

**Systematische Untersuchungen von
Proteininteraktionen der MYB und bHLH
Transkriptionsfaktoren aus
*Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Ilona Zimmermann
aus Gernersheim

angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Köln 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Weisshaar
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Michael Melkonian

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eukaryontische Transkriptionsfaktoren	1
1.2	Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren	3
1.3	Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen	4
1.4	Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen	8
1.5	Die Regulation der Flavonoidbiosynthese	9
1.6	Die Regulation der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung	12
1.7	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	15
2.1.2	Medien, Puffer und Lösungen	15
2.1.3	Desoxyoligonukleotide	15
2.1.4	Sequenzanalysen	16
2.1.5	Verwendete Organismen:	17
2.1.6	DNA-Vektoren	17
2.1.7	cDNA-Bibliotheken für das Hefe 2-Hybrid-System	18
2.1.8	Herstellung der Vektoren	18
2.2	Allgemeine Methoden	21
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	21
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl-Methode)	21
2.2.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	22
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienkulturen	22
2.2.5	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	22
2.2.6	Konzentrationsabschätzung von Plasmid-DNA	22
2.2.7	Endonukleolytische Spaltung von DNA	23
2.2.8	Agarosegelelektrophorese	23
2.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten	23
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.12	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial	24
2.2.13	cDNA-Synthese	24
2.2.14	RT-PCR	24
2.3	Das Gateway-System	24
2.4	Techniken im Umgang mit Hefen	26
2.4.1	Lösungen und Medien für Hefen:	26
2.4.2	Hefetransformation	27
2.4.3	Konjugation von Hefezellen	28
2.4.4	Galaktosidase-Tests	28
2.5	Methoden zum Hefe 2-Hybrid-System	29
2.5.1	Vorversuche zum Hefe 2-Hybrid-System:	30
2.5.2	Durchführung der Hefe 2-Hybrid-Screens	30

2.5.3	In vivo Rekombination in Hefe	31
2.5.4	Plasmid-Präparation aus Hefezellen	31
2.5.5	Kolonie-PCR auf Hefezellen	32
2.5.6	Aufreinigung von PCR-Ansätzen im Mikrotiterplattenformat	32
2.6	Ungerichtete Mutagenese durch „error prone“ PCR	32
2.7	In vitro Transkription und Translation	33
2.8	Proteinexpression von GST-fusionierten Proteinen in E.coli	33
2.9	GST-vermittelter Pull-down-Assay	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Das Hefe 2-Hybrid-System zur Analyse von Interaktionsnetzwerken	35
3.1.1	Proteininteraktionsanalyse in einem Hochdurchsatzverfahren	35
3.1.2	Kartierung der Interaktionsdomänen von AtbHLH002 und AtbHLH012	42
3.1.3	Analyse eines Interaktionsnetzwerks von ausgewählten Subgruppen zweier Proteinfamilien	44
3.1.4	in vitro Bestätigung der Interaktionsdaten von AtMYB75 und AtMYB90	48
3.1.5	Deletionsmutagenese von AtMYB75	51
3.1.6	Untersuchung der Interaktionsdomäne von AtMYB75 durch Mutagenese	52
3.1.7	Die Interaktion basiert auf einem Motiv, welches in allen interagierenden Proteinen vorhanden ist	58
3.1.8	Expressionsanalyse von ausgewählten MYB und bHLH-Faktoren, die in einem funktionellen Zusammenhang stehen	62
4	Diskussion	64
4.1	Die Spezifität der MYB- / bHLH-Interaktionen	64
4.1.1	Was ist die strukturelle Basis für die Interaktionen der MYB und bHLH Proteine?	65
4.1.2	Die variablen Aminosäuren der Interaktionsdomäne bilden eine Interaktionsfläche	68
4.1.3	Das Motiv Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R ist auch über Artgrenzen hinweg konserviert	70
4.2	Regulatorische Netzwerke der MYB- und bHLH Proteine	72
4.2.1	Regulation der Phenylpropanoid-Biosynthese und der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung	72
4.2.2	Sind die MYB-Proteine, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren interagieren redundant?	75
4.2.3	Identifizierung neuer putativer Regulatoren der MYB- und bHLH-Proteine	75
4.3	Ausblick	76
5	Zusammenfassung	78
6	English abstract	79
7	Literatur	80
8	Anhang	91
8.1	Listen der Kandidaten aus den Hefe 2-Hybrid-Screens	91
8.1.1	bestätigte Kandidaten	91
8.1.2	bisher unbestätigte Kandidaten	94
8.1.3	Autoaktivierende AD-Fusionen	103
8.2	Oligonukleotide	103

1 Einleitung

Die Regulation der Transkription von Genen ist ein grundlegender Prozess, dessen Flexibilität und Komplexität auf kombinatorischer Interaktion einer Vielzahl von Proteinen basiert. Das Vorhandensein und die Aktivität dieser Proteine müssen zeitlich und räumlich exakt abgestimmt sein.

1.1 Eukaryontische Transkriptionsfaktoren

Proteine, die bei der Transkriptionsregulation von eukaryontischen Genen eine bedeutende Rolle spielen, können vereinfacht in 3 Gruppen unterteilt werden: 1.) die allgemeinen Transkriptionsfaktoren, 2.) die sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren und 3.) die Koregulatoren. Die allgemeinen Transkriptionsfaktoren sind ubiquitär und bilden den Prä-Initiationskomplex (PIC) im Promotorbereich. Zu ihnen zählen die RNA Polymerase II und die allgemeinen Transkriptionsinitiationsfaktoren, die sequenzspezifisch im Promotor zum Beispiel an die TATA-Box binden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Transkriptionsstart. Zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren gehören die Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFII F und TFII H. Mit Ausnahme von TFIIB sind es Proteinkomplexe, die aus 2-14 verschiedenen Proteinen bestehen (Roeder, 1996; Zawel and Reinberg, 1993).

Gene besitzen in ihrem Promotorbereich außer den Kernkomponenten, die von den allgemeinen Transkriptionsfaktoren gebunden werden, noch mehrere proximale Promotorelemente und weitere regulatorische Sequenzen, wie z.B. Silencer oder Enhancer, die von den verschiedenen sequenzspezifischen DNA- bindenden Transkriptionsfaktoren erkannt werden (Ogata et al., 2003). Diese spezifischen Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut. Sie enthalten neben der DNA-Bindedomäne mindestens noch eine weitere funktionelle Domäne, die Aktivator- oder Repressorfunktion haben kann oder der Protein-Proteinwechselwirkung dient (Frankel and Kim, 1991; Ptashne, 1988). Die spezifischen Transkriptionsfaktoren werden Entsprechend ihrer DNA-Erkennungssequenzen in Familien eingeteilt (Pabo and Sauer 1992). Während die DNA-Erkennungssequenzen meist strukturell konserviert sind, sind die Sequenzen außerhalb dieser Domänen meist variabel in Struktur und Funktion (Wolberger, 1999). Die exakte Regulation der Transkription von eukaryontischen Genen basiert auf der Bildung eines Komplexes, der als Enhanceosom bezeichnet wird (Carey, 1998; Smale, 2001). Dieser Proteinkomplex besteht aus Transkriptionsfaktoren, die sequenzspezifisch an verschiedene Bereiche des Promotors binden, und anderen Proteinen, die als Kofaktoren und Mediatoren fungieren (Roeder, 1996). Die Regulation von Genen durch Bindung mehrerer

verschiedener Transkriptionsfaktoren, die durch spezifische DNA-Protein und Protein-Protein-Interaktionen in Wechselwirkung stehen, wird als kombinatorische Kontrolle bezeichnet (Singh, 1998; Wolberger, 1999). Dadurch kann mit Hilfe weniger verschiedener regulatorischer Proteine die vielfältige und komplexe zeitliche und räumliche Regulation der Transkriptionsrate von Zielgenen kontrolliert werden (Freiman and Tjian, 2003).

Die an den Proteinkomplexen beteiligten Transkriptions-Kofaktoren oder Koregulatoren binden nicht an die DNA, sondern interagieren mit Regulatoren und beeinflussen dadurch deren Funktion und Aktivität auf verschiedene Art und Weise (Martinez, 2002). Die Koregulatoren können als Mediatoren zwischen Proteinkomplexen vermitteln oder durch posttranslationelle Modifizierungen die Affinität der Transkriptionsfaktoren für die Bindung an andere Proteine oder an die DNA verändern (Barlev et al., 2001; Gu and Roeder, 1997). Koregulatoren können auch eine Veränderung der Gesamtkonformation und damit eine Aktivierung/Inaktivierung regulatorischer Bereiche bewirken oder den nucleo-cytoplasmatischen Transport oder die Proteinstabilität regulieren.

Während im Vergleich zu Hefe und tierischen Organismen bei Pflanzen bisher wenig über die generellen Transkriptionsfaktoren bekannt ist, sind inzwischen viele genspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert worden. Pflanzen benötigen aufgrund ihrer Ortsgebundenheit Mechanismen, die es ihnen ermöglichen auf vielfältige biotische und abiotische Umwelteinflüsse zu reagieren. Diese Mechanismen begründen das Vorkommen vieler pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel die EREBP-, die NAC-, die WRKY- und die Dof-Familie. Andere Familien von Transkriptionsfaktoren kommen in allen eukaryontischen Organismen vor, sind aber in Pflanzen besonders stark amplifiziert, so zum Beispiel die MADS-Box-Proteine, die bZIP-Proteine und die MYB-Transkriptionsfaktoren (Riechmann et al., 2000).

Das inzwischen annähernd vollständig sequenzierte Arabidopsisgenom (AGI, www.arabidopsis.org) erlaubt die umfassende Vorhersage von Transkriptionsfaktoren anhand konservierter DNA-Bindungsmotive. Insgesamt kodieren in Arabidopsis ca. 1500 Gene für mögliche Transkriptionsfaktoren, das entspricht fast 6% aller Gene (Riechmann et al., 2000). Von diesen ist bisher nur ein kleiner Prozentsatz genetisch charakterisiert. Zu den größten Gruppen von Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gehören die bHLH-Proteine und die R2R3-MYB-Proteinfamilie (Heim et al., 2003; Riechmann et al., 2000). Gemeinsam, teilweise durch direkte Interaktion, sind diese beiden Transkriptionsfaktor-Familien an der Regulation der Phenylpropanoidbiosynthese und der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung beteiligt.

1.2 Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren

Der Name der MYB-Proteinfamilie basiert auf den Sequenzähnlichkeiten zum Produkt des retroviralen Onkogens *v-MYB* des *avian myeloblastosis virus* (AMV) und dessen zellulären Protoonkogen *c-MYB*. Vertreter dieser Gruppe wurden in einer Vielzahl eukaryontischer Organismen von Pilzen bis zu Pflanzen, Insekten und Säugetieren identifiziert (Gonda et al., 1985; Klempnauer and Sippel, 1987; Ohi et al., 1994; Stober-Grässer et al., 1992; Stracke et al., 2001; Tice-Baldwin et al., 1989). Alle MYB-Transkriptionsfaktoren haben eine so genannte MYB-Domäne, die in tierischen Organismen aus 3 unvollkommenen Sequenzwiederholungen, bestehend aus 51- 53 Aminosäuren gebildet wird (im folgenden auch R1, R2 und R3 genannt) (Frampton et al., 1991). Jede der drei Sequenzwiederholungen kodiert für jeweils drei Helices, von denen die letzten zwei 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., 1991).

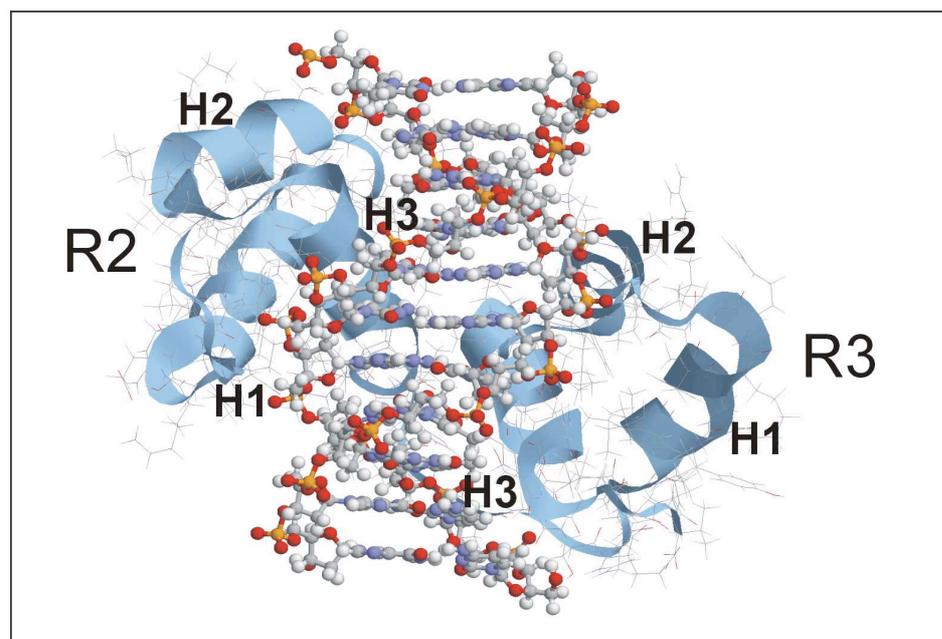


Bild 1.1 Der Komplex aus der c-MYB-Bindedomäne an DNA

Dargestellt ist die R2- und R3-Domäne von cMYB und die Bindung der Helices (jeweils H1-H3) in der großen Furche der DNA basierend auf einer NMR-Strukturanalyse von c-MYB aus Maus (Modell angefertigt bei www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/) (Ogata et al., 1994).

Charakteristisch sind außerdem die im regelmäßigen Abstand von 18 bis 19 Aminosäuren vorkommenden konservierten Tryptophanreste, die den hydrophoben Kern der 3-dimensionalen Helix-Struktur bilden und so indirekt für die Bindung an die DNA notwendig sind (Kanei-Ishii et al., 1990; Ogata et al., 1992; Ogata et al., 1994). Die Sequenzwiederholungen R2 und R3 sind für die sequenzspezifische Bindung an

die DNA ausreichend (Gabrielsen et al., 1991). NMR-Strukturanalysen von DNA-gebundenem c-MYB aus Maus haben gezeigt, dass die R2 und R3-Wiederholungen in der großen Furche der DNA liegen und jeweils die dritten Helices kooperativ an die DNA binden (Bild 1.1) (Ogata et al., 1994). Dabei binden konservierte Aminosäuren der DNA-bindenden Helix von R3 spezifisch an die Kernsequenz, während die Helix der R2-Wiederholung weniger spezifische Interaktionen mit den Nukleotiden der Peripherie der DNA-Erkennungssequenz eingeht (Ogata et al., 1995). Die MYB-Proteine der Tiere binden spezifisch an so genannte TYP I-Sequenzen: C₁T AACNG (Howe and Watson, 1991; Ogata et al., 1995).

In den untersuchten tierischen Organismen sind jeweils ein bis drei Mitglieder der MYB-Familie vorhanden (Graf, 1992; Lüscher and Eisenman, 1990; Stober-Grässer et al., 1992; Thompson and White, 1991). Die MYB-Transkriptionsfaktoren in tierischen Zellen sind an der Zellzykluskontrolle, der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen und dem programmierten Zelltod beteiligt (Ganter and Lipsick, 1999; Oh and Reddy, 1999). Andere MYB-Proteine, wie 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 and Grotewold, 1999). Mitglieder einer anderen Familie von MYB-Proteinen mit nur einer Sequenzwiederholung, die ebenfalls in Hefe, 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).

1.3 Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen

Strukturell sind die pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren den tierischen MYB-Transkriptionsfaktoren ähnlich, auch sie besitzen eine MYB-Domäne im N-terminalen Bereich (Solano et al., 1997).

Anders als in Tieren, wo nur ein bis drei Mitglieder der MYB-Familie in den untersuchten Organismen vorhanden sind, findet man in Pflanzen eine viel größere Zahl von MYB-Proteinen (Rubio et al., 2001; Stracke et al., 2001). In *A. thaliana* gibt es über 125 R2R3-MYB-Proteine. Anhand der Anzahl der Sequenzwiederholungen können die MYB-Proteine der Pflanzen in 3 Gruppen eingeteilt werden: die 1R-MYB-Proteine (eine Sequenzwiederholung), die R2R3-MYB-Proteine (2 Sequenzwiederholungen) und die MYB-3R-Proteine (3 Sequenzwiederholungen). Eine Ausnahme ist AtMYB4R, ein MYB-Protein mit 4 Sequenzwiederholungen aus *A. thaliana* (Stracke et al., 2001).

Die Gruppe der MYB-Transkriptionsfaktoren mit 3 Sequenzwiederholungen ist in *A. thaliana* mit 5 Proteinen vertreten. Ähnlich wie die MYB-Proteine in tierischen Organismen, sind MYB-3R-Proteine auch hier an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt (Ito et al., 2001).

Basierend auf Sequenzanalysen wird davon ausgegangen, dass es mehr als 50 MYB-Proteine mit nur einer Sequenzwiederholung in *A. thaliana* gibt (Riechmann et al., 2000). Für diese Gruppe wurden Funktionen bei der Regulation pflanzenspezifischer Prozesse beschrieben. In Arabidopsis wirken die Proteine LHY (LONG HYPOCOTYL) und CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) als Teil des circadianen Oszillators direkt an den photoperiodischen Reaktionen der Pflanzen mit (Green and Tobin, 2002). Die Proteine CAPRICE (CPC), TRIPTYCHON (TRY) und AtMYBL2 sind an der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung beteiligt (Kirik et al., 2001; Sawa, 2002; Schnittger et al., 1999; Wada et al., 1997).

Die R2R3-MYB-Proteine mit zwei Sequenzwiederholungen stellen mit mehr als 125 Mitgliedern die größte MYB-Unterfamilie dar (Stracke et al., 2001). Die Expansion dieser Familie erfolgte wahrscheinlich nach dem Verlust der R1-Sequenzwiederholung (Jin and Martin, 1999). Die Proteine sind außerhalb der MYB-Domäne sehr unterschiedlich, aber anhand der Sequenzhomologien in der MYB-Domäne und einzelner Motive des C-Terminus wurden die R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis in 22 Untergruppen eingeteilt (Bild 1.3) (Stracke et al., 2001).

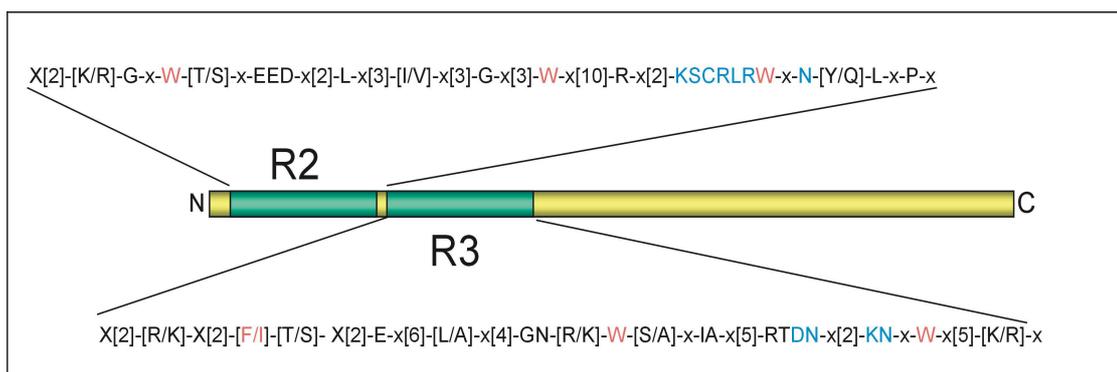


Bild 1.2 Schematische Übersicht eines R2R3-MYB-Proteins aus Pflanzen

Dargestellt sind in grün die zwei MYB-Sequenzwiederholungen und ihre jeweiligen Konsensussequenzen, die in Anlehnung an eine Sequenzanalyse aus Stracke et al. (2001) bestimmt wurden. In blau sind die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren dargestellt. (angelehnt an Stracke et al. (2001) und Avila et al. (1993))

Die R2R3-Domänen innerhalb der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren sind bis auf eine Ausnahme (AtMYB CDC5+ mit 31% Identität) mindestens zu 40% identisch mit einer Konsensussequenz, die sich aus Aminosäuren zusammensetzt, die in der gesamten Familie zu mehr als 90% konserviert sind (Bild 1.2). Einige Aminosäuren, wie zum Beispiel die Tryptophanreste, die den hydrophoben Kern der Helix-Struktur ausmachen oder Aminosäuren im Bereich der DNA-bindenden dritten Helix, sind fast zu 100% konserviert (Avila et al., 1993).

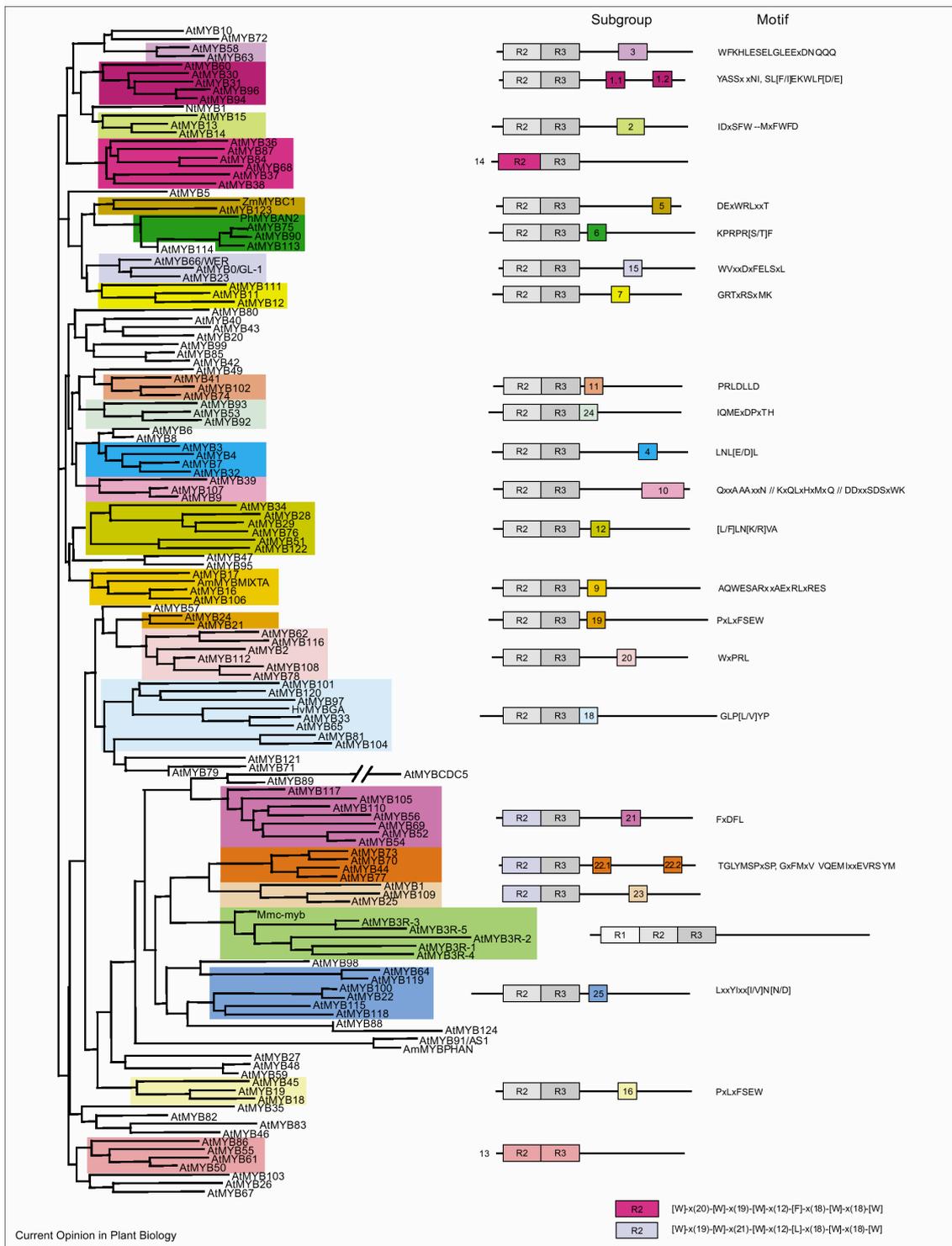


Bild 1.3 Stammbaum der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren

Der Stammbaum wurde der Veröffentlichung von Stracke et al (2001) entnommen. In der rechten Spalte sind Subgruppen aufgeführt, die anhand der MYB-Domäne sowie übereinstimmender Sequenzmotive des C-Terminus definiert wurden (Stracke et al., 2001).

Die Ergebnisse aus den bisher näher untersuchten R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren legen nahe, dass diese Proteinfamilie, wie auch die 1R-MYB-Proteine verschiedene, aber vorwiegend pflanzenspezifische Prozesse regulieren. Die Funktionen der über die MYB Domäne hinausgehenden Proteinbereiche sind weitgehend unbekannt. Für einige R2R3-MYB-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie eine C-terminale Domäne besitzen, die für eine Transkriptionsaktivierung verantwortlich ist (Goff et al., 1991; Moyano et al., 1996; Sainz et al., 1997). Bei anderen wiederum wurden bestimmte Sequenzmotive mit Repressorfunktionen in Zusammenhang gebracht (Jin et al., 2000). Auch eine posttranslationale Regulation der pflanzlichen MYB Proteine durch Phosphorylierung, wie sie für B-MYB beschrieben ist, wird diskutiert (Petrovas et al., 2003). Die Funktion der MYB-Domäne liegt einerseits in der DNA-Bindung, sie kann aber auch an Proteininteraktionen beteiligt sein, wie zum Beispiel an der Interaktion mit bHLH-Proteinen (Goff et al., 1992).

Für die R2R3-MYB-Proteine in Pflanzen sind vielfältige biologische Funktionen beschrieben und postuliert worden. Einige MYB-Proteine werden durch Stressfaktoren wie Trockenheit, Nässe und UV-Strahlung, durch Pathogenbefall oder durch Pflanzenhormone induziert (Abe et al., 2003; Kirik et al., 1998a; Urao et al., 1993). Andere MYB-Transkriptionsfaktoren sind an der Spross- oder Blattmorphogenese oder an der Blütenbildung beteiligt. So zum Beispiel DIVARICATA und PHANTASTICA aus *Antirrhinum majus* (Galego and Almeida, 2002; Waites et al., 1998) und die PHANTASTICA – Orthologe Rough Sheath aus Mais und AS1 (*AtMYB91*) aus *Arabidopsis* (Byrne et al., 2000; Schneeberger et al., 1998). *LeBlind*, ein MYB-Protein aus Tomate, welches die größten Homologien zu *AtMYB36* aufweist, wird für die Initiation von Lateralmeristemen benötigt (Schmitz et al., 2002) und *AmMIXTA* determiniert die konische Zellform in Petalen von *Antirrhinum majus* (Noda et al., 1994). Einige MYB-Transkriptionsfaktoren sind für die Keimung notwendig. *AtMYB61* wird in der Samenhülle exprimiert und ist für die Zusammensetzung und Produktion von Pektinen, die während der Keimung eine Schleimhülle bilden, mit verantwortlich (Penfield et al., 2001). *AtMYB44* und *AtMYB77*, deren Expression in der späten Embryogenese erhöht ist, regulieren wahrscheinlich den Übergang von der Ruhephase zur Keimung (Kirik et al., 1998b) und *HvMYBGa*, ein MYB-Protein aus Gerste ist Teil einer Giberellinsäure induzierten Genexpressionskaskade, die während der Keimung ausgelöst wird (Gubler et al., 1995).

Eine gut untersuchte Gruppe sind die MYB-Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Phenylpropanoidbiosynthesewegs und an der Trichom- bzw. der Wurzelhaarentwicklung beteiligt sind. Für einige dieser Proteine konnte gezeigt werden, dass sie zusammen mit bHLH-Proteinen Zielgene aktivieren (Goff et al., 1992; Quattrocchio et al., 1998). Die Regulation der einzelnen Schritte des Flavonoidbiosynthesewegs in *Zea mays* ist eines der am besten untersuchten Beispiele für Genregulation durch kombinatorische Interaktionen der Transkriptionsfaktoren (Singh, 1998).

1.4 Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen

Basische Helix Loop Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH) sind verbreitete Proteine. Bekannte Vertreter sind das humane c-MYC, sowie MyoD, Achaete und Scute von *Drosophila melanogaster*. Der erste bHLH, der in Pflanzen beschrieben wurde war Lc aus Mais (Ludwig et al., 1989). In *A. thaliana* wurden 133 Gene identifiziert, die ein bHLH-Motiv enthalten. Anhand von Sequenzvergleichen und Übereinstimmungen in der Genstruktur wurden die bHLH-Proteine in *A. thaliana* in 12 Subgruppen unterteilt (Heim et al., 2003). Die Namensgebende bHLH-Domäne dieser Proteine enthält eine Sequenz aus ca. 18 hydrophilen und basischen Aminosäuren, denen sich zwei Regionen aus hydrophoben Aminosäuren anschließen. Diese nehmen eine Helix-Loop-Helix-Konformation ein (Murre et al., 1994; Murre et al., 1989). Die bHLH-Domäne dient einerseits der DNA-Bindung über die basischen Bereiche, andererseits der Dimerisierung über konservierte Bereiche in den Helices (Brownlie et al., 1997; Heim et al., 2003).

Die biologischen Funktionen der bHLH-Faktoren sind vielfältig. Einige bHLH-Proteine, so zum Beispiel PIF3 (*AtbHLH008*) (Phytochrome interacting factor3), spielen eine Rolle bei der lichtabhängigen Genregulation und der Regulation circadianer Abläufe (Makino et al., 2002; Martinez-Garcia et al., 2000; Quail et al., 1995). Andere bHLH-Faktoren regulieren Stress- oder Pflanzenhormonabhängige Gene und sind dadurch auch am Wachstum und an Entwicklungsvorgängen in Pflanzen beteiligt. (Abe et al., 1997; de Pater et al., 1997; Friedrichsen et al., 2002). Auch die Fertilität kann in bestimmten bHLH-Mutanten gestört sein. Die SPATULA-Mutante (*AtbHLH024*) zeigt Defekte in der Bildung des Pollenschlauchs und das Protein ALCATRAZ (*AtbHLH073*) ist für die Differenzierung einer nichtlignifizierten Zelllage verantwortlich, die für die Zellseparation während der Reifung der Schoten notwendig ist (Alvarez and Smyth, 1999; Heisler et al., 2001; Rajani and Sundaresan, 2001).

Die ersten bHLH-Faktoren in Pflanzen wurden im Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese in Mais entdeckt (R/B-ähnliche bHLH-Proteine in *Zea mays*; (Goff et al., 1992)) (siehe Bild 1.5). Homologe dieser Mais-bHLH-Proteine sind in *Arabidopsis* ebenfalls an der Regulation der Flavonoidbiosynthese aber auch an der Regulation der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung beteiligt und werden im folgenden ebenfalls als R/B-ähnliche bHLH-Proteine bezeichnet (Nesi et al., 2000; Payne et al., 2000).

IIIId	AtbHLH003		At4g16430	AF251688	1	H-E-R	
	AtbHLH013	MYC7E	At1g01260	AY120752	1	H-E-R	
	AtbHLH017		At2g46510	AY094399	1	H-E-R	
	AtbHLH014		At4g00870	AJ519812	2	H-E-R	
IIIe	AtbHLH006	RAP-1*	At1g32640	X99548	1	H-E-R	
	AtbHLH004	*	At4g17880	AF251689	1	H-E-R	
	AtbHLH005	* *	At5g46760	AF251690	1	H-E-R	
	AtbHLH026	*	At5g46830	AF252636	1	H-E-R	
IIIIf	AtbHLH042	TT8	At4g09820	AJ277509	7	H-E-R	
	AtbHLH012	ATMYC1*	At4g00480	AF251697	8	L-D-R	
	AtbHLH001	GI3	At5g41315	AF246291	7	H-E-R	
	AtbHLH002	EGL1*	At1g63650	AF027732	7	H-E-R	

Bild 1.4 Ausschnitt aus einer Übersicht über bHLH-Proteine aus Pflanzen

Dargestellt sind die Subgruppen IIIId, IIIe und IIIIf, die die größte Ähnlichkeit zu den R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen in Mais zeigen. (entnommen aus Heim et al., 2003)

Neben den R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen sind an der Regulation beider Prozesse eng verwandte MYB Proteine, ein WD40 Protein (TTG1) und ein WRKY Transkriptionsfaktor (TTG2) beteiligt. Daher wird vermutet, dass die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Regulation auf gleichen oder ähnlichen Prinzipien basieren (Johnson et al., 2002; Schiefelbein, 2003). Von zentraler Bedeutung für diese Regulation sind kombinatorische Interaktionen der beteiligten MYB- und bHLH-Proteine.

1.5 Die Regulation der Flavonoidbiosynthese

Die Flavonoide, eine umfangreiche Gruppe der Phenylpropanoide, haben in der Pflanze vielfältige Funktionen. Als Pigmente der Blüten, Blätter und Früchte haben sie Schutz- oder Signalfunktion, sie dienen als Fraßschutz und zur Pathogenabwehr und können darüber hinaus an Entwicklungsprozessen wie Pollenreifung und Entwicklung der Samenschale beteiligt sein (Debeaujon et al., 2001; Li et al., 1993; Taylor and Jorgensen, 1992; van der Meer et al., 1992; Winkel-Shirley, 2001; Ylstra et al., 1992). Diese Funktionen erfordern eine exakte und flexible Regulation des Flavonoidbiosynthesewegs in Reaktion auf externe Stimuli.

Ausgangsstoff für die Flavonoidbiosynthese ist das Zimtsäurederivat pCumaroyl-Coenzym A, das durch Deaminierung, Hydroxylierung und Aktivierung aus Phenylalanin gebildet wird. Sukzessive Addition von 3 Einheiten Malonyl-CoA verbunden mit Decarboxylierung, Abspaltung von Coenzym A und Zyklisierung führt zur Bildung von Chalkon, dem gemeinsamen Vorläufermolekül der verschiedenen Flavonoide.

Die Regulation der Strukturgene, die an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, ist vor allem in Mais gut untersucht und basiert auf einem kombinatorischen Zusammenwirken von MYB-Proteinen der C1-Unterfamilie (C1, PL1 und P) mit den so genannten R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren (R, Lc, Sn und B), die in unterschiedlichen Organen zeitlich und räumlich koordiniert exprimiert werden (Consonni et al., 1993; Consonni et al., 1997; Ludwig and Wessler, 1990; Singh, 1998; Tonelli et al., 1994) (Bild 1.5).

Die MYB-Proteine C1 und PL1 sind zur Aktivierung ihrer Zielgene (*C2/CHS*, *A1/DFR*, *As/AS*, *Bz1/UFGT* und *Bz2/GST*, siehe Bild 1.5) von der Interaktion mit einem dieser R/B-bHLH-Faktoren abhängig. In transienten Versuchen in Mais und mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid-Verfahrens konnte gezeigt werden, dass C1 und R physikalisch interagieren (Goff et al., 1992). Das MYB-Homolog *ZmP* hingegen reguliert die Expression mehrerer früher Gene des Flavonoidbiosynthesewegs und den Zweig der Phlobaphen-Synthese (*CHS*, *CFI*, *DFR* siehe Bild 1.5) unabhängig von bHLH-Faktoren (Grotewold et al., 1994). Die anthocyan-spezifischen Gene *As/AS*, *Bz1/UFGT* und *Bz2/GST* werden dagegen nicht von *ZmP* reguliert (Dooner et al., 1991). Die rötlichen Phlobaphene kommen anders als Anthocyane nicht in der gesamten Pflanze, sondern hauptsächlich im Samenperikarp und in bestimmten Blütenteilen vor. Eine kombinatorische Kontrolle von Phenylpropanoidgenen durch MYB und bHLH-Faktoren wurde auch in anderen Pflanzen gezeigt. In *Petunia hybrida* sind daran die MYB-Proteine *PhAN2* und *PhAN4*, die bHLH-Faktoren *PhJAF13* und *PhAN1* und ein WD40-Protein, das Protein *PhAN11* beteiligt (de Vetten et al., 1997; Quattrocchio et al., 1999; Quattrocchio et al., 1998). *AmELUTA*, ein MYB-Protein, und *AmDELILA*, ein R/B-ähnliches bHLH-Protein, sind an der Flavonoidbiosynthese in *Antirrhinum majus* beteiligt (Martin et al., 1991).

Die systematische Analyse von *A. thaliana* Mutanten führte zu der Identifizierung einer großen Zahl von Mutanten des Phenylpropanoidbiosynthesewegs (Shirley et al., 1995; Wisman et al., 1998). Da *A. thaliana* keine auffällige Färbung besitzt, wurden Mutanten der Flavonoidbiosynthese anhand des „transparent testa“ (TT) Phänotyps identifiziert (Koorneef, 1990). Diese Mutanten haben aufgrund fehlender Tannine in der Samenhülle gelbe bis hellbraune Samen, die leicht von den dunkelbraunen Wildtyp-Samen unterschieden werden können. Einige der "transparent testa" (TT)-Mutanten haben Defekte in Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese (tt3:DFR; tt4: CHS; tt5: CFI; tt6: F3H; tt7: F3'H), die als Einzelkopie Gene im *A.thaliana* Genom vorliegen (Shirley et al., 1995; Wisman et al., 1998). In diesen Mutanten zeigt die gesamte Pflanze einen Defekt in der Flavonoid-Akkumulation.

Die anderen bislang molekular charakterisierten TT-Mutanten betreffen regulatorische Gene, die die strukturellen Gene der Flavonoidbiosynthese regulieren. Die in den Mutanten tt2 und tt8 veränderten Gene kodieren für ein MYB Protein (*AtMYB123*, TT2) und ein R/B-ähnliches bHLH-Protein (*AtbHLH042*, TT8). Beide Proteine werden gemeinsam für die Expression von DFR und LAR in Schoten von *A.thaliana* benötigt und es wird postuliert, dass diese beiden Proteine wie die Proteine *ZmC1* und *ZmR* interagieren (Nesi et al., 2000; Nesi et al., 2001). Darüber hinaus wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert: ein Zinkfingerprotein (*WIP1*, TT1), ein WD40 Protein (*TTG1*) und ein WRKY-Transkriptionsfaktor (*TTG2*) (Borevitz et al., 2000; Johnson et al., 2002; Sagasser et al., 2002; Walker et al., 1999). In Bild 1.5 sind Zwischenschritte der Flavonoidbiosynthese, die in *Zea mays* und *A. thaliana* von bHLH-Faktoren und/oder MYB-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, farbig hervorgehoben.

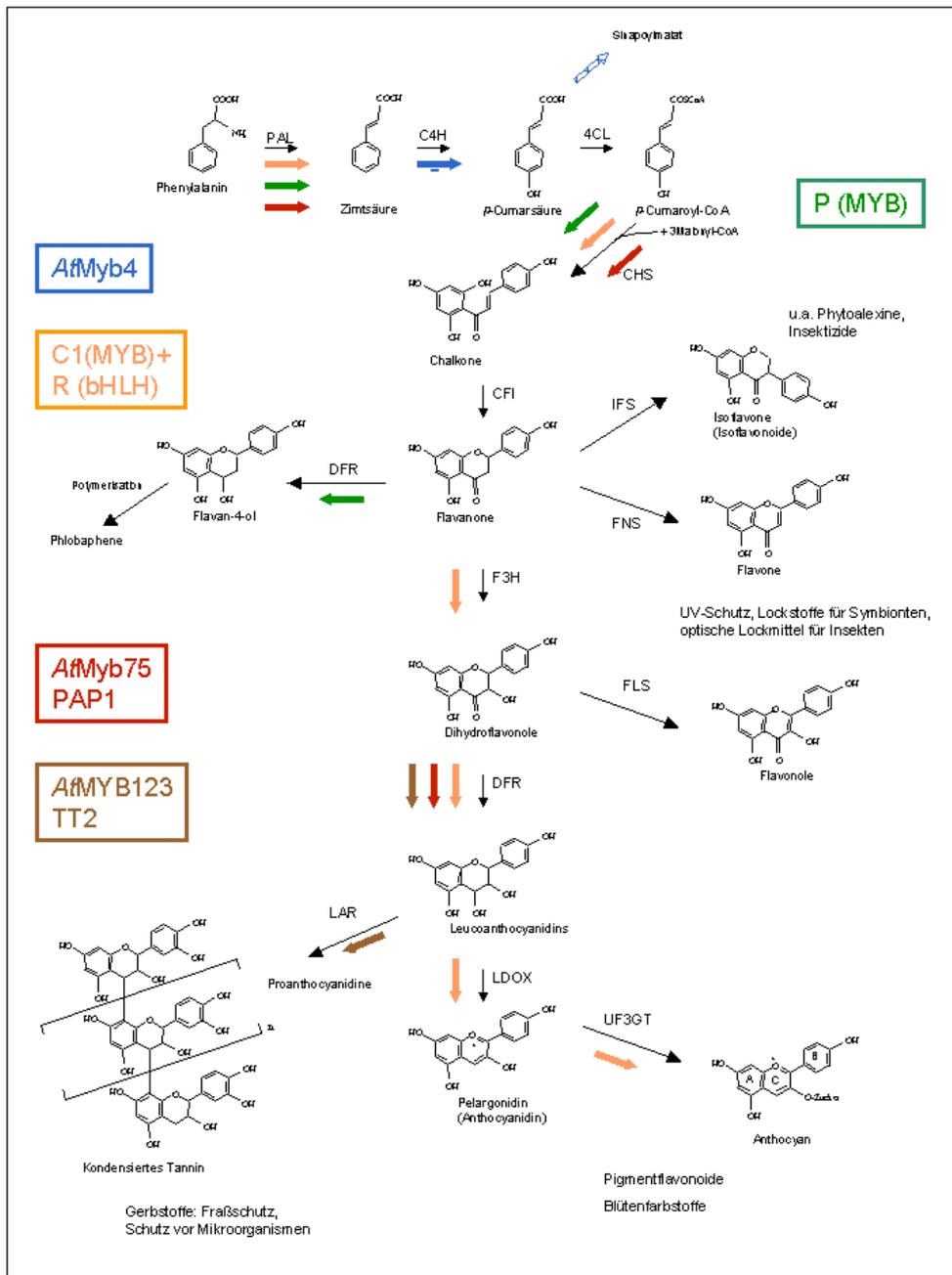


Bild 1.5 Schematische Darstellung der Biosynthese einiger Flavonoide

Es sind die wichtigsten Reaktionen der Flavonoidbiosynthese dargestellt. Die Enzyme, die die entsprechenden Reaktionen katalysieren, sind neben den Reaktionsschritten in Großbuchstaben abgekürzt aufgeführt. Die farbigen Pfeile stehen für Reaktionswege, bei denen die Expression des jeweiligen Enzyms von den Transkriptionsfaktoren, die in denselben Farben aufgeführt sind reguliert werden. Abkürzungen: 4CL: 4-Cumarat-CoA-Ligase; 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 (verändert nach Vom Endt et al., (2002)).

Weitere MYB-Proteine, die in *A. thaliana* eine regulatorische Rolle für den Phenylpropanoidbiosyntheseweg spielen, wurden durch „Activation Tagging“ (PAP1 (AtMYB75) und PAP2 (AtMYB90)) und durch die Identifizierung einer UV-toleranten Mutante (AtMYB4) gefunden. Die Überexpression von PAP1 bzw. PAP2 führt zu einer Erhöhung der Transkriptmengen mehrerer Strukturgene des Phenylpropanoid biosynthesewegs (*CHS*, *DFR*, *PAL*, vgl. Bild 1.5) und damit zu einer Akkumulation von Anthocyanen, glykosylierten Anthocyanen, Flavonolen und zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren. Die Pflanzen zeigen eine deutliche rötlich-violette Färbung (Borevitz et al., 2000).

AtMYB4 wirkt als Repressor des für C4H kodierenden Gens. In Wildtyp-Pflanzen verursacht die Einwirkung von UV-Licht eine Reduzierung der atmyb4-Expression und erlaubt so die Synthese von C4H, was zu einer erhöhten Produktion von Sinapinsäureestern führt. Den Sinapinsäureestern wird eine Schutzfunktion gegenüber schädigenden UV-Strahlen zugeschrieben, KO-Mutanten von *ATMYB4* besitzen eine erhöhte UV-B-Toleranz (Jin et al., 2000).

Die Charakterisierung der "transparent testa glabra" (TTG) Mutanten, die nicht nur im Phenylpropanoidbiosyntheseweg gestört sind, sondern auch Veränderungen in der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung aufweisen, legen nahe, dass die molekulare Grundlage der Regulation dieser Prozesse durch die Verwendung gleicher Komponenten (TTG1, TTG2, MYB-Proteine, R/B-ähnliche bHLH-Faktoren) mechanistische Ähnlichkeiten aufweist.

1.6 Die Regulation der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung

Sowohl Wurzelhaare als auch Trichome sind spezialisierte Zellen der Epidermis. Wurzelhaare dienen der Aufnahme von Wasser und Mineralstoffen. In *A. thaliana* entstehen Wurzelhaare jeweils an den Stellen, an denen zwei Kortex-Zellen aufeinander treffen (Haarzell-Position, H-Position). Die Zellen, die direkt auf einer Kortexzelle liegen, differenzieren zu Nicht-Wurzelhaarzellen (Non-Hair-cell-Position, N-Position) (Dolan, 2001).

Trichome sind im allgemeinen Blatthaare, die ein- oder mehrzellig sind und aus einer Epidermiszelle entstehen. Die Trichome können aus lebenden oder toten Zellen bestehen und spielen bei verschiedenen Pflanzenarten sehr unterschiedliche Rollen (z.B. Drüsenhaare, Brennhaare, Schutz vor UV-Strahlung und Verdunstung).

In *Arabidopsis* bestehen Trichome aus einer großen Zelle, die von 8-10 Trichombegleitzellen umgeben ist, die sich ebenfalls morphologisch von den umliegenden Zellen abheben (Hülkamp et al., 1994). Im Gegensatz zu der Wurzelhaarentstehung kann man bei der Trichomentstehung bezüglich der Lage keine Korrelation mit anderen, darunter liegenden Zellen erkennen. Die Trichome entstehen in der Initiationszone und sind dann jeweils ca. drei bis vier Zellen voneinander entfernt, was zu einer gleichmäßigen Verteilung auf der Blattoberfläche führt (Larkin et

al., 1996). Sobald die Epidermiszelle zu einer Trichomzelle determiniert ist, teilt sich die Zelle nicht mehr, die Replikation geht jedoch weiter. Die Trichomzelle erhebt sich aus der Blattoberfläche und durchläuft die primäre und sekundäre Verzweigung, begleitet von vier Endoreduplikationen (32C) (Hülkamp et al., 1994). Analysen von Mutanten, die Veränderungen in der Anzahl oder Lage der Trichome zeigen und Untersuchungen mit Überexpressionslinien, führten zu der Identifizierung von zehn Proteinen aus verschiedenen Proteinfamilien, die an der Steuerung der Trichomdifferenzierung in *Arabidopsis* beteiligt sind. Dazu gehören die R2R3-MYB-Proteine GL1 (*AtMYB0*) und *AtMYB23*, sowie die Proteine TRIPTYCHON (*TRY*), Caprice (*CPC*) und *AtMYBL2*, die zu der Gruppe der 1R-MYB-Transkriptionsfaktoren gehören, weiterhin GLABRA 3 (*GL3* (*AtbHLH001*)) ein bHLH-Protein, GLABRA2 (*GL2*) ein Homöobox-Protein, und die bereits oben erwähnten Proteine TTG1 und TTG2 (Johnson et al., 2002; Kirik et al., 2001; Oppenheimer et al., 1991; Payne et al., 2000; Rerie et al., 1994; Sawa, 2002; Schellmann et al., 2002; Wada et al., 1997; Walker et al., 1999).

Während die Proteine GL1, TTG1, GL3, TTG2 und GL2 die Regulation der Trichomdifferenzierung aktivieren, inhibieren die 1R-MYB-Transkriptionsfaktoren die Trichomdifferenzierung (Sawa, 2002; Schiefelbein, 2003). Einige der Proteine, die an der Regulation der Trichomentwicklung beteiligt sind, spielen auch bei der Wurzelhaardifferenzierung eine Rolle. *ttg1*- und *g/2*-Mutanten haben ektopische Wurzelhaare, die nun auch über Kortezellen, also an N-Positionen entstehen. TTG1 und GL2 führen in der Wurzel zu einer Repression der Wurzelhaarbildung, wohingegen sie im Spross die Trichombildung induzieren (Di Cristina et al., 1996; Galway et al., 1994; Masucci et al., 1996). *cpc*-Mutanten besitzen nur ca. ein Viertel der Wurzelhaarzellen von Wildtyp-Pflanzen, was dafür spricht, dass CPC die Wurzelhaardifferenzierung unterstützt (Wada et al., 1997). An der Wurzelhaardifferenzierung ist auch ein R2R3-MYB-Protein beteiligt. Die Mutation von WEREWOLF (*AtMYB66*) führt zu einer von Kortezellen unabhängigen ektopischen Induktion von Wurzelhaaren, sowie zu einer ektopischen Induktion von Stomata in der Hypokotylepidermis (Lee and Schiefelbein, 1999). Vieles spricht dafür, dass wie bei der Phenylpropanoidbiosynthese, auch die Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung kombinatorisch durch bHLH-Proteine und MYB-Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Für einige Proteine, die an der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung beteiligt sind, konnte eine direkte Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren gezeigt werden. So konnte die Interaktion von GL1 mit *ZmR* und mit GL3, die Interaktion von WER und CPC mit *ZmR* und die Interaktion von *AtMYBL2* mit GL3 im Hefe 2-Hybrid-System gezeigt werden. Es ist jedoch noch unklar, welche endogenen bHLH-Proteine im Fall von WER, CPC und *AtMYBL2* tatsächlich an der Regulation beteiligt sind (Lee and Schiefelbein, 1999; Payne et al., 2000; Sawa, 2002; Wada et al., 1997). Aufgrund der genetischen und biochemischen Daten wurden Modelle entwickelt, die die Regulation der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung beschreiben sollen (Schellmann et al., 2002; Schiefelbein, 2003). Diese Modelle stimmen im wesentlichen darin überein, dass

im Spross die Proteine GL3, GL1 und TTG1 und in der Wurzel WER zusammen mit einem noch unbekanntem bHLH-Faktor und TTG1 die Expression von GL2 induzieren. Dieses Protein induziert über einen noch unbekanntem Regulationsweg die Trichomdifferenzierung im Spross bzw. das „Nicht-Wurzelhaarschicksal“ in der Wurzelhaarzone. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang ein Aktivator-Repressorsystem, bei dem der Aktivator (z.B. der GL3/GL1-Komplex) über positive Rückkopplung die eigene und die Aktivität oder Expression des Repressorproteins (CPC/TRY) stimuliert. Das Repressorprotein wiederum inhibiert die Aktivität oder Expression des Aktivators. Es wird vorgeschlagen, dass dieser negative Regulator in Nachbarzellen diffundieren kann, und so dort durch laterale Inhibition die Aktivität des Aktivators beeinflusst. Dadurch würden diese Zellen miteinander in Konkurrenz treten. Kleine Veränderungen in der Zusammensetzung von Aktivator und Repressor können so schnell das Gleichgewicht stören, so dass im Falle der Trichomentwicklung eine Zelle zum Trichom differenziert, während die Trichomentwicklung in den benachbarten Zellen inhibiert wird (Schellmann et al., 2002). Bisher ist noch unklar, wie die Zell-Zellkommunikation auf molekularer Ebene abläuft, welche anderen Faktoren beteiligt sind und welche Zielgene dadurch reguliert werden. Auch die molekularen Funktionen von TTG1, TTG2 und GL2 im Zusammenhang mit der Regulation der Pektinbildung für die Schleimhülle von Samen, der Tanninbildung und der Anthocyanbiosynthese sind weitgehend unbekannt.

1.7 Zielsetzung

Molekulare Untersuchungen der MYB- und bHLH-Proteine aus *A. thaliana* legen eine funktionelle Verknüpfung dieser beiden Proteinfamilien nahe. Ziel dieser Arbeit war es, die strukturellen und funktionellen Daten, die über diese Familien von Transkriptionsfaktoren existieren, mit Hilfe einer systematischen Untersuchung von Protein-Interaktionsnetzwerken zu erweitern. Hierfür sollte das Hefe 2-Hybrid-System als Hochdurchsatz-Verfahren weiterentwickelt werden, um in großem Umfang die Identifizierung neuer Interaktionspartner zu ermöglichen.

Interaktionsnetzwerke zwischen allen Vertretern zweier ausgewählter Gruppen von R/B-ähnlichen bHLH- und einer Gruppe von MYB-Transkriptionsfaktoren sollten im Hinblick auf ihre Interaktionsspezifität analysiert werden. Die Informationen aus den Interaktionsanalysen sollten darüber hinaus verwendet werden, um die strukturellen Grundlagen der Interaktionen im Detail zu analysieren und im Zusammenhang mit der Frage von Spezifität und Redundanz in großen Proteinfamilien zu reflektieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Alle Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Biozym (Hameln), FLUKA (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Sämtliche Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Vilnius, Litauen), Invitrogen (Paisley, GB), MWG, (Ebersberg), Roche (Mannheim), Serva und Stratagene (Heidelberg) geliefert. Darüber hinaus wurden DNA- und Protein-Größenmarker von New England Biolabs (Schwalbach) benutzt.

Zur Aufreinigung von Plasmiden und DNA wurden Materialien der Firmen Qiagen (Hilden) und Roche (Mannheim), zur Proteinbiochemie Systeme der Firma Promega (Madison, WI, USA), sowie vorgegossene 12% Tris Glycin Gele der Firma Invitrogen (Paisley, GB) verwendet.

Das Filmmaterial wurde von Kodak (Rochester) und das Radioisotop S35 Methionin von Amersham Biosciences (Freiburg) 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.

Als Medienzusätze in der Bakterienkultur wurde Bacto-Hefeextrakt und Bacto-Trypton der Firma Gibco-BRL (Gaithersburg) verwendet.

Für die Hefekultur wurden Minimalmedien der Firma Clontech und Aminosäuren der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt.

Für Festmedien wurde Agar der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

Filter, Membran- und Säulenmaterialien wurde von den Firmen Millipore (Molsheim), Nalgene (Rochester), Satorius (Göttingen), Whatman (Maidstone) und Calbiochem (La Jolla) bezogen.

2.1.3 Desoxyoligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Paisley, GB), Metabion (Martinsried), MWG-Biotech GmbH (München) und Qiagen (Hilden) bezogen.

Die verwendeten Nukleotide sind im Anhang unter Punkt 2 aufgeführt.

2.1.4 Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzanalysen wurden von der ADIS-Einheit des MPIZ durchgeführt. Vektorsequenzen und fehlerhafte Sequenzen wurden manuell entfernt, die resultierenden Sequenzen wurden dann mit Sequenzen von Arabidopsis-Genom-Datenbanken verglichen. Bei den Ergebnissen aus den Hefe 2-Hybrid-Screens wurden die Informationen unter Angabe der MIPS-Identifikationsnummer, des offenen Leserahmens, des Proteinabschnittes und der Lage in der Sequenz, sowie weiteren Informationen über Funktion oder Motivdaten in einer Access-Datenbank gespeichert.

Sequenzanalysen:

<http://www.mips.gsf.de> (MIPS)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI)

<http://www.arabidopsis.org/> (TAIR)

<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>

BioEdit <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html>

Proteinanalysen:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>

<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>

Ermittlung der relativen Häufigkeiten von Aminosäuren:

<http://www.bio.cam.ac.uk/cgi-bin/seqlogo/logo.cgi>

<http://tfcad.mpi-z-koeln.mpg.de/cgi-bin/acf.cgi>

(Stracke R, Werber M, Weisshaar B: The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 Oct; 4(5):447-56)

Motivsuche :

<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>

3-dimensionale Modelle:

<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>

RasTop; Molecular Visualization Software (<http://www.geneinfinity.org/rastop/>)

2.1.5 Verwendete Organismen:

2.1.5.1 Bakterien:

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
DH5 α	F ⁻ , λ 80dlacZ λ M15, λ (lacZYA-argF), U169, endA1, recA1, hsdR17, (r _k ⁻ -m _k ⁺), deoR, thi-1, supE44, λ -, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1983)
BL21 CodonPlus™- (DE3) RIL	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ -m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA The [argU ileY leuW Cam ^r] (Stratagene)
DB3.1	F ⁻ , gyrA462, endA, λ (sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20, (r _B ⁻ -m _B ⁻), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm ^r), xyl5, λ leu, mtl1 (Invitrogen)

2.1.5.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Hefe-Stamm	Genotyp
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 λ , gal80 λ , Lys2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, MEL1, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ (James et al., 1996) (Holtz, unpublished)
Y187	MAT λ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 λ , met-, gal80 λ , URA3::GAL1UAS-Gal1TATA-lacZ, MEL1 (Harper et al., 1993)
PJ69-4a	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 λ , gal80 λ , Lys2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::Gal7-lacZ (Harper et al., 1993)

2.1.5.3 Die Pflanzen

Die Anzucht von *A.thaliana* Pflanzen erfolgte bei 14 h Licht, 10 h Dunkel in einer Klimakammer bei 65% Luftfeuchtigkeit, 20 °C.

2.1.6 DNA-Vektoren

2.1.6.1 *E. coli* Vektoren

Plasmid	wesentliche Merkmale
pGEX-4T	Expressionsvektor in <i>E.coli</i> ; GST-Fusion (Amersham)
pGEX2TattR	Expressionsvektor in <i>E.coli</i> ; GST-Fusion (Amersham)
pET32attR	Expressionsvektor in <i>E.coli</i> , His-Tag (Novagen)

2.1.6.2 Hefevektoren

Plasmid	wesentliche Merkmale
pACT2	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Aktivator-domäne-Fusionen GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, Leu2, amp ^r , HA-Epitop-Tag (Clontech) (Durfee et al., 1993).
pAS2-1	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Bindungs-domäne-Fusionen GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, amp ^r , CYH ^s 2 (Clontech) (Durfee et al., 1993).
pBD-SNF1	Derivat des Vektors pAS1, das als BamHI-Fragment das Hefe SNF1 Gen (Celenza u. Carlson, 1986) als Fusion an die GAL4 DNA-Bindungs-domäne enthält (Fields und Song, 1989)
pAD-SNF4	Derivat des Vektors pACT, das als BamHI-Fragment das Hefe SNF4 Gen (Celenza et al., 1989) als Fusion an die GAL4 DNA-Aktivator-domäne enthält (Fields und Song, 1989)

2.1.6.3 Gateway-Vektoren

Plasmid	wesentliche Merkmale
pAS attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Bindungsdomäne-Fusionen über LR-Rekombination GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, amp ^r , CYH ^s 2 (Clontech, verändert)
pACT attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Aktivator-domäne-Fusionen über LR-Rekombination; GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, Leu2, amp ^r , HA-Epitop-Tag (Clontech, verändert)
pcACT attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Bindungsdomäne-Fusionen über LR-Rekombination; Cen/ARS-Plasmid Rekombinationskassette mit ccdB-Gen und Cm ^r ; GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, amp ^r , CYH ^s 2 (Durfee et al. 1999, verändert)
pCD2 attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Klonierung von GAL4 Aktivator-domäne-Fusionen über LR-Rekombination; Cen/ARS-Plasmid Rekombinationskassette mit ccdB-Gen und Cm ^r ; GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, Leu2, amp ^r , HA-Epitop-Tag (Durfee et al. 1999, verändert)
pDEST14 attR	Vektor zur nativen Proteinexpression in <i>E. coli</i> ohne Fusion; T7-Promotor, Rekombinationskassette mit ccdB-Gen und Cm ^r , amp ^r , (Invitrogen)
pGEX2 attR	Vektor zur Proteinexpression in <i>E. coli</i> N-Terminale GST-Fusion, Thrombin-Schnittstelle, amp ^r , Rekombinationskassette mit ccdB-Gen und Cm ^r (Amersham, verändert von T. Soellick, nicht veröffentlicht)
pDONR201	Vektor zur Konstruktion von Entry-Vektoren über BP-Reaktion; Rekombinationskassette mit ccdB-Gen und Cm ^r , KnR, (Invitrogen)

2.1.7 cDNA-Bibliotheken für das Hefe 2-Hybrid-System

Bezeichnung	wesentliche Merkmale
Ara 446	aus <i>A. thaliana</i> Suspensionskultur (ohne Licht) DNA erhalten von K. Salchert, AG C. Koncz, MPIZ Köln
Ara-1101	Clontech Matchmaker cDNA Library; grünes Blattmaterial von <i>A. thaliana</i> ; 3 Wo altes vegetatives Gewebe, Ökotyp Columbia; aus polyT- und randomisierter cDNA (Clontech)
HS-Ara1	normalisierte polyT-cDNA aus allen Organen von <i>A. thaliana</i> Ökotyp Columbia erhalten von Hans Sommer, MPIZ Köln
Ara 518	Retransformation der Bibliothek Ara446
Clontech CP	Retransformation der Clontech Matchmaker cDNA Library

2.1.8 Herstellung der Vektoren

2.1.8.1 Vektoren zur Verwendung in den Hefe 2-Hybrid-Screens und Matrix-Ansätzen

- Die Sequenzen der Proteine *AtMYB6*, *AtMYB12*, *AtMYB30*, *AtMYB73*, *AtMYB3R 1* wurden ausgehend von Vektoren, die von der AG Weißhaar zur Verfügung gestellt wurden, mit den Oligonukleotiden [IZ0028, IZ0029], [IZ0019, IZ0020], [IZ0026, IZ0027], [IZ0048, IZ0052], [IZ0031, IZ0032] und [IZ0028, IZ0029] amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in pAS2attR.
- Die Sequenzen der Proteine *AtMYB25*, *AtMYB26*, *AtMYB42*, *AtMYB43*, *AtMYB55*, *AtMYB78*, *AtMYB88*, *AtMYB95*, *AtMYB99*, *AtMYB103* und *AtMYB123* wurden mit den Primern [IZ0068, IZ0069] ausgehend von PCR-Produkten mit speziellen Überhängen (zur Verfügung gestellt von Ralf Stracke, AG Weißhaar) amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in pAS2attR.

- Die Entry-Vektoren der restlichen MYB-Proteine wurden von der AG Weißhaar bereitgestellt, es folgte eine Rekombination in pASattR bzw. in pCD2attR und teilweise in pcACTattR.
- Die Kandidaten *AfbHLH046* und *LEA* wurden auf einer Arabidopsis cDNA-Bank mit den Primern [IZ0080, IZ0081] und [IZ0042, IZ0043] amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in pAS2attR.
- pAS2-*AfMYB4* wurde von Andreas Müller, die Vektoren pAS2-bZIP21 und pAS2-bZIP65 von Marc Jakoby zur Verfügung gestellt.
- Die Entry-Vektoren aller bHLH-Faktoren mit Ausnahme von *AfbHLH046* wurden von der AG Weißhaar bereitgestellt (Marc Heim und Marc Jakoby). Es folgte eine Rekombination in pCD2attR bzw. pcACTattR.
- Die Vektoren pAS-WIP1-WIP6 wurden von Martin Sagasser (AG Weißhaar) zur Verfügung gestellt.

2.1.8.2 Vektoren zur Herstellung von Deletionskonstrukten

pCD2-bHLH002N₁₃₃₁:

Der Vektor wurde durch PCR mit den Primern IZ160 und MJ193 auf dem Vektor pCD2-bHLH002 und anschließender Rekombination in pCD2attR mit Hilfe des Gateway-Verfahrens hergestellt

pCD2-bHLH002-Q331_E401

Der Vektor wurde durch PCR mit den Primern IZ160 und IZ157 auf dem Vektor pCD2-bHLH002 und anschließender Rekombination in pCD2attR mit Hilfe des Gateway-Verfahrens hergestellt

pCD2-bHLH012N₁₅₈:

Der Vektor wurde kloniert, indem der Vektor pENTR-bHLH012 mit *ScaI* geschnitten und religiert wurde. Dieser Vektor wurde dann zur Rekombination in den Vektor pCD2attR verwendet.

pCD2-bHLH012C₁₂₀₆:

Der Vektor wurde durch Schneiden des Vektors pENTR-bHLH012 mit *BspMI*, Behandlung mit 5'3'-Exonuklease, Religation und anschließender Rekombination in pCD2attR hergestellt.

pCACT-*AfMYB75*_[1-100] und pCD2-*AfMYB75*_[1-100]:

Das *AfMYB75*-Fragment wurde ausgehend von pCD2-*AfMYB75* mit den Primern IZ0107 und IZ0139 amplifiziert und mit Hilfe der Gateway-Technologie über pDONR201 in pCACTattR und pCD2attR rekombiniert.

pCACT-AtMYB75_[1-114] und pCD2-AtMYB75_[1-114]:

Das AtMYB75-Fragment wurde ausgehend von pCD2-AtMYB75 mit den Primern IZ0107 und IZ0140 amplifiziert und mit Hilfe der Gateway-Technologie über pDONR201 in pCACTattR und pCD2attR rekombiniert.

pCACT-AtMYB75_[1-178] und pCD2-AtMYB75_[1-178]:

Das AtMYB75-Fragment wurde ausgehend von pCD2-AtMYB75 mit den Primern IZ0107 und IZ0141 amplifiziert und mit Hilfe der Gateway-Technologie über pDONR201 in pCACTattR und pCD2attR rekombiniert.

pCD2-AtMYB75_[1-190]:

Ein weiteres Deletionskonstrukt zum Entfernen der Aktivierungsdomäne wurde durch Restriktion des Vektors pCD2-AtMYB75 mit *SpeI* und *PstI*, Behandlung der Überhänge mit T4-DNA-Polymerase und anschließender Ligation hergestellt. Der Vektor enthält die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 1-190 von AtMYB75 fusioniert an die Bindedomäne von Gal4.

pCACT-AtMyb4C_[118]:

Dieser Vektor wurde durch Amplifizierung der Teilsequenz mit den Oligonukleotiden IZ163 und IZ162 und anschließender Rekombination über pDONR201 in pCACTattR hergestellt.

pCACT-AtMyb6C_[118]:

Dieser Vektor wurde durch Amplifizierung der Teilsequenz mit den Oligonukleotiden IZ164 und IZ0028 und anschließender Rekombination über pDONR201 in pCACTattR hergestellt.

2.1.8.3 Klonierung zur gerichteten Mutagenese von AtMYB75

<u>pCACT-AtMYB75L73I:</u>	IZ0111 und IZ0114
<u>pCACT-AtMYB75R76K:</u>	IZ0111 und IZ0115
<u>pCACT-AtMYB75R76E:</u>	IZ0111 und IZ0115
<u>pCACT-AtMYB75R79S:</u>	IZ0111 und IZ0113
<u>pCACT-AtMYB75L80A:</u>	IZ0111 und IZ0112

Mit den Oligonukleotiden IZ0111 und IZ0112-IZ0115 (siehe Anhang), die verglichen mit AtMYB75 1-3 Austausche in der Nukleotidsequenz haben, wurde der gesamte Vektor pENTR-AtMYB75 in einer PCR mit Pfu-Polymerase amplifiziert. Dadurch wurde bei allen fünf Ansätzen jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. Die Oligonukleotide enthalten eine AvrII-Schnittstelle, die die Religation der Vektoren ermöglicht. Das Einfügen der AvrII-Schnittstelle führte zu einer stillen Mutation, es wurden keine zusätzlichen Nukleotide eingefügt und der offene Leserahmen blieb unverändert. Die Entry-Vektoren wurden anschließend in pCACTattR rekombiniert.

2.2 Allgemeine Methoden

Soweit nicht anders angegeben basieren die in dieser Arbeit verwendeten Techniken und Standardmethoden der Molekularbiologie auf den von Sambrook et al. (1989) veröffentlichten Protokollen oder sie wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien wurden bei 37 °C unter Schütteln oder auf Agarplatten kultiviert.

Lösungen und Medien wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore) hergestellt und bei 125 °C für 20min autoklaviert. Bei Selektionsmedien oder Selektionsplatten wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 60 °C zugefügt. Die Endkonzentration betrug für Ampicillin 80 µg/ ml, für Chloramphenicol 30 µg/ ml und für Kanamycin 25 µg/ ml.

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Bakterien in einer 25%igen Glycerinlösung in Medium bei –80 °C aufbewahrt.

DYT-Medium:	5 g/ l NaCl
	10 g/ l Bacto-Hefeextrakt
	10 g/ l Bacto-Trypton

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl-Methode)

Zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden die Bakterien wie folgt vorbehandelt: 2 ml einer Übernachtskultur wurden 1:100 in 200 ml DYT-Medium verdünnt und bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer Optischen Dichte von 0,4-0,5 bei 600 nm inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt:

Die Bakterienkulturen wurden in 4 Zentrifugenröhrchen überführt, 10 Minuten auf Eis gekühlt und danach 10 Minuten bei 4000 upm (Heraeus Megafuge 1.0 R) sedimentiert. Die Pellets wurden möglichst luftblasenfrei in je 5 ml TFB I-Puffer resuspendiert und danach mit weiteren 10 ml TFB I-Puffer versetzt. Es wurden jeweils zwei Suspensionen vereinigt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in je 4 ml TFB II-Puffer aufgenommen und vereinigt. Es wurden 200 µl-Aliquots hergestellt, die sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die kompetenten Bakterien können 3 Monate bei -80 °C gelagert werden.

TFB I-Puffer:	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 100 mM RbCl 15% Glycerin Der pH wurde mit 2N Essigsäure auf 5,8 eingestellt
TFB II-Puffer:	10 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glycerin

2.2.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Um Bakterien zu transformieren, wurden 200 µl der kompetenten Bakterien mit 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C wurden die Zellen in 800 ml DYT-Flüssigmedium überführt und danach 30 Minuten auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann auf Antibiotika-haltigen DYT-Mediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienkulturen

Plasmid-DNA wurde aus *E.coli* mit Hilfe von QIAprep Spin Columns sowie QIAGEN-Säulchen der Größe 500 und 2500 der Firma QIAGEN (Hilden) präpariert.

2.2.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden gefällt, indem die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. vorgekühltem (-20 °C) Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C oder 1 h bei -80 °C inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation (13000 upm, 30 Minuten) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.6 Konzentrationsabschätzung von Plasmid-DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ ml. (ssDNA: 37 µg/ ml; kurzkettige Oligonukleotide 20 µg/ ml, RNA 42 µg/ ml). Eine Messung der Extinktion (Ext) bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) ermöglicht außerdem die Überprüfung der Reinheit der Präparation. Das Verhältnis Ext_{260}/Ext_{280} ergibt den Reinheitsgrad: ist das Verhältnis <1,75, so können in der Präparation Proteine oder Phenole enthalten sein, ist es > 1,9, so ist die Probe vermutlich mit anderen Nukleinsäuren verunreinigt.

2.2.7 Endonukleolytische Spaltung von DNA

Zur Klonierung und Charakterisierung der Plasmid-DNA, wurde sie an spezifischen Stellen mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Inkubation der DNA mit den jeweiligen Endonukleasen erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers in den entsprechenden mitgelieferten Restriktionspuffern.

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.2.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden je nach Größe der Fragmente 0,8 bis 1,5%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 0,3 µg Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass diese unter UV-Licht sichtbar wird. Das noch flüssige Gel wurde in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels, wurde es in eine mit 1xTAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese fand bei einer Feldstärke von 5 bis 15 V/ cm bis zur gewünschten Auftrennung statt. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 3xProbenpuffer (1/3 Volumenäquivalent) versetzt.

2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur präparativen Reinigung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde die DNA in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Fragmente mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „PCR Purification Kit“ von Roche nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurde die Agarose bei 42 °C in einem Reagenz aufgelöst und die DNA anschließend über eine Säule aufgereinigt.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung der Restriktionsfragmente wurden sie in verschiedenen molaren Verhältnissen in einem Ligationsansatz gemischt und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers über Nacht bei 16 °C ligiert.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl folgende Komponenten: 200 bis 500 ng Matrizen-DNA, jeweils 100 ng zweier verschiedener Desoxyoligonukleotide als Primer, 5 l 10xPCR-Puffer (vom jeweiligen Hersteller mitgeliefert), 4 µl eines dNTP-Gemisches (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 1,25 mM) und 2,5 U Taq- oder Pfu- Polymerase. Für die DNA-Amplifikation mittels PCR wurde ein Thermocycler MJ Research PTC-225 verwendet. PCR-Programm: 2 min 95 °C, danach

35 Zyklen (30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 1-2 min 72 °C), 30 s 72 °C, danach abkühlen auf 15 °C.

2.2.12 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Kit von Qiagen aufbereitet. Die DNase-Behandlung wurde direkt auf der Säule durchgeführt. Eine anschließende Kontroll-PCR wurde zur Überprüfung der Abwesenheit von DNA mit Actin-Primern durchgeführt.

2.2.13 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit der Reversen Transkriptase der Firma Stratagene mit dem Oligo-dT-Primer MJ389 (Anhang 1.2).

2.2.14 RT-PCR

Die Konzentration der cDNA wurde photometrisch bestimmt und ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarose-Gel überprüft. Für die RT-PCR wurden jeweils ca. 0,6 µg cDNA eingesetzt. Die PCR erfolgte mit Taq-Polymerase und sequenzspezifischen Oligonukleotiden mit dem folgenden PCR-Programm: 3 min 95 °C, danach 45 Zyklen (20s 95 °C, 20s 55 °C, 45s 72 °C), 30s 72 °C, danach abkühlen auf 15 °C.

Als Kontrollreaktion für den Einsatz vergleichbarer cDNA-Mengen wurde eine PCR mit den Primern Act5 und Act3 durchgeführt, die spezifisch für das Transkript des Aktins sind. Eine weitere Kontrolle wurde mit den Primern Ran5 und Ran3 durchgeführt.

2.3 Das Gateway-System

Das Gateway-System von Invitrogen bietet die Möglichkeit auf relativ einfachem Wege Gene oder DNA-Sequenzen in ein oder mehrere Vektoren zu überführen. Die Gateway-Technologie eignet sich deshalb besonders gut für Hochdurchsatz-Projekte und standardisierte Klonierungsabläufe.

DNA-Sequenzen können über PCR amplifiziert und entweder über eine herkömmliche Klonierung oder aber über Rekombination, durch Anhängen von bestimmten Rekombinationssequenzen bei der PCR, in einen Entry-Vektor gebracht werden. Dieser Vektor dient als Ausgangsbasis für weitere Rekombinationen des Gens oder dieser Sequenz in verschiedene so genannte Destinationsvektoren.

Die Rekombinationsreaktionen der Gateway-Technologie basieren auf der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda in *E.coli*. In der lysogenen Phase kann dieser Phage seine genomische DNA sequenzspezifisch in die *E.coli* Wirts-DNA integrieren und kann diese so, über mehrere Generationen hinweg, an Tochterzellen weitergeben, bis bestimmte Faktoren die Excision des viralen Genoms aus dem Wirtsgenom induzieren und die lytische Phase beginnt. Die Integration und Excision der viralen DNA benötigt sowohl virale als auch *E.coli*-Proteine. Die Integration, bei der die attP-Sequenz mit der attB-Sequenz im *E.coli*-

Genom rekombiniert, wird durch die Proteine Int (Integrase) und IHF (integration host factor), einem *E.coli*-Protein vermittelt. Während der Integration wird das Genom sequenzspezifisch geschnitten und das virale Genom ähnlich einer Restriktion und Klonierung integriert. Dabei entstehen auf beiden Seiten des viralen Genoms die attL und die attR-Sequenzen (L für links, R für rechts). Bei der Excision des Lamda-Genoms werden diese Sequenzen erkannt und unter Wiederherstellung der attP und attB-Sequenz wird die virale DNA herausgeschnitten. Für diese Reaktion wird wiederum die Integrase (Int), der Wirtsfaktor IHF und zusätzlich das virale Protein Xis, die Excisionase benötigt.

Für die *in vitro* Rekombinationsereignisse werden die beschriebenen Enzyme aus *E.coli* und dem Lambdaphagen genutzt, die Reaktion entspricht im Prinzip der in *E. coli* stattfindenden. Die att-Sequenzen sind aber leicht modifiziert. Das gewünschte Gen kann durch PCR amplifiziert werden und entweder in einer BP-Reaktion in den Donorvektor, oder aber direkt in einen Entry-Vektor kloniert werden. Der Entry-Vektor besitzt attL-Sequenzen auf beiden Seiten des Gens, welche die Rekombination dieses Gens in den Destinationsvektor (attR-Sequenzen) erlauben (LR-Reaktion). Sowohl bei der so genannten BP-Reaktion als auch bei der LR-Reaktion werden Nebenprodukte gebildet, die dann entsprechend attP- und attR-Sequenzen besitzen. Um die Effektivität der Rekombination zu erhöhen und die anschließende Selektion zu erleichtern, enthält die jeweilige so genannte Rekombinationskassette, die in „leeren“ Donor- und Destinationsvektoren zwischen den att-Sequenzen liegt, außer dem Gen zur Chloramphenikolresistenz noch das *ccdB*-Gen (Nalidixinsäure). Dieses Gen ist toxisch für DH5 α -Zellen und erlaubt so nur das Wachstum von Bakterien, die das gewünschte Konstrukt enthalten. Zur Klonierung und Amplifizierung von Vektoren, die das *ccdB*-Gen enthalten, müssen deshalb Stämme wie DB3.1 verwendet werden, deren Untereinheit A der DNA-Gyrase mutiert ist. Eigene Vektoren können unkompliziert durch das Hineinklonieren einer Rekombinationskassette in Destinationsvektoren umgewandelt werden. Die Klonierung wird erleichtert, weil die Rekombinationskassette in drei verschiedenen Leserastern erhältlich ist, so dass die Auswahl des Restriktionsenzym davon unabhängig ist. Außerdem trägt sie Chloramphenikol als Marker, es kann deshalb direkt auf die Insertion selektiert werden.

2.4 Techniken im Umgang mit Hefen

2.4.1 Lösungen und Medien für Hefen:

Es wurden je nach Bedarf flüssige oder feste Voll- oder Selektionsmedien verwendet. Die Hefen wurden bei 30 °C unter Schütteln oder auf Agarplatten kultiviert.

YPAD (Vollmedium)	Difco-Pepton 20g/ l Hefeextrakt 10g/ l Adenin 100 mg/ l (Bacto-Agar 18g/ l) pH 5,8
----------------------	--

SD-Minimalmedium	Difco "Nitrogen base w/o amino acids" 6,9g/ l L-Adenin 100 mg/ l L-Arginin 50 mg/ l L-Asparaginsäure 80 mg/ l L-Histidin 20 mg/ l L-Isoleucin 50 mg/ l L-Leucin 100 mg/ l L-Lysin 30 mg/ l L-Methionin 20 mg/ l L-Phenylalanin 50 mg/ l L-Threonin 200 mg/ l L-Tryptophan 50 mg/ l L-Tyrosin 50 mg/ l L-Valin 150 mg/ l L-Uracil 20 mg/ l (Bacto-Agar 18g/ l) pH 5,8
------------------	--

Die zur Selektion verwendeten Aminosäuren wurden dem Medium nicht zugesetzt.

Es wurden auch fertige Aminosäuremischungen von Clontech verwendet, die wie vom Hersteller angegeben verwendet wurden. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Hefen in einer 25%igen Glycerinlösung in Medium bei – 80 °C aufbewahrt.

Medium zur Gegenselektion auf 5-FOA:

Zur Selektion auf nicht interagierende Proteine wurde dem Medium 5-FOA zugegeben. Bei Interaktion wird das Reportergen Ura3 exprimiert und 5-FOA wird zu dem toxischen Produkt 5-Fluoro-Uracil umgewandelt. Während interagierende Proteine so zum Absterben der Hefezellen führen, können nichtinteragierende Mutanten selektiert werden.

5-FOA muss zuvor in DMSO gelöst werden (500 mg/ ml) (ca. 30 min bei 50 °C inkubieren). Die entsprechende Menge (0,1 %) wird kurz vor dem Gießen der Platten dem Medium zugeben.

5-FOA Medium	
	L-Arginin 20 mg/ l
	L-Asparaginsäure 100 mg/ l
	L-Histidin 20 mg/ l
	L-Isoleucin 20 mg/ l
	L-Leucin 100 mg/ l
	L-Lysin 30 mg/ l
	L-Methionin 20 mg/ l
	L-Phenylalanin 30 mg/ l
	L-Threonin 20 mg/ l
	L-Tryptophan 50 mg/ l
	L-Tyrosin 20 mg/ l
	L-Valin 40 mg/ l
	L-Uracil 20 mg/ l
	0,1% 5-FOA
	3 mM 3AT
	(DIFCO-Agar 18 g/ l)
	pH 5,8

2.4.2 Hefetransformation

2.4.2.1 Hefetransformation

Die Transformation von Hefe erfolgte nach der LiAc-Methode von Gietz & Schiestl (Gietz et al., 1995). Es wurden jeweils 200-500 ng DNA eingesetzt. Bei größeren Ansätzen wurden die Reagenzien nacheinander auf das im Restvolumen resuspendierte Zellpellet gegeben und der Transformationsansatz nach dem Mischen auf die vorgelegte DNA verteilt.

2.4.2.2 Hefetransformation im Mikrotiterplatten-Format

Zur Hefetransformation im Mikrotiterplatten-Format wurden pro 100 Transformationen vier 50 ml Hefekulturen für 4 h bei 30 °C unter schütteln inkubiert.

Es wurde ein „Mastermix“ aus folgenden Komponenten zusammengestellt: (68,5 µl PEG, 10 µl 1M LiAc, 14,5 µl ssDNA und 7 µl H₂O) x Anzahl der Transformationen

Die Hefekultur wurde zentrifugiert, in H₂O gewaschen und in 10 ml 100 mM LiAc aufgenommen. Danach wurden die Zellen nochmals zentrifugiert, das Pellet im Restvolumen resuspendiert und der Mastermix aus den oben aufgeführten Reagenzien addiert. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz auf die in der Mikrotiterplatte vorgelegte DNA pipettiert und mit einer Multipipette resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für 30 und bei 42 °C für 20 Minuten. Danach wurden die Hefen sedimentiert und das Pellet in 100 µl Selektionsmedium aufgenommen. Aus dieser Lösung wurde eine 1:50 und 1:500-Verdünnung hergestellt und die Platten bei 30 °C gelagert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Hefen auf festes Selektionsmedium überstempelt.

2.4.3 Konjugation von Hefezellen

2.4.3.1 Konjugation

Mehrere Kolonien von Hefezellen mit unterschiedlichem Konjugationstyp wurden von einer Platte genommen und in 500 µl YPAD mit dem Konjugationspartner vereint. Die Zellen wurden mit der Pipette vermischt und 4 h ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in H₂O aufgenommen und auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.4.3.2 Konjugation im Mikrotiterplatten-Format

Die Hefen wurden entweder von Platten oder aber aus Übernachtskulturen in Mikrotiterplatten vereinigt und in 100 µl YPAD resuspendiert. Nach mindestens 5 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen zentrifugiert und in 200 µl Selektionsmedium aufgenommen. Aus diesem Ansatz wurden eine 1:20 und eine 1:200-Verdünnung hergestellt, die über Nacht bei 30 °C inkubiert wurden. Die Hefen wurden nach ein oder zwei Tagen ausgehend von diesen Verdünnungen auf SD-Festmedium-Platten ohne Leucin und Tryptophan überstempelt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.4.4 Galaktosidase-Tests

2.4.4.1 PNPG-Test zum Nachweis von β -Galaktosidase

Übernachtskulturen der Hefekolonien wurden nach Messen der optischen Dichte abzentrifugiert. 16 µl des Überstandes wurden jeweils mit 48 µl p-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid-haltigem Reaktionspuffer („Yeast protocols handbook“ von Clontech) versetzt. Nach 30, 60 und 90 Minuten wurde die Reaktion mit 1M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Die optische Dichte bei 410 nm wurde gemessen und die relativen Galaktosidase-Werte aus 12 Messungen berechnet.

Die relativen β -Galaktosidase Einheiten wurden nach (Lazo et al., 1978) berechnet.

$$\beta\text{-Galaktosidase} = \text{OD}_{410} \times V_f \times 1,000 : [(\epsilon \times b) \times t \times V_i \times \text{OD}_{600}]$$

t = Inkubationszeit bis zum Abstoppen der Reaktion

V_f = Endvolumen des Tests (200 µl)

V_i = Volumen des eingesetzten Kulturüberstandes (16 µl)

OD₆₀₀ = optische Dichte der Übernachtskultur

$\epsilon \times b$ = Molare Absorption von pNitrophenol bei 410 nm \times

Lichtweg in cm (verwendet: 20,3 ml/ µmol)

2.4.4.2 β -Galaktosidase-Filtertest

Auf Selektivmedium herangezogene Hefekolonien wurden mittels eines Nylonfilters von den Platten abgezogen und in flüssigem Stickstoff für ca. 10-15 Sekunden aufgeschlossen und bei RT aufgetaut. Danach wurden die Filter auf einem mit X-Gal-Lösung (100 mM NaP_i pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgCL₂ \times 6 H₂O, 50 mM β -Mercapto-

ethanol, 1 mg/ ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktosid (X-Gal)) getränktem Whatman-Papier über Nacht bei 30 °C inkubiert und danach getrocknet.

2.5 Methoden zum Hefe 2-Hybrid-System

Das Hefe 2-Hybrid System wurde erstmals 1989 von Fields und Song (Fields and Song, 1989) beschrieben. Es basiert auf der Tatsache, dass eukaryontische Transkriptionsfaktoren unabhängige und voneinander trennbare funktionelle DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomänen besitzen können. Die unabhängige Fusion der GAL4-Bindedomäne (AS 1-147) und der Aktivator-domäne (AS 768-881) an miteinander interagierende Proteine erlaubt die GAL1-Promotorabhängige Expression eines Reportergens (LacZ), die Funktion des geteilten GAL4-Transkriptionsfaktors wird durch die Proteininteraktion rekonstituiert. Mittlerweile ist zur Verringerung falsch positiver Kandidaten die zusätzliche Benutzung von Prototrophie vermittelnden Reportergenen wie zum Beispiel Histidin, Adenin oder Uracil, sowie die Verwendung verschiedener vorgeschalteter Promotoren vor den Reportergenen gängig. Als Bait wird das an die DNA-Bindedomäne fusionierte Protein bezeichnet, das Prey ist das Protein, welches an die Aktivierungsdomäne fusioniert ist. In Bild 2.1 ist das Hefe 2-Hybrid-System schematisch dargestellt.

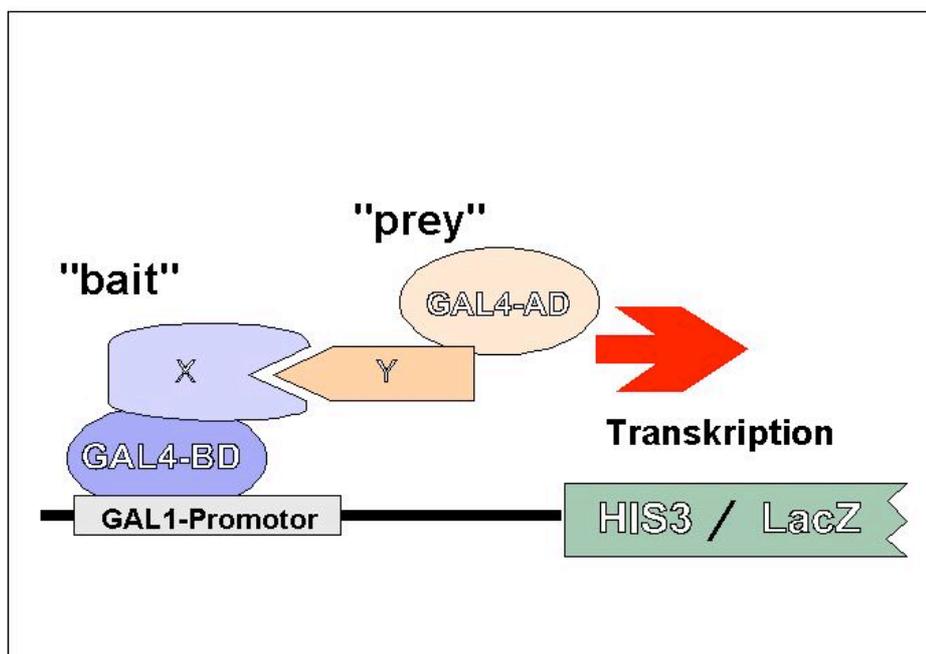


Bild 2.1 schematische Darstellung des Hefe 2-Hybrid-Systems

Die zu testenden Proteine werden an die Aktivierungsdomäne (Prey) bzw. an die DNA-Bindedomäne (Bait) von GAL4 fusioniert. Bei Interaktion der Proteine wird die Funktion des GAL4-Proteins über die Interaktion wiederhergestellt und das Reportergen wird aktiviert (Fields and Song, 1989).

2.5.1 Vorversuche zum Hefe 2-Hybrid-System

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Hefe 2-Hybrid-Konstrukten wurde getestet, ob die auf ihnen kodierten Proteine unspezifische DNA-Bindeeigenschaften bzw. unspezifische Protein-Bindeeigenschaften haben. Dazu wurden die pBD-Plasmide in Kombination mit pACT2, bzw. pAD-Plasmide in Kombination mit pAS2 in Hefen transformiert. Die transformierten Hefen wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden Kolonien erneut auf mehreren Platten mit Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin als Reporter mit 3, 5, 25 und 50 mM 3-AT ausgestrichen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Platten ausgewertet.

2.5.2 Durchführung der Hefe 2-Hybrid-Screens

Die Hefe 2-Hybrid Screens wurden nach einem optimierten Protokoll (beschrieben in Soellick und Uhrig, (2001)) durchgeführt. Dieses Verfahren nutzt die Möglichkeit der Konjugation zweier Hefestämme mit unterschiedlichem Kreuzungstyp (a und α) aus.

Die pAD-cDNA-Banken wurden mittels eines Standardprotokolls in die entsprechenden Stämme (Y187 bzw. AH109) transformiert und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Die eingesetzten Baits wurden frisch in einen Stamm mit entgegengesetztem Kreuzungstyp transformiert (Y187 bzw. AH109). Für die Screens wurde jeweils eine entsprechende Menge frische Übernachtskultur mit der aliquotierten cDNA-Bibliothek vermischt. Zur Induktion der Matingfaktoren wurde der Matingansatz für 105 Minuten in saurem YCM-Medium (pH 3,5) inkubiert, danach wurden die Hefen zur Konjugation in einer optimierten Dichte auf einen Filter übertragen und für 4,5 h auf YCM-Platten (pH 4,5) inkubiert. Im Anschluss wurden 1×10^8 Zellen auf 3 12x12 cm Platten mit Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 3-50 mM 3-AT (abhängig vom Bait) verteilt und 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Konjugationseffizienz, wurde jeweils die Anzahl der überlebenden Zellen der Bibliothek (Titerplatten Selektionsmedium ohne Leucin) mit der Anzahl der Zygoten aus dem Konjugationsansatz (Titerplatten Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin) verglichen und die Gesamtzellmenge durch Auszählen der Kulturen vor dem Ausstreichen bestimmt. Die Kandidaten-Kolonien aus den Screens wurden mit Wasser in Mikrotiterplatten resuspendiert und in diesem Format auf Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 3-50 mM 3-AT übertragen. Mittels Kolonie-PCR wurden die Inserts der Kandidaten amplifiziert, danach aufgereinigt und sequenziert. Bei interessanten Kandidaten wurden die Plasmide aus Hefe isoliert und nochmals auf Interaktion mit dem ursprünglichen Bait in Hefe getestet. In einigen Fällen wurden sämtliche Kandidaten nach der Kolonie-PCR in Mikrotiterplatten (MTP) in Hefe rekombiniert und mit Hefe konjugiert, die das ursprüngliche Bait enthält.

2.5.3 *In vivo* Rekombination in Hefe

Da sich konventionelle Klonierungsmethoden für Hochdurchsatzprojekte nicht eignen, wurde in dieser Arbeit die effiziente Methode der *in vivo* Rekombination in Hefe genutzt. Hefe bietet die Möglichkeit, PCR-Produkte über homologe Rekombination in linearisierte Plasmide zu integrieren („Gap Repair“) (Oldenburg et al., 1997). Die PCR wird mit Primern durchgeführt, die an ihren 5`-Enden jeweils einen 50-100 Nukleotid-Überhang haben, die homolog zu dem Integrationsort im gewünschten Vektor sind. Alternativ kann die PCR auf einem Vektor durchgeführt werden, der übereinstimmende Sequenzen im Rekombinationsbereich besitzt. Dann sollten die Primer so gewählt werden, dass ca. 100 Nukleotide aus den homologen Bereichen vor und hinter dem Insert mitamplifiziert werden. Zur homologen Rekombination werden die Hefen mit dem linearisierten Vektor, in den das Insert integriert werden soll, und dem PCR-Produkt kotransformiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Die *in vivo* Rekombination in Hefe ist in Bild 2.2 schematisch dargestellt.

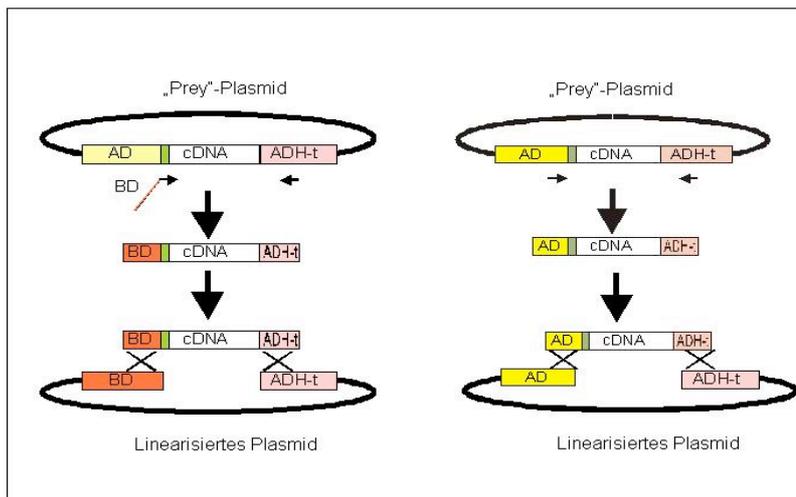


Bild 2.2 Schematische Darstellung der *in vivo* Rekombination in Hefe

Überhänge an den Oligonukleotiden, die der Vektorsequenz in den flankierenden Bereichen entspricht, erlauben in Hefe die Rekombination dieses PCR-Produkts in einen linearisierten Vektor.

2.5.4 Plasmid-Präparation aus Hefezellen

2 ml Übernachtskulturen in Selektionsmedium mit einem kleinen Spatel Yeast Lytic Enzym (ICN) versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und anschließend wie ein 2-facher Minipräparationsansatz mit dem Plasmid-Mini-Spin-Kit von Qiagen weiterbehandelt. Die DNA wurde in 50 µl Wasser eluiert. 10 µl davon wurden zur Transformation elektrokompenter oder chemisch kompetenter Zellen verwendet.

2.5.5 Kolonie-PCR auf Hefezellen

Die Hefen wurden im Mikrotiterplattenformat mit einem Stempel ausgehend von einer Festmedium-Selektionsplatte in jeweils 20 µl 0,02N NaOH-Lösung übertragen. Je 2 µl dieses Lysats konnten sofort für die PCR eingesetzt werden.

2 µl dNTP (10 mM); 2 µl MgCl₂ (25 mM); 5 µl 10x-Puffer (Qiagen); 0,1 µl AO0015 (100 pmol) (Anlage Oligonukleotide); 0,1 µl AO0018 (100 pmol) (Anlage Oligonukleotide); 0,25 µl Taq-Polymerase (Qiagen); 2 µl Lysat ; add 50 µl H₂O

Die PCR wurde auf dem Thermocycler MJ Research PTC-225 mit dem folgenden Programm durchgeführt: 2 min 94 °C, danach 45 Zyklen (45 s 94 °C, 45 s 50 °C, 2 min 72 °C), 2 min 94 °C, 2 min 50 °C, 5 min 72 °C.

2.5.6 Aufreinigung von PCR-Ansätzen im Mikrotiterplattenformat

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen im Mikrotiterplattenformat wurde Sephadex TM G-50 Superfine von Amersham Pharmacia verwendet. Die Matrix wurde mit einer speziellen Vorrichtung in Multiscreen HV Membranplatten (Millipore) gefüllt und mit 300 µl Wasser versetzt. Sie wurde zum Quellen 3 h bei 4 °C gelagert und danach zwei Mal mit 150 µl Wasser gewaschen. 20 µl PCR-Ansatz wurden auf die Matrix pipettiert und zentrifugiert. Das Eluat konnte direkt zum Sequenzieren verwendet werden.

Einige PCR-Ansätze aus den Screens wurden vor dem Sequenzieren nicht aufgereinigt, sondern mit Exo-SAP-IT (Amersham Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers behandelt.

2.6 Ungerichtete Mutagenese durch „error prone“ PCR

Zum Einfügen ungerichteter Mutationen wurde das entsprechende Gen in einem MnCl₂-haltigen PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase amplifiziert und in Hefe in entsprechende Vektoren rekombiniert. Pro 100 µl Ansatz wurden 2 µl 10 mM dATP und dGTP, 10 µl 10 mM dCTP und dTTP, 10 µl 10xMutagenese-Puffer, je 1 µl „forward“ und „reverse“ Primer (100 pmol/ µl), 10ng Vektor-DNA, 1 U Taq-Polymerase (Qiagen) und 0,05-0,1 mM MnCl₂ bei folgendem PCR-Programm inkubiert:

2 min 94 °C, danach 40 Zyklen (2 min 94 °C, 45 s 50 °C, 2 min 72 °C), 2 min 94 °C, 2 min 50 °C, 5 min 72 °C.

10 x Mutagenese-Puffer:

100 mM Tris/HCl pH 9

500 mM KCl

1% Triton X100

70 mM MgCl₂

Die PCR-Produkte wurden direkt zur *in vivo* Rekombination in Hefe eingesetzt (2.5.3).

2.7 *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde mit dem TNT-Retikulocytenextrakt von Promega durchgeführt. Als Template wurde der Vektor pDEST14 mit dem entsprechenden Insert verwendet. Zu 1 µg Vektor wurden 1 µl L^{-[35]}S-Methionin, 1 µl Puffer, 0,5 µl T7-Polymerase, gegeben und der Ansatz auf 25 µl mit Wasser aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit einem Volumen Retikulocytenlysat versetzt und 1,5 h bei 30 °C inkubiert. 1 µl des Ansatzes wurden auf ein SDS-PAGE geladen. Der Erfolg der *in vitro* Transkription und Translation wurde durch Exposition eines Films nachgewiesen.

Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase und anschließender *in vitro* Translation in Retikulocyten-Lysat synthetisiert. Dazu wurden die bHLH-Proteine *AtbHLH001*, *AtbHLH002*, *AtbHLH012*, *AtbHLH042* in den Gateway-Vektor pDEST14 rekombiniert. Dieser Vektor enthält einen T7-Promotor vor der Rekombinationskassette, der bei der *in vitro* Transkription im Retikulocytenextrakt als Transkriptionsstart für die T7-RNA-Polymerase dient. Die *in vitro* Transkription und Translation von *AtbHLH013* erfolgte ausgehend von dem Vektor pET32attR (His-Tag-Fusion), in den die cDNA von *AtbHLH013* rekombiniert wurde. In der *in vitro* Transkriptions-/ Translationsreaktion wurde L^{-[35]}S-Methionin zur Markierung der Produkte eingesetzt.

2.8 Proteinexpression von GST-fusionierten Proteinen in *E.coli*

Zur Proteinexpression wurden die entsprechenden cDNAs in pGEX2attR rekombiniert. Es wurde der Bakterienstamm BL21DE3(RIL) verwendet. 500 ml DYT mit Ampicillin und Chloramphenikol wurden mit 25 ml einer Übernachtskultur angeimpft und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde für weitere 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden geerntet und in 9 ml MTBS (siehe unten) resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde 200 µl Lysozym (10 mg/ ml-Lösung) addiert und der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Um Proteinabbau zu verhindern wurde außerdem 50 µl 0,2M Lösung PMSF hinzugefügt. Das Lysat wurde mehrmals sonifiziert, um die genomische DNA zu fragmentieren und danach mit 100 µl Triton X-100 versetzt. Das Gemisch wurde 30 min unter leichtem Drehen bei 4 °C inkubiert und danach bei 10000 upm (Beckman AvantiTM J-25I; Rotor JS13.1) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Glutathion-Agarose-Matrix vermischt und 1 h bei 4 °C unter rollen inkubiert. Die Agarose-Matrix wurde danach fünf Mal mit 1 ml MTBS gewaschen und das Protein mit 2-5 Fraktionen 200 µl reduzierter 10 mM Glutathionlösung von der Matrix eluiert. Je 20 µl des Eluats wurden auf einem SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassie Blau gefärbt.

Glutathion-Agarose:

70mg Matrix-Pulver von SIGMA (G4510) wurde in 5 ml PBS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

MTBS: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,01% IGEPAL (SIGMA)
 in H₂O

10 mM reduzierte Glutathion-Lösung:

Glutathion wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8 gelöst.

2.9 GST-vermittelter *Pull-down*-Assay

200 µl Glutathion-Agarose (siehe 2.8) wurden mit 5 µg Proteinlösung in MTBS 1 h bei 4 °C unter Rollen inkubiert und danach mit 1 ml MTBS gewaschen. Das Blocken der Matrix erfolgte während einer einstündigen Inkubation in einer Milchpulverlösung (5 mg/ ml Milchpulver in MTBS). Die Matrix wurde mit 1 ml MTBS gewaschen, in 200 µl MTBS aufgenommen und mit 8 µl TNT-Produkt versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4 °C wurde die Matrix 5x mit 1 ml MTBS gewaschen und danach mit 40 µl 2xSDS-Gelladepuffer versetzt, aufgekocht und 20 µl davon auf ein 12%iges PAGE aufgetragen.

Das Gel wurde getrocknet, die Exposition des Films erfolgte über Nacht.

3 Ergebnisse

Bisher ist über die Funktion der MYB-Transkriptionsfaktoren nur wenig bekannt. Die Analyse der Proteinsequenzen ermöglichte eine Einteilung der Proteine in Subgruppen, die bei dieser Proteinfamilie vorwiegend auf Sequenzhomologien im Bereich der MYB-Domäne basieren. Die C-terminalen Bereiche weisen nur sehr geringe Homologien auf, die sich innerhalb der Subgruppen auf kurze Motive beschränken (Stracke et al., 2001). Vertreter der MYB-Transkriptionsfaktoren wurden in unterschiedlichen Ansätzen, die das Hefe 2-Hybrid-System nutzen, hinsichtlich funktioneller Zusammenhänge analysiert. Daraus resultierende Ergebnisse wurden für die weitere Untersuchung von Genen aus verschiedenen Transkriptionsfaktorfamilien, die unter anderem an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, verwendet.

3.1 Das Hefe 2-Hybrid-System zur Analyse von Interaktionsnetzwerken

Die Untersuchung der MYB-Transkriptionsfaktoren im Hefe 2-Hybrid-System wurde mit zwei Herangehensweisen bearbeitet. In einem Screeningverfahren wurde mit Vertretern der MYB- und bHLH-Familie aus unterschiedlichen Subgruppen in ungerichteten Hefe 2-Hybrid-Screens nach interagierenden Proteinen gesucht. In einem anderen Ansatz wurden Proteine aus ausgewählten Subfamilien der MYB- und bHLH-Faktoren, die unter anderem an der Regulation des Flavonoidbiosynthesewegs beteiligt sind, in einem Hefe 2-Hybrid-Matrixverfahren gezielt auf gegenseitige Interaktion getestet. Mit Hilfe dieser Ansätze sollten Aussagen über mögliche funktionelle Zusammenhänge der Proteine innerhalb der Subgruppen und über deren Spezifität gemacht werden.

3.1.1 Proteininteraktionsanalyse in einem Hochdurchsatzverfahren

Einzelne Vertreter aus unterschiedlichen Subgruppen der MYB-Transkriptionsfaktoren sollten in einem Hefe 2-Hybrid-Screeningverfahren untersucht werden, wobei die Verwendung eines breiten Spektrums von MYB-Transkriptionsfaktoren einen systematischen Überblick über die mögliche Funktionen und Zusammenhänge innerhalb der Proteinfamilie erlauben sollte. Des Weiteren wurden Screens mit bHLH-Faktoren und WIP-Proteinen durchgeführt, beides Proteinfamilien, von denen einzelne Vertreter an der Regulation des Phenylpropanoidbiosynthesewegs beteiligt sind.

3.1.1.1 Etablierung eines effizienten Hefe 2-Hybrid-Verfahrens für den Laborbereich

Die Untersuchung einer solchen Proteinfamilie setzt voraus, dass ein umfangreiches Screeningverfahren im Labormaßstab durchgeführt werden kann. Dazu mussten die

einzelnen Zwischenschritte so modifiziert werden, dass ein routinemäßiger Ablauf möglichst durchgehend im Mikrotiterplatten-Format erfolgen konnte.

Ein limitierender Schritt war das Klonieren der verschiedenen cDNAs in die die Hefe 2-Hybrid-Vektoren. Dieser Schritt wurde durch die Einführung des Gateway-Klonierung-Systems erleichtert. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich durch PCR auf cDNA-Banken oder schon vorhandenen Vektoren und zwei anschließenden Rekombinationsreaktionen in einem standardisierten Verfahren die gewünschten Vektoren herzustellen.

Die konventionellen Hefe 2-Hybrid Screening-Methoden, die Doppeltransformationen der cDNA-Bibliothek mit den Bait-Vektoren und das Ausstreichen auf einer großen Anzahl von Platten erfordern, wurden diesem Ansatz ebenfalls nicht gerecht. Durch die Verwendung eines Protokolls, welches in unserem Labor entwickelt wurde und eine Verbesserung des Matingverfahrens auf Nylonfiltern darstellt, konnten an 2 Tagen mit vergleichsweise geringem Aufwand bis zu 12 Screenings parallel durchgeführt werden (Soellick und Uhrig, 2001). Da Plasmidpräparationen aus Hefen relativ aufwändig sind, wurden die DNA-Fragmente der Kandidaten mittels PCR auf den Kolonien amplifiziert. Die Sequenzierung der Produkte erforderte die Umstellung der herkömmlichen PCR-Aufreinigungsmethode in eine Aufreinigung mit einer Sephadex-Matrix im Mikrotiterplattenformat. Des Weiteren wurde mit Hilfe der „Gap Repair“ Methode (siehe Material und Methoden) ein Weg gefunden, Kandidaten nach einer PCR wieder in einen Hefektor in Hefe zu rekombinieren und die Interaktion in Hefe zu bestätigen. Das Protokoll für die Transformation des geschnittenen Hefektors zusammen mit dem PCR-Produkt, das in der Hefe in das Plasmid integriert wird, wurde ebenfalls effizient dem 96-well-Format angepasst. Auch der anschließende Test auf Interaktion mit den ursprünglichen Bait-Vektoren zur Bestätigung der Kandidaten wurde durch die Etablierung eines Protokolls zur Hefekonjugation im 96-well-Format vereinfacht. Parallel zu den Screenings wurde an einer weiteren Erleichterung des Matingverfahrens gearbeitet. Eine Verbesserung in der Handhabung wurde durch das Mating der Hefen in YPAD-Flüssigmedium mit 10% PEG bei einer Zelldichte von $2 \text{ OD}_{600} / \text{ml}$ unter schütteln bei 80 upm erreicht. Das Ausstreichen der Hefen auf Festmedium zur Selektion der Kandidaten wurde durch das Ausgießen in Flüssigmedium ersetzt. Eine weitere Verbesserung dieses Schrittes konnte durch Immobilisierung der Kolonien in Medium erreicht werden, welches die gelierende Substanz Gelrite enthält. Diese Substanz macht das Medium in dieser Konzentration dickflüssiger, die Hefen bleiben in der Schwebe, ohne sich bei leichten Erschütterungen zu verteilen. Folglich kann bei einer angestrebten Zygotenzahl von 1 Million der gesamte Screen auf 2 Platten (\varnothing 12 cm) ausgegossen werden. Diese Verbesserungen erlauben die Bearbeitung von 96 parallelen Ansätzen, wobei pro Ansatz ca. 1-5 Millionen Zygoten untersucht werden können. Dieses Hochdurchsatzprotokoll kann ohne Verwendung von besonderen Geräten oder Robotern im Labor durchgeführt werden. In Bild 3.1 ist ein solcher standardisierter

Screeningvorgang, wie er während dieser Arbeit entwickelt wurde, schematisch dargestellt.

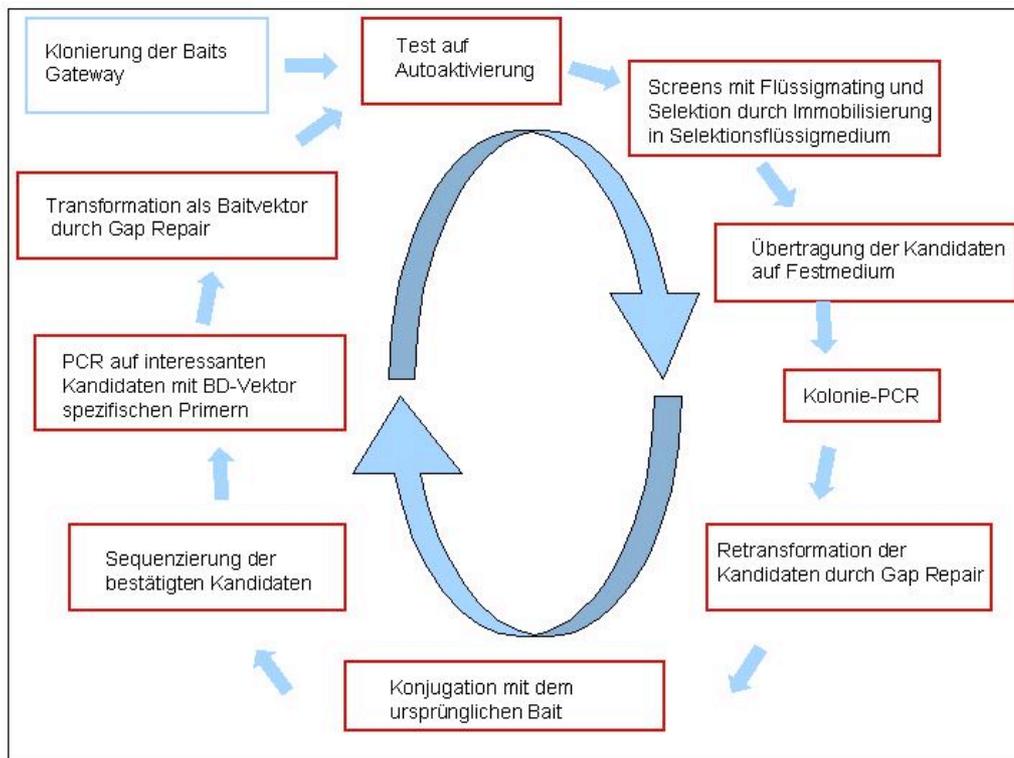


Bild 3.1 Übersicht über den Ablauf von Hefe 2-Hybrid-Screens nach dem während dieser Arbeit etablierten Protokoll.

Sämtliche Schritte, die hier rot umrandet sind, können im Mikrotiterplattenformat durchgeführt werden. Die Gap Repair-Rekombination in Hefe und die Klonierung mit Hilfe des Gateway-Systems erleichtern die einzelnen Klonierungsschritte.

3.1.1.2 Die Durchführung der Hefe 2-Hybrid-Screens

Für die Hefe 2-Hybrid-Screens wurden 56 MYB-, 17 bHLH-, 6 WIP-, zwei bZIP-Proteine sowie ein LEA-Protein, welches in einem Screen mit *AfMyb6* erhalten wurde, als Bindedomänenfusionen (Bait) in Hefe exprimiert. In ersten Experimenten wurde kontrolliert, ob diese Proteine unabhängig von einer Interaktion mit einem Aktivierungsdomänen-fusionierten Protein (Prey) den Hefe 2-Hybrid-Reporter aktivieren (im Folgenden Autoaktivierung genannt). Solche autoaktivierenden Proteine können im Hefe 2-Hybrid-System nur begrenzt verwendet werden. Die kodierenden Sequenzen dieser Proteine wurden mit Hilfe des Gateway-Verfahrens in pAS2-attR (ein 2µ Plasmid mit hoher Kopienzahl in Hefe) bzw. pCD2attR (ein Cen/Ars-Plasmid mit geringer Kopienzahl in Hefe) rekombiniert. Die Herstellung der einzelnen Vektoren, sowie die Quellen der kodierenden DNAs sind im Anhang (A) näher beschrieben.

Name	MIPS-ID	BD in Hefe	Name	MIPS-ID	BD in Hefe
AtMYB0 GL1	At3g27920	++	AtMYB111	At5g49330	++
AtMYB4	At4g38620	-	AtMYB112	At1g48000	++
AtMYB5	At3g13540	++	AtMYB113	At1g66370	++
AtMYB6	At4g09460	-	AfMYB115	At5g40360	++
AtMYB9	At5g16770	++	AfMYB116	At1g25340	++
AtMYB11	At3g62610	++	AfMYB118	At3g27780	-
AtMYB12	At2g47460	tox	AfMYB121	At3g30210	++
AtMYB23	At5g40330	++	AfMYB122	At1g74080	++
AtMYB25	At2g39880	++	AfMYB123 TT2	At5g35550	+
AtMYB26	At3g13890	+	AfMYB124	At1g14350	++
AtMYB29	At5g07690	++	AfMYB 3R 1	At4g32730	++
AtMYB30	At3g28910	tox	AfMYB 3R 3	At3g09370	+
AtMYB39	At4g17780	++	AfMYB 3R 4	At5g11510	++
AtMYB42	At4g12350	+	AfMYB 3R 5	At5g02320	tox
AtMYB43	At5g16600	++	AfMYB 4R 1	At3g18100	++
AtMYB44	At5g67300	+	AfbZIP21	At1g08320	++
AtMYB51	At5g59780	tox	AfbZIP65	At5g06839	++
AtMYB55	At4g01680	++	WIP1 TT1	At1g34790	-
AtMYB59	At5g59780	++	WIP2	At3g57670	+
AtMYB64	At5g11050	++	WIP3	At1g08290	-
AtMYB66 WER	At5g14750	++	WIP4	At3g20880	tox
AtMYB73	At4g37260	++	WIP5	At1g51220	tox
AtMYB75 PAP1	At1g56650	++	WIP6	At1g13290	tox
AtMYB77	At3g50060	+	AfbHLH001 GL3	At5g41315	++
AfMYB78	At5g49620	++	AfbHLH002	At1g63650	+
AfMYB79	At4g13480	-	AfbHLH003	At4g16430	-
AfMYB84	At3g49690	++	AfbHLH004	At4g17880	tox
AfMYB85	At4g22680	++	AfbHLH005	At5g46760	++
AfMYB88	At2g02820	++	AfbHLH006	At1g32640	tox
AfMYB90 PAP2	At1g66390	++	AfbHLH008 PIF3	At1g09530	++
AfMYB91	At2g37630	-	AfbHLH009 PIF4	At2g43010	++
AfMYB94	At3g47600	++	AfbHLH010	At2g31220	++
AfMYB95	At1g74430	++	AfbHLH012	At4g00480	-
AfMYB98	At4g18770	tox	AfbHLH013	At1g01260	-
AfMYB99	At5g62320	++	AfbHLH034	At3g23210	++
AfMYB102	At4g21440	++	AfbHLH042 TT8	At4g09820	-
AfMYB103	At1g63910	++	AfbHLH068	At4g29100	+
AfMYB106	At3g01140	++	AfbHLH104	At4g14410	-
AfMYB107	At3g02940	++	AfbHLH125	At1g62975	-
AfMYB108	At3g06490	++	AfbHLH046	At5g08130	+
AfMYB109	At3g55730	++	LEA	At2g44060	-

Tabelle 3.1 Übersicht über die klonierten und getesteten Bindedomänen-Fusions-Proteine

Dargestellt sind die entsprechenden Baits, die an die BD fusioniert sind und ihre Autoaktivierungskompetenz in Hefe; -: keine Autoaktivierung; + leichte Autoaktivierung; ++ starke Autoaktivierung; **tox**: toxisches Produkt für Hefe.

Insgesamt waren 25 Bait-Proteine nicht oder nur leicht autoaktivierend. 14 Proteine (17%) konnten ohne Einschränkung und ohne Zugabe von mehr als 5 mM 3-AT für die Hefe 2-Hybrid-Screens verwendet werden. 13% der Proteine sind zwar autoaktivierend, aber durch entsprechende Mengen an 3-AT (10-25 mM) konnte das Wachstum dieser Zellen ohne Interaktionspartner auf SD-LWH unterdrückt werden. Bei 58% der Proteine ist die Autoaktivierung in Hefe so stark, dass sie nicht für dieses System verwendet werden konnten. 12% der Proteine sind für die Hefen toxisch, bei diesen Konstrukten wurden nur wenige Kolonien gefunden, die auf einem Rasen aus abgestorbenen Hefen wuchsen. Eine Übersicht über die Ergebnisse aus diesen Vortests sind in Tabelle 3.1 und in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

	MYBs	bHLHs	WIPs	sonstige	insgesamt
OK	5	6	2	1	14
leicht SA	6	3	1	-	11
SA	40	6	-	2	48
tox	5	2	3	-	10
	56	17	6	3	82

Tabelle 3.2 Übersicht über die getesteten Bait-Proteine

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vortests der Bait-Proteine. Die mit Bait und Kontrollvektor ko-transformierten Hefen wurden auf Selektionsmedium mit 3-50 mM 3-AT ausgestrichen und nach 3 Tagen analysiert. Autoaktivierende Proteine, deren Wachstum durch 25 mM 3-AT inhibiert werden konnte, wurden als leicht autoaktivierend bezeichnet. OK: nicht autoaktivierend, SA: autoaktivierend, tox: toxisch in Hefe. MYBs: MYB-Transkriptionsfaktoren, bHLHs: bHLH-Transkriptionsfaktoren; WIPs: WIP-Proteine, sonstige: bZIP-Proteine und ein LEA-Protein (Kandidat aus einem Screen mit *AtMyb6*).

Einige autoaktivierende Proteine wurden sowohl ausgehend von Plasmiden mit hoher Kopienzahl (pAS2-attR) als auch von Plasmiden mit einer geringen Kopienzahl (pCACTattR) in Hefe exprimiert, um zu testen, ob durch eine geringe Kopienzahl des Plasmids und eine damit eventuell verbundene niedrigere Expressionsrate des BD-fusionierten Proteins die Autoaktivierung beeinflusst werden kann. Allerdings wurde dadurch in keinem Fall die Autoaktivierung reduziert.

Mit insgesamt 43 Baits wurden 96 Hefe 2-Hybrid-Screens durchgeführt. Baits, die in einem Screen erfolgreich waren, wurden gegen mehrere verschiedene Bibliotheken eingesetzt (Tabelle 3.3). Bei den Banken handelte es sich um eine Bibliothek, die cDNA aus *Arabidopsis*-Zellkulturen (Ara Zellkultur) enthält, die im Dunklen angezogen wurden, eine normalisierte Bibliothek, die aus der gesamten Pflanze hergestellt wurde (HS Aral), und eine Bank, die von Clontech erworben wurde und ebenfalls aus ganzen Pflanzen gewonnen wurde (Ara Clontech). Einige Screens wurden aufgrund der Autoaktivierung des Baits eingestellt. Insgesamt wurden 55 erfolgreiche Screens ausgewertet. Diese wurden mit 32 Baits durchgeführt, die mit 1-3 cDNA-Banken aus *Arabidopsis thaliana* konjugiert wurden.

Bait	HS-Aral	Ara Zellkultur	Ara Clontech
A tb H LH 002	1		
A tb H LH 003	1		1
A tb H LH 005			1
A tb H LH 012	1	1	1
A tb H LH 013	1		1
A tb H LH 042	1	1	
A tb H LH 046		1	
A tb H LH 125	1		1
LEA	1	1	
A t MYB109		1	
A t MYB111		1	
A t MYB112	1	1	
A t MYB116		1	
A t MYB118		1	
A t MYB121		1	
A t MYB122		1	

Bait	HS-Aral	Ara Zellkultur	Ara Clontech
A t MYB123		1	
A t MYB26		1	1
A t MYB 3R 3	1	1	1
A t MYB4	1	1	1
A t MYB42		2	
A t MYB44			1
A t MYB 4R			1
A t MYB6	1	1	1
A t MYB73		1	
A t MYB75		1	1
A t MYB78		1	
A t MYB88		1	
A t MYB95		1	
WIP1	1	2	
WIP2	1	1	
WIP3	1	2	1

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der durchgeführten und anschließend ausgewerteten Screens

s. 55 Screens wurden mit 32 Baits und mit 3 verschiedenen cDNA-Bibliotheken aus *A.thaliana* durchgeführt. Die Bibliotheken sind im Text und in Material und Methoden beschrieben

Die Erfahrung aus vorangegangenen Screens hat gezeigt, dass aus den verschiedenen DNA-Banken meist unterschiedliche Kandidaten isoliert werden. So wurden je nach Bait 7- >1000 Kandidaten gefunden, von denen maximal 96 pro Screen weiter analysiert wurden. Insgesamt wurden 1000 Kandidaten sequenziert. Die Analyse dieser Daten ergab abzüglich mehrfach vorkommender Sequenzen und ribosomaler Proteine, eine Anzahl von 520 unterschiedlichen Kandidaten. Von diesen Proteinen sind ca. 60% unbekannt. Ca. die Hälfte dieser unbekannt Proteine kann anhand von Sequenzähnlichkeiten oder bestimmten Domänen in einen möglichen funktionellen Zusammenhang eingeordnet werden. Es wurden 51 Proteine isoliert, die den Transkriptionsfaktoren oder DNA-bindenden Proteinen zugeordnet werden können. Einige Kandidaten wurden in mehreren Screens mit verschiedenen Bait-Proteinen gefunden. Von anderen wurden mit dem gleichen Bait mehrere unterschiedliche Fragmente isoliert. Verschieden lange Proteinfragmente geben Hinweise auf mögliche Interaktionsbereiche und das Auffinden verschiedener Klone erhöht im Allgemeinen die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine echte Interaktion in Hefe handelt. Interaktionen, die durch Rekombination in Hefe und Test gegen das ursprüngliche Bait nochmals überprüft wurden, sind im Anhang unter Punkt 2 aufgeführt. Da diese

Außer den R2R3-MYB-Proteinen wurden vier verschiedene 1R-MYB-Proteine isoliert, *AtMybL2*, CPC und zwei weitere noch unbekannte 1R-MYB-Proteine. Das Protein mit der MIPS-Identifizierungsnummer At1g01360 ist dem Protein CPC ähnlich und wurde CPC-like1 (CPC-L1) genannt. Das Protein mit der Nummer At2g30420 ist dem Protein TRIPTYCHON am ähnlichsten und wurde deshalb als TRY-like1 (TRY-L1) bezeichnet. *AtMybL2* und CPC-L1 wurden sowohl mit einem Screen mit *AfbHLH002* identifiziert als auch mit *AfbHLH012* erhalten. Außerdem konnte die Interaktion von dem WD40-Protein TTG1 mit *bHLH012* und eine Interaktion von *AtMyb123* mit dem WD40-Protein At1g18080 gezeigt werden. Einige Zinkfingerproteine wurden in unterschiedlichen Screens mit verschiedenen MYB-Transkriptionsfaktoren erhalten. Das unbekannte Zink-Finger Protein At4g19700 wurde mit *AtMyb4*, *AtMyb6*, *AtMyb0* und sogar verschiedene Klone mit *AtMyb75* gefunden. Ein Screen mit *AfbHLH002* ergab außerdem die Interaktion mit einem Zinkfingerprotein (At1g34170), welches wie WIP1 eine C2H2-Zinkfingerdomäne hat. Mit *AtMyb6* wurde noch die spezifische Interaktion mit dem C-Terminus von *AfbHLH046* und mit einem LEA-Protein in Hefe bestätigt. Dieses Protein wurde bei zwei verschiedenen Screens mit dem gleichen Bait mehrmals gefunden und deshalb hier mit aufgeführt.

Es wurden außerdem bisher unbekannte Heterodimerisierungen von bHLH-Faktoren gezeigt. Diese Dimerisierungen beschränken sich nicht auf die entsprechende Subgruppe, sondern sind auch zwischen Vertretern verschiedener Subgruppen möglich. (Bild 3.2) So konnte die Dimerisierung von *AfbHLH125* mit *AfbHLH035*, *AfbHLH068*, *AfbHLH110*, *AfbHLH017* und *AfbHLH027* (2 Fragmente) und die Dimerisierung von *AfbHLH013* und *AfbHLH003* sowie *AfbHLH003* mit *AfbHLH017* gezeigt werden. Die Interaktion von *AfbHLH013* und *AfbHLH003* konnte auf Seiten von *AfbHLH003* auf ein Fragment von 118 Aminosäuren (AS 349-467) eingeschränkt werden, welches das bHLH-Motiv enthält.

Zwei Proteine aus der bHLH-Subgruppe III_d und ein Protein der Subgruppe III_e interagieren mit unterschiedlichen noch nicht charakterisierten Proteinen, die jedoch alle ein kurzes Motiv gemeinsam haben („FLEKR“).

Es wurden jeweils verschiedene Fragmente dieser Proteine gefunden, das kürzeste war ein Fragment von At5g13220, das nur 36 Aminosäuren (162–197) enthält (NLEGLDLP~~IARRKSLQR~~FLEKRKERLVSTSPYYPTSA). Eine Liste mit allen Kandidaten, ausgenommen der ribosomalen Proteine ist der Arbeit im Anhang 1 beigelegt.

3.1.2 Kartierung der Interaktionsdomänen von *AfbHLH002* und *AfbHLH012*

Die Experimente ergaben, dass *AfbHLH012* unter anderem mit *AtMYB75*, TTG1 und dem Zinkfinger-Protein At1g34170 interagiert. *AfbHLH002* ist *AfbHLH012* über einige Bereiche sehr ähnlich. Deshalb wurde untersucht, ob dieses Protein und *AfbHLH042* ebenfalls mit den drei genannten Kandidaten aus den Screens mit *AfbHLH012*

interagieren. Deletionen von den Bait-Proteinen pBD-*AfbHLH002* und pBD-*AfbHLH012* sollten Hinweise auf die Interaktionsdomänen geben.

Die Vektoren pCD2-bHLH002N_{Q331}, pCD2-bHLH002-Q331_E401, pCD2-bHLH012N_{I158} und pCD2-bHLH012C_{R206} wurden jeweils mit pCACT-*AtMyb75* und den aus Hefe isolierten Vektoren pAD-TTG1 und pAD-At1g34170 ko-transformiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Die Interaktionen wurden durch Histidinprototrophie und Test auf β -Galaktosidase-Aktivität überprüft. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Bild 3.3 und Bild 3.4 dargestellt.

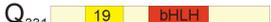
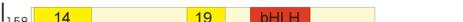
		<i>AtMYB75</i>	ZnFi <i>At1g34370</i>	TTG1
<u><i>AfbHLH002</i></u>				
	1	+	+	+
	2	-	-	+
	3	-	-	+
<u><i>AfbHLH012</i></u>				
	4	+	+	+
	5	-	-	+
	6	-	-	-

Bild 3.3 Deletionsanalyse von *AfbHLH002* und *AfbHLH012*

Die Fragmente von *AfbHLH002* und *AfbHLH012*: *bHLH002_Cd331*, *AfbHLH002_Q331_E401*; *AfbHLH012_Nd158* und *AfbHLH012_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 *AfbHLH002* entspricht einem sauren Bereich, der in *AfbHLH012* nicht vorhanden ist.

AtMyb75 und *At1g34170* interagieren beide mit *AfbHLH012* und *AfbHLH002*, jedoch mit keinem der verkürzten Proteine. TTG1 interagiert sowohl mit beiden Volllängen-Proteinen, als auch mit den jeweiligen C-terminalen Deletionen. Dieselben Ergebnisse wurden mit einem zweiten Reporter, dem *lacZ*-Gen erhalten. Bei den interagierenden Proteinen ist eine deutliche Blaufärbung zu sehen. Der Interaktionsbereich lässt sich auf den Bereich zwischen den Aminosäuren Q331 und E401 in *AfbHLH002* begrenzen. Die in der Abbildung in orange dargestellten Motive 11, 18, 13, 14 und 19 entsprechen den in Subgruppe IIIf gemeinsamen Motiven, die in Heim et al. (2003) beschrieben wurden.

	1		2		3		4		5		6	
	<i>AfbHLH002</i>		<i>AfbHLH002</i> Cd301		<i>AfbHLH002</i> Q301_E401		<i>AfbHLH012</i>		<i>AfbHLH012</i> Nd158		<i>AfbHLH012</i> Cd206	
<i>AtMYB75</i>		+		-		-		+		-		-
ZnFi <i>At1g34370</i>		+		-		-		+		-		-
TTG1		+		+		+		+		+		-

Bild 3.4 Interaktionen der Deletionsmutanten von *AfbHLH002* und *AfbHLH012* mit Kandidaten aus den Hefe 2-Hybrid-Screens

Ko-transformierte Hefen wurden auf SD-LWH mit 3 mM 3-AT ausgestrichen und in einem LacZ-Test mit X-Gal gefärbt (β -Galaktosidaseaktivitätstest mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktosid). + Interaktion (Wachstum auf SD-LWH5 und Blaufärbung beim LacZ-Test; -: keine Interaktion der Proteine; verwendet wurden die in Bild 1.3 abgebildeten Deletionskonstrukte.

3.1.3 Analyse eines Interaktionsnetzwerks von ausgewählten Subgruppen zweier Proteinfamilien

Sowohl MYB- als auch bHLH-Proteine sind an der Regulation des Flavonoidstoffwechsels und an Entwicklungsprozessen der Epidermis beteiligt. Die entsprechenden MYB- und bHLH-Faktoren sind in den jeweiligen Stammbäumen innerhalb eines Zweiges lokalisiert. Die genomweiten Analysen, die zu der Gruppierung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in Familien, Gruppen und Untergruppen geführt haben, ermöglichen nun, sämtliche Proteine, die basierend auf ihrer Sequenz in einem möglichen funktionellen Zusammenhang stehen, in einem systematischen Ansatz auf gegenseitige Interaktion zu testen. Die Proteine *AtMYB123*, *AtMYB75*, *AtMYB90*, *AtMYB113*, *AtMYB5* der Subgruppen 5 und 6, sowie die Proteine der Subgruppen 15 (*AtMYB66*, *AtMYB0*, *AtMYB23*) und 7 (*AtMYB11*, *AtMYB12*, *AtMYB111*) und die bHLH-Faktoren der Gruppe IIIf (*AfbHLH001*, *AfbHLH002*, *AfbHLH012* und *AfbHLH042*) sowie einige Vertreter aus der Gruppe III d (*AfbHLH003* und *AfbHLH013*) wurden in einem Matrixverfahren analysiert. Bei dieser Methode wird die Interaktion aller Baits mit allen Prey-Proteinen mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid-Systems getestet. Dazu werden Hefen mit unterschiedlichem Konjugationstypus jeweils mit einem Bait bzw. Prey Vektor transformiert. Die Hefen werden dann in einer Matrix so verteilt, dass jeweils jedes Bait mit jedem Prey konjugieren kann. Nach der Konjugation werden die Zygoten auf Selektionsmedium bezüglich ihrer Reporteraktivierung (Wachstum bzw. Galaktosidase-Aktivität) untersucht. Die Fusion der Hefen im Matrixverfahren hat den Vorteil, dass nicht für jede zu testende Interaktion eine Doppeltransformation durchgeführt werden muss. Außerdem sind die Ergebnisse aufgrund der gleichen Ausgangsbasis besser vergleichbar.

Die entsprechenden cDNAs (im Rahmen des GABI-Projekts von Ralf Stracke bzw. innerhalb der AG von Prof. Weisshaar von Marc Heim und Marc Jakoby in Entry-Vektoren zur Verfügung gestellt) wurden mit Hilfe des Gateway-Systems in die 2-

Hybrid-Vektoren pCD2attR und pCACTattR rekombiniert. Die Vektoren wurden einzeln in die Hefestämme AH109 (für die BD-Fusionsproteine) und Y187 (für die AD-Fusionsproteine) transformiert und anschließend über Konjugation der Hefen in entsprechenden Kombinationen vereinigt und auf Medium ohne Tryptophan und Leucin auf Anwesenheit beider Plasmide selektiert. Mehrere Kolonien wurden in Wasser resuspendiert und auf Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin überstempelt und nach 3 Tagen mit einer gleich behandelten Selektionsplatte, die Histidin enthält, verglichen.

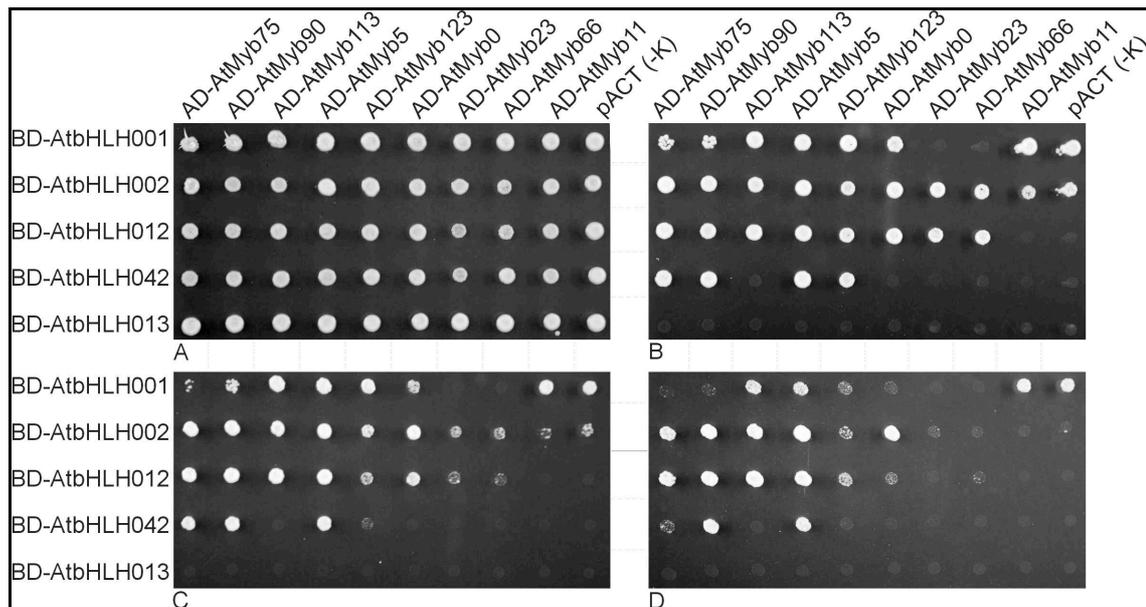


Bild 3.5 Interaktionsmatrix der ausgewählten MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren

A: Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin; B: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 5 mM 3-AT; C: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 20 mM 3-AT; D: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin 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.

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Proteine im Hefe 2-Hybrid-System ohne entsprechendem Partner die Expression der Reportergene aktivieren können, wurden die Hefen, die das zu testende Konstrukt enthalten, mit Hefen, die jeweils mit dem leerem Vektor transformiert wurden, fusioniert. Diese Hefen wurden danach auf Wachstum ohne Histidinzugabe auf 3-AT-haltigem Selektionsmedium (verschiedene Konzentrationen) getestet. Dabei stellte sich heraus, dass alle getesteten MYB-Transkriptionsfaktoren und *A**t**bHLH001* als Bindedomänenfusion autoaktivierend sind und deshalb nur als Aktivierungsdomänenfusion verwendet werden können. Die bHLH-Faktoren *A**t**bHLH0012*, *A**t**bHLH042* und *A**t**bHLH013* konnten als Bindedomänenfusion verwendet werden, sie zeigen zusammen mit dem Kontrollvektor pACT kein Wachstum

auf Selektionsmedium ohne Histidin. *AfbHLH002* ist autoaktivierend, das Wachstum der Kolonien konnte aber durch erhöhte Zugabe von 3-AT (20 mM) soweit unterdrückt werden, dass ein deutlicher Unterschied beim Wachstum der Hefen im Vergleich zu der Kontrolle mit kotransformiertem leeren Vektor zu sehen war.

Die Proteine *AtMYB75*, *AtMYB90*, *AtMYB5* und *AtMYB123* interagieren mit den bHLH-Faktoren *AfbHLH002*, *AfbHLH012* und *AfbHLH042*. Hefen, die *AfbHLH012* zusammen mit *AtMYB0*, *AtMYB23* und *AtMYB66* und *AtMYB113* exprimieren wachsen auf Selektionsmedium. Bei *AfbHLH002* kann ebenfalls eine Interaktion mit *AtMYB0* und *AtMYB113* gezeigt werden. Hefen, die *AfbHLH042* zusammen mit *AtMYB113*, *AtMYB0*, *AtMYB23* oder *AtMYB66* exprimieren, wachsen nicht auf Selektionsmedium.

Wird die Interaktionsstärke mit dem Wachstum der Hefen gleichgesetzt, so ist festzustellen, dass die Interaktionen zwischen den getesteten Proteinen unterschiedlich stark sind. Die Interaktionen zwischen den Proteinen aus der Unterfamilie 15 der MYB-Transkriptionsfaktoren mit den getesteten bHLH-Faktoren sind insgesamt schwächer. Keiner der verwendeten MYB-Transkriptionsfaktoren interagiert mit *bHLH013* aus der Subgruppe IIIId.

Die Kotransformationen von Plasmiden die für *AfbHLH001* und *AtMYB23* bzw. *AtMYB66* kodieren führen in Hefe zu vermindertem Wachstum.

Unabhängig von der Selektion auf Wachstum ohne Histidin, wurde zusätzlich ein weiterer Reporter des Hefe 2-Hybrid-Systems hinzugezogen. Es handelt sich dabei um das MEL1-Gen unter der Kontrolle des natürlichen Mel1-Promotors, wohingegen Histidin ausgehend von einem GAL1-Promotor induziert wird. Der MEL1-Reporter erlaubt eine semiquantitative Analyse der Interaktionsstärke. MEL1 kodiert für eine β -Galaktosidase, die in den periplasmatischen Raum und in das Medium sekretiert wird, um dort Melibiose in Galaktose und Glukose aufzuspalten. Beim β -Galaktosidase-Test kann die Aktivität der β -Galaktosidase anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid zu D-Galactose und p-Nitrophenol, ein Molekül mit einem Absorptionsmaximum bei 410 nm, ermittelt werden. Im Gegensatz zu dem häufig verwendeten quantitativen β -Galaktosidase-Test müssen dazu die Hefen nicht aufgeschlossen werden, sondern es wird zellfreies Kulturmedium verwendet. Aus diesem Grund eignet sich der Test besonders gut für große Ansätze im Mikrotiterplatten-Format.

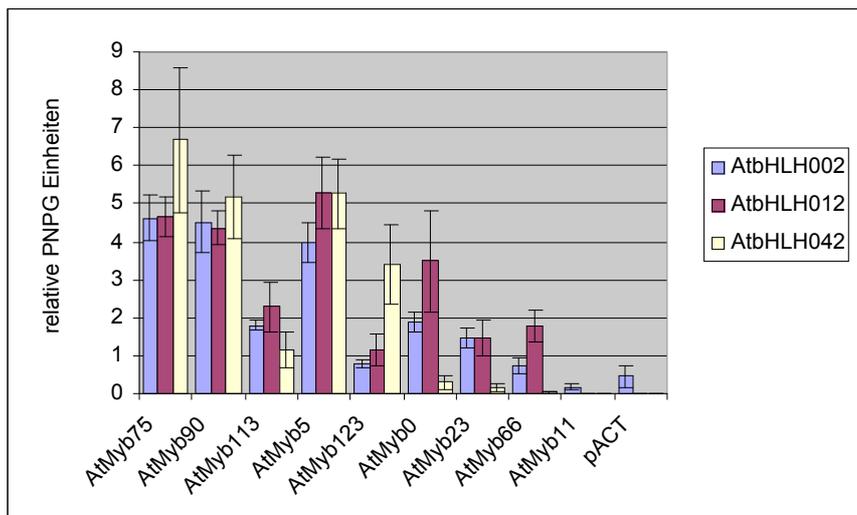


Bild 3.6 β -Galaktosidase-Test der Interaktionen zwischen den getesteten bHLH-Faktoren und MYB-Transkriptionsfaktoren

Die MYB-Proteine wurden als Aktivierungsdomänenfusionen zusammen mit den bHLH-Faktoren, fusioniert an die Bindedomäne, in Hefe exprimiert. Die Hefen wurden in Flüssigmedium herangezogen, der Überstand der Kultur wurde nach dem Abzentrifugieren der Hefen für den β -Galaktosidase-Test verwendet. Es sind jeweils die relativen β -Galaktosidase-Einheiten aus den entsprechenden PNP-G-Tests gezeigt. Negativkontrolle: pACT konjugiert mit den Hefen, die die bHLH-Proteine enthalten.

Die ermittelten β -Galaktosidase-Einheiten unterstützen die Ergebnisse, die schon mit Hilfe des Histidinreportergens ermittelt wurden. Die Interaktion von *AtbHLH002* mit *AtMYB75*, *AtMYB90*, *AtMYB113*, *AtMYB5*, *AtMYB0* und *AtMYB23* ist deutlich stärker als mit der Negativkontrolle, der Kointegration mit leerem AD-Vektor. Die β -Galaktosidase-Aktivität liegt bei der Interaktion mit *AtMYB123* und *AtMYB66* nur leicht über dem Wert, der bei der Negativkontrolle ermittelt wurde. *AtbHLH042* interagiert mit allen Vertretern der Subgruppe 5 und 6 und mit *AtMYB5*, jedoch nicht mit Mitgliedern der Subgruppe 15. Die Menge des umgesetzten p-Nitrophenylgalaktosids, die mit *AtbHLH042* erzielt wurden sind vergleichbar mit den entsprechenden Werten der Interaktionen von *bHLH002*. Die β -Galaktosidase-Aktivität bei einer Koexpression von *AtMYB123* zusammen mit *AtbHLH042* ist höher, als die Expression zusammen mit *AtbHLH002* und *AtbHLH012*, wohingegen nur ein geringes Wachstum auf Medium ohne Histidin zu sehen ist. Keiner der getesteten bHLH-Faktoren interagiert mit *AtMYB11*.

Das Matrixverfahren hat gezeigt, dass die MYB-Transkriptionsfaktoren der Subgruppen 5, 6, 7 und 15 mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe IIIf interagieren. Während alle getesteten bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf unterschiedlich stark mit den Vertretern der MYB-Subgruppe 5 und 6 interagieren können, interagiert nur *AtbHLH012* auch mit allen Vertretern der MYB-Subgruppe 15. Im Fall von *AtbHLH002* konnte eine schwache Interaktion mit *AtMYB0* und *AtMYB23* gezeigt werden. Keines der getesteten MYB-Proteine bindet an *AtbHLH013* und keines der untersuchten

bHLH-Proteine an *AtMYB11*. Außer den in Bild 3.5 dargestellten Proteine wurden noch die MYB-Transkriptionsfaktoren *AtMYB4*, *AtMYB6*; *AtMYB12*; *AtMYB55*, *AtMYB112* und *AtMYB118* auf Interaktion mit den oben genannten bHLH-Faktoren getestet. Diese ergaben keine Interaktion. Weitere bHLH-Faktoren aus den verwandten Subgruppen III d (*AtbHLH003* und *AtbHLH013*), die ähnliche Sequenzmotive wie die Vertreter der Subgruppe III f besitzen, sowie weniger homologe bHLH-Transkriptionsfaktoren (*AtbHLH046* (Va) und *AtbHLH125* (Ib)) zeigten ebenfalls keine Interaktionen mit den getesteten MYB-Transkriptionsfaktoren.

3.1.4 *in vitro* Bestätigung der Interaktionsdaten von *AtMYB75* und *AtMYB90*

Für acht ausgewählte Interaktionen wurden GST-vermittelte *in vitro* Pull-Down Experimente (Melcher and Johnston, 1995) durchgeführt. Dazu wurden die Proteine *AtMYB75* und *AtMYB90* ausgewählt. Diese Proteine haben bei den Hefe 2-Hybrid-Experimenten starke Interaktionen mit allen bHLH-Faktoren der Gruppe III f gezeigt. Die MYB-Transkriptionsfaktoren *AtMYB75* und *AtMYB90* wurden durch LR-Rekombination in den Gateway-Vektor pGex-attR rekombiniert und als GST-Fusionen in Bakterien exprimiert. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Glutathion-Agarose Matrix aufgereinigt und mit einer 10 mM reduzierten Glutathion-Lösung eluiert. Die Aufreinigung wurde mittels einer Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft.

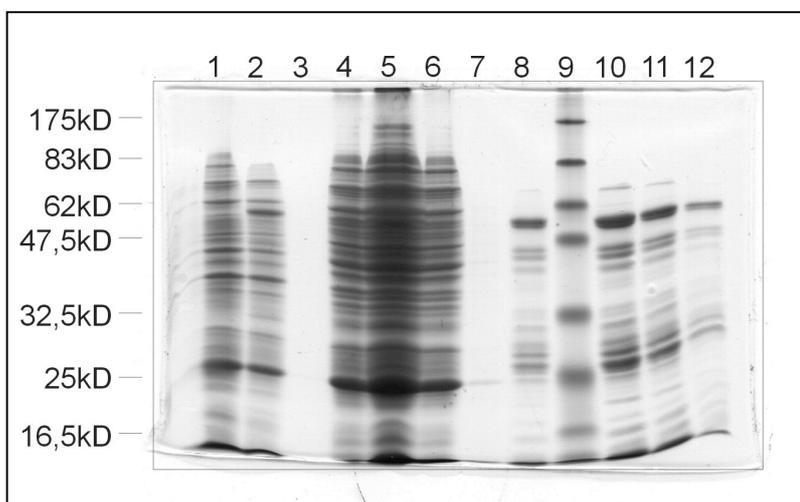


Bild 3.7 Aufreinigungsschritte der GST-Fusion von *AtMYB75* (55,8kD).

Die unterschiedlichen Fraktionen wurden mit einem SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Spur 1: nicht induzierter *E.coli* Gesamtaufschluss; Spur 2: *E.coli* Gesamtaufschluss nach Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 3: kein Auftrag; Spur 4: Überstand nach dem nativen Aufschluss; Spur 5: Überstand nach der Bindung des Proteins an Glutathion-Agarose; Spur 6: erste Waschfraktion; Spur 7: vierte Waschfraktion; Spur 8: Agarosematrix nach der Elution; Spur 9: Protein-Größenstandard; Spur 10: erster Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion; Spur 11: zweiter Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion; Spur 12: dritter Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion.

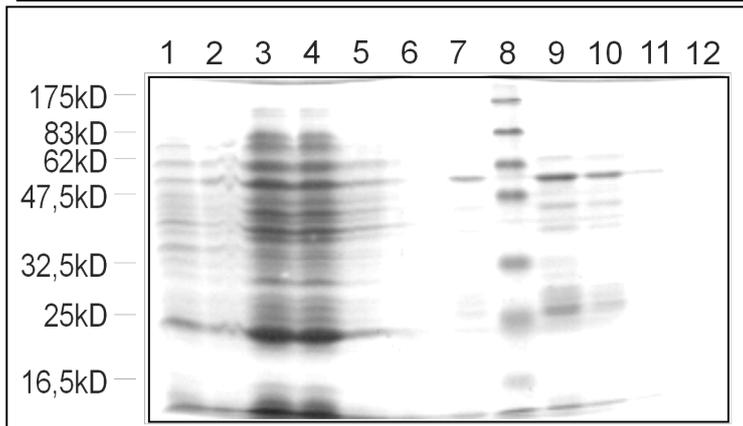


Bild 3.8 Aufreinigungsschritte der GST-Fusion von AtMYB90 (55,5kD)

Die unterschiedlichen Fraktionen wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Spur 1: nicht induzierter E.coli Gesamtaufschluss; Spur 2: E.coli Gesamtaufschluss nach Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 3: Überstand nach dem nativen Aufschluss; Spur 4: Überstand nach der Bindung des Proteins an Glutathion-Agarose; Spur 5: erste Waschfraktion; Spur 6: zweite Waschfraktion; Spur 7: Agarosematrix nach der Elution; Spur 8: Protein-Größenstandard; Spur 9: erster Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion; Spur 10: zweiter Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion; Spur 11: dritter Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion; Spur 12: vierter Elutionsschritt mit 10 mM Glutathion.

Nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten sind die Banden der erwarteten Größen bei ca. 55kD zu erkennen. Darüber hinaus werden bei beiden Aufreinigungen kleinere Proteine erhalten. Die GST-Expression von dem Plasmid pGex-4T, die für die Kontrollansätze erfolgte, ist hier nicht gezeigt.

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Proteine wurden die Vektoren pDEST14-*AtbHLH001*, pDEST14-*AtbHLH002*, pDEST14-*AtbHLH012* und pDEST14-*AtbHLH042* verwendet. Die *in vitro* Transkription und Translation von *AtbHLH013* erfolgte ausgehen von dem Vektor pET32-*AtbHLH013*. Die Größe der L-^[35]S-Methionin markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE, Trocknen der Gele und Nachweis der Radioaktivität durch Auflegen eines Films und Exposition über 10h bestimmt.

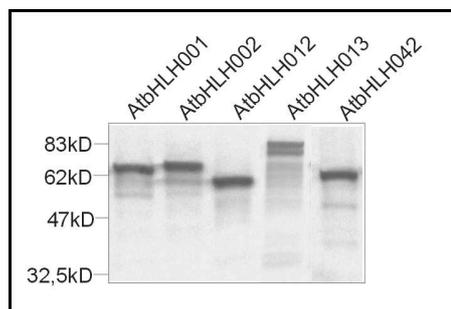


Bild 3.9 In vitro Transkription und Translation der bHLH-Faktoren

In vitro Transkription und Translation der radioaktiv markierten Proteine *AtbHLH001*, *AtbHLH002*, *AtbHLH012*, *AtbHLH042* und *AtbHLH013* (Spalte 1-5). Die Proteine wurden in einem 20µl-Ansatz in Retikulozytenlysat unter Zugabe von T7-Polymerase und S³⁵-Methionin synthetisiert. 1µl des Ansatzes wurde auf ein SDS-PAGE aufgetragen und das Gel getrocknet. Die Exposition des Films erfolgte über Nacht.

Die radioaktiv markierten bHLH-Faktoren haben alle die erwartete Größe:

AtbHLH001: 70,5kD, *AtbHLH002*: 66,6kD, *AtbHLH012*: 59,5kD, *AtbHLH013*: 84,5kD und *AtbHLH042*: 59kD (Bild 3.9).

Für die *in vitro* Bindungsstudien wurden die aufgereinigten Proteine an Glutathion-Agarose gebunden und mit den entsprechenden L-^[35]S-Methionin radioaktiv markierten putativen Interaktoren inkubiert. Als Kontrolle wurde die mit Hilfe des Vektors pGEX-4T in Bakterien exprimierte und aufgereinigte Glutathion-S-Transferase an GST gebunden und mit den gleichen radioaktiv markierten Proteinen inkubiert. Nach der Elution von der Glutathion – Agarose wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Exposition des Films auf dem getrockneten Gel erfolgte über 10h.

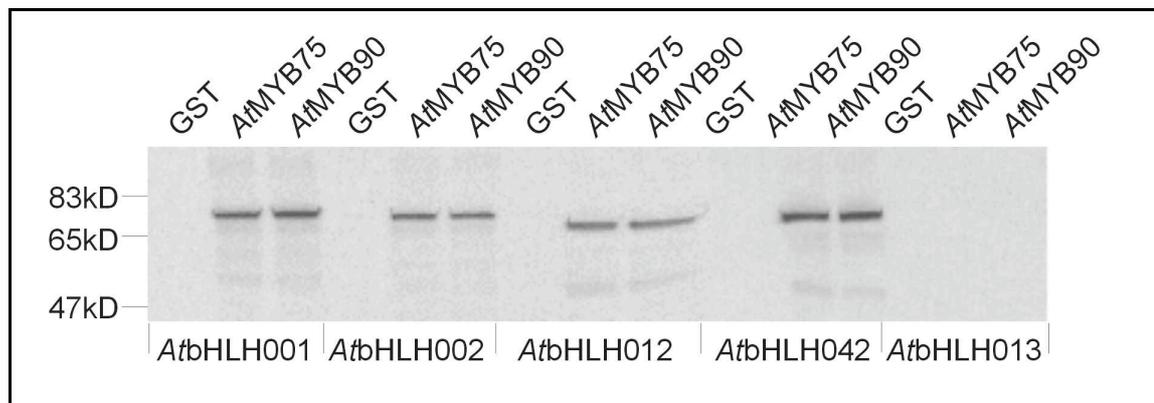


Bild 3.10 In vitro Bindungsversuche

Die GST-fusionierten MYB-Transkriptionsfaktoren wurden an Glutathion-Agarose gebunden und mit L-^[35]S-Methionin markierten bHLH-Faktoren inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde die Matrix in SDS-Probenpuffer aufgenommen und der Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Film wurde über Nacht exponiert.

Spur 1: GST-Kontrolle mit ^[35]S *AtbHLH001*; Spur 2: GST-*AtMYB75* mit ^[35]S *AtbHLH001*; Spur 3: GST-*AtMYB90* mit ^[35]S *AtbHLH001*; Spur 4: GST-Kontrolle mit ^[35]S *AtbHLH002*; Spur 5: GST-*AtMYB75* mit ^[35]S *AtbHLH002*; Spur 6: GST-*AtMYB90* mit ^[35]S *AtbHLH002*; Spur 7: GST-Kontrolle mit ^[35]S *AtbHLH012*; Spur 8: GST-*AtMYB75* mit ^[35]S *AtbHLH012*; Spur 9: GST-*AtMYB90* mit ^[35]S *AtbHLH012*; Spur 10: GST-Kontrolle mit ^[35]S *AtbHLH042*; Spur 11: GST-*AtMYB75* mit ^[35]S *AtbHLH042*; Spur 12: GST-*AtMYB90* mit ^[35]S *AtbHLH042*; Spur 13: GST-Kontrolle mit ^[35]S *AtbHLH013*; Spur 14: GST-*AtMYB75* mit ^[35]S *AtbHLH013*; Spur 15: GST-*AtMYB90* mit ^[35]S *AtbHLH013*

Der GST-vermittelte Pull-Down zeigt eine spezifische Bindung der bHLH-Proteine *AtbHLH001*, *AtbHLH002*, *AtbHLH012* und *AtbHLH042* an die GST-fusionierten MYB-Transkriptionsfaktoren *AtMYB75* und *AtMYB90*. Nur bei diesen beiden Proben wurde radioaktiv markiertes Produkt nachgewiesen. In der GST-Kontrolle wurde keine Radioaktivität detektiert. Eine Interaktion mit *AtbHLH013* ist nicht vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass auch *AtbHLH001* mit *AtMYB75* und *AtMYB90* interagiert.

3.1.5 Deletionsmutagenese von *AtMYB75*

Sequenzvergleiche von allen interagierenden MYB-Transkriptionsfaktoren, von denen in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass sie mit bHLH-Faktoren interagieren, lassen keine durchgängigen Gemeinsamkeiten außerhalb der MYB-Domäne erkennen. Von C1 aus Mais ist bekannt, dass ein N-terminaler Bereich, der die MYB-Domäne enthält, für eine Interaktion mit den bHLH-Faktor R ausreicht. Unklar ist, ob dies auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten Protein der Fall ist oder ob und inwiefern Sequenzen, die außerhalb der MYB-Domäne liegen, einen Einfluss auf die Bindung an bHLH-Faktoren haben. Es wurden vier verschieden lange C-terminale Deletionen von *AtMYB75* hergestellt. Die Fragmente beinhalten den N-Terminus bis Aminosäure 100 (V100Stop) (pCACT-*AtMYB75*_[1-100], pCD2-*AtMYB75*_[1-100]), den N-Terminus bis Aminosäure 114 (pCACT-*AtMYB75*_[1-114], pCD2-*AtMYB75*_[1-114]) und den N-Terminus bis Aminosäure 178 (pCACT-*AtMYB75*_[1-178], pCD2-*AtMYB75*_[1-178]). Ein weiteres Deletionskonstrukt, zum Entfernen der Aktivierungsdomäne, enthält die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 1-190 von *AtMYB75* fusioniert an die Bindedomäne von Gal4 (pCD2-*AtMYB75*_[1-190],). Die Vektoren pCD2-*AtMYB75*_[1-100], pCD2-*AtMYB75*_[1-114], pCD2-*AtMYB75*_[1-178] und pCD2-*AtMYB75*_[1-190], sowie die entsprechenden AD-Fusionsvektoren pCACT-*AtMYB75*_[1-100], pCACT-*AtMYB75*_[1-114] und pCACT-*AtMYB75*_[1-178] wurden in Hefe transformiert und die Interaktion der verkürzten Proteine mit den bHLH-Proteinen im Hefe 2-Hybrid-System untersucht.

Die Proteinfragmente *AtMYB75*_[1-114] und *AtMYB75*_[1-178] können sowohl als Aktivierungsdomänenfusion als auch fusioniert an die Bindungsdomäne mit den Proteinen *AtbHLH002*, *AtbHLH012* und *AtbHLH042* interagieren. Die verkürzten *AtMYB75*-Proteine sind im Gegensatz zum Vollängen *AtMYB75*-Protein als BD-Fusion nicht autoaktivierend. Auch das Protein BD-*AtMYB*_[1-190] ist nicht autoaktivierend und interagiert mit den genannten bHLH-Faktoren. Die Proteine *AtMYB75*_[1-114], *AtMYB75*_[1-178] und *AtMYB*_[1-190] können fusioniert an die Bindedomäne auch mit *bHLH001*, welches an die Aktivierungsdomäne fusioniert ist, interagieren.

Die Vektoren pCD2-*AtMYB75*_[1-100] und pCACT-*AtMYB75*_[1-100] zeigen keinen Effekt, wenn sie mit den entsprechenden Vektoren, die für die AD-bzw.BD-Fusionen der bHLH-Faktoren kodieren, ko-transformiert werden.

Die Ergebnisse der Deletionsanalyse zeigen, dass der N-terminale Bereich bis AS 114 von *AtMYB75* für eine Interaktion mit den getesteten bHLH-Faktoren ausreicht. Eine Deletion innerhalb der letzten AS der R3-Wiederholung zerstört die Interaktion dagegen (Tabelle 3.4).

	bHLH001	bHLH002	bHLH012	bHLH042	pACT
BD-AtMYB75_□100	-	-	-	-	-
BD-AtMYB75_□114	++	++	++	++	-
BD-AtMYB75_□178	++	++	++	++	-
BD-AtMYB75_□190	++	++	++	++	-

Tabelle 3.4 Deletionsmutanten von AtMYB75 im Hefe 2-Hybrid-System

Dargestellt sind die Interaktionen der BD-fusionierten MYB-Transkriptionsfaktoren mit den AD-fusionierten bHLH-Faktoren. Die Deletionen ab Aminosäure 114 können sowohl als AD- als auch als BD-Fusionen mit den bHLH-Faktoren interagieren.

Die Aktivierungsdomäne kann durch Deletion der letzten 58 Aminosäuren zerstört werden. Das Konstrukt mit der Deletion nach Aminosäure 190 kann im Gegensatz zu dem autoaktivierenden unveränderten Bait BD-AtMYB75 zum Screenen von Interaktionen im Hefe 2-Hybrid-System verwendet werden.

Dieses Deletionskonstrukt wurde außerdem verwendet, um exemplarisch die Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren zu testen.

3.1.6 Untersuchung der Interaktionsdomäne von AtMYB75 durch Mutagenese

Zur genaueren Analyse der Interaktionsdomäne von AtMYB75 sollte dieser Bereich mutagenisiert und die entsprechenden Proteine auf Interaktion mit den bHLH-Faktoren der Gruppe III getestet werden. In einem ungerichteten Mutagenese-Ansatz sollten temperatursensitive Mutanten selektiert werden. Diese Mutanten wachsen bei Raumtemperatur, während die Interaktion mit den bHLH-Faktoren bei 30°C gestört ist, was dazu führt, dass das Wachstum der Hefen verringert wird oder ganz ausbleibt. Parallel dazu wurde eine gerichtete Mutagenese von AtMYB75 durchgeführt, bei der gezielt vier Aminosäuren in einem Bereich, der bei allen interagierenden MYB-Proteinen stark konserviert ist, ausgetauscht wurden. Das Ziel in beiden Versuchsansätzen war, Mutanten zu finden, die hinsichtlich der Interaktion mit den bHLH-Faktoren geschwächt sind, aber möglichst wenig von der Gesamtstruktur der MYB-Proteine abweichen. Mit Hilfe dieser Mutanten sollten Informationen über den Interaktionsbereich, sowie über wichtige Aminosäuren, die an den Interaktionen beteiligt sind erhalten werden.

Bei der ungerichteten Mutagenese von AtMYB75, mit dem Ziel temperatursensitive Interaktionsmutanten zu erhalten, wurde AtMYB75 in einem Manganhaltigen PCR-Ansatz amplifiziert. Bei dieser Form der PCR ist die Wahrscheinlichkeit eines Einbaus von falschen Nukleotiden durch die Taq-Polymerase erhöht, was zu zufälligen Punktmutationen im Transkript führt. Die PCR wurde auf dem Vektor pACT-AtMYB75 mit den Oligonukleotiden AO015 und AO018 (siehe Anhang) durchgeführt, die wiederum homologe Sequenzen zu dem Plasmid pACT2-1 enthalten. Die Produkte konnten so durch Rekombination in Hefe in den linearisierten Vektor pACT2-1 integriert werden. Die transformierten Hefen wurden mit Hefen, die BD-Fusionen von

AtbHLH012 und *AtbHLH042* enthielten, fusioniert und auf Selektionsmedium ohne Histidin ausplattiert. Diese primäre Selektion auf Interaktion ist notwendig, um den Anteil von Klonen mit vorzeitigen Sequenzabbrüchen im Verhältnis zu Vollängenproteinen mit möglichst wenigen Aminosäure-Austauschen zu verringern. Von diesen Kolonien wurden pro Ansatz (PCR mit 0,05 mM MnCl_2 , 0,1 mM MnCl_2 , 0,2 mM MnCl_2 und 0,5 mM MnCl_2 und Test auf Interaktion mit *AtbHLH012* und *AtbHLH042*) 96 Kolonien unter verschiedenen Bedingungen auf Interaktion getestet. Dazu wurden Replika der Zygoten auf Selektionsplatten mit 1 mM 3-AT bei unterschiedlichen Temperaturen (22°C, 30°C und 37°C) inkubiert. Die Kolonien auf den verschiedenen Platten wurden nach 4 Tagen verglichen. Je höher der Mangangehalt in der PCR war, umso gravierender war der Effekt der Mutagenese. Ein Mangangehalt von 0,05 mM in der PCR hatte kaum einen Effekt, die transformierten Hefen konnten bei allen Temperaturen uneingeschränkt wachsen. Konzentrationen über 0,1 mM MnCl_2 in der PCR führten zu einem Ausbleiben der meisten Interaktionen, sowohl bei 22°C als auch bei 30°C. Wurden Hefen verwendet, die mit dem PCR-Ansatz mit 0,1 mM MnCl_2 transformiert wurden, so konnten unter relativ unstringenten Bedingungen (1 mM 3-AT und Inkubation bei 22°C) noch viele Kolonien wachsen, während die Interaktionen bei 30°C zum größten Teil ausblieben.

Von 96 Kolonien des Ansatzes 0,1 mM MnCl_2 im PCR-Ansatz und Interaktion mit *AtbHLH012* sind insgesamt 50 Kolonien auf Selektionsmedium mit 1 mM 3-AT gewachsen. 37 Kolonien davon wachsen bei der höheren Temperatur schlechter. Die anderen 13 Kolonien interagieren so gut wie die nicht mutierten AD-MYB75-Fusionen. Von den 96 Kolonien aus dem Ansatz 0,1 mM MnCl_2 im PCR-Ansatz und Interaktion mit *AtbHLH042* sind 28 Kolonien auf 1 mM 3-AT-haltigem Selektionsmedium gewachsen. Diese Kolonien wachsen auf Selektionsmedium bei höheren Temperaturen bis auf fünf Ausnahmen nicht. Die 57 Kolonien wurden für eine Kolonie-PCR verwendet und die Produkte wurden sequenziert. Gleichzeitig wurden die Kolonien nochmals überstempelt und das Wachstum bei Raumtemperatur und 30°C auf LWH mit 1 mM 3-AT dokumentiert.

Bis auf zwei Einzelmutationen, die sich in der R3-Wiederholung befinden, haben alle anderen Sequenzen 2-7 AS-Austausche, was bei der Auswertung der Sequenzen berücksichtigt wurde. Die Deletionsanalysen in 3.1.5 haben gezeigt, dass die ersten 114 Aminosäuren von *AfMYB75* für eine Interaktion ausreichen. Aus den Screens in 3.1.1, konnten wiederum Kandidaten isoliert werden, die nur eine MYB-Wiederholung besitzen, die der R3-Wiederholung am ähnlichsten ist. Basierend auf diesen Informationen, wurden als erste Priorität Mutationen im Bereich der R3-Domäne betrachtet. Dies führte zu einer Einteilung der Mutanten in solche, die mindestens einen Austausch innerhalb der R3-Wiederholung haben (I Tabelle 3.5), solche, die keinen Austausch in der R3-Wiederholung aber mindestens einen Austausch im

Bereich der R2-Wiederholung haben (II Tabelle 3.5) und solche, die nur Austausche im C-terminalen Bereich des Proteins haben (III Tabelle 3.5). Dazu kommen noch die Mutanten, bei denen die Mutagenese zu einem Stop-Kodon innerhalb der R2- bzw. zu Beginn der R3-Wiederholung geführt hat (IV Tabelle 3.5).

Eine Übersicht über die ausgewerteten Sequenzen ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

	Anzahl Kolonien	Wachstum mit bHLH012	Wachstum mit bHLH042	kein Wachstum mit bHLH012	kein Wachstum mit bHLH042
I	18	9	2	1	6
II	10	5	1	1	3
III	7	5	-	-	2
IV	15	2	-	3	10
V	7		1	3	3

Tabelle 3.5 Auswertung der Sequenzen aus der Mutagenese

I: mind. 1 Mutation in der R3-Wiederholung

II: kein Austausch in der R3- aber mindestens 1 Austausch in der R2- Wiederholung

III: nur Austausche im C-Terminus

IV: Sequenzabbrüche in der R2 oder zu Beginn der R3-Wiederholung

V: nur Deletion

In den 42 Sequenzen, die keinen Sequenzabbruch im Bereich vor der R3-Domäne haben, befinden sich insgesamt 121 Punktmutationen. Dies sind im Durchschnitt 2,9 Mutationen pro Sequenz. Dazu kommen noch die Mutationen, die zu einem Stop-Codon und so zu Deletionen des Proteins führen. Solche Deletionen treten in 12 Sequenzen auf. Jeweils 3 Stop-Codons befinden sich bei AS 101 und 104. Diese Proteine können nicht mehr mit den bHLH-Proteinen interagieren. Weitere Stop-Codons befinden sich bei AS110, AS114, zwei bei AS122, eins bei AS160 und ein weiteres bei AS184. Bei diesen Proteinen wird die Interaktion mit den bHLH-Faktoren nicht beeinträchtigt.

Die einzigen Einzelaustausche befinden sich an Position L77H und L87I in der R3-Domäne. Diese Punktmutanten zeigen Temperatursensitivität, allerdings hat die Mutation an Position 87 einen geringeren Effekt als die Mutation an Position 77. Außerdem treten Mutationen an den Positionen S68T/P; L75H/F, L77H, R79G/W, 2x R84W und 3x H112L mehrfach auf (Bild 3.11). Im Bereich zwischen Aminosäuren 68 und 87 treten mit 16 Austauschen die Mutationen gehäuft auf. Hier sind 11 von 20 Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt.

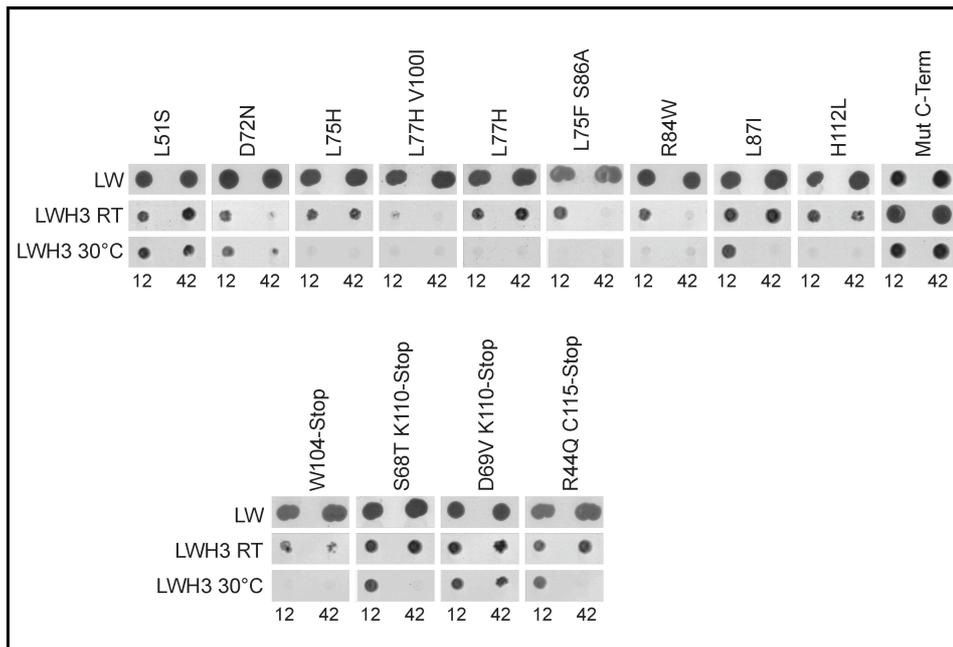


Bild 3.12 Darstellung einiger Kolonien aus der ungerichteten Mutagenese

Die entsprechenden Mutanten wurden auf Interaktion mit den bHLH-Faktoren *AtbHLH012* und *AtbHLH042* in Hefe getestet. Die Hefen wurden auf Selektivmedium ohne Leucin und Tryptophan (LW, erste Reihe) und zum Test auf Interaktion auf Selektivmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin mit 3 mM 3-AT (LWH3) getropft und bei Raumtemperatur (22°C) bzw. bei 30°C inkubiert (letzte 2 Reihen).

Die gezeigten Mutationen im Bereich der R2-Domäne (L51S) und im C-Terminalen Teil des *AtMYB75*-Proteins führen bei diesen Klonen zu keiner Störung der Interaktion. Alle Mutationen im Bereich der R3-Domäne verringern die Interaktionsstärke mit *AtbHLH012* und *AtbHLH042*. Bei einigen Klonen ist primär die Interaktion mit *AtbHLH042* geschwächt, so zum Beispiel beim Austausch D72N. Ein Einzelaustausch in dieser Region hat kein vollständiges Ausbleiben der Interaktion zur Folge. Doppelaustausche in diesem Bereich schwächen die Interaktion stärker, so dass in einigen Fällen keine Interaktion mehr gezeigt werden kann (z.B. L77H+V100I).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Screens und der Deletionsanalysen, konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Bereich der R3-Domäne die Interaktion von *AtMYB75* mit den Proteinen *AtbHLH012* und *AtbHLH042* entscheidend beeinflussen. Elf von 20 Aminosäure-Positionen zwischen der Aminosäure 68 und 87 wurden bei der ungerichteten Mutagenese ausgetauscht. Diese Mutationen haben eine Schwächung der Interaktion zur Folge. Zwei Austausche in diesem Bereich sind gravierender als Einzelaustausche. Die einzigen Klone, die nur eine Mutation haben, haben diesen Austausch im Bereich der R3-Domäne (L77H und L87I). Deletionen, die bei der ungerichteten Mutagenese erzeugt wurden, zeigen, dass trotz einer Deletion bei K110 die Interaktion von *AtMYB75* mit den bHLH-Faktoren möglich ist. Die

Mit den Oligonukleotiden IZ0111 und IZ0112-IZ0115 (siehe Anhang), die verglichen mit *AtMYB75* 1-3 Austausche in der Nukleotidsequenz haben, wurde der gesamte Vektor pENTR-*AtMYB75* in einer PCR amplifiziert. Dabei wurden bei allen fünf Ansätzen jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. Die Oligonukleotide enthalten eine AvrII-Schnittstelle, die die Religation der Vektoren ermöglicht. Das Einfügen der AvrII-Schnittstelle führte lediglich zu einer stillen Mutation, es wurden keine zusätzlichen Nukleotide eingefügt und der offene Leserahmen blieb unverändert. Die Entry-Vektoren wurden anschließend in pCACTattR rekombiniert und die Interaktion der mutagenisierten Transkriptionsfaktoren mit den BD-fusionierten Proteinen *AfbHLH002*, *AfbHLH012* und *AfbHLH042* in Hefe untersucht.

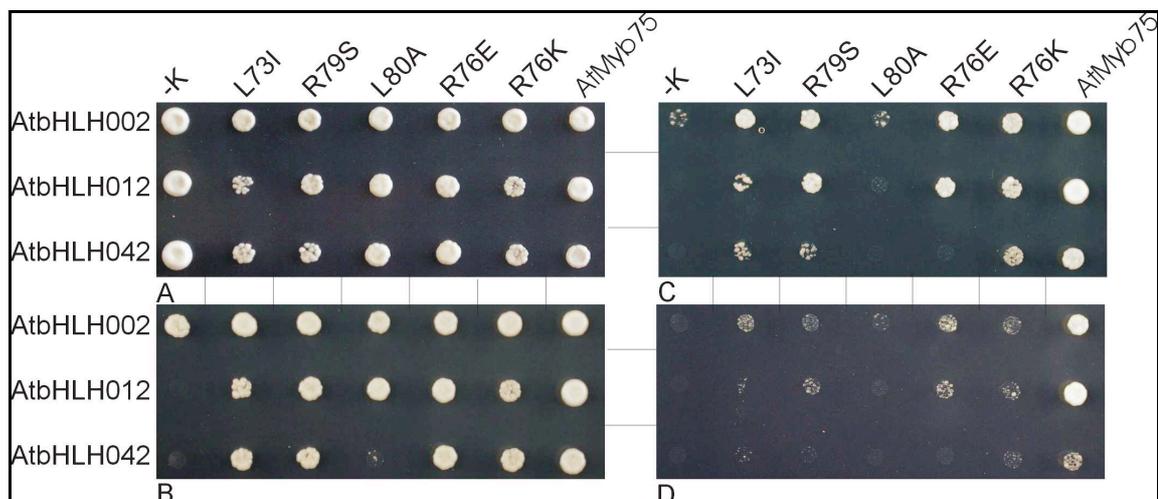


Bild 3.14 Auswirkungen der Mutagenese von *AtMYB75* auf die Interaktionen mit *AfbHLH002*, *AfbHLH012* und *AfbHLH042*.

A: Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin; **B:** Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 5 mM 3-AT; **C:** Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 20 mM 3-AT; **D:** Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 40 mM 3-AT. Die Hefen wurden mit entsprechenden Vektoren transformiert, kombinatorisch miteinander gematet und auf Selektionsmedium überstempelt. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Austausch von nur einer AS an diesen Positionen zur Schwächung der Interaktion führt.

Den stärksten Effekt auf die Interaktion hat der Austausch an Position 80. Diese Aminosäure wurde auch bei der ungerichteten Mutagenese ausgetauscht, dort allerdings gegen das zur Originalsequenz ähnliche Valin. Kein Einzelaustausch hat das Ausbleiben der Interaktion zur Folge.

3.1.7 Die Interaktion basiert auf einem Motiv, welches in allen interagierenden Proteinen vorhanden ist

Bisher wurden zum größten Teil MYB-Proteine auf Interaktion mit den bHLH-Faktoren getestet, die auch im Stammbaum zusammen gruppieren. Exemplarisch sollten nun

vier weitere Proteine getestet werden, die innerhalb der MYB-Domäne etwas stärker von den bisher verwendeten MYB-Proteinen abweichen. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen von *AtMYB59*, *AtMYB73*, *AtMYB88* und *AtMYB-3R4* in pCACTattR rekombiniert und die Interaktion mit BD-bHLH012 in Hefe getestet. Die Entry-Vektoren wurden von der AG Weißhaar zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden von den Proteinen *AtMYB4* und *AtMYB6* Deletionskonstrukte hergestellt, die nur den N-terminalen Bereich einschließlich der MYB-Domäne beinhalten. Diese Proteine sind im Bereich der MYB-Domäne den getesteten MYB-Transkriptionsfaktoren relativ ähnlich, können aber als Vollängen-Proteine nicht mit den getesteten bHLH-Faktoren interagieren. Durch das Entfernen des C-Terminus, sollte die Beeinflussung einer möglichen Interaktion durch diesen Bereich ausgeschlossen werden. Die entsprechenden Vektoren wurden durch Amplifikation der Teilsequenz mit den Oligonukleotiden IZ163 und IZ162 bzw. IZ164 und IZ0028, die über pDONR201 in pCACTattR rekombiniert wurden, hergestellt. Die dabei entstandenen Vektoren pCACT-*AtMYB4C*Δ118 und pCACT-*AtMYB6C*Δ118 wurden ebenfalls in Hefe transformiert und die verkürzten Proteine auf Interaktion mit BD-bHLH012 getestet.

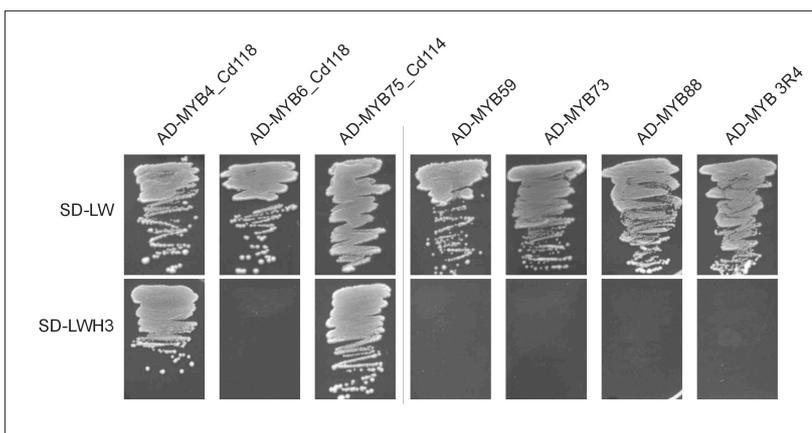


Bild 3.15 Deletionen von *AtMYB4* und *AtMYB6* und Analyse von weniger ähnlichen MYB-Proteinen

Die Proteine wurden als AD-Fusionen auf Interaktion mit BD-bHLH012 getestet. Dargestellt ist das Wachstum auf SD-LW-Medium und auf SD-LWH3-Selektionsmedium.

Das verkürzte MYB4-Protein kann mit *AtbHLH012* interagieren, alle anderen MYB-Faktoren zeigen keine Interaktion mit *AtbHLH012*.

Ein Sequenzvergleich aller bisher verwendeten Interaktoren kombiniert mit den Ergebnissen aus den Mutagenesen, ermöglicht die Definition des Motivs $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$, welches in allen interagierenden Proteinen vorhanden ist. Bei den Aminosäuren des Motivs handelt es sich um bestimmte Aminosäuren, die im Gegensatz zu den nicht interagierenden Proteinen bei diesen Faktoren konserviert sind. Abweichungen von diesem Motiv schwächen oder unterbinden die Interaktionen. Darüber hinaus haben auch die benachbarten Aminosäuren einen Einfluss auf die

identifiziert wurden sind TRIPTYCHON (TRY) und At4g01060, ein Protein mit Ähnlichkeit zu CPC (At2g46410). Dieses wurde CPC-L2 genannt. Bei dem R2R3-MYB-Protein handelt es sich um das Protein *AtMYB82*. Dieses Protein befindet sich in dem Stammbaum, der 2001 von Stracke et al. veröffentlicht wurde in einem anderen Zweig (zwischen Subgruppe 13 und Subgruppe 16). Die MYB-Domäne von *AtMYB82* ist der MYB-Domäne von *AtMYB75* sehr ähnlich, der Rest des Proteins zeigt keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu den anderen interagierenden Proteinen. Es sollte getestet werden, ob dieses MYB-Protein ebenfalls mit den bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf interagiert, wie man ausgehend von der Hypothese vorhersagen würde. *AtMYB82* wurde dazu in den Gateway-Vektor pCACTattR rekombiniert und die Interaktion von *AtMYB82* mit *AfbHLH002*, *AfbHLH012* und *AfbHLH042* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass auch *AtMYB82* mit den bHLH-Faktoren der Gruppe IIIf interagieren kann.

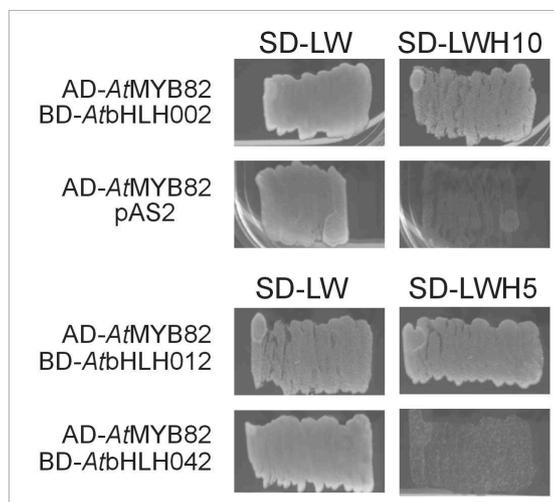


Bild 3.17 Interaktionen von *AtMYB82* mit *AfbHLH002*, *AfbHLH012*, *AfbHLH042*

Die Hefen wurden mit AD-*AtMYB82* und den entsprechenden Bait-Vektoren kotransformiert und zur Selektion auf SD-LWH5 bzw. SD-LWH10 ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Wird davon ausgegangen, dass der Austausch von Arginin gegen Lysin an der Position 76 wie bei *AtMYB4* und *AtMYBL2* eine Interaktion nicht verhindert, dann wären außerdem noch die zu *AtMYB4* homologen Proteine *AtMYB3*, *AtMYB7* und *AtMYB32* potentielle Interaktoren. Anhand der hohen Homologie zu *AtMYB* wäre es möglich, dass in diesen Fällen auch nur die entsprechenden Proteinfragmente interagieren können.

Die Ergebnisse aus den Interaktionsanalysen aller untersuchten MYB-Proteine wurden in Tabelle 3.6 zusammengefasst und die Interaktion mit BD-*AfbHLH012*, wenn vorhanden, durch ein + gekennzeichnet. BD-*AfbHLH012* wurde ausgewählt, da es nicht autoaktivierend ist und außerdem in der Interaktionsmatrix mit allen getesteten MYB-Proteinen interagiert hat.

Bezeichnung AD-Fusion	Interaktion mit BD-AtbHLH012	Bezeichnung AD-Fusion	Interaktion mit BD-AtbHLH012
AtMYB0	+	AtMYB75_□114	+
AtMYB4	-	AtMYB82	+
AtMYB4_□118	+	AtMYB88	-
AtMYB5	+	AtMYB90	+
AtMYB6	-	AtMYB111	-
AtMYB6_□118	-	AtMYB118	-
AtMYB11	-	AtMYB113	+
AtMYB12	-	AtMYB123	+
AtMYB23	+	CPC	+
AtMYB55	-	CPCL1	+
AtMYB59	-	AtMYBL2	+
AtMYB66	+	TRYL1	+
AtMYB73	-	AtMYB3R4	-
AtMYB75	+		

Tabelle 3.6 Zusammenstellung aller getesteten MYB-Proteine

Die MYB-Proteine wurden als AD-Fusionen im Hefe 2-Hybrid-System auf Interaktion mit bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf getestet. BD-AtbHLH012 hat als Bait keinen Hintergrund und interagiert mit den MYB-Proteinen in ähnlicher Weise wie AtbHLH002. Es wurde deshalb exemplarisch für die Subgruppe hier als Bait aufgeführt. +: Interaktion vorhanden, -: keine Interaktion. Die Interaktion wurde durch Selektion auf SD-LWH-Medium mit 3 mM 3-AT bestimmt.

Die Analyse der Sequenzen der mit den bHLH-Faktoren interagierenden MYB-Proteine erlaubte die Definition eines Motivs, das in allen getesteten Interaktoren vorhanden ist. Anhand dieses Motivs konnte ein weiterer R2R3-MYB-Faktor identifiziert werden, der mit den getesteten bHLH-Faktoren interagieren kann. Der Versuch hat gezeigt, dass mit Hilfe detaillierter Analysen von Protein-Protein-Interaktionen Vorhersagen bezüglich spezifischer funktioneller Zusammenhänge gemacht werden können, die allein durch Sequenzvergleiche von Vollängenproteinen nicht gefunden wurden. Die Screens und die weiteren Analysen haben gezeigt, dass nicht nur R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren an solchen Interaktionsnetzwerken beteiligt sind, sondern auch MYB-Proteine, die nur eine Sequenzwiederholung in der MYB-Domäne besitzen und bisher immer getrennt betrachtet wurden. Detaillierte Datenbankrecherchen haben ergeben, dass bis auf zwei weitere MYB-Transkriptionsfaktoren, die nur eine Sequenzwiederholung besitzen, alle MYB-Proteine mit diesem Motiv (Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R) in dieser Arbeit getestet und deren Interaktion mit den bHLH-Faktoren der Gruppe IIIf bestätigt wurden.

3.1.8 Expressionsanalyse von ausgewählten MYB und bHLH-Faktoren, die in einem funktionellen Zusammenhang stehen

Die MYB-Transkriptionsfaktoren AtMYB75, AtMYB90 und AtMYB113 haben große Sequenzähnlichkeit im N-Terminalen Bereich und haben im Hefe 2-Hybrid-System die gleichen Interaktionspartner. Mit Hilfe einer reversen Transkription sollten die Expressionsmuster dieser MYB-Proteine und der interagierenden bHLH-Faktoren untersucht werden.

Mit den genspezifischen Oligonukleotiden IZ0142-IZ0155, von *AtMYB75*, *AtMYB90*, *AtMYB113*, *AtbHLH001*, *AtbHLH002*, *AtbHLH012* und *AtbHLH042* wurde eine reverse Transkription auf Wurzel, Sprossachse, Rosettenblätter, Sprossblätter, Blüten und Schoten von Pflanzen, die bei 14 h Licht (kein UV- oder Trockenstress) in der Klimakammer aufgezogen wurden, durchgeführt.

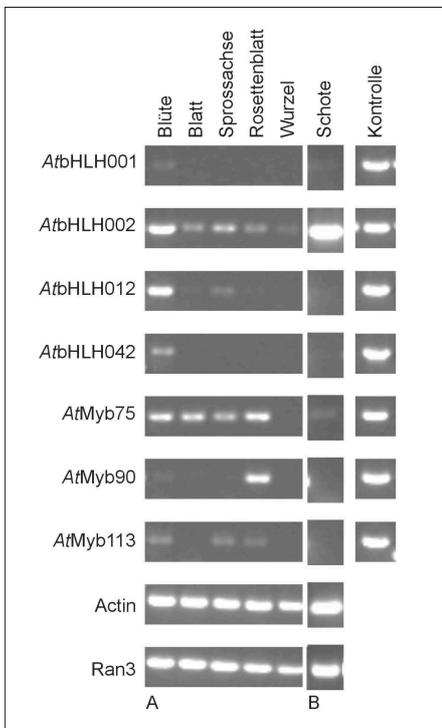


Bild 3.18 Expressionsanalyse ausgewählter Interaktoren

cDNAs aus unterschiedlichen Organen wurden durch reverse Transkription hergestellt, und als Matrize für eine PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden benutzt. Es wurden jeweils 8 µl eines 25 µl-PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle wurde der entsprechende Entry-Vektor verwendet (2 ng/PCR-Ansatz). Kontaminationen durch genomische DNA wurden durch PCR auf der RNA, die der cDNA-Synthese diente ausgeschlossen.

Während die Expression von *AtbHLH002* in allen Geweben (auch in Wurzel und Schote) nachzuweisen ist, konnte die mRNA von *AtbHLH001* nur in Blättern und schwach in Blüte und Sprossachse nachgewiesen werden. *AtbHLH012* ist in der Blüte stark exprimiert, in geringeren Mengen auch in Rosettenblättern und Sprossachse. *AtbHLH042* ist nur in der Blüte exprimiert. *AtMYB75* ist in fast allen Geweben, *AtMYB90* dagegen nur in Rosettenblättern und *AtMYB113* relativ schwach in Blüte, Sprossachse und Rosettenblättern exprimiert.

Die Transkriptionsfaktoren beider Familien sind in den untersuchten Organen unterschiedlich exprimiert.

4 Diskussion

Die Verfügbarkeit des vollständig sequenzierten Genoms von *Arabidopsis thaliana* erlaubt es, die Transkriptionsfaktoren in einer höheren Pflanze umfassend zu beschreiben. Zwei der umfangreichsten Transkriptionsfaktor-Familien in *Arabidopsis thaliana* sind die MYB- und die bHLH Proteine. Nur von einer geringen Anzahl dieser Transkriptionsfaktoren ist eine Funktion beschrieben. Die bioinformatische Identifizierung dieser beiden Familien ist weitgehend abgeschlossen (Heim et al., 2003; Stracke et al., 2001). Aufbauend auf diesen Daten stellt sich die Frage, ob mit der bioinformatischen Klassifizierung, die auf den Sequenzen der DNA-Bindungsdomänen basiert, weitere funktionelle oder strukturelle Gemeinsamkeiten verbunden sind. Transkriptionsfaktoren werden vielfach durch kombinatorische Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren bzw. Kofaktoren reguliert. Die systematische Untersuchung von Protein-Proteininteraktionen dieser Transkriptionsfaktoren ist daher ein erster wichtiger Schritt, um Hinweise auf weitere funktionelle Zusammenhänge zu erhalten. Für einzelne Mitglieder der R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren und der Subfamilie 15 der MYB-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* wurden Interaktionen bei der gemeinsamen Regulation von Zielgenen beschrieben (siehe Einleitung). Daher wurde der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf die Interaktionseigenschaften dieser und verwandter Subgruppen gelegt.

Zur systematischen Untersuchung dieser Proteininteraktionen wurde das Hefe 2-Hybrid-System gewählt. Dieses System hat sich schon in diversen Hochdurchsatzprojekten bewährt und ist neben der Massenspektrometrie und der Analyse von Proteinen mit Hilfe von Proteinarrays eine der wenigen Methoden, um ganze Proteinfamilien, Proteinkomplexe und sogar ganze Genome zu untersuchen (Aebersold and Mann, 2003; Phizicky et al., 2003).

Der Umfang der zu untersuchenden Proteinfamilien erforderte die Etablierung eines vereinfachten Protokolls, welches den standardisierten Ablauf systematischer Hefe 2-Hybrid-Screens in einem hohen Durchsatz erlaubt. Ausgehend von dem genomweiten Ansatz und einem Test der Interaktionen zwischen MYB-Transkriptionsfaktoren und bHLH-Faktoren in einem Matrixverfahren, wurde die Spezifität dieser Interaktionen näher untersucht.

4.1 Die Spezifität der MYB- / bHLH-Interaktionen

Mit verschiedenen Vertretern der MYB und bHLH-Proteine wurden Hefe 2-Hybrid-Bibliotheken nach interagierenden Proteinen durchsucht. Parallel wurden in einem Matrixverfahren die Interaktionen von sämtlichen MYB-Proteinen der eng verwandten Subgruppen 5, 6, 7 und 15 mit der bHLH-Subgruppe IIIf untersucht.

Die Ergebnisse erlauben es, diese Subgruppen anhand ihrer Interaktionseigenschaften zu differenzieren. Die Subgruppen 5 und 6 interagieren mit allen Vertretern der untersuchten bHLHs, die Subgruppe 15 interagiert nur mit *AtbHLH002* und *AtbHLH012*, wohingegen keine Interaktionen der Subgruppe 7 mit den bHLH-Faktoren der Subgruppe III_f gezeigt werden konnte. Die Interaktionen von *AtbHLH001* wurden, aufgrund der Autoaktivierung in Hefe, in *in vitro* Bindungsstudien untersucht. Bei diesen Versuchen wurde die Interaktion mit *AtMYB75* und *AtMYB90* gezeigt.

Darüber hinaus wurden in ungerichteten Hefe 2-Hybrid-Screens vier weitere MYB-Proteine isoliert, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen interagieren. Dabei handelt es sich um die 1R-MYB Proteine CPC (CAPRICE) und zwei bisher unbekannte Proteine, die aufgrund ihrer Homologien zu CPC bzw. zu TRY (TRIPTYCHON) CPC-L1 und TRY-L1 genannt wurden, sowie um *AtMYBL2*, ein MYB-Protein, das neben einer vollständigen R3-MYB-Wiederholung nur eine unvollständige R2-Wiederholung aufweist.

Hieraus ergibt sich die Frage nach strukturellen Gemeinsamkeiten dieser 14 MYB Proteine, die teilweise nur sehr entfernt verwandt sind.

4.1.1 Was ist die strukturelle Basis für die Interaktionen der MYB und bHLH Proteine?

Durch die Analyse von Deletionsmutanten wurde der Interaktionsbereich auf Seiten der R2R3-MYB-Proteine am Beispiel von *AtMYB75* auf die R3-Wiederholung eingegrenzt. Für eine Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen ist weder die R2-Wiederholung (bis Aminosäure W53) noch der C-Terminus (ab Aminosäure 114) notwendig. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Tatsache, dass sich die Homologie zu den interagierenden 1R-MYB-Proteinen auf die R3-Wiederholung beschränkt. Teilweise waren diese verhältnismäßig kurzen 1R-MYB-Proteine im N-terminalen Bereich zusätzlich verkürzt, so dass nur noch die R3-Wiederholung als Interaktionsbereich erhalten blieb (CPC ab Aminosäure 25; CPC-like ab Aminosäure 33).

Eine detailliertere Untersuchung der Interaktionsdomäne wurde mit Hilfe von gerichteter und ungerichteter Mutagenese durchgeführt. Da bei ungerichteter Mutagenese häufig vorzeitige Sequenzabbrüche auftreten, ist die Selektion von nicht-interagierenden Mutanten oft nicht informativ. In dieser Arbeit wurden daher temperatursensitive Mutanten isoliert. Der Vorteil von temperatursensitiven Mutanten liegt darin, dass solche Aminosäureaustausche selektiert werden, die zu keiner grundlegenden Veränderung der Proteinstruktur führen, so dass eine Interaktion bei permissiver Temperatur noch möglich ist. Bei solchen Mutanten sollten durch den Austausch entweder direkt Aminosäuren betroffen sein, die zusammen mit anderen Aminosäuren die Interaktionsfläche ausmachen, oder aber es sind Aminosäuren ausgetauscht, die für die Stabilität dieser Interaktionsfläche nötig sind. Dies können z.B. Aminosäuren sein, die in der Tertiärstruktur unterhalb dieser Interaktionsdomäne im Kern des Proteins liegen.

Die Suche nach temperatursensitiven Mutanten von *AtMYB75* ergab, dass Aminosäuren-Austausche in der ersten Hälfte der R3-Wiederholung die Interaktion mit bHLH-Faktoren schwächen. Die Häufung der temperatursensitiven Mutanten in diesem Bereich weist darauf hin, dass diese Aminosäuren mit großer Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung und Stabilität einer Interaktionsdomäne beteiligt sind. Das Auftreten von Mutanten, die nur Substitutionen im C-Terminalen Teil der Proteinsequenz hatten, ließe sich dadurch erklären, dass durch die Mutagenese Aminosäuren getroffen werden, die die Gesamtstabilität des Proteins beeinflussen, so dass bei höheren Temperaturen die Konformation des Proteins verändert wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich solche Aminosäuren, auf Grund der Tertiärstruktur des Proteins, in einer räumlichen Nähe zum Interaktionsbereich befinden und die Interaktion so beeinflussen können.

Die Ergebnisse aus diesen Ansätzen haben gezeigt, dass die getesteten MYB-Faktoren spezifisch mit den bHLH-Faktoren der Gruppe IIIf interagieren und die Interaktionsdomäne im Bereich der R3-Wiederholung liegt.

Um ein genaueres Bild über die Gemeinsamkeiten der Proteine zu erhalten, die mit bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf interagieren, wurden die Aminosäuren im Bereich der R3-Wiederholung näher untersucht. Von hochkonservierten Aminosäuren, die in fast allen MYB-Proteinen vorhanden sind, wird erwartet, dass sie strukturgebend sind, so zum Beispiel die Tryptophane, die den Kern der Helices in den MYB-Wiederholungen ausmachen, sowie die Aminosäuren, die direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind (Aharoni et al., 2001; Ogata et al., 1992). Positionen, die bei dem Vergleich aller MYB-Proteine variabel sind, bei den interagierenden Proteinen aber signifikant invariabel sind, legen nahe, dass solche Aminosäuren aufbauend auf der Gesamtstruktur spezifische funktionelle Bereiche, wie zum Beispiel Protein-Interaktionsdomänen, ausbilden.

Eine statistische Untersuchung der Häufigkeiten aller Aminosäuren der R3-Wiederholung der Gruppe der interagierenden MYB-Proteine, verglichen mit der gesamten MYB Familie ergab an 7 Positionen einen signifikanten Unterschied. Die Aminosäure-Positionen 72, 73, 76, 80, 81, 87, 90 und 91 (bezogen auf *AtMYB75*) sind bezogen auf die gesamte MYB Familie sehr variabel, innerhalb der MYB Proteine, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen interagieren aber stark konserviert (Bild 4.1).

Ein direkter Sequenzvergleich der interagierenden MYB-Proteine mit der eng verwandten aber nicht interagierenden Subgruppe 7 zeigte, dass die Positionen 72, 81 und 90 keine Rolle in der Spezifizierung der Interaktionsdomäne spielen, da diese auch innerhalb der nicht interagierenden Gruppe konserviert sind. Die Gruppe der MYB-Proteine, die mit den R/B-ähnlichen bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren, lässt sich also durch das Sequenzmotiv $Lx_2[R/\kappa]x_3Lx_6Lx_3R$ charakterisieren. Die Proteine der Subgruppe 7, die trotz ihrer engen Verwandtschaft mit den MYB-Subgruppen 5, 6 und 15 nicht mit den getesteten bHLH-Faktoren interagieren, haben bezüglich dieses Motivs mindestens 2 Aminosäure-Austausche.

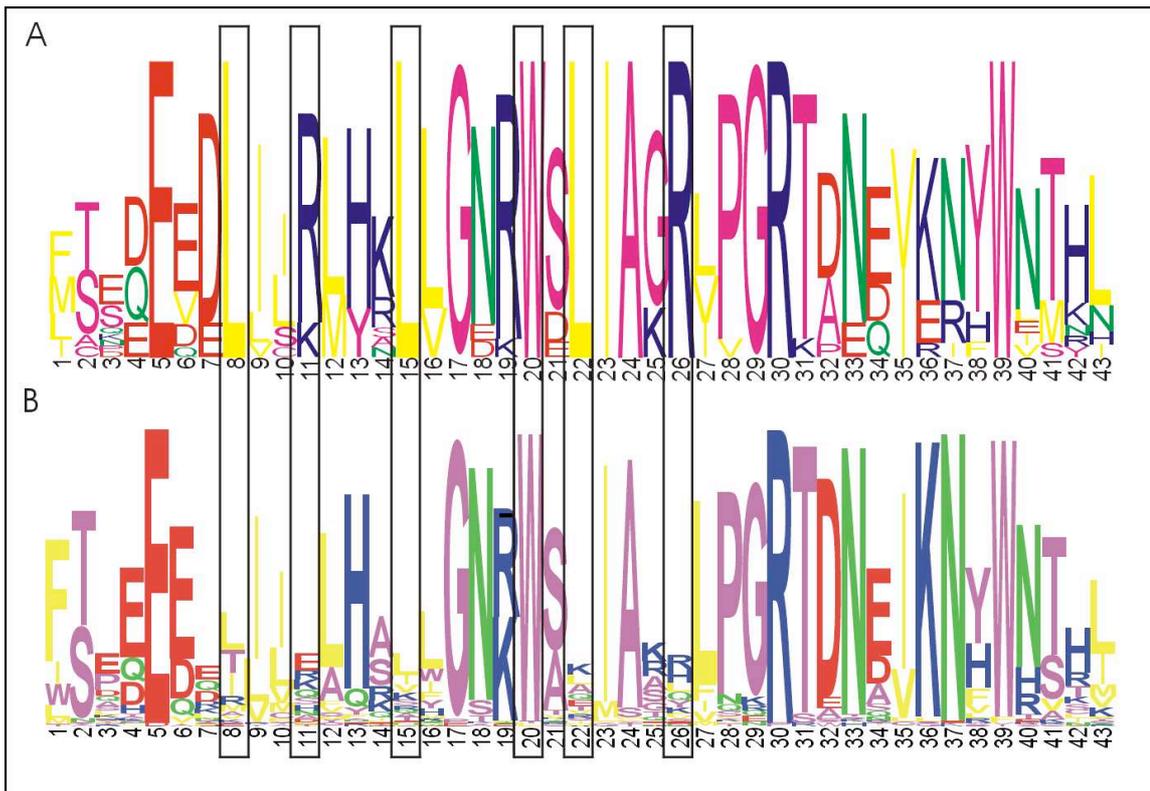


Bild 4.1 Häufigkeiten der verschiedenen Aminosäuren im Bereich der R3-Wiederholung der MYB-Domäne

A: Häufigkeiten der Aminosäuren bei den MYB-Faktoren, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren interagieren; B: Häufigkeiten der Aminosäuren bei der gesamten MYB-Proteinfamilie. Die Höhe der Buchstaben spiegelt die relative Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure wieder. Umrandet sind die wenig konservierten Aminosäuren, die bei den interagierenden MYB-Proteinen wahrscheinlich die Spezifität der Interaktion ausmachen und das Motiv $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ bilden. Zusätzlich ist das für alle MYB-R3 Domäne charakteristische invariable Tryptophan (W) gekennzeichnet.

Eine Motiv-Suche im *A. thaliana* Genom ergab, dass außer den schon untersuchten MYB-Proteinen, noch zwei 1R-MYB-Proteine und vier weitere R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren dieses Motiv enthalten. Bei den noch nicht getesteten 1R-MYB-Proteinen handelt es sich um TRIPTYCHON (TRY, At5g53200) und ein CPC-ähnliches Protein, welches CPCL-2 (At4g01060) genannt wurde. Die R2R3-MYB-Proteine mit diesem Motiv, die noch nicht analysiert wurden, sind die Proteine AtMYB82 und AtMYB4 zusammen mit den nächsten homologen Proteinen AtMYB3, AtMYB7, und AtMYB32. Die Proteine AtMYB4, AtMYB3, AtMYB7, und AtMYB32 bilden gemeinsam die Subgruppe 4, AtMYB82 kann keiner Subgruppe zugeordnet werden.

Um herauszufinden, ob anhand dieses Motivs auch Vorhersagen über mögliche Interaktoren getroffen werden können, wurden exemplarisch die Interaktionen von AtMYB82 und AtMYB4 mit den R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass AtMYB82 mit den bHLH-Faktoren interagiert, AtMYB4 zeigte dagegen als Volllängenprotein keine Interaktion mit dem bHLH-Faktoren. Nach

Entfernen der C-Terminalen Domäne konnte auch für *AtMYB4* eine Interaktion mit den getesteten bHLH-Faktoren gezeigt werden (vgl. Bild 3.15).

Die MYB-Proteine, die mit bHLH-Faktoren interagieren können und sich durch das Sequenzmotiv $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ auszeichnen, gehören zu sehr unterschiedlichen MYB-Familien. Innerhalb der R2R3-MYB-Proteine sind das die Subgruppen 4, 5, 6 und 15 und die keiner Subgruppe zugehörigen Proteine *AtMYB82* und *AtMYBL2*. Aus der Familie der 1R-MYB-Proteine wurden Proteine mit Ähnlichkeit zu CAPRICE und TRIPTYCHON als bHLH-Interaktionspartner identifiziert. Die MYB-Domäne dieser Familie ähnelt der R3-Wiederholung der R2R3-MYB-Proteine am stärksten. Das Sequenzmotiv $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ findet sich exakt in diesem, zwischen den beiden Familien überlappenden Bereich der DNA-Bindedomäne wieder. Stellt man die Sequenzähnlichkeit der MYB-Proteine basierend auf der Region des Interaktionsmotivs in einem Dendrogramm grafisch dar, ergibt sich im Vergleich zu der Gruppierung unter Berücksichtigung der gesamten R2R3-Domäne (Stracke et al., 2001) ein deutlicher Unterschied. Ob die daraus resultierende Subgruppierung Hinweise auf weitere Sequenzmotive liefert, die an weiteren TF-Interaktionen beteiligt sind, ist nicht vorhersehbar. Allerdings ist von v-MYB bekannt, dass es ebenfalls über die MYB-Domäne mit C/EBP, einem anderen Transkriptionsfaktor interagiert (Mink et al., 1996), und auch die bHLH-Proteine und die bZIP Proteine dimerisieren jeweils über ihre DNA-bindenden Domänen (Ferré-D'Amaré et al., 1993; Kircher et al., 1998)]. Der MYB-Protein-Stammbaum, der sich auf den Bereich der R3-Wiederholung beschränkt, könnte eine Ausgangsbasis für weitere systematische Analysen dieser Proteine darstellen, die Hinweise darauf geben, welche Rolle dieser Bereich bei anderen Gruppen der MYB-Transkriptionsfaktoren spielt.

4.1.2 Die variablen Aminosäuren der Interaktionsdomäne bilden eine Interaktionsfläche

Die MYB-Domänen einiger MYB-Proteine wurden an der Röntgenstruktur des c-MYB aus Huhn modelliert und die Lage der Aminosäuren, die im Bereich der Interaktionsdomäne liegen, genauer betrachtet.

Die innerhalb der MYB-Familie weniger konservierten Aminosäuren der R3-Wiederholung befinden sich auf der Oberfläche der Helices eins und zwei auf der von der DNA abgewandten Seite der Domäne. Sie bilden bei den interagierenden Proteinen eine Kranz-ähnliche Oberfläche, in deren Mitte sich die hydrophoben Aminosäuren befinden, die zwar innerhalb der Subgruppen 5, 6, 7 und 15 konserviert sind, aber nicht innerhalb der gesamten MYB-Familie. Bezogen auf *AtMYB75* sind das die Aminosäuren an Position 77 und 81. Die Aminosäure Leucin an Position 77 war bei

der ungerichteten Mutagenese bei zwei temperatursensitiven Klonen gegen ein Histidin ausgetauscht, in einem Fall war dies sogar ein Einzelaustausch. Der Kranz, der diese hydrophoben Aminosäuren umgibt, wird von Aminosäuren gebildet, die innerhalb der MYB-Proteine variabel, bei den interagierenden Proteinen aber weitestgehend konserviert sind. Sämtliche Aminosäuren des postulierten Motivs befinden sich in diesem Bereich.

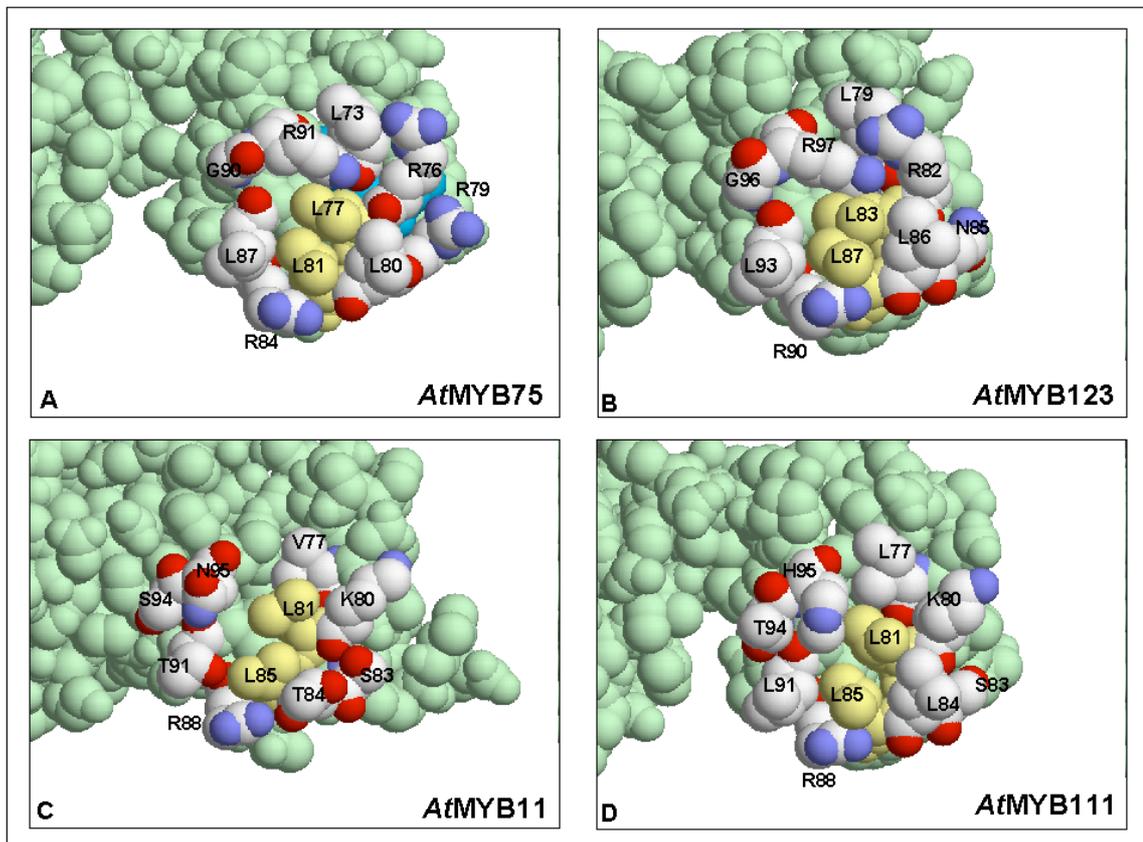


Bild 4.2 Interaktionsdomänen verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren

A und B: MYB-Proteine, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren interagieren. C und D: MYB-Proteine, die keine Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren zeigen. Die Interaktionsdomäne wurde hervorgehoben. Sie wird von Aminosäuren gebildet, die sich auf der DNA-angewandten Seite auf den nebeneinander liegenden Helices 1 und 2 der R3-Domäne befinden. Die MYB-Domänen wurden an der Röntgenstruktur des c-MYB aus Huhn modelliert (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/> RasTop; Molecular Visualization Software (<http://www.geneinfinity.org/rastop/>).

Das Modell zeigt unterschiedliche Ladungsverteilungen innerhalb dieses Kranzes, die möglicherweise für die Spezifität der Proteininteraktion verantwortlich sind. Bei den interagierenden Proteinen befinden sich an zwei entgegengesetzten Positionen jeweils positiv geladene Aminosäuren. Bei den MYB-Proteinen der Subgruppe 7 sind diese geladenen Aminosäuren nur teilweise erhalten. Die MYB-Proteine der Subgruppe 15 haben alle an der Position, die bei AtMYB75 der Position G90 entspricht, ein Lysin. Dadurch wird in diesen Bereich eine basische Aminosäure eingeführt, die auf Grund

ihrer positiven Ladung die Spezifität dieser Subgruppe ausmachen könnte. In den Hefe 2-Hybrid-Untersuchungen haben sich diese Proteine von der Subgruppe 5 und 6 dadurch abgegrenzt, dass sie nicht mit AtbHLH042 interagieren.

Auffällig ist, dass sich bei allen Vertretern der Subgruppe 7 und bei allen Vertretern der Subgruppe 4, zu der auch *AtMYB4* gehört, an Position 79 (bezogen auf *AtMYB75*) ein Serin befindet. Bei den Subgruppen 5, 6 und 15 befinden sich bis auf zwei Ausnahmen, nämlich Asparagin bei *AtMYB123* und Alanin bei *AtMYBL2* basische Aminosäuren (R oder K) an der entsprechenden Position. Sowohl die gerichtete, als auch die ungerichtete Mutagenese zeigt eine Schwächung der Interaktion, wenn das Arginin an dieser Position in *AtMYB75* gegen eine andere Aminosäure (G, W) ausgetauscht wird. Eine Phosphorylierungs-Vorhersage hat ergeben, dass das Serin an dieser Position eine potentielle Phosphorylierungsstelle sein könnte. Eine Phosphorylierung an dieser Position hätte ebenfalls eine auffällige Veränderung der Ladungsverhältnisse innerhalb dieser Interaktionsdomäne zur Folge.

Die Modelle der MYB-Domäne zeigen, dass die Aminosäuren, für die eine Funktion bei der Proteininteraktion mit bHLH-Faktoren postuliert wurde, eine Plattform-ähnliche Struktur auf der abgewandten Seite der DNA-Bindungsdomäne bilden. Diese Interaktionsdomäne umfasst sowohl Aminosäuren aus dem Bereich der ersten als auch der zweiten Helix der R3-Domäne.

4.1.3 Das Motiv $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ ist auch über Artgrenzen hinweg konserviert

Das funktionelle Zusammenwirken von MYB-Proteinen und R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren ist neben den genannten Beispielen aus Arabidopsis (vgl. Kapitel 1) auch in verschiedenen anderen Pflanzenspezies beschrieben worden.

Am besten untersucht ist die kombinatorische Regulation der Flavonoidbiosynthese in Mais durch ein Zusammenwirken der MYB Proteine *ZmC1* und *ZmPI* mit verschiedenen R/B-ähnlichen bHLH Proteinen (Goff et al., 1992). Darüber hinaus wurde für einzelne MYB Proteine aus *Petunia hybrida*, *Fragaria ananassa* (Erdbeere) und *Perilla frutescens* (Schwarznessel) eine direkte Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH Proteinen gezeigt: *PhAN2* aus Petunie interagiert mit *PhJAF13*, *FaMYB1* aus Erdbeere interagiert heterolog mit *PhAN1* aus Petunie und für *MYBP1* aus *Perilla frutescens* wurde eine Interaktion mit *MYCRP* gezeigt (Aharoni et al., 2001; Goff et al., 1992; Gong et al., 1999; Quattrocchio et al., 1999).

Alle diese MYB-Proteine, für die eine direkte Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren gezeigt wurde, enthalten in der R3-Wiederholung das in 4.1.1 postulierte Motiv. Die auf diesem Strukturelement basierende Interaktion zwischen MYB-Transkriptionsfaktoren und R/B-ähnlichen bHLH Proteinen kann also als ein evolutiv konserviertes regulatorisches Prinzip betrachtet werden.

Die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäuren in der R3 Domäne wurde anhand von *ZmC1* und *ZmP* aus Mais untersucht. Bei der Regulation der Gene des Flavonoidbiosynthesewegs ist das MYB-Protein *ZmC1* auf die Interaktion mit einem

bHLH-Protein der R/B-Untergruppe angewiesen (Goff et al., 1992). Das Protein *ZmP* kann dagegen bestimmte Gene des Flavonoidbiosynthesewegs unabhängig von bHLH-Faktoren aktivieren. Sequenzvergleiche von *ZmC1* und *ZmP* aus *Zea mays* haben ergeben, dass sich diese beiden Proteine im Bereich der R3-Domäne in nur acht Aminosäuren unterscheiden. Der Austausch von vier dieser Aminosäuren in *ZmP* gegen die entsprechenden Aminosäuren von *ZmC1* im Bereich der ersten Helix der R3-Wiederholung reichte aus, dass *ZmP* mit *ZmR* in Hefe interagieren kann (Grotewold et al., 2000). Diese Substitutionen, die in Hefe zur Interaktion ausreichen, führen in Mais-Zellkulturversuchen jedoch nicht zur Aktivierung entsprechender Zielgene. Es wurde gezeigt, dass dazu der Austausch zweier weiterer Aminosäuren im Bereich der zweiten Helix in der R3-Wiederholung notwendig ist. Der Effekt in der Zellkultur, der durch den Austausch dieser Aminosäuren hervorgerufen wird, wird damit erklärt, dass dieser Austausch die regulatorische Aktivität des Proteins verstärkt und es wird postuliert, dass die Aminosäuren im Bereich der ersten Helix der R3-Wiederholung für die Spezifität der Interaktion mit *ZmR* ausreichen (Grotewold et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden durch gerichtete Mutagenese der entsprechenden Aminosäuren in *AtMYB75* gezeigt, dass Einzelaustausche zu einer Schwächung der Interaktion, nicht aber zu einem vollständigen Verlust führten. Basierend auf dem systematische Ansatz dieser Arbeit konnte ein allgemeineres Motiv formuliert werden, welches auch MYB-Proteine einschließt, die in ihrer Sequenz nicht vollständig mit den in Grotewold et al. (2000) erwähnten Aminosäuren, die für die Spezifität von C1 verantwortlich sind, übereinstimmen. Darüber hinaus schließt das Motiv $LX_2[R/K]X_3LX_6LX_3R$ Aminosäuren, die auf der zweiten Helix der R3-Wiederholung liegen, als wichtige Elemente der Interaktionsdomäne mit ein. Ein systematischer Ansatz wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist bei Mais noch nicht möglich, man ist deshalb von einzelnen charakterisierten Proteinen abhängig. Inwiefern die Aminosäuren der zweiten Helix tatsächlich an der Interaktion von MYB- und bHLH-Faktoren beteiligt sind, könnte durch entsprechende Mutationen in diesem Bereich untersucht werden. Die Formulierung eines allgemeinen, konservierten Interaktionsmotivs kann verwendet werden, um aus den enormen Datenmengen der EST- und Genom-Projekte diese Gruppe von MYBs vorherzusagen, und könnte so als Grundlage für gezielte Funktionsuntersuchungen dienen. Neben dem Genom von *Arabidopsis thaliana* ist mittlerweile auch die weitgehend vollständige Genomsequenz von Reis (*Oryza sativa*) verfügbar (IRGSP <http://www.tigr.org>). Eine bioinformatische Analyse der MYB Familie aus Reis ergab sechs Sequenzen, die das Interaktionsmotiv in der R3-Wiederholung enthalten, und somit als putative Interaktoren von R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen postuliert werden können. In einem Stammbaum, in dem alle MYB-Proteine aus *A.thaliana* und *Oryza sativa* gemeinsam aufgeführt werden (unveröffentlichte Daten von Martin Werber), verteilen sich die Proteine mit diesem Motiv auf verschiedene Subgruppen, die teilweise eine nur sehr geringe Verwandtschaft aufweisen. Die

strukturelle Gemeinsamkeit dieser Proteine hätte also nicht über eine generelle Sequenzhomologie zu MYB-Proteinen aus *A. thaliana* vorhergesagt werden können.

Die Vorhersage einer MYB / bHLH Interaktion aufgrund des Sequenzmotivs $LX_2[R/K]X_3LX_6LX_3R$ setzt voraus, dass das Motiv nicht nur notwendig, sondern auch innerhalb einer Gesamtstruktur eines Proteins ausreichend für die Interaktion ist. Das Protein *AtMYB4*, welches dieses Interaktionsmotiv besitzt, interagiert als Volllängenprotein aber nicht mit bHLH-Faktoren der Subgruppe IIIf (siehe 3.1.3). Für ein Proteinfragment von *AtMYB4*, das nur den N-terminalen Bereich bis zur R3 Domäne enthält, konnte eine Bindung an diese bHLH-Proteine gezeigt werden (Bild 3.15). Die Tatsache, dass das Protein nach der Deletion des C-terminus interagiert, bestätigt die Funktion des postulierten Interaktionsmotivs, zeigt aber auch, dass das molekulare Umfeld eine Rolle spielt.

Hier stellt sich die Frage, ob im Falle von *AtMYB4* der C-terminale Teil direkt die Interaktion verhindert, oder ob dieser Teil eine Funktion in Hefe ausübt, die mit der Aktivierung der Reportergene interferiert.

AtMYB4 ist als Repressorprotein beschrieben (Jin et al., 2000) Das Sequenzmotiv $LNL^{E/D}L$ (Stracke et al., 2001), das in der Subgruppe 4 der Arabidopsis MYB-Proteine und in *FaMYB1* aus Erdbeere konserviert ist, ist direkt an der Repressorfunktion beteiligt (Jin et al., 2000). Dieses Motiv ähnelt dem Repressormotiv bestimmter ERF-Proteine (EAR-Motiv $L^{L/F}DLN^{L/F}(X)P$, (Koyama et al., 2003)).

Hefe 2-Hybrid-Versuche mit ERF-Proteinen, die das ähnliche EAR-Motiv enthalten, zeigten keine Repressorfunktion, sondern waren sogar leicht autoaktivierend. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vorgeschlagen, dass es sich um ein pflanzenspezifisches Motiv handelt, welches in Hefen nicht funktionell ist (Koyama et al., 2003). *AtMYB4* zeigt in Hefe keine Autoaktivierung. In Hefe 2-Hybrid-Screens konnten mit *AtMYB4* Kandidaten Interaktionen mit anderen Proteinen gezeigt werden, so dass man annehmen kann, dass zumindest starke Interaktionen nicht beeinflusst werden. Auch mit *AtMYB6*, welches ebenfalls das Motiv $LNL^{E/D}L$ enthält, konnten Kandidaten wie *AtbHLH046* und ein LEA-Protein in Screens identifiziert werden. Eine generelle Repressorfunktion dieses Motivs in Hefe kann folglich ausgeschlossen werden. Dies lässt im Fall von *AtMYB4* auf einen direkten Einfluss des C-Terminus auf die Interaktion schließen.

4.2 Regulatorische Netzwerke der MYB- und bHLH Proteine

4.2.1 Regulation der Phenylpropanoid-Biosynthese und der Trichom- bzw. Wurzelhaardifferenzierung

Die Funktionen aller bislang charakterisierten MYB-Proteine, die R/B-ähnliche bHLH-Faktoren binden, stehen im Zusammenhang mit der Regulation zweier sehr unterschiedlicher Bereiche aus Sekundärstoffwechsel und Zelldifferenzierung.

Kombinatorische Interaktionen zwischen MYB- und R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen regulieren einerseits verschiedene Schritte der Phenylpropanoid-Biosynthese, andererseits steuern sie die epidermale Zelldifferenzierung in der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung. Eine Verbindung zwischen diesen Funktionen stellt das Protein TTG1 her, was an beiden Regulationswegen beteiligt ist und darüber hinaus noch die Schleimbildung in Samenhüllen reguliert (Johnson et al., 2002; Western et al., 2000).

Es gibt verschiedene Modelle, die die Regulation der Trichom- und Wurzelhaardifferenzierung beschreiben und einen generellen Regulationsmechanismus postulieren, der auf kombinatorischen und kompetitiven Proteininteraktionen basieren könnte (Marks and Esch, 2003; Schellmann et al., 2002; Schiefelbein, 2003). Die Komponenten dieses Aktivator-Repressor Systems sind neben R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen (GL3, TT8) die MYB Proteine *AtMYB0* (GL1) und *AtMYB66* (WER), das WD40 Protein TTG1 und die nicht-zellautonom repressorisch wirkenden 1R-MYB Proteine CPC und TRY. Die Modelle stimmen im wesentlichen darin überein, dass im Spross die Proteine GL3, GL1 und TTG1 und in der Wurzel WER (*AtMYB66*) zusammen mit einem noch unbekanntem bHLH-Faktor und TTG1 die Expression von GL2 induzieren. Dieses Protein führt über einen noch unbekanntem Regulationsweg zur Trichomdifferenzierung im Spross, bzw. zum „Nicht-Wurzelhaarschicksal“ in der Wurzelhaarzone. Am Beispiel der Trichomentwicklung wurde vorgeschlagen, dass die Abstände zwischen den Trichomen durch eine negative Regulation von z.B. TRY in Nachbarzellen, und einer Feedback-Regulation, die auf einer positiven Rückkopplung des Aktivators (MYB-bHLH-Komplex) auf sich selbst basiert, aufrechterhalten werden. Durch diese Feedback-Regulation werden zufällige Unterschiede in den Expressionsniveaus verstärkt, was dazu führt, dass einige Zellen zu Trichomen differenzieren und die Trichomdifferenzierung der benachbarten Zellen inhibieren (Hülkamp and Schnittger, 1998) (siehe auch Kapitel1).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen umfassenden Überblick über mögliche weitere Proteine, die in ähnlichen Regulationszusammenhängen stehen könnten. Es wurden neue mögliche Aktivatoren dieses Systems, den R2R3 MYB-Proteinen der Subgruppen 5, 6 und 15, sowie dem keiner Subgruppe zuzuordnenden *AtMYB82*, identifiziert. Die Interaktionspartner der MYB-Proteine sind innerhalb der getesteten bHLH-Proteine auf die Vertreter der Untergruppe IIIf beschränkt. Die Proteine *AtbHLH003* und *AtbHLH013* der Gruppe IIIId und *AtbHLH004*, *AtbHLH005* und *AtbHLH006* der Gruppe IIIe teilen mehrere Motive mit den bHLH-Faktoren der Gruppe IIIf (Heim et al., 2003), es konnte jedoch keine Interaktion mit den MYB-Proteinen gezeigt werden.

AtMYB66 und auch *AtMYB23*, für die schon zuvor eine Interaktion mit einem noch unbekanntem bHLH-Faktor postuliert wurde (Kirik et al., 2001; Schiefelbein, 2000), interagieren in Hefe mit den R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren *AtbHLH002* und *AtbHLH012*. Da *AtbHLH002* in der Wurzel exprimiert wird, könnte *AtbHLH002* ein

möglicher Partner von *AtMYB66 in vivo* sein. Tatsächlich wurde *AtbHLH002* als „Enhancer of Glabra 3“ (EGL1) in diesem Zusammenhang diskutiert (Bernhardt et al., 2001). Ob, und inwiefern z.B. diese Interaktionen tatsächlich mit der Regulation der Wurzelhaardifferenzierung zusammenhängen, kann nicht ohne weitere Experimente entschieden werden.

In Arabidopsis-Zellkulturen konnte durch Koexpression von *AtMYB123* (TT2) mit *AtbHLH042* (TT8) und von *AtMYB75* (PAP1) mit verschiedenen mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren eine Aktivierung von Promotoren einiger Gene des Phenylpropanoid-Stoffwechsels gezeigt werden. Die Aktivierung des BANYULS (BAN) - Promoters durch TT2 und TT8 konnte durch die Koexpression von TTG1 weiter verstärkt werden (Marc Heim, persönliche Mitteilung). TT2 und TT8 werden gemeinsam für die Expression von DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase) und LAR (Leucoanthocyanidinreduktase) in Schoten von *Arabidopsis thaliana* benötigt (Nesi et al., 2000; Nesi et al., 2001).

Weiterhin wurden in dieser Arbeit neue mögliche Repressoren (CPC-L1 und TRY-L1) identifiziert, die an die R/B-ähnlichen bHLH-Proteine binden. Diese 1R-MYB-Proteine besitzen, wie auch TRY nur eine MYB-Sequenzwiederholung, die homolog zur R3-Wiederholung ist. Die Proteine CPC, CPC-L1 und TRY-L1 bestehen fast nur aus dieser MYB-Domäne, ein C-terminaler Bereich nach der R3-Wiederholung, wie er bei R2R3-MYB-Faktoren vorkommt, fehlt hier, bzw. ist bei TRY-L1 auf 40 Aminosäuren reduziert. *AtMYBL2* unterscheidet sich von den anderen 1R-MYB-Proteinen durch das Vorhandensein von Resten der R2-Wiederholung und einem C-Terminus, der in der Länge dem C-Terminus der anderen MYB-Proteinen entspricht. Auffällig ist, dass die Tryptophanmoleküle, die eigentlich im Innern der Helices liegen und sonst stark konserviert sind, bei *AtMYBL2* im Bereich der R2-Wiederholung durch andere Aminosäuren ersetzt sind. Sowohl bei *AtMYBL2*, als auch bei den Proteinen CPC, CPC-L1 und TRY-L1 sind im Bereich der DNA-bindenden Helix Aminosäure-Austausche an den konservierten Positionen, die an der DNA-Bindung beteiligt sind, vorhanden (Avila et al., 1993). Eine DNA-Bindung dieser Proteine ist unwahrscheinlich. Bei diesen Faktoren könnte man sich eine kompetitive Repression durch Bindung an bHLH-Faktoren, die dadurch nicht mehr mit den R2R3-MYB-Faktoren interagieren können, vorstellen. Eine funktionelle Redundanz, zumindest in Teilfunktionen, könnte erklären, weshalb bisher noch keine Mutanten der Proteine CPC-L1, CPC-L2 und TRY-L1 identifiziert wurden. Eine weitere denkbare Möglichkeit ist, dass diese 1R-MYB-Faktoren in ähnlicher Weise wie für die Trichomentwicklung vorgeschlagen wurde, an der Regulation anderer Prozesse, die von MYB- und bHLH-Faktoren reguliert werden, eventuell auch an der Phenylpropanoid-Biosynthese, beteiligt sind. Dafür gibt es bisher jedoch noch keine Hinweise.

Eine wichtige Grundlage des beschriebenen Regulationsmodells stellt die Interaktion zwischen R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen und TTG1 dar. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein mit allen bHLH-Proteinen der Subgruppe IIIf, nicht aber mit *AtbHLH013* der Subgruppe IIIId interagiert. Mit Deletionsanalysen von *AtbHLH002* und

AtbHLH012 konnte der interagierende Bereich auf Seiten der bHLH-Proteine auf den C-Terminus eingeschränkt werden. Die Deletionen von *bHLH002* ergaben als Interaktionsbereich ein Fragment von nur 70 Aminosäuren, welches das in Heim et al. (2003) definierte Motiv 19 enthält.

4.2.2 Sind die MYB-Proteine, die mit R/B-ähnlichen bHLH-Faktoren interagieren redundant?

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen von 14 MYB-Proteinen mit einer Subgruppe von bHLH-Faktoren gezeigt. Besonders bei MYB-Proteinen wie PAP1 und PAP2, die in ihrer gesamten Aminosäuresequenz zu 80% identisch sind, liegt es nahe, dass diese Proteine auch redundante Funktionen haben könnten. Für beide Proteine wurden die gleichen Bindungspartner identifiziert. Die Untersuchung der Expression der PAP1 und PAP2-Gene mit Hilfe von RT-PCR zeigt, dass *AtMYB90* im Vergleich zu *AtMYB75* schwächer, und im Gegensatz zu *AtMYB75* nicht in allen überirdischen Pflanzenorganen exprimiert wird. Allerdings sind die Expressionsmuster der untersuchten MYB-Proteine in einigen Organen überlappend, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Proteine dort zumindest teilweise gleiche Funktionen ausüben. Auch eine überlappende Funktion von *AtbHLH002* und GL3 wird diskutiert (Bernhardt et al., 2001).

Eine *A. thaliana* Linie mit einer T-DNA Insertion im MYB75 Gen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, zeigte verglichen mit dem Wildtyp keinen auffälligen aberanten Phänotyp. Eine ähnliche Beobachtung, das Fehlen phänotypischer Veränderungen von Antisense-Linien von *AtMYB75*, wird von Borevitz angedeutet (Borevitz et al., 2000).

Die C-Termini der MYB-Proteine sind generell weniger stark konserviert. Obwohl die C-Termini von Mais C1 und *Petunia AN2* sehr unterschiedlich sind, können sie die jeweilige k.-o.-Mutante komplementieren (Quattrocchio et al., 1999; Quattrocchio et al., 1993). In ähnlicher Weise können auch Werewolf und GL1 vertauscht werden, obwohl die C-Termini nur zu 23% identisch sind (Lee and Schiefelbein, 2001). Die funktionelle Spezifität dieser Proteine scheint also durch die in den genannten Fällen sehr ähnlichen MYB-Domänen bestimmt zu werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in den MYB-Proteinen, die R/B-ähnliche bHLH-Proteine binden, die Interaktionsspezifität von der Proteinoberfläche der R3-Wiederholung bestimmt wird. Diese Interaktion scheint somit eine sehr wesentliche Komponente der Funktion dieser MYB-Proteine zu sein.

4.2.3 Identifizierung neuer putativer Regulatoren der MYB- und bHLH-Proteine

Umfassende Hefe 2-Hybrid Screenings resultierten in der Identifizierung einer großen Zahl neuer möglicher Interaktionspartner der MYB- und bHLH-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Auffällig war, dass mit Ausnahme einer Interaktion zwischen

AtMYB6 und *AtbHLH046* keine weiteren Interaktionen zwischen MYB-Proteinen und bHLH-Proteinen gefunden werden konnten. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Fähigkeit mit MYB-Proteinen zu interagieren eventuell spezifisch für bHLH-Proteine der Subgruppe IIIf ist.

Ein weiteres Resultat der Screenings war, dass einzelne Vertreter der bHLH-Proteine der Subgruppen Ib, IIc, IIId und X Homo- und / oder Heterodimere ausbilden können. Bisher konnte für bHLH-Faktoren aus *A. thaliana* die Homodimerisierung von *AtbHLH008* (PIF3) und die Heterodimerisierung von *AtbHLH026* (HFR1/ REP1) mit *AtbHLH008* in Hefe gezeigt werden (Fairchild et al., 2000; Zhu et al., 2000).

Die getesteten bHLH-Proteine bildeten Dimere mit Vertretern der selben Gruppe oder mit Vertretern aus anderen Gruppen. In tierischen bHLH-Proteinen ist die konservierte HLH-Struktur notwendig für eine Dimerisierung (Ellenberger et al., 1992; Ferré-D'Amaré et al., 1993). Das kleinste Fragment, das in den Screenings mit *AtbHLH013* isoliert werden konnte, war ein C-terminaler Teil von *AtbHLH003*. Bei diesem Fragment handelt es sich um eine N-terminale Deletion, die bei Aminosäuren 249 beginnt, so dass der vollständige „Helix Loop Helix-Bereich“ als Interaktionsdomäne erhalten bleibt.

Auch eine Reihe unbekannter Proteine wurden als mögliche Interaktionspartner isoliert. Interessante Kandidaten für weitere funktionelle Charakterisierungen stellen die Proteine dar, die mit mehreren der untersuchten "Köder"-Proteine interagieren und so Querverbindungen in dem Netzwerk darstellen (Bild 3.2).

Einige der stark vernetzten Proteine erwiesen sich als Mitglieder einer bislang nicht charakterisierten Proteinfamilie. Mit den bHLH-Proteinen *AtbHLH003*, *AtbHLH005* und *AtbHLH013* wurden sechs Proteine isoliert, die alle ein gemeinsames Motiv im C-Terminus teilen. Diese Proteine wurden in verschiedenen Längen isoliert, das Kürzeste war ein Fragment von *At5g13220*, das lediglich die Aminosäuren 162 bis 197 enthielt (NLEGDLPIARRKSLQRFLEKRKERLVSTSPYYPTSA). Diese 40 Aminosäuren enthalten demnach das Interaktionsmotiv. Eine Motivsuche mit diesen Proteinen (*At1G19180*, *At1G72450*, *At1G74950*, *At5G13220* und *At5G20900*) ergab, dass es mit diesem methodischen Ansatz sogar möglich war, eine Gruppe von Proteinen zu erhalten, die alle insgesamt 3 Motive gemeinsam haben und eine kleine Proteinfamilie bilden. Diese Proteinfamilie könnte als Ausgangsbasis für weitere Analysen der regulatorischen Mechanismen der bHLH-Proteine dienen.

4.3 Ausblick

Die Anwendung eines optimierten Hochdurchsatz Hefe 2-Hybrid Systems ermöglichte einen umfassenden Überblick über die Interaktionen von MYB-Proteinen, R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen und akzessorischen Proteinen, die möglicherweise regulatorische Funktion haben. Die Daten erlaubten es, ein generelles Interaktionsmotiv für MYB-Transkriptionsfaktoren zu definieren, das notwendig und

hinreichend für die Interaktion mit R/B-ähnlichen bHLH-Proteinen ist. Da dieses Motiv auch über Artgrenzen hinweg konserviert ist, könnte dieses Motiv zur Voraussage von Interaktionen aufgrund von Sequenzdaten verwendet werden, die dann gezielt experimentell untersucht werden können. So zum Beispiel, wie schon angedeutet, bei der Untersuchung des annähernd vollständig sequenzierten Reisgenoms, aber auch bei der Untersuchung anderer Spezies, wie Wein oder Tomate, bei denen ein besonderes Interesse bei der Untersuchung des Flavonoidbiosynthesewegs besteht (Aviram and Fuhrman, 2002; Bovy et al., 2002). Weiterhin wäre es interessant die putativen Regulatoren, die während dieser Arbeit identifiziert wurden näher zu untersuchen. Darunter auch die Proteinfamilie, die mit den bHLH-Proteinen der Gruppe III isoliert wurde.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Protein-Protein-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren aus den MYB- und bHLH-Familien aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Mit Hilfe der Hefe 2-Hybridtechnik wurden Wechselwirkungen zwischen beiden Familien analysiert und in Screenings neue Interaktionspartner identifiziert.

- 1) Die Hefe 2-Hybrid-Technologie wurde so weiterentwickelt, dass manuell eine Hoch-Durchsatz Leistung zur Identifizierung von Interaktionspartnern in cDNA Bibliotheken erreicht werden kann, die bisher nur mit automatisierten Verfahren möglich war.
- 2) In einer systematischen Interaktionsanalyse wurde gezeigt, dass MYB-Transkriptionsfaktoren vom R2R3- wie auch vom 1R-Typ mit bHLH-Proteinen der Subgruppe III_f spezifisch interagieren. Mit Hilfe von Deletionsanalysen, Mutagenesen und bioinformatischen Methoden, konnte die Interaktionsdomäne auf einen kurzen Sequenzabschnitt im Bereich der R3/R1-Wiederholung der MYB-Proteine eingegrenzt werden. Die Interaktion beruht auf einem gemeinsamen Motiv $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$, welches in allen MYB-Transkriptionsfaktoren, die mit diesen und homologen bHLH-Faktoren interagieren, innerhalb des Pflanzenreichs konserviert ist.
- 3) Es wurde für drei bHLH-Faktoren der Subgruppe III_f gezeigt, dass die mit dem WD40-Protein TRANSPARENT TESTA GLABRA1 interagieren. Die Bindungsdomäne wurde für AtbHLH002 auf einen Bereich von 70 Aminosäureresten eingegrenzt. Dieser Bereich enthält ein Motiv, welches in allen bHLH-Faktoren dieser Subgruppe konserviert ist.
- 4) Es konnten neuartige Protein-Protein-Wechselwirkungen von MYB- bzw. bHLH-Faktoren mit Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und verschiedenen anderen Proteinen gezeigt werden. Besonders auffällig war eine Proteinfamilie, die über einen konservierten Sequenzbereich im C-terminalen Bereich mit bHLH-Faktoren der Subgruppe III interagieren.
- 5) Bei verschiedenen Vertretern der bHLH-Familie wurde außerdem eine Heterodimerisierung mit anderen bHLH-Faktoren gefunden. Die Interaktion zwischen AtbHLH013 und AtbHLH003 konnte auf Seiten von AtbHLH003 auf die bHLH-Domäne eingeschränkt werden.

6 English abstract

In this work, protein-protein interactions within members of the MYB and bHLH-transcription-factor (TF) families of *Arabidopsis thaliana* have been investigated. The yeast-two-hybrid approach was used to dissect the specificity of the interactions of both families to each other, and to identify new MYB and bHLH TF interaction partners.

1. An improved yeast-two-hybrid-screening was established during this work, which resulted in an efficient high-throughput method. The efficiency is comparable to automated yeast-two-hybrid approaches.
2. This systematic work revealed the specific interaction of the R2R3 and the 1R-type of MYB-TFs with subgroup IIIf of the bHLH-protein family. Deletion analysis, mutagenesis, and bioinformatics was used to map the interaction domain to a part of the R3/(R1)-repeat present in the MYB-TFs. The molecular interaction is based on the common motif $Lx_2[R/K]x_3Lx_6Lx_3R$ conserved in the MYB-proteins, that bind to this bHLH proteins. This conservation is also present in other plant species.
3. It was demonstrated that three bHLH-transcription factors of subgroup IIIf molecularly interact with the WD40-protein Transparent Testa Glabra 1 (TTG1). The interaction domain was mapped to a stretch of 70 amino acids in AtbHLH002, which contains a motif common to all members of this TF subgroup.
4. With the yeast-two-hybrid approach novel protein-protein interactions between the MYB-proteins and the bHLH-TFs were identified. Additionally the MYB and bHLH-TFs were shown to interact with zinc finger proteins. A further result was the isolation of a protein family that interacted with different bHLH TFs of subgroup III. This interaction was dependent on the C-terminal region conserved in the newly identified protein family.
5. Furthermore bHLH-hetero-dimerisations were identified that have not previously been demonstrated. And it was shown that the interaction of AtbHLH003 to AtbHLH013 was dependent on the bHLH domain of AtbHLH003.

7 Literatur

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *PLANT CELL*, **15**, 63-4629.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinizaki, K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, **9**, 1859-1868.
- Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**, 198-207.
- Aharoni, A., De Vos, C.H.R., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N.M. and O'Connell, A.P. (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, **28**, 319-332.
- Alvarez, J. and Smyth, D.R. (1999) CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development*, **126**, 2377-2386.
- Avila, J., Nieto, C., Canas, L., Benito, M.J. and Paz-Ares, J. (1993) *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. *The Plant Journal*, **3**, 553-562.
- Aviram, M. and Fuhrman, B. (2002) Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, **957**, 146-61.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, **8**, 1243-54.
- Bernhardt, C., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A.M. and Schiefelbein, J.W. (2001) Two bHLH genes are involved in Arabidopsis root epidermis cell specification. *12th International Conference on Arabidopsis Research*, Madison, Wisconsin, p. 436.
- Bilaud, T., Koering, C.E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1996) The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Research*, **24**, 1294-1303.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. and Lamb, C. (2000) Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *PLANT CELL*, **12**, 2383-4629.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C. and van Tunen, A. (2002) High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous

- expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell*, **14**, 2509-26.
- Braun, E.L. and Grotewold, E. (1999) Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol*, **121**, 21-4.
- Brownlie, P., Ceska, T., Lamers, M., Romier, C., Stier, G., Teo, H. and Suck, D. (1997) The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. *Structure*, **5**, 509-520.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.A. (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, **408**, 967-971.
- Carey, M. (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*, **92**, 5-8.
- Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G. and Tonelli, C. (1993) Molecular homology among members of the R gene family in maize. *The Plant Journal*, **3**, 335-346.
- Consonni, G., Ronchi, A., Pilu, R., Gavazzi, G., Dellaporta, S.L. and Tonelli, C. (1997) Ectopic anthocyanin pigmentation in maize as a tool for defining interactions between homologous regulatory factors. *Molecular General Genetics*, **256**, 265-276.
- de Pater, S., Pham, K., Memelink, J. and Kijne, J. (1997) RAP-1 is an Arabidopsis MYC-like R protein homologue, that binds to G-box sequence motifs. *Plant Molecular Biology*, **34**, 169-174.
- de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J. and 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**, 1422-1434.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Léon-Kloosterziel, K.M. and Koornneef, M. (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *The Plant Cell*, **13**, 853-872.
- Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1996) The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J*, **10**, 393-402.
- Dolan, L. (2001) How and where to build a root hair. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 550-4.
- Dooner, H.K., Robbins, T.P. and Jorgensen, R.A. (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Reviews in Genetics*, **25**, 173-199.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-69.
- Ellenberger, T., Brandl, C.J., Struhl, K. and Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**, 1223-1237.

- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. and Quail, P.H. (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes & Development*, **14**, 2377-2391.
- Ferré-D'Amaré, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B. and Burley, S.K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*, **363**, 38-45.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-6.
- Frampton, J., Gibson, T., Ness, S., Doderlein, G. and Graf, T. (1991) Proposed structure for the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein based on model building and mutational analysis. *Protein Engineering*, **4**, 891-901.
- Frankel, A.D. and Kim, P.S. (1991) Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell*, **65**, 717-719.
- Freiman, R.N. and Tjian, R. (2003) Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell*, **112**, 11-7.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M. and Chory, J. (2002) Three Redundant Brassinosteroid Early Response Genes Encode Putative bHLH Transcription Factors Required for Normal Growth. *Genetics*, **162**, 1445-56.
- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1991) Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science*, **253**, 1140-1143.
- Galego, L. and Almeida, J. (2002) Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers. *Genes Dev*, **16**, 880-91.
- Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W. and Schiefelbein, J.W. (1994) The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the Arabidopsis root. *Developmental Biology*, **166**, 740-754.
- Ganter, B. and Lipsick, J.S. (1999) Myb and oncogenesis. *Adv Cancer Res*, **76**, 21-60.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-60.
- Goff, S.A., Cone, K.C. and 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. and 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., Gough, N., Dunn, A. and de Blaquiére, J. (1985) Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *EMBO J.*, **4**, 2003-1539.

- Gong, Z.-Z., Yamazaki, M. and Saito, K. (1999) A light inducible *Myb*-like gene that is specifically expressed in red *Perilla frutescens* and presumably acts as a determining factor of the anthocyanin forma. *Molecular General Genetics*, **262**, 65-72.
- Graf, T. (1992) Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, **2**, 249-255.
- Green, R.M. and Tobin, E.M. (2002) The Role of CCA1 and LHY in the Plant Circadian Clock. *Developmental Cell*, **2**, 516-518.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B. and 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**, 543-553.
- Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B. and Chandler, V.L. (2000) Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 13579-13584.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K. and Jacobsen, J.V. (1995) Gibberellin-Regulated Expression of a myb Gene in Barley Aleurone Cells: Evidence for Myb Transactivation of a High-pI [α]-Amylase Gene Promoter. *PLANT CELL*, **7**, 1879-4629.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-16.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and 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**, 735-747.
- Heisler, M.G., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R. and Smyth, D.R. (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development*, **128**, 1089-1098.
- Howe, K.M. and Watson, R.J. (1991) Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by *c-myb* protein. *Nucleic Acids Research*, **19**, 3913-3919.
- Hülkamp, M., Misra, S. and Jurgens, G. (1994) Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, **76**, 555-66.
- Hülkamp, M. and Schnittger, A. (1998) Spatial regulation of trichome formation in *Arabidopsis thaliana*. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 213-20.

- Hwang, M.G., Chung, I.K., Kang, B.G. and Cho, M.H. (2001) Sequence-specific binding property of *Arabidopsis thaliana* telomeric DNA binding protein 1 (AtTBP1). *FEBS Lett*, **503**, 35-40.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H. and 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**, 1891-1905.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. and Martin, C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, **19**, 6150-6161.
- Jin, H. and Martin, C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Molecular Biology*, **41**, 577-585.
- Johnson, C.S., Kolevski, B. and 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.
- Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D.N., Ogata, K., Nishimura, Y. and Ishii, S. (1990) The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the *myb* protooncogene product. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 19990-19995.
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E. and Frohnmeyer, H. (1998) CPRF4, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analysis of light dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Molecular General Genetics*, **257**, 595-605.
- Kirik, V., Kolle, K., Misera, S. and Baumlein, H. (1998a) Two novel *MYB* homologues with changed expression in late embryogenesis-defective *Arabidopsis* mutants. *Plant Molecular Biology*, **37**, 819-827.
- Kirik, V., Kölle, K., Wohlfarth, T., Miséra, S. and Bäumllein, H. (1998b) Ectopic expression of a novel *MYB* gene modifies the architecture of the *Arabidopsis* inflorescence. *The Plant Journal*, **13**, 729-742.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hülskamp, M. and Baumlein, H. (2001) Ectopic expression of the *Arabidopsis* AtMYB23 gene induces differentiation of trichome cells. *Dev Biol*, **235**, 366-77.
- Klempnauer, K.H. and Sippel, A.E. (1987) The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the *v-myb* oncogene functions as a DNA-binding domain. *The EMBO Journal*, **6**, 2719-2725.
- Koornneef, M. (1990) Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Services*, **27**, 1-4.

- Koyama, T., Okada, T., Kitajima, S., Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. and Sato, F. (2003) Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two- hybrid system with tobacco ERF3 as bait and its characterization of specific interaction. *J Exp Bot*, **54**, 1175-81.
- Larkin, J.C., Young, N., Prigge, M. and Marks, M.D. (1996) The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development*, **122**, 997-1005.
- Lazo, P.S., Ochoa, A.G. and Gascon, S. (1978) alpha-Galactosidase (melibiase) from *Saccharomyces carlsbergensis*: structural and kinetic properties. *Arch Biochem Biophys*, **191**, 316-24.
- Lee, M.M. and Schiefelbein, J. (1999) WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell*, **24**, 473-483.
- Lee, M.M. and Schiefelbein, J. (2001) Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development*, **128**, 1539-1546.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell*, **5**, 171-179.
- Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L. and 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.
- Ludwig, S.R. and Wessler, S.R. (1990) Maize *R* gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins. *Cell*, **62**, 849-851.
- Lüscher, B. and Eisenman, R.N. (1990) New light on Myc and Myb. *Genes & Development*, **4**, 2235-2241.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2002) The APRR1/TOC1 Quintet Implicated in Circadian Rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-Overexpressing Plants. *Plant & Cell Physiology*, **43**, 58-69.
- Marks, M.D. and Esch, J.J. (2003) Initiating inhibition. *EMBO Rep*, **4**, 24-5.
- Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J. and Vrijlandt, E. (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal*, **1**, 37-49.
- Martinez, E. (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol*, **50**, 925-47.
- Martinez-Garcia, J., Huq, E. and Quail, P. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**, 859-863.
- Masucci, J.D., Rerie, W.G., Foreman, D.R., Zhang, M., Galway, M.E., Marks, M.D. and Schiefelbein, J.W. (1996) The homeobox gene *GLABRA2* is required for

- position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **122**, 1253-60.
- Melcher, K. and Johnston, S.A. (1995) GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol*, **15**, 2839-48.
- Mink, S., Kerber, U. and Klempnauer, K. (1996) Interaction of C/EBPbeta and v-Myb is required for synergistic activation of the mim-1 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1316-507.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J.F. and 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.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R. and Stuver, M.H. (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1218**, 129-135.
- Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell*, **56**, 777-783.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and 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**, 1863-1878.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M. and 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**, 2099-2114.
- Noda, K.-I., Glover, B.J., Linstead, P. and Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, **369**, 661-664.
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. and 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., Hojo, H., Yoshimura, S., Zhang, R., Aimoto, S., Ametani, Y., Hirata, Z., Sarai, A. and et al. (1995) Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nat Struct Biol*, **2**, 309-20.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-648.

- Ogata, K., Sato, K. and Tahirov, T.H. (2003) Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 262.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1999) The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 3017-3333.
- Ohi, R., McCollum, D., Hirani, B., Haese, G.J.D., Zhang, X., Burke, J.D., Turner, K. and Gould, K.L. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe cdc5+* gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *The EMBO Journal*, **13**, 471-483.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J. and Marks, M.D. (1991) A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell*, **67**, 483-493.
- Pabo, C. O. and R. T. Sauer (1992). Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. Annual Reviews of Biochemistry **61**: 1053-1095.
- Payne, C.T., Zhang, F. and 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.
- Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C. and Bevan, M.W. (2001) MYB61 Is Required for Mucilage Deposition and Extrusion in the Arabidopsis Seed Coat. *The Plant Cell*, **13**, 2777-2791.
- Petrovas, C., Jeay, S., Lewis, R.E. and Sonenshein, G.E. (2003) B-Myb repressor function is regulated by cyclin A phosphorylation and sequences within the C-terminal domain. *Oncogene*, **22**, 2011-20.
- Phizicky, E., Bastiaens, P.I., Zhu, H., Snyder, M. and Fields, S. (2003) Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, **422**, 208-15.
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-689.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y. and 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. and 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., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M. and Koes, R.E. (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *The Plant Cell*, **5**, 1497-1512.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N. and Koes, R. (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J*, **13**, 475-88.
- Rajani, S. and Sundaresan, V. (2001) The Arabidopsis myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology*, **11**, 1914-1922.

- Rerie, W.G., Feldmann, K.A. and Marks, M.D. (1994) The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, **8**, 1388-1399.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., 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. and Yu, G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-10.
- Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-35.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*, **15**, 2122-33.
- Sagasser, M., Lu, G.-H., Hahlbrock, K. and 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**, 138-149.
- Sainz, M.B., Grotewold, E. and 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**, 611-625.
- Sawa, S. (2002) Overexpression of the *AtmybL2* gene represses trichome development in *Arabidopsis*. *DNA Res*, **9**, 31-4.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G. and Hülskamp, M. (2002) *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *Embo J*, **21**, 5036-46.
- Schiefelbein, J. (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 74-8.
- Schiefelbein, J.W. (2000) Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol*, **124**, 1525-31.
- Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F. and Theres, K. (2002) The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 1064-1069.
- Schneeberger, R., Tsiantis, M., Freeling, M. and Langdale, J.A. (1998) The rough sheath2 gene negatively regulates homeobox gene expression during maize leaf development. *Development*, **125**, 2857-65.
- Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jurgens, G. and Hülskamp, M. (1999) Generation of a spacing pattern: the role of *triptycon* in trichome patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 1105-16.

- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M. and Goodman, H.M. (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, **8**, 659-671.
- Singh, K.B. (1998) Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol*, **118**, 1111-20.
- Smale, S.T. (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes & Development*, **15**, 2503-2508.
- Soellick, T.R. and Uhrig, J.F. (2001) Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biol*, **2**.
- Solano, R., Fuertes, A., Sanchezpulido, L., Valencia, A. and 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**, 2889-2895.
- Stober-Grässer, U., Brydolf, B., Bin, X., Grässer, F., Firtel, R.A. and Lipsick, J.S. (1992) The Myb DNA-binding domain is highly conserved in *Dictyostelium discoideum*. *Oncogene*, **7**, 589-596.
- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 447-456.
- Taylor, L.P. and Jorgensen, R. (1992) Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *Journal of Heredity*, **83**, 11-17.
- Thompson, W.F. and White, M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 423-466.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G.R. and Arndt, K.T. (1989) BAS1 has a Myb motif and activates *HIS4* transcription only in combination with BAS2. *Science*, **246**, 931-935.
- Tonelli, C., Dolfini, S., Ronchi, A., Consonni, G. and Gavazzi, G. (1994) Light inducibility and tissue specificity of the *R* gene family in maize. *Genetica*, **94**, 225-234.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. and Shinozaki, K. (1993) An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell*, **5**, 1529-1539.
- van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. *The Plant Cell*, **4**, 253-262.
- Vom Endt, D., Kijne, J.W. and Memelink, J. (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, **61**, 107-114.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) Epidermal Cell Differentiation in *Arabidopsis* Determined by a *Myb* Homolog, *CPC*. *Science*, **277**, 1113-1116.

- Waites, R., Selvadurai, H.R., Oliver, I.R. and Hudson, A. (1998) The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell*, **93**, 779-89.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. and 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.
- Western, T.L., Skinner, D.J. and Haughn, G.W. (2000) Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol*, **122**, 345-56.
- 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. and 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**, 12432-12437.
- Wolberger, C. (1999) Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28**, 29-56.
- Ylstra, B., Tourev, A., Moreno, R.M.B., Stöger, E., van Tunen, A.J., Vicente, O., Mol, J.N.M. and Herberle-Bors, E. (1992) Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.*, **100**, 902-907.
- Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H. and Chung, I.K. (2000) Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 24208-14.
- Zawel, I. and Reinberg, D. (1993) Initiation of Transcription by RNA Polymerase II: A Multi Step Process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **44**, 67-108.
- Zhu, Y., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D. and 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**, 13419-24.

8 Anhang

8.1 Listen der Kandidaten aus den Hefe 2-Hybrid-Screens

8.1.1 bestätigte Kandidaten

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-bHLH002	At1g71030	1R MYB
IZ BD-bHLH002	At1g71030	1R MYB
IZ BD-bHLH002	At1g71030	1R MYB
IZ BD-bHLH002	At3g09820	putative adenosine kinase
IZ BD-bHLH002	At5g47720	acetoacyl-CoA-thiolase
IZ BD-bHLH002	At1g20020	ferredoxin--NADP reductase precursor, putative
IZ BD-bHLH002	At1g01380	MYB homolog (CPC), putative
IZ BD-bHLH002	At2g20870	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At1g64980	hypothetical protein
IZ BD-bHLH003	At4g12980	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At1g20100	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g43970	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At4g31340	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At4g27120	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g43910	putative methyl chloride transferase
IZ BD-bHLH003	At1g53070	protein kinase, putative
IZ BD-bHLH003	At2g22360	DnaJ like protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At3g59440	calmodulin-like protein
IZ BD-bHLH003	At2g43970	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At1g20100	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At1g10350	putative heat-shock protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At5g43750	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g01520	unknown protein
IZ BD-bHLH012	At1g71030	1R MYB
IZ BD-bHLH012	At3g27920	MYB0
IZ BD-bHLH012	At1g01380	CPC-homolog
IZ BD-bHLH012	At2g46410	CPC-Caprice

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-bHLH012	At1g56650	MYB75
IZ BD-bHLH012	At1g34370	Zink Finger protein similarity to WIP
IZ BD-bHLH012	At5g40330	MYB23
IZ BD-bHLH012	At5g24520	Ttg1
IZ BD-bHLH012	At5g14750	Werewolf
IZ BD-bHLH013	At1g72450	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g74950	expressed protein
IZ BD-bHLH013	At3g14590	hypothetical protein
IZ BD-bHLH013	At3g17860	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g72450	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g10350	putative heat-shock protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At5g20900	putative protein
IZ BD-bHLH013	At5g20900	putative protein
IZ BD-bHLH013	At5g20900	putative protein
IZ BD-bHLH013	At5g13220	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At5g13220	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At4g16430	putative transcription factor BHLH3
IZ BD-bHLH013	At1g19180	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At3g17860	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At4g16430	putative transcription factor BHLH3
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At4g16430	putative transcription factor BHLH3
IZ BD-bHLH013	At4g16430	bHLH003
IZ BD-bHLH013	At4g16430	putative transcription factor BHLH3
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH013	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH125	At1g27660	bHLH110
IZ BD-bHLH125	At1g73790	unknown protein
IZ BD-bHLH125	At5g57150	AtbHLH035
IZ BD-bHLH125	At5g57150	AtbHLH035
IZ BD-LEA	At1g20430	Unknown protein
IZ BD-LEA	At1g74910	putative GDP-mannose pyrophosphorylase
IZ BD-LEA	At3g42050	vacuolar H(+)-ATPase subunit-like protein
IZ BD-LEA	At4g23880	hypothetical protein
IZ BD-LEA	At2g27680	Unknown protein
IZ BD-LEA	At2g20890	Unknown protein
IZ BD-LEA	At2g29560	putative enolase

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-LEA	At2g33210	mitochondrial chaperonin (HSP60)
IZ BD-LEA	At5g57990	ubiquitin-specific protease 23 (UBP23)
IZ BD-LEA	At3g16840	ATP-dependent RNA helicase
IZ BD-MYB111	At4g40030	histone H3.3
IZ BD-MYB111	At5g43870	putative protein
IZ BD-MYB111	At5g10860	putative protein
IZ BD-MYB111	At1g73500	MAP-Kinase, put.
IZ BD-MYB123	At5g38630	cytochrome b-561
IZ BD-MYB123	At3g56580	putative protein
IZ BD-MYB123	At1g18080	hypothetical protein
IZ BD-MYB123	At2g18980	peroxidase (ATP22a)
IZ BD-MYB123	At1g01530	hypothetical protein
IZ BD-MYB26	At5g42470	brain and reproductive organ-expressed protein-like
IZ BD-MYB26	At5g06860	polygalacturonase inhibiting protein 1; PGIP1
IZ BD-MYB26	At5g66100	putative protein
IZ BD-MYB26	At4g18340	beta-1,3-glucanase-like protein
IZ BD-MYB4	At1g44100	amino acid permease AAP5
IZ BD-MYB4	At2g17420	putative thioredoxin reductase
IZ BD-MYB4	At3g15640	putative cytochrome c oxidase subunit Vb
IZ BD-MYB4	At3g06800	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At4g35630	phosphoserine aminotransferase
IZ BD-MYB4	At4g32520	glycine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1) - like prot
IZ BD-MYB4	At1g22050	F2E2.12
IZ BD-MYB4	At3g06350	putative dehydroquinase shikimate dehydrogenase
IZ BD-MYB4	At1g47128	cysteine proteinase RD21A
IZ BD-MYB4	At4g19700	putative protein
IZ BD-MYB4	At5g54940	translation initiation factor-like protein
IZ BD-MYB4	At5g53400	unknown protein
IZ BD-MYB4	At3g24770	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At3g13222	unknown protein
IZ BD-MYB4	At2g35790	unknown protein
IZ BD-MYB4	At1g65290	unknown protein acyl-carrier-protein
IZ BD-MYB4	At1g33860	unknown protein
IZ BD-MYB42	At1g22850	unknown protein
IZ BD-MYB42	At1g64220	hypothetical protein
IZ BD-MYB42	At4g19210	RNase L inhibitor-like protein
IZ BD-MYB6	At4g19700	putative protein; identisch zu 248_27
IZ BD-MYB6	At1g06550	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase, putative
IZ BD-MYB6	At5g08130	myc-like protein
IZ BD-MYB6	At4g19700	putative protein; identisch zu 248_27
IZ BD-MYB6	At3g03030	unknown protein
IZ BD-MYB6	At2g46550	unknown protein
IZ BD-MYB6	At2g44060	similar to late embryogenesis abundant proteins
IZ BD-MYB78	At3g49470	alpha NAC-like protein
IZ BD-MYB78	At1g11600	putative cytochrome P450

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB78	At1g06210	unknown protein
IZ BD-MYB78	At5g60620	putative protein
IZ BD-MYB78	At1g62380	hypothetical protein
IZ BD-MYB95	At1g10180	unknown protein
IZ BD-MYB95	At2g20800	putative NADH-ubiquinone oxireductase
IZ BD-Myc-like	At3g23570	unknown protein
IZ BD-WIP3	At2g02470	putative PHD-type zinc finger protein

8.1.2 bisher unbestätigte Kandidaten

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-bHLH002	At3g04760	putative protein
IZ BD-bHLH002	At5g35550	MYB-related transcription factor LBM2-like protein; MYB123
IZ BD-bHLH002	At5g47720	acetoacyl-CoA-thiolase
IZ BD-bHLH002	At1g56650	transcription factor MYB75
IZ BD-bHLH002	At5g02590	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At2g46510	bHLH017
IZ BD-bHLH003	At2g16900	expressed protein
IZ BD-bHLH003	At5g33320	PEP translocator
IZ BD-bHLH003	At5g46110	Phosphate Triosephosphate translocator
IZ BD-bHLH003	At4g09650	H ⁺ ATPase
IZ BD-bHLH003	At1g74950	expressed protein
IZ BD-bHLH003	At3g10850	hydroxyacylglutathione hydrolase cytoplasmic (glyoxalase II)
IZ BD-bHLH003	At1g01260	bHLH013
IZ BD-bHLH003	At4g02120	CTP synthase-like protein
IZ BD-bHLH003	At3g12140	unknown protein
IZ BD-bHLH003	At5g38410	RUBISCO SSU
IZ BD-bHLH005	At1g74950	expressed protein
IZ BD-bHLH005	At1g33040	expressed protein
IZ BD-bHLH005	At1g70700	unknown protein
IZ BD-bHLH005	At5g20900	putative protein
IZ BD-bHLH005	At3g15353	expressed protein
IZ BD-bHLH012	At2g30420	TRY-like
IZ BD-bHLH012	At1g32920	expressed protein
IZ BD-bHLH013	At4g16430	bHLH003
IZ BD-bHLH013	At1g70700	hypothetical protein
IZ BD-bHLH013	At5g20900	putative protein
IZ BD-bHLH013	At1g74950	expressed protein
IZ BD-bHLH013	At1g19180	expressed protein
IZ BD-bHLH042	At5g28540	luminal binding protein
IZ BD-bHLH042	At1g68530	very-long-chain fatty acid condensing enzyme (CUT1)
IZ BD-bHLH042	At3g04560	unknown protein
IZ BD-bHLH042	At4g24620	glucose-6-phosphate isomerase

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-bHLH042	At1g69770	putative chromomethylase
IZ BD-bHLH042	At3g27690	putative chlorophyll A-B binding protein
IZ BD-bHLH042	At4g30600	signal recognition particle receptor-like protein
IZ BD-bHLH042	At3g10980	unknown protein
IZ BD-bHLH042	At3g61870	putative protein
IZ BD-bHLH042	At3g27240	cytochrome c, putative
IZ BD-bHLH042	At3g53560	putative protein
IZ BD-bHLH042	At1g72610	germin-like protein
IZ BD-bHLH042	At4g21650	subtilisin proteinase - like
IZ BD-bHLH042	At2g30570	photosystem II reaction center 6.1KD protein
IZ BD-bHLH042	At1g64880	hypothetical protein
IZ BD-bHLH042	At1g23190	putative phosphoglucomutase
IZ BD-bHLH042	At1g30820	CTP synthase-like protein
IZ BD-bHLH042	At1g51760	hypothetical protein
IZ BD-bHLH042	At5g11200	DEAD BOX RNA helicase RH15
IZ BD-bHLH042	At4g22780	Translation factor EF-1 alpha - like protein
IZ BD-bHLH042	At5g43280	enoyl CoA hydratase-like protein
IZ BD-bHLH042	At1g12730	hypothetical protein
IZ BD-bHLH125	At4g29930	bHLH transcription factor (bHLH027)
IZ BD-bHLH125	At4g29100	putative bHLH transcription factor (bHLH068)
IZ BD-bHLH125	At1g17470	developmentally regulated GTP-binding protein
IZ BD-bHLH125	At3g04760	putative protein
IZ BD-bHLH125	At4g29930	bHLH transcription factor (bHLH027)
IZ BD-bHLH125	At2g46510	bHLH017
IZ BD-bHLH125	At5g57150	bHLH035
IZ BD-bHLH125	At1g29920	photosystem II CABP
IZ BD-LEA	At1g30270	serine/threonine kinase, putative CBL-interacting protein kinase 23
IZ BD-LEA	At3g17020	unknown protein
IZ BD-LEA	At3g08580	adenylate translocator
IZ BD-LEA	At5g65140	trehalose-6-phosphate phosphatase
IZ BD-LEA	At5g25800	exonuclease - like protein
IZ BD-MYB109	At1g07920	elongation factor 1-alpha
IZ BD-MYB109	At5g53650	unknown protein
IZ BD-MYB109	At4g02520	Atpm24.1 glutathione S transferase
IZ BD-MYB109	At2g41430	dehydration-induced protein (ERD15)
IZ BD-MYB109	At1g18250	hypothetical protein
IZ BD-MYB109	At1g20620	hypothetical protein
IZ BD-MYB109	At5g57580	calmodulin-binding protein
IZ BD-MYB109	At5g38650	putative protein
IZ BD-MYB109	At5g26360	chaperonin gamma chain - like protein
IZ BD-MYB109	At2g03780	unknown protein
IZ BD-MYB109	At4g12230	putative protein
IZ BD-MYB109	At1g08450	calreticulin, putative

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB109	At3g26420	RNA-binding protein
IZ BD-MYB109	At1g60710	auxin-induced atb2
IZ BD-MYB109	At3g16640	translationally controlled tumor protein-like protein
IZ BD-MYB109	At4g01000	putative protein
IZ BD-MYB109	At2g21660	glycine-rich RNA binding protein
IZ BD-MYB109	At4g29190	putative protein
IZ BD-MYB109	At3g53190	pectate lyase -like protein
IZ BD-MYB109	At4g03320	putative chloroplast protein import component
IZ BD-MYB109	At5g21100	ascorbate oxidase
IZ BD-MYB109	At3g04520	L-allo-threonine aldolase, putative
IZ BD-MYB109	At5g13450	delta subunit of mitochondrial F1-ATPase
IZ BD-MYB109	At1g14890	unknown protein
IZ BD-MYB111	At3g62290	ADP-ribosylation factor-like protein
IZ BD-MYB111	At5g22280	putative protein
IZ BD-MYB111	At1g14870	unknown protein
IZ BD-MYB112	At4g19200	putative protein
IZ BD-MYB112	At5g53560	cytochrome b5
IZ BD-MYB112	At2g37120	unknown protein
IZ BD-MYB112	At3g55710	glucuronosyl transferase - like protein
IZ BD-MYB112	At3g19450	cinnamyl alcohol dehydrogenase
IZ BD-MYB112	At2g19350	unknown protein
IZ BD-MYB112	At1g21740	putative bzip-like transcription factor
IZ BD-MYB112	At3g12390	hypothetical protein
IZ BD-MYB112	At5g24770	vegetative storage protein Vsp2
IZ BD-MYB112	At1g20450	hypothetical protein
IZ BD-MYB112	At4g28390	ADP,ATP carrier-like protein
IZ BD-MYB112	At2g22260	hypothetical protein
IZ BD-MYB112	At4g01850	S-adenosylmethionine synthase 2
IZ BD-MYB116	At5g53290	putative protein
IZ BD-MYB116	At3g10850	glyoxalase II
IZ BD-MYB116	At4g13430	putative protein
IZ BD-MYB116	At1g12880	hypothetical protein
IZ BD-MYB118	At1g31320	hypothetical protein
IZ BD-MYB118	At3g16640	translationally controlled tumor protein-like protein
IZ BD-MYB118	At1g12270	hypothetical protein
IZ BD-MYB118	At4g15800	OEP8 like protein
IZ BD-MYB118	At5g19760	oxoglutarate/malate translocator-like protein
IZ BD-MYB118	At4g00210	hypothetical protein
IZ BD-MYB118	At5g66070	putative protein
IZ BD-MYB118	At1g73010	hypothetical protein
IZ BD-MYB118	At3g08030	unknown protein
IZ BD-MYB118	At5g66070	putative protein
IZ BD-MYB118	At4g32940	gamma-VPE (vacuolar processing enzyme)

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB118	At3g04730	auxin-induced protein; IAA16
IZ BD-MYB121	At2g17700	putative protein kinase
IZ BD-MYB122	At5g01410	pyridoxine biosynthesis
IZ BD-MYB122	At3g28940	AIG2-like protein
IZ BD-MYB122	At1g74530	unknown protein
IZ BD-MYB122	At1g20270	hypothetical protein
IZ BD-MYB122	At4g19980	hypothetical protein
IZ BD-MYB122	At2g43280	hypothetical protein
IZ BD-MYB122	At1g58350	hypothetical protein
IZ BD-MYB122	At2g42680	unknown protein
IZ BD-MYB122	At3g55440	cytosolic triosephosphatisomerase
IZ BD-MYB122	At4g31500	cytochrome P450 monooxygenase
IZ BD-MYB123	At4g26110	nucleosome assembly protein I-like protein
IZ BD-MYB123	At1g15690	hypothetical protein
IZ BD-MYB123	At5g55660	putative protein
IZ BD-MYB123	At2g38530	putative nonspecific lipid-transfer protein
IZ BD-MYB26	At1g09630	putative RAS-related protein
IZ BD-MYB26	At5g48480	unknown protein
IZ BD-MYB26	At5g08300	succinyl-CoA-ligase alpha subunit
IZ BD-MYB26	At2g46170	unknown protein
IZ BD-MYB26	At5g05670	signal recognition particle receptor beta subunit-like protein
IZ BD-MYB26	At4g38670	putative thaumatin-like protein
IZ BD-MYB26	At5g20010	RAN1 small Ras-like GTP-binding nuclear protein (Ran-1)
IZ BD-MYB26	At5g42850	unknown protein
IZ BD-MYB26	At5g10430	AtAGP4 polysaccharide biosynthesis; A02
IZ BD-MYB26	At4g32240	putative protein
IZ BD-MYB26	At2g36530	enolase (2-phospho-D-glycerate hydroylase)
IZ BD-MYB26	At4g30190	H ⁺ -transporting ATPase type 2
IZ BD-MYB26	At5g05980	tetrahydrofolylpolyglutamate synthase-like protein
IZ BD-MYB26	At4g03560	putative calcium channel
IZ BD-MYB26	At1g54580	acyl-carrier protein (ACP)
IZ BD-MYB26	At1g80460	putative glycerol kinase
IZ BD-MYB26	At2g29200	putative pumilio/Mpt5 family RNA-binding protein
IZ BD-MYB26	At3g19130	RNA binding protein
IZ BD-MYB26	At5g23690	putative protein
IZ BD-MYB26	At5g13490	adenosine nucleotide translocator
IZ BD-MYB26	At1g80300	adenine nucleotide translocase
IZ BD-MYB26	At1g63940	putative monodehydroascorbate reductase
IZ BD-MYB26	At5g55280	cell division protein FtsZ chloroplast homolog precursor
IZ BD-MYB3R-3a	At5g12330	lateral root primordia (LRP1)
IZ BD-MYB3R-3a	At1g19530	unknown protein
IZ BD-MYB3R-3a	At4g34700	putative protein
IZ BD-MYB3R-3a	At5g01840	putative protein

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB3R-3a	At2g31440	unknown protein
IZ BD-MYB3R-3a	At1g79830	unknown protein
IZ BD-MYB3R-3a	At5g21090	leucine-rich repeat protein
IZ BD-MYB3R-3a	At1g54020	hypothetical protein; doppelt bei 252_64
IZ BD-MYB3R-3a	At4g39260	glycine-rich protein (clone AtGRP8
IZ BD-MYB3R-3a	At1g57720	?translation elongation factor eEF-1?like
IZ BD-MYB3R-3a	At4g09000	14-3-3-like protein
IZ BD-MYB3R-3a	At5g05180	putative protein
IZ BD-MYB3R-3a	At1g34350	hypothetical protein
IZ BD-MYB3R-3a	At2g18440	unknown protein
IZ BD-MYB3R-3a	At5g04810	membrane-associated salt-inducible protein-like
IZ BD-MYB3R-3a	At2g18090	unknown protein
IZ BD-MYB3R-3a	At5g14660	putative protein
IZ BD-MYB3R-3b	At1g08820	hypothetical protein
IZ BD-MYB3R-3b	At1g47860	hypothetical protein
IZ BD-MYB3R-3b	At3g21890	CONSTANS B-box-like
IZ BD-MYB3R-3b	At5g61200	putative protein
IZ BD-MYB3R-3b	At3g15353	expressed protein
IZ BD-MYB3R-3b	At3g60600	putative protein
IZ BD-MYB3R-3b	At5g15230	GASA4
IZ BD-MYB3R-3b	At4g12650	putative protein
IZ BD-MYB3R-3b	At1g16850	hypothetical protein
IZ BD-MYB3R-3b	At3g58040	putative protein
IZ BD-MYB4	At1g14530	unknown protein
IZ BD-MYB4	At3g53470	putative protein
IZ BD-MYB4	At4g36980	unknown protein
IZ BD-MYB4	At3g03750	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At4g39350	cellulose synthase catalytic subunit
IZ BD-MYB4	At1g70330	unknown protein
IZ BD-MYB4	At5g02560	putative protein
IZ BD-MYB4	At5g05010	coatomer delta subunit (delta-coat protein) (delta-COP)
IZ BD-MYB4	At4g35800	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) II largest chain
IZ BD-MYB4	At5g05010	coatomer delta subunit (delta-coat protein) (delta-COP)
IZ BD-MYB4	At3g19390	putative cysteine proteinase RD21A precursor
IZ BD-MYB4	At1g71130	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At3g25070	contains similarity to nitrate-induced NOIprotein~gene_id:MJL12.1
IZ BD-MYB4	At1g56690	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At4g30200	putative protein
IZ BD-MYB4	At5g42620	major surface like glycoprotein
IZ BD-MYB42	At4g35100	plasma membrane intrinsic protein (SIMIP)
IZ BD-MYB42	At5g15920	putative protein
IZ BD-MYB42	At5g36940	cationic amino acid transporter -like protein
IZ BD-MYB42	At1g68290	putative bifunctional nuclease

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB42	At3g54820	aquaporin/MIP - like protein
IZ BD-MYB42	At1g67150	hypothetical protein
IZ BD-MYB42	At2g30410	putative TCP1-chaperonin cofactor A
IZ BD-MYB42	At4g26410	putative protein
IZ BD-MYB42	At3g16640	translationally controlled tumor protein-like protein
IZ BD-MYB42	At1g55510	branched-chain alpha-keto acid decarboxylase E1 beta subunit
IZ BD-MYB42	At1g72880	hypothetical protein
IZ BD-MYB42	At1g30230	elongation factor 1-beta, putative
IZ BD-MYB42	At5g52900	unknown protein
IZ BD-MYB42	At5g16470	putative protein
IZ BD-MYB42	At1g69530	hypothetical protein
IZ BD-MYB44	At1g04820	tubulin alpha
IZ BD-MYB44	At1g27730	salt tolerance zinc finger
IZ BD-MYB4R	At3g07780	expressed protein
IZ BD-MYB4R	At1g52410	Myosin-like
IZ BD-MYB4R	At3g12920	expressed protein
IZ BD-MYB6	At1g47128	cysteine proteinase
IZ BD-MYB6	At5g22290	NAM (no apical meristem)-like protein
IZ BD-MYB6	At2g01470	putative protein transport protein SEC12p
IZ BD-MYB6	At1g27730	salt tolerance zinc finger
IZ BD-MYB6	At5g61200	putative protein
IZ BD-MYB6	At2g01690	expressed protein
IZ BD-MYB6	At4g20360	translation elongation factor EF-Tu precursor, chloroplast
IZ BD-MYB6	At5g45100	putative protein
IZ BD-MYB73	At5g15230	GAST1 protein homolog (clone GASA4)
IZ BD-MYB73	At2g29980;	omega-3 fatty acid desaturase
IZ BD-MYB75_ohne AD	At5g16720	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g54350	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At1g31160	protein kinase C inhibitor like protein(Zinc-binding protein)
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g19700	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At1g14980	mitochondrial chaperonin 10
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g27620	unknown protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At5g45100	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g53620	inorganic pyrophosphatase -like protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g19700	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g58220	unknown protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g19700	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g19700	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g58930	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At5g61200	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g16630	kinesin-like protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g12920	unknown protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At2g25510	unknown protein

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-MYB75_ohne AD	At4g24110	unknown protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At5g45100	putative protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At5g58320	contains similarity to unknown protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At3g45240	putative protein kinase
IZ BD-MYB78	At1g09640	unknown protein
IZ BD-MYB78	At5g20830	sucrose-UDP glucosyltransferase
IZ BD-MYB78	At3g08030	unknown protein
IZ BD-MYB78	At3g11780	unknown protein
IZ BD-MYB78	At5g15230	GASA4
IZ BD-MYB78	At3g02230	reversibly glycosylated polypeptide-1
IZ BD-MYB88	At3g13650	dirigent protein, putative
IZ BD-MYB88	At3g57610	adenylosuccinate synthetase
IZ BD-MYB88	At4g16440	LET1 like protein
IZ BD-MYB88	At3g08030	unknown protein
IZ BD-MYB88	At5g58920	putative protein
IZ BD-MYB88	At1g62380	hypothetical protein1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
IZ BD-MYB95	At5g12170	putative protein
IZ BD-MYB95	At3g58600	putative protein
IZ BD-MYB95	At1g80460	putative glycerol kinase
IZ BD-MYB95	At4g15640	hypothetical protein
IZ BD-MYB95	At5g54970	putative protein
IZ BD-MYB95	At5g56680	SYNC1 protein
IZ BD-MYB95	At3g16640	translationally controlled tumor protein-like protein
IZ BD-MYB95	At5g23460	unknown protein
IZ BD-Myc-like	At1g15690	hypothetical protein
IZ BD-Myc-like	At3g44310	nitrilase 1
IZ BD-Myc-like	At4g20150	putative protein
IZ BD-Myc-like	At4g20150	putative protein
IZ BD-Myc-like	At4g13940	adenosylhomocysteinase
IZ BD-Myc-like	At4g21120	amino acid transport protein AAT1
IZ BD-Myc-like	At1g77840	putative eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF-5)
IZ BD-Myc-like	At1g14900	linker histone protein, putativeHMG-I/Y protein
IZ BD-Myc-like	At5g63440	unknown protein
IZ BD-Myc-like	At4g15160	cell wall protein like
IZ BD-Myc-like	At5g54510	auxin-responsive-like protein
IZ BD-Myc-like	At5g11010	putative protein
IZ BD-Myc-like	At3g14160	unknown protein
IZ BD-Myc-like	At2g39770	GDP-mannose pyrophosphorylaseCYT1 protein
IZ BD-Myc-like	At3g57150	putative protein
IZ BD-Myc-like	At5g51820	phosphoglucumutase
IZ BD-Myc-like	At5g64350	immunophilin
IZ BD-Myc-like	At2g47170	ADP-ribosylation factor 1
IZ BD-Myc-like	At5g25280	serine-rich protein

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-Myc-like	At3g07470	unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g20100	similar to unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g03470	F21B7.9 hypoth. protein
IZ BD-WIP1	At4g15970	regulatory protein
IZ BD-WIP1	At2g41250	hypothetical protein
IZ BD-WIP1	At4g29950	putative protein
IZ BD-WIP1	At5g14520	pescadillo - like protein
IZ BD-WIP1	At5g17920	cobalamin-independent methionine synthase
IZ BD-WIP1	At3g08610	unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g72630	hypothetical protein
IZ BD-WIP1	At5g65660	unknown protein
IZ BD-WIP1	At2g01720	putative ribophorin I
IZ BD-WIP1	At1g55920	serine acetyltransferase
IZ BD-WIP1	At4g13640	MYB-like
IZ BD-WIP1	At2g2494	probable steroid binding protein At2g24940
IZ BD-WIP1	At1g58360	neutral amino acid transport system II amino acid permease I
IZ BD-WIP1	At5g63130	gene_id:MDC12.9~unknown protein
IZ BD-WIP1	At3g49720	hypothetical protein
IZ BD-WIP1	At5g26030	ferrochelatase-I (in Chloroplast/Mitochondria)
IZ BD-WIP1	At1g75750	GAST1 protein homolog/ unknown protein
IZ BD-WIP1	At5g17920	cobalamin-independent methionine synthase
IZ BD-WIP1	At1g27390	putative protein receptor, TOM20-like protein (geringere Homologie)
IZ BD-WIP1	At4g38040	putative protein
IZ BD-WIP1	At2g31200	actin depolymerizing factor 6
IZ BD-WIP1	At2g30490	cinnamate-4-hydroxylase
IZ BD-WIP1	At5g65660	gene_id:K21L13.18~unknown protein
IZ BD-WIP1	At3g46010	actin depolymerizing factor 1 (ADF1)
IZ BD-WIP1	At3g62250	ubiquitin extension protein (UBQ5)
IZ BD-WIP1	At4g29950	putative protein
IZ BD-WIP1	At1g79550	Member of Phosphoglycerate kinase family
IZ BD-WIP1	At5g43760	beta-ketoacyl-CoA synthase
IZ BD-WIP1	At1g60270	Glukosidase-like?
IZ BD-WIP1	At2g33220	unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g18060	unbekanntes Protein
IZ BD-WIP1	At3g19740	ATPase, putative
IZ BD-WIP1	At5g47060	putative protein
IZ BD-WIP1	At3g13940	unknown protein
IZ BD-WIP1	At3g17800	unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g67840	unknown protein
IZ BD-WIP1	At1g47840	hexokinase, putative
IZ BD-WIP1	At3g24140	helix-loop-helix DNA-binding protein
IZ BD-WIP1	At5g33370	putative protein
IZ BD-WIP1	At5g35160	putative protein

8 Anhang

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-WIP2	At4g16520	symbiosis-related like protein
IZ BD-WIP2	At1g30070	unknown protein
IZ BD-WIP2	At1g79550	member of the PF 00162 Phosphoglycerate kinase family.
IZ BD-WIP2	At1g68360	putative zinc finger protein
IZ BD-WIP2	At3g43220	hypothetical protein F7K15.70 PF02383 SacI homology domain
IZ BD-WIP2	At1g52070	Similar to gi 3413714 T19L18.21 putative myrosinase-binding protein
IZ BD-WIP2	At3g5426	hypothetical protein F24B22.220
IZ BD-WIP2	At5g04430	putative RNA-binding protein
IZ BD-WIP2	At4g15910	drought-induced protein like
IZ BD-WIP2	At4g05180	Oxygen-evolving enhancer protein 3 precursor - like protein
IZ BD-WIP2	At5g40660	putative protein
IZ BD-WIP2	At3g62290	ADP-ribosylation factor-like protein
IZ BD-WIP2	At5g66760	succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit
IZ BD-WIP2	g9295717	T24P13.1(sim.put. initiation factor 5A (eIF-5A)
IZ BD-WIP2	At3g02050	putative potassium transporter
IZ BD-WIP2	At4g37940	AGAMOUS-LIKE MADS BOX PROTEIN
IZ BD-WIP2	At2g25520	putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein
IZ BD-WIP2	At3g15620	Arabidopsis thaliana gene for 6-4 photolyase
IZ BD-WIP2	g8134566	cobalamin-independent methionine synthase
IZ BD-WIP2	At5g47080	essential role in the control of cell division and differentiation
IZ BD-WIP2	g9994099	hypothetical protein
IZ BD-WIP2	g402904	laminin receptor-like protein; rib. Prot.
IZ BD-WIP3	At1g44820	Contains similarity to aminoacylase from <i>Sus scrofa domestica</i>
IZ BD-WIP3	At4g28570	putative protein
IZ BD-WIP3	At5g43870	unknown protein
IZ BD-WIP3	At1g48490	transcription factor IRE, Kinase
IZ BD-WIP3	At4g27180	kinesin-related protein katB
IZ BD-WIP3	At5g61820	MtN19-like protein unknown
IZ BD-WIP3	At3g16640	translationally controlled tumor protein-like
IZ BD-WIP3	At5g47220	AtERF2ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2
IZ BD-WIP3	At5g61200	putative protein
IZ BD-WIP3	At4g29040	26S proteasome subunit 4-like protein
IZ BD-WIP3	At5g19240	putative protein
IZ BD-WIP3	At4g29040	proteasome subunit 4-like protein
IZ BD-WIP3	At2g33210	mitochondrial chaperonin (HSP60)
IZ BD-WIP3	At1g72160	cytosolic factor, putative
IZ BD-WIP3	At4g16120	hypothetical proteinputative cell wall protein GPI-anchored protein
IZ BD-WIP3	At3g27690	putative chlorophyll A-B binding protein

8.1.3 Autoaktivierende AD-Fusionen

Bait-Name	MIPS Identifikation	sonstiges
IZ BD-LEA	At5g12890	glucosyltransferase -like protein
IZ BD-LEA	At3g42170	putative transposase
IZ BD-MYB26	At5g43060	cysteine protease component of protease-inhibitor complex
IZ BD-MYB4	At4g16770	gibberellin oxidase-like protein
IZ BD-MYB4	At1g07960	similar to protein disulfide isomerase
IZ BD-MYB4	At5g43060	cysteine protease component of protease-inhibitorcomplex
IZ BD-MYB4	At3g23160	hypothetical protein
IZ BD-MYB4	At3g22990	gene_id:MXC7.2~unknown protein
IZ BD-MYB4	At5g53850	putative protein
IZ BD-MYB4	At4g10110	putative protein
IZ BD-MYB73	At4g15880;	hypothetical protein
IZ BD-MYB73	At3g62290;	ADP-ribosylation factor-like protein
IZ BD-MYB75_ohne AD	At1g07960	unknown protein
IZ BD-WIP3	At5g55070	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 subunit
IZ BD-WIP3	At5g43060	cysteine protease component of protease-inhibitor complex

8.2 Oligonukleotide

Oligo-Nr	Oligo-Name	Sequenz
AO0044	pCACT_3-Ende	GAATTAGCTTGGCTGCAGGT
AO005	ENTR_FW	CTCGGGCCCCAAATAATGAT
AO006	i-ENTRrev	GGCCAGAGCTGCAGCTGGAT
AO015	pBD-3Ende	GAAAGCAACCTGACCTACAGGAAAGAG
AO018	AD5-recom-MunI	GAGAGACAATTGGTATATACTATCTATTTCGATG
AO026	pGEX-5neu	GTGGTGGCGACCATCCTCCAA
AO027	pGEX-3	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG
IZ0019	ATMYB12_ATT B1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGGATCCATGGGAAGAGCGCCA TGTTG
IZ0020	ATMYB12_ATT B2_REV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGCTGATCATGACAGAAGCCAA GCGAC
IZ0021	i-ENTRrev	GGCCAGAGCTGCAGCTGGAT
IZ0022	ENTR_FW	CTCGGGCCCCAAATAATGAT
IZ0023	AT-FW-pBT8	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGGACCTCGAGTGGCCACCATG
IZ0024	AT-rev-pBT8	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATTACTCATGATCCACCGGT
IZ0025	MYB12-D-fw-Primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGCCGTAACCTCCACAAC
IZ0026	GW-MYBIZ30 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAATTCATGGTGAGGCCTCCTT GTTGT
IZ0027	GW-MYBIZ30 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATCCTCAGAAGAAATTAGTGTT TTCATCC
IZ0028	GW-MYB6 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGAAGATCTCCTTGTTG

8 Anhang

Oligo-Nr	Oligo-Name	Sequenz
IZ0029	GW-MYB6 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCAGTTACAACAGTGACAAAACGC GC
IZ0031	GW-MYB3R fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAATTCATGAAGCGTGAGATGAA AGC
IZ0032	GW-MIZ13rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACAGCTATGACCATG
IZ0042	GW-pLEAfw	(GWF)CCATGGCCATGTCGACATCTGAGGATAAACC
IZ0043	pGW-LEA-rev	(GWR)GGATCCGCTATAAGCAAAGAAAAGAATATATAGG
IZ0048	attB1-MYB73	(GWF)TAATGTCAAACCCGACCCGTAAG
IZ0052	attB1-MYB73	(GWF)TAATGTCAAACCCGACCCGTAAG
IZ0068	gw-MYB-REGIA-ATG	(GWF)CATTCCAGCTGACCACCATG
IZ0069	gw-MYB-REGIA-rev	(GWR)ATCCCCGGAATTGCCATGGYA
IZ0074	GW-AtERF2-fw	(GWF)CCATGTACGGACAGTGCAATATAGA
IZ0075	GW-AtERF2-rev	(GWR)CTTATGAAACCAATAACTCATCAACAC
IZ0080	Myc-I fw	(GWR)ATACTGTCCCGTCTTGAGCCGT
IZ0081	Myc-I-rev	(GWF)GGATGGAGCTTCCTCAACCTCG
IZ0107	GWMYB75-1	GGGGAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGCT GC
IZ0108	GTW-MYB75-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAATCAAATTCACAGTCTCTCCA TCG
IZ0109	GTW-MYB90-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTT GAGG
IZ0110	GTW-MYB90-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAACGGTGAGAAACACTAATCAA GTTC
IZ0111	MYB75-mut-fw	GAGAGACCTAGGAATAGGTGGTCTTTAATTGCTGGAAGATTACC
IZ0112	MYB75L80Arev	GAGAGACCTAGGGCCCTATGAAGGCGAAGAAGAAGATCGACTTCATCAGAGC
IZ0113	MYB75R79Srev	GAGAGACCTAGGAGGCTATGAAGGCGAAGAAGAAGATCGACTTCATCAGAGC
IZ0114	MYB75L73Irev	GAGAGACCTAGGAGCCTATGAAGGCGAAGAAGAATATCGACTTCATCAGAGC
IZ0115	MYB75R76E_R76Krev	GAGAGACCTAGGAGCCTATGAAGCTYAAGAAGAAGATCGACTTCATCAGAGC
IZ0135	RT_MYB75_fw	GTTCTGTAAGAGCTGGGCT
IZ0136	RT_MYB75_rev	CTAATCAAATTCACAGTCTCTCCA
IZ0137	RT_MYB90_fw	GCTTCTAGGAAATAGCTAGG
IZ0138	RT_MYB90_rev	CTAATCAAGTTCAACAGTCTCTCC
IZ0139	GW_M75_111KStop	(GWR)CTACAGCAATTAAGACCACCTATTC
IZ0140	GW_M75_K122Stop	(GWR)TCATGACGTCATTTGCGGTCCGAC
IZ0141	GW_M75_G198Stop	(GWR)TCATGTCACAAACATTATTGATGTTAAGTCC
IZ0142	I142-RT-MYB90_fw	ATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGT
IZ0143	I143-RT-MYB90_rev	CTAATCAAGTTCAACAGTCTCTC
IZ0144	I144-RT_MYB75-fw	ATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
IZ0145	I145-RT-MYB75_rev	CTAATCAAATTCACAGTCTCTC
IZ0146	I146-RT-MYB113_fw	ATGGGCGAATCACCCAAAGG
IZ0147	I147-RT-MYB113_rev	CTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTC
IZ0148	I148-RT-bHLH002_fw	CAATGGCAACCGGAGAAAACAG
IZ0149	RT-bHLH002_rev	GCACCACCATCGTTGATGAACG
IZ0150	I150-RT-bHLH001_fw	ATGGCTACCGGACAAAACAGAAC

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, 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; 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.

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

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Joachim Uhrig für die engagierte Betreuung und intensive Unterstützung dieser Arbeit. Vielen Dank für die stets hilfreichen Diskussionen und die tolle Zusammenarbeit!

Dr. Bernd Weißhaar möchte ich danken für die Unterstützung und Ermutigung während meiner Arbeit und die ermöglichte Teilnahme an verschiedenen Konferenzen und der „Insel-Exkursion“.

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

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

Ich möchte allen danken, die mich während meiner Arbeit hier unterstützt haben. Im Besonderen Marc A. Heim, der mich in die Transformation von Arabidopsis-Zellkulturen eingewiesen hat und Marc Jakoby, Gieta Dewal, Ralf Stracke und Frank Mehrrens, die mir stets hilfreiche Tipps und Vektoren gegeben haben. Vielen Dank auch Martin Sagasser, der mir die WIP-Vektoren zur Verfügung gestellt hat. Ich möchte allen Mitarbeitern der AG Uhrig danken, insbesondere Ulrike Unte und meinem ehemaligen Mitarbeiter Tim R. Soellick, die mich während meiner Arbeit des öfteren unterstützt und immer mal wieder ein nettes Protokoll für mich hatten.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Peter Schreier, der stets Interesse für meine Arbeit gezeigt hat, und den ehemaligen Mitarbeitern der AG Schreier Gregor Bucher und Christoph Rudolph, mit denen ich eine Menge Spaß hatte!

Besonders möchte ich mich außerdem bei Wolfgang Schmalenbach für die praktische Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Weißhaar sowie der ADIS danke ich für die schönen Stunden bei gemeinsamen Aktivitäten auf Amrum und in der Eifel!

