

Basische Helix-Schleifen-Helix
Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* :
Eine genomweite Studie zu Struktur und Funktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Marc Anton Heim
aus Bad Kreuznach

angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Köln im September 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Weisshaar
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Martin Hülkamp

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, 13. November 2003

„Kunst und Wissenschaft, Forschung und Lehre sind frei.“

Artikel 5 Absatz (3) Satz 1
Grundgesetz der Bundesrepublik Deutschland
Vom 23. Mai 1949 (BGBl. I S. 1)

Lieber Leser,

die vorliegende Dissertation ist das Ergebnis von 3 Jahren intensiver Bemühungen, einen vollständigen Überblick über eine Familie von Transkriptionsfaktoren im als vollständig sequenziert geltenden Genom des pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* zu erlangen.

Ebenso abstrakt wie dieser Satz erschien mir zeitweise die Wissenschaft in den letzten Monaten. Dies führte zwangsläufig dazu, über Sinn und Unsinn der modernen biologischen Forschung nachzudenken, in einer Zeit da wir ganze Bibliotheken mit den Daten füllen, die wir innerhalb eines Jahres zusammentragen können. Daher seien hier einige Punkte angemerkt, die mir heute viel wichtiger erscheinen, als sämtliche Ergebnisse, die ich in eine Dissertation hineinschreiben könnte.

Der enorme Fortschritt der Molekularbiologie und die damit verbundenen neuen Möglichkeiten in den unterschiedlichen Forschungsschwerpunkten der Biologie eröffnen Einsichten in Bereiche, die man vor wenigen Jahren noch nicht einmal kannte. Die daraus erwachsende komplexe Sichtweise erfordert umso mehr die ganze Konzentration eines Forschers auf die wissenschaftliche Materie und entfernt ihn dabei zunehmend von dem, was eigentlich der zentrale Punkt der Wissenschaft sein sollte. Bei aller Innovation und technischem Fortschritt sollten wir nicht vergessen, dass wir nicht um unserer selbst Willen oder für die Wissenschaft als Selbstzweck forschen. Die primäre Aufgabe der Wissenschaft sollte darin liegen, erworbenes Wissen zu vermitteln.

Denn Wissenschaft bedeutet mehr als nur die Ansammlung und die Auswertung von Fakten zu bestimmten Vorgängen der unbelebten und belebten Umwelt. Vielmehr sollten wir uns der tatsächlich belebten Umwelt zuwenden, nämlich den Menschen, die uns in Artikel 5 GG die „Freiheit der Forschung“ zusichern. Wenn sie jetzt fragen, „Wofür soll ich mir denn noch Zeit nehmen?“, dann ist die passende Antwort die Gegenfrage, „Wofür denn überhaupt, wenn nicht dafür?“. Die Freiheit der Forschung kann nur gewahrt bleiben, wenn sie sich nicht abschottet, sondern alle daran aktiv beteiligt, die diese betrifft. Und das sind neben Wissenschaftlern, Hochschullehrern,

Politikern, Auftraggebern und Förderern vor allen Dingen die Menschen, denen unsere Forschung in Zukunft zu Gute kommen soll. Wir sollten uns immer neu der Diskussion stellen, ob das, was wir tun, wirklich sinnvoll, notwendig und ethisch vertretbar ist. Wir müssen uns dazu verpflichtet fühlen, nicht nur Fachpublikum unser Wissen zu vermitteln, sondern auch Laien zu lehren und selbst zu lernen, mit ihnen zu diskutieren. Vermitteln wir unsere Ziele nicht klar genug und lehren wir unser Wissen nicht andere, dann stehen wir irgendwann vor einer Wand aus Unwissen und Unverständnis. Und Unwissen vermittelt Ängste und wer vor etwas Angst hat, lehnt es ab. Nicht umsonst umfasst der Begriff der Wissenschaft in Artikel 5 Absatz (3) Satz 1 Forschung und Lehre. Und was die erwähnte Kunst anbelangt, so hat ein wenig Ausdrucksstärke und Kreativität noch keinem Vortrag geschadet.

Dass Wissenschaftler laut aktuellen Studien bei europäischen Kindern im Grund- und Vorschulalter als unheimlich und von Jugendlichen oft als zwielichtig angesehen werden, während in Entwicklungsländern Wissenschaftler von Kindern im gleichen Alter als Heilsbringer und Lebensretter betrachtet werden, offenbart ein weiteres Problem. Wir dürfen nicht nur einfach blankes Fachwissen vermitteln, sondern müssen die zukünftigen Forschergenerationen und die, die diese Forschung finanzieren sollen, früh genug auf Interesse weckende Weise damit in Kontakt bringen. Es geht dabei nicht um eine Entmystifizierung der Wissenschaft, sondern darum, Berührungsängste zu nehmen.

Ein letzter Punkt noch, bevor sich der Leser dem prosaischen Vorwort entfliehend der Wissenschaft zuwenden darf. In Zeiten wirtschaftlicher Konsolidierung und Neuausrichtung, von denen auch die Forschung nicht unberührt bleibt, ist interne Kommunikation umso wichtiger. Das betrifft Doktoranden, Post-Docs, Technische Angestellte ebenso wie Professoren, Arbeitsgruppenleiter und Direktoren. Einerseits sollte ein Grundverständnis für die wirtschaftlichen Notwendigkeiten ebenso vermittelt werden wie andererseits das Interesse am Menschen und Mitarbeiter nicht verloren gehen. Lässt jedoch die eine Seite die andere Seite machiavellistisch im Unklaren, führt die fehlende Information mit Sicherheit nicht zu einer Vereinfachung der Lage.

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass Dinge so sind, wie sie sind.*

Aristoteles

*Für Nicole
Und meine Eltern*

Kurzzusammenfassung (deutsch)

Die basischen Helix-Schleifen-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren repräsentieren eine der größten Transkriptionsfaktor-Familien im Genom von *Arabidopsis thaliana*. Diese Arbeit stellt die erste grundlegende und genomweite Analyse der AtbHLH-Transkriptionsfaktoren dar. Zum einen konnten durch detaillierte Sequenzanalysen des *A. thaliana* Genoms und die Optimierung der Genom-Annotation 162 für AtbHLH-Proteine kodierende Gene identifiziert werden. Zum anderen konnten tiefere Einblicke in das Netzwerk der transkriptionellen Regulation gewonnen werden. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie in der die DNA-Bindung und die bHLH-Dimerisierung vermittelnden bHLH-Domäne lassen sich die AtbHLH-Proteine in 14 strukturelle Gruppen einteilen, die auch in konservierten Motiven außerhalb der bHLH-Domäne, in der ORF-Struktur ihrer Gene und, sofern diese bekannt sind, auch in ihren Funktionen konvergieren. Dabei zeigen die bHLH-Transkriptionsfaktoren eine Reihe von funktionellen Redundanzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Beteiligung der AtbHLH-Transkriptionsfaktoren an der Regulation des Flavonoid-Stoffwechselweges untersucht. Dabei zeigte es sich, dass es auch AtbHLH-Faktoren gibt, die die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Strukturgenpromotoren als Einzelfaktor vermitteln können, während die Mehrzahl der untersuchten Faktoren auf die Interaktion mit Vertretern der Gruppe der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktorfamilie angewiesen sind. Eine strukturell eng mit den R/B-Faktoren aus Mais verwandte Subgruppe von vier AtbHLH-Faktoren, die spezifische R2R3-MYB-Interaktionspartner zur transkriptionellen Aktivierung ihrer Zielgene benötigen, zeigte dabei funktionelle Redundanzen in transienter Koexpression in *A. thaliana* Zellkulturprotoplasten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TTG1, ein Vertreter der WD40-Wiederholungen enthaltenden Proteine, für die synergistische Aktivierung bestimmter Strukturgene des Flavonoid-Stoffwechselweges durch AtbHLH und R2R3-MYB-Faktoren essentiell ist. Die Ergebnisse erlauben dabei Einblicke in die Hierarchie der transkriptionellen Regulation der untersuchten Zielgene.

English Abstract

The basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors represent one of the largest transcription factor gene families in the *Arabidopsis thaliana* genome. This work provides the first complete and genom-wide overview on *AtbHLH* transcription factors. Sequence analysis and optimization of the genome annotation have led to the identification of 162 genes that encode for bHLH domain containing proteins. The identified proteins are structurally clustered into 14 groups based on their protein sequence similarity inside the bHLH domain. The structural clusters do not only show sequence homology in the bHLH domain, they also correlate in some conserved motifs outside the bHLH domain, in their genes ORF structures and as far identified in their functions. Within the single subgroups *AtbHLH* proteins show significant functional redundancies.

To determine the role of the bHLH transcription factors in the regulation of the flavonoid biosynthesis a selection of factors has been tested in transient co-expression experiments in *A. thaliana* protoplasts. The factors have also been assayed on their ability to activate transcription as a single factor, as well as on their dependency on a second group of transcriptional activators, the R2R3-MYB transcription factor family. A subgroup of four *AtbHLH* proteins showing strong sequence homologies to the R/B-bHLH family in mays and a synergistic potential together with certain R2R3-MYB-transcription factors, revealed significant functional redundancies. Furthermore their ability to initiate transcription together with MYB-transcription factors was strongly dependent on the presence of another protein, TTG1, which represents a WD40 repeat containing protein (WD40). The results provide deeper insights into the hierarchy of transcriptional activation mediated by bHLH, MYB and WD40 proteins.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung

English Abstract

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	2
1.1 Die Flavonoidbiosynthese	6
1.2 Eukaryotische Genexpression	9
1.2.1. bHLH Transkriptionsfaktoren	13
1.2.2 Funktionen und Regulationsmechanismen pflanzlicherer bHLH-TF	16
1.2.3 Die MYB Transkriptionsfaktoren	28
1.2.4. WD40 Wiederholungen enthaltende Proteine	33
1.2.5. Die Interaktion von bHLH, MYB und WD40 Proteinen	36
1.2.6 Die lichtregulatorische Einheit des <i>AtCHS</i> -Promotors zeigt Homologien mit weiteren Strukturgen-Promotoren der Flavonoidbiosynthese	38
1.3 Voraussetzungen	41
1.4 Zielsetzung	42
2. Material und Methoden	44
2.1 Material	44
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	44
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	44
2.1.3 Desoxyoligonukleotide	48
2.1.4 Verwendete Sonden und Primer in der QRT-PCR (TaqMan®-System)	48
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und DNA-Vektoren	49
2.1.6 Zellkulturen und Pflanzen	50
2.1.7 Weiteres biologisches Material	50
2.2 Methoden	51
2.2.1 Ammonium-Acetat-Fällung von DNA	51
2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	51
2.2.3 Restriktionsspaltung von DNA	51
2.2.4 Agarosegelelektrophorese	52
2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten	52
2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten	52
2.2.7 Kultivierung von Bakterien	56
2.2.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation	56
2.2.9 Transformation von Bakterienzellen	57
2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.2.11 Isolierung von DNA	61
2.2.12 Herstellung von Reporterkonstrukten	63
2.2.13 Automatische DNA-Sequenzierung	63
2.2.14 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten	63

2.2.15 Gewinnung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten	64
2.2.16 Transfektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten	64
2.2.17 Ernte transfizierter Protoplasten	65
2.2.18 Gewinnung von Proteinextrakten aus Protoplasten	66
2.2.19 Proteinbestimmung nach Bradford	66
2.2.20 Bestimmung der Luziferase-Aktivität	66
2.2.21 Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität	67
2.2.22 Auswertung der Transfektionsexperimente	68
2.2.23 Gewinnung von Mesophyll-Protoplasten aus Blattmaterial	69
2.2.24 Transfektion von Mesophyllprotoplasten	70
2.2.25 Quantitative Echtzeit-RT-PCR	71
2.2.26 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen mit <i>A. tumefaciens</i>	75
2.2.28 Identifikation von bHLH Motiven im <i>A. thaliana</i> Genom	76
2.2.29 Strukturelle Einteilung der AtbHLH Transkriptionsfaktoren	77
3. Ergebnisse	78
3.1 Es gibt 162 bHLH-Proteine kodierende Gene im <i>A. thaliana</i> Genom	79
3.1.1 Die chromosomale Verteilung der AtbHLH-Gene	83
3.1.2 Die AtbHLH-Konsensussequenz der bHLH-Proteindomäne	84
3.1.3 Das 5-9-13-DNA-Bindemotiv der AtbHLH-Faktoren	89
3.2 Die Regulation von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese durch AtbHLH und R2R3-AtMYB-Transkriptionsfaktoren	91
3.2.1 Die Promotorstruktur der möglichen Zielgene <i>CHS</i> , <i>DFR</i> und <i>BAN</i>	91
3.2.2 Testergebnisse des Transfektionssystems	94
3.3 Punktmutation im konservierten Motiv 11	103
3.4 Das WD40-Protein TTG1 ist direkt in die Regulation des Flavonoidstoffwechsels involviert	106
3.5 <i>TTG1</i> ist in Protoplasten exprimiert	109
3.6 Auswirkungen von TTG1 auf das Aktivierungspotential von bHLH/MYB Interaktionspartnern im Transfektionssystem	111
3.7 RNAi Funktionskontrolle mittels QRT-PCR	115
3.8 GFP Lokalisation von TT8 und TTG1	116
3.9 Bestätigung der Transfektionsergebnisse aus Zellkultur-Protoplasten mit ttg1-1-Mesophyll-Protoplasten	121
4. Diskussion	123
4.1 Die bHLH-Genfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	123
4.2 Strukturelle Verwandtschaft der AtbHLH untereinander	129
4.2.1 Die AtbHLH-Konsensus-Sequenz	129
4.2.2 Die Strukturelle Einteilung der AtbHLH-Faktoren korreliert mit der Phylogenie pflanzlicher bHLH-Proteine	130
4.2.3 Nicht alle AtbHLH können an E-Box-Motive binden	132
4.2.4 Die strukturellen AtbHLH-Cluster zeigen funktionelle Korrelation	134
4.3 AtbHLH-Faktoren regulieren die Expression von Schlüsselenzymen der Flavonoidbiosynthese zusammen mit AtMYB-Faktoren	139

4.3.1	Überexpression bestimmter AtbHLH erhöht die MYB111 induzierte Aktivierung der AtCHSmin-Promotors _____	139
4.3.2	AtbHLH-ZIP-Faktoren aktivieren ohne MYB-Interaktionspartner _____	142
4.3.3	AtbHLH-Faktoren ohne Leuzin-Zipper benötigen einen spezifischen R2R3-MYB-Interaktionspartner bei der Aktivierung von Strukturengen des Flavonoidstoffwechsels _____	144
4.4	TTG1 spielt eine übergeordnete regulatorische Rolle in einem Interaktionsnetzwerk zur transkriptionellen Regulation _____	149
4.5	Ein regulatorisches Netzwerk aus TTG1 (WD40), bHLH und MYB-Transkriptionsfaktoren in der transkriptionellen Regulation zellulärer Differenzierung und des Sekundärstoffwechsels _____	155
6.	Zusammenfassung _____	159
7.	Literaturverzeichnis _____	162
8.	Anhang _____	177
8.1	Konsensi konservierter Motive außerhalb der bHLH-Domäne _____	177
8.2	Ermittelte AS-Frequenzen innerhalb der AtbHLH-Domäne _____	178
8.3	Wertetabellen zu den Transfektionsexperimenten, GFP-Studien und QRT-PCR-Experimenten _____	181
8.4	Putative cis-wirkende Elemente der verwendeten Promotoren _____	197
8.5	GenBank-Akzessionen _____	199
8.6	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer: _____	208
8.7	Klonliste _____	211
Erklärung _____		215
Teilpublikationen _____		216

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumberliferon
4-MUG	4-Methylumberliferyl-Glucuronid
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B5	B5-Medium
BAN	BANYULS (putative Leucoanthocyaninreduktase)
bHLH	basische Helix-Schleifen-Helix
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumine")
bZIP	basische Leuzin-Zipper
C1	"Colour 1"-Protein aus <i>Zea mays</i>
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHS	Chalkonsynthase
CPRF	Common Plant Regulatory Factor
CoA	Coenzym A
<i>Col</i>	<i>Columbia</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonolreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoosynucleosintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	FAM-Fluoreszenzmarker
fwd	"forward"- Angabe über die Hybridisierungsausrichtung von Starteroligonukleotiden
g	Erdanziehung [9,81 m/s]
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTW	GATEWAY
GUS	beta-Glucuronidase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Motiv
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HTH	Helix-Turn-Helix-Motiv
kb	kilo-Basenpaare
KO	Knock Out
LB	LB-Medium
LAR	Leucoanthocyaninreduktase
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
LRU	Lichtregulatorische Einheit
LUC	Luciferase (aus <i>Photinus pyralis</i>)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger) RNA
MS	Murashige-Skooge-Medium
NLS	Nukleäres Lokalisations Signal
nt	Nukleotide

OX	Überexpression
PEG	Polyethylenglykol
<i>Ph</i>	<i>Petunia hybrida</i>
QRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RACE	schnelle (Rapid) Amplifikation von cDNA Stücken (Ends)
rev	"reverse" - Angabe über die Hybridisierungsausrichtung von Starteroligonukleotiden
RFP	Rot Fluoreszierendes Protein
RLU	relative Lichteinheiten ("Units")
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat ("Sodiumdodecylsulfate")
SOB	SOB-Medium
SOC	SOC-Medium
TAM	TAMRA-Fluoreszenzmarker
TF	Transkriptionsfaktor
TOPO	Topoisomerase
tRNA	transfer RNA
<i>tt</i>	<i>transparent testa</i>
U	hier Enzymeinheiten ("Unit")
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
<i>WS</i>	<i>Wassilewskija</i>
wt	Wilttyp
YFP	Gelb („Yellow“) Fluoreszierendes Protein
ZIP	Leuzin-Zipper-Motiv
<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i>

Aminosäuren: Abkürzungsverzeichnis und Buchstabencode

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

1 Einleitung

Seit der ersten Veröffentlichung der genomischen DNA-Sequenz des pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (dt.: Ackerschmalwand; Familie der *Brassicaceae*) im Dezember 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) steht der Pflanzenforschung zum ersten Mal die Informationsgrundlage zu einer umfassenden Analyse eines pflanzlichen Genoms zur Verfügung. Dank der schnell fortschreitenden Optimierung und Automatisierung molekularbiologischer Methoden gelang die Sequenzierung in kürzester Zeit. Jedoch zeigte sich auch den größten Optimisten schnell, dass mit der Sequenzierung erst ein kleiner Schritt zur „Entschlüsselung“ getan ist. Trotz einer enormen Zahl an vorhandenen cDNA-Sequenzen und der Verfügbarkeit der Sequenzinformationen der publizierten EST- (Expressed Sequences Tags) und RAFL-Klone (Random Amplified Full length cDNA) in zahlreichen Datenbanken, sind die Vorhersagen für die Gesamtanzahl kodierter Gene recht schwer und zum Teil mit „*in silico*“ Analyse nur recht ungenau zu beantworten.

Während erste Schätzungen bezüglich der Genzahl in *Arabidopsis thaliana* von ca. 20000 Genen sprachen (Rounsley *et al.*, 1996), beliefen sich erste Voraussagen bei der Veröffentlichung des Genoms im Dezember 2000 bereits auf 25,498 Gene (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Jedoch basierten auch diese auf zum Teil nur ungenauen Vorhersagen oder Sequenzhomologien mit bereits publizierten Genen aus *A. thaliana* oder anderen eukaryotischen Organismen. Dank fortwährender Optimierung der „*in silico*“ Analysemethoden, durch die Einbeziehung neu publizierter cDNA-Sequenzen und Vergleichen mit nahe verwandten Spezies (z.B. *Brassica napus* bzw. *Brassica oleracea*) wird aktuell eine Gesamtzahl von ca. 29,388 Genen im Genom von *A. thaliana* angenommen (TIGR Veröffentlichung des Genoms Version 4.0 [17. April 2003]).

Die Beantwortung der Frage der Gesamtzahl der Gene wirft aber zugleich die nächsten Fragen auf. Die Bestätigung der vorhergesagten Genstruktur, die Einteilung der Gene in Genfamilien, der funktionelle Nachweis und die Detektion möglicher Redundanzen sind die nächsten zu bewältigenden Aufgaben. Aufgrund des großen Erfolges der Sequenzierungsprojekte bei unterschiedlichen Organismen entwickelte sich die Jagd nach immer mehr Daten im letzten Jahrzehnt zu einer

wahren Flut von „-omiken“, die die Sammlung von Sequenzdaten (Genomik), Expressionsdaten (Transkriptomik), Protein(struktur) bezogener Daten (Proteomik) und Daten zu situations- und entwicklungsspezifischen Stoffwechselleistungen (Metabolomik) zum Selbstzweck erklärten. Was vermag der Organismus aufgrund welcher Gene, die wann exprimiert werden und mit welchen daraus hervorgehenden Genprodukten an Leistungen zu vollbringen? Je globaler – oder besser je genomumspannender die Fragen wurden, desto wichtiger wurden die Knockout-generierenden Projekte, die bis zum heutigen Tag zu fast jedem identifizierten Gen in *A. thaliana* eine T-DNA- oder Transposon-insertierte Mutante bereithalten. Und erneut bieten sich ungeahnte Möglichkeiten, mit der Phänotypisierung Terrabytes an Daten zu sammeln und zu speichern. Ohne ausgefeilte „*in silico*“-Analysen und geeignete Datenbanken kommt heute die moderne Biologie, wie viele andere Wissenschaften auch, nicht mehr aus. Um so wichtiger erscheint es gerade in der Biologie nicht den Bezug zur „*in vivo*“-Analyse zu verlieren.

Diese Arbeit liefert Ansätze, die zeigen, dass die Ergebnisse von „*in silico*“ basierten Analysen tatsächlich eine geeignete Grundlage für biologische Studien am Organismus bieten können, statt nur eine Sammlung von Daten darzustellen. Die vorliegende Analyse definiert die Familie der „basische Region Helix-Schleifen-Helix“ Transkriptionsfaktoren (engl.: **b**asic **H**elix-**L**oop-**H**elix) im Genom von *A. thaliana* und zeigt die Schwierigkeiten der Abgrenzung auf. Darüber hinaus werden zu den bereits publizierten Daten zu Struktur und Funktion experimentelle Ansätze zur funktionellen Analyse von bHLH Transkriptionsfaktoren, ihren Interaktionspartnern und Zielgenen präsentiert.

Die basischen Helix-Schleifen-Helix Transkriptionsfaktoren, bilden eine Großfamilie von Transkriptionsfaktoren, die als Dimere an spezifische DNA-Sequenzmotive binden können. Die Vertreter dieser Familie von transkriptionellen Regulatoren sind in allen eukaryotischen Reichen zu finden. Daher waren bHLH TF bereits Bestandteil zahlreicher, umfassender Analysen in anderen eukaryotischen Organismen außerhalb des Pflanzenreichs (Peyrefitte *et al.*, 2001; Ledent *et al.*, 2002). Beim Menschen wurden bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen für diese Proteine beschrieben, darunter die Kontrolle der Zellproliferation, die Entwicklung der Zellidentität sowie ihre Fähigkeit zur transkriptionellen Regulation, Homo- bzw. Heterodimere auszubilden. In Pflanzen ist erst wenig bekannt über die

bHLH Transkriptionsfaktorfamilie, aber in den vergangenen Monaten häufen sich die Publikationen zu pflanzlichen bHLH TF, die deren wichtige und in vielen Prozessen involvierten Funktion in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rücken.

Basierend auf den sequenzähnlichsten bHLH Transkriptionsfaktoren zum Mais bHLH *ZmSn*, für die es ebenfalls in *A. thaliana* erste Hinweise auf eine Beteiligung am Flavonoidstoffwechsel gab, wurde eine umfassende, computerunterstützte Analyse in den Sequenzdatenbanken des Arabidopsis Genoms durchgeführt, um den Umfang und die Besonderheiten dieser Transkriptionsfaktorfamilie in *A. thaliana* zu bestimmen. Dabei orientierte sich die Analyse zunächst an der durch Atchley *et al.* (1999) definierten Konsensussequenz für bHLH TF, die das Resultat einer Organismen übergreifenden Analyse von 392 bHLH TF darstellt. Dabei war jedoch zu beachten, dass in der Analyse von Atchley *et al.* (1999) nur ein kleiner Anteil der betrachteten bHLH TF aus Pflanzen bzw. ein noch geringerer aus *A. thaliana* stammte. Deshalb wurde der Suchkonsensus nach und nach modifiziert und optimiert, um einen möglichst stringenten Konsensus zu erhalten, der zugleich die Gesamtheit der bHLH TF in *A. thaliana* repräsentiert und zu einem vollständigen Gesamtergebnis führt.

Die Kombination von bioinformatischen und molekularbiologischen Methoden führte im Rahmen der vorliegenden Analyse zur Neuidentifikation zahlreicher *AtbHLH*-kodierender Gene sowie zur Verbesserung vieler bestehender Annotationen. Der erste Teil dieser Arbeit gibt somit einen Überblick über die *AtbHLH*-Transkriptionsfaktorfamilie und eröffnet im Zusammenhang mit bereits publizierten Daten zur Funktion einiger *AtbHLH* weitere Ausblicke auf mögliche Funktionen und Redundanzen innerhalb der Genfamilie. Basierend auf den Resultaten der computergestützten Sequenzanalyse wurde im zweiten Teil der Arbeit die Beteiligung der identifizierten bHLH TF am Flavonoidstoffwechsel, insbesondere an der Regulation der Expression bestimmter Schlüsselenzyme des Stoffwechselweges zu den kondensierten Tanninen bzw. den Anthocyanen untersucht. Dabei bediente sich die Analyse in erster Linie des transienten Expressionssystems in *A. thaliana* AT7-Zellkultur-Protoplasten (Trezzi *et al.*, 1993; Sprenger-Haussels *et al.*, 2000). Die so erhaltenen Ergebnisse zeigen eine spezifische Interaktion von bHLH TF und R2R3-MYB TF (Stracke *et al.*, 2001) unter

der Beteiligung einer weiteren Transkriptionsfaktorfamilie, den WD40-Sequenzwiederholungen enthaltenden Proteinen, auf.

Im Folgenden sollen die biologischen und molekularbiologischen Grundlagen zum bearbeiteten Projekt gemäß dem Stand der Wissenschaft wiedergegeben werden, um ein gewisses Grundverständnis für die später dargestellten Ergebnisse aufzubauen.

1.1 Die Flavonoidbiosynthese

Die zu den Phenylpropanoiden gehörenden Flavonoide haben in der Pflanze vielfältige Funktionen. Sie dienen nicht nur als Pigmente der Blüten, Blätter und Früchte, sondern sind auch UV-Schutz, haben Signalfunktionen, dienen als Fraßschutz und zur Pathogenabwehr und können darüber hinaus an Entwicklungsprozessen wie Pollenreifung und Entwicklung der Samenschale beteiligt sein (Taylor *et al.*, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Ylstra *et al.*, 1994; Debeaujon *et al.*, 2000; Winkel-Shirley, 2001). Die Komplexität der unterschiedlichen Teile des Stoffwechselweges und der Funktionen der End- und Zwischenprodukte erfordert eine exakte Feinregulation des Flavonoidbiosyntheseweges in Reaktion auf externe Stimuli und im Kontext der Pflanzenentwicklung (vgl. Abb. E1 zu Schlüsselreaktionen und Verzweigungen des Flavonoidstoffwechsels).

Das Zimtsäurederivat p-Cumaroyl-Coenzym A, das durch Desaminierung, Hydroxylierung und Aktivierung aus Phenylalanin gebildet wird, ist das Ausgangsprodukt für die Flavonoidbiosynthese. Sukzessive Addition von 3 Einheiten Malonyl-CoA, zusammen mit einer Decarboxylierung und der Abspaltung von Coenzym A und Zyklisierung führt zur Bildung von Chalkon: Dieses ist der *Ausgangsstoff* für die Synthese der verschiedenen Flavonoide. Die Regulation der Strukturgene, die an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, ist vor allem in Mais ausführlich untersucht worden. Die selektive Regulation basiert auf einem kombinatorischen Zusammenwirken von MYB-Proteinen der C1-Unterfamilie (C1, PL1 und P) mit den sogenannten R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren (R, Lc, Sn und B), die in unterschiedlichen Organen zeitlich und räumlich koordiniert exprimiert werden (Singh *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1990; Consonni *et al.*, 1993; Tonelli *et al.*, 1994; Consonni *et al.*, 1997). Auf die einzelnen in die Regulation involvierten Faktoren wird im Abschnitt zu den Transkriptionsfaktoren näher eingegangen.

Da *A. thaliana* keine auffällige Pigmentierung besitzt und somit Mutationen in Strukturgenen und in für die Regulation der Flavonoidbiosynthese wichtigen Genen nicht, wie in Mais durch einen auffälligen Pigmentierungsverlust detektiert werden können, erfolgte die systematische Identifizierung über den „*transparent testa*“ (TT) Phänotyp (Koornneef, 1990). So führt der Verlust eines Strukturgens oder eines

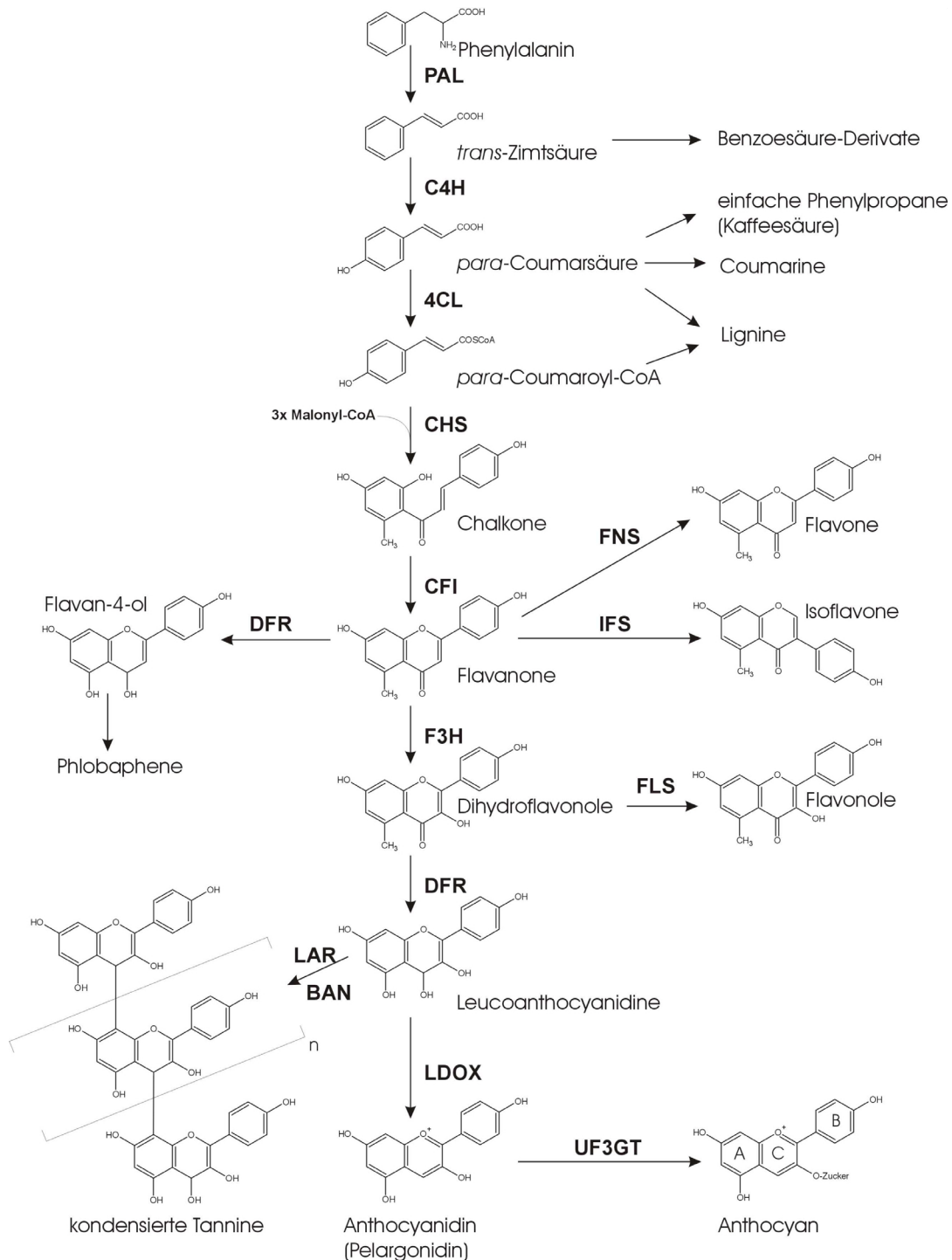


Abb.E1: Schematische Darstellung der Biosynthese wichtiger Flavonoidklassen. Dargestellt sind die wichtigsten Reaktionen der Flavonoidbiosynthese. Die Enzyme, die die entsprechenden Reaktionen katalysieren, sind neben den Reaktionsschritten in Großbuchstaben abgekürzt aufgeführt. Abkürzungen: 4CL: 4-Cumarat-CoA-Ligase; BAN, BANYULS (eine putative Leucoanthocyanidinreduktase); C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase (Cinnamate-4-Hydroxylase); CFI: Chalkon-Flavanon-Isomerase; CHS: Chalkonsynthase; DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase; F3H: Flavanon-3-Hydroxylase; FLS: Flavonolsynthase; FNS: Flavonsynthase; IFS: Isoflavonsynthase; LAR: Leucoanthocyanidinreduktase; LDOX: Leucoanthocyanidinoxidase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; UF3GT: UDP Glukose-Flavonoyl-Glukosyl-Transferase (Darstellung des Stoffwechselweges modifiziert nach Taiz *et al.*, 2000). Die Strukturformeln wurden mit dem kostenlosen ACD/ChemSketch-Programm erstellt; Zu beziehen über www.acdlabs.com)

Regulationsfaktors zu einer, durch das Fehlen von Tanninen in der Samenhülle hervorgerufenen, gelben bis hellbraunen Samenfarbe, die leicht von dem Dunkelbraun der Wildtyp-Samen unterschieden werden kann. In systematischen Analysen von *A. thaliana* Mutanten konnte so eine Großzahl von Mutanten des Phenylpropanoid-Weges identifiziert werden (Shirley *et al.*, 1995; Wisman *et al.*, 1998). Zum einen konnten Mutanten mit Defekten in Strukturgenen der Flavonoid-Biosynthese (*tt3*:DFR; *tt4*: CHS; *tt5*: CFI; *tt6*: F3H; *tt7*: F3'H), die als Einzelkopie-Gene im *A. thaliana* Genom vorliegen, isoliert werden, in denen die gesamte Pflanze einen Defekt in der Flavonoid-Akkumulation aufweist. Zum anderen wurden TT-Mutanten molekular charakterisiert deren Mutation regulatorische Gene betrifft, die die strukturellen Gene der Flavonoidbiosynthese regulieren. So auch die Mutanten *tt2* und *tt8*, deren veränderte Gene für ein MYB Protein (*AtMYB123/TT2*) bzw. ein R/B-ähnliches bHLH Protein (*AtbHLH042/TT8*) kodieren. Beide Proteine werden gemeinsam für die Expression von *DFR* und *LAR* in Schoten von *A.thaliana* benötigt und können bei der Regulation direkt interagieren (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden Transkriptionsfaktoren identifiziert die zu den Zinkfingerproteinen zählen (*WIP1/TT1*) bzw. in die Gruppen der WD40-Sequenzwiederholungen enthaltenden Proteine (*TTG1*) und WRKY-Transkriptionsfaktoren (*TTG2*) fallen (Walker *et al.*, 1999; Borevitz *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Sagasser *et al.*, 2002).

1.2 Eukaryotische Genexpression

Die erste Analyse von Erbfaktoren, die zur Ausprägung bestimmter Merkmale eines Organismus führen, wurde von Gregor Mendel im Jahr 1866 an der Erbse durchgeführt und bildet somit die Grundlage der andauernden Suche nach der Funktion der Gene. Nach heutigem Verständnis sind Gene DNA-Sequenzen, die für bestimmte RNA Moleküle kodieren und damit direkt an der Entstehung von Enzymen und zellulären Strukturproteinen beteiligt sind. Die gesteuerte Expression der Gene eines Organismus bestimmt sowohl sein Wachstum und seine Entwicklung als auch die Reaktionsfähigkeit auf seine Umwelt. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Zelltypen eines mehrzelligen Organismus nicht nur in ihrer Morphologie und ihrer Funktion, sondern auch ganz entscheidend in den genetischen Programmen, die phasen- und gewebsspezifisch oder auch generell aktiv sind. Egal ob endogen gesteuert oder aufgrund biotischer oder abiotischer Umweltreize induziert, die Reaktion des Organismus und seine Entwicklung hängen von der vorangegangenen oder neu initiierten Aktivierung der Gene ab.

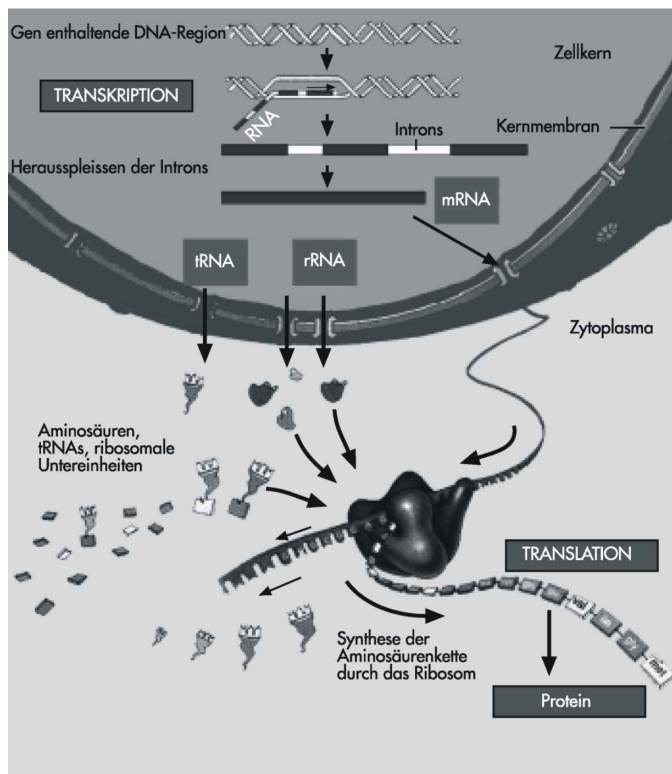


Abb.E2.: Eukaryontische Genexpression
(Quelle: UNI-PRESS Ausg. Nr.110 / Oktober 2001, Universität Bern, CH). Im Zellkern wird eine DNA-Region in ein RNA-Molekül überschrieben (Transkription), modifiziert (Herausspleissen der Introns) und danach ins Zytosoma exportiert. Das Entfernen der Introns (weiße Abschnitte) aus den Boten-RNAs (mRNA) beispielsweise ist eine typische RNA-Modifikation. Im Zytosoma dient die Boten-RNA den Ribosomen als Bauplan für die Proteinsynthese (Translation).

Die Unterschiede in der Genexpression verschiedener Zelltypen und Gewebe innerhalb eines Organismus und die Auswahl bereitgestellter Genprodukte können auf unterschiedlichen Ebenen der Genregulation begründet liegen. Es bestehen die u.a. Möglichkeiten der a) transkriptionellen Kontrolle über Genaktivierung oder Repression, der b) RNA-Processing-Kontrolle, der Art in der das primäre RNA-Transkript gespliced oder modifiziert wird, der c) RNA-Transportkontrolle beim Export fertiger mRNAs ins Cytoplasma, der d) Translations-Kontrolle, die Regulation welche mRNA tatsächlich translatiert wird und wo die Translation stattfindet, der e) RNA-Stabilitätskontrolle durch gezielten Abbau von mRNAs und f) der Kontrolle der Proteinaktivität durch Abbau, posttranslationale Modifikation oder räumliche Abgrenzung der synthetisierten Proteine.

Die Expression der meisten eukaryotischen Proteine wird auf Ebene der Transkription gesteuert. Dabei ist der Transkriptionsmechanismus in eukaryotischen Zellen deutlich komplexer als in Prokaryoten. Zum einen gibt es drei unterschiedliche RNA-Polymerasen (RNA-Pol), die RNA-Pol I, II und III. Die RNA-Pol I befindet sich im Nucleolus und ist für den Großteil der Synthese ribosomaler RNAs zuständig, während die RNA-Pol II sich im Nucleoplasma befindet und für die Synthese der prä-mRNAs zuständig ist. Die RNA-Pol III, ebenfalls im Nucleoplasma, ist für die Bildung kleiner RNAs, wie tRNA und 5S-rRNA, zuständig. Außerdem bilden eukaryotische Zellen einen wesentlich komplexeren Transkriptionsinitiationskomplex aus. Der Initiationskomplex der RNA-Pol II setzt sich aus sieben allgemeinen Transkriptionsfaktoren zusammen, die dem Komplex das Auffinden der korrekten Startstelle erlauben. Die allgemeinen Transkriptionsfaktoren sind ubiquitär und bilden mit der RNA Pol II den Prä-Initiationskomplex (PIC) im Promotorbereich. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Transkriptionsstart. Zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren gehören die Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF und TFIIH. Mit Ausnahme von TFIIB sind es Proteinkomplexe, die aus 2-14 verschiedenen Proteinen bestehen (Roeder, 1991; Zawel *et al.*, 1993; Roeder, 1996). Die Transkription selbst beginnt, sobald der letzte Faktor, TFIIH (Transkriptionsfaktor für RNA-Polymerase II, Protein H) an den Komplex bindet und die Phosphorylierung der RNA-Pol II bewirkt. Anschließend löst sich die RNA-Polymerase vom Initiationskomplex und wandert am „Antisense-Strang“ der DNA in

3'→5'-Richtung entlang. Währenddessen dissoziieren erste allgemeine TF wieder vom Komplex ab, während andere zurückbleiben, um erneut eine RNA-Pol II zu binden.

Ein weiterer Unterschied zur prokaryotischen Transkription besteht in der Komplexität eukaryotischer Promotoren. In 5'-Richtung aufwärts vom Initiationspunkt finden sich weitere Stellen, die die Transkription regulieren. Dabei lassen sich Promotoren in der Regel in zwei Komponenten einteilen: zum einen in den eigentlichen Kernpromotor oder Minimalpromotor. Das ist der kleine Bereich „stromaufwärts“ der Initiationsstelle, der unbedingt zur Genexpression erforderlich ist. Darüber hinaus finden sich noch regulatorische Bereiche, die die Aktivität des Minimalpromotors kontrollieren. Der für die durch die RNA-Pol II transkribierten Gene notwendige Minimalpromotor erstreckt sich meistens 100-200 bp stromaufwärts der Initiationsstelle und enthält mehrere Sequenzbereiche, die als nahe Promotorsequenzen bezeichnet werden. Ungefähr 25-35 bp stromaufwärts der Initiationsstelle findet sich üblicherweise die TATA-Box, an der der Zusammenbau des Initiationskomplexes stattfindet. Neben der TATA-Box finden sich im Minimalpromotor auch noch *cis*-wirkende-Sequenzen, die von spezifischen Transkriptionsfaktoren gebunden werden, u.a. die CAAT-Box und die GC-Box. Die Bindung von *trans*-wirkenden Faktoren an diese Sequenzen führt zur Erhöhung der Transkriptionsrate, da der Zusammenbau des Initiationskomplexes und die DNA-Bindung erleichtert werden. Neben diesen nahen *cis*-wirkenden Sequenzen gibt es in eukaryotischen Promotoren auch noch entfernte regulatorische Sequenzen, die sich in einem Bereich von ca. 1-1.5 kb stromaufwärts der Initiationsstelle finden. Bei den hier bindenden Transkriptionsfaktoren spricht man von Aktivatoren und Repressoren, je nach ihrer Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität. Außer diesen direkt dem Genlocus zuordenbaren *cis*-wirkenden Elementen gibt es auch Kontrollelemente, die sich in der Gensequenz selbst oder in Bereichen bis zu 10 kb stromaufwärts oder –abwärts von der Initiationsstelle entfernt befinden können und starke Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität haben können. Solche positiven regulatorischen Sequenzen bezeichnet man allgemein als „Enhancer“-Elemente, negative regulatorische Sequenzen als „Silencer“-Elemente.

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren werden aufgrund gemeinsamer Struktur- und/oder Sequenzmerkmale in Familien unterteilt oder nach ihrer DNA-

Erkennungssequenz klassifiziert (Pabo *et al.*, 1992; Nelson, 1995). So unterscheidet man beispielsweise bHLH-, bZIP-, MYB und WRKY-Transkriptionsfaktoren, die teilweise im Folgenden näher erläutert werden sollen. U.a. sind MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Pflanze an der Regulation der Flavonoidbiosynthese beteiligt. Transkriptionsfaktoren sind modular strukturiert, d.h. dass Funktionen wie die DNA-Erkennung und -Bindung oder die Aktivierung der Transkription in getrennten Domänen des Proteins lokalisiert sind (Frankel *et al.*, 1991). Darüber hinaus finden sich auch häufig noch Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die es den TF ermöglichen, mit anderen TF der gleichen Familie zu dimerisieren oder auch mit anderen Proteinfaktoren zu interagieren (Ptashne, 1988). Während die DNA-Erkennungssequenzen und die Protein-Protein-Interaktionsdomänen meist strukturell konserviert sind, sind die Sequenzen außerhalb dieser Domänen meist variabel in Struktur und Funktion (Wolberger, 1999). Das kombinatorische Zusammenwirken mehrerer verschiedener Transkriptionsfaktoren, die durch spezifische DNA-Protein und Protein-Protein-Interaktionen in Wechselwirkung stehen, ermöglicht es mit Hilfe weniger verschiedener regulatorischer Proteine die vielfältige und komplexe zeitliche und räumliche Regulation der Transkriptionsrate von Zielgenen zu kontrollieren (Freiman *et al.*, 2003).

Das inzwischen annähernd vollständig sequenzierte Arabidopsisgenom (The ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000) ermöglicht es gezielte „*in silico*“ basierte Analysen durchzuführen und die Transkriptionsfaktorfamilien in ihrer Gesamtheit zu betrachten (Stracke *et al.*, 2001; Jakoby *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2003). Kurz nach Veröffentlichung der Sequenz der *A. thaliana*-Genoms wurde eine Zahl von ca. 1500 Transkriptionsfaktorgenen publiziert (Riechmann *et al.*, 2000), wohingegen mittlerweile aufgrund der verbesserten Genannotation sogar von ca. 1700 TFs ausgegangen wird. Fast 6% aller *A. thaliana*-Gene stehen somit für Transkriptionsfaktoren. Von diesen ist bisher nur ein kleiner Teil molekularbiologisch beschrieben und ein verschwindend geringer Teil funktionell charakterisiert (Meinke *et al.*, 2003). Jedoch zeigen neuere Publikationen den zunehmenden Nutzen, den man sich von der kompletten Analyse von Transkriptionsfaktorfamilien verspricht (Riechmann *et al.*, 2000; Stracke *et al.*, 2001; Jakoby *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2003).

1.2.1. bHLH Transkriptionsfaktoren

Die basischen Helix-Schleifen-Helix Proteine sind eine Großfamilie von Transkriptionsfaktoren, die in nichtpflanzlichen Organismen bereits ausführlich untersucht wurden. Hauptsächlich im Säugetiersystem wurden grundlegende Analysen zu Struktur, Funktion und Phylogenie durchgeführt (Atchley *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998; Ledent *et al.*, 2001; Ledent *et al.*, 2002). 1989 identifizierten (Murre *et al.*) eine Region hoher Sequenzhomologie in zehn tierischen, DNA-bindenden Proteinen, die auf Grund ihrer Aminosäureeigenschaften und räumlichen Struktur als bHLH Domäne bezeichnet wurde. Die seither durchgeführten Analysen an bHLH Proteinen aus tierischen, pilzlichen und pflanzlichen Systemen offenbarten eine große Zahl an Faktoren, die wichtige Komponenten in transkriptionsregulierenden Netzwerken in den untersuchten Systemen darstellen und eine große Bandbreite an Prozessen steuern, die von der Zellproliferation bis hin zur Entwicklung der Zellidentität reichen (Grandori *et al.*, 2000; Massari *et al.*, 2000).

Die bHLH Transkriptionsfaktorfamilie ist definiert durch einen Aminosäuresequenzbereich hoher Homologie, die bHLH-Domäne (vgl. Abb. E3). Sie besteht aus ~60 Aminosäuren (AS) mit zwei unterschiedlichen Regionen bestimmter Funktion. Die basische Region am N-terminalen Ende der Domäne ist an der DNA Bindung beteiligt und besteht aus ca. 15 AS, die eine große Zahl konservierter basischer AS-Reste aufweisen. Die Helix-Schleifen-Helix (HLH) Region bildet das C-terminale Ende der Domäne und stellt eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar, die für die Dimerisierung der bHLH Proteine entscheidend ist (Murre *et al.*, 1989; Ferré-D'Amaré *et al.*, 1994). Sie besteht aus hauptsächlich hydrophoben Resten, die zwei amphipathische Helices bilden, die durch eine AS Schleife von variabler Länge getrennt werden (Murre *et al.*, 1989). Typischerweise besitzen eukaryotische TF zumindest zwei funktionelle Bereiche, zum einen eine DNA-Bindedomäne und außerdem eine Aktivierungs- bzw. eine Repressionsdomäne, die zusammen zu einer Modulation der transkriptionellen Initiation zu befähigen (Ptashne, 1988). Daher sind außer der für die Bindung der DNA wichtigen bHLH Domäne zur transkriptionellen Aktivierung noch zusätzliche Aktivierungsbereiche notwendig. Dabei kann die Fähigkeit zur transkriptionellen Regulation jedoch nicht nur im Besitz einer eigenen Aktivierungsdomäne liegen, sondern auch über die Interaktion mit

anderen Transkriptionsfaktoren moduliert werden. Im Rahmen dieser Analyse wurden auch signifikante Sequenzähnlichkeiten innerhalb bestimmter Subgruppen identifiziert, die außerhalb der bHLH Domäne liegen und einen funktionellen Zusammenhang offenbaren könnten (vgl. Tab. R1 im Ergebnisteil). Kokristallisationsstudien zweier unterschiedlicher bHLH TF haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen den HLH Regionen sowohl zur Bildung von Homo- als auch von Heterodimeren führen kann (Ma *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde bereits 1993 für die ubiquitär exprimierten Angehörigen der E12-bHLH-Familie in Tieren gezeigt, dass diese gewebespezifisches Regulierungspotential durch die Heterodimerisierung mit gewebsspezifisch exprimierten bHLH Proteinen anderer Subgruppen erlangen (Quong *et al.*, 1993). Einige bHLH TF zeigen dagegen lediglich eine Homodimerisierung oder beschränken ihre Fähigkeit auf die Bildung von Heterodimeren auf die Interaktion mit eng strukturverwandten Mitgliedern der

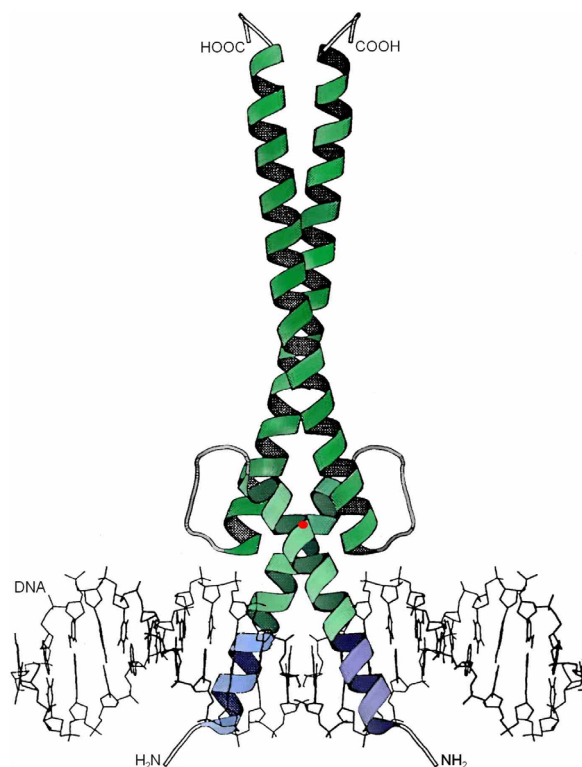


Abb.E3: bHLH-Dimer gebunden an DNA (modifiziert nach Atchley, *et al.*, 2000 *MBE*, **17**, 164-178). Dargestellt ist nur der Bereich der beiden bHLH-Domänen. Die amino- und carboxyterminalen Bereiche sind nicht abgebildet und nur durch Indizes (NH_2 und COOH) angedeutet. Die basischen Regionen der beiden bHLH Monomere sind blau dargestellt, die Helices 1 und 2 jeweils grün. Der Kontaktpunkt zwischen den Helices 1 am hochkonservierten Aminosäurerest Leuzin23 (vgl. Ergebnisteil) ist durch einen roten Punkt angedeutet. Die Schleifenstruktur ist grau hinterlegt.

Transkriptionsfaktorfamilie. Andere wiederum können mit einer Vielzahl an Partnern Heterodimere bilden (Littlewood *et al.*, 1998).

Das DNA Motiv, an das bestimmte bHLH Proteine binden können, ist ein Hexanukleotid-Konsensus, der als E-Box (5'-CANNTG-3') beschrieben ist. Es gibt unterschiedliche Arten von E-Boxen, die durch die beiden Kernbasen charakterisiert sind. Der häufigste beschriebene Typus ist die palindromische G-Box (5'-CACGTG-3'). Dabei vermitteln bestimmte hochkonservierte AS-Reste in der basischen Region der bHLH Proteine die Spezifität für die äußeren Basen, während andere konservierte AS Reste für die Wahrnehmung der zentralen Basen entscheidend sind und somit die Spezifität für bestimmte Typen der E-Boxen geben (Robinson *et al.*, 2000). Generell besitzen bHLH-Proteine mit einem konservierten H-E-R-Konsensus an den Positionen 5-9-13 die Fähigkeit an E-Box-Motive zu binden (Atchley *et al.*, 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass auch die benachbarten Nukleotide außerhalb des Hexanukleotid-Konsensus eine entscheidende Rolle für die Bindeaffinität bestimmter bHLH TF spielen (Littlewood *et al.*, 1998; Atchley *et al.*, 1999; Massari *et al.*, 2000). Darüber hinaus gibt es mittlerweile Hinweise dafür, dass bestimmte Reste der zunächst als funktionslos angesehenen Schleifenregion entscheidend für die sequenzspezifische Wahrnehmung bestimmter DNA-Elemente sind, die außerhalb der eigentlichen Bindesequenz liegen (Nair *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2003).

Verschiedene Analysen tierischer bHLH TF teilen diese in sechs Hauptgruppen ein (A bis F), die deren evolutionären Ursprung und strukturelle Ähnlichkeit, sowie ihre DNA Bindespezifität widerspiegeln (Dang *et al.*, 1992; Atchley *et al.*, 1997; Ledent *et al.*, 2001). Zusammenfassend lässt sich diese Einteilung wie folgt charakterisieren. Gruppe A bHLH Proteine können an einen bestimmten E-Box Typus mit der Konsensussequenz 5'-CAGCTG-3' binden und beinhalten unter anderem Faktoren wie MyoD, Twist, Achaete-Scute, Hen, Atonal und Delilah. Gruppe B fasst eine große Gruppe funktionell diverser Proteine, die an G-Box-Motive (5'-CACGTG-3') binden können, zusammen. Zu diesen zählen Proteine wie Pho4 und die R ähnlichen bHLHs sowie eine Subgruppe von bHLH Proteinen, die eine zusätzliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne, einen „Leuzin-Zipper“, im Anschluss an die Helix 2 besitzen (u.a. SREBP, MYC, MAD, TFE und USF). Gruppe C bHLH Proteine enthalten auch eine zusätzliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die PAS Domäne. Dazu zählen die Faktoren Per, Arnt und Sim.

Diese Faktoren binden an *cis*-Elemente, die von dem klassischen E-Box-Motiv abweichen, wie 5'-NACGTG-3' oder 5'-NGCGTG-3'. Zur Gruppe D zählen solche HLH Proteine, die aufgrund eines Fehlens der basischen Region nicht an DNA binden können und daher als Repressoren in Frage kommen, die via konkurrierender Heterodimerisierung agieren. Zur Gruppe D zählen unter anderen Emc, Id und Heira. Die bHLH Proteine der Gruppe E, die von Atchley und Fitch (1997) zunächst zur Gruppe B gezählt wurden, enthalten WRPW-bHLH Proteine wie „Enhancer of Split“ und Hairy, die bevorzugt an N-Boxen (5'-CACGGC-3' oder 5'-CACGAC-3') binden (Ledent *et al.*, 2001). Sie besitzen nur eine geringe Affinität für E-Box-Motive und weisen ein Prolin statt einem Arginin an einem für die DNA-Bindung entscheidenden Rest in der bHLH Domäne auf (Fisher *et al.*, 1998). Die Gruppe F wird von COE-bHLH Proteinen gebildet, die eine zusätzliche COE-Domäne besitzen, die sowohl bei der Dimerisierung als bei der DNA Bindung eine Rolle spielt. Allerdings weichen diese Proteine in ihrer Sequenz relativ stark von den anderen beschriebenen Gruppen ab (Crozatier *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1998; Ledent *et al.*, 2001). Die Fähigkeit zur Dimerisierung und der Erkennung unterschiedlicher E-Boxen bildet in der Vielfalt der Gruppen die Grundlage für eine große funktionelle und regulatorische Diversität in der Kombinatorik verschiedener bHLH Proteine (Fairman *et al.*, 1993).

1.2.2 Funktionen und Regulationsmechanismen pflanzlicherer bHLH-TF

In Pflanzen wurde als erstes bHLH Protein der Faktor Lc beschrieben, der an der Regulation des Anthocyan Biosyntheseweges in Mais beteiligt ist (Ludwig *et al.*, 1989). Bei der genetischen Analyse dieses Biosyntheseweges in Mais wurde eine ganze Gruppe von *bHLH* Genen identifiziert, die für die Bildung des violetten Pigments essentiell sind: *R* (*R-s* und *R-p*), *B*, *Lc*, *Sn* (Neuffer *et al.*, 1997) und *R-ch Hopi* (Petroni *et al.*, 2000). Die von diesen Genen kodierten bHLH TF interagieren zur transkriptionellen Regulation der Zielgene mit Proteinen einer weiteren Familie von Transkriptionsfaktoren, nämlich den R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren *ZmC1* und *ZmP*. Zusammen kontrollieren die Familienangehörigen der R/B-TF-Familie in Mais zusammen mit ihren MYB-Interaktionspartnern die gewebsspezifische Pigmentierung in Mais. Die Interaktionsfähigkeit der bHLH- und MYB-

Transkriptionsfaktoren konnte auch bereits in *A. thaliana* nachgewiesen werden. So zeigen GLABRA3 (*AtbHLH001/GL3*) (vgl. Abb. E4) und GLABROUS1 (*AtMYB0/GL1*;) die an der Regulation der Epidermisdifferenzierung bei der Trichom- und Wurzelhaarbildung beteiligten sind, ebenso Interaktionspotential (Payne *et al.*, 2000), wie die die Synthese kondensierter Tannine in der Samenschale regulierenden Faktoren TRANSPARENT TESTA 2 (*AtMYB123/TT2*) und TT8 (*AtbHLH042*, vgl. Abb. E4) (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). GL3 und TT8 sind zwei strukturell eng verwandte *AtbHLH* Proteine, die die MYB/bHLH Interaktion auch in *A. thaliana* als einen allgemeinen Mechanismus der Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktorklassen zur Regulation unterschiedlicher Stoffwechselwege und Prozesse unter Beweis stellen. Zunehmende Evidenz gibt es dafür, dass außer den bHLH und den MYB Transkriptionsfaktoren auch noch eine weitere Transkriptionsfaktor-Familie an der transkriptionellen Regulation durch bHLH und MYB Faktoren beteiligt ist.

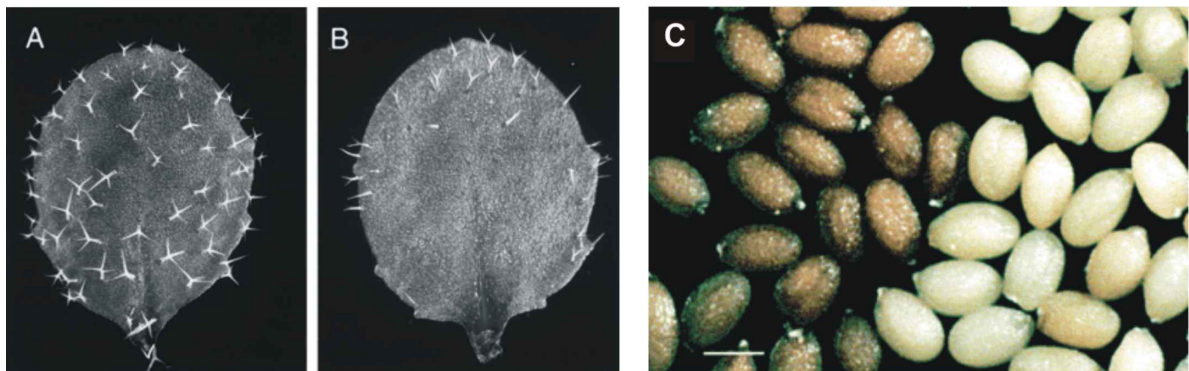


Abb.E4.: Phänotypen der *AtbHLH*-Mutanten *gl3* (B) und *tt8* (C, rechts) (Quellen: Nesi *et al.*, 2000 und Payne *et al.*, 2000). **A)** viertes Rosetten-Blatt einer *A. thaliana* Wildtyp Pflanze, Ökotyp *Landsberg erecta* (*Ler*) **B)** viertes Rosettenblatt der *Ler gl3-1* Mutante **C)** Samen des *A. thaliana*-Ökotyps Wassilewskija-2 (WS-2); im Vergleich Wildtyp (links) und *tt8-deb122* Mutante (rechts); der Größenstandard (weißer Balken) im rechten Bild entspricht 300μm.

Zahlreiche bHLH/MYB Kombinationen, die in der Regulation unterschiedlicher pflanzlicher Biosynthesewege und Entwicklungsprozesse involviert sind, interagieren mit WD40-Proteinen (Nesi *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001). Ausführliche genetische Studien in *Petunia hybrida*, in denen eine Beteiligung des bHLH Faktors AN1 zusammen mit dem MYB-Faktor AN2 und dem WD40-Protein AN11 am Anthocyanstoffwechsel gezeigt wurden, untermauern diese komplexere

Sichtweise (de Vetten *et al.*, 1997; Mol *et al.*, 1998; Quattrocchio *et al.*, 1999; Spelt *et al.*, 2000). Ob es sich dabei um einen stabilisierenden oder vielleicht eher modifizierenden Vorgang handelt, bleibt zunächst ungeklärt. Allerdings ist gezeigt, dass die Interaktion lediglich einseitig stattfindet. Und zwar interagieren nur der bHLH und WD40 bzw. der bHLH und der MYB Faktor miteinander. WD40 und MYB Faktoren können anscheinend nicht interagieren; so gezeigt für die Interaktion von GL3 mit GL1 und TRANSPARENT TESTA GLABRA1, einem WD40-Protein (Payne *et al.*, 2000).

Seitdem Lc als erster pflanzlicher bHLH-Faktor veröffentlicht wurde, wurden nur wenige pflanzliche bHLH Proteine untersucht und beschrieben. Dadurch blieb diese Familie in Pflanzen weitgehend uncharakterisiert, was die Anzahl, Struktur und Funktion der bHLHs anbelangt. Jedoch gibt es eine gewisse Zahl an bHLH Proteinen, die für einige Schlüsselstellen in der Entwicklung und der Reaktion auf belebte und unbelebte Umwelt von großer Relevanz sind. Bisher gibt es zu folgenden bHLH Proteinen nähere funktionelle Studien:

Zwei der publizierten *AtbHLHs* sind die sequenzähnlichsten bHLHs zu den bereits oben erwähnten *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH042/TT8*. *AtbHLH002/EGL1* (ENHANCER of GLABRA3, die Abkürzung EGL1 ist dabei unglücklich gewählt, aber so zunächst publiziert worden, Bernhardt *et al.*, 2001) und *AtbHLH012/AtMYC1* bilden somit zusammen mit TT8 und GL3 die Gruppe der ZmSn-ähnlichen bHLH Proteine im *A. thaliana* Genom. Der durch Duplikation entstandene GL3 ähnlichste bHLH *AtbHLH002/EGL1* weist dabei auch eine funktionelle Überlappung mit GL3 auf. Beide sind an der Regulation der Differenzierung der Trichomvorläuferzellen der Epidermis und an der Wurzelhaarentwicklung beteiligt (Payne *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Neben ihrer Funktion in der Trichom- und Wurzelhaarbildung sind jedoch auch Auswirkungen auf die Regulation der Flavonoidbiosynthese nicht auszuschließen (Zhang *et al.*, 2003).

Der „transparent testa“ Phänotyp der *tt8*-Mutante wiederum und die Expression von *TT8* während der Samenentwicklung und in jungen Keimlingen legt eine gewebs- und phasenspezifische Regulation der beiden Flavonoidbiosynthesegene *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE (DFR)* und *BANYULS (BAN)* nahe, deren Expression in der *tt8*-Mutante deutlich reduziert ist (Nesi *et al.*, 2000). Der vierte Faktor *ATMYC1* ist der Lc ähnlichste bHLH im Arabidopsis Genom. Eine

Überexpression des Mais Anthocyan-Biosyntheseregulators Lc in *A. thaliana* resultiert in einer höheren Trichomdichte und gesteigerten Anthocyankonzentration verglichen mit Wildtyp-Pflanzen (Lloyd *et al.*, 1992). Auch wenn hier Lc in einem heterologen System exprimiert wurde, legen diese Beobachtungen doch nahe, dass strukturell ähnliche Transkriptionsfaktoren artübergreifend orthologe Prozesse regulieren können. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass Überexpression, egal ob solche arteigener Gene oder homologer Faktoren aus anderen Spezies, aufgrund der hohen Expressionsrate auch zu Artefakten führen können, die nicht aus der eigentlichen Funktion der Faktoren herrühren. *AtbHLH012/ATMYC1* selbst wurde in einer systematischen Suche nach bHLH kodierenden Genen in *A. thaliana* aus einer cDNA-Bank isoliert. Die Expressionsstudien zeigten eine geringe Expression in Blättern und eine starke Expression in sich entwickelnden Samen (Urao *et al.*, 1996). Genaue funktionelle Studien fehlen jedoch bis heute.

Wenige Tage vor Abgabe dieser Arbeit erschien als Online-Vorabpublikation ein Artikel zu der Gruppe der Sn-ähnlichen *AtbHLH* mit *AtbHLH001/GL3*, *AtbHLH002/EGL1* (dort sinnvollerweise als EGL3 publiziert) und *AtbHLH042/TT8*, der ein regulatorisches Netzwerk dieser *AtbHLH*s zusammen mit mehreren *AtMYB*-Faktoren und TTG1 analysiert (Zhang *et al.*, 2003). Da die Arbeit zu kurz vor der Abgabe stand, um noch Änderungen an den Graphiken bezüglich der Namensgebung EGL1→EGL3 vorzunehmen, wird in den Abbildungen und im Text dieser Arbeit weiterhin von EGL1 die Rede sein. Auf die dort publizierten Daten wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

Neben den Publikationen zu den *ZmSn*-ähnlichen *AtbHLH*-Faktoren gibt es noch einige weitere funktionelle Studien zu *AtbHLH*-Faktoren. Allerdings ist das Spektrum der bereits gezeigten Funktionen für bHLH-Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* noch recht klein und über die Interaktionsdomäne zu den MYB-Transkriptionsfaktoren noch wenig bekannt, außer dass sie im aminoterminalen Bereich zu suchen ist (Payne *et al.*, 2000). Die Autoren schränken für GL3 den Interaktionsbereich zum *AtMYB*-Faktor GL1 auf die ersten 100 Aminosäuren des Proteins ein und beschreiben die Region zwischen den Aminosäureresten 200 und 400 als relevanten Bereich für die TTG1-Interaktion. Eine aus dem vergangenen Jahr stammende Publikation könnte jedoch wegweisend für die Untersuchungen zur Interaktion mit *AtMYB*-Transkriptionsfaktoren oder möglichen anderen Proteinen

sein. So wurde erstmals eine dominante Punktmutation in einem für einen *AtbHLH*-Faktor kodierendem Gen, *ATR2*, beschrieben, die nicht ein verfrühtes STOP-Kodon oder eine Leserahmenfehler verursacht (vgl. mit *g13-1*). Das *atr2D* Allel führt zu einem nichtkonservativen AS-Austausch von Aspartat zu Asparagin im N-terminalen Bereich von *AtbHLH005/ATR2* innerhalb der ersten 100 Aminosäuren (Smolen *et al.*, 2002). Es handelt sich dabei um eine Region, die, außerhalb der bHLH-Domäne liegend, in einer Vielzahl von *AtbHLH* Faktoren und den meisten R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren im Pflanzenreich hochkonserviert ist. Eben auch in *AtbHLH001/GL3* und zwar im äußersten Aminoterminus zwischen den Aminosäureresten 30 bis 60. Die Mutation, die in der untersuchten Linie einen deutlichen Expressionsanstieg von Genen des Tryptophan-Stoffwechsels und einiger stressregulierten Gene zeigte, führt, wenn man das *atr2D*-Allel in Pflanze überexprimiert, zu einigen pleiotropen Effekten. Zu diesen zählen reduziertes Wachstum, eine dunkle Pigmentierung und Sterilität. Ein MYB-Transkriptionsfaktor, *ATR1*, der ebenfalls Auswirkungen auf den Tryptophan-Stoffwechsel hat, konnte jedoch nicht als Interaktionspartner bestätigt werden. *ATR1* und *ATR2* scheinen in unterschiedlichen Punkten der Regulation in den Tryptophan-Stoffwechsel einzugreifen.

Ein weiterer funktionell untersuchter *AtbHLH*-Faktor ist das *rd22BP1* Protein (*AtbHLH006/rd22BP1/RAP-1*), das erstmals im Zusammenhang mit Untersuchungen an einem Abscisinsäure (ABA)- und Trockenstress-induzierbaren Minimal-Promoter des *rd22* Gens beschrieben wurde (Abe *et al.*, 1997; de Pater *et al.*, 1997). Der 67 bp lange Promotor beinhaltet als cis-aktive Elemente sowohl zwei bHLH-Bindestellen (beide 5'-CACATG-3') als auch eine MYB Erkennungsstelle (MRE; 5'-TGGGTTA-3') in direkter Nachbarschaft. *AtbHLH006/RAP1/Rd22BP1* bindet spezifisch an die erste bHLH-Bindestelle im *rd22* Promotor und führt somit zur Initiation der Transkription. Erste molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass *rd22BP1*, genauso wie sein Zielgen, ABA und Trockenstress-reguliert ist. Darüber hinaus zeigten transiente Ko-Überexpressionsstudien in Arabidopsis Protoplasten, dass *rd22BP1* in der Lage ist den *rd22*-Minimal-Promotor zu aktivieren. Das gleiche gilt für *AtMYB2*. Eine Kombination aus *rd22BP1* und *AtMYB2* resultierte in 3fach höheren Aktivierungsraten. Der als Kontrolle benutzte bHLH Faktor *AtbHLH012/AtMYC1* führte zu keiner Aktivierung (Abe *et al.*, 1997).

Ende letzten Jahres wurden dann drei Vertreter der AtbHLH-Familie, AtbHLH044/BEE1, AtbHLH058/BEE2 und AtbHLH050/BEE3 (BR Enhanced Expression) mit verschiedenen Stoffwechselwegen und Entwicklungsprozessen in Verbindung gebracht (Friedrichsen *et al.*, 2002).



Abb.E5: Keimlingsphänotyp der *bee1-bee2-bee3* Dreifachmutante (Quelle: Friedrichsen *et al.*, 2002). Die Dreifachmutanten haben im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen deutlich kürzere Hypokotylen und Wurzeln

Es handelt sich bei diesen drei Faktoren um redundante, positive Regulatoren des frühen Brassinosteroid (BR) Signalweges, die aber auch den zum BR-Signalweg antagonistisch agierenden Abscisinsäure-Signalweg beeinflussen. Dabei weisen die drei AtbHLH-Faktoren eine funktionelle Redundanz auf, so dass erst eine Dreifachmutante verschiedene

Keimlings- und Blütenphänotypen aufweist, die mit dem Brassinosteroid abhängigen Signalweg in Verbindung zu bringen sind (vgl. Abb.E5).

ABORTED MICROSPORES (AtbHLH021/AMS, Sorensen *et al.*, 2003) reguliert die Pollenentwicklung im post-meiotischen Stadium. Eine T-DNA-Insertion im achten Exon des Gens führt daher zu einem männlich sterilen Phänotyp. Homozygote Mutanten haben keinerlei reife Pollen, da diese direkt nach der Freisetzung der Mikrosporen degenerieren. Darüber hinaus sind die Staubbeutel verkürzt und liegen bereits bei der Blütenöffnung unterhalb der Narbe.

Der PHYTOCHROM INTERACTING FACTOR3 (PIF3) ist ein weiteres Beispiel für vielfältige Interaktionen von bHLH und anderen Faktoren. PIF3 ist ein am Phytochrom-regulierten, lichtresponsiven Signalweg beteiligter bHLH Faktor, der zunächst in einem Hefe-2-Hybrid (YTH) Versuchsansatz identifiziert werden konnte (Ni *et al.*, 1998). Erste molekulare Analysen zeigten, dass PIF3 ein G-Box bindendes Protein ist, das bevorzugt mit der aktivierten Form von Phytochrom interagiert und an der Regulation der Expression lichtregulierter MYB-Gene, wie *CCA1* und *LHY*, beteiligt ist (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Phytochrome sind photosensorische Rezeptormoleküle, die auf bisher ungeklärtem Wege Umgebungslichtsignale

weiterleiten und zu einer nukleären Antwort der Genaktivierung führen. [Phytochrome sind wasserlösliche, bläuliche Chromoproteide mit einer offenen Tetrapyrrol-Verbindung als Pigment. Hellrotes Licht (660 nm) wandelt P660 (phytochrome red, Pr., absorbiert rotes Licht bei 660 nm) in P730 (phytochrome far red, Pfr., absorbiert dunkelrotes Licht bei 730 nm) um; dunkelrotes Licht macht die Umwandlung rückgängig.]. Analysen an Photorezeptormutanten von *phyA* und *phyB* haben gezeigt, dass *phyA* alleine verantwortlich ist für die Wahrnehmung von kontinuierlichem, dunkelrotem Licht, während *phyB* der Hauptphotorezeptor für die Wahrnehmung von Rotlicht bei der Deetiolierung von Keimlingen ist (Quail *et al.*, 1995). PIF3 bindet bevorzugt an die aktivierte Form des Phytochrom B (*phyB*), die biologisch aktive Pfr-Form, und zwar am photoinaktiven C-Terminus (Ni *et al.*, 1999). Jedoch ist auch eine Bindung der C-terminalen Domäne von Phytochrom A (*phyA*) gezeigt worden (Quail, 2000), allerdings mit deutlich geringerer Affinität. Die Feststellung, dass Transkriptionsfaktoren, insbesondere bHLH Faktoren, direkt an aktivierte Formen von Phytochrom binden können, weist völlig neue Wege der Signaltransduktion auf. So legen die Ergebnisse nahe, dass eine Translokation des Photorezeptors und anschließende Bindung eines Transkriptionsfaktors in den Nukleus erfolgt und dann direkt zur Genaktivierung führt (Quail, 2000). Für PIF3 konnte bereits gezeigt werden, dass er konstitutiv nukleär lokalisiert ist (Ni *et al.*, 1998).

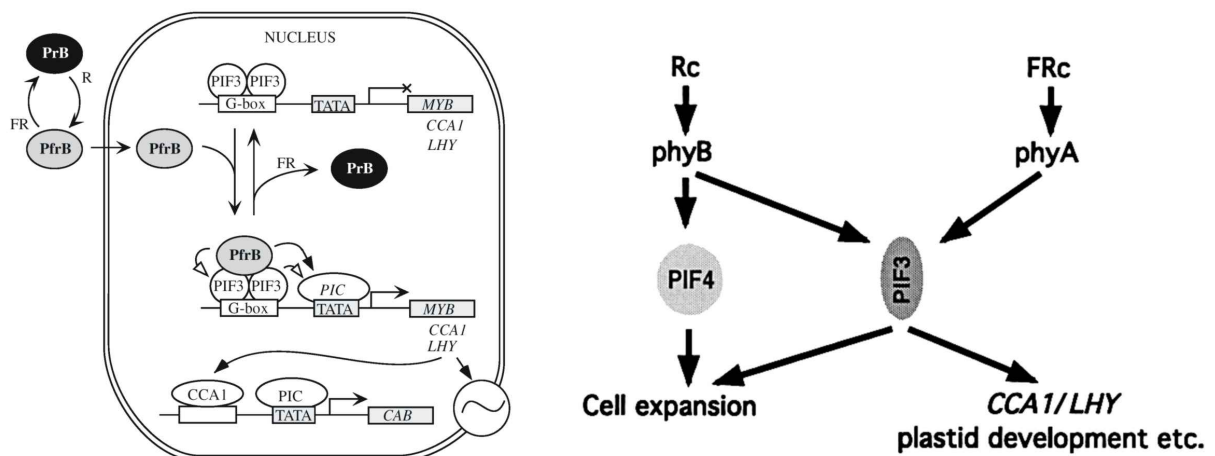


Abb.E6: Für den Phytochrom-Signalweg postuliertes Modell (Quellen: Quail, 2002 sowie Huq und Quail, 2002). Dabei bleibt ungeklärt, ob die PIF-Phytochrom-Interaktion erst im Nukleus stattfindet, wie links angedeutet oder schon im Cytoplasma erfolgt (vgl. Ni *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu PIF3 wirkt sich PIF4 nur auf das Zellwachstum aus und scheint ausschließlich am *phyB*-Signalweg beteiligt zu sein.

Der PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (*AtbHLH009/PIF4*) wurde im Gegensatz zu PIF3 nicht bei einer Interaktionssuche identifiziert, sondern als Mutationslocus *sr12* (short under red light2) beschrieben (Huq *et al.*, 2002). Die Mutation bewirkt eine Hypersensitivität gegenüber kontinuierlichem Rotlicht, nicht allerdings gegenüber dunkelrotem Licht. *AtbHLH009/PIF4/SRL2* bindet ebenfalls bevorzugt an die biologisch aktive Pfr-Form des phyB und zeigt wie PIF3 (Zhu *et al.*, 2000) eine geringe Affinität zu phyA. PIF4 ist ebenfalls nukleär lokalisiert und kann an G-Box-Motive binden. Da außer der Hypersensitivität gegenüber Rotlicht keine Phänotypen oder pleiotropen Effekte zu beobachten sind, liegt die Vermutung nahe, dass PIF4 nur am phyB-Signalweg beteiligt ist und sich nur auf die Regulation von Genen des Zellwachstums auswirkt (vgl. Abb. E6). Im Gegensatz scheint die Regulation durch PIF3 eher generellen Charakter zu besitzen (Huq *et al.*, 2002). PIF4 enthält ebenfalls wie PIF3 eine weitere Interaktionsdomäne. Direkt im Anschluss an die bHLH-Domäne findet sich eine PAS-Domäne (Per-Arnt-Sim-like-domain, Kay, 1997; Dunlap, 1998), die allerdings weniger gut konserviert ist als in PIF3 (Huq *et al.*, 2002). Ob die PAS-Domäne tatsächlich für die Phytochromeinteraktion entscheidend ist (Ni *et al.*, 1998) bleibt daher unklar, wenn nicht unwahrscheinlich. Die Expression von PIF4 ist sowohl durch Rotlicht als auch durch dunkelrotes Licht induzierbar.

LONG HYPOCOTYL IN FAR RED LIGHT (*AtbHLH026/HFR1*) ist ein dritter bHLH Faktor, für den eine Beteiligung am Phytochrom-Signalweg nachgewiesen werden konnte (Fairchild *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002). Die *hfr1* Mutante weist eine deutlich reduzierte Antwort der Keimlinge auf kontinuierliches dunkelrotes Licht auf, wodurch die Keimlinge eine leichte Streckung des Hypokotyls verglichen mit Wildtyppflanzen aufweisen. Während die Spezifität von PIF 3 und PIF4 eher auf Seiten von phyB liegt, scheint HFR1 eine Rolle im phyA-Signalweg zu spielen, da die *HFR1*-Expression unter dunkelroten Lichtbedingungen stark hochreguliert ist. Jedoch kann HFR1 nicht an Phytochrom binden, obwohl er strukturell recht ähnlich zu den beiden Phytochrominteragierern ist. Aufgrund der strukturellen Homologie besitzt das Protein allerdings die Fähigkeit zur Heterodimerisation mit PIF3. Während HFR1 als Homodimer nicht in der Lage ist phyA oder phyB zu binden, bindet das Heterodimer PIF3/HFR an beide Formen des Phytochroms. Neuere

Untersuchungen zeigen, dass HFR1 unterhalb von COP1 in einem HY5-unabhängigen Signalweg agiert (Kim *et al.*, 2002).



Abb.E6: *spt-2*-Schotenphänotyp
Die Septum-Bildung bleibt auf die basale Hälfte beschränkt während sich Samen nur am apikalen Ende bilden. (Quelle: Heisler *et al.*, 2001)

Sieht man sich dagegen die Funktion eines weiteren eng verwandten *AtbHLHs*, ALCATRAZ (*AtbHLH073*), an, so findet man hier eine enge Gewebsspezifität, während seine Funktion ebenfalls in die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane fällt. ALCATRAZ ist während der Schotenreife für die Ausbildung einer nichtlignifizierten zellulären Trennschicht zuständig, die beim Austrocknen der reifen Schote eine Trennung bzw. ein Aufplatzen der Schotenhälften ermöglicht. Die Mutation bzw. Expression von Antisense-Konstrukten zeigen daher einen Defekt in der Schotenreife, der dazu führt, dass man zur Samenernte die Schoten manuell aufbrechen muss (Rajani *et al.*, 2001).

SPATULA (*AtbHLH024*), ein ebenfalls strukturell recht eng verwandtes *AtbHLH*-Protein zu den Phytochrominteraktoren PIF3 und PIF4 ist ein Faktor, der für gewebespezifische Entwicklungsphasen zuständig ist (Heisler *et al.*, 2001) (vgl. Abb.E6). Da er in die Wachstumsregulation des Fruchtblatt-Randgewebes und des daraus hervorgehenden Pollenleitergewebes involviert ist, ist SPT der erste bHLH Faktor, für den ein Bezug zur Blütenorganentwicklung beschrieben wurde. Jedoch ist der Faktor auch in weiteren Geweben exprimiert und sein Expressionsprofil lässt darauf schließen, dass er ebenfalls eine Rolle in der Abscissionsregulation spielen könnte.

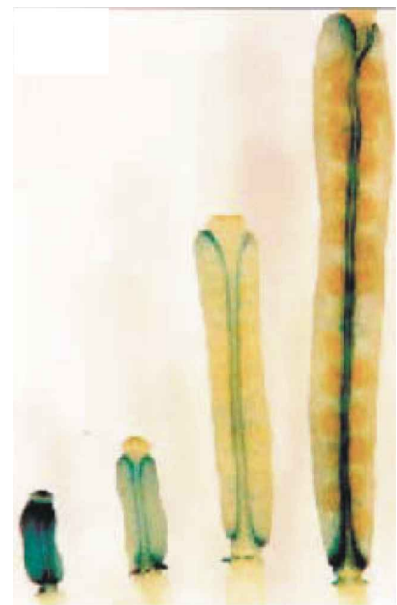


Abb.E7: mRNA-GUS Lokalisationsanalyse der *SPT*-Expression in sich entwickelnden Schoten. (Quelle: Rajani *et al.*, 2001)

Mit PIL1 (PIF3 LIKE 1; AtbHLH124) wurde schließlich auch ein AtbHLH identifiziert, der eng mit der Funktion und Regulation der biologischen, Tagesrhythmik bestimmenden Uhr der Pflanze in Verbindung steht (Makino *et al.*, 2002). Wie die zuvor beschriebenen AtbHLHs PIF4, SPATULA und ALCATRAZ ist auch PIL1 strukturell sehr ähnlich zu PIF3. Bei Untersuchungen, die die Tagesrhythmik und die innere Uhr von *A. thaliana* zum Ziel hatten wurden zahlreiche, lichtabhängig regulierte Gene identifiziert, zu deren bestcharakterisierten *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) und *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY) zählen. Diese sind zur Klasse der MYB-Transkriptionsfaktoren zu zählen (Wang *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1999) und haben Auswirkungen auf die Expression Tagesrhythmik abhängiger Gene (Wang *et al.*, 1998; Piechulla, 1999). TIMING OF CAB 1 (TOC1) ist ein ebenfalls nukleär lokalisiertes Protein, dessen Gen auch der tagesrhythmischen Regulation unterliegt und im Expressionsmuster am Ende einer wellenartig verlaufenden Expressionskaskade verschiedener Gene steht ($APRR9 \rightarrow APRR7 \rightarrow APRR5 \rightarrow APRR3 \rightarrow APRR1/TOC1$; Matsushika *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2002). Die APRR9 Expression am Anfang der Welle ist dabei ein lichtregulierter Prozess. TOC1 gehört zur CONSTANS Transkriptionsfaktor-Familie und agiert nahe oder sogar als Bestandteil des Oszillators der Tagesrhythmik selbst (Makino *et al.*, 2002). Für APRR1/TOC1 wurde wiederum gezeigt, dass er mit dem beschriebenen Faktor PIL1 im Hefeinteraktionstest ebenso physikalisch interagieren kann, wie PIF3 (Makino *et al.*, 2002). Darüber hinaus hat eine Überexpression direkte Auswirkungen auf die sonst stark Tagesrhythmik abhängige Expression von CCA1 und LHY, was ebenfalls für PIF3 gezeigt ist und somit eine Verbindung zum Phytochromsignalweg herstellt.

Die Bemühungen dem zentralen Oszillator und der Regulation der inneren biologischen Uhr der Pflanzen auf die Spur zu kommen, führten zu weiteren Untersuchungen an möglichen an PIF3 ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die zur Identifizierung weiterer der Tagesrhythmik unterliegenden AtbHLH Faktoren führten. Nachdem für PIL1 untersuchte Mutanten keinerlei die Tagesrhythmik betreffende Phänotypen zeigten, wurden die nächstähnlichen AtbHLH Faktoren bezüglich möglicher Zusammenhänge mit der circadianen Rhythmik untersucht. Dazu zählen die als PIL2 (AtbHLH132), PIL5 (AtbHLH015) und PIL6/PIF1 (AtbHLH065) bezeichneten AtbHLHs (PIL = PIF3-Like) ebenso wie PIF3, PIF4 und HFR1

(Yamashino *et al.*, 2003). In Hefeinteraktionsstudien konnten diese *AtbHLHs* alle, mit Ausnahme von *HFR1*, mit *APRR1/TOC1* physikalisch interagieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PIF4* und *PIL6* einer circadianen Rhythmik unterliegt und lichtreguliert ist. Zusammengenommen ergeben die *PIF3*-ähnlichen Faktoren ein Netzwerk von lichtabhängigen und Tagesrhythmik-bezogenen Regulatoren, deren Funktionen und mögliche Redundanzen weitere Untersuchungen erfordern. Insgesamt lässt sich die Hypothese aufstellen, dass *PIF3* und *HFR1* im Kontext mit den Phytochromen die lichtresponsiven Signalgeber sind, während die circadian kontrollierten Faktoren *CCA1* und *LHY* sowie *PIL6* und *PIF4* in die Regulation des *APRR1/TOC1*-Quintets eingreifen und darüber Signale für Tagesrhythmik, Hypocotyl-Wachstum und Blüteninitiation geben. Hierbei wird eine Verstärkung durch die zusätzliche Lichtinduzierbarkeit der Expression von *PIF4* und *PIL6*, sowie *CCA1* und *LHY* erzielt (Yamashino *et al.*, 2003).

Der bisher einzige im Zusammenhang mit der Kälteanpassung bei *A. thaliana* beschriebene *AtbHLH*-Faktor ist *AtbHLH116/ICE1* (INDUCER OF CBF EXPRESSION 1; Chinnusamy *et al.*, 2003). Die CBF Proteinfamilie sind kältere regulierte Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits wieder eine Vielzahl an Genen regulieren, die für die Reaktion auf eine Abkühlung der Umgebungstemperatur und eine Frosttoleranz entscheidend sind. *AtbHLH116/ICE1* stellt einen vorgeschalteten Faktor dar, der für die Expression der *CBF* Gene wichtig ist. Für *ICE1* ist gezeigt, dass er sowohl an den *CBF3*-Promotor binden, als auch die *CBF3*-Promotor getriebene Reportergenexpression initiieren kann. Eine Mutation im *ICE1* Gen blockiert dagegen die *CBF3* Expression und führt zu geringerer Kältetoleranz der Mutanten (vgl. Abb. E8).



Abb.E8: Verlust der Kälteanpassungsfähigkeit der *ice1* Mutante (Quelle: Chinnusamy *et al.*, 2003)
Im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen (links) zeigen die *ice1* Keimlinge eine deutlich reduzierte Kältetoleranz. Die Keimlinge wurden nach Keimung bei 22°C für 6 Wochen bei 4°C inkubiert.

Erst kürzlich konnten funktionelle Zusammenhänge für zwei weitere *AtbHLH*-Faktoren aufgezeigt werden. Deren Expressionsrate wird durch die ektopische Überexpression eines Zink-Finger-Proteins DOF-Proteins (DNA binding with One Einger) deutlich erhöht (Kang *et al.*, 2003). Der als OBP3 (OBF Binding Protein 3) beschriebene DOF-Faktor, dessen Expression wiederum Salicylsäure (SA) induzierbar ist, verursacht bei ektopischer Überexpression Wachstumsdefizite in *A. thaliana*. Aufgrund ihrer durch OBP3 induzierten Expression wurden sie als *ORG2* und *ORG3* (OBP3 Responsive Genes) bezeichnet. Darüber hinaus wurden die *ORG2*- und *ORG3*-Expression durch SA induziert bzw. durch Jasmonat (JA) unterdrückt. Zielgene für die beiden *AtbHLH*-Faktoren konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Die Fähigkeit, dass bHLH Proteine die Expression von Genen diversifizieren können, indem sie in einem breiten Spektrum unterschiedlicher Interaktionen zusammen mit anderen bHLH-TF Homo- und Heterodimere bilden, mit weiteren Proteinfamilien (R2R3-MYB TF und WD40) interagieren und darüber hinaus noch unterschiedliche Typen an DNA-Sequenzelementen unterscheiden können, macht eine umfassende Analyse der kompletten *AtbHLH*-Familie für die Identifikation möglicher funktioneller Interaktionen und Homologien unentbehrlich.

Im Arabidopsis Genom konnten bisher 32 Genfamilien identifiziert werden, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und mindestens drei oder mehr Mitglieder haben (Riechmann *et al.*, 2000). Jede Familie ist charakterisiert durch eine definierte, eigene Region hochkonservierter Aminosäurereste, die für gewöhnlich die DNA-Bindedomäne beinhaltet. Vergleichende Analysen dieser konservierten Bereiche zeigen, dass es innerhalb der Familien Subgruppen gibt, die strukturell einander ähnlicher sind als andere Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilie. Auch findet man kleinere Motive oder Domänen außerhalb der DNA-Bindedomänen, die Struktur- und Sequenzhomologien aufweisen. Dies legt nahe, dass solche Faktoren, die gemeinsame Motive aufweisen auch innerhalb ihrer Subgruppen überlappende oder gar redundante Funktionen haben könnten. In Gruppen, in denen für einige der Faktoren die Funktionen bekannt sind, gibt es tatsächlich Gene, deren kodierte Funktionen sehr ähnlich sind, auch wenn die Transkriptionsfaktorfamilie an sich eine breit gestreute Funktionsvielfalt aufweist. So unter anderem in den Familien der

AP2-Faktoren (Riechmann *et al.*, 1998), der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktorfamilie (Stracke *et al.*, 2001) oder der MADS-Box-Familie (Becker *et al.*, 2000) oder der bZIP-Faktoren (Jakoby *et al.*, 2002). Daher sollte eine strukturelle Einteilung aller AtbHLH Faktoren eine Richtlinie für mögliche Funktionsvorhersagen darstellen. Allerdings können aufgrund dieser Sequenzähnlichkeiten innerhalb einer Spezies nur sehr eingeschränkt Vorhersagen bezüglich ihrer Phylogenie gemacht werden.

1.2.3 Die MYB Transkriptionsfaktoren

Namensgeber der MYB Transkriptionsfaktorfamilie sind das Produkt des retroviralen Onkogens *v-MYB*, des „avian myeloblastosis virus“ (AMV), und sein zelluläres Gegenstück, das Protoonkogen *c-MYB*. MYB-Proteine wurden, ebenso wie die bHLH-TF, in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen beschrieben. Der erste aus Pflanzen klonierte Transkriptionsfaktor ist der C1-MYB aus Mais (Roth *et al.*, 1991). Man findet MYB-TF sowohl in Pilzen (Tice-Baldwin *et al.*, 1989; Stober-Grässer *et al.*, 1992; Ohi *et al.*, 1994) als auch in Pflanzen (Martin *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1999; Stracke *et al.*, 2001) und Säugetieren (Gonda *et al.*, 1985; Nomura *et al.*, 1988). Die MYB-Transkriptionsfaktoren werden dabei nach dem Vorhandensein von ein bis vier MYB-Domänen in der Proteinsequenz in Gruppen unterteilt.

Die MYB-Domäne repräsentiert eine stark konservierte DNA-Bindedomäne (Thompson *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1999; Stracke *et al.*, 2001), die in ihrer Sequenzkonservierung zwischen Pflanzen- und Tierreich nur wenige Unterschiede aufweist. Die MYB-Domäne in tierischen Organismen besteht aus drei, je 51 - 53 Aminosäuren langen, unvollkommenen Sequenzwiederholungen, die als R1, R2 und R3 bezeichnet werden (Frampton *et al.*, 1989). Im Abstand von je 18 bis 19 Aminosäuren finden sich konservierte Tryptophanreste, die den hydrophoben Kern der MYB-Bindungsdomäne bilden (Ogata *et al.*, 1992; Ogata *et al.*, 1994). Jede dieser drei Sequenzwiederholungen kodiert für drei α -Helices, wobei jeweils die zweite und die dritte Helix eine Helix-Turn-Helix (HTH)-Struktur, ähnlich dem HTH-Motiv des Lambda-Repressors aus *E.coli*, sowie der DNA-bindenden Domäne der Homöoboxproteine, ausbilden (Frampton *et al.*, 1989; Ogata *et al.*, 1992; Ogata *et al.*, 1994). Während die Sequenzwiederholungen R2 und R3 funktionell in die sequenzspezifische Bindung der DNA involviert sind, scheint dafür die R1-

Wiederholung unwichtig zu sein (Saikumar *et al.*, 1990; Gabrielsen *et al.*, 1991). Dabei liegen bei cMYB die R2/R3-Wiederholungen eng gepackt in der großen Furche der DNA. Der Kontakt zur DNA erfolgt jeweils über die dritte Helix jeder Wiederholung, die auch in Kontakt mit der Erkennungshelix der anderen Wiederholung tritt. Zur kooperativen Bindung der DNA sind also beide Wiederholungen nötig (Ogata *et al.*, 1994). Für die tierischen MYB-Proteine ist gezeigt, dass sie spezifisch an sogenannte TYP I-Sequenzen: (5'-CAACNG-3' oder 5'-TAACNG-3') (Howe *et al.*, 1991; Weston, 1992; Grotewold *et al.*, 1994). Funktionell sind tierische MYBs bisher in der Zellzykluskontrolle, der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen und der Apoptose beschrieben worden (Ganter *et al.*, 1999; Ganter *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 1999). Weitere MYB-Proteine, wie z.B. die cdc5-verwandten Proteine und die MIDA-1-ähnlichen Proteine, deren MYB-Domäne von der DNA-Bindedomäne typischer 3R-MYB-Transkriptionsfaktoren abweicht, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Zellteilung (Braun *et al.*, 1999). Mitglieder einer anderen Familie von MYB-Faktoren mit nur einer Sequenzwiederholung, die sowohl in Hefe, als auch bei Tieren und Pflanzen konserviert sind, erkennen und binden G-reiche Sequenzen im Bereich der Telomere (Bilaud *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2001).

Während es im Tierreich, in den bisher untersuchten Organismen, nur wenige Vertreter der MYB-Familie gibt (Lüscher *et al.*, 1990; Graf, 1992; Thompson *et al.*, 1995; Lipsick, 1996), stellen die R2/R3-MYB-Faktoren in Pflanzen eine der größten Transkriptionsfaktorfamilien dar (Martin *et al.*, 1997; Kranz *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Pflanzliche MYB-Transkriptionsfaktoren binden sequenzspezifisch an Typ II-Sequenzen (5'-C/TAA^CA/TAC^C/AC-3') oder an Sequenzen vom Typ IIC (5'-C/TACCA^C/TAC^C/AC-3'). Lediglich der Faktor *PhMYB3* aus *Petunia hybrida* kann neben Typ II- auch Typ I-Sequenzen erkennen (Grotewold *et al.*, 1994; Sablowski *et al.*, 1994; Solano *et al.*, 1995; Sainz *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1997). Außerdem finden sich in der Nähe des carboxyterminalen Endes der pflanzlichen MYB-Proteine oft mehrere Serin- und Threonin-Reste, die potentielle Substrate für Proteinkinasen darstellen. Es könnte also sein, dass die Aktivität bzw. Stabilität pflanzlicher MYB-Transkriptionsfaktoren posttranskriptional durch Phosphorylierung beeinflusst werden kann, was für c-MYB bereits gezeigt werden konnte (Lüscher *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1991; Bies *et al.*, 2001; Petrovas *et al.*,

2003). Dies wird durch Studien an *AmMYB340* aus *Anthriscum majus* untermauert, der für eine effektive DNA-Bindung dephosphoryliert vorliegen muss (Moyano *et al.*, 1996). Bekannte Funktionen der pflanzlichen MYB-Faktoren beinhalten, die Kontrolle der Zelldifferenzierung und -morphogenese, die Beteiligung an hormoninduzierten Signaltransduktionsprozessen, die Steuerung der Tryptophanbiosynthese, die Regulation bestimmter Prozesse der Phytopathogenabwehr und die Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels.

Mit ihrer MYB-Domäne im aminoterminalen Bereich sind die pflanzlichen MYB-Faktoren den tierischen MYBs strukturell recht ähnlich (Solano *et al.*, 1997) und man kann sie anhand der Anzahl der vorhandenen Sequenzwiederholungen in 3 Gruppen einteilen. Die nur eine Sequenzwiederholung enthaltenden 1R-MYB-Proteine, die R2R3-MYB-Proteine mit 2 Sequenzwiederholungen und die MYB-3R-Proteine mit 3 Sequenzwiederholungen. *AtMYB4R*, bildet mit 4 Sequenzwiederholungen eine Ausnahme in *A. thaliana* (Stracke *et al.*, 2001). Die Gruppe der MYB-3R-Transkriptionsfaktoren ist in *A. thaliana* mit 5 Proteinen vertreten, die ähnlich wie die MYB-Proteine in tierischen Organismen, an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind (Ito *et al.*, 2001). Für die Gruppe der 1R-MYBs wird davon ausgegangen, dass es in *A. thaliana* mehr als 50 1R-MYB-Proteine gibt (Riechmann *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* sind Vertreter dieser Gruppe, wie LHY (LONG HYPOCOTYL) und CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) als Teil des circadianen Oszillators direkt an den photoperiodischen Reaktionen der Pflanzen beteiligt (Green *et al.*, 2002), während CAPRICE (CPC), TRIPTYCHON (TRY) und *AtMYBL2* in die Regulation der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung eingreifen (Wada *et al.*, 1997; Schnittger *et al.*, 1999; Kirik *et al.*, 2001; Sawa, 2002). Weitere pflanzliche Vertreter der 1R-MYB Proteine sind MYBSt1 aus *Solanum tuberosum* (Baranowskij *et al.*, 1994) und *PcMYB1* aus *Petroselinum crispum* (Feldbrügge *et al.*, 1997). Was die Gruppe der R2R3-MYB-Proteine anbelangt, so wurden in *Arabidopsis* bisher 125 R2/R3-MYB-Gene identifiziert (Stracke *et al.*, 2001). Die meisten pflanzlichen MYB-Proteine besitzen somit lediglich zwei der in c-MYB vorhandenen drei Sequenzwiederholungen (Paz-Ares *et al.*, 1987; Marocco *et al.*, 1989; Cone *et al.*, 1993; Wissenbach *et al.*, 1993; Stracke *et al.*, 2001). Die Expansion dieser Familie erfolgte demnach wahrscheinlich nach dem Verlust der R1-Sequenzwiederholung (Jin *et al.*, 1999). Die Proteine, die außerhalb der MYB-

Domäne sehr divergent sind, lassen sich anhand von Sequenzhomologien in der MYB-Domäne und die Konservierung einzelner Motive im carboxyterminalen Bereich in 22 Untergruppen in *A. thaliana* einteilen (Stracke *et al.*, 2001). Während für einige Vertreter der R2R3-MYB-Proteine gezeigt wurde, dass sie eine carboxyterminale Domäne besitzen, die für eine Transkriptionsaktivierung verantwortlich ist (Goff *et al.*, 1991; Moyano *et al.*, 1996; Sainz *et al.*, 1997), wurden bei anderen bestimmte Sequenzmotive mit Repressorfunktionen in Zusammenhang gebracht (Jin *et al.*, 2000). Allerdings ist die Funktion der MYB-Domäne nicht nur auf die DNA-Bindung beschränkt, sondern sie dient auch der Protein-Protein-Interaktion, z.B. mit der Klasse der bHLH TF (Goff *et al.*, 1992).

Wie auch die bHLH TF werden die R2R3-MYB-Proteine in Pflanzen mit den unterschiedlichsten biologischen Funktionen in Verbindung gebracht. Während einige auf Stressfaktoren wie Austrocknung und UV-Strahlung oder auf Pathogenbefall und hormonelle Induktion reagieren (Urao *et al.*, 1993; Kirik *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 2003), sind andere MYB-Transkriptionsfaktoren an Prozessen wie der Spross- oder Blattmorphogenese, der Blütenbildung oder der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung beteiligt (Schneeberger *et al.*, 1998; Byrne *et al.*, 2000; Galego *et al.*, 2002). Einige MYBs in *A. thaliana* sind an der Keimungsfähigkeit bzw. direkt an der Samenkeimung beteiligt: *AtMYB61* ist in der Samenhülle für die Produktion von Pektinen, die während der Keimung eine Schleimhülle bilden, mit verantwortlich; (Penfield *et al.*, 2001) und *AtMYB44* und *AtMYB77*, deren Expression in der späten Embryogenese erhöht ist, regulieren wahrscheinlich den Übergang von der Ruhephase zur Keimung (Kirik *et al.*, 1998).

Die bestuntersuchte Gruppe der pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren, sind die an der Regulation des Phenylpropanoidbiosynthesewegs und an der Trichom- bzw. der Wurzelhaarentwicklung beteiligten MYBs. Sie zeichnen sich durch strukturelle Homologie in den Sequenzwiederholungen aus und bilden in der strukturellen Einteilung (Stracke *et al.*, 2001) eine gemeinsame Subgruppe, die Faktoren wie GLABRA 1 (*AtMYB0/GL1*), WEREWOLF (*AtMYB66/WER*), TRANSPARENT TESTA 2 (*AtMYB123/TT2*) enthält. Für einige dieser Proteine konnte gezeigt werden, dass sie zusammen mit bHLH-Faktoren interagieren und gemeinsam Zielgene aktivieren (Goff *et al.*, 1992; Quattrocchio *et al.*, 1998; Payne *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001).

Aufgrund einer Vielzahl funktioneller Studien ist die Regulation der Flavonoidbiosynthese in *Zea mays* eines der am besten untersuchten Beispiele für Genregulation durch kombinatorische Interaktionen von bHLH und MYB-Transkriptionsfaktoren, wobei sich orthologe Regulationsmechanismen in *A. thaliana* und *Petunia hybrida* finden, die bisher jedoch nur unzureichend aufgeklärt waren. Das C1-Protein aus *Zea mays* (Paz-Ares *et al.*, 1987) aktiviert die Transkription von an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Genen in der Aleuronschicht des Maiskorns. C1 induziert die Expression von C2 (= *CHS*), A1 (= *DFR*), A2 (= *AS*), Bz1 (= UDP-Glukose-Flavonol-3-O-glykosyltransferase, UGFT) und Bz2 (= Glutathion-S-Transferase, GST). Das Protein PL ist das funktionelle Äquivalent zu C1 und wird für die Pigmentierung bestimmter vegetativer und reproduktiver Gewebe benötigt (Cone *et al.*, 1993). C1/PL sind zur Transaktivierung auf die Anwesenheit eines bHLH-Faktors aus der R-Familie (R, Lc, Sn, B) angewiesen (Cone *et al.*, 1986; Chandler *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1989; Cone *et al.*, 1993). Diese Abhängigkeit wird durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Goff *et al.*, 1992). In Mais wird die Phlobaphensynthese, ein Zweig der Flavonoidbiosynthese, durch das MYB-Homolog P reguliert. Die roten Phlobaphene kommen im Mais, anders als Anthocyane, die in den meisten Pflanzenteilen vorkommen, hauptsächlich im Samen-Perikarp und bestimmten Blütenteilen vor. Genetische Studien ergaben, dass P der einzige Faktor in Mais ist, der die Phlobaphensynthese reguliert. Die Aminosäuresequenz der DNA-Bindungsdomänen von P und C1 sind zu 80% identisch (Grotewold *et al.*, 1991). Signifikante Übereinstimmungen im C-Terminus der beiden Proteine fehlen. P kontrolliert die Expression von *CHS*, *CFI* und *DFR*, die für die Bildung von 3-Deoxy-Flavonoiden und Phlobaphenpigmenten benötigt werden. Die anthocyanspezifischen Gene für *AS*, *UGFT* und *GST* werden nicht durch P aktiviert (Dooner *et al.*, 1991). Anders als C1 ist P zur Transaktivierung nicht von der Interaktion mit einem bHLH-Protein abhängig, sondern aktiviert die Transkription seiner Zielgene allein (Grotewold *et al.*, 1994). Der unterschiedliche Effekt von R auf C1 und P könnte die unterschiedlichen Zielgen-Spezifitäten bei den 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 Pigment1 =

AtMYB75) und *PAP2* (*AtMYB90*) zur verstärkten Produktion von Anthocyaninen in *Arabidopsis*, aber auch in transgenen Tabak-Pflanzen (Borevitz *et al.*, 2000). Die *AtMYB75*-Überexpression, so konnte gezeigt werden, resultiert in einer erhöhten Expression der Gene *PAL*, *CHS*, *DFR* und *GST* (Glutathione-S-Transferase). Der samenspezifische MYB-Faktor *TT2* spielt bei der transkriptionellen Kontrolle der Proanthocyanidinsynthese eine essentielle Rolle (Nesi *et al.*, 2001). Wie sein strukturelles Homolog *C1* ist auch *TT2* auf die Interaktion mit einem bHLH-Faktor, in diesem Fall dem *TT8*-Protein, zur Aktivierung seiner Zielgene *BAN* (*BANYULS*, einer Leucoanthocyanidin-Reduktase) und *TT12* (Transporter des MATE [Multidrug And Toxic Compound Extrusion]-Typs) angewiesen. Kotransfektionsexperimente in Protoplasten der *Arabidopsis*-Zellkulturlinie *At7* identifizieren *AtMYB12*, als flavonolspezifischen Regulator der Flavonoidbiosynthese (Mehrtens, 1999) (Mehrtens, 2003). So ist *AtMYB12* in der Lage die Expression von *CHS*-, *CFI*-, *F3H*- und *FLS*-Reporterkonstrukten (Promotor-GUS-Fusionen) zu aktivieren, während *DFR*-bzw. *BAN*-Promotorkonstrukte keine gesteigerte Aktivität zeigen. Entscheidend ist, dass *MYB12*, anders als *C1* oder *TT2* und genauso wie *P*, nicht auf einen bHLH-Partner angewiesen ist (Mehrtens, 2003). Interessanterweise zeigt der Mais-Faktor *P* in transienten Genexpressionsstudien das gleiche Aktivierungsmuster der Reporterexpression wie *MYB12*. Die MYB-Domäne beider Proteine weist eine 88%ige Identität auf, der C-Terminus der Faktoren lässt jedoch keine auffälligen Ähnlichkeiten erkennen. Tatsächlich ist *AtMYB12* der zu *ZmP* ähnlichste MYB-Faktor aus *A. thaliana*. Wahrscheinlich spiegeln die Transfektionsdaten die Bindung beider Transkriptionsfaktoren an die selben *cis*-Elemente in den Promotoren der aktivierten Gene wieder (Mehrtens, 2003).

1.2.4. WD40 Wiederholungen enthaltende Proteine

Proteine mit WD40-Sequenzwiederholungen (in der Folge als WD40 bezeichnet) sind an einer Vielzahl unterschiedlicher, regulatorischer Prozesse beteiligt. Darunter Signaltransduktion (β -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen), Regulation des Zellzyklus (z.B. *CDC20* und *CDC4*), transkriptionelle Repression (*TUP1* in Hefe) und RNA-Processing (Neer *et al.*, 1994). Die am besten charakterisierten WD40 sind dabei eindeutig die β -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (in der Folge al

β -G-UE bezeichnet), die laut Röntgenstrukturanalyse eine siebenblättrige β -Propeller-Struktur ausbilden (Sondek *et al.*, 1996). Das typische WD-Sequenzwiederholungsmotiv weist charakteristische GH und WD-Aminosäuredupletts (bzw. TRP-ASP) auf, die von einer bestimmten Struktur wechselnder hydrophober und hydrophiler Reste getrennt werden. Die WD40 scheinen regulatorische Funktion zu haben, zumindest konnte bisher keinerlei katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Die WD40, zu denen die Familien der 1) G- β -UE, 2) nukleären Groucho-verwandten Proteine, 3) regulatorische Protein-Phosphatase-UE, 4) die Protein-Kinase-C-bindenden RACKs (Neer *et al.*, 1994) und 5) Transkriptionsrepressoren des Typus HIR1 (Lamour *et al.*, 1995) zählen, werden nach der Zahl ihrer Sequenzwiederholungen und Funktionen klassifiziert. Eine Vielzahl unterschiedlicher WD40-kodierender Gene wurde in der Vergangenheit identifiziert, deren funktionelle Diversität von der Beteiligung an Rezeptorkomplexen bis hin zu möglichen regulatorischen Aufgaben im Sekundärstoffwechsel reicht. Zwei pflanzliche WD40 sind bekannt, die in die Anthocyanbiosynthese eingreifen. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1; Koornneef, 1981; Walker *et al.*, 1999) aus *A. thaliana* und ANTHOCYANIN 11 (AN11; Koes *et al.*, 1994; de Vetten *et al.*, 1997) aus *Petunia hybrida*. Beide zeigen eine funktionelle Orthologie. Sowohl AN11, das fünf WD40-Sequenzwiederholungen aufweist, als auch TTG1 mit nur vieren, regulieren die Anthocyanbiosynthese im Kontext mit bHLH (AN1 bzw. TT8) und MYB (AN2 bzw. TT2) Transkriptionsfaktoren (de Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist die Fähigkeit von TTG1 gezeigt, an den Trichom- und Wurzelhaarentwicklungs-Regulator AtbHLH001/GL3 zu binden, was die Verbindung zwischen den beiden Phänotypen der Trichomlosigkeit („glabra“) und des Fehlens der kondensierten Tannine in der Samenschale („transparent testa“) schafft. Somit stellt TTG1 eine essentielle Komponente zumindest der gewebsspezifischen Regulation der kondensierten Tannine und der Epidermis-Differenzierung bei der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung dar. Darüber hinaus hat Koornneef bereits 1981 den Effekt von TTG1 auf die Anthocyanbiosynthese beschrieben, die in der *ttg1* Mutante auch in den Blättern und im Stamm nicht mehr vorhanden war. Also ist die Funktion von TTG1 nicht nur auf bestimmte Gewebe beschränkt. Des weiteren hat TTG1 wie bereits oben schon erwähnt einen Einfluss auf die Produktion der seed coat mucilage, die in *ttg1-1*-Mutanten nicht ausgebildet wird. Außerdem konnte

gezeigt werden, dass *TTG1* ubiquitär in der Pflanze exprimiert wird, was eine eher generalistische Funktion für *TTG1* nahe legt.

Auch wenn *TTG1* und *An11* nur 4 bzw. 5 Sequenzwiederholungen besitzen, besteht trotzdem die Möglichkeit, dass sie eventuell 7 Propeller ausbilden können, wie für andere Faktoren mit weniger als 7 Sequenzwiederholungen bereits beschrieben (Murzin, 1992; ter Haar *et al.*, 1998). Ein weiteres WD40 aus *A. thaliana* ist *COP1*, das drei WD40 Domänen enthält und als Teil eines Proteinkomplexes einen negativen Regulator der Transkription im Kontext der Photomorphogenese darstellt (Ang *et al.*, 1998; Hardtke *et al.*, 2000). Dabei führt die Interaktion von *COP1* mit dem bZIP Transkriptionsfaktor *HY5* im Kern zu einem Abbau von *HY5*. Im Licht wird *COP1* allerdings aus dem Nukleus transportiert, was zur Stabilität von *HY5* führt, der an lichtinduzierte Promotoren binden kann, und somit die Transkription aktiviert (Osterlund *et al.*, 2000). Die Interaktion mit anderen Proteinen erfolgt vermutlich über die WD40-Sequenzwiederholungen. Allerdings weisen sowohl *TTG1* als auch *AN11* größere Sequenzhomologie zu den G- β -UE auf als zu allen anderen bekannten WD40-Proteinen (Walker *et al.*, 1999).

Gerade vor dem Hintergrund der Verknüpfung verschiedener distinkter Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse in der Pflanze, stellt sich die Frage, wie genau *TTG1* an der Regulation dieser Vorgänge beteiligt ist. *TTG1* ist kein Transkriptionsfaktor im eigentlichen Sinn, zumindest konnte bisher keine DNA-Bindung für WD40-Faktoren gezeigt werden. Dennoch interagiert *TTG1* mit Transkriptionsfaktoren. Ob *TTG1* aber deshalb eine nukleäre Funktion hat, blieb bisher ungeklärt.

1.2.5. Die Interaktion von bHLH, MYB und WD40 Proteinen

Dass bHLH und MYB-Proteine physikalisch interagieren können und korregulatorisch die transkriptionelle Aktivität einer Vielzahl an Promotoren regulieren, ist bereits auch für pflanzliche Faktoren gezeigt worden (Payne *et al.*, 2000). Die Daten aus unter-

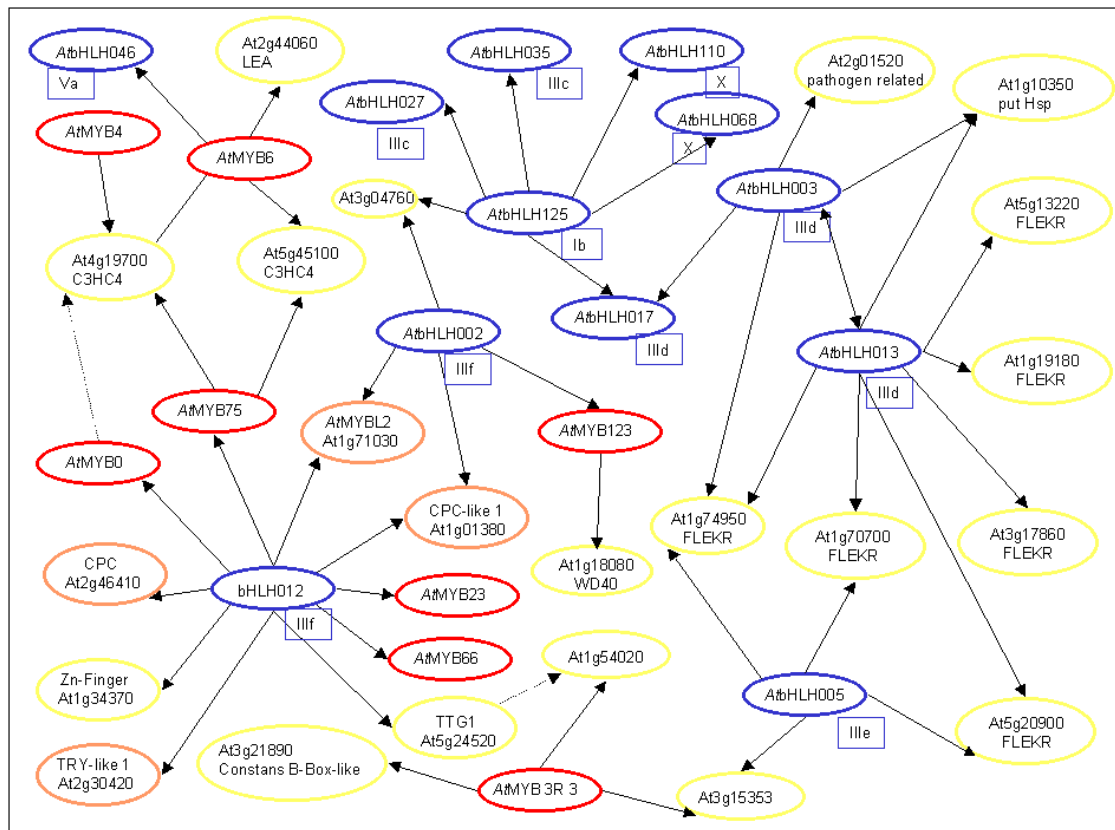


Abb. 3 Interaktionsnetzwerk von AtbHLH-Faktoren in Hefe 2-Hybrid-Screens (Quelle: Dissertation Ilona Zimmermann, 2003, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln). Interaktionsnetzwerk ausgewählter Kandidaten. Rot umrandet: MYB-Transkriptionsfaktoren, orange: 1RMYB-Proteine, blau: bHLH-Transkriptionsfaktoren; im Kästchen die entsprechende Subgruppe (vgl.Tab.E1, Ergebnisteil), gelb: andere Proteine.

schiedlichen Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien (Zimmermann, 2003) zeigen nicht nur eine Vielzahl an spezifischen Interaktionen von bHLH- und MYB-Proteinen, sondern die Screening Ergebnisse weisen auch auf weitere mögliche Interaktionspartner hin. Darunter auch Zinkfingerproteine und eine Gruppe unterschiedlicher bisher uncharakterisierter Proteine, die ein gemeinsames Motiv aufweisen („FLEKR“). Außerdem wurden eine Reihe neuer putativer Heterodimerisierungspartner identifiziert, die eine große kombinatorische Vielfalt der bHLH-Proteine untereinander aufzeigen.

Entscheidend ist jedoch, dass die dort gezeigten bHLH/MYB-Interaktionen auf bHLH-Proteine der Gruppen III und V beschränkt bleiben (vgl. zur strukturellen Einteilung der bHLH-Proteine: Tab.R1 im Ergebnisteil dieser Arbeit). Dies schränkt die Suche nach möglichen Interaktionsdomänen deutlich ein. Kartierungsexperimente zur Interaktion mit bHLH bzw. WD40 Proteinen bestätigen am Beispiel ausgewählter bHLH/MYB und WD40 Interaktionspartner die Annahmen, dass auf Seiten der bHLH-Proteine die bHLH/MYB-Interaktionsdomäne im N-Terminalen Bereich der bHLH-Proteine zu suchen ist, während die bHLH/WD40-Interaktionsdomäne C-Terminal lokalisiert scheint.


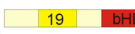
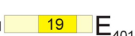

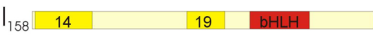

		AtMYB75	ZnFi At1g34370	TTG1
<u><i>AtbHLH002</i></u>				
	1	+	+	+
Q ₃₃₁ 	2	-	-	+
Q ₃₃₁  E ₄₀₁	3	-	-	+
<u><i>AtbHLH012</i></u>				
	4	+	+	+
I ₁₅₈ 	5	-	-	+
 R ₂₀₆	6	-	-	-

Abb.E4: Deletionsanalyse von *AtbHLH002* und *AtbHLH012* (Quelle: Dissertation Ilona Zimmermann, 2003, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln). Die Fragmente von *AtbHLH002* und *AtbHLH012*: *bHLH002_Cd331*, *AtbHLH002_Q331_E401*; *AtbHLH012_Nd158* und *AtbHLH012_Cd206* wurden als Baits auf Interaktion mit AD-Fusionen von TTG1, AtMYB75 und einem Zinkfingerprotein (*At1g34370*) getestet. +: Interaktion auf LWH5 vorhanden; - keine Interaktion auf LWH5. In orange sind die in Heim *et al.* 2003 beschriebenen Motive eingezeichnet, der blaue Bereich in *AtbHLH002* entspricht einem sauren Bereich, der in *AtbHLH012* nicht vorhanden ist.

In direkten Interaktionsstudien zu bHLH Transkriptionsfaktoren der Subgruppe III_f und bekannten MYB-Interaktionspartnern und deren strukturähnlichsten MYB-Faktoren konnte das Interaktionspotential der Subgruppe III_f mit R2R3-MYB-Faktoren, wie z.B. *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB123/TT2*, bestätigt werden (vgl. Abb. E4), die zusätzlich noch durch Daten aus „*in vitro*“ Pull-Down Experimenten (nach Melcher *et al.*, 1995) bestätigt werden konnten (Zimmermann, 2003).

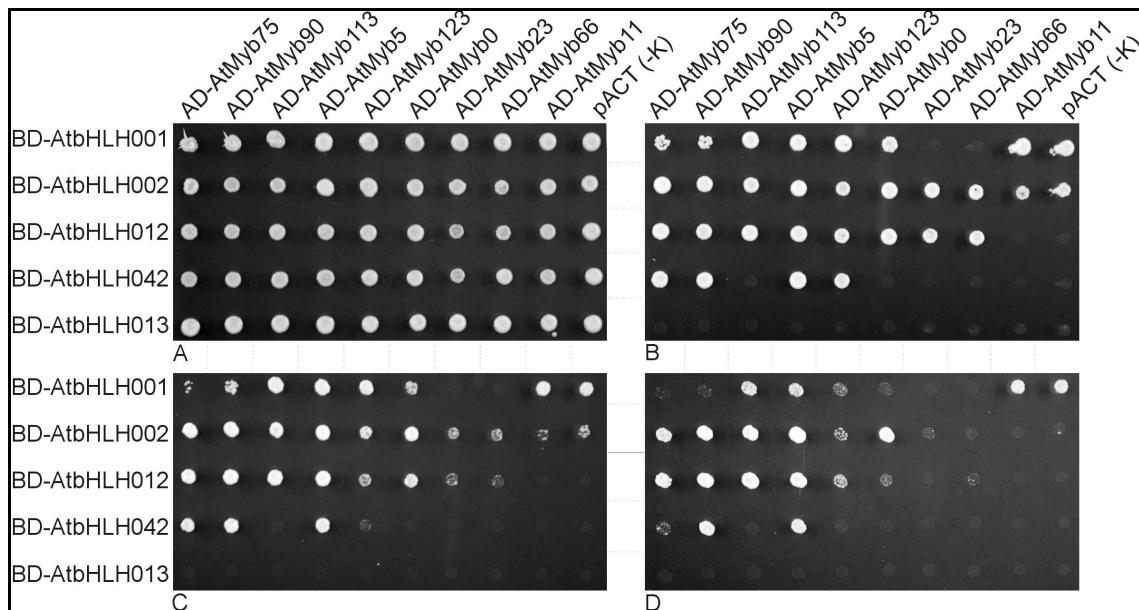


Abb.5 Interaktionsmatrix ausgewählter MYB- und bHLH-Transkriptions-faktoren (Quelle: Dissertation Ilona Zimmermann, 2003, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln); A: Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leuzin; B: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leuzin und Histidin mit 5 mM 3-AT; C: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leuzin und Histidin mit 20 mM 3-AT; D: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leuzin und Histidin mit 40 mM 3-AT. Die Hefen wurden mit entsprechenden Vektoren transformiert, kombinatorisch miteinander konjugiert und auf Selektionsmedium überstempelt. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

1.2.6 Die lichtregulatorische Einheit des *AtCHS*-Promotors zeigt Homologien mit weiteren Strukturgenen-Promotoren der Flavonoidbiosynthese

Um in einem einfachen System die „*in vivo*“ Funktion von möglichen koregulatorischen Transkriptionsfaktorkomplexen effektiv testen zu können, ist es nötig, die Minimalpromotoren und die *cis*-wirkenden Elemente in den Promotorregionen der zu untersuchenden Strukturgene zu ermitteln. Durch Eingrenzung der entscheidenden Elemente der transkriptionellen Regulation lassen sich so Promotor-Reporter-Konstrukte erstellen, die ein effektives Testsystem mittels transienten Expressionsanalysen zulassen. So wurde für den *AtCHS*-Promotor basierend auf Deletionsanalysen ein 164bp langer funktionaler Minimalpromotor des *AtCHS*-Genes definiert (Hartmann *et al.*, 1998). Transiente Expressionsstudien in *Arabidopsis-thaliana*-Protoplasten belegen, dass dieses

Promotorfragment die lichtabhängige Aktivierung des β -Glukuronidase-Reportergens (GUS) vermitteln kann.



Abb. E6: Die cis-wirkenden Elemente im *AtCHS*-Minimalpromotor (-164nt - ATG). Die jeweiligen Elemente sind farblich dargestellt (ACE = ACGT-Containing-Element; bZIP-Bindestelle; E-Box = RRE = R-Recognition-Element; putative bHLH-Bindestelle; MRE = MYB-Recognition-Element; MYB-Bindestelle)

Der *AtCHS*-Minimalpromotor enthält drei unterschiedliche *cis*-wirkende Elemente (vgl. Abb. E6). In funktionellen Studien wurden unterschiedlich mutierte Minimalpromotorkonstrukte auf ihre Aktivierbarkeit in Ko-Transfektionssystem mit transfizierten Arabidopsisprotoplasten getestet (Hartmann *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, dass zwei der drei *cis*-wirkenden Elemente, das ACE (ACGT Containing Element) und das MRE (MYB Recognition Element), für die Lichtinduktion entscheidend sind (Hartmann *et al.*, 1998). Blockmutationen im ACE bzw. MRE führen zur Reduktion der gemessenen GUS'-Aktivitäten auf unter 5% der Wildtypaktivität, während eine Doppelmutation praktisch keine Lichtantwort mehr zeigt. Für die lichtabhängige Induktion der *CHS*-Expression werden also beide Elemente benötigt. Daher wird die Promotorregion, die die Lichtreaktion in der Genexpression vermittelt und das ACE^{*AtCHS*} und das MRE^{*AtCHS*} enthält, als LRU (Light responsive unit) bezeichnet. Vergleicht man die LRU^{*AtCHS*} mit der bereits charakterisierten LRU^{*PcCHS*} aus *Petersilie* so legt die strukturelle Ähnlichkeit nahe, dass beide Elemente mit denselben Transkriptionsfaktoren interagieren können. Im Falle der LRU^{*PcCHS*} sind es 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 AtMYB44 bindet sequenzspezifisch an das MRE^{*AtCHS*} (Hartmann *et al.*, 1998).

Zwischen ACE und MRE findet sich im *AtCHS*-Minimalpromotor ein drittes Element, das RRE (R Recognition Element), das eine mögliche Bindungsstelle für bHLH-Transkriptionsfaktoren darstellt. Transfektionsanalysen mit mutierten und Wildtypkonstrukten zeigen jedoch, dass das RRE nicht an der lichtregulierten Expression des *CHS*-Genes beteiligt ist (Hartmann, unveröffentlicht). Jedoch zeigen

die Kotransfektionsexperimente auch, dass die heterologen Transkriptionsfaktoren *ZmC1* und *ZmSn* das *CHS*-Gen aus *A. thaliana* lichtunabhängig aktivieren können. Also kann der *AtCHS*-Promotor durch eine synergistische Kombination eines MYB- mit einem bHLH-Faktor aktiviert werden. Eine Blockmutation im MRE resultiert in einer ~11 fachen und eine Blockmutation im RRE in einer ~4,5 fachen Reduktion der gemessenen GUS-Aktivitäten. Die eine Promotorvariante mit Mutationen in beiden Elementen zeigt keinerlei Aktivierbarkeit mehr. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl ein intaktes MRE als auch RRE für die Interaktion mit dem C1/Sn-Komplex zur Transaktivierung der *CHS*-Expression benötigt werden, wobei der Einfluss des MRE größer als der des RRE ist (Hartmann, unveröffentlicht).

Auch in anderen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese findet man LRUs (z.B. bei *AtCFI*, *AtF3H* und *AtFLS*; Sagasser, unveröffentlicht; Hartmann *et al.*, 1998). Diese stimmen in den Kernsequenzen von ACE und MRE mit der im *AtCHS*-Promotor gefundenen LRU überein, jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich des Abstandes der beiden *cis*-Elemente sowie deren Orientierung zueinander. So liegen sie teilweise invertiert vor (bei LRU^{AtFLS} und LRU^{AtF3H}). Während sich in allen Promotoren ACE und MRE identifizieren lassen, ist der Fall für das die bHLH-Konsensussequenz umfassende RRE weniger eindeutig. Im *AtF3H*-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). Diese liegt ebenfalls, wie auch das ACE und das MRE, invertiert vor. Die einzige bHLH-Erkennungssequenz im *AtCFI*-Minimalpromotor überschneidet sich mit der ACE-Kernsequenz (CACGTG). Erste Ergebnisse aus 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 C1/Sn wiederhergestellt (Mehrtens, unveröffentlicht). Hypothetisch könnte das ACE^{AtCFI} somit eine duale Funktion ausüben: bei der lichtregulierten Genexpression fungiert es bei der Bindung von bZIP-Proteinen als ACE, bei der Transaktivierung durch

MYB-/bHLH-Proteine als RRE. Das den *AtFLS*-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 *AtFLS*-Minimalpromotor ebenso wie durch Licht auch durch C1/Sn zu aktivieren ist (Hartmann, unveröffentlicht).

1.3 Voraussetzungen

Die Ergebnisse der Diplomarbeit von Carla Schönbohm (vgl. auch Schoenbohm *et al.*, 2000) dienten als Ansatzpunkt für die im Rahmen dieser Analyse durchgeführten Untersuchungen zur Struktur der *AtbHLH*-Genfamilie. Sie konnte in ersten Sequenzhomologiesuchen im vorläufigen Genom von *A. thaliana* eine Reihe von Genen identifizieren, die später als bHLH-Transkriptionsfaktoren bestätigt werden konnten. Zusammen mit den in das REGIA-Projekt eingeflossenen Sequenzinformationen bildete dieser Datensatz die Grundlage für die Ermittlung einer ersten Konsensussequenz für die Analyse der im *A. thaliana* Genom enthaltenen *AtbHLH*-Sequenzen. Anhand der Aminosäuresequenz des Mais-bHLH *ZmSn* und den nächstähnlichen bHLH-Faktoren im Pflanzenreich konnten damals, zusammen mit denen im Rahmen des REGIA-Projektes (Regulatory Gene Initiative in Arabidopsis) bearbeiteten bHLH-Faktoren, 67 putative *AtbHLH*-TF identifiziert werden. Erste im Rahmen ihrer Arbeit erstellten *AtbHLH*- und *AtMYB*-Konstrukte für Ko-Transfektionsexperimente in AT7-Protoplasten erwiesen sich allerdings als unbrauchbar und wurden neu kloniert. Daher wurden die mit diesen Konstrukten erhaltenen Transfektionsergebnisse verworfen.

Mein Dank an dieser Stelle gilt Frau Dr. Ulrike Hartmann und Herrn Dr. Frank Mehrrens, die mit ihren Studien zur Struktur und Funktion der LRU^{*AtCHS*} bzw. der Aktivierbarkeit durch bZIP-, bHLH- und MYB- Transkriptionsfaktoren die Voraussetzungen für den Teil zur funktionellen Charakterisierung der *ZmSn*-ähnlichen *AtbHLH* dieser Arbeit geliefert haben.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit umspannt zwei Bereiche. Zunächst soll ein Überblick über die Gesamtheit aller *AtbHLH* kodierenden Gene im Arabidopsis Genom gegeben werden. Eine strukturelle Einteilung der *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren in Subgruppen soll im Zusammenhang mit Daten über bereits beschriebene Funktionen, funktionelle Zuordnungen und Aussagen über mögliche Redundanzen erleichtern. Darüber hinaus soll vor dem Hintergrund der Regulation der Flavonoidbiosynthese und der daran beteiligten Transkriptionsfaktorfamilien (u.a. *bHLH* und *R2R3-MYB*) und möglichen Interaktionspartnern (*WD40*) ein regulatorisches Netzwerk beschrieben werden, das mögliche Redundanzen innerhalb der beschriebenen Subgruppen mit einschließt. Die grundlegende, strukturelle Einteilung aller *AtbHLH*-TF in (Sub-)Gruppen erlaubt, im Zusammenspiel mit der in Stracke *et al.* (2001), präsentierten Einteilung der *R2R3-MYB* TF, zum ersten Mal eine systematische und vergleichende Suche nach interagierenden *MYB* und *bHLH* TF, die entscheidende Schritte des Phenylpropanoidstoffwechsels gemeinsam regulieren. Insbesondere ergaben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden:

- Wie viele *AtbHLH*-Faktoren gibt es in *A. thaliana*?
- Welche *AtMYB* und *AtbHLH*-Faktoren übernehmen die lichtunabhängige Regulation des *Chalkonsynthase*-Gens in *A. thaliana*?
- Inwiefern regulieren diese Faktoren auch andere Strukturgene der Flavonoidbiosynthese? Gibt es funktionelle Redundanzen?
- Wie sieht die Beteiligung des *WD40* Proteins *TTG1* an der Regulation aus?

Aufgrund des zentralen Interesses an den *AtbHLH*-Faktoren und ihrer Interaktion mit *AtMYB* Faktoren und den bekannten Zusammenhängen von (dem ebenfalls getesteten) *AtbHLH042/TT8* zur Anthocyan-Biosynthese, wurden in dieser Arbeit zwei weitere Promotoren untersucht: Der *AtDFR*-Promotor des für die

Dihydroflavonol-4-Reduktase kodierenden Gens und der *AtBAN*-Promotor des *BANYULS* Gens, das für eine putative Leucoanthocyanidinreduktase kodiert. Es wurde der Frage nachgegangen, ob diese Promotoren ähnliche Elemente wie die lichtregulierbaren Promotoren der zuvor beschriebenen Strukturgene enthalten und in wie weit diese ebenfalls durch bestimmte synergistische *AtMYB/AtbHLH* Kombinationen aktivierbar sind. Außerdem soll untersucht werden, in wie fern eine Spezifität bestimmter Faktorkombinationen für bestimmte Promotoren zu detektieren ist, u.a. auch vor dem Hintergrund der Gewebespezifität.

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 Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Biozym (Hameln), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Ribonuklease A (RNaseA), DNaseI und Lysozym wurden von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius), 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 Fa. 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 (Flaschenfilter, Nalgene-Nunc, 0,22µm Porengröße). Hitzelabile Substanzen (Antibiotika, Vitamine) wurden den Selektionsmedien erst nach Abkühlen unter 50°C unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

B5-Medium: 3,2g Packung Gamborg's B5-Medium für 1l (Sigma)
 1mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pH 7,5
 0,4M Saccharose
 pH 5,7 einstellen mit 0,1M KOH

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

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

Medium B: 1 M Glucose
 0,25 M Mannitol
 3,2g Gamborg's B5-Medium für 1l (Sigma)
 1ml Gamborg's Vitamin Solution (1000x, Sigma)
 1mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Der pH wurde durch Zugabe von 0,1M KOH Lösung auf 5,7 eingestellt und das Medium anschließend sterilfiltriert.

SOB-Medium: 5g Trypton
 1,25g Hefe-Extrakt
 0,125g NaCl
 625µl 1M KCl
 ad 250ml mit ddH₂O (miliQ)

nach dem Autoklavieren Zugabe von 1,25ml 2M MgCl₂

SOC-Medium: wie SOB nur Zugabe von 0,9g Glucose pro 250ml
 und sterilfiltrieren (0,22µm), statt autoklavieren!

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

TBII: 23g/l KH₂PO₄
 164g/l K₂HPO₄

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 100mM IPTG-Lösung und 2ml einer 2%igen X-Gal-Lösung (in DMF) hinzugefügt (Endkonzentration 0,2mM IPTG und 0,004% X-Gal).

YEP-Medium:

- 10 g Bacto-Trypton (XXX)
- 10 g Hefe-Extrakt
- 5 g NaCl
- 5 g Saccharose
- ad 1L mit ddH₂O

Der pH 7,5 wurde durch Zugabe von 0,1M KOH eingestellt. Zur Herstellung von Selektionsplatten wurden dem Medium noch 15g Bacto-Agar zugesetzt.

Enzym-Lösung –II:

- 1,5% Cellulase R10 (Onozuka)
- 0,4% Mazerozym R10
- 0,4M Mannitol
- 20mM KCl
- 20mM MES

dann wurde der pH auf 5,7 durch Zugabe von KOH eingestellt und die Lösung für 10Minuten auf 55°C unter sanften Rühren erhitzt. Danach erfolgte durch die Zugabe von entsprechenden Mengen die Einstellung auf:

- 10mM CaCl₂
- 5mM β -Mercaptoethanol
- 0,1% BSA

Die Lösung wurde dann durch einen Faltenfilter vorfiltriert und anschließend über einen Sterilfilter (Saugflasche, 0,22µm Porengröße, Fa. Nalgene-Nunc) sterilfiltriert.

<u>PEG-II::</u>	4g PEG4000
	3,5ml ddH ₂ O (miliQ)
	2 ml 1M Mannitol
	1 ml CaCl ₂

Stop-Mix:

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

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

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

W5-Waschlösung :

154 mM NaCl
125 mM CaCl ₂
5 mM KCl
2 mM MES

Der pH wurde durch Zugabe von 0,1 M KOH Lösung auf 5,7 eingestellt.

2.1.3. Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen Applied Biosystems (Weiterstadt), Metabion (Martinsried), Eurogentec (Herstal, Belgien), MWG-Biotech GmbH (München) und geliefert. Die untenstehenden Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben. Eine Liste sämtlicher verwendeter Primer (Standard-Primer zur Sequenzierung, alle spezifischen *AtbHLH* -, *AtMYB*-, *AtBAN*-und *AtWD40*-Primer) befindet sich im Anhang zu dieser Arbeit. Außerdem können alle Primer bei vorliegender Zugriffserlaubnis auch unter <https://adis.mpiz-koeln.mpg.de/OligoOrderDB/current/cgi-bin/query.cgi> eingesehen werden.

2.1.4. Verwendete Sonden und Primer in der QRT-PCR (TaqMan®-System)

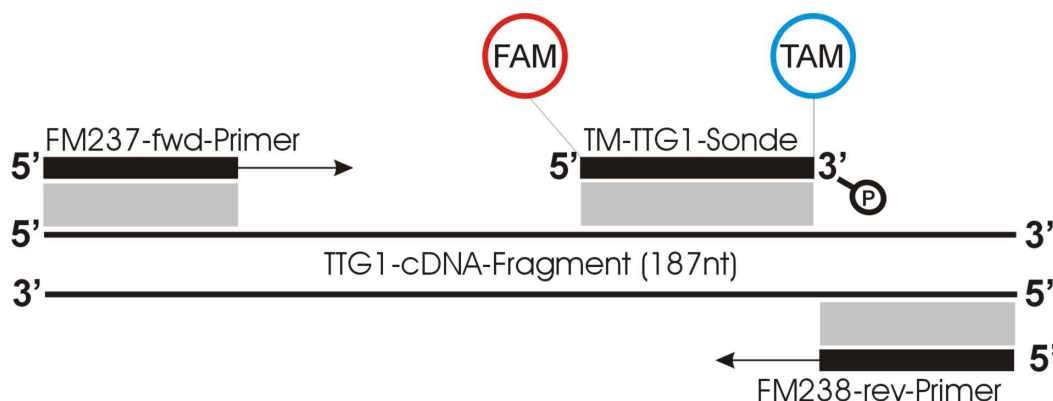


Abb.M1 Schematische Darstellung der relativen Lage der Primer- und Sondenhybridisierung der zur TTAG1-Detektion verwendeten Primer und der TM-TTG1-Sonde. Das durch FM237 und FM238 umspannte Amplikon umfasst die Nukleotide 100 bis 286 der TTAG1-cDNA. An der Sonde sind der Fluoreszenzmarker (FAM) und der „Quencher“ (TAM) eingezeichnet. Durch das Vorhandensein einer Phosphat-Gruppe statt einer OH-Gruppe am 3'Ende der Sonde wird verhindert, dass die Sonde als Starter-Oligonukleotid fungiert. Sobald die am 5'Primer initiierte DNA-Synthese die Sonde verdrängt kommt es zu einer Spaltung der Sonde durch eine 5'Exonuklease, der Fluoreszenzmarker und der „Quencher“ werden getrennt und es kann eine Fluoreszenz mit charakteristischer Wellenlänge ($\lambda=500-600\text{nm}$) nach Anregung (Argon-Ionen Laser) detektiert werden.

	<u>Sonde</u>	<u>5'-Mod.</u>	<u>3'-Mod.</u>	<u>Primer</u>	<u>Größe</u>	<u>cDNA-spezifisch?</u>
Zielgen						
18S	nicht bekannt	VIC	TAMRA	nicht bekannt	187nt	Nein
<i>AtTTG1</i>	TM-TTG1	FAM	TAMRA	FM237/FM238	187nt	Nein

Tab.M1 : 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 Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) in Form eines PDAR-Kits (Predeveloped TaqMan® Assay Reagent Kit) erworben. Die Fa. machte keine Angaben zur Sequenz der Primer oder der verwendeten Sonde. Das Primer- und das Sonden-Design des TM-TTG1-Primersets und der TM-TTG1-Sonde erfolgte durch Frank Mehrrens.

2.1.5. Verwendete Bakterienstämme und DNA-Vektoren

<u>E.coli-Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz</u>
XL1-Blue MRF ^r Kan ^r	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , {F ^r pro AB, <i>lacI</i> ^q Z Z Δ M15, Tn5(Kan ^r)	Fa. Stratagene
GM2163	F- <i>ara</i> r14, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galT22</i> , <i>supE44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rps136</i> (Strr), <i>Xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13</i> , Tn9(Cam ^r), <i>dcm6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> (rk ⁻ mk ⁺), <i>mcrA</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989) (Fa. Biolabs)
GM3101 TOP10	C58C1 Rif ^r , pMP90RK Gm ^r , Km ^r F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Strr), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	(Koncz <i>et al.</i> , 1986) Fa. Invitrogen
DH5 α -mcr	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$, $\Phi-80lacZ\Delta M15$, F ⁻ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$	
<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT8-GUS	pBT2 basierter Vektor ohne die für die Blau/Weis-Selektion notwendigen Bereiche, Amp ^r	(Sprenger-Haussels <i>et al.</i> , 2000)
pBT10-GUS	<i>colE1ori</i> , Amp ^r , -46 bis +8 des 35S-Promotor aus CaMV, <i>uidA</i> ORF, <i>nosPA</i> , MCS, Deletionen im Vektorrückgrad	(Sprenger-Haussels <i>et al.</i> , 2000)
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 <i>et al.</i> , 2000)
pBT10-AtCHS164-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch den <i>AtCHS</i> -Minimalpromotor ersetzt	(Hartmann <i>et al.</i> , 1998)
pBT10-AtBAN-GUS	wie pBT10-GUS, statt 35S-Promotor <i>AtBAN</i> -1460kb-Promotor	Sagasser, unveröffentlicht
pBT10-AtDFR520-GUS	wie pBT10-GUS, der 35S-Promotor ist durch 520nt-Fragment des <i>AtDFR</i> -Promotor ersetzt	Mehrtens, unveröffentlicht
pBT10- Δ GUS	wie pBT10-GUS, jedoch ohne 35S-Promotor	(Sprenger-Haussels <i>et al.</i> , 2000)
pDONR201	ENTRY-Vektor mit Kan ^r und <i>attb1-ccdB-attb2</i> -Kassette	Fa. Invitrogen
pBTdest	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF wurde durch eine <i>attr1-ccdB-attr2</i> Kassette ersetzt	Marc Jakoby, unveröffentlicht
p2x35S-TTG1	pLBR19 basierter Vektor, mit <i>AtTTG1</i> -ORF, Amp ^r	Antoine Baudry, INRA, Versaille, unveröffentlicht
pBT8-35S-ZmC1	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>C1</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-AtMYB12	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>AtMYB12</i> -ORF ersetzt	Stracke, unveröffentlicht

<u>Plasmid</u>	<u>wesentliche Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBT8-35S-AtMYB111	wie pBT8-GUS, der <i>uidA</i> -ORF ist durch den <i>AtMYB111</i> -ORF ersetzt	Stracke, unveröffentlicht
pGTW2x35S-GFP	pPAM basierter Vektor mit <i>attr1-ccdB-attr2</i> -Kassette, Amp ^r	Turck, unveröffentlicht
pJawohlRNAi8	pPAM basierter binärer Vektor mit doppelter und invertierter <i>attr1-ccdB-attr2</i> -Kassette, Amp ^r ; Selektion im Agrobakterienstamm PGV3101 pMP90RK mit Rif ^r , Kan ^r , Carb ^r , Gent ^r , Pflanzenselektion mit BASTA ^r	Uelker, unveröffentlicht
pBT4-Δ-LUC	<i>colE1ori</i> , Amp ^r , <i>Luc</i> -ORF, <i>nosPA</i>	(Sprenger-Haussels <i>et al.</i> , 2000)
PCR [®] 2.1.TOPO	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, T7-Promotor, Kan ^r , Amp ^r	Fa. Invitrogen

Sofern oben nicht abweichend aufgeführt wurden sämtliche getesteten cDNAs von MYB, bHLH und WD40 Faktoren zunächst in pDONR201 rekombiniert und für die Versuche im Transfektionssystem in pBTdest überführt.

2.1.6. Zellkulturen und Pflanzen

Die für diese Arbeit verwendete *A.thaliana*-Zellsuspensionskultur At7 (Accession Columbia) 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 *et al.*, 1962). Die Zellen wurden fünf Tage nach der Subkultivierung zur Protoplastengewinnung eingesetzt. Die Betreuung der At7-Zellkultur erfolgte durch Frau L. Bollenbach.

Die Anzucht von *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen erfolgte folgendermaßen: Die Samen wurden in Pflanzbehältern auf Erde ausgelegt und bei 4°C für 48h stratifiziert. Danach wurden die Samen zum Keimen im Gewächshaus für 10 Tage unter Kurtagbedingungen (8h Licht, 16h dunkel) gestellt und die Pflanzen anschließend bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen (16h Licht, 8h Dunkel) gehalten.

2.1.7. Weiteres biologisches Material

Verschiedene für die Kotransfektionsexperimente eingesetzte Plasmide wurden von U.Hartmann, H.Jin, M.Sagasser, M.Sprenger-Haussels, Frank Mehrstens, Antoine Baudry, R. Stracke und Marc Jakoby hergestellt (siehe 2.1.5.).

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 Tabellen-Kalkulationsprogramms Excel[®] der Fa. Microsoft (Unterschleißheim) ausgeführt. Notwendige Bildbearbeitung und Erstellung komplexer Graphiken erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop 6.0 und Corel Draw 9.0.

2.2.1. Ammonium-Acetat-Fällung von DNA

DNA, die zur automatischen Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde durch Zugabe von 1 Volumenteil 4M 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, 14000rpm, 5min.). Nach der Trocknung des Sediments wurde dieses in 10mM 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 260nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 ungefähr einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 40µg/ml RNA, 35µg/ml einzelsträngiger DNA oder 20µg/ml Oligonukleotiden. Die photometrische Messung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte in einer Quarzküvette gegen bidest. Wasser als Blindwert.

2.2.3. Restriktionsspaltung von DNA

Die Durchführung der restriktionendonukleolytischen Spaltung richtet sich nach den Angaben der Hersteller der Restriktionsendonukleasen. Verwendet wurden die mitgelieferten Puffer. Pro µg zu spaltender DNA wurden 3U/h an Enzym eingesetzt. Die Enzymmenge sollte 1/10 des Gesamtansatzes nicht übersteigen, da das in den Lagerungspuffern der Restriktionsenzyme enthaltende Glycerin sonst die

Spaltungsreaktion beeinträchtigen würde. Die Ansätze wurden (wenn nicht vom Hersteller anders angegeben) bei 37°C für mindestens 1h inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch die Zugabe von 0,2 Volumenteilen Stop-Mix oder durch 20 minütige Hitzeinaktivierung der jeweiligen Restriktionsendonuklease bei 65 bzw 80°C (Herstellerangaben beachten).

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 aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 0,3µg 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 fanden bei einer Feldstärke von 5 bis 15V/cm bis zur gewünschten Auftrennung statt. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten

Die durch PCR bzw Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach einer Agarosegelelektrophorese mittels des „GFX®PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ der Fa. Amersham-Pharmacia Biotech INC, Piscataway, isoliert. Dazu wurden definierte Banden aus dem Gel ausgeschnitten und gemäß Hersteller Protokoll aufgearbeitet.

2.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.6.1. Klonierung mit Hilfe von T4-Ligase

Ein Ligationsansatz von 30µl enthielt die folgenden Komponenten: 1µl geschnittener Vektor-DNA (~100ng), 5µl (~100ng) geschnittenes DNA-Fragment, 3µl 10x Ligasepuffer (500mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM MgCl₂, 20mM DTT), 3µl rATP (10mM), 1µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) und 17µl doppelt destilliertes Wasser. Die

Inkubation des Ansatzes erfolgte bei RT für mindestens 1,5h. Anschließend wurden 15µl 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 Fa. Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.6.3. Gateway® Rekombination

Die DNA-Sequenzierungen vollständiger Genome vieler Organismen bilden die Grundlage für genomweite Genfunktionsanalysen, wie sie seit kurzem in Vielzahl durchgeführt werden. Zur effizienten Durchführung wurde die Entwicklung neuer Methoden nötig, die schnelle, effiziente und gleichzeitige Analysen vieler Gene und Genprodukte ermöglichen. Für Untersuchungen, die auf rekombinanten Expressionsplasmiden beruhen (z.B. Überexpression ganzer Genfamilien, sowie Proteinexpressionen und -präparationen aus *E. coli*, Interaktionsstudien in Hefe (Hefe Zwei-Hybrid-System) oder Lokalisationsstudien mit Fluoreszenzfusionsproteinen in Zellkulturzellen) wurden neue Methoden entwickelt, die eine besonders schnelle und effiziente Klonierungen eines Genes ermöglichen. So lassen sich in genetischen Screens identifizierte Gene zur Charakterisierung parallel in eine Vielzahl von Expressionsplasmiden klonieren. Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen beruhen diese Methoden auf sequenzspezifischen DNA-Rekombinationen, die durch spezifische Rekombinasen katalysiert werden. In vorliegenden Arbeit wurde hierzu das Gateway-System der Fa. Invitrogen, das auf der Verwendung der Lambda-Rekombinase und Rekombinationsstellen beruht (siehe weiterführende Literatur, Gateway™ Cloning Technology Instruction Manual) verwendet. So wurden durch PCR gewonnene cDNAs durch Rekombination in ein pDonor-Plasmid kloniert (u.a. pDONR201 oder pENTR/D-TOPO). Aus den erhaltenen pEntry-Plasmiden wurden die codierenden Sequenzen durch eine zweite Rekombination in die unterschiedlichen verwendeten Expressionsvektoren übertragen und dann zu weiteren Analysen verwendet.

2.2.6.3.1 Rekombinationsprozesse des Bakteriophagen Lambda.

Zur Klonierung durch Rekombination bedient sich das verwendete Gateway-System des Rekombinationssystems des Bakteriophagen- λ . Dieser Phage ist ein Bakterien Virus, das seine lineare DNA in eine Bakterienzelle injiziert und recircularisiert. Die Phagen-DNA kann nun im lytischen Zyklus direkt vermehrt und in neue Phagen verpackt werden oder im lysogenen Zyklus als stille Kopie in das Wirtsgenom integriert werden. Diese Integration des Phagengenoms in das Wirtsgenom basiert auf zwei homologen DNA-Sequenzen, der Phagen *attP* und der Bakterien *attB* Stelle.

Diese zwei DNA-Abschnitte können wiederum genutzt werden, um das Phagengenom durch Rekombination aus dem Wirtsgenom freizusetzen und den lytischen Zyklus zu starten. Neben der „Integrase“ und dem „Integration Host Factor“ wird hierfür noch eine „Excisionase“ benötigt. Unter dem Zusammenwirken dieser Faktoren rekombinieren *attR* und *attL* Stelle miteinander und setzen das Phagengenom aus dem Wirtsgenom frei.

2.2.6.3.2. In vitro Rekombination zur Herstellung von Entry- und Expressionsplasmiden.

In der gleichen Art und Weise wie bei der Integration des Phagen Genoms rekombinieren die entsprechenden DNA-Abschnitte unter Mitwirkung der unterschiedlichen Faktoren miteinander. So rekombinieren in der BP-Reaktion zur Herstellung des Entry-Klones die *attB* Stellen des PCR-Produktes mit den *attP*-Stellen des pDonor-Plasmides. Damit dabei das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung in das pDonor-Plasmid rekombiniert wird, gibt es zwischen den *attB1* und *attB2* Stellen wie zwischen den *attP1* und *attP2* Stellen kleine DNA-Sequenz Unterschiede, die dazu führen, dass *attB1* immer mit *attP1* und *attB2* immer mit *attP2* rekombiniert. Die Herstellung der Expressionsplasmide aus Entry-Klonen und Destinations-Plasmiden entspricht wiederum der Phagengenom-Excisionsreaktion. Hierbei rekombinieren die zwei *attL* Stellen des Entry-Klones mit den *attR* Stellen des Destinations-Plasmides. Auch hier bleibt durch geringfügige DNA-Sequenzunterschiede zwischen L1 und L2 sowie R1 und R2 die gewollte Orientierung der Inserts erhalten.

2.2.6.3.3. Primerdesign

Die zur Amplifikation der cDNA verwendeten Primer müssen dementsprechend *attB1*- (im sense Primer) bzw. *attB2*-sites (im antisense Primer) sowie genspezifische Sequenzabschnitte enthalten. Dabei ist darauf zu achten, dass das Amplifikat in späteren Expressionsvektoren auch "in frame" rekombiniert werden kann bzw. verwendete Tags (z.B. GFP, GST) in frame liegen. Desweiteren ist bei einer späteren Verwendung von C-terminalen Fusionen darauf zu achten, dass die entsprechende cDNA ohne Stop-Codon amplifiziert wird. Ansonsten besteht natürlich die Möglichkeit vorhandene DONR-Plasmide bzw. Expressionsplasmide mittels Side Directed Mutagenesis (SDM) zu modifizieren.

2.2.6.3.4. Klonierung eines PCR-Produktes durch die BP-Reaktion.

Das PCR-Produkt mit den *attB*-Enden wird dem pDonor-Plasmid (Vector) zugegeben und mit dem BP-Clonase Enzym-Mix vermischt. Durch eine Rekombination entsteht der Eingangsklon ohne *ccdB*-Gen, jedoch mit dem eingefügten PCR-Produkt. Die Eingangsklone können durch die Kanamycinresistenz selektioniert werden. Das *ccdB*-Gen des Donor-Plasmides ist für die Gegenselektionierung nötig. Alle Plasmide mit dem *ccdB*-Gen führen zum Absterben der Bakterientransformanten. Nur wenn das *ccdB*-Gen durch eine Rekombination aus dem pDonor-Plasmid entfernt wurde, können Bakterientransformanten mit der Kanamycinresistenz selektioniert werden.

2.2.6.3.5. Die LR-Reaktion.

attL1 und *attR1* (oder *attL2* und *attR2*) rekombinieren und bilden ein Co-Integrat. Die Co-Integrate werden dann durch eine zweite Rekombinations-Reaktion zu zwei Tochtermolekülen aufgelöst. Diese haben die gleiche Struktur, unabhängig welches Paar von Rekombinations-stellen (*attL1* und *attR1* oder *attL2* und *attR2*) zuerst miteinander reagiert, um das Co-Integrat zu bilden. Die Selektionierung der Expressionsklone wird dadurch erreicht, dass der Rekombinations-Mix in *E. coli* transformiert wird. Nur die Plasmide ohne *ccdB* Gen aber mit Ampicillin-Resistenz (Ap^r) führen zu Kolonien.

2.2.7. Kultivierung von Bakterien

Zur Herstellung methylierter Plasmid-DNA wurden die *E.coli*-Stämme TOP10 (Fa. Invitrogen), DH5 α -mcr oder XL-1 Blue MRF⁺ Kan^r der Fa. 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 der Stämme TOP10, DH5 α -mcr und 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. Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation

Je nach in *E. coli* Zellen zu transformierender Konstrukte wurden wechselnd sowohl auf die Methoden der Transformation chemokompetenter oder elektrokompenter Zellen zurückgegriffen. Die verwendeten Zellen wurden entweder bei der Fa. Invitrogen bestellt (chemo- bzw. elektrokompente TOP10-Zellen) oder selbst hergestellt.

2.2.8.1. Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Mit 1ml aus einer am Vorabend beimpften 5ml-Übernachtskultur (37°C, 60 Upm) wurden 250ml SOB Medium angeimpft (1l-Erlenmeyerkolben). Bei 37°C und 200 Upm wurde die Kultur inokuliert bis zu einer optischen Dichte von $OD_{\lambda=600}=0,6$. Die Kultur wurde dann auf Eis heruntergekühlt und anschließend bei 2500 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml TB-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 20ml TB-Puffer resuspendiert. Nach schrittweiser Zugabe von 1,4ml DMSO wurden die Zellen erneut für 10 Minuten auf Eis inokuliert und anschließend in vorgekühlten 1,5ml Eppendorfgefäßen aliquotiert (100 μ l) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.8.2 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Mit 1ml aus einer am Vorabend beimpften 5ml-Übernachtskultur (37°C, 60 Upm) wurden 250ml SOB Medium angeimpft (1l-Erlenmeyerkolben). Bei 37°C und 200 Upm wurde die Kultur inokuliert bis zu einer optischen Dichte von $OD_{\lambda=600}=0,6$. Die Kultur wurde dann auf Eis heruntergekühlt und anschließend bei 2500 Upm

abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in dieser Reihenfolge in 500ml ddH₂O (steril), 250ml ddH₂O (steril), 10%iger Glycerinlösung gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in 1ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert (40µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

2.2.9. Transformation von Bakterienzellen

2.2.9.1 Transformation chemokompetenter Bakterienzellen

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Zur Transformation chemokompetenter XL-1 Blue bzw. DH5α-mcr oder TOP10 Zellen wurden 15µl eines Ligationsansatzes zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot kompetenter Zellen (2.2.8.) hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für mindestens 1h 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° über Nacht.

Chemokompetente Agrobakterienzellen des Stammes GV3101 wurden wie folgt transformiert. Die bei –80°C gelagerten Zellen wurden auf Eis für ca.1h aufgetaut. Dann erfolgte die Zugabe von 200ng Plasmid-DNA zu 100µl Zellen. Nach vorsichtigem Mischen blieben die Zellen für weitere 5 Minuten auf Eis stehen, wurden dann in flüssigem Stickstoff für 5 Minuten schockgefroren, und anschließend wieder auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C, die durch Zugabe von 250µl SOC beendet wurde. Die Zellen wurden dann für 2h bei 28°C inkubiert und anschließend wie unter 2.2.7 beschrieben ausplattiert.

2.2.9.2. Schnelle Transformation von Bakterienzellen

Zu einem auf Eis aufgetauten 50µl Aliquot kompetenter GM2163-Bakterien wurden 200 bis 500ng 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 2.2.7. beschrieben ausplattiert.

2.2.9.3. Transformation elektrokompeter Bakterienzellen

Ein Aliquot elektrokompeter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 50pg Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1mm Durchmesser) der Fa. Bio-rad (München) gegeben. Nach einminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in einem Gene Pulser system, ebenfalls der Fa. Bio-rad, bei 1.8kV und mit einer mittleren Entladungszeit von ca. 5msec. gepulst. Unmittelbar danach wurden 250µl SOC (Raumtemperatur) zugegeben, die Zellen in sterile 1.5ml Reaktionsgefäße überführt und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100µl der Zellen wie unter 2.2.7 beschrieben ausplattiert.

2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

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

2.2.10.1. Kolonie-PCR

Um transformierte Zellen effektiv und schnell auf das von ihnen getragene Plasmid testen zu können, wurde zur Kolonie-PCR direkt Zellmaterial statt aufgereinigte Plasmid-DNA in dem PCR-Ansatz eingesetzt. Dazu wurde mit sterilen Pipettenspitzen Koloniematerial in 15 µl ddH₂O überführt, 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend in die PCR eingesetzt. Die Wassermenge im PCR-Ansatz wurde entsprechend reduziert.

2.2.10.2. Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends - RACE-PCR

Um die vorhergesagte ORF Struktur verifizieren zu können, wurden gemäß des GeneRacer®-Kit-Protokolls (Fa. Invitrogen) cDNA Fragmente amplifiziert, anschließend kloniert (TOPO/TA-Cloning, Invitrogen) und sequenziert. Die Starteroligonukleotide wurden dafür so konstruiert, dass jeweils ein Set von zwei innerhalb eines Exons kurz hintereinander hybridisierenden Primern (P1 und

P2nested) für zwei aufeinanderfolgende PCR-Läufe zur Verfügung stand. Als Gegenprimer diente entweder der für die cDNA-Synthese verwendete CDS-Not-Primer (bei 3'RACE-PCR zur Amplifikation des Carboxyterminus des Zielgens) oder bei einer 5'RACE-PCR zur Amplifikation des Aminoterminus den an die anstelle des mRNA-CAPs angehängte Nukleotidsequenz hybridisierende GeneRacer-Primer (vgl. GeneRacer-Kit, Fa. Invitrogen).

2.2.10.3. 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 (2.2.12.1) oder Punktmutationen (2.2.12.2) einzufügen oder STOP codons zu deletieren (2.2.12.3).

2.2.10.3.1 Einführung von Restriktionsschnittstellen

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-Fragments benutzt werden.

2.2.10.3.2. Punktmutation von in Plasmiden vorliegenden cDNA-Klonen

Punkt-Mutationen wurden durch gerichtete PCR-Mutagenese mit modifizierten Primern in vorhandene Plasmide eingeführt. Das Primerdesign wurde so gewählt, dass die Primer absolut deckungsgleich an die komplementären DNA Stränge binden können. Die PCR wurde dann unter sehr stringenten Bedingungen auf extrem niedrigen Mengen an Ausgangsplasmid durchgeführt (< 200fg pro 50µl PCR-Ansatz). Die Amplifikation lief nur über 12 PCR-Zyklen, bei denen für die Elongationsphase je 1kb Plasmid 1min angesetzt wurde. Die Ansätze wurden anschließend DpnI verdaut, um das Ausgangsplasmid zu verdauen. Der PCR-Ansatz wurde dialysiert und anschließend 5µl in elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert. Die erhaltenen Klone wurden zur Plasmid-Präparation (Kap. 2.2.14.1) in 5ml-Kulturen angezogen, die Plasmidpräparation durchgeführt und die

gewünscht mutierten Konstrukte durch Sequenzierung der erhaltenen Plasmide selektiert.

2.2.10.3.3. Deletion des STOP-Kodons

Für die GFP-Fusionskonstrukte war es notwendig die in den ursprünglich klonierten cDNAs enthaltenen STOP-Kodons zu mutieren. Daher wurden mittels gerichteter PCR-Mutagenese (siehe 2.2.13.2.) die Stop-Kodons entsprechend modifiziert. Als Ausgangsplasmid wurden die in pDONR201 vorliegenden Konstrukte der betreffenden Gene verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass trotz verändertem STOP-Kodon die Konstrukte entsprechend dem Gateway®-Protokoll (Fa. Invitrogen) den Leseraster für die spätere Verwendung in Destinations-Vektoren beibehielten.

2.2.10.3.4. Semiquantitative Expressionsdetektion mittels RT-PCR

Um in unterschiedlichen unterschiedlichen Pflanzenorganen und in Protoplasten die Expression bestimmter Gene detektieren zu können, wurden zunächst mit dem CDS-NotIII-Primer und den verschiedenen RNA-Präparationen Erststrangsynthesen durchgeführt. Dazu wurde das SuperscriptII®-System von Invitrogen benutzt und das Standard-Protokoll mit Ausnahme des abweichenden Primers befolgt. Auf den erhaltenen cDNA-Quellen wurden PCR-Amplifikationen durchgeführt. Dazu wurde zur Detektion der jeweiligen cDNA mit spezifischen Primern detektiert, die so gewählt wurden, dass das Amplifikat wenn möglich cDNA-spezifisch oder deutlich von der möglicherweise mitamplifizierten, als Kontamination vorhandenen genomischen DNA auf Grund der Größe zu unterscheiden war.

2.2.11. Isolierung von DNA

2.2.11.1. Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA

(modifiziert nach Goode *et al.*, 1992)

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

2.2.11.2. Quatitative Plasmidpräparation über Säulenchromatographie

(modifiziert nach Herstellerangaben der Fa. Qiagen)

Diese Technik diente vor allem der Isolierung hochreiner, unmethylierter Plasmid-DNA für den Einsatz in Transfektionsexperimenten. 400ml einer Übernachtskultur des Bakterienstammes GM2163, in ampicillinhaltigem TB-Medium herangezogen, wurden zur Sedimentation der Bakterien zentrifugiert (Kontron, Centrikon H-401, Rotor A6.14, 6000rpm, 10 min., 4°C). Das Pellet wurde in 50ml Puffer P1 (50mM Tris/HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RnaseA) resuspendiert, 5 min. bei RT inkubiert und zur Lyse der Zellen mit 50ml P2-Puffer (200mM NaOH, 1% SDS) versetzt. Die Zugabe von 50ml Puffer P3 (3M 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, 12000rpm, 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 35ml QBT-Puffer (750mM NaCl, 50mM 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 50ml QC-Puffer (1M NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Eluiert wurde die DNA mit 35ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50mM Tris/HCl, 15% Ethanol, pH 8,5). Durch die Zugabe von 17,5ml Isopropanol zum Eluat erfolgte die Fällung der DNA. Das DNA-Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation (Minifuge, 5000rpm, 30 min., 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (Sigma, 13000rpm, 15 min., 4°C). Nach der Trocknung des Sediments wurde dieses in 500µl TE-Puffer gelöst. Eventuell im Ansatz verbliebene unlösliche Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation (Sigma, 13000rpm, 15 min., 4°C) sedimentiert und der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA in ein steriles 2ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-Konzentration im Überstand wurde photometrisch (2.2.2.) bestimmt und durch Verdünnung mit TE-Puffer auf einen Wert von 1µg/µl eingestellt.

2.2.11.3. Isolierung genomischer DNA

Die Isolation kleiner Mengen genomischer DNA aus *Arabidopsis-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 (200mM Tris/HCl pH7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS) ca. 15sec. gemörsert und anschließend für 5sec. auf einem Vortex-Mischer auf höchster Stufe geschüttelt. Das Pflanzenmaterial wurde durch Zentrifugation pelletiert (14000rpm, 3min., RT) und 150µl des Überstandes für eine Isopropanolfällung der DNA eingesetzt, welche durch Zugabe von 150µl Isopropanol und 2 min. Inkubation bei RT durchgeführt wurde. Das DNA-Präzipitat wurde pelletiert (14000rpm, 5min., RT), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl TE-Puffer aufgenommen. 2µl 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 Fa. Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.12. Herstellung von Reporterkonstrukten zum Einsatz in den Ko-Transfektionsexperimenten

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 ersetzten. 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 *Columbia*, da zur PCR ausschließlich genomische DNA dieser Accession als Matrize eingesetzt wurde.

Die unten angegebenen Fragmentlängen sind auf den Translationsstart bezogen.

2.2.13. 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 Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte auf dem ABI PRISM[®]-System 377 bzw. 3700 ebenfalls der Fa. Applied Biosystems.

2.2.14. Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten

DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des UWGCG-Programmpaketes (University of Wisconsin Genetics Computer Group) auf einer „UNIX“-Workstation ausgewertet (Devereux et al., 1984). Für Internet basierte Recherchen in GenBank-Datenbanken und Für die Auswertung der aus Sequenzierungen von Konstrukten bzw. PCR-Produkten erhaltenen Sequenzinformationen wurde das Programm Sequencher 4.1 auf einem Macintosh Sytem verwendet. Zur Erstellung von Proteinsequenz-Alignments (mit dem Programm AlignX) und zu Beginn des Projektes auch zur Datenbankverwaltung wurde die User-suite VectorNTi 6.0 der Fa. Informax (Oxford, Großbritannien) auf einem PC benutzt.

2.2.15. Gewinnung von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

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

Zur Gewinnung von Protoplasten der Zelllinie At7 wurden zunächst 40ml einer fünf Tage alten Zellsuspensionskultur bei 1500rpm, 5 min. bei RT zentrifugiert (Minifuge RF). Das Pellet wurde in 30ml 240mM CaCl₂ resuspendiert und erneut zentrifugiert (Minifuge RF, 1500rpm, 5 min., RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die sedimentierten Zellen in 60ml sterilfiltrierter Enzymlösung folgender Zusammensetzung aufgenommen: 0,7g Zellulase „Onozuka R-10“ (SERVA) und 0,1625g Mazerozym R-10 (SERVA) gelöst in 60ml 240mM CaCl₂. Verteilt auf zwei Petrischalen (Durchmesser 14,5cm) wurde die Zellsuspension über Nacht bei 26°C und 20rpm im Dunkeln geschüttelt. Dabei sollte die Inkubationszeit von 20 Stunden nicht überschritten werden. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Protoplasten für 20 min. bei 40rpm geschüttelt und dann abzentrifugiert (Minifuge RF, 1500rpm, 5 min., RT). Das Pellet wurde mit 240mM CaCl₂ gewaschen und nochmals wie vorher zentrifugiert. Zu dem Sediment wurden bis zu einem Endvolumen von 15ml B5 + 0,4M Saccharose (2.1.2.) hinzugegeben und dieses dann resuspendiert. Lebende Protoplasten wurden durch Zentrifugation (Minifuge RF, 800rpm, 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 Fa. Becton Dickinson Labware, N.J., USA verwendet.

2.2.16. Transfektion von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten

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

Die DNA-Aufnahme in die *Arabidopsis-thaliana*-Protoplasten wurde durch PEG vermittelt. In 10ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) wurden 200µl Protoplastensuspension vorgelegt. Dieser wurden die Transfektions-DNA (10µg Reporterplasmid, eventuell ein oder zwei Effektorplasmide (je 0,5µg), 5µg Standardisierungsplasmid (pBT10-UBI-LUCm3), aufgefüllt mit pBT10-ΔGUS auf eine DNA-Gesamtmenge von 25µg) und 200µl sterilfiltrierter PEG-Lösung (25% PEG₆₀₀₀, 100mM 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 5ml 275mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (pH 6,0) abgestoppt. Durch eine weitere Zentrifugation (Minifuge RF, 800rpm, 8 min., RT) wurden die Protoplasten erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in 7ml B5 + Saccharose aufgenommen und der Transfektionsansatz zu gleichen Teilen auf zwei Petrischalen (Durchmesser 5cm) verteilt. Die Inkubation beider erfolgte bei 26°C für 20h im Dunkeln (Doppelwerte).

Zur Kontrolle auf eine eventuelle Autoaktivität der verwendeten Reporterogenkonstrukte bzw. die Aktivierbarkeit durch einen einzelnen Transkriptionsfaktor, wurden sowohl die Promotorkonstrukte alleine, als auch jeweils die MYB- bzw. bHLH-Transkriptionsfaktoren ohne möglichen Interaktionspartner auf dem jeweiligen Promotorkonstrukt getestet. Als Bezugspunkt und Positivkontrolle wurde ein 35S-GUS-Konstrukt und als Negativkontrolle ein GUS-Konstrukt mit Promotordeletion verwendet (vgl. Material und Methoden). Standardisiert wurden die Messergebnisse durch ein kotransfiziertes 35S-LUCIFERASE-Konstrukt, das eine Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Zellqualität des jeweiligen Versuchsansatzes ermöglicht. Solange sich bei den Kontrollansätzen in mindestens drei unabhängigen Experimenten keine abweichenden Ergebnisse zeigten, wurde auf eine Wiederholung im Achterblock und somit auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Ergebnisse der Kontrollansätze sind in den Abb. 8, 9 und 10 dargestellt.

2.2.17. Ernte transfizierter Protoplasten

In 50ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, N.J., USA) wurden 20ml 240mM CaCl_2 -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. 1ml abgesaugt. Die Protoplasten wurden in dem verbliebenen Überstand vorsichtig resuspendiert und mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette unter Verwendung von „Cell saver“-Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik, 1000µl Kapazität, mit großer Öffnung) in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei -80°C eingefroren.

2.2.18. 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 800µl Luziferase-Extraktionspuffer (100mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5, 1mM DTT) aufgenommen. Die Proben wurden für 30 sec. 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 (2.2.21.), den Luziferase-Test (2.2.22.) und den α -Glukuronidase-Test (2.2.23.) eingesetzt.

2.2.19. Proteinbestimmung nach Bradford

(nach Bradford, 1976)

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

2.2.20. Bestimmung der Luziferase-Aktivität

(nach Wood, 1991)

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

2.2.21. Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität

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

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 μ l Proteinextrakt mit dem gleichen Volumen 4-MUG-Substrat (2mM 4-MUG in 50mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0, 1mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 10mM β -Mercaptoethanol) auf Eis in einer MicroAmp[®]-PCR-Platte (AppliedBiosystems) zusammenpipettiert und dann bei 37⁰C im Thermocycler (GeneAMP[®] PCR System 9700, AppliedBiosystems) inkubiert. Nach 20, 40 und 60min. wurden jeweils 20 μ l des Ansatzes in 200 μ l 200mM Na₂CO₃-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“ (Wellenlänge Anregung: 360nm, Wellenlänge Emission: 460nm, Signalverstärkung („Gain“) 1,0; Spannungswert des Photomultipliers: 1100mV; Messdauer pro Probe: 1,0sec.) wurde die Fluoreszenz der Proben bestimmt. Parallel dazu wurde zur Kalibrierung des Systems stets auch die Fluoreszenz einer 4-MU-Eichkurve gemessen. Die Lichtemission bei 460nm ist der Menge des vorliegende 4-MU proportional. Die Differenz der Meßwerte (60'-40', 40'-20') wurde bestimmt und deren Mittelwert ($\Delta E_{460}/20$ min) gebildet. Die in 100 μ l Extrakt enthaltenen Proteinmenge wurde aus den Ergebnissen der Proteinbestimmung (2.2.22.) abgeleitet. Die Berechnung der spezifischen GUS-Aktivität erfolgte nach der folgenden Formel:

$$(1) E_A(\text{GUS}) = \frac{\Delta E_{460} \cdot 1000 \mu\text{g} / \text{mg} \cdot 200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l}}{20 \text{ min.} \cdot \text{m} / \text{pMol} \cdot \mu\text{g Protein}}$$

mit:

m: Steigung der 4-MU-Eichgeraden

2.2.22. 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.

$$(2) Q_{MW} = \frac{1}{8} \cdot \sum \frac{GUS_i}{LUC_i}$$

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.

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

$$(3) LUC_{MW} = \frac{1}{n} \cdot \sum LUC_i$$

mit:

n: Summe aller Transffektionen

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):

$$(4) F_i = \frac{LUC_{MW}}{LUC_i}$$

Der spezifische GUS-Wert (GUS_i) einer Transfektion wurde mit dem zugehörigen spezifischen Korrekturfaktor F_i multipliziert, so daß man einen standardisierten, korrigierten GUS-Wert (GUS_{ki}) erhielt:

$$(5) GUS_{ki} = F_i \cdot GUS_i$$

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

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

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

$$(7) \quad GUS'_{rel} = \frac{GUS'_i}{GUS'_K}$$

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:

$$(8) \quad \Delta GUS'_{rel} = \sqrt{\left(\frac{\Delta GUS'_i}{GUS'_K}\right)^2 + \left(\frac{GUS'_i \cdot \Delta GUS'_K}{(GUS'_K)^2}\right)^2}$$

mit:

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

2.2.23. Gewinnung von Mesophyll-Protoplasten aus Blattmaterial

(modifiziert nach Sheen, 2001)

Um die in Zellkultur-Protoplasten gesammelten Ergebnisse durch Untersuchungen in der *ttg1-1* Knockout-linie bestätigen zu können, wurden Protoplasten aus Blättern von *ttg1-1* (KO-Mutante des Ökotyps *A. thaliana* var. *Landsberg erecta*) gewonnen. Als Vergleichsmaterial wurde Blattmaterial aus dem „Wildtyp“-Hintergrund von *A. thaliana* var. *Landsberg erecta*. Dazu wurden zunächst 50 Pflanzen beider Linien in Sterilkultur (auf 50ml MS-Medium, WECK-Gläser) 5 Wochen unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden dunkel) bei 22°C angezogen. Dann wurden jeweils ca. 200 Blätter mit einer Rasierklinge in 1mm dünne Streifen geschnitten, ohne dabei zuviel Blattgewebe zu verletzen. Die Streifen wurden in 100 ml Enzymlösung II gegeben und damit im Vakuum infiltriert (5 Minuten, RT;

Infiltration ein zweites mal wiederholen). Danach wurden die Blattstreifen für 2-4 Stunden bei 22°C im Dunkeln bei 50Upm geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die „lysierten“ Blätter durch ein Netz mit 80µm Maschenweite filtriert und anschließend in einem 50 ml Falcon vorsichtig bei 800 Upm in einer Minifuge R abzentrifugiert. Die Protoplasten (sehr weiches Pellet) wurden danach in 25 ml Waschlösung W5 gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in wenig W5 auf eine geeignete Dichte ($\sim 3 \times 10^5$ Protoplasten/ml) resuspendiert.

2.2.24 Transfektion von Mesophyllprotoplasten

Von den so gewonnenen Protoplasten wurden 200µl einem Transfektionsansatz eingesetzt. Hierzu wurde zunächst die DNA (Volumen, Mengen und Ansätze wie bei der Transfektion von Zellkulturprotoplasten) sterilen 10ml Inkubationsröhrchen (Fa. Sarstedt) vorgelegt, dann 200µl Protoplastensuspension zupipettiert und schließlich die DNA Aufnahme durch Zugabe von 220µl PEG-II Lösung gestartet. Die Ansätze wurden durch sanftes Schütteln gemischt und bei RT inkubiert. Nach 30 Minuten wurde 1ml Waschlösung W5 zugegeben, die Ansätze abzentrifugiert (800 Upm, Minifuge R) und in 2ml Medium M5 vorsichtig resuspendiert. Die Transfektionsansätze wurden über Nacht (20 Stunden) bei 22°C im Dunkeln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze nach Zugabe von 8ml 240mM CaCl_2 -Lösung bei 2000Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1ml abgesaugt, das Pellet vorsichtig darin resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 15 sec. bei 15000g zentrifugiert, dann die Eppendorf Gefäße in gleicher Rotorposition um 180° gedreht, und erneut 15 Sekunden bei 15000g zentrifugiert, um ein solides Pellet zu erhalten. Der Überstand wurde vollständig abgezogen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung bzw. Aufarbeitung und Messung der Proben sowie die Datenauswertung erfolgte wie zuvor für die Zellkulturprotoplasten beschrieben (siehe 2.2.18 bis 2.2.22).

2.2.25. 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 Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt). Design und Auswahl der verwendeten Sonden-/Primer-Systeme wurden nach Herstellerangaben mittels des Software-Pakets PrimerExpress® (Version 1.5.) derselben Fa. durchgeführt. Für die Post-PCR-Datenanalyse wurde die SDS (Sequence Detection System) Software Version 1.7. (Applied Biosystems) sowie das Tabellen-Kalkulationsprogramm Excel® der Fa. Microsoft verwendet.

2.2.25.1. 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.

2.2.25.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Aus kleinen Mengen transfizierter bzw. nicht transfizierter Zellkultutprotoplasten (< 100mg) wurde die Gesamt-RNA mittels des „Nucleospin® RNA-Plant“-Kit der Fa. Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Standen größere Mengen Pflanzenmaterial zur Verfügung, wurde auf die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Dunsmuir *et al.* (1988) zurückgegriffen. Dabei wurden ca. 5g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in ein Kunststoff-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 50ml (Fa. Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland), in dem 10ml RNA-Lysis-Puffer (100mM Tris/HCl pH 8,5; 100mM NaCl; 20mM 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 Minuten wie vorher geschüttelt. Nach Zentrifugation (Minifuge, 5000rpm, 10min., 4°C) zur Trennung der Phasen wurde der die RNA enthaltende, wässrige Überstand in ein neues 50ml-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. 3M NaAc pH 5,2 versetzt und 20min. bei -80°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Minifuge, 5000rpm, 30min., 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 Stunden auf Eis inkubiert und die RNA durch Zentrifugation wie zuvor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 2 ml DEPC-Wasser gelöst und die RNA durch Ethanol/Salz-Behandlung gefällt. Die RNA wird wie zuvor durch erneute Zentrifugation pelletiert und das Pellet in 200µl DEPC-Wasser gelöst. RNA-Quantität und -Qualität wurden photometrisch bestimmt.

2.2.25.1.2. DNaseI-Restriktion von Gesamt-RNA

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

- 10µl Gesamt-RNA (max. 10µg RNA)
- 4µl Erststrang-Puffer (250mM Tris/HCl pH8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl₂)
- 5µl DNaseI (2,7 Kunitz-Einheiten/µl; Qiagen)
- 1µl RNase-freies Wasser
- 20µl Gesamtvolumen

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

2.2.25.1.3. 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.x.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 (5M, sterilfiltriert) zu den Gesamt-RNA-Proben. Nach kurzem Mischen erfolgte die Fällung für mindestens 30min. bei -20°C . Der Fällung folgte ein Zentrifugationsschritt (14000rpm, 4°C , 30min.). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 3 M NaAc pH 5,6 gewaschen und erneut zentrifugiert (14000rpm, 4°C , 5min.). 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.

2.2.25.1.4. Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Synthese des cDNA-Erststranges wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

- RNA (max. 5 μg)
- 4 μl Erststrang-Puffer (siehe 2.x.1.2.)
- 2 μl MgCl_2 (50mM)
- 1 μl dNTPs (je 10mM)
- 2 μl DTT (0,1M)
- 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 (50ng/ μl)
- RNase-freies Wasser ad 20 μl

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

2.2.25.2. Quantifizierung der endogenen 18S-rRNA-Referenz

Als endogene Referenz zur Normalisierung der Genexpression diente in allen Fällen die in den Proben enthaltende Menge an 18S-rRNA. Nach Herstellerangaben wurden hierzu die fertig vorgemischten, sogenannten 18S-PDAR (18S-rRNA-Pre-developed TaqMan® Assay Reagents) der Fa. Applied Biosystems verwendet. Diese beinhalteten 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

187nt 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:

- 12,5µl Platinum®-Quantitative PCR SuperMix-UDG (2fach konzentriert)
- 1,25µl 18S-PDAR (20fach konzentriert)
- 0,5µl ROX (5-Carboxy-X-Rhodamin; 25µM)
- 5µl cDNA-Matrize
- 5,75µl Wasser
- 25µl Gesamtvolumen

Folgendes PCR-Profil wurde verwendet:

- 2min. 50°C
- 2min. 95°C
- 40 Zyklen á
 - 15sec. 95°C
 - 1min. 60°C

2.2.25.3. Quantifizierung der relativen Genexpression spezifischer Zielgene

Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

- 12,5µl Platinum®-Quantitative PCR SuperMix-UDG
- 5'-PCR-Primer: 900nM Endkonzentration
- 3'-PCR-Primer: 900nM Endkonzentration
- TaqMan®-Probe: 200nM Endkonzentration
- 5µl DNA-Matrize
- 0,5µl ROX
- RNase-freies Wasser ad 25µl

Folgendes PCR-Profil wurde verwendet:

- 2min. 50°C
- 2min. 95°C
- 40 Zyklen á
 - 15sec. 95°C
 - 1min. 60°C

Die Anwendung des Gauss'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes die zugehörigen Fehlerwerte:

$$(9) \Delta R_{\text{Norm}} = \sqrt{\left(\frac{\partial R_{\text{Norm}}}{\partial C_t^{\text{Ref}}} \cdot \Delta C_t^{\text{Ref}}\right)^2 + \left(\frac{\partial R_{\text{Norm}}}{\partial C_t^{\text{Ziel}}} \cdot \Delta C_t^{\text{Ziel}}\right)^2} = \ln 2 \cdot R_{\text{Norm}} \cdot \sqrt{(\Delta C_t^{\text{Ref}})^2 + (\Delta C_t^{\text{Ziel}})^2}$$

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):

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

$$(10) \ln 2 \cdot R \cdot \sqrt{(\Delta C_t^{\text{P(Ziel)}})^2 + (\Delta C_t^{\text{P(Ziel)}})^2 + (\Delta C_t^{\text{K(Ref)}})^2 + (\Delta C_t^{\text{K(Ziel)}})^2}$$

2.2.26 Transformation von *Arabidopsis thaliana* Ökotypen mittels *Agrobacterium tumefaciens* (modifiziert nach Koncz et al., 1986)

Mit einer selektionierten Transformanten-Kolonie des Agrobakterienstammes *GM3101* wurden zunächst 5ml YEP Medium beimpft und 48h bei 28°C inkubiert (60 Upm). 1ml dieser Vorkultur wurde benutzt um 500ml YEP Medium (+1% Saccharose; im 2L-Erlenmeyerkolben) anzupflanzen. Diese Kultur wurde 20h bei 28°C und 160 Upm inkubiert. Nach 20h wurde der Kultur erneut 20gr Saccharose zugesetzt und die erhaltene Bakteriensuspension direkt zur Pflanzentransformation eingesetzt. Der Bakteriensuspension wurde direkt vor der Pflanzentransformation ein mildes Detergenz zugesetzt, das sowohl die Schaumbildung verhinderte als auch die Kontaktfläche zu den Pflanzen erhöhte und somit eine gleichmäßige Benetzung der Pflanz/Blüten ermöglichte. Die blühenden Pflanzen (mit Blüten in allen Entwicklungsstadien) wurden kopfüber in die in die Bakteriensuspension „gedippt“ und für ca. 10 Sekunden darin auf und ab bewegt. Danach wurden die Pflanzen in Plastiktüten (Melitta-Frischhaltebeutel) verpackt und für 2 Tage im Gewächshaus unter Langtagbedingungen inkubiert. Danach wurden die Plastiktüten entfernt und die Pflanzen bis zum Abreifen der Samen im Langtag belassen. Die erhaltenen Samen wurden je nach Resistenzmarker auf Kanamycin-haltigem Medium oder durch BASTA-Selektion selektioniert.

2.2.27 Auswertung der Lokalisation von transient exprimierten GFP-Fusionsprotein in Arabidopsis Zellkulturprotoplasten

Mit GFP-Fusionskonstrukten transfizierte Zellkulturprotoplasten wurden nach 16-20 stündiger Inkubation auf einem Zeis-Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und die Ergebnisse mit einer Digitalkamera fotodokumentiert. Zur statistischen Auswertung wurden je Ansatz 3 mal 100 intakte Protoplasten ausgewertet. Jedes Experiment wurde mindestens 3 mal wiederholt, so dass je Konstrukt bzw. je Konstruktkombination mindestens 900 intakte Protoplasten ausgewertet wurden. Als Kontrolle diente ein 35S-GFP-Konstrukt.

2.2.28 Identifikation von bHLH Motiven im Arabidopsis thaliana Genom

Basierend auf dem von Atchley and Fitch (1997) für das bHLH Motiv beschriebenen Konsensus wurde die genomische DNA Sequenz mittels des TBLASTN Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) durchsucht. Zusätzlich wurden die ZmSN ähnlichsten Sequenzen bei GenBank basierend auf der ZmSn-Proteinsequenz ebenfalls mit dem TBLASTN Algorithmus ermittelt. Außerdem wurden die bei der Annotation des Arabidopsis thaliana Genoms (TAIR: www.arabidopsis.org; MIPS: mips.gsf.de/proj/thal/) vorhergesagten offenen Leseraster (ORFs) nach dem bHLH Motiv durchsucht. Darüber hinaus wurde noch mittels Freitextsuche nach den Schlagwörtern bHLH, Helix-Loop-Helix, und MYC gesucht und die erhaltenen Ergebnisse/Annotationen durch Vergleiche mit dem Atchley-Konsensus auf das Vorhandensein einer echten bHLH Domäne überprüft. Zusätzlich zu dem so erhaltenen Satz an putativen bHLH Genen, wurden alle die Gene dem Datensatz hinzugefügt, deren vorhergesagte oder tatsächliche Genprodukte die INTERPRO Domänen IPR001092, IPR003015 (www.ebi.ac.uk/interpro/) oder das PROSITE Motiv PS00038 (www.expasy.ch/prosite) enthielten. Die bHLH Domänen der so identifizierten bHLH Proteine wurden mittels AlignX (VectorNTi suite 6, Fa. Informax) sequenzspezifisch aneinander ausgerichtet und die jeweils nächstähnlichen Gene in Gruppen eingeteilt. Für jede der Gruppen wurde ein eigener Konsensus ermittelt. Diese Konsensi wurden schließlich zur Identifikation von ähnlichen Sequenzen mittels des PSI-Blast Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) benutzt, um auch die bisher noch fehlenden bHLH Sequenzen zu finden und die Gruppen zu komplementieren. Sequenzen, die zuvor als bHLH beschrieben worden waren, jedoch kein bHLH Motiv

enthielten oder die durch Atchley (1997) definierten Kriterien nicht erfüllt wurden aussortiert. Die Exon-Intron Struktur für jede Vorhersage wurde durch Vergleiche mit den nächstähnlichen bHLH Sequenzen, schon vorhandenen cDNAs, und bekannten mRNA-Sequenzen überprüft und nötigenfalls optimiert. Zusätzlich erfolgte noch ein Vergleich mit den Vorhersagen verschiedener Genstruktur-Vorhersage-Programmen (GeneMark: opal.biology.gatech.edu/GeneMark ; GeneScan: genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN/genscan.cgi). Auf diese Weise konnten nicht nur zusätzliche Exons und Introns identifiziert sondern auch noch weitere bHLH gefunden werden, die aus Tandemduplikationen hervorgegangen sind.

2.2.29. Strukturelle Einteilung der *AtbHLH* Transkriptionsfaktoren

Von jedem der 162 *AtbHLH*-Gene wurde zunächst nur die Aminosäuresequenz der bHLH-Domäne benutzt, um mit dem AlignX-Programm der VNTi-Benutzeroberfläche auf dem PC ein Alignment zu erstellen und so die sequenzhomologsten bHLH-Faktoren zu bestimmen (Neighbor-Joining Tree Algorithmus). AlignX basiert auf dem ClustelW-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994). Um diese erste strukturelle Einteilung zu verifizieren, wurde auf Basis des manuell verbesserten Alignments eine „bootstrap-Analyse“ mit dem Programm PHYLIP (Felsenstein, 1993) durchgeführt. Dabei wurden basierend auf der Sequenzinformation 500 unterschiedliche Stammbäume berechnet und alle Verzweigungen, die in mehr als 250 dieser Bäume auftraten, wurden zur Berechnung der letztendlichen strukturellen Einteilung miteinbezogen. Außerdem wurden die Proteinsequenzen der 162 *AtbHLH*-Faktoren in ihrer Gesamtlänge mit Hilfe des MEME-Programms (Bailey *et al.*, 1994) nach konservierten Bereichen außerhalb der bHLH-Domäne durchsucht und die Ergebnisse in die strukturelle Einteilung mit einbezogen.

3. Ergebnisse

Um alle für bHLH-Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene im Arabidopsis Genom zu identifizieren und einen strukturellen Überblick zu geben, wurden unterschiedliche bioinformatische Methoden mit verschiedenen experimentellen Ansätzen kombiniert. Die Analyse schließt Daten zu bereits publizierten *AtbHLH*-Faktoren mit ein und liefert Ansätze zur Aufklärung möglicher Funktionen und Redundanzen. Des Weiteren werden Aspekte der Beteiligung der *AtbHLH*-TF an der transkriptionellen Regulation bestimmter Strukturgene der Flavonoidbiosynthese beleuchtet. Dazu wurden zunächst die strukturell ähnlichsten Faktoren zur R-bHLH-Familie in Mais identifiziert und auf deren Orthologie in der Regulation der Flavonoidbiosynthese und im Speziellen der Anthocyanbiosynthese zu untersucht. Außerdem wurde analysiert, wie spezifisch das regulatorische Interaktionsnetzwerk von bHLH und R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren ist. Dazu war zu klären, inwiefern *AtbHLH*-Faktoren bei der transkriptionellen Aktivierung bestimmter Strukturgene der Flavonoidbiosynthese durch ihre sequenzähnlichsten oder auch durch weniger homologe Faktoren aus Arabidopsis ersetzbar sind. Außerdem wurde untersucht, inwieweit die Spezifität der Aktivierung durch den MYB-Interaktionspartner beeinflusst wird. Da *AtMYB*-Proteine bekannt waren, die ohne bHLH-Interaktionspartner zu einer Aktivierung bestimmter Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in der Lage sind, wurde überprüft, ob diese durch Ko-Überexpression von verschiedenen *AtbHLH*-Genen eine Erhöhung ihrer Aktivierungsfähigkeit zeigen. Vor dem Hintergrund, dass die beiden Interaktionspartner aus Mais *ZmC1* (R2R3_MYB) und *ZmSn* (bHLH) nur zusammen bestimmte Reportergenkonstrukte aktivieren können, wurde zum einen untersucht, ob es *AtbHLH*-Faktoren in Arabidopsis gibt, die auch ohne Ko-Überexpression bestimmter *AtMYB*-Gene zu einer spezifischen Aktivierung bestimmter Reportergenkonstrukte führen. Zum anderen wurde untersucht, inwiefern es *AtbHLH*-Faktoren gibt, die nur in spezifischer Interaktion mit *AtMYB*-Faktoren zu einer Aktivierung führen. Schließlich gaben unterschiedliche Publikationen Hinweise auf die Beteiligung einer dritten Proteinfamilie an der Regulation der untersuchten Stoffwechselwege, so dass zusätzlich die Auswirkungen von TTG1 (WD40 Protein) auf die synergistischen Effekte spezifischer *AtbHLH* und *AtMYB* Interaktionspartner in der transkriptionellen Regulation untersucht wurden.

3.1 Es gibt 162 bHLH-Proteine kodierende Gene im *A. thaliana* Genom

Um nach Veröffentlichung des Arabidopsis Genoms (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) einen vollständigen Überblick über die Transkriptionsfaktorfamilie geben zu können, wurden - basierend auf den Aminosäuresequenzen der *ZmSn*-ähnlichen bHLH-TF und dem durch Atchley et al., 1997 und 1999 beschriebenen Konsensus - detaillierte Analysen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Das Alignment in Abb. R1 gibt exemplarisch den Aufbau der bHLH-Domäne in Pflanzen anhand der sequenzhomologen Gene zum Mais-Faktor *ZmSn* wieder.

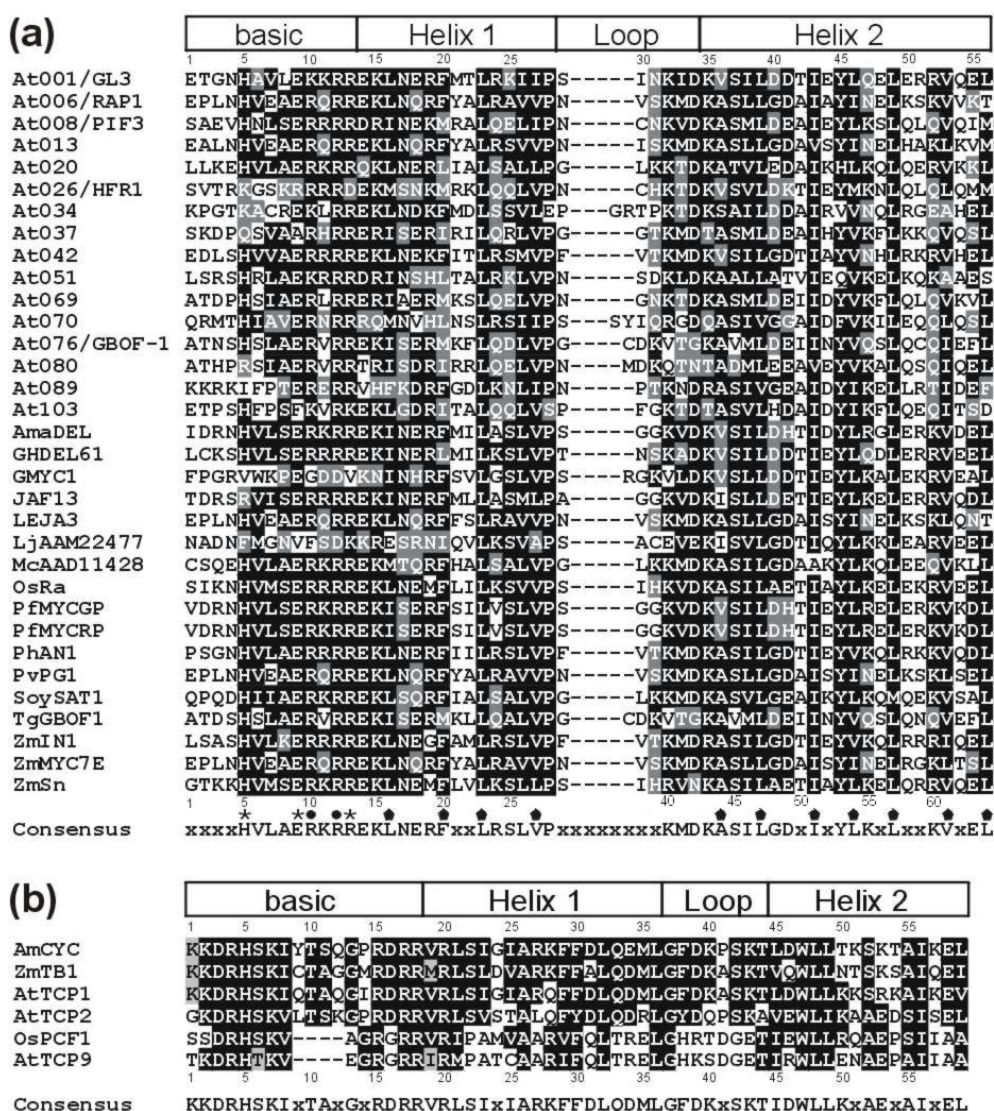


Abb.R1 Alignment der basischen Helix-Loop-Helix-Strukturen ausbildenden Domänen auf Proteinebene von a) *ZmSn* und den sequenzähnlichen bHLH TF im Pflanzenreich und b) bekannten TCP-Faktoren (Cubas et al., Plant J.1999). Sterne indizieren die Aminosäure-Reste, die bei der Bindung der DNA direkten Kontakt mit den Basen haben, Punkte markieren die das DNA-Rückgrad kontaktierenden AS-Reste und Fünfecke solche AS-Reste, die für die Dimerisierung und Komplex-Stabilisierung der bHLH Proteine wichtig sind.

Es verdeutlicht, welche Reste für die Findung eines allgemeinen Konsensus zur genomweiten Suche von *AtbHLH*-TF als relevant erscheinen (vgl. Sterne/Fünfecke in Abb.R1). Die in Abb.1b dargestellten TCP-Faktoren wurden in der Analyse der bHLH-TF ausgeschlossen, da sie zwar eine dreidimensionale Struktur ähnlich der der bHLH aufweisen, jedoch keine ausreichende Sequenzhomologie besitzen. Sie werden daher als Resultat eines konvergenten Evolutionsprozesses angesehen und in der vorliegenden Arbeit nicht näher betrachtet. Durch kontinuierliche Optimierung der Suchkriterien anhand der bereits identifizierten *AtbHLH*-Sequenzen konnten schließlich 162 Gene, die für bHLH-Motive enthaltende Proteine kodieren, im *A. thaliana* Genom identifiziert werden. Tab. R1 gibt die *AtbHLH* Transkriptionsfaktoren in ihrer Gesamtheit wieder.

Die Einteilung in Gruppen (in Tab. R1 farblich hervorgehoben) erfolgte anhand der Resultate einer „bootstrapped neighboured joining tree“-Analyse (vgl. Material und Methoden), die auf Basis eines manuell nacheditierten Alignments der Proteinsequenzen aller 162 bHLH-Domänen durchgeführt wurde. Da diese strukturelle Einteilung keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Phylogenie der bHLH Faktoren zulässt, zumal nur Sequenzen aus einem Organismus mit in die Analyse eingeflossen sind, wurde auf die Darstellung des „Clusterings“ in Form eines phylogenetischen Baumes verzichtet. Jedem bHLH wurde ein generischer Name (*AtbHLH*-Nummer) als eindeutiges Erkennungszeichen zugeordnet. Allerdings stellt die Gruppierung in Tab. R1 nicht nur eine reine strukturelle Einteilung dar, sondern ermöglicht auch Rückschlüsse auf mögliche Funktionen und Redundanzen innerhalb einzelner Gruppen und darüber hinaus. Dazu wurden in Tab. R1 auch alle bisher bekannten Funktionen durch Referenzen und Angabe der Synonyme indiziert. Die außerhalb der bHLH-Domäne konservierten Bereiche (in Tab. R1 in den graphischen Modellen zur bHLH-Struktur der einzelnen Subgruppen durch ein- oder mehrfarbige Boxen hervorgehoben) können Hinweise auf mögliche Interaktionspartner und Funktionen der bHLH-Proteine geben.

Tabelle 1 bHLH Transkriptionsfaktoren im *A. thaliana* Genom

Gruppe	AtbHLH Nummer	AGI-Gencode	Synonym	GenBank	5-9-13	Exon Zahl	Referenz	Konservierte Bereiche
Ia	67	★	At3g61950	AF488600	H-E-R	5		
	70	★	At2g46810	AF488602	H-E-R	4		
	97	★	At3g24140	AF488624	H-E-R	4		
	71	★	At5g46590	AF488603	H-E-R	2		
	99	★	At5g65320	AF488625	H-E-R	3		
	96	★	At1g72210	AJ459771	H-E-R	3		
	94	★	At1g22490	AF488622	H-E-R	3		
	57	★	At4g01460	AF488590	H-E-R	3		
	45	★	At3g06120	AF488580	H-E-R	3		
	98	★	At5g53210	NM_124700	H-E-R	4		
	36	★	At5g51780	AF488575	H-E-R	3		
	118	★	At4g25400	NM_118672	H-E-R	3		
	120	★	At5g51790	NM_124558	H-E-R	3		
	126	★	At4g25410	Z46563	H-E-R	3		
	55	★	At1g12540	AF488589	H-E-R	3		
	125	★	At1g62975	AF506369	H-E-R	3		
	162	★	At4g20970	NM_118215	R-E-R	2		
	38	★	At3g56970	AF488576	H-E-R	2	Kang et al., 2003	
Ib	39	★	At3g56980	AF488577	H-E-R	2	Kang et al., 2003	
	100	★	At2g41240	AF488626	H-E-R	2		
	191	★	At5g04150	AJ519810	H-E-R	3		
	160	★	At1g71200	NM_105789*	H-E-R	2		
	95	★	At1g49770	AF488623	H-E-R	3		
	10	★	At2g31220	AF251695	T-E-R	3		
	89	★	At1g06170	AF488619	I-E-R	3		
	91	★	At2g31210	AJ519809	P-E-R	3		
	138	★	At2g31215	NM_179830	T-E-R	2		
	21	★	At2g16910	AF488565	N-E-R	5	Sorensen et al., 2003	
IIla	28	★	At2g28160	AF488570	T-E-R	4		
	22	★	At4g21330	NM_118253	N-E-R	3		
IIlb	33	★	At1g12860	AF488572	N-E-R	4		
	116	★	At3g26744	AY079016	N-E-R	4	Chinnusamy et al., 2003	
	61	★	At5g10570	AF488594	N-E-R	4		
	93	★	At5g65640	AF488621	N-E-R	4		
IIlc	27	★	At4g29930	AF488569	N-E-R	5		
	35	★	At5g57150	AF488574	N-E-R	5		
	90	★	At1g10610	AF488620	N-E-R	8		
IIId	3	★	At4g16430	AF251688	H-E-R	1		
	13	★	At1g01260	AY120752	H-E-R	1	GenBank submission	
	17	★	At2g46510	AY094399	H-E-R	1		
	14	★	At4g00870	AJ519812	H-E-R	2		
IIle	6	★	At1g32640	X99548	H-E-R	1	Abe et al., 1997 / 2003	
	4	★	At4g17980	AF251689	H-E-R	1	Abe et al., 2003	
	5	★	At5g46760	AF251690	H-E-R	1	Smolen et al., 2002	
	28	★	At5g46830	AF252636	H-E-R	1		
IIIf	1	★	At5g41315	GL3	H-E-R	7	Payne et al., 2000	
	2	★	At1g63650	EGL1 / EGL3	H-E-R	7	Zhang et al., 2000	
	42	★	At4g09820	TT8	H-E-R	7	Nesi et al., 2000	
	12	★	At4g00480	AtMYC1	L-D-R	8	Urao et al., 1996	
IVa	18	★	At2g22750	AF488562	H-E-R	3		
	25	★	At4g49567	AF488567	H-E-R	3		
	19	★	At2g22760	AF488563	H-E-R	3		
	20	★	At2g22770	AF488564	H-E-R	3		
	47	★	At3g47640	AF488582	K-E-R	4		
IVb	121	★	At3g19860	AF488633	K-E-R	4		
	11	★	At4g36060	AF251696	K-E-R	5		
IVc	34	★	At3g23210	AF488573	K-E-R	4		
	104	★	At4g14410	AF488628	K-E-R	4		
	105	★	At5g54580	AF488629	K-E-R	5		
	115	★	At1g51070	AF488632	K-E-R	5		
IVd	41	★	At5g56960	NM_125078	H-E-R	5		
	92	★	At5g43650	AY065390	H-E-R	3		
Va	46	★	At5g08130	AF488581	H-E-R	10		
	102	★	At1g69010	AF488627	H-E-R	7		
	141	★	At5g38860	NM_123247	H-E-R	8		
Vb	30	★	At1g68810	AY072161	H-E-R	2		
	32	★	At3g25710	AF488571	H-E-R	2		
	106	★	At2g41130	AY074639	H-E-R	2		
	107	★	At3g56770	NM_115536	H-E-R	2		
	51	★	At2g40200	AF488586	H-E-R	2		
	131	★	At4g38071	AJ577587	H-E-R	2		
	108	★	At1g25310	NM_102341	D-K-R	4		
VI	109	★	At1g68240	AJ577585	R-E-R	5		
	65	★	At3g59060	PIL6	H-E-R	5	Yamashino et al., 2003	
VIIa	9	★	At2g43010	PIF4	H-E-R	6	Huq et al., 2002	
	8	★	At1g09530	PIF3	H-E-R	6	Ni et al., 1998	
	15	★	At2g20180	PIF5	H-E-R	7	Yamashino et al., 2003	
	23	★	At4g28790	AF488566	H-E-R	6		
	119	★	At4g28811	AJ519811	H-E-R	7		
	127	★	At4g28815	AJ577586	H-E-R	6		
	56	★	At4g28800	NM_119024	H-E-R	8		
	124	★	At2g46970	AB090873	H-E-R	6	Yamashino et al., 2003	
	132	★	At3g62090	AB090874	Y-E-R	5	Yamashino et al., 2003	
	26	★	At1g02340	HFR1	K-R-D	5	Fairchild et al., 2000	
	16	★	At4g00050	AF488561	H-E-R	5		
	72	★	At5g61270	AF488604	H-E-R	5		
VIIb	73	★	At5g67110	ALCATRAZ	H-E-R	5	Rajani et al., 2001	
	24	★	At4g36930	SPATULA	H-E-R	7	Heisler et al., 2001	

Tab.R1: Strukturelle Einteilung der 162 AtbHLH-Proteine. Die strukturelle Verwandtschaft der AtbHLH-Faktoren wurde anhand eines ClustalW-Alignments der bHLH-Domäne auf Proteinebene durch eine „neighbourhood joining tree“ Analyse bestimmt. Von einer Darstellung als Stammbaum wurde jedoch wegen der im strukturellen Clustering fehlenden phylogenetischen Aussagekraft abgesehen. Die Gruppierung in 14 Subgruppen wird durch unterschiedliche Hintergrundfarben angedeutet. Die Namen der Gruppen befinden sich in der ersten Spalte. (Fortsetzung nächste Seite)

Tabelle 1 bHLH Transkriptionsfaktoren im *A. thaliana* Genom (fortgesetzt)

Gruppe	AtbHLH Nummer	AGI-Gencode	Synonym	GenBank	5-9-13	Exon Zahl	Referenz	Konservierte Bereiche
VIIIa	146	At4g30180		AU237244	P-G-E	1		
	117	At3g22100		NM_113106	N-I-R	1		
	52	At1g30670		AF488587	Q-A-R	2		
	53	At2g34820		AF488588	Q-A-R	2		
	37	At3g50330		NM_114893	Q-A-R	1		
	88	At5g67060		AF488618	Q-A-R	1		
	43	At5g09750		NM_121012	Q-A-R	1		
	40	At4g00120		AF488578	Q-A-R	1		
	87	At3g21330		AF488617	Q-A-R	1		
	140	At5g01310		NM_120209	Q-A-R	1		
	54	At1g27740		AY085436	Q-A-R	4		
	139	At5g43175		NM_148080	Q-A-R	4		
	84	At2g14760		AJ577584	Q-A-R	5		
	85	At4g33880		AF488616	Q-A-R	5		
	83	At1g66470		AF488615	Q-A-R	5		
	86	At5g37800		NM_123139	Q-A-R	5		
IX	80	At1g35460		AF488612	R-E-R	5		
	81	At4g09180		AF488613	R-E-R	5		
	122	At1g51140		AY063120	R-E-R	6		
	129	At2g43140		AU237473	R-E-R	5		
	128	At1g05805		AY045907	R-E-R	6		
	130	At2g42280		NM_129790	R-E-R	6		
X	68	At4g29100		AF488634	S-L-K	7		
	133	At2g20095		AJ577588	S-L-K	7		
	110	At1g27660		NM_102531	S-F-K	7		
	123	At3g20640		AU239808	P-F-K	7		
	103	At4g21340		AY065362	H-F-K	6		
	112	At1g61560		AF488630	P-F-K	6		
	114	At4g05170		NM_116756	P-F-K	6		
	111	At1g31050		AA395190	L-K-K	6		
	153	At1g05710		AJ576040	L-S-K	5		
	154	At2g31730		AJ576041	L-S-K	5		
	113	At3g19500		AF488631	S-A-K	5		
	135	At1g74500		AY088286	S-S-E	2		
	161	At3g47710		NM_114639	Q-S-D	2		
	134	At5g15160		AK118887	A-S-D	2		
	136	At5g39860*		AY088246	S-P-D	2		
XI	7	At1g03040		AF251692	H-E-R	6		
	59	At4g02590		AF488592	H-E-R	6		
	82	At5g58010		AF488614	H-E-R	5		
	66	At2g24260		AF488599	H-E-R	6		
	69	At4g30980		AF488601	H-E-R	6		
XII	75	At1g25330		AF488607	H-E-R	6		
	50	At1g73830	BEE3	AF488585	H-E-R	6	Friedrichsen et al., 2002	
	44	At1g18400	BEE1	AF488579	H-E-R	6	Friedrichsen et al., 2002	
	31	At1g59640	ZCW32	AB028232	H-E-R	5	GenBank submission	
	79	At5g62610		AF488611	H-E-R	6		
	58	At4g36540	BEE2	AF488591	H-E-R	5	Friedrichsen et al., 2002	
	64	At2g18300		AF488597	H-E-R	6		
	49	At1g68920		AF488584	H-E-R	8		
	76	At1g26260		AF488608	H-E-R	8		
	63	At4g34530		AF488596	H-E-R	6		
	62	At1g32340		AF488595	H-E-R	8	GenBank submission	
	78	At5g48560		AF488610	H-E-R	7		
	77	At3g23690		AF488609	H-E-R	7		
	74	At1g10120		AF488606	H-E-R	8		
	137	At5g50915		AY087602	H-E-R	7		
	48	At2g42300		AF488583	H-E-R	6		
	60	At3g57800		AF488593	H-E-R	6		
XIII	142	At5g64340		AY062561	G-E-K	1		
	143	At5g09460		BT000009	G-E-K	1		
	145	At5g50010		BT005301	K-N-E	1		
	144	At1g29950		AF361607	S-D-R	1		
XIV	147	At3g17100		NM_190270	V-K-L	1		
	148	At3g06590		NM_111535	V-N-I	1		
	149	At1g09250		BT003052	L-N-L	1		
	150	At3g05800		NM_111454	G-R-L	1		
	151	At2g47270		NM_130295	S-S-C	1		
	158	At2g43060		AJ576045	K-S-A	1		
	159	At4g30410		AJ576046	S-A-K	1		
	152	At1g22380		NM_102088	I-R-S	1		
	155	At2g31280		AJ576042	S-R-R	9		
	156	At2g27230		AJ576043	N-R-R	8		
	157	At1g64625		AJ576044	S-R-R	8		

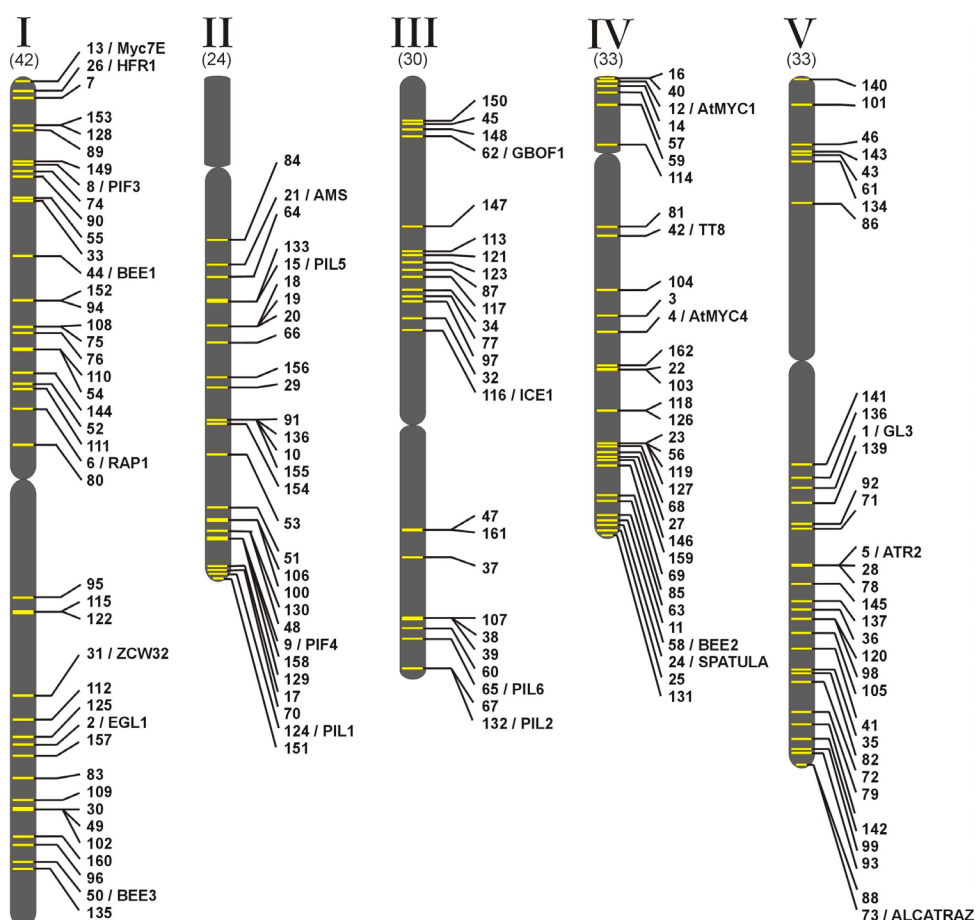
Tab.R1 (fortgesetzt)

Neben den Synonymen (Spalte4) und den zugehörigen Referenzen zu bereits beschriebenen Funktionen (Spalte8) sind auch vorhandene GenBank-Akzessionen, AGI-Gencodes, sowie die jeweiligen putativen 5-9-13-DNA-Bindemotive und Angaben zu Duplikationsvorgängen in der Tabelle zu finden (rote Sterne indizieren über das Genom verteilte, vorwiegend interchromosomale Duplikationsvorgänge; blaue Sterne indizieren intrachromosomale Duplikationen mit direkter anschließender Lage, wie Tandemduplikationen). EGL1 wurde zunächst 2001 als EGL1 publiziert, jedoch wegen der eindeutigeren Funktionsbezeichnung in einer aktuellen Publikation als EGL3 veröffentlicht. Die Lage der bHLH-Domäne (rote Box) innerhalb der Proteine und konservierte Bereiche außerhalb der bHLH-Domäne (nummerierte Boxen, teilweise farbig, wenn über Subgruppen hinaus konserviert) sind graphisch dargestellt und sollen ebenfalls Hinweise auf mögliche funktionelle Bereiche wie Interaktionsdomänen für Faktoren anderer Proteinfamilien geben. Die Konsensussequenzen der Motive 1 - 40 finden sich im Anhang dieser Arbeit. *Da für AtbHLH160 eine neue Annotation zwar eingereicht, aber noch nicht bestätigt wurde wird hier auf die alte Akzession verwiesen.

3.1.1 Die chromosomale Verteilung der *AtbHLH*-Gene

Bei Betrachtung der chromosomalen Verteilung der *AtbHLH* kodierenden Gene ergibt sich das in Abb.R2a dargestellte Bild. Während sich die bHLH-Verteilung über alle Chromosomen teilweise mit deutlicher Clusterbildung erstreckt, konnte im oberen Arm von Chromosom 2 kein einziges für einen bHLH TF kodierendes Gen identifiziert werden. Da es in der Evolution des *A. thaliana* Genoms zu vielfältigen Reorganisations- und Duplikationsvorgängen gekommen ist (vgl. Blanc *et al.*, 2003),

a)



b)

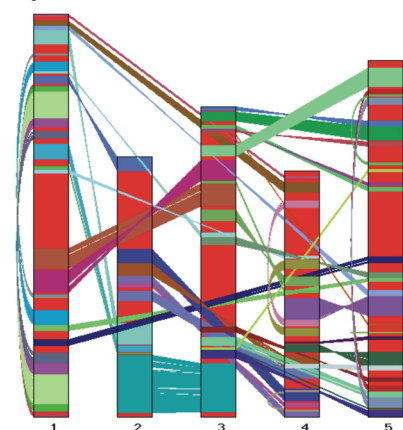


Abb.R2 a) chromosomale Verteilung der *AtbHLH*-Gene auf den fünf Chromosomen des *A. thaliana* Genoms; die römischen Ziffern geben die Nummern der Chromosomen an und die Zahlen in Klammern darunter die Gesamtzahl der *AtbHLH*-Gene auf dem jeweiligen Chromosom und **b)** duplizierte Bereiche des Arabidopsis Genoms auf den fünf Chromosomen (Quelle: TAIR; www.arabidopsis.org/; vgl. Blanc *et al.*, 2003); die roten Bereiche stellen nichtduplizierte Bereiche dar, wobei es auch hier zu Tandemduplikationsvorgängen gekommen sein kann. Andersfarbige Bereiche und die zugehörigen Verbindungslinien deuten die inter- und intrachromosomal duplizierten Bereiche an. Der Vergleich zwischen den beiden Graphiken a) und b) soll die Visualisierung duplizierter *AtbHLH*-Gene erleichtern. Beispiele sind im Text aufgeführt.

ist es naheliegend, dass auch eine Vielzahl an *AtbHLH*-Genen dupliziert vorliegen. In der Tat gibt es eine Reihe von Tandemduplikationen (Tab. R1, blaue Sterne) und Duplikationen ganzer Genbereiche auf andere Chromosomen im *A. thaliana* Genom (Tab. R1, rote Sterne; vgl. Abb. R1a). Beispiele solcher intra- bzw. interchromosomalen Duplikationsvorgänge weisen auch funktionelle Redundanzen auf. So z.B. bei den innerhalb von Chromosom 1 duplizierten Genen *AtbHLH044/BEE1* und *AtbHLH050/BEE3*, deren Genprodukte zusammen mit *AtbHLH058/BEE2* im Brassinosteroid-Signalweg aktiv sind. Gene wie *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* sind ebenfalls aus Duplikationsvorgängen hervorgegangen. Und beide weisen Funktionen in der Regulation der Trichomentwicklung auf. Auch die in die Subgruppe Ib fallenden *AtbHLH038*, *039*, *100* und *101* sind das Resultat von Duplikationsvorgängen - *AtbHLH038* und *039* als Tandemduplikation auf dem unteren Arm von Chromosom III und *AtbHLH100* (unterer Arm von Chromosom II) sowie *AtbHLH101* (oberer Arm Chromosom V).

3.1.2 Die *AtbHLH*-Konsensussequenz der bHLH-Proteindomäne – Suchkonsensus und Einteilungskriterium

Da bHLH-Faktoren außerhalb ihrer bHLH-Domäne meist nur geringe Sequenzkonservierung auf Proteinebene aufweisen, wurde stets nur die Konsensussequenz der Domänen der bereits identifizierten *AtbHLH* und einiger anderer pflanzlicher bHLH-Proteine zur Erstellung des Suchkonsensus verwendet (vgl. Material und Methoden). Während der fortwährenden Suche wurde der *AtbHLH*-Suchkonsensus immer wieder um die neugefundenen Sequenzen ergänzt. Dies führte zu einer dynamischen Optimierung, die bis zur Identifikation von 162 *AtbHLH*-Faktoren einigen Modifikationen unterzogen wurde. Die Summe aller identifizierten Faktoren ermöglicht nun eine Darstellung der Kriterien, die zur Identifikation von *AtbHLH* Proteinen herangezogen werden können. Um die Charakteristik und die Gemeinsamkeiten aller 162 *AtbHLH*-Domänen auf Proteinebene darzustellen, wurde auf der Basis des für die strukturelle Einteilung verwendeten Alignments der bHLH-Domänen (ähnlich der Abb.1) die Aminosäureverteilung und –häufigkeit für die einzelnen Aminosäurereste ermittelt. Der Grad der Konservierung wurde mit einem von Dr. Martin Werber, Ag Weißhaar, MPIZ Köln, erstellten Web-Tool berechnet (<http://tfcard.mpiz-koeln.mpg.de/cgi-bin/afc2.cgi>). Als Ausgabe erhält man die

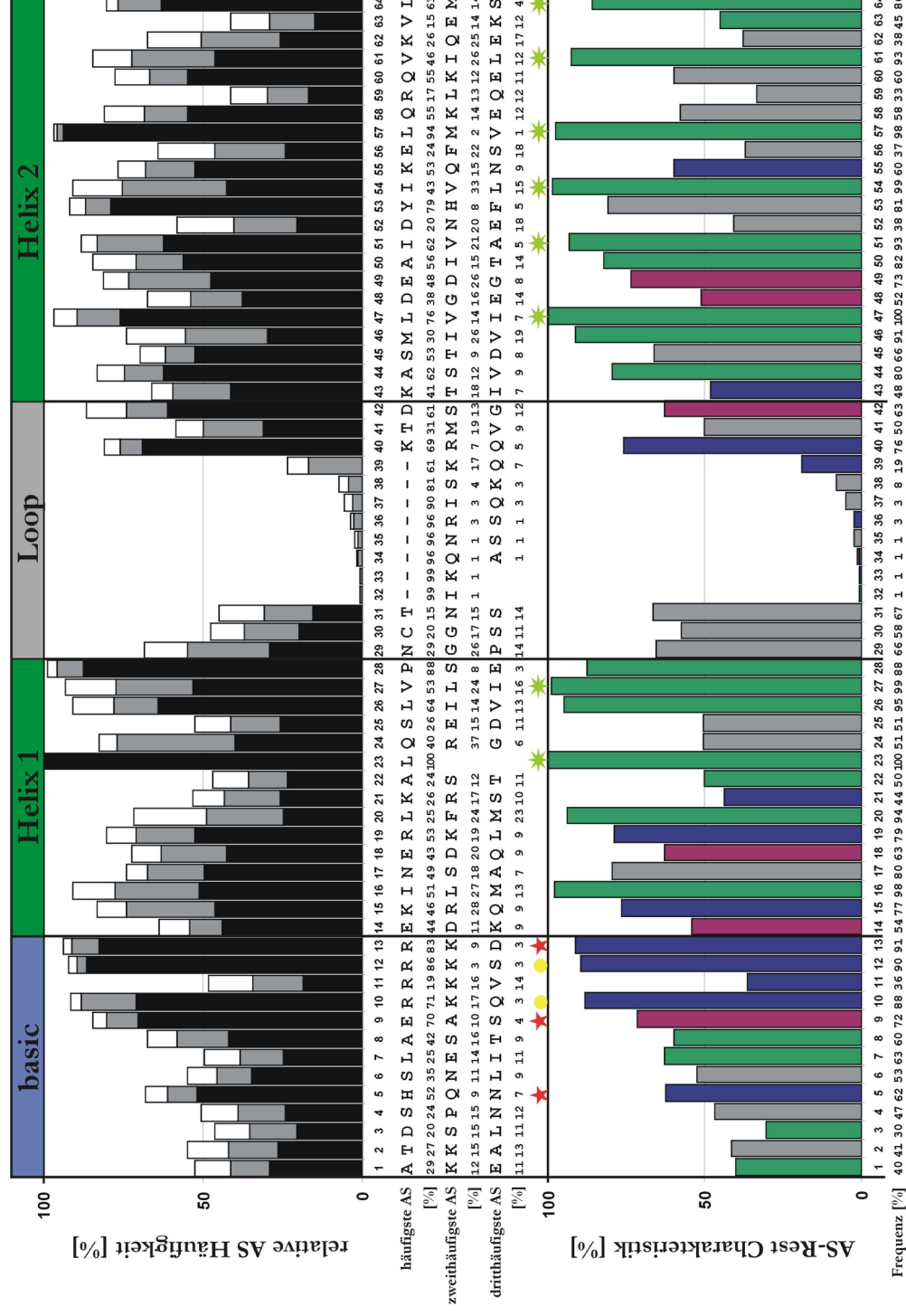


Abb.R3 Aminosäureverteilung in der bHLH-Domäne der 162 AfbHLH-Proteine. Oben dargestellt (schwarz / grau / weiß) sind die drei häufigsten Aminosäuren, mit Angaben der jeweiligen Prozentwerte (Wertetabelle darunter). Unten dargestellt (mehrfarbig) ist die Aminosäurecharakteristik des jeweiligen AS-Restes (grün = hydrophobe AS-Reste; blau = basische AS-Reste; grau = polar, hydrophile AS-Reste; rot = saure AS-Reste). Die Summen der relativen Häufigkeiten von Aminosäuren gleicher Charakteristik finden sich darunter. Die Symbole darüber indizieren die AS-Reste, die direkten Kontakt zu Basen der DNA ausbilden können (rote Sterne), das Rückgrad der DNA kontaktieren (gelbe Punkte) oder für die Protein-Protein-Interaktion (Dimerisierung) oder Komplexstabilität verantwortlich sind (grüne Sterne).

prozentuale Häufigkeit einzelner Aminosäuren des jeweiligen Restes in der bHLH-Domäne. Eine automatisierte graphische Darstellung ist damit ebenfalls möglich, jedoch wurde zur besseren Darstellung der Ergebnisse die Abb. R3 anhand der ausgegebenen Prozentwerte manuell erstellt. Der Grad der Konservierung der einzelnen Reste und die ermittelten Frequenzen sind in Abb. R3 dargestellt.

Aus der graphischen Darstellung wird deutlich, dass sich die Sequenzkonservierung auf die für die DNA-Bindung und Dimerisierung notwendigen AS-Reste beschränkt (vgl. farbige Sterne und Punkte in Abb. R3). Während das Nicht-Vorhandensein der basischen Reste kein Ausschlusskriterium bei der Identifikation der *AfbHLH*-Faktoren war, wurden bei der Konservierung der beiden Helices stringenter Bedingungen angelegt. Die helikale Struktur musste stets erhalten sein. Potentielle Kandidaten mit Prolin-Resten innerhalb der putativen Helices wurden daher verworfen. Dagegen diente das Prolin an Position 28 (oder 29) als klares Identifikationskriterium. Ebenso wie die anderen hydrophoben Reste der Helices 1 und 2. Die notwendige Konservierung bestimmter AS-Reste der primären Proteinstruktur (Aminosäuresequenz) wird besonders deutlich bei

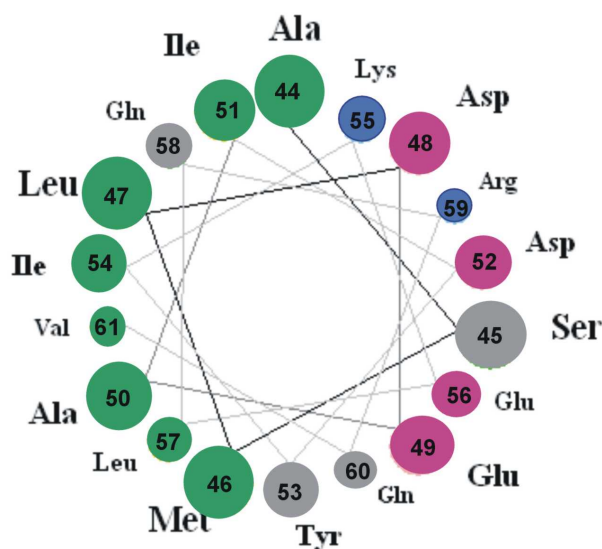


Abb. R4 Analyse der 3D Anordnung der AS-Reste 44 - 61 des *AfbHLH*-Konsensus (Helix2).
grün = hydrophob; blau = basisch; pink = sauer und grau = polar

Betrachtung der Sekundärstruktur, die die bHLH-Domäne ausbildet. Am einfachsten ist dies an der Helix 2 zu verdeutlichen. Die für die Interaktion mit der DNA und zur Dimerisierung und Komplex-stabilisierung notwendigen Reste erweisen sich dabei als hochkonserviert. Betrachtet man eine Darstellung der Helix 2 im „Helical wheel“ (Abb. R4), so wird deutlich, dass die konservierten Reste eine hydrophobe Seite des α -Helikalen Bereiches bilden und somit die Kontaktfläche zur Interaktion der

beiden Helices 2 bei der Homo- oder Heterodimerisation aufbauen. Auffällig ist auch der hochkonservierte Rest 23 (100% Leu) in der Helix 1. Neben der Konservierung in den hydrophoben AS-Resten der beiden Helices findet sich bei den *AfbHLH*-Proteinen der Subgruppen IVb und c direkt im Anschluß zur Helix 2 noch eine

Leuzin-Zipper-Domäne (bHLH-ZIP-Proteine), eine für Protein-Protein-Interaktionen beschriebene Domäne.

Vergleicht man die Konservierung der einzelnen Reste in der *AtbHLH*-Domäne mit dem Motiv, das Atchley *et al.*, 1999, beschrieben haben, so offenbaren sich einige Besonderheiten der Arabidopsis bHLH, die von dem Gesamtkonsensus der von Atchley betrachteten 392 bHLH-Sequenzen abweichen (vgl. Tab. R2). Es muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund der variablen Loop-Länge die Positionsangaben zwischen dem Atchley-Konsensus und dem Konsensus dieser Analyse abweichen können. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit werden deshalb bei Abweichungen beide Nummern in Text und Tab. R2 angegeben. Während die Aminosäurereste 1 und 2 im Atchley-Konsensus hochkonserviert basisch sind, sind diese bei den *AtbHLH* eher variabel, wenn auch ein gewisser Prozentsatz der *AtbHLH*-Proteine auch hier basische Reste aufweist. Deutlicher ist der Unterschied bei dem Aminosäurerest 19, der bei den *AtbHLH* hochkonserviert basisch und nicht hydrophob wie im Atchley-Konsensus ist. Der basische Rest 24 des Atchley-Konsensus ist dagegen bei den *AtbHLH* schwächer konserviert. Ob dies Auswirkungen auf die Bindeaffinität oder Stabilität des Komplexes hat ist ungeklärt. Bei allen *AtbHLH*-Proteinen endet die Helix 1 mit einem Prolin. Dabei ist das Helix-1-brechende Prolinrest deutlich stärker konserviert als im Atchley-Konsensus und befindet sich bei 88% der Proteine an Domänenposition 28. Die übrigen *AtbHLH* haben eine um einen Aminosäurerest längere Helix 1, die erst an Position 29 mit einem Prolin beendet wird.

Während im Atchley-Konsensus die Helix 2 hochkonserviert mit einer basischen Aminosäure beginnt, ist dieser Aminosäurerest (50/43) bei den *AtbHLH* Proteinen deutlich geringer konserviert. Jedoch treten, ebenso wie bei Atchley, die basischen Reste am Ende der Schleifenstruktur gehäuft auf. Was die Helix 2 anbelangt weichen zwar einzelne Positionen in ihrer Verteilung der Aminosäuren etwas vom Atchley-Konsensus ab, allerdings handelt es sich dabei stets um konservative Abweichungen, die die Aminosäureeigenschaften beibehalten. Am deutlichsten wird dies beim Rest in Position 51/44, der bei den *AtbHLH* eine deutliche Verschiebung von Valin zur kleinen, hydrophoben Aminosäure Alanin aufweist, was jedoch die Eigenschaft der Helix an dieser Position nicht beeinflusst (vgl. auch Abb.4). Die Reste jenseits der Domänenposition 64/57 fanden bei Atchley *et al.* (1999) keine Berücksichtigung, jedoch weist die Gesamtheit der *AtbHLH*-Faktoren an den Positionen 68/61 bzw. 71/64 eine deutliche Konservierung der

hydrophoben Reste auf, die sich alternierend im wechselnden Abstand von 3 bzw. 4 Aminosäuren fortsetzen und so die hydrophobe Oberfläche der Helix 2 fortführen. Allerdings handelt es sich dabei nur in wenigen Fällen, um ein konserviertes Leuzin-Zipper-Motiv (vgl. A**tb**H**LH**-Gruppe-IVb und c in Tab. R1).

Position in bHLH-Dom. (Atchley/Heim)	Region	relative Häufigkeit der Aminosäuren innerhalb der bHLH-Domänen (Atchley)	relative Häufigkeit der Aminosäuren innerhalb der A tb H LH -Domänen (Heim)	Charakteristikum der jeweiligen Aminosäurereste
01/01	basisch	R (61%), K (27%)	A (29%) , K (12%), E (11%),..., R (7%)	hydrophob (40%)
02/02	basisch	R (77%), K (16%)	T (27%) , K (15%), A (13%), R (12%), S (10%)	polar (41%)
05/05	basisch	H (41%), A (27%), K (8%)	H (52%),..., K (6%)	basisch (62%)
09/09	basisch	E (93%)	E (70,4%), A (10%)	sauer (72%)
10/10	basisch	R (81%), K (14%)	R (71%), K (17%)	basisch (88%)
12/12	basisch	R (91%)	R (86%)	basisch (90%)
13/13	basisch	R (49%)	R (83%), K (9%)	basisch (91%)
16/16	Helix 1	I (35%), L (33%), V (23%)	I (51%), L (27%), M (13%)	hydrophob (98%)
17/17	Helix 1	N (74%)	N (50%), S (18%)	polar (80%)
19/19	Helix 1	A (41%), S (21%)	R (53%) , K (19%) , H (8%)	basisch (89%)
20/20	Helix 1	F (72%), I (9%), L (14%)	L (25%), F (24%), M (23%), I (16%)	hydrophob (94%)
23/23	Helix 1	L (98%)	L (100%)	hydrophob (100%)
24/24	Helix 1	K (35%), R (44%)	Q (40%) , R (37%),..., K (6%)	basisch (51%)
26/26	Helix 1	L (33%)	L (64%), I (14%), V (13%)	hydrophob (95%)
27/27	Helix 1	V (32%), I (30%), L (13%)	V (53%), L (24%), I (16%)	hydrophob (99%)
28/28	Helix 1	P (63%)	P (88%)	Helix-Brecher (89%)
29/29	Helix1	variabel	variabel, P (14%)	[Helix-Brecher (14%)]
46/39	Loop	K (33%)	K (17%)	[basisch (17%)]
47/40	Loop	K (58%), R (24%)	K (69%), R (7%)	basisch (76%)
50/43	Helix 2	K (93%)	K (41%), T (18%) , R (7%)	basisch (48%)
51/44	Helix 2	V (42%), A(20%), L (15%), I (10%)	A (62%)	hydrophob/klein (80%)
53/46	Helix 2	I (74%), T (15%), V(7%)	M (30%), I (26%), V (19%), L (15%)	hydrophob (91%)
54/47	Helix 2	L (98%)	L (76%), V (14%), I (7%)	hydrophob (100%)
57/50	Helix 2	A (76%)	A (56%), I (15%), T (14%), V (11%)	hydrophob (82%)
58/51	Helix 2	I (31%), T (23%), V (27%)	I (62%) , V (21%), A (5%)	hydrophob (93%)
60/53	Helix 2	Y (77%)	Y (79%)	aromatisch (81%)
61/54	Helix 2	I (69%), L (16%), V (8%)	I (43%), V(33%), L (15%), M (7%)	hydrophob (99%)
64/57	Helix 2	L (80%), M (7%)	L (94%), M (2%)	hydrophob (98%)
68/61	Helix 2	n.d.	V (46%), I (26%), L (12%)	hydrophob (93%)
71/64	Helix 2	n.d.	L (63%), M (14%)	hydrophob (86%)

Tab. R2: Konsensus der bHLH-Domäne - Vergleich zwischen dem durch Atchley *et al.*, 1999, beschriebenen Motivs und den Resultaten dieser Arbeit (vgl. Abb. R3) Die Diskrepanz in den Positionsangaben, insbesondere in der Helix 2, kommt durch einen längeren Konsensus für den Schleifen/Loop-Bereich für die Organismen-überspannende bHLH-Analyse von Atchley *et al.* zustande. Abweichende Reste zum Atchley-Konsensus sind fettgedruckt dargestellt.

Die so definierten, hochkonservierten Aminosäurereste in der bHLH-Domäne der A**tb**H**LH**-Transkriptionsfaktoren bildeten die Grundlage bei der Suche nach A**tb**H**LH**-kodierenden Genen. Zusammengefasst sind dabei die hydrophoben Reste innerhalb der Helices (16, 20, 23, 26, 27 in Helix 1, sowie .53/46, 54/47, 57/50, 58/51, 61/54, 64/57, 68/61 und 71/64 in Helix 2), insbesondere die höchstkonservierten Positionen 23 (100% Leuzin) und 54/47 (100% hydrophob; 76% Leuzin) entscheidend. Wichtig ist auch das an den Positionen 28 und/oder 29 das Helix-1-brechende Prolin, ebenso wie das Vorhandensein basischer Reste am Ende der Schleife und zu Beginn der Helix 2. Ein weiteres Kriterium sind auch der basische Rest 19 und das Tyrosin in Position 60/53. In jedem Fall ist darauf zu achten, dass die Länge der Schleife variieren kann (bei A**tb**H**LH**-Proteinen zwischen 6 und 14 Resten). Was die

basische Region anbelangt, so ist die Definition einer klaren Konsensus-Sequenz hier erschwert, da Abweichungen auch durch ein komplettes Fehlen der basischen Region zu Stande kommen können (z.B. inhibitorische bHLH). Was die möglicherweise DNA-bindenden *AtbHLH* betrifft, so ist der Rest an Position 5 nicht notwendigerweise basisch, während die Reste an den Positionen 10, 12 und 13 relativ hoch konserviert sind. Der Rest an Position 9 ist in den meisten Fällen sauer.

3.1.3 Das 5-9-13-DNA-Bindemotiv der *AtbHLH*-Faktoren

Über die Fähigkeit der bHLH-Proteine an DNA zu binden ist bisher relativ wenig bekannt. Lediglich für wenige *AtbHLH*s mit dem H-E-R-Konsensus konnte eine DNA-Bindung „*in vitro*“ gezeigt werden (u.a. PIF3 und TT8; teilweise unveröffentlichte Daten). Für alle anderen putativen Bindekonsensi ist bisher noch keine DNA-Bindung gezeigt worden. Es ist jedoch naheliegend, dass ähnlich wie bei den bZIPs eine Veränderung des Bindekonsensus zu veränderten Bindepräferenzen führt. Wie im Ergebnisteil zu den Ko-Transfektionsexperimenten gezeigt werden wird, führen auch die *AtbHLH*-ZIP-Proteine der Subgruppe IVc zu einer transkriptionellen Aktivierung des *AtCHS*min-Promotors und des *AtDFR*-Promotors. Die *AtbHLH*-ZIP haben einen leicht veränderten 5-9-13-Konsensus mit K-E-R, jedoch ist der Austausch von H zu R konservativer Natur. Was die anderen Gruppen betrifft, so sind keine weiteren Bindepräferenzen bekannt. Allerdings kann aufgrund der Zusammensetzung der basischen Regionen der *AtbHLH*-Proteine der Gruppen X, XIII und XIV vermutet werden, dass diese Proteine nicht in der Lage sein dürften, an die bekannten Konsensi oder überhaupt an DNA zu binden. Sie besitzen eine nur schwach konservierte basische Region, teilweise helixbrechende Proline in der eigentlich helikalen basischen Region und ein völlig inkonsistentes 5-9-13 Motiv. Deshalb bleibt zu vermuten, dass diese Faktoren möglicherweise eine Gruppe inhibitorischer *AtbHLH*-Faktoren bilden, die via konkurrierender Heterodimerisation das Aktivierungspotential anderer *AtbHLH* herabsetzt. Auf die unterschiedlichen Bindepräferenzen der in den Kotransfektionsexperimenten getesteten *AtbHLH* wird im Diskussionsteil noch näher eingegangen.

Bezüglich der Verifikation der im Rahmen der Analyse erstellten Vorhersagen wurden zahlreiche *AtbHLH*-cDNAs kloniert und sequenziert. Neben den

Klonierungen wurden auch viele 3'RACE-PCR-Experimente (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) zur Expressionsdetektion und anschließender Klonierung der cDNA-Fragmente eingesetzt, deren Sequenzierungsergebnisse zusätzlich in die Verbesserung der Analyse eingeflossen sind. Somit konnte die Mehrheit der erstellten Gen-Modelle verifiziert werden und die meisten der *AtbHLH*-Gene können als exprimiert bestätigt werden. Einen nicht kleinen Anteil hatte dabei neben den eigenen RACE-PCR Studien auch die zunehmende Verfügbarkeit von cDNA-Sequenzen, die zu einer fortwährenden Verbesserung der Gen-Modelle und der Neuidentifikation zahlreicher *AtbHLH*-Gene führte. Allerdings wurden bisher für insgesamt 31 der 162 Gene weder EST-Sequenzen bei GenBank hinterlegt, noch wurden Versuche unternommen, ihre Expression gezielt nachzuweisen (Stand August 2003).

Somit gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht nur die Identifikation vieler zuvor nicht zu den bHLH Transkriptionsfaktoren gezählten Proteinen, sondern auch die Optimierung bestehender Genvorhersagen durch Klonierungen entsprechender cDNAs (z.B. *AtbHLH125*) oder Vergleiche mit bereits vorhandenen cDNAs (z.B. *AtbHLH160* verglichen mit den Exon/Intron-Strukturen der nächstverwandten Gene *AtbHLH038*, sowie 039, 100 und 101, deren cDNAs durch Dr. Marc Jakoby kloniert worden waren). Insgesamt führte diese Studie zur Neuidentifikation von mehr als 60 putativen *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren und zur Optimierung von 48 Genvorhersagen. Die entsprechenden Daten wurden sowohl bei GenBank hinterlegt (Klonierung der entsprechenden cDNAs erfolgte durch den einreichenden Dissertationskandidaten, sowie durch Dr. Marc Jakoby) als auch ans Münchner Informationszentrum für Proteinsequenzen (MIPS) übermittelt und in die MIPS *A. thaliana* Datenbank (MAtdB) integriert. Die für die Ergebnisse dieser Arbeit wichtigen GenBank-Einträge finden sich am Ende dieser Arbeit im Anhang wieder. Ansonsten finden sich Bezeichnungen der erstellten Einträge in der Tabelle 1 wieder.

Um einen Bezug zwischen der strukturellen Einteilung und der Funktion der beschriebenen *AtbHLH* herzustellen, wandte sich die Arbeit wieder der Kernfrage der transkriptionellen Regulation des Flavonoidstoffwechsels zu. Hier im Speziellen der Regulation der Strukturgene auf dem Weg zu den Anthocyanen und den kondensierten Tanninen.

3.2 Die Regulation von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese durch *AtbHLH* und *R2R3-AtMYB*-Transkriptionsfaktoren

Um der Funktion der detektierten *AtbHLH* nachzugehen und mögliche Regulatoren des Phenylpropanoid- und Flavonoid-Stoffwechsels zu detektieren, wurden eine Reihe von *AtbHLH*-cDNAs kloniert, in entsprechende Vektoren kloniert (siehe Material und Methoden) und im Transfektionssystem getestet. Dabei lag das zentrale Interesse auf den Sequenzhomologen zu den R/B-bHLH-Faktoren aus Mais, was zunächst zu einer Einschränkung auf die Subgruppe III-f führte (vgl. Abb. R5a). Als mögliche Interaktionspartner wurde die R2R3-MYB-Subgruppe mit den bekannten Regulatoren der Anthocyanbiosynthese *AtMYB75/PAP1*, *AtMYB90/PAP2* und des Flavonidstoffwechsels *AtMYB12* und der Synthese kondensierter Tannine *AtMYB123/TT2* in die Analyse mit einbezogen (vgl. Abb. R5b). Zu dieser Subgruppe gehören auch die für die Wurzelhaar- und Trichomentwicklung mitverantwortlichen *AtMYB0/GL1* und *AtMYB66/WER*.

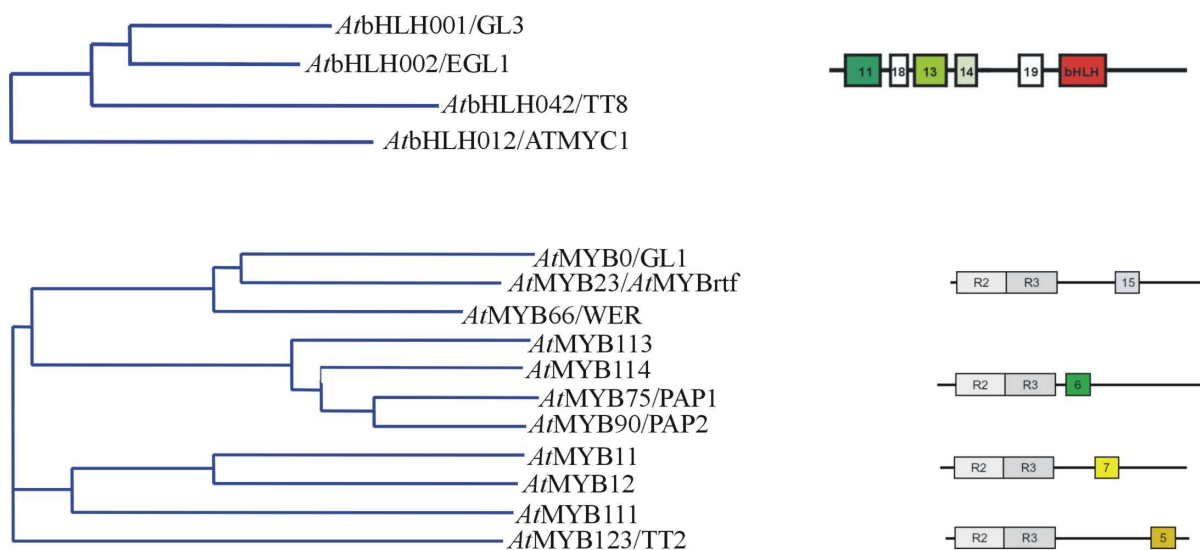


Abb. 5 a) Subgruppe III-f der *AtbHLH* Transkriptionsfaktoren (vgl. Tabelle 1)
b) Subgruppe der getesteten R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren (vgl. Stracke et al., 2001)

3.2.1 Die Promotorstruktur der möglichen Zielgene CHS, DFR und BAN

Die Funktion der bereits beschriebenen *AtbHLH* bzw. *AtMYB*-Transkriptionsfaktoren der zunächst betrachteten Subgruppen legte nahe, diese auf ihre mögliche Aktivität bei der Regulation der Strukturgene auf dem Weg zu den Anthocyanen bzw. den

kondensierten Tanninen zu untersuchen. Als interessante Gene kamen somit das für das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese kodierende *Chalkonsynthase-Gen* (*CHS*), sowie das Gen der *Dihydroflavonol-4-Reduktase* (*DFR*) und das für eine putative Leucoanthocyanidinreduktase kodierende *BANYULS-Gen* (*BAN*) in Betracht.

Die Struktur des *CHS*-Promotors ist in eingehenden Studien bereits beschrieben worden und die darin enthaltenen *cis*-wirkenden Elemente sind bekannt (vgl. Einleitung). Um zu klären, ob die *DFR*- bzw. *BAN*-Promotoren entsprechende Elemente enthalten, die die Regulation durch bHLH und MYB Transkriptionsfaktoren ermöglichen könnten, wurden mit einem im Internet verfügbaren Suchprogramm (PLACE; <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>) die Promotorsequenzen nach entsprechenden Bindemotiven untersucht.

Das verwendete 520nt lange *DFR*-Promotorfragment (-520 bis ATG, vgl. Abb. R6) weist insgesamt sieben putative bZIP-Bindestellen auf (davon eines invers auf dem Gegenstrang). Zwei dieser ACGT-Elemente stellen zugleich E-Box-Motive dar, die als Bindemotive für bHLH-Faktoren beschrieben sind. Dabei handelt es sich um einen speziellen Typus des E-Box-Motives (CANNTG), das als G-Box bezeichnet wird (CACGTG). Das ACGT Motiv bildet hier die zentralen 4 Nukleotide. An Motive mit CACGTG- Konsensus können bHLH Proteine mit H-E-R-Konsensus im 5-9-13-

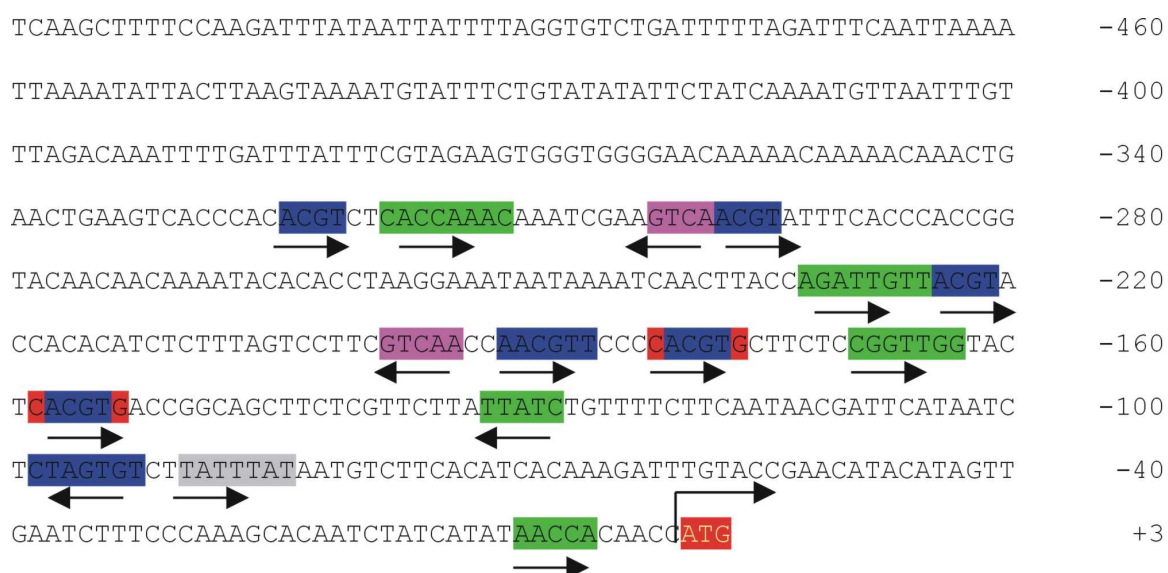


Abb.6 Sequenz des in den Transfektionsexperimenten verwendeten *AtDFR*-Promotorfragments (-520 bis ATG) mit der Lage der mittels PLACE-Analyse detektierten putativen *cis*-wirkenden Elemente (blau = ACGT-Elemente [bZIP]; rot = E-Box-Elemente [bHLH]; grün = MYB-Bindestellen [MYB]; pink = W-Box [WRKY]; grau = TATA-Box; die Pfeile indizieren, ob das Motiv invers oder in Leserichtung vorliegt; rot mit gelber Schrift = Startkodons; näheres siehe Anhang)

Motiv binden. Außer den 7 bZIP bzw. 2 bHLH-Bindemotiven finden sich auch noch insgesamt 5 putative MYB-Bindestellen. Von den 4 auf dem (+) Strang liegenden MYB-Bindestellen befindet sich eine hinter der TATA-Box kurz vor dem späteren Translationsstart und kommt somit als möglicher Enhancer oder Silencer in Frage. Die fünfte Signalsequenz für MYB-Transkriptionsfaktoren befindet sich auf dem Gegenstrang, auf dem sich noch zwei putative WRKY-Bindestellen finden lassen. Die genauen Positionen sind im Anhang aufgeführt. Somit sind sowohl putative Bindestellen für bHLH TF als auch für MYB TF im verwendeten *DFR*-Promotorfragment vorhanden. Um jedoch die tatsächliche Aktivierbarkeit durch bHLH und MYB Transkriptionsfaktoren nachzuweisen, bedarf es experimenteller Studien im Transfektionssystem. Von Interaktionsstudien in Hefe und „*in vitro*“-Bindungsstudien an bestimmte Elemente im Promotor wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit ebenso abgesehen, wie von Mutationsanalysen mit den verwendeten Promotoren. Diese sind jedoch für weiterführende Analysen an den bisher wenig charakterisierten Promotoren interessant. Eine Gesamtliste der identifizierten Elemente findet sich im Anhang dieser Arbeit.

Im Falle des *BANYULS*-Promotors wurde ein wesentlich größeres Fragment benutzt, das 1460 Nukleotide vor dem Translationsstart umfasste. Der Translationsstartpunkt entspricht im Falle des *BANYULS*-Gens ebenfalls dem

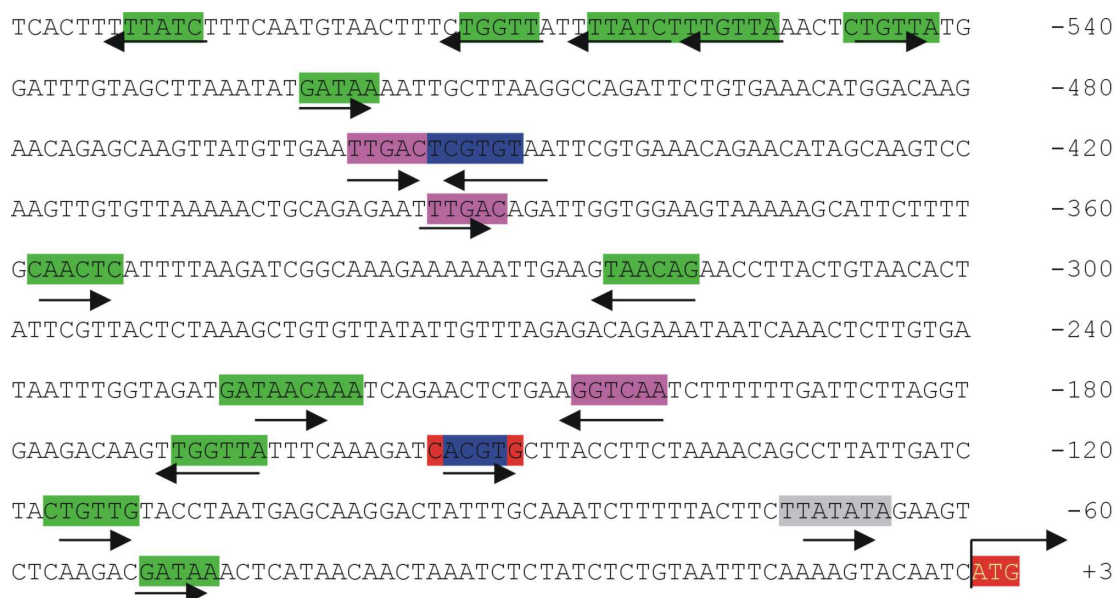


Abb. R7 Fragment (-600nt bis ATG) des in den Transfektionsexperimenten verwendeten 1460nt langen *BAN*-Promotors mit der Lage der mittels PLACE-Analyse detektierten putativen cis-wirkenden Elemente (blau = ACGT-Elemente [bZIP]; rot = E-Box-Elemente [bHLH]; grün = MYB-Bindestellen [MYB]; pink = W-Box [WRKY]; grau = TATA-Box; die Pfeile indizieren, ob das Motiv invers oder in Leserichtung vorliegt; rot mit gelber Schrift = Startkodon; näheres siehe Anhang)

Transkriptionsstart, was in 5'RACE-PCR Analysen (Rapid Amplification of cDNA Ends) nachgewiesen werden konnte (Devic et al., 1999; diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Betrachtet man nun die Verteilung der putativen *cis*-wirkenden Elemente, so findet man eine deutliche Häufung von möglichen Bindekonsensi für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren nur in den 500 Nukleotiden vor dem Startkodon. In den restlichen 1000 Nukleotiden des verwendeten Promotorfragments finden sich lediglich zahlreiche putative MYB-Bindestellen (Vergleiche Tabelle im Anhang). Wie auch beim *DFR*-Promotor findet man beim untersuchten Promotorfragment des *BANYULS*-Gens sowohl putative Bindestellen für bHLH, MYB, bZIP und WRKY Transkriptionsfaktoren. Allerdings findet sich hier nur ein einziges G-Box-Motiv, dass sowohl eine bHLH als auch eine bZIP Bindestelle darstellen könnte. Insgesamt gibt es neben der G-Box noch eine weitere putative bZIP-Bindestelle, 3 putative W-Boxen für WRKY-Transkriptionsfaktoren und 7 putative MYB-Bindeelemente in den 500nt stromaufwärts des Startkodons.

3.2.2 Testergebnisse des Transfektionssystems

Die oben erwähnte Vorauswahl der Faktoren (Abb. R5) wurde durch zusätzliche *AtbHLH*-Faktoren aus weiteren Subgruppen zur Kontrolle ergänzt. Darunter Faktoren wie *AtbHLH104* und *AtbHLH115* (aus der Subgruppe IV c, der *AtbHLH*-Faktoren mit Leuzin-Zipper-Motiv), sowie strukturell relativ nah verwandte Faktoren zur Subgruppe III f (z.B. *AtbHLH006/RAP1/rd22BP* aus Subgruppe III e), aber auch Faktoren mit geringerer Sequenzhomologie wie *AtbHLH008/PIF3* - als Negativ-Kontrolle, da bei diesen Faktoren eine spezifische Reportergenaktivierung nicht zu erwarten war. Außerdem fanden die beiden bekannten regulatorischen Interaktionspartner des Phenylpropanoidstoffwechsels in Mais, *ZmSn* und *ZmC1*, als Kontrolleffektoren Verwendung. Die zur Standardisierung verwendeten Luciferase-Werte sind jeweils aus den Datentabellen im Anhang ersichtlich.

3.2.2.1 Kontrollansätze zur Bestimmung des Aktivierungspotentials einzelner Faktoren

Keines der getesteten Reporterkonstrukte ($\text{LRU}^{\text{AtCHS}}$ -GUS; $\text{Prom}^{\text{AtDFR}}$ -GUS; $\text{Prom}^{\text{AtBAN}}$ -GUS) zeigte eine Reporteraktivität, ohne dass ein Effektor (Transkriptionsfaktor) im Ansatz mit kotransfiziert wurde. Bei den R2R3-MYB-

Transkriptionsfaktoren bewirkten die beiden R2R3-MYB-TF *AtMYB12* und *AtMYB111* eine Aktivierung des *AtCHS*-Minimalpromotors (vgl. Abb. R8), während diese beiden Faktoren alleine nicht vermochten das *AtDFR*- bzw. das *AtBAN*-Promotorkonstrukt zu aktivieren. Was die bHLH Transkriptionsfaktoren anbelangt, so zeigte sich, dass die *AtbHLH*-Faktoren, die in der Verlängerung der Helix 2 ein Leuzin-Zipper-Motiv ausbilden (*AtbHLH034*, 104, 115), ebenfalls den *AtCHS*-Promotor ohne weitere ko-transfizierte MYB-Faktoren aktivieren können. Von den übrigen bHLH Faktoren war dazu nur der Mais-bHLH *ZmSn* in der Lage, was ebenfalls in vorangegangenen Studien schon beschrieben worden war. Jedoch liegen diese Aktivierungsraten sehr niedrig und sind stark konzentrationsabhängig.

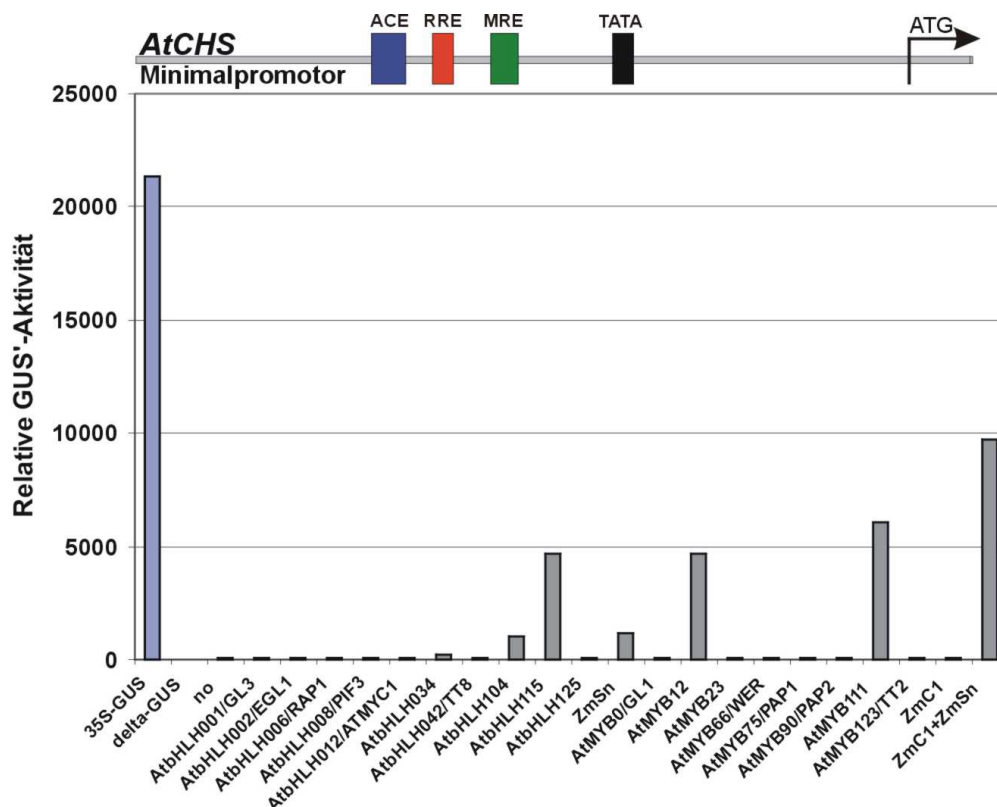


Abb. R8: Reportergenaktivierung des *AtCHS*-Minimalpromotor-GUS-Konstrukts durch transiente Expression einzelner Effektoren (MYB oder bHLH TF) im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die 35S-GUS Positiv-Kontrolle ebenso mit in die Graphik aufgenommen, wie die Δ GUS Negativ-Kontrolle. Zur einfacheren Zuordnung sind sowohl die generischen TF-Namen als auch deren funktionelle Synonyme angegeben. Als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit des Promotorkonstrukts durch interagierende MYB/bHLH-Faktoren wurde *ZmC1* zusammen mit *ZmSn* in einem Ansatz kotransfiziert. Der *AtCHS*-Minimalpromotor (obere Graphik) besitzt 3 cis-wirkende Elemente, von denen das RRE (R-Response-Element; putative bHLH-Bindestelle; rote Box) und das MRE (MYB Recognition Element; MYB-Bindestelle; grüne Box) für die lichtunabhängige Aktivierung des Minimalpromotors entscheidend sind. Die bZIP-Bindestelle (blaue Box) scheint nur für die lichtabhängige Regulation wichtig zu sein. Die Lage der TATA-Box ist schwarz dargestellt.

Im Gegensatz zum *AtCHS*min-Promotor waren der *AtDFR*- (Abb. R9) und der *AtBAN*-Promotor (Abb. R10) nicht durch einzelne MYB-TF aktivierbar. Jedoch konnte der *AtDFR*-Promotor durch die getesteten *AtbHLH*-Leuzin-Zipper Faktoren ebenso aktiviert werden, wie durch *ZmSn*. Der *AtBAN*-Promotor zeigte keine Aktivierung durch irgendeinen der getesteten Faktoren (vgl. Abb. R10).

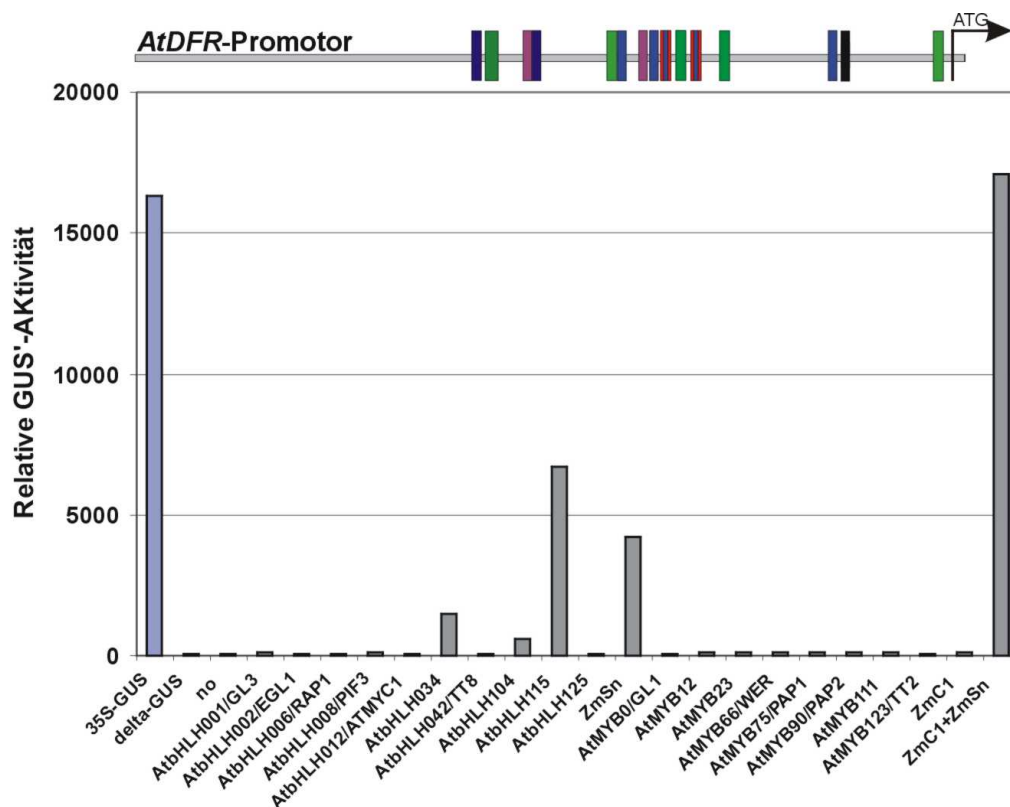


Abb. R9: Reportergenaktivierung des *AtDFR*-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Expression einzelner Effektoren (MYB oder bHLH TF) im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die 35S-GUS Positiv-Kontrolle ebenso in die Graphik aufgenommen, wie die Δ GUS Negativ-Kontrolle. Zur einfacheren Zuordnung sind sowohl die generischen TF-Namen als auch deren funktionelle Synonyme angegeben. Als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit des Promotorkonstrukts durch interagierende MYB/bHLH-Faktoren wurde *ZmC1* zusammen mit *ZmSn* in einem Ansatz kotransfiziert. Der verwendete *AtDFR*-Promotor (obere Graphik) besitzt mehrere cis-wirkende Elemente. Darunter putative MYB-Bindestellen (grüne Box), putative bHLH-Bindestellen (rote Box), putative bZIP-Bindestellen (blaue Box) und putative W-Boxen (WRKY-Bindestellen; violette Box). Die Lage der TATA-Box ist in schwarz dargestellt.

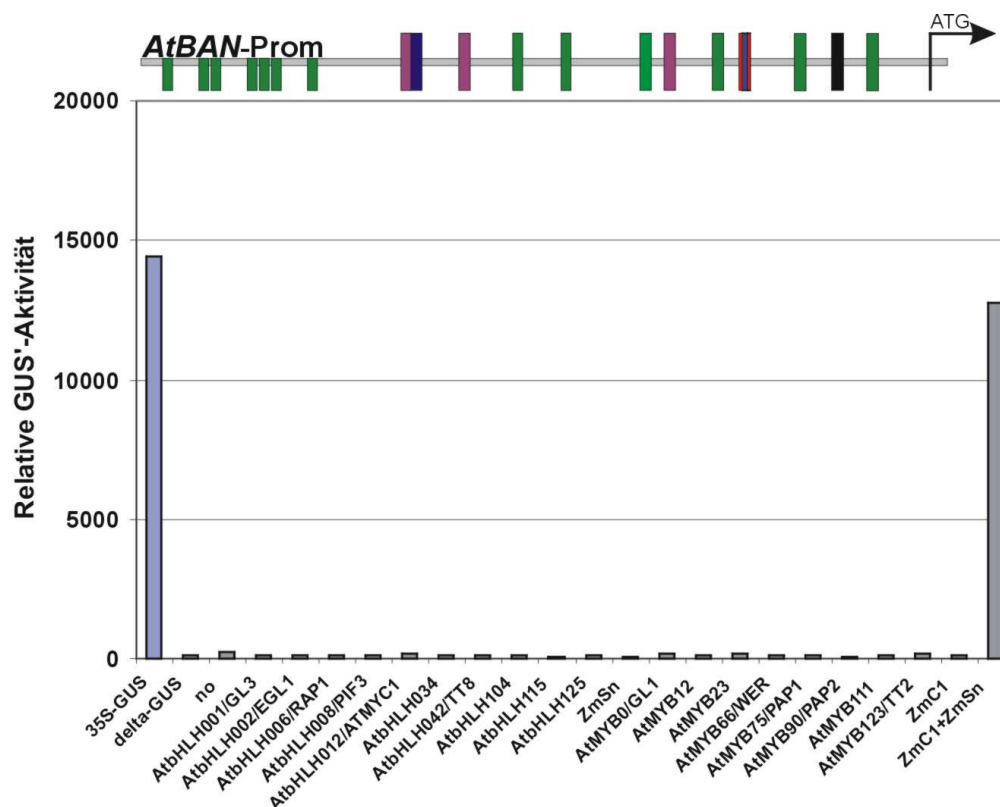


Abb. R10: Reportergenaktivierung des *AtBAN*-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Expression einzelner Effektoren (MYB oder bHLH TF) im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die 35S-GUS Positiv-Kontrolle ebenso mit in die Graphik aufgenommen, wie die Δ GUS Negativ-Kontrolle. Zur einfacheren Zuordnung sind sowohl die generischen TF-Namen als auch deren funktionelle Synonyme angegeben. Als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit des Promotorkonstrukts durch interagierende MYB/bHLH-Faktoren wurde *ZmC1* zusammen mit *ZmSn* in einem Ansatz kotransfiziert. Der verwendete *AtBAN*-Promotor (obere Graphik) besitzt eine Vielzahl putativer cis-wirkende Elemente. Allerdings hat er neben vielen putativen MYB-Bindestellen (grüne Box) und drei putativen W-Boxen (WRKY-Bindestellen; violette Box) lediglich eine putative bHLH-Bindestelle (rote Box), die als ACGT-Box such zugleich eine der beiden putative bZIP-Bindestellen (blaue Box) bildet. Die Lage der TATA-Box ist in schwarz dargestellt.

Außer den R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren, die in den Abb. R8, R9 und R10 aufgeführt sind wurde auch *AtMYB114* in der Transfektion getestet, jedoch lag konnte keine cDNA für den Faktor aus *A. thaliana* kloniert werden, da keine Expression detektiert werden konnte. Das daraufhin verwendete genomische Fragment zeigte in ersten Transfektionsversuchen keine Aktivierung der getesteten Promotorkonstrukte, so dass von einer weiteren Verwendung des Konstrukts abgesehen wurde. Mit der nun vorliegenden cDNA (Dr. Ralph Stracke, Ag Weißhaar) sollten noch weitere Experimente in der Zukunft durchgeführt werden. Für den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit waren jedoch mit der *AtMYB114*-cDNA keine weiteren Experimente mehr möglich.

3.2.2.2 Können bestimmte *At*MYB-Faktoren unabhängig von *At*bHLH-Faktoren zu einer transkriptionellen Aktivierung führen ?

Aufgrund der Beobachtung, dass sowohl einige *At*MYB- als auch einige *At*bHLH-ZIP ohne ko-überexprimierten Interaktionspartner Reporter-genkonstrukte aktivieren können, war es von Interesse, zu überprüfen, ob dennoch Synergien mit möglichen Interaktionspartnern auftreten. So wurden zunächst die auf dem *AtCHS*min-Promotor aktivierenden MYB-Faktoren (*At*MYB12 und *At*MYB111) zusammen mit möglichen bHLH-Interaktionspartnern getestet. Dazu wurden die entsprechenden Faktoren zusammen mit dem Reporter ko-transfiziert. Die Ergebnisse für MYB111 sind in Abb. R11 dargestellt. Die Ko-Überexpression bestimmter bHLH-TF zusammen mit MYB111 führt zu einer deutlichen, jedoch unspezifischen Erhöhung der Promotoraktivität. Sowohl *ZmSn*, als auch alle anderen getesteten *At*bHLH (*At*bHLH001/GL3; *At*bHLH002/EGL1; *At*bHLH012/ATMYC1; *At*bHLH042/TT8; *At*bHLH008/PIF3) führen zu einem starken Anstieg der Aktivierung verglichen mit MYB111 alleine. Für MYB12 konnte der gleiche Effekt nicht gezeigt werden, wobei MYB12 nur ein einziges Mal in Kombination mit den getesteten *At*bHLH-Faktoren

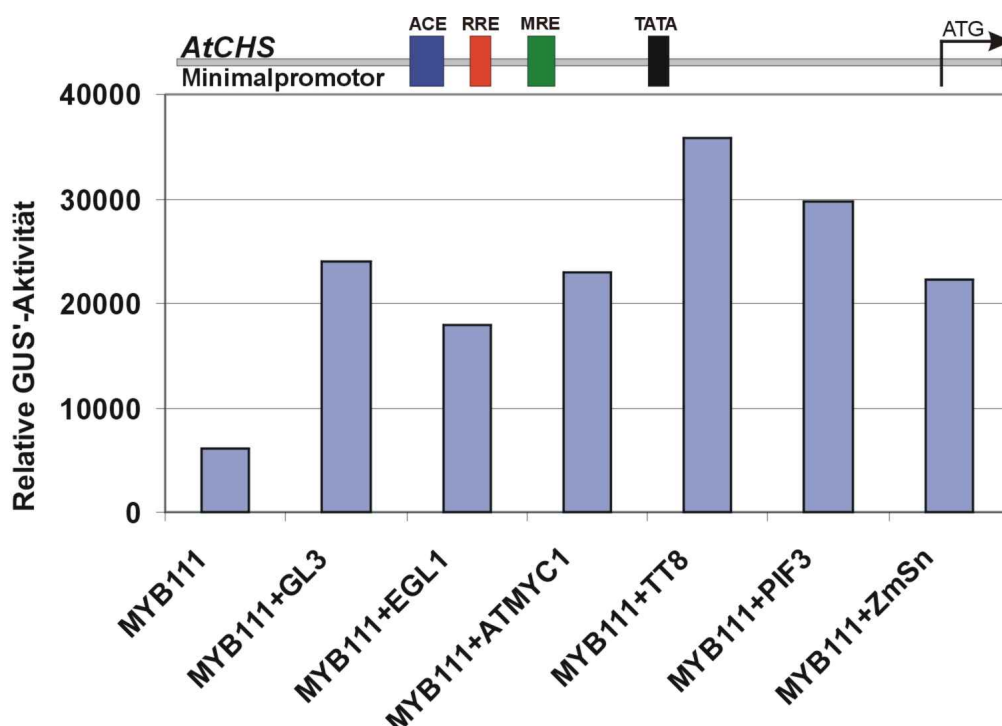


Abb. R11: Reporter-genaktivierung des *AtCHS*min-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Ko-Überexpression von MYB111 und bHLH TF im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Für die bHLH-TF sind die funktionellen Synonyme angegeben (*At*bHLH001/GL3; *At*bHLH002/EGL1; *At*bHLH012/ATMYC1; *At*bHLH042/TT8; *At*bHLH008/PIF3). Die Promotorstruktur wurde oben bereits eingehend besprochen.

auf dem *AtCHS*-Promotor getestet wurde und keinerlei Anstieg in der Aktivierung zeigte (Daten hier nicht gezeigt). Die Zunahme der Reporter-gen-Aktivität durch Ko-Überexpression von *MYB12* und verschiedener *AtbHLH* zeigt jedoch einen klar synergistischen Effekt von bHLH-TF und MYB-TF bei der transkriptionellen Regulation von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese.

Die Ergebnisse zu der möglichen Verstärkung der *AtbHLH*-ZIP vermittelten Reporter-genaktivierung sind in Abschnitt 3.2.2.3 mit dargestellt (Abb. R12).

3.2.2.3 Synergistische Aktivierung der getesteten Promotoren durch spezifische MYB/bHLH Kombinationen

Als nächste Fragen waren nun zu klären, ob das Aktivierungspotential der *AtbHLH*-ZIP-Proteine durch Ko-Überexpression von *MYB*-Genen erhöht werden kann, und ob es spezifische TF Kombinationen von alleine inaktiven Faktoren gibt, die gemeinsam zu einer spezifischen Aktivierung der getesteten Promotorkonstrukte führen. Dazu wurden die unterschiedlichen MYB-TF mit den zu testenden *AtbHLH*-TF im Transfektionssystem getestet.

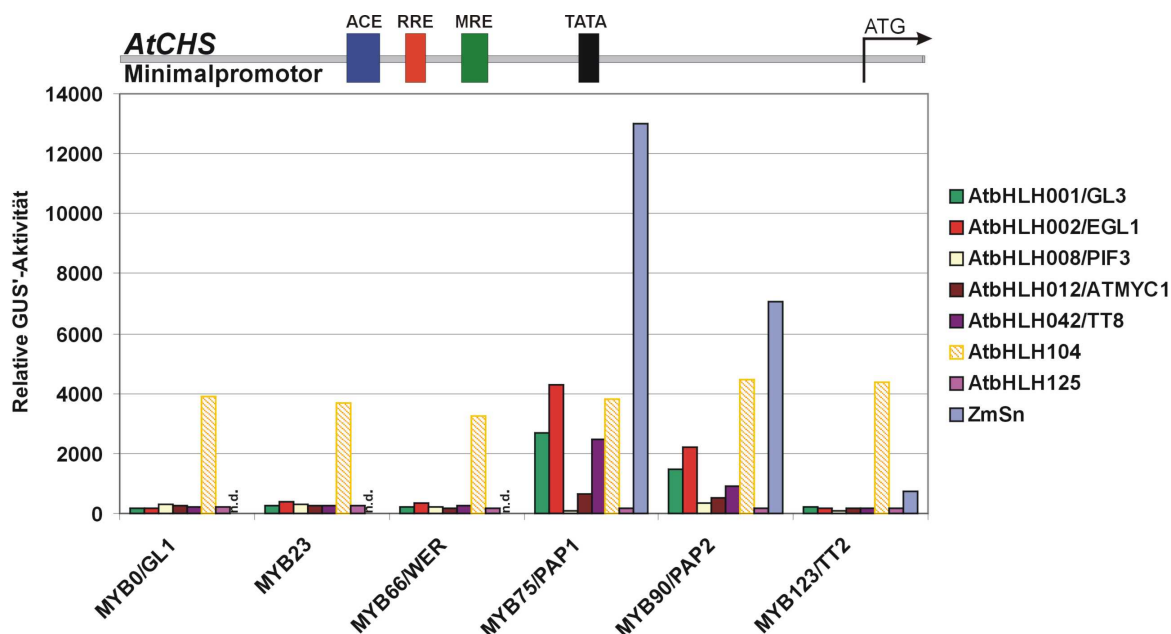


Abb. R12: Reporter-genaktivierung des *AtCHS*-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Ko-Überexpression verschiedener bHLH- und MYB TF im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Der Schwellenwert (SW), der dem durchschnittlichen Grundrauschen des Reporter-genkonstrukts ohne kotransfizierte Effektoren entspricht, war graphisch hier nicht darstellbar, da er für das getestete *DFR*-Promotorkonstrukt bei <100 relativer GUS'-Aktivität liegt (vgl. Abb. R8 und zugehörige Wertetabelle im Anhang). Nicht getestete Faktorkombinationen sind mit „n.d.“ gekennzeichnet. Auf eine erneute Darstellung der Ergebnisse mit *AtMYB111* wurde verzichtet, siehe dazu Abb. R11.

Eine spezifische Aktivierung des *AtCHSmin*-Promotors (vgl. Abb. R12) ist durch die R2R3-MYB-TF *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB90/PAP2* zusammen mit den *ZmSn*-ähnlichen Faktoren zu beobachten. Dabei scheint das Aktivierungspotential auf Seiten von *AtMYB75/PAP1* deutlich größer als das von *AtMYB90/PAP2*. Außerdem ist das Aktivierungspotential bei Kombinationen von *PAP1* und *PAP2* mit den *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* deutlich höher als mit den Faktoren *AtbHLH12/ATMYC1* und *AtbHLH042/TT8*. Bei den R2R3-MYBs führt *AtMYB123/TT2* zu einer deutlich geringeren Aktivierung des *AtCHSmin*-Promotorkonstrukts verglichen mit dem Aktivierungspotential von *PAP1* und *PAP2*. Lediglich mit *ZmSn* ist eine signifikante Aktivierung zu verzeichnen. Die absoluten Werte (siehe Anhang) zeigen jedoch bei *AtMYB123/TT2* und kotransfizierten bHLHs noch einen deutlichen Anstieg der Reportergenaktivität, während bei *AtMYB0/GL1*, *AtMYB23*, *AtMYB66/WER* mit den entsprechenden *AtbHLH* keinerlei Reportergenaktivität zu messen war. Nur *AtbHLH104*, ein bHLH-ZIP-Faktor, führt in allen getesteten Kombinationen zu einer Aktivierung. Vergleicht man dies jedoch mit den Kontrollansätzen in 3.2.2.1 (Abb. R8, R9, R10), so ist kein Unterschied zu sehen, ob *AtbHLH104* alleine oder kotransfiziert mit den R2R3-MYB-TF das Reportergenkonstrukt aktiviert. Somit scheint diese Aktivierung zumindest nicht auf den mit *AtbHLH104* kotransfizierten MYB-Konstrukten zu beruhen. Die Präferenz auf Seiten von *AtMYB75/PAP1* zum *AtCHSmin*-Promotor wird zusätzlich durch die Ergebnisse mit dem Mais-Faktor *ZmSn* deutlich. Während dieser mit *AtMYB123/TT2* nur zu einer geringen Aktivierung führt, ist die Aktivierung zusammen mit *AtMYB90/PAP2* schon deutlich stärker, jedoch wird die stärkste Aktivierung des Reportergenkonstrukts mit der Kombination *ZmSn/PAP1* erzielt.

Eine ähnliche Verteilung des Aktivierungspotentials ist für den *AtDFR*-Promotor zu beobachten (vgl. Abb. R13). Allerdings lagen die erreichten Gus'-Aktivitäten hier um ein Vielfaches höher als bei den anderen beiden getesteten Promotoren. Ob dies an der Verteilung der Motive innerhalb des Promotors oder der getesteten Promotorlänge (520nt) – und somit an den überhaupt vorhandenen Motiven - liegt, muss in weiterführenden Experimenten noch gezeigt werden. Keine der mit *AtMYB0/GL1*, *AtMYB23* und *AtMYB66/WER* getesteten Kombinationen führte zu einer Aktivierung des Reportergenkonstrukts. Lediglich die auch in den Einzelfaktorkontrollen aktivierenden *AtbHLH*-ZIP-Faktoren und *ZmSn* führten zu einer leichten Aktivierung des Reportergenkonstrukts, was jedoch nicht auf die spezifische Interaktion mit dem MYB-Kotransfektionspartner zurückzuführen ist. Die

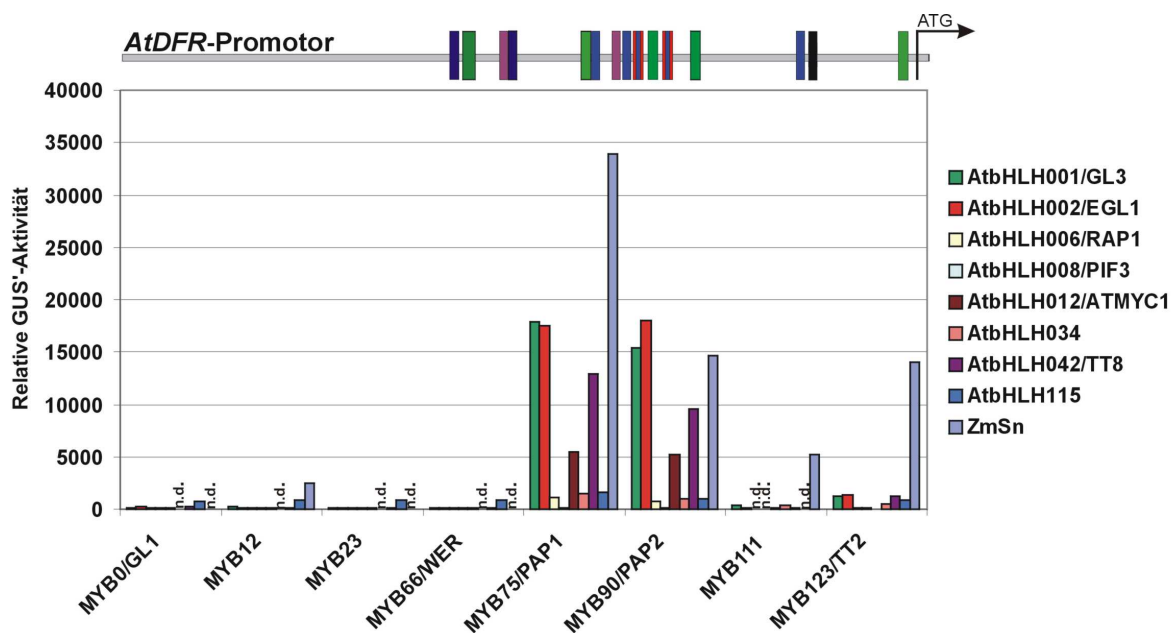


Abb. R13: Reporteraktivierung des *DFR*-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Ko-Überexpression verschiedener bHLH- und MYB TF im Dunkeln bei 20-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Der Schwellenwert (SW), der dem durchschnittlichen Grundrauschen des Reportergenkonstrukts ohne kotransfizierte Effektoren entspricht, war graphisch hier nicht darstellbar, da er für das getestete *DFR*-Promotorkonstrukt bei <100 relativer GUS'-Aktivität liegt (vgl. Abb.9 und zugehörige Wertetabelle im Anhang). Nicht getestete Faktorkombinationen sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Aktivierung durch die *AtbHLH*-ZIP-Faktoren ist auch mit den anderen *AtMYB*-Faktoren nicht höher, womit auch dort eine spezifische Interaktion ausgeschlossen werden kann. Das Aktivierungspotential ist wieder deutlich am größten bei den Kombinationen mit PAP1 und PAP2, während die TT2-Kombinationen in deutlich geringeren GUS'-Aktivitäten resultieren. *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* bilden dabei die Kombinationen mit den MYB-Faktoren, die zur höchsten GUS'-Aktivität führen, während die *AtbHLH042/TT8* wesentlich geringere GUS'-Aktivitäten aufweisen und *AtbHLH012/ATMYC1* bei den *ZmSn*-ähnlichsten *AtbHLH* zu den geringsten Aktivierungsraten führt. *AtMYB111*, der den *AtDFR*-Promotor (im Gegensatz zum *AtCHSmin*-Promotor) nicht als Einzelfaktor aktivieren konnte, bewirkt nur in Kombination mit *ZmSn* eine verhältnismäßig geringe Aktivierung. Ansonsten zeigen die *ZmSn*-Kombinationen wieder eine deutliche Präferenz auf Seiten von PAP1 und PAP2.

Dagegen verteilt sich das Aktivierungspotential beim getesteten *AtBAN*-Promotor genau entgegengesetzt (vgl. Abb. R14). Während bei den beiden vorher gezeigten Promotoren die Aktivierungsmaxima eindeutig auf Seiten von PAP1/PAP2 zusammen mit GL3/EGL1 zu finden waren, wird das getestete *AtBAN*-Promotor-

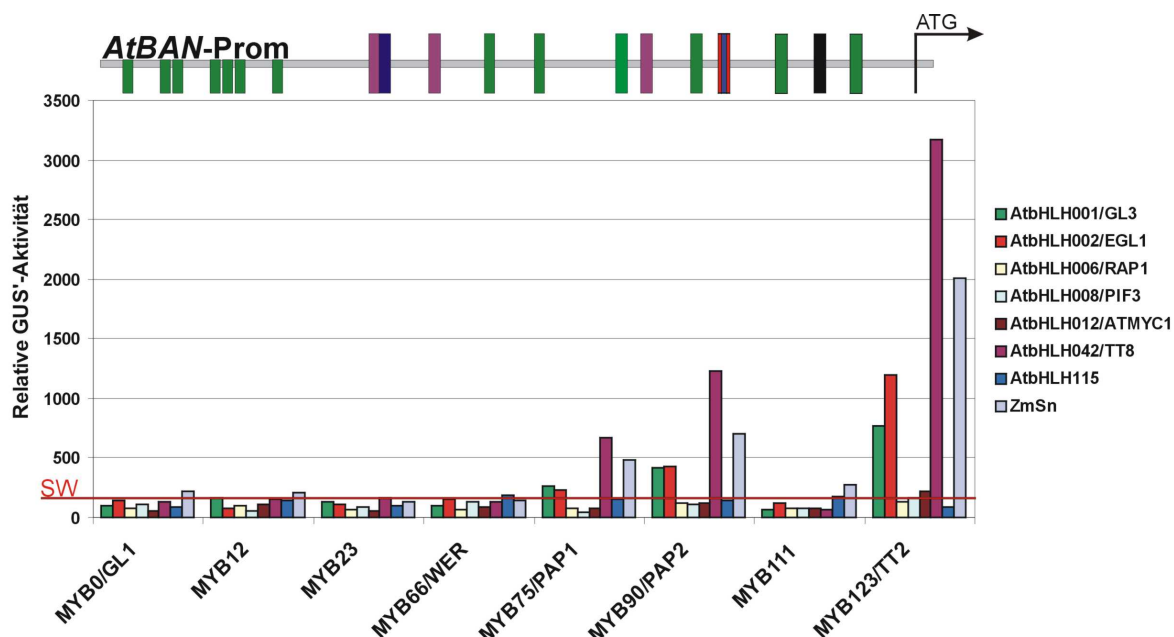


Abb. R14: Reporteraktivierung des *BAN*-Promotor-GUS-Konstrukts durch transiente Ko-Überexpression verschiedener bHLH- und MYB TF im Dunkeln bei 20stündiger Inkubation: dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Die rote Linie gibt den Schwellenwert (SW) an, der dem durchschnittlichen Grundrauschen des Reportergenkonstrukts ohne kotransfizierte Effektoren entspricht. Dieser liegt bei dem getesteten *BAN*-Promotorkonstrukt bei 211 (vgl. Abb. 10 und zugehörige Wertetabelle im Anhang).

Reporterkonstrukt am stärksten durch eine Kombination von *AtMYB123/TT2* mit *AtbHLH042/TT8* aktiviert. Dabei liegt die Gus'-Aktivität sogar deutlich höher als die bei den anderen Promotorkonstrukten am stärksten aktivierenden Kombinationen mit *ZmSn*. Die Aktivierung durch Kombinationen von *AtMYB75/PAP1* bzw. *AtMYB90/PAP2* mit verschiedenen *AtbHLH*-Faktoren fällt dagegen deutlich geringer aus. Allerdings ist auch hier eine Verschiebung des Aktivierungspotentials hin zu den Kombinationen mit *AtbHLH042/TT8* zu beobachten, während die Kombinationen mit *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* schwächer aktivieren. *ZmSn* führt in allen Kombinationen zumindest zu einer leichten Aktivierung, die jedoch extrem niedrig ausfällt. *AtMYB111* kann auch in Kombination mit *AtbHLH*-Faktoren den *AtBAN*-Promotor nicht aktivieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl der *AtCHSmin*-Promotor als auch der *AtDFR*-Promotor auf Seiten der Arabidopsis Faktoren am stärksten durch Kombinationen von *AtbHLH001/GL3* bzw. *AtbHLH002/EGL1* mit den *AtMYB*-Faktoren *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB90/PAP2* zu aktivieren sind, während der getestete *AtBAN*-Promotor am stärksten durch die Kombination *AtbHLH042/TT8* und *AtMYB123/TT2* aktiviert wird. Die *AtbHLH*-ZIP-Faktoren können zumindest

leicht, beim *AtCHS*min-Promotor sogar recht stark, als Einzelfaktoren aktivieren, was durch die Ko-Transfektion mit *AtMYB*-Faktoren nicht beeinflusst wird. *ZmSn* kann ebenfalls ohne ko-transfizierten Interaktionspartner das Reportergenkonstrukt aktivieren, weist aber im Gegensatz zu den *AtbHLH*-ZIP-Faktoren synergistische Effekte mit *AtMYB*-Faktoren auf. *AtMYB12* bzw. *AtMYB111* können den *AtCHS*min-Promotor als Einzelfaktoren aktivieren, wobei in Kombination mit *AtbHLH*-Faktoren zumindest bei *AtMYB111* ein deutlicher Anstieg der Reportergenaktivität zu beobachten ist, der jedoch unspezifisch bezüglich des getesteten *AtbHLH*-Ko-Transfektionspartners ist.

3.3 Eine Punktmutation im konservierten Motiv 11 hat keine Auswirkungen auf das synergistische Aktivierungspotential der *ZmSn*-ähnlichen *AtbHLH*-Faktoren

Die beobachteten synergistischen Effekte von bHLH- und MYB-Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung von Reportergenkonstrukten und die Bestätigung der Fähigkeit zur physikalischen Interaktion dieser potentiellen *AtbHLH*/*AtMYB*-Interaktionspartner in Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien (vgl. Zimmermann, 2003; sowie Payne *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001) werfen die Frage nach möglichen Interaktionsdomänen innerhalb der beiden Transkriptionsfaktorfamilien auf. Betrachtet man die *AtbHLH*-TF in ihrer Gesamtheit, so fällt die strukturelle Divergenz außerhalb der Domäne auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass nur ein Teil der bHLH-Proteine in der Lage sein könnte mit R2R3-MYB-Proteinen zu interagieren.

Auf Seiten der MYB-TF wurden bereits bestimmte Reste in der R3-Domäne identifiziert, die für die Interaktion mit bHLH-Proteinen notwendig sind (Zimmermann, 2003). Im 3D-Modell befinden sich diese Reste auf der der DNA-zugewandten Seite in den nebeneinander liegenden Helices 1 und 2 der R3-Domäne. Basierend auf den bisher bekannten Daten zur bHLH/MYB-Interaktion und den in dieser Analyse außerhalb der bHLH-Domäne identifizierten konservierten Bereichen in bHLH Proteinen (vgl. Tab. R1), deren Interaktionsfähigkeit mit MYB-Proteinen gezeigt werden konnte, wird deutlich, dass die Interaktionsdomäne im aminoterminalen Bereich der bHLH-Proteine zu suchen ist. Als 2002 eine Punktmutation im aminoterminalen Bereich von *AtbHLH005/ATR2* beschrieben wurde, die funktionelle Auswirkungen zeigte (Smolen *et al.*, 2002), lag es nahe, aufgrund der beobachteten

phänotypischen Effekte, sich diese Region in den nächstähnlichen *AtbHLH*-Proteinen näher anzusehen. Die Lage der Punktmutation in *AtbHLH005/ATR2* betrifft das für die Subgruppen III_d, e und f als Motiv 11 bezeichneten Bereich sequenzieller Homologie (vgl. Tab. R1).

<i>atr2D94N</i>	(67)	WTYAIFWQISHDFDSSTG--DNTVILGWNGYYKG
<i>AtbHLH001/GL3</i>	(27)	WSYGIFWSVSAS-QSG-----VLEWGDGYYNG
<i>AtbHLH002/EGL1</i>	(26)	WSYGIFWSVSAS-QPG-----VLEWGDGYYNG
<i>AtbHLH012/MYC1</i>	(36)	WSYAIFWSSSLT-QPG-----VLEWGECCYNG
<i>AtbHLH042/TT8</i>	(33)	WTYSVFWQFCPQ-----QRVLVWNGYYNG
<i>AtbHLH006/RAP1</i>	(83)	WTYAIFWQPSYD-FSGAS-----VLGWGDGYYKG
<i>AtbHLH004</i>	(78)	WTYAVFWQSSHGFAGEDNNNNNTVLLGWGDGYYKG
<i>AtbHLH005/ATR2</i>	(67)	WTYAIFWQISHDFDSSTG--DNTVILGWGDGYYKG
<i>AtbHLH028</i>	(49)	WSYAIFWKPSYDDFSGEA-----VLKWGDGVYTG
<i>AtbHLH003</i>	(63)	WDYAIFWLASNVSNDG-----CVLIWGDGHCRV
<i>AtbHLH013</i>	(66)	WNYAIFWQISRKAGDL-----VLCWGDGYCRE
<i>AtbHLH017</i>	(66)	WNYAIFWQQTMSRSGQQ-----VLGWGDGCCRE
<i>AtbHLH014</i>	(50)	WAYVIFWQKMFDDQSDRS-----YLVVVDGHFCG
Consensus		WSYAIFWQxSxxxxSxxxxxxxxxVLxWGDGYYKG

Abb. R15: Alignment der als Motiv 11 in Tab. R1 beschriebenen Region im Aminoterminus der *AtbHLH*-Proteine der Subgruppen III_d, e und f. Der in der *atr2D* veränderte Aminosäurerest 94 ist rot hinterlegt. Der korrespondierende Aminosäurerest in *AtbHLH042/TT8*, das als einziges *AtbHLH*-Protein ein N statt einem sauren Rest besitzt, ist rot dargestellt.

Um bestimmen zu können, ob eine Punktmutation an entsprechender Position im Motiv 11 (vgl. Abb. R15) Auswirkungen auf die Funktionalität von *AtbHLH*-TF im Transfektionssystem hat, wurden mittels „Site Directed Mutagenesis“ Punktmutationen in die *AtbHLH*-cDNA-Klone von *AtbHLH001/GL3*, *AtbHLH002/EGL1*, *AtbHLH012/ATMYC1* und *AtbHLH042/TT8* eingeführt. Die mutierten cDNAs wurden im Vergleich zu den Wildtypallelen im Transfektionssystem getestet. Da die betreffenden Wildtypallele eines MYB-Interaktionspartners bedürfen, um den getesteten *AtBAN*-Promotor aktivieren zu können, würde eine Reduktion oder eine Zunahme der Reporterogenaktivierung möglicherweise auf eine reduzierte oder verbesserte Interaktionsfähigkeit hinweisen, die dann noch im Hefe-2-Hybridsystem verifiziert werden müsste. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied für die Aktivierungsfähigkeit in Kombination mit *AtMYB123/TT2* auf dem *AtBAN*-Promotor festgestellt werden (vgl. Abb. R16). Ebenfalls war eine Verschiebung des Aktivierungspotentials hin zu einem anderen MYB-Interaktionspartner (z.B. bei TT8-N53D von *AtMYB123/TT2* zu *AtMYB75/PAP1* oder *AtMYB90/PAP2*) nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt), so dass auf weitere Studien im Hefe-2-Hybridsystem und im Transfektionssystem verzichtet wurde.

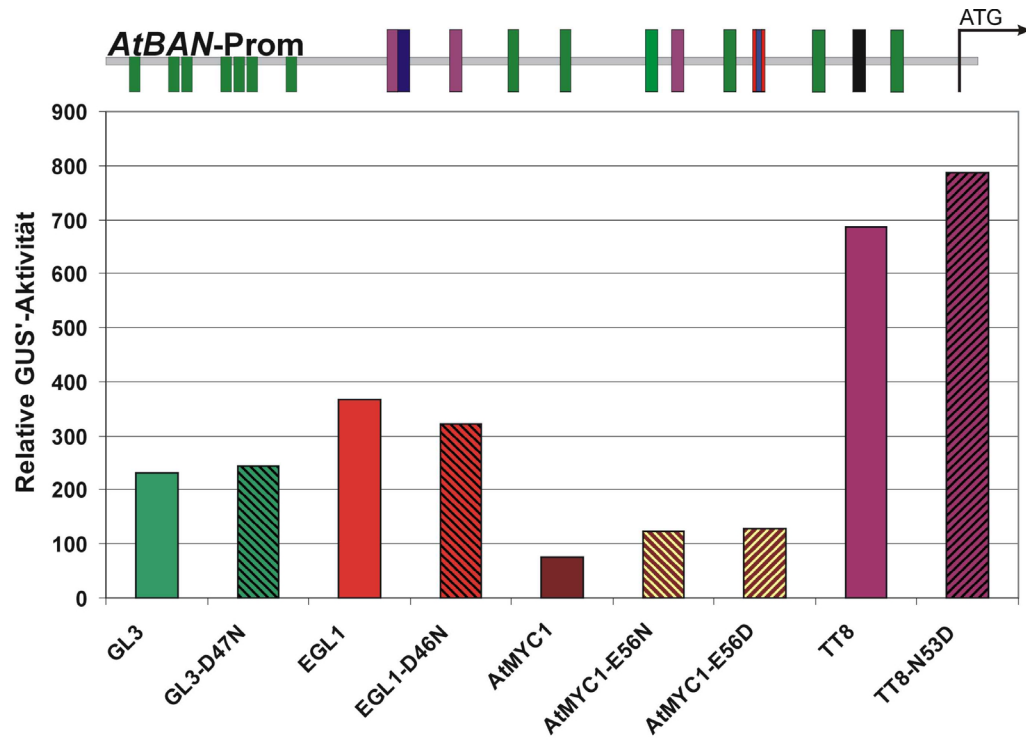


Abb. R16: Aktivierungspotential punktmutierter Konstrukte der *AtHLLH*-Subgruppe III f auf dem *AtBAN*-Promotor-GUS-Konstrukt mit *AtMYB123/TT2* als Interaktionspartner. Dargestellt sind die relativen GUS'-Aktivitäten der Wildtypallele (einfarbig grün, rot, braun und violett) im Vergleich zu den punktmutierten Konstrukten (schraffiert). Die mutierten Positionen sind jeweils in der Erweiterung des Proteinnamens angegeben.

3.4 Das WD40-Protein *TTG1* ist direkt in die Regulation des Flavonoidstoffwechsels involviert

Der durch Koornneef (1981) erstmals beschriebene Phänotyp der *transparent testa glabra 1* Mutante verbindet zwei auf den ersten Blick distinkte Abläufe, den der Pflanzenentwicklung und den des Sekundärstoffwechsels, miteinander. Offensichtliche Phänotypen sind das Fehlen der Trichome und eine gelbliche Samenfarbe. Also wirkt sich der Verlust des intakten Genprodukts nicht nur auf die Synthese der kondensierten Tannine, sondern auch auf die Zelldifferenzierung aus. Weitere zu beobachtende Effekte sind das Fehlen der „seed coat mucilage“ (der die Samenschale bedeckende Polysaccharidschleim), sowie das völlige Fehlen von Anthocyanen. In Abb. R17 ist das Fehlen von der lichtinduzierten Anthocyanbiosynthese im Vergleich zu *Landsberg erecta* Pflanzen deutlich zu erkennen. Außerdem waren bei den *ttg1-1* Pflanzen auch verfrühte Seneszenzsymptome zu beobachten (vgl. hierzu Koornneef *et al.*, 1981).



Abb. R17: Lichtstress/Seneszenz bei *Landsberg erecta* (oben) und *ttg1-1* Pflanzen (unten). Die Pflanzen wurden 12 Wochen unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht) angezogen und dann in Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) überführt. Nach wenigen Tagen wurden die Rosettenblätter der „Wildtyp“-Pflanzen als Reaktion auf den Lichtstress (oder evtl. auch als Resultat verfrühter Seneszenz) durch die Akkumulation von Anthocyanen rot, während die Rosettenblätter der *ttg1-1* Pflanzen ausbleichen und keinerlei Pigmentakkumulation zeigten. Die einzelne rötliche Pflanze in der unteren Reihe war eine Kontamination.

Wenn nun die *ttg1-1* Mutation derart drastische Auswirkungen auf vermeintlich unabhängige Vorgänge in der Pflanze hat, worin besteht dann die Verbindung der beiden Prozesse? Mittlerweile ist bekannt, dass TTG1 direkt mit AtbHLH001/GL3 interagiert, der zusammen mit AtMYB0/GL1 einen wichtigen Regulator der Trichomentwicklung und der Wurzelhaarentwicklung spielt (Payne et al., 2000). TTG1 kann allerdings nicht mit AtMYB0/GL1 interagieren, was eine Art Brückenfunktion für AtbHLH001/GL3 zwischen TTG1 und AtMYB0/GL1 erwarten lässt. AtbHLH001/GL3 seinerseits kann zusammen mit AtMYB075/PAP1 bzw. AtMYB90/PAP2 Strukturgene des Biosynthesewegs zu den Anthocyanen aktivieren (vgl. Abb. R12 und R13).

Ein ähnliches Interaktionsmuster ist inzwischen für die Regulatoren der Synthese kondensierter Tannine, AtMYB123/TT2 und AtbHLH042/TT8, gezeigt. Beide Faktoren interagieren (Nesi et al., 2000) und regulieren gemeinsam die Expression des *BANYULS*-Gens. Neuere Studien legen nahe (diese Arbeit in Kooperation mit Antoine Baudry / Loic Lepiniec, INRA, Versailles, Veröffentlichung in Vorbereitung), dass ein trimere Komplex aus TTG1/TT8/TT2 für die transkriptionelle Aktivierung notwendig ist, wobei wiederum nur TT2 und TT8 bzw. TT8 und TTG1 interagieren können, nicht aber TTG1 und MYB. In den Transfektionsanalysen zur Aktivierung des *BANYULS*-Promotors konnte aber eine deutliche Aktivierung gezeigt werden, ohne dass ein *TTG1*-Expressionskonstrukt mit ko-transfiziert wurde. Sollte also TTG1 essentiell für die transkriptionelle Regulation durch die beiden Transkriptionsfaktoren sein, müsste TTG1 in Protoplasten exprimiert sein, damit überhaupt eine transkriptionelle Aktivierung durch die Ko-Überexpression von

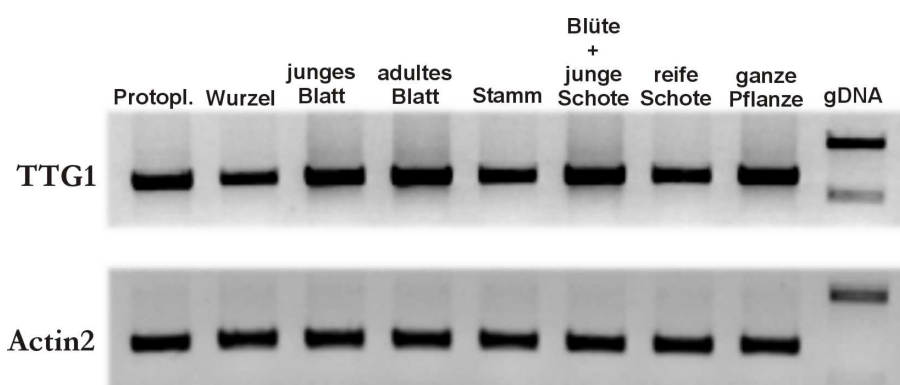


Abb. R18: RT-PCR-Detektion der *TTG1*-Expression in Protoplasten (links) und unterschiedlichen *Arabidopsis*-Organen. Dargestellt ist die Signalstärke der *TTG1*-Expression im Verhältnis zum Referenzgen *ACTIN2* bei gleichen Auftragsmengen (10µl) auf einem 1% Agarosegel in 1xTAE. Die Signale sind das Resultat von 28 PCR Zyklen ausgehend von 250ng gesamt-RNA pro RT-PCR-Ansatz (50µl).

*At*MYB123/TT2 und *At*bHLH042/TT8 möglich ist. Um dies zu überprüfen, wurden auf unterschiedlichen RNA-Quellen (Protoplasten, unterschiedliche Arabidopsis-Organe) RT-PCRs durchgeführt und somit die Expression von *TTG1* detektiert. Tatsächlich konnte die Expression von *TTG1* in Protoplasten nachgewiesen werden (vgl. Abb. R18). *TTG1* scheint darüber hinaus ubiquitär exprimiert zu sein, was einen generellen Regulationsmechanismus für *TTG1* erwarten lässt.

Für *At*bHLH001/GL3 und *At*bHLH042/TT2 ist die physikalische Interaktion mit *TTG1* ebenso gezeigt (Payne *et al.*, 2000, Nesi *et al.*, 2001) wie für *At*bHLH012/ATMYC1 und *At*bHLH002/EGL1 (Zimmermann, 2003). Aufgrund dieser Resultate soll im Folgenden vor allem die Beteiligung von *TTG1*, *At*MYB123/TT2 und den *At*bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf an der Regulation der *BANYULS*-Expression beleuchtet werden.

3.5 TTG1 ist als einziger der untersuchten Faktoren in Protoplasten exprimiert

Um der Frage nachzugehen, ob außer TTG1 einer der getesteten Faktoren in Protoplasten exprimiert ist, wurden mit den gleichen cDNAs, wie in Abschnitt 3.5 RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob sich eine Korrelation zwischen den potentiellen Regulatoren des *BANYULS*-Promotors in der Samenschale, *AtMYB123/TT2*, *AtbHLH042/TT8* und TTG1 nachweisen lässt (Abb. R19).

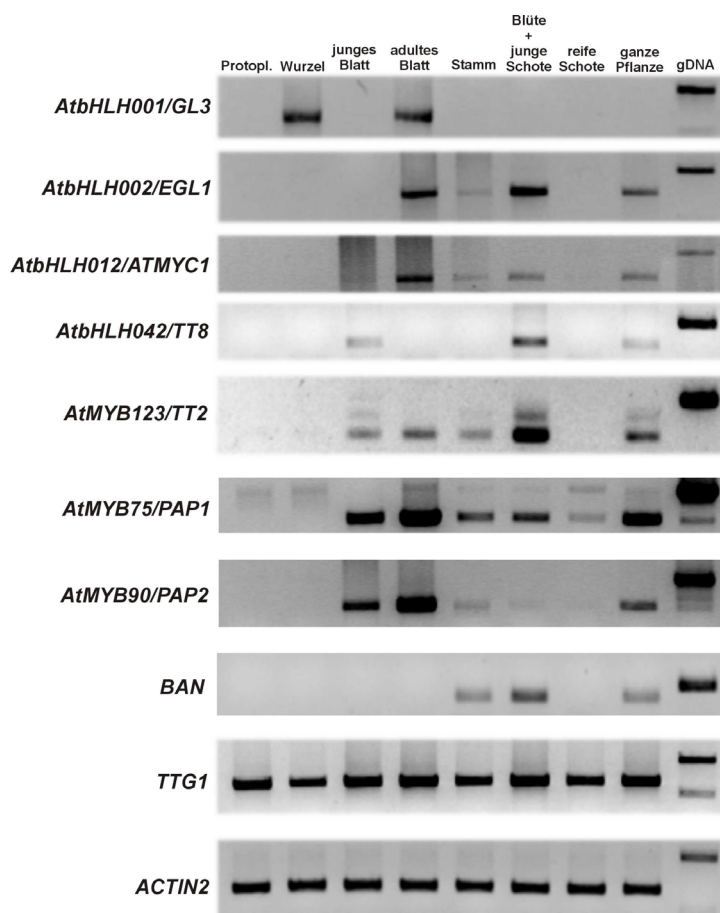


Abb. R19: RT-PCR-Resultate Dargestellt ist die Signalstärke der einzelnen RT-PCR-Ansätze im Verhältnis zum Referenzgen *ACTIN2* bei gleichen Auftragsmengen (10µl) auf einem 1% Agarosegel in 1xTAE. Die Signale sind das Resultat von 28 PCR Zyklen (*ACTIN2*, *TTG1*, *BAN*, *MYB75/PAP1*, *AtMYB90/PAP2*, *AtMYB123/TT2* und *AtbHLH042/TT8*) bzw. 2x30 PCR Zyklen (*AtbHLH001/GL3*, *AtbHLH002/EGL1* und *AtbHLH012/ATMYC1*) ausgehend von 250ng gesamt-RNA pro RT-PCR-Ansatz (50µl). Die Kontrollansätze mit auf genomischer DNA aus *A. thaliana Columbia 0* (gDNA) finden sich in der äußersten rechten Spalte.

Keines der untersuchten Gene, weder eines der *AtbHLH*-Gene, noch eines der untersuchten *AtMYB*-Gene ist in Protoplasten exprimiert. Die Expressionen von *AtBAN*, *AtMYB123/TT2* und *AtbHLH042/TT8* korrelieren in Blüten und jungen

Schoten. Allerdings wird dort auch *AtbHLH002/EGL1* exprimiert. Die auftretenden Doppelbanden in *AtMYB123/TT2* sind das Resultat von unterschiedlich gespleister mRNA. Dies wurde durch Klonierung und Sequenzierung gezeigt. Die Klone ergaben unterschiedlich gespleiste Varianten, die das komplette erste bzw. zweite Intron in *AtMYB123/TT2* betrafen. Beide Varianten führen zu verfrühten STOP-Kodons, jeweils kurz hinter der eigentlichen Spleißstelle. Ob sich darin ein regulatorischer Mechanismus zeigt – wie beim Mais Faktor *ZmIn1* (Burr *et al.*, 1996) – wurde nicht weiter verfolgt.

3.6 Auswirkungen von TTG1 auf das Aktivierungspotential von bHLH/MYB Interaktionspartnern im Transfektionssystem

Die Bindefähigkeit von TTG1 an die *AtbHLH*-Faktoren der oben schon auf die Aktivierungsfähigkeit getesteten Subgruppe III_f wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt (vgl. Einleitung Kap. 1.2.5). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *TTG1* in Protoplasten (wie in allen anderen Organen in *A. thaliana* auch) exprimiert ist. Sollte *TTG1* wirklich Auswirkungen auf die Modulation der Expression bestimmter Gene durch bHLH/MYB-Interaktionspartner haben, so ist dies im Ko-Transfektionssystem durch Ko-Überexpression bzw. RNAi-Silencing von *TTG1* nachzuweisen. Und tatsächlich wirkt sich die Ko-Überexpression von *TTG1* im transienten System stark auf die gemessene Gus'-Aktivität aus (vgl. Abb. R19).

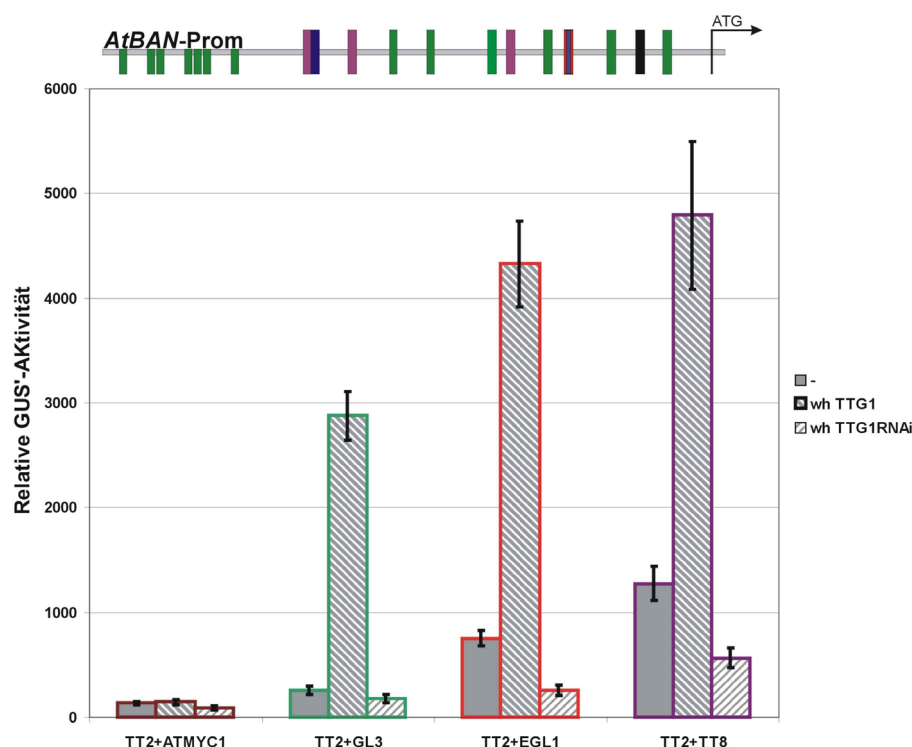


Abb. R19: Auswirkungen von 2x35S-*TTG1* und 2x35S-*TTG1RNAi* auf die Aktivierung des *AtBAN*-Promotors durch die *AtbHLH*-Faktoren der Subgruppe III_f zusammen mit *AtMYB123/TT2*. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität, die Farbkodierung der Größenbalken (braun, grün, rot, violett) entspricht der Farbgebung in den vorangegangenen Graphiken zur Reportergenaktivität in transienten Ko-Überexpressionsstudien in AT7-Protoplasten. Die von links oben nach rechts unten schraffierten Säulen repräsentieren die GUS'-Aktivität bei Ko-Überexpression von *TTG1*, die von links unten nach rechts oben gestreiften Säulen die GUS'-Aktivität in 2x35S-*TTG1RNAi* kotransfizierten Ansätzen.

Die Ko-Überexpression von *TTG1* zusammen mit *AtbHLH042/TT8* und *AtMYB123/TT2* führt zu einem Anstieg der Reportergenaktivität des *AtBAN*-Promotorkonstruktes von bis zu 1000% gegenüber den Ansätzen ohne *TTG1*.

Ergänzend dazu resultiert die Überexpression eines hauptsächlich die 5'-untranslatierte Region von TTG1 enthaltenden RNAi-Silencing-Konstruktes in einer deutlichen Reduktion der gemessenen GUS-Aktivität. Zur Kontrolle (Abb. R20) wurden das *TTG1*-Überexpressionskonstrukt zusammen mit den einzelnen Faktoren *AtbHLH042/TT8* und *AtMYB123/TT2* getestet, was nicht zu einer Aktivierung des Promotors führte. *ZmC1* und *ZmSn*, die beiden MYB/bHLH-Interaktionspartner aus Mais zeigen ebenfalls ein erhöhtes Aktivierungspotential in Ko-Überexpression mit *TTG1*, jedoch fällt der Effekt deutlich geringer aus als bei den Arabidopsis Faktoren. Das RNAi-Konstrukt führt sogar bei diesen Faktoren unter Einbeziehung der Fehlerbalken zu keiner signifikanten Reduktion der GUS'-Aktivität. Dies ist ein erster Beweis dafür, dass die gemessene Reduktion der GUS'-Aktivität in den Ansätzen mit TT2 und TT8 nicht auf einem möglichen toxischen Effekt des Transkripts beruht. Dies wird jedoch später noch anhand von GFP-Studien im Rahmen dieser Arbeit bestätigt.

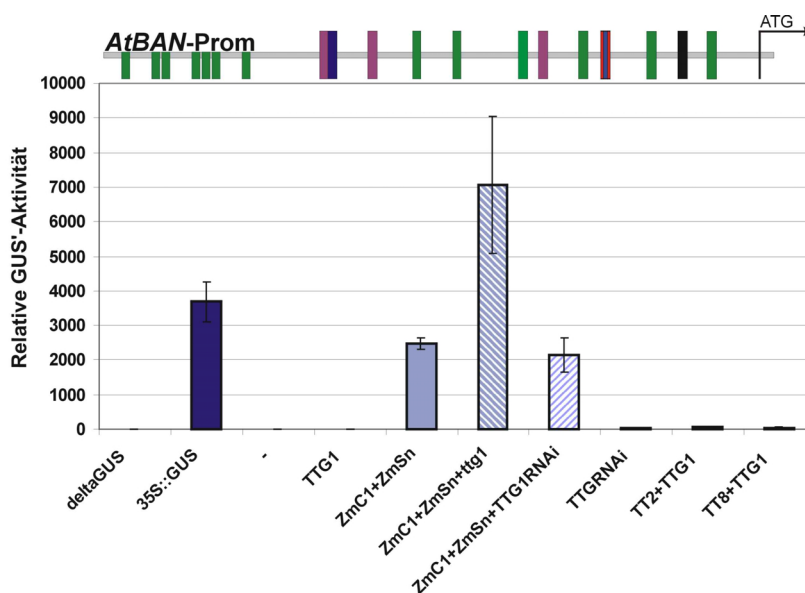


Abb. R20: Kontrollansätze zur Auswirkung von TTG1 auf die Aktivierung des *AtBAN*-Promotors durch bHLH und MYB Interaktionspartner. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität. Getestet wurden sowohl die *TTG1* und *TTG1RNAi*-Konstrukte alleine, als auch zusammen mit den Einzelfaktoren TT2 und TT8 (hier gezeigt nur die Kombinationen mit dem *TTG1*-Überexpressionskonstrukt). Außerdem wurden noch *ZmC1* und *ZmSn* auf mögliche Aktivierungspotentialverschiebungen durch *TTG1* getestet.

Um zu überprüfen, ob der Effekt durch *TTG1* nicht nur auf eine Arabidopsis-Faktor-Kombination beschränkt bleibt und sogar auf weitere Promotoren übertragbar sein könnte, wurden die vorher auf ihre Aktivität getesteten Kombination mit ebenfalls in Ko-Überexpressionsstudien mit *TTG1* bzw. *TTG1RNAi* getestet. Dabei ließ sich

beim *AtBAN*-Promotor (vgl. Abb. R21) der gleiche Effekt für alle getesteten Kombinationen von *AtbHLH* und *AtMYB* beobachten, die auch schon ohne *TTG1* zu einer Aktivierung geführt hatten. *TTG1*-Überexpression führt zu einem Anstieg der GUS'-Aktivität und *TTG1RNAi*-Ko-Expression zu einer Reduktion. Faktorkombinationen, die den Promotor ohne *TTG1* nicht aktivieren konnten, vermochten dies auch nicht bei Ko-Überexpression von *TTG1* (Daten hier nicht gezeigt). Für die anderen getesteten Promotoren ergab sich ein vergleichbares Bild (Abb. R22 und R23).

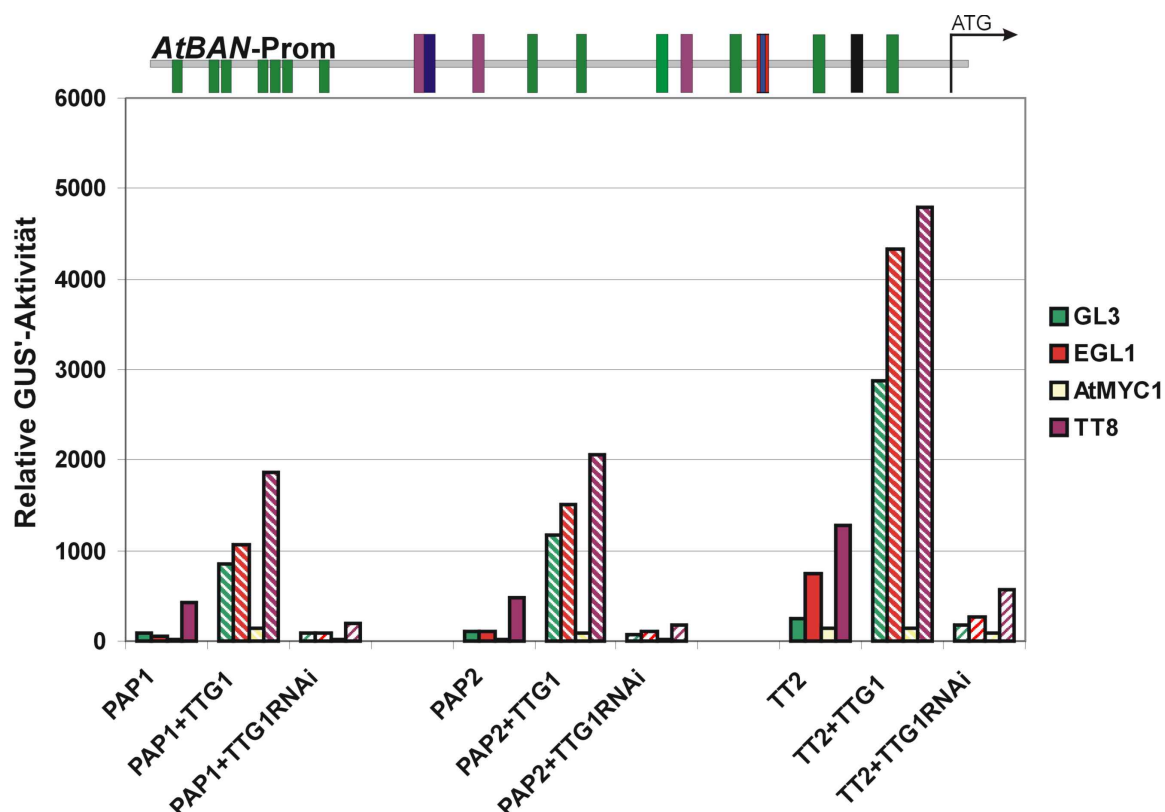


Abb. R21: Auswirkungen von *2x35S-TTG1* und *2x35S-TTG1RNAi* auf die Aktivierung des *AtBAN*-Promotors durch die *AtbHLH*-Faktoren der Subgruppe IIIf zusammen mit den *AtMYB*-Faktoren 75/PAP1, 90/PAP2 und 123/TT2. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität, die Farbkodierung der Größenbalken (braun, grün, rot, violett) entspricht der Farbgebung in den vorangegangenen Graphiken zur Reportergenaktivität in transienten Ko-Überexpressionsstudien in AT7-Protoplasten

Auch die Kontrollen zum *AtCHSmin*- und *AtDFR*-Promotor (Daten hier nicht gezeigt) ergaben keine Aktivität bei zuvor inaktiven Faktor-Kombinationen oder Einzelfaktoren. Somit beruht die Aktivierungssteigerung durch *TTG1* wahrscheinlich nicht auf einer direkten DNA-Bindung sondern vielmehr auf einer Stabilisierung oder Modifikation des DNA-bindenden *bHLH*/*MYB*-Komplexes. Natürlich kann ein Einfluss von weiteren Faktoren nicht ausgeschlossen werden, für die *TTG1* möglicherweise als Bindeglied fungiert.

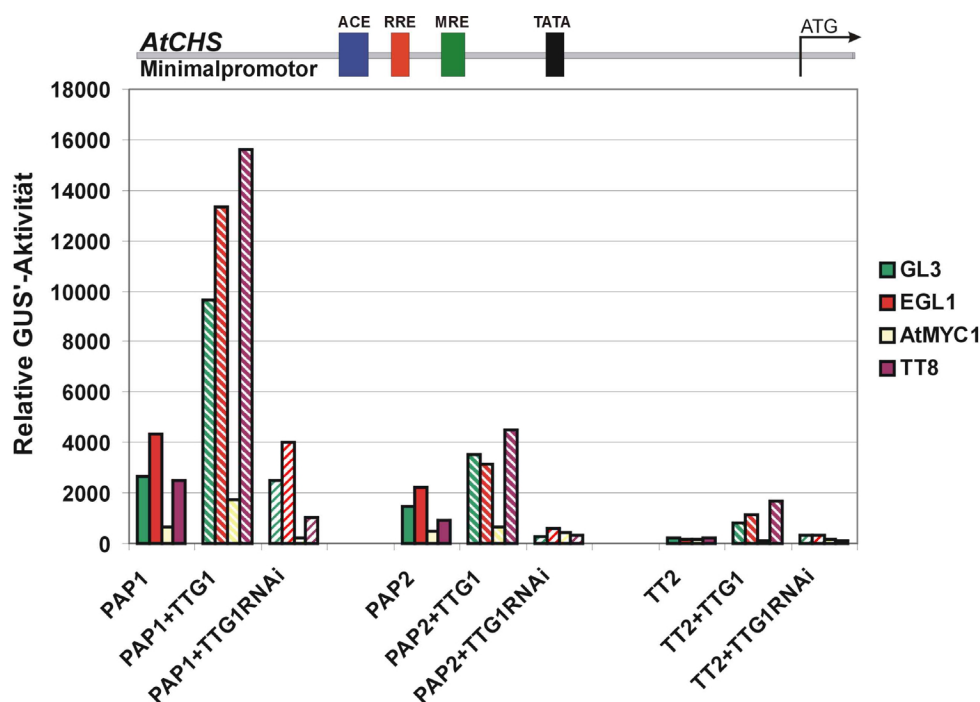


Abb. R22: Auswirkungen von *2x35S-TTG1* und *2x35S-TTG1RNAi* auf die Aktivierung des *AtCHS*min-Promotors durch die *AtbHLH*-Faktoren der Subgruppe IIIf zusammen mit den *AtMYB*-Faktoren 75/PAP1, 90/PAP2 und 123/TT2. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität, die Farbkodierung der Größenbalken (braun, grün, rot, violett) entspricht der Farbgebung in den vorangegangenen Graphiken zur Reportergenaktivität in transienten Ko-Überexpressionsstudien in AT7-Protoplasten

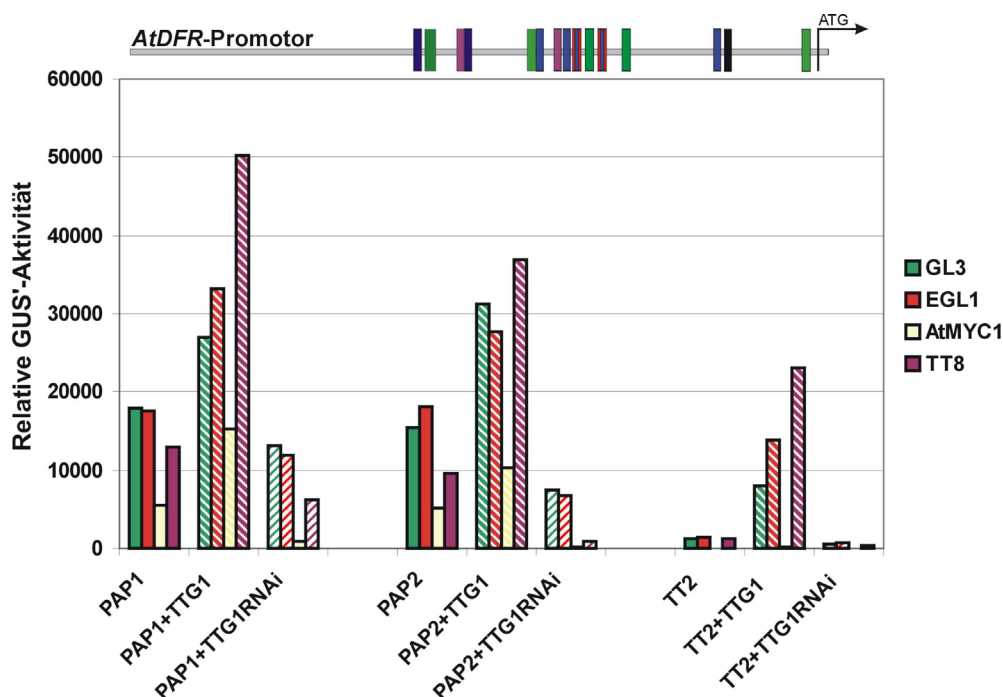


Abb. R23: Auswirkungen von *2x35S-TTG1* und *2x35S-TTG1RNAi* auf die Aktivierung des *AtDFR*-Promotors durch die *AtbHLH*-Faktoren der Subgruppe IIIf zusammen mit den *AtMYB*-Faktoren 75/PAP1, 90/PAP2 und 123/TT2. Dargestellt ist die relative GUS'-Aktivität, die Farbkodierung der Größenbalken (braun, grün, rot, violett) entspricht der Farbgebung in den vorangegangenen Graphiken zur Reportergenaktivität in transienten Ko-Überexpressionsstudien in AT7-Protoplasten

3.7 RNAi Funktionskontrolle mittels QRT-PCR

Zur Überprüfung der Funktionalität des *TTG1RNAi*-Konstruktes wurden Pflanzen der Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia 0* mit dem binären Konstrukt mittels Agrobakterien-Transformation transformiert. Sollte das *TTG1RNAi*-Konstrukt das mRNA-Level des *TTG1*-Transkripts in der Pflanze signifikant verringern, müssten die Pflanzen den gleichen oder einen ähnlichen Phänotyp wie die *ttg1-1*-Linie aufweisen. Sie wären durch ein Fehlen der Trichome und eine gelbliche Samenfarbe zu erkennen. Da die Kontrollpflanzen zur Überprüfung gegen Ende dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen (in ersten Transformationen konnten keine BASTA-resistenten Pflanzen selektioniert werden) wurde eine Überprüfung der Transkriptkonzentration in transfizierten Protoplasten erwogen. Da jedoch selbst unter optimalen Bedingungen die Transfektionseffizienz bei lediglich 20% der intakten Protoplasten liegt, waren dazu weder RT-PCR-Experimente noch Northern-Hybridisierung geeignet. In diesen Analysen wäre lediglich die *TTG1*-Überexpression, nicht aber der durch das RNAi-Silencing verursachten Unterschied in der Transkriptkonzentration von weniger als 20% zu detektieren gewesen. Deshalb wurde auf die Quantitative RealTime-PCR-Methode zurückgegriffen, die selbst geringe Unterschiede in der Transkriptkonzentration sichtbar machen kann. Dazu wurden AT7-Protoplasten (je 10 Transfektionsansätze) mit dem *TTG1*-Überex-

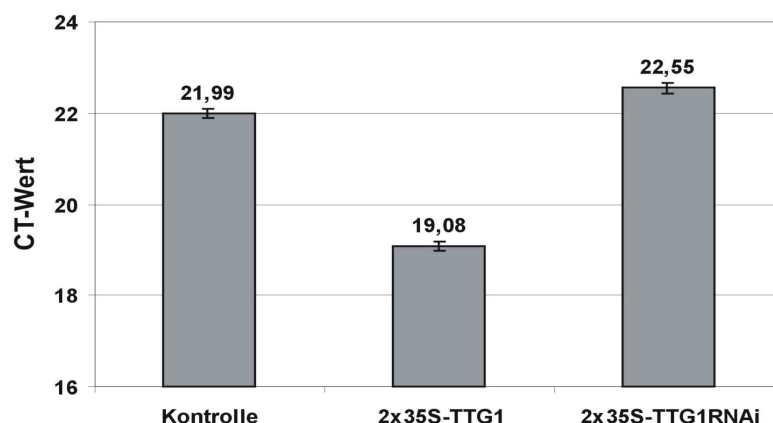


Abb. R24:QRT-PCR-Resultate zur Verifikation der Funktionalität des *TTG1RNAi*-Konstruktes. Dargestellt sind die Mittelwerte der in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3x3 Proben ermittelten CT-Werte. Der CT-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, bei dem die vorliegende Kopienzahl im Ansatz ausreichte eine bestimmte Fluoreszenzstärke zu erreichen. Das heißt, je größer der CT-Wert, desto geringer die Anzahl der spezifischen cDNA-Kopien im Ansatz, desto geringer ist das untersuchte Gen in den Zellen exprimiert gewesen, die zur RNA-Präparation benutzt wurden.

pressionskonstrukt bzw. mit dem *TTG1RNAi*-Konstrukt transformiert. Als Kontrolle diente die gleiche Menge mit einem inaktiven Konstrukt (pΔGUS) transfizierter Protoplasten. Die Zellen wurden nach der Transfektion ebenfalls für 20 Stunden im Dunkeln inkubiert, mit CaCl₂ gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte wie im Material und Methoden Teil aufgeführt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt, wobei auch unterschiedliche RNA-Präparationen verwendet wurden, um Präparationsartefakte auszuschließen. Die Summe der Experimente (vgl. Abb. R24) ergab eine deutliche Abnahme der *TTG1*-Transkriptmenge in mit dem *TTG1RNAi*-Konstrukt transfizierten Zellen (CT = 22,55 gegenüber der Kontrolle mit einem CT = 21,99). Dagegen war die Transkriptmenge in den mit dem Überexpressionskonstrukt transfizierten Zellen deutlich höher (CT = 19,08). Ein Unterschied von $\Delta\text{CT} = 0,56$ zwischen Kontrolle und *TTG1RNAi*-transfizierten Zellen bedeutet einen Unterschied in der Kopienzahl von $2^{0,56}$ (=1,474) was einem Unterschied von 47,4% bezüglich der relativen Transkriptmenge entspricht. Diese Zahlen sind auf keinen Fall absolut zu sehen, zumal bei einer mittels 35S-GFP-Kontrolle ermittelten Transfektionseffizienz von ~18% auch bei einem Wirkungsgrad des *TTG1RNAi*-Konstrukts von 100% eben nur eine Reduktion der Transkriptkonzentration von ~18% zu erwarten gewesen ist. Allerdings ist dieses Resultat ein deutlicher Hinweis auf die Funktionalität des *TTG1RNAi*-Konstruktes. Es lässt jedoch die Möglichkeit offen, dass das Konstrukt einen toxischen Effekt auf die Protoplasten ausübt. Dies wurde aber in den folgenden GFP-Lokalisationsstudien ausgeschlossen.

3.8 GFP Lokalisation von TT8 und TTG1

Da es in der Literatur unterschiedliche Aussagen über die Lokalisation des TTG1-Proteins bzw. TTG1-ähnlicher Proteine aus anderen pflanzlichen Organismen (z.B. AN11 in *Petunia hybrida*) in der Zelle gab, wurde die Lokalisation eines GFP-fusionierten TTG1-Proteins in AT7-Protoplasten untersucht. Außerdem wurde die zu erwartende nukleäre Lokalisation von TT8::GFP überprüft. Tatsächlich zeigten die mit einem *2x35S-TT8::GFP*-Konstrukt transfizierten Protoplasten eine klare nukleäre Lokalisation von TT8-GFP (vgl. Abb. R25). Während die Ko-Überexpression von *TTG1* oder *TT2* keinen Einfluss auf die TT8-GFP-Lokalisation bzw. auf die Fluoreszenzstärke hatte, waren in den mit *2x35S-TTG1RNAi* kotransfizierten Zellen eine deutliche Abnahme der Zahl der fluoreszenten Zellen (vgl. Statistik in Abb. R27)

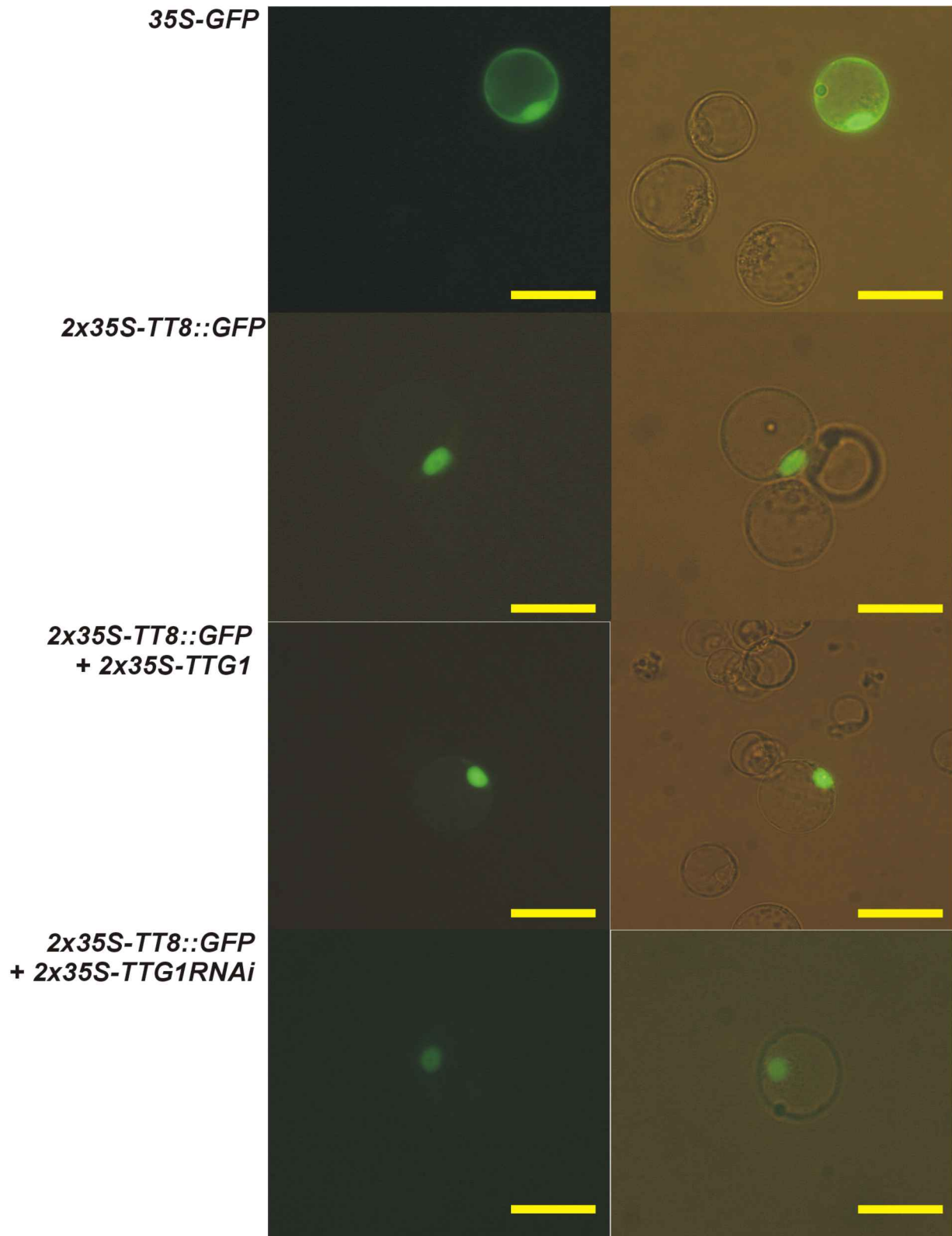


Abb. R25: Lokalisation eines carboxyterminal fusionierten TT8::GFP Proteins in AT7-Protoplasten. Links sind jeweils die Konstrukte angegeben, mit denen die daneben abgebildeten Protoplasten transfiziert wurden. In der linken Bilderspalte sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen abgebildet, rechts daneben finden sich Überblendungen mit Hellfeldaufnahmen zur genaueren Orientierung. Die Größenbalken (gelb) entsprechen 40 μm.

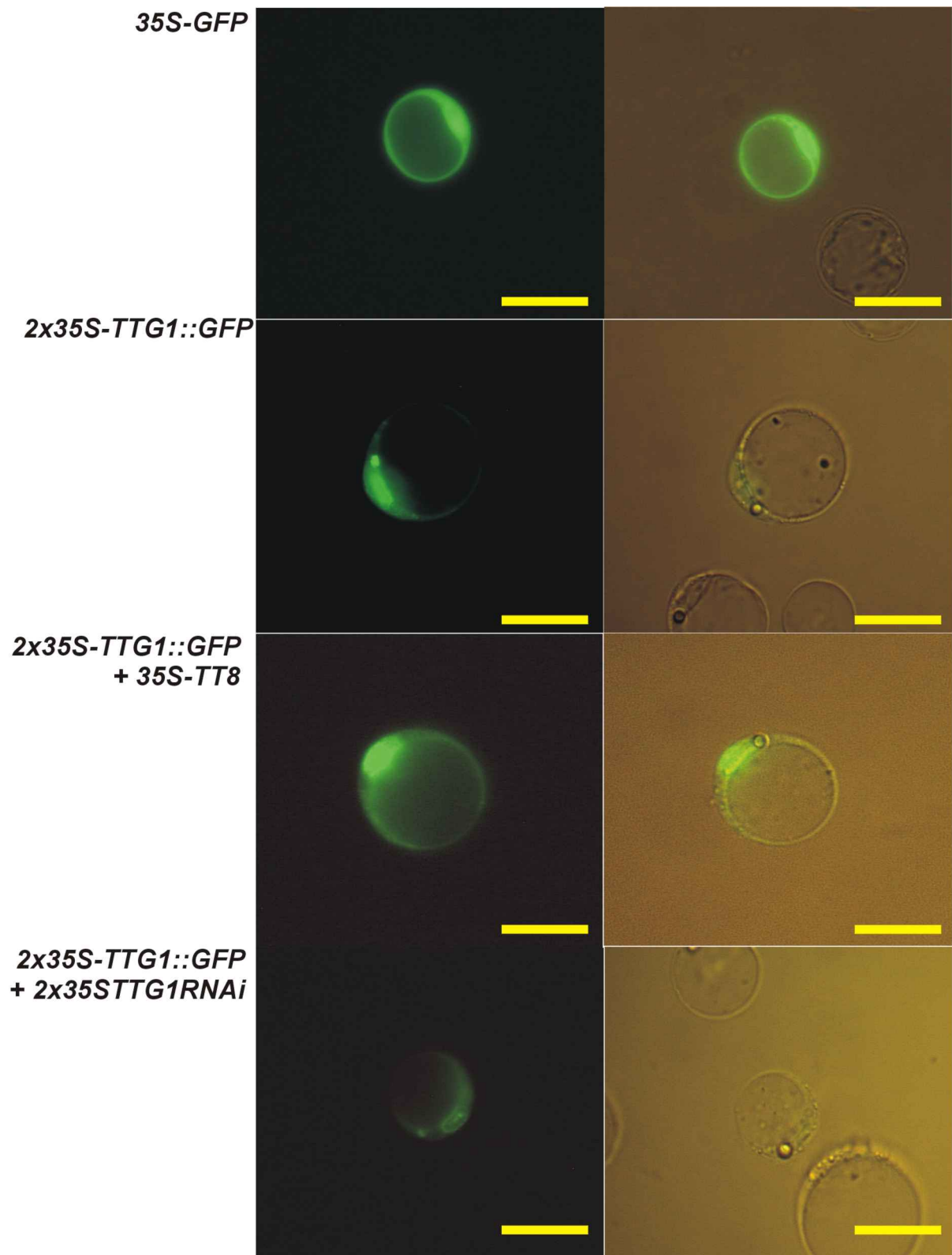


Abb. R26: Lokalisation eines carboxyterminal fusionierten TTG1::GFP Proteins in AT7-Protoplasten. Links sind jeweils die Konstrukte angegeben, mit denen die daneben abgebildeten Protoplasten transfiziert wurden. In der linken Bilderspalte sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen abgebildet, rechts daneben finden sich Überblendungen mit Hellfeldaufnahmen zur genaueren Orientierung. Die Größenbalken (gelb) entsprechen 40 μm.

und in vielen Zellen nach visuellem Eindruck auch eine deutliche reduzierte Fluoreszenzintensität wahrzunehmen (vgl. Abb. R25). Dass in den mit *2x35S-TTG1RNAi* transfizierten Zellen die Zahl der fluoreszenten Zellen vermindert ist, lässt Rückschlüsse auf eine mögliche stabilisierende Funktion des TTG1-Proteins auf TT8 zu. Dabei beweist die mit *2x35S-TTG1RNAi* transfizierte *35S-GFP*-Kontrolle, dass das *TTG1RNAi*-Konstrukt keinen toxischen Effekt auf die AT7-Protoplasten hat, da die absolute Zahl der fluoreszenten Zellen zwischen der *35S-GFP*-Kontrolle mit und ohne *2x35S-TTG1RNAi*-Konstrukt konstant bleibt (vgl. Abb. R27).

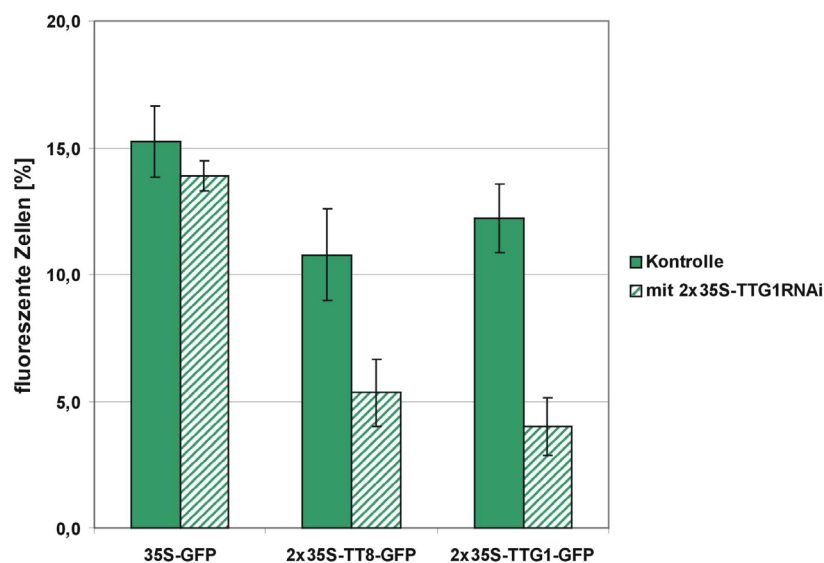


Abb. R27: relativer Anteil fluoreszenter Zellen an der Zahl intakter Protoplasten in den Transfektions-Experimenten mit GFP-fusionierten TTG1- bzw TT8-Proteinen. Gezählt wurden in jeweils drei unabhängigen Ansätzen pro Konstrukt 3x100 intakte Protoplasten und der Anteil fluoreszenter Zellen. Die Graphik stellt somit pro Balken den Mittelwert von 9x100 ausgezählten Zellen dar.

Dagegen ergeben die Lokalisationsstudien mit dem *2x35S-TTG1::GFP*-Konstrukt keine eindeutige Lokalisation für TTG1. Eine Kernfluoreszenz ist zwar deutlich sichtbar, jedoch erscheint die Fluoreszenz ubiquitär. Außerdem sind in Kernnähe deutliche Fluoreszenzmaxima zu erkennen (vgl. Abb. R26), die vesikuläre Struktur haben. Ob es sich bei diesen vesikulären Strukturen möglicherweise um Abbauartefakte des Fusionsproteins handelt oder eventuell um raues Endoplasmatisches Reticulum (rER), dass durch die Protoplastierung der Zellen an Integrität eingebüßt hat und nun vesikulär vorliegt, konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr geklärt werden. Jedoch sollte in Zukunft zur Lokalisation des

Endoplasmatischen Retikulums in den Protoplasten ein ER-spezifischer Farbstoff mit kontrastiertem Spektrum zur GFP-Fluoreszenz verwendet werden, wie sie z.B. von der Fa. Molecular Probes (Leiden, Niederlande) angeboten werden (geeignet wäre z.B. ER-Tracker Blue-White DPX). In den TTG1-GFP-Ansätzen mit kotransfiziertem *TTG1RNAi*-Konstrukt ist wiederum eine deutliche Reduktion der Zahl der fluoreszenten Zellen und der subjektiv empfundenen Fluoreszenzintensität zu verzeichnen, was wieder ein klarer Hinweis auf die Funktionalität der *TTG1RNAi*-Konstruktes ist.

Um zu überprüfen, ob die fusionierten Proteine noch funktionell sind, wurden diese im Vergleich mit den nichtfusionierten Proteinen im Transfektionssystem getestet (vgl. Abb. R28). Dabei zeigte sich, dass das TT8-GFP Protein die gleiche Aktivität auf dem *AtBAN*-Promotor besitzt, wie das nichtfusionierte Protein. Allerdings ist bei Verwendung des *TTG1-GFP*-Fusionskonstruktes keine Aktivierungssteigerung im Vergleich zu der Kombination TT2/TT8 alleine zu sehen. Somit muss das carboxyterminale Fusionsprotein von TTG1 als nicht-funktionell angesehen werden. Vor diesem Hintergrund müssen auch die Lokalisationsstudien mit TTG1::GFP als nicht signifikant betrachtet werden. Daher ist für zukünftige Experimente eine aminoternale Fusion der carboxyterminalen vorzuziehen und erneut auf ihre Funktionalität zu überprüfen.

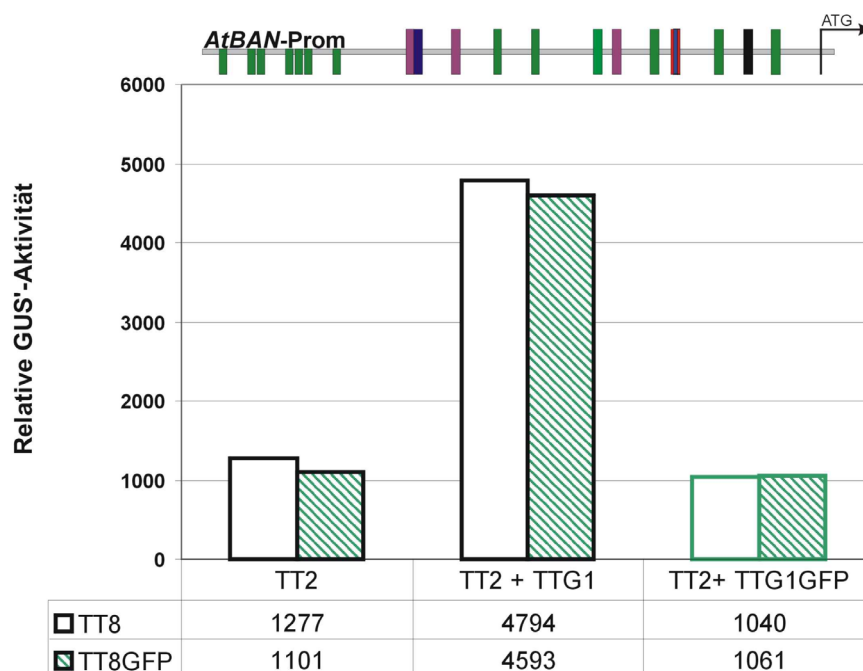


Abb. R28: Überprüfung der Funktionalität der verwendeten GFP-Konstrukte im Transfektionssystem. Verglichen wurden die Fusionskonstrukte mit den regulären, zuvor auf ihr Aktivierungspotential getesteten Überexpressionskonstrukte. Dargestellt ist die Relative GUS'-Aktivität. Die grün schraffierten Säulen repräsentieren die *TT8::GFP* exprimierenden Ansätze, die grün-umrandeten Säulen die *TTG1::GFP* exprimierenden Ansätze.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass TT8-GFP funktionell und klar kernlokalisiert ist. Das nichtfunktionelle, carboxyterminal fusionierte TTG1-GFP scheint ubiquitär lokalisiert. Studien mit einem aminoterminal fusioniertem Protein stehen noch aus. *TTG1RNAi*-Ko-Überexpression führt in beiden Fällen zu einer reduzierten Zahl fluoreszenter Zellen, ist jedoch nicht toxisch, was in kombinierten 35S-GFP-Kontrollen gezeigt werden konnte.

3.9 Bestätigung der Transfektionsergebnisse aus Zellkultur-Protoplasten mit *ttg1-1*-Mesophyll-Protoplasten

Da die Bestätigung der Funktionalität des *TTG1RNAi*-Konstruktes „*in planta*“ noch ausstand, wurden zur Verifikation der Rolle von TTG1 bei der Aktivierung der getesteten Reportergenkonstrukte Kotransfektionsexperimente mit aus Blattmaterial gewonnenen *ttg1-1*-Mesophyll-Protoplasten durchgeführt. Dazu wurden die schon in AT7-Protoplasten getesteten *TT2* und *TT8*-Überexpressionskonstrukte in Mesophyll-Protoplasten der *ttg1-1*-Linie (im Vergleich zu *Landsberg erecta* Zellen) auf die Aktivierungsfähigkeit des *AtBAN*-Promotors getestet. Tatsächlich zeigte die *TT2/TT8* Kombination alleine in *ttg1-1*-Zellen eine deutlich geminderte Aktivierung des *AtBAN*-Promotors im Vergleich zu den Ansätzen in *Landsberg erecta* Zellen (vgl. Abb. R29, nächste Seite). Erst die zusätzliche Überexpression von *TTG1* führte zu einer deutliche Aktivierung des Prom*AtBAN-GUS*-Konstruktes. In Ansätzen mit den Mais-Faktoren *ZmC1* und *ZmSn* war zwar auch eine deutliche Reduktion der Reportergenaktivität ohne *TTG1*-Überexpressionskonstrukt zu verzeichnen, jedoch viel diese wesentlich geringer aus als mit den Arabidopsis-Faktoren.

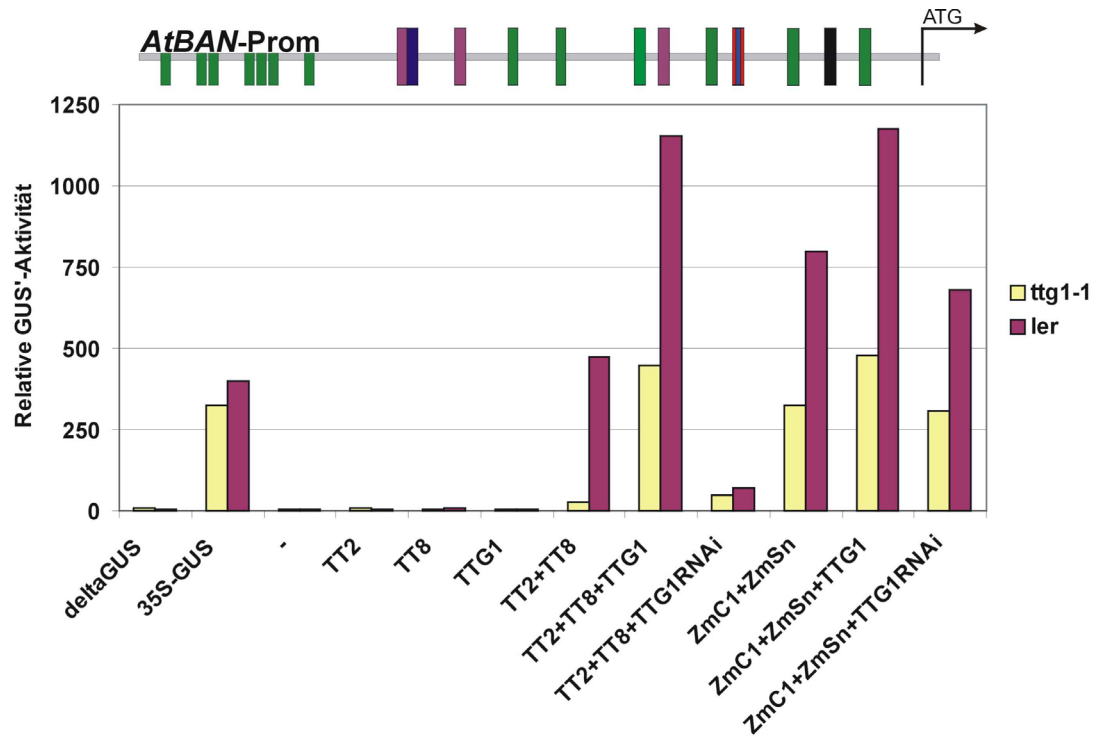


Abb. R29: Verifikation der Rolle von TTG1 bei der Aktivierung des *AtBAN*-Promotors in Mesophyllprotoplasten aus *ttg1-1*-Pflanzen und *Landsberg erecta*-Pflanzen. Dargestellt ist die Relative GUS'-Aktivität. Zur Mesophyllprotoplasten-Präparation wurden Rosettenblätter von 6 Wochen alten Gewächshauspflanzen der Linien *ttg1-1* und *Landsberg erecta* verwendet.

4. Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit, kurz nach Veröffentlichung des Arabidopsis Genoms, waren nur wenige *AtbHLH*-Faktoren beschrieben und nur 62 putative *AtbHLH*-TF annotiert. Für die meisten Genvorhersagen fehlten eindeutige funktionelle Zuordnungen und viele davon waren noch fehlerbehaftet und somit in der Vorhersage nicht als *AtbHLH*-Faktor zu erkennen. Außerdem war die Zahl der vorhergesagten Gene in der ersten Annotation noch deutlich geringer, als die aktuelle Version des Genoms aufweist. Kurz nach Veröffentlichung des Genoms waren bereits 139 putative bHLH-TF im Arabidopsis Genom vorhergesagt worden (Riechmann *et al.*, 2000). Die identifizierten Gene wurden jedoch nicht im Einzelnen beschrieben, so dass dieser Datensatz nicht zu Vergleichen herangezogen werden konnte. Wie viele der dort identifizierten Faktoren dem Konsensus der hier beschriebenen *AtbHLH*-Faktoren entsprechen bleibt daher unklar. Somit bildet die vorliegende Analyse den ersten Ansatz, die Gesamtheit der *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren und die damit verbundenen Sequenzinformationen verfügbar zu machen.

4.1 Die *bHLH*-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Durch die iterative Optimierung des *AtbHLH*-Suchkonsensus und der großen Zahl an mittlerweile verfügbaren cDNA-Sequenzinformationen konnten schließlich 162 Gene im Arabidopsis Genom identifiziert werden, die für bHLH-Faktoren kodieren. Eine Vielzahl an bestehenden Annotationen konnte verbessert und die Faktoren der Familie der *AtbHLH*-Faktoren zugeordnet werden. Damit stellt die Genfamilie der *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren eine der größten Transkriptionsfaktor-Familien in *Arabidopsis thaliana* dar. Zugleich wurde eine strukturelle Einteilung der *AtbHLH* TF in Gruppen vorgenommen, die - mit den eingebundenen Informationen über die bereits beschriebenen *AtbHLH* Transkriptionsfaktoren und vorhandene konservierte Bereiche über die bHLH-Domäne hinaus - funktionelle Vorhersagen für einzelne Gruppen und zu möglichen Redundanzen erleichtert.

Auf rein bioinformatischem Weg konnten zunächst 133 *AtbHLH* Faktoren identifiziert werden. Trotz umfassender weiterer Analysen kamen keine neuen positiven Suchergebnisse hinzu, so dass der Datensatz komplett erschien. Aufgrund

von Neuannotation einiger Gene basierend auf cDNA-Sequenzinformationen konnten in der Folgezeit jedoch noch vereinzelte *AtbHLH*-Faktoren identifiziert werden, die in Ihrer Sequenz von den zuvor identifizierten abwichen, aber dennoch die Klassifikationskriterien als bHLH erfüllten. Dabei waren hauptsächlich Variationen der Schleifen-Länge und der Zusammensetzung der basischen Region zu beobachten. Durch entsprechende Anpassung des Suchkonsensus an die neugefundenen *AtbHLH* und durch Einbeziehung des SESAM-Suchalgorithmus (Seed Extraction Sequence Analysis Method) in der MAtDB, konnte schließlich die Zahl der identifizierten *AtbHLH*-Sequenzen auf 152 erhöht werden. Dabei erwies sich gerade das SESAM-Programm als hilfreich, da es eine einfache und schnelle Identifizierung der nächstähnlichen bHLH-Faktoren zu den neuidentifizierten *AtbHLH* mit abweichenden Konsensus ermöglichte. Aufgrund der stringenten Bedingungen ergaben sich nur sehr wenige falsch-positive Suchergebnisse, die aussortiert werden mussten. Die SESAM-Analyse wurde zusätzlich dazu eingesetzt, mit allen bisher schon identifizierten bHLH, davon viele mit verbesserter Annotation, nach deren nächstähnlichen Faktoren zu suchen und mögliche unidentifiziert gebliebene Gene doch noch aufzufinden. Auch die als falsch-positiv identifizierten Sequenzen wurden so erneut überprüft und gegebenenfalls mit ähnlichen bHLH erneut verglichen. Allerdings konnten dadurch keine weiteren *AtbHLH*-Faktoren mehr identifiziert werden, die dem Suchkonsensus und den Einteilungskriterien dieser Analyse entsprachen.

Vergleicht man mehrere Analysen zu den *AtbHLH* Faktoren, die in den letzten Wochen veröffentlicht wurden, und deren Datensätze miteinander, so treten deutliche Diskrepanzen bezüglich der Zahl der identifizierten bHLH-Faktoren auf. Im Juni 2003 erschien eine Veröffentlichung, die den Versuch unternahm die Gesamtheit der pflanzlichen bHLH-Faktoren phylogenetisch zu untersuchen (Buck *et al.*, 2003). Die Studie beinhaltete neben 131 *Oryza sativa* bHLH Faktoren und 46 bHLH Faktoren aus anderen pflanzlichen Organismen nur 118 *AtbHLH* Sequenzen. Die benutzten bHLH Sequenzen sind als WWW-Veröffentlichung unter <http://coltrane.gnets.ncsu.edu/plants/> verfügbar. Vergleiche dieses Datensatzes mit dem der nun vorliegenden Arbeit ergaben eine Übereinstimmung in 116 Sequenzen. Während 46 der hier präsentierten *AtbHLH*-Sequenzen in der Studie von Buck und Atchley noch keine Berücksichtigung fanden, enthielt diese auch zwei Sequenzen, die nicht in die hier vorliegende Analyse miteinbezogen wurden (At1g49830 bzw.

At5g33210). Diese beiden Gene kodieren nach den Klassifikationskriterien dieser Studie nicht für *AtbHLH*-Faktoren und wurden deshalb im Laufe der Sequenzuntersuchungen verworfen. Auf die phylogentische Einteilung und die Korrelation mit den in dieser Arbeit aufgestellten strukturbezogenen Gruppen wird in Kapitel 4.2 der Diskussion näher eingegangen. Die *TCP*-Gene wurden, wie in dieser Studie auch, von der Analyse ausgeschlossen, da sie neben der Homologie in ihrer Sekundärstruktur keine Sequenzhomologie zu den untersuchten *AtbHLH*-Faktoren aufweisen.

Durch die Berücksichtigung neuer cDNA-Annotationen und Verbesserungen bestehender Annotationen war die Zahl der identifizierten *AtbHLH*-Faktoren auf 152 angewachsen als im August 2003 eine weitere Analyse zu den *AtbHLH*-Faktoren veröffentlicht wurde (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Die Autoren beschreiben in ihrer Analyse 147 *AtbHLH* Faktoren, bei deren genaueren Betrachtung und in Sequenzvergleichen jedoch zahlreiche Fehler ermittelt wurden. Dadurch reduziert sich die Zahl der dort präsentierten Sequenzen auf 144 und andere von ihnen verworfene *AtbHLH* unserer im Mai publizierten Analyse als *AtbHLH*s bestätigen sich als *AtbHLH*-Faktoren. Allerdings fanden sich in der Analyse auch 5 *AtbHLH*-Sequenzen, die zuvor im Rahmen dieser Studie trotz intensiver Suche nicht identifiziert werden konnten und die Gesamtzahl auf 157 *AtbHLH*s erhöhten. Ein durch diese zusätzlichen Faktoren optimierter Suchkonsensus erbrachte in weiteren Sequenzanalysen auf der genomischen DNA-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* keine weiteren bHLH Faktoren mehr. Jedoch konnten noch fünf weitere *AtbHLH*-Faktoren identifiziert werden, die aufgrund eines Reannotationsprojektes als Bestandteil der NCBI-RefSeq-Projektes als bHLH-Faktoren neu annotiert wurden. Diese in sämtlichen bioinformatischen Ansätzen nicht aufgefunden Gene konnten erst durch eine Volltextsuche unter NCBI in den annotierten Proteineinträgen und einem Vergleich mit der bei TIGR (The Institute for Genomic Research) verfügbaren Gesamtliste aller bis dahin als bHLH-Faktoren annotierter Genvorhersagen (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) identifiziert werden. Insgesamt finden sich bei TIGR 130 als bHLH-Faktoren annotierte Genvorhersagen, die nach Überprüfung und Erweiterung um die 5 erwähnten Einträge alle Bestandteil der vorliegenden Analyse sind (Es gibt deutlich mehr Einträge in der Liste, allerdings sind aufgrund von Mehrfachannotationen einige Sequenzen dort doppelt aufgeführt).

Unter <http://arabidopsis.org/info/genefamily/genefamily.html> bei TAIR (The Arabidopsis Information Resource) findet sich eine Datenbank, die auf externe Annotationen zu Genfamilien zurückgreift. Die *AtbHLH*-TF sind dort bisher noch nicht mit einem eigenen Eintrag aufgeführt, jedoch sind alle *AtbHLH*-Faktoren, die in der Annotations-Datenbank vorhanden sind, egal ob durch Volltextsuche in der Annotationsbeschreibung oder durch Sequenzvergleiche identifiziert, in diese Analyse miteingeflossen. Bei einer Volltextsuche nach „bHLH“ unter den Annotationsbeschreibungen ergeben sich 140 Einträge, die wie bei TIGR Mehrfachannotationen enthalten und schließlich in 127 Faktoren resultieren.

Bei AGRIS (The Ohio State University *Arabidopsis* *Gene* *Regulatory* *Information* *Server*) befanden sich bei Abgabe dieser Arbeit in der “*Arabidopsis thaliana* transcription factor database” (AtTFDB; <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/index.jsp>) 133 Einträge, die den in Heim *et al.* 2003 veröffentlichten *AtbHLH*s entsprechen und somit keine Quelle für weitere, möglicherweise im Laufe dieser Arbeit unidentifiziert gebliebene *AtbHLH*-Faktoren darstellt.

Aufgrund der Vergleiche mit den oben genannten Publikationen und Datenbanken kann darauf geschlossen werden, dass mit den hier angewandten Methoden keine weiteren *AtbHLH*-Transkriptionsfaktor mehr identifiziert werden können, sofern diese überhaupt noch in den vorhandenen Sequenzinformationen unidentifiziert geblieben sind. Als Resultat der kontinuierlichen Optimierung der Annotation ist eine Veröffentlichung einer umfassenden Liste aller 162 *AtbHLH*-Faktoren in Vorbereitung, die die bereits publizierten (und teilweise fehlerbehafteten) Listen ergänzen soll und die Ergebnisse dieser Analyse zusammenfasst (Brief an den Editor von *Plant Cell*, eingereicht im August 2003). Die Ursachen, die zu den beobachteten Diskrepanzen in den beiden Analysen geführt haben, werden im Folgenden noch näher diskutiert.

Der Hauptunterschied in den beiden Analysen besteht in den unterschiedlichen verwendeten Datenbanken. So waren verbesserte oder neue Annotationen bestimmter Gene (z.B. *AtbHLH084*, *AtbHLH125*, *AtbHLH127*) zwar schon in der MatDB bei MIPS miteingearbeitet, waren jedoch nicht in den Annotationsdatenbanken unter TIGR und TAIR verfügbar. Dies führte dazu, dass verschiedene *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren, die in Heim *et al.*, (2003) identifiziert wurden, nicht als bHLH-Faktoren durch Toledo-Ortiz bestätigt werden konnten, da

diese auf die alte Annotation zurückgriffen. Dies beleuchtet auch, wie wichtig es bei der Annotation von Genfamilien ist, nicht nur auf die Such-Algorithmen und Genvorhersageprogramme zu vertrauen, sondern die bestehenden Genvorhersagen kritisch zu betrachten. Dabei ist es nötig, die Genvorhersage potentieller Kandidatengene auf Ebene der unterschiedlichen Leserahmen des ORF zu überprüfen und soweit nötig zu verbessern. Genvorhersage-Programme, die mit Wahrscheinlichkeiten für Spleißstellen und Intronlängen arbeiten, versagen bei der Detektion sehr kurzer Introns (vgl. Neuannotation zu *AtbHLH160* anhand *AtbHLH038*, *039*, *100* und *101*). Natürlich ist diese Annotation per Hand nicht für alle 30000 oder mehr Gene im *Arabidopsis thaliana* Genom und auch nur dann möglich, wenn bereits cDNA Sequenzen sequenzähnlicher Gene vorliegen, jedoch hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass dies der einzige Weg war, bestimmte *AtbHLH*-Faktoren zu identifizieren. Dies zeigt auch, wie wichtig es für den Fortschritt der Forschung ist, dass neue und verbesserte Annotationen, sowie sequenzierte cDNAs und Proteinsequenzinformationen veröffentlicht und somit für weitere Analysen verfügbar gemacht werden, auch wenn schon primäre Annotationen zu den Genen vorhanden sind. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass Doppeleinträge auch zu Fehlern führen können. So tauchen bei Toledo-Ortiz innerhalb der 147 beschriebenen Gene Doppeleinträge auf, die aus zwei unterschiedlichen GenBank-Akzessionen zu dem selben Gen, aber von unterschiedlichen BACs herrührten (z.B. *AtbHLH75* und der dort als *AtbHLH136* publizierte Eintrag, der mittlerweile in dieser Arbeit durch einen neuentdeckten *AtbHLH* „aufgefüllt“ wurde). Als Bezugsquelle für alle Annotationen sollten daher auch nicht die Pseudochromosomen-Positionen, sondern die AGI-Gencodes Verwendung finden. Weil mögliche Korrekturen in einzelnen BAC-Sequenzen ganze Bereiche in ihrer Lage verschieben können, ist die Lokalisation auf den Pseudochromosomen ein unzuverlässiges Identifikationsmerkmal.

Eine weitere Fehlerquelle sind Tandem-Duplikationen, die wie bei *AtbHLH119* und *AtbHLH127* dazu führen, dass Genvorhersageprogramme bei direkt benachbarter genomischer Lokalisation oft versagen. Auf die direkt benachbarte Lokalisation ist auch bei der Suche mit dem blast-Algorithmus zu achten, dessen Resultate sonst vom Experimentator falsch interpretiert werden können, und so eng beieinander liegende, duplizierte Gene einfach „übersehen“ werden (vgl. auch *AtbHLH091* und *138*).

Eine ganz entscheidende Fehlerquelle ist der Umstand, dass in allen großen Annotationsprojekten enorm große Datenmengen zu handhaben sind. Meistens arbeiten nicht nur ein oder zwei Experimentatoren an einer Genfamilie, sondern mehrere, oft sogar räumlich getrennt. Dies macht es nötig die bearbeiteten Daten und Sequenzinformationen aufeinander abzustimmen. Am geeignetsten dazu erscheint die Verwendung einer gemeinsamen, von allen Mitarbeitern editierbaren Datenbank. Die Bearbeitung eines einzigen Datensatzes, der alle relevanten Informationen enthält und regelmäßig aktualisiert wird, ist der größte Schutz vor redundanter Arbeit und dem Verlust von Daten. Wenn allen Beteiligten die gleichen Daten zur Bearbeitung zur Verfügung stehen, kann viel Zeit gespart und können Fehler vermieden werden.

Es bleibt anzumerken, dass es trotz umfassender Suche und anhaltender Optimierung der Suchkriterien und Methoden auf bioinformatischem Wege nicht gelungen ist, mit Suchalgorithmen wie TblastN, psiblast und blastP alle *AtbHLH*-Faktoren zu identifizieren. Das muss nicht notwendigerweise am Aufbau der Suchprogramme oder der Suchmatrizen selbst liegen. Allerdings muss bei jeder Suchmatrix nach individuellen Kriterien vorgegangen werden, so dass die Suchprogramme oft nicht die dafür notwendige Flexibilität aufweisen. Dies zeigt sich u.a. auch an der variablen Länge der Schleifen-Struktur der bHLH-Domäne, die trotz niedriger „gap-penalty“ zunächst zahlreiche *AtbHLH* kodierenden Gene unidentifiziert ließ. Umso wichtiger ist es, die Ergebnisse solcher sequenzbasierten Suchen sorgfältig zu analysieren und nicht nur einfach nach einem bestimmten Sequenzidentitätsfaktor mit ja/nein-Aussage zu sortieren.

Als Resultat kann jedoch festgehalten werden, dass die *AtbHLH*-Transkriptionsfaktor-Familie im Rahmen der angewandten Methoden als umfassend beschrieben bewertet werden kann, was die Identifikation aller zugehörigen Gene im Arabidopsis Genom anbelangt. Sofern die Verbesserung der genomischen Sequenz durch die Annotation fehlender Bereiche nicht noch zusätzliche bHLH-Faktoren beinhaltende Sequenzinformationen bringt, repräsentieren die 162 hier gezeigten *AtbHLH*-Faktoren die Gesamtheit aller bHLH-Faktoren im Genom von *Arabidopsis thaliana* (vgl. Tab. R1).

4.2 Strukturelle Verwandtschaft der AtbHLH untereinander

4.2.1 Die AtbHLH-Konsensus-Sequenz

Wie bereits dargelegt wurde war der verwendete AtbHLH-Konsensus während der Suche zahlreichen Veränderungen unterworfen. Deshalb soll hier kurz zusammengefasst werden, welche Reste für die Einteilung als AtbHLH-Transkriptionsfaktor entscheidend sind. Der allgemeine Suchkonsensus ergibt sich aus den in Abb. R3 dargestellten Prozentwerten, wobei die Länge der Schleifenstruktur variabel gewählt werden sollte. Da die basische Region nicht notwendigerweise konserviert sein muss, um als AtbHLH-Heterodimerisationspartner oder AtMYB-Interaktionspartner Einfluss auf die Transkriptionsregulation nehmen zu können, sind die Bedingungen hier nicht zu stringent zu setzen und Fehlpaarungen zuzulassen. Zumal der allgemeine Suchkonsensus die Mehrheit der AtbHLH-Faktoren repräsentiert, die in der basischen Region eine entsprechende Konservierung aufweisen. Im folgenden Konsensus sind alle unbedingt einzuhaltenden AS-Reste fett gedruckt, die variablen AS-Reste durch X gekennzeichnet (keine AS zu mehr als 25% konserviert), Großbuchstaben geben einen Konservierungsgrad von über 25% an, Kapitälchen Konservierungsgrade unter 25%. Zur Demarkation der basischen Region, der beiden Helices und der Schleifenstruktur sind die Buchstaben unterschiedlich unterstrichen: [AKE]-[TKAR]-X₂-H-[SN]-[LEI]-[AS]-E-[RK]-X-[RK]₂-[ED]-[KR]-[ILMV]-[NS]-[ED]-[RK]-[LFMIV]-[KR]-X-L-[QR]-[SEDQ]-[LIVM]-[VLIM]-**P**-[NGP]-[CGS]-[TNSX]-X_{1,6}-K-[KR]-[TM]-[DSG]-[KT]-[AS]-S-[MIVL]-**L**VIFM-[DGE]-[ED]-[AITV]-[IVAL]-X-Y-[IVLM]-[KQ]-X-[LMVA]-[QK]-X-[QKE]-[VILA]-[KQE]-X-[LM].

Auffällig ist der hochkonservierte Rest 23 (100% Leu) in der Helix 1, der verglichen mit den Röntgenstrukturanalysen tierischer bHLH eine entscheidende stabilisierende Rolle bei der DNA-Bindung auf das bHLH-Dimer hat. Die Position des 23Leu-Restes liegt am oberen Ende, des durch basische Region und Helix 1 aufgebauten helikalen Bereiches. Das Leu23 „fixiert“ somit den bHLH-Dimer-Komplex in diesem Bereich, der ansonsten nur durch die Interaktion der beiden Helices 2 stabilisiert wird. Die Helix 1 wird durch ein Prolin beendet, dass entweder an Position 28 oder auch 29 liegen kann. In der Helix 2 ist der AS-Rest an Position 54/47 ein entscheidendes Einteilungskriterium, der bei allen identifizierten

AtbHLH hydrophob ist. Bei allen *AtbHLH*-Proteinen finden sich im Anschluss an die Helix 2 alternierende hydrophobe AS-Reste im Abstand von 3, 4 bzw. 7 Aminosäuren, die jedoch nur in wenigen Fällen ein echtes Leuzin-Zipper-Motiv darstellen (Subgruppen IVb/c). Aufgrund der geringen Konservierung sollten diese AS-Reste aber nicht als Einteilungskriterium dafür verwendet werden, ob es sich um einen bHLH-Faktor handelt oder nicht. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bei einer Erhaltung der helikalen Struktur über den Rest 71/64 hinaus das Auftreten alternierender hydrophober Reste möglicherweise die Interaktionsfläche zur Dimer-Bildung vergrößern und somit dem Komplex zusätzliche Stabilität verleihen kann. Das Auftreten konservierter basischer AS-Reste am Ende der Schleifenstruktur könnte die These einer möglichen Beteiligung an der DNA-Bindung durch die Schleifenstruktur untermauern (vgl. Atchley und Fitch, 1997), jedoch ist hier zu beachten, dass dies aufgrund der relativ kurzen Schleifenstruktur (max. 14 Aminosäuren) als eher unwahrscheinlich erscheint.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit besteht darin, alle identifizierten *AtbHLH*-Faktoren aufgrund von Sequenzhomologien auf Proteinebene in strukturelle Gruppen zu unterteilen. Dabei sollen die strukturelle Ähnlichkeit der bHLH-Domänen und das Vorhandensein von konservierten Sequenzmotiven außerhalb der bHLH-Domäne Rückschlüsse auf die Funktion der *AtbHLH*-Faktoren und mögliche Redundanzen innerhalb der strukturellen Gruppen liefern.

4.2.2 Die strukturelle Einteilung der *AtbHLH*-Faktoren korreliert mit der Phylogenie pflanzlicher bHLH-Proteine

Die vorliegende Analyse unterteilt die *AtbHLH*-Faktoren in 14 Gruppen. Die auf einer „bootstrapped neighbour joining tree“-Analyse beruhende Einteilung wird durch die Korrelation der einzelnen Gruppen in Exon/Intron-Struktur, DNA-Bindekonsensus (5-9-13-Motiv), das Auftreten konservierter Proteinmotive außerhalb der bHLH-Domäne und vorhandene Funktionsinformationen unterstützt und bestätigt. Es handelt sich dabei aber in erster Linie um ein strukturell basiertes „Clustering“, dass keine phylogenetische Aussage treffen soll. Deshalb wurde auch auf die Darstellung der Ergebnisse aus Tab.1 als Baum verzichtet. Eine phylogenetische Einteilung ausschließlich anhand der identifizierten *Arabidopsis* Sequenzen wäre wenig sinnvoll gewesen, da für einen vernünftigen phylogenetischen Analysesansatz zumindest der vollständige Datensatz eines weiteren pflanzlichen Organismus

vorliegen sollte, sowie zusätzliche Sequenzinformationen aus weiteren pflanzlichen und tierischen Organismen mit in die Analyse einfließen sollten.

Interessanterweise korreliert die hier vorgenommene Einteilung in strukturelle Gruppen (vgl. Tab.1) mit einer neu publizierten phylogenetischen Einteilung aller pflanzlichen bHLH-Faktoren in 15 phyletische Gruppen (+14 „Außengruppen“; Buck und Atchley, 2003) weitestgehend, wobei nicht jeder strukturelle Cluster exakt einer der phylogenetischen Gruppen von Buck und Atchley entspricht. Teilweise wird aufgrund homologer Sequenzbereiche über die Domäne hinaus im strukturellen Clustering nur in Subgruppen unterteilt, während Buck und Atchley in eigene phyletische Stämme unterteilen. Allerdings fallen die in einzelne phylogenetische Gruppen unterteilten *AtbHLH*-Faktoren immer in jeweils die gleiche Gruppe im strukturellen „Clustering“ der Tab.1, so dass die strukturelle Gruppeneinteilung als konsistent angesehen werden kann. Ein Großteil der 118 phylogenetisch untersuchten *AtbHLH*-Faktoren wurde keinem phyletischen Stamm zugewiesen, da diese zum einen nicht in bestehende Gruppen einzuordnen waren (bootstrap-Wert < 75%) oder die eigene Gruppe zu klein war (weniger als 4 Mitglieder unterschiedlicher Organismen oder nicht mehr als sechs Mitglieder aus *Arabidopsis thaliana*). Darunter fallen auch die von uns als Nicht-bHLH angesehenen Gene At1g49830 und At5g33210, die in unseren Analysen mit keinem der „echten“ *AtbHLH*-Faktoren clusterten. Die verbleibenden Gene ohne eigenem phyletischen Stamm bilden 14 „Außengruppen“, die möglicherweise eigene phyletische Stämme darstellen könnten (Buck und Atchley, 2003). Ergänzt man die Buck/Atchley-Analyse um die noch nicht berücksichtigten 44 Gene, könnten somit weitere 14 phyletische Stämme nach den dort angelegten, stringenten Kriterien hinzukommen. Somit zeigt sich eine mögliche Gesamtzahl von 29 phyletischen bHLH-Stämmen im Pflanzenreich, die mit den in dieser Analyse aufgestellten 27 Subgruppen (enthalten in 14 strukturellen Gruppen, vgl. Tab.1) eng korrelieren. Im Vergleich wäre daher eine phylogenetische Studie interessant, die alle 162 *AtbHLH*-Proteinsequenzen beinhaltet. Die phylogenetische Bestätigung des strukturellen Clusterings ist somit zusätzliche Evidenz, dass die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede einzelner Gruppen, Rückschlüsse auf gemeinsame Funktion und mögliche Redundanzen zulassen können. Wie aufgrund der starken Sequenzkonservierung zu erwarten war, fallen bei Buck und Atchley (2003) die *ZmSn*-ähnlichen Faktoren der Gruppe III_f ebenfalls in eine gemeinsame phylogenetische Gruppe (aufgrund der

Homologie zu den R-Faktoren aus Mais als R-Gruppe bezeichnet). Wie später noch diskutiert werden wird, ist trotz der Beteiligung dieser *AtbHLH*-Faktoren an unterschiedlichen Prozessen für diese auch eine funktionelle Redundanz nachzuweisen.

Die auch auf einer „bootstrapped neighbour joining tree“-Analyse basierende Einteilung der *AtbHLH* in Toledo-Ortiz *et al.*, 2003, korreliert ebenfalls mit der hier vorliegenden strukturellen Einteilung aus Tab.1. Kleinere Abweichungen in der strukturellen Einteilung ergeben sich nur aus Sequenzabweichungen innerhalb der verwendeten, teilweise unterschiedlichen Annotationen und der freien Drehbarkeit einzelner Baum-Arme des berechneten „Stammbaums“. Das dort als Einteilungskriterium verwendete Intron-Muster innerhalb des für die bHLH-Domänen kodierenden DNA-Sequenzbereichs stellt ein sinnvolles Demarkationskriterium für die einzelnen Gruppen und Subgruppen dar, das genauso wie DNA-Bindemotiv, Gesamtintronzahl und Position der bHLH Domäne mit der Proteinsequenzhomologie der bHLH-Domäne korreliert.

4.2.3 Nicht alle *AtbHLH* können an E-Box-Motive binden

Bezüglich des DNA-Bindemotivs (5-9-13-Konsensus) findet sich innerhalb der strukturellen Gruppeneinteilung eine durchgängige Konsistenz. Die meisten der beschriebenen *AtbHLH*-Faktoren weisen einen H-E-R-Konsensus auf (83 aus 9 Gruppen, vgl. Tab.1). Bei der sequenzspezifischen Wahrnehmung der DNA bildet das Glutamat an Position 9 mehrere Bindungen zu Basen der DNA aus und spielt eine essentielle Rolle bei der Bindung von bHLH-Proteinen an E-Box-Motive (CANNTG; Bacsı und Hankinson; 1996). Insgesamt haben 115 *AtbHLH*-Faktoren in 11 Gruppen (=70%) ein Glutamat an Position 9. Nur in den Gruppen VIII, X und XIV finden sich keine Proteine mit einem Glutamat an dieser Position. Der Wechsel zu Alanin (vgl. Gr.XIII) führt zumindest bei Säuger-bHLH zu einem Verlust der Bindefähigkeit (vgl. Bacsı und Hankinson, 1996). Somit muss für Vertreter der Gruppen VIII (Q-A-R), X ([SLPHQA]-[FSLKAP]-[KDE]) und XIV (variabel) erst noch gezeigt werden, ob sie überhaupt an DNA und wenn ja an welche Motive binden können. Zumindest bei den Gruppen X und XIV scheint es sich um putative Repressoren zu handeln, die über Heterodimerisation mit anderen *AtbHLH* deren DNA-Bindung verhindern oder stören. Die basische Region in diesen Proteinen ist

kaum konserviert, hat fast keine basischen Reste und aufgrund zahlreicher Proline auch keine helikale Struktur, wobei die Dimerisierungsdomäne gleichzeitig einen hohen Konservierungsgrad aufweist.

Die *AtbHLH*-Proteine in den Gruppen II, IVb/c und IX dagegen weichen in ihrem 5-9-13-Konsensus nur an Position 5 vom konservierten Histidin des H-E-R-Motivs ab. Inwiefern die Veränderungen des Bindekonsensus an Position 5 zu Threonin, Isoleuzin, Prolin (Gr.II), Glutamin (Gr.VIII) oder Glycin (Gr.XIII) Auswirkungen auf die DNA-Bindefähigkeit haben, bleibt für die pflanzlichen bHLH-Faktoren ungeklärt. Das Prolin an Position 5 in der bHLH-Domäne von *AtbHLH091* könnte aufgrund der strukturverändernden Eigenschaft eine DNA-Bindung verhindern. Dagegen ist für die konservative Abweichung zu Arginin (Gr.IX) oder Lysin (Gr. IVb/c) an Position 5 des Bindekonsensus keine Auswirkungen auf die generelle DNA-Bindefähigkeit zu erwarten, so dass Vertreter beider Gruppen an E-Box-Elemente binden können sollten. Ob die Abweichung zu einem Wechsel der Bindepräferenz führt muss in Zukunft näher untersucht werden.

Die Veränderung zu Lysin an Position 5 (Gr.IVb/c) scheint zumindest keinen Einfluss auf die Aktivierungsfähigkeit haben, wenn man die Ergebnisse der Transfektionsexperimente zu den Vertretern der Subgruppe IVc betrachtet, die sogar ohne R2R3MYB-Interaktionspartner zu einer Aktivierung der getesteten Promotorkonstrukte führen. Für diese auch nicht durch Ko-Überexpression von *MYB*-Faktorgen beeinflussbare Aktivierung könnte somit zum einen ein verändertes Bindeverhalten aufgrund des veränderten 5-9-13-Konsensus verantwortlich sein. Zum anderen besitzen diese Faktoren auch ein zusätzliches Leuzin-Zipper-Motiv, das weitere Interaktionen mit anderen Proteinen zulässt und möglicherweise zu einer zusätzlichen Stabilisierung des DNA-bindenden Komplexes führt. Darauf wird jedoch im Folgenden noch näher eingegangen werden (vgl. 4.3). Für alle diese Hypothesen zum Bindeverhalten der beschriebenen *AtbHLH*-Proteine muss jedoch der experimentelle Nachweis in Hefe-1-Hybrid-Analysen, Pull-down-assays oder Gel-Shift-Experimenten noch erbracht werden.

Festzuhalten bleibt hier, dass außer den getesteten *AtbHLH*-ZIP Faktoren (Gr.IVb/c mit K-E-R-Konsensus) und den *AtbHLH* der Subgruppen IIIf (mit H-E-R-Konsensus) keiner der getesteten *AtbHLH*-Faktoren eines der getesteten Promotorkonstrukte aktivieren konnte - weder alleine noch mit einem MYB-Interaktionspartner. Während die beiden getesteten *AtDFR* und *AtBAN*-

Promotorkonstrukte jeweils konservierte G-Box-Motive (CACGTG) enthalten, bildet das im *AtCHS*min-Promotorkonstrukt zu findende RRE einen anderen Typ der E-Box (CATCTG). Somit scheinen die beiden zentralen Basen bei den Arabidopsis bHLH-Faktoren keine Auswirkung auf das generelle Aktivierungsvermögen von *AtbHLH*-Proteinen mit [HK]-E-R-Konsensus auf Promotoren mit E-Box-Elementen zu haben. Ob es Unterschiede in der Bindungsstärke an das Promotorelement gibt, lässt sich durch die Experimente im Transfektionssystem nicht bestimmen. Der Umstand, dass das *AtbHLH*-ZIP-Protein *AtbHLH115* den *AtCHS*min-Promotor (mit CATCTG) und den *AtDFR*-Promotor (mit CACGTG) aktivieren kann, nicht aber den *AtBAN*-Promotor (ebenfalls mit CACGTG), zeigt jedoch auch deutlich, dass außer dem 5-9-13-Motiv und dem Vorhandensein entsprechender Bindekonsensi im Promotor auch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen, wie z.B. koaktivierende Interaktionspartner oder Repressoren, sowie die Lage des RRE im Promotor. Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die *AtbHLH*-Faktoren auf synergistische Effekte mit Faktoren anderer Proteinfamilien (R2R3-Myb und WD40-Proteinen) untersucht.

4.2.4 Die strukturellen *AtbHLH*-Cluster zeigen funktionelle Korrelation

Bisher sind erst wenige *AtbHLH*-Proteine funktionell beschrieben worden, doch bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass diese Funktionen mit strukturellen Eigenschaften der bHLH-Domäne korrelieren und funktionelle Cluster bilden. Alle der bisher 20 funktionell beschriebenen *AtbHLH*-TF clustern in drei der 14 hier beschriebenen Gruppen – und zwar in den Gruppen III, VII und XII, wobei es klare funktionelle Zusammenhänge in den einzelnen Subgruppen gibt, die teilweise ihren Ursprung in Duplikationsvorgängen während der Evolution des *A. thaliana* Genoms haben.

Während die bisher beschriebenen Faktoren der Subgruppe VIIa alle in Bezug zur Lichtrezeption und Tagesrhythmik stehen (z.B. *AtbHLH008/PIF3*, *AtbHLH009/PIF4*, *AtbHLH0026/HFR1*, *AtbHLH065/PIL6*, *AtbHLH124/PIL1*), werden die beiden Faktoren der Subgruppe VIIb mit der Fruchtentwicklung und der Fruchtreifung in Verbindung gebracht (*AtbHLH024/SPATULA*; *AtbHLH073/ALCATRAZ*). Aus Gruppe XII sind bisher drei redundante Faktoren,

AtbHLH044/BEE1, *AtbHLH050/BEE3* und *AtbHLH058/BEE2*, bekannt, die im frühen Brassinosteroidweg involviert sind (Friedrichsen *et al.*, 2002).

Funktionell diverser sieht auf den ersten Blick die große Gruppe III der *AtbHLH*-Faktoren aus. Unter den 26 Mitgliedern dieser Gruppe finden sich bei 8 funktionell beschriebenen *AtbHLH* verschiedene Funktionen, die von der Pollenentwicklung (*AtbHLH021/AMS*), über Kältetoleranz (*AtbHLH116/ICE*) und Aminosäuresynthese (*AtbHLH005/ATR2*) bis hin zur Trichom- und Wurzelhaarentwicklung (*AtbHLH001/GL3* bzw. *AtbHLH002/EGL1*) und Flavonoidbiosynthese reichen (*AtbHLH042/TT8*). Jedoch zeigen sich auch hier funktionelle Cluster, die, wie die im Rahmen dieser Analyse durchgeführten Transfektionsanalysen und kürzlich veröffentlichten „*in planta*“ Daten (Zhang *et al.*, 2003) zu den *AtbHLH* der Subgruppe IIIc zeigen, funktionelle Redundanzen aufweisen. So können im Transfektionssystem sowohl *AtbHLH001/GL3*, *AtbHLH002/EGL1* (*EGL3*), *AtbHLH012/ATMYC1* und *AtbHLH042/TT8* die getesteten Promotorkonstrukte aktivieren, auch wenn ihre zunächst beschriebenen primären „*in vivo*“-Funktionen wie bei *GL3* und *EGL1* nicht in die Flavonoidbiosynthese fallen. Es kommt zwar zu deutlichen Unterschieden zwischen den *AtbHLH*, was die relative Aktivierungstärke und den am stärksten synergistisch wirkenden Interaktionspartner anbelangt, aber die generelle Aktivierungsfähigkeit bleibt dadurch unbeeinflusst. Dabei zeigt *AtbHLH012/ATMYC1* das deutlich schwächste Aktivierungspotential, was aber damit zu erklären ist, dass der Faktor eine nur eingeschränkt konservierte basische Region aufweist, die zu einem veränderten Bindevverhalten führen sollte (L-D-R statt H-E-R im 5-9-13-Konsensus). Ob der Faktor überhaupt eine „*in vivo*“ Funktion hat bleibt dabei unklar, da zumindest in 2 unterschiedlichen T-DNA-Insertionslinien (SALK), die für das Gen beim NASC (Nottingham Arabidopsis thaliana Stock Centre) verfügbar sind, keinen sichtbaren Phänotyp aufwiesen. Hier könnten jedoch durch vergleichende Expressionsstudien und HPLC unterstütztem „metabolic profiling“ weitere Einsichten gewonnen werden.

Die funktionelle Redundanz der drei anderen Faktoren der Subgruppe IIIf konnte kürzlich „*in planta*“ gezeigt werden, wobei die beteiligten Regulationsmechanismen von *TTG1* abhängen (Zhang *et al.*, 2003). Da die *gl3*-Mutante nur eine verringerte Trichomdichte, nicht jedoch einen völlig kahlen Phänotyp aufweist, blieb bisher zu vermuten, dass es gewisse Redundanzen mit z.B. *AtbHLH/EGL1* (*EGL3*) geben muss. Den Autoren gelang es zu zeigen, dass

eine Doppelmutante *gl3/egl3* eben diesen völlig trichomlosen Phänotyp aufweist und darüber hinaus noch eine Reihe pleiotroper Effekte zeigt, die denen der *ttg1*-Mutante gleichen. So weisen 5 Tage alte Sämlinge der Doppelmutante u.a. klare Defekte der Anthocyan-Biosynthese in den Hypokotylen und Kotyledonen auf. Außerdem produzieren die Doppelmutanten deutlich weniger von der die Samenschale bedeckenden Polysaccharidschleimschicht (seed coat mucilage). Allerdings sind beide Defekte (reduzierte Anthocyanbiosynthese und „seed coat mucilage“-Produktion) auch in der *egl3* Einzelmutante zu finden. Außerdem zeigt sich in der Doppelmutante ein Defekt in der positionsabhängigen Wurzelhaarentwicklung, was ebenso wie in der *ttg1* Mutante (Lee und Schiefelbein, 1999) dazu führt, dass die Trichoblasten (Wurzelhaare) nicht mehr in einzelnen Epidermiszellreihen gebildet werden und die Wurzelhaarabstände variabel und unregelmäßig sind.

Bei allen zu beobachtenden Übereinstimmungen zum *ttg1*-Phänotyp ist jedoch bei keiner der drei Mutanten, *gl3*, *egl3* und *gl3/egl3*, eine gelbliche Samenfarbe zu beobachten, wie sie bei den *transparent testa* Mutanten (u.a. *tt8*) auftritt. Dagegen ist der Dreifachknockout *gl3/egl1/tt8* die zu erwartende genaue Phänokopie des *ttg1*-Phänotyps. Dies verwundert jedoch wenig, denn selbst wenn *AtbHLH002/EGL1* (*EGL3*) und *AtbHLH001/GL3* ausschließlich für die Regulation der Anthocyan-Biosynthese und der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung sowie der „seed coat mucilage“ Produktion verantwortlich sind, führt eine Kombination mit dem *transparent testa* Phänotyp von *tt8* zu einem *ttg1*-Phänotyp. Allerdings konnten die Autoren zeigen, dass während die Keimlinge der *gl3/egl3*-Doppelmutante noch geringe, wenn auch nur deutlich reduzierte Mengen an Anthocyanen produzieren können, in der Dreifachmutante keine Pigmentproduktion in den Hypokotylen und Kotyledonen mehr festzustellen ist. So weisen die drei *AtbHLH*-Faktoren in der Anthocyanbiosynthese zumindest eine partielle Redundanz auf. Was die Produktion von kondensierten Tanninen in der Samenschale anbelangt, so wird deren transkriptionelle Regulation auf Seiten der *AtbHLH*-Proteine ausschließlich von *AtbHLH042/TT8* übernommen.

Ergänzend zu den sichtbaren Phenotypen haben die Autoren auch noch die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationen auf die Expression der mit der Anthocyan-Biosynthese verknüpften Gene der *AtCHS* (Chalkonsynthase) und der *AtDFR* (Dihydroflavonolreduktase) mittels Quantitativer Real Time PCR (QRT-PCR)

untersucht. Jedoch sind die untersuchten Bedingungen nicht ausreichend, um eindeutige Effekte zu zeigen, da bei der Regulation der *AtCHS* nicht zwischen lichtabhängiger und lichtunabhängiger Regulation getrennt wird. Entscheidend ist es, unterschiedliche Stimuli der Anthocyanbiosynthese wie Lichtstress, osmotischer Stress, sowie Jasmonat oder hohe Zuckerkonzentrationen im Medium miteinander zu vergleichen und die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationen auf die Regulation der Strukturgene und nicht nur die Entwicklungsphasen abhängige Induktion der Anthocyanbiosynthese zu betrachten. Somit könnten veränderte Expressionsprofile aufgrund unterschiedlicher Fähigkeiten der Mutanten, auf äußere Reize zu reagieren, verschiedene Regulationswege unterscheiden helfen. In Korrelation mit den publizierten Daten zu verschiedenen *AtMYB*-Transkriptionsfaktoren, stellen die Autoren schließlich ein hierarchisches Interaktionsmodell von *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren und TTG1 auf, das konsistent mit den Ergebnissen dieser Analyse ist und auf das später noch eingegangen wird (vgl. Abb. D2, Diskussion).

Außer den oben genannten Daten ist bisher zu möglichen Funktionen und Redundanzen bei *AtbHLH*-Faktoren wenig gezeigt worden. Jedoch gibt es Dank der vorliegenden Beschreibung der *AtbHLH*-Transkriptionsfaktorfamilie eine Vielzahl von Ansatzpunkten, um gezielt nach der Funktion der *AtbHLH*-Faktoren suchen zu können. Die Kombination von strukturellen Informationen über die nächstähnlichen *AtbHLH*-Faktoren erleichtert die funktionelle Analyse und Versuchsplanung mit den modernen Methoden der vorwärts und rückwärts gerichteten Genomik, da mögliche Redundanzen leichter vorhersagbar sind. Kombiniert man die Sequenzinformationen mit Expressionsstudien (wie sie in Projekten wie REGIA speziell zu Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden), lassen sich nicht nur Vorhersagen zu möglichen Interaktionspartnern treffen, sondern auch Funktionen in bestimmten Stoffwechselwegen (kombiniert mit Expressionsdaten bestimmter Strukturgene) aufklären. So könnten genomweite Expressionsstudien (z.B. auf dem ATH1-Chip [25K] der Firma Affymetrix) mit RNA-Präparationen aus Überexpressionspflanzen einzelner *AtbHLH* zur Identifikation weiterer Zielgene führen. Jedoch erweisen sich gerade die vergleichenden Expressionsstudien mit Transkriptionsfaktoren als schwierig, da oft nur geringe Expressionsunterschiede, die bei Transkriptionsfaktoren schon immense Auswirkungen auf die Expression von Zielgenen haben können, im Grundrauschen undetektiert bleiben können. Doch mit

Zunahme der Sensitivität dieser Analysen dürften in näherer Zukunft auch schon Expressionsunterschiede von unter 2fach gesteigerter oder reduzierter Expression zuverlässig detektierbar sein und signifikante Ergebnisse liefern.

Darüber hinaus stehen heute aus zahlreichen Projekten Pflanzenlinien mit Gen-Mutationen in nahezu allen Genen zur Verfügung. So sind bereits in unterschiedlichen Projekten durch Transposon- und T-DNA-Insertion mehr als 300.000 Linien mit putativen Gen-Mutationen generiert worden, von denen ca. 180.000 öffentlich verfügbar sind. Alleine aus dem GABI-KAT Projekt (Genom-Analysen im Biologischen System Pflanze – Kölner Arabidopsis-T-DNA-Linien; siehe http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/GABI-Kat_homepage.html) sind inzwischen für mehr als 90 der *AtbHLH*-Gene putative T-DNA Insertionen bekannt und verfügbar. Diese können in Zukunft durch unterschiedliche Komplementationsversuche (mit der cDNA des betroffenen Gens oder cDNAs möglicher (partiell) redundanter Gene, die unter Kontrolle des Promotors des ausgeschalteten Gens exprimiert werden) und Überexpressionsstudien (mit möglichen Interaktionspartnern) die Funktion vieler *AtbHLH* näher beleuchten und weitere Einblicke in das Netzwerk der transkriptionellen Regulation gewähren.

Sind putative Targetgene erst einmal identifiziert, lässt sich die transkriptionelle Aktivierung durch *AtbHLH* und *AtMYB*-Faktoren im Transfektionssystem relativ unkompliziert untersuchen. Vor dem Hintergrund beschriebener Interaktionen von bHLH und R2R3-MYB-Proteinen (in *Arabidopsis* und anderen Spezies) wurden deshalb *AtbHLH*-Faktoren im Rahmen dieser Arbeit auf mögliche synergistische Effekte bei der Promotoraktivierung im Transfektionssystem getestet. Da für die Mais Faktoren *ZmC1* und *ZmSn* bereits zu Beginn dieser Arbeit die synergistische Interaktion bei der Regulation u.a. des *AtCHS*-Promotors gezeigt war, wurden deren nächsthomologe Faktoren aus *Arabidopsis thaliana* auf ihr regulatorisches Potential bei der Aktivierung von Promotoren bestimmter *Arabidopsis*-Strukturgene der Flavonoid- und Anthocyan-Biosynthese getestet. Dabei lieferten die erhaltenen Ergebnisse zusätzliche Evidenz für die Funktionalität des strukturellen Clusterings, die im Folgenden näher diskutiert werden.

4.3 ***AtbHLH*-Faktoren regulieren die Expression von Schlüssel-enzymen der Flavonoidbiosynthese zusammen mit *AtMYB*-Faktoren**

Die „*in silico*“ Analyse der verwendeten *AtDFR*- und *AtBAN*-Promotoren zeigt, dass diese, ebenso wie der bereits in zahlreichen Analysen beschriebene *AtCHS*min-Promotor, putative Bindeelemente für bZIP, bHLH und MYB-Transkriptionsfaktoren beinhalten. Alle Promotoren konnten auch in Kontrollversuchen mit *ZmC1* und *ZmSn* in vergleichbarer Stärke aktiviert werden. Bei der Aktivierung durch *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede bezüglich Aktivierungsfähigkeit und Aktivierungsstärke, was zum einen auf der unterschiedlichen Kombination der Transkriptionsfaktoren beruht aber zum anderen auch mit dem unterschiedlichen Aufbau der getesteten Promotoren in Verbindung gebracht werden kann. Hierbei ist jedoch auch anzumerken, dass das Auffinden der für diese Faktoren beschriebenen Bindekonsensi kein Beweis für die tatsächliche Funktion als *cis*-wirkendes Element ist. Dies muss in Mutationsanalysen und „*in vitro*“ Bindestudien noch experimentell untermauert werden.

Für alle der beobachteten synergistisch wirkenden *AtMYB* und *AtbHLH*-Faktoren konnte in Hefe-2-Hybrid-Experimenten eine Bestätigung der tatsächlichen physikalischen Interaktion der beiden Faktoren erbracht werden, sofern durch Selbstaktivierung der Faktoren ein Test nicht möglich war (vgl. Einleitung und Dissertation Ilona Zimmermann, 2003). Somit können zwar sekundäre Effekte durch Aktivierung anderer Faktoren in den Protoplasten nicht ausgeschlossen werden, jedoch beweist dies zumindest, dass es sich bei den im Transfektionsexperiment aktivierenden Faktoren zumindest um Interaktionspartner handelt. Ob sie nun direkt an den getesteten Promotor binden können, bleibt in Hefe-1-Hybridexperimenten oder in „*in-vitro*“-Bindestudien zu beweisen.

4.3.1 **Überexpression bestimmter *AtbHLH* erhöht die MYB111 induzierte Aktivierung der *AtCHS*min-Promotors**

Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass bestimmte R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren ohne ko-überexprimierten *AtbHLH*-Partner Promotoren von Stukturgenen der Flavonoid-Biosynthese aktivieren können (*AtMYB12* und

AtMYB111; Mehrrens, 2003), ohne dabei zusammen mit *AtbHLH*-Faktoren getestet worden zu sein. *AtMYB12* war dabei bereits Gegenstand detaillierter Ko-Transfektionsstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass *AtMYB12* in der Lage ist in transienter Überexpression in AT7-Protoplasten sowohl den *AtCHS*min-Promotor, als auch Promotor-GUS-Fusionen der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Gene *AtCFI*, *AtF3H*, *AtFLS* und *At4CL3* zu aktivieren (Diplomarbeit und Dissertation Frank Mehrrens, 2003; Abkürzungen siehe Einleitung, Legende zu Abb. E1). Außerdem konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass *MYB12* ebenfalls zu einer geringen Aktivierung der Promotoren der *PAL1*, *PAL2*, *PAL4* und *C4H*-Gene führt, die Strukturgene des allgemeinen Phenylpropanioidstoffwechsels darstellen. *AtMYB12* selbst ist lichtreguliert und UV-induzierbar, ist also mit der lichtinduzierten Aktivierung des *AtCHS*-Promotors in Verbindung zu bringen. Für den mit *MYB12* strukturell eng verwandten Faktor *MYB111* konnte ebenfalls durch Frank Mehrrens gezeigt werden, dass er in transienter Überexpression in Protoplasten in der Lage ist, die gleichen Promotorkonstrukte zu aktivieren wie *MYB12*. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass *MYB111* im Gegensatz zu seinem Paralog *MYB12* nicht UV-induzierbar ist und zu etwas geringeren Aktivierungsraten wie *MYB12* führt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Faktoren nun auch auf mögliche synergistische Effekte mit *AtbHLH* Faktoren bei der Aktivierung des *AtCHS*min-Promotors untersucht.

Sowohl *AtMYB12* als auch *AtMYB111* aktivieren von den getesteten Promotoren nur den *AtCHS*min-Promotor, nicht aber den *AtDFR*- oder den *AtBAN*-Promotor, weder als Einzelfaktor noch in Synergie mit *AtbHLH*-Faktoren (die in Abb. R13 und R14 verzeichneten Aktivierungen mit *ZmSn* dürften auf das Aktivierungspotential von *ZmSn* alleine zurückzuführen sein). Dies ist möglicherweise durch Unterschiede in der DNA-Bindepräferenz der beiden *AtMYB*-TF zu anderen erklären, die jedoch in dieser Studie nicht näher untersucht wurden. Stattdessen wurde sich mehr auf mögliche Synergien zwischen *AtMYB* und *AtbHLH*-Faktoren konzentriert. Für *AtMYB12* konnten keine synergistischen Effekte mit *AtbHLH*-Faktoren ermittelt werden, während bei *AtMYB111* eine signifikante Steigerung der Aktivierung durch die Ko-Überexpression von *AtbHLH*-Genen zu verzeichnen war. Allerdings war dabei keine Spezifität für bestimmte *AtbHLH*-Faktoren zu beobachten. Alle mit *AtMYB111* getesteten *AtbHLH* besaßen einen H-E-R-DNA-Bindekonsensus, darunter auch PIF3, der in keinem der weiteren

Experimente mit irgendeinem der getesteten anderen *At*MYB-Faktoren zu einer Aktivierung führte. Einzige Ausnahme war *AtbHLH012/AtMYC1*, der trotz seiner geringen Konservierung in der basischen Region – verbunden mit einem möglichen Reduktion der DNA-Bindefähigkeit (5-9-13 Motiv: L-D-R) – ebenfalls zu einer Aktivierungssteigerung führte. Die zu beobachtende unspezifische GUS-Aktivitätssteigerung durch die Ko-Überexpression eines *AtbHLH*-Gens ist somit auch schwer zu deuten. Zum einen spricht das Fehlen des konservierten Bereichs im Aminoterminus von PIF3 dagegen, dass die erhöhte Promotoraktivität allein durch die Interaktion *AtbHLH/AtMYB* verursacht wird, zum anderen weist *AtbHLH012/AtMYC1* eigentlich kein ausreichend konserviertes DNA-Bindemotiv auf, um sie nur mit der Bindung des *AtbHLH* an das RRE des *AtCHSmin*-Promotors erklären zu können. Bisher ist nur die Fähigkeit von *AtbHLH012/AtMYC1* an R2R3-MYB-TF zu binden gezeigt (Zimmermann, 2003). Über seine DNA-Bindefähigkeit ist nichts bekannt. Daher sollten in Zukunft zusätzliche *AtbHLH*-Faktoren auf ihre Synergie mit *AtMYB111* bei der Aktivierung des *AtCHSmin*-Promotors getestet werden, die entweder keinen H-E-R-Konsensus besitzen oder keine Konservierung im Aminoterminus besitzen bzw. beide Eigenschaften erfüllen. Unterschiede in der Aktivierungssteigerung könnten weitere Rückschlüsse über den tatsächlichen aktivierungssteigernden Mechanismus liefern. Auch ist die Verwendung von artifiziellen *AtbHLH*-Faktoren denkbar, die nur eine für die Bindung von *AtMYB*-Faktoren notwendige Interaktionsdomäne (sobald identifiziert), aber keine oder nur eine modifizierte DNA-Bindedomäne enthalten.

Bisher lassen die beobachteten Effekte jedoch noch unterschiedliche Interpretationen zu. Diese reichen von der möglichen Rekrutierung weiterer Proteine durch den *AtbHLH*-Faktor aus dem Cytoplasma in den Nukleus bis hin zu einer Konformationsänderung des *AtMYB*-Faktors, die entweder durch die Bindung des *AtbHLH* direkt an den MYB-Interaktionspartner oder durch die benachbarte Bindung an die DNA verursacht werden könnte. Diese Hypothesen müssen jedoch noch in weiteren Studien bestätigt werden. Natürlich können im Transfektionssystem auch Sekundäreffekte auftreten, die durch Beeinflussung der Expression anderer TF-Gene eine Aktivierung des Reportergenkonstrukts bewirken. Jedoch erscheint dies im Kontext mit den anderen in dieser Arbeit erhaltenen Daten als unwahrscheinlich für die beobachteten Synergien zwischen *AtMYB111* und unterschiedlichen *AtbHLH*-Faktoren.

4.3.2 *AtbHLH*-ZIP-Faktoren können ohne ko-überexprimierten MYB-Faktor bestimmte Promotoren von Strukturgenen der Flavonoid-Biosynthese aktivieren

Auf Seiten der *AtbHLH* Transkriptionsfaktoren war bisher nicht gezeigt, dass sie Promotoren der Flavonoidbiosynthese auch ohne MYB-Interaktionspartner aktivieren können. Lediglich für den Maisfaktor *ZmSn* war bekannt, dass er auch in hohen Konzentrationen ($>1\mu\text{g}$ pro $200\mu\text{l}$ Protoplasten) eine geringe Aktivierung des *AtCHSmin*-Promotors in Arabidopsis-Protoplasten bewirken kann. Dies konnte auch in den Kontrollansätzen dieser Studie bestätigt werden, in denen Konzentrationen von $0,5\mu\text{g}$ pBT8-*ZmSn* pro $200\mu\text{l}$ Protoplasten bereits geringes Aktivierungspotential aufwiesen. Für bHLH Faktoren aus Arabidopsis konnte hier nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass zumindest die Faktoren der Subgruppe IVc mit zusätzlichem Leuzin-Zipper-Motif im Anschluss an die bHLH-Domäne ebenfalls den *AtCHSmin* und den *AtDFR*-Promotor aktivieren können. Das stärkste Aktivierungspotential wies dabei *AtbHLH115* auf. Allerdings führte die Überexpression der *AtbHLH*-ZIP-Gene in Protoplasten nur zur Aktivierung des *AtCHSmin*- und des *AtDFR*-Promotors, nicht aber des *AtBAN*-Promotors. Bei genauerer Betrachtung der verwendeten Promotorfragmente fällt auf, dass sowohl der *AtCHSmin*- als auch der *AtDFR*-Promotor direkt benachbarte putative bZIP-Bindestellen neben den E-Box-Elementen besitzen. Beim *AtBAN*-Promotor findet sich benachbart zur E-Box lediglich ein MRE, das auch in den anderen beiden Promotoren vorhanden ist und für die Bindung des MYB-Interaktionspartner verantwortlich zu sein scheint. Somit könnte die Aktivierung der beiden Promotoren durch *AtbHLH*-ZIP Faktoren auf einer Interaktion mit bZIP-Proteinen beruhen, jedoch ist hierfür in Hefe-2-Hybrid-Experimenten der Beweis einer Interaktionsfähigkeit noch nicht erbracht worden. Natürlich ist auch denkbar, dass die starke Überexpression des *AtbHLH*-ZIP-Gens (35S-Promotor) und die daraus zu erwartende hohe Protein-Konzentration zu einer unspezifischen Bindung des *AtbHLH*-ZIP-Faktors an E-Box und ACGT-Element gleichermaßen führt und somit die transkriptionelle Aktivierung auslöst.

Es gibt jedoch noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten, die allerdings nicht den Unterschied zwischen *AtCHSmin/AtDFR* und *AtBAN*-Aktivierung erklären können. So könnten das Leuzin-Zipper-Motiv auch anderen Faktoren die Bindung an den *AtbHLH* ermöglichen und so die transkriptionelle Aktivität moduliert werden. Andererseits könnte auch ein *AtbHLH*-ZIP-Dimer durch die zusätzliche

Interaktionsdomäne deutlich stabiler sein als einfache *AtbHLH*-Dimere, langanhaltender an die DNA binden und somit eine transkriptionelle Aktivierung bewirken. Die Versuche mit den *AtbHLH*-ZIP-Proteinen im Hefe-2-Hybridsystem gestalten sich auch äußerst schwierig, da die bisher getesteten Fusionskonstrukte alle stark selbstaktivierend waren (Zimmermann, 2003). Dies deutet darauf hin, dass die *AtbHLH*-ZIP-Proteine eine eigene starke Aktivierungsdomäne besitzen könnten. In der Tat besitzen die *AtbHLH*-ZIP-Proteine der Gruppe IVc am äußersten Carboxyterminus eine Region mit konservierten Methionin- und Prolin-Resten, die eine Aktivierungsdomäne darstellen könnten (vgl. Motiv 23, Tab.1: **M**-W-[QSH]-[FY**P**]-[**M**L]-**P**-[**P**Q]-[As]-x-[VR]-D-T-S-[QR]-D-[HLQ]-x-[LN]-[RL]-**P**-**P**-[VA]-A). Entsprechende Deletions-Konstrukte sollten in Hefe-2-Hybrid-Experimenten in der Zukunft Klarheit bringen können. Eine Vielzahl an Möglichkeiten, die in weiteren Experimenten noch bewiesen oder widerlegt werden müssen. Eindeutig ist jedoch, dass die Aktivierung durch *AtbHLH*-ZIP-Faktoren unabhängig von MYB-Faktoren ist. Denn die Ko-Überexpressionen von *At*MYB-Faktoren, auch solchen, die mit anderen *AtbHLH*-Faktoren die Aktivierung der getesteten Promotoren bewirken, zeigten keine Synergie mit den *AtbHLH*-ZIP-Faktoren. Weitere Hinweise darauf, welche Bindestellen und somit welche Faktoren für die Aktivierung verantwortlich sind, sollten in Zukunft mit Studien an Promotor-Konstrukten mit mutierten Bindeelementen zu ermitteln sein (vgl. Hartmann et al., 1998).

Ob die Aktivierung von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese durch *AtbHLH*-ZIP-Faktoren jedoch spezifisch ist, erscheint vor neueren Resultaten mit Überexpressionspflanzen und Knockout-Mutanten fraglich (Dr. Marc Jakoby, Ag Weißhaar, unpublizierte Daten). So konnte in Überexpressionspflanzen kein Phänotyp beobachtet werden, der mit der Flavonoidbiosynthese in Verbindung gebracht werden kann und auch Untersuchungen an Knockout-Pflanzen zeigten lediglich nekrotische bzw. letale Phänotypen, nicht jedoch spezifische Effekte, die auf eine Beteiligung am Flavonoidstoffwechsel hinweisen. Somit könnte es sich auch bei den im Transfektionssystem gemessenen Daten um Artefakte handeln, soweit sie die Regulation dieser Strukturgene betreffen. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bestimmte *AtbHLH*-Faktoren ohne ko-überexprimierten *At*MYB-Interaktionspartner in der Lage sind eine transkriptionelle Aktivierung zu bewirken.

4.3.3 *AtbHLH*-Faktoren ohne Leuzin-Zipper benötigen einen spezifischen R2R3-MYB-Interaktionspartner bei der Aktivierung von Strukturengen des Flavonoidstoffwechsels

Außer den oben bereits beschriebenen *AtMYB*- und *AtbHLH*-Faktoren bewirkte keiner der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine Aktivierung der getesteten Reportergenkonstrukte, ohne mit einem möglichen Interaktionspartner ko-überexprimiert zu sein. Die getesteten Promotoren konnten nur durch Vertreter der *AtbHLH*-Subgruppe IIIc in Kombination mit bestimmten *AtMYB*-Faktoren aktiviert werden. *AtbHLH*-Faktoren aus anderen Gruppen zeigten keine synergistischen Aktivierung der getesteten Promotoren zusammen mit *AtMYB*-Faktoren. Es zeigte sich jedoch, dass während bei den *AtMYB*-Faktoren selbst im Vergleich nächsthomologer Faktoren strenge Spezifitäten für die Regulation bestimmter Stoffwechselwege und Entwicklungsprozesse vorliegen, die *AtbHLH*-Transkriptionsfaktoren klare Redundanzen innerhalb der strukturellen Gruppen aufweisen. Dabei führten die Kombinationen unterschiedlicher *AtbHLH* mit den für die Wurzelhaar- und Trichomentwicklung beschriebenen *AtMYB*-Faktoren (*AtMYB0/GL1* und *AtMYB66/WER*) und deren nächstähnlichem MYB-TF *AtMYB23* bei keinem der drei Promotor-Konstrukte zu einer Aktivierung. Dagegen zeigen *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB90/PAP2* bzw. *AtMYB123/TT2* deutliche Präferenzen bei der Regulation der untersuchten Strukturgene. Während die *AtCHSmin*- und *AtDFR*-Promotorkonstrukte durch die beiden nächstähnlichen (und redundanten) Faktoren *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB90/PAP2* im Zusammenspiel mit den *AtbHLH*-TF der Gruppe IIIf am stärksten aktiviert werden, obliegt die stärkste Aktivierung auf Seiten des *AtBAN*-Promotors den *AtMYB123/TT2-AtbHLH*-Kombinationen. Innerhalb der *AtbHLH*-Gruppe IIIf zeigte *AtbHLH012/AtMYC1* das deutlich schwächste Aktivierungspotential, was mit der geringen Konservierung des DNA-Bindemotivs zu erklären ist. Bei den anderen Faktoren der Gruppe IIIf werden dagegen wieder klare Präferenzen sichtbar. Die beiden redundanten *AtbHLH*-TF *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* (*EGL3*) aktivierten mit *PAP1* und *PAP2* am stärksten die *AtCHSmin* und *AtDFR*-Promotorkonstrukte, während *AtbHLH042/TT8* der deutlich stärkste Aktivierungspartner für *TT2* bei der Aktivierung des *AtBAN*-Promotorkonstrukts ist, was vor dem Hintergrund der beiden *transparent testa* Phänotypen der jeweiligen Knockout-Linien naheliegend erscheint. *AtbHLH001/GL3* und *AtbHLH002/EGL1* (*EGL3*) weisen dort deutlich geringere Aktivierungsraten auf.

Somit sind zwar synergistische Aktivierungspaare für die einzelnen Promotoren zu bestimmen, es ist jedoch auch offensichtlich, dass die Hauptaktivierungsunterschiede weniger durch die Bindepräferenzen der AtbHLH an die AtMYB-Faktoren, sondern vielmehr durch die Präferenzen der einzelnen AtMYB-Faktoren zu den Promotoren verursacht werden. Dies wird dadurch unterstrichen, dass die AtbHLH-Faktoren der Gruppe IIIa klar überlappendes Aktivierungspotential besitzen und somit redundant erscheinen. Ob die Redundanz auch für die Regulation von für die Trichom- und Wurzelhaarentwicklung relevanter Gene zutrifft, muss im Transfektionssystem erst noch mit geeigneten Promotor-Konstrukten überprüft werden.

Zwei weitere AtMYB-Faktoren wurden bisher nicht in die detaillierten Transfektionsanalysen miteingeschlossen, da einerseits das genomische *AtMYB114* Konstrukt nicht zur Aktivierung eines der getesteten Promotoren führte und dessen nächst homologer Faktor *AtMYB113* zunächst nicht kloniert war. Somit kann hier keine Aussage über mögliche funktionelle Redundanzen dieser Faktoren gemacht werden. Allerdings konnte für *AtMYB114* bisher weder im Ökotyp *Columbia* noch in *Landsberg erecta* eine Expression detektiert werden, weshalb es sich um ein Pseudogen zu handeln scheint. Darüber hinaus besitzt das *Columbia*-Allel aufgrund eines Basenpolymorphismus (SNP) ein verfrühtes STOP-Kodon. In den anderen Ökotypen, für die die Sequenzinformationen vorliegen, taucht dieses STOP nicht



Abb. D1: AtMYB114-Überexpressionspflanzen des Ökotyps Columbia. Pflanzen entsprechen der F1-Generation, deren Parentalgeneration mit einem pXYZ-35S-gDNA-*AtMYB114var Landsberg* Konstrukt (den kompletten ORF von *AtMYB114-var. Landsberg* umspannend) transformiert worden war. Durchführung und Analyse Dr. Ralph Stracke, Ag Weißhaar, unveröffentlicht.

auf, jedoch konnte auch hier keine Expression nachgewiesen werden (Dr. Ralph Stracke, Ag Weißhaar, unveröffentlicht). Um dennoch MYB114 in der Transfektion testen zu können, wurde ein genomisches Fragment des Ökotyps *Landsberg* kloniert (Dr. Ralph Stracke, Ag Weißhaar) und in den entsprechenden Expressionsvektor überführt. Ebenso wurde das Konstrukt, um eine vollständige cDNA klonieren zu können und eventuelle Auswirkungen „*in planta*“ nach weisen zu können, in einen binären Überexpressionsvektor kloniert und durch Agrobakterien vermittelte Transformation in den Ökotyp *Columbia-0* eingeschleust. Die selektierten Überexpressionslinien dieses Konstrukts weisen einen deutlichen Phänotyp auf, der dem der AtMYB75/PAP1 und AtMYB90/PAP2 Überexpressionspflanzen ähnelt (vgl. Abb. R11). Dabei zeigen die jungen Keimlinge eine ubiquitäre Anhäufung von Anthocyanen untere Reihe, Bildmitte), während diese bei den adulten Pflanzen auf die Blattachsen, Stiele und jungen Blätter beschränkt bleibt (obere Reihe gesamt und untere Reihe linke Pflanze). Der vorliegende Polymorphismus und die Anhäufung von Anthocyanen in der Überexpressionspflanze machen weitere Experimente im Transfektionssystem nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten, da sich diese Analyse auf die Funktionen und Redundanzen auf Seiten der AtbHLH Transkriptionsfaktoren konzentriert hat.

Die beobachtete Redundanz bei den AtbHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf ist konsistent mit den Hypothesen von Zhang *et al.* (2003), die wie oben bereits näher erläutert, anhand der Phänotypen in Einfach-, Doppel- und Dreifachmutanten klare Redundanzen dieser Faktoren „*in planta*“ nachgewiesen haben. Sie konnten ebenfalls die Interaktionsfähigkeit der ZmSn-ähnlichen bHLH mit den an den unterschiedlichen Prozessen beteiligten R2/R3-MYB-Faktoren nachweisen. So konnten sie zeigen, dass AtbHLH001/GL3 nicht nur mit den AtMYB-Faktoren AtMYB0/GL1, AtMYB75/PAP1 und AtMYB90/PAP2, sowie CAPRICE (CPC) und TRYPTICHON (TRY) interagieren kann, sondern schränkten die Interaktionsdomäne auch auf die ersten 100 Aminosäuren ein. Ebenso bestätigten sie die bereits von ihnen im Jahr 2000 (Payne *et al.*) veröffentlichte Interaktion mit TTG1. Für EGL1 (EGL3) kamen sie in der neuen Studie zum gleichen Ergebnis (Zhang *et al.*, 2003).

Die Verschiebungen der Aktivierungsstärken lassen auch Rückschlüsse auf die Spezifitäten bezüglich der hauptbeteiligten Faktoren an den einzelnen Vorgängen in der Pflanze zu. Während die AtMYB-Faktoren 75/PAP1 und 90/PAP2 zusammen mit den AtbHLH-Faktoren 001/GL3 und 002/EGL1 (EGL3) wahrscheinlich die

regulatorische Hauptfunktion in der lichtunabhängigen und entwicklungsgesteuerten Regulation der Anthocyanbiosynthese zu haben scheinen, obliegt die Hauptregulation der Synthese der kondensierten Tannine in der Samenschale dem Interaktionsduplet *AtMYB123/TT2* und *AtbHLH042/TT8*. Diese These wird auch durch die RT-PCR-Resultate unterstützt, die eine klare Korrelation der *TT8*, *TT2* und *BAN* Expression in Blüten und sich entwickelnden Schoten zeigen. Zwar ist auch eine *EGL1(EGL3)*- und *PAP1*-Expression in der gleichen cDNA-Quelle detektierbar, jedoch schließt der *tt*-Phänotyp des *tt8*-Knockouts eine Redundanz hier aus, so dass *EGL1 (EGL3)* zwar im gleichen Organ, wohl aber nicht im gleichen Gewebe exprimiert sein dürfte. Um hier tiefere Einblicke zu gewinnen, sollte in Zukunft die gewebespezifische Detektion der Expression der vier Faktorengene (*GL3*, *EGL1 (EGL3)*, *AtMYC1* und *TT8*) mittels „*in situ*“-Hybridisierung mit der Expression der Zielgene korreliert werden. Ob dagegen der Einsatz von Promotor-GUS-Fusionen ausreicht, mögliche Gewebe- und Zelllinien-spezifische Expressionen zu detektieren ist unklar. Allerdings sind für einige *ZmSn*-ähnliche *AtbHLH*-Faktoren schon organspezifische Expressionsmuster gezeigt worden (vgl. Zhang *et al.*, 2003)

Die Verschiebung der Aktivierungsspezifität von *AtMYB75/PAP1* und *AtMYB90/PAP2* bei der *AtCHS*min- und *AtDFR*-Aktivierung hin zu *AtMYB123* bei der *AtBAN*-Aktivierung und die gegenseitige Ersetzbarkeit der *AtbHLH*-Faktoren (mit geringen Spezifitäten) zeigt auch, dass die eigentliche Spezifität der transkriptionellen Interaktion durch den ko-exprimierten *AtMYB*-Interaktionspartner vermittelt wird. Die Rolle des *AtbHLH*-Partners, dessen Spezifität lediglich durch die generelle DNA-Bindefähigkeit und die Fähigkeit zur Interaktion mit dem *MYB*-Interaktionspartner limitiert scheint, dürfte eher in einer Stabilisierung des Komplexes oder einer Brückenbildung zu weiteren Faktoren (z.B. *TTG1*) liegen. Demnach sollten *AtbHLH001/GL3* oder *AtbHLH002/EGL1 (EGL3)* unter der Kontrolle des *AtbHLH042/TT8*-Promotors den *tt8*-Phänotyp komplementieren können, bzw. sollte mit *AtbHLH042/TT8* unter Kontrolle des *GL3*-Promotors der *g/3-1*-Phänotyp komplementiert werden können. Ein ähnliches Experiment wurde bereits mit den *AtMYB*-Faktoren *AtMYB0/GL1* und *AtMYB66/WER* durchgeführt, deren Fusionskonstrukte mit dem jeweils anderen Promotor den durch die Mutation des anderen Gens ausgelösten Phänotyp komplementieren konnten (Lee *et al.*, 2001). Als Kontrollen würden sich *AtbHLH*-Faktoren anbieten, deren DNA-Bindefähigkeit herabgesetzt ist oder ganz fehlt (z.B. *AtbHLH012/AtMYC1* oder artifizielle, mutierte

bHLH-Konstrukte) und solche deren MYB-Interaktionsdomäne fehlt oder mutiert ist, aber die die gleiche DNA-Bindefähigkeit wie TT8 oder GL3 besitzen. Dank der in Tab.1 dargestellten Ergebnisse sollte eine geeignete Auswahl von Kontrollfaktoren einfach sein, sobald MYB- und WD40-Interaktionsdomänen näher kartiert sind. Auch der Einsatz von mutierten Promotorkonstrukten ist sinnvoll. So könnte ebenfalls gezeigt werden, wie wichtig die tatsächliche Bindung der *AtbHLH*-Faktoren an die DNA ist, oder ob die Bindung an den *AtMYB*-Interaktionspartner ausreichend sein kann, um einen Promotor zu aktivieren.

Dank der Bestrebungen die im Transfektionssystem gezeigten Synergien im Hefe-2-Hybridsystem auf Ebene der physikalischen Interaktion zu bestätigen (Zimmerman, 2003), konnten nicht nur die gezeigten Aktivierungspartner als Interaktionspartner verifiziert werden, sondern auch weitere Interaktion zum WD40-Faktor TTG1 aufgezeigt werden. Ebenso wurden die notwendigen Interaktionsdomänen auf Bereiche im Aminoterminus der getesteten *AtbHLH*-Faktoren eingeschränkt, die mit den in Tab. R1 gezeigten konservierten Bereichen korrelieren. Allerdings ergab eine erste Punktmutationsanalyse im Motiv 11 (vgl. Tab. R1) der *AtbHLH*-Gruppe IIIf im Transfektionssystem keine eindeutigen Ergebnisse (Ergebnisse Kap. 3.3), so dass zur weiteren Einkreisung der Interaktions-relevanten Aminosäurereste zusätzliche gerichtete Mutationsanalysen erforderlich sind.

Zusätzlich kompliziert werden die Einsichten in die Regulation durch *AtbHLH*-Faktoren durch die Tatsache, dass die *AtbHLH*-Faktoren „*in vivo*“ auch Heterodimere bilden können und sich somit in der Kombinatorik der *AtbHLH*-Faktoren eine enorme Vielfalt im regulatorischen Netzwerk aus *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren ergibt. Daher sind detaillierte Expressionsstudien in Array-Experimenten und in gewebsspezifischen „*in situ*“-Hybridisierungen um so wichtiger. Außerdem könnten in Transfektionsexperimenten mehrere Faktorkombinationen (zwei unterschiedliche *AtbHLH* und ein *AtMYB*) getestet werden. Somit ließen sich nicht nur Hinweise auf synergistische Heterodimerisierungspartner, sondern auch auf mögliche inhibitorische *AtbHLH*-Faktoren sammeln. Aufgrund der immensen Kombinationsmöglichkeiten sollte aber zuvor durch Hefe-2-Hybridexperimente und Expressionsstudien die Zahl der zu testenden *AtbHLH*-Faktoren eingeschränkt werden. Selbst die Faktoren, die wirklich koexprimiert sind und physikalisch miteinander interagieren können, dürften die Zahl an testbaren Kombinationen noch

soweit übersteigen, dass eine Selektion auf wenige Vertreter einzelner Gruppen für erste Experimente sinnvoll ist, die bei entsprechenden Ergebnissen erweitert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich für diesen Teil der Analyse festhalten, dass die *AtbHLH*-Faktoren funktionelle Redundanzen im Rahmen ihrer strukturellen Konservierung aufweisen, die auch „*in planta*“ zu bestätigen sind (vgl. Zhang et al., 2003). Bestimmte *AtMYB*- und *AtbHLH*-Faktoren vermögen nur in Ko-Expression synergistisch bestimmte Promotoren zu aktivieren, nicht jedoch als Einzelfaktor. Die gezeigten synergistischen Effekte basieren auf physikalischer Interaktion der *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren (vgl. Dissertation Ilona Zimmermann, 2003) und es finden sich Expressionskorrelationen „*in planta*“ zwischen den beschriebenen Aktivierungspartnern und Zielgenen. Die Transfektionsergebnisse sind eindeutig, da keiner der getesteten Faktoren im Hintergrund der At7-Protoplasten exprimiert wird (vgl. Kap. 3.6 Abb. R19). Somit resultiert die transkriptionelle Aktivierung direkt aus der Ko-Überexpression der *AtMYB*- und *AtbHLH*-Interaktionspartnergene. Ob diese auch auf der Bindung der Faktoren an die in Kap. 3.2 beschriebenen putativen Bindeelemente in den getesteten Promotoren beruht, muss erst noch experimentell bewiesen werden. Weitere gewebespezifische Expressionsstudien und Komplementationsanalysen „*in planta*“ sind notwendig, um Redundanzen und regulatorische Netzwerke vollständig zu beleuchten.

4.4 TTG1 spielt eine übergeordnete regulatorische Rolle in einem Interaktionsnetzwerk zur transkriptionellen Regulation

Zu Beginn dieser Arbeit wurde TTG1 zum ersten Mal als Interaktionspartner eines *AtbHLH* Transkriptionsfaktor beschrieben und seine mögliche Funktion in einem trimären DNA-bindenden Komplex beleuchtet (Payne et al., 2000). Die Verbindung zweier distinkter Vorgänge in der Pflanze (Flavonoidbiosynthese und Trichom- und Wurzelhaarentwicklung) ließ Vermutungen über eine übergeordnete Funktion von TTG1 in der Regulation dieser Vorgänge zu. Jedoch blieb offen, ob es sich dabei wirklich um einen Eingriff in die transkriptionelle Regulation relevanter Strukturgene handelt. Was die Flavonoidbiosynthese anbelangt, kann die Frage aufgrund der vorliegenden Ergebnisse mit ja beantwortet werden. Denn es zeigte sich, dass TTG1 nicht nur die transkriptionelle Aktivierung durch *AtbHLH* und *AtMYB*-Faktoren

positiv beeinflusst wird, sondern für diese essentiell ist. Die Ko-Überexpression von *TTG1* im Transfektionssystem zusammen mit *AtbHLH*- und *AtMYB*-Interaktionspartnern zeigt die synergistische Wirkung dieser Faktoren. Dabei scheint es sich bei der Funktion und der Einflussnahme von *TTG1* auf die transkriptionelle Regulation um einen generellen Mechanismus zu handeln, da *TTG1* ubiquitär in allen Arabidopsis Organen und Entwicklungsphasen und sogar in AT7-Protoplasten exprimiert wird (vgl. Kap 3.5). Außerdem bleibt der synergistische Effekt nicht auf einzelne Transkriptionsfaktorkombinationen oder Promotoren beschränkt, sondern er findet sich bei allen in dieser Arbeit gezeigten *AtbHLH/AtMYB*-Interaktionen. Dass der *TTG1*-vermittelte Effekt auch bei der Regulation der *AtCHS* zu sehen ist, verwundert zunächst, da in vorangegangenen und neueren Studien gezeigt worden war, dass diese unabhängig von *TTG1* ist (Kubasek et al., 1992; Zhang et. al., 2003). Dies ist jedoch mit den unterschiedlichen Signalwegen zu erklären, die das *AtCHS*-Gen regulieren. So ist durchaus denkbar, dass eine lichtabhängige Regulation der *AtCHS*-Expression, vermittelt durch bZIP und MYB-Transkriptionsfaktoren unabhängig von *TTG1* ist, während die entwicklungsphasengesteuerte Regulation *TTG1* abhängig ist. Auch die durch Jasmonat oder hohe Saccharose-Konzentration im Keimungsmedium stimulierte Induktion des Stoffwechselwegs zu den Anthocyanen könnte eine *TTG1*-abhängige Aktivierung des *AtCHS*-Gens erfordern. Deshalb sind detaillierte vergleichende Expressionsstudien für die unterschiedlichen Stimuli notwendig, um nähere Einblicke in die Regulation der mit *TTG1* verknüpften Stoffwechselwege zu gewinnen.

Das RNAi vermittelte Silencing der *TTG1*-Expression in Protoplasten und die Versuche in *ttg1-1*-Mesophyllprotoplasten bestätigen die Rolle für die transkriptionelle Regulation durch *AtbHLH*-Faktoren. Dass dennoch eine Restaktivität in den RNAi-Transfektions-Ansätzen zu verzeichnen ist, lässt sich durch die zu erwartende nicht 100%ige Transfektionseffizienz aller transfizierten Zellen mit allen fünf eingesetzten Konstrukten erklären. Auch die Erhöhung der eingesetzten Menge des RNAi-Konstrukts je Transfektionsansatz auf über 20µg führte nicht zu einer völligen Unterdrückung der Reporter-genaktivierung. Die Funktionalität des *TTG1*-RNAi-Konstrukts konnte mittels Quantitativer Real Time PCR (QRT-PCR) nachgewiesen werden. Außerdem wurden durch die 35S-GFP Kontrollen mit *TTG1*-RNAi-Koexpression mögliche toxische Effekte des *TTG1*-RNAi-

Konstrukts ausgeschlossen. Eine Bestätigung der Funktionalität „*in planta*“ über den *ttg1-1*-Phänotyp durch die Überexpression des RNAi-Konstrukts steht noch aus. Jedoch befinden sich die transgenen Pflanzen im Selektionsprozeß.

Die zu beobachtende durch *A**t**H_LH042/TT8* und *A**t**MYB123/TT2* vermittelte Restaktivität der Ansätze ohne *TTG1*-Überexpression in Mesophyllprotoplasten eröffnet Perspektiven auf die Art der *TTG1*-Funktion. Da in der *TTG1*-Sequenz kein Nukleares Lokalisierungs-Signal (NLS) zu detektieren, erscheint eine Bindung an den *A**t**H_LH*-Interaktionspartner bereits im Cytoplasma als wahrscheinlich. Die GFP-Fusionsexperimente zeigen für *TT8* eine deutliche Lokalisation im Nukleus, jedoch sind für *TTG1* die Ergebnisse nicht eindeutig. Zum einen ist das Fusionsprotein nicht funktionell (im Gegensatz zur *TT8*-GFP-Fusion) und zum anderen ist keine klare Sublokalisierung zu erkennen. Zwar weisen die *TTG1::GFP* exprimierenden Zellen auch eine deutliche Fluoreszenz im Kern auf, jedoch auch im Rest der Zelle – darunter auch in vesikulären Strukturen (meist ein oder zwei pro Zelle), die oft in Kernnähe zu finden sind. Dabei könnten die lokalen, vesikelartigen Maxima sowohl von Abbauesikeln stammen, als auch durch eine Lokalisation am durch die Protoplastierung desintegrierten und vesikulär vorliegenden Endoplasmatischen Retikulums stammen. Für genauere Aussagen ist es hier zunächst essentiell mit einem funktionellen *TTG1::GFP*-Fusionsprotein die Lokalisation zu überprüfen. Die dreidimensionale Struktur von *TTG1* legt dafür eine aminoternale Fusion anstelle der in dieser Arbeit verwendeten carboxyterminalen Fusion nahe, da der Carboxyterminus in die β -Propeller-Struktur integriert ist, während der Aminoterminus frei liegt.

Dass sich in den *ttg1*-Mesophyllprotoplasten bei Ko-Überexpression von *TT8* und *TT2* ohne *TTG1*-Koexpression noch eine gewisse GUS-Aktivität messen lässt, kann durch die großen Proteinmengen erklärt werden, die bei der 35S-Überexpression der Konstrukte entstehen und die somit konzentrationsbedingt zu einer Aktivierung führen. Dies würde aber auch bedeuten, dass sobald eine Promotorbindung erfolgt ist, dies auch ohne *TTG1* zur transkriptionellen Aktivierung führt. Es sei denn, dass *TTG1* durch einen weiteren WD40-Faktor zumindest partiell ersetzt werden kann. Die bisher gezeigten Daten zur WD40-*A**t**H_LH*-*A**t**MYB*-Interaktion und zur die Transkription aktivierenden Synergie lassen somit verschiedene Interpretationen für die *TTG1*-Funktion zu:

- i. TTG1 fungiert als eine Art Shuttle und bringt den im Cytosol synthetisierten Transkriptionsfaktor zum Zellkern. Dabei wird das Ziel „Zellkern“ durch das NLS des *AtbHLH*-Faktors bestimmt. TTG1 könnte also ein Teil eines allgemeinen Proteintransporters sein, der ähnlich dem für *ZmRACK* (ebenfalls ein WD40 Protein) und *ZmRIK* vorhergesagten Komplex am Cytoskelett entlangwandert und im Cytoplasma synthetisierte Proteine an ihren Bestimmungsort geleitet (vgl. Dissertation Sonja Vorwerk, 2003).
- ii. Durch die Bindung an TTG1 wird die „Markierung“ des *AtbHLH*-Faktors durch andere WD40 Proteine (wie z.B. COP1) verhindert und der Faktor somit vor einem möglichen Abbau geschützt. In *AtbHLH042/TT8* und *AtbHLH092* findet sich z.B. ein konserviertes saures Motiv im für die TTG1-Interaktion vorhergesagten Bereich des Aminoterminus, das dem Bindekonsensus der bZIP-Faktoren zur COP1-Interaktion ähnelt (Daten hier nicht gezeigt). Unterstützt wird diese These außerdem dadurch, dass bei der Ko-Überexpression von *TT8::GFP* mit *TTG1RNAi* die Zahl der fluoreszenten Zellen und die subjektive Fluoreszenzintensität deutlich abnehmen im Vergleich zu nur *TT8::GFP* exprimierenden Zellen. Dies kann durch eine Instabilität von TT8 in der Abwesenheit von TTG1 erklärt werden. Somit könnte die Funktion von TTG1 in einer Stabilisierung des *AtbHLH*-Interaktionspartners liegen. Dies könnte auch die starke Aktivierung durch *ZmSn* und Interaktionspartner erklären, die weniger stark abhängig von TTG1 erscheint. *ZmSn* ist als bHLH-Faktor aus Mais möglicherweise „weniger kompatibel“ zu einem instabilisierenden Arabidopsis-Proteinkomplex (vgl. auch Punkt iv).
- iii. Die Bindung durch TTG1 bewirkt eine Konformationsänderung des *AtbHLH*-Interaktionspartners, die die Bindung an die DNA und möglicherweise an den *AtMYB*-Interaktionspartner ermöglicht. TTG1 könnte also auch eine aktivierende Funktion auf den *AtbHLH* oder gar den *AtbHLH/AtMYB*-Komplex haben. Dagegen würde sprechen, dass auch ohne WD40-Interaktionspartner in artifiziellen Systemen sowohl die DNA-Bindung, als auch die Bindung an den *AtMYB*-Interaktionspartner nachgewiesen werden kann (diverse Kristallisationsstudien, Hefe-Hybrid-Studien zur Interaktion und

Promotorbindung, Pull-down und Gel-shift-assays). Jedoch arbeiten alle diese Systeme mit extrem hohen Proteinmengen, so dass dies auch konzentrationsbedingte Effekte sein können, die die Abwesenheit eines WD40-Partners kompensieren.

- iv. TTG1 stabilisiert den DNA-bindenden Komplex aus AtbHLH- und AtMYB-Faktor und bewirkt so ein Verbleiben des Komplexes an der DNA. Dies steht in engem Zusammenhang mit der in Punkt ii vorhergesagten Funktion, jedoch hier auf die direkte Interaktion des Komplexes mit der DNA bezogen.
- v. TTG1 bildet ein Brückenelement zu weiteren Faktoren, die zur Bildung des Initiationskomplexes notwendig sind.

Diese Hypothesen beleuchten verschiedene, teilweise überlappende Aspekte, die in Ihrer Kombination das Bild widerspiegeln, das sich während der Versuchsplanung und Ergebnisauswertung über die TTG1-Funktion aufgedrängt hat. Zwar fehlen für diese Thesen noch fundierte Beweise, jedoch können sie wegweisend für zukünftige Experimente sein. Dabei scheint sich die Funktion von TTG1 ähnlichen WD40 Proteinen nicht nur auf Pflanzen zu beschränken. TTG1 ähnliche WD40-Proteine finden sich nicht nur in den pflanzlichen Genomen von Apfel, Hirse, Petunie, Schwarznessel und Reis (in der Reihenfolge der für die jeweiligen Proteine durch Sequenzkonservierung zugewiesenen blastp-Werte), sondern auch in den Genomen von Mensch, Maus, Frosch, Fliege und Wurm. Jedoch gibt es nur wenige orthologe Sequenzen in den beschriebenen pflanzlichen Genomen zu TTG1. Im Arabidopsis Genom finden sich für TTG1 (At5g24520) nur zwei weitere WD40-Proteine kodierende Gene mit signifikanter Sequenzhomologie (ATAN11, [At1g12910](#) und ein putativer transkriptioneller Regulator, [At3g26640](#)) - ebenso im Reisgenom, das nur zwei orthologe Sequenzen zu den TTG1-ähnlichen WD40-Proteinen aufweist (ein AN11-ähnliches Protein, OJ1123_G04, und ein TTG1-ähnlicher Faktor, PO415B12). Es gibt zwar viele WD-40 Wiederholungen enthaltende Proteine, aber weitere Faktoren (außer den oben aufgeführten) mit ausreichender Homologie im Hinblick auf mögliche bHLH-Interaktionsdomänen (evtl. im konservierten Aminoterminal) finden sich nicht. Die sich daraus ergebende eingeschränkte Kombinatorik steht im starken Kontrast zu den AtMYB und AtbHLH-Faktoren, die eine deutlich größere

Zahl an Kombinationsmöglichkeiten bieten und somit dem generellen Mechanismus durch TTG1 eine spezifische, regulatorische Komponente gegenüberstellen – insbesondere in der weiteren Interaktion mit *At*MYB-Transkriptionsfaktoren. Welche *At*bHLH-Faktoren jedoch überhaupt mit TTG1 interagieren können, ist in weiteren Hefe-2-Hybridstudien noch zu klären. Aufgrund der Sequenzkonservierung lassen sich zumindest die Gruppen IIId, e und f den potentiellen TTG1-Interaktoren zuordnen.

Neuere Daten zum Wirkort von TTG1 (persönliche Kommunikation, Baudry *et al.*, Ag Loic Lepiniec am Institut National de la Recherche Agronomique [INRA], Versailles) zeigen, dass zumindest die Translokalisierung von TTG1 in den Nukleus für eine vollständige Funktionalität notwendig ist. Transgene *ttg1-13*-Pflanzen, die ein *TTG1::GR*-Fusionskonstrukt exprimierten, zeigten erst nach Dexamethason-Behandlung und der damit verbundenen Translokalisationsmöglichkeit des Fusionskonstrukts in den Nukleus eine Komplementation des *ttg1*-Phänotyps. Dies beantwortet jedoch nicht die Frage, ob die Interaktion mit dem *At*bHLH-Faktor bereits im Cytoplasma oder erst im Nukleus stattfindet. Denn die *TTG1::GR*-Fusion könnte durchaus auch durch Bindung TT8 im Cytoplasma zurückhalten und erst nach Dexamethason-Behandlung im Komplex mit TT8 zur DNA gelangen. Ergänzend konnte die Arbeitsgruppe in Hefe-3-Hybridexperimenten zeigen, dass TT2/TT8 und TTG1 als trimärer Komplex an den *At*BAN-Promotor binden und bestätigten auch die Brückenbildung zwischen TTG1 und TT2 durch TT8, die ihrerseits nicht interagieren. Ebenso konnten sie eine Bindung von TT2 und TT8 an den Promotor nachweisen. Die Studien zur Promotoranalyse werden in Kürze veröffentlicht werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Funktion von TTG1 für die transkriptionelle Regulation bestimmter durch *At*bHLH- und *At*MYB-Faktoren regulierter Vorgänge, lassen jedoch weiterhin die Frage nach genauer Funktion und dem Interaktionsort von TTG1 mit TT8 offen. Jedoch erscheint eine stabilisierende Funktion vor dem Hintergrund der hier durchgeführten GFP-Experimente als wahrscheinlichste These.

Daher ist es wichtig, als nächstes den Ort der *At*bHLH/WD40-Interaktion zu lokalisieren. Die Ko-Expression eines *TTG1::GR*-Fusionskonstrukts mit einem *AtbHLH042/TT8::GFP*-Konstrukt „*in planta*“ könnte erste Hinweise liefern. Sollte TTG1::GR das TT8::GFP-Protein im Cytoplasma zurückhalten, könnte eine Verschiebung der Fluoreszenz gegenüber der Einzel-Expression von *TT8::GFP* zu

beobachten sein. Darüber hinaus legen die Resultate zum trimeren, DNA-bindenden TT2/TT8/TTG1-Komplex (Baudry *et al.*, unveröffentlicht) kombinierte Studien mit unterschiedlichen Fluoreszenzfusionen nahe (GFP, YFP, RFP), mit denen die Ko-Lokalisation der Interaktionspartner untersucht werden könnte. Es gibt noch zahlreiche weitere Aspekte, für die eine mögliche TTG1-Beteiligung untersucht werden muss, so z.B. die Auswirkungen, die TTG1 auf die AtMYB111 oder AtbHLH115 vermittelte Promotoraktivierung ausübt. Derartige Analysen könnten die Frage beantworten, ob möglicherweise doch AtbHLH- bzw. AtMYB-Interaktionspartner für die durch AtMYB111 bzw. AtbHLH-ZIP mitverantwortlich sind und weitere Experimente mit deletierten Promotorkonstrukten (Δ E-Box oder Δ MRE) ergänzen.

4.5 Ein regulatorisches Netzwerk aus TTG1 (WD40), bHLH und MYB-Transkriptionsfaktoren in der transkriptionellen Regulation zellulärer Differenzierung und des Sekundärstoffwechsels

Die vielfältigen pleiotropen Effekte des *ttg1*-Knockouts und die ubiquitäre TTG1-Expression in *Arabidopsis thaliana* ergeben in der Korrelation mit den unterschiedlichen Phänotypen für verschiedene AtbHLH-Knockouts eine übergeordnete, regulatorische Funktion für TTG1 bei der transkriptionellen Aktivierung durch AtbHLH und AtMYB-Faktoren. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit zur Regulation bestimmter Strukturgene der Flavonoid-Biosynthese untermauert. Dabei scheint die Spezifität der transkriptionellen Regulation durch die AtMYB-Transkriptionsfaktoren vermittelt zu werden, während den partiell redundanten AtbHLH-Faktoren eine Art Brückenfunktion zukommt. Bezüglich der Hierarchie der beteiligten Faktoren ergibt sich somit eine pyramidale Struktur, an deren Spitze TTG1 steht, wie sie auch kürzlich auch in Zhang *et al.* (2003) für die AtbHLH-Faktoren beschrieben wurde. In Abb. D2 werden die Ergebnisse dieser Arbeit diesem Modell gegenübergestellt. Darin zeigt sich, dass die Spezifität für die jeweilige regulatorische Funktion vom MYB-Faktor ausgeht, während die AtbHLH-Faktoren in ihren Funktionen überlappen. Die vermutete funktionelle Redundanz von TT8 mit GL3 und EGL1 (EGL3) bei der Interaktion mit PAP1/PAP2 und bei der Regulation von für die Anthocyanbiosynthese wichtigen Strukturgenen konnte so im Transfektionssystem ebenso bestätigt werden, wie die

möglichen Einflüsse von GL3 und EGL1 (EGL3) auf die Synthese der kondensierten Tannine. Das Transfektionssystem bietet somit eine geeignete Methode, um die aufgrund struktureller Homologie vermuteten Funktionen und möglichen synergistischen Effekte von *AtbHLH*-Faktoren mit *AtMYB*- und WD40-Faktoren effektiv und in einem „*in vivo*“ System testen zu können. So konnte die bisher nur vermutete direkte Beteiligung von TTG1 an der transkriptionellen Regulation bestimmter Strukturgene durch *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren zu ersten Mal experimentell gezeigt werden. Während die in Zhang *et al.* (2003) dargestellten Daten lediglich visuell phänotypische Effekte widerspiegeln, beruhen die im Transfektionssystem gemessenen Synergien tatsächlich auf der Regulation der relevanten Strukturgene. Wie oben schon angemerkt, ist es daher für die weitere Analyse der gezeigten Mutanten (Zhang *et al.*, 2003) dringend erforderlich, biochemische, HPLC gestützte Untersuchungen durchzuführen. Außerdem sollte zwischen den verschiedenen die untersuchten Biosynthesewege aktivierenden Umweltfaktoren (Licht, osmotischer Stress, Pthogenbefall) unterschieden sowie die tatsächliche Koexpression der Faktoren überprüft werden.

Allerdings könnte das TTG1-abhängige regulatorische Netzwerk wesentlich komplexer sein, als es in Abb. D2 dargestellt ist. Ergänzt durch die bereits gezeigten regulatorischen Effekte von *AtMYB12* und *AtMYB111*, deren Beeinflussung durch TTG1 allerdings erst noch gezeigt werden muss, sowie die mögliche Beteiligung weiterer *AtMYB*- und *AtbHLH*-Faktoren (*AtMYB113/114* bzw. *AtbHLH012/ATMYC1* und die *AtbHLH*-ZIP-Proteine) ergibt sich ein Netzwerk, für das es einer dreidimensionalen Darstellung bedarf. Dazu kommt noch die notwendige Unter-

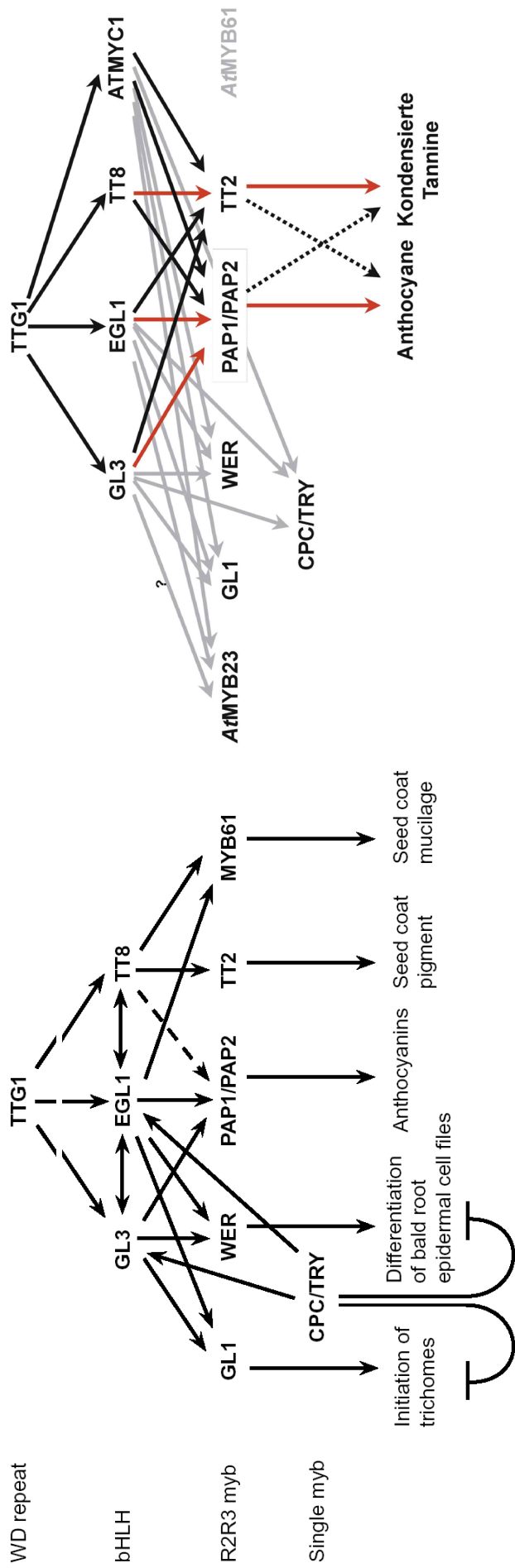


Abb. D2: Modell für das regulatorische Netzwerk von TTG1.

links: Modell aus Zhang et al., 2003 Das Modell fasst alle bekannten regulatorischen Faktoren zusammen, die im TTG1-abhängigen Regulationsweg eine Rolle spielen. Dabei sind die tatsächlich gezeigten Interaktionen mit durchgehenden Pfeilen dargestellt, die hypothetischen mit unterbrochenen Pfeilen. Das Modell illustriert deutlich die Redundanzen unter den AtbHLH-Faktoren, während TTG1 und die AtMYB-Faktoren eine klare Spezifität aufweisen.

rechts: Modell basierend auf den Daten dieser Arbeit: die schwarzen und roten Pfeile zeigen die im Transfektionssystem gemessenen synergistischen Effekte. Dabei stehen die roten Pfeile für die TF-Kombination, die die stärkste Aktivierung bewirkte (PAP1 bzw. PAP2 zusammen mit GL3 bzw. EGL1 bei der Regulation des *AtDFR*- und des *AtCHS*-Promotors; TT2 zusammen mit TT8 bei der Regulation des *AtBAN*-Promotors). Die gestrichelten Pfeile indizieren hier die gemessenen redundanten, wenn auch schwächeren synergistischen Effekte von PAP1/PAP2 auf den *AtBAN*-Promotor bzw. von TT2 auf die *AtCHS*- und *AtDFR*-Promotoren. Alle diese Interaktionen konnten auch im Hefe-2-Hybrid-System bestätigt werden (Zimmermann 2003) oder waren bereits zuvor beschrieben. Die grauen Pfeile indizieren die lediglich im Hefe-2-Hybrid-System gemessenen Interaktionen, die keine Auswirkungen auf die getesteten Strukturgen-Promotoren der Flavonoidbiosynthese im Transfektionssystem hatten. Die Interaktion GL3-AtMYB23 konnte bisher nicht experimentell bestätigt werden und ist daher mit einem Fragezeichen versehen. AtMYB61 ist grau dargestellt, da dieser Faktor nicht in die Analysen dieser Arbeit miteinbezogen wurde.

scheidung in lichtunabhängige und lichtinduzierte Regulation der Anthocyanbiosynthese, so dass der Rahmen eines einfachen Pfeildiagramms deutlich gesprengt würde. Jedoch stellt dieses Modell exemplarisch sehr gut die hierarchische Struktur der transkriptionellen Regulation durch *AtbHLH*- und *AtMYB*-Faktoren dar. Eine Übertragbarkeit auf andere Regulationswege (auch in anderen Organismen) muss zwar noch experimentell bestätigt werden, jedoch lassen das Vorhandensein von *TTG1*-Homologen in allen bisher sequenzierten Organismengenomen (und darüber hinaus) einen generellen regulatorischen Mechanismus erwarten. Die kürzlich analysierte Phylogenie der pflanzlichen bHLH-Faktoren zeigt, dass die Regulationsmechanismen durch *AtbHLH*-Faktoren schon recht früh in der Eukaryoten-Entwicklung entstanden sein müssen (vgl. Buck und Atchley, 2003). Vor diesem Hintergrund erscheint die Übertragbarkeit auf alle eukaryotischen Organismengruppen als wahrscheinlich und eröffnet neue Sichtweisen der transkriptionellen Regulation. Somit könnte durch einige Vertreter der WD40-Proteinfamilie die Definition des Transkriptionsfaktors um eine weitere Funktionssparte erweitert werden.

6 Zusammenfassung

Die Familie der basischen Helix-Schleifen-Helix-Transkriptionsfaktoren stellt mit 162 Vertretern eine der größten TF-Familien im Genom der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) dar. Die Kombination bioinformatischer und molekularbiologischer Methoden resultiert in der Verbesserung vieler bestehender Genannotationen und der Neuannotation bisher unidentifizierter Gene als *AtbHLH*-Transkriptionsfaktor. Die Vollständigkeit der heute vorliegenden Genomsequenz vorausgesetzt, repräsentieren diese 162 *AtbHLH*-Sequenzen die Gesamtheit der *AtbHLH* TF im *Arabidopsis* Genom, sofern der hier angelegte Suchkonsensus den *AtbHLH*-Sequenzen genügend Rechnung trägt. Die eingeführte generische Nomenklatur stellt ein eindeutiges und funktionsunabhängiges Identifikationskriterium für die *AtbHLH*-TF dar.

Die Faktoren weisen außerhalb der konservierten, namensgebenden bHLH-Domäne nur geringe Homologien auf, die, wenn vorhanden, auf wenige Vertreter beschränkt bleiben. Aufgrund der Sequenzkonservierung der bHLH-Domäne auf Proteinebene lassen sich die identifizierten *AtbHLH*-TF in 14 Gruppen einteilen, die außer in der Ähnlichkeit ihrer bHLH-Domäne, in ihrer Funktion, der ORF-Struktur, und ihrem möglichen DNA-Bindevverhalten korrelieren. Zusätzlich bestätigt sich die aufgrund struktureller Ähnlichkeit getroffenen Einteilung durch neuere phylogenetische Analysen zu den pflanzlichen bHLH-Faktoren (Atchley und Buck, 2003). Die wenigen vorhandenen Sequenzkonservierungen außerhalb der bHLH-Domäne finden sich in Sequenzbereichen, die in einzelnen Gruppen für die Protein-Protein-Interaktion (z.B. mit MYB- und WD40-Proteinen) relevant sind oder möglicherweise Aktivierungsdomänen darstellen (z.B. bei den *AtbHLH*-ZIP-TF). Daher erlaubt die strukturelle Einteilung nicht nur eine Vorhersage zu möglichen Funktionen der *AtbHLH*-Faktoren einer Gruppe, sondern eröffnet auch weitere experimentelle Ansätze zur Definition entscheidender Interaktionsdomänen. Die strukturelle Einteilung vereinfacht darüber hinaus die Identifikation redundanter Gene.

Die Interaktionsfähigkeit der *AtbHLH*-Proteine und die Synergien mit Vertretern anderer TF-Familien vergrößern zusätzlich die kombinatorischen und regulatorischen Möglichkeiten der *AtbHLH*-TF. Dennoch bleibt festzuhalten, dass einige *AtMYB*-TF nicht auf die Anwesenheit von *AtbHLH*-Proteinen angewiesen

sind, um zu einer transkriptionellen Aktivierung bestimmter Promotoren zu führen. Während diese Regulation spezifisch erscheint, sind die mit den AtbHLH-ZIP gemessenen Einzelfaktoraktivierungen eher unspezifisch. Für diese transkriptionelle Aktivierung könnte eine eigene putative Aktivierungsdomäne im äußersten Carboxyterminus der AtbHLH-ZIP-Proteine mitverantwortlich zu sein.

Dagegen zeigen die anderen zu einer Aktivierung führenden AtbHLH eine deutliche Abhängigkeit von AtMYB-Interaktionspartnern. Ob diese AtbHLH aufgrund des Fehlens einer eigenen Aktivierungsdomäne auf die MYB-Interaktion angewiesen sind, bleibt dabei unklar. Deutlich sind jedoch die Redundanzen auf Seiten der AtbHLH-Faktoren, während die AtMYB-Faktoren die Spezifität für den jeweiligen Promotor zu vermitteln scheinen. Sofern bei der Redundanz der ZmSn-ähnlichen AtbHLH-TF von Spezifität gesprochen werden kann, scheinen die aus einem Duplikationsvorgang hervorgegangenen Faktoren AtbHLH001/GL3 und AtbHLH002/EGL1 (EGL3) in Kombination mit AtMYB75/PAP1 und AtMYB90/PAP2 für die lichtunabhängige Regulation der Anthocyanbiosynthese verantwortlich zu sein, während die Regulation des Biosynthesewegs zu den kondensierten Tanninen der Kombination AtbHLH042/TT8 und AtMYB123/TT2 obliegt. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die in den Transfektionsexperimenten gemessenen Funktionen, erst noch durch den Nachweis der tatsächlichen Ko-Expression der beteiligten Gene „*in planta*“ bestätigt werden müssen. Die Ergebnisse aus den Transfektionsanalysen stellen jedoch den experimentellen Beweis der funktionellen Redundanz der ZmSn-ähnlichen AtbHLH-TF dar, der durch die phänotypischen Beobachtungen aus neusten Mutationsanalysen bestätigt wird (Zhang *et al.*, 2003).

Zusätzlich konnte zum ersten Mal der direkte Einfluß von TTG1 auf die AtbHLH/AtMYB regulierte transkriptionelle Aktivierung von Strukturgenen der Anthocyanbiosynthese gezeigt werden. Dabei handelt es sich um einen essentiellen Mechanismus, der über das Pflanzenreich hinaus konserviert sein könnte. Zumindest deutet das Vorhandensein homologer Gene in allen untersuchten Organismen darauf hin.

Für die 162 AtbHLH-TF sind erst wenige Funktionen gezeigt, jedoch dürfte nicht zuletzt auf Basis dieser Analyse im Kontext mit den großen Zahlen verfügbarer mutagenisierter *A. thaliana*-Linien die Identifikation weiterer Funktionen deutlich erleichtert werden. Nicht nur dass Rückschlüsse auf mögliche Redundanzen

erleichtert werden, sondern auch dass ein Großteil der AtbHLH-Faktoren jetzt überhaupt erst als solche identifiziert sind, dürfte die Versuchsplanung in vielen Bereichen erleichtern.

Ein erster Schritt ist mit der vorliegenden Analyse getan. Zukünftige Studien müssen jetzt den funktionellen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen AtbHLH, AtMYB evtl. WD40 und auch bisher nicht identifizierten Interaktionspartnern herstellen. Ein erster Schritt in diese Richtung sollten detaillierte Expressionsanalysen, Interaktionsstudien verbunden mit der exakten Identifikation der Interaktionsdomänen, Studien zum DNA-Bindevverhalten und Untersuchungen zu den tatsächlich regulierten Stoffwechselvorgängen „*in planta*“ sein. Somit bildet die Verbesserung der Annotation der Genfamilie der AtbHLH-TF (sowie die Annotation anderer Genfamilien in anderen Projekten) überhaupt erst die Voraussetzung dafür, die heute im Rahmen von „Transcriptomics“, „Proteomics“ und „Metabolomics“ verfügbaren Daten interpretierbar zu machen.

***„Sein und Wissen ist ein uferloses Meer: Je weiter wir vordringen,
um so unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt;
jeder Triumph des Wissens schließt hundert Bekenntnisse des
Nichtwissens in sich.“***

Isaac Newton

7 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). "Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling." *Plant Cell* **15**(1): 63-78.
- 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.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Research* **25**(17): 3389-402.
- 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.
- 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." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(10): 5172-5176.
- Atchley, W. R., Terhalle, W. und Dress, A. (1999). "Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain." *Journal of Molecular Evolution* **48**(5): 501-16.
- Bailey, T. L. und Elkan, C. (1994). "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers." *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*: 28-36.
- Baranowskij, N., Froberg, 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.
- Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. und Theissen, G. (2000). "MADS-Box gene diversity in seed plants 300 million years ago." *Molecular Biology and Evolution* **17**(10): 1425-1434.
- Bernhardt, C., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A. M. und Schiefelbein, J. W. (2001). Two bHLH genes are involved in Arabidopsis root epidermis cell specification. 12th International Conference on Arabidopsis Research, Madison, Wisconsin.
- Bies, J., Feikova, S., Markus, J. und Wolff, L. (2001). "Phosphorylation-dependent conformation and proteolytic stability of c-Myb." *Blood Cells Mol Dis* **27**(2): 422-8.
- Bilaud, T., Koering, C. E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S. M. und Gilson, E. (1996). "The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human." *Nucleic Acids Research* **24**(7): 1294-1303.

- Blanc, G., Hokamp, K. und Wolfe, K. H.** (2003). "A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome." Genome Res **13**(2): 137-44.
- 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.
- Buck, M. J. und Atchley, W. R.** (2003). "Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins." J Mol Evol **56**(6): 742-50.
- Burr, F. A., Burr, B., Scheffler, B. E., Blewitt, M., Wienand, U. und Matz, E. C.** (1996). "The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *r1-b1* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing." The Plant Cell **8**(8): 1249-1259.
- 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.
- 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.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. H., Hong, X., Agarwal, M. und Zhu, J. K.** (2003). "ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis." Genes Dev **17**(8): 1043-54.
- 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.
- Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G. und Tonelli, C.** (1993). "Molecular homology among members of the *R* gene family in maize." The Plant Journal **3**(2): 335-346.
- Consonni, G., Ronchi, A., Pilu, R., Gavazzi, G., Dellaporta, S. L. und Tonelli, C.** (1997). "Ectopic anthocyanin pigmentation in maize as a tool for defining interactions between homologous regulatory factors." Molecular General Genetics **256**(3): 265-276.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibensouda, S. und Vincent, A.** (1996). "Collier, a novel regulator of Drosophila head development, is expressed in a single mitotic domain." Curr Biol **6**(6): 707-18.

- Dang, C. V., Dolde, C., Gillison, M. L. und Kato, G. J.** (1992). "Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 599-602.
- Dangl, J. L., Hauffe, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1987). "Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor." The EMBO Journal **6**: 2551-2556.
- de Pater, S., Pham, K., Memelink, J. und Kijne, J.** (1997). "RAP-1 is an *Arabidopsis* MYC-like R protein homologue, that binds to G-box sequence motifs." Plant Molecular Biology **34**(1): 169-174.
- 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., Leon-Kloosterziel, K. und Koornneef, M.** (2000). "Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*." Plant Physiology **122**(2): 403-414.
- 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.
- Dunlap, J. C.** (1998). "Common threads in eukaryotic circadian systems." Curr Opin Genet Dev **8**(4): 400-6.
- Fairchild, C. D., Schumaker, M. A. und Quail, P. H.** (2000). "HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction." Genes & Development **14**(18): 2377-2391.
- Fairman, R., Beran-Steed, R. K., Anthony-Cahill, S. J., Lear, J. D., Stafford, W. F., 3rd, DeGrado, W. F., Benfield, P. A. und Brenner, S. L.** (1993). "Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10429-33.
- 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.
- Felsenstein, J.** (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Seattle, Distributed by the author: University of Washington, Seattle.
- Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G. und Burley, S. K.** (1994). "Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF." The EMBO Journal **13**: 180-189.
- Fisher, A. und Caudy, M.** (1998). "The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions." Bioessays **20**(4): 298-306.
- Frampton, J., Leutz, A., Gibson, T. J. und Graf, T.** (1989). "DNA-binding domain ancestry." Nature **342**: 134.

- Frankel, A. D. und Kim, P. S.** (1991). "Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation." Cell **65**: 717-719.
- Freiman, R. N. und Tjian, R.** (2003). "Regulating the regulators: lysine modifications make their mark." Cell **112**(1): 11-7.
- Friedrichsen, D. M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J. N., Alonso, J., Ecker, J. R., Furuya, M. und Chory, J.** (2002). "Three Redundant Brassinosteroid Early Response Genes Encode Putative bHLH Transcription Factors Required for Normal Growth." Genetics **162**(3): 1445-56.
- Gabrielsen, O. S., Sentenac, A. und Fromageot, P.** (1991). "Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif." Science **253**: 1140-1143.
- Galego, L. und Almeida, J.** (2002). "Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers." Genes Dev **16**(7): 880-91.
- Ganter, B., Chao, S. T. und Lipsick, J. S.** (1999). "Transcriptional activation by the myb proteins requires a specific local promoter structure." FEBS Lett **460**(3): 401-10.
- Ganter, B. und Lipsick, J. S.** (1999). "Myb and oncogenesis." Adv Cancer Res **76**: 21-60.
- 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**: 864-675.
- 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., Gough, N. M., Dunn, A. R. und de Blaquiére, J.** (1985). "Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine *myb* proto-oncogene." The EMBO Journal **4**: 2003-2008.
- Goode, B. L. und Feinstein, S. C.** (1992). "'Speedprep' purification of template for double stranded DNA sequencing." Biotechnology **12**(3): 148-149.
- Graf, T.** (1992). "Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells." Current Opinion in Genetics and Development **2**: 249-255.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. und Eisenman, R. N.** (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 653-99.
- Green, R. M. und Tobin, E. M.** (1999). "Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 4176-4179.
- Green, R. M. und Tobin, E. M.** (2002). "The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock." Dev Cell **2**(5): 516-8.
- 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., 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.
- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A. P., Steinbiß, H. H., Herrera-Estrella, L. und Schell, J.** (1985). "Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts." Molecular General Genetics **199**: 161-168.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**: 557-580.
- 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." The EMBO Journal **19**(18): 4997-5006.
- 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.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. und Bailey, P. C.** (2003). "The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity." Mol Biol Evol **20**(5): 735-47.
- Heisler, M. G., Atkinson, A., Bylstra, Y. H., Walsh, R. und Smyth, D. R.** (2001). "SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein." Development **128**(7): 1089-1098.
- 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.
- Huq, E. und Quail, P. H.** (2002). "PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis." Embo J **21**(10): 2441-2450.
- Hwang, M. G., Chung, I. K., Kang, B. G. und Cho, M. H.** (2001). "Sequence-specific binding property of Arabidopsis thaliana telomeric DNA binding protein 1 (AtTBP1)." FEBS Lett **503**(1): 35-40.
- 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.
- 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.
- Jakoby, M., Droege-Laser, W., Kroj, T., Tiedemann, J., Vicente-Carbajosa, J., Weisshaar, B. und Parcy, F.** (2002). "The bZIP family of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*." Trends in Plant Science **7**: 106-111.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. und Hirsh, D.** (1986). "b-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**: 8447-8451.

- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrrens, 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.
- Jin, H. und Martin, C.** (1999). "Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family." Plant Molecular Biology **41**(5): 577-585.
- Johnson, C. S., Kolevski, B. und Smyth, D. R.** (2002). "TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor." The Plant Cell **14**: 1359-1375.
- Kang, H. G., Foley, R. C., Onate-Sanchez, L., Lin, C. und Singh, K. B.** (2003). "Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid." Plant J **35**(3): 362-72.
- Kay, S. A.** (1997). "PAS, present, and future: clues to the origins of circadian clocks." Science **276**(5313): 753-754.
- 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." Plant J **30**(6): 711-9.
- Kirik, V., Kolle, K., Misera, S. und Baumlein, H.** (1998). "Two novel *MYB* homologues with changed expression in late embryogenesis-defective *Arabidopsis* mutants." Plant Molecular Biology **37**(5): 819-827.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hülskamp, M. und Baumlein, H.** (2001). "Ectopic expression of the Arabidopsis AtMYB23 gene induces differentiation of trichome cells." Developmental Biology **235**(2): 366-377.
- 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.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector." Molecular General Genetics **204**: 383-396.
- Koornneef, M.** (1981). "The complex syndrome of ttg mutants." Arabidopsis Information Services **18**: 45-51.
- Koornneef, M.** (1990). "Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*." Arabidopsis Information Services **27**: 1-4.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, 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.
- 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.

- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M. A. und Lipinski, M. (1995). "A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region." Hum Mol Genet **4**(5): 791-9.
- Ledent, V., Paquet, O. und Vervoort, M. (2002). "Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins." Genome Biology **3**(6): research0030.1-0030.18.
- Ledent, V. und Vervoort, M. (2001). "The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis." Genome Research **11**(5): 754-770.
- 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.
- Lipphardt, S., Brettschneider, R., Kreuzaler, F., Schell, J. und Dangl, J. L. (1988). "UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Anthirrhinum majus* chalcone synthase gene." The EMBO Journal **7**(13): 4027-4033.
- Lipsick, J. S. (1996). "One billion years of Myb." Oncogene **13**: 223-235.
- Littlewood, T. D. und Evan, G. I. (1998). Basic Helix-Loop-Helix transcription factors. Oxford, Oxford University Press.
- 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.
- Ludwig, S. R., Bowen, B., Beach, L. und Wessler, S. R. (1990). "A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation." Science **247**: 449-450.
- 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. und Eisenman, R. N. (1990). "New light on Myc and Myb." Genes & Development **4**: 2235-2241.
- Ma, P. C. M., Rould, M. A., Weintraub, H. und Pabo, C. O. (1994). "Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation." Cell **77**: 451-459.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T. und Mizuno, T. (2002). "The APRR1/TOC1 Quintet Implicated in Circadian Rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-Overexpressing Plants." Plant & Cell Physiology **43**(1): 58-69.
- Marocco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Ares, J., Saedler, H., Salamini, F. und Rohde, W. (1989). "Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the *myb* oncoproteins." Molecular General Genetics **216**: 183-187.
- Martin, C. und Paz-Ares, J. (1997). "MYB transcription factors in plants." Trends in Genetics **13**(2): 67-73.
- 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.

- Massari, M. E. und Murre, C.** (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-40.
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. und Mizuno, T.** (2000). "Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock." Plant Cell Physiol **41**(9): 1002-12.
- 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*." Universität zu Köln. Köln, Germany
- Mehrtens, Frank** (2003). Dissertation, Universität zu Köln, Köln
- Meinke, D. W., Meinke, L. K., Showalter, T. C., Schissel, A. M., Mueller, L. A. und Tzafrir, I.** (2003). "A sequence-based map of *Arabidopsis* genes with mutant phenotypes." Plant Physiol **131**(2): 409-18.
- Melcher, K. und Johnston, S. A.** (1995). "GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators." Mol Cell Biol **15**(5): 2839-48.
- Mol, J., Grotewold, E. und Koes, R.** (1998). "How genes paint flowers and seeds." Trends in Plant Science **3**(6): 212-217.
- 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.
- 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.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods in Enzymology **155**: 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). "A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." Physiol. Plant. **15**: 473-497.
- Murre, C., McCaw, P. S. und Baltimore, D.** (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins." Cell **56**: 777-783.
- Murzin, A. G.** (1992). "Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for seven-fold symmetry." Proteins **14**(2): 191-201.
- Nair, S. K. und Burley, S. K.** (2000). "Recognizing DNA in the library." Nature **404**(6779): 715, 717-8.
- Nair, S. K. und Burley, S. K.** (2003). "X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors." Cell **112**(2): 193-205.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. und Smith, T. F.** (1994). "The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins." Nature **371**: 297-300.
- Nelson, H. C. M.** (1995). "Structure and function of DNA-binding proteins." Current Opinion in Genetics and Development **5**: 180-189.

- 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.
- Neuffer, M. G., Coe, E. H., Jun. und Wessler, S. R. (1997). Mutants of Maize. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ni, M., Tepperman, J. M. und Quail, P. H. (1998). "PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein." Cell **95**(5): 657-667.
- Ni, M., Tepperman, J. M. und Quail, P. H. (1999). "Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light." Nature **400**(6746): 781-4.
- 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): 3017-3333.
- 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.
- Osterlund, M. T., Wei, N. und Deng, X. W. (2000). "The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development." Plant Physiol **124**(4): 1520-4.
- Pabo, C. O. und Sauer, R. T. (1992). "Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition." Annual Reviews of Biochemistry **61**: 1053-1095.
- Payne, C. T., Zhang, F. und Lloyd, A. M. (2000). "GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1." Genetics **156**: 1349-1362.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A. und Saedler, H. (1987). "The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators." The EMBO Journal **6**(12): 3553-3558.

- Penfield, S., Meissner, R. C., Shoue, D. A., Carpita, N. C. und Bevan, M. W.** (2001). "MYB61 Is Required for Mucilage Deposition and Extrusion in the Arabidopsis Seed Coat." The Plant Cell **13**(12): 2777-2791.
- Petroni, K., Cominelli, E., Consonni, G., Gusmaroli, G., Gavazzi, G. und Tonelli, C.** (2000). "The developmental expression of the maize regulatory gene Hopi determines germination-dependent anthocyanin accumulation." Genetics **155**(1): 323-336.
- Petrovas, C., Jeay, S., Lewis, R. E. und Sonenshein, G. E.** (2003). "B-Myb repressor function is regulated by cyclin A phosphorylation and sequences within the C-terminal domain." Oncogene **22**(13): 2011-20.
- Peyrefitte, S., Kahn, D. und Haenlin, M.** (2001). "New members of the Drosophila Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loop-helix genes." Mech Dev **104**(1-2): 99-104.
- Piechulla, B.** (1999). "Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants." Chronobiol Int **16**(2): 115-28.
- Ptashne, M.** (1988). "How eukaryotic transcriptional activators work." Nature **335**: 683-689.
- Quail, P. H.** (2000). "Phytochrome-interacting factors." Semin Cell Dev Biol **11**(6): 457-66.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. und Wagner, D.** (1995). "Phytochromes: photosensory perception and signal transduction." Science **268**: 675-680.
- Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J. und Koes, R.** (1999). "Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of Petunia and its role in the evolution of flower color." The Plant Cell **11**: 1433-1444.
- 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.
- Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R. und Murre, C.** (1993). "A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells." Molecular and Cellular Biology **13**(2): 792-800.
- Rajani, S. und Sundaresan, V.** (2001). "The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence." Current Biology **11**(24): 1914-1922.
- 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.
- Riechmann, J. L. und Meyerowitz, E. M.** (1998). "The AP2/EREBP family of plant transcription factors." Biological Chemistry **379**(6): 633-646.
- Robinson, K. A. und Lopes, J. M.** (2000). "SURVEY AND SUMMARY: Saccharomyces cerevisiae basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes." Nucleic Acids Research **28**(7): 1499-1505.

- Roeder, R. G.** (1991). "The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly." Trends in Biochemical Sciences **16**: 402-408.
- Roeder, R. G.** (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." Trends Biochem Sci **21**(9): 327-35.
- 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.
- Roth, B. A., Goff, S. A., Klein, T. M. und Fromm, M. E.** (1991). "C1- and R-dependent expression of the maize *Bz1* gene requires sequences with homology to mammalian *myb* and *myc* binding sites." The Plant Cell **3**: 317-325.
- Rounsley, S. D., Glodek, A., Sutton, G., Adams, M. D., Somerville, C. R., Venter, J. C. und Kerlavage, A. R.** (1996). "The construction of Arabidopsis expressed sequence tag assemblies. A new resource to facilitate gene identification." Plant Physiol **112**(3): 1177-83.
- 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): 138-149.
- 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., 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawa, S.** (2002). "Overexpression of the *AtmybL2* gene represses trichome development in *Arabidopsis*." DNA Res **9**(2): 31-4.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I. A. und Coupland, G.** (1998). "The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering." Cell **93**(7): 1219-1229.
- Schneeberger, R., Tsiantis, M., Freeling, M. und Langdale, J. A.** (1998). "The rough sheath2 gene negatively regulates homeobox gene expression during maize leaf development." Development **125**(15): 2857-65.
- Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jurgens, G. und Hulskamp, M.** (1999). "Generation of a spacing pattern: the role of triptychon in trichome patterning in *Arabidopsis*." Plant Cell **11**(6): 1105-16.

- 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.
- Sheen, J.** (2001). "Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts." Plant Physiol **127**(4): 1466-75.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y. und Hakoshima, T.** (1997). "Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition." Embo J **16**(15): 4689-97.
- 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.
- Singh, H., Clerc, R. G. und LeBowitz, J. H.** (1989). "Molecular cloning of sequence-specific DNA binding proteins using recognition site probes." BioTechniques **7**: 252-261.
- Smolen, G. A., Pawlowski, L., Wilensky, S. E. und Bender, J.** (2002). "Dominant alleles of the basic helix-loop-helix transcription factor ATR2 activate stress-responsive genes in *Arabidopsis*." Genetics **161**(3): 1235-46.
- 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., Avila, J., Canas, L., Diaz, I. und Paz-Ares, J.** (1995). "Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*." The EMBO Journal **14**: 1773-1784.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. und Sigler, P. B.** (1996). "Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution." Nature **379**(6563): 369-74.
- Sorensen, A. M., Krober, S., Unte, U. S., Huijser, P., Dekker, K. und Saedler, H.** (2003). "The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor." Plant J **33**(2): 413-23.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N. M. und Koes, R.** (2000). "anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes." The Plant Cell **12**(9): 1619-1631.
- Sprenger-Haussels, M. und Weisshaar, B.** (2000). "Transactivation properties of parsley proline rich bZIP transcription factors." The Plant Journal **22**(1): 1-8.
- 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.

- Taiz, L. und Zeiger, E.** (2000). Die Flavonoidbiosynthese. Pflanzenphysiologie. Heidelberg, Spektrum-Verlag. **1.deutsche Auflage:** 360ff.
- Taylor, L. P. und Jorgensen, R.** (1992). "Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia." Journal of Heredity **83**(N1): 11-17.
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. C. und Kirchhausen, T.** (1998). "Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker." Cell **95**(4): 563-73.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 796-815.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J.** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Research **22**: 4673-4680.
- Thompson, M. A. und Ramsay, R. G.** (1995). "Myb: an old oncoprotein with new roles." Bioessays **17**(4): 341-350.
- 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.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. und Quail, P. H.** (2003). "The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family." Plant Cell **15**(8): 1749-70.
- Tonelli, C., Dolfini, S., Ronchi, A., Consonni, G. und Gavazzi, G.** (1994). "Light inducibility and tissue specificity of the *R* gene family in maize." Genetica **94**: 225-234.
- 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.
- Urao, T., Noji, M., Yamaguchishinozaki, K. und Shinozaki, K.** (1996). "A transcriptional activation domain of ATMYB2, a drought-inducible Arabidopsis Myb-related protein." The Plant Journal **10**(6): 1145-1148.
- 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., Brouwer, M., Spelt, C. E., Mol, J. N. M. und Stuitje, A. R.** (1992). "The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative *cis*-acting module in the control of organ-specific expression." The Plant Journal **2**(N4): 525-535.
- 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.
- 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, 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.
- Wang, Z. Y. und Tobin, E. M.** (1998). "Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression." Cell **93**(7): 1207-17.
- Weston, K.** (1992). "Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins." Nucleic Acids Research **20**: 3043-3049.
- 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 promoter/Gus genes in transgenic tobacco." The Plant Journal **4**(N3): 411-422.
- Wolberger, C.** (1999). "Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation." Annu Rev Biophys Biomol Struct **28**: 29-56.
- 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.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Mizuno, T.** (2003). "A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **44**(6): 619-29.
- Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollman, P. C. H., Mol, J. N. M. und van Tunen, A. J.** (1994). "Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth." The Plant Journal **6**(N2): 201-212.
- 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.
- Zawel, I. und Reinberg, D.** (1993). "Initiation of Transcription by RNA Polymerase II: A Multi Step Process." Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **44**: 67-108.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C. T. und Lloyd, A.** (2003). "A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis." Development **130**(20): 4859-69.

- Zhu, Y., Tepperman, J. M., Fairchild, C. D. und Quail, P. H.** (2000). "Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13419-24.
- Zimmermann, I.** (2003). Dissertation, "Systematische Untersuchungen von Proteininteraktionen der MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*." Universität zu Köln. Köln

8. Anhang

8.1 Konsensus-Sequenzen konservierter Motive außerhalb der bHLH-Domäne (vgl. Tab. R1)

MOTIF1 = [KRL]-[RS]-[RK]-[RK]-[TRPA]-[RK]-X₂-K-[NT]-X-[EDV]-[ED]-[VIAK]-E-[NS]
 MOTIF2 = E-[ASP]-[QKEP]-[KLV]-[RKHQ]
 MOTIF3 = [DEKN]-[VIL]-E-[VA]-[TK]-[VLIMF]-[EGQ]-X-[HND]-[VA]-X-[LI]-[KR]-[IVT]-[LVMQR]-[SCTA]-[KRETH]-[RKT]-X₁₋₁₂-
 [PQKV]-[GRP]-[QL]-[LIV]-[LIMVSF]-[KR]-X-[IV]-X₂-[LIF]-[EQN]-X-L-X-[LF]-[TSQEA]-[ILVT]-L-[HQ]-[LVT]-[NST]-[IVL]-
 [TSN]-[TS]-X₄₋₅-[VIMAS]-[LIS]-[YFN]-[STF]-[FI]-[SNTV]-[VLIA]-[KR]-[VMIA]
 MOTIF4 = C-F-D-P-N
 MOTIF5 = G-S-[TN]-[ST]-N-S
 MOTIF6 = P-D-L-L-S-L-L-[HQ]-L-P-R-[CS]-S
 MOTIF7 = Y-D-P-L-F-H-L-N-[FL]-P-X-Q-P
 MOTIF8 = R-K-G-R-G
 MOTIF9 = S-S-X-[SA]-X-P-[PT]-L
 MOTIF10 = [KR]-P-G-L-[LV]₂-[SA]-T-[VM]-[RNS]-[TA]-L-[ED]-[TN]-L-G-L-[DE]-[VI]-[QE]-Q-[CA]-V-I-S-C-F-[SN]-[DG]-F-[SA]-
 L-X₂₆-A-G-Y-[GA]-G
 MOTIF11 = L-[QNRKP]-[QKNG]-[RKHQLG]-L-X₂-[VLAS]-[VIL]-[EDRQN]-X₃₋₈-W-[STAND]-Y-[ASGV]-[IVL]-F-W-[QSKL]-X₆₋₁₈-
 [VLIY]-L-X-W-[GV]-[DEN]-G-[YHCV]-[YCF]-[KNRCT]-[GEV]
 MOTIF12 = [QDK]-[EDT]-X-[RKY]-[KRST]-[VN]-[LIS]-[RQI]-[EK]-[LC]-X₂-[LMS]-[IFM]-[SGDV]-G-[GSE]
 MOTIF13 = [EDGV]-[DEARK]-[VL]-[TSA]-[DEA]-[TLME]-[ED]-[WMLI]-[FY]-[YFL]-[LA]-[VAMS]-[SC]-[MVFL]-[STY]-[FQYWG]-
 [SVFE]-[FD]-X₂-[GDSP]-X₁₋₃-[GCV]-[GLMI]-[PA]-[GRA]-[KRGQE]-[ACSTE]-[FYLV]-[ASVL]-[SNTDR]-X₃-[VIL]-[WL]-
 [LVA]-[STCA]-[GND]-[ASPLV]
 MOTIF14 = R-[SA]-X-[LMQE]-[AG]-[KRGQ]-[SVIFD]-[AYFVH]-[GSKA]-[ILVMF]-[QHRK]-T-[VIML]-[VLA]-[CSLM]-[IVF]-[PA]-X₃-
 G-[VI]-[VLI]-E-[LIV]-[GA]-[STV]-[TSVL]-[EKSRW]-X-[ILV]-X-[EQP]-X₃-[LVFS]-[IVLMF]-X₂-[VIT]-[KRQDN]-[STAFI]-
 [LVIFCS]-[FL]
 MOTIF15 = [KR]-[PG]-[RK]-K-R-G-R-[KR]-A-[NH]-G-R-[EDA]
 MOTIF16 = D-D-[ND]-[AL]-[SL]-X₁₋₃-[MI]-E-A-[FL]-[IML]-X₁₋₂-[SGT]-[SDN]-[DPH]-[HIS]-[SP]-[STP]-L-[FWL]-P
 MOTIF17 = L-[DE]-L-E-V-N-H-A-S-[LMI]-S-V-[VM]-N-D-L-M-I-Q-Q-A-[TN]-V-K-M-G
 MOTIF18 = L-[ERQ]-[RK]-S-[EKQ]-[QE]-L-[RS]-[EK]-L-Y-[EL]-[ST]-[LM]-[SL]-X-[GA]-[ED]-S
 MOTIF19 = S-S-F-[TAL]-[RT]-W-[KR]-X-[SCE]-[SNE]-[SQG]-X₇₋₁₁-S-Q-X-[VM]-[LI]-[KR]-[KQ]-[IM]-[LI]-[FH]-[DER]-V-P
 MOTIF20 = S-[MIV]-[VI]-L-V-K-[KR]-S-[KQS]-[LV]-[VIYF]-[LF]-D-[DE]
 MOTIF21 = [LM]-P-[EM]-I-E-[VA]-[RK]-[VIF]-S-X₂-D-[VIL]-L-I-[KR]-[IV]-[LH]-C-E-K-X-K-G. MOTIF22 = S-[RKG]-K-R-X-[RK]-
 [Tc]-[GE]-S-[CS]-[ST]
 MOTIF23 = M-W-[QSH]-[FYP]-[ML]-P-[PQ]-[AS]-X-[VR]-D-T-S-[QR]-D-[HLQ]-X-[LN]-[RL]-P-P-[VA]-A
 MOTIF24 = [KR]-A-[LE]-[AS]
 MOTIF25 = P-[TS]-[EL]-[TSCAE]-D-[ED]-[ILV]-[TS]-[VL]
 MOTIF26 = S-[FL]-[CS]-C-[EQS]-D-[RQ]-[SPTE]-[DEG]-[LA]-[LMI]-X-[DE]-[LIVM]-[IMA]-X₂-[LM]-[KT]-[SAK]-[LMV]-[KRE]-[TA]-
 [LIV]-[KRQF]-A-[ED]-[IM]-X-[TS]-[VI]-G-G-R-[Tvm]-[KR]
 MOTIF27 = [AS]-L-K-[ASQ]-[VLS]-[LIMV]-[ECN]
 MOTIF28 = EDQV-[DEQ]-[DE]-[ILVY]-[VM]-E-L-[LV]-[WFGC]-X₂-[GS]-Q-[VI]-[VLS]
 MOTIF29 = [SLPDN]-[SVFG]-[TSRELN]-[KRM]-[REN]-[SKVNC]-[RPI]
 MOTIF30 = [MLI]-[AGD]-[AQ]-M-[KR]-E-M-[IMQ]-[YF]-[RKM]-[IA]-A-[VA]-[MF]-[QR]-[PS]-[VI]-X-[IF]-[DG]-[PL]-[EA]-X-[V]-[KPE]-
 [KP]-P-[KN]-R-[RK]-N-V-[RK]-I
 MOTIF31 = G-K-[TI]-[RK]-[AP]-X₃₋₄-[SAT]
 MOTIF32 = [SA]-[STA]-D-[DE]-[LF]-W-[MP]
 MOTIF33 = D-S-[VI]-[PA]-[CF]-[RK]-[VIA]-R-A-K-R-G-[CF]
 MOTIF34 = [KA]-[KRG]-[PKRA]
 MOTIF35 = [DE]-L-[RS]-[SG]-[RH]-G-L-C-L-[VM]-P-[IVL]-S
 MOTIF36 = [RK]-[Pt]-[RK]-[VI]-R-A-R-R-G-Q
 MOTIF37 = S-M-S-R-L-G-G-A
 MOTIF38 = T-E-X-[QR]-V-A-K-L-M-E-E-[DN]-[MV]-G-[SA]-A-M-Q-[YL]-L-Q-[GS]-K-[GA]-L-C-[LIM]-M-P-I-S-L-A-[TM]-[At]-I
 MOTIF39 = [DEGPN]-[YV]-[IV]-H-[VM]-R-A-[RK]-R-G-[QE]
 MOTIF40 = S-M-[KR]-L-[ASTE]-[ATVI]-[VAIL]-X₂₋₃-[LMYPS]-[DENT]-[FLIPGC]-[NDGPAH]-[LVIMSAT]-[DELNI]

8.2 Ermittelte AS-Frequenzen innerhalb der AfbHLH-Domäne

Die erste Ziffer (>1, >2, >3 usw.) gibt die jeweilige Position im AfbHLH-Konsensus an. Darauf folgen jeweils durch Semikola getrennt die Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code und deren Häufigkeit an dieser Position in Prozent.

```
>1
A;29;K;12,3;E;11,1;Q;9,9;S;8,6;R;7,4;P;3,7;T;2,5;D;2,5;L;2,5;I;1,9;G;1,9;N;
1,9;M;1,2;F;1,2;C;0,6;H;0,6;-;0,6;V;0,6;

>2
T;26,5;K;15,4;A;13;R;11,7;S;10,5;P;8;L;3,7;Q;1,9;D;1,9;V;1,9;G;1,2;E;1,2;N;
0,6;H;0,6;C;0,6;-;0,6;I;0,6;

>3
D;20,4;S;14,8;L;11,1;M;7,4;E;7,4;R;6,8;G;6,2;A;5,6;K;4,3;H;3,7;N;3,1;Q;2,5;
P;2,5;I;1,9;V;1,2;T;0,6;W;0,6;

>4
S;24,1;P;14,8;N;11,7;K;11,1;R;6,2;T;6,2;V;4,3;E;3,7;D;3,7;Q;3,7;M;3,1;A;1,9;
L;1,9;G;1,2;I;1,2;H;0,6;F;0,6;

>5
H;51,9;Q;9,3;N;6,8;S;6,8;K;6,2;R;4,3;P;3,1;L;3,1;G;1,9;T;1,9;I;1,2;V;1,2;Y;
1,2;A;0,6;D;0,6;

>6
S;34,6;N;11,1;L;9,3;V;9,3;I;8;A;5,6;R;4,9;K;4,3;T;3,1;F;2,5;G;1,9;M;1,2;Q;1,
2;D;1,2;E;0,6;C;0,6;P;0,6;

>7
L;24,7;E;13,6;I;11,1;A;9,3;V;7,4;S;6,2;P;4,9;M;3,7;R;3,7;G;3,1;C;2,5;T;2,5;
D;1,9;N;1,2;Q;1,2;F;1,2;K;0,6;H;0,6;W;0,6;

>8
A;42;S;16;T;9,3;V;8;R;4,9;L;3,1;I;3,1;P;3,1;Y;3,1;K;1,9;G;1,2;N;1,2;D;1,2;E;
1,2;M;0,6;

>9
E;70,4;A;9,9;S;4,3;R;3,7;F;3,1;K;1,9;N;1,9;D;1,2;L;1,2;G;0,6;P;0,6;I;0,6;M;
0,6;

>10
R;71;K;17,3;Q;3,1;P;2,5;E;1,9;G;1,2;A;1,2;I;0,6;M;0,6;N;0,6;

>11
R;18,5;K;16;V;13,6;N;10,5;Q;9,9;L;7,4;E;6,2;A;4,3;I;3,7;D;2,5;H;1,9;S;1,9;G;
1,2;T;1,2;M;0,6;-;0,6;

>12
R;86,4;K;3,1;S;2,5;D;2,5;G;1,9;P;1,2;Q;0,6;E;0,6;A;0,6;T;0,6;

>13
R;82,7;K;8,6;D;2,5;L;1,9;E;1,9;A;0,6;I;0,6;C;0,6;S;0,6;

>14
E;43,8;D;10,5;K;9,3;Q;8;R;8;S;3,7;T;3,7;G;3,1;P;2,5;A;1,9;N;1,2;M;1,2;V;1,2;
H;0,6;C;0,6;L;0,6;

>15
K;46,3;R;27,8;Q;9,3;E;4,9;A;2,5;H;2,5;L;1,9;M;1,2;D;1,2;N;0,6;G;0,6;S;0,6;V;
0,6;

>16
I;51,2;L;26,5;M;13;V;4,9;F;2,5;E;0,6;N;0,6;Q;0,6;

>17
N;49,4;S;17,9;A;6,8;G;6,2;K;4,9;R;3,1;Q;3,1;T;3,1;H;2,5;E;1,9;I;0,6;F;0,6;

>18
E;42,6;D;20,4;Q;9,3;S;6,2;R;3,7;T;3,7;K;3,1;G;2,5;A;2,5;N;1,9;H;1,9;I;1,2;C;
0,6;V;0,6;

>19
R;52,5;K;18,5;L;9,3;H;8;A;2,5;M;2,5;Q;2,5;S;1,9;Y;1,2;F;0,6;T;0,6;

>20
L;24,7;F;24,1;M;22,8;I;16;V;5,6;Y;4,3;T;1,9;A;0,6;
```

>21
 K;25,9;R;17,3;S;9,9;A;8,6;Y;8;T;5,6;M;3,7;Q;3,7;N;3,1;I;3,1;L;2,5;F;2,5;E;1,9;V;1,9;G;1,2;D;0,6;H;0,6;
 >22
 A;23,5;S;12,3;T;11,1;I;9,9;K;9,3;E;7,4;V;7,4;L;4,9;D;3,1;C;2,5;M;2,5;F;1,9;R;1,9;G;1,2;Q;0,6;Y;0,6;
 >23
 L;100;
 >24
 Q;40,1;R;37;G;5,6;K;5,6;S;4,9;H;3,1;E;1,9;M;0,6;A;0,6;I;0,6;
 >25
 S;25,9;E;15,4;D;11,1;Q;11,1;A;9,3;N;7,4;K;6,2;R;5,6;T;3,7;G;1,9;L;0,6;H;0,6;V;0,6;Y;0,6;
 >26
 L;64,2;I;13,6;V;13;M;3,7;C;1,9;H;1,2;Q;0,6;S;0,6;T;0,6;A;0,6;
 >27
 V;53,1;L;24,1;I;16;M;5,6;T;1,2;
 >28
 P;87,7;S;8;E;3,1;D;1,2;
 >29
 N;29;G;25,9;P;13,6;L;4,3;S;3,7;K;3,7;R;3,7;E;2,5;C;2,5;T;2,5;H;1,9;F;1,9;Q;1,9;A;1,2;I;0,6;D;0,6;W;0,6;
 >30
 C;19,8;G;17,3;S;10,5;I;9,9;V;6,2;F;6,2;L;4,9;M;3,7;P;3,1;T;3,1;N;3,1;A;2,5;H;2,5;E;2,5;Y;2,5;Q;1,2;K;1,2;
 >31
 T;15,4;N;15,4;S;14,2;Y;9,9;G;9,3;D;9,3;R;8;K;4,3;E;3,1;A;3,1;F;2,5;Q;1,9;H;1,2;P;1,2;C;0,6;V;0,6;
 >32
 -;99,4;I;0,6;
 >33
 -;99,4;K;0,6;
 >34
 -;96,3;Q;1,2;A;0,6;D;0,6;N;0,6;S;0,6;
 >35
 -;96,3;N;1,2;S;1,2;L;0,6;R;0,6;
 >36
 -;96,3;R;2,5;S;1,2;
 >37
 -;89,5;I;3,1;Q;2,5;R;2,5;S;1,9;N;0,6;
 >38
 -;80,9;S;4,3;K;3,1;T;3,1;Q;1,9;A;1,9;I;1,9;V;1,2;L;0,6;P;0,6;D;0,6;
 >39
 -;60,5;K;16,7;Q;6,8;G;4,3;P;4,3;R;1,9;T;1,9;D;1,2;E;0,6;H;0,6;L;0,6;N;0,6;
 >40
 K;69,1;R;6,8;Q;4,9;V;4,9;I;3,7;G;1,9;N;1,2;P;1,2;A;1,2;E;1,2;T;1,2;L;1,2;M;0,6;S;0,6;
 >41
 T;30,9;M;19,1;V;8,6;G;6,8;L;6,2;R;5,6;S;4,3;N;3,7;I;3,1;A;2,5;Q;2,5;C;1,9;D;1,2;K;1,2;P;0,6;E;0,6;H;0,6;W;0,6;
 >42
 D;61,1;S;13;G;12,3;N;6,8;T;2,5;E;1,9;A;1,9;Q;0,6;
 >43
 K;41,4;T;17,9;I;6,8;R;6,8;Q;6,2;A;5,6;L;4,9;V;3,1;M;2,5;P;1,2;Y;1,2;S;0,6;N;0,6;E;0,6;D;0,6;
 >44
 A;62,3;S;12,3;V;8,6;P;6,2;D;3,1;E;1,9;T;1,9;L;1,2;N;1,2;I;1,2;
 >45
 S;52,5;T;9,3;D;8;L;7,4;A;6,8;V;4,3;G;3,1;E;3,1;K;1,9;R;1,2;M;1,2;C;0,6;N;0,6;
 >46
 M;29,6;I;25,9;V;18,5;L;15,4;T;3,7;H;2,5;F;1,9;Q;1,9;K;0,6;
 >47

L;75,9;V;13,6;I;7,4;F;2,5;M;0,6;
>48
D;37,7;G;16;E;13,6;Q;6,2;S;6,2;A;4,3;N;4,3;L;3,7;K;1,9;T;1,9;H;1,2;V;1,2;C;
0,6;R;0,6;M;0,6;
>49
E;47,5;D;25,9;G;8;K;4,9;L;3,1;R;3,1;N;1,9;Q;1,9;A;1,2;C;0,6;I;0,6;T;0,6;V;0
,6;
>50
A;56,2;I;14,8;T;13,6;V;11,1;S;2,5;G;1,9;
>51
I;62,3;V;21;A;4,9;L;3,1;C;2,5;T;2,5;M;1,9;H;0,6;R;0,6;G;0,6;
>52
D;20,4;N;19,8;E;17,9;K;9,3;S;8;Q;6,8;R;4,9;H;4,3;G;3,1;T;2,5;A;1,2;C;0,6;L;
0,6;V;0,6;
>53
Y;79;H;8;F;4,9;R;1,9;M;1,9;Q;1,2;L;0,6;I;0,6;S;0,6;V;0,6;E;0,6;
>54
I;42,6;V;32,7;L;15,4;M;7,4;T;1,2;F;0,6;
>55
K;52,5;Q;15,4;N;8,6;R;6,8;P;3,1;A;2,5;E;1,9;L;1,9;S;1,9;T;1,9;V;1,2;G;0,6;D
;0,6;M;0,6;H;0,6;
>56
E;24,1;F;22,2;S;17,9;D;6,2;Q;6,2;N;4,3;A;3,7;Y;3,1;K;2,5;C;1,9;T;1,9;G;1,9;
L;1,2;V;1,2;H;1,2;I;0,6;
>57
L;93,8;M;1,9;V;1,2;T;1,2;A;0,6;Q;0,6;Y;0,6;
>58
Q;54,9;K;13,6;E;12,3;R;6,2;L;4,3;H;3,7;N;1,2;S;1,2;F;0,6;M;0,6;I;0,6;T;0,6;
>59
R;16,7;L;13;Q;11,7;E;9,9;S;9,9;K;5,6;M;5,6;N;5,6;A;4,9;D;4,3;H;3,1;V;2,5;G;
2,5;T;1,9;I;1,2;Y;1,2;C;0,6;
>60
Q;54,9;K;11,7;E;11,1;R;8;L;3,7;N;1,9;V;1,9;T;1,9;S;1,2;I;1,2;A;0,6;H;0,6;M;
0,6;D;0,6;
>61
V;46,3;I;25,9;L;12,3;A;8;T;3,7;E;1,2;K;1,2;S;0,6;Y;0,6;
>62
K;25,9;Q;24,7;E;16,7;D;5,6;R;5,6;N;4,9;S;4,3;L;3,1;T;1,9;G;1,9;H;1,9;A;1,2;
I;1,2;V;0,6;W;0,6;
>63
V;14,8;E;14,2;K;12,3;F;10,5;S;9,9;M;7,4;A;5,6;D;5,6;I;3,7;T;3,1;L;3,1;N;2,5
;R;1,9;Q;1,2;-;1,2;H;1,2;Y;1,2;C;0,6;
>64
L;63;M;13,6;S;3,7;Y;3,1;I;3,1;A;2,5;T;1,9;F;1,9;-
;1,2;R;1,2;V;1,2;P;0,6;K;0,6;G;0,6;D;0,6;H;0,6;C;0,6;

8.3 Wertetabellen zu den Transfektionsexperimenten, GFP-Studien und QRT-PCR-Experimenten

Tab. A1 zu Abb. R8: Rohdaten der Kontrollansätze auf die Aktivierungsfähigkeit einzelner Effektoren auf dem *AtCHSmin*-Promotor.

Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		GUS'
		mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
35S-GUS	no	29653,9	9977,9	28935,0	7721,8	17266,4	6349,9	15934,7	3891,7	21347,9				
ΔGUS	no	5,4	9166,0	12,4	8792,6	8,6	5019,9	7,9	4186,7	8,2				
PromAtCHSmin	no	45,4	11947,7	75,8	7899,1	67,8	4781,8	48,9	3691,9	59,6				
PromAtCHSmin	AtbHLH001/GL3	47,6	7693,6	89,8	8129,6	49,3	4382,8	44,9	3812,8	61,8				
PromAtCHSmin	AtbHLH002/EGL1	33,8	8829,2	96,5	6121,3	58,6	5232,8	51,9	4581,5	65,3				
PromAtCHSmin	AtbHLH006/RAP1	33,5	6255,9	78,4	7182,8	61,3	6261,8	42,5	3497,2	58,0				
PromAtCHSmin	AtbHLH008/PIF3	41,8	7827,0	101,9	6726,7	84,5	4108,3	55,5	3804,6	84,0				
PromAtCHSmin	AtbHLH012/ATMYC1	33,7	9012,7	84,1	8229,9	93,3	5018,8	48,3	4027,9	65,8				
PromAtCHSmin	AtbHLH034	141,7	7166,6	268,0	8127,7	167,7	6363,8	136,6	3289,9	183,0				
PromAtCHSmin	AtbHLH042/TT8	38,9	8826,9	98,1	6782,9	104,3	7282,1	57,0	3672,8	72,5				
PromAtCHSmin	AtbHLH104	729,7	6731,7	1201,6	6862,8	981,7	4926,8	798,4	4298,7	1031,2				
PromAtCHSmin	AtbHLH115	4084,5	9307,2	6782,8	8923,8	5291,8	6721,8	4291,8	3598,3	4668,8				
PromAtCHSmin	AtbHLH125	45,8	7882,8	102,8	6182,6	97,6	5816,2	67,7	3981,8	84,7				
PromAtCHSmin	ZmSn	1567,7	8973,0	1592,0	8388,1	1129,1	6182,8	873,0	4046,8	1205,8				
PromAtCHSmin	AtMYB0/GL1	51,8	9865,2	93,9	7138,3	72,4	5891,3	43,9	3412,8	66,4				
PromAtCHSmin	AtMYB12	4690,0	6782,9	5191,8	7639,8	4293,9	4991,9	3291,9	4926,8	4655,6				
PromAtCHSmin	AtMYB23	61,3	11891,8	104,9	6491,9	97,9	6325,8	65,8	3296,4	83,3				
PromAtCHSmin	AtMYB66/WER	34,8	8201,8	82,4	8372,8	75,8	6016,7	55,2	3629,8	60,6				
PromAtCHSmin	AtMYB75/PAP1	42,3	7901,8	88,9	8462,8	81,3	7077,8	67,8	3407,9	67,2				
PromAtCHSmin	AtMYB90/PAP2	51,3	8720,4	71,2	9120,8	79,3	5098,3	49,8	3815,7	62,4				
PromAtCHSmin	AtMYB111	9623,0	8973,9	6716,4	6489,8	4988,5	7927,8	3981,9	4391,7	6041,9				
PromAtCHSmin	AtMYB123/TT2	61,3	7981,8	58,8	7812,4	65,7	6394,7	35,0	3945,7	54,1				
PromAtCHSmin	ZmC1	71,9	9175,0	78,8	8186,8	72,9	5819,8	59,0	4102,5	67,0				
PromAtCHSmin	AtTTG1	43,3	8962,8	69,8	7822,9	70,9	5993,3	64,5	3987,3	59,9				
PromAtCHSmin	AtTTG1RNAi	52,3	5607,9	67,9	6701,8	78,9	4392,3	43,8	2952,0	79,4				

Mittelwert

8546,6

7612,5

5775,2

3850,0

Tab. A2 zu Abb. R9: Rohdaten der Kontrollansätze auf die Aktivierungsfähigkeit einzelner Effektoren auf dem *AtDFR*-Promotor.
Die Werte entstammen 3 unabhängigen Experimenten.

Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		GUS'	
		mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec		
35S-GUS	No	13968,8	9180,0	5834,3	2256,4	18974,8	6749,5	28967,3	14329,9	16320,5					
ΔGUS	No	34,2	7368,6	56,9	2893,7	67,7	5396,7	116,2	12834,3	74,8					
PromAtIDFR	No	36,6	6473,4	62,3	1893,0	48,7	6242,7	126,4	14763,8	77,9					
PromAtIDFR	AtbHLH001/GL3	265,2	7627,9	71,3	2671,8	56,3	7915,5	81,3	11829,4	126,9					
PromAtIDFR	AtbHLH002/EGL1	61,8	8040,1	32,8	2281,7	46,5	5492,3	187,3	13572,8	86,0					
PromAtIDFR	AtbHLH006/RAP1	73,0	6455,3	54,7	2734,9	63,3	6629,3	145,2	14826,4	86,5					
PromAtIDFR	AtbHLH008/PIF3	82,7	8926,8	45,7	3891,7	78,4	6281,7	201,3	10036,4	114,2					
PromAtIDFR	AtbHLH012/ATMYC1	25,5	7410,9	48,3	4296,7	56,8	7915,3	104,3	17829,7	46,6					
PromAtIDFR	AtbHLH034	531,1	8091,7	725,8	2198,7	1182,2	5811,5	2367,3	9823,2	1509,8					
PromAtIDFR	AtbHLH042/TT8	43,6	8275,9	32,3	5619,9	76,3	6816,3	102,4	16723,3	53,5					
PromAtIDFR	AtbHLH104	756,3	9273,3	622,9	6729,3	802,4	8273,4	1029,4	17826,4	586,8					
PromAtIDFR	AtbHLH115	9595,7	9390,6	6291,7	2813,7	5893,7	7128,7	6792,4	14878,4	6686,6					
PromAtIDFR	AtbHLH125	39,0	10725,6	67,3	3219,8	76,3	9012,6	98,3	17662,3	55,6					
PromAtIDFR	ZmSn	3913,4	8352,3	2893,9	3196,3	4294,7	6293,7	5018,3	11293,6	4231,5					
PromAtIDFR	AtMYB0/GL1	58,8	8936,4	67,7	2107,8	78,3	8231,7	112,3	13984,9	80,2					
PromAtIDFR	AtMYB12	98,7	9837,8	54,5	2853,8	89,5	5497,3	119,2	10238,4	100,1					
PromAtIDFR	AtMYB23	63,8	9833,5	67,8	2016,3	76,4	6329,7	157,3	14900,3	93,6					
PromAtIDFR	AtMYB66/WER	45,9	7920,7	32,7	2819,3	54,4	7008,5	219,3	12453,9	91,3					
PromAtIDFR	AtMYB75/PAP1	66,7	7654,3	45,3	3683,8	57,9	4296,4	168,3	9630,2	106,6					
PromAtIDFR	AtMYB90/PAP2	80,9	5432,2	39,3	4132,8	49,6	6718,7	132,9	10293,3	92,5					
PromAtIDFR	AtMYB111	31,9	4890,8	56,3	2671,8	82,4	5827,4	146,4	12482,4	91,1					
PromAtIDFR	AtMYB123/TT2	123,3	8264,5	72,8	2966,3	74,3	6358,8	91,8	15738,3	88,0					
PromAtIDFR	ZmC1	29,2	8024,6	52,7	3491,9	98,3	4683,4	137,3	10373,5	96,4					
PromAtIDFR	AtTTG1	118,7	11825,8	56,3	2289,6	101,3	7015,3	162,4	11293,4	110,3					
PromAtIDFR	AtTTG1RNAi	122,0	9625,7	34,8	1857,7	67,3	3183,4	178,3	7982,3	148,1					
Mittelwert		8313,6		3103,6		6444,4		13104,0							

Tab. A3 zu Abb. R10: Rohdaten der Kontrollansätze auf die Aktivierungsfähigkeit einzelner Effektoren auf dem *AtBAN*-Promotor. Die Werte entstammen 3 unabhängigen Experimenten.

Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		GUS'
		mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
35S-GUS	-	5927,0	9767,2	17892,4	9826,4	16453,9	7839,2	22381,5	17589,6	14418,2								
ΔGUS	-	66,4	17590,4	117,2	11286,7	112,9	6253,4	187,3	15723,3	110,0								
PromAtBAN	-	21,5	15885,5	156,3	8195,4	47,8	5836,4	482,4	11283,4	211,0								
PromAtBAN	AtbHLH001/GL3	17,9	15523,7	238,8	10356,4	116,7	6932,4	136,2	13937,4	125,4								
PromAtBAN	AtbHLH002/EGL1	24,6	12523,5	96,4	11823,8	97,5	7355,0	294,3	15927,4	112,6								
PromAtBAN	AtbHLH006/RAP1	11,6	12806,2	186,4	7823,5	146,0	4962,3	114,3	12836,4	146,9								
PromAtBAN	AtbHLH008/PIF3	27,1	6384,2	61,3	12336,5	72,4	7283,4	187,4	10267,4	103,9								
PromAtBAN	AtbHLH012/ATMYC1	25,1	11828,9	312,7	9278,4	176,6	7386,8	312,3	16738,2	197,9								
PromAtBAN	AtbHLH034	56,4	8926,4	56,9	11277,4	93,4	5823,4	265,4	10848,5	142,0								
PromAtBAN	AtbHLH042/TT8	38,7	11071,6	258,4	16283,2	201,8	7349,4	191,8	13876,4	146,8								
PromAtBAN	AtbHLH104	97,9	10996,7	137,3	10283,4	186,3	9283,4	157,3	14267,4	132,2								
PromAtBAN	AtbHLH115	26,1	12565,2	67,8	7283,4	56,3	6381,3	97,5	9238,4	81,0								
PromAtBAN	AtbHLH125	34,5	10673,4	67,3	12736,4	82,4	4837,5	281,7	18923,4	103,7								
PromAtBAN	ZmSn	20,6	9196,9	152,4	11823,4	105,6	10723,4	126,0	14283,4	86,6								
PromAtBAN	AtMYB0/GL1	49,6	14511,3	207,9	12001,2	187,3	7236,4	228,3	11293,5	168,9								
PromAtBAN	AtMYB12	69,5	13095,2	113,4	7982,4	39,3	5382,2	119,4	8934,4	108,9								
PromAtBAN	AtMYB23	51,8	12983,7	198,9	8267,9	58,4	8233,3	173,9	8399,4	154,6								
PromAtBAN	AtMYB66/WER	26,4	8962,4	71,3	11982,4	159,3	6735,4	272,8	15836,4	124,7								
PromAtBAN	AtMYB75/PAP1	28,5	6028,6	87,3	15283,7	72,3	8236,7	312,4	13349,4	122,3								
PromAtBAN	AtMYB90/PAP2	23,4	5015,3	113,7	10027,4	119,3	9372,4	99,3	15263,4	86,8								
PromAtBAN	AtMYB111	19,6	5667,8	86,4	7823,4	270,3	11923,4	124,9	17277,4	103,5								
PromAtBAN	AtMYB123/TT2	47,5	8384,7	85,3	6743,4	77,7	9378,7	266,4	9238,2	159,8								
PromAtBAN	ZmC1	39,4	10296,4	116,6	8236,4	192,7	8364,4	37,9	18238,4	95,7								
PromAtBAN	AtTTG1	49,5	15107,6	157,8	9239,4	73,0	7236,4	146,9	15273,6	103,2								
PromAtBAN	AtTTG1RNAi	37,4	8157,9	97,2	4822,8	118,9	3768,4	78,3	7823,4	155,4								
Mittelwert		10958,0		10121,0		7364,6		13466,7										

Tab. A4 zu Abb. R11 und R12: Rohdaten der Anätze mit unterschiedlichen Effektor-Kombinationen zur Aktivierung des *AtCHS*min-Promotors

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
GL1+GL3	246,8	17286,3	184,0	9823,4	123,3	6732,4	155,7
GL1+EGL1	197,3	15394,3	396,3	10283,8	96,4	9287,4	186,9
GL1+AtMYC1	423,7	19273,4	167,3	7823,4	420,8	8203,4	270,9
GL1+TT8	289,2	16729,8	216,2	12374,4	266,4	5730,3	228,7
GL1+PIF3	156,3	14823,7	492,7	6738,4	129,5	6382,3	296,0
GL1+At104	4973,8	10927,3	2103,8	5497,9	3106,0	8022,2	3920,9
GL1+At125	212,2	10728,8	143,9	6182,9	176,3	7229,9	206,0
MYB12+GL3	7897,3	15381,3	6273,8	12848,4	4331,7	8374,4	4762,5
MYB12+EGL1	8952,5	16021,4	7637,2	11892,4	4826,4	7832,4	5612,9
MYB12+AtMYC1	4982,3	17239,3	4383,4	12397,4	1998,4	6389,3	2949,6
MYB12+TT8	6972,4	14381,2	5367,4	13927,4	3378,9	8356,4	4096,1
MYB12+ZmSn	16894,8	17651,9	13834,2	12893,9	11027,4	8263,4	10166,8
MYB23+GL3	356,4	15367,4	437,6	13892,6	273,4	7839,5	267,4
MYB23+EGL1	524,3	11937,4	735,4	15298,4	198,9	9373,8	373,2
MYB23+AtMYC1	432,4	13826,4	383,9	12635,0	219,8	8263,4	280,8
MYB23+TT8	312,2	12948,4	329,4	16293,4	273,9	7937,4	239,1
MYB23+PIF3	216,4	9283,4	637,8	14273,4	423,4	12673,6	301,5
MYB23+At104	3897,8	9206,7	3927,3	12083,9	2917,9	6877,4	3704,9
MYB23+At125	129,4	6728,4	203,4	9829,4	345,3	7892,4	240,0
WER+GL3	197,6	8383,4	287,4	11826,4	216,8	9243,7	223,3
WER+EGL1	483,9	12373,4	387,9	13535,3	256,3	7649,5	325,6
WER+AtMYC1	220,2	15283,4	297,5	15273,4	178,6	8302,4	165,6
WER+TT8	397,3	14726,4	412,4	15982,4	196,3	6921,4	253,3
WER+PIF3	156,8	9273,3	367,8	14927,4	253,7	8672,4	208,3
WER+AtbHLH104	2605,0	8973,4	4892,4	10283,4	1729,4	6021,9	3239,3
WER+AtbHLH125	116,2	10273,4	189,4	10399,4	208,4	7829,4	160,1
PAP1+GL3	2487,4	13728,8	837,3	5274,1	3383,8	5273,8	2676,6
PAP1+EGL1	4633,0	15023,4	1002,6	4186,9	4269,1	4194,1	4302,7
PAP1+AtMYC1	894,9	14792,2	153,9	6324,5	869,1	6305,3	641,5
PAP1+TT8	1982,8	15628,4	519,3	4382,9	3099,3	4389,3	2473,1
PAP1+PIF3	122,8	17296,4	31,1	8380,5	216,7	8388,6	99,4
PAP1+At104	5283,4	12394,4	3628,3	9646,3	2736,2	6882,4	3800,4
PAP1+At125	195,2	18384,3	376,4	12637,5	169,3	9372,8	170,1
PAP1+ZmSn	15322,4	15273,4	3830,6	5455,3	16156,5	5434,7	13019,9
PAP2+GL3	1437,7	12938,3	489,9	4777,9	1478,5	4769,9	1467,9
PAP2+EGL1	2966,3	14394,8	866,3	6358,7	2617,7	6352,0	2204,9
PAP2+AtMYC1	598,9	16339,8	188,3	4831,1	502,8	4803,1	504,1
PAP2+TT8	1432,3	13926,4	236,6	3941,0	498,5	3951,1	899,1
PAP2+PIF3	256,4	17293,3	4,6	4341,3	524,2	4335,6	339,7
PAP2+At104	5871,1	12309,5	3491,4	7501,9	3219,4	6735,9	4451,4
PAP2+At125	199,0	16320,9	26,6	4963,1	344,3	7627,3	169,7
PAP2+ZmSn	8234,4	17237,9	4347,6	3937,6	3315,3	3951,3	7054,1
MYB111+GL3	7210,4	2826,8	8492,7	4528,2	9483,9	2838,0	23859,3
MYB111+EGL1	9191,5	5713,7	6287,4	3578,3	14831,7	5728,7	17738,0
MYB111+AtMYC1	11471,7	5536,6	5726,0	2996,7	20853,9	5529,6	22844,4
MYB111+TT8	13503,8	4101,1	7268,5	5368,9	31536,2	4063,8	35576,7
MYB111+PIF3	15237,6	4404,2	5628,2	3726,9	19757,4	4406,1	29362,2
MYB111+ZmSn	14335,0	5802,5	4358,7	4438,5	22105,3	5795,1	22076,8

Tab. A4 (fortgesetzt)							
Effektor	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	GUS'
TT2+GL3	315,7	14283,3	90,1	7213,8	264,8	7177,4	214,1
TT2+EGL1	221,3	10289,4	43,5	6333,9	153,8	6345,3	167,3
TT2+AtMYC1	197,2	15763,4	82,6	6138,8	253,5	6120,7	185,3
TT2+TT8	296,4	12374,4	33,7	5243,0	154,9	5221,4	188,9
TT2+PIF3	117,0	16273,5	17,5	3534,6	155,5	7460,8	92,0
TT2+AtbHLH104	6108,9	12387,5	3271,9	7346,4	2936,4	6740,0	4370,6
TT2+AtbHLH125	164,9	10379,3	97,5	3987,9	133,9	7739,0	176,4
TT2+ZmSn	536,3	16372,4	315,9	1893,0	311,1	5620,3	733,8
ZmC1+ZmSn	17381,2	17393,5	2149,3	4814,1	8678,2	4806,1	9659,3
35S-GUS	26839,9	14026,9	18635,3	8492,4	14882,9	7006,2	19239,1
ΔGUS	167,3	13827,4	98,3	9238,4	122,4	6927,3	122,1

Mittelwert

13041,7

8390,4

6755,8

Tab. A5 zu Abb. R13: Rohdaten der Anätze mit unterschiedlichen Effektor-Kombinationen zur Aktivierung des *AtDFR*-Promotors

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
GL1+GL3	246,4	16689,3	176,3	7938,3	16,9	1273,4	147,9
GL1+EGL1	435,8	14823,8	203,9	6794,0	23,9	1562,4	232,2
GL1+AtMYC1	228,7	15839,8	198,4	5918,4	17,3	1283,4	183,0
GL1+TT8	362,4	12836,8	156,4	8202,0	27,9	1163,9	206,2
GL1+AtbHLH006	192,8	13846,4	117,2	7193,4	47,4	1928,9	143,3
GL1+PIF3	156,4	14952,4	83,9	4974,0	87,3	1982,3	161,8
GL1+AtbHLH115	1263,8	16836,4	830,0	10273,4	198,4	1479,9	752,4
MYB12+GL3	556,7	25998,8	197,8	6740,0	65,4	1763,9	232,9
MYB12+EGL1	141,1	24835,1	123,3	14762,4	21,4	2183,4	63,5
MYB12+AtMYC1	148,2	12642,7	168,0	15784,0	17,8	1365,9	99,1
MYB12+TT8	123,6	18375,4	89,9	9839,8	24,9	1928,4	74,9
MYB12+AtbHLH006	87,3	12635,4	276,4	15673,4	48,3	2376,8	114,0
MYB12+PIF3	183,4	16827,4	75,6	9389,8	16,8	1873,4	81,4
MYB12+AtbHLH115	1284,0	14627,4	928,4	8391,0	152,6	1287,4	872,4
MYB12+ZmSn	3280,2	9110,8	1728,7	6837,0	426,3	2281,0	2477,1
MYB23+GL3	126,4	8399,9	78,1	12038,5	137,9	8732,2	102,8
MYB23+EGL1	83,4	5388,4	109,9	9838,9	184,9	10831,4	121,4
MYB23+AtMYC1	273,4	12386,4	238,4	12937,5	302,0	14283,4	176,1
MYB23+TT8	198,4	13974,8	135,9	7829,4	235,8	14097,2	135,6
MYB23+AtbHLH006	127,3	9273,4	67,4	2833,4	187,8	12872,4	151,0
MYB23+PIF3	92,1	10783,4	119,3	11838,3	227,9	14939,3	88,4
MYB23+AtbHLH115	927,8	10283,9	867,4	7392,4	1029,9	12780,4	844,6
WER+GL3	273,4	16293,5	173,2	11984,0	178,4	5872,4	157,3
WER+EGL1	192,8	12835,4	132,7	9283,6	102,9	4072,4	142,2
WER+AtMYC1	138,4	9374,4	98,8	7389,4	98,3	4893,4	130,3
WER+TT8	193,5	12997,8	165,4	11837,4	20,9	6664,9	106,5
WER+AtbHLH006	382,5	18473,4	158,4	6732,4	116,5	5653,4	186,3
WER+PIF3	183,4	12844,4	98,7	7672,4	98,6	6923,9	117,8
WER+AtbHLH115	937,4	10927,4	1293,8	11283,9	378,4	4838,3	815,4
PAP1+GL3	7299,1	4138,0	14091,8	8458,9	3048,5	803,1	17935,4
PAP1+EGL1	7761,1	4611,3	14790,4	9059,6	5433,6	1422,6	17555,2
PAP1+AtMYC1	934,4	6866,6	21653,9	16714,1	830,8	1500,7	5501,3
PAP1+TT8	15754,9	11327,4	20251,7	12389,8	2320,5	1522,7	12899,8
PAP1+AtbHLH006	1476,4	9273,4	926,1	9384,4	148,3	1183,4	1119,4
PAP1+PIF3	98,5	8273,4	176,0	12837,5	23,3	1837,5	109,0
PAP1+AtbHLH034	2439,2	15929,6	1829,4	9390,5	502,8	2937,3	1472,8
PAP1+AtbHLH115	3283,4	16920,4	2193,4	10983,0	498,7	2983,4	1639,5
PAP1+ZmSn	22817,8	3628,1	18131,5	9806,1	5018,3	1993,4	33942,8
PAP2+GL3	14837,4	9829,7	14867,7	7008,1	3129,5	1668,6	15448,0
PAP2+EGL1	12834,7	8702,4	16803,0	6883,8	4730,1	1588,9	18029,8
PAP2+AtMYC1	1499,4	6289,4	7223,8	6975,6	841,6	1371,4	5159,6
PAP2+TT8	6374,5	9273,4	14995,0	8436,7	1511,5	1910,4	9521,0
PAP2+AtbHLH006	727,3	7283,4	563,4	7383,1	212,7	1821,2	806,9
PAP2+PIF3	182,4	9273,9	112,2	11039,0	48,4	2938,4	133,3
PAP2+AtbHLH034	1338,0	10472,8	723,8	6728,9	312,5	2839,4	1003,3
PAP2+AtbHLH115	1627,4	12737,8	1028,7	11083,4	256,4	1932,4	991,2
PAP2+ZmSn	19091,0	11021,3	14091,6	9384,4	5021,7	2437,4	14615,2
MYB111+GL3	326,0	4707,8	74,0	6020,3	393,7	12739,3	353,0

Tab. A5 (fortgesetzt)								
Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'	
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec		
MYB111+EGL1	256,8	17559,0	65,0	12230,8	382,9	12883,7	119,0	
MYB111+ATMYC1	13,6	6597,7	86,1	9713,9	371,3	14892,4	74,6	
MYB111+TT8	16,2	6192,1	106,8	11792,5	456,3	12034,6	97,3	
MYB111+AtbHLH034	314,6	10080,9	368,0	9389,4	672,3	15672,4	310,9	
MYB111+ZmSn	1784,7	3622,5	8618,1	9571,5	3283,9	12033,9	5181,3	
TT2+GL3	1706,4	14269,2	1140,9	9482,9	451,2	1734,9	1243,6	
TT2+EGL1	1428,6	10643,4	2152,8	12180,6	468,8	2581,0	1358,7	
TT2+AtMYC1	45,2	15632,9	63,9	10174,7	46,4	2593,7	58,7	
TT2+TT8	1441,1	13136,8	1387,0	9726,9	463,6	2067,4	1221,4	
TT2+AtbHLH006	265,4	14263,4	98,9	6737,5	17,9	1292,4	139,6	
TT2+PIF3	182,3	8279,9	203,4	12937,8	24,4	2398,4	150,3	
TT2+AtbHLH034	187,8	3282,7	623,4	10893,5	145,8	1683,4	535,6	
TT2+AtbHLH115	983,4	8239,4	1029,9	12023,9	328,0	2982,0	901,0	
TT2+ZmSn	23245,0	12841,2	9582,7	6377,3	3892,4	2637,4	14017,5	
ZmC1+ZmSn	8828,5	5430,5	17161,7	7432,0	3833,6	1705,5	17066,2	
35SGUS	19258,8	12034,3	14286,4	9827,4	8032,2	5001,2	13255,8	
Δ GUS	129,4	11823,8	98,2	10820,4	56,4	5732,4	86,1	

Mittelwert

11532,4

9552,0

4623,8

Tab. A6 zu Abb. R14: Rohdaten der Anätze mit unterschiedlichen Effektor-Kombinationen zur Aktivierung des *AtBAN*-Promotors

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
GL1+GL3	135,4	10983,4	78,4	9836,3	58,7	7283,4	93,3
GL1+EGL1	189,9	11965,4	87,2	8792,3	134,9	6374,3	144,9
GL1+AtbHLHMYC1	75,4	15992,7	56,3	9484,4	66,9	7263,4	59,8
GL1+TT8	123,4	9825,3	104,9	7823,4	160,1	9387,4	133,4
GL1+AtbHLH006	102,9	12380,9	54,3	9236,4	94,3	8229,4	79,0
GL1+PIF3	78,2	14319,3	98,3	6392,4	91,8	5920,7	108,4
GL1+AtbHLH115	124,0	17833,0	72,9	8239,3	110,1	7284,0	92,1
GL1+ZmSn	298,9	12384,9	187,5	9366,7	205,0	8281,3	218,5
MYB12+GL3	97,3	10378,9	99,8	9391,4	234,0	5910,0	166,2
MYB12+EGL1	78,1	12939,4	84,9	7129,4	60,1	8238,4	79,7
MYB12+AtMYC1	115,3	15726,4	53,1	7293,8	185,9	8273,4	106,2
MYB12+TT8	145,9	16293,8	119,8	6522,8	211,0	9376,3	148,5
MYB12+AtbHLH006	96,9	10283,3	67,9	5930,8	100,5	8362,3	102,8
MYB12+PIF3	57,1	18374,8	43,9	9238,4	96,8	8812,4	53,9
MYB12+AtbHLH115	138,7	10289,4	108,8	8829,4	142,2	6732,4	143,3
MYB12+ZmSn	265,7	11869,3	175,3	8208,4	167,3	7209,3	212,3
MYB23+GL3	98,3	13725,4	67,4	9715,5	221,5	5937,4	140,1
MYB23+EGL1	105,7	17263,4	87,9	5208,5	96,8	8365,0	106,4
MYB23+AtbHLHMYC1	46,2	13836,8	56,3	11837,3	94,3	7238,4	59,7
MYB23+TT8	104,1	15728,4	109,3	4782,9	215,4	7637,4	167,6
MYB23+AtbHLH006	69,3	16725,9	59,8	10283,4	96,8	7672,3	65,3
MYB23+PIF3	78,3	12383,8	76,8	11983,9	96,7	5492,3	87,8
MYB23+AtbHLH115	127,8	18083,4	98,9	8394,5	109,8	8291,3	97,6
MYB23+Zmsn	117,3	10829,4	178,3	11927,7	172,4	9881,3	132,6
WER+GL3	117,3	10273,9	71,3	6740,4	94,2	11283,8	98,9
WER+EGL1	157,0	9238,4	75,3	7239,5	94,3	4272,8	153,0
WER+AtbHLHMYC1	98,3	12937,4	48,2	7389,4	96,5	5623,8	92,1
WER+TT8	79,3	8927,4	96,9	6755,9	162,1	7763,2	131,3
WER+AtbHLH006	76,9	12983,4	57,9	7367,3	48,8	7697,3	63,8
WER+PIF3	46,4	9928,3	48,0	4236,4	208,0	6229,3	135,2
WER+AtbHLH115	137,3	12938,7	98,3	4112,9	208,0	7282,3	187,5
WER+ZmSn	204,9	14528,9	117,1	7891,9	196,8	11082,7	145,8
PAP1+GL3	382,7	10349,7	121,7	6803,7	48,2	1749,5	268,5
PAP1+EGL1	284,5	9281,6	154,3	10824,8	57,4	2022,9	234,0
PAP1+AtbHLHMYC1	104,3	11329,7	13,7	15371,1	105,3	6726,4	76,4
PAP1+TT8	1345,3	9972,7	24,6	11756,2	146,9	2565,4	670,9
PAP1+AtbHLH006	76,3	10237,8	105,3	14283,4	95,4	12038,5	72,0
PAP1+PIF3	47,5	9283,4	16,0	11118,5	107,3	13927,4	43,2
PAP1+AtbHLH115	112,7	6974,7	124,4	8237,4	257,4	14629,4	154,3
PAP1+ZmSn	720,3	10052,5	120,3	10052,5	389,7	5733,9	481,8
PAP2+GL3	375,8	8739,3	422,0	10601,6	99,1	2037,6	413,7
PAP2+EGL1	416,9	9206,8	586,5	15243,0	105,3	1947,8	431,3
PAP2+AtbHLHMYC1	78,9	12053,8	115,4	8067,8	34,8	1729,8	120,3
PAP2+TT8	1629,8	11322,9	723,0	5701,0	186,7	1749,2	1229,1
PAP2+AtbHLH006	102,4	10209,4	156,8	12058,4	156,3	10826,8	116,0
PAP2+PIF3	98,5	8599,6	121,3	12908,7	202,9	14386,8	109,1
PAP2+AtbHLH115	146,9	9845,8	212,9	14927,7	174,8	11927,7	139,7
PAP2+ZmSn	726,3	9284,0	755,1	10166,5	655,1	10166,5	700,8

Tab. A6 (fortgesetzt)							
Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
MYB111+GL3	12,3	6828,6	196,7	17529,4	113,3	9823,4	71,1
MYB111+EGL1	69,1	11045,3	273,4	14126,9	98,8	7823,3	117,5
MYB111+ATMYC1	73,0	7560,4	73,0	13266,0	82,7	8209,4	79,8
MYB111+TT8	65,3	9670,0	65,3	13629,0	87,3	10728,8	61,4
MYB111+RAP1	139,7	16892,3	98,3	12962,0	115,0	12002,4	79,9
MYB111+PIF3	113,8	12655,6	159,8	17078,4	56,3	11927,4	76,7
MAB111+AtbHLH115	156,9	8920,3	275,1	14265,9	287,3	16792,9	172,2
MYB111+ZmSn	122,7	10436,7	499,7	12437,2	382,8	9827,4	269,7
TT2+GL3	876,8	10251,9	814,0	11909,1	176,0	2026,0	764,0
TT2+EGL1	1736,3	14627,3	1288,7	12261,1	319,9	1950,1	1198,0
TT2+AtbHLHMYC1	204,5	11828,7	131,0	9593,6	108,8	2465,1	217,8
TT2+TT8	3289,7	12378,3	2524,5	10107,8	574,3	1046,2	3165,7
TT2+AtbHLH006	98,3	14729,7	117,0	8926,4	87,7	3201,8	134,3
TT2+PIF3	107,5	11928,4	64,4	2821,1	76,8	3407,3	163,4
TT2+AtbHLH115	56,3	10273,4	76,3	7824,0	37,9	2891,9	84,5
TT2+ZmSn	2487,9	12387,9	1204,6	6054,7	985,9	4071,8	2010,3
ZmC1+ZmSn	1976,9	983,4	1511,2	9513,0	1786,8	981,1	12738,4
35S-GUS	16576,3	11329,8	13289,7	9823,0	3276,3	7203,4	11186,5
ΔGUS	76,3	10895,3	103,4	11293,4	97,3	7825,4	86,9

Mittelwert

11709,6

9718,3

7209,8

Tab. A7 zu Abb. R16: Rohdaten zur Aktivierung des *AtBAN*-Promotors mit unterschiedlichen punktmutierten *AtbHLH*-Konstrukten. Als Interaktionspartner dienen *AtbMYB123/TT2* und *AtMYB75/PAP1*

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	EA GUS pMol 4-MUG	EA LUC RLUs	GUS'
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	
Δ GUS	8,0	3487,3	3,8	1733,3	11,7	2482,0	3,8
35S-GUS	2871,1	2049,8	1135,5	565,3	1997,7	885,7	2122,2
TT2+GL3	302,5	1414,1	297,5	974,4	308,7	2016,3	231,8
TT2+EGL1	600,5	1768,4	264,1	680,6	379,7	1394,7	366,5
TT2+AtMYC1	190,8	2572,9	43,5	479,0	98,0	1967,4	76,3
TT2+TT8	1504,1	2279,1	251,7	340,2	646,0	1350,1	685,6
TT2+ <i>gl3D47N</i>	305,5	1388,2	156,6	474,9	261,3	1578,8	244,8
TT2+ <i>egl1D46N</i>	473,5	1772,7	152,5	298,5	525,7	2436,6	322,2
TT2+ <i>atmyc1E56N</i>	52,3	490,0	48,4	285,0	183,9	2089,2	124,1
TT2+ <i>atmyc1E56D</i>	170,8	2047,8	68,3	355,8	211,7	1871,8	127,8
TT2+ <i>tt8N53D</i>	328,1	587,7	752,7	492,4	738,3	1384,9	787,1
PAP1+GL3	38,3	281,1	135,8	414,5	34,4	1053,1	137,9
PAP1+EGL1	83,7	466,4	146,3	288,3	48,4	973,5	197,1
PAP1+AtMYC1	69,8	2307,7	28,9	270,4	12,2	1278,2	37,2
PAP1+TT8	120,3	2170,2	180,9	509,3	36,7	1065,6	102,0
PAP1+ <i>gl3D47N</i>	26,9	491,9	43,8	273,8	13,3	655,8	63,3
PAP1+ <i>egl1D46N</i>	122,4	864,2	89,0	197,6	70,5	1313,8	170,5
PAP1+ <i>atmyc1E56N</i>	74,2	1673,6	29,8	202,5	18,6	1170,2	53,9
PAP1+ <i>atmyc1E56D</i>	70,4	1446,0	49,9	226,9	16,1	916,0	68,6
PAP1+ <i>tt8N53D</i>	76,7	1026,7	118,8	602,8	39,2	970,0	89,2
Mittelwert		1529,3		483,3		1442,7	

Tab. A8 zu Abb. R19: Rohdaten zu den Auswirkungen von TTG1-Ko-Überexpression und TTG1-RNAi-Silencing auf die Aktivierungsfähigkeit unterschiedlicher Effektorkombinationen bei der Aktivierung des *AtBAN*-Promotors

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs	
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec
TT2+GL3	210,0	1733,3	29,8	382,7	87,8	452,1	87,8	452,1	87,8	452,1	87,8	452,1
TT2+EGL1	342,2	834,6	164,4	406,4	258,6	455,9	258,6	455,9	258,6	455,9	258,6	455,9
TT2+AbHLHMYC1	127,4	1248,1	16,0	351,9	64,1	750,8	64,1	750,8	64,1	750,8	64,1	750,8
TT2+TT8	627,0	907,9	200,2	273,7	331,8	319,0	331,8	319,0	331,8	319,0	331,8	319,0
TT2+GL3+TTG1	1845,1	1229,1	830,8	540,5	1027,0	502,6	1027,0	502,6	1027,0	502,6	1027,0	502,6
TT2+EGL1+TTG1	2970,6	1563,0	1623,7	688,3	2028,1	639,6	2028,1	639,6	2028,1	639,6	2028,1	639,6
TT2+AbHLHMYC1+TTG1	108,8	1027,4	148,8	5678,0	29,0	357,4	29,0	357,4	29,0	357,4	29,0	357,4
TT2+TT8+TTG1	2387,9	1115,7	2415,5	800,3	3036,1	744,4	3036,1	744,4	3036,1	744,4	3036,1	744,4
TT2+GL3+TTG1RNAi	13,9	212,2	83,4	487,1	143,8	2414,9	143,8	2414,9	143,8	2414,9	143,8	2414,9
TT2+EGL1+TTG1RNAi	28,3	238,8	83,1	522,8	229,0	2739,6	229,0	2739,6	229,0	2739,6	229,0	2739,6
TT2+AbHLHMYC1+TTG1RNAi	8,3	302,7	25,0	346,6	2,9	325,4	2,9	325,4	2,9	325,4	2,9	325,4
TT2+TT8+TTG1RNAi	228,8	570,0	186,6	418,0	132,0	992,4	132,0	992,4	132,0	992,4	132,0	992,4

Mittelwert	915,2	908,0	891,2
------------	-------	-------	-------

Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs	
	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec
TT2+GL3	315,9	2469,6	176,0	2026,0	128,8	670,1	128,8	670,1	128,8	670,1	128,8	670,1
TT2+EGL1	738,4	2333,7	319,9	950,1	210,7	666,1	210,7	666,1	210,7	666,1	210,7	666,1
TT2+AbHLHMYC1	248,4	4399,2	108,8	1465,1	36,1	646,9	36,1	646,9	36,1	646,9	36,1	646,9
TT2+TT8	1063,9	2051,0	574,3	1046,2	422,1	925,4	422,1	925,4	422,1	925,4	422,1	925,4
TT2+GL3+TTG1	1360,6	945,5	1733,1	1431,6	1003,5	799,7	1003,5	799,7	1003,5	799,7	1003,5	799,7
TT2+EGL1+TTG1	7997,3	4368,1	4747,2	1968,6	783,9	426,2	783,9	426,2	783,9	426,2	783,9	426,2
TT2+AbHLHMYC1+TTG1	137,8	2475,1	103,7	1213,9	74,0	782,7	74,0	782,7	74,0	782,7	74,0	782,7
TT2+TT8+TTG1	3709,9	1770,1	2185,4	1285,3	578,8	300,0	578,8	300,0	578,8	300,0	578,8	300,0
TT2+GL3+TTG1RNAi	31,5	815,0	36,7	420,3	29,2	229,7	29,2	229,7	29,2	229,7	29,2	229,7
TT2+EGL1+TTG1RNAi	70,7	904,8	121,5	496,5	48,6	384,1	48,6	384,1	48,6	384,1	48,6	384,1
TT2+AbHLHMYC1+TTG1RNAi	77,6	938,3	19,2	412,1	26,2	789,8	26,2	789,8	26,2	789,8	26,2	789,8
TT2+TT8+TTG1RNAi	141,0	730,5	114,3	397,7	186,6	616,7	186,6	616,7	186,6	616,7	186,6	616,7

Mittelwert	2016,7	1092,8	603,1
------------	--------	--------	-------

GUS'	"+/-"
256,5	39,4
753,3	75,0
134,4	16,7
1277,1	166,2
2879,0	233,9
4329,3	408,2
143,9	22,9
4794,1	703,6
176,2	38,7
259,7	48,1
86,7	21,9
565,1	93,5

Tab. A9 zu Abb. R20: Rohdaten zu den Kontrollansätzen mit den TTG1-OX- und TTG1-RNAi-Konstrukten

Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs	
		mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec
35S-GUS	-	8856,0	5614,1	7337,1	4587,0	8470,1	5364,7						
delta-GUS	-	6,6	9581,0	13,6	7308,2	5,0	8725,6						
PromAtBAN	-	11,7	8570,8	6,5	6382,0	14,6	1571,1						
PromAtBAN	TTG1	17,3	1827,3	9,3	1192,2	5,6	834,2						
PromAtBAN	TTG1RNAi	13,2	633,2	8,4	782,3	13,7	742,3						
PromAtBAN	TT2+TTG1	13,4	303,5	47,3	1273,3	38,9	928,3						
PromAtBAN	TT8+TTG1	58,5	1129,8	112,4	3937,4	17,3	2092,3						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn	3218,3	2344,7	6989,6	5894,0	3231,7	2399,1						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn+TTG1	11767,8	8441,6	12147,7	5874,8	10523,1	6118,3						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn+TTG1RNAi	895,9	1577,0	432,0	264,9	729,1	815,9						

Mittelwert

4002,3

3749,6

2959,2

Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs		EA GUS pMol 4-MUG		EA LUC RLUs	
		mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec	mg * min	mg * sec
35S-GUS	-	5511,8	1664,4	8870,9	4166,9	768,0	589,6						
delta-GUS	-	2,7	1372,7	2,2	1909,8	3,9	3208,4						
PromAtBAN	-	9,8	1036,3	7,6	944,2	11,8	1671,5						
PromAtBAN	TTG1	10,1	1142,7	3,4	1024,3	46,3	10233,9						
PromAtBAN	TTG1RNAi	1,4	826,7	7,4	1157,9	1,7	616,8						
PromAtBAN	TT2+TTG1	96,4	4928,3	78,4	1462,3	26,4	1082,4						
PromAtBAN	TT8+TTG1	86,3	3829,4	19,3	1627,2	16,2	1927,4						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn	15041,6	9218,7	8280,7	6854,2	1417,1	1429,6						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn+TTG1	1312,3	170,9	1041,8	183,7	5802,4	1657,3						
PromAtBAN	ZmC1+ZmSn+TTG1RNAi	1576,8	1941,9	533,7	246,2	917,9	1392,3						

Mittelwert

2613,2

1957,7

2380,9

GUS'	"+/-"
3684,2	576,5
2,4	0,5
11,6	3,0
13,0	1,9
19,5	6,3
70,7	10,0
42,1	13,2
2478,7	169,6
7059,1	1974,5
2157,0	499,2

Tab. A10 zu Abb. R21 + R22 + R23: GUS'-Wertetabelle zu allen getesteten Effektorkombinationen mit den TTG1-OX- und TTG1-RNAi-Konstrukten zur Untersuchung von Auswirkungen auf die Aktivierung der *AtCHS*min-, *AtDFR*- und *AtBAN*-Promotorkonstrukte

	AtBAN Abb. R21 GUS'	AtCHS Abb. R22 GUS'	AtDFR Abb. R23 GUS'
35S-GUS	3684,2	19398,0	13255,8
delta-GUS	2,4	16,2	4,8
nur Reporter	11,6	203,2	43,9
TTG1	13,0	151,8	183,7
TTG1RNAi	19,5	141,4	133,8
TT2+TTG1	70,7	214,3	51,2
TT8+TTG1	42,1	209,3	58,7
ZmC1+ZmSn	2478,7	9744,9	17066,2
ZmC1+ZmSn+TTG1	7059,1	19271,3	24907,1
ZmC1+ZmSn+TTG1RNAi	2157,0	8634,0	10455,2
PAP1+GL3	95,2	2683,6	17935,4
PAP1+EGL1	61,1	4316,9	17555,2
PAP1+AtbHLHMYC1	17,9	646,1	5501,3
PAP1+TT8	428,5	2472,4	12899,8
PAP1+GL3+TTG1	846,5	9664,1	27030,4
PAP1+EGL1+TTG1	1073,5	13326,9	33219,8
PAP1+AtbHLHMYC1+TTG1	135,7	1753,7	15260,3
PAP1+TT8+TTG1	1870,7	15606,4	50211,5
PAP1+GL3+TTG1RNAi	89,4	2495,3	13143,6
PAP1+EGL1+TTG1RNAi	87,2	3999,8	11934,0
PAP1+AtbHLHMYC1+TTG1RNAi	11,6	242,8	903,4
PAP1+TT8+TTG1RNAi	200,8	1034,7	6217,5
PAP2+GL3	109,9	1473,8	15448,0
PAP2+EGL1	112,6	2220,6	18029,8
PAP2+AtbHLHMYC1	12,2	505,9	5159,6
PAP2+TT8	476,5	908,8	9521,0
PAP2+GL3+TTG1	1171,1	3525,0	31180,5
PAP2+EGL1+TTG1	1501,6	3147,0	27709,4
PAP2+AtbHLHMYC1+TTG1	89,9	626,3	10356,5
PAP2+TT8+TTG1	2051,4	4481,5	36834,3
PAP2+GL3+TTG1RNAi	75,4	257,3	7397,3
PAP2+EGL1+TTG1RNAi	109,9	596,9	6765,6
PAP2+AtbHLHMYC1+TTG1RNAi	19,0	422,5	208,1
PAP2+TT8+TTG1RNAi	185,8	352,0	850,4
TT2+GL3	256,5	216,0	1243,6
TT2+EGL1	753,3	169,5	1358,7
TT2+AtbHLHMYC1	134,4	185,8	58,7
TT2+TT8	1277,1	191,4	1221,4
TT2+GL3+TTG1	2879,0	808,3	7973,6
TT2+EGL1+TTG1	4329,3	1158,9	13916,9
TT2+AtbHLHMYC1+TTG1	143,9	109,0	266,1
TT2+TT8+TTG1	4794,1	1662,5	23153,9
TT2+GL3+TTG1RNAi	176,2	301,7	559,9
TT2+EGL1+TTG1RNAi	259,7	332,1	757,8
TT2+AtbHLHMYC1+TTG1RNAi	86,7	182,7	20,9
TT2+TT8+TTG1RNAi	565,1	108,7	373,1

Tab. A11 zu Abb. R24: Rohdaten und Auswertung der QRT-PCR Experimente zur Detektion quantitativer Expressionsunterschiede von *TTG1* in Protoplasten vermittelt durch RNAi-Silencing und transiente Überexpression

18S	Ct	STDEV	Ct	STDEV	Ct	STDEV	Mittelwert mittl. Fehler
RNAi	8,85	0,04	7,88	0,15	7,02	0,03	7,92
Kontrolle	8,84	0,02	8,05	0,09	7,61	0,05	8,17
OX	8,92	0,10	7,98	0,04	7,28	0,05	8,06

TTG1	Ct	Stdev	Ct	Stdev	Ct	Stdev	Mittelwert mittl. Fehler
RNAi	22,19	0,14	23,13	0,08	22,32	0,11	22,55
Kontrolle	21,61	0,20	22,62	0,03	21,73	0,07	21,99
OX	18,69	0,18	18,85	0,03	19,70	0,07	19,08

Tab. A12 zu Abb. R27: Rohdaten und Auswertung zur relativen Zahl fluoreszenter Zellen in transient GFP-Fusionskonstrukte exprimierenden AT7-Protoplasten. Die Zahlen entsprechen der Zahl fluoreszenter Zellen pro 100 intakter Protoplasten. Ausgezählt wurden in 3 unabhängigen Experimenten 3x100 Zellen.

Experiment	1			2			3			Mittelwert	mittl. Fehler
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
35S-GFP	17	15	15	13	15	15	18	12	17	15,2	1,4
35S-GFP + 2x35S-TTG1RNAi	15	14	12	14	14	15	13	14	14	13,9	0,6
2x35S-TT8::GFP	11	13	10	13	10	9	14	6	11	10,8	1,8
2x35S-TT8::GFP + 2x35S-TTG1RNAi	5	3	6	5	5	7	9	5	3	5,3	1,3
2x35S-TTG1::GFP	12	12	14	14	13	11	9	14	11	12,2	1,4
2x35S-TTG1::GFP + 2x35S-TTG1RNAi	3	6	3	7	4	2	4	3	4	4,0	1,1

Tab. A13 zu Abb. R29: Rohdaten zu den zur Reportergenaktivierung (*AtBAN*-Promotor-GUS) in transienten Ko-Expressionsstudien in *ttg1-1*-Mesophyllprotoplasten

ttg1-1						
Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	GUS-n Mittelwert
deltaGUS		11,9	331,7	11,9	331,7	6,7
35S-GUS		760,3	431,7	760,3	431,7	325,8
PromAtBAN -		3,8	190,1	3,8	190,1	3,7
PromAtBAN myb123		4,5	170,7	13,6	191,0	9,0
PromAtBAN abh042		6,1	199,4	3,6	188,3	4,6
PromAtBAN ttg1		5,9	193,0	7,4	232,4	5,7
PromAtBAN myb123+abh042		14,6	155,5	22,9	126,9	25,2
PromAtBAN myb123+abh042+ttg1		270,5	144,3	306,2	103,4	445,7
PromAtBAN myb123+abh042+ttg1RNAi		22,3	85,3	16,7	69,8	46,3
PromAtBAN ZmC1+ZmSn		275,7	121,7	171,0	136,9	326,5
PromAtBAN ZmC1+ZmSn+ttg1		407,8	157,4	326,9	127,6	476,7
PromAtBAN ZmC1+ZmSn+ttg1RNAi		132,8	80,0	94,6	56,6	308,2
Mittelwert			188,4		182,2	

Ler						
Reporter	Effektor	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	EA GUS pMol 4-MUG mg * min	EA LUC RLUs mg * sec	GUS-n Mittelwert
deltaGUS		6,4	483,1	6,4	483,1	3,2
35S-GUS		776,6	468,6	776,6	468,6	397,7
PromAtBAN -		4,0	300,1	4,0	300,1	3,2
PromAtBAN myb123		4,5	243,1	5,4	263,5	4,7
PromAtBAN abh042		8,4	227,8	5,6	221,5	7,4
PromAtBAN ttg1		3,0	250,4	5,8	211,3	4,7
PromAtBAN myb123+abh042		335,9	173,5	358,2	178,7	472,9
PromAtBAN myb123+abh042+ttg1		700,2	173,9	887,5	158,9	1152,7
PromAtBAN myb123+abh042+ttg1RNAi		24,1	120,4	42,7	106,5	72,1
PromAtBAN ZmC1+ZmSn		737,1	183,8	452,5	170,9	799,5
PromAtBAN ZmC1+ZmSn+ttg1		903,9	159,6	783,9	190,4	1174,4
PromAtBAN ZmC1+ZmSn+ttg1RNAi		321,6	102,2	284,9	112,6	681,6
Mittelwert			240,5		238,8	

8.4 Putative *cis*-wirkende Elemente der verwendeten Promotoren

Tab. A14 putative *cis*-wirkende Elemente im 520nt-*DFR*-Promotor

Die Einträge und Referenzen zu den angegebenen Motiv-Nummern können auf der PLACE-Webseite (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>) eingesehen werden, Die Liste beschränkt sich auf die Bindemotive für bHLH, bZIP, MYB und WRKY-Proteinen und TATA-Boxen

Name des Bindestellen-Konsensus	Putativ bindender-Faktor	Lage im Promotor	Strang (+/-)	Signal-Sequenz	Motiv #
ABRELATERD1	bZIP	-324	(-)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	bZIP	-323	(+)	ACGT	S000415
				MACCWAM	
MYBPLANT	MYB	-317	(+)	C	S000167
WBOXATNPR1	WRKY	-301	(-)	TTGAC	S000390
ACGTATERD1	bZIP	-297	(+)	ACGT	S000415
CCA1ATLHCB1	MYB	-238	(-)	AAMAATCT	S000149
ACGTABOX	bZIP	-225	(+)	TACGTA	S000130
ACGTATERD1	bZIP	-224	(+)	ACGT	S000415
WBOXATNPR1	WRKY	-197	(-)	TTGAC	S000390
ACGTTBOX	bZIP	-190	(+)	AACGTT	S000132
ACGTATERD1	bZIP	-189	(+)	ACGT	S000415
CACGTGMOTIF	bHLH/bZIP	-181	(+)	CACGTG	S000042
EBOXBNNAPA	bHLH	-181	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSENSUSAT	bHLH	-181	(+)	CANNTG	S000407
ABRELATERD1	bZIP	-180	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	bZIP	-180	(+)	ACGT	S000415
MYBCORE	MYB	-169	(+)	CNGTTR	S000176
MYBPZM	MYB	-168	(-)	CCWACC	S000179
CACGTGMOTIF	bHLH/bZIP	-158	(+)	CACGTG	S000042
EBOXBNNAPA	bHLH	-158	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSENSUSAT	bHLH	-158	(+)	CANNTG	S000407
ABRELATERD1	bZIP	-157	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	bZIP	-157	(+)	ACGT	S000415
TATABOX5	TATAbinding	-90	(+)	TTATTT	S000203
MYB1AT	MYB	-10	(+)	WAACCA	S000408

Tab. A15 putative *cis*-wirkende Elemente im 1460nt langen *AtBAN*-Promotorfragment. Die Einträge und Referenzen zu den angegebenen Motiv-Nummern können auf der PLACE-Webseite (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>) eingesehen werden, Die Liste beschränkt sich auf die Bindemotive für bHLH, bZIP, MYB und WRKY-Proteinen und TATA-Boxen

Name des Bindestellen-Konsensus	Putativ bindender-Faktor	Lage im Promotor	Strang (+/-)	Signal-Sequenz	Motiv #
MYB1AT	MYB	-1369	(+)	WAACCA	S000408
TATCCAOSAMY	MYB	-1200	(-)	TATCCA	S000403
MYBST1	MYB	-1199	(+)	GGATA	S000180
IBOX	MYB	-1198	(+)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	MYB	-1198	(+)	GATAA	S000199
IBOX	MYB	-1123	(+)	GATAAG	S000124
MYBCORE	MYB	-1005	(+)	CNGTTR	S000176
CAREOSREP1	MYB	-994	(-)	CAACTC	S000421
MYB1AT	MYB	-919	(-)	WAACCA	S000408
IBOXCORE	MYB	-913	(+)	GATAA	S000199
MYBPLANT	MYB	-843	(-)	MACCWAMC	S000167
MYB1AT	MYB	-840	(-)	WAACCA	S000408
MYBCORE	MYB	-834	(+)	CNGTTR	S000176
CCA1ATLHCB1	MYB	-819	(-)	AAMAATCT	S000149
CAREOSREP1	MYB	-781	(-)	CAACTC	S000421
IBOXCORE	MYB	-686	(-)	GATAA	S000199
IBOXCORE	MYB	-592	(-)	GATAA	S000199
MYB1AT	MYB	-571	(-)	WAACCA	S000408
IBOXCORE	MYB	-563	(-)	GATAA	S000199
MYBGAHV	MYB	-558	(-)	TAACAAA	S000181
MYBCORE	MYB	-547	(+)	CNGTTR	S000176
IBOXCORE	MYB	-521	(+)	GATAA	S000199
WBOXATNPR1	WRKY	-458	(+)	TTGAC	S000390
DPBFCOREDCCDC3	bZIP	-454	(-)	ACACNNG	S000292
WBOXATNPR1	WRKY	-393	(+)	TTGAC	S000390
CAREOSREP1	MYB	-358	(+)	CAACTC	S000421
MYBCORE	MYB	-322	(-)	CNGTTR	S000176
IBOXCORE	MYB	-241	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	MYB	-226	(+)	GATAA	S000199
MYBGAHV	MYB	-224	(+)	TAACAAA	S000181
ELRECOREPCR1	WRKY	-204	(-)	TTGACC	S000142
WBOXATNPR1	WRKY	-203	(-)	TTGAC	S000390
MYB1AT	MYB	-169	(-)	WAACCA	S000408
CACGTGMOTIF	bHLH/bZIP	-153	(+)	CACGTG	S000042
EBOXBNNAPA	bHLH	-153	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	bHLH	-153	(+)	CANNTG	S000407
ABRELATERD1	bZIP	-152	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	bZIP	-152	(+)	ACGT	S000415
MYBCORE	MYB	-117	(+)	CNGTTR	S000176
TATABOX4	TATAbinding	-71	(-)	TATATAA	S000111
IBOXCORE	MYB	-51	(+)	GATAA	S000199

8.5 GenBank-Akzessionen

Auf eine Darstellung aller im Kontext dieser Arbeit erstellten GenBank Akzessionen wurde wegen des Umfangs verzichtet. Jedoch ergibt sich aus der unten aufgeführten Liste ein Gesamtüberblick. Ein Großteil der dort aufgeführten Einträge wurde von Dr. Marc Jakoby eingereicht, dessen Klonierungserfolge bei 3'RACE-PCR-Produkten die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Genvorhersagen bestätigen konnten und auch zur Verbesserung bestehender Vorhersagen genutzt wurden. Alle GenBank-Akzessionen finden sich auch in Tab. R1 des Ergebnisteils wieder. Exemplarisch ist hier der im Rahmen dieser Arbeit erstellte *AtbHLH125* GenBank-Eintrag aufgeführt:

AtbHLH125:

```

LOCUS           AF506369                780 bp    mRNA    linear    PLN 16-
MAY-2002
DEFINITION      Arabidopsis thaliana basic helix-loop-helix transcription
factor bHLH125 mRNA, complete cds.
ACCESSION       AF506369
VERSION         AF506369.1   GI:20805889
KEYWORDS        .
SOURCE          Arabidopsis thaliana (thale cress)
  ORGANISM      Arabidopsis thaliana
                Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta;
                Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
                rosids; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.
REFERENCE       1  (bases 1 to 780)
  AUTHORS       Heim,M.A., Jakoby,M.J. and Weisshaar,B.
  TITLE         Family of AtbHLH transcription factors in Arabidopsis
thaliana
  JOURNAL       Unpublished
REFERENCE       2  (bases 1 to 780)
  AUTHORS       Heim,M.A., Jakoby,M.J. and Weisshaar,B.
  TITLE         Direct Submission
  JOURNAL       Submitted (25-APR-2002) Ag Weisshaar, Max-Planck-Institute
for
                Plant Breeding Research, Carl-von-Linne Weg 10, Cologne
50829,
                Germany
FEATURES        Location/Qualifiers
  source         1..780
                 /organism="Arabidopsis thaliana"
                 /mol_type="mRNA"
                 /db_xref="taxon:3702"
                 /chromosome="I"
                 /note="ecotype: Columbia"
  CDS            1..780
                 /codon_start=1
                 /product="basic helix-loop-helix transcription
factor
                 bHLH125"
                 /protein_id="AAM28882.1"
                 /db_xref="GI:20805890"

```



```

/translation="MDCVPSLFMPDSTYEDGLLFSDSFLLSPFISYQNNDVFHSITNK
IGGSNKKRSLCDITYGANEANKNDDDDRESKMKHRDIERQRRQEVSSLFKRLRTLPLF
QYIQGKRSTSDHIVQAVNYIKDLQIKIKELNEKRN RVKKVISATTTTHSAIEECTSSL
SSSAASTLSSSSCSCVGDKHITVVVTPCLVGVEIIISCCLGRNKSCLSVLQMLAQEQR
FSVVSCLSARRQQRFMHTIVSQVEDGKQINILELKDKIMTM"
BASE COUNT      266 a      145 c      153 g      216 t
ORIGIN
    1 atggattgtg ttccttcatt gtttatgcct gattcaacct acgaagatgg
attactatatt
   61 tctgattcct ttcttctttc tccgtttata tcataccaa acaatgatgt
tttccattcg
  121 atcacaaaca aaattgggtg aagcaataag aaacgaagtt tgtgtgatg
aacatatggt
  181 gcgaatgaag ccaacaaaaa tgatgatgat cgagagagca agaagatgaa
acatagagac
  241 attgaaaggc aaagaagaca agaagtttca tctcttttca aaagactaag
aactctcttg
  301 ccatttcaat atatccaggg taaacgctcg acatcagatc acatcgtgca
ggcagtgaac
  361 tacatcaaag acttacaaat caaaatcaaa gaactcaacg aaaagagaaa
tcgggtaaaa
  421 aaagtcatat cggccacaac tactactcat tcagctatag aggaatgcac
cagtagttta
  481 tcatcatcag cagcatcaac actatcatca agctgctcat gtgtgggaga
caaacacatt
  541 actgttgtgg tcacaccttg tttagttggt gttgagatca tcataagttg
ttgtctcgga
  601 cgaaacaagt cttgtctctc gagggttctt caaatgtag ctcaagaaca
aaggttcagt
  661 gtagttagtt gcctctcagc tagacggcaa cagagattca tgcacaccat
tgtttcgcag
  721 gtggaggatg gcaaacagat caatatattg gagcttaagg ataaaataat
gactatgtag
//

```

Gesamtliste:

- 1: AJ519812
Arabidopsis thaliana mRNA for putative bHLH transcription factor
gi|26185714|emb|AJ519812.1|ATH519812[26185714]
- 2: AJ519811
Arabidopsis thaliana partial mRNA for putative bHLH transcription factor
gi|26185712|emb|AJ519811.1|ATH519811[26185712]
- 3: AJ519810
Arabidopsis thaliana mRNA for putative bHLH transcription factor
gi|26185710|emb|AJ519810.1|ATH519810[26185710]
- 4: AJ519809
Arabidopsis thaliana mRNA for putative bHLH transcription factor
gi|26185708|emb|AJ519809.1|ATH519809[26185708]
- 5: AJ576046
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH eta gene)
gi|32563007|emb|AJ576046.1|ATH576046[32563007]

- 6: AJ576045
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH zeta gene)
gi|32563005|emb|AJ576045.1|ATH576045[32563005]
- 7: AJ576044
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH epsilon gene)
gi|32563003|emb|AJ576044.1|ATH576044[32563003]
- 8: AJ576043
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH delta gene)
gi|32563001|emb|AJ576043.1|ATH576043[32563001]
- 9: AJ576042
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH gamma gene)
gi|32562999|emb|AJ576042.1|ATH576042[32562999]
- 10: AJ576041
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH-beta gene)
gi|32562997|emb|AJ576041.1|ATH576041[32562997]
- 11: AJ576040
Arabidopsis thaliana mRNA for bHLH transcription factor (bHLH-alpha gene)
gi|32562995|emb|AJ576040.1|ATH576040[32562995]
- 12: AF488604
Arabidopsis thaliana clone bHLH072 putative bHLH transcription factor mRNA, complete cds
gi|32527638|gb|AF488604.2|[32527638]
- 13: AF488560
Arabidopsis thaliana clone bHLH015 putative bHLH transcription factor mRNA, complete cds
gi|26051283|gb|AF488560.2|[26051283]
- 14: AF488634
Arabidopsis thaliana clone bHLH068 putative bHLH transcription factor mRNA, complete cds
gi|22711851|gb|AF488634.2|[22711851]
- 15: AF488633
Arabidopsis thaliana clone bHLH121 putative bHLH transcription factor mRNA, partial sequence
gi|20127116|gb|AF488633.1|[20127116]
- 16: AF488632
Arabidopsis thaliana clone bHLH115 putative bHLH transcription factor mRNA, complete cds
gi|20127114|gb|AF488632.1|[20127114]
- 17: AF488631
Arabidopsis thaliana clone bHLH113 putative bHLH transcription factor mRNA, partial sequence
gi|20127113|gb|AF488631.1|[20127113]
- 18: AF488630
Arabidopsis thaliana clone bHLH112 putative bHLH transcription factor mRNA, partial sequence
gi|20127112|gb|AF488630.1|[20127112]

- 19: AF488629
Arabidopsis thaliana clone bHLH105 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127110|gb|AF488629.1| [20127110]
- 20: AF488628
Arabidopsis thaliana clone bHLH104 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127108|gb|AF488628.1| [20127108]
- 21: AF488627
Arabidopsis thaliana clone bHLH102 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127107|gb|AF488627.1| [20127107]
- 22: AF488626
Arabidopsis thaliana clone bHLH100 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127106|gb|AF488626.1| [20127106]
- 23: AF488625
Arabidopsis thaliana clone bHLH099 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127105|gb|AF488625.1| [20127105]
- 24: AF488624
Arabidopsis thaliana clone bHLH097 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127104|gb|AF488624.1| [20127104]
- 25: AF488623
Arabidopsis thaliana clone bHLH095 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127103|gb|AF488623.1| [20127103]
- 26: AF488622
Arabidopsis thaliana clone bHLH094 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127102|gb|AF488622.1| [20127102]
- 27: AF488621
Arabidopsis thaliana clone bHLH093 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127101|gb|AF488621.1| [20127101]
- 28: AF488620
Arabidopsis thaliana clone bHLH090 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127100|gb|AF488620.1| [20127100]
- 29: AF488619
Arabidopsis thaliana clone bHLH089 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127098|gb|AF488619.1| [20127098]
- 30: AF488618
Arabidopsis thaliana clone bHLH088 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127096|gb|AF488618.1| [20127096]

- 31: AF488617
Arabidopsis thaliana clone bHLH087 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127094|gb|AF488617.1| [20127094]
- 32: AF488616
Arabidopsis thaliana clone bHLH085 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127092|gb|AF488616.1| [20127092]
- 33: AF488615
Arabidopsis thaliana clone bHLH083 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127091|gb|AF488615.1| [20127091]
- 34: AF488614
Arabidopsis thaliana clone bHLH082 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127090|gb|AF488614.1| [20127090]
- 35: AF488613
Arabidopsis thaliana clone bHLH081 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127089|gb|AF488613.1| [20127089]
- 36: AF488612
Arabidopsis thaliana clone bHLH080 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127087|gb|AF488612.1| [20127087]
- 37: AF488611
Arabidopsis thaliana clone bHLH079 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127086|gb|AF488611.1| [20127086]
- 38: AF488610
Arabidopsis thaliana clone bHLH078 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127084|gb|AF488610.1| [20127084]
- 39: AF488609
Arabidopsis thaliana clone bHLH077 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127083|gb|AF488609.1| [20127083]
- 40: AF488608
Arabidopsis thaliana clone bHLH076 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127082|gb|AF488608.1| [20127082]
- 41: AF488607
Arabidopsis thaliana clone bHLH075 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127081|gb|AF488607.1| [20127081]
- 42: AF488606
Arabidopsis thaliana clone bHLH074 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127080|gb|AF488606.1| [20127080]

- 43: AF488605
Arabidopsis thaliana clone bHLH073 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127079|gb|AF488605.1| [20127079]
- 44: AF488603
Arabidopsis thaliana clone bHLH071 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127077|gb|AF488603.1| [20127077]
- 45: AF488602
Arabidopsis thaliana clone bHLH070 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127076|gb|AF488602.1| [20127076]
- 46: AF488601
Arabidopsis thaliana clone bHLH069 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127074|gb|AF488601.1| [20127074]
- 47: AF488600
Arabidopsis thaliana clone bHLH067 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127073|gb|AF488600.1| [20127073]
- 48: AF488599
Arabidopsis thaliana clone bHLH066 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127071|gb|AF488599.1| [20127071]
- 49: AF488598
Arabidopsis thaliana clone bHLH065 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127069|gb|AF488598.1| [20127069]
- 50: AF488597
Arabidopsis thaliana clone bHLH064 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127067|gb|AF488597.1| [20127067]
- 51: AF488596
Arabidopsis thaliana clone bHLH063 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127065|gb|AF488596.1| [20127065]
- 52: AF488595
Arabidopsis thaliana clone bHLH062 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127063|gb|AF488595.1| [20127063]
- 53: AF488594
Arabidopsis thaliana clone bHLH061 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127061|gb|AF488594.1| [20127061]
- 54: AF488593
Arabidopsis thaliana clone bHLH060 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127059|gb|AF488593.1| [20127059]

- 55: AF488592
Arabidopsis thaliana clone bHLH059 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127057|gb|AF488592.1| [20127057]
- 56: AF488591
Arabidopsis thaliana clone bHLH058 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127055|gb|AF488591.1| [20127055]
- 57: AF488590
Arabidopsis thaliana clone bHLH057 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127053|gb|AF488590.1| [20127053]
- 58: AF488589
Arabidopsis thaliana clone bHLH055 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127052|gb|AF488589.1| [20127052]
- 59: AF488588
Arabidopsis thaliana clone bHLH053 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127050|gb|AF488588.1| [20127050]
- 60: AF488587
Arabidopsis thaliana clone bHLH052 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127048|gb|AF488587.1| [20127048]
- 61: AF488586
Arabidopsis thaliana clone bHLH051 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127046|gb|AF488586.1| [20127046]
- 62: AF488585
Arabidopsis thaliana clone bHLH050 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127045|gb|AF488585.1| [20127045]
- 63: AF488584
Arabidopsis thaliana clone bHLH049 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127043|gb|AF488584.1| [20127043]
- 64: AF488583
Arabidopsis thaliana clone bHLH048 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127042|gb|AF488583.1| [20127042]
- 65: AF488582
Arabidopsis thaliana clone bHLH047 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127041|gb|AF488582.1| [20127041]
- 66: AF488581
Arabidopsis thaliana clone bHLH046 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127040|gb|AF488581.1| [20127040]

- 67: AF488580
Arabidopsis thaliana clone bHLH045 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127039|gb|AF488580.1| [20127039]
- 68: AF488579
Arabidopsis thaliana clone bHLH044 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127038|gb|AF488579.1| [20127038]
- 69: AF488578
Arabidopsis thaliana clone bHLH040 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127037|gb|AF488578.1| [20127037]
- 70: AF488577
Arabidopsis thaliana clone bHLH039 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127035|gb|AF488577.1| [20127035]
- 71: AF488576
Arabidopsis thaliana clone bHLH038 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127033|gb|AF488576.1| [20127033]
- 72: AF488575
Arabidopsis thaliana clone bHLH036 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127032|gb|AF488575.1| [20127032]
- 73: AF488574
Arabidopsis thaliana clone bHLH035 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127031|gb|AF488574.1| [20127031]
- 74: AF488573
Arabidopsis thaliana clone bHLH034 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127029|gb|AF488573.1| [20127029]
- 75: AF488572
Arabidopsis thaliana clone bHLH033 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127028|gb|AF488572.1| [20127028]
- 76: AF488571
Arabidopsis thaliana clone bHLH032 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127027|gb|AF488571.1| [20127027]
- 77: AF488570
Arabidopsis thaliana clone bHLH029 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127025|gb|AF488570.1| [20127025]
- 78: AF488569
Arabidopsis thaliana clone bHLH027 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127024|gb|AF488569.1| [20127024]

- 79: AF488568
Arabidopsis thaliana clone bHLH026 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127023|gb|AF488568.1| [20127023]
- 80: AF488567
Arabidopsis thaliana clone bHLH025 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127021|gb|AF488567.1| [20127021]
- 81: AF488566
Arabidopsis thaliana clone bHLH023 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127020|gb|AF488566.1| [20127020]
- 82: AF488565
Arabidopsis thaliana clone bHLH021 putative bHLH transcription factor
mRNA, partial sequence
gi|20127019|gb|AF488565.1| [20127019]
- 83: AF488564
Arabidopsis thaliana clone bHLH020 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127017|gb|AF488564.1| [20127017]
- 84: AF488563
Arabidopsis thaliana clone bHLH019 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127015|gb|AF488563.1| [20127015]
- 85: AF488562
Arabidopsis thaliana clone bHLH018 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127013|gb|AF488562.1| [20127013]
- 86: AF488561
Arabidopsis thaliana clone bHLH016 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127011|gb|AF488561.1| [20127011]
- 87: AF488559
Arabidopsis thaliana clone bHLH013 putative bHLH transcription factor
mRNA, complete cds
gi|20127008|gb|AF488559.1| [20127008]
- 88: AF251692
Arabidopsis thaliana putative transcription factor BHLH7 mRNA, complete
cds
gi|21735476|gb|AF251692.2| [21735476]

8.6 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer:

Name	Sequenz	Verwendungszweck
5race-BAN-1	CGTCAGTCCAGTTTCTTCGTTTCATCACGATTC	5RACE Primer 1 BAN At Col
5race-BAN-2nested	GCCGGTGAATGAGGATTCGAAACTGTCTTC	5RACE Primer 2 nested BAN At Col
abh001-D47N-fwd	CTGGGGTTTTAGAAATGGGAAATGGATACTATAATGGAG	Punktmutagenese von AtbHLH001 D47N
abh001-D47N-rev	CTCCATTATAGTATCCATTTCCTCCATTCATAAACCCCCAG	Punktmutagenese von AtbHLH001 D47N
abh002-D46N-fwd	CAGGGGTGTTGGAGTGGGAAATGGATATTACAAATGGAG	Punktmutagenese von AtbHLH002 D46N
abh002-D46N-rev	CTCCATTGTAATATCCATTTCCCCCACTCCAACACCCCTG	Punktmutagenese von AtbHLH002 D46N
abh012-E56D-fwd	CTGGGGTTTTGGAGTGGGAGACGGATGTTACAATGGAG	Punktmutagenese von AtbHLH012 E56D
abh012-E56D-rev	CTCCATTGTAACATCCGTCCTCCCACTCCAAAACCCCCAG	Punktmutagenese von AtbHLH012 E56D
abh012-E56N-fwd	CTGGGGTTTTGGAGTGGGAAACGGATGTTACAATGGAG	Punktmutagenese von AtbHLH012 E56N
abh012-E56N-rev	CTCCATTGTAACATCCGTTTCCCACTCCAAAACCCCCAG	Punktmutagenese von AtbHLH012 E56N
abh042-N53D-fwd	CGGGTCCTGGTGCGGGGGATGGATACATAACCGGTG	Punktmutagenese von AtbHLH042 N53D
abh042-N53D-rev	CACCGTTGTAGTATCCATCCCCCCCACACCAAGACCCG	Punktmutagenese von AtbHLH042 N53D
abh042noStopSDMfwd	GTCAATAATACATGATACTAATCTATGCAACCCAGCTTTCTTGACAAAAG	no Stop Punktmutagenese von pDONR201-TT8
abh042noStopSDMrev	CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCATAGATTAGTATCATGTATTATGAC	no Stop Punktmutagenese von pDONR201-TT8
abh12	GATGACGAATGTTCTTAGCGGTCTTACCTGATC	5'RACE AtbHLH12 2.PCR
abh12-5-2	CCATCAAGCAAGATTTGATGTTTCGAAGCAGG	5'RACE AtbHLH12 1.PCR
abh125-3-1	GTACTCATAGATATCAAAATCCCAATGGATTG	FL-cDNA Primer AtbHLH 125 3Race-1
abh125-GTW-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGATTGTGTTCCCTTCATTGTTTATGCCTG	FL-cDNA AtbHLH125 mit attB
abh125-GTW-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACATAGTCATTATTTATCCTTAAGCTCC	FL-cDNA AtbHLH125 mit attB
abh12-FL_GWY_fwd	(GWF)CCATGTCTTTGACAATGGCTGATGGTGTAGAA	FL-cDNA AtbHLH12 mit attB
abh12-FL_GWY_rev	(GWR)JTAAAACAAAATCACCAATGACTCTTCTCAGC	FL-cDNA AtbHLH12 mit attB
abh1-5-1	GGCTCCGTACTGAACATAGGCGCG	5'RACE AtbHLH1 1.PCR
abh1-5-2	CAGGGGCTTCGAGGAATGATGCTTTCAC	5'RACE AtbHLH1 2.PCR
abh1-FL_GWY_fwd	(GWF)CCATGGCTACCGGACAAAAACAGAACAACTG	FL-cDNA AtbHLH1mit attB
abh1-FL_GWY_rev	(GWR)TCAACAGATCCCATGCAACCCTTTGAAGTGC	FL-cDNA AtbHLH1 mit attB
abh2-5-1	CACGCCTTGGTAATGAACATCGTCGTCC	Primer for 5race AtbHLH002 1.pcr round
abh2-5-2	CAAGGAACAACGCTCTTAACACTTTGTATCAGC	Primer for 5race AtbHLH002 2.pcr round

Tab. A16 Primerliste

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Abh2-FL_GWY_fwd	(GWF)CCATGGCAACCGGAGAAAAACAGAACGGTG	AtbHLH002 full length gateway attB primer
Abh2-FL_GWY_rev	(GWR)TTAACATATCCATGCAACCCCTTTGAAGTGCC	AtbHLH002 full length gateway attB primer
Abh42-5-1	CATCTTCATCATCAGGAGAGCCCAAGCCTC	Primer for 5race AtbHLH42 1.pcr round
Abh42-5-2	GTGTTCAGAAAAGAGCCGGCTTTGGGTTCCG	Primer for 5race AtbHLH42 2.pcr round
Abh42-FL_GWY_fwd	(GWF)CCATGGATGAATCAAGTATTATTCGGGCAG	AtbHLH042 full length gateway attB primer
Abh42-FL_GWY_rev	(GWR)CTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTGG	AtbHLH042 full length gateway attB primer
CDS-NotI	ATTCTAGAGGCCGAGGGCGGCCCATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Primer zur Synthese von cDNA mit NotI Schnitt
ENTR4 fwd	CCAGGCATCAAACTAAGCAGAGAAGGC	SequenzierPrimer für pENTR4
ENTR4 rev	AGATTGTCGCACCTGATTGCCCGAC	SequenzierPrimer für pENTR4
FM237-FP_TTG1	TCATCCTCCGGTCACAGAATC	TTG1-fwd Primer für TaqMan
FM238-RP_TTG1	TGAATCGGAATCGAAAAAGAGAGAA	TTG1-rev Primer für TaqMan
GeneRacerDNAOligo	(Pho)CGACTGGAGCAGGACGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAA	GeneRacer 5RACE Oligo DNA
GTW-MYB0-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGAAATAAGGAGAAGAGATGAAAAAG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 0
GTW-MYB0-2:	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGTTCTTAAAGGCAGTACTCAACATCTCCAG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 0 rev
GTW-MYB11-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGAAGGCGCGCTGCTG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 11 fwd
GTW-MYB11-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTCAAGACAAAAGCCAAAGCAGCCATC	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 11 rev
GTW-MYB114-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTTG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 114 fwd
GTW-MYB114-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTCTAAAAAATATCGACTTTTTTGGGCGCGTG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 114 rev
GTW-MYB12-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGAAGCGCCCATGTTGCG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 12 rev
GTW-MYB12-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTTCATGACAGAAAGCCAAAGCAGCCAAAGC	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 12 fwd
GTW-MYB23-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGAAATGACAAGAGATGGAAAAAGAACATG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 23 rev
GTW-MYB23-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTCAAAGGCAATACCCATTAGTAAATCCCATC	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 23 rev
GTW-MYB66-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGAAAGAAAGTAAGTAGTAGTGGTGACG	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 66 fwd
GTW-MYB66-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTCAAAAACAGTGCCATCTATAAAGT	GTWY-Primer zur Amplif. von AtMYB 66 rev
GTW-MYB75-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGCTGC	AtMYB75 full length gateway attB primer
GTW-MYB75-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTCTAAATCAAAATTCACAGTCTCTCCATCG	AtMYB75 full length gateway attB primer
GTW-MYB90-1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTTGAGG	AtMYB90 full length gateway attB primer
GTW-MYB90-2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTCAAACGGTGAGAAAACACTAATCAAGTTTC	AtMYB90 full length gateway attB primer

Tab. A16 (fortgesetzt): Primerliste

Name	Sequenz	Verwendungszweck
H1690	CGCGATCCAGACTGAATGC	Standard Sequenzierprimer pBT10 GUS >upstream
H227	CCTCTATATAAGGAAGTTC	Standard Sequenzierprimer pBT-Derivate
H228	CGCAAGACCGGCAACAGG	Standard Sequenzierprimer pBT-Derivate
H755	GAGTCAGTGAGCGAGGAA	Standard Sequenzierprimer pBT10 Polylinker > downstream
L36	ACATGACGATTATACGGGTCTATGC	TTG1-RT-PCR-Primer
L47	AACGAGAAGAAAATAGCTCA	BAN-RT-PCR-Primer
L48	GACTGATTTCGATTTTAAGC	BAN-RT-PCR-Primer
L51	TCCATTTCGGAGTTTCAC TTC	TT2-RT-PCR-Primer
L52	CACCAATTAGAAAGCGTTCAGACAA	TT2-RT-PCR-Primer
L53	TTTAGAGAGAGAGCTACCACG	TT8-RT-PCR-Primer
L54	CACCAGTTGCTTCCTCGTCTTFA	TT8-RT-PCR-Primer
MYB0-3-1	CGTAACGTAGGGTAACAAAGGATAACGC	FL- 3RACE Primer AMYB0 / GL1
newGTW	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGYA	Universeller No-Stop-Primer für pDONR201 Klone
Rev SeqPr (-48)	AGCGGATAACAATTTACACACAGGA	Standard Sequenzierprimer TOPO-Vektoren
revGTWnoST	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTCCAACTCTAAGGAGCTGCATTTTGTTAGC	TTG1 fl-cDNA Primer rev. GTW no STOP
RS469	TCCGCTCTTTCTTTCCAAAGCTCAT	cDNA spezifischer Actin2-Primer
RS470	TCCAGCACAAATACCGGTTGTACG	cDNA spezifischer Actin2-Primer
S205	AGCTCCAGATTTCGTTATCCAGATCG	TTG1-RT-PCR-Primer
SeqL-A	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Standard Sequenzierprimer pDONR201
SeqL-B	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Standard Sequenzierprimer pDONR202
TM-TTG1	(FAM)CTCGAAGATTACAACAACCGCATCGACA(TAM)	TaqMan-probe for the TTG1-Gene (Col-0).
ttg1GTWfwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGATAATTCAAGCTCCAGATTTCG	GTW forward primer for amplification of ttg1 fl-cDNA
ttg1GTWrevSTOP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAACCTCTAAGGAGCTGCATTTTGTTAGC	GTW reverse primer for amplification of ttg1 fl-cDNA incl. original STOP codon
Uni SeqPr (-47)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAG	Standard Sequenzierprimer TOPO-Vektoren

Tab. A16 (fortgesetzt): Primerliste

8.7 Klonliste

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Klone bearbeitet:

Klon-Nummer	Insert	Art des Inserts	Vektor	Selektion
mhei-001	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-002	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-003	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-004	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-005	<i>AtMYB075</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-006	<i>AtMYB090</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-007	<i>AtMYB011</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-008	<i>AtMYB023</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-009	<i>AtMYB066</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-010	<i>AtbHLH034</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-011	<i>AtbHLH104</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-012	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-013	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-014	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-015	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-016	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-017	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-018	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-019	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-020	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-021	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-022	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-023	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-024	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-025	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-026	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-027	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-028	<i>AtMYB075</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-029	<i>AtMYB075</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-030	<i>AtMYB075</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-031	<i>AtMYB075</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-032	<i>AtMYB090</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-033	<i>AtMYB090</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-034	<i>AtMYB090</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-035	<i>AtMYB090</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-036	<i>AtMYB011</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-037	<i>AtMYB011</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-038	<i>AtMYB023</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-039	<i>AtMYB023</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-040	<i>AtMYB066</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-041	<i>AtMYB066</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-042	<i>AtbHLH034</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-043	<i>AtbHLH034</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-044	<i>AtbHLH104</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)

Klon-Nummer	Insert	Art des Inserts	Vektor	Selektion
mhei-045	<i>AtbHLH104</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-046	<i>AtMYB00</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-047	<i>AtMYB11</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-048	<i>AtMYB11</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-049	<i>AtMYB23</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-050	<i>AtMYB23</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-051	<i>AtMYB66</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-052	<i>AtMYB66</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-053	<i>AtMYB0</i>	fl-cDNA	pDEST22 (AD)	AMP (50)
mhei-054	<i>AtMYB0</i>	fl-cDNA	pDEST32 (BD)	GM (10)
mhei-055	<i>AtMYB0</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-056	<i>AtMYB0</i>	fl-cDNA	pBENDER	AMP (50)
mhei-057	<i>AtMYB114</i>	fl-genomDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-058	<i>Prom-AtDFR</i>	minimal Prom	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-059	<i>Prom-AtBAN</i>	minimal Prom	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-060	<i>AtbHLH125</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-061	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA	pDEST17	AMP (50)
mhei-062	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA	pDEST17	AMP (50)
mhei-063	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA	pDEST17	AMP (50)
mhei-064	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA	pDEST17	AMP (50)
mhei-065	<i>TTG1</i>	fragment	pENTRYD-TOPO	KAN (50)
mhei-066	<i>AtbHLH068</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-067	<i>Prom_atCHS</i>	minimal Prom	pBT10	AMP (50)
mhei-068	<i>TTG1</i>	fragment	pBT-antisense	AMP (50)
mhei-069	<i>Prom-AtDFR</i>	minimal Prom	pBlue	AMP (50)
mhei-070	<i>Prom-AtBAN</i>	minimal Prom	pBlue	AMP (50)
mhei-071	<i>AtbHLH005</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-072	<i>AtbHLH010</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-073	<i>AtbHLH011</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-074	<i>AtbHLH013</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-075	<i>AtbHLH003</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-076	<i>AtbHLH004</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-077	<i>AtbHLH006</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-078	<i>Prom-AtCHS</i>	minimal Prom	pENTR	KAN (50)
mhei-079	<i>AtbHLH003</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-080	<i>AtbHLH004</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-081	<i>AtbHLH005</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-082	<i>AtbHLH006</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-083	<i>AtbHLH010</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-084	<i>AtbHLH013</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-085	<i>AtbHLH068</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-086	<i>AtbHLH125</i>	fl-cDNA	pBTdest	AMP (50)
mhei-087	<i>Prom-AtCHS</i>	minimal Prom	pBlue	AMP (50)
mhei-088	<i>TTG1</i>	fl-cDNA	pLBR19	AMP (50)
mhei-089	<i>Leervector</i>	Leervector	p2x35S-GTWY-GFP	Amp und Kan
mhei-090	<i>AtbHLH014</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-091	<i>AtbHLH014</i>	genDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-092	<i>AtbHLH028</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-093	<i>PromBanyuls</i>	1400bp Prom.	pBT8GUS	AMP (50)
mhei-094	<i>PromDFR</i>	520bp Prom.	pBT8GUS	AMP (50)

Klon-Nummer	Insert	Art des Inserts	Vektor	Selektion
mhei-095	<i>TTG1</i>	fragment	pJawohl8-RNAi	AMP (50)
mhei-096	<i>TTG1</i>	fragment	pJawohl17-RNAi	AMP (50)
mhei-097	<i>TTG1</i>	fl-cDNA	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-098	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA (D47N)	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-099	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA (D46N)	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-100	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56N)	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-101	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56D)	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-102	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA (D53N)	pDONR2.01	KAN (50)
mhei-103	<i>TTG1</i>	fl-cDNA	pCACTattR	AMP (50)
mhei-104	<i>COP1</i>	fl-cDNA	pCACTattR	AMP (50)
mhei-105	<i>TTG1</i>	fl-cDNA	pCD2attR	AMP (50)
mhei-106	<i>COP1</i>	fl-cDNA	pCD2attR	AMP (50)
mhei-107	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA (D47N)	pBTdest	AMP (50)
mhei-108	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA (D46N)	pBTdest	AMP (50)
mhei-109	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56N)	pBTdest	AMP (50)
mhei-110	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56D)	pBTdest	AMP (50)
mhei-111	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA (D53N)	pBTdest	AMP (50)
mhei-112	<i>AtbHLH001</i>	fl-cDNA (D47N)	pCD2attR	AMP (50)
mhei-113	<i>AtbHLH002</i>	fl-cDNA (D46N)	pCD2attR	AMP (50)
mhei-114	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56N)	pCD2attR	AMP (50)
mhei-115	<i>AtbHLH012</i>	fl-cDNA (E56D)	pCD2attR	AMP (50)
mhei-116	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA (D53N)	pCD2attR	AMP (50)
mhei-117	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA neST	pDONR201	KAN (50)
mhei-118	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA neST	p2x35S-GTWY-GFP	AMP (50)
mhei-119	<i>TTG1</i>	fl-cDNA neST	pDONR201	KAN (50)
mhei-120	<i>TTG1</i>	fl-cDNA neST	p2x35S-GTWY-GFP	AMP (50)
mhei-121	<i>AtbHLH001</i>	2.5kb-Promotor	pCR4TOPOblunt	AMP (50)
mhei-122	<i>AtbHLH002</i>	2.5kb-Promotor	pCR4TOPOblunt	AMP (50)
mhei-123	<i>AtbHLH012</i>	2.5kb-Promotor	pCR4TOPOblunt	AMP (50)
mhei-124	<i>AtbHLH042</i>	1.7kb-Promotor	pCR4TOPOblunt	AMP (50)
mhei-125	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA neST	pDONR201	KAN (50)
mhei-126	<i>AtbHLH001</i>	2.5kb-Promotor	pBT10-GUS	AMP (50)
mhei-127	<i>AtbHLH002</i>	2.5kb-Promotor	pBT10-GUS	AMP (50)
mhei-128	<i>AtbHLH042</i>	1.7kb-Promotor	pBT10-GUS	AMP (50)
mhei-129	<i>AtbHLH042</i>	fl-cDNA neST	p2x35S-GTWY-GFP	AMP(50)
mhei-130	<i>AtbHLH001</i>	2.5kb-Promotor	pANGUS	AMP(50)
mhei-131	<i>AtbHLH002</i>	2.5kb-Promotor	pANGUS	AMP(50)
mhei-132	<i>AtbHLH042</i>	1.7kb-Promotor	pANGUS	AMP(50)

Danke.....

Herrn Prof. Dr. B. Weißhaar danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die großen Möglichkeiten, die er mir in meiner Zeit in Köln eröffnet hat. Ich danke ihm für die Anleitung zum eigenverantwortlichen und selbständigen Arbeiten und für das freundschaftliche Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge danke ich für die Übernahme des Koreferats und für eine wunderbare Zeit im Graduiertenkolleg „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen in Pflanzen.“. Er hat uns Kollegiaten stets ein ansprechendes Umfeld im wissenschaftlichen Sinne und darüber hinaus geboten.

Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Allen Graduiertenkollegiaten sei gedankt für zahlreiche Diskussionen, interessante Seminarvorträge und das eine oder andere gemeinsame Kölsch. Gut Holz.....

Dem MPI für Züchtungsforschung und seinen Direktoren danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seinen Mitarbeitern für das hervorragende wissenschaftliche Umfeld.

Der Ag Weisshaar - und damit meine ich wirklich alle – danke ich für ihre Unterstützung im Labor, die guten Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen, sowie für viele schöne Momente jenseits der Wissenschaft. Ich werde Euch nicht alle aufzählen, aber jeder hat mit zu dieser Arbeit beigetragen.

Im Besonderen danke ich Herrn Dr. Marc Jakoby, für unzählige Ratschläge im Labor, für den täglichen Ansporn und das Wissen, dass er mir vermittelt hat. Und für seine guten Nerven....

Gedankt sei auch meinem Schutzengel. Bei all dem Asphalt und Blech, mit dem ich bei diversen Fahrradunfällen in Kontakt gekommen bin, hatte er fast mehr zu tun als ich im Labor.

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

Der größte Dank gilt Nicole, meiner Frau, die nicht nur mein Halt und die größte Unterstützung an jedem Tag der letzten Jahre war, sondern auch ein unerschöpflicher Quell an Motivation, Glück und Liebe. Ich liebe Dich!

Erklärung

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

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Bernd Weisshaar (Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie, Max Planck Institut für Züchtungsforschung) betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat mitzuteilen.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Teilpublikationen
oder Publikationen in Vorbereitung:

Teilpublikationen:

Antoine Baudry, **Heim M.A.**, Debeaujon I., Caboche M., Weisshaar B., und Loic Lepiniec. „Functional analysis of TT2, TT8, and TTG1 reveals new insights in gene regulation by MYB/bHLH complexes in plants.“, in Vorbereitung.

Paul C. Bailey, **Heim M.A.**, Huq E., Jakoby M., Martin C., Quail P., Toledo-Ortiz G., Werber M., Weisshaar B. “An Update on the bHLH transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*.” Eingereicht zu *The Plant Cell*, September 2003.

Marc A. Heim, Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B. und Paul C. Bailey. “The Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor Gene Family in Plants: A Genome-wide study of Protein Structure and Functional Diversity.”, *Molecular Biology and Evolution*, 2003 May; 20(5):735-47, Oxford University Press, Oxford, UK

Poster-Präsentationen und Vorträge:

Poster Präsentation im Rahmen der Ph.D. Summerschool „Functional Genomics: Theory and Hands on Data Analysis“ der Graduate School of Experimental Plant Sciences, Universität Utrecht, Niederlande: “A Genome-wide Survey on basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors – 162 AtbHLH Transcription Factors are present in the *A. thaliana* Genome”, **Marc A. Heim**, Jakoby M.J., Dewal G., Bailey P., Martin C. und Bernd Weisshaar, August 2003

Poster Präsentation auf der Jahrestagung der American Society of Plant Biologists – Plant Biology 2002, Denver, Colorado, USA: “A Genome-wide Survey on basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors”, **Marc A. Heim**, Jakoby M.J., Dewal G., Bailey P., Martin C. und Bernd Weisshaar

Vortrag im Rahmen des Minisymposiums “Transcriptional Regulation” auf Einladung der American Society of Plant Biologists – Jahrestagung der American Society of Plant Biologists - Plant Biology 2002, Denver, Colorado, USA

.....
Datum

.....
Unterschrift

Lebenslauf

Name: Marc Anton Heim

Abschluss: Diplom Biologe

Anschrift: Auf dem Kamm 92, 50321 Brühl

Telefon: +49 22 32 95 05 74

E-Mail: crucenius@web.de

Geburtstag/-ort: 10. Mai 1975, Bad Kreuznach

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Nicole Maria Heim, geb. Feyen

Studium und Schulbildung:

10/2001- heute Studium der Betriebswirtschaftslehre (Diplomstudiengang)
Universität zu Köln

10/2000-09/2003 Doktorarbeit in Genetik, Universität zu Köln
Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft
im Rahmen des Graduiertenkollegs:
“Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen in Pflanzen”.
Dissertationsthema:
„Basische Helix-Schleifen-Helix Transkriptionsfaktoren in
Arabidopsis thaliana: Eine genomweite Studie zu Struktur und
Funktion.“, angefertigt am Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung, Köln. Vorgelegt im September 2003.

10/1995-09/2000 Studium der Biologie (Diplomstudiengang),
Universität Kaiserslautern, Schwerpunkt Biotechnologie
Diplomarbeit unter Betreuung von Frau Professor Dr. H. Anke,
Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung an der
Universität Kaiserslautern, zum Thema:
„A 42-94-03a, ein neuer und selektiver Hemmstoff der
Konidienkeimung bei *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryza*) und
anderen phytopathogenen Pilzen aus *Mollisia cinerea*.“, vorgelegt
im September 2000.

10/1994-09/1995 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr

08/1985-06/1994 Gymnasium an der Stadtmauer, Bad Kreuznach, Abschluss: Abitur

08/1981-07/1985 Grundschule Süd, Bad Kreuznach