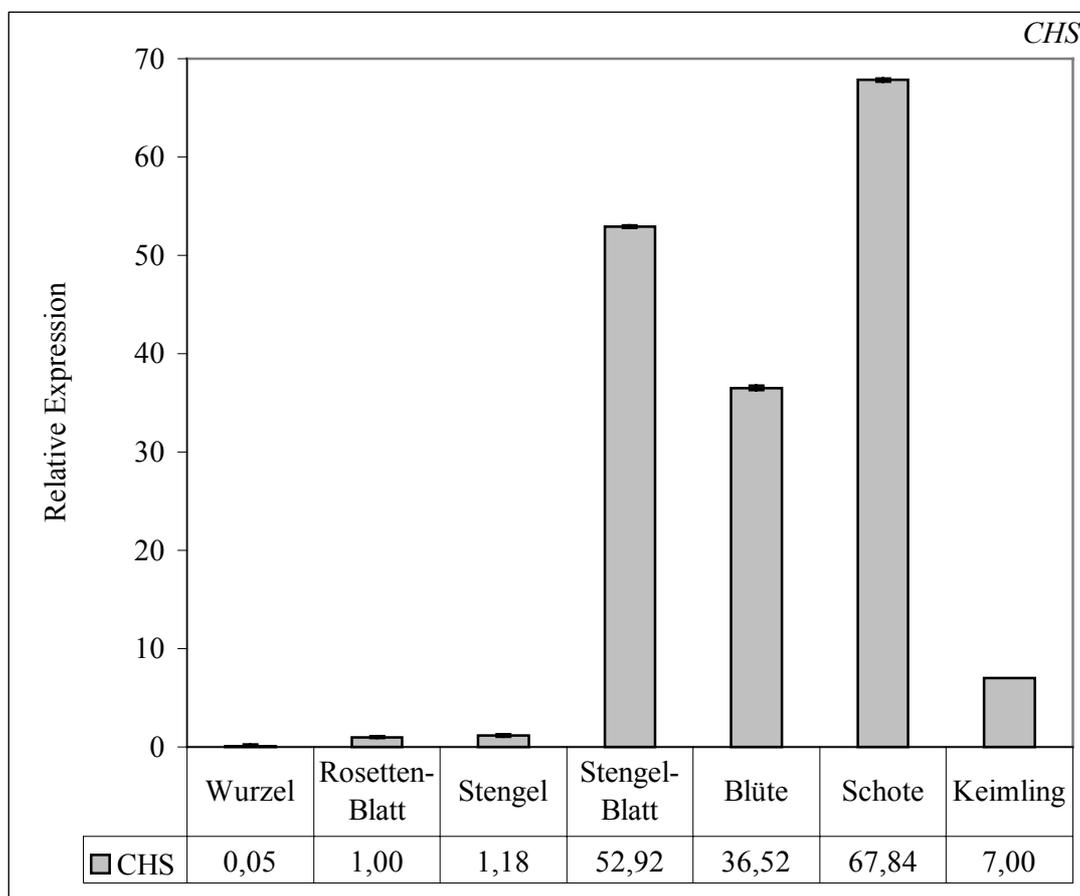


Abb. 35: Relative Expression von *CHS* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_T -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.4.3. Relative *CFI*-Expression

Die Schwankungsbreite der *CFI*-Expressionswerte war insgesamt deutlich geringer als die für *MYB12* und *CHS* beobachtete. Die stärkste Expression konnte in Blüten festgestellt werden, aber auch in Schoten und Stengel-Blättern lagen die Werte über dem des Kalibrators. In Stengel und Wurzel war die *CFI*-Expression augenscheinlich etwas geringer als in Rosetten-Blättern, jedoch war dieser Unterschied aufgrund überlappender Fehlerbalken nicht signifikant. Auch hier zeigten sich also Ähnlichkeiten zum Expressionsmuster von *MYB12*. In Relation zur Expression in lichtgezogenen Keimlingen, war die *CFI*-Expression in allen Geweben adulter Pflanzen erhöht. Besonders ausgeprägt war diese Erhöhung für die Organe Stengelblatt, Blüte und Schote.

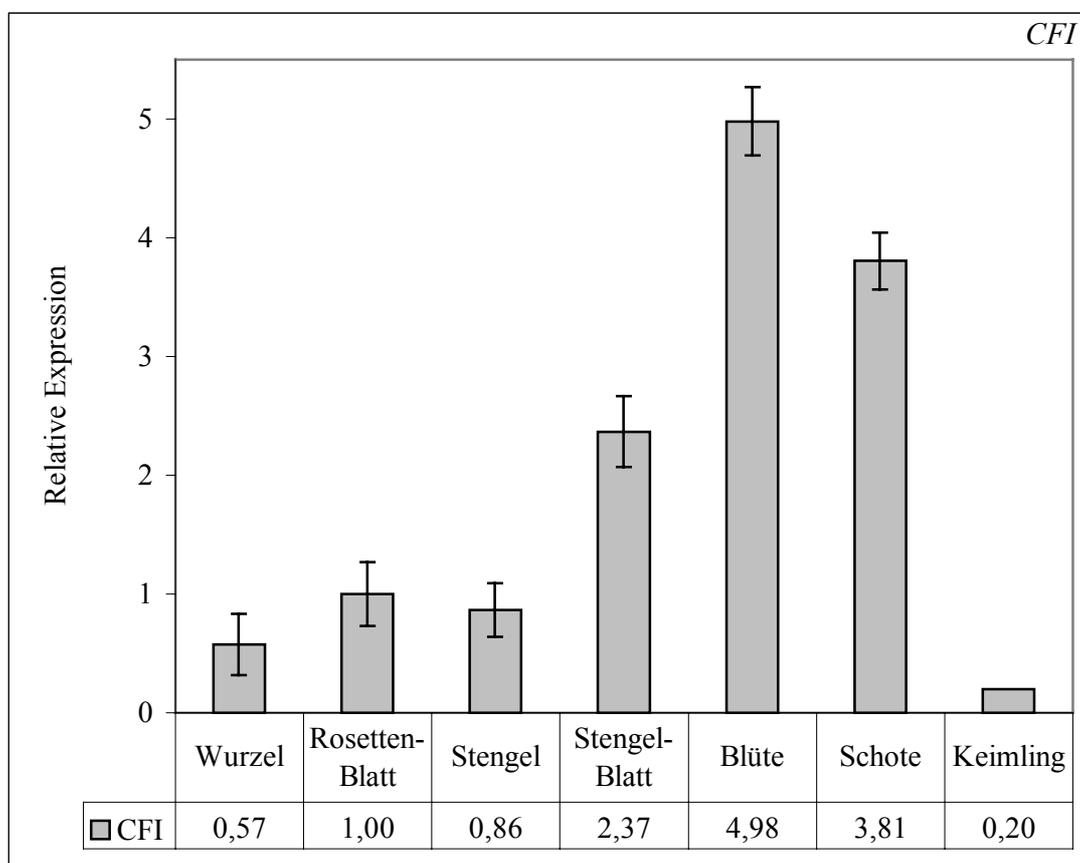


Abb. 36: Relative Expression von *CFI* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_t -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.4.4. Relative *F3H*-Expression

Das Expressionsmuster von *F3H* ähnelte dem von *MYB12*, *CHS* und *CFI*. Auch hier waren die relativen Expressionswerte in Blüten, Schoten und Stengel-Blättern am höchsten. Die *F3H*-Expression in Stengeln übertraf die des Kalibrators etwa um den Faktor 2. In Wurzeln war die *F3H*-mRNA nur sehr schwach konzentriert. Die Expression in belichteten Keimlingen war relativ zu den Geweben höchster *F3H*-Expression deutlich stärker ausgeprägt als dies bei oben beschriebenen Genen der Fall war. Die Keimlingsexpression lag für *F3H* bei etwa 50 % des maximal in Blüten erreichten Wertes, wohingegen sie bei *MYB12* nur etwa 10-20 %, bei *CHS* 10 % und bei *CFI* sogar nur ca. 5 % des Maximalwertes betrug.

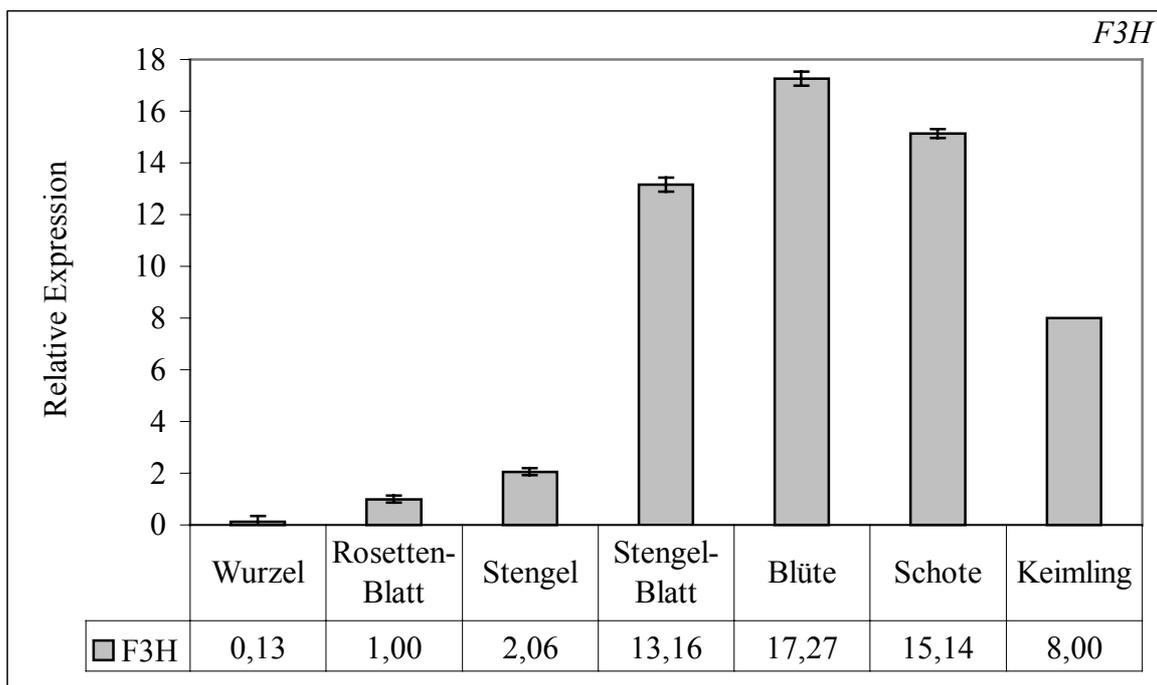


Abb. 37: Relative Expression von *F3H* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_T -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.3.5. Relative *FLS*-Expression

Die Expression von *FLS* in adulten Pflanzen beschränkte sich im Wesentlichen auf die Organe Stengelblatt, Blüte und, in etwas geringeren Ausmaß, Schote, auf die selben Organe also, für die auch die höchsten relativen *MYB12*-, *CHS*-, *CFI*- und *F3H*-Expressionswerte festgestellt wurden. Die Expression in Stengel und Rosetten-Blatt hingegen war nur schwach. In der Wurzel lag die *FLS*-Expression in der Nähe des Detektionslimits, das Gen war dort also praktisch nicht expremiert. Das Expressionsniveau in lichtgewachsenen Keimlingen war in Relation zur Expression im Rosettenblatt sehr stark erhöht, stärker als dies für die anderen untersuchten Gene der Fall war, und entsprach in etwa dem Expressionswert in Schoten.

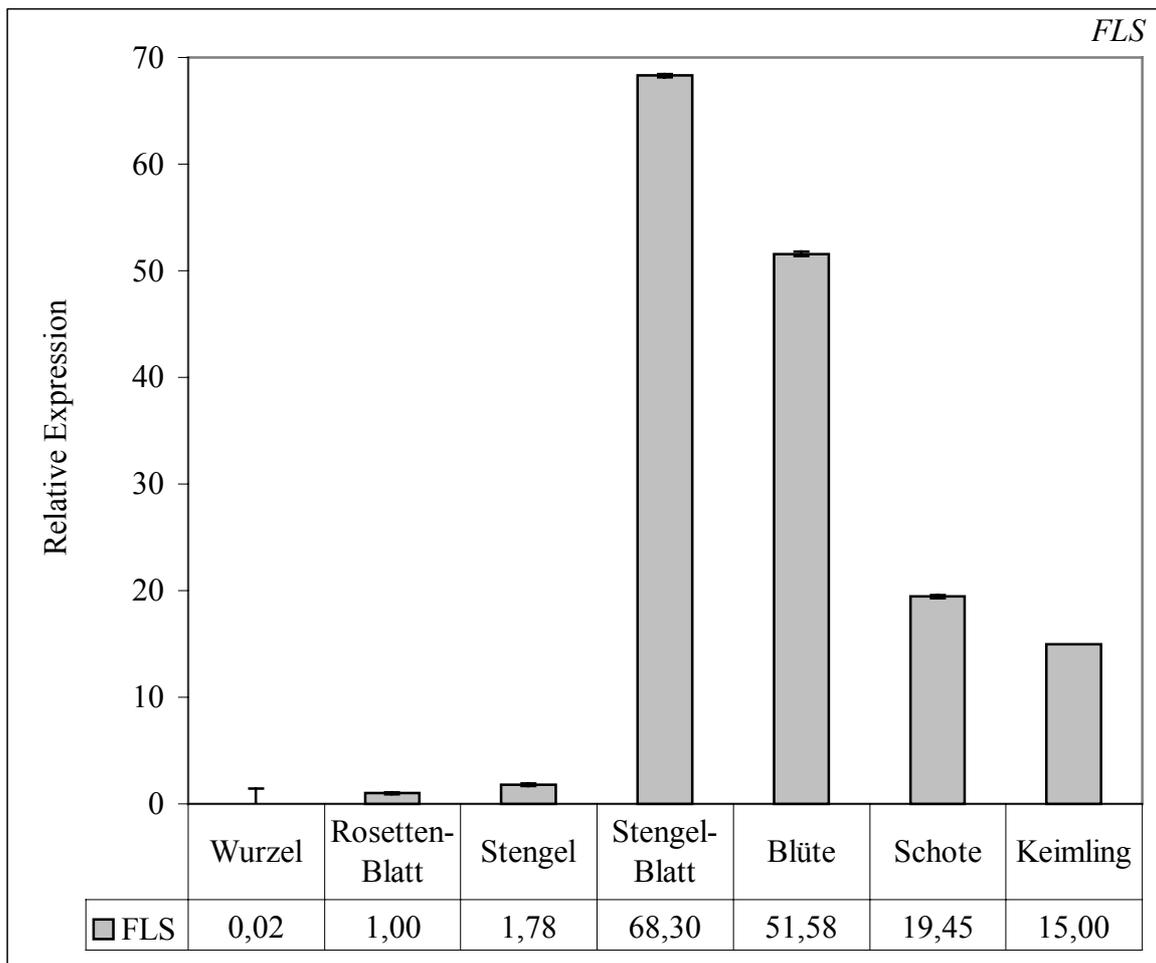


Abb. 38: Relative Expression von *FLS* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_t -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.3.6. Relative *F3'H*-Expression

Die relative Expression des *F3'H*-Gens war in Schoten deutlich am stärksten, aber auch in Blüten konnte eine signifikante Expression festgestellt werden. In allen anderen Geweben wurde das Gen nur schwach expremiert. Das Expressionsmuster unterschied sich damit vor allem bezüglich der schwachen Expression im Stengelblatt von den anderen bisher besprochenen Genen. Dies war ein weiteres Indiz für die differentielle Regulation des *F3'H*-Gens, nicht nur in sich entwickelnden Keimlingen, sondern auch in adulten Pflanzen, von den „frühen“ Genen der Flavonoidbiosynthese. Die Expression in belichteten Keimlingen lag etwa in der Größenordnung des Kalibrators, war also nur relativ schwach.

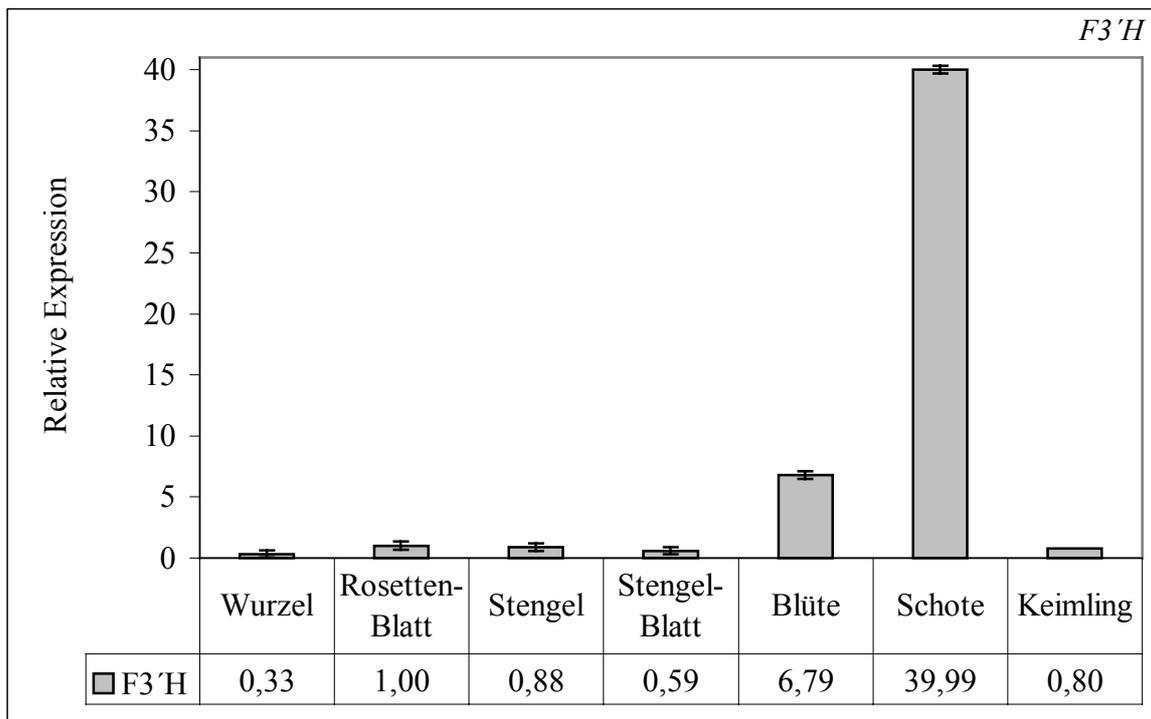


Abb. 39: Relative Expression von *F3'H* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_t -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.2.3.7. Relative *DFR*-Expression

Das *DFR*-Expressionsmuster zeigte eine umfassende Übereinstimmung mit dem von *F3'H*. Am stärksten war *DFR* in Schoten expremiert. Die Blütenexpression war hingegen vergleichsweise schwach ausgeprägt und lag nur etwa 50 % über der des Kalibrators. Die *DFR*-Expression im Stengel war nur schwach. Dies galt in besonderem Maße für die relative Expression in der Wurzel und in Stengel-Blättern, die praktisch nicht vorhanden war. *DFR* als sogenanntes „spätes“ Gen des Flavonoidmetabolismus zeigte also keine Koregulation mit den „frühen“ Genen *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS*. Der Vergleich zur Expression von *DFR* in Keimlingen erfolgte, wie oben bereits erläutert, nicht unter Verwendung des dort in der Echtzeit-RT-PCR-Analyse eingesetzten *CHS*-Kalibrators, sondern relativ zur *DFR*-Expression in 2 Tage alten, belichteten Wildtypkeimlingen. Wie bereits früher festgestellt, wird *DFR* in Keimlingen unter den gewählten Versuchsbedingungen praktisch nicht expremiert.

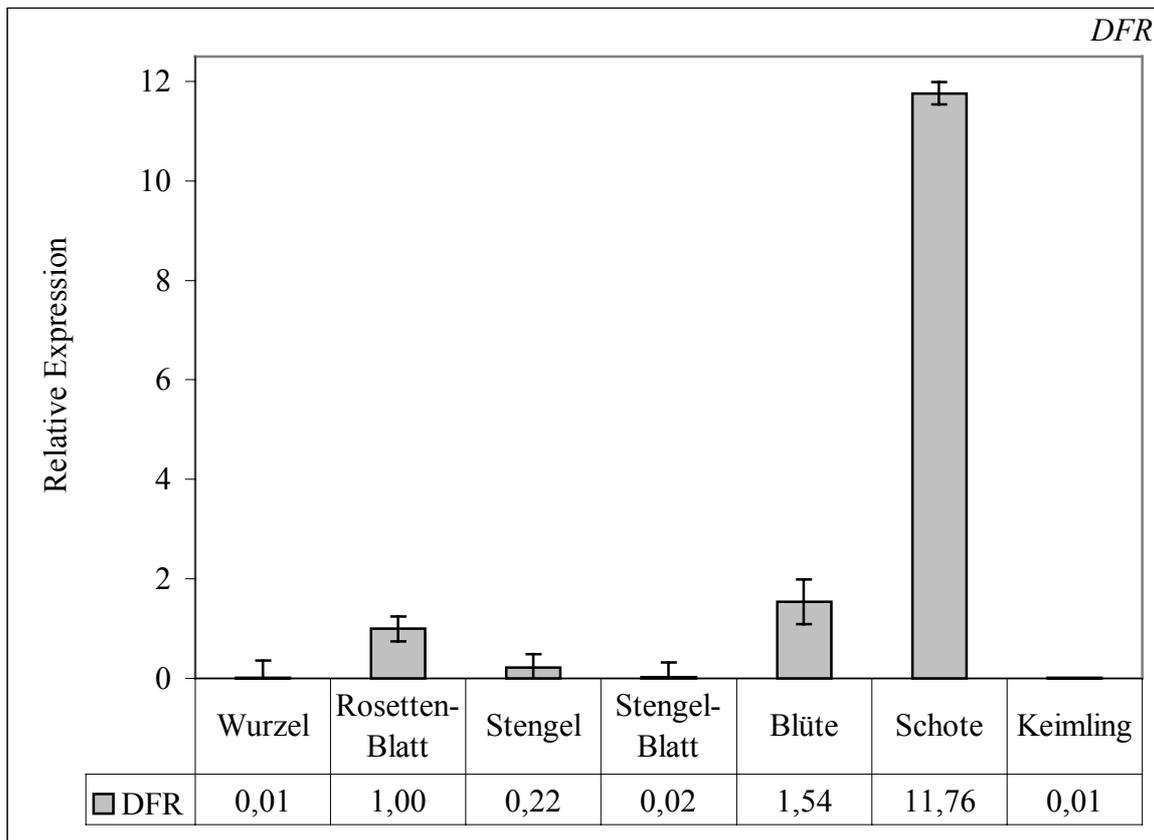


Abb. 40: Relative Expression von *DFR* in verschiedenen Geweben adulter Wildtyp-Pflanzen. Verwendet wurden 6 Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene, Wildtyp-Pflanzen. Als Kalibrator diente die Rosettenblatt-Probe. Die Rubrik „Keimling“ gibt die ungefähre Relation von Rosettenblatt-Expression und der Expression im Keimlingskalibrator an. Der Wert soll einen groben Eindruck von den Expressionsverhältnissen in Keimlingen relativ zu denen in adulten Pflanzen liefern. Auf eine Fehlerangabe wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die Berechnung des Wertes verwendeten Daten, wegen unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Festlegung der C_T -Werte, nur bedingt miteinander vergleichbar waren.

3.3. HPLC-Analyse zur Detektion des *myb12*-Phänotyps

Die Pflanzen der *myb12*-Knockout- bzw. *MYB12*-Überexpressionslinie zeigten keinen direkt sichtbaren Phänotyp. Die oben geschilderten Resultate der Transfektions- und Echtzeit-RT-PCR-Experimente führten zu der Annahme, dass möglicherweise jedoch biochemische, den Flavonoidgehalt der verschiedenen Linien betreffende Unterschiede existieren könnten. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden, aus dem selben Keimlingsmaterial, welches auch für die quantitative RT-PCR eingesetzt worden war, methanolische Extrakte zur HPLC-Analyse gewonnen (2.2.28.1). Durch die zur Verfügung stehenden Methoden konnten in diesen insgesamt 5 Quercetin-, 3 Kämpferol- sowie 4 Sinapinsäurederivate identifiziert werden. Leider konnte keine genauere Identifikation der einzelnen Komponenten erfolgen, was zur Detektion eines biochemischen *myb12*-Phänotyps aber auch nicht zwingend notwendig war. Die Synthese der Aglyka ist unabhängig von der Art und dem Umfang der nachfolgenden Substitutionen (Glykosylierungen), deren genaue Kenntnis daher für die phänotypische Charakterisierung von *MYB12* nicht relevant war. Die Benennung der einzelnen identifizierten Substanzen erfolgte durch die Angabe der zugehörigen Substanzklasse (Q = Quercetinderivat, K = Kämpferolderivat und S = Sinapinsäurederivat), sowie der jeweils charakteristischen Retentionszeit.

3.3.1. HPLC-Analyse methanolischer Extrakte aus Weißlicht-bestrahlten Keimlingen

3.3.1.1. Relative Quantifizierung der Quercetinderivate

Insgesamt konnten 5 Quercetinderivate (Quercetinglykoside) in den methanolischen Extrakten belichteter Keimlinge identifiziert werden. Die beiden quantitativ dominierenden Quercetine waren dabei Q20.86 sowie Q23.07, die in Wildtyp-Keimlingen etwa $\frac{3}{4}$ der gesamten Quercetinmenge ausmachten. Für alle gefundenen Quercetinderivate war eine signifikante quantitative Reduzierung (durchschnittlich um den Faktor 2 bis 3) in den Keimlingen der *myb12*-Knockout-Linie zu beobachten. Genau der gegenteilige Effekt, eine durchschnittlich etwa 4 fache Steigerung der Quercetinmenge im Vergleich zu Wildtyp, zeigte sich hingegen in der Überexpressionslinie. Der Quercetingehalt in belichteten Keimlingen korrelierte also mit dem Expressionsniveau von *MYB12*. Abbildung 41 zeigt die Resultate der relativen Quantifizierung der Quercetinderivate im Detail.

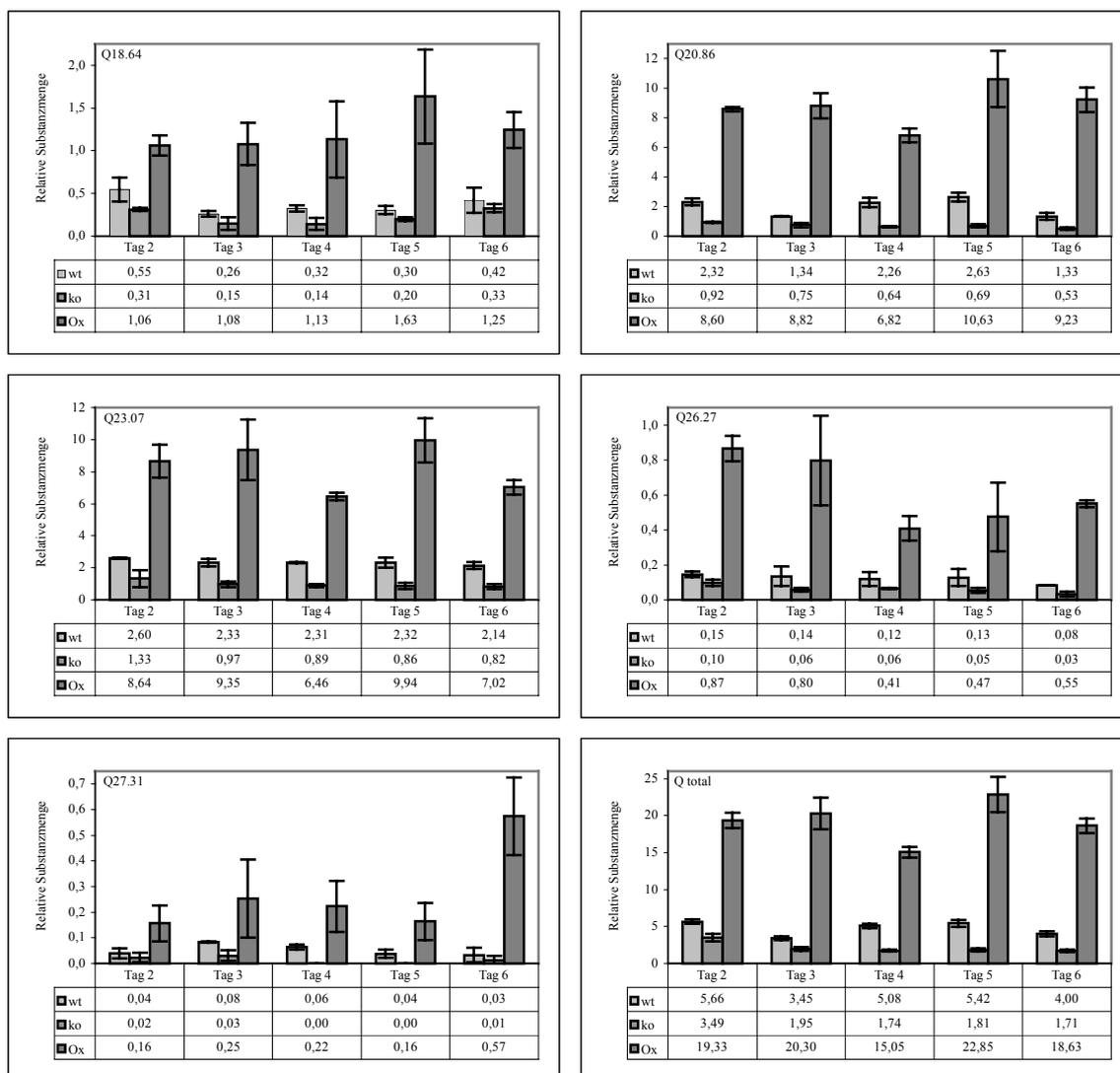


Abb. 41: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse Weißlicht-bestrahlter Keimlinge nachgewiesenen Quercetinglykoside. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Quercetinderivate sowie der aus diesen resultierende relative Gesamt-Quercetingehalt (Q total). Die Benennung der einzelnen Quercetinderivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; Q, Quercetin.

3.3.1.2. Relative Quantifizierung der Kämpferolderivate

Wie schon für die Quercetine beobachtet, so waren auch die relativen Mengen aller drei vorgefundenen Kämpferolglykoside in belichteten Keimlingen *MYB12*-abhängig. In Knockout-Keimlingen war der Kämpferolgehalt auf durchschnittlich ca. 30 % des Wildtyp-Niveaus verringert, in *MYB12* überexprimierenden Keimlingen hingegen um etwa den Faktor 3 erhöht. Neben den Quercetinen waren also auch die Kämpferole von einer *MYB12*-Fehlexpression betroffen. Damit erstreckte sich der „biochemische“ *myb12*-Phänotyp auf die gesamte Klasse der Flavonole, ebenso wie es theoretisch aus den Transfektions- und relativen Expressionsdaten abgeleitet werden konnte. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der relativen Kämpferolquantifizierung.

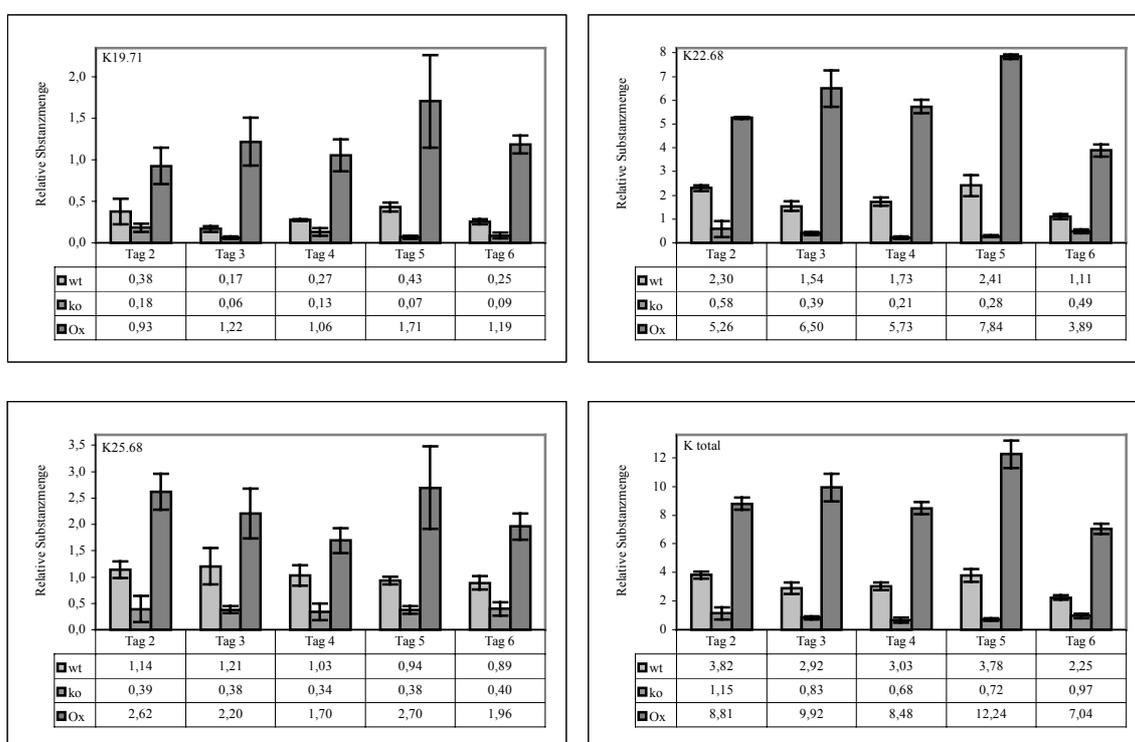


Abb. 42: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse Weißlicht-bestrahlter Keimlinge nachgewiesenen Kämpferolglykoside. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Kämpferolderivate sowie der aus diesen resultierende relative Gesamt-Kämpferolgehalt (K total). Die Benennung der einzelnen Kämpferolderivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; K, Kämpferol.

3.3.1.3. Relative Quantifizierung der Sinapate

Auf den ersten Blick etwas unerwartet erschienen die Resultate der Sinapatquantifizierung. Wie sich zeigte, war auch diese Substanzklasse von der *MYB12*-Expression abhängig, was scheinbar im Widerspruch zu den Transfektionsresultaten für die *MYB12*-Aktivierbarkeit von *F5H* und *OMT* stand, die beide nicht *MYB12*-responsiv waren. Die genauere Betrachtung der HPLC-Daten, ließ erkennen, dass der *MYB12*-Effekt nicht gleichermaßen bei allen vier detektierten Sinapinsäurederivaten auftrat. Der Einfluss der *MYB12*-Expression ließ sich am eindeutigsten für das Sinapat S17.96 feststellen. In Knockout-Keimlingen, ohne funktionelles *MYB12*-Gen, war der Gehalt dieses Sinapates um ca. 40 % reduziert, in Keimlingen der Überexpressionslinie dagegen um etwa 70 % erhöht. Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch für das, allerdings mengenmäßig recht unbedeutende, Sinapat S21.85 beobachten. Die beiden verbliebenen Sinapinsäureester S24.91 und S32.15 kamen in Wildtyp- und Knockout-Keimlingen in nahezu gleichen Mengen vor, zeigten aber auch eine tendenziell gesteigerte Präsenz in Keimlingen der *MYB12*-Überexpressionslinie. Auf die Darstellung des Gesamtsinapatgehalts wurde in Abbildung 43 verzichtet, da das sehr unterschiedliche Verhalten der einzelnen Sinapate die Aussagekraft einer solchen zu sehr einschränkt.

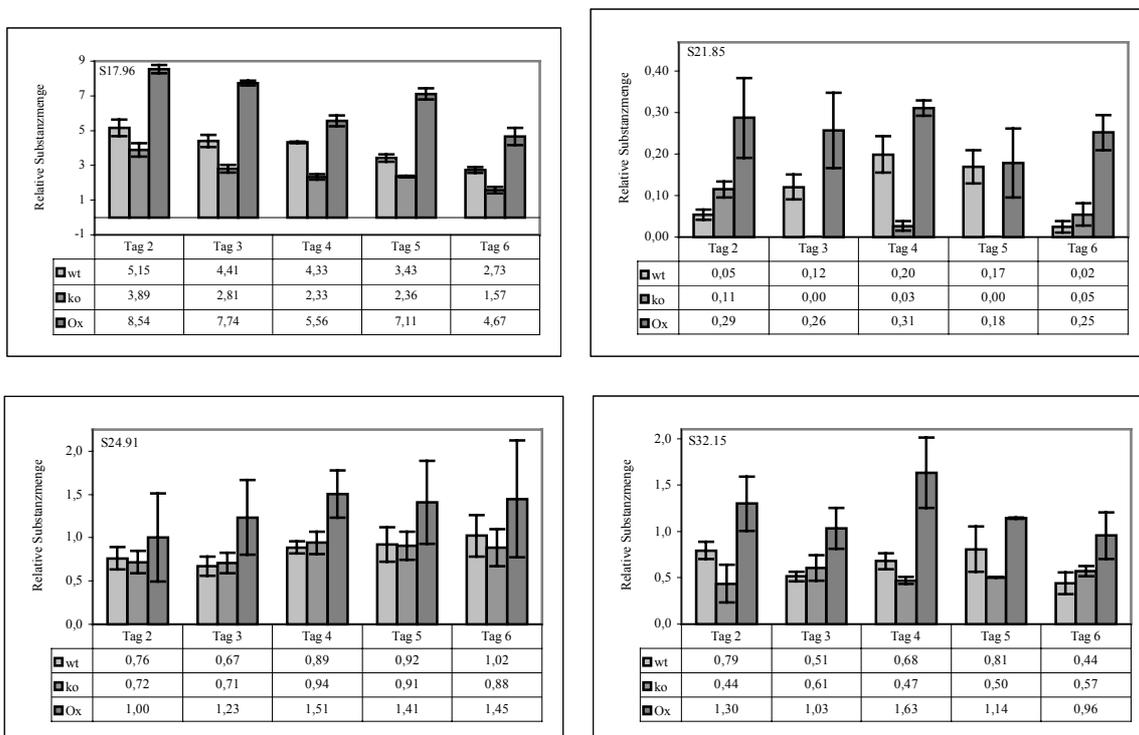


Abb. 43: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse Weißlicht-bestrahlter Keimlinge nachgewiesenen Sinapinsäurederivate. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Sinapinsäurederivate. Die Benennung der einzelnen Sinapinsäurederivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; S, Sinapat.

3.3.2. HPLC-Analyse methanolischer Extrakte aus etiolierten Keimlingen

3.3.2.1. Relative Quantifizierung der Quercetinderivate

In etiolierten Wildtyp-Keimlingen konnten im Durchschnitt weniger Quercetine als in den entsprechenden belichteten Gegenstücken gefunden werden. Für die beiden Haupt-Quercetine Q20.86 und Q23.07 betrug die Reduktion im Mittel etwa 70 % bzw. 55 %. In etiolierten Keimlingen der *myb12*-Knockout-Linie war die mengenmäßige Reduzierung der einzelnen Quercetinderivate gegenüber denen in etiolierten Wildtyp-Keimlingen vorgefundenen abhängig von ihrem Glykosylierungsgrad. Dabei galt, je höher dieser (je niedriger die Retentionszeit), desto stärker die messbare Reduzierung. Diese betrug im Durchschnitt für Q18.64 und Q20.86 etwa 50 %, für Q23.07 noch ca. 15 % und für Q26.27 schließlich nur noch knapp 10%. Allerdings konnte Q27.31 in etiolierten Knockout-Keimlingen überhaupt nicht detektiert werden. Bei Betrachtung der Überexpressionswerte fiel auf, dass auch hier der *MYB12*-Effekt vom Umfang der Glykosylierung abhing. Erreichte die Q18.64-Menge in etiolierten *MYB12*-Überexpressionskeimlingen nur weniger als 50 % der in belichteten Wildtyp-Keimlingen gemessenen Quantität, so wurde der fehlende Lichtstimulus für die anderen Quercetinderivate durch die erhöhte *MYB12*-Expression kompensiert (Q20.86) oder sogar überkompensiert (Q23.07, Q26.17 und Q27.31), d.h. die Werte übertrafen die lichtgewachsener Wildtyp-Keimlinge. Der relative *MYB12*-Effekt nahm also mit abnehmender Glykosylierung der Quercetine zu. Die mittlere Quercetin-Gesamtmenge in etiolierten Überexpressionskeimlingen überstieg die in belichteten Keimlingen des Wildtyps um etwa 50 %, was ungefähr dem Wert für das Haupt-Quercetin Q23.07 entsprach. In Abbildung 44 sind die Resultate der Quercetin-Quantifizierung in etiolierten Keimlingen in der Übersicht dargestellt.

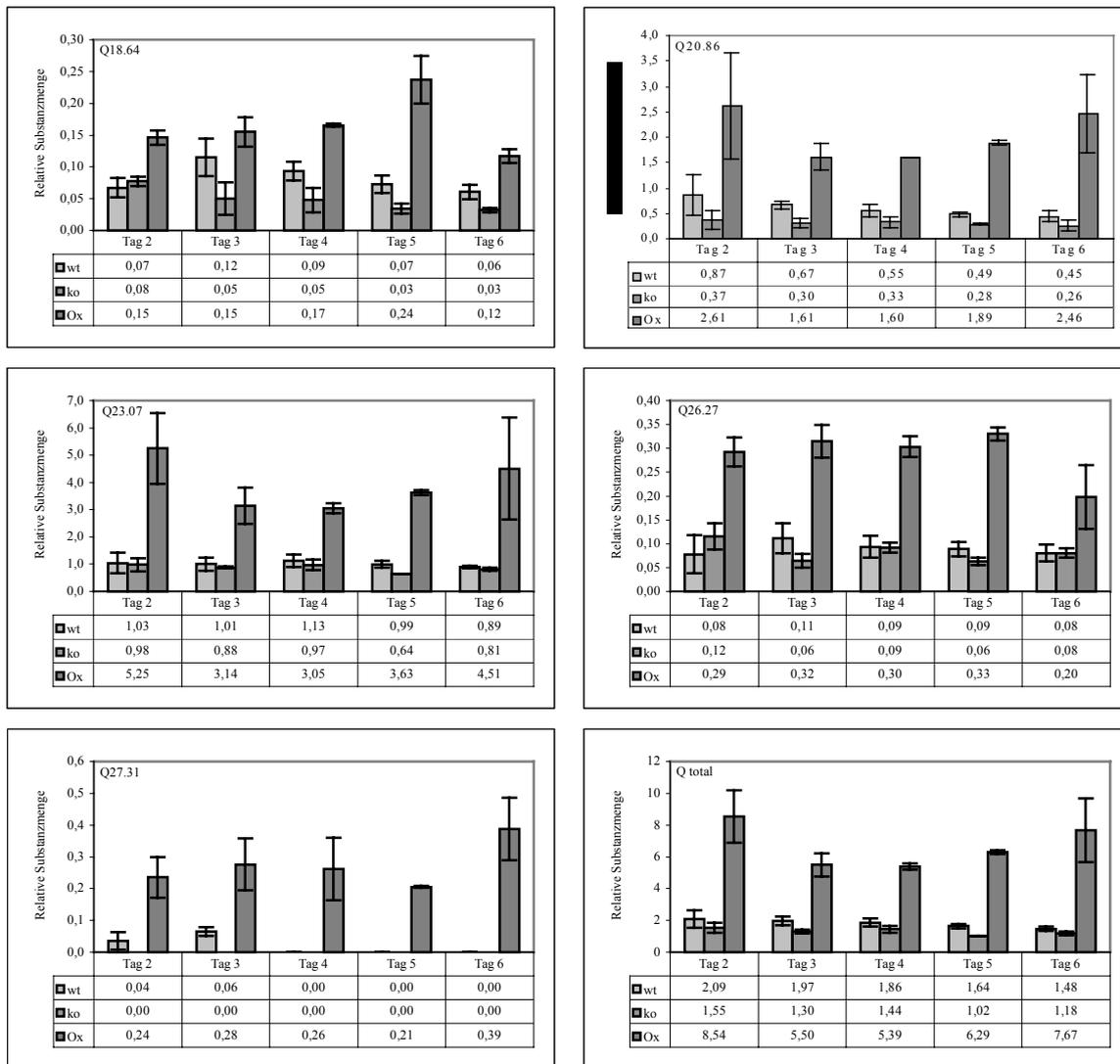


Abb. 44: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge nachgewiesenen Quercetinglykoside. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Quercetinderivate sowie der aus diesen resultierende relative Gesamt-Quercetingehalt (Q total). Die Benennung der einzelnen Quercetinderivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; Q, Quercetin.

3.3.2.2. Relative Quantifizierung der Kämpferolderivate

Die Menge der Kämpferolderivate war in etiolierten Keimlingen aller drei Linien deutlich geringer als in belichteten Keimlingen. Besonders extrem war die Reduzierung von K19.71, welches nur noch in geringen Mengen in der *MYB12*-Überexpressionslinie nachgewiesen werden konnte. Für K22.68 und K25.68 konnten zwischen Wildtyp- und Knockout-Keimlingen keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet werden. In den Pflanzen der *MYB12*-Überexpressionslinie war jedoch der Kämpferolgehalt gegenüber diesen beiden Linien klar erhöht. Anders als für einen Teil der Quercetinderivate festgestellt, erreichte die Kämpferolmenge in keinem Fall mehr das Wildtypniveau belichteter Keimlinge. Die Überexpression von *MYB12* konnte also nicht den fehlenden Lichtreiz für die Kämpferolproduktion kompensieren. Abbildung 45 veranschaulicht die erhaltenen HPLC-Daten zur Kämpferol-Quantifizierung in etiolierten Keimlingen.

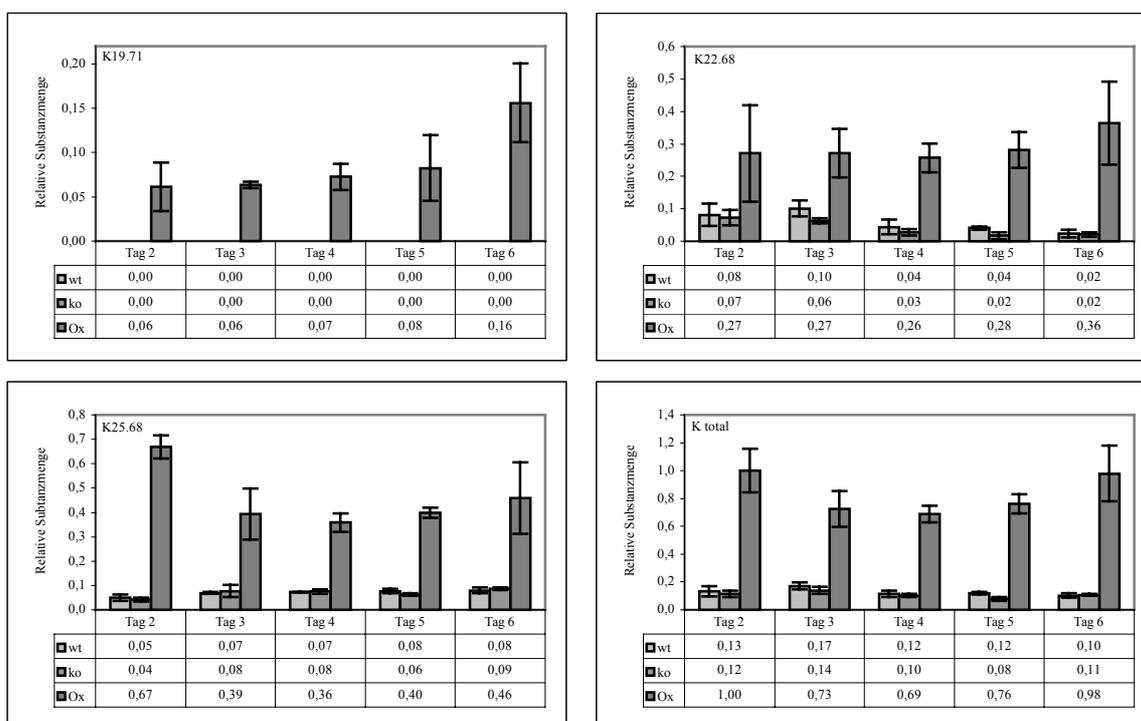


Abb. 45: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge nachgewiesenen Kämpferolglykoside. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Kämpferolderivate sowie der aus diesen resultierende relative Gesamt-Kämpferolgehalt (K total). Die Benennung der einzelnen Kämpferolderivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; K, Kämpferol.

3.3.2.3. Relative Quantifizierung der Sinapate

Die Auswertung der HPLC-Analyse ergab für den Sinapat-Gesamtgehalt in etiolierten Wildtyp und *MYB12*-Knockout-Pflanzen keinen signifikanten Unterschied, so wie er noch in Weißlicht-bestrahlten Keimlingen zu beobachten war. Die *MYB12*-Überexpression führte aber immer noch zu einer geringfügigen Erhöhung des Gesamt-Sinapatgehalts. Das Haupt-Sinapat in etiolierten Wildtyp-Keimlingen war nicht länger S17.96, sondern S32.15, das unter Lichtausschluss in allen drei Linien verstärkt gebildet wurde. Aus den gleichen Gründen wie schon im Falle der Weißlicht-bestrahlten Keimlinge erläutert, wurde auch hier auf die Darstellung der Gesamtsinapatgehalte in den drei Linien verzichtet. Die Ergebnisse der Sinapat-Quantifizierung sind Abbildung 46 zu entnehmen.

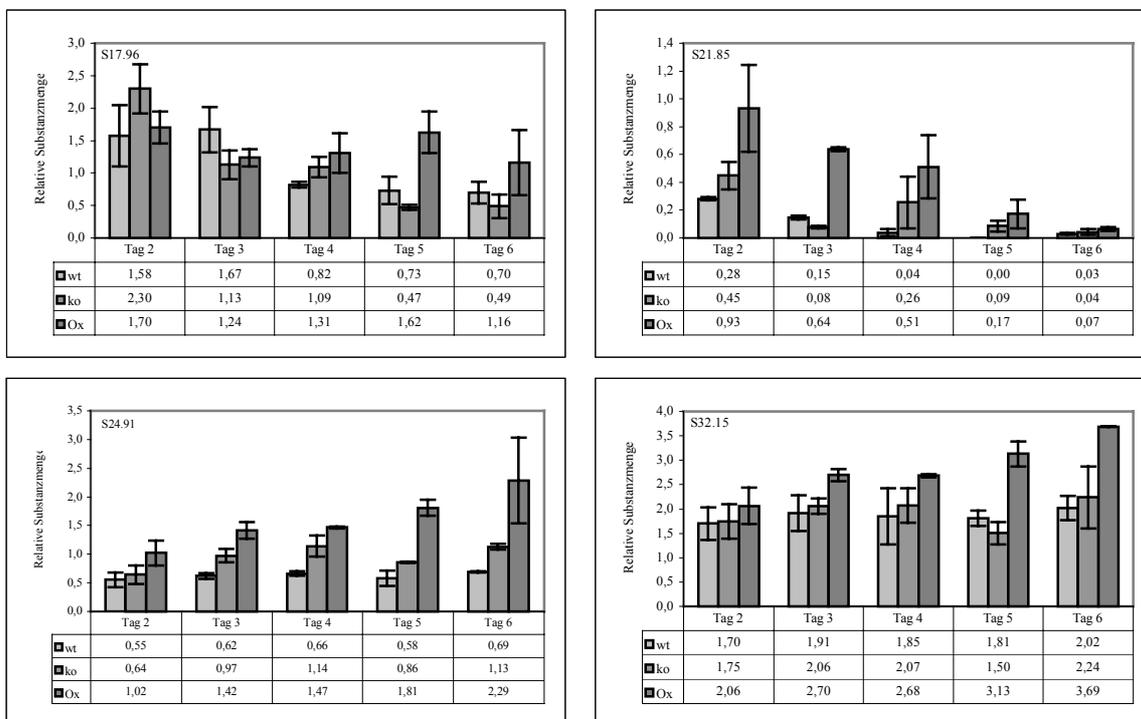


Abb. 46: Relative Quantifizierung der in der HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge nachgewiesenen Sinapinsäurederivate. Dargestellt sind die auf den internen Standard Naringenin normalisierten relativen Substanzmengen der einzelnen Sinapinsäurederivate. Die Benennung der einzelnen Sinapinsäurederivate erfolgte nach der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Nomenklatur und ist jeweils oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; S, Sinapat.

3.4. Naturstoffreagenz A-Färbung von *A. thaliana*-Keimlingen

Die Visualisierung der in Keimlingen vorhandenen Flavonoide durch Färbung mit Naturstoffreagenz A sollte die gewonnenen HPLC-Daten zum *myb12*-Phänotyp ergänzen. Gefärbt und fotografiert wurden 6 Tage alte, sowohl belichtete als auch etiolierte, Keimlinge aller drei *MYB12*-Linien wie in Abschnitt 2.2.29. beschrieben. Die früher festgestellten biochemischen Differenzen zwischen Wildtyp-, *myb12*-Knockout- und *MYB12*-Überexpressionspflanzen, sowie zwischen lichtgewachsenen und etiolierten Keimlingen, konnten durch das unterschiedliche Färbeverhalten der Keimlinge bestätigt werden. Ein Vorteil der direkten Visualisierung der Flavonoid-Akkumulation lag dabei in der Möglichkeit diese im Keimling lokalisieren zu können. Dokumentiert wurden die beobachteten Fluoreszenzen in vier Bereichen der Keimlinge: dem oberen Hypokotyl inklusive der Kotyledonen (Abbildung 47 und 48; A, E, I), der Hypokotyl-Wurzel-Übergangszone (Abbildung 46 und 48; B, F, J), der Wurzelhaarzone (Abbildung 47; C, G, K) sowie der Wurzelspitze (Abbildung 47 und 48; D, H, L). Da in etiolierten Keimlingen keine Fluoreszenz in der Wurzelhaarzone zu erkennen war, wurde stattdessen der distale Bereich des oberen Hypokotyls unmittelbar unterhalb des jeweils in den Teilen A, E und I der beiden Abbildungen dargestellten Bereiches fotografiert (Abbildung 48; B, F, J).

3.4.1. Flavonoid-Akkumulation in belichteten Keimlingen

Im Bereich des oberen Hypokotyls zeigten Wildtyp-Keimlinge eine gelb-grüne Fluoreszenz (Abb. 47A), hervorgerufen durch die Anwesenheit von Quercetin- (gelb) und Kämpferolderivaten (grün). Im Vergleich dazu war die Färbung der Knockout-Keimlinge in dieser Region sichtbar schwächer ausgeprägt (Abb. 47E). *MYB12* überexpressierende Pflanzen fluoreszierten in diesem Abschnitt aufgrund einer erhöhten Flavonolkonzentration orange-gelb bis orange-rot (Abb. 47I). Für alle drei Linien konnte eine Flavonol-Akkumulation am Sprossvegetationspunkt beobachtet werden, der deutlich als stark fluoreszierende Struktur zwischen den beiden Keimblättern zu erkennen war. Die flavonolspezifische Fluoreszenz war im Bereich der Wurzel auf den Zentralzylinder beschränkt. Die Wurzelepidermis fluoreszierte in der Sinapinsäurederivate anzeigenden Farbe Blau. Der Flavonolgehalt in der Wurzel von *MYB12*-Knockout-Keimlingen war gegenüber dem im Wildtyp klar reduziert. Die Anfärbung des Zentralzylinders war in der Hypokotyl-Wurzel-Übergangszone von Knockout-Keimlingen noch am deutlichsten sichtbar (Abb. 47F), nahm zur Wurzelhaarzone hin jedoch stark ab

(Abb. 47G). Die beobachtete Fluoreszenz in Keimlingen der Überexpressionslinie im Bereich des Hypokotyl-Wurzel-Übergangs bzw. der oberen Wurzel war ausgeprägter als im Wildtyp. Die gleiche orange-gelbe Färbung wie für das Hypokotyl war auch hier zu erkennen (Abb. 47J). In der Wurzelhaarzone schienen die Unterschiede zur Wildtyp-Wurzel weniger in der Intensität, als der Qualität der Fluoreszenz zu liegen. Überexpressionskeimlinge schienen dort etwas mehr Kämpferolderivate aufzuweisen als ihre Wildtyp-Gegenstücke, was sich in einer etwas mehr ins Grünliche verschobenen Färbung zeigte (Abb. 47K). In der Wurzelspitze, im Bereich des Apikalmeristems, war eine intensive Flavonol-Akkumulation für Wildtyp- und, noch stärker, für *MYB12* überexpressierende Keimlinge zu beobachten (Abb. 47D, L). In Knockout-Keimlingen hingegen fiel diese sehr viel schwächer aus (Abb. 47H).

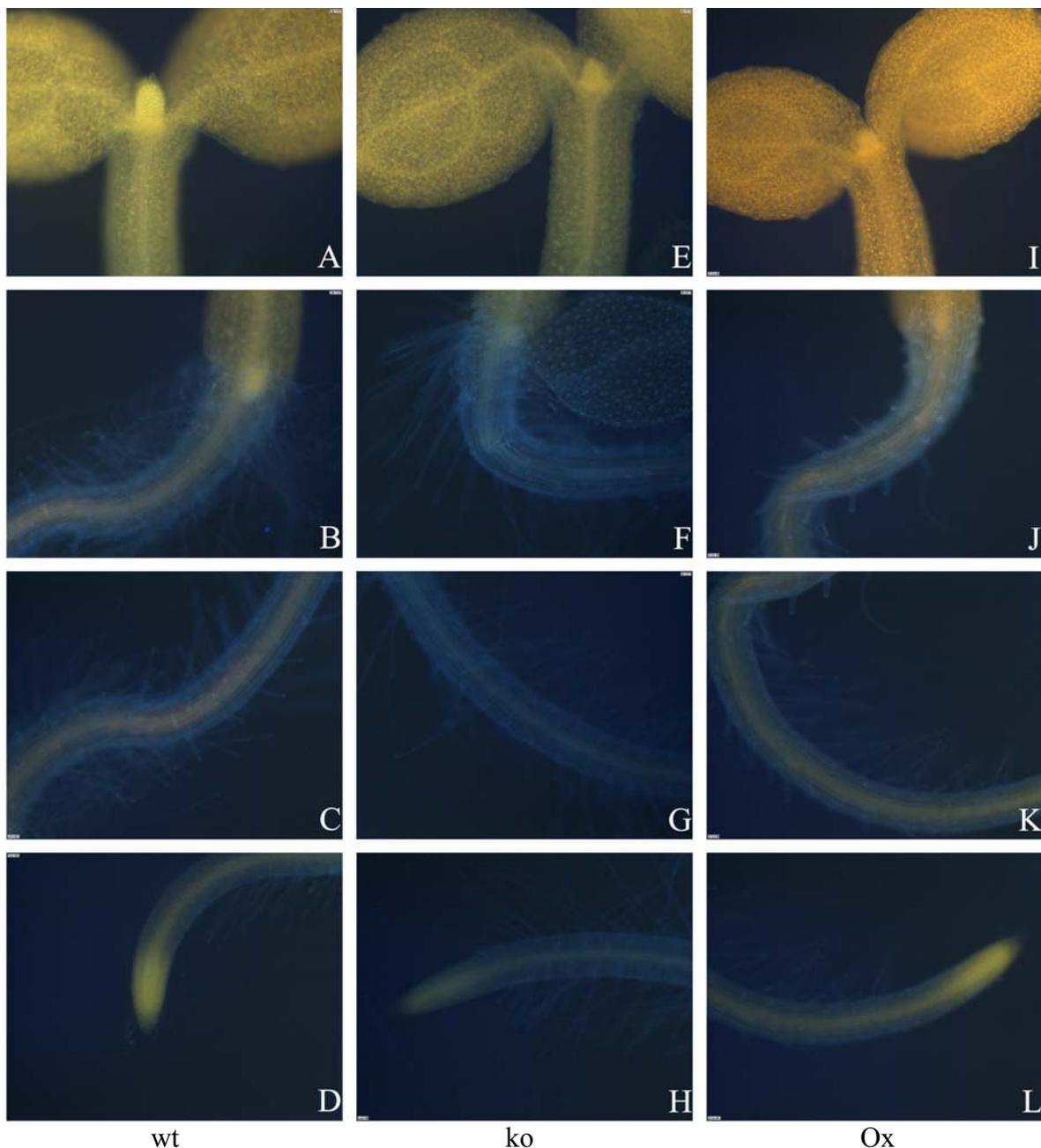


Abb. 47: Abbildungsunterschrift siehe bitte nächste Seite.

Abb. 47: Naturstoffreagenz A-Färbung 6 Tage alter, belichteter Keimlinge. Die gewählte Objektivvergrößerung betrug 10, die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 365 nm, fotografiert wurde diese bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die abgebildeten Keimlingsregionen sind: oberes Hypokotyl mit Kotyledonen (A, E, I), Hypokotyl-Wurzel-Übergangszone (B, F, J), Wurzelhaarzone (C, G, K) und Wurzelspitze (D, H, L). Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.4.2. Flavonoid-Akkumulation in etiolierten Keimlingen

In etiolierten Keimlingen konnte eine flavonolspezifische Fluoreszenz nur in den Kotyledonen und dem oberen Bereich des langgestreckten Hypokotyls festgestellt werden (Abb. 48A, B, E, F, I, J). Der untere Abschnitt des Hypokotyls in der Wurzelübergangszone als auch die gesamte Wurzel selbst zeigten keinerlei auf die Anwesenheit von Quercetin- oder Kämpferol-derivaten hinweisende Färbung (Abb. 48C, D, G, H, K, L). In den distalen Regionen der Wurzel war selbst die schwache, blaue Fluoreszenz der Sinapate, wie noch im oberen Teil der Wurzel sichtbar, nicht mehr vorhanden (Abb. 48 D, H, I). Die Färbung der Keimblätter schien in etiolierten Keimlingen durchgängig intensiver als in denen belichteter Keimlinge zu sein. Umgekehrt verhielt es sich mit der Fluoreszenz des Hypokotyls, welches in lichtgewachsenen Keimlingen stärker gefärbt erschien. Hier zeigte sich die Fluoreszenz fokussiert im Leitbündelsystem (Abb. 48B, F, J). Wie schon in belichteten Keimlingen, so war auch in etiolierten Keimlingen der Sprossvegetationspunkt durch seine stärkere Fluoreszenz in allen drei *MYB12*-Linien deutlich hervorgehoben sichtbar. Zwischen den etiolierten Keimlingen des Wildtyps und der *myb12*-Knockout-Linie konnten, wie schon in der HPLC-Analyse, auch mittels der Naturstoffreagenz A-Färbung keine signifikanten Unterschiede im Flavonolgehalt festgestellt werden (Abb. 48A, E, bzw. B, J). Anders im Falle der Überexpressionslinie, dort konnte erneut wie schon in belichteten Keimlingen eine deutliche orange-gelbe, vor allem auf eine erhöhte Quercetinkonzentration zurückzuführende, Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 48I, J).

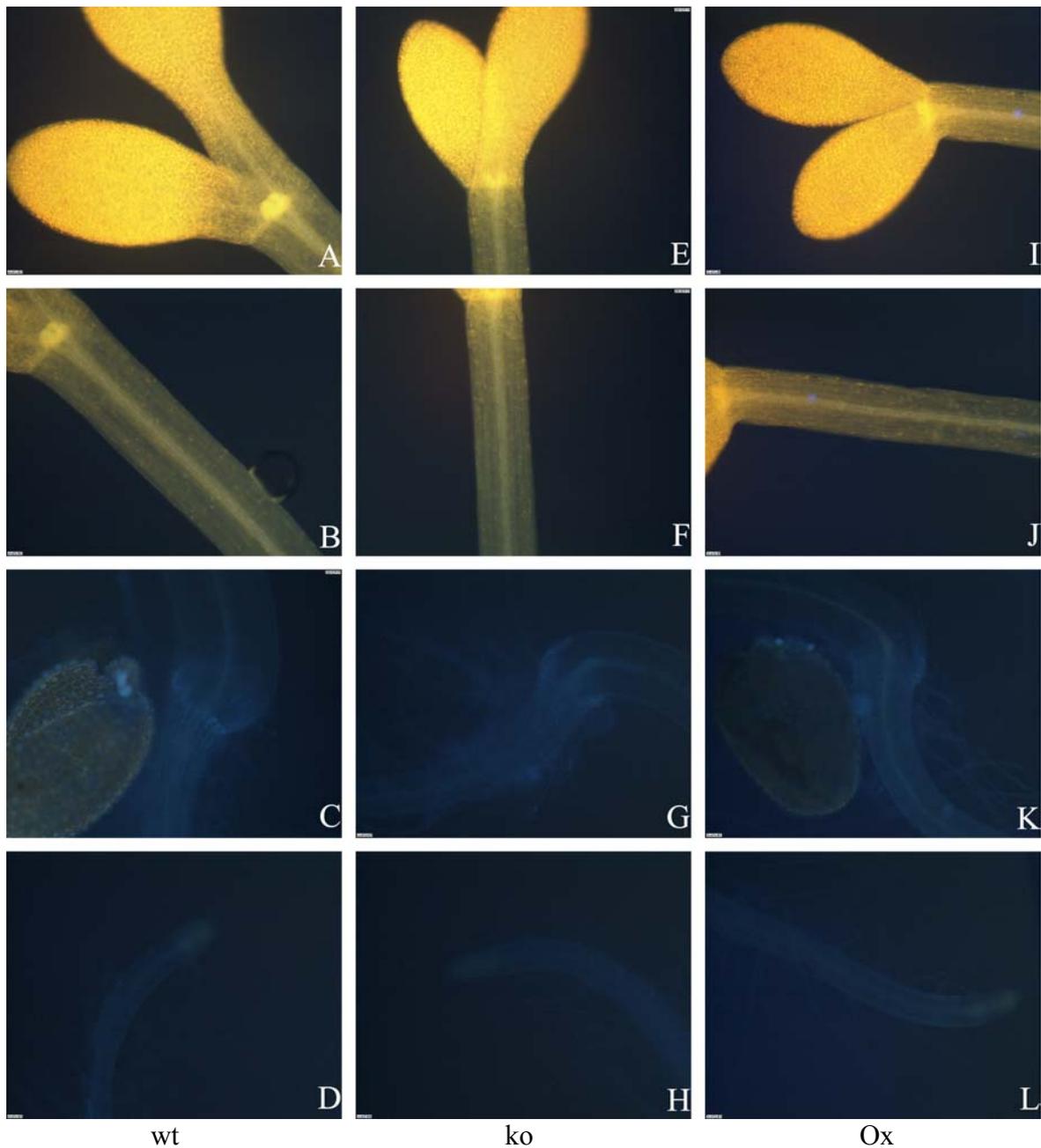


Abb. 48: Naturstoffreagenz A-Färbung 6 Tage alter, etiolierter Keimlinge. Die gewählte Objektivvergrößerung betrug 10, die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 365 nm, fotografiert wurde diese bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die abgebildeten Keimlingsregionen sind: oberes Hypokotyl mit Kotyledonen (A, E, I), oberes Hypokotyl (B, F, J), Hypokotyl-Wurzel-Übergangszone (C, G, K) und Wurzelspitze (D, H, L). Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie.

3.5. Bestimmung des Anthocyangehalts von *A. thaliana*-Keimlingen

Getestet werden sollte, ob der *myb12*-Phänotyp sich, neben der Produktion von Flavonolen, auch auf die Bildung von Anthocyanen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden aus 5 Tage alten Keimlingen der drei *MYB12*-Linien (Weißlicht-bestrahit und etioliert) die Anthocyane durch Behandlung mit Methanol/HCl extrahiert und photometrisch quantifiziert (2.2.30.). Abbildung 49 fasst die Ergebnisse dieser Analyse zusammen.

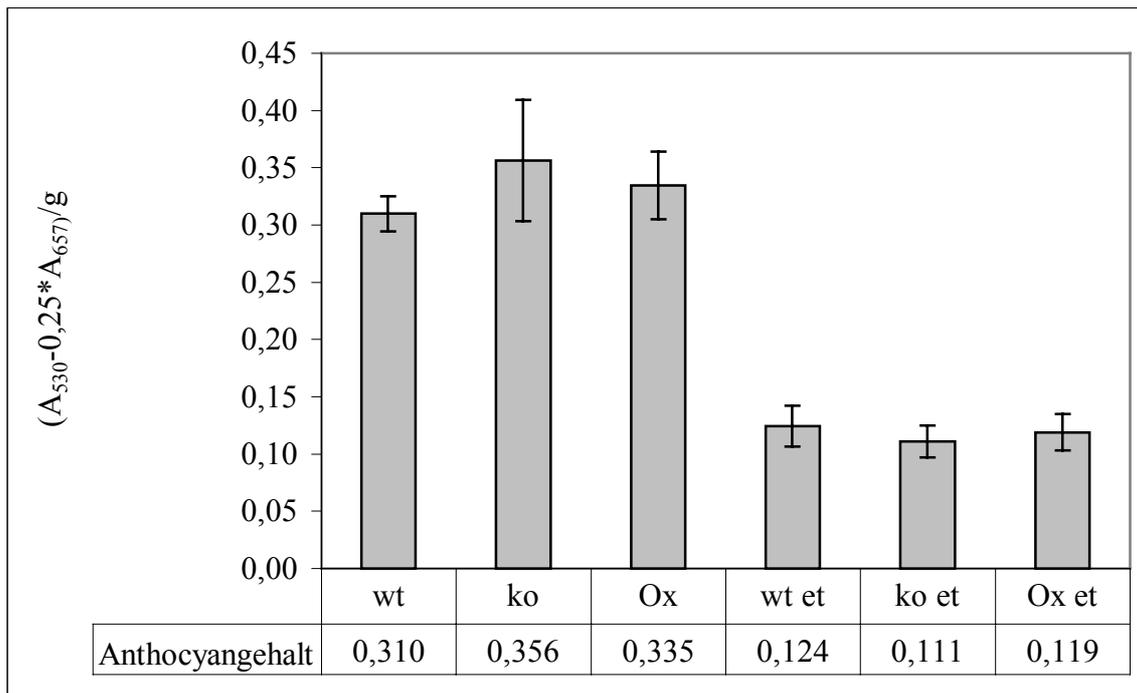


Abb. 49: Photometrische Bestimmung des Anthocyangehalts 5 Tage alter Keimlinge. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus insgesamt sechs Messungen unter Verwendung von zwei unabhängigen Keimlingspräparationen. Abkürzungen: wt, Wildtyp; ko, *myb12*-Knockout-Linie; Ox, *MYB12*-Überexpressionslinie; et, etioliert; A_{530} , Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm; A_{657} , Absorption bei einer Wellenlänge von 657 nm.

Es konnte kein Einfluss der *MYB12*-Expression auf den Anthocyangehalt der Keimlinge festgestellt werden, was im Einklang mit der Tatsache, dass das *DFR*-Gen nicht unter der Kontrolle von *MYB12* steht, war. Die Werte für die drei *MYB12*-Linien stimmten jeweils innerhalb der Fehlergrenzen, sowohl in Weißlicht-bestrahlten als auch etiolierten Keimlingen, überein. Beeinflusst wurde der Anthocyangehalt der Proben allein durch die An- oder Abwesenheit eines Lichtstimulus. Der Anthocyangehalt in etiolierten Keimlingen war der Erwartung entsprechend deutlich niedriger (etwa um den Faktor 3) als in belichteten Keimlingen.

3.6. Lokalisation des *MYB12*-Gens im Genom von *A. thaliana*

Mittels des in Abschnitt 2.2.24. beschriebenen Verfahrens der Kartierung unter Verwendung von RI-Linien konnte das *AtMYB12*-Gen (Marker Name FM12B) auf dem langen Arm von Chromosom 2 zwischen den Markern ATHB7 und mi79a bei 87,48 cM lokalisiert werden. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der Analyse der RI-Linien zusammen. Abbildung 50 zeigt in einer schematischen Darstellung die Position von *MYB12* auf Chromosom 2.

RI-Linie Nr.	4	5	13	14	17	19B	25	29	30	32	33	34	35	36	37	46
Accession	L	C	C	C	C	L	L	L	C	C	C	L	C	C	C	C

RI-Linie Nr.	52	53	54	59	62	67	68	71	79	84	90	107	113	115	123	125
Accession	C	L	L	C	C	C	C	C	C	C	L	L	C	C	C	L

RI-Linie Nr.	131	160	161	166	167	173	175	177	179	180	181	182	188	190	191	193
Accession	C	L	C	C	C	L	L	L	L	L	L	L	C	L	L	L

RI-Linie Nr.	194	199	209	214	217	231	232	235	237	238	240	242	245	253	257	259
Accession	L	C	C	L	L	L	C	C	L	C	C	C	C	C	C	C

RI-Linie Nr.	263	264	266	267	279	283	284	288	295	296	297	302	303	311	332	342
Accession	L	L	L	C	L	C	L	L	C	L	C	L	L	L	L	L

RI-Linie Nr.	345	349	350	351	356	358	359	363	367	370	377	386	390	394	395	397
Accession	L	C	L	C	C	C	L	L	C	L	L	L	L	C	L	L

RI-Linie Nr.	398	400	Col	Ler
Accession	C	C	C	L

Tab. 2: Segregation des *MYB12*-spezifischen AFLP in 100 RI-Linien. Angegeben sind neben der Nummer der jeweiligen RI-Linie auch die zugehörige Accession des PCR-amplifizierten *MYB12*-Intron-Fragments. Abkürzungen: C, Accession Col; L, Accession Ler; Col und Ler, Wildtyp-Kontrollen.

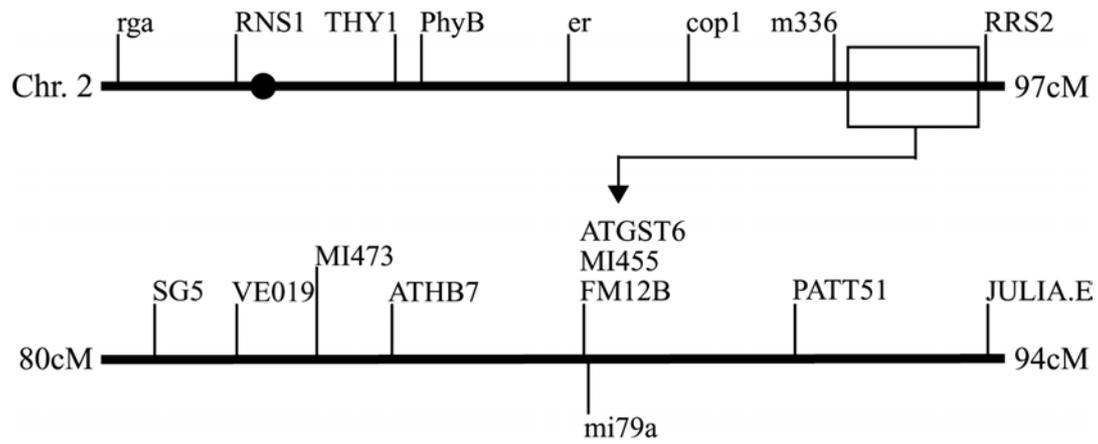


Abb. 50: Schematische Übersicht der RI-Karte von Chromosom 2. Der Marker für *MYB12* (FM12B) befindet sich bei 87,48 cM zwischen den Markern ATHB1 und mi79a auf dem unteren Arm des Chromosoms.

4. Diskussion

Die Identifikation aller Mitglieder der Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* ist inzwischen fast vollständig abgeschlossen (Stracke *et al.*, 2001). Der Fülle an Sequenzinformationen steht allerdings eine nur sehr lückenhafte funktionelle Charakterisierung dieser Faktoren entgegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors MYB12 als Regulator des Phenylpropanoidmetabolismus näher untersucht. Es wurde der Frage nach MYB12-Zielgenen und einem entsprechenden *myb12*-Phänotyp nachgegangen. In der Etablierung der Methode der quantitativen Echtzeit-RT-PCR lag ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit, ermöglicht diese doch Expressionsstudien mit einer bislang nicht darstellbaren Sensitivität durchführen zu können, was auch für zukünftige funktionelle Untersuchungen anderer, oftmals nur sehr schwach exprimierter, Transkriptionsfaktoren von großem Nutzen ist.

4.1. Transiente Expressionsstudien zur Funktion von MYB12

4.1.1. Transiente Expressionsanalysen identifizieren die „frühen“ Flavonoidgene als potentielle MYB12-Zielgene

Die Transfektionsanalysen zur Regulation des *F3'H*-Genes durch MYB12 bzw. die heterologen Faktoren *ZmP* und *ZmC1/ZmSn* vervollständigten Ergebnisse aus früheren Experimenten, bei denen die anderen an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene bereits in gleicher Weise untersucht worden waren (Mehrtens, 1999). Insgesamt konnten durch transiente Expressionsstudien in Protoplasten der *A. thaliana*-Zellkulturlinie At7 als potentielle MYB12 Zielgene innerhalb dieses Stoffwechselweges die flavonolspezifischen, genauer, die kämpferolspezifischen Gene *CHS*, *CFI*, *F3H*, und *FLS* identifiziert werden. Die zur Quercetin- bzw. Anthocyaninsynthese benötigten Gene *F3'H* und *DFR* wurden nicht durch MYB12 aktiviert. Dasselbe Aktivierungsmuster wie MYB12 zeigte der heterologe, jedoch zu MYB12 strukturell sehr ähnliche, Transkriptionsfaktor *ZmP* aus *Z. mays*. Das Ausmaß der *FLS*-Aktivierung war allerdings wesentlich geringer als für MYB12 beobachtet. Beide Faktoren sind in ihrer Funktion nicht auf die Anwesenheit eines Koaktivators angewiesen, so wie es für *ZmC1* der Fall ist, der bei der Aktivierung seiner Zielgene von der Interaktion mit einem bHLH-Faktor

der R-Familie (Cone *et al.*, 1986; Cone *et al.*, 1993; Chandler *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1989) abhängig ist.

Im transienten At7-Testsystem wurden die anthocyaninspezifischen Gene *CHS*, *CFI*, *F3H* und *DFR* von der Effektorkombination *ZmC1/ZmSn* aktiviert, was mit deren Funktion in *Z. mays* als Regulatoren der Anthocyanbiosynthese übereinstimmt (Chen und Coe, 1977; Cone *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1987; Coe *et al.*, 1988; Dooner *et al.*, 1991). Die dazu nicht benötigten Gene *FLS* und *F3'H* konnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht als *ZmC1/ZmSn*-Zielgene identifiziert werden. Verschiedene vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Gene der zur Flavonoidbiosynthese benötigten Enzyme sich in zwei Untergruppen unterteilen lassen: in sogenannte „frühe“ und „späte“ Gene (Martin *et al.*, 1991; Kubasek *et al.*, 1992; Koes *et al.*, 1994; Shirley *et al.*, 1995, Pelletier und Shirley, 1996; Pelletier *et al.*, 1997). Die Expression der „frühen“ Gene *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* ist koreguliert, während die „späten“ Gene, wie *DFR* und *LDOX* (siehe Abbildung 2), einer differentiellen Regulation unterliegen. In dieser Hinsicht würde, den Ergebnissen der Transfektionsanalysen folgend, *F3'H* als „spätes“ Gen klassifiziert werden können.

Die Tatsache, dass das *DFR*-Reporterkonstrukt in den transienten Expressionsstudien nicht durch *ZmP* aktivierbar war, obschon der Faktor in *Z. mays* ein *DFR*-Regulator ist (Grotewold *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1997), könnte auf die divergente Evolution der Promotor-Sequenzen der Orthologe in beiden Spezies hindeuten (Quattrocchio *et al.*, 1998). Um dies zu testen, könnte ein *ZmDFR*-Reporterkonstrukt im transienten At7-System auf die Aktivierbarkeit durch *ZmP*, aber auch MYB12 hin untersucht werden. Trifft die Hypothese zu, so sollte dieses Konstrukt sowohl *ZmP*- als auch MYB12-responsiv sein. Potentielle Bindungsstellen für MYB-Transkriptionsfaktoren sind sowohl im Promotorbereich des *Z. mays*- als des *A. thaliana-DFR*-Genes zu finden, trotzdem ist nur der *Z. mays*-Promotor das Ziel der Regulation durch den Faktor *ZmP*. Demnach ist es nicht möglich allein aus der Anwesenheit eines konservierten *cis*-aktiven Elements innerhalb eines Promotors auf dessen Funktionalität zu schließen. Selbst der Nachweis der Bindung eines Aktivators an ein konserviertes Promotorelement führt nicht zwangsläufig zur Aktivierung der Transkription, wie das Beispiel der zwei MYB-Faktoren *AmMYB305/340* aus *A. majus* zeigt, die, wenn in Hefe expremiert, die Promotoren von *CHS*, *DFR* und *LDOX* binden, ohne dass jedoch eine Aktivierung stattfindet (Moyano *et al.*, 1996).

4.1.2. MYB12 als Regulator des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels und der Sinapinsäurebiosynthese

In den transienten Expressionsanalysen war MYB12 nicht nur an der Regulation der Flavonoidbiosynthese im engeren Sinne beteiligt (Abbildung 10), sondern es konnten auch potentielle Zielgene im allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel identifiziert werden (Abbildung 11), dessen Endprodukt 4-Cumaroyl-CoA zusammen mit Malonyl-CoA das Ausgangssubstrat für das am Beginn des Flavonoidbiosyntheseweges stehende Enzym CHS darstellt. Erste Hinweise auf eine mögliche regulatorische Rolle von MYB12 auch in diesem Abschnitt des Phenylpropanoidmetabolismus resultierten aus vorangegangenen Transfektionsexperimenten, die das Gen *4CL3* als MYB12-induziert identifizierten (Mehrrens, 1999). Die systematische Untersuchung der weiteren Stukturgene dieses Stoffwechselweges ergaben, dass auch eine MYB12-abhängige Aktivierung der Reporterkonstrukte der Gene *PAL1*, *PAL2*, *PAL4* und *C4H* vorlag. Die Promotoren von *PAL3*, *4CL1* und *4CL2* waren hingegen keine MYB12-Ziele (Abbildung 9). Die Mitglieder der *PAL*- und *4CL*-Genfamilien unterlagen also einer differentiellen Regulation durch MYB12. Eine solche differentielle Kontrolle der Genexpression ist für beide Genfamilien, speziell für die *PAL*-Familie auch in anderen Spezies, bereits früher beobachtet worden. So konnten Wanner *et al.* (1995) in *A. thaliana* für *PAL1/PAL2* übereinstimmende gewebespezifische und pathogen-induzierte Expressionsmuster nachweisen. Abweichend dazu war eine Expression des *PAL3*-Genes nur auf sehr niedrigem Niveau in Wurzeln und in Keimlingen nachweisbar. Die gemeinsame Expression von *PAL1* und *PAL2* konnte dabei mit dem Auftreten extensiver Homologie-Bereiche in den Promotoren der beiden Gene korreliert werden, wohingegen das *PAL3*-Gen diese nicht aufwies. Auch die Mitglieder der *PAL*-Familie in *P. crispum* unterliegen der differentiellen Genexpression (Logemann *et al.*, 1995). Die Expression von *PcPAL1-3* erfolgt koordiniert, sowohl was Gewebespezifität als auch stimulusabhängige Induktion (UV-Licht- oder Pathogeneinwirkung, Verwundung) anbetrifft. Das vierte Mitglied der Genfamilie, *PcPAL4*, ist nicht durch Bestrahlung mit UV-Licht aktivierbar, ebenso ist die Erhöhung der Expression als Antwort auf Verletzung der Pflanze strikt auf, und im Gegensatz zu den anderen drei *PAL*-Isoformen, die Wurzel beschränkt. Die differentielle Kontrolle der Expression der verschiedenen *PAL*-Isoformen wird mit dem Vorgang des „metabolic channeling“, der Kanalisierung von Intermediaten in bestimmte Abschnitte eines Stoffwechselweges, assoziiert. So scheinen *LePAL2* und *LePAL3* aus *Lycopersicon esculentum* an der stimulusabhängigen (UV-Strahlen, Verwundung) Erhöhung des Intermediatflusses in den Phenylpropanoidstoffwechsel verantwortlich zu sein (Sarma *et al.*, 1998). Die Hemmung der Expression von *LePAL3* durch Zimtsäure, Cumarinsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure, Metabolite des Ligninstoffwechsels, lässt den Schluss zu,

dass in *L. esculentum* LePAL3 den Intermediat-Fluss in diesen Teil des Phenylpropanoidmetabolismus kontrolliert. LePAL2 könnte die gleiche Rolle für die Flavonoidbiosynthese übernehmen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die in *Quercus pedunculata* vorkommenden PAL-Isoformen (Alibert *et al.*, 1972) gemacht.

Es erscheint aufgrund der genannten Beispiele nicht ausgeschlossen, dass die differentielle Responsivität der Mitglieder der *A. thaliana*-PAL-Genfamilie auf MYB12 ebenfalls Ausdruck des „metabolic channeling“ ist, indem speziell die Enzym-Isoformen verstärkt gebildet werden, die der Flavonoidbiosynthese zugeordnet sind. Das dies tatsächlich der Fall sein könnte, zeigt auch die unterschiedliche MYB12-Wirkung auf Reporterkonstrukte der drei vorkommenden 4CL-Varianten. Aktiviert wird nur der 4CL3-Promotor, nicht aber der der beiden anderen Isoformen. Ehling *et al.* (1999) konnten für die von den Mitgliedern dieser Genfamilie kodierten Enzyme unterschiedliche Substratspezifitäten nachweisen, die eine Beteiligung an jeweils verschiedenen Teilabschnitten des Phenylpropanoidstoffwechsels nahe legen. Insbesondere die Aktivität von 4CL3 könnte speziell mit der Kanalisierung von 4-Cumaroyl-CoA für die Synthese von Flavonolen und Anthocyanen korreliert sein, wie sich aus dem 4CL3-Expressionsmuster (starke Expression in Blüten, aber keine in lignifizierten Organen wie Stengel oder Wurzel), der ausgeprägten Induzierbarkeit durch UV-Bestrahlung (nicht aber durch Verwundung oder Pathogeneinwirkung) und der größeren Spezifität für 4-Coumarinsäure im Vergleich zu Kaffeesäure oder Ferulasäure (den unmittelbareren Lignin-Biosynthese-Vorstufen) ableiten lässt. Die 4CL-Isoformen 1 und 2 sind hingegen in die Synthese von Lignin, Suberin sowie zellwandgebundener und freier phenolischer Substanzen involviert. Weitere Beispiele des „metabolic channeling“ durch 4CL-Isoformen sind auch aus anderen Spezies bekannt, z.B. ist Pt4CL2 aus *Populus tremuloides* an der Flavonoidbiosynthese beteiligt (Hu *et al.*, 1998), während 4CL16 aus *Glycine max* eine Rolle bei der Phytoalexinbiosynthese spielt (Uhlmann und Ebel, 1993).

Für die Funktion von MYB12 im allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus lassen sich die Kotransfektionsresultate also in der Weise interpretieren, dass der Faktor, nicht nur die Flavonoidbiosynthese im engeren Sinne, sondern auch die Bereitstellung der dazu benötigten Vorstufen kontrolliert, zumindest von 4-Cumaroyl-CoA. Ob dies auch für das zweite CHS-Substrat Malonyl-CoA zutrifft muss hier offen bleiben. Erwähnt werden sollte schließlich, dass auch die Kombination der heterologen Faktoren ZmC1/ZmSn das PAL1-, PAL2-, PAL4- und C4H-Promotorkonstrukt zu aktivieren vermochte. Das Ausmaß dieser Aktivierung war jedoch durchgängig deutlich schwächer ausgeprägt als für MYB12 beobachtet. Eine signifikante Aktivierung der Mitglieder der 4CL-Genfamilie konnte für ZmC1/ZmSn nicht gezeigt werden.

Die oben diskutierte Kontrolle der Synthese der Flavonoid-Vorstufen trifft auf die *Z. mays*-Faktoren *ZmC1/ZmSn* in der *A. thaliana*-Zellkultur offenbar in dieser Form nicht zu.

Eine unmittelbare Regulation der Sinapinsäurebiosynthese durch MYB12, oder *ZmC1/ZmSn*, konnte durch die Transfektionsanalysen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12). Weder *F5H* noch *OMT*, deren beider Genprodukte zur Synthese von Sinapinsäure benötigt werden, zeigten eine signifikant erhöhte Reporteraktivität in Kotransfektionsexperimenten mit MYB12 oder der Kombination *ZmC1/ZmSn* als Effektoren. Damit erhärtet sich die Vermutung, dass MYB12 spezifisch an der Kontrolle der Flavonoidbiosynthese mitwirkt.

4.1.3. Die MYB12-Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors wird durch das MRE der *LRU^{AtCHS}* vermittelt

Die Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors durch MYB12 war erwartungsgemäß abhängig von der Anwesenheit eines intakten MREs (Abbildung 13). Dieses stellt die Erkennungs- und Bindungsstelle für MYB-Faktoren dar und ist auch für die Aktivierung durch die heterologen Faktoren *ZmP* sowie *ZmC1/ZmSn* erforderlich (Hartmann, 1998; Hartmann *et al.*, in Vorbereitung). Die Blockmutationen in den beiden anderen *cis*-aktiven Elementen der *LRU^{AtCHS}*, dem ACE und dem RRE, zeigten keine vergleichbaren Auswirkungen, allerdings ging hier die Aktivierung um etwa die Hälfte auf ungefähr 1000fach in Relation zur Kontrolle zurück. Die Ursache dieser Reduktion ist unklar. Es könnte jedoch sein, dass die Konformation des *CHS*-Promotors durch die ACE- und RRE-Blockmutation bzw. durch das Fehlen der dort normalerweise bindenden Faktoren derart verändert wird, dass die Effektivität der MYB12-Aktivierung herabgesetzt wird. Das RRE, der hypothetische Bindungsort für bHLH-Transkriptionsfaktoren ist nur, wie bereits früher von Hartmann *et al.* (in Vorbereitung) gezeigt, bei der *ZmC1/ZmSn*-Interaktion zur Aktivierung der Genexpression von Bedeutung. Die Block-Mutation im ACE hatte keinerlei messbaren Auswirkungen auf die *ZmC1/ZmSn*-Wirkung.

Die Ergebnisse von Hartmann *et al.* (1998) zur Induktion des *CHS*-Minimal-Promotors durch UV-haltiges Weißlicht konnten im Rahmen dieser Arbeit vollständig reproduziert werden. Voraussetzung für eine UV-Induktion ist das Vorhandensein eines intakten ACE und eines intakten MRE. Beide wirken synergistisch durch die Bindung von bZIP- bzw. MYB-Faktoren bei der lichtabhängigen Regulation des *CHS*-Promotors zusammen. Interessanterweise konnte die Kotransfektion mit MYB12 und in geringerem Umfang auch mit *ZmP*, den negativen Effekt eines defekten MREs auf die Lichtantwort teilweise kompensieren. Dies erscheint auf den ersten Blick paradox, benötigt doch auch MYB12 ein intaktes MRE zur Aktivierung des *CHS*-Minimalpromotors. Es könnte jedoch möglich sein, dass das MYB12-Protein mit dem

am ACE gebundenen, an der UV-Antwort beteiligten, bZIP-Faktor zu interagieren vermag und so indirekt an den *CHS*-Promotor gebunden wird. Die hieraus resultierende Aktivierung ist zwar deutlich schwächer als die beim Wildtyp-Promotor beobachtete, trotzdem ist sie signifikant. Eine andere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Annahme, dass MYB12 in hohen Konzentrationen, wie sie in transfizierten Protoplasten vorliegen, unspezifisch, d.h. in MRE-unabhängiger Weise direkt an den *CHS*-Minimalpromotor zu binden vermag. Die Interaktion von MYB12 mit dem lichtabhängigen, am ACE gebundenen bZIP-Faktor wäre dann wieder die Voraussetzung zur Aktivierung, denn im Dunkeln resultiert die hypothetische Promotorbindung von MYB12 in keiner erhöhten Reporteraktivität. Das relativ geringe Ausmaß der Aktivierung ließe sich durch die geringere Affinität der MRE-unabhängigen MYB12-Bindung an den Promotor erklären. Insgesamt weisen die Transfektionsergebnisse nicht auf eine zentrale Rolle von MYB12 in der UV-vermittelten Induktion des *CHS*-Promotors hin, denn die ACE-Blockmutation hemmt die MYB12-Aktivierung nur in relativ geringem Maße, die durch UV-Licht bewirkte jedoch vollständig.

4.1.4. Das *myb12*-Knockout-Allel ist nicht funktionell

Die Verwendung des *myb12*-Knockout-Proteins (AT123) als Effektor in Kotransfektionsexperimenten führte zu keinerlei Aktivierung der getesteten Promotorkonstrukte (Abbildung 14). Damit ist eindeutig belegt, dass das *AT123*-Allel nicht länger für einen funktionellen Transkriptionsfaktor kodiert. Gezeigt werden konnte so auch, dass die MYB12-Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Drittel des Wildtyp-Proteins, welches in der Knockout-Variante fehlt (Abbildung 9), lokalisiert sein muss. Eine genauere Bestimmung der für die Transaktivierung relevanten Aminosäuren steht noch aus.

Die Lichtinduktion der *CHS*-, *CFI*- und *FLS*-Promotorkonstrukte schien durch die Anwesenheit des AT123-Proteins leicht inhibiert zu werden. Durchgängig erreichten die Induktionswerte nur noch ca. 60% - 70% des Wertes, der ohne die Anwesenheit des Effektors vorlag. Möglicherweise konkurriert das funktionsuntüchtige AT123-Protein mit einem an der Lichtinduktion involvierten MYB-Faktor um die Bindung an das MRE der LRU und mindert so die erreichbare Induktionsstärke. Andererseits spricht die unveränderte Induktion des *F3H*-Promotors auch bei Anwesenheit der defekten MYB12-Variante gegen diese Hypothese.

4.1.5. Die Gene *F3'H* und *DFR* sind in der *At7*-Zellkultur nicht UV-induzierbar

Abbildung 14 zeigt auch, dass weder die *F3'H*- noch die *DFR*-Expression in Protoplasten der *At7*-Zellkultur durch die Bestrahlung mit UV-Licht induzierbar ist, was erneut die bereits oben diskutierte Zweiteilung des Flavonoidbiosyntheseweges in „frühe“ und „späte“ Gene verdeutlicht. Wie Hartmann (1997) bereits gezeigt hat, sind die „frühen“ Gene *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* nach UV-Bestrahlung koreguliert. Das „späte“ Strukturgen *DFR* ist dies jedoch nicht, ebenso wie das *F3'H*-Gen, das aus diesem Grund auch als „spätes“, unter differentieller Regulation stehendes, Gen der Flavonoidbiosynthese bezeichnet werden kann. Dies entspricht den Ergebnissen bezüglich der Aktivierbarkeit der einzelnen Reporterkonstrukte durch MYB12. MYB12 ist demnach in der *A. thaliana*-Zellkultur nur an der Regulation der „frühen“, UV-induzierbaren, Gene des Stoffwechselweges beteiligt.

4.1.6. Der MYB12-Promotor ist durch UV-Licht induzierbar/Definition eines MYB12-Minimalpromotors

Der im letzten Paragraphen geschilderten Übereinstimmung zwischen UV-Induzierbarkeit und MYB12-Aktivierbarkeit der „frühen“ Flavonoidbiosynthese-Gene wegen, wurde auch der *MYB12*-Promotor selbst auf seine UV-Responsivität hin untersucht. Wie sich zeigte, war diese tatsächlich gegeben (Abbildung 15). Durch eine Deletionsanalyse konnte ein operativer, zur UV-Induktion hinreichender, *MYB12*-Minimal-Promotor definiert werden. Dieser umfasst den Bereich 403bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart des Gens (Abbildung 50). Aus dieser Analyse folgt auch, dass im Promotorbereich zwischen den Positionen -259bp und -403bp die für eine effektive UV-Induktion notwendigen *cis*-Elemente lokalisiert sein müssen. Tatsächlich finden sich in diesem Abschnitt insgesamt drei ACS (ACGT containing sequence = potentielles ACE für das die funktionelle Charakterisierung fehlt). Diejenige bei Position -339bp/-342bp ist dabei, wie in der LRU^{*AtCFI*} Bestandteil einer RRS (R recognition sequence = potentielles RRE für das die funktionelle Charakterisierung fehlt)- Konsensussequenz (bei -343bp/-338bp). Ein weiteres ACS/RRS-Doppelement findet sich noch an Position -117bp/-122bp. An Position -194bp/-202bp befindet sich eine mögliche Bindungsstelle für pflanzliche MYB-Proteine. Die Sequenz dieser MRS (MYB recognition sequence = potentielles MRE für das die funktionelle Charakterisierung fehlt) weicht dabei in einer Position vom TypIIIC-Konsensus ($ACC^A/TA^C/AC$) ab. Wie schon für die beiden ACE/RRS-Doppelemente geschildert, kommen im *MYB12*-Minimalpromotor auch potentielle bHLH-Erkennungsstellen vor. Eine dritte RRS liegt an Position -41bp/-46bp. Eine detailliertere Analyse des *MYB12*-Minimalpromotors zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit

der soeben beschriebenen potentiellen *cis*-aktiven Elemente, etwa durch die Einführung von Blockmutationen, steht noch aus. Möglicherweise ließe sich so auch für den *MYB12*-Minimalpromotor, analog zu den bislang untersuchten Minimalpromotoren der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene, eine „LRU^{AtMYB12cc}“ bestimmen.

Die UV-Induzierbarkeit der *MYB12*-Expression wirft die Frage nach der Beteiligung des Faktors an der UV-Antwort erneut auf. Die Ergebnisse der Transfektionsanalyse des Blockmutationen in den verschiedenen *cis*-Elementen tragenden *CHS*-Minimalpromotors lassen nicht darauf schließen, dass *MYB12* Teil der UV-Signaltransduktionskette zur Aktivierung der *CHS*-Expression ist (vergl. 4.1.3.). Wäre die UV-vermittelte *CHS*-Induktion *MYB12*-abhängig, so sollte die Induktion der *MYB12*-Expression nach Beginn der UV-Einwirkung der von *CHS* vorangehen. Ein erstes *in planta*-Experiment zur Klärung dieser Fragestellung, die Generierung von Expressionskinetiken für *MYB12* und *CHS* in UV-bestrahlten etiolierten Wildtyp-Keimlingen, brachte wegen einer mangelnden zeitlichen Auflösung am Beginn der Kinetik keine klaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Wiederholung dieses Experiments mit kürzeren Intervallen der Probenahme, sowie die Ausweitung der Analyse auch auf Keimlinge der Knockout-Linie, sollten zur Klärung der Frage, ob die UV-Induktion des *CHS*-Genes tatsächlich *MYB12*-abhängig ist, beitragen. Wäre dies der Fall, so sollte die Aktivierung der *CHS*-Expression durch UV-Licht in der *myb12*-Knockout-Linie deutlich beeinträchtigt sein. Da diese Experimente noch ausstehen, muss die Rolle von *MYB12* in der UV-Signaltransduktion zur Aktivierung der *CHS*-Expression, möglicherweise auch der anderen „frühen“ Gene der Flavonoidbiosynthese auf Grundlage der bisher verfügbaren Daten offen bleiben.

```

-403 AGCTTTATCAAAAATTATAAGAAGAACAAAAAATGTGCGATTACTATCTGATCTACGTATT -344
-343 CACGTACAAAACAACAATTAATTTCAATAAAGATCTACTAACTTTAGAGAAAAAATCTTA -284
-283 TGTGTTAATAAAAAAGTACGTCAATGATCTCGGCACACACTAGAATTAGTGTCTAAGAG -224
-223 AACCCAGCAGCAACCTGCACGGACCGACCAGGAGTCTCTCGACGGTGAATAAGCCACGACT -164
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
-163 TCAGTCTCCTTCTAAACCAACGTGGCGCTTCTTACACCACAACGTTCATCATCTCCTT -104
-103 CTCCCTCGAACCCGCAAGCTCTTTTAAATCCCTTTCAATTAATTAATTAACTATATATCAC -44
-43 CTC CCCCTATATATATCTAAATCAGTCACTTTTTGCTTCTGTTCTCTGCTCACTCAGTAAC +17
+18 TTCTCTTCTCACTTACACACTCTCTCTCTCTCTCCATTGCCTTGACTTTTGTGGTCA +77
+78 GTGGAATAAACACATATAACCGCCGGAGACCATG

```

Abb. 50: Sequenz und Struktur des *MYB12*-Minimalpromotors. Grau unterlegt ist der in den Transfektionsexperimenten zur effektiven UV-Induktion des *MYB12*-Promotors identifizierte Bereich. Angegeben sind auch die Positionen sämtlicher MRS (grün), ACS (gelb) und RRS (blau). Rot markiert ist der Transkriptionsstart (+1), welcher als Referenzpunkt für alle Positionsangaben dient. Das ATG-Startkodon ist durch Fettdruck hervorgehoben.

4.1.7. Die Zielgene von MYB12 und MYB111 sind identisch

Die Frage nach dem Ausmaß funktioneller Redundanz zwischen den >125 in *A. thaliana* gefundenen, bzw. pflanzlichen R2R3-MYB-Proteinen im allgemeinen, konnte bisher, wegen nur lückenhaft vorhandenen Daten zur Funktion der meisten MYB-Faktoren, nicht hinreichend beantwortet werden. Es wird ein Zusammenhang zwischen Funktion und Struktur der MYB-Proteine vermutet. Strukturell ähnliche MYB-Faktoren, so wird generell angenommen, üben eine ähnliche, selten sogar identische Funktion innerhalb der Pflanze aus, so wie es für die *Z. mays*-Faktoren *ZmC1* und *ZmPl* der Fall ist (Cone *et al.*, 1993). Beide aktivieren die Strukturgene der Anthocyanbiosynthese, *ZmC1* jedoch im Aleuron und speziellen Blütengeweben, *ZmPl* dagegen in vegetativen Pflanzengeweben. Die beiden Paraloge haben also differentielle Expressionsmuster angenommen, sind jedoch funktionell vollständig äquivalent.

Anders der strukturell zu *ZmC1/ZmPl* sehr ähnliche, die Phlobaphensynthese regulierende Faktor *ZmP*. Dieses *ZmC1/ZmPl*-Paralog vermag nur einen Teil der durch *ZmC1* bzw. *ZmPl* kontrollierten Zielgene zu aktivieren (Grotewold *et al.*, 1994), bestätigt aber die generelle Annahme, dass ähnliche MYB-Faktoren auch ähnliche Funktionen ausüben.

Ein weiteres Beispiel für funktionelle Redundanz sind die beiden *A. thaliana*-MYB-Faktoren MYB75/PAP1 und MYB90/PAP2 (Borevitz *et al.*, 2000). Indizien hierfür sind die identischen Überexpressionsphänotypen, sowohl bei Expression in *A. thaliana* als auch in transgenen *Nicotiana*-Pflanzen, sowie das Fehlen eines sichtbaren Knockout-Phänotyps in MYB75/PAP1-Antisense-Pflanzen.

Vor diesem Hintergrund sollte mit Hilfe der Kotransfektionsanalyse überprüft werden, ob dies auch für die zur selben phylogenetischen Untergruppe gehörenden *A. thaliana*-MYB-Transkriptionsfaktoren MYB12 und MYB111 (Abbildung 51; Untergruppe 7) der Fall sein könnte. Wie die Analysen zeigen, ist MYB111 tatsächlich in der Lage als Transkriptionsaktivator auf die gleichen Reporterkonstrukte wie MYB12 zu wirken (Abbildung 16). Die Gesamtheit aller „frühen“ Flavonoidgene, sowie auch das *C4H*-Gen, welches als einziges aus dem allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel getestet wurde, sind dabei die potentiellen Zielgene dieses Faktors. Dieses Verhalten, obwohl insgesamt die funktionelle Charakterisierung von MYB111 gerade erst begonnen hat, spricht für identische Funktionen der beiden Transkriptionsfaktoren. Da bislang noch keine Daten zur Expression von *MYB111* vorliegen, kann zu diesem Zeitpunkt allein aus den Transfektionsresultaten zur fehlenden UV-Induzierbarkeit des *MYB111*-Promotors (Abbildung 17) eine differentielle Regulation des Faktors im Vergleich zu seinem nahen Verwandten MYB12 abgeleitet werden. Ob weitere Unterschiede, z.B. bezogen auf die gewebespezifische Expression, bestehen, muss in zukünftigen Experi-

menten geklärt werden. Diese sollten auch das dritte Mitglied der Untergruppe 7, MYB11, berücksichtigen, um so ein möglichst vollständiges Bild der Funktionen der in dieser phylogenetischen Untergruppe lokalisierten Faktoren zu erhalten.

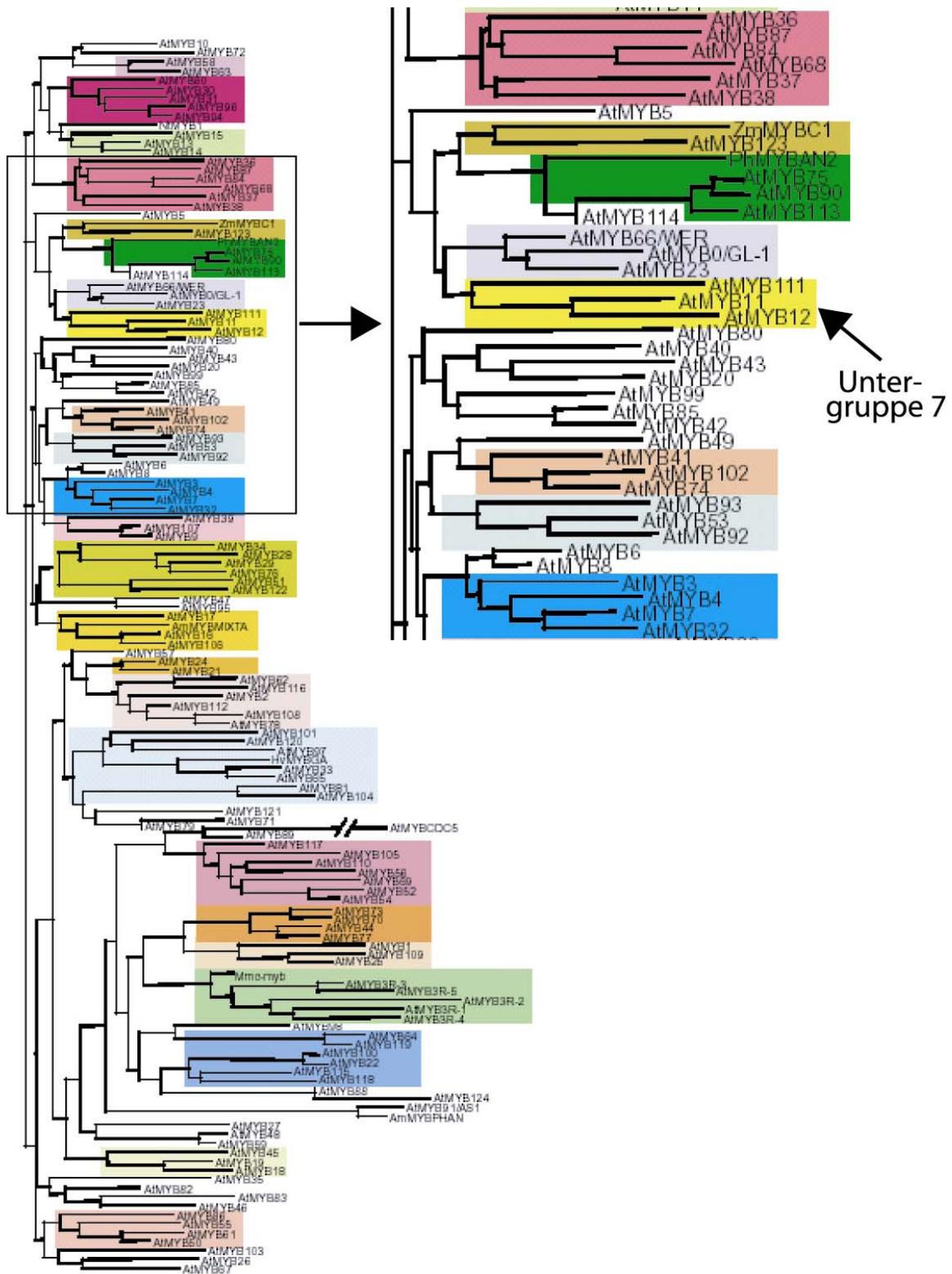


Abb. 51: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der MYB-Proteine aus *A. thaliana*. Die Untergruppe 7, der MYB12 angehört, wurde hervorgehoben. Verändert nach Stracke *et al.* (2001).

4.2. Expressionsanalyse von MYB12 und seinen potentiellen Zielgenen mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR

Die Expressionsanalysen von *MYB12* und seinen möglichen Zielgenen wurden in unter Weißlicht angezogenen sowie etiolierten Keimlingen im Alter zwischen 2 und 6 Tagen durchgeführt. Die Verwendung von Keimlingen zur Demonstration der MYB12-Effekte erschien sinnvoll, weil in vorangegangenen Studien eine signifikante Expression des Faktors lediglich in belichteten Keimlingen detektiert werden konnte (Kranz *et al.*, 1998). In transgenen, eine MYB12-Promotor::GUS-Fusion tragenden Linien konnte darüber hinaus eine *MYB12*-spezifische GUS-Färbung nur in Keimlingen, nicht aber in adulten Pflanzen festgestellt werden (Kranz, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Argument für die Untersuchung von Keimlingen war die Tatsache, dass hier zur Flavonoidbiosynthese und deren Regulation bereits Daten verfügbar waren (Kubasek *et al.*, 1992, 1998; Winkel-Shirley *et al.*, 1995; Cain *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1999; Burbulis und Winkel-Shirley, 1999). Wie Kubasek *et al.* (1992) feststellten, erfolgt die Expression der Flavonoid-Strukturgene *PAL*, *CHS*, *CFI* und *DFR* in Keimlingen zeitlich streng koordiniert, steht also unter entwicklungsabhängiger Kontrolle. Dies gilt auch für die Akkumulation der Stoffwechselendprodukte, in diesem Fall der Anthocyane, die am 5. Tag nach der Keimung ihr Konzentrationsmaximum erreichen. Um eine eventuelle Entwicklungsabhängigkeit der MYB12-Funktion zu untersuchen, wurde deshalb ebenfalls eine Keimlingskinetik verwendet.

4.2.1. Die verwendeten TaqMan[®]-Systeme sind für die relative Quantifizierung der Genexpression optimiert

Eines der Ziele dieser Arbeit war das Design optimierter Echtzeit-RT-PCR-Systeme für die relative Quantifizierung der Genexpression von *MYB12* und seinen potentiellen Zielgenen, den Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese. Optimale quantitative RT-PCR-Systeme zeichnen sich durch zwei Haupteigenschaften, einer hohen Amplifikationseffizienz zum einen und einer geringen intersystemischen Effizienzvarianz zum anderen aus. Die erstere garantiert ein Höchstmaß an Sensitivität, da auch geringe Startmengen an Matrizen-DNA effizient amplifiziert werden und damit reproduzierbar zu detektieren sind, die letztere bringt vor allem ökonomische Vorteile, da auf die Verwendung von Standardkurven verzichtet werden kann, was die Kosten der Analyse erheblich reduziert. Sämtliche in dieser Arbeit zur relativen Quantifizierung der Genexpression eingesetzten TaqMan[®]-Systeme entsprachen in dieser Hinsicht

optimalen PCR-Systemen. Innerhalb der Fehlergrenzen erreichten die Effizienzen in allen Fällen 100% (Abbildungen 18 und 19).

4.2.2. Die Expressionsanalyse in belichteten Keimlingen identifiziert *CHS* und *FLS* als die primären MYB12-Zielgene

In belichteten Wildtyp-Keimlingen zeigten die Expressionskinetiken der „frühen“ Gene im Flavonoidbiosynthese-Weg einen ähnlichen Verlauf. Die relative Expression von *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* war am 4./5. Tag der Entwicklung maximal und fiel dann zum Ende der Kinetik wieder deutlich ab. Dies war ebenso für das *F3'H*-Gen zu beobachten, welches also unter den gewählten experimentellen Bedingungen mit den „frühen“ Genen der Flavonoidsynthese ko-reguliert war. Eine *DFR*-Expression war dagegen zu keinem Zeitpunkt der Keimlingsentwicklung auf signifikantem Niveau festzustellen.

Somit konnten frühere Ergebnisse von Kubasek *et al.* (1992) bestätigt, aber auch erweitert werden, welche die Expression der Gene *CHS*, *CFI* und *DFR* in 2- bis 5-Tage-alten, belichteten Keimlingen mittels RNA-Gel-Blot-Experimenten untersucht haben. Diese konnten eine maximale Expression dieser Gene am dritten Tag nach der Keimung zeigen. Die abweichenden Befunde bezüglich der Expression des *DFR*-Gens könnten aus den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen für die Keimlinge in beiden Versuchsansätzen zu erklären sein. Kubasek und Mitarbeiter verwendeten 2% Saccharose im Wachstumsmedium, während das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte MS-Medium keine Saccharose enthielt. Die externe Zufuhr von Saccharose hat vielfältige Auswirkungen. Unter Lichtausschluss angezogene *A. thaliana*-Keimlinge durchlaufen ein schnelles Elongationswachstum bis die Kohlenstoffreserven der Kotyledonen erschöpft sind. Für das weitere Wachstum benötigen die Keimlinge entweder eine externe Kohlenstoffquelle (z.B. Saccharose) oder einen Lichtstimulus, welcher die Photomorphogenese und De-Etiolierung, die Voraussetzungen des autotrophen Wachstums, einleitet (Chory *et al.*, 1996). Insbesondere die von langwelligem Rotlicht vermittelte Signaltransduktion via Phytochrom A wird durch Saccharose inhibiert, diese stellt also einen Antagonisten der Photomorphogenese dar (Dijkwel *et al.*, 1997). Der Effekt von Saccharose kann in vielen Fällen durch Hexosen wie Glukose oder Fruktose nachgeahmt werden (Krapp *et al.*, 1993; Jang und Sheen, 1997; Jang *et al.*, 1997; Ehness *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998;). Die externe Zugabe von Saccharose bzw. die Hemmung des Saccharosetransports in lichtgewachsenen *A. thaliana*-Pflanzen resultiert in einer intrazellularen Saccharose-Akkumulation. Diese bewirkt neben der Inhibition der Photosynthese sowie der Chlorophyll-Biosynthese, eine abberante Entwicklung der Wurzel, die Induktion verschiedener Stress-Antworten und

die Akkumulation von Stärke und Anthocyanen (von Schaewen *et al.*, 1990; Riesmeier *et al.*, 1994; Herbers *et al.*, 1996). Auf der Ebene der Genexpression konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die unter der transkriptionellen Kontrolle durch Glukose stehen, u.a. auch Gene der Anthocyanbiosynthese (Faure *et al.*, 1994; Smeekens *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass eine *DFR*-Expression in belichteten Wildtyp-Keimlingen nicht detektierbar war, könnte also auf das Fehlen von Saccharose im Wachstumsmedium zurückzuführen sein.

Die Verschiebung der Expressionsmaxima von *CHS* und *CFI* vom 3. auf den 4./5. Tag der Keimlingsentwicklung könnte ebenfalls aus den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in beiden experimentellen Ansätzen resultieren. Die *MYB12*-Expression in Wildtyp-Keimlingen war in ihrem zeitlichen Verlauf identisch mit der Expression der Flavonoidgene. Ein Maximum der relativen Expression konnte am 4./5.Tag nach der Keimung festgestellt werden.

Eine Koregulation von *MYB12* und den Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese kann aufgrund dieser Daten allerdings nicht zwingend geschlossen werden. Wegen der begrenzten zeitlichen Auflösung der Kinetik, die Probennahme erfolgte in 24h-Intervallen, ist es möglich, dass subtile Unterschiede im Expressionsverhalten der getesteten Gene nicht detektiert werden konnten. Die Koexpression eines regulatorischen Faktors mit seinen Zielgenen entspräche auch nicht dem klassischen Modell der transkriptionellen Kontrolle, wo die Expression des Regulators jener der durch ihn gesteuerten Gene vorangeht.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Fehlen funktionellen MYB12-Proteins in den Keimlingen der Knockout-Linie und der Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese konnte nur für *CHS* und *FLS* bestätigt werden. Dies relativiert die Ergebnisse der Transfektionsstudien, die MYB12 als Regulator auch von *CFI* und *F3H* identifizierten. Vermutlich ist die MYB12-Responsivität dieser Gene das Resultat der Überladung des transienten Expressionssystems resultierend aus der Verwendung des starken 35S-Promotors zur Effektortranskription. Die Zielgen-Selektivität von MYB12 scheint bei hohen Konzentrationen des Faktors herabgesetzt zu sein, so dass in diesem Fall zusätzliche Gene unter seine Kontrolle fallen. Ähnliche Phänomene konnten bereits früher, z.B. für c-MYB (Andersson *et al.*, 1999) und *AtMYB4* (Jin *et al.*, 2000), beobachtet werden. Der Hintergrund der transient gesteigerten *DFR*-Expression in der Knockout-Linie, und in noch verstärktem Ausmaß auch in der *MYB12*-Überexpressionslinie an Tag 5 der Keimlingsentwicklung, bleibt unklar. Experimentelle Gründe, die auf eine Kontamination der Proben mit Fremd-DNA zurückzuführen sind, sind für dieses Verhalten mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, da diese in beinahe gleicher Weise (die Fehlerwerte wären sonst erheblich größer) in beiden biologischen

Replikaten aufgetreten sein müssten. Insgesamt wird auch durch die quantitative Echtzeit-RT-PCR kein direkter Zusammenhang zwischen *MYB12*- und *DFR*-Expression erkennbar.

Aus der Tatsache, dass die *MYB12*-Expression in Wildtyp- und Knockout-Keimlingen sehr ähnlich war, kann geschlossen werden, dass MYB12 höchstwahrscheinlich nicht seine eigene Transkription aktiviert. Eine solche positive Rückkopplung sollte entgegen den Beobachtungen, da, wie die Transfektionsanalysen gezeigt haben, das MYB12-Knockout-Protein funktionsuntüchtig ist, zu einer reduzierten Expression des *MYB12*-Knockout-Allels in der Knockout-Linie führen.

Die Resultate der relativen Genexpression in der Überexpressionslinie belegen die dort vorliegende massive Steigerung der *MYB12*-Expression zu allen Zeitpunkten der Kinetik. Am stärksten auf die erhöhte MYB12-Konzentration reagierten, in Widerspiegelung der Knockout-Ergebnisse, die wahrscheinlichen MYB12-Zielgene *CHS* und *FLS*. Aber auch die Expression des *CFI*-Gens, sowie der Gene *F3H* und *F3'H* sind in der Überexpressionslinie stärker exprimiert als im Wildtyp. Die Steigerung der Expression der beiden Hydroxylase-Gene war dabei nicht durchgängig über den gesamten Verlauf der Kinetik messbar, für *F3'H* sogar nur während der ersten beiden Tage der Messreihe. Diese Beobachtungen sind möglicherweise auch, wie oben bereits im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Transfektionsanalysen zur Identifikation von potentiellen MYB12-Zielgenen diskutiert, auf die reduzierte Zielgen-Spezifität eines in hohen Konzentrationen vorliegenden MYB12-Transkriptionsfaktors zurückzuführen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass aufgrund der eindeutigen Korrelation zur Expression funktionellen MYB12-Proteins durch die quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse nur die Gene *CHS* und *FLS* als MYB12-Zielgene in lichtgewachsenen Keimlingen identifiziert werden konnten. Ein direkter, spezifischer Einfluss von MYB12 auf die anderen getesteten Strukturgene der Flavonoidbiosynthese konnte nicht belegt werden.

Die beiden MYB12-Zielgene sind an wichtigen Verzweigungspunkten des Flavonoidmetabolismus positioniert. Das Enzym CHS steht am Beginn des Stoffwechselweges, einem Punkt, dem bei der Regulation der gesamten Flavonoidbiosynthese eine zentrale Rolle zukommt, entscheidet sich doch hier, ob der weitere Weg der Intermediate aus dem allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel in die Flavonoidsynthese oder einen anderen möglichen Stoffwechselweg wie z.B. in die Sinapinsäuresynthese mündet (Abbildung 2). Entsprechend der exponierten Stellung der CHS ist die Regulation dieses Stoffwechselschrittes komplex. Diese erfolgt hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene (Chappell und Hahlbrock, 1984; Dangl *et al.*, 1987; Weisshaar *et al.*, 1991; Hartmann *et al.*, 1998), obwohl neuere Ergebnisse auch auf eine translationale oder posttranslationale Kontrolle der CHS-Aktivität hindeuten, welche mögli-

cherweise durch spezifische Flavonoidintermediate (Flavonolglykoside) vermittelt wird (Pelletier *et al.*, 1999). FLS, die Enzymfunktion die vom zweiten MYB12-Zielgen kodiert wird, ist zur Bildung von Flavonolen aus Dihydroflavonolen (Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin) notwendig. Die Stufe der Dihydroflavonole stellt einen weiteren Verzweigungspunkt des Stoffwechselweges dar, denn diese können statt von FLS auch vom Enzym DFR umgesetzt werden (Abbildung 2). Mit den Leucoanthocyanidinen entstehen auf diesem Wege Vorstufen der Anthocyan-Pigmente. Durch die transkriptionelle Aktivierung des *FLS*- nicht aber des *DFR*-Gens, steuert MYB12 also spezifisch die Produktion von Flavonolen und nicht die von Anthocyanen.

FLS stellt nicht nur in dieser Hinsicht einen interessanten Punkt innerhalb der Flavonoidbiosynthese dar, sondern auch, weil es das einzige Enzym in diesem Abschnitt des Phenylpropanoidstoffwechsels ist, welches nicht durch ein einzelnes Gen, sondern durch eine kleine Genfamilie von 6 Mitgliedern (*FLSI-6*) kodiert wird, von denen 2 nicht expremiert zu werden scheinen (Winkel-Shirley, 2001). Die FLS-Isoform, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist FLS1. Die wenigen publizierten Erkenntnisse zur *FLS*-Expression beschränken sich auf Untersuchungen von Pelletier *et al.* (1997) und Hartmann (1997) zur Expression von *FLSI*. Demnach gehört *FLSI*, wegen seiner koordinierten Expression mit *CHS*, *CFI* und *F3H* zur Gruppe der „frühen“ Gene des Flavonoidstoffwechsels. Eine Tatsache, die auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden konnte. Für die anderen Mitglieder der *FLS*-Genfamilie stehen keine weiteren Informationen zur Verfügung. Die Genduplikation in *A. thaliana* könnte einen Mechanismus zur Kontrolle des Typs (Kämpferol versus Quercetin) und der Menge der in verschiedenen Geweben oder als Antwort auf unterschiedliche Umwelt-Reize produzierten Flavonole darstellen. Wisman *et al.* (1998) konnten für verschiedene homozygote *FLSI*-Knockout-Linien aus einer En-1-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population einen starken Rückgang des Kämpferol-, aber nur eine leichte Reduktion des Quercetingsgehalts beobachten. Des weiteren war rekombinantes, in *Escherichia coli* expremiertes, FLS1-Protein in der Lage *in vitro* Dihydrokämpferol in Kämpferol umzusetzen. Beide Befunde belegen, dass es sich bei FLS1 um eine bevorzugt das Substrat Dihydrokämpferol umsetzende Isoform des FLS-Enzyms handelt und bestätigen damit auch die Hypothese die Funktion der *FLS*-Genduplikation in *A. thaliana* betreffend. Vor diesem Hintergrund wäre es wichtig zu wissen, welche FLS-Isoformen welche Substratspezifität aufweisen, wo und unter welchen Bedingungen sie in der Pflanze expremiert sind und welche MYB12-responsiv sind. Wäre *FLSI* das einzige von MYB12 regulierte Mitglied der *FLS*-Genfamilie, so könnte von einem kämpferolspezifischen Transkriptionsfaktor gesprochen werden.

4.2.3. Das MYB12-Transaktivierungspotential ist in etiolierten Keimlingen reguliert

Die Expressionskinetiken der Flavonoidstrukturgene in etiolierten Keimlingen zeigten erwartungsgemäß große Unterschiede zu denen in belichteten Keimlingen. Sowohl in Wildtyp-, als auch Knockout-Keimlingen konnten nur noch geringe Restaktivitäten der „frühen“ Gene des Flavonoidstoffwechsels gemessen werden. Gleiches war auch für *DFR* zu beobachten, hier lag die Expression allerdings in allen drei *MYB12*-Linien in der Nähe des Detektionslimits. Wie die Expression seiner Zielgene *CHS* und *FLS*, so war auch die *MYB12*-Expression in Wildtyp- und, die des Knockout-Allels, in Knockout-Keimlingen über den gesamten Zeitraum der Kinetik hinweg drastisch gegenüber den in belichteten Keimlingen gefundenen Werten reduziert. Die Expression von *MYB12* sowie den „frühen“ Flavonoidbiosynthese-Genen *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* ist also stark lichtabhängig. Ein abweichendes Verhalten konnte für das *F3'H*-Gen beobachtet werden. In Wildtyp-Keimlingen konnte über den kompletten Verlauf der Kinetik eine deutlich messbare Expression nachgewiesen werden. Diese lag in etwa auf Kalibratorniveau und fiel erst am Tag 6 leicht ab. Die *F3'H*-Expression in der Knockout-Linie war gegenüber dem Wildtyp tendenziell leicht reduziert. Diese Reduktion war jedoch innerhalb der Fehlergrenzen nicht signifikant. Die differentielle Regulation von *F3'H* im Vergleich zu den „frühen“ Genen im Flavonoidmetabolismus wird durch diese Befunde erneut demonstriert.

Die Expressionsanalyse etiolierter Keimlinge der *MYB12*-Überexpressionslinie erbrachte unerwartete Ergebnisse. Als erstes fiel auf, dass das Ausmaß der *MYB12*-Überexpression in dieser Linie im Dunkeln nur etwa 25% des Niveaus der in lichtgewachsenen Keimlingen erreichte. Der Grund hierfür liegt entweder in einem generell in etiolierten Keimlingen niedrigeren Transkriptionsniveau, in der verminderten Aktivität des zur Überexpression verwendeten 35S-Promotors oder einer Kombination aus beiden Effekten. Tests mit belichteten sowie etiolierten Keimlingen einer 35S-*uidA*-Überexpressionslinie (Daten nicht gezeigt) lassen den Schluss zu, dass der 35S-Promotor in der Tat im Dunkeln weniger aktiv zu sein scheint als unter Lichteinfluss. Die Reduktion der spezifischen (auf die Gesamt-Proteinmenge normalisierten) Aktivität des 35S-Promotors war im Licht ungefähr dreimal größer als unter Lichtabschluss. Insgesamt war *MYB12* in der Überexpressionslinie aber immer noch 20 mal stärker expremiert als im Wildtyp-Kalibrator. Für alle „frühen“ Gene konnte in der Überexpressionslinie das gleiche Expressionsverhalten beobachtet werden: Eine relativ schwache, jedoch schon über dem Wildtyp-Niveau liegende Expression bis zum 4. Tag nach der Keimung und ab diesem Zeitpunkt ein annähernd exponentieller Anstieg der Expression bis zum Ende der Kinetik. Für *CHS*, *CFI* und *FLS* wurde dabei der Kalibratorwert, zum Teil

deutlich, überschritten. Da dieser Effekt nur in der *MYB12*-Überexpressionslinie auftrat, war dieser ein *MYB12*-spezifischer. In etiolierten Keimlingen scheint das Transaktivierungspotential von *MYB12* eine Funktion der Zeit bzw. des Alters der Keimlinge zu sein. Neben der transkriptionellen Kontrolle der *MYB12*-Aktivität könnten also auch translationale und/oder posttranslationale Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass nicht die Aktivität des Transkriptionsfaktors *MYB12* als solchem reguliert ist, sondern die Aktivierungskompetenz der Promotoren der „frühen“ Flavonoidbiosynthese-Gene sich mit der Zeit erhöht, z.B. durch den Wegfall eines Repressors. Die freigewordenen Promotoren könnten dann durch *MYB12* aktiviert werden. Ein Indiz dafür, dass es nicht die Aktivität des *MYB12*-Proteins selbst ist, die der Regulation unterliegt, ist die Tatsache, dass die Expression der Gene *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* auch schon während der ersten drei Tage der Kinetik gegenüber dem Wildtyp, wenn auch nur leicht, erhöht ist. *MYB12* und ein unbekannter Repressor, könnten während der frühen Entwicklung in etiolierten Keimlingen um die Bindung an die Promotoren der „frühen“ Flavonoidgene konkurrieren. Durch die gegenüber Wildtyp-Pflanzen erhöhte *MYB12*-Konzentration in Überexpressionskeimlingen würde das Gleichgewicht zugunsten der Genaktivierung und zuungunsten der Repression verschoben werden. Dieser Effekt verstärkt sich mit der Zeit durch die allmähliche Aufhebung der Repression.

Der Faktor COP1, ein RING-Finger-Protein mit WD40-Domäne (Deng *et al.*, 1992), nimmt in der globalen Repression der Photomorphogenese und somit auch der Flavonoidbiosynthese in der Abwesenheit von Licht eine zentrale Stellung ein. COP1 kann mit stromabwärts liegenden Aktivatoren der Photomorphogenese in Protein-Protein-Wechselwirkungen treten. Durch die Wechselwirkung mit COP1 werden die Faktoren gezielt der Protein-Degradation zugeführt. An diesem Prozess ist ein auch in Tieren vorkommender Multienzym-Komplex, das sogenannte COP9-Signalosom (Wei und Deng, 1999) beteiligt, welches den Abbau COP1-markierter Proteine entweder selber katalysiert oder aber diese der Degradation durch das 26S-Proteasome zuführt (Deshaies und Meyerowitz, 2000). Eine Interaktion mit COP1 konnte für das *A. thaliana*-bZIP-Protein HY5, einem Aktivator der Photomorphogenese, gezeigt werden (Osterlund *et al.*, 2000). Yamamoto *et al.* (1998) konnten mittels der Durchmusterung einer *A. thaliana*-cDNA-Bibliothek eine Anzahl COP1-interagierender Proteine (CIPs) identifizieren, von denen CIP7 ein positiver Regulator der Anthocyanbiosynthese und der Chlorophyllakkumulation während der Photomorphogenese ist. Das COP1-Protein ist im Dunkeln kernlokalisiert, und wird unter Lichteinfluss aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert, wo es seine Repressorfunktion nicht länger ausüben kann (von Arnim und Deng,

1994). Die COP1-Funktion ist nicht nur lichtreguliert, sondern auch von anderen Faktoren abhängig. So reprimiert COP1 die Expression des blütenspezifischen Faktors *AtMYB21* in Keimlingen, wie die Überexpression des Faktors in *cop1*-Mutanten zeigt. Die Expression von *MYB21* ist in Keimlingen nicht durch die Bestrahlung mit Weißlicht zu induzieren, die daraus resultierende Abnahme der COP1-Konzentration im Zellkern ist also nicht hinreichend für eine De-Repression von *MYB21* in Keimlingen. Die lichtunabhängige, gewebespezifische Regulation der COP1-Funktion wurde schon früher für die lichtunabhängige Kernlokalisierung von COP1 in Wurzeln und die Anwesenheit einer dominant negativen Form des COP1-Proteins (COP1b) in reifen Samen und während der Keimung berichtet (von Arnim und Deng, 1994; Zhou *et al.*, 1998).

Eine Interaktion von MYB12 mit dem Repressor COP1 in etiolierten Keimlingen könnte eine Erklärung für die dort beobachteten Expressionsmuster in den drei *MYB12*-Linien liefern. Die starke Überexpression des Faktors könnte zur Folge haben, dass ein geringer Prozentsatz des insgesamt vorhandenen MYB12-Proteins der COP1-vermittelten Degradation entgeht und es so im Laufe der Zeit zu einer Akkumulation des Proteins in den Keimlingen kommt. Am 4. Tag nach der Keimung scheint dann ein Schwellenwert erreicht, der zur Aktivierung der „frühen“ Gene der Flavonoidbiosynthese ausreicht. Dieser Effekt tritt in Wildtyp-Keimlingen nicht auf, was möglicherweise daran liegt, dass hier die MYB12-Proteinmenge insgesamt zu gering ist, um dem COP1-abhängigen Abbau zu entgehen. Folglich kommt es hier nicht zu der in den Überexpressionskeimlingen postulierten Anhäufung von MYB12. Leider sind zur Verifizierung dieser Hypothese noch keine Daten auf Proteinebene zur zeitabhängigen Akkumulation von MYB12 verfügbar. Durch die Analyse der Protein-Wechselwirkungen von MYB12, etwa durch Verwendung des „yeast two-hybrid“-Systems, könnte die postulierte MYB12/COP1-Interaktion überprüft werden.

Ein vergleichbarer Effekt der zunehmenden Aktivierbarkeit durch MYB12 mit der Zeit wie für *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* in der Überexpressionslinie beobachtet, konnte für das *F3'H*-Gen nicht festgestellt werden. Im Gegenteil, die Expressionsdaten lassen eher eine Reduktion der *F3'H*-Expression zum Ende der Kinetik hin erkennen. Da diese auch in etiolierten Wildtyp-Keimlingen stattfindet, die *MYB12* nur auf sehr niedrigem Niveau exprimieren, ist sie wahrscheinlich MYB12-unabhängig.

4.2.4. Die Expression von *MYB12* ist in allen Geweben adulter Pflanzen nachweisbar

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR ist es gelungen die bisher verfügbaren Expressionsdaten für *MYB12* in Geweben adulter Pflanzen zu erweitern, bzw. zu korrigieren. Bisher konnte eine Expression von *MYB12* nur auf sehr niedrigem Niveau in Stengeln adulter Pflanzen nachgewiesen werden. Tatsächlich war die Expression von *MYB12* aber in allen untersuchten Geweben nachweisbar, am stärksten in Blüten, Schoten und etwas abgeschwächt in Stengel-Blättern. Diese abweichenden Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die sehr viel höhere Sensitivität der quantitativen Echtzeit-RT-PCR gegenüber der von Kranz *et al.* (1998) angewandten „Reverse Northern“-Methode, eines auf cDNA-Hybridisierung basierenden Verfahrens, zurückzuführen.

Die Expressionsdaten für an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgene decken sich größtenteils mit vorherigen Resultaten aus RNA-Gel-Blot-Experimenten (Hartmann, 1997). Wie zuvor konnte für *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS*, alle damals getesteten Gene, nur eine schwache Expression in Wurzeln und Stengeln festgestellt werden. Übereinstimmend waren auch die Beobachtung, dass diese vier Gene am stärksten in Schoten und Blüten expremiert waren. Deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen waren allerdings für die Genexpression in Blättern zu verzeichnen. Die Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlichen Experimentalansätzen liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Stengel- und Rosetten-Blättern differenziert, wohingegen in der Arbeit von Hartmann dieses nicht dokumentiert ist. Wahrscheinlich wurde dort ein Gemisch aus Stengel- und Rosettenblättern zur RNA-Gewinnung verwendet. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass dies zu verfälschten Resultaten führt, da für alle Flavonoidgene ein deutlicher Unterschied im Expressionsniveau in Stengel- bzw. Rosettenblättern messbar war. Die Werte für das Organ „Blatt“ von Hartmann stellt in diesem Sinne quasi einen Mittelwert dar. Wie die quantitative Echtzeit-RT-PCR zeigte, war die Expression der „frühen“ Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in Stengel-Blättern, zum Teil sehr deutlich, gegenüber der in Rosetten-Blättern erhöht.

Die bisherigen Expressionsdaten konnten auch hinsichtlich der *F3'H* und *DFR*-Genexpression erweitert werden. Beide Gene wiesen ein von den anderen untersuchten Genen abweichendes Expressionsmuster auf. *F3'H* wurde am stärksten in der Schote und, deutlich schwächer, in der Blüte expremiert. Die relative Expression in Stengel-Blättern war jedoch gegenüber der in Rosetten-Blättern reduziert. Ähnliches war auch für *DFR* zu beobachten, nur war hier eine klar stärkere Konzentration der Expression auf die Schote relativ zur Blüte zu erkennen. Auch war die relative *DFR*-Expression in Stengel-Blättern, zusammen mit der in Wurzeln, die niedrigste überhaupt für dieses Gen gemessene. Diese Befunde bestätigen die von

Hartmann (1997) postulierte Koexpression der „frühen“ Flavonoidbiosynthesegene. Darüber hinaus, sind die abweichenden Expressionsmuster von *F3'H* und *DFR* ein weiterer Beleg für deren differentielle Regulation im Vergleich zum Rest des Stoffwechselweges.

Das *MYB12*-Expressionsmuster und die Expressionsmuster der koregulierten Gene *CHS*, *CFI*, *F3H* und *FLS* ähneln sich, eine starke Expression ist in Blüten und Schoten zu detektieren, weist aber auch Unterschiede auf. So ist die relative *MYB12*-Expression in Stengel-Blättern zwar über dem Kalibrator-Niveau, jedoch klar schwächer ausgeprägt als für die „frühen“ Gene des Stoffwechselweges. Umgekehrt ist die Expression von *MYB12* in der Wurzel messbar stärker als in Rosetten-Blättern, was für keines der anderen untersuchten Gene gilt. Aus den vorliegenden Daten können noch keine definitiven Schlüsse auf *MYB12* als, möglicherweise gewebespezifischer, Regulator der Flavonoidbiosynthese in adulten Pflanzen gezogen werden. Dazu müssten die oben diskutierten Expressionsanalysen auch in adulten Pflanzen der *MYB12*-Knockout- und Überexpressionslinie durchgeführt werden. Allein die Ähnlichkeit der Expressionsmuster zwischen *MYB12* und seinen potentiellen Zielgenen in Wildtyp-Pflanzen reicht dafür nicht aus. Sollte *MYB12* kein Regulator der Flavonoidbiosynthese in adulten Pflanzen sein, was eher unwahrscheinlich erscheint, bliebe offen welche anderen Funktionen der Faktor hier erfüllt.

4.3. HPLC-Detektion des „biochemischen“ *myb12*-Phänotyps

Die vorher diskutierten Resultate der Transfektions- und quantitativen Echtzeit-RT-PCR-Analysen identifizieren MYB12 als Regulator der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana*. Die Untersuchung von Keimlingen aller drei MYB12-Linien mittels HPLC sollte diesen Befund auf biochemischer Ebene durch die Detektion MYB12-korrelierter Unterschiede belegen.

4.3.1. In belichteten Keimlingen korreliert die *MYB12*-Expression mit dem Flavonolgehalt

In den Keimlingen lichtgewachsener *A. thaliana*-Pflanzen konnten für alle drei analysierten Substanzklassen, Quercetine, Kämpferole und Sinapate, Effekte der *MYB12*-Fehlexpression festgestellt werden. Alle fünf vorkommenden Quercetine und alle drei vorkommenden Kämpferole waren in der *myb12*-Knockout-Linie in ihrer Konzentration gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert, ebenso, wie es beim Wegfall eines positiven Regulators der Flavonolbiosynthese zu erwarten gewesen wäre. Die Tatsache, dass auch ohne die Anwesenheit von funktionellem MYB12-Protein die Flavonolsynthese nicht vollständig zum Erliegen kommt, deckt sich mit den Ergebnissen der quantitativen Echtzeit-RT-PCR, denn zumindest eine Restexpression der Flavonoidbiosynthese-Gene war in der Knockout-Linie stets messbar. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente haben gezeigt, dass diese Restaktivität mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch das verkürzte AT123-Protein bewirkt wird (3.1.5.), denn dieses konnte bei Überexpression in Protoplasten der At7-Zellkulturlinie keines der sonst in den Transfektionsversuchen MYB12-responsiven Promotorkonstrukte aktivieren. Möglicherweise ist die Residualaktivität der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in der Knockout-Linie ein Ausdruck von überlappenden Zielgenspezifitäten der Komponenten des regulatorischen Systems dieses Stoffwechselweges. Die Transfektionen mit MYB111 als Effektor haben bestätigt, dass es offensichtlich andere MYB-Faktoren mit ähnlichen, vielleicht identischen, Funktionen in *A. thaliana* gibt. Auch MYB11, das dritte Mitglied der Untergruppe 7 (Abbildung 51), wäre ein Kandidat hierfür. Wie bereits weiter oben diskutiert, liegen derzeit noch keine Daten über die Expressionsmuster der beiden potentiellen funktionellen MYB12-Äquivalente vor, so dass die Frage nach der Redundanz innerhalb der Untergruppe 7 zur Zeit nicht definitiv beantwortet werden kann. Neben einer detaillierten Expressionsanalyse aller drei Mitglieder dieser Untergruppe, wäre auch die Generierung und Analyse von Doppel- bzw. Dreifach-Knockout-Mutanten dieser Faktoren notwendig. Verknüpft mit einer Analyse

der Flavonolendprodukte, nicht nur in Keimlingen, könnte ein umfassenderes Bild der Kontrolle der Flavonolbiosynthese durch MYB12 und – eventuell – die beiden anderen Mitglieder der Untergruppe 7 erstellt werden.

Die Ausschaltung von *MYB12* hatte jedoch nicht nur Auswirkungen auf die Flavonoidbiosynthese im engeren Sinne, sondern, wie die HPLC-Analyse zeigte, auch auf die Bildung von Sinapinsäurederivaten. Durchgängig, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß als für die Flavonole, war der Gehalt des Haupt-Sinapats S17.96 in belichteten Knockout-Keimlingen gegenüber dem Wildtyp reduziert. In den Keimlingen der Überexpressionslinie hingegen war der Gehalt sämtlicher Sinapate, wenn auch auf unterschiedlichem Signifikanzniveau, erhöht. Der pleiotrope Effekt von MYB12 auch auf die Sinapinsäuresynthese erscheint im ersten Augenblick im Widerspruch zu den Ergebnissen der Transfektionsanalyse der Gene *F5H* und *OMT*, zweier Strukturgene des Sinapinsäuremetabolismus, zu stehen. Wie die Kotransfektionsresultate zeigten, waren Reporterkonstrukte dieser beiden Gene nämlich nicht durch MYB12 aktivierbar, was dessen unmittelbare regulatorische Rolle in diesem Abschnitt des Phenylpropanoidstoffwechsels eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Der MYB12-Effekt auf die Sinapinsäuresynthese ist möglicherweise ein indirekter, der sich aus den Resultaten der Transfektionsanalyse der Strukturgene des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels, welcher auch die Vorstufen zur Sinapatproduktion liefert, erklärt. Der Knockout von MYB12, einem Aktivator auch des allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus, zumindest im *A. thaliana*-Zellkultursystem, sollte den Fluss durch diesen Stoffwechselweg negativ beeinflussen und somit letztlich die Verfügbarkeit von 4-Cumarsäure bzw. 4-Cumaroyl-CoA für die Sinapatsynthese begrenzen. Die gleiche Argumentation würde auch den gesteigerten Sinapatgehalt in den Keimlingen der *MYB12*-Überexpressionslinie begründen, eine erhöhte Verfügbarkeit von Synthesevorstufen würde hier den Intermediatfluss in diesen Teil des Stoffwechselweges stimulieren. Ergebnisse von Jin *et al.* (2000), die *AtMYB4* als Repressor der Synthese von Sinapinsäurederivaten identifizieren konnten, zeigen, dass der prinzipielle geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese von Sinapaten die Bildung von 4-Cumarat aus Zimtsäure durch die Wirkung des Enzyms C4H ist. Für das Gen *CCoAOMT*, eine Methyltransferase, die Kaffeoyl-CoA und 5-Hydroxy-Feruloyl-CoA als Substrate zur Synthese von Feruloyl-, bzw. Sinapoyl-CoA in einem alternativen Methylierungsweg zur Sinapinsäureestersynthese verwendet, wird eine transkriptionelle Steuerung durch einen Rückkopplungsmechanismus vorgeschlagen, der die Expression dieses Genes reziprok zur Menge an für die Sinapinsäuresynthese zur Verfügung stehenden Hydroxyzimtsäurederivaten reguliert. Danach führt eine *MYB4*-Überexpression, und daraus resultierend eine niedrigere 4-Cu-

marat-Konzentration zu einer erhöhten *CCoAOMT*-Expression. In *myb4*-Knockout-Pflanzen ist der gegenteilige Effekt sichtbar. Ein ähnlicher Rückkopplungsmechanismus ist bereits früher für *PAL* in *Nicotiana* gezeigt worden (Blount *et al.*, 2000). Diese Beispiele belegen die prinzipielle Möglichkeit der Regulation des Sinapinsäuresynthesemetabolismus durch Intermediate desselben. Hinsichtlich des *MYB12*-Effektes auf die Synthese des Sinapates S17.96 muss jedoch dann von einem positiven Rückkopplungsmechanismus ausgegangen werden, anders als in den oben geschilderten Beispielen negativer Rückkopplungswirkungen.

Wesentlich ausgeprägter als die Steigerung des Sinapatgehalts war die Erhöhung des Flavonolgehalts, sowohl von Quercetin-, als auch Kämpferolderivaten, in den Keimlingen der Überexpressionslinie; eine Beobachtung, welche die Hypothese von *MYB12* als Aktivator der Flavonolsynthese weiter erhärtet, komplementiert sie doch die Ergebnisse der HPLC-Analyse der *myb12*-Knockout-Keimlinge.

4.3.2. Die *MYB12*-Überexpression in etiolierten Keimlingen kompensiert den fehlenden Lichtstimulus zur Synthese von Quercetin

In Korrelation mit der niedrigeren Expression von *MYB12* und den „frühen“ Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese in etiolierten Wildtyp-Keimlingen war auch der Flavonolgehalt, und zwar beider Flavonolspezies, deutlich gegenüber lichtgewachsenen Pflanzen reduziert.

Der Effekt der *MYB12*-Fehlexpression war in seiner Stärke vom Glykosylierungsgrad der Quercetinderivate abhängig. Für die Knockout-Linie galt die Regel, je umfangreicher die Glykosylierung, desto ausgeprägter der Effekt des *MYB12*-Verlustes. Die Überexpressionslinie zeigte dagegen genau das gegenteilige Verhalten, je niedriger die Glykosylierung, desto größer der *MYB12*-Effekt. Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens bleibt unklar, da über die Glykosylierung der Flavonole in *A. thaliana*-Keimlingen und die darin involvierten Enzyme bzw. Gene nichts bekannt ist.

Bei der Beschränkung auf die Betrachtung der Quercetin-Aglykonmengen ist festzuhalten, dass die Gesamt-Quercetinmenge in etiolierten Keimlingen der Überexpressionslinie über dem Niveau in belichteten Wildtyp-Keimlingen lag, die Überexpression von *MYB12* also den fehlenden Lichtstimulus (über-)kompensieren konnte. Dies war für die Kämpferolderivate nicht zu beobachten. Zwar war auch hier in der *MYB12*-Überexpressionslinie der Kämpferolgehalt gegenüber etiolierten Wildtyp-Keimlingen erhöht, erreichte jedoch bei weitem nicht das Niveau lichtgewachsener Wildtyp-Pflanzen. Ein quantitativer Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Keimlingen war hinsichtlich des Kämpferolaglykons kaum detektierbar.

Zur Bildung von Quercetin ist also die Überexpression von *MYB12* hinreichend, die effiziente Kämpferolproduktion erfolgt jedoch nur bei De-Etiolierung. Möglicherweise spielt auch hier, die bereits oben (4.2.2.) diskutierte Tatsache eine Rolle, dass die FLS-Enzymfunktion in *A. thaliana* von einer kleinen Genfamilie kodiert wird. Die unterschiedliche Abhängigkeit der Synthese der Aglyka von Quercetinen und Kämpferolen in Keimlingen der *MYB12*-Überexpressionslinie von der De-Etiolierung, könnte, unter der Voraussetzung das quercetin-, bzw. kämpferolspezifische FLS-Isoformen existieren, erklärt werden durch deren differentielle Aktivität in etiolierten Keimlingen. Während die quercetinspezifische Isoform(en) auch im Dunkeln katalytisch aktiv ist, müsste die kämpferolspezifische Variante(n) unter diesen Bedingungen zumindest teilweise inaktiv sein. Denkbar wäre eine lichtabhängige, posttranslationale Modifikation dieser speziellen Enzym-Isoform zu deren Aktivierung bzw. De-Repression. Ein anderer Erklärungsansatz könnte auch darin liegen, dass nicht wegen unterschiedlicher Enzymaktivitäten der quercetin- bzw. der kämpferolspezifischen FLS-Isoformen im Dunkeln die Kämpferolmenge in etiolierten Überexpressionskeimlingen nicht das Wildtyp-Niveau belichteter Keimlinge erreicht, sondern dass die überwiegende Zahl der Enzym-Isoformen eine stärkeren Substratpräferenz für Quercetin als für Kämpferol aufweist. Sollte *MYB12* auf alle Mitglieder der *FLS*-Genfamilie aktivierend wirken, so würde für die Quercetinsynthese ein additiver Effekt eintreten, nicht aber für die Bildung von Kämpferolen. Ob einer der vorgeschlagenen Erklärungsversuche zutrifft, oder ob ein anderes Modell die Resultate der HPLC-Analyse von *MYB12*-Überexpressionskeimlingen besser beschreibt, bleibt bis zur eingehenderen Untersuchung der *FLS*-Genfamilie in *A. thaliana* offen. Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedenfalls vermuten, dass es sich bei dem Faktor *MYB12* weder um einen quercetin-, noch um einen kämpferolspezifischen, sondern um einen generellen Regulator der Flavonolbiosynthese handelt.

Die Analyse der Sinapinsäurederivate in etiolierten Keimlingen ergab für *MYB12*-Wildtyp- und Knockout-Pflanzen keinen signifikanten Unterschied. In der Überexpressionslinie war vor allem S32.15, aber auch S24.91 in leicht erhöhter Konzentration detektierbar. Insgesamt war die Sinapatmenge in Wildtyp- und in Überexpressionskeimlingen geringer als in ihren lichtgewachsenen Gegenstücken. Der Sinapatgehalt in belichteten und etiolierten Keimlingen der Knockout-Linie war dagegen kaum abweichend. Alles in allem sind die (sekundären) *MYB12*-Effekte auf die Menge an Sinapinsäurederivaten in etiolierten Keimlingen schwächer ausgeprägt als vorher bei lichtgewachsenen beobachtet. Ein direkter Zusammenhang zwischen *MYB12*-Expression und Sinapatmenge lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten. *MYB12* ist also kein sinapatspezifischer Regulator des Phenylpropanoidmetabolismus.

4.4. Naturstoffreagenz A-Färbung von *A. thaliana*-Keimlingen

Ergänzt wurden die oben diskutierten HPLC-Analysen durch die direkte Visualisierung der in 6 Tage alten Keimlingen vorliegenden Flavonoidmengen. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in der Möglichkeit aufgrund ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens, die Lokalisation der verschiedenen Sekundärmetabolite innerhalb der Pflanze simultan zu bestimmen zu können. Eine grobe Abschätzung ihrer Abundanz kann über die Intensität der Anfärbung erfolgen. In belichteten Keimlingen aller drei Linien konnten Flavonolderivate in den Kotyledonen, dem Hypokotyl, sowie im Zentralzylinder und Apex der Wurzel gefunden werden (Abbildung 47). Die Unterschiede der in der Intensität der Anfärbung mit Naturstoffreagenz A stimmen mit den durch die HPLC-Analyse bestimmten quantitativen Unterschieden im Flavonolgehalt der drei Linien überein, insbesondere fällt die nur sehr schwache Färbung des Wurzelapex der Knockout-Keimlinge auf (Abbildung 47H).

Vorläufige Experimente mit transgenen *MYB12*-Promotor::GUS-Pflanzen zeigen eine völlige Übereinstimmung der *MYB12*-spezifischen GUS-Färbung in der Wurzel junger Keimlinge mit der hier gefundenen Lokalisation der Flavonoide in diesem Teil des Keimlings. Sowohl der Zentralzylinder als auch der Bereich des Apikalmeristems wiesen eine deutliche Blaufärbung durch die Aktivität des GUS-Reportergenes auf. Im Hypokotyl und den Kotyledonen konnte hingegen keine GUS-Färbung festgestellt werden (Kranz, persönliche Mitteilung). Aus diesen Beobachtungen können zwei unterschiedliche Schlussfolgerungen gezogen werden. Die eine wäre, dass *MYB12* in Keimlingen ein wurzelspezifischer Regulator der Flavonolbiosynthese ist. Die Flavonolproduktion in den oberirdischen Teilen des Keimlings würden dann *MYB12* unabhängig erfolgen. Alternativ dazu könnten die in der Wurzel gebildeten Flavonole auch ins Hypokotyl und die Keimblätter transportiert werden. Hinweise, dass ein Transport von Flavonolen innerhalb der Wurzel vorkommt lassen neuere Ergebnisse von Saslowsky und Winkel-Shirley (2001) erkennen. Diese konnten zeigen, dass Flavonoide, anders als die beiden in ihrer Studie untersuchten, am Anfang der Flavonoidbiosynthese stehenden, Enzyme CHS und CFI, auch im Zentralzylinder der Wurzel vorkommen. Das Fehlen der beiden zur Flavonolsynthese unentbehrlichen Enzyme an einem Ort der Flavonolakkumulation kann also als Beleg für einen Transport der Flavonole gelten. Weitergehende Erkenntnisse zum Transport von Flavonolen innerhalb der Pflanze, auch über längere Distanzen, sind zur Zeit noch nicht verfügbar. Auch wäre es verfrüht aus den vorläufigen *MYB12*-Promotor::GUS-Studien endgültige Schlüsse zu ziehen.

In etiolierten Keimlingen war die Flavonolfluoreszenz gänzlich auf die Kotyledonen sowie, weniger ausgeprägt, auf das obere Hypokotyl beschränkt. Die auf den ersten Blick intensiver erscheinende Färbung der Kotyledonen der etiolierten Keimlinge gegenüber denen belichteter Keimlinge (Abbildung 48A, E, I) erklärt sich nicht aus einer höheren Flavonolkonzentration in etiolierten Keimlingen, was im Widerspruch zu den gewonnenen HPLC-Daten stehen würde, sondern aus dem optischen Effekt, der durch die kleineren Zellen der nicht vollständig entfalteten Keimblätter hervorgerufen wird. Die Fluoreszenz wird hier also von einer kleineren Fläche abgestrahlt und erscheint deshalb intensiver als dies bei den Kotyledonen belichteter Keimlinge der Fall ist. Unterschiede zwischen im Dunkeln angezogenen Wildtyp- und Knockout-Keimlingen waren kaum ersichtlich, was die durch HPLC-Analyse festgestellte Differenz im Flavonolgehalt der beiden Linien doch auch nur gering. Die Überexpressionslinie zeigte durch die deutliche Orange-Färbung der Keimblätter einen gegenüber den beiden anderen Linien gesteigerten Gehalt an Flavonolen an. Dem Augenschein nach und soweit die Naturstoffreagenz A-Färbung dies zulässt, konnten die HPLC-Ergebnisse also bestätigt werden. Die Lokalisation der Flavonole in lichtgewachsenen Keimlingen stimmt mit der von Murphy *et al.* (2000) und Peer *et al.* (2000) gefundenen im überein. Saslowsky und Winkel-Shirley (2001) konnten durch Immunofluoreszenz die Ko-Lokalisation von CHS und CFI in den Epidermis- und Rindenzellen der Wurzelelongationszone, dem Ort der stärksten Flavonolakkumulation in der Wurzel, nachweisen.

Die Funktion der Flavonoide in der Wurzel sind bislang weitgehend unbekannt. Eine Hypothese ist, dass diese dort an der Regulation des Auxin-Transports beteiligt sind. In der Wurzel erfolgt ein polarer Auxin-Transport durch den Zentralzylinder von der Wurzelbasis in Richtung Wurzelspitze (Estrelle, 1996; Lomax *et al.*, 1995). Der Transport kann jedoch auch von der Wurzelspitze in entgegengesetzter Richtung über die Zellen der Epidermis und der Wurzelrinde zur Elongationszone verlaufen, wo das Hormon Auxin u.a. die Zellelongation vermittelt. Wie bereits erläutert (Abschnitt 1.2.), könnten Quercetin und Kämpferol als negative Regulatoren des endogenen Auxin-Transports fungieren.

4.5. Der Anthocyangehalt in den drei *MYB12*-Linien ist unverändert

Die photometrische Analyse des Anthocyangehalts erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den unter gleichen Lichtbedingungen angezogenen Keimlingen der drei *MYB12*-Linien. Innerhalb der Fehlergrenzen waren im Wildtyp, in der Knockout- und der Überexpressionslinie die Anthocyanwerte konstant. Die Fehlexpression von *MYB12* hatte also keinen Einfluss auf die Bildung von Anthocyanen. Dies ist ein weiterer klarer Beleg für die Rolle von *MYB12* als flavonolspezifischer Regulator der Flavonoidbiosynthese. In keinem der in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Ansätze konnte eine regulatorische Funktion von *MYB12* auf das Gen *DFR*, dessen Genprodukt das am Anfang der Anthocyan-synthese stehende Enzym darstellt, nachgewiesen werden. Die in etiolierten Keimlingen niedrigere Anthocyankonzentration entspricht ebenfalls den Erwartungen, findet doch unter Lichtausschluss die Flavonoidbiosynthese als Ganzes, zumindest im Wildtyp und in der Knockout-Linie, auf einem reduzierten Niveau statt.

4.6. Hypothetisches Modell der MYB12-Wirkung in Keimlingen

Auf der Basis der oben diskutierten Zusammenhänge konnte ein hypothetisches Modell der MYB12-Wirkung erstellt werden, welches die Resultate der quantitativen Echtzeit-RT-PCR- sowie der HPLC-Analyse belichteter und etiolierter Keimlinge zu erklären vermag (Abbildung 53).

MYB12 wird lichtabhängig expremiert, und aktiviert in Wildtypkeimlingen die Expression der Gene *CHS* und *FLS* und damit die Synthese von Flavonolen. Die Aktivierung auch von Strukturgenen des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels ist wahrscheinlich, jedoch noch nicht auf mRNA-Ebene verifiziert worden. In etiolierten Keimlingen ist die *MYB12*-Expression hingegen stark reduziert, die dadurch verminderte MYB12-Proteinmenge reicht nicht aus, um der durch COP1 vermittelten Degradation zu entgehen. Die Aktivierung der Flavonolsynthese durch MYB12 unterbleibt.

Da das AT123-Protein funktionsuntüchtig ist, findet in den Keimlingen der Knockout-Linie unabhängig von den Lichtbedingungen zur Anzucht keine Aktivierung der MYB12-Zielgene und somit auch nicht der Flavonolsynthese statt.

In belichteten Keimlingen der Überexpressionslinie führt die vermehrte Bildung des MYB12-Proteins zu einer starken Erhöhung der Zielgen-Expression; die Gene *CFI* und *F3H* fallen unter diesen Bedingungen ebenfalls unter die Kontrolle durch MYB12. Die Menge der gebildeten Flavonole nimmt drastisch zu. Das Ausmaß der MYB12-Überexpression ist in etiolierten Keimlingen der Überexpressionslinie nicht so ausgeprägt wie in belichteten. Trotzdem ist die MYB12-Proteinmenge ausreichend, damit zumindest ein kleiner Teil der COP1-Interaktion und so der Degradation entgeht. Vorausgesetzt die Stabilität von MYB12 ist groß genug, könnte der Faktor im Laufe der Zeit akkumulieren. Die wachsende Expression der „frühen“ Gene der Flavonoidbiosynthese würde folglich die steigende MYB12-Konzentration repräsentieren.

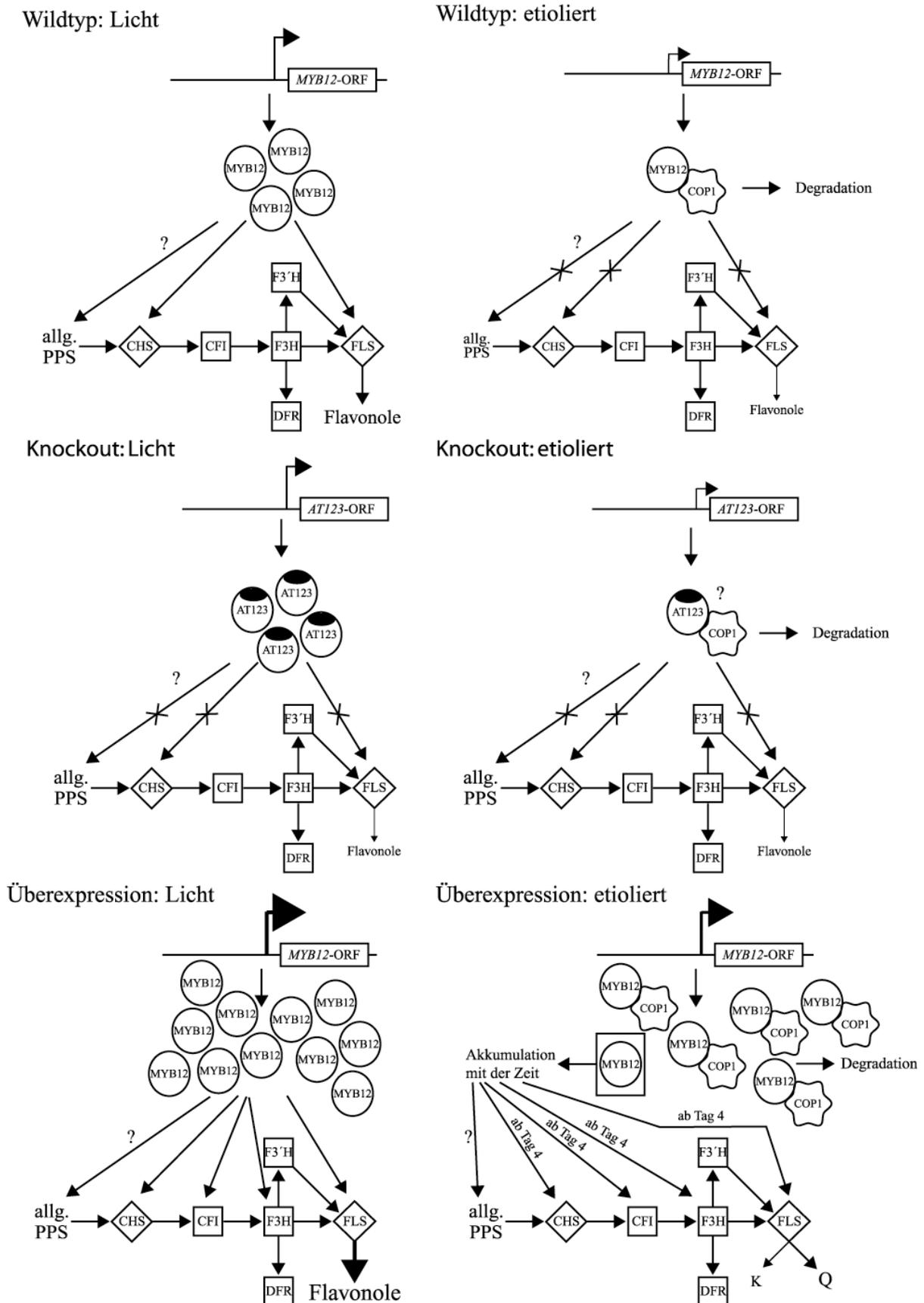


Abb. 53: Hypothetisches Modell der MYB12-Wirkung in Keimlingen. Abbildungsunter-schrift siehe bitte nächste Seite.

Abb. 53: Hypothetisches Modell der MYB12-Wirkung in Keimlingen. Die Darstellung des Modells ist in 6 Module unterteilt: je zwei (belichtetet und etioliert) pro verwendeter Linie. Der obere Abschnitt jedes Moduls zeigt das Schema des *MYB12*-Gens (Wildtyp), des *AT123*-Allels (Knockout) bzw. des *MYB12*-Überexpressionskonstruktes (Überexpression). Der abgeknickte Pfeil symbolisiert die Transkription der jeweiligen ORFs. Durch deren Länge und Dicke wird das jeweilige Transkriptionsniveau repräsentiert. Das AT123-Protein wird ebenso symbolisiert, allerdings zusätzlich mit einer schwarze Ellipsen versehen. Kreise stellen das MYB12-Protein dar. Die Proteinmenge wird durch die unterschiedliche Anzahl von Kreisen wiedergegeben. Der mit MYB12 interagierende Repressor COP1 ist durch Kreise mit gewellter Kreislinie versinnbildlicht. Im unteren Abschnitt eines jeden Moduls ist die Flavonoidbiosynthese mit den involvierten Enzymen schematisch dargestellt. Von den MYB12-Proteinen ausgehende und auf bestimmte Enzyme deutende Pfeile bedeuten die Aktivierung der sie kodierenden Gene durch MYB12. Durchkreuzte Pfeile hingegen zeigen an, dass keine Aktivierung der Transkription mehr erfolgt. Das Fragezeichen an denen auf den allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsel deutenden Pfeilen, soll verdeutlichen, dass die Daten zu dessen Aktivierung durch MYB12 lediglich auf Transfektionsexperimenten beruhen und noch nicht durch quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analysen bestätigt wurden. Die Menge an gebildeten Flavonolen ist in jedem Modul durch die Schriftgröße des Wortes „Flavonole“ sowie der Dicke des vom Enzym FLS ausgehenden Pfeils angegeben. Ausnahme ist das letzte Modul (Überexpression: etioliert), bei dem nicht die Flavonolproduktion im Ganzen, sondern differenziert nach Quercetinen und Kämpferolen dargestellt ist, weil in deren Produktion in diesem Falle ein deutliches Ungleichgewicht zu beobachten war, welches in der Abbildung wiedergegeben werden sollte. Abkürzungen: allg. PPS, allgemeiner Phenylpropanoidstoffwechsel; CFI, Chalkon-Flavanon-Isomerase; CHS, Chalkonsynthase; COP1, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1; DFR, Dihydroflavonol-4-Reduktase; F3H, Flavanon-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; K, Kämpferol; Q, Quercetin.

4.7. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte MYB12 als flavonolspezifischer Regulator der Flavonoidbiosynthese identifiziert werden. Einige weiterführende Experimente zur eingehenderen Analyse der MYB12-Funktion sind bereits in der Diskussion besprochen worden.

Darüber hinaus erscheint es sinnvoll die MYB12-Effekte im allgemeinen Teil des Phenylpropanoidmetabolismus näher zu untersuchen. Insbesondere sollte die bisher nur durch transiente Expressionsstudien im At7-Zellkultursystem bestimmte MYB12-Zielgen-Spezifität für bestimmte PAL- und 4CL-Isoformen *in planta* durch quantitative Echtzeit-RT-PCR verifiziert werden. Auch wäre es lohnenswert zu untersuchen, ob MYB12 ebenfalls eine regulatorische Rolle bei der Synthese des, neben 4-Cumaroyl-CoA, zweiten CHS-Substrats Malonyl-CoA besitzt. Könnte etwa gezeigt werden, dass die Expression des Gens *ACC* (*Acetyl-CoA-Carboxylase*), dessen Genprodukt die Malonyl-CoA-Synthese aus Acetyl-CoA und „aktivierter“ Kohlensäure katalysiert, MYB12-abhängig erfolgt, würde damit die MYB12-Funktion nicht länger auf den Sekundärmetabolismus beschränkt sein, sondern auch den Primärstoffwechsel betreffen.

Die Identifikation weiterer MYB12-Zielgene außerhalb des Flavonoidstoffwechsels könnte auch durch den Einsatz von DNA-Microarrays unter Verwendung von cDNA der *myb12*-Knockout- und *MYB12*-Überexpressionslinie erfolgen. Diese auf DNA-Hybridisierung basierende Methode, hat den Vorteil, dass mit ihr komplexe Änderungen des Expressionsmusters einer sehr großen Anzahl von Genen gleichzeitig detektiert werden können.

Ein Schwerpunkt der weiteren Experimente sollte in der Untersuchung der Regulation, der *MYB12*-Expression und der Identifikation der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren liegen, welche bislang unbekannt sind. Langfristiges Ziel muss die Kenntnis des kompletten Signaltransduktionswegs zur Aktivierung von MYB12 sein. Der Ansatz eines „reverse genetics screens“ erscheint für diesen Zweck sinnvoll. Die ständig größer werdende Anzahl zur Verfügung stehender, durch Insertionsmutagenese generierter, *A. thaliana*-Knockout-Linien, könnte benutzt werden, um Linien mit geänderter *MYB12*-Expression zu identifizieren. Die Suche könnte dabei zunächst auf Linien mit Knockouts in Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, beginnen. Da deren Zahl immer noch sehr groß wäre (>2000), könnte die Suche vereinfacht werden, indem zunächst die Knockout-Linien auf einen geänderten Flavonolgehalt hin untersucht werden. Die Färbung mit Naturstoffreagenz A erscheint dabei eine vielversprechende Methode, erlaubt sie doch mit relativ geringem Aufwand einen hohen Probandendurchsatz. Linien mit geänderter Flavonolsynthese würden anschließend auf eine geänderte

MYB12-Expression bzw. eine veränderte Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese hin untersucht werden.

Eine verfeinerte Deletionsanalyse bzw. die Einführung von einzelnen Aminosäureaustauschen im C-terminalen Drittel des *MYB12*-Proteins würde die genauere Bestimmung der *MYB12*-Transaktivierungsdomäne ermöglichen. Analog sollten die Transaktivierungsdomänen der beiden anderen zur Untergruppe 7 gehörenden Faktoren (*MYB11* und *MYB111*) identifiziert werden, um so die Charakterisierung aller Mitglieder dieser Verwandtschaftsgruppe zu komplettieren.

5. Zusammenfassung

MYB-Transkriptionsfaktoren sind in Pflanzen an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Kontrolle des Phenylpropanoidstoffwechsels, aber auch die Steuerung der Zelldifferenzierung und -morphogenese und die Vermittlung von Hormonwirkungen.

Nachdem die Identifikation sämtlicher MYB-Faktoren aus *A. thaliana* praktisch abgeschlossen ist, steht deren funktionelle Charakterisierung jedoch erst am Anfang. Die phänotypische Analyse von Knockout- und Überexpressionslinien der verschiedenen Faktoren nimmt dabei eine zentrale Stellung ein, ermöglicht diese doch Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Faktoren *in planta* zu ziehen.

Die Etablierung und Optimierung der Methode der quantitativen Echtzeit-RT-PCR konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden, was einen entscheidenden Schritt zur Verbesserung von Expressionsanalysen hinsichtlich Sensitivität und Probendurchsatz bedeutet.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor MYB12 als flavonolspezifischer Aktivator der Flavonoidbiosynthese identifiziert werden. Wie die quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse der *myb12*-Knockout-Linie zeigt, sind die primären Zielgene des Faktors dabei *CHS* und *FLS*, deren Genprodukte an exponierten Positionen innerhalb des Flavonoidbiosyntheseweges stehen, nämlich am Anfang der Reaktionsfolge bzw. am Verzweigungspunkt zwischen Flavonol- und Anthocyan synthese. Das anthocyan spezifische Gen *DFR* wird nicht von MYB12 reguliert. Die Resultate der Expressionsanalyse der Struktur gene der Flavonoid biosynthese in etiolierten Keimlingen der MYB12-Überexpressionslinie weisen auf eine entwicklungsabhängige, möglicherweise durch einen Repressor vermittelte, Regulation des MYB12-Transaktivierungspotentials hin.

Der Einfluss von MYB12 beschränkt sich nicht nur auf die Flavonolsynthese im engeren Sinne, sondern auch auf den dieser vorgeschalteten allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus, wie die Identifikation der weiteren potentiellen MYB12-Zielgene, *PAL1*, *PAL2*, *PAL4*, *C4H* und *4CL3*, mit Hilfe von transienten Expressionsstudien in Protoplasten kultivierter *A. thaliana*-Zellen zeigen. Die Sinapinsäuresynthese unterliegt dagegen nicht der Kontrolle durch MYB12.

Auf biochemischer Ebene konnte mittels HPLC-Analysen der zu erwartende *myb12*-Phänotyp, die direkte Korrelation zwischen *MYB12*-Expressionsniveau und der vorhandenen Flavonolmenge, festgestellt werden. Die Produktion von Anthocyanen war hingegen nicht MYB12-abhängig.

Die transkriptionelle Aktivierung durch MYB12 ist erwartungsgemäß abhängig vom Vorhandensein eines funktionellen MRE zur sequenzspezifischen Bindung des Faktors an die Promotoren seiner Zielgene, welches die Voraussetzung für das Stattfinden der Transaktivierung darstellt.

Die Expression von *MYB12* ist lichtabhängig, in etiolierten Keimlingen ist sie, wie die der „frühen“ Flavonoidgene, in nur sehr geringem Ausmaß gegeben. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ist die *MYB12*-Expression in starkem Ausmaß induzierbar. Die Beteiligung des Faktors an der UV-abhängigen Stimulation der Flavonoidbiosynthese erscheint aus diesem Grunde nahe liegend, wurde allerdings bislang noch nicht demonstriert.

MYB12 und der aus derselben Verwandtschaftsgruppe stammende Transkriptionsfaktor MYB111 zeigen in transienten Expressionanalysen identische Zielgen-Spezifitäten. Anders als für *MYB12* ist die *MYB111*-Expression jedoch nicht durch UV-Licht zu induzieren. Die differentielle stimulus-abhängige Expression beider Faktoren spricht, trotz identischer Zielgene, nicht für deren funktionelle Redundanz.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Expression von *MYB12* in Organen adulter Pflanzen konnten die Ergebnisse vorangehender Expressionsstudien ergänzen bzw. falsifizieren. Eine *MYB12*-Expression war mittels der quantitativen Echtzeit-RT-PCR tatsächlich in allen untersuchten Geweben, besonders in Blüten und Schoten, detektierbar.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock und Herrn Prof. Dr. Francesco Salamini danke ich für die Möglichkeit die Arbeiten zu meiner Dissertation in der Abteilung Biochemie bzw. der Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Bernd Weißhaar für die engagierte Betreuung und intensive Unterstützung dieser Arbeit und den stets hilfreichen Diskussionen.

Besonders möchte ich mich bei Ute Tartler für die tatkräftige und bereitwillige praktische Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Für die Bereitstellung der At7-Zellkultur und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Lydia Bollenbach bedanken.

Herrn Prof. Dr. F.-J. Marner möchte ich für die freundliche Unterweisung in die praktischen Aspekte der HPLC-Analyse danken.

Herrn Dr. Pawel Bednarek gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und die Bedienung der HPLC-Anlage.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Weißhaar sowie der ADIS danke ich für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre, die fachliche und moralische Unterstützung meiner Arbeit sowie für viele schöne Stunden bei gemeinsamen Aktivitäten innerhalb und außerhalb des Instituts.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Bernd Weißhaar betreut worden.

Teilpublikationen:

Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrstens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. and Martin, C. (2000).

Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*.

The EMBO Journal **19**(22), 6150-6161.

Mehrstens, F., Kranz, H., Bednarek, P. and Weisshaar, B.

The *Arabidopsis thaliana* transcription factor *AtMYB12* is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis.

In Vorbereitung.

Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrstens, F. and Weisshaar, B.

Differential combinatorial interactions of R2R3-MYB, bZIP, and bHLH factors control the light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes.

In Vorbereitung.

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. und Shinizaki, K.** (1997). "Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought- and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression." *The Plant Cell* **9**(10): 1859-1868.
- Adam, E., Kozma Bogнар, L., Kolar, C., Schäfer, E. und Nagy, F.** (1996). "The Tissue-Specific Expression of a Tobacco *Phytochrome B* Gene." *Plant Physiology* **110**(4): 1081-1088.
- Aguade, M.** (2001). "Nucleotide Sequence Variation at Two Genes of the Phenylpropanoid Pathway, the *FAH1* and *F3H* Genes, in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular Biology and Evolution* **18**(1): 1-9.
- Aharoni, A., de Vos, C. H. R., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J. N. M. und O'Connell, A. P.** (2001). "The Strawberry *FaMYB1* Transcription Factor Suppresses Anthocyanin and Flavonol Accumulation in Transgenic Tobacco." *The Plant Journal* **28**(3): 319-332.
- Ahmad, M. und Cashmore, A. R.** (1996). "Seeing Blue: The Discovery of Cryptochrome." *Plant Molecular Biology* **30**: 851-861.
- Ahmad, M. und Cashmore, A. R.** (1997). "The Blue-Light Receptor Cryptochrome 1 Shows Functional Dependence on Phytochrome A or Phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **11**(3): 421-427.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A. und Cashmore, A. R.** (1998). "Chimeric Proteins between CRY1 and CRY2 *Arabidopsis* Blue Light Photoreceptors Indicate Overlapping Functions and Varying Protein Stability." *The Plant Cell* **10**: 197-208.
- Ahmad, M., Lin, C. und Cashmore, A. R.** (1995). "Mutations Throughout an Arabidopsis Blue-Light Photoreceptor Impair Blue-Light-Responsive Anthocyanin Accumulation and Inhibition of Hypocotyl Elongation." *The Plant Journal* **8**(5): 653-658.
- Albert, S., Delseny, M. und Devic, M.** (1997). "*BANYULS*, a Novel Negative Regulator of Flavonoid Biosynthesis in the *Arabidopsis* Seed Coat." *The Plant Journal* **11**(2): 289-299.
- Alibert, G., Ranjeva, R. und Boudet, A.** (1972). "Research on the Catalyst Enzymes in the Biosynthesis of Phenolic Acids in *Quercus pedunculata*. Part 3: Sequential Formation from Phenyl Alanine of Cinnamate *p*-Coumarate and Caffeic Acids from Isolated Cellular Organelles." *Physiologia Plantarum* **27**(2): 240-243.
- An, Y. Q., McDowell, J. M., Huang, S., McKinney, E. C., Chambliss, S. und Meagher, R. B.** (1996). "Strong, Constitutive Expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* Actin Subclass in Vegetative Tissues." *The Plant Journal* **10**(1): 107-121.
- Andersson, K. B.; Berge, T.; Matre, V. und Gabrielsen, O. S.** (1999). "Sequence selectivity of c-Myb in vivo. Resolution of a DNA target specificity paradox." *J Biol Chem.* **274**(31): 21986-21994.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. und Deng, X.-W.** (1998). "Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development." *Molecular Cell* **1**: 213-222.

- Argüello-Astorga, G. R. und Herrera-Estrella, L. R.** (1996). "Ancestral Multipartite Units in Light-Responsive Plant Promoters Have Structural Features Correlating with Specific Phototransduction Pathways." *Plant Physiology* **112**(3): 1151-1166.
- Armstrong, G. A., Weisshaar, B. und Hahlbrock, K.** (1992). "Homodimeric and Heterodimeric Leucine Zipper Proteins and Nuclear Factors from Parsley Recognize Diverse Promoter Elements with ACGT Cores." *The Plant Cell* **4**(5): 525-537.
- Atchley, W. R. und Fitch, W. M.** (1997). "A Natural Classification of the Basic Helix-Loop-Helix Class of Transcription Factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5172-6.
- Avila, J., Nieto, C., Canas, L., Benito, M. J. und Paz-Ares, J.** (1993). "Petunia hybrida Genes Related to the Maize Regulatory *CI* Gene and to Animal *MYB* Proto-Oncogenes." *The Plant Journal* **3**(4): 553-562.
- Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C. und Lescure, B.** (1992). "A Protocol for Transient Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Protoplasts Isolated from Cell Suspension Cultures." *Plant Physiology and Biochemistry* **30**(1): 123-128.
- Bailey, J. A. und Mansfield, J. W.,** eds. (1982) *Phytoalexins*, John Wiley, New York.
- Ballaré, C. L.** (1999). "Keeping up with the Neighbours: Phytochrome Sensing and Other Signalling Mechanisms." *Trends in Plant Science* **4**(3): 97-102.
- Ballesteros, M. L., Bolle, C., Lois, L. M., Moore, J. M., Vielle-Calzada, J.-P., Grossniklaus, U. und Chua, N.-H.** (2001). "LAF1, a MYB Transcription Activator for Phytochrome A Signaling." *Genes & Development* **15**(19): 2613-2625.
- Baranowskij, N., Frohberg, C., Prat, S. und Willmitzer, L.** (1994). "A Novel DNA Binding Protein with Homology to MYB Oncoproteins Containing Only One Repeat Can Function as a Transcriptional Activator." *The EMBO Journal* **13**(22): 5383-5392.
- Barnes, S. A., McGrath, R. B. und Chua, N.-H.** (1997). "Light Signal Transduction in Plants." *Trends in Cell Biology* **7**(1): 21-26.
- Batschauer, A., Ehmann, B. und Schäfer, E.** (1991). "Cloning and Characterization of a Chalcone Synthase Gene from Mustard and Its Light-Dependent Expression." *Plant Molecular Biology* **16**: 175-185.
- Batschauer, A., Rocholl, M., Kaiser, T., Nagatani, A., Furuya, M. und Schafer, E.** (1996). "Blue and UV-A Light-Regulated Chs Expression in *Arabidopsis* Independent of Phytochrome a and Phytochrome B." *The Plant Journal* **9**(1): 63-69.
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L. und Hunter, C. P.** (2001). "Quantitative Analysis of mRNA Amplification by in Vitro Transcription." *Nucleic Acids Res* **29**(5): 1-9.
- Baum, G., Long, J. C., Jenkins, G. I. und Trewavas, A. J.** (1999). "Stimulation of the Blue Light Phototropic Receptor NPH1 Causes a Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(23).

- Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B. und Wisman, E.** (1998). "Successful PCR-Based Reverse Genetic Screens Using an *En-1* Mutagenised *Arabidopsis Thaliana* Population Generated Via Single Seed Descent." *Theoretical and Applied Genetics* 97(5/6): 729-734.
- Bavage, A. D., Davies, I. G., Robbins, M. P. und Morris, P.** (1997). "Expression of an *Antirrhinum Dihydroflavonol Reductase* Gene Results in Changes in Condensed Tannin Structure and Accumulation in Root Cultures of Lotus Corniculatus (Bird's Foot Trefoil)." *Plant Molecular Biology* 35(4): 443-458.
- Bell-Lelong, D. A., Cusumano, J. C., Meyer, K. und Chapple, C.** (1997). "Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in *Arabidopsis*: Regulation in Response to Development and Environment." *Plant Physiology* 113(3): 729-738.
- Bender, J. und Fink, G. R.** (1998). "A MYB Homologue, ATR1, Activates Tryptophan Gene Expression in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(10): 5655-5660.
- Bharti, A. K. und Khurana, J. P.** (1997). "Mutants of *Arabidopsis* as a Tool to Understand the Regulation of Phenylpropanoid Pathway and UVB Protection Mechanisms." *Photochemistry and Photobiology* 65(5): 765-776.
- Bies, J., Feiková, S., Markus, J. und Wolff, L.** (2001). "Phosphorylation-Dependent Conformation and Protolytic Stability of C-MYB." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27(2): 422-428.
- Bieza, K. und Lois, R.** (2001). "An *Arabidopsis* Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics." *Plant Physiology* 126: 1105-1115.
- Birnboim, H. C.** (1983). "A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA." *Methods in Enzymology* 100: 243-255.
- Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N. und Weintraub, H.** (1990). "Sequence-Specific DNA Binding by the C-Myc Protein." *Science* 250: 1149-1151.
- Blecken, J., Weisshaar, B. und Herzfeld, F.** (1994). "Two Distinct *Cis*-Acting Elements Are Involved in Light-Dependent Activation of the Pea *ELIP* Promoter." *Molecular General Genetics* 245: 371-379.
- Block, A., Dangl, J. L., Hahlbrock, K. und Schulze-Lefert, P.** (1990). "Functional Borders, Genetic Fine Structure, and Distance Requirements of *Cis* Elements Mediating Light Responsiveness of the Parsley Chalcone Synthase Promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 5387-5391.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. und Dixon, R. A.** (2000). "Altering Expression of *Cinnamic Acid 4-Hydroxylase* in Transgenic Plants Provides Evidence for a Feedback Loop at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway." *Plant Physiology* 122: 107-116.

- Bodeau, J. P. und Walbot, V.** (1992). "Regulated Transcription of the Maize Bonze-2 Promoter in Electroporated Protoplasts Requires the *CI* and *R* Gene Products." *Molecular General Genetics* **233**: 379-387.
- Bodeau, J. P. und Walbot, V.** (1996). "Structure and Regulation of the *Maize Bronze2* Promoter." *Plant Molecular Biology* **32**(4): 599-609.
- Booij-James, I. S., Dube, S. K., Jansen, M. A. K., Edelman, M. und Matoo, A. K.** (2000). "Ultraviolet-B Radiation Impacts Light-Mediated Turnover of the Photosystem II Reaction Center Heterodimer in *Arabidopsis* Mutants Altered in Phenolic Metabolism." *Plant Physiology* **124**(3): 1275-1283.
- Borevitz, J. O., Xia, Y. J., Blount, J., Dixon, R. A. und Lamb, C.** (2000). "Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis." *The Plant Cell* **12**(12): 2383-2393.
- Bradford, M. M.** (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Braun, E. L. und Grotewold, E.** (1999). "Newly Discovered Plant *C-MYB*-Like Genes Rewrite the Evolution of the Plant *MYB* Gene Family." *Plant Physiology* **121**: 21-24.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L. und Muday, G. K.** (2001). "Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **126**: 524-535.
- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B. und Bowen, B.** (2000). "Expression Profiling of the Maize Flavonoid Pathway Genes Controlled by Estradiol-Inducible Transcription Factors *CRC* and *P*." *The Plant Cell* **12**(1): 65-80.
- Burbulis, I. E. und Winkel-Shirley, B.** (1999). "Interactions among Enzymes of the *Arabidopsis* Flavonoid Biosynthetic Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(22): 12929-12934.
- Burbulis, I. E., Iacobucci, M. und Shirley, B. W.** (1996). "A Null Mutation in the First Enzyme of Flavonoid Biosynthesis Does Not Affect Male Fertility in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **8**: 1013-1025.
- Burbulis, I. E., Pelletier, M. K., Cain, C. C. und Shirley, B. W.** (1996). "Are Flavonoids Synthesized by a Multi-Enzyme Complex?" *SAAS Bulletin, Biochemistry & Biotechnology* **9**: 29-36.
- Bustin, S. A.** (2000). "Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays." *Journal of Molecular Endocrinology* **25**: 169-193.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. und Martienssen, R. A.** (2000). "Asymmetric Leaves1 Mediates Leaf Patterning and Stem Cell Function in *Arabidopsis*." *Nature* **408**(6815): 967-971.

- Cain, C. C., Saslowsky, D. E., Walker, R. A. und Shirley, B. W.** (1997). "Expression of Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase Proteins in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant Molecular Biology* **35**(3): 377-381.
- Cashmore, A. R.** (1997). "The Cryptochrome Family of Photoreceptors." *Plant Cell & Environment* **20**(6): 764-767.
- Chalker-Scott, L.** (1999). "Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses." *Photochemistry and Photobiology* **70**: 1-9.
- Chandler, V. L., Radicella, J. P., Robbins, T. P., Chen, J. und Turks, D.** (1989). "Two Regulatory Genes of the Maize Anthocyanin Pathway Are Homologous: Isolation of *B* Utilizing *R* Genomic Sequences." *The Plant Cell* **1**: 1175-1183.
- Chang, C., Bowman, J. L., DeJohn, A. W., Lander, E. S. und Meyerowitz, E. M.** (1988). "Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map for *Arabidopsis Thaliana*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 6856-6860.
- Chappell, J. und Hahlbrock, K.** (1984). "Transcription of Plant Defense Genes in Response to UV Light or Fungal Elicitor." *Nature* **311**: 76-78.
- Chapple, C. C. S., Vogt, T., Ellis, B. E. und Somerville, C. R.** (1992). "An *Arabidopsis* Mutant Defective in the General Phenylpropanoid Pathway." *The Plant Cell* **4**: 1413-1424.
- Chapple, C., Shirley, B., Zook, M., Hammerschmidt, R. und Somerville, S. C.** (1994). Secondary Metabolism in *Arabidopsis*. *Arabidopsis*. Meyerowitz, E. M. and Somerville, C. R. New York, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 989-1030.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.-H., Puente, P., Deng, X.-W. und Wei, N.** (1998). "*Arabidopsis* bZIP Protein HY5 Directly Interacts with Light-Responsive Promoters in Mediating Light Control of Gene Expression." *The Plant Cell* **10**(5): 673-684.
- Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, X.-W. und Wei, N.** (1998). "Combinatorial Interaction of Light-Responsive Elements Plays a Critical Role in Determining the Response Characteristics of Light-Regulated Promoters in *Arabidopsis*." *The Plant Journal* **15**(1): 69-77.
- Chen, S.-M. und Coe, E. H.** (1977). "Control of Anthocyanin Synthesis by the *C* Locus in Maize." *Biochem. Genet.* **15**: 333-346.
- Chopra, S., Athma, P. und Peterson, T.** (1996). "Alleles of the Maize *P* Gene with Distinct Tissue Specificities Encode MYB-Homologous Proteins with C-Terminal Replacements." *The Plant Cell* **8**(7): 1149-1158.
- Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R. K., Elich, T., Frankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J. und Vitart, V.** (1996). "From Seed Germination to Flowering, Light Controls Plant Development Via the Pigment Phytochrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12066-12071.

- Christie, J. M. und Jenkins, G. I.** (1996). "Distinct UV-B and UV-A/Blue Light Signal Transduction Pathways Induce *Chalcone Synthase* Gene Expression in *Arabidopsis* Cells." *The Plant Cell* **8**(9): 1555-1567.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R. und Walbot, V.** (1994). "Impact of Low-Temperature Stress on General Phenylpropanoid and Anthocyanin Pathways: Enhancement of Transcript Abundance and Anthocyanin Pigmentation in Maize Seedlings." *Planta* **194**(4): 541-549.
- Ciereszko, I., Johansson, H. und Kleczkowski, L. A.** (2001). "Sucrose and Light Regulation of a Cold-Inducible UDP-Glucose Pyrophosphorylase Gene Via a Hexokinase-Independent and Abscisic Acid-Insensitive Pathway in *Arabidopsis*." *Biochemical Journal* **354**: 67-72.
- Cocciolone, S. M., Chopra, S., Flint-Garcia, S. A., McMullen, M. D. und Peterson, T.** (2001). "Tissue-Specific Patterns of a Maize MYB Transcription Factor Are Epigenetically Regulated." *The Plant Journal* **27**: 467-478.
- Coe, E. H., Hoisington, D. A. und Neuffer, M. G.** (1988). In *The Genetics of Corn*. Corn and Corn Improvement. Sprague, G. F. und Dudley, J. W. Madison, The American Society of Agronomy: 81-259.
- Cone, K. C., Burr, F. A. und Burr, B.** (1986). "Molecular Analysis of the Maize Anthocyanin Regulatory Locus *C1*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 9631-9635.
- Cone, K. C., Cocciolone, S. M., Burr, F. A. und Burr, B.** (1993). "Maize Anthocyanin Regulatory Gene *PL* Is a Duplicate of *C1* That Functions in the Plant." *The Plant Cell* **5**: 1795-1805.
- Cone, K. C., Cocciolone, S. M., Moehlenkamp, C. A., Weber, T., Drummond, B. J., Tagliani, L. A., Bowen, B. A. und Perrot, G. H.** (1993). "Role of the Regulatory Gene *PL* in the Photocontrol of Maize Anthocyanin Pigmentation." *The Plant Cell* **5**: 1807-1816.
- Dangl, J. L., Hahlbrock, K. und Schell, J.** (1989). Regulation and Structure of *Chalcone Synthase* Genes. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6. Vasil, J. K. and Schell, J. New York, Academic Press, Inc.: 155-173.
- Dangl, J. L., Hauffe, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1987). "Parsley Protoplasts Retain Differential Responsiveness to UVLight and Fungal Elicitor." *The EMBO Journal* **6**: 2551-2556.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B. und Roby, D.** (1999). "A Novel MYB Oncogene Homologue in *Arabidopsis thaliana* Related to Hypersensitive Cell Death." *The Plant Journal* **20**(1): 57-66.
- de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J. und Koes, R.** (1997). "The *AN11* Locus Controlling Flower Pigmentation in *Petunia* Encodes a Novel WD-Repeat Protein Conserved in Yeast, Plants, and Animals." *Genes & Development* **11**(11): 1422-1434.

- Debeaujon, I., Peeters, A. J. M., Léon-Kloosterziel, K. M. und Koornneef, M.** (2001). "The *Transparent Testa12* Gene of *Arabidopsis* Encodes a Multidrug Secondary Transporter-Like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium." *The Plant Cell* **13**(4): 853-872.
- Deboo, G. B., Albertson, M. C. und Taylor, L. P.** (1995). "Flavanone 3-Hydroxylase Transcripts and Flavonol Accumulation Are Temporally Coordinated in Maize Anthers." *The Plant Journal* **7**(5): 703-713.
- Deikman, J. und Hammer, P. E.** (1995). "Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Physiology* **108**: 47-57.
- Deng, X.-W. und Quail, P. H.** (1992). "Genetic and Phenotypic Characterization of COP1 Mutants of *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **2**(1): 83-95.
- Deng, X.-W., Caspar, T. und Quail, P. H.** (1991). "COP1: A Regulatory Locus Involved in Light-Controlled Development and Gene Expression in *Arabidopsis*." *Genes & Development* **5**: 1172-1182.
- Deng, X.-W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A. M., Feldman, K. A. und Quail, P. H.** (1992). "COP1, an *Arabidopsis* Regulatory Gene, Encodes a Protein with Both a Zinc-Binding Motif and a GB Homologous Domain." *Cell* **71**: 791-801.
- Deshaies, R. J. und Meyerowitz, E. M.** (2000). "COP1 Patrols the Night Beat." *Nat Cell Biol* **2**: E102-E104.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O.** (1984). "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX." *Nucleic Acids Research* **12**: 387-395.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G. und Delseny, M.** (1999). "The *BANYULS* Gene Encodes a DFR-Like Protein and Is a Marker of Early Seed Coat Development." *The Plant Journal* **19**: 387-398.
- Dijkwel, P. P., Huijser, C., Weisbeek, P. J., Chua, N. H. und Smeekens, S. C. M.** (1997). "Sucrose Control of Phytochrome A Signaling in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **9**(4): 583-595.
- Dixon, R. A. und Paiva, N. L.** (1995). "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism." *The Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dong, X., Braun, E. L. und Grotewold, E.** (2001). "Functional Conservation of Plant Secondary Metabolic Enzymes Revealed by Complementation of *Arabidopsis* Flavonoid Mutants with Maize Genes." *Plant Physiology* **127**: 46-57.
- Dooner, H. K.** (1983). "Coordinate Genetic Regulation of Flavonoid Biosynthetic Enzymes in Maize." *Molecular General Genetics* **189**: 136-141.
- Dooner, H. K., Robbins, T. P. und Jorgensen, R. A.** (1991). "Genetic and Developmental Control of Anthocyanin Biosynthesis." *Annual Reviews in Genetics* **25**: 173-199.

- Dunsmuir, P., Bond, D., Lee, K., Gidoni, D. und Townsend, J.** (1988). Stability of Introduced Genes and Stability in Expression. *Plant Molecular Biology Manual*. Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A. and Verma, D. S. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: C1/1-17.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). "A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis." *Nucleic Acids Research* **19**(6): 1349.
- Ehrling, J.; Büttner, D.; Wang, Q.; Douglas, C. J.; Somssich, I. E. und Kombrink, E.** (1999). "Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms." *The Plant Journal* **19**(1): 9-20.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E. und Roitsch, T.** (1997). "Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms Via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation." *The Plant Cell* **9**(10): 1825-1841.
- Estelle, M.** (1996). "Plant Tropisms: The Ins and Outs of Auxin." *Current Biology* **6**: 1589-1591.
Expression of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase, an Enzyme Involved in the resistance Response of Soybean (*Glycine max* L.) against Pathogen Attack." *Plant Physiol.* **102**: 1147-1156.
- Faktor, O., Kooter, J. M., Dixon, R. A. und Lamb, C. J.** (1996). "Functional Dissection of a Bean *Chalcone Synthase* Gene Promoter in Transgenic Tobacco Plants Reveals Sequence Motifs Essential for Floral Expression." *Plant Molecular Biology* **32**(5): 849-859.
- Faktor, O., Kooter, J. M., Loake, G. J., Dixon, R. A. und Lamb, C. J.** (1997). "Differential Utilization of Regulatory *Cis*-Elements for Stress-Induced and Tissue-Specific Activity of a French Bean *Chalcone Synthase* Promoter." *Plant Science* **124**(2): 175-182.
- Faktor, O., Loake, G., Dixon, R. A. und Lamb, C. J.** (1997). "The G-Box and H-Box in a 39 bp Region of a French Bean *Chalcone Synthase* Promoter Constitute a Tissue-Specific Regulatory Element." *The Plant Journal* **11**(5): 1105-1113.
- Fankhauser, C.** (2000). "Phytochromes as Light-Modulated Protein Kinases." *Cell & Developmental Biology* **11**: 467-473.
- Faure, J.-D., Jullien, M. und Caboche, M.** (1994). "A Pleiotropic Mutation Affecting Cotyledone Development, Cytokinin Resistance and Carbo-Nitrogen Metabolism." *The Plant Journal* **5**: 481-491.
- Feild, T. S., Lee, D. W. und Holbrook, N. M.** (2001). "Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood." *Plant Physiology* **127**: 566-574.
- Feinbaum, R. L. und Ausubel, F. M.** (1988). "Transcriptional Regulation of the *Arabidopsis thaliana* *Chalcone Synthase* Gene." *Molecular and Cellular Biology* **8**(5): 1985-1992.

- Feinbaum, R. L., Storz, G. und Ausubel, F. M.** (1991). "High Intesity and Blue Light Regulated Expression of Chimeric *Chalcone Synthase* Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants." *Molecular General Genetics* **226**: 449-456.
- Feldbrügge, M., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (1996). "The Transcriptional Regulator CPRF1: Expression Analysis and Gene Structure." *Molecular General Genetics* **251**: 619-627.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K. und Weisshaar, B.** (1994). "Functional Analysis of a Light-Responsive Plant bZIP Transcriptional Regulator." *The Plant Cell* **6**(11): 1607-1621.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (1997). "*PcMYB1*, a Novel Plant Protein Containing a DNA-Binding Domain with One MYB Repeat, Interacts *in Vivo* with a Light-Regulatory Promoter Unit." *The Plant Journal* **11**(5): 1079-1093.
- Focks, N., Sagasser, M., Weisshaar, B. und Benning, C.** (1999). "Characterization of TT15, a Novel *Transparent Testa* Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." *Planta* **208**(3): 352-357.
- Foos, G.; Grimm, S. und Klempnauer, K.-H.** (1992). „Function antagonism between the members of the *myb*-family: B-*myb* inhibits v-*myb*-induced gene activation." *EMBO J.* **11**: 4619-4629.
- Forkmann, G.** (1991). "Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and Its Extension by Genetic Engineering." *Plant Breeding* **106**: 1-26.
- Förster, V. T.** (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz." *Annals of Physics* **2**: 55-75.
- Foster, R., Izawa, T. und Chua, N.-H.** (1994). "Plant bZIP Proteins Gather at ACGT Elements." *FASEB Journal* **8**(N2): 192-200.
- Frampton, J., Gibson, T., Ness, S., Doderlein, G. und Graf, T.** (1991). "Proposed Structure for the DNA-Binding Domain of the MYB Oncoprotein Based on Model Building and Mutational Analysis." *Protein Engeneering* **4**(8): 891-901.
- Frampton, J.; Gibson, T. J.; Ness, S. A.; Döderlein, G. und Graf, T.** (1991). „Proposed structure for the DNA-binding domain of the Myb-oncoprotein based on model building and mutaional analysis." *Prot. Eng.* **4**: 891-901.
- Frangne, N., Eggmann, T., Koblichke, C., Weissenböck, G., Martinoia, E. und Klein, M.** (2002). "Flavone Glucoside Uptake into Barley Mesophyll and *Arabidopsis* Cell Culture Vacuoles. Energization Occurs by H⁺-Antiport and ATP-Binding Cassette-Type Mechanisms." *Plant Physiology* **128**: 726-733.
- Frankel, A. D. und Kim, P. S.** (1991). "Modular Structure of Transcription Factors: Implications for Gene Regulation." *Cell* **65**: 717-719.

- Frohnmeier, H., Bowler, C., Zhu, J.-K., Yamagata, H., Schäfer, E. und Chua, N.-H.** (1998). "Different Roles for Calcium and Calmodulin in Phytochrome- and UV-Regulated Expression of *Chalcone Synthase*." *The Plant Journal* **13**(6): 763-772.
- Fuglevand, G., Jackson, J. A. und Jenkins, G. I.** (1996). "UV-B, UV-A, and Blue Light Signal Transduction Pathways Interact Synergistically to Regulate *Chalcone Synthase* Gene Expression in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **8**(12): 2347-2357.
- Gabrielsen, O. S. und Sentenac, A.; Fromageot, P.** (1991). „Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif." *Science* **253**: 1140-1143.
- Gallagher, S. R.** (1992). „Quantitation of GUS activity by fluorometry." In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. New York: Academic Press, pp. 47-59.
- Galway, M. E., Masucci, J. D., Lloyd, A. M., Walbot, V., Davis, R. W. und Schiefelbein, J. W.** (1994). "The *TTG* Gene Is Required to Specify Epidermal Cell Fate and Cell Patterning in the *Arabidopsis* Root." *Developmental Biology* **166**(2): 740-754.
- Ganter, B. und Lipsick, J.S.** (1999). "Myb and oncogenesis." *Adv. Cancer Res.* **76**: 21-60.
- Gerard, C. J., Andrejka, L. M. und Macina, R. A.** (2000). "Mitochondrial *ATP Synthase 6* as an Endogenous Control in the Quantitative RT-PCR Analysis of Clinical Cancer Samples." *Mol Diagn* **5**(1): 39-46.
- Ghandehari, D., Sherman, B. K. und Yu, C. L.** (2000). "Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis among Eukaryotes." *Science* **290**(5499): 2105-2110.
- Gibson, U. E., Heid, C. A. und Williams, C. A.** (1996). "A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR." *Genome Res* **6**: 995-1001.
- Giese, K., Cox, J. und Grosschedl, R.** (1992). "The HMG Domain of Lymphoid Enhancer Factor 1 Bends DNA and Facilitates Assembly of Functional Nucleoprotein Structures." *Cell* **69**: 185-195.
- Goff, S. A., Cone, K. C. und Chandler, V. L.** (1992). "Functional Analysis of the Transcriptional Activator Encoded by the Maize *B* Gene: Evidence for a Direct Functional Interaction between Two Classes of Regulatory Proteins." *Genes & Development* **6**: 864-875.
- Goff, S. A., Cone, K. C. und Fromm, M. E.** (1991). "Identification of Functional Domains in the Maize Transcriptional Activator C1: Comparison of Wild-Type and Dominant Inhibitor Proteins." *Genes & Development* **5**: 298-309.
- Gonda, T. J.** (1998). "The C-MYB Oncoprotein." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**(5): 547-551.
- Goode, B. L.; Feinstein, S. C.** (1992). "Speedprep' purification of template for double-stranded DNA sequencing." *BioTechniques* **12**(3): 148-149.
- Goodrich, J., Carpenter, R. und Coen, E. S.** (1992). "A Common Gene Regulates Pigmentation Pattern in Diverse Plant Species." *Cell* **68**: 955-964.

- Graham, T. L.** (1998). "Flavonoid and Flavonol Glycoside Metabolism in *Arabidopsis*." *Plant Physiology and Biochemistry* **36**(1-2): 135-144.
- Grotewold, E., Athma, P. und Peterson, T.** (1991). "Alternatively Spliced Products of the Maize *P* Gene Encode Proteins with Homology to the DNA-Binding Domain of MYB-Like Transcription Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4587-4591.
- Grotewold, E., Athma, P. und Peterson, T.** (1991). "Alternatively Spliced Products of the Maize *P* Gene Encode Proteins with Homology to the DNA-Binding Domain of *Myb*-Like Transcription Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4587-4591.
- Grotewold, E., Chamberlin, M., Snook, M., Siamed, B., Butler, L., Swenson, J., Maddock, S., St. Clair, G. und Bowen, B.** (1998). "Engineering Secondary Metabolism in Maize Cells by Ectopic Expression of Transcription Factors." *The Plant Cell* **10**(5): 721-740.
- Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B. und Peterson, T.** (1994). "The *MYB*-Homologous *P* Gene Controls Phlobaphene Pigmentation in Maize Floral Organs by Directly Activating a Flavonoid Biosynthetic Gene Subset." *Cell* **76**(3): 543-553.
- Grotewold, E., Sainz, M. B., Tagliani, L., Hernandez, J. M., Bowen, B. und Chandler, V. L.** (2000). "Identification of the Residues in the MYB Domain of Maize C1 That Specify the Interaction with the bHLH Cofactor R." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(25): 13579-13584.
- Guehmann, S., Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F. und Moelling, K.** (1992). "Reduction of a Conserved Cys Is Essential for MYB DNA-Binding." *Nucleic Acids Res* **20**(9): 2279-2286.
- Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. und Hofer, E.** (1987). "Complementary DNA for Human T-Cell Cyclophilin." *Embo J* **6**: 947-950.
- Hahlbrock, K. und Grisebach, H.** (1979). "Enzymatic Controls in the Biosynthesis of Lignin and Flavonoids." *Annual Reviews of Plant Physiology* **30**: 105-130.
- Hahlbrock, K. und Rack, H.** (1975). „Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis." *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 41-46.
- Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1989). "Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism." *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 347-369.
- Hain, R.; Stabel, P.; Czernilofsky, A. P.; Steinbiß, H. H.; Herrera-Estrella, L. und Schell, J.** (1985). „Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts." *Mol. Gen. Genet.* **199**: 161-168.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.

- Harborne, J. B. und Williams, C. A.** (2000). "Advances in Flavonoid Research since 1992." *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Hardtke, C. S., Gohda, K., Osterlund, M. T., Oyama, T., Okada, K. und Deng, X. W.** (2000). "HY5 Stability and Activity in *Arabidopsis* Is Regulated by Phosphorylation in Its COP1 Binding Domain." *Embo J* **19**(18): 4997-5006.
- Hardtke, C. S., Okamoto, H., Stoop-Myer, C. und Deng, X. W.** (2002). "Biochemical Evidence for Ubiquitin Ligase Activity of the *Arabidopsis* COP1 Interacting Protein 8 (CIP8)." *The Plant Journal* **30**(4): 385-394.
- Harrison, M. J. und Dixon, R. A.** (1994). "Spatial Patterns of Expression of Flavonoid/Isflavonoid Pathway Genes During Interactions between Roots of *Medicago truncatula* and the Mycorrhizal Fungus *Glomus versiforme*." *The Plant Journal* **6**: 9-20.
- Hartmann, U.** (1997). Untersuchungen zur Lichtabhängigen Koregulation der Gene der Flavonol-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Mat.-Nat. Fak. Köln, Germany, Universität zu Köln.
- Hartmann, U., Valentine, W. J., Christie, J. M., Hays, J., Jenkins, G. I. und Weisshaar, B.** (1998). "Identification of UV/Blue Light-Response Elements in the *Arabidopsis thaliana* Chalcone Synthase Promoter Using a Homologous Protoplast Transient Expression System." *Plant Molecular Biology* **36**: 741-754.
- Hatton, D., Sablowski, R., Yung, M. H., Smith, C., Schuch, W. und Bevan, M.** (1995). "Two Class of *Cis* Sequences Contribute to Tissue-Specific Expression of *PAL2* Promoter in Transgenic Tobacco." *The Plant Journal* **7**(6): 859-876.
- Hatton, D., Smith, C. und Bevan, M.** (1996). "Tissue-Specific Expression of the *PAL3* Promoter Requires the Interaction of Two Conserved *Cis* Sequences." *Plant Molecular Biology* **31**(2): 393-397.
- Heller, W. und Forkmann, G.** (1988). „Biosynthesis." In *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, (Harborne, J.B., eds). London: Chapman and Hall, pp. 399-425.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Métraux, J.-P. und Sonnewald, U.** (1996). "Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possiblehexose Sensing in the Secretory Pathway." *The Plant Cell* **8**: 793-803.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R.** (1993). "Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions." *Biotechnology* **11**: 1026-1030.
- Hirayama, T. und Shinozaki, K.** (1996). "A CDC5+ Homolog of a Higher Plant, *Arabidopsis thaliana*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(23): 13371-13376.
- Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J. und Dennies, E. S.** (1998). "Evidence for a Role for *AtMYB2* in the Induction of the *Arabidopsis thaliana* Alcohol Dehydrogenase Gene (*ADH1*) by Low Oxygen." *Genetics* **149**: 479-490.

- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. und Gelfand, D. H.** (1991). "Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' to 3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7276-7280.
- Holm, M., Hardtke, C. S., Gaudet, R. und Deng, X. W.** (2001). "Identification of a Structural Motif That Confers Specific Interaction with the WD40 Repeat Domain of *Arabidopsis* COP1." *Embo J* **20**(1-2): 118-27.
- Holmes, D. S. und Quigley, M.** (1981). "A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids." *Analytical Biochemistry* **114**: 193-197.
- Howe, K. M. und Watson, R. J.** (1991). "Nucleotide Preferences in Sequence-Specific Recognition of DNA by *C-Myb* Protein." *Nucleic Acids Research* **19**: 3913-3919.
- Howles, P. A., Sewalt, V. J., Paiva, N. L., Elkind, Y., Bate, N. J., Lamb, C. und Dixon, R. A.** (1996). "Overexpression of *L-Phenylalanine Ammonia-Lyase* in Transgenic Tobacco Plants Reveals Control Points for Flux into Phenylpropanoid Biosynthesis." *Plant Physiology* **112**(4): 1617-1624.
- Hsieh, H.-L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.-H., Matsui, M., Goodman, H. und Deng, X. W.** (2000). "Fin219, an Auxin-Regulated Gene, Defines a Link between Phytochrome A and the Downstream Regulator COP1 in Light Control of *Arabidopsis* Development." *Genes & Development* **14**(15): 1958-1970.
- Hu, W. J., Kawaoka, A., Tsai, C. J., Lung, J., Osakbe, K., Ebinuma, H. und Chiang, V. L.** (1998). "Compartmentalized Expression of Two Structurally and Functionally *Distinct 4-Coumarate:Coa Ligase* Genes in Aspen (*Populus tremuloides*)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5407-5412.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. und Briggs, W. R.** (1997). "*Arabidopsis* NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain." *Science* **278**(5346): 2120-2123.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). "High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." *Gene* **96**: 23-28.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J. H. und Watanabe, A.** (2001). "G2/M-Phase-Specific Transcription During the Plant Cell Cycle Is Mediated by C-MYB-Like Transcription Factors." *The Plant Cell* **13**(8): 1891-1905.
- Iwashina, T.** (2000). "The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants." *Journal of Plant Research* **113**(1111): 287-299.
- Jackson, D., Culianez-Macia, F., Prescott, A. G., Roberts, K. und Martin, C.** (1991). "Expression Patterns of *MYB* Genes from *Antirrhinum* Flowers." *The Plant Cell* **3**(2): 115-125.
- Jackson, J. A., Fuglevand, G., Brown, B. A., Shaw, M. J. und Jenkins, G. I.** (1995). "Isolation of *Arabidopsis* Mutants Altered in the Light-Regulation of *Chalcone Synthase* Gene Expression Using a Transgenic Screening Approach." *The Plant Journal* **8**(3): 369-380.

- Jacobs, M. und Rubery, P. H.** (1988). "Naturally Occuring Auxin Transport Regulators." *Science* **241**: 346-349.
- Jang, J.-C. und Sheen, J.** (1997). "Sugar Sensing in Higher Plants." *Trends in Plant Science* **2**: 208-214.
- Jang, J.-C., Leon, P., Zhou, L. und Sheen, J.** (1997). "Hexokinase as a Sugar Sensor in Higher Plants." *The Plant Cell* **9**: 5-19.
- Jefferson, R. J.** (1987). "Assaying Chimaeric Genes in Plants: The Gus Gene Fusion System." *Plant Molecular Biology Reporter* **5**: 387-405.
- Jenkins, G. I.** (1997). "UV and Blue Light Signal Transduction in *Arabidopsis*." *Plant Cell & Environment* **20**: 773-778.
- Jenkins, G. I., Long, J. C., Wade, H. K., Shenton, M. R. und Bibikova, T. N.** (2001). "UV and Blue Light Signalling: Pathways Regulating *Chalcone Synthase* Gene Expression in *Arabidopsis*." *New Phytologist* **151**: 121-131.
- Jin, H. und Martin, C.** (1999). "Multifunctionality and Diversity within the Plant *MYB*-Gene Family." *Plant Molecular Biology* **41**(5): 577-585.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrstens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. und Martin, C.** (2000). "Transcriptional Repression by *AtMYB4* Controls Production of UV-Protecting Sunscreens in *Arabidopsis*." *The EMBO Journal* **19**(22): 6150-6161.
- Kaiser, T. und Batschauer, A.** (1995). "*Cis*-Acting Elements of the *CHS1* Gene from White Mustard Controlling Promoter Activity and Spatial Patterns of Expression." *Plant Molecular Biology* **28**: 231-243.
- Kaiser, T., Emmler, K., Kretsch, T., Weisshaar, B., Schäfer, E. und Batschauer, A.** (1995). "Promoter Elements of the Mustard *CHS1* Gene Sufficient for Light Regulation in Transgenic Plants." *Plant Molecular Biology* **28**: 219-229.
- Kanei-Ishii, C., MacMillan, E. M., Nomura, T., Sarai, A., Ramsay, R. G., Aimoto, S., Ishii, S. und Gonda, T. J.** (1992). "Transactivation and Transformation by MYB Are Negatively Regulated by a Leucine-Zipper Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(7): 3088-3092.
- Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D. N., Ogata, K., Nishimura, Y. und Ishii, S.** (1990). "The Tryptophan Cluster: A Hypothetical Structure of the DNA-Binding Domain of the *MYB* Protooncogene Product." *Journal of Biological Chemistry* **265**(32): 19990-19995.
- Karge, W. H., Schaefer, E. J. und Ordovas, J. M.** (1998). "Quantification of mRNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) Using an Internal Standard and a Nonradioactive Detection Method." *Methods in Molecular Biology* **110**: 43-61.

- Kelley, M. R., Jurgens, J. K., Tentler, J., Emanuele, N. V., Blutt, S. E. und Emanuele, M. A.** (1993). "Coupled Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique Is Comparative, Quantitative, and Rapid: Uses in Alcohol Research Involving Low Abundance mRNA Species Such as Hypothalamic *LHRH* and *GRF*." *Alcohol* **10**: 185-189.
- Kim, B. C., Tennessen, D. J. und Last, R. L.** (1998). "UV-B-Induced Photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **15**(5): 667-674.
- Kim, Y.-M., Woo, J.-C., Song, P.-S. und Soh, M.-S.** (2002). "HFR1, a Phytochrome A-Signalling Component, Acts in a Separate Pathway from Hy5, Downstream of COP1 in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **30**(6): 711-719.
- Kirik, V. und Baumlein, H.** (1996). "A Novel Leaf-Specific MYB-Related Protein with a Single Binding Repeat." *Gene* **183**: 109-113.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hülkamp, M. und Baumlein, H.** (2001). "Ectopic Expression of the *Arabidopsis AtMYB23* Gene Induces Differentiation of Trichome Cells." *Developmental Biology* **235**(2): 366-377.
- Koch, M. A., Weisshaar, B., Kroymann, J., Haubold, B. und Mitchell-Olds, T.** (2001). "Comparative Genomics and Regulatory Evolution: Conservation and Function of the *CHS* and *APETALA3* Promoters." *Molecular Biology and Evolution* **18**(10): 1882-1891.
- Koes, R. E., Quattrocchio, F. und Mol, J. N. M.** (1994). "The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution." *BioEssays* **16**(2): 123-132.
- Kombrink, E. und Hahlbrock, K.** (1986). "Responses of Cultured Parsley Cells to Elicitors from Phytopathogenic Fungi." *Plant Physiology* **81**: 216-221.
- Koorneef, M., Alonso-Blanco, C. und Stam, P.** (1998). Genetic Analysis. *Arabidopsis Protocols*. Martinez-Zapater, J. and Salinas, J. Totowa, USA, Humana Press: 105-117.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. und Weisshaar, B.** (1998). "Towards Functional Characterisation of the Members of the *R2R3-MYB* Gene Family from *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **16**: 263-276.
- Kranz, H., Scholz, K. und Weisshaar, B.** (2000). "*C-MYB* Oncogene-Like Genes Encoding Three MYB Repeats Occur in All Major Plant Lineages." *The Plant Journal* **21**(2): 231-235.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C. und Sitt, M.** (1993). "Regulation of the Expression of *RBCS* and Other Photosynthetic Genes by Carbohydrates: A Mechanism for the Sink Regulation of Photosynthesis." *The Plant Journal* **3**: 817-828.
- Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J. und Schilperoort, R. A.** (1982). "In Vitro Transformation of Plant Protoplasts with Ti-Plasmid DNA." *Nature* **296**: 72-74.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D. N. und Hahlbrock, K.** (1983). "UV-Induction of Chalcone Synthase mRNA in Cell Suspension Cultures of *Petroselinum hortense*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 2591-2593.

- Kreuzer, K. A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., Pauli, G., Huhn, D. und Schmidt, C. A.** (1999). "Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse-Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-Free Detection of Beta-Actin Transcripts as Quantitative Reference." *Clinical Chemistry* **45**: 297-300.
- Kubasek, W. L., Ausubel, F. M. und Shirley, B. W.** (1998). "A Light-Independent Developmental Mechanism Potentiates Flavonoid Gene Expression in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant Molecular Biology* **37**: 217-223.
- Kubasek, W. L., Shirley, B. W., McKillop, A., Goodman, H. M., Briggs, W. und Ausubel, F. M.** (1992). "Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating *Arabidopsis* Seedlings." *The Plant Cell* **4**: 1229-1236.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S. und Last, R. L.** (1995). "*Arabidopsis* Mutants Lacking Phenolic Sunscreens Exhibit Enhanced Ultraviolet-B Injury and Oxidative Damage." *Plant Physiology* **109**(4): 1159-1166.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C. und Douglas, C. J.** (1997). "Antisense Suppression of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase Activity in *Arabidopsis* Leads to Altered Lignin Subunit Composition." *The Plant Cell* **9**(11): 1985-1998.
- Lee, L. G., Connell, C. R. und Bloch, W.** (1993). "Allelic Discrimination by Nick-Translation Pcr with Fluorogenic Probes." *Nucleic Acids Res* **21**: 3761-3766.
- Lee, M. M. und Schiefelbein, J.** (1999). "WEREWOLF, a MYB-Related Protein in *Arabidopsis*, Is a Position-Dependent Regulator of Epidermal Cell Patterning." *Cell* **24**(5): 473-483.
- Lee, M. M. und Schiefelbein, J.** (2001). "Developmentally Distinct *MYB* Genes Encode Functionally Equivalent Proteins in *Arabidopsis*." *Development* **128**(9): 1539-1546.
- Lee, M. W., Qi, M. und Yang, Y.** (2001). "A Novel Jasmonic Acid-Inducible Rice Myb Gene Associates with Fungal Infection and Host Cell Death." *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**(4): 527-535.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. und Martinez-Zapater, J. M.** (1995). "Low Temperature Induces the Accumulation of Phenylalanine Ammonia Lyase and Chalcone Synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a Light-Dependent Manner." *Plant Physiology* **108**: 39-46.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R. G. und Last, R. L.** (1993). "*Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation." *The Plant Cell* **5**: 171-179.
- Lie, Y. S. und Petropoulos, C. J.** (1998). "Advances in Quantitative PCR Technology: 5'Nuclease Assays." *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 43-48.
- Lipphardt, S.; Brettschneider, R.; Kreuzaler, F.; Schell, J. und Dangl, J. L.** (1988). "UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Antirrhinum majus* chalcone synthase gene." *EMBO J.* **7**: 4027-4033.
- Lipsick, J. S.** (1996). "One Billion Years of MYB." *Oncogene* **13**: 223-235.

- Lister, C. und Dean, C.** (1993). "Recombinant Inbred Lines for Mapping RFLP and Phenotypic Markers in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 4: 745-750.
- Liu, L., White, M. J. und MacRae, T. H.** (1999). "Transcription Factors and Their Genes in Higher Plants Functional Domains, Evolution and Regulation." *European Journal of Biochemistry* 262: 247-257.
- Livak, K., Flood, S. J. A., AMarmaro, J., Giusti, W. und Deetz, K.** (1995). "Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quencher Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization." *PCR Methods Appl.* 4: 357-362.
- Lloyd, A. M., Walbot, V. und Davis, R. W.** (1992). "*Arabidopsis* and *Nicotiana* Anthocyanin Production Activated by Maize Regulators R and C1." *Science* 258: 1773-1775.
- Loake, G. J., Choudhary, A. D., Harrison, M. J., Mavandad, M., Lamb, C. J. und Dixon, R. A.** (1991). "Phenylpropanoid Pathway Intermediates Regulate Transient Expression of a *Chalcone Synthase* Gene Promoter." *The Plant Cell* 3: 829-840.
- Logemann, E., Block, A., Schulz, W., Somssich, I. E. und Hahlbrock, K.** (2000). "Ultraviolet Light Selectively Co-Induces Supply Pathways from Primary Metabolism and Flavonoid Secondary Product Formation in Parsley." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1903-1907
- Logemann, E., Parniske, M. und Hahlbrock, K.** (1995a). "Modes of Expression and Common Structural Features of the Complete *Phenylalanine Ammonia-Lyase* Gene Family in Parsley." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(13): 5905-5909.
- Logemann, E., Wu, S. C., Schroeder, J., Schmelzer, E., Somssich, I. E. und Hahlbrock, K.** (1995). "Gene Activation by UV Light, Fungal Elicitor or Fungal Infection in *Petroselinum crispum* Is Correlated with Repression of Cell Cycle-Related Genes." *The Plant Journal* 8(6): 865-876.
- Lomax, T. L., Muday, G. K. und Rubery, P.** (1995). *Auxin Transport. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Davies, P. J. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Press.
- Long, S. R.** (1989). "Rhizobium-Legume Nodulation: Life Together in the Underground." *Cell* 56: 203-214.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M. und Frohnmeyer, H.** (2000). "Glutathione and UV Light-Induced Glutathione S-Transferase Are Involved in Signaling to *Chalcone Synthase* in Cell Cultures." *The Plant Cell* 12: 1939-1950.
- Ludwig, S. R. und Wessler, S. R.** (1990). "Maize *R* Gene Family: Tissue-Specific Helix-Loop-Helix Proteins." *Cell* 62: 849-851.

- Ludwig, S. R., Habera, L. F., Dellaporta, S. L. und Wessler, S. R.** (1989). "Lc, a Member of the Maize R Gene Family Responsible for Tissue-Specific Anthocyanin Production, Encodes a Protein Similar to Transcriptional Activators and Contains the MYC-Homology Region." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 7092-7096.
- Lüscher, B.; Eisenmann, R. N.** (1990). "New light on Myc and Myb. Part I. Myc." *Genes and Development* **4**: 2025-2035.
- Mansur, N. R., Meyer-Siegler, K., Wurzer, J. C. und Sirover, M. A.** (1999). "Cell-Cycle Regulation of Glycerinaldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase/Uracil DNA Glycosylase Gene in Normal Human Cells." *Nucleic Acids Res* **21**: 993-998.
- Marocco, A.; Wissenbach, M.; Becker, D.; Paz-Ares, J.; Saedler, H.; Salamini, F.; Rhode, W.** (1989). "Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the myb oncoproteins." *Mol. Gen. Genet.* **216**: 183-187.
- Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M. und Walbot, V.** (1995). "A Glutathione S-Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize Gene *Bronze-2*." *Nature* **375**(6530): 397-400.
- Martin, C. und Paz-Ares, J.** (1997). "MYB Transcription Factors in Plants." *Trends in Genetics* **13**(2): 67-73.
- Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J. und Vrijlandt, E.** (1991). "Control of Anthocyanin Biosynthesis in Flowers of *Antirrhinum Majus*." *The Plant Journal* **1**(1): 37-49.
- Martinez-Garcia, J., Huq, E. und Quail, P.** (2000). "Direct Targeting of Light Signals to a Promoter Element-Bound Transcription Factor." *Science* **288**(5467): 859-863.
- Martínez-Hernández, A., López-Ochoa, L., Argüello-Astroga, G. und Herrera-Estrella, L.** (2002). "Functional Properties and Regulatory Complexity of a Minimal RBCS Light-Responsive Unit Activated by Phytochrome, Cryptochrome, and Plastid Signals." *Plant Physiology* **128**: 1223-1233.
- McNellis, T. W., von Arnim, A. G., Araki, T., Komeda, Y., Miséra, S. und Deng, X.-W.** (1994). "Genetic and Molecular Analysis of an Allelic Series of *COPI* Mutants Suggests Functional Roles for the Multiple Protein Domains." *The Plant Cell* **6**: 487-500.
- Mehrtens, F.** (1999). Untersuchungen zur Bedeutung von MYB-Ähnlichen und bHLH-Faktoren Für die Aktivierung der Promotoren von an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgenen in *Arabidopsis thaliana*. Mat.-Nat. Fak. Köln, Germany, Universität zu Köln.
- Meissner, R. C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H. D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeekens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A. F., Bouchez, D., Jones, J. J. D., Pereira, A., Wisman, E. und Bevan, M.** (1999). "Function Search in a Large Transcription Factor Gene Family in *Arabidopsis*: Assessing the Potential of Reverse Genetics to Identify Insertional Mutations in R2R3 MYB Genes." *The Plant Cell* **11**(10): 1827-1840.

- Merkle, T., Frohnmeier, H., Schulze-Lefert, P., Dangl, J. L., Hahlbrock, K. und Schafer, E.** (1994). "Analysis of the Parsley *Chalcone-Synthase* Promoter in Response to Different Light Qualities." *Planta* **193**(N2): 275-282.
- Meyer, K., Cusumano, J. C., Somerville, C. und Chapple, C. C. S.** (1996). "Ferulate-5-Hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* Defines a New Family of Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(14): 6869-6874.
- Migliarese, M. R., Richardson, A. F., Aziz, N. und Bender, T. P.** (1996). "Differential Regulation of C-MYB-Induced Transcription Activation by a Phosphorylation Site in the Negative Regulatory Domain." *Journal of Biological Chemistry* **271**(37): 22697-22705.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. und Nakamura, K.** (1997). "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with Pleiotropic Effects on the Expression of the Gene for Beta-Amylase and on the Accumulation of Anthocyanin That Are Inducible by Sugars." *The Plant Journal* **11**(4): 841-51.
- Mo, Y., Nagel, C. und Taylor, L. P.** (1992). "Biochemical Complementation of *Chalcone Synthase* Mutants Defines a Role for Flavonols in Functional Pollen." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 7213-7217.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J. F. und Martin, C.** (1996). "Apparent Redundancy in *MYB* Gene Function Provides Gearing for the Control of Flavonoid Biosynthesis in *Antirrhinum* Flowers." *The Plant Cell* **8**: 1519-1532.
- Muir, S. R., Collins, G. J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., de Vos, C. H. R., van Tunen, A. J. und Verhoeven, M. E.** (2001). "Overexpression of *Petunia Chalcone Isomerase* in Tomato Results in Fruit Containing Increased Levels of Flavonols." *Nature Biotechnology* **19**: 470-474.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). "Specific Synthesis of DNA *in Vitro* Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction." *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). "Specific Enzymatic Amplification of DNA *in Vitro*: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 263-273.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Murphy, A., Peer, W. A. und Taiz, L.** (2000). "Regulation of Auxin Transport by Aminopeptidases and Endogenous Flavonoids." *Planta* **211**: 315-324.
- Myrset, A. H., Bostard, A., Jamin, N., Lirsac, P. N., Toma, F. und Gabrielsen, O. S.** (1993). "DNA and Redox State Induced Conformational Changes in the DNA-Binding Domain of the MYB Oncoprotein." *The EMBO Journal* **12**(12): 4625-4633.
- Nagy, F. und Schaefer, E.** (2000). "Nuclear and Cytosolic Events of Light-Induced, Phytochrome-Regulated Signaling in Higher Plants." *The EMBO Journal* **19**: 157-163.

- Nam H. G.; Giraudat, J.; Den Boer, B.; Moonan, F.; Loos, W.; Hauge, B. M. und Goodman, H. M.** (1989). "Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map of *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Cell* **1**(7): 699-705.
- Nelson, H. C. M.** (1995). "Structure and Function of DNA-Binding Proteins." *Current Opinion in Genetics and Development* **5**: 180-189.
- Nemeth, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Konczkalman, Z., Stankovicstangeland, B., Bako, L., Mathur, J., Okresz, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Redei, G. P., Schell, J. und Koncz, C.** (1998). "Pleiotropic Control of Glucose and Hormone Responses by PRL1, a Nuclear WD Protein, in *Arabidopsis*." *Genes & Development* **12**(19): 3059-3073.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2000). "The *TT8* Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of *DFR* and *BAN* Genes in *Arabidopsis* Siliques." *The Plant Cell* **12**(10): 1863-1878.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (2001). "The *Arabidopsis TT2* Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed." *The Plant Cell* **13**(9): 2099-2114.
- Noda, K.-I., Glover, B. J., Linstead, P. und Martin, C.** (1994). "Flower Colour Intensity Depends on Specialized Cell Shape Controlled by a MYB-Related Transcription Factor." *Nature* **369**: 661-664.
- Noh, B. und Spalding, E. P.** (1998). "Anion Channels and the Stimulation of Anthocyanin Accumulation by Blue Light in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant Physiology* **116**: 503-509.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. und Ishizaki, R.** (1988). "Isolation of Human Cdna Clones of *Myb*-Related Genes, *a-Myb* and *B-Myb*." *Nucleic Acids Research* **16**: 11075-11089.
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. und Nishimura, Y.** (1992). "Solution Structure of a DNA-Binding Unit of MYB: A Helix-Turn-Helix-Related Motif with Conserved Tryptophans Forming a Hydrophobic Core." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6428-6432.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. und Nishimura, Y.** (1994). "Solution Structure of a Specific DNA Complex of the MYB DNA-Binding Domain with Cooperative Recognition Helices." *Cell* **79**: 639-648.
- Oh, I. H. und Reddy, E. P.** (1999). "The *MYB* Gene Family in Cell Growth, Differentiation and Apoptosis." *Oncogene* **18**(19): 3017-3033.
- Ohi, R., McCollum, D., Hirani, B., Haese, G. J. D., Zhang, X., Burke, J. D., Turner, K. und Gould, K. L.** (1994). "The *Schizosaccharomyces Pombe Cdc5+* Gene Encodes an Essential Protein with Homology to C-Myb." *The EMBO Journal* **13**: 471-483.
- Ohl, S., Hedrick, S., Chory, J. und Lamb, C. J.** (1990). "Functional Properties of a *Phenylalanine Ammonia-Lyase* Promoter from *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **2**: 837-848.

- Olsson, L. C., Veit, M., Weissenböck, G. und Bornman, J. F.** (1998). "Differential Flavonoid Response to Enhanced UV-B Radiation in *Brassica napus*." *Phytochemistry* **49**(4): 1021-1028.
- Oppenheimer, D. G., Herman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J. und Marks, M. D.** (1991). "A *MYB* Gene Required for Leaf Trichome Differentiation in *Arabidopsis* Is Expressed in Stipules." *Cell* **67**: 483-493.
- Orlando, C., Pinzani, P. und Pazzagli, M.** (1998). "Developments in Quantitative PCR." *Clin Chem Lab Med* **36**(5): 255-269.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. und Deng, X. W.** (2000). "Targeted Destabilization of HY5 During Light-Regulated Development of *Arabidopsis*." *Nature* **405**: 462-465.
- Pabo, C. O. und Sauer, R. T.** (1992). "Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition." *Annual Reviews of Biochemistry* **61**: 1053-1095.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J. und Rice-Evans, C. A.** (2001). "Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**: 1161-1168.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A. und Saedler, H.** (1987). "The Regulatory *CI* Locus of *Zea Mays* Encodes a Protein with Homology to MYB Proto-Oncogene Products and with Structural Similarities to Transcriptional Activators." *The EMBO Journal* **6**(12): 3553-3558.
- Paz-Ares, J., Wienand, U., Peterson, P. A. und Saedler, H.** (1986). "Molecular Cloning of the *CI* Locus of *Zea Mays*: A Locus Regulating the Anthocyanin Pathway." *The EMBO Journal* **5**: 829-834.
- Peccoud, J. und Jacob, C.** (1996). "Theoretical Uncertainty of Measurements Using Quantitative Polymerase Chain Reaction." *Biophysical Journal* **71**: 101-108.
- Peer, W. A., Brown, D. E., Tague, B. W., Muday, G. K., Taiz, L. und Murphy, A. S.** (2001). "Flavonoid Accumulation Patterns of *Transparent Testa* Mutants of *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **126**: 536-548.
- Pelletier, M. K. und Shirley, B. W.** (1996). "Analysis of Flavanone 3-Hydroxylase in *Arabidopsis* Seedlings. Coordinate Regulation with Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase." *Plant Physiology* **111**: 339-345.
- Pelletier, M. K., Burbulis, I. E. und Shirley, B. W.** (1999). "Disruption of Specific Flavonoid Genes Enhances the Accumulation of Flavonoid Enzymes and Endproducts in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant Molecular Biology* **40**(1): 45-54.
- Pelletier, M. K., Murrell, J. R. und Shirley, B. W.** (1997). "Characterization of *Flavonol Synthase* and *Leucoanthocyanidin Dioxygenase* Genes in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **113**(4): 1437-1445.

- Pfaffl, M. W.** (2001). "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): 2002-2007.
- Pfaffl, M. W. und Hageleit, M.** (2001). "Validities of mRNA Quantification Using Recombinant RNA and Recombinant DNA External Calibration Curves for Real-Time RT-PCR." *Biotechnology Letters* **23**: 275-282.
- Piazza, P., Procissi, A., Jenkins, G. I. und Tonelli, C.** (2002). "Members of the *CI/PL* Regulatory Gene Family Mediate the Response of Maize Aleurone and Mesocotyl to Different Light Qualities and Cytokinins." *Plant Physiology* **128**: 1077-1086.
- Pietta, P. G.** (2000). "Flavonoids as Antioxidants." *Journal of Natural Products* **63**: 1035-1042.
- Pollak, P. E., Vogt, T., Mo, Y. und Taylor, L. P.** (1993). "Chalcone Synthase and Flavonol Accumulation in Stigma and Anthers of *Petunia hybrida*." *Plant Physiol.* **102**: 925-932.
- Puente, P., Wei, N. und Deng, X. W.** (1996). "Combinatorial Interplay of Promoter Elements Constitutes the Minimal Determinants for Light and Developmental Control of Gene Expression in *Arabidopsis*." *The EMBO Journal* **15**(14): 3732-3743.
- Quattrocchio, F., Wing, J. F., van der Woude, K., Mol, J. N. M. und Koes, R.** (1998). "Analysis of bHLH and MYB Domain Proteins: Species Specific Regulatory Differences Are Caused by Divergent Evolution of Target Anthocyanin Genes." *The Plant Journal* **13**(4): 475-488.
- Rabino, I. und Mancinelli, A. L.** (1986). "Light, Temperature, and Anthocyanin Production." *Plant Physiology* **81**: 922-924.
- Rabinowicz, P. D., Ma, H. und Grotewold, E.** (1997). "Consequences of the Ectopic Expression of the MYB-Domain Protein P." *Maize Genetics Cooperation Newsletters* **71**: 21-22.
- Rabinowicz, P., Braun, E., Wolfe, A., Bowen, B. und Grotewold, E.** (1999). "Maize *R2R3 MYB* Genes: Sequence Analysis Reveals Amplification in the Higher Plants." *Genetics* **153**(1): 427-444.
- Raeymaekers, L.** (1995). "A Commentary on the Practical Applications of Competitive PCR." *Genome Res* **5**: 91-94.
- Rausher, M., Miller, R. und Tiffin, P.** (1999). "Patterns of Evolutionary Rate Variation among Genes of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway." *Molecular Biology and Evolution* **16**(2): 266-274.
- Richter, G.** (1988). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Stuttgart; New York.
- Riechmann, J. L. und Ratcliffe, O. J.** (2000). "A Genomic Perspective on Plant Transcription Factors." *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 423-434.

- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K. und Yu, C. L.** (2000). "Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis among Eukaryotes." *Science* **290**(5499): 2105-2110.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. und Frommer, W. B.** (1994). "Evidence for an Essential Role of the Sucrose Transporter in Phloem Loading and Assimilate Partitioning." *Embo J* **13**: 1-7.
- Rocholl, M., Talke-Messerer, C., Kaiser, T. und Batschauer, A.** (1994). "Unit1 of the Mustard *Chalcone Synthase* Promoter Is Sufficient to Mediate Light Responses from Different Photoreceptors." *Plant Science* **97**(N2): 189-198.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpical, J. M., Leyva, A. und Paz-Ares, J.** (1998). "More Than 80 R2r3-MYB Regulatory Genes in the Genome of Arabidopsis Thaliana." *The Plant Journal* **14**(3): 273-284.
- Rook, F., Weisbeek, P. und Smeekens, S.** (1998). "The Light-Regulated Arabidopsis bZIP Transcription Factor Gene *Atb2* Encodes a Protein with an Unusually Long Leucine Zipper Domain." *Plant Mol Biol* **37**(1): 171-8.
- Rosinski, J. A. und Atchley, W. R.** (1998). "Molecular Evolution of the MYB Family of Transcription Factors: Evidence for Polyphyletic Origin." *Journal of Molecular Evolution* **46**(1): 74-83.
- Rosinski, J. A. und Atchley, W. R.** (1999). "Molecular Evolution of Helix-Turn-Helix Proteins." *Journal of Molecular Evolution* **49**(3): 301-309.
- Rosberg, M., Theres, K., Acarkan, A., Herrero, R., Schmitt, T., Schumacher, K., Schmitz, G. und Roth, B. A., Goff, S. A., Klein, T. M. und Fromm, M. E.** (1991). "C1- and R-Dependent Expression of the Maize *BZI* Gene Requires Sequences with Homology to Mammalian MYB and MYC Binding Sites." *The Plant Cell* **3**: 317-325.
- Ruegger, M. O. und Chapple, C.** (2001). "Mutations That Reduce Sinaopylmalate Accumulation in *Arabidopsis thaliana* Define Loci with Deverse Roles in Phenylpropanoid Metabolism." *Genetics* **159**: 1741-1749.
- Ryan, K. G., Swinney, E. E., Markham, K. R. und Winefield, C.** (2002). "Flavonoid Gene Expression and UV Photoprotection in Transgenic and Mutant Petunia Leaves." *Phytochemistry* **59**: 23-32.
- Ryan, K. G., Swinney, E. E., Winefield, C. und Markham, K. R.** (2001). "Flavonoids and UV Photoprotection in *Arabidopsis* Mutants." *Zeitschrift für Naturforschung C* **56c**: 745-754.
- Sablowski, R. W. M., Baulcombe, D. C. und Bevan, M.** (1995). "Expression of a Flower-Specific MYB Protein in Leaf Cells Using a Viral Vector Causes Ectopic Activation of a Target Promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6901-6905.

- Sablowski, R. W. M., Moyano, E., Culianez-Macia, F. A., Schuch, W., Martin, C. und Bevan, M.** (1994). "A Flower-Specific MYB Protein Activates Transcription of Phenylpropanoid Biosynthetic Genes." *The EMBO Journal* **13**(N1): 128-137.
- Sagasser, M., Lu, G.-H., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (2002). "*A. thaliana* *Transparent Testa 1* Is Involved in Seed Coat Development and Defines the WIP Subfamily of Plant Zinc Finger Proteins." *Genes & Development* **16**(1):138-49.
- Saikumar, P., Murali, R. und Reddy, E. P.** (1990). "Role of Tryptophan Repeats and Flanking Amino Acids in MYB-DNA Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 8452-8456.
- Sainz, M. B., Goff, S. A. und Chandler, V. L.** (1997a). "Extensive Mutagenesis of a Transcriptional Activation Domain Identifies Single Hydrophobic and Acidic Amino Acids Important for Activation in Vivo." *Molecular and Cellular Biology* **17**(1): 115-122.
- Sainz, M. B., Grotewold, E. und Chandler, V. L.** (1997). "Evidence for Direct Activation of an Anthocyanin Promoter by the Maize C1 Protein and Comparison of DNA Binding by Related MYB Domain Proteins." *The Plant Cell* **9**(4): 611-625.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J. und Ishii, S.** (1989). "Delineation of Three Functional Domains of the Transcriptional Activator Encoded by the *C-MYB* Protooncogene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(15): 5758-5762.
- Sakuta, M.** (2000). "Transcriptional Control of Chalcone Synthase by Environmental Stimuli." *Journal of Plant Research* **113**(1111): 327-333.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, G. und Sommer, S. S.** (1990). "The "Megaprimer" Method of Site-Directed Mutagenesis." *BioTechniques* **8**(4): 404-407.
- Sarma, A. D., Sreelakshmi, Y. und Sharma, R.** (1998). "Differential Expression and Properties of Phenylalanine Ammonia-Lyase Isoforms in Tomato Leafs." *Phytochemistry* **49**(8): 2233-2243.
- Saslowsky, D. und Winkel-Shirley, B.** (2001). "Localization of Flavonoid Enzymes in *Arabidopsis* Roots." *The Plant Journal* **27**(1): 37-48.
- Schäfer, E., Kunkel, T. und Frohnmeyer, H.** (1997). "Signal Transduction in the Photocontrol of *Chalcone Synthase* Gene Expression." *Plant Cell & Environment* **20**(6): 722-727.
- Schaffer, R.; Ramsay, N.; Samach, A.; Corden, S.; Puterill, J.; Carre, I. A.; Coupland, G.** (1998). "The late elongated hypocotyl Mutation of *Arabidopsis* Disrupts Circadian Rhythms and the Photoperiodic Control of Flowering." *Cell* **93**: 1219-1229.

- Schneider-Poetsch, H. A. W. und Braun, B.** (1991). "Proposal on the Nature of Phytochrome Action Based on the C-Terminal Sequences of Phytochrome." *Journal of Plant Physiology* **137**: 576-580.
- Schneider-Poetsch, H. A. W., Braun, B., Marx, S. und Schaumburg, A.** (1991). "Phytochromes and Bacterial Sensor Proteins Are Related by Structural and Functional Homologies." *Federation of European Biochemical Societies* **281**: 245-249.
- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G. und Weisshaar, B.** (2000). "Identification of the *Arabidopsis thaliana* Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene and Functional Expression of the Encoded P450 Enzyme." *Biological Chemistry* **381**: 749-753.
- Schulze-Lefert, P., Becker-Andre, M., Schulz, W., Hahlbrock, K. und Dangl, J. L.** (1989). "Functional Architecture of the Light-Responsive *Chalcone Synthase* Promoter from Parsley." *The Plant Cell* **1**: 707-714.
- Schwechheimer, C. und Bevan, M.** (1998). "The Regulation of Transcription Factor Activity in Plants." *Trends in Plant Science* **3**(10): 378-383.
- Schwechheimer, C. und Deng, X. W.** (2001). "COP9 Signalosome Revisited: A Novel Mediator of Protein Degradation." *Trends in Cell Biology* **11**(10): 420-426.
- Sewalt, V. J., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. und Dixon, R. A.** (1997). "Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of *L-Phenylalanine Ammonia-Lyase* or *Cinnamate 4-Hydroxylase*." *Plant Physiology* **115**(1): 41-50.
- Sharma, R.** (2001). "Phytochrome: A Serine Kinase Illuminates the Nucleus!" *Current Science* **80**(2): 178-188.
- Sheahan, J. J.** (1996). "Sinapate Esters Provide Greater UV-B Attenuation Than Flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)." *American Journal of Botany* **83**(6): 679-686.
- Sheahan, J. J. und Rechnitz, G. A.** (1992). "Flavonoid-Specific Staining of *Arabidopsis-thaliana*." *Biotechniques* **13**(6): 880-883.
- Sheahan, J. J. und Rechnitz, G. A.** (1993). "Differential Visualization of *Transparent Testa* Mutants in *Arabidopsis thaliana*." *Analytical Chemistry* **65**(7): 961-963.
- Shin, B., Choi, G., Yi, H., Yang, S., Insook, C., Lee, S., Paek, N.-C., Kim, J.-H., Song, P.-S. und Choi, G.** (2002). "*AtMYB21*, a Gene Encoding a Flower-Specific Transcription Factor, Is Regulated by COP1." *The Plant Journal* **30**(1): 23-32.
- Shirley, B. W.** (1996). "Flavonoid Biosynthesis: 'New' Functions for an 'Old' Pathway." *Trends in Plant Science* **1**(11): 377-382.
- Shirley, B. W.** (1998). "Flavonoids in Seeds and Grains: Physiological Function, Agronomic Importance and the Genetics of Biosynthesis." *Seed Science Research* **8**(4): 415-422.

- Shirley, B. W., Hanley, S. und Goodman, H. M.** (1992). "Effects of Ionizing Radiation on a Plant Genome: Analysis of Two *Arabidopsis Transparent Testa* Mutations." *The Plant Cell* **4**: 333-347.
- Shirley, B. W., Kubasek, W. L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F. M. und Goodman, H. M.** (1995). "Analysis of *Arabidopsis* Mutants Deficient in Flavonoid Biosynthesis." *The Plant Journal* **8**: 659-671.
- Sidorenko, L. V., Li, X., Cocciolone, S. M., Chopra, S., Tagliani, L., Bowen, B., Daniels, M. und Peterson, T.** (2000). "Komplex Structure of a Maize *MYB* Gene Promotor: Functional Analysis in Transgenic Plants." *The Plant Journal* **22**(6): 471-482.
- Slamon DJ, Boone TC, Murdock DC, Keith DE, Press MF, Larson RA, Souza LM.** (1986). "Studies of the human c-myc gene and its product in human acute leukemias." *Science* **233**(4761): 347-351.
- Smeekens, S.** (1998). "Sugar Regulation of Gene Expression in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 230-234.
- Smeekens, S. und Rook, F.** (1997). "Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal Transduction in Plants." *Plant Physiology* **115**: 7-13.
- Smith, A. R. H., Goad, L. J. und Goodwin, T. W.** (1972). "Incorporation of Stereospecifically Labelled Mevalonic Acid into Poriferasterol by *Ochromonas Malhamensis*." *Phytochemistry* **11**(9): 2775-2781.
- Smith, G. J. und Markham, K. R.** (1998). "Tautomerism of Flavonol Glucosides: Relevance to Plant UV Protection and Flower Colour." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **118**: 99-105.
- Smith, G. J., Thomson, S. J., Markham, K. R., Andary, C. und Cardon, D.** (2000). "The Photostabilities of Naturally Occurring 5-Hydroxyflavones, Flavonols, Their Glycosides and Their Aluminium Complexes." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **136**: 87-91.
- Solano, R., Fuertes, A., Sanchezpulido, L., Valencia, A. und Paz-Ares, J.** (1997). "A Single Residue Substitution Causes a Switch from the Dual DNA Binding Specificity of Plant Transcription Factor MYB.Ph3 to the Animal C-MYB Specificity." *Journal of Biological Chemistry* **272**(5): 2889-2895.
- Solano, R., Nieto, C. und Paz-Ares, J.** (1995). "MYB.Ph3 Transcription Factor from *Petunia hybrida* Induces Similar DNA-Bending/Distortions on Its Two Types of Binding Site." *The Plant Journal* **8**: 673-682.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I. und Paz-Ares, J.** (1995a). "Dual DNA Binding Specificity of a Petal Epidermis-Specific MYB Transcription Factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*." *The EMBO Journal* **14**: 1773-1784.
- Somerville, C. und Somerville, S.** (1999). "Plant Functional Genomics." *Science* **285**(5426): 380-383.

- Song, P.-S.** (1999). "Inter-Domain Signal Transmission within the Phytochromes." *Journal of Biochemistry & Molecular Biology* **32**(3): 215-225.
- Spalding, E. P.** (2000). "Ion Channels and the Transduction of Light Signals." *Plant, Cell and Environment* **23**: 665-674.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G. und Tonelli, C.** (1994). "Cloning and Molecular Analysis of Structural Genes Involved in Flavonoid and Stilbene Biosynthesis in Grape (*Vitis-Vinifera L.*)" *Plant Molecular Biology* **24**(N5): 743-755.
- Sprenger, M.** (1993). Funktionsanalyse von DNA Bindenden Proteinen durch Kotransfektionsexperimente in Pflanzlichen Protoplasten. Köln, Universität zu Köln.
- Sprenger, M.** (1997). Transkriptionsregulierende Eigenschaften DNA-Bindender Faktoren des Chalkonsynthasepromotors Aus *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana*. Mat.-Nat. Fak. Köln, Germany, Universität zu Köln.
- Sprenger-Haussels, M. und Weisshaar, B.** (2000). "Transactivation Properties of Parsley Proline Rich bZIP Transcription Factors." *The Plant Journal* **22**(1): 1-8.
- Stacey, M. G., Hicks, S. N. und von Arnim, A. G.** (1999). "Discrete Domains Mediate the Light-Responsive Nuclear and Cytoplasmic Localization of Arabidopsis COP1." *The Plant Cell* **11**(3): 349-364.
- Stafford, H. A.** (1974). "Possible Multi-Enzyme Complexes Regulating the Formation of C6-C3 Phenolic Compounds and Lignins in Higher Plants." *Recent Advances in Phytochemistry* **8**: 53-79.
- Stapleton, A. E. und Walbot, V.** (1994). "Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage." *Plant Physiology* **105**: 881-889.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. und Jürgens, G.** (1999). "Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF." *Science* **286**(5438): 316-318.
- Steward, A. J., Chapman, W., Jenkins, G. I., Graham, I., Martin, T. und Crozier, A.** (2001). "The Effect of Nitrogen and Phosphorus Deficiency on Flavonol Accumulation in Plant Tissues." *Plant, Cell and Environment* **24**(1189-1197).
- Stober-Grässer, U., Brydolf, B., Bin, X., Grässer, F., Firtel, R. A. und Lipsick, J. S.** (1992). "The MYB DNA-Binding Domain Is Highly Conserved in Dictyostelium Discoideum." *Oncogene* **7**: 589-596.
- Stracke, R., Werber, M. und Weisshaar, B.** (2001). "The *R2R3-MYB* Gene Family in *Arabidopsis thaliana*." *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 447-456.
- Styles, E. D. und Ceska, O.** (1977). "The genetic control of flavonoid synthesis in maize." *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 289-302.

- Sugimoto, K., Takeda, S. und Hirochika, H.** (2000). "MYB-Related Transcription Factor *NtMYB2* Induced by Wounding and Elicitors Is a Regulator of the Tobacco Retrotransposon *Tto1* and Defense-Related Genes." *The Plant Cell* **12**(12): 2511-2527.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. und Bennett, M.** (2002). "Auxin Cross-Talk: Integration of Signalling Pathways to Control Plant Development." *Plant Mol Biol* **49**: 411-426.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F. A., Roberts, K. und Martin, C.** (1998a). "The *AmMYB308* and *AmMYB330* Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco." *The Plant Cell* **10**: 135-154.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C.-F., Lynn, D., Dow, J. M. und Martin, C.** (1998). "Inhibition of Phenolic Acid Metabolism Results in Precocious Cell Death and Altered Cell Morphology in Leaves of Transgenic Tobacco Plants." *The Plant Cell* **10**: 1801-1816.
- Tanikawa, J.; Yasukawa, T.; Enari, M.; Ogata, K.; Nishimura, Y.; Ishii, S. und Sarai, A.** (1993). „ Recognition of a specific DNA sequence by the *c-myb* proto-oncogene product: role of three repeat units in the DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9320-9324.
- Tansey, W. P.** (2001). "Transcriptional Activation: Risky Business." *Genes & Development* **15**(9): 1045-1050.
- Taylor, L. P. und Briggs, W. R.** (1990). "Genetic Regulation and Photocontrol of Anthocyanin Accumulation in Maize Seedlings." *The Plant Cell* **2**: 115-127.
- Taylor, L. P. und Jorgensen, R.** (1992). "Conditional Male Fertility in Chalcone Synthase-Deficient Petunia." *Journal of Heredity* **83**(N1): 11-17.
- Terzaghi, W. B. und Cashmore, A. R.** (1995). "Photomorphogenesis: Seeing the Light in Plant Development." *Current Biology* **5**(5): 466-468.
- Terzaghi, W. B. und Cashmore, A. R.** (1995a). "Light-Regulated Transcription." *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 445-474.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**(6814): 796-815.
- Thompson, M. A. und Ramsay, R. G.** (1995). "Myb: An Old Oncoprotein with New Roles." *Bioessays* **17**(4): 341-350.
- Thornycroft, D., Sherson, S. M. und Smith, S. M.** (2001). "Using Gene Knockouts to Investigate Plant Metabolism." *Journal of Experimental Botany* **52**(361): 1593-1601.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G. R. und Arndt, K. T.** (1989). "BAS1 Has a MYB Motif and Activates *HIS4* Transcription Only in Combination with *BAS2*." *Science* **246**: 931-935.

- Tonelli, C., Consonni, G., Dolfini, S. F., Dellaporta, S. L., Viotti, A. und Gavazzi, G.** (1991). "Genetic and Molecular Analysis of *Sn*, a Light-Inducible, Tissue Specific Regulatory Gene in Maize." *Molecular General Genetics* **225**: 401-410.
- Torii, K., McNellis, T. und Deng, X.** (1998). "Functional Dissection of Arabidopsis COP1 Reveals Specific Roles of Its Three Structural Modules in Light Control of Seedling Development." *The EMBO Journal* **17**(19): 5577-5587.
- Trezzini, G. F., Horrichs, A. und Somssich, I. E.** (1993). "Isolation of Putative Defense-Related Genes from *Arabidopsis thaliana* and Expression in Fungal Elicitor-Treated Cells." *Plant Molecular Biology* **21**: 385-389.
- Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M. und Komeda, Y.** (1991). "Sugar-Dependent Expression of the *CHS-A* Gene for *Chalcone Synthase* from Petunia in Transgenic *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* **97**: 1414-1421.
- Tuerck, J. A. und Fromm, M. E.** (1994). "Elements of the Maize *Al* Promoter Required for Transactivation by the Anthocyanin *B/C1* or Phlobaphene *P* Regulatory Genes." *The Plant Cell* **6**: 1655-1663.
- Uhlmann, A. und Ebel, J.** (1993). "Molecular Cloning and Expression of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase, an Enzyme Involved in the resistance Response of Soybean (*Glycine max L.*) against Pathogen Attack." *Plant Physiol.* **102**: 1147-1156.
- Uimari, A. und Strommer, J.** (1997). "MYB26: A MYB-Like Protein of Pea Flowers with an Affinity for Promoters of Phenylpropanoid Genes." *The Plant Journal* **12**(6): 1273-1284.
- Ulmasov, T., Hagen, G. und Guilfoyle, T. J.** (1999). "Activation and Repression of Transcription by Auxin-Response Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(10): 5844-5849.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. und Shinozaki, K.** (1993). "An *Arabidopsis* MYB Homolog Is Induced by Dehydration Stress and Its Gene Product Binds to the Conserved MYB Recognition Sequence." *The Plant Cell* **5**: 1529-1539.
- van der Meer, I. M., Stam, M. E., van Tunen, A. J., Mol, J. N. M. und Stuitje, A. R.** (1992). "Antisense Inhibition of Flavonoid Biosynthesis in Petunia Anthers Results in Male Sterility." *The Plant Cell* **4**: 253-262.
- van der Meer, I. M., Stam, M. E., van Tunen, A. J., Mol, J. N. M. und Stuitje, A. R.** (1992). "Antisense Inhibition of Flavonoid Biosynthesis in Petunia Anthers Results in Male Sterility." *The Plant Cell* **4**: 253-262.
- van Houwelingen, A., Souer, E., Spelt, K., Kloos, D., Mol, J. und Koes, R.** (1998). "Analysis of Flower Pigmentation Mutants Generated by Random Transposon Mutagenesis in *Petunia hybrida*." *The Plant Journal* **13**(1): 39-50.
- Veit, M. und Pauli, G.** (1999). "Major Flavonoids from *Arabidopsis thaliana* Leaves." *Journal of Natural Products* **62**(9): 1301-1303.

- von Arnim, A. G. und Deng, X.-W.** (1994). "Light Inactivation of *Arabidopsis* Photomorphogenic Repressor COP1 Involves a Cell-Specific Regulation of Its Nucleocytoplasmic Partitioning." *Cell* **79**: 1035-1045.
- von Schaewen, A., Sitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U. und Willmitzer, L.** (1990). "Expression of a Yeast-Derived Invertase in the Cell Wall of Tobacco and *Arabidopsis* Plants Leads to Accumulation of Carbohydrate and Inhibition of Photosynthesis and Strongly Influences Growth and Phenotype of Transgenic Tobacco Plants." *Embo J* **9**: 3033-3044.
- Vu, H. L., Troubetzkoy, S., Nguyen, H. H., Russell, M. W. und Mestecky, J.** (2000). "A Method for Quantification of Absolute Amounts of Nucleic Acids by (RT)-PCR and a New Mathematical Model for Data Analysis." *Nucleic Acids Res* **28**(7).
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y. und Okada, K.** (1997). "Epidermal Cell Differentiation in *Arabidopsis* Determined by a MYB Homolog, CPC." *Science* **277**: 1113-1116.
- Wade, H. K., Bibikova, T. N., Valentine, W. J. und Jenkins, G. I.** (2001). "Interactions within a Network of Phytochrome, Cryptochrome and UV-B Phototransduction Pathways Regulate *Chalcone Synthase* Gene Expression in *Arabidopsis* Leaf Tissue." *The Plant Journal* **25**(6): 675-685.
- Waites, R., Selvadurai, H. R. N., Oliver, I. R. und Hudson, A.** (1998). "The *PHANTASTICA* Gene Encodes a MYB Transcription Factor Involved in Growth and Dorsoventrality of Lateral Organs in *Antirrhinum*." *Cell* **93**: 779-789.
- Walker, A. R., Davison, P. A., Bolognesi-Winfield, A. C., James, C. M., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Esch, J. J., Marks, M. D. und Gray, J. C.** (1999). "The *Transparent Testa Glabra1* Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis*, Encodes a WD40 Repeat Protein." *The Plant Cell* **11**: 1337-1350.
- Wang, H., Ma, J.-M., Zhao, H.-Y. und Deng, X. W.** (2001). "Direct Interaction of *Arabidopsis* Cryptochromes with COP1 in Light Control of Development." *Science* **294**: 154-158.
- Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S. und Tobin, E. M.** (1997). "A MYB-Related Transcription Factor Is Involved in the Phytochrome Regulation of an *Arabidopsis* LHCb Gene." *The Plant Cell* **9**(4): 491-507.
- Wanner, L. A., Li, G., Ware, D., Somssich, I. E. und Davis, K. R.** (1995). "The *Phenylalanine Ammonia-Lyase* Gene Family in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Molecular Biology* **27**: 327-338.
- Watson, R. J.; Robinson, C.; Lam, E.** (1993). "Transcription regulation by murine B-myb is distinct from that by cmyb." *Nucleic Acids Res.* **21**: 267-272.
- Wei, N. und Deng, X. W.** (1996). "The Role of the *COP/DET/FUS* Genes in Light Control of *Arabidopsis* Seedling Development." *Plant Physiology* **112**: 871-878.
- Wei, N. und Deng, X. W.** (1999). "Making Sense of the COP9 Signalosome." *Trends in Genetics* **15**: 98-103.

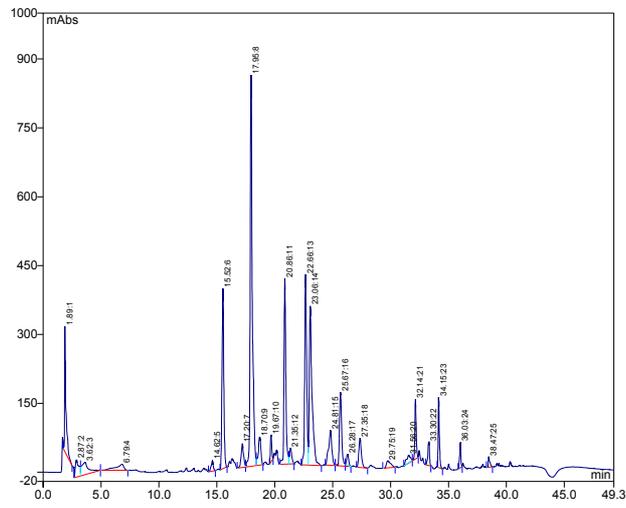
- Wei, N., Kwok, S. F., von Arnim, A. G., Lee, A., McNellis, T. W., Piekos, B. und Deng, X.-W.** (1994). "Arabidopsis *COP8*, *COP10*, and *COP11* Genes Are Involved in Repression of Photomorphogenic Development in Darkness." *The Plant Cell* **6**(5): 629-643.
- Weisshaar, B. und Jenkins, G. I.** (1998). "Phenylpropanoid Biosynthesis and Its Regulation." *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 251-257.
- Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., da Costa e Silva, O. und Hahlbrock, K.** (1991). "Light-Inducible and Constitutively Expressed DNA-Binding Proteins Recognizing a Plant Promoter Element with Functional Relevance in Light Responsiveness." *The EMBO Journal* **10**(7): 1777-1786.
- Weisshaar, B., Block, A., Armstrong, G. A., Herrmann, A., Schulze-Lefert, P. und Hahlbrock, K.** (1991). Regulatory Elements Required for Light-Mediated Expression of the *Petroselinum crispum* Chalcone Synthase Gene. *Molecular Biology of Plant Development*. Jenkins, G. I. and Schuch, W. Cambridge, UK, The Company of Biologists Limited. XLV: 191-210.
- Weisshaar, B., Feldbrügge, M., Armstrong, G. A., Yazaki, K. und Hahlbrock, K.** (1992). Elements Involved in Light Regulation of the Parsley *CHS* Promoter: *Cis*-Acting Nucleotide Sequences and *Trans*-Acting Factors. *Groupe Polyphenols, the 20th Anniversary*. Scalbert, A. Paris, Groupe Polyphenols: 281-289.
- Weston, K.** (1998). "Myb proteins in life, death and differentiation." *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 76-81.
- Whitelam, G. C. und Devlin, P. F.** (1998). "Light Signalling in *Arabidopsis*." *Plant Physiol. Biochem.* **36**(1-2): 125-133.
- Williams, C. E. und Grotewold, E.** (1997). "Differences between Plant and Animal MYB Domains Are Fundamental for DNA Binding Activity, and Chimeric MYB Domains Have Novel DNA Binding Specificities." *Journal of Biological Chemistry* **272**(1): 563-571.
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I. und Williams, P. M.** (1999). "Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro." *Analytical Biochemistry* **270**(1): 41-49.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). "Evidence for Enzyme Complexes in the Phenylpropanoid and Flavonoid Pathways." *Physiologia Plantarum* **107**: 142-149.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology." *Plant Physiology* **126**: 485-493.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H. und Weisshaar, B.** (1998). "Knock-out Mutants from an En-1 Mutagenized *Arabidopsis thaliana* Population Generate New Phenylpropanoid Biosynthesis Phenotypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(21): 12432-12437.

- Wissenbach, M.; Überlacker, B.; Vogt, F.; Becker, D.; Salamini, F. und Rohde, W.** (1993) "MYB Genes from *Hordeum vulgare*: tissue-specific expression of chimeric MYB promotor/GUS genes in transgenic tobacco." *Tue Plant Journal* **4**(3): 411-422.
- Wood, K. V.** (1991). "The Origin of Beetle Luciferases." *Bioluminescence and Chemiluminescence: current status*. Stanley P., Kricka L., Wiley J. and sons (eds.), Chichester 1.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W.** (1989). "Quantitative Evaluation of *Escherichia Coli* Host Strains for Tolerance to Cytosine Methylation in Plasmid and Phage Recombinants." *Nucleic Acids Research* **17**: 3469-3478.
- Wu, S.-C. und Hahlbrock, K.** (1992). "In Situ Localization of Phenylpropanoid-Related Gene Expression in Different Tissues of Light- and Dark-Grown Parsley Seedlings." *A Journal of Biosciences / Zeitung für Naturforschung C* **47c**: 591-600.
- Yamamoto, Y. Y., Matsui, M., Ang, L.-H. und Deng, X.-W.** (1998). "Role of a COP1 Interactive Protein in Mediating Light-Regulated Gene Expression in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **10**: 1083-1094.
- Yang, H.-Q., Tang, R.-H. und Cashmore, A. R.** (2001). "The Signalling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1." *The Plant Cell* **13**: 2573-2587.
- Yeh, K.-C. und Lagarias, J. C.** (1998). "Eukaryotic Phytochromes: Light-Regulated Serine/Threonine Protein Kinases with Histidine Kinase Ancestry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13976-13981.
- Ying, G.-G., Proost, P., van Damme, J., Bruschi, M. und Introna, M.** (2000). "NUCLEOLIN, a Novel Partner for the MYB Transcription Factor Family That Regulates Their Activity." *The Journal of Biological Chemistry* **275**(6): 4152-4158.
- Ylstra, B., Muskens, M. und Van Tunen, A. J.** (1996). "Flavonols Are Not Essential for Fertilization in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Molecular Biology* **32**(6): 1155-1158.
- Yu, E. Y., Kim, S. E., Kim, J. H., Ko, J. H., Cho, M. H. und Chung, I. K.** (2000). "Sequence-Specific DNA Recognition by the Myb-Like Domain of Plant Telomeric Protein Rtbp1." *Journal of Biological Chemistry* **275**(31): 24208-14.
- Zhang, P. F., Chopra, S. und Peterson, T.** (2000). "A Segmental Gene Duplication Generated Differentially Expressed MYB-Homologous Genes in Maize." *The Plant Cell* **12**(12): 2311-2322.
- Zhong, H. und Simons, J. W.** (1999). "Direct Comparison of GAPDH, Beta-Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**: 523-529.
- Zhou, D. X., Kim, Y. J., Li, Y., F., Carol, P. und Mache, R.** (1998). "COP1b, an Isoform of COP1 Generated by Alternative Splicing, Has a Negative Effect on COP1 Function in Regulating Light-Dependent Seedling Development in *Arabidopsis*." *Mol Gen Genet* **257**: 387-391.

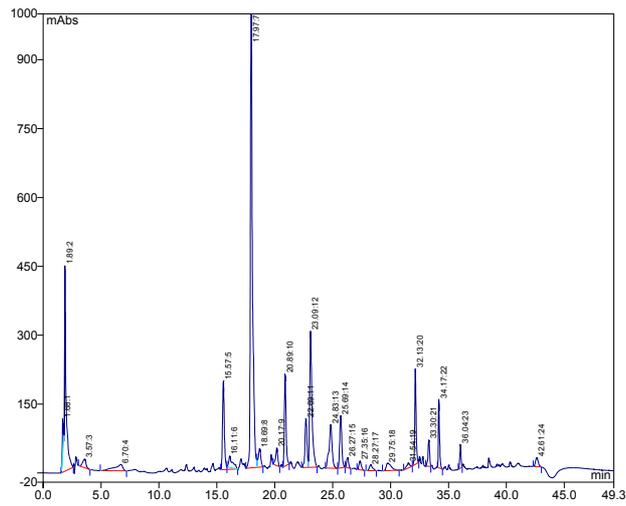
Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T. L. und Sheen, J. (1998). "Glucose and Ethylene Signal Transduction Cross-Talk Revealed by an *Arabidopsis* Glucose-Insensitive Mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10294-10299.

HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 2

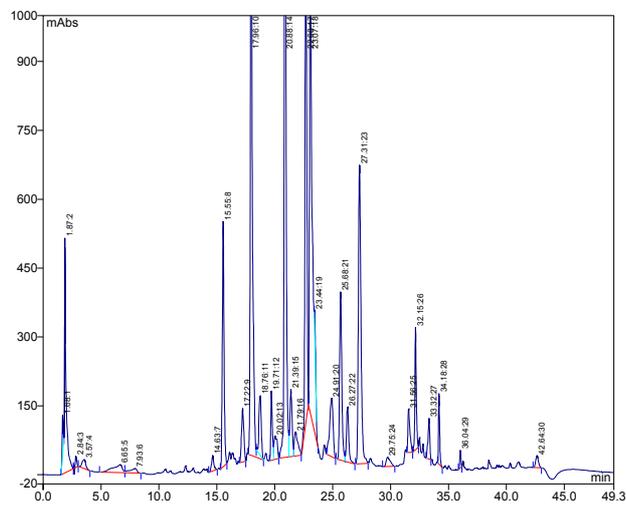
wt 2d Replik 1



ko 2d Replik 1

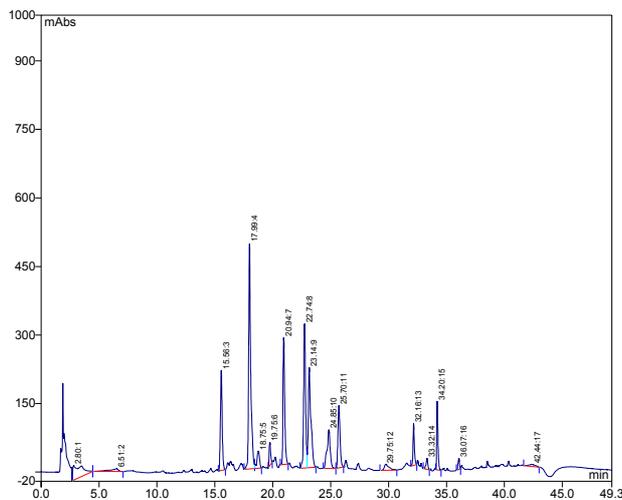


Ox 2d Replik 1

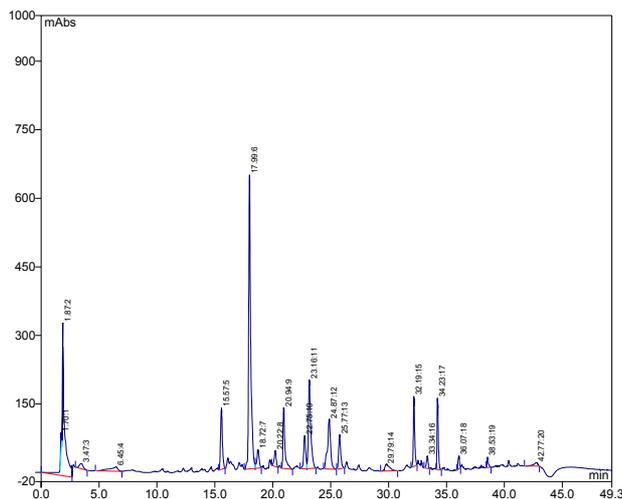


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 3

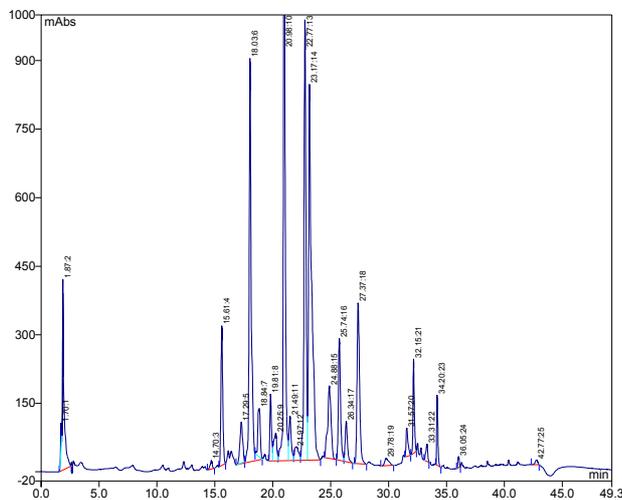
wt 3d Replik 1



ko 3d Replik 1

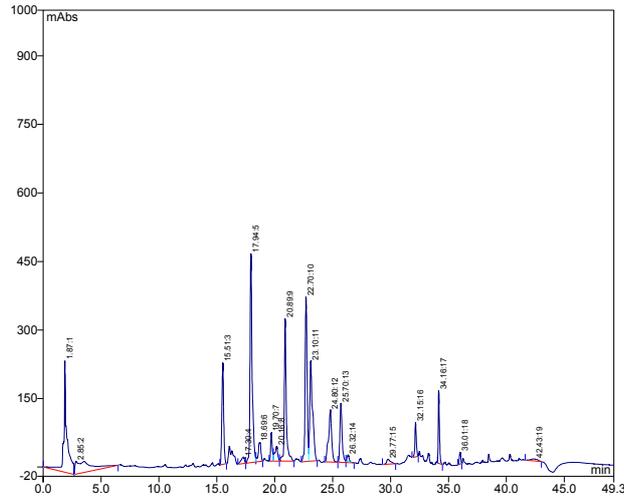


Ox 3d Replik 1

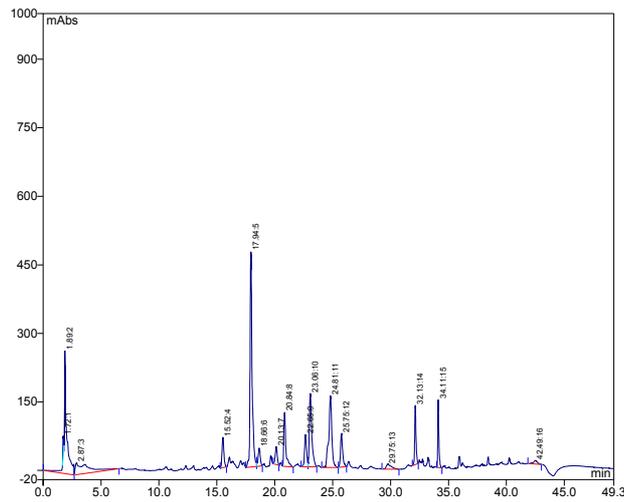


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 4

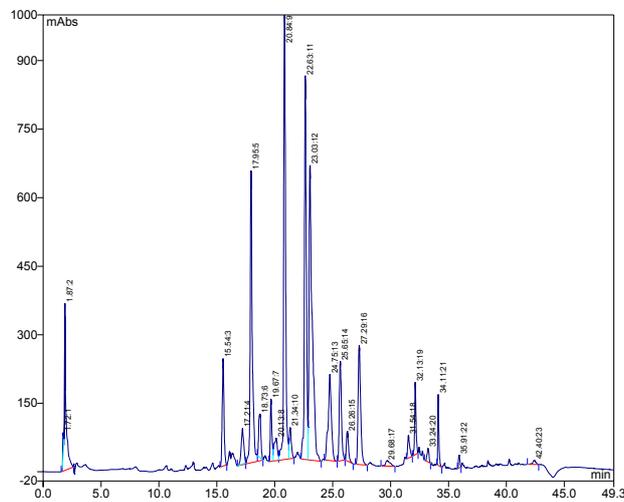
wt 4d Replik 1



ko 4d Replik 1

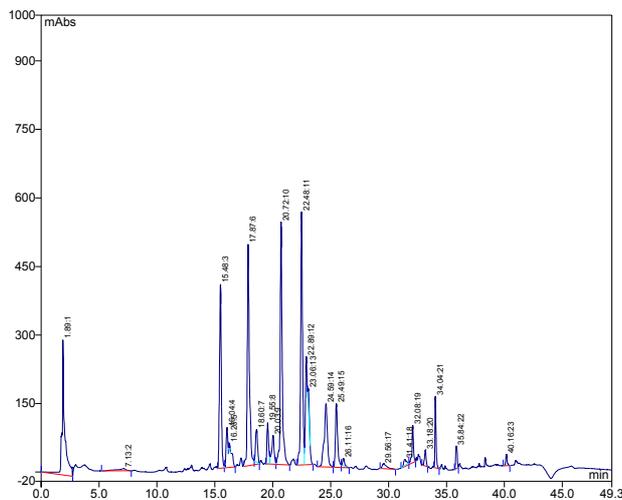


Ox 4d Replik 1

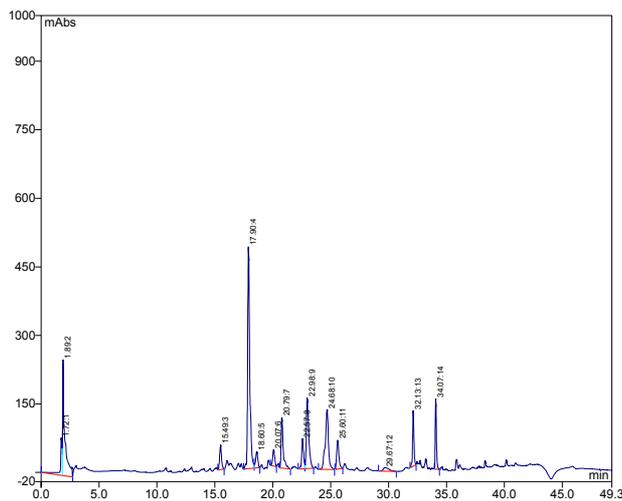


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 5

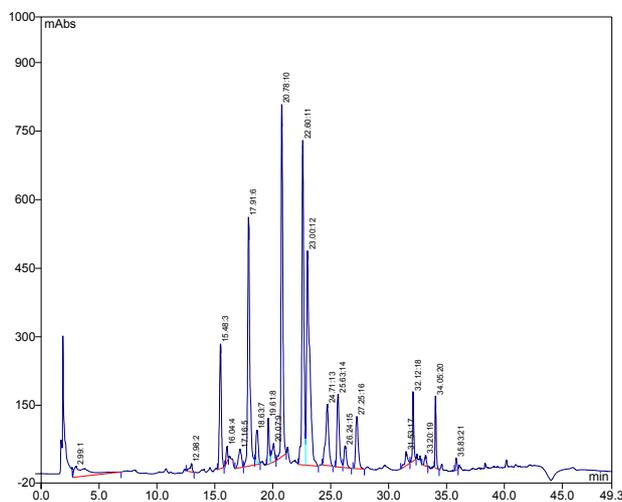
wt 5d Replik 1



ko 5d Replik 1

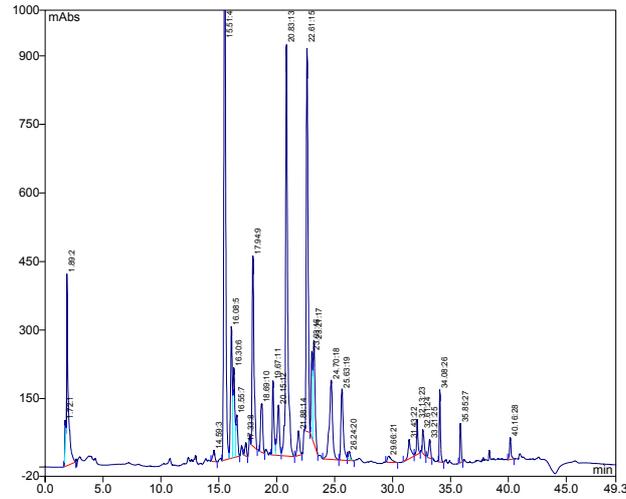


Ox 5d Replik 1

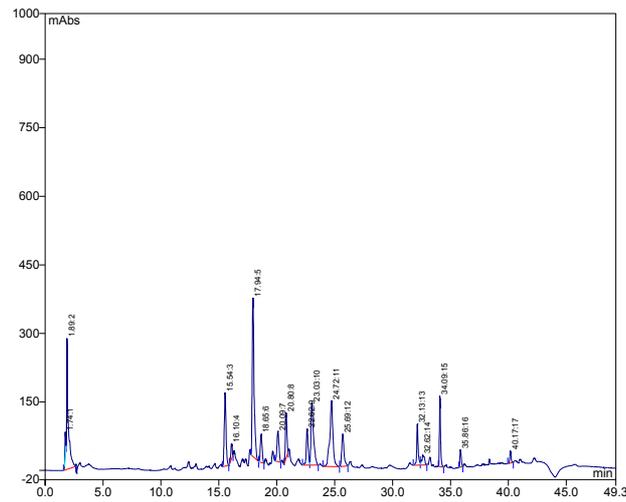


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 6

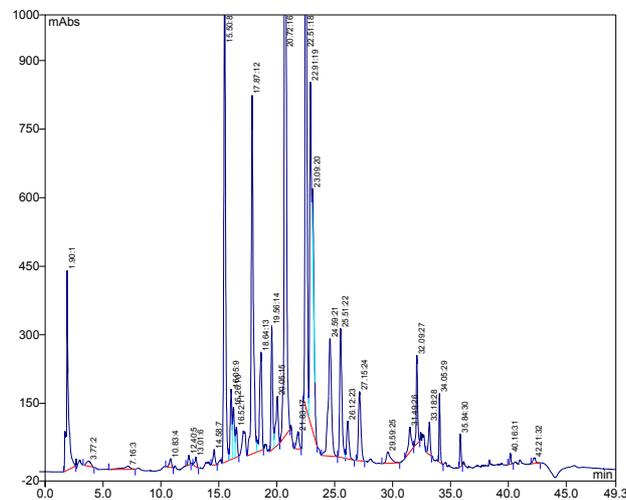
wt 6d Replik 1



ko 6d Replik 1

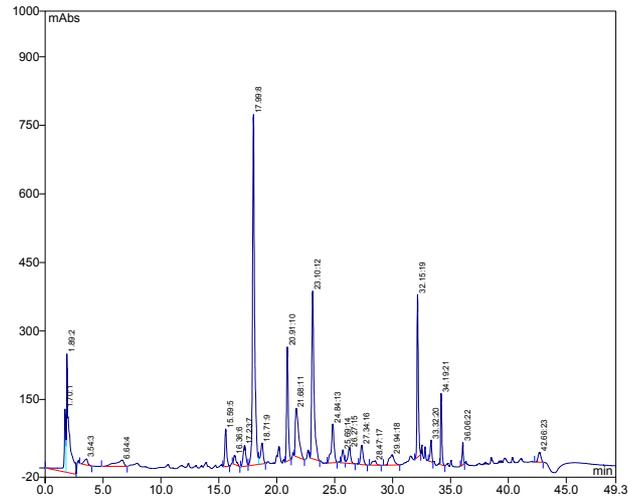


Ox 6d Replik 1

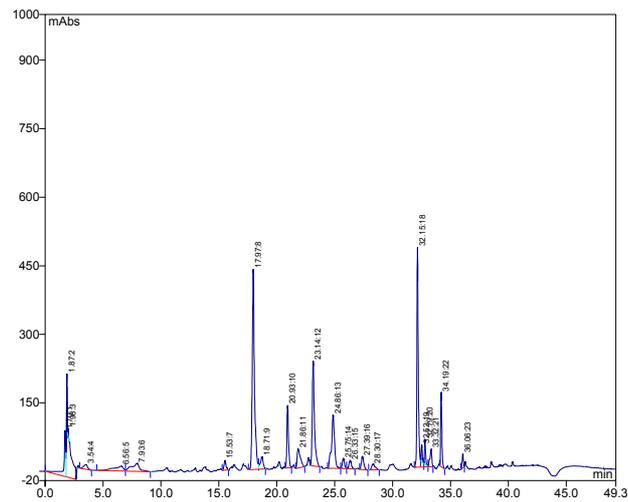


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 2

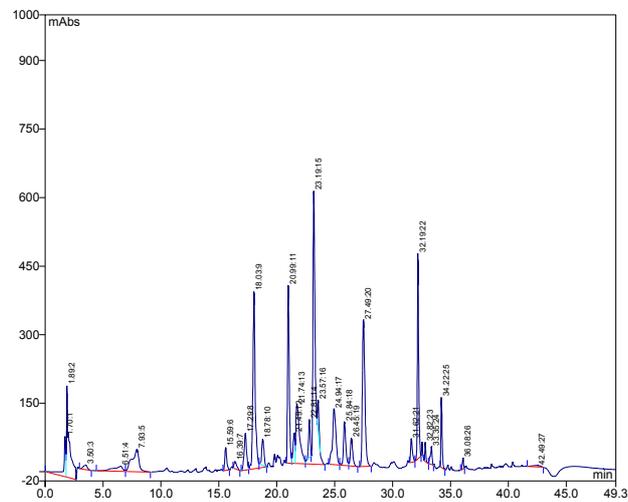
wt et 2d Replik 1



ko et Replik 1

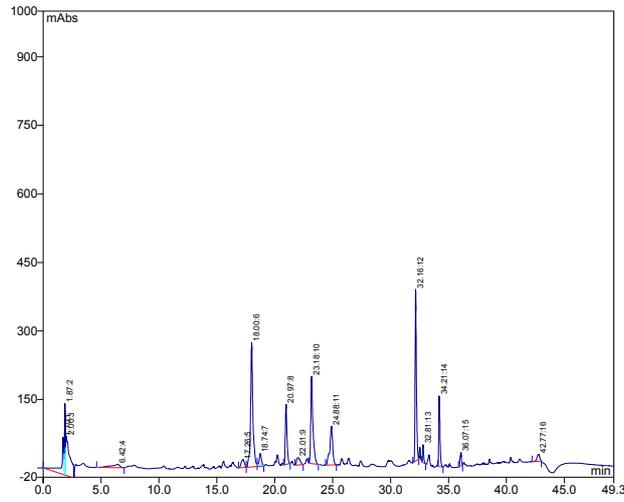


Ox et 2d Replik 1

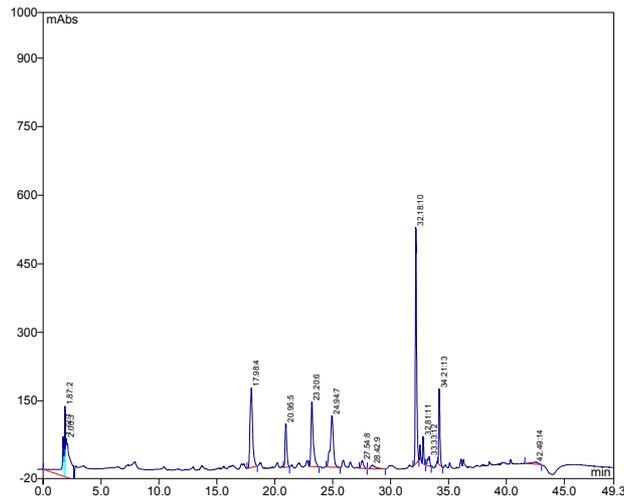


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 3

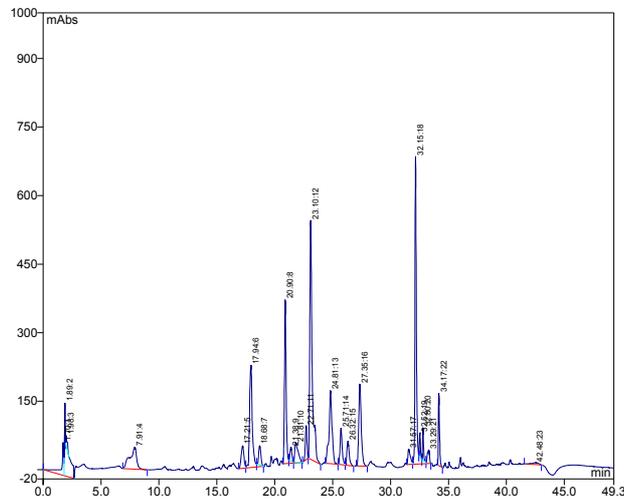
wt et 3d Replik 1



ko et 3d Replik 1

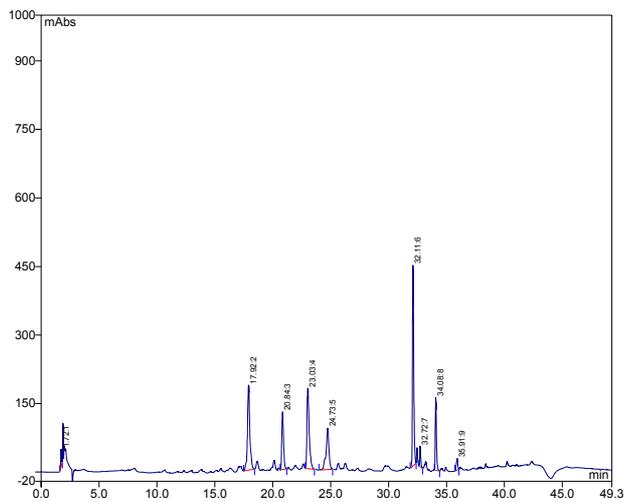


Ox et 3d Replik 1

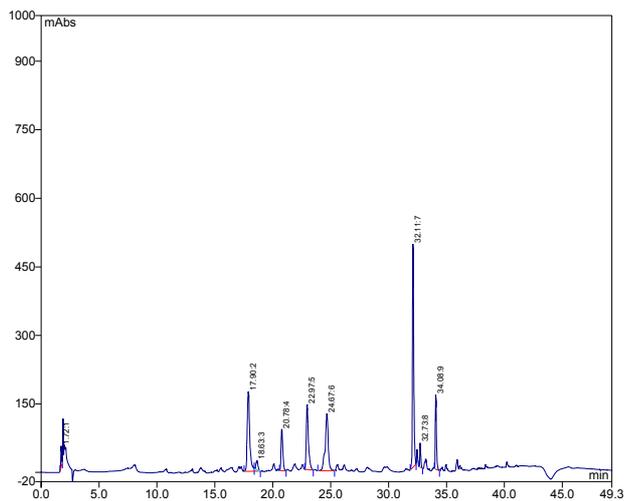


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 4

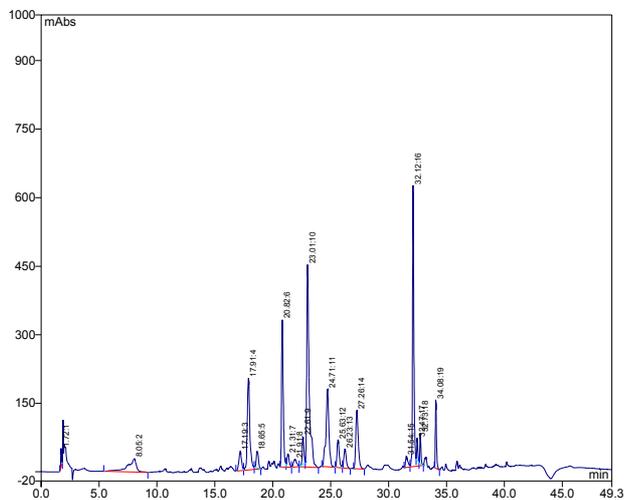
wt et 4d Replik 1



ko et 4d Replik 1

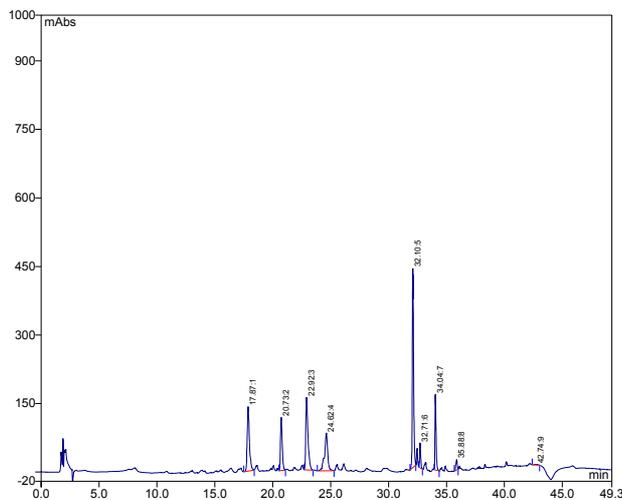


Ox et 4d Replik 1

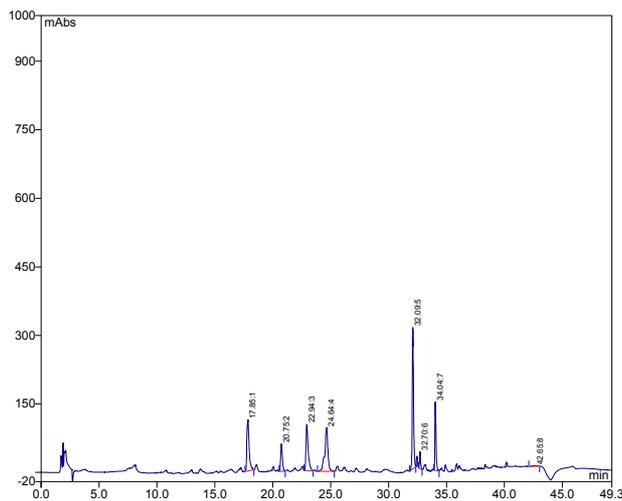


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 5

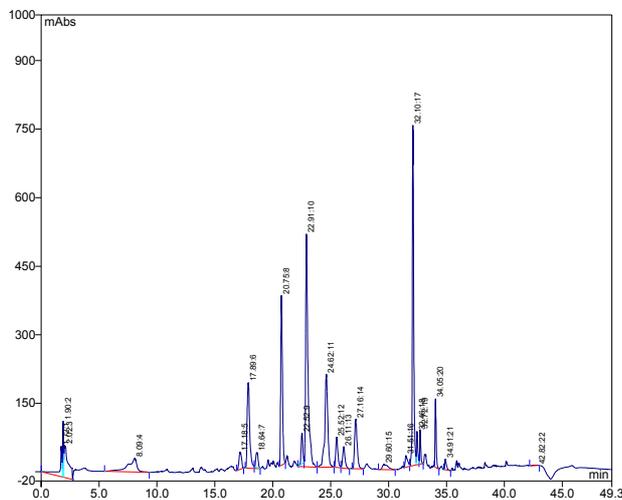
wt et 5d Replik 1



ko et 5d Replik 1

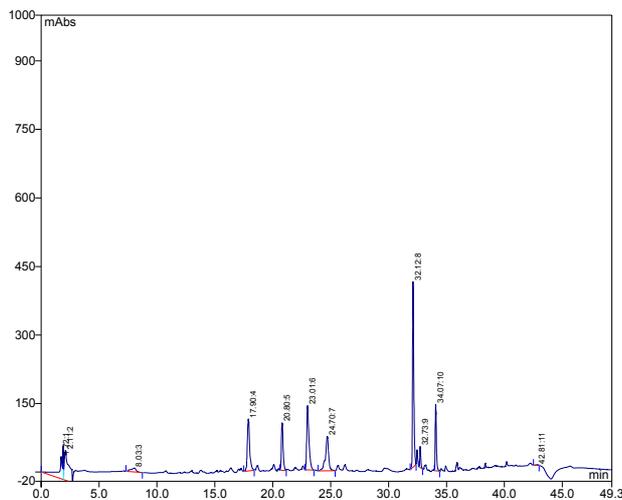


Ox et 5d Replik 1

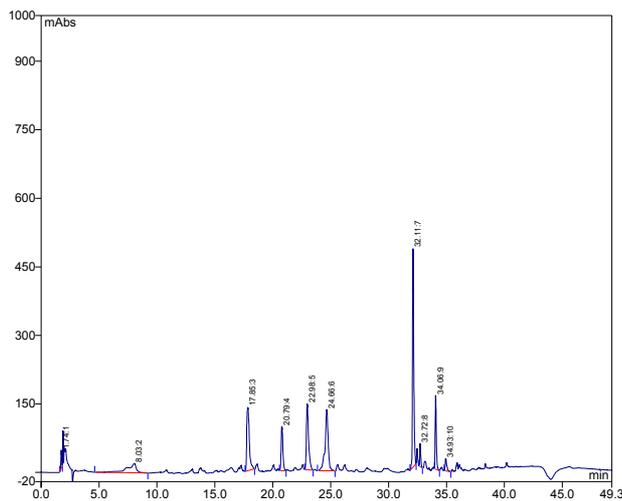


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 6

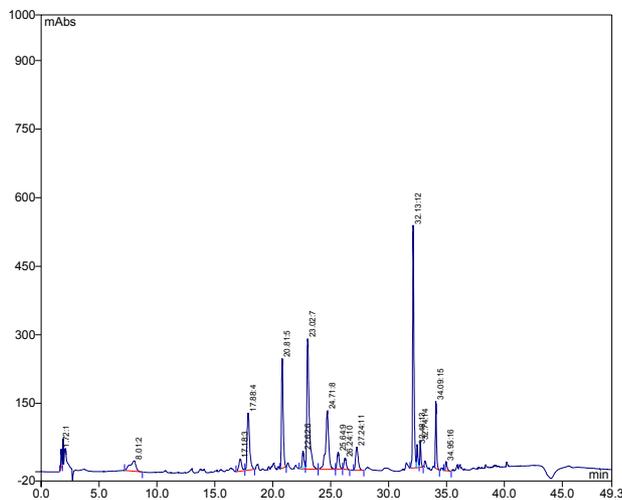
wt et 6d Replik 1



ko et 6d Replik 1

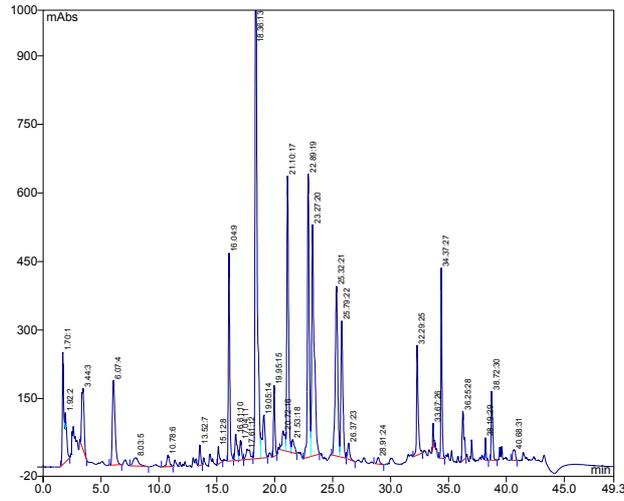


Ox et 6d Replik 1

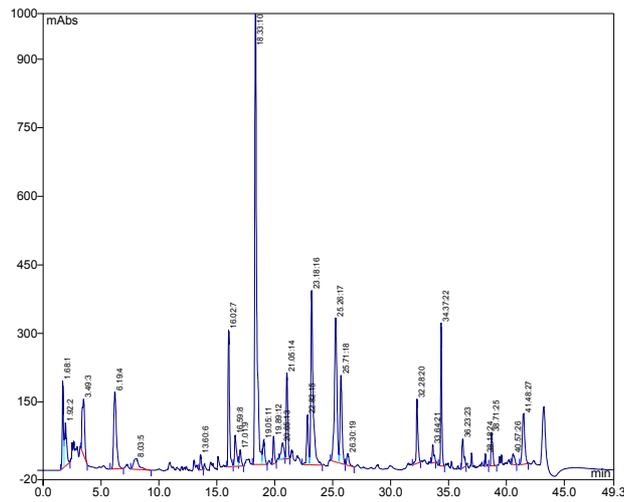


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 2

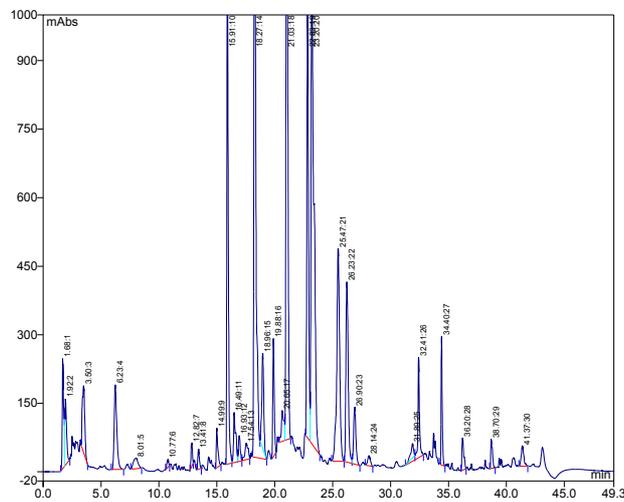
wt 2d Replik 2



ko 2d Replik 2

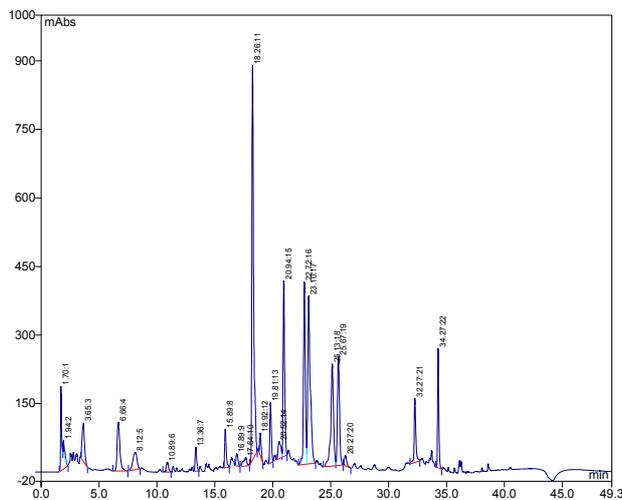


Ox 2d Replik 2

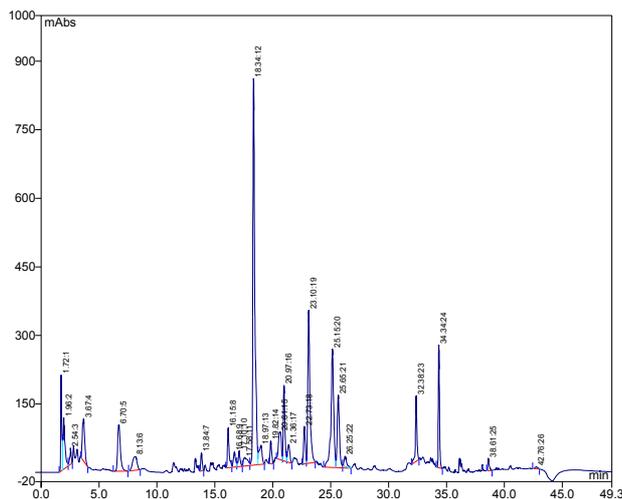


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 3

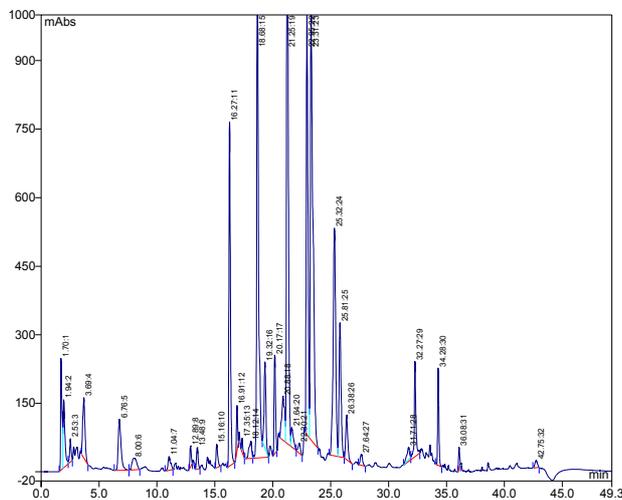
wt 3d Replik 2



ko 3d Replik 2

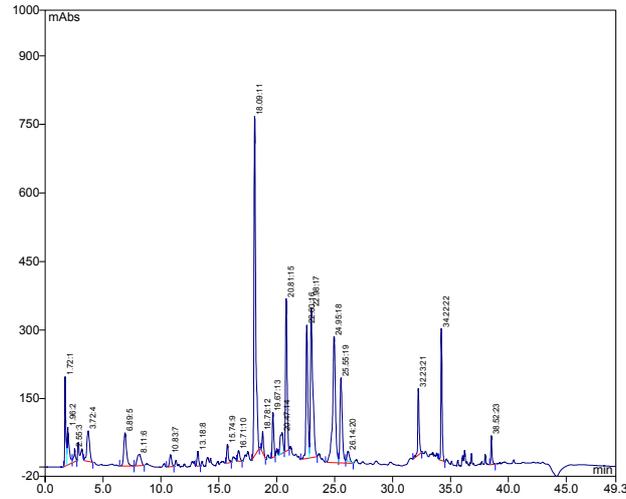


Ox 3d Replik 2

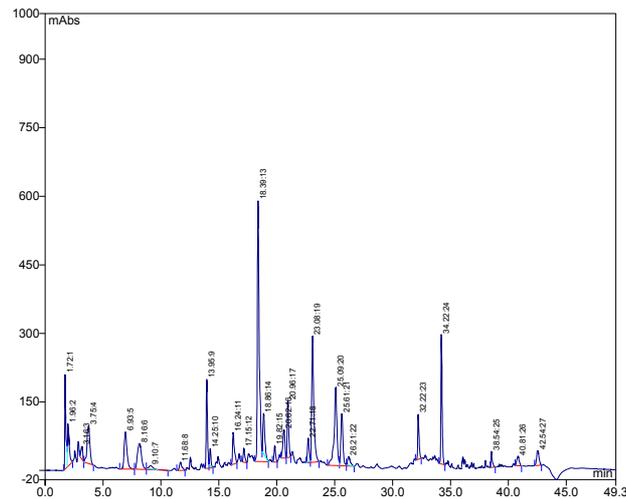


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 4

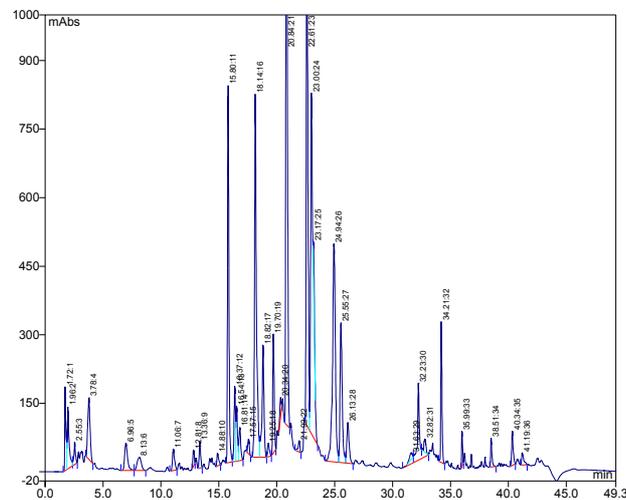
wt 4d Replik 2



ko 4d Replik 2

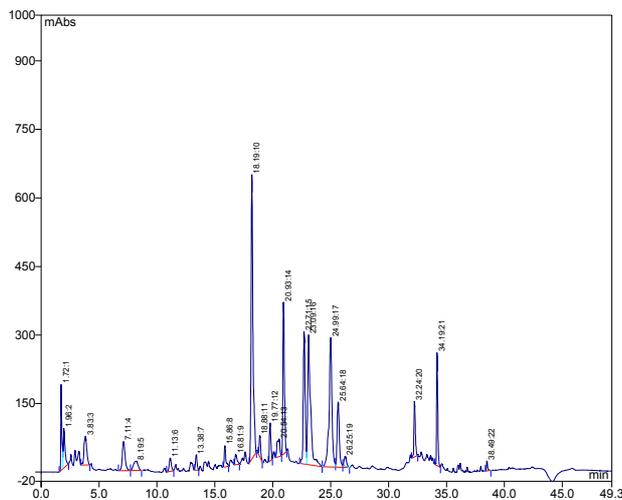


Ox 4d Replik 2

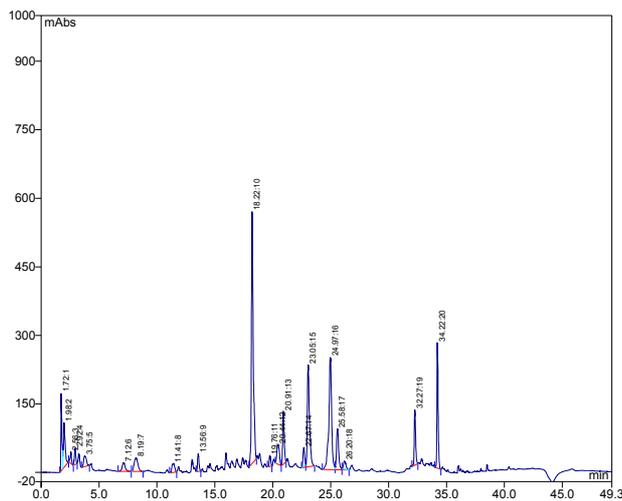


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 5

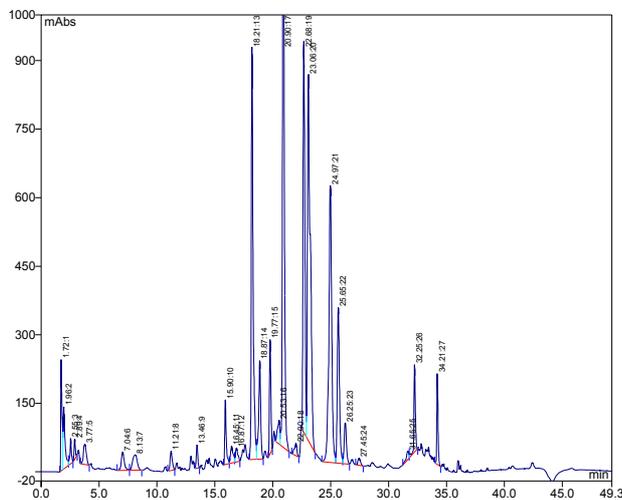
wt 5d Replik 2



ko 5d Replik 2

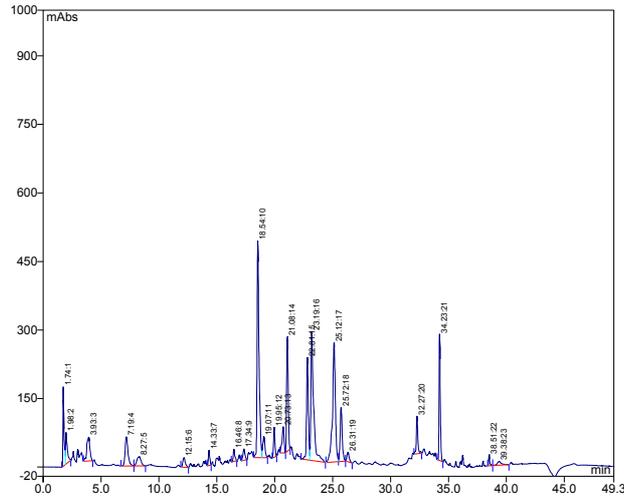


Ox 5d Replik 2

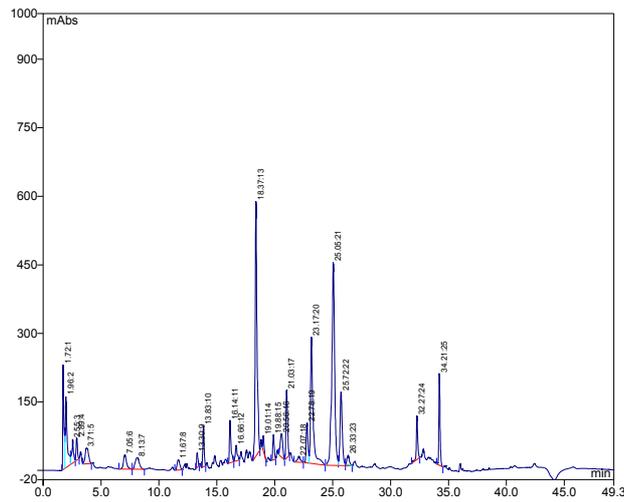


HPLC-Analyse belichteter Keimlinge, Tag 6

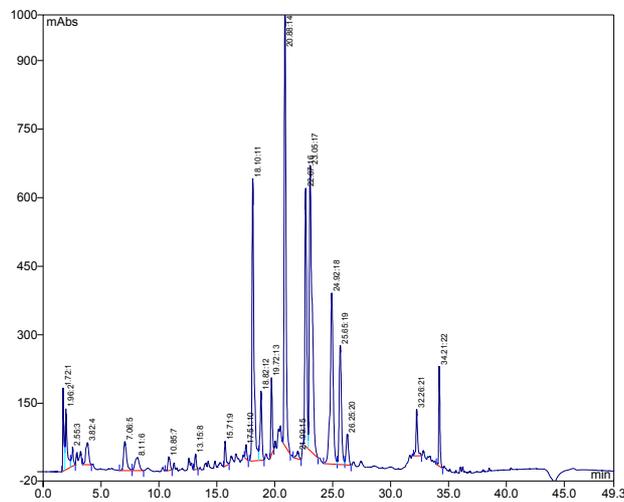
wt 6d Replik 2



ko 6d Replik 2

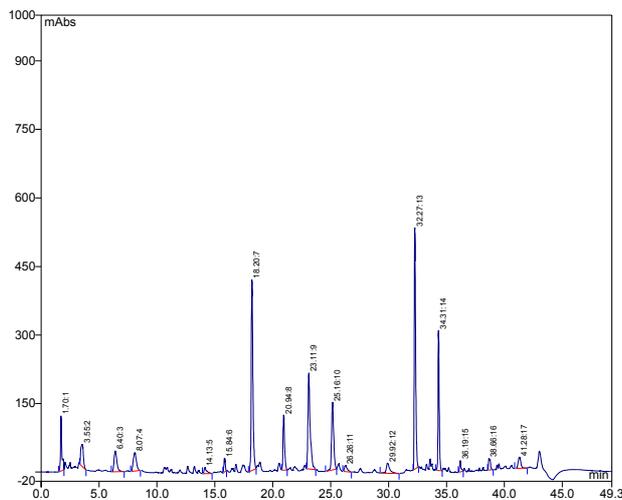


Ox 6d Replik 2

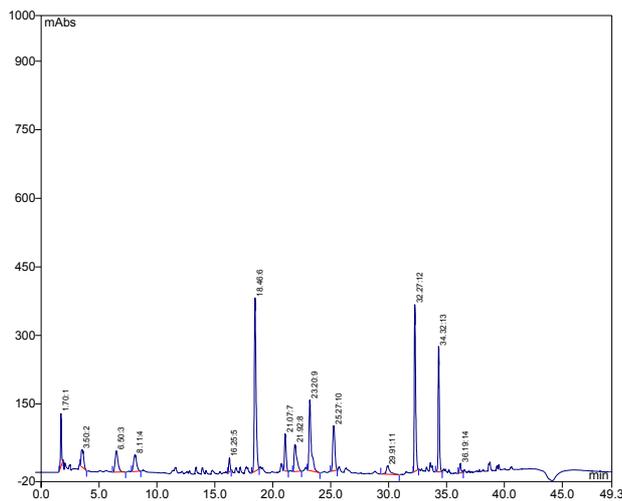


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 2

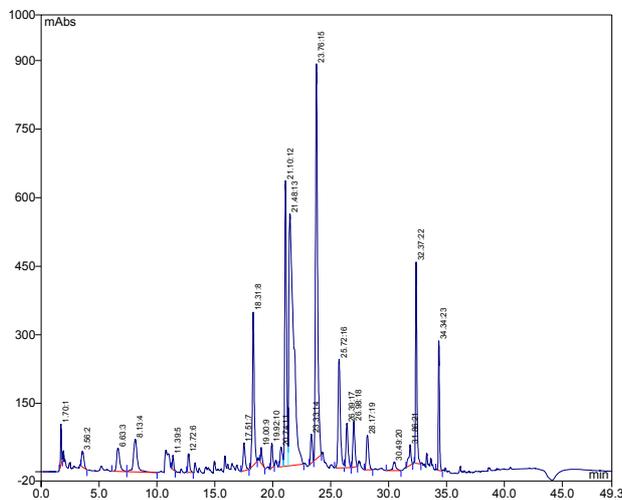
wt et 2d Replik 2



ko et 2d Replik 2

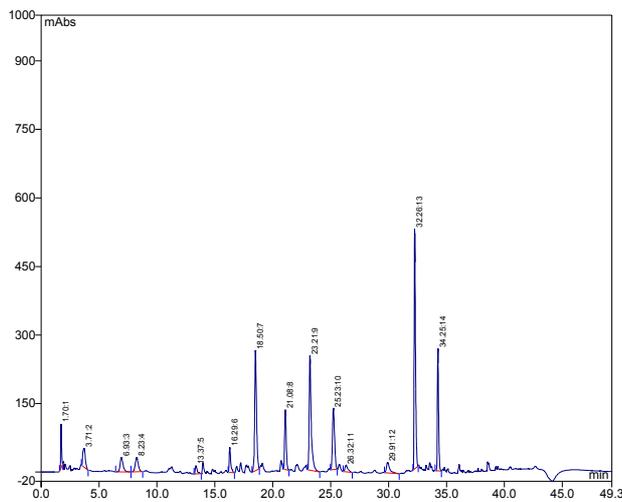


Ox et 2d Replik 2

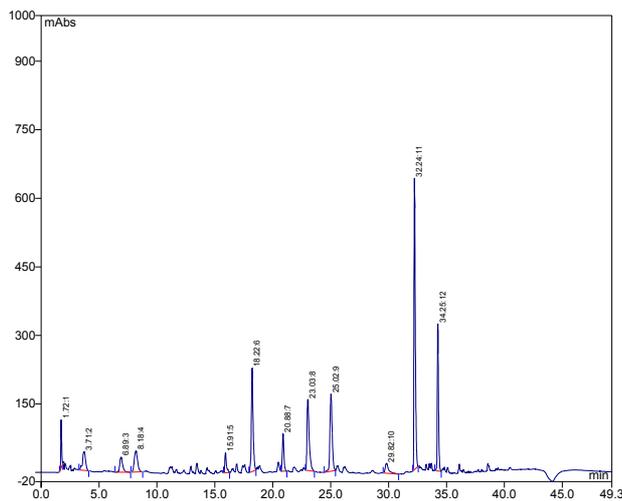


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 3

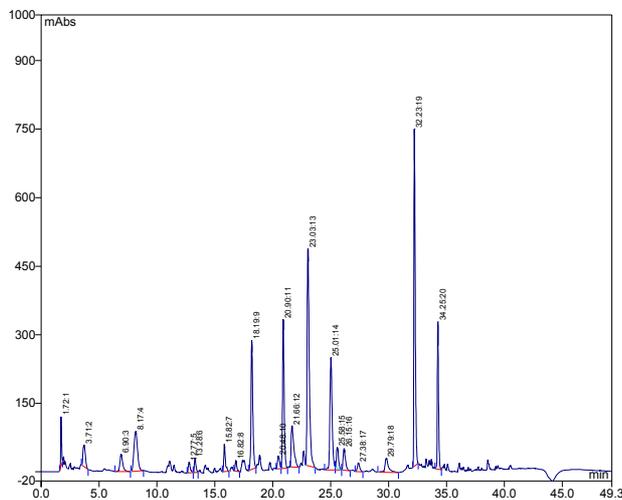
wt et 3d Replik 2



ko wt 3d Replik 2

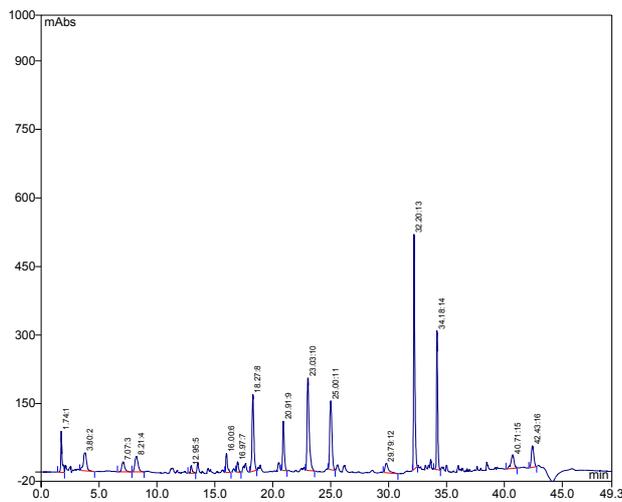


Ox et 3d Replik 2

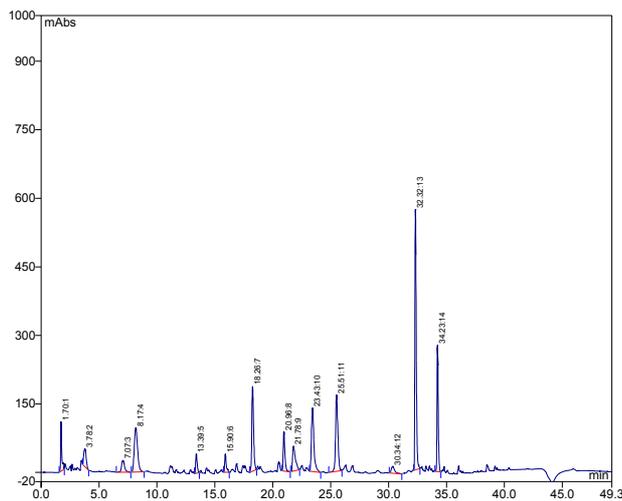


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 4

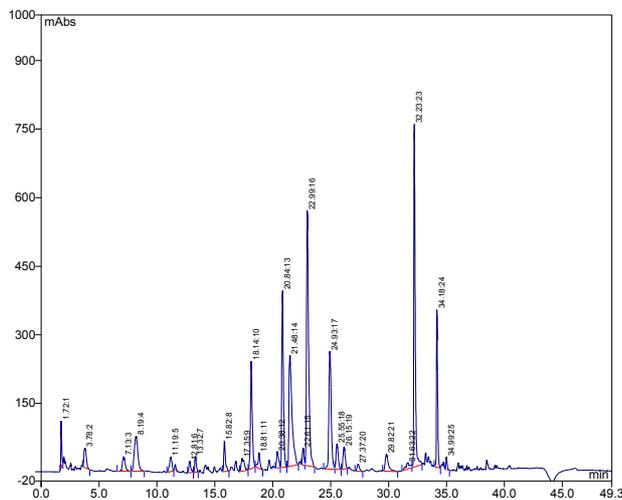
wt et 4d Replik 2



ko et 4d Replik 2

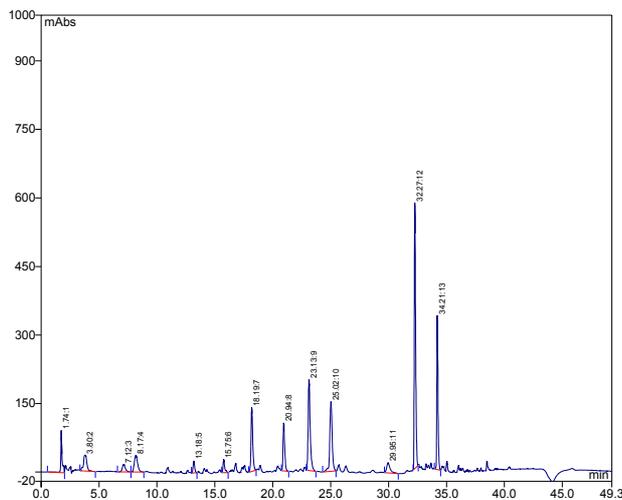


Ox et 4d Replik 2

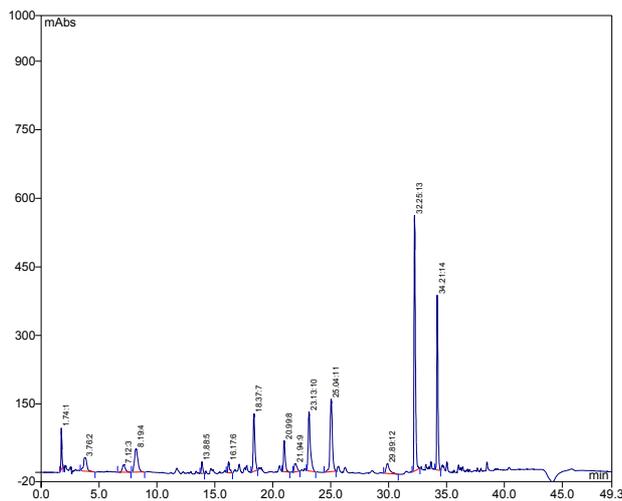


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 5

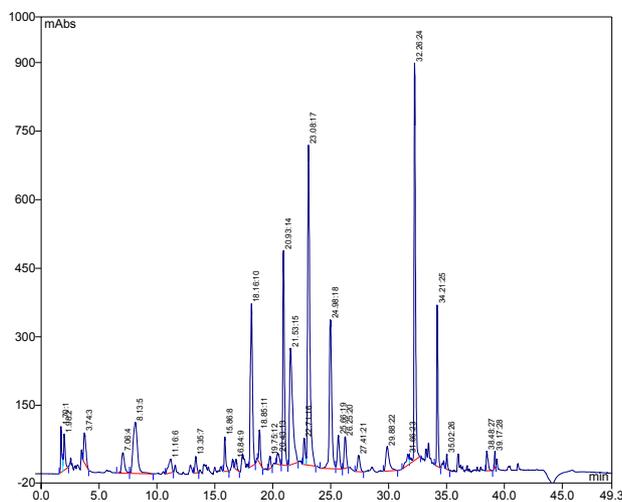
wt et 5d Replik 2



ko et 5d Replik 2

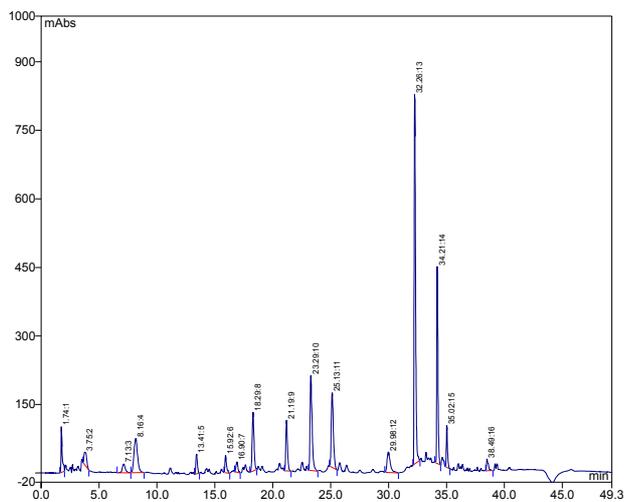


Ox et 5d Replik 2

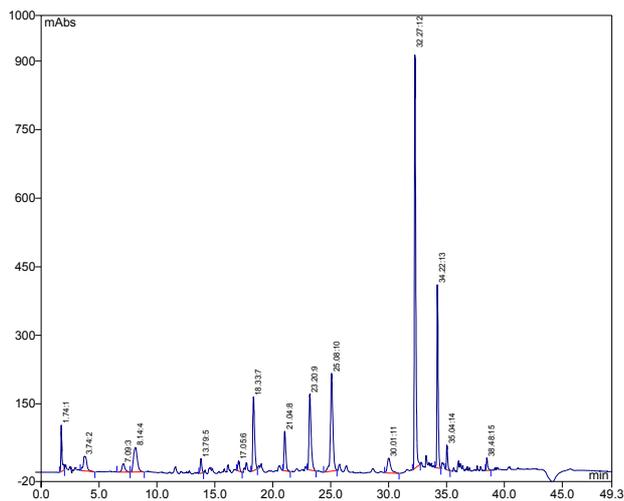


HPLC-Analyse etiolierter Keimlinge, Tag 6

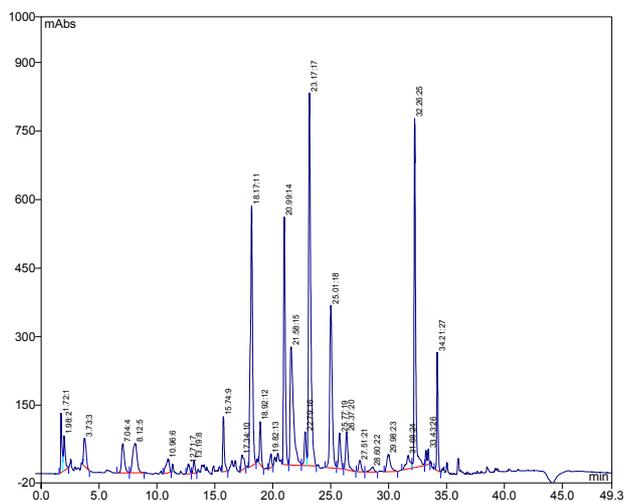
wt et 6d Replik 2



ko et 6d Replik 2



Ox et 6d Replik 2



Lebenslauf:

Name: Frank Mehrrens

Geburtsdatum: 08.10.1968

Geburtsort: Bensberg

Familienstand: ledig

1975 bis 1979 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Kippekausen

1979 bis 1988 Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums Bensberg, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

1988 bis 1989 Ableistung des Grundwehrdienstes

1990 bis 1992 Ausbildung zum staatlich-geprüften Biologisch-Technischen Assisienten an der Rheinischen Akademie e.V.in Köln

1992 bis 1999 Studium der Biologie an der Univerität zu Köln, Diplomabschluss im Fach Genetik mit der Gesamtnote: sehr gut

1999 bis 2002 Durchführung der Arbeiten zur Promotion an der Universität zu Köln im Fach Genetik am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln unter Anleitung von Herrn PD Dr. Bernd Weißhaar.