

**Analyse von *transparent-testa*-Mutanten aus  
*Arabidopsis thaliana***

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Martin Sagasser**

aus Braunschweig

angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung  
Köln 2000

*Für Bettina*

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bernd Weißhaar  
Prof. Dr. Hansjörg Schneider-Poetsch  
Prof. Dr. Klaus Hahlbrock

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2000

## Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* mittels Promotorstudien sowie durch die Charakterisierung von *transparent-testa*-Mutanten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält. Damit stehen nun Mutanten für alle Schritte der Biosynthese der Flavonole zur Verfügung. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, daß die an diesem Stoffwechselweg beteiligten Gene nach Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht koordiniert exprimiert werden. Diese Lichtinduktion wird bei *CHS*, *CFI* und *FLS* durch ein ACGT-Element und ein MYB-Erkennungselement im Promotor vermittelt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung des *F3H*-Promotors zeigte, daß dieser eine andersartige Struktur aufweist, für die Lichtinduktion der *F3H*-Expression jedoch die gleichen *cis*-Elemente benötigt. Die Beteiligung gleicher *cis*-Elemente an der Lichtinduktion aller untersuchten Gene spricht dafür, daß deren Expression durch die gleichen *trans*-Faktoren reguliert wird.

Weiterhin konnte mit *tt15* eine neue *A. thaliana* Mutante charakterisiert werden. In vegetativen Teilen dieser Mutante waren die Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese sowie die Gehalte an Flavonoiden gegenüber dem Wildtyp unverändert. *tt15*-Samen dagegen enthielten im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger Cyanidin und Quercetin. Das spricht dafür, daß das in dieser Mutante defekte Gen für einen samenspezifischen Regulator der Flavonoidbiosynthese oder für ein Enzym der Synthese kondensierter Tannine kodiert.

In den Samen der *tt1*-Mutante fehlte Cyanidin vollständig. Mit Hilfe einer *A. thaliana* Linie, die eine Insertion eines Transposons am *tt1*-Lokus trug, konnte das *TT1*-Gen isoliert werden. Die Identität dieses Gens wurde durch Komplementation der *tt1*-Mutation bestätigt. Mittels RT-PCR und Promotor-GUS-Fusionen konnte gezeigt werden, daß *TT1* vorwiegend in den Samenanlagen bestäubter Blüten und sich entwickelnder Schoten exprimiert wird. Die Überexpression von *TT1* in *A. thaliana* führte zu vielfältigen schweren Veränderungen in der Morphologie der Pflanzen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von TT1 enthält zwei Zinkfinger-Motive. Strukturen dieser Art können DNA binden oder Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Da für ein TT1-GFP-Fusionsprotein eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, daß es sich bei TT1 um ein Protein mit regulatorischer Funktion handelt.

Mittels Datenbankrecherchen konnten weitere pflanzliche Sequenzen identifiziert werden, die Zinkfinger-Motive mit hoher Ähnlichkeit zu TT1 aufweisen. Sie alle enthalten eine neuartige Kombination aus einem C2H2- und einem C2HC-Zinkfinger-Motiv. Die TT1-ähnlichen Proteine bilden somit eine neue Familie von Zinkfinger-Proteinen, denen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulation pflanzlicher Entwicklungsvorgänge zukommt.

## Abstract

In this work various aspects of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* were investigated using promoter studies and the characterisation of *transparent testa* mutants.

In a first project the *tt6* locus was shown to encode the *F3H* gene. With this finding mutants for all steps of flavonol biosynthesis are now available. The genes involved in this pathway had been shown to be co-ordinately expressed upon irradiation with UV containing white light. In the cases of *CHS*, *CFI* and *FLS* light induction was found to be mediated via an ACGT containing element and a MYB recognition element in the respective promoters. Analysis of the *F3H* promoter carried out in this work, revealed a different overall structure of this promoter but a requirement for the same *cis* elements for light inducibility. The fact that all genes tested rely on the same *cis* elements for light induction indicates that the same *trans* acting factors might be involved in controlling their transcription.

Another project was the characterisation of *tt15*, a new mutant of *A. thaliana*. Mutant plants were shown to be unaltered in flavonoid biosynthesis gene expression as well as end product accumulation in vegetative parts when compared to wild type. Cyanidin and quercetin accumulation however was significantly reduced in mutant seeds indicating a defect in seed specific regulation of flavonoid biosynthesis or an enzymatic step leading to the formation of condensed tannins.

The *tt1* mutant was confirmed to be seed specific, completely lacking cyanidin in seeds. An *A. thaliana* plant line containing an *En1* insertion at the *tt1* locus was used to isolate the gene. Successful gene isolation was shown by complementation of the *tt1* mutant. Expression of the *TT1* gene was localised to fertilised ovules and developing siliques using RT-PCR and transgenic plants carrying promoter GUS fusion constructs. Ectopic expression of *TT1* lead to severe morphological alterations. The amino acid sequence deduced from the *TT1* ORF contains two zinc finger motives. Structures of this type have been shown to bind DNA or mediate protein / protein interactions. A TT1-GFP fusion protein was localised to the nucleus suggesting a regulatory function for TT1. This is the first zinc finger protein that has been shown to be involved in flavonoid accumulation during seed development.

A number of GenBank entries from various plant species show zinc finger motives with significant similarity to TT1. They all contain a novel combination of a C2H2 and a C2HC zinc finger motif. TT1 like proteins therefore constitute a new family of zinc finger proteins which may play important roles in the regulation of developmental processes in plants.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DIE FLAVONOIDE	2
1.1.1	<i>Funktionen und Bedeutung von Flavonoiden</i>	3
1.1.2	<i>Die Biosynthese der Flavonoide</i>	4
1.1.3	<i>Regulation der Flavonoidbiosynthese</i>	8
1.2	FLAVONOIDBIOSYNTHESE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	12
1.2.1	<i>Mutanten der Biosynthese</i>	14
1.2.2	<i>Regulatorische Mutanten</i>	17
1.3	INSERTIONSMUTAGENESE	19
1.4	ZIELE DIESER ARBEIT	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	MATERIAL	23
2.1.1	<i>Chemikalien, Enzyme und Radioisotope</i>	23
2.1.2	<i>Desoxyoligonukleotide</i>	23
2.1.3	<i>Puffer und Medien</i>	26
2.1.4	<i>Bakterienstämme, DNA-Vektoren und Sonden</i>	27
2.1.5	<i>Zellkulturen und Pflanzen</i>	29
2.1.6	<i>Sonstiges biologisches Material</i>	30
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	31
2.2.1	<i>PCR</i>	32
2.2.2	<i>Plasmid-DNA-Präparationen</i>	33
2.2.3	<i>Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial</i>	34
2.2.4	<i>RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial</i>	35
2.2.5	<i>Gelelektrophorese und Kapillartransfer von Nukleinsäuren</i>	37
2.2.6	<i>Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren</i>	37
2.2.7	<i>DNA-Sequenzierung und computergestützte Auswertung von Sequenzdaten</i>	38
2.3	FÜR DIESE ARBEIT BESONDERS RELEVANTE METHODEN	38
2.3.1	<i>Extraktion und Dünnschichtchromatographie von Flavonoiden</i>	38
2.3.2	<i>Färbereaktion mit Naturstoffreagenz A</i>	39
2.3.3	<i>Kreuzungen</i>	40
2.3.4	<i>Genetische Kartierung mit Hilfe von CAPS-Polymorphismen</i>	40
2.3.5	<i>Kartierung mit Hilfe der IGF-BAC Bibliothek</i>	41
2.3.6	<i>Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE)</i>	42
2.3.7	<i>Schnelle Vervielfältigung genomischer DNA-Enden (RAGE)</i>	43
2.3.8	<i>Bestimmung und Analyse genomischer DNA-Sequenzen</i>	44
2.3.9	<i>RT-PCR</i>	46
2.3.10	<i>Herstellung transgener Pflanzen</i>	47
2.3.11	<i>GUS-Färbung</i>	49
2.3.12	<i>Transfektion von A.-thaliana-Protoplasten</i>	49
2.3.13	<i>Aktivitätsmessungen von Reporterenzymen in Protoplastenextrakten</i>	50
2.3.14	<i>Herstellung bestimmter Plasmid-Konstrukte</i>	52

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
3.1	UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER <i>TRANSPARENT-TESTA</i> -MUTANTEN AUS <i>A. THALIANA</i>	56
3.1.1	<i>Phänotypische Charakteristika der klassischen tt-Mutanten</i>	56
3.1.2	<i>Differenzielle Färbung mit Naturstoffreagenz A</i>	59
3.1.3	<i>tt15 - eine neue tt-Mutante</i>	62
	3.1.3.1 Expression von Strukturgenen des Phenylpropanstoffwechsels	62
	3.1.3.2 Flavonoidgehalt in verschiedenen Teilen der Mutante	64
3.1.4	<i>Untersuchung von tt-Mutanten aus einer En1-mutagenisierten A.-thaliana-Population</i>	66
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR KLÄRUNG DER FRAGE, OB DAS <i>F3H</i> -GEN DEM <i>TT6</i> -LOKUS ENTSPRICHT	69
3.2.1	<i>Kartierung des F3H-Gens im Genom und Vergleich mit der Position des tt6-Lokus</i>	69
3.2.2	<i>Untersuchung der F3H-Sequenz aus tt6</i>	73
3.2.3	<i>Isolierung von F3H-Insertionsmutanten und Untersuchung weiterer tt6-Allele</i>	74
3.2.4	<i>Untersuchung der F3H-mRNA-Mengen in unterschiedlichen tt6-Allelen und Wildtypen</i>	76
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR LICHTABHÄNGIGEN EXPRESSION DES <i>A. THALIANA F3H</i> -GENS	78
3.3.1	<i>Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von AtF3H</i>	78
3.3.2	<i>Eingrenzung eines F3H-Minimalpromotors</i>	79
3.3.3	<i>Definition funktioneller cis-aktiver ACE- und MRE-Sequenzen im F3H-Promotor</i>	81
	3.3.3.1 Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten MRSAtF3H	81
	3.3.3.2 Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten ACSAtF3H	83
	3.3.3.3 Identifizierung einer lichtregulatorischen Einheit im AtF3H-Promotor	85
3.4	ISOLIERUNG DES <i>A. THALIANA TT1</i> -GENS	87
3.4.1	<i>Detektion einer En1-Insertion, die mit dem tt-Phänotyp kosegregiert, und Isolierung der flankierenden DNA</i>	87
3.4.2	<i>Lokalisierung der flankierenden DNA im Genom</i>	91
	3.4.2.1 Kartierung mittels RI-Linien	92
	3.4.2.2 Kosegregation eines Ler-CAPS-Markers mit dem tt1-Phänotyp	93
	3.4.2.3 Isolierung von BAC-Klonen, die mit der flankierenden DNA hybridisieren	95
3.4.3	<i>Komplementation der tt1-Mutation</i>	97
3.4.4	<i>Bestimmung verschiedener Sequenzen</i>	98
	3.4.4.1 Bestimmung der genomischen Wildtyp-Sequenz	98
	3.4.4.2 Bestimmung der cDNA-Sequenz	100
	3.4.4.3 Bestimmung der Sequenzen der tt1-Mutanten	102
	3.4.4.4 TT1-ähnliche Proteine	105
3.4.5	<i>Genomische DNA-Gel-Blot-Analysen</i>	106
3.4.6	<i>Expressionsstudien</i>	108
	3.4.6.1 Nachweis und relative Quantifizierung der AtTT1-mRNA mittels RT-PCR	108
	3.4.6.2 Herstellung und Analyse transgener TT1-Promotor-GUS-Pflanzen	110
3.4.7	<i>Kernlokalisationsstudien</i>	112
3.4.8	<i>Phänotypische Charakterisierung von tt1</i>	113
	3.4.8.1 Expression von Strukturgenen des Phenylpropanstoffwechsels	113
	3.4.8.2 Untersuchung des Flavonoidgehaltes verschiedener Pflanzenteile	115
3.4.9	<i>Phänotypen von 35S-TT1-Pflanzen</i>	116

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>118</b>
4.1	<i>TT15</i> - EINE NEUE <i>TT</i> -MUTANTE MIT SAMENSPEZIFISCHEM PHÄNOTYP	118
4.2	INSERTIONSMUTAGENESE IN <i>A. THALIANA</i> – EIN EFFIZIENTES MITTEL ZUR ISOLIERUNG VON GENEN	120
4.3	<i>TT6</i> - EINE KLASSISCHE <i>TT</i> -MUTANTE ENTHÄLT EINE MUTATION IM <i>F3H</i> -GEN	123
4.4	DIE REGULATION DER LICHTABHÄNGIGEN EXPRESSION VON <i>F3H</i> ERFOLGT ÜBER DIE GLEICHEN CIS-ELEMENTE WIE DIE VON <i>CHS</i> , <i>CFI</i> UND <i>FLS</i>	126
4.5	DIE <i>TT1</i> -ÄHNLICHEN GENE - EINE NEUE KLASSE PFLANZLICHER ZINKFINGER-PROTEINE	130
4.5.1	<i>Die Isolierung des TT1-Gens</i>	130
4.5.2	<i>TT1 und ähnliche pflanzliche Zinkfinger-Proteine</i>	132
4.5.3	<i>Mögliche Funktion von TT1</i>	138
4.6	AUSBLICK	142
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>163</b>

## Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl-Glukuronid
A	Adenin
ACE	ACGT-Element
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
bZIP	basisches Leuzin-Reißverschluß-Protein
C	Cytosin
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	komplementäre DNA
CFI	Chalkon-Flavanon-Isomerase
CHS	Chalkon-Synthase
Ci	Curie
cM	centi Morgan
Col	Columbia
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure (acetic acid)
EGTA	Ethylen-glykol-bis( $\beta$ -aminoethylether) N,N,N',N' tetraessigsäure
G	Guanin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GUS	$\beta$ -Glukuronidase
GUS'	spezifische, standardisierte GUS-Aktivität
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAC-Z	$\beta$ -Galaktosidase
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LRU	Lichtregulatorische Einheit
LUC	Luciferase
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
MRE	MYB-Erkennungselement
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NOS	Nopalin-Synthase

OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden
RAGE	schnelle Amplifikation von genomischen Enden
RI	Rekombinante Inzuchtlinien
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSLP	simple sequence length polymorphism
T	Thymin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
<i>tt</i>	<i>transparent testa</i>
U	Enzymeinheit
UBQ	Polyubiquitin
ün	über Nacht
UV	ultraviolett
UWCG	University of Wisconsin, Computer Group Genetics
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-Glukuronat

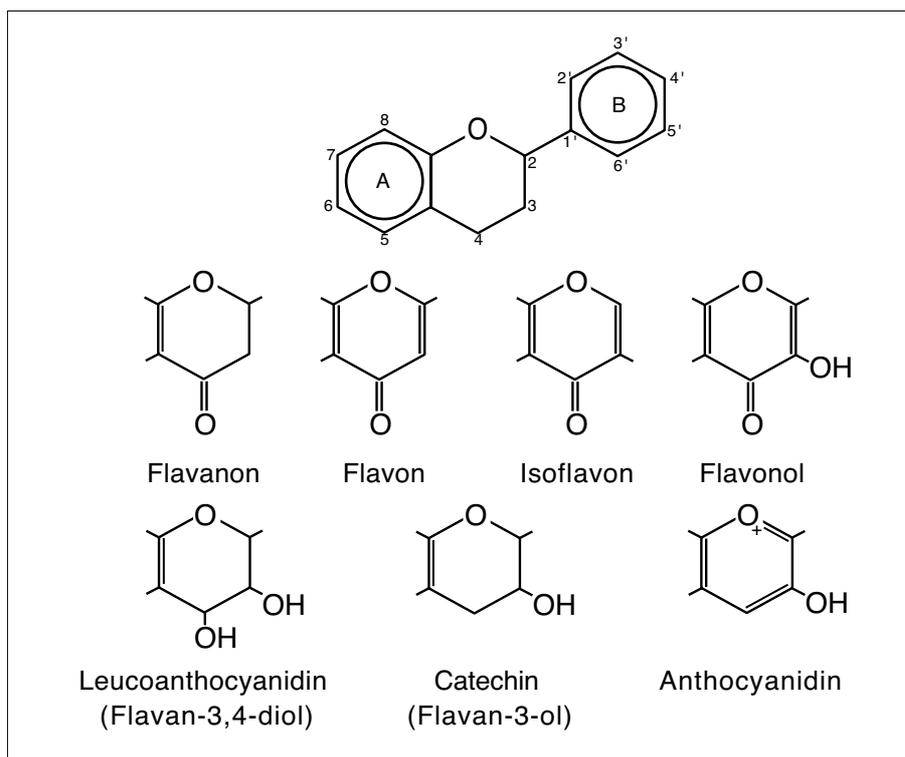
## **1 Einleitung**

Der Lebenszyklus höherer Pflanzen umfaßt die Keimlingsentwicklung, das vegetative Wachstum und die Reproduktion. Diese Phasen sind Teile eines genetisch festgelegten Entwicklungsprogramms, das durch die Pflanze in vielfältiger Wechselwirkung mit der umgebenden belebten und unbelebten Natur realisiert wird. Pflanzen sind in der Lage und in Bezug auf Licht sogar darauf angewiesen, externe Reize wahrzunehmen und auf sie zu reagieren. Sowohl bei diesen stimulus-induzierten Reaktionen von Pflanzen als auch bei ihren entwicklungspezifisch vorgegebenen Eigenschaften kommt den sogenannten Sekundären Pflanzenstoffen eine besondere Bedeutung zu. Die Bezeichnung „sekundär“ beruht darauf, daß es sich dabei um Stoffe handelt, für die vielfach keine klare Funktion zu erkennen ist. Manche von ihnen werden nur unter bestimmten Bedingungen in wenigen Zellen synthetisiert oder sind auf eine Art oder gar Varietät beschränkt; zum Teil erscheinen sie wie Abfallstoffe, die in der Vakuole oder im Apoplasten abgelagert werden. Andere pflanzliche Sekundärstoffe dagegen zählen zu den häufigsten organischen Substanzen überhaupt und machen große Teile der pflanzlichen Biomasse aus. Viele dieser Substanzen werden unter hohem Energieaufwand hergestellt oder erfüllen offensichtliche strukturelle oder adaptive Funktionen. Der Begriff „sekundär“ trifft daher für diese Pflanzenstoffe nur in soweit zu, daß sie, im Unterschied zu den Komponenten des Primärstoffwechsels, nicht in jeder Zelle anzutreffen sind.

Die Bedeutung Sekundärer Pflanzenstoffe für die Pflanze liegt häufig im Bereich der „Kommunikation“ mit der Umgebung; etwa im Sinne von Abwehr (z.B. gegen Pathogene, Herbivoren oder UV-Strahlung) oder Anziehung (z.B. von bestäubenden oder samenverbreitenden Organismen). Im Hinblick auf die Verteidigungsfunktion gilt, daß junge und verwundbare sowie für das Überleben und die Verbreitung relevante Organe besonders stark geschützt werden und daher häufig die höchsten Sekundärstoffgehalte aufweisen. Vom Menschen werden diese Substanzen seit Jahrtausenden als Farb-, Duft-, Geschmacks-, Arznei- und Giftstoffe genutzt. Die zur Zeit beschriebenen mehreren 10000 Sekundären Pflanzenstoffe (Wink, 1999) werden in die drei großen Gruppen der Alkaloide, Isoprenoide und Phenylpropanoide unterteilt. Zu den letzteren gehört mit den Flavonoiden diejenige Klasse pflanzlicher Sekundärstoffe, die im Hinblick auf ihre Funktionen, ihre Biosynthese und deren Regulation sicherlich am besten untersucht ist.

## 1.1 Die Flavonoide

Zwei aromatische Ringe (A und B), die über eine C<sub>3</sub>-Brücke verbunden sind, bilden die Grundstruktur der mehr als 4000 derzeit bekannten Flavonoide (Abbildung 1; Petersen *et al.*, 1999). An Hand des Oxidationszustandes des mittleren Heterozyklus lassen sie sich in eine Reihe von Untergruppen wie Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavan-3-ole, Flavan-3,4-diole, Isoflavone oder Anthocyanidine gliedern.



**Abbildung 1: Grundstrukturen verschiedener Flavonoide.**

Im oberen Teil der Abbildung ist der Grundkörper eines Flavans dargestellt, darunter der mittlere Heterozyklus einiger Gruppen von Flavonoiden (nach Heß, 1999, verändert).

Zu jeder Untergruppe gehört wiederum eine Schar von Substanzen, die sich durch unterschiedliche Modifikationen des C-15-Körpers, vor allem in den Substituenten des B-Ringes, voneinander unterscheiden. Dabei gilt, daß das Absorptionsmaximum mit steigender Konjugation und sinkender Sättigung der Bindungen im Molekül bei immer größeren Wellenlängen liegt (Shirley *et al.*, 1995).

Das erklärt die auffälligste Eigenschaft der Flavonoide, nämlich die Tatsache, daß sie UV-absorbierend, fluoreszierend oder farbig sind.\* Darüber hinaus sind sie, vor allem unter Laborbedingungen, für Pflanzen nicht lebensnotwendig. Mutanten der Flavonoidbiosynthese und der sie kontrollierenden regulatorischen Elemente sind daher sowohl lebensfähig als auch besonders einfach zu erkennen. Die Existenz und leichte Zugänglichkeit genetischer Variabilität sind es, die das Studium der Flavonoidbiosynthese, der zugrundeliegenden Gene und ihrer Vererbung zu klassischen Modellsystemen sowohl der Biochemie als auch der Genetik der Pflanzen gemacht haben.

### 1.1.1 Funktionen und Bedeutung von Flavonoiden

In nahezu allen Phasen der pflanzlichen Entwicklung erfüllen Flavonoide vielfältige Funktionen. So schützen zum Beispiel in die Schale von Samen eingelagerte Isoflavone, Anthocyane oder kondensierte Tannine den ruhenden Embryo vor Herbivoren und Pathogenen (Shirley, 1998). Kondensierte Tannine verstärken vermutlich auch die Struktur der Samenschale und beeinflussen darüber hinaus die Dormanz und damit das Auskeimen unter günstigen Bedingungen (Koes *et al.*, 1994). In vielen Keimlingen und adulten Pflanzen akkumulieren unter dem Einfluß hoher Lichtintensitäten Flavonole in den Vakuolen epidermaler und subepidermaler Zellschichten. Flavonole absorbieren Licht im kurzwelligen UV-Bereich und sind daher geeignet, durch die Absorption potentiell schädlichen, energiereichen Lichtes die DNA vor Schädigungen bewahren (Li *et al.*, 1993; Schmelzer *et al.*, 1988; Stapleton und Walbot, 1994). Ein weiteres Beispiel für die Rolle von Flavonoiden in der vegetativen Entwicklung von Pflanzen sind die Isoflavonoide, die bei Leguminosen als Signalmoleküle in der Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien (Long, 1989) oder als Phytoalexine bei der Pathogenabwehr dienen (Lamb *et al.*, 1989).

Im Zuge der Reproduktion sorgen bei vielen Spezies auffällig gefärbte Blüten für die Anlockung bestäubender Tiere, wie Insekten oder Vögel (Koes *et al.*, 1994). Eine orange, rote oder purpurne Pigmentierung wird dabei, neben Carotinoiden und Betalainen, vor allem von Anthocyanen hervorgerufen. Ko-Pigmentierung durch die zusätzliche Akkumulation farbloser

---

\* Die Bezeichnung Flavonoide geht auf das lateinische Wort *flavus* (gelb) zurück und bezieht sich auf die Färbung mehrerer Stoffe dieser Gruppe (z.B. Aurone).

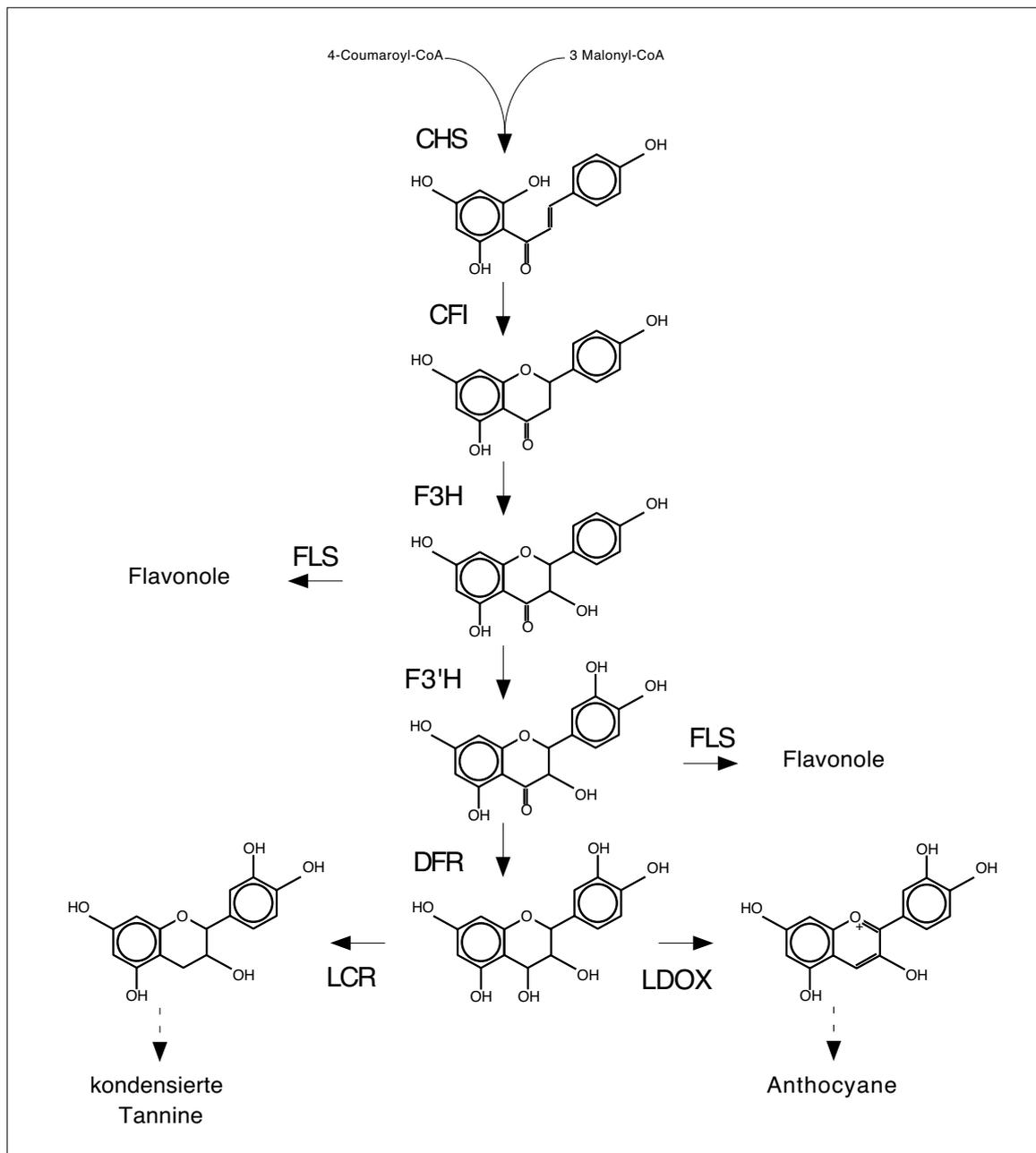
Flavonoide, Flavanone und Flavonole, die Komplexe mit den Anthocyanen und mit Metallionen eingehen können und so zur Änderung ihrer Absorptionseigenschaften beitragen, kann zu Variationen der Blütenfarbe führen (Mol *et al.*, 1998). Flavonole sind darüber hinaus in Mais (*Zea mays*) und Petunie (*Petunia hybrida*) für eine normale Pollenkeimung notwendig (Taylor und Jorgensen, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Ylstra *et al.*, 1994), während sie in *Arabidopsis thaliana* bei der männlichen Fertilität keine Rolle spielen (Burbulis *et al.*, 1996). Die Färbung von Früchten durch Anthocyane schließlich dient wahrscheinlich der Anlockung von Tieren, die die Verbreitung der Samen gewährleisten.

Auf Grund ihrer vielfältigen Funktionen gilt Flavonoiden schon seit langem ein besonderes züchterisches Interesse. Resistenz gegenüber Pathogenen oder erhöhter UV-Belastung, die Färbung von Blüten, Früchten und Samen oder der Gehalt an potentiell gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen wie Vitaminen, Antioxidantien oder anderer „Nutraceuticals“ (Dixon und Steele, 1999) beeinflussen entscheidend den Wert pflanzlicher Produkte. Kondensierte Tannine zum Beispiel verbessern als natürlicher Schutz vor Herbivoren und Pathogenen die Lagerfähigkeit und Qualität von Saatgut. Andererseits beeinflussen sie aber auf Grund ihrer Eigenschaft, Proteine binden und fällen zu können, die Verdaulichkeit von Pflanzenteilen sowie die Verwendbarkeit pflanzlicher Rohstoffe in bestimmten enzymatischen Prozessen, wie etwa dem Brauvorgang (Shirley, 1998). Die Manipulation des Flavonoidgehaltes von Pflanzen kann somit zur Beeinflussung der Qualität pflanzlicher Erzeugnisse, zur Überexpression wirtschaftlich oder medizinisch bedeutender Substanzen oder zur Erhöhung der Resistenz gegenüber Krankheiten, Schädlingen oder ultravioletter Strahlung genutzt werden (Dixon *et al.*, 1996). Voraussetzung dafür ist allerdings ein möglichst vollständiges Verständnis der Flavonoidbiosynthese und ihrer Regulation.

### **1.1.2 Die Biosynthese der Flavonoide**

Die Enzyme für nahezu alle Schritte der Biosynthese des C<sub>15</sub>-Grundgerüsts der Flavonoide sind aus verschiedenen Pflanzenarten beschrieben worden. Vielfach konnten auch die entsprechenden Gene isoliert werden. Im Folgenden sollen vor allem diejenigen Schritte dargestellt werden, die auch in *A. thaliana* relevant sind (Abbildung 2 und 3). Die beiden Ausgangspunkte der Flavonoidbiosynthese sind 4-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA. 4-Coumaroyl-CoA ist ein Produkt des generellen Phenylpropan-Stoffwechselweges, der aus-

gehend von Phenylalanin auch zu Vorstufen für die Synthese von Ligninen, Coumarinen und Stilbenen führt. Die drei beteiligten Enzyme sind Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), Zimtsäure-4-Hydroxylase (Cinnamate-4-Hydroxylase, C4H) und 4-Coumarat: CoA-Ligase (4CL) (Hahlbrock und Ragg, 1975).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese einiger Flavonoide.**

Es sind die wichtigsten Reaktionen der Flavonoidbiosynthese dargestellt. Die Enzyme, die die einzelnen Schritte katalysieren, sind folgendermaßen abgekürzt: Chalkonsynthase, CHS; Chalkon-Flavanon-Isomerase, CFI; Flavanon-3-Hydroxylase, F3H; Flavonoid-3'-Hydroxylase, F3'H; Flavonolsynthase, FLS; Dihydroflavonol-4-Reduktase, DFR; Leucoanthocyanidin-Dioxygenase, LDOX; Leucoanthocyanidin-Reduktase, LCR.

Malonyl-CoA wird durch die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) aus Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> gebildet. Es ist ein Produkt des Krebs- oder Tricarbonsäurezyklus, jüngste Untersuchungen deuten jedoch auch auf eine Herkunft aus dem Abbau von Fettsäuren hin (Logemann *et al.*, 2000).

In der ersten Reaktion, die spezifisch für die Synthese des Flavonoidgrundgerüsts ist, wird 4-Coumaroyl-CoA schrittweise mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu 4,2',4',6'-Tetrahydrochalcon verbunden (Heller und Hahlbrock, 1980). Diese Kondensation wird durch die Chalkonsynthese (CHS) katalysiert, ein Enzym aus der Gruppe pflanzlicher Polyketidsynthasen, die eine Vielzahl von Naturstoffen bilden. Die Kristallstruktur und der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms wurden an Hand von CHS2 aus Alfalfa (*Medicago sativa*) aufgeklärt (Ferrer *et al.*, 1999). Es liegt als Homodimer mit zwei funktionell unabhängigen aktiven Zentren vor, deren Architektur über die Spezifität des Enzyms für bestimmte Startermoleküle, die Zahl der möglichen Kondensationsreaktionen und die Faltung des intermediären Polyketids entscheidet. Chalkone, die unmittelbaren Produkte der CHS, akkumulieren nur in wenigen Pflanzenarten. 6'-Hydroxychalkone isomerisieren *in vivo* und *in vitro* spontan zu einem racemischen Flavanon. Diese spontane Reaktion ist jedoch in Anwesenheit hoher Proteinkonzentrationen deutlich unterdrückt (Mol *et al.*, 1985). In den meisten Spezies erfolgt durch das Enzym Chalkon-Flavanon-Isomerase (CFI)\* eine stereospezifische Isomerisierung zu Naringenin. Die exakte Reihenfolge der daran anschließenden Reaktionen ist nicht sicher bekannt. Die in Abbildung 2 gewählte Form folgt hierin den Angaben von Chapple (1994). Die dargestellte Hydroxylierung von Naringenin an Position 3 zum Dihydroflavonol Dihydrokämpferol wird durch die Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) katalysiert (Britsch *et al.*, 1981). Ausgehend von Dihydrokämpferol kann durch die Flavanon-3'-Hydroxylase (F3'H), eine spezifische B-Ring-Hydroxylase, Dihydroquercetin synthetisiert werden. Die Dihydroflavonole sind Intermediate für die Bildung sowohl von Flavonolen als auch von Flavan-3,4-diolen.

---

\* In zahlreichen Veröffentlichungen wird für die Chalkon-Flavanon-Isomerase die Abkürzung CHI benutzt. Diese Bezeichnung wird jedoch bereits für Endochitinasen verwendet und ermöglicht darüber hinaus keine stringente Differenzierung zwischen Chalkon-Flavanon-Isomerasen und Chalkon-Auron-Isomerasen. Um der Klarheit willen, wird in dieser Arbeit für Chalkon-Flavanon-Isomerase die Abkürzung CFI verwendet.

Flavonole entstehen aus Dihydroflavonolen durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3. Die Bildung von Kämpferol aus Dihydrokämpferol bzw. Quercetin aus Dihydroquercetin wird durch das Enzym Flavonolsynthese (FLS) katalysiert (Forkmann *et al.*, 1986). Flavan-3,4-diole entstehen durch die enzymatische Reduktion von Dihydroflavonolen am C-4-Atom des C-Rings unter Beteiligung der Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR). Sie werden auch als Leucoanthocyanidine bezeichnet und sind die Vorstufen der Anthocyane und der kondensierten Tannine (zusammengefaßt in Forkmann, 1991).

Die Biosynthese der Anthocyane erfordert zunächst die Bildung von Anthocyanidinen. Gene, die vermutlich für eine Leucoanthocyanidin-Dioxygenase (LDOX; auch Anthocyanidin-Synthase, ANS) kodieren, wurden in verschiedenen Pflanzenarten identifiziert (Pelletier *et al.*, 1997). Der enzymatische Nachweis für die Bildung von Anthocyanidinen aus Flavan-3,4-diolen *in vitro* konnte jedoch erst kürzlich erbracht werden (Saito *et al.*, 1999). Wie bei vielen anderen Flavonoiden, z.B. den Flavonolen, erfolgt auch bei Anthocyanidinen eine Glykosidierung an der C<sub>3</sub>-Hydroxylgruppe. Dabei dient zumeist UDP-aktivierte Glukose als Substrat für UDP-Glukose:Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (3GT). Aber auch andere Zucker können als erste Einheit übertragen sowie später weitere Zucker und Acylgruppen angefügt werden (Holton und Cornish, 1995). Glykosidierte Anthocyanidine werden als Anthocyane bezeichnet.

Die kondensierten Tannine bilden zusammen mit den aus anderen Stoffwechselwegen stammenden hydrolysierbaren Tanninen (Gallo- oder Ellagitannine), in denen ein zentrales Polyol (z.B. Glukose) mit Gallussäure-Einheiten verestert ist, eine heterogene Sekundärstoffgruppe. Ihr gemeinsames Merkmal ist die Fähigkeit, Proteine binden und fällen zu können. Catechine, die farblosen Vorstufen der kondensierten Tannine, entstehen durch Reduktion von Flavan-3,4-diolen durch eine NADPH-abhängige Leucoanthocyanidinreduktase (LCR oder LAR; auch Flavan-3,4-diol-Reduktase, FDR). Obwohl die anschließende Bildung von Proanthocyanidin-Oligomeren und damit die Kondensation zu Tanninen im Pflanzenreich weit verbreitet ist, konnte sie bislang noch nicht enzymatisch nachvollzogen werden (Petersen *et al.*, 1999).

Alle bislang beschriebenen Enzyme der Flavonoidbiosynthese mit Ausnahme von F3'H werden nach Zellaufschluß in der zytoplasmatischen Fraktion wiedergefunden. Schon seit längerem wurde auf Grund von Fütterungsversuchen mit radioaktiv markierten Intermediaten des Stoffwechselweges vermutet, daß die Synthese des C15-Grundgerüsts und seine Modifizierungen in einem an der ER-Membran lokalisierten Multienzymkomplex erfolgen (Stafford, 1974). Für *A. thaliana* konnten kürzlich Interaktionen zwischen CHS, CFI und DFR in Hefe „Two Hybrid“-Systemen und von CHS, CFI und F3H in Lysaten von Keimlingen nachgewiesen werden (Burbulis und Winkel-Shirley, 1999). Diese Interaktionen können als Beleg für einen solchen Komplex gewertet werden. Die Verankerung des Komplexes an der Membran könnte über die P450-Hydroxylasen C4H und F3'H erfolgen (Shirley, 1999).

Die Endprodukte der Flavonoidbiosynthese, wie Anthocyane und Flavonol-Glykoside, akkumulieren in der Vakuole. Einen Anhaltspunkt für den zugrundeliegenden Mechanismus gibt vermutlich die Mutation des *bronze2*-Gens (*bz2*) in *Z. mays*, die zu Körnern ohne Anthocyane führt. Das BZ2-Protein hat Ähnlichkeit mit Glutathion-S-Transferasen und vermag Glutathion auf künstliche Substrate zu übertragen (Marrs *et al.*, 1995). Damit erscheint es vorstellbar, daß Anthocyane durch das Anfügen von Glutathion für den Transport in die Vakuole markiert werden. Als Transporter kommen Proteine vom „ATP binding cassette“-Typ in Frage. Das *AtMRP1*-Gen zum Beispiel vermittelt bei Expression in Hefe den Transport von Glutathion-Anthocyan-Konjugaten (Lu *et al.*, 1997). In intakten pflanzlichen Geweben liegt jedoch nur ein sehr geringer Anteil der Anthocyane als Glutathion-Konjugat vor, was darauf schließen läßt, daß das Glutathion abgespalten und wiederverwendet wird, sobald die Anthocyane in die Vakuole aufgenommen wurden.

### 1.1.3 Regulation der Flavonoidbiosynthese

Entsprechend ihren Funktionen werden Flavonoide in bestimmten Geweben zu definierten Zeitpunkten synthetisiert. Zu den in dieser Hinsicht am besten untersuchten Beispielen gehört die Pigmentierung von Kotyledonen und Hypokotylen sich entwickelnder Keimlinge, von Blüten und seneszenten Blättern. Über die entwicklungspezifische Regulation hinaus kann die Akkumulation von Flavonoiden in vielen Geweben auch durch externe Reize induziert werden. Dazu gehört Streß, etwa in Form hoher Lichtintensitäten oder UV-Strahlung, Trockenheit, Hitze oder Kälte. Aber auch Verwundung oder Pathogenbefall sowie die Applikation

von Zuckern oder Phytohormonen können den Gehalt an Flavonoiden in vegetativen Pflanzenteilen beeinflussen (Mol *et al.*, 1996). Die Biosynthese von Flavonoiden ist damit ein ideales Modellsystem für das Studium der Komplexität regulierter Stoffwechselprozesse bei Pflanzen.

Die Genetik des Flavonoidstoffwechsels wurde bislang vor allem an auffällig pigmentierten Arten wie *Z. mays* oder *P. hybrida* untersucht. In diesen Organismen stellen Abweichungen der Blüten-, Pflanzen- oder Samenfarbe geeignete Marker zur Identifizierung von Mutanten der Flavonoidbiosynthese und ihrer entwicklungspezifischen Regulation dar. In *Z. mays* können beispielsweise verschiedene Gewebe des Korns, der Wurzel und Koleoptile des Keimlings sowie von Stengel, Blatt und Blütenorganen pigmentiert sein (Holton und Cornish, 1995). Die Analyse regulatorischer Loci der Flavonoidbiosynthese in *Z. mays* zeigte, daß sie zwei unterschiedliche Familien von Transkriptionsfaktoren kodieren. Die Gene des *R*- und des *B*-Lokus (*R*, *S*, *Sn*, *Lc* und *B*) kodieren jeweils Proteine, die eine carboxyterminale bHLH-Domäne („basic region/helix-loop-helix“) mit Ähnlichkeit zu MYC-Oncoproteinen enthalten. Die Gene der *C1/Pl*-Familie dagegen kodieren Proteine, die aminoterminal eine DNA-bindende Domäne mit Ähnlichkeit zu MYB-Oncoproteinen und carboxyterminal eine saure, transaktivierende Domäne aufweisen (Goff *et al.*, 1992). Die verschiedenen Mitglieder einer Genfamilie werden in unterschiedlichen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. Faktoren sowohl der *R/B*- als auch der *C1/Pl*-Familie werden jedoch für die transkriptionelle Aktivierung der Expression der „Strukturgene“\* der Flavonoidbiosynthese benötigt (Klein *et al.*, 1989). Die zeitlich und räumlich koordinierte, überlappende Expression unterschiedlicher Mitglieder dieser beiden Genfamilien stellt damit ein grundlegendes Prinzip der Regulation dieses Stoffwechselweges in *Z. mays* dar (Mol *et al.*, 1998).

Ein weiteres regulatorisches Gen der MYB-Familie enthält der *P*-Lokus. Das *P*-Protein reguliert den auf bestimmte Blütenorgane beschränkten 3-Deoxyanthocyan- oder Phlobaphen-Stoffwechselweg, für den unter anderem die Aktivitäten von *CHS*, *CFI* und *DFR* benötigt werden. *P* aktiviert die entsprechenden Gene, ohne dafür einen bHLH-Partner zu benötigen

---

\* Mit dem Begriff „Strukturgene“ der Flavonoidbiosynthese werden in dieser Arbeit Gene bezeichnet, die für Enzyme kodieren, die Schritte der Biosynthese der Flavonoide katalysieren. Er dient im wesentlichen der Abgrenzung zu Genen, die Faktoren kodieren, die diesen Stoffwechselweg regulieren.

(Grotewold *et al.*, 1994). Im Promotor des *Al*-Gens, das in *Z. mays* DFR kodiert, die für die Synthese sowohl von Anthocyanen als auch von Phlobaphenen benötigt wird, finden sich regulatorische Sequenzen, die sowohl von C1 als auch von P erkannt werden. Promotoren von Genen, die nicht durch P reguliert werden, enthalten dagegen nur Bindestellen, die von C1 erkannt werden (Grotewold *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1997).

Auch in dikotylen Arten wie *Antirrhinum majus* (Martin *et al.*, 1991), *Perilla frutescens* (Gong *et al.*, 1999) oder *P. hybrida* konnten mit Hilfe von Mutanten der Flavonoidbiosynthese regulatorische Loci identifiziert werden. Dabei handelt es sich ebenfalls um Gene, die MYB- und bHLH-Proteine kodieren, die zum Teil eine sehr hohe Ähnlichkeit zu denen aus *Z. mays* aufweisen und sogar in der Lage sind, die entsprechenden Mutationen in *Z. mays* zu komplementieren (Bradley *et al.*, 1998; Quattrocchio *et al.*, 1998). Für die Akkumulation von Anthocyanen in den Petalen von *P. hybrida* wird jedoch zusätzlich ein bislang aus *Z. mays* unbekannter Faktor benötigt. Während unter den beteiligten Loci *AN1* und *AN2* die schon bekannten bHLH- und MYB-Gene enthalten, kodiert der *AN11*-Lokus ein Protein, das ein WD40-Motiv enthält (de Vetten *et al.*, 1997). Ähnliche Proteine konnten auch in Hefe und tierischen Systemen identifiziert werden, klare Erkenntnisse über ihre Funktion liegen jedoch nicht vor. Das *AN11*-Gen wird in pigmentierten und unpigmentierten Zellen exprimiert und das Protein ist im Cytoplasma lokalisiert. Die *an11*-Mutation kann durch Überexpression von *AN2* teilweise komplementiert werden. Diese Daten lassen darauf schließen, daß es sich bei *AN11* um einen Regulator mit generellerer Funktion stromaufwärts von *AN2* handelt, der möglicherweise dessen Kernlokalisierung oder DNA-Bindefunktion modifiziert (de Vetten *et al.*, 1997). Auch über die transkriptionelle Kontrolle der Expression regulatorischer Gene ist wenig bekannt. Einzig für *C1* aus *Z. mays* weiß man, daß es durch *VIVIPAROUS1* reguliert wird. *vp1*-Mutanten haben farblose Körner und zeigen vorzeitige Keimung. Es wird vermutet, daß es sich bei *VP1* um einen generelleren Regulator handelt, der auch zur transkriptionellen Aktivierung von *C1* führt (Hattori *et al.*, 1992).

An den oben genannten Arten wurde auch die stimulusinduzierte Regulation der Flavonoidbiosynthese untersucht (zusammengefaßt in Mol *et al.*, 1996; Procissi *et al.*, 1997). Viele grundlegende Erkenntnisse über die Regulation dieses Stoffwechselweges wurden jedoch durch biochemische Untersuchungen an *in vitro* Systemen wie Zellkulturen von Petersilie (*Petroselinum*

*linum crispum*) gewonnen. In diesem System reduzierter Komplexität wurde beispielsweise die Lichtregulation der *CHS*-Expression studiert. Die Aktivierung des *PcCHS*-Promotors nach UV-Bestrahlung wird durch eine lichtregulatorische Einheit („light regulatory unit“, LRU<sup>PcCHS</sup>) vermittelt, die zwei charakteristische Sequenzmotive enthält (Weisshaar *et al.*, 1991b). Zum einen handelt es sich dabei um ein Motiv, das in seinem Kern die Sequenz ACGT enthält und daher als „ACGT-Containing Element“ (ACE) bezeichnet wird. Es wird *in vitro* wie *in vivo* von Faktoren gebunden, die eine basische Region und eine Leucin-Reißverschluß-Region enthalten („basic region/leucin zipper“, bZIP; Weisshaar *et al.*, 1991a). Zum anderen handelt es sich um ein Sequenzmotiv, das von MYB-Transkriptionsfaktoren erkannt und daher „MYB-Recognition Element“ (MRE) genannt wird (Feldbrügge *et al.*, 1997). Eine Beteiligung ähnlicher Sequenzen an der Lichtregulation der *CHS*-Expression konnte mittlerweile für verschiedene Arten gezeigt werden (zusammengefaßt in Hartmann *et al.*, 1998).

Die Integration der vielfältigen internen und externen Signale, die die Flavonoidbiosynthese regulieren, erfolgt somit zumindest zum Teil auf der Ebene der Transkription der beteiligten Strukturgene. Dabei werden die regulatorischen Elemente (*cis*-Elemente) in den Promotoren dieser Gene von spezifischen Transkriptionsfaktoren erkannt, wobei die Kombination verschiedener *cis*-Elemente in einem Promotor dessen Spezifität für unterschiedliche Stimuli bestimmt (Quattrocchio *et al.*, 1998; Weisshaar und Jenkins, 1998). Die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren sowie deren Interaktion mit weiteren regulatorischen Proteinen fördert oder behindert die Einleitung der mRNA-Synthese durch Wechselwirkung mit generellen Transkriptionsfaktoren (Ptashne, 1988). Die Regulation der Aktivität der Transkriptionsfaktoren schließlich erfolgt vermutlich sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene. Hierbei ist vor allem die Regulation ihrer Konzentration im Zellkern (Kircher *et al.*, 1998) sowie ihrer DNA-Bindung über den Grad ihrer Phosphorylierung zu nennen (Dröge-Laser *et al.*, 1997). In ihrer ganzen Komplexität ist diese Regulation jedoch bei weitem noch nicht vollständig verstanden.

## 1.2 Flavonoidbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

In den letzten zehn Jahren hat sich die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), ein unscheinbarer Kreuzblütler, zum Modellsystem der Wahl für die Untersuchung fast aller Aspekte der Biologie höherer Pflanzen entwickelt (Meyerowitz und Sommerville, 1994). *A. thaliana* akkumuliert in unterschiedlichen Organen und Geweben verschiedene Glykoside von Flavonolen und Anthocyanen sowie kondensierte Tannine. Bei den Flavonolen handelt es sich um Quercetin- und Kämpferolderivate (Wintersohl *et al.*, 1979). Junge Keimlinge enthalten vorwiegend Quercetine, die in den Vakuolen von Epidermiszellen lokalisiert sind (Sheahan *et al.*, 1998). Im Verlauf der Entwicklung der Pflanze verschiebt sich das Spektrum der Flavonole von Quercetin- hin zu Kämpferolderivaten (Graham, 1998). Nur für die Kämpferolglykoside aus Blättern adulter Pflanzen sind bislang vollständige Strukturen publiziert worden (Veit und Pauli, 1999). Dabei handelt es sich mindestens um ein Triosid (Kämpferol 3-*O*- $\beta$ -[ $\beta$ -D-Glukopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)D-Glukopyranosid]-7-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid) und zwei Dioside (Kämpferol 3-*O*- $\beta$ -D-Glukopyranosid-7-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid sowie Kämpferol 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid-7-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid). Auch Blüten von *A. thaliana*-Pflanzen enthalten Kämpferolglykoside, wobei in Stamen zu gleichen Teilen Quercetinderivate nachgewiesen wurden. Die Samen wiederum enthalten im wesentlichen Quercetinglykoside (Shirley *et al.*, 1995). Unter den im sichtbaren Bereich des Spektrums absorbierenden Inhaltsstoffen sind vor allem die Rotfärbung seneszenter Blätter durch Anthocyane und die dunkelbraune Färbung der Samen durch kondensierte Tannine zu nennen. Diese Pigmente akkumulieren im Verlauf der Samenentwicklung im Endothel, der innersten Zellschicht der Samenschale. Mittels *in situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß die dafür benötigten Strukturgene *CHS*, *CFI*, *DFR* und *LDOX* von der Befruchtung bis zum Torpedo-Stadium der Embryoentwicklung bevorzugt in dieser Zellschicht exprimiert werden (Devic *et al.*, 1999).

Über die erwähnte entwicklungs- und gewebespezifisch regulierte Biosynthese von Flavonoiden hinaus wird auch in *A. thaliana* dieser Stoffwechselweg durch bestimmte endogene (metabolische und hormonelle) und exogene Stimuli (Licht, Temperatur etc.) beeinflusst. Bei Anzucht unter hohen Lichtintensitäten und in Anwesenheit von Saccharose oder bei Applikation von Cytokininen zum Beispiel akkumulieren *A. thaliana*-Keimlinge Anthocyane in den

Petiolen der Kotyledonen und im Hypokotyl (Deikman und Hammer, 1995). Auch die Bestrahlung etiolierter Keimlinge mit UV-B oder Blaulicht führt zur Erhöhung der mRNA-Niveaus der an der Biosynthese der Flavonoide beteiligten Gene. Die Akkumulation der Transkripte erfolgt dabei in der Reihenfolge der enzymatischen Schritte im Stoffwechselweg. *PAL* ist besonders schnell induziert, es folgen die sogenannten frühen Gene *CHS* und *CFI* und erst mit Verzögerung *DFR* (Kubasek *et al.*, 1998; Kubasek *et al.*, 1992). Auch in *A. thaliana* Suspensionskulturzellen und daraus gewonnenen Protoplasten ist die *CHS*-Expression licht-induzierbar (Hartmann *et al.*, 1998). Das gleiche gilt für die Expression von *CFI*, *F3H* und *FLS*. Der Anstieg der Transkriptmengen ist auf eine transiente Verstärkung der Transkriptionsrate zurückzuführen, für die *de novo* Proteinbiosynthese nötig ist (Hartmann, 1997). Das weist darauf hin, daß zunächst spezifische Transkriptionsfaktoren gebildet werden müssen, die schließlich an die entsprechenden Promotoren binden, um sie zu aktivieren.

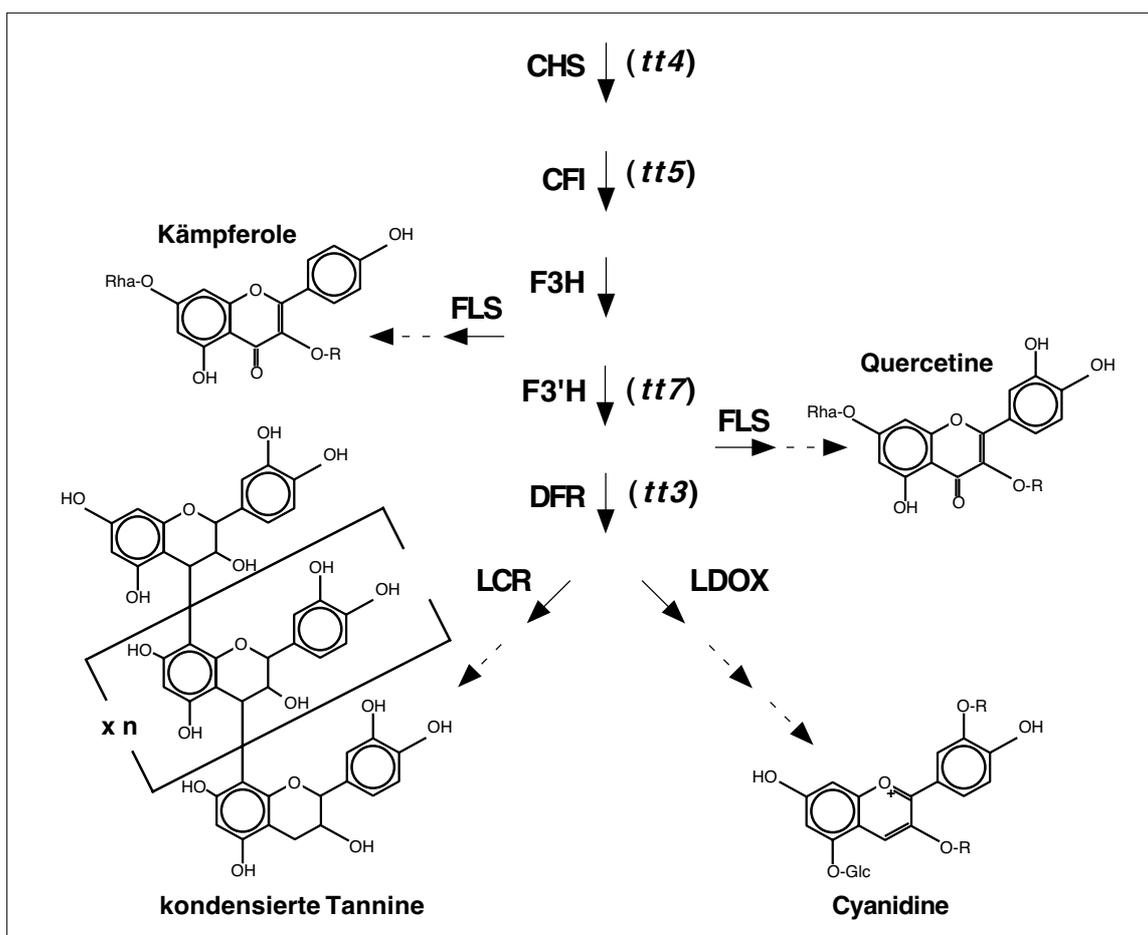
In den Promotoren von *CHS*, *CFI* und *FLS* konnten analog zum *CHS*-Promotor aus *Peter-silie* Bindestellen für MYB- und bZIP-ähnliche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Hartmann, 1997). Die daran bindenden Faktoren sind jedoch bislang in *A. thaliana* nicht bekannt. Generell gibt es bislang zwar biochemische aber, vielleicht abgesehen von der *hy5*-Mutation (1.2.2), keine genetischen Belege für eine Beteiligung von bZIP-Faktoren an der Regulation der induzierten Flavonoidbiosynthese. Umgekehrt gab es bislang keine biochemischen Daten, die die Beteiligung von bHLH-Faktoren an der gewebe- und entwicklungspezifischen Regulation der Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese belegten. Mittlerweile konnte jedoch durch Kotransfektion von *ZmSn* und *ZmC1* eine Aktivierung verschiedener Promotoren von Genen der Flavonoidbiosynthese aus *A. thaliana* gezeigt werden (Mehrtens, 1999). Eine Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtungen ist, daß bZIP-Faktoren spezifisch für die stimulus-induzierte Genaktivierung sind, während bHLH-Faktoren Gene in gewebe- und entwicklungspezifischer Weise aktivieren und beide Klassen von Transkriptionsfaktoren dabei mit MYB-ähnlichen Proteinen interagieren (Weisshaar und Jenkins, 1998).

Viele Erkenntnisse über die Flavonoidbiosynthese und ihre Regulation in *A. thaliana* wurden bislang an Hand von Mutanten gewonnen, die durch Behandlung von Samen mit mutagenen Chemikalien wie Ethylmethansulfonat (EMS) oder Strahlung (Röntgen, Neutronen) erzeugt wurden. In verschiedenen Kollektionen solcher Mutanten konnten Pflanzen mit

abweichender Samenfarbe identifiziert werden, die zunächst Mutationen an elf verschiedenen Loci repräsentierten (Bürger, 1971; Koornneef, 1990; Shirley *et al.*, 1995). Mittlerweile sind Mutationen an etwa 20 verschiedenen Loci bekannt, die anstelle der dunkelbraunen Samen des Wildtyps zu Samen von hellerem oder grünlichem Braun bis hin zu Gelb führen (Nesi *et al.*, 1999). Die Mutanten und die zugehörigen Loci werden als *transparent testa* oder *tt* bezeichnet, weil als Ursache für den Phänotyp angenommen wird, daß durch mehr oder weniger ausgeprägtes Fehlen der kondensierten Tannine in der Samenschale die gelbe Farbe der darunter liegenden Kotyledonen sichtbar wird (Koornneef, 1990). Alle bislang bekannten *tt*-Mutationen sind rezessiv und werden maternal vererbt. Das Fehlen der Pigmentierung in diesen Mutanten kann entweder auf Defekte in den Strukturgenen der Biosynthese bzw. des Transports von Flavonoiden oder auf Mutationen in Regulatoren dieser Gene zurückzuführen sein.

### 1.2.1 Mutanten der Biosynthese

Unter den *A. thaliana* *tt*-Mutanten können auf Grund von Merkmalen, die mit bloßem Auge sichtbar sind, zwei Gruppen unterschieden werden. Die *tt*-Mutanten 1, 2, 8, 9 und 10 weisen gegenüber dem Wildtyp offenbar nur eine veränderte Samenfärbung auf. Im Unterschied dazu produzieren *tt3*, 4, 5, 6 und 7 hellere Samen und sind darüber hinaus auch in der Akkumulation von Anthocyanen in den vegetativen Pflanzenteilen beeinträchtigt (Koornneef, 1990). Einigen der *tt*-Loci dieser zweiten Gruppe konnten Strukturgene der Flavonoidbiosynthese zugeordnet werden (Abbildung 3). So enthält der *tt4*-Lokus das *AtCHS*-Gen und der *tt5*-Lokus *AtCFI* (Chang *et al.*, 1988; Shirley *et al.*, 1992). Beide Gene liegen im Genom von *A. thaliana* nur in einer Kopie vor. Da sie für Enzyme kodieren, deren Aktivität für die Synthese aller Flavonoide benötigt wird, sind in keiner der beiden Mutanten derartige Verbindungen nachzuweisen. Der *tt3*-Lokus enthält das *AtDFR*-Gen (Shirley *et al.*, 1992), dessen Produkt für die Bildung von Anthocyanen und kondensierten Tanninen benötigt wird. In der *tt3*-Mutante fehlen daher diese Substanzen, während die Akkumulation von Flavonolen nicht beeinträchtigt ist.



**Abbildung 3: Flavonoide in *A. thaliana*.**

Es ist der Biosyntheseweg und die Strukturen der wichtigsten Flavonoide in *A. thaliana* dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen entsprechen Abbildung 2. Bei einzelnen enzymatischen Schritten ist in Klammern der Name der Mutante angegeben, in der die entsprechende Reaktion blockiert ist. Mögliche Substituenten in den Strukturen sind wie folgt bezeichnet: Rhamnose, Rha-; Glukose, Glc-; verschiedene, R-.

Auf Grund der in der *tt7*-Mutante gefundenen Flavonoidzusammensetzung wird vermutet, daß auch dieser Locus ein Strukturgen enthält. Die *tt7*-Mutante enthält kein Quercetin, weist jedoch einen Kämpferolgehalt auf, der dem des Wildtyps gleicht. Weiterhin akkumuliert sie das Anthocyanidin Pelargonidin, das von Dihydrokämpferol abstammt, während *A.-thaliana*-Wildtyp-Pflanzen hauptsächlich Cyanidin produzieren, das als Vorstufe Dihydroquercetin benötigt. Ein solcher Phänotyp ist in Übereinstimmung mit der Annahme, daß in der *tt7*-Mutante das Gen für die F3'H defekt ist, die die 3'-Hydroxylierung von Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin katalysiert (vgl. Abbildung 3; Koornneef *et al.*, 1982).

Zu der Gruppe von Mutanten, die wie *tt3*, *4*, *5* und *7* sowohl in der Pigmentierung der Samen als auch in der Akkumulation von Anthocyanen in den vegetativen Pflanzenteilen beeinträchtigt sind, gehört auch die *tt6*-Mutante. *tt6*-Pflanzen und -Samen enthalten weniger Anthocyanidine als Wildtyp-Pflanzen, vor allem fehlen jedoch Flavonole. Auf Grund dieses Phänotyps wurde vermutet, daß der *tt6*-Lokus ein *FLS*-Gen enthält oder für ein Gen kodiert, das an dessen Regulation beteiligt ist (Shirley *et al.*, 1995). Ein *FLS*-Gen (*FLS1*) konnte von zwei unabhängigen Gruppen identifiziert werden (Hartmann, 1997; Pelletier *et al.*, 1997). Die Untersuchung der Sequenz dieses Gens aus der *tt6*-Mutante zeigte jedoch, daß sie keine Unterschiede zur Wildtypsequenz aufwies. Darüber hinaus führte eine Zerstörung des *FLS1*-Gens durch Insertion des transponierbare Element *En1* (s.u.) nicht zu einem *tt*-Phänotyp (Hartmann, 1997). Diese Resultate belegten, daß der *tt6*-Lokus dieses *FLS*-Gen nicht enthält. Während alle bislang identifizierten Strukturgene der Flavonoidbiosynthese im haploiden Chromosomensatz von *A. thaliana* nur einmal vorkommen, existieren jedoch noch mindestens vier weitere Gene in *A. thaliana*, die für Proteine mit 51-64% Identität zu *FLS1* kodieren (Pelletier *et al.*, 1997). Nur für *FLS1* konnte bisher die Konversion von Dihydrokämpferol zu Kämpferol nachgewiesen werden (Hartmann, 1997). Da die Insertion des Transposons *En1* im *FLS1*-Gen nur zu reduzierten Kämpferol-, nicht aber zu erniedrigten Quercetingehalten der Pflanzen führt (Hartmann, 1997), kann spekuliert werden, daß weitere Flavonolsynthasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten oder differenzieller Expression existieren. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, daß der *tt6*-Lokus eines dieser Gene enthält. Die Tatsache, daß sowohl für den *tt6*-Lokus als auch für das *F3H*-Gen eine Kartenposition auf dem unteren Arm von Chromosom III von *A. thaliana* ermittelt werden konnte (Koorneef, 1990; Pelletier und Shirley, 1996), eröffnet darüber hinaus auch die Möglichkeit, daß der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält. Da jedoch die Lokalisation des *tt6*-Lokus in jüngeren Veröffentlichungen in Zweifel gezogen wurde (J. Campanella und C. Town in Pelletier und Shirley, 1996), stellt sich weiterhin die Frage, welches Gen der *tt6*-Lokus enthält.

Mit Hilfe einer Mutante, die eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Pigmentierung der Samenschale zeigt, konnte auch ein weiteres Strukturgen der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* identifiziert werden. Die *banyuls*-Mutante (*ban*; Albert *et al.*, 1997) produziert Samen, die schon in sehr frühen Entwicklungsstadien eine starke rote Pigmentierung zeigen. In

Wildtyp-Pflanzen beginnt die Akkumulation der braunen Pigmente in der Samenschale dagegen erst mit Beginn der Austrocknung der Samen. Die Untersuchung der Samen der *ban*-Mutante zeigte, daß die Färbung auf Anthocyane in der innersten Zellschicht der Samenschale zurückzuführen ist, während die im Wildtyp nachweisbare Akkumulation von Catechinen, den farblosen Vorstufen der kondensierten Tannine, ausbleibt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Annahme, daß in der Samenschale des Wildtyps Leucoanthocyanidine durch LCR zu Catechinen reduziert werden, während sie in der Mutante auf Grund fehlender LCR-Aktivität von LDOX zu Anthocyanidinen umgesetzt werden können. Das *BANYULS*-Gen weist eine hohe Ähnlichkeit zu *DFR* auf (Devic *et al.*, 1999). Das legt die Vermutung nahe, daß es sich beim *BAN*-Genprodukt nicht um einen Regulator sondern um ein weiteres Enzym der Flavonoidbiosynthese handelt. Der Nachweis einer LCR-Aktivität steht jedoch noch aus. Einen *ban*-ähnlichen Phänotyp zeigt auch die *ast*-Mutante (*arabidopsis spotted testa*; Tanaka *et al.*, 1997), die ebenfalls auf Chromosom I lokalisiert werden konnte und daher möglicherweise allelisch zu *ban* ist.

### 1.2.2 Regulatorische Mutanten

Unter den bislang identifizierten regulatorischen Mutanten der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* scheint nur die *tt8*-Mutation spezifisch für diesen Stoffwechselweg zu sein. In *tt8*-Keimlingen, die drei Tage lang unter kontinuierlichem Weißlicht gewachsen sind, ist die Akkumulation von *DFR*-mRNA im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die Transkriptmengen von *CHS*, *CFI* und *F3H* sind dagegen unverändert (Pelletier und Shirley, 1996; Shirley *et al.*, 1995). Auf Proteinebene zeigen sich in fünf und sechs Tage alten *tt8*-Keimlingen FLS und LDOX deutlich reduziert (Pelletier *et al.*, 1999). In methanolischen Extrakten der *tt8*-Mutante sind mittels HPLC Flavonole, nicht aber Flavonolglykoside, nachweisbar. Dies läßt vermuten, daß das TT8-Genprodukt an der Regulation der Expression der „späten“ Gene der Flavonoidbiosynthese beteiligt ist.

Alle sonstigen bekannten regulatorischen Mutanten der Flavonoidbiosynthese in *A. thaliana* zeigen pleiotrope Effekte, die nicht nur die Akkumulation von Flavonoiden, sondern auch verschiedene epidermale Charakteristika betreffen. In der *ttg1*-Mutante zum Beispiel ist wie in *tt8* die Akkumulation von *DFR*-mRNA beeinträchtigt. Das daraus resultierende Fehlen von Anthocyanen ist in dieser Mutante jedoch mit einem *glabra*-Phänotyp

gekoppelt, der sich darin äußert, daß die *ttg1*-Pflanzen keine Trichome auf Blättern und Stengel ausbilden. Einen gegenteiligen Effekt hat die Mutation auf die Zahl der Wurzelhaare. Weiterhin vermögen die Samen ohne Trocknung und Stratifizierung zu keimen (Koornneef, 1981). Sowohl das Fehlen von Anthocyanen als auch das Fehlen von Trichomen konnte in vorangegangenen Experimenten durch Transformation der *ttg1*-Mutante mit dem *R*-Gen aus *Z. mays* komplementiert werden (Lloyd *et al.*, 1992). Es wurde deshalb vermutet, daß *TTG1* für ein MYC-ähnliches Protein kodiert oder für dessen Expression notwendig ist. Die Isolierung des *TTG1*-Gens zeigte jedoch, daß es für ein WD40-Protein mit Ähnlichkeit zu *AmAN11* kodiert (Walker *et al.*, 1999). Die Autoren vermuten daher, daß es sich bei *TTG1* um einen übergeordneten Regulator bHLH-ähnlicher Proteine - oder ihrer Komplexe mit MYB-Faktoren - handelt, die ihrerseits wiederum mit MYB-ähnlichen Proteinen bei der Trichomentwicklung und der Regulation der Flavonoidbiosynthese interagieren.

Weitere positive Regulatoren der Flavonoidbiosynthese scheinen *TTG2*, *ANL2* und *HY5* zu sein. *ttg2* ist ein weiterer *ttg*-Lokus (C. S. Johnson und D. R. Smyth in Walker *et al.*, 1999), der bislang nicht ausführlich beschrieben ist. Er kodiert jedoch offenbar für einen Transkriptionsfaktor, der der WRKY-Familie angehört (Johnson und Smyth, 1998). Bei *ANL2* (*ANTHOCYANINLESS2*) handelt es sich um ein Homöodomänen-Protein der HD-GLABRA2-Gruppe, das die Akkumulation von Anthocyanen in subepidermalen Zellen von Blättern und die zelluläre Organisation von Wurzeln kontrolliert (Kubo *et al.*, 1999).

*HY5* ist ein bZIP-Faktor, der an der Regulation verschiedener stimulusinduzierter Eigenschaften von Wurzel und Hypokotylzellen beteiligt ist (Oyama *et al.*, 1997). Für eine Beteiligung von *HY5* an der Lichtinduktion der Flavonoidbiosynthese spricht, daß in *hy5*-Mutanten *CHS*-GUS-Konstrukte nicht aktiv sind (Chattopadhyay *et al.*, 1998). *HY5* bindet *in vitro* an *ACE*<sup>CHS</sup>, ist jedoch allein nicht in der Lage, in Hefe die Transkription zu aktivieren (Ang *et al.*, 1998), weil vermutlich ein entsprechender (MYB-) Interaktionspartner fehlt. *HY5* interagiert *in vitro* mit *COP1*, einem negativen Regulator der Photomorphogenese (Ang *et al.*, 1998). *cop1*-Mutanten (*constitutive photomorphogenic1*) akkumulieren auch im Dunkeln Anthocyane und *CHS*-mRNA. Diese Beobachtung könnte durch eine in *cop1*-Mutanten fehlende Inaktivierung von *HY5* durch *COP1* erklärt werden. Einen Anhaltspunkt für die Richtigkeit dieser Annahme gibt die Tatsache, daß Pflanzen, die *HY5* ohne *COP1*-Inter-

aktionsdomäne überexprimieren, im Licht neben anderen Besonderheiten auch deutlich erhöhte Anthocyangehalte zeigen (zusammengefaßt in Jarillo und Cashmore, 1998).

Neben COP1 ist auch ICX1 ein potentieller negativer Regulator der Anthocyanbiosynthese. Die *icx1*-Mutante (*increased chalcone synthase expression*) zeigt erhöhte *CHS*-, *CFI*- und *DFR*-Transkriptmengen sowie pleiotrope Effekte, die ähnlich wie *ttg* und *anl2* epidermale Charakteristika wie die Oberflächenstruktur der Samen oder die Zahl der Trichome betreffen (Jackson *et al.*, 1995). Auch die molekulare Ursache dieses Phänotyps ist bislang nicht bekannt. Insgesamt scheint es sich bei den zuletzt genannten Proteinen um übergeordnete Regulatoren zu handeln, die die Aktivität oder Lokalisation von Transkriptionsfaktoren beeinflussen, die in verschiedenen Signaltransduktionswegen bei der Steuerung der Expression unterschiedlicher Zielgene eine Rolle spielen. Diese Transkriptionsfaktoren könnten dann wiederum zum Beispiel bHLH- oder MYB-ähnliche Proteine sein.

### 1.3 Insertionsmutagenese

Die bereits erwähnte Entwicklung von *A. thaliana* zum bevorzugten Modellsystem für die Analyse verschiedener pflanzlicher Entwicklungs und Regulationsprozesse hatte zunächst vor allem praktische Gründe. *A. thaliana* ist klein, anspruchslos und hat mit sechs bis acht Wochen eine kurze Generationsdauer, so daß sich innerhalb kurzer Zeit auf geringem Raum viele Individuen kultivieren lassen (Meyerowitz, 1989). Sie ist obligat selbstfertil, diploid und hat ein sehr kleines Genom von weniger als  $10^8$  Basenpaaren mit einem geringen Anteil repetitiver DNA (Pruitt und Meyerowitz, 1986). Diese Eigenschaften erlaubten es, mit den klassischen Mitteln chemischer und physikalischer Mutagenese eine Saturierung, das heißt eine hohe Wahrscheinlichkeit für je eine Mutation in jedem Gen des Genoms, zu erreichen. An Hand der vielen durch diese Mutationen gegebenen sichtbaren und molekularen Marker konnten genetische Karten erstellt werden, die wiederum die Isolierung von Genen erleichterten, die ihrerseits zu einer weiteren Verbesserung der Karten beitrugen (Koornneef, 1994). Darüber hinaus konnte inzwischen eine nahezu vollständige physische Karte überlappender genomischer *A. thaliana*-DNA-Fragmente in künstlichen Hefe- und Bakterienchromosomen konstruiert werden (Mozo *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1995). Schließlich wird voraussichtlich bis Ende des Jahres 2000 die vollständige Nukleotidsequenz des Genoms von *A. thaliana* bestimmt sein (<http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis>).

Diese Voraussetzungen machen die Isolierung von Genen an Hand ihrer Kartenposition („positional cloning“) in *A. thaliana* vermutlich so leicht wie in kaum einer anderen Pflanzenart. Dennoch handelt es sich dabei nach wie vor um ein sehr zeitaufwendiges und arbeitsintensives Verfahren.

Einen im Prinzip sehr viel schnelleren Weg zur Isolierung eines mutierten Gens stellt die Insertionsmutagenese dar. Dabei werden DNA-Elemente, die in der Lage sind, zufällig in Chromosomen zu integrieren, als Mutagene genutzt, um in Pflanzen Null-Mutationen eines Gens zu erzeugen („loss of function“ oder „knock out mutants“). Ausgehend von der bekannten Sequenz des inserierten Elementes kann die unbekannt Sequenz des umgebenden Insertionsortes zum Beispiel mittels PCR-Techniken erhalten werden (Maes *et al.*, 1999). Zur Insertionsmutagenese eignen sich besonders die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* oder Transposons (Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997; Martienssen, 1998). Transposons sind DNA-Elemente innerhalb eines Genoms, die sich selbst mobilisieren und an anderer Stelle wieder integrieren können („cut and paste“ Mechanismus). Sie sind in höheren Pflanzen weit verbreitet und werden in *P. hybrida* und *Z. mays* schon lange zu Mutagenesezwecken genutzt (Kunze *et al.*, 1997). Der *A.-thaliana*-Ökotyp Columbia enthält dagegen kein aktives endogenes transponierbares Element (Bhatt *et al.*, 1998). Um auch in diesem System Transposons als Mutagen nutzen zu können, wurde beispielsweise das autonome Element *En1* aus *Z. mays* durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer auf *A. thaliana* übertragen (Cardon *et al.*, 1993). Dieses von P. Peterson *Enhancer (En)* und von B. McClintock *Suppressor-mutator (Spm)* genannte Transposon (zusammengefaßt in Kunze *et al.*, 1997) erwies sich auch im heterologen System als aktiv. Es konnte daher als Mutagen zum Aufbau einer saturierenden Mutantenpopulation verwendet werden (Wisman *et al.*, 1998).

Transposons können grundsätzlich auf zwei Wegen Mutationen auslösen: Einerseits durch Integration in ein Gen andererseits aber auch durch unpräzises Ausschneiden, das Mutationen an der ehemaligen Integrationsstelle verursachen kann (Schwarz-Sommer *et al.*, 1985). *En1* zum Beispiel erzeugt bei seiner Integration eine Duplikation der drei an 5' vorangehenden Basen an seinem 3'-Ende („targetsite duplication“). Diese zusätzlichen Nukleotide können nach einer Exzision ganz oder teilweise am alten Insertionsort zurückbleiben (Cardon *et al.*, 1993). Im Falle einer Integration innerhalb eines offenen Leserahmens können solche sogenannten

„footprints“ zu Verschiebungen und damit zu veränderten Aminosäuresequenzen oder vorzeitigen Stop-Kodons führen und dadurch die Mutation stabilisieren. Ein Exzisionsereignis kann jedoch auch zur Wiederherstellung einer intakten Sequenz in einer Zelle und damit all ihren Nachkommen führen (Reversion). Das ist der Fall, wenn entweder kein „footprint“ zurückgelassen wird oder die zusätzlichen Nukleotide den Leserahmen nicht verschieben, sondern eine zusätzliche Aminosäure einführen, die die Funktion des Genproduktes nicht beeinträchtigt. Auf Grund solcher Ereignisse können *En1*-mutagenisierte Pflanzen Mosaik aus Geweben darstellen, die Mutanten- oder Wildtyp-Phänotyp zeigen. Diese Tatsache muß bei der Analyse *En1*-mutagenisierter Linien berücksichtigt werden.

Neben der Untersuchung von Pflanzen mit vom Wildtyp abweichendem Phänotyp ist eine andere mögliche Anwendung mittels Insertionsmutagenese gewonnener Populationen, sie gezielt nach Pflanzen mit einer Insertion in einem Gen zu durchsuchen. Über den eventuell aus der Insertion resultierenden Phänotyp können dann möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion des betroffenen Gens gezogen werden („reverse genetics“). Für den Nachweis einer bestimmten Insertion macht man sich die Sensitivität und Spezifität der PCR zunutze. Mittels spezifischer Oligonukleotide für das inserierte Element und das zu untersuchende Gen ist es möglich, ein einzelnes Insertionsereignis in einer komplexen DNA-Probe nachzuweisen, die mehrere hundert Pflanzen repräsentieren kann (Bouchez und Höfte, 1998). Durch Organisation der zur Gewinnung der DNA herangezogenen Pflanzen in einer dreidimensionalen Matrix (Baumann *et al.*, 1998; Koes *et al.*, 1995) lassen sich mittels einer überschaubaren Zahl von Reaktionen viele tausend Pflanzen auf die gewünschte Insertion hin untersuchen und die zugehörigen Einzelpflanzen identifizieren.

#### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, weitere an der Flavonoidbiosynthese oder ihrer Regulation beteiligte Gene in *A. thaliana* zu isolieren, um so neue Erkenntnisse über die Regulation von stimulusinduzierter sowie gewebe- und entwicklungsspezifischer Genexpression zu gewinnen. Dazu sollten sowohl bereits publizierte *transparent-testa*-Mutanten näher untersucht als auch neue Vertreter dieser Klasse identifiziert und charakterisiert werden.

Zu Beginn der Arbeit mußten zunächst Methoden der Anzucht und der Analyse dieser Mutanten etabliert werden. Mit diesen Methoden sollte dann eine erste Charakterisierung der neu entdeckten Mutante *tt15* durchgeführt werden, um so Anhaltspunkte über die Natur des darin vorliegenden Defektes zu erhalten. Darüber hinaus sollten die Methoden genutzt werden, Mutanten mit veränderter Samenfarbe näher zu untersuchen, die in einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population beobachtet worden waren. Unter diesen Linien sollten vor allem samenspezifische oder regulatorische *tt*-Mutanten identifiziert werden, um die in diesen Pflanzen mutierten Gene zu isolieren. Durch Identifizierung von neuen *tt6*-Allelen sowie von Pflanzen mit Transposoninsertionen im *F3H*-Gen sollte darüber hinaus versucht werden, die Frage zu beantworten, ob der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält. Da *AtF3H* zu denjenigen Genen gehört, die nach Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht koordiniert exprimiert werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit schließlich auch der *F3H*-Promotor auf Elemente hin untersucht werden, die diese Induktion vermitteln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Biozym (Hameln), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Sie hatten analytischen Reinheitsgrad. Organische Lösungsmittel stammten von Riedel-de Haen (Hannover) und Merck, Chemikalien für Kulturmedien von Gibco BRL (Eggenstein) und Difco Lab (Detroit, USA).

Eine Probe des Herbizids Norfluorazon (Zorial<sup>®</sup>, interne Bezeichnung A-6283A) wurde von M. Schulte, Novartis Agro, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Es wurden Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), Ribonuklease A (RNase A) und Lysozym von den Firmen Roche (Mannheim), New England Biolabs (NEB, Schwalbach), Stratagene (Heidelberg), Gibco BRL und Serva verwendet. Darüber hinaus wurden DNA-Größenmarker (Gibco BRL), Sephadex-G25 (Pharmacia), „Quick-Sep“-Säulen für Gelausschlußchromatographie (Isolab, Ohio, USA) und Hyperfilm-MP-Röntgenfilme (Amersham, Braunschweig) benutzt.

(-32P)dCTP (3000 $\mu$ Ci/mmol) wurde von der Firma Amersham geliefert.

#### 2.1.2 Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und LifeTechnologies (Paisley, GB) bezogen. Die Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben.

##### Standard Primer:

uni	GTAAAACGACGGCCAGT
rev	AACAGCTATGACCATG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
GPSspe	CTTAAAAACTCCATTTCCACCCCT
GPSnot	TTGTCATAGTTTATGATCTATTTTG

H227	CCTCTATATAAGGAAGTTC	35S-down
H228	CGCAAGACCGGCAACAGG	nos-up
H755	GAGTCAGTGAGCGAGGAA	MCS-down
H1690	CGCGATCCAGACTGAATGC	GUS-up
SKT17 (HK33)	TCTAGAAGCTAGTGGATCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synth.
Mercury	CTGGAATTCGCTACGATCCT	RAGE
MercuryTC	CTGGAATTCGCTACGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC	RAGE
PCR-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	RACE
Oligo-dT-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV	RACE

Verschiedene genspezifische Oligonukleotide:

En26	CACTCCTTTGACGTTTTCTTGTAGTG	
En50	GCCGACACTCTTAATCGAAG	
En205	AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA	
En7631	TCAGGCTCACATCATGCTAGTCC	
En8130	GAGCGTCGGTCCCCACACTTCTATAC	
En8141	GGACCGACGCTCTTATGTTAAAAG	
En8202	CACTCCTTACCTTTTTTCTTGTAGTG	
S8	CCAACGCCTGCGCCTCTCCGTCACCGTTCC	<i>CFI</i>
S9	GGAGCTAACAGAATCTATCCCGTTCTTCCG	<i>CFI</i>
S10	GATGAACCGGGAGGGAATGTTTCTTCC	<i>CFI</i>
S11	GTGCCAGGTGACACACACCGTTCTTCCCG	<i>CFI</i>
S12	GGTGCTTCTTCTTTGGATGAGATCAGACAG	<i>CHS</i>
S13	CTTGGTCTCCGTCCTTCCGTCAAGCGTCTC	<i>CHS</i>
S14	CCGTCTATGGCACCATCAGAGTCTGGAAGG	<i>CHS</i>
S15	GACACCCCACTCCAACCCTTCTCCTGTCTG	<i>CHS</i>
H862	ACCGTGTGTGTAACCGGCG	<i>DFR</i>
H863	TTGCATAAGTCGTCCAAATG	<i>DFR</i>
S90	GCTTTTCCATAATTTATAATTATTTTAGGTGTCTG	<i>DFR</i>
S91	GTCCGGTCGATTCAAAGACAGCACTC	<i>DFR</i>
S168	CACAGACTGGTTCAAGTCTAATCC	AL049660
S169	GACTGCATTGACTCATGATCATTGTC	AL049660
S171	CTCGATATCAGAAGCAGCATCATAG	AC006085
S172	CTATTTTCCACTGTTTTGTACATCG	AB025629
S173	CTTGCTGCTCGACATCAGAAGCAGCC	AB025629
S170	GAATCTCTTCAACAATGGATGTGACC	AC006085
Actin2-1	TCCCTCAATCTCATCTTCTTCC	<i>Actin2</i>
Actin2-2	GACCTGCCTCATCATACTCG	<i>Actin2</i>
S165	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	nga280 forward
S166	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	nga280 reverse

F3H-spezifische Oligonukleotide:

S4	AGGAACTTTGACTGAGCTAGCCGGAGAGTC	CAPS
S5	GGTAAAAGTGACGGAGGAGTATAGTGAGAG	PCR-„screening“
S6	GACCGTGGTCGCCGAGATTGACGAC	
S7	GAGGCGAGCAAGCTCCAAATCTCTTCCC	PCR-„screening“
S21	CACTTTCACCCATCCTTCAGGCTTATTTG	CAPS, 5'-RACE
S22	CCACCGTGAGTAGTCTCTGTTTTC	
S23	CCAATCTTGCACAGCCTCTCC	5'-RACE
S34	CACCGGTACGAGAAATACGTTACAATC	5'-RACE
S69	GTCTTTGTTCTGTATGGGCCTTTGAC	
S70	CATAGACAAGTGCATCAATTATCATTATTTTC	
S77	GTCAGTGTGACGCTTGAGTCCGAG	
S84	CGGACGAATTTAGAGTTGAGCTTAGACTCTCCG	
S85	GAGAGCGGCCATAGCTACTGCAGCTACC	
S86	GGATCCGTTCTCTCATGGAAAAGTAGACG	
S87	CCATGTGTCTACTACCTACGGTGTAACG	
S88	GTCGCTTACAATGTGTTTAGCGACGAAATC	
S89	CATGCGTCGATATGGACCAAAGATTGTTG	
S92	GGATCCGTTCTCTCATGGAAAAGTAGACG	
S93	GGCTACATTCCAACGTATCAC	
S1	GCGGGATCCGTTCTCTCATGG	Prom.-GUS, 5'- <i>Bam</i> HI
S2	TTGGAATTTCCAAGCCCGTACCAGAACATG	Prom.-GUS, 5'- <i>Eco</i> RI
S3	GAGCCATGGTAATTACGAAGACAAAAGAC	Prom.-GUS, 3'- <i>Nco</i> I
S19	CTAGAATTCGTTAAAAACGTAAATCATATTAAC	Prom.-GUS, 5'- <i>Eco</i> RI
S20	AATGAATTCCTACAAAATATTATTATACCGTATG	Prom.-GUS, 5'- <i>Eco</i> RI
S29	GGAGAAATTCAGAGCGGAGACATGTTCTGGTACGGGC	ACS5mut
S30	GTTGATAGAAAGCTCTAGATTTAAAAATGCTTGTGGTCTG	ACS4mut
S36	GGTCGCTAGCTAGTCGACACGGTACTACTGCTC	MRS1mut
S73	GTTAATATGATTTCTAGATTTAACGGTTG	ACS3mut
S74	TCGTTTACACGTCGACTAGTAGACACATG	MRS2mut

T1I-spezifische Oligonukleotide:

S105	CACCACCACTATACGAGATATCCTC	RAGE, RT-PCR
S106	ATTGTTGATACAAGAGTTTTGG	RAGE, 5'-RACE
S111	GCTCTTCTTCTGAAAAACCTAGAC	RAGE
S112	GAGGTTAGGGAAGAGATCAAGG	RAGE, 5'-RACE
S117	CATACCTGAAGATTGTTGTAGCG	CAPS
S121	GCTAAACAACCAGGATTTAATAGATG	
S122	GGGTAATGAAATGAATGCTAATGTTG	
S124	CATCTATTAAATCCTGGTTGTTTAGC	
S125	CAACATTAGCATTTCATTTCATTACC	
S126	GTACGTAAGTCACACAATATGATTC	CAPS
S127	GAGAGCAATCATTATATTAAGGTAAC	
S128	CCATGTTAAGGCGTTTGGGTCTG	
S129	CAGACCCAAACGCCTTAACATGG	

S130	GTCCTTAAGAGAACGTTTGTG	RT-PCR
S131	CGCTCCAAACGCACTACAAAC	3'-RACE
S132	GGAGTCCTGAAAGGCACACAG	3'-RACE
S133	CGTAAGCTTTTAGCTTTTCTAC	
S134	GCTTGAACGAGGATGGTC	5'-RACE
S138	GTGGTAATAATTGGCTAGTATG	
S139	CTCTAACGGTCAACACCTCTG	
S140	CAAGTATTACTTCTAATATACTG	
S141	GTAAATAGATATTTTCATAAGCG	
S142	CGGTCCTTTCCTGTATTGTG	5'-RACE
S143	GAACCATGTCCCCACATGTGC	5'-RACE
S145	TGTAGTGATGAAAAATATAATGGTA	
S148	GAATATATAATTCTACTTACGC	
S149	CATACTAGCCAATTATTACCAC	
S156	GTGTTATTAACATAATATAGAG	
S157	CAAAAATGTTGAAGCAATTCAG	
S158	ACCCGACAACCTCTATATCC	
S159	CAACTTAACATTGGTGGAT	
S160	AGCATCATTATCCACCAAT	
S161	CATATGCAATTTTGGTTTTA	
S174	GAATTATAATATTTCCAAAACTAAC	
S175	CAAGTGTGAACAAAACGAATAATGTG	
S176	CACCAAGACTAACCAACATTACC	
S177	GAGAAATCAACTAATCTATTGC	
S151	GACTCCATGGAATGTGGTGAATAG	Prom.-GUS, 3'- <i>Nco</i> I
S152	CATTCCATGGAGTCACCACCACTATAC	GFP-Fusion, 5'- <i>Nco</i> I
S153	ATACCATGGAAAAAACAAAGTCTCG	GFP-Fusion, 3'- <i>Nco</i> I
S167	GCCCGAGCTCAAAAAAACAAAGTCTCGGAG	35S-cDNA, 3'- <i>Sac</i> I

### 2.1.3 Puffer und Medien

Puffer und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert. Die folgenden Mengen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf 1 l.

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
TAE-Puffer:	40 mM Tris/Acetate pH 7,5, 1 mM EDTA
20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0 mit Essigsäure

L-Medium:	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 2,4 g MgSO <sub>4</sub>
LB-Medium:	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
TB-Medium:	TB I: 12 g Pepton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin pro 900 ml TB II: 23 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 164 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pro l Beide Komponenten wurden getrennt autoklaviert und vor Gebrauch im Verhältnis 9:1 (TB I: TB II) gemischt

Bei Selektionsmedien oder -platten wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 60°C zugefügt. Die Endkonzentration betrug für Ampicillin 80 µg/ml und für Kanamycin 25 µg/ml.

Für die Herstellung von Platten wurden 12,5 g Agar-Agar pro l Medium mit autoklaviert. Zur Blau/Weiß-Selektion wurden dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf unter 60°C 2 ml einer 100 mM IPTG-Lösung und 2 ml einer 2%igen X-Gal-Lösung in DMF zugegeben.

#### 2.1.4 Bakterienstämme, DNA-Vektoren und Sonden

<i>E.-coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-blue MRF' Kan <sup>r</sup>	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , {F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Z $\Delta$ M15, Tn5(kan <sup>r</sup> )}	Firma Stratagene
GM2163	F <sup>-</sup> , <i>ara14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galT22</i> , <i>supE44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rps1136</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>Xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13</i> , Tn9 (Cam <sup>r</sup> ), <i>dcm6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> (rk- mk+), <i>mcrA</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\Phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Firma Invitrogen

<b>Agrobacterium-Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
GV3101	mit pMP90-virulenz Plasmid, C59C1, Rif <sup>r</sup>	(Koncz und Schell, 1986)
<b>Plasmid</b>	<b>wesentliche Merkmale</b>	<b>Referenz</b>
pBluescript II SK(+)	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	(Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992)
pCR-Script SK(+)	wie pBluescript II SK(+), <i>SrfI</i> in MCS	Firma Stratagene
pCR-TOPO	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Firma Invitrogen
pT7-Blue	<i>f1ori</i> , <i>colE1ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	Firma Novagen
pBT10-GUS	<i>colE1ori</i> , Amp <sup>r</sup> , -46 bis +8 des 35S-Promotors aus CaMV, <i>uidA</i> -ORF, <i>nosPA</i> , MCS, Deletionen im Vektorrückgrat	(Feldbrügge <i>et al.</i> , 1997)
pBT10-UBI-LUCm3	wie pBT10-GUS, <i>PcUBI4-2</i> Minimalpromotor, <i>Luc</i> -ORF mit 3 stillen Mutationen in den Erkennungsstellen für <i>EcoRI</i> , <i>ClaI</i> und <i>XbaI</i> statt <i>uidA</i> -ORF	(Sprenger, 1997)
pBT8-35S-LUCm3	wie pBT8-GUS, 35S-Promotor aus CaMV, <i>Luc</i> -ORF statt <i>uidA</i> -ORF	(Sprenger, 1997)
pAtCFI-mMRE-4-GUS	wie pBT10-GUS, <i>AtCFI</i> mMRE Tetramer (UH140)	(Hartmann, 1997)
pGPS1	R6k- $\gamma$ <i>ori</i> , Tn7 (Kan <sup>r</sup> )	Firma NEB
pGPTV-TATA-GUS	Kan <sup>r</sup> (nptII), MCS, -46 bis +8 des 35S-Promotors aus CaMV, <i>uidA</i> ORF, <i>nosPA</i>	(Sprenger, 1997)
pAVA393	wie pBluescript II SK(+), doppelter 35S-Promotor aus CaMV, translationeller Enhancer aus TEV, <i>GFP5</i> -ORF, 35SPA	(Siemering <i>et al.</i> , 1996; von Arnim <i>et al.</i> , 1998)

Sonde	Ursprung	Referenz
<i>CHS</i>	pUC-gDNA-AtCHS (BW369), ca. 1,1 kb <i>EcoRI</i> -Fragment	(Feinbaum und Ausubel, 1988)
<i>CFI</i>	pEX-AtCFI (BW447), ca. 750 bp <i>EcoRI/NcoI</i> -Fragment	(Shirley <i>et al.</i> , 1992)
<i>FLS</i>	pSK-cAtFLS (UH99), ca 1,4 kb <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment	(Hartmann, 1997)
<i>DFR</i>	pCR-Script-cDNA-AtDFR (UH1), ca. 760 bp <i>BamHI/SacI</i> -Fragment	(Shirley <i>et al.</i> , 1992)
<i>UBQ</i>	pAttS0348 (UH3), ca. 550 bp <i>EcoRI</i> -Fragment	EST-Sequenz
<i>F3H</i>	pCR-Script-cDNA-AtF3H (SA20), ca. 780 bp <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
<i>TT1</i> (5'-Bereich)	pCR-RAGE20 (SA62), ca 120 bp <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
<i>TT1</i> (cDNA)	pSK-AtTT1-GFP (SA81), ca. 900 bp <i>NcoI</i> -Fragment	diese Arbeit
<i>En1</i> -links	pCR-TOPO-ZmEn1-links (SA51), ca. 150 bp <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
<i>En1</i> -rechts	pCR-TOPO-ZmEn1-rechts (SA53), ca. 500 bp <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit

### 2.1.5 Zellkulturen und Pflanzen

Die verwendete *A. thaliana*-Zellsuspensionskultur At7 (Ökotyp Columbia) wurde von L. Bollenbach betreut. Sie wurde wie beschrieben (Trezza *et al.*, 1993) im Dunkeln unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink und Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) kultiviert. 5 Tage nach der Subkultivierung wurden die Zellen für die Isolation von Protoplasten verwendet.

Die Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte gewöhnlich im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel). Nach der Aussaat in Töpfe (für Kreuzungen) oder Kisten (für Segregationsanalysen) mit VM-Erde erfolgte eine Stratifizierung der Samen für 24-48 h bei 4°C. Material für RNA-Isolierungen wurde von gesunden etwa 6 Wochen alten Pflanzen jeweils 5 h nach Einsetzen der täglichen Beleuchtungsperiode isoliert. Für die Vakuuminfiltration wurden je 6 Pflanzen in Töpfen (Ø 10 cm) in einer Phytokammer unter Kurztagbedingungen angezogen (8 h Licht, 16 h Dunkel). Für jedes Konstrukt wurden 4 Töpfe vorbereitet. Um Blütenbildung zu induzieren, wurden die Pflanzen nach 10 bis 12 Wochen in ein Gewächshaus mit Langtagbedingungen überführt. Etwa eine Woche vor der Infiltration wurden die Primärinfloreszenzen entfernt, um die Bildung sekundärer Infloreszenzen anzuregen.

Die Lichtinduktion von *A. thaliana*-Pflanzen und -Protoplasten erfolgte in einem Klimaschrank HT (Infors, Bottmingen, CH) mit 9 Phillips Leuchtstoffröhren: 4x „warm white Light“, 3x „blue TLD“ und 2x „Silvana black light blue“, bei einer Quantenstromdichte von ca. 1000 µE.

### 2.1.6 Sonstiges biologisches Material

- Die *A. thaliana* *tt*-Mutanten *tt1* (NW82), *tt2* (NW83), *tt3* (NW84), *tt4* (NW85), *tt5* (NW86), *tt6* (NW87), *tt7* (NW88), *tt8* (NW111), *tt10* (NW110) und *ttg* (NW89) wurden über das „Ohio *Arabidopsis* Stock Center“ (Ohio, USA) bezogen. Die für Kartierungen im Genom verwendeten 100 „Recombinant Inbred“-Linien (RI-Linien, NW1899; Lister und Dean, 1993), wurden vom „Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre“ (Nottingham, UK) bezogen. Genomische DNA der RI-Linien wurde von E. Bongartz isoliert.
- Die IGF-BAC-Filter 79.1.151 sowie die BACs F11O6, F3N5, F2B22, F10P4 und F4M12 wurden über das Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes (Berlin) bezogen.
- Die *tt15*-Mutante und Columbia-2 Wildtyp wurden von N. Focks und C. Benning (Institut für Genbiologische Forschung, Berlin) zur Verfügung gestellt.

- Transposoninsertionslinien, deren Samenfarbe von der des Wildtyps abwich, wurden im Verlauf der Herstellung einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population identifiziert (E. Baumann, N. Schmitz und E. Wisman, persönliche Mitteilung). Zur Herstellung dieser Population wurde das autonome Element *En1* aus *Z. mais* mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *A. thaliana* (Ökotyp Columbia) übertragen (Cardon *et al.*, 1993). Pflanzen, die das Transposon enthielten, wurden über zwölf Generationen hinweg mittels „single seed descent“ vermehrt (Baumann *et al.*, 1998; Wisman *et al.*, 1998), bis eine Population aus 8000 Linien mit 48000 unabhängigen *En1*-Insertionen zur Verfügung stand (E. Wisman, persönliche Mitteilung). Weitere Pflanzen mit heller Samenfarbe wurden im Rahmen der Durchmusterung der Population auf Mutanten mit veränderter Zuckertoleranz von A. Kortstee, J. Pego und S. Smeekens (Universität Utrecht, NL) identifiziert. Anhang 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Linien.
- Pflanzen mit *En1*-Insertionen im *F3H*-Gen (5A45, 13728 und 5G38) wurden durch Mitarbeiter von E. Wisman mittels eines PCR-Screenings (Baumann *et al.*, 1998) in der mutagenisierten *A.-thaliana*-Population identifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide S5 und S7 verwendet.
- Eine cDNA, die durch reverse Transkription von Landsberg *erecta* Wildtyp Gesamt-RNA mit dem SKT17-Primer hergestellt worden war, sowie Gesamt-RNA aus 8 h mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlten At7-Suspensionskulturzellen wurden von U. Hartmann zur Verfügung gestellt (Hartmann, 1997). RNA aus verschiedenen Organen von *A.-thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia stammte von M. Sprenger (Sprenger, 1997).

## 2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die nachfolgend aufgeführten Standardtechniken basieren auf Methoden aus dem „Molekularbiologischen Handbuch“ (Sambrook *et al.*, 1989). Sie wurden wie in Hartmann (1997) ausführlich beschrieben durchgeführt. Bei der Verwendung von „Kits“ erfolgte die Anwendung, sofern nicht anders vermerkt, nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

- Ethanol/Salzfällung von Nukleinsäuren
- Phenolextraktion
- Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen
- Auftrennung von DNA in Agarosegelen
- Reinigung von DNA durch Gelausschluß-Chromatographie über Sephadex-G25-Säulen
- Kultivierung von *E. coli*
- Endonukleolytische Restriktionsspaltungen von DNA erfolgten nach Angaben der Hersteller der Enzyme in den zugehörigen Puffern.
- Ligationen von DNA Fragmenten wurden mit T4-DNA-Ligase von Roche im dazugehörigen Puffer für eine Stunde bei RT oder bei 16°C über Nacht durchgeführt. Ein typischer 30 µl Ansatz enthielt etwa 100 ng Vektor-DNA, 200 ng DNA-Fragment, 1 U T4-DNA-Ligase sowie 3 µl 10 mM rATP.
- Transformationskompetente Bakterienzellen (*E. coli*) wurden nach der Rubidiumchloridmethode hergestellt (Hanahan, 1983).
- Transformation von Plasmiden oder Ligationsprodukten erfolgte nach der Hitzeschockmethode (Hanahan, 1983).
- Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese erfolgte mit dem „QIAquick-Gelextraktions-Kit“ der Firma Qiagen oder dem „NucleoSpin Extract Kit“ von Macherey und Nagel (Düren).

### 2.2.1 PCR

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

Reaktionsansätze für PCR hatten gewöhnlich ein Volumen von 50 µl. Sie enthielten 50-500 ng Matrizen-DNA, 10 pmol spezifische gegenläufige Primer, 0,4 mM dNTP-Mix und 0,5-2,5 U Polymerase in dem entsprechenden 1x Puffer. Es wurden *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) und *Taq*-DNA-Polymerasen der Firmen Roche und Appligene/Oncor (Heidelberg) verwendet. Die Amplifikationen erfolgten entweder in GeneAmp 9600 oder 9700 Maschinen (Perkin Elmer, Weiterstadt) oder in einem MJ Research PTC-225, Modell Tetrad (Biozym) nach folgendem Schema:

1x	85-94°C	2-4 min
25-40x	94°C	30-60 s
	50-65°C	30-60 s
	72°C	1-2 min/kb
1x	72°C	5-10 min
1x	4-16°C $\infty$	

Blockmutationen wurden in DNA-Sequenzen durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Aplifikationen eingeführt (modifiziert nach Sarkar und Sommer, 1990). In der ersten PCR wurde ein Primer mit der gewünschten Mutation und ein unmutierter gegenläufiger Primer verwendet. Das Produkt dieser Reaktion wurde mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche gereinigt und in der zweiten Reaktion zusammen mit einem weiteren gegenläufigen Oligonukleotid als „Megaprimer“ eingesetzt.

### **2.1.2 Plasmid-DNA-Präparationen**

Die schnelle Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der TELT-Methode (Holmes und Quigley, 1981). Dazu wurden 1,5 ml einer 3 ml üN-Kultur in TB-Medium abzentrifugiert (3 min, 13000 rpm, RT; Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg) und das Pellet in 200 µl TELT-Puffer (50 mM Tris/HCL pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4% Triton X-100) sowie 20 µl Lysozymlösung (1 mg/ml) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde nach 3 min bei 95°C für 5 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C) und das Pellet mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers verworfen. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 100 µl Isopropanol gefällt und sedimentiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer mit 40 µg/ml RNaseA gelöst.

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde eine modifizierte alkalische Methode nach Birnboim (1979) verwendet. Dazu wurde eine 50 ml üN-Kultur in TB-Medium abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C; Minifuge RF, Heraeus, Osterode) und das Pellet in 4 ml TE50/10 (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) und 1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert. Nach 5 min auf Eis wurde die Suspension zum Aufschluß der Zellen mit 10 ml Lösung II (1% SDS; 0,2 M NaOH) versetzt, gemischt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschlie-

ßend wurden 7,5 ml Lösung III (3 M K-Acetat; 1,8 M Ameisensäure) zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde filtriert, mit 10 ml Isopropanol für 10 min auf Eis gefällt und pelletiert (15 min, 5000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung von RNA und Proteinen wurde 1 Vol 5 M LiCl in TE-Puffer zugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C; Eppendorf 5403) wurde der Überstand mit 2,5 Vol Ethanol 5 min bei -80°C inkubiert und wiederum zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Das Präzipitat wurde in 400 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 2 µl RNaseA-Lösung (2 mg/ml) versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanol/Salz-Fällung. Die DNA wurde in 200 µl TE aufgenommen und auf 1 µg/µl eingestellt.

Hochreine Plasmid-DNA für Transfektionsexperimente wurde durch eine Kombination aus alkalischer Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung gewonnen. Dazu wurde das Qiagen „Plasmid MEGA Kit“ nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Reinigung wurde die DNA-Lösung zur Pelletierung unlöslicher Verunreinigungen noch einmal zusätzlich zentrifugiert (30 min, 14000 rpm, 4°C; Eppendorf 5403) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus einer 400 ml üN-Kultur von GM2163-Bakterien in TB-Medium konnten bis zu 2 mg Plasmid-DNA isoliert werden.

### **2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial**

Die Isolation kleiner Mengen genomischer DNA aus *A.-thaliana*-Blättern für PCR erfolgte nach der Methode von Edwards (1991). Dazu wurden 1-2 kleine *A.-thaliana*-Blätter (20-40 mg) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) ca. 15 s gemörsert und anschließend für 5 s auf einem Vortex-Mischer auf höchster Stufe geschüttelt. Das Pflanzenmaterial wurde pelletiert (3 min, 13000 rpm, RT; Eppendorf 5403) und 150 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 150 µl Isopropanol und 2 min Inkubation bei RT wurde die genomische DNA gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde pelletiert (5 min, 13000 rpm, RT), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. 2 µl dieser DNA wurden als Matrizen für PCR verwendet.

Größere Mengen genomischer DNA, die auch für Gel-Blot-Experimente geeignet war, wurden mit Hilfe des „Nucleon PhytoPure Kits“ (Amersham Life Science) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden 100-300 mg Blattmaterial in einem 50 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe von 3 ebenso vorgekühlten Mahlkörpern (Hoechst, Frankfurt) durch 20 s schütteln auf einem Vortex-Mischer bei höchster Stufe zerkleinert. Nach Zugabe von 600 µl SDS-haltigem Lysis-Reagenz wurde das Material bei 37°C aufgetaut. Der Ansatz wurde nochmals für 5 s geschüttelt, mit 10 µl RNase A (2 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Überführung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurden 200 µl Reagenz 2 zugegeben, gemixt und unter gelegentlichem Umschwenken von Hand für 10 min bei 65°C inkubiert. Danach erfolgte eine 20 min Inkubation auf Eis und anschließend die Zugabe von 500 µl eiskaltem Chloroform und 100 µl eines speziellen Harzes zur Entfernung von Polysacchariden. Nach 10 min Inkubation auf einem Überkopfschüttler wurde zur Phasentrennung 10 min bei 7000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5403) und die klare Oberphase mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die DNA wurde durch Zugabe eines Volumens Isoopropanol gefällt, pelletiert (10 min, 13000 rpm, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und üN bei 4°C in 100 µl TE-Puffer suspendiert.

#### **2.1.4 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial**

Pflanzenmaterial für RNA-Isolationen wurde direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Das Material wurde jeweils unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert. Aus größeren Mengen von *A.-thaliana*-Pflanzenmaterial (1-5 g) wurde RNA nach der Methode von Dunsmuir (1988) isoliert. Dazu wurde es in ein 50 ml-Reaktionsgefäß mit 10 ml RNA-Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,5; 100mM NaCl; 20mM EGTA; 2% SDS) und 10 ml Phenol überführt. Nach 5 min Mischen auf einem Überkopfschüttler wurden 5 ml Chloroform zugegeben und weitere 5 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (10 min 5000 rpm, 4°C; Minifuge RF) und anschließend die Oberphase in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, das 10 ml Phenol enthielt. Extraktion und Phasentrennung wurden wiederholt und danach die wäßrige Phase mit 10 ml Chloroform extrahiert. Die Fällung der Nukleinsäuren aus der Oberphase erfolgte mit 2,5 Vol Ethanol und 0,1 Vol 3 M Na-Acetat pH 5,2 für 20 min bei -80°C. Sie wurden pelletiert (30 min, 5000 rpm, 4°C) und in 5 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst

(0,1% DEPC, Inkubation üN unter Gasaustauschbedingungen bei RT, anschließend autoklaviert). Zur Gewinnung der RNA wurde die Lösung mit 5 ml 4 M LiCl-Lösung versetzt, mindestens 3 h auf Eis inkubiert und zentrifugiert (30 min, 5000 rpm, 4°C). Die RNA wurde zunächst in 2 ml DEPC-Wasser gelöst, durch Ethanol/Salz-Behandlung gefällt und schließlich in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Standen 100 mg-1 g Material zur Verfügung, so wurde die Methode von Logemann (1987) angewandt. Dazu wurden zu einer Probe 6 Volumen Z6-Puffer (8 M Guanidiniumhydrochlorid; 20 mM MES; 20 mM EDTA) sowie 1% β-Mercaptoethanol gegeben und bis zur vollständigen Homogenität gemischt. Danach wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24:24:1) durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit 0,05 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol versetzt und die RNA 1 h bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 13 000 upm, 4°C; Eppendorf 5403) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl DEPC Wasser gelöst.

Für RNA-Extraktionen aus 10-100 mg Ausgangsmaterial wurde das „Purescript RNA Isolation Kit“ (Gentra Systems, Minneapolis, USA) nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Dazu wurde das gemörserte Pflanzenmaterial in mit flüssigem Stickstoff gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 300 µl SDS-haltigem Lysis-Reagenz wurde das Material bei RT aufgetaut und 5 s auf einem Vortex-Mischer auf höchster Stufe geschüttelt. Es wurden 100 µl Reagenz 2 zugegeben, gemischt und Zelltrümmer sowie gefällte Proteine abzentrifugiert (4 min, 14000 rpm, 4°C; Eppendorf 5403). Der Überstand wurde mit 500 µl Chloroform extrahiert und anschließend die RNA durch Zugabe von 300 µl Isopropanol zur Oberphase gefällt. Nach Zentrifugation (4 min, 14000 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und für 30 min auf Eis in 20 µl DEPC-Wasser rehydriert.

Die Anreicherung von polyA<sup>+</sup>-mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte durch Affinitätschromatographie (modifiziert nach Okayama *et al.*, 1987). Dazu wurden Oligo-(dT)-Zellulose-Säulen nach Angaben des Herstellers verwendet (Pharmacia).

### 2.1.5 Gelelektrophorese und Kapillartransfer von Nukleinsäuren

Für genomische DNA-Gel-Blot-Analysen (modifiziert nach Southern, 1975) wurden jeweils 5-10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde im Gel mit 0,25 M HCl behandelt, denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und neutralisiert (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5).

Für RNA-Gel-Blot-Analysen (modifiziert nach Alwine *et al.*, 1977) wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA denaturiert (10 min 65°C, danach sofort auf Eis) und in einem denaturierenden Agarosegel (1% Agarose, 1,88% Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer) aufgetrennt (10x MOPS Puffer: 400 mM MOPS, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH).

Der Kapillartransfer von DNA und RNA auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham Pharmacia) erfolgte in 10x SSC-Puffer über Nacht. Anschließend wurden die Membranen 2 h bei 80°C gebacken, um die Nukleinsäuren kovalent daran zu binden.

### 2.1.6 Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren

Die Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren erfolgte in verschließbaren Röhren über Nacht bei 65°C in einem Rollinkubator in 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5 10% Dextransulfat sowie 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA. DNA-Sonden wurden unter Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP mit dem „Random Primed DNA Labelling Kit“ (Roche) radioaktiv markiert. Nicht eingebaute dNTPs wurden mittels eines Gelfiltrationsschrittes aus dem Ansatz entfernt. Nach einer Prähybridisierung von mindestens 2 h wurde die Sonde hitzedenaturiert und zu der Membran gegeben. Nach 16 h wurde der Filter 2x20 min in 2xSSC, 0,5% SDS bei 65°C gewaschen, in Folie eingeschweißt und für die Autoradiographie bei -80°C exponiert.

Um für eine Rehybridisierung gebundene Sonde von einer Membran zu entfernen, wurde diese in 0,1% SDS bei 80°C 2x20 min gewaschen.

### **2.1.7 DNA-Sequenzierung und computergestützte Auswertung von Sequenzdaten**

Automatisierte DNA-Sequenzanalysen wurden von der ADIS-Einheit des MPIZ unter Verwendung von „Big Dye-terminator Chemistry“ auf Abi Prism 377 und 3700 DNA-Sequencern (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt

Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Programme des UWGCG-Paketes („University of Wisconsin Genetics Computer Group“; Devereux *et al.*, 1984) auf einer „Unix-Workstation“ (DEC 3000) ausgewertet.

## **2.3 Für diese Arbeit besonders relevante Methoden**

### **2.3.1 Extraktion und Dünnschichtchromatographie von Flavonoiden**

Die Identifikation der Aglyka von Flavonoiden erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC; auch „thin layer chromatography“, TLC). Dazu wurden 6 mg Samen oder 50-300 mg Blattmaterial in 1 ml 2 M HCl zunächst für 16 h bei RT und anschließend für 20 min bei 100°C inkubiert. Nach dieser sauren Hydrolyse wurde das Pflanzenmaterial durch Abzentrifugieren oder mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt und die Flavonoid-Aglyka mit 50 µl Isoamylalkohol unter Schütteln aus der wässrigen Phase extrahiert. 1-5 µl des Extraktes wurden auf Zellulose-DC-Platten (Merck) aufgetragen und in Forestal (Wasser/Eisessig/HCl, 10:30:1) aufgetrennt. Als Referenzsubstanzen standen Quercetin und Kämpferol (Roth) sowie Cyanidin (Apin Chemical, Oxon, UK) und Pelargonidin (Fluka, Buchs, CH) zur Verfügung. Es wurde jeweils 1 µl einer 0,1 mg/ml Lösung in Methanol bzw. Ethanol mit aufgetragen. Nach der Entwicklung waren Cyanidin und Pelargonidin im Weißlicht als rote Flecken zu erkennen, während Quercetin und Kämpferol unter UV-Licht (366 nm; MinUVIS, DESAGA, Heidelberg) gelb fluoreszierten.

Flavonoidglykoside wurden mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie („high performance thin layer chromatography“, HPTLC) nach einem nach Veit (1999) modifizierten Verfahren untersucht. Für die Extraktion der Flavonoidglykoside wurden 50-100 mg Pflanzenmaterial in 100-200 µl 80% Methanol gemörsert und abzentrifugiert. 1-2 µl des Überstandes wurden auf eine Kieselgel-60 HPTLC-Platte (Merck) aufgetragen und in einer HPTLC-Kammer (DESAGA) in einem Gemisch aus Ethylacetat/Wasser/Essigsäure/-Ameisensäure (100:26:12:12) entwickelt. Nach dem Abdampfen des Laufmittels wurde die Platte mit einer 1% Lösung von Naturstoffreagenz A (Roth) in Methanol und anschließend mit 5% methanolischer PEG400-Lösung besprüht. Die Identifizierung einzelner Inhaltsstoffe erfolgte einerseits über die unterschiedlichen Fluoreszenzfarben (Kämpferolderivate, gelb; Quercetinderivate, orange) andererseits durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen, die von J. Hagemeyer isoliert werden konnten.

### 2.3.2 Färbereaktion mit Naturstoffreagenz A

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

Die spezifische Fluoreszenz, die die Interaktion von Naturstoffreagenz A mit Flavonoiden hervorruft, wird durch Chlorophyllfluoreszenz überdeckt. Um diese Störung zu vermeiden, wurden die zu untersuchenden Pflanzen auf einem Herbizid angezogen, das die Karotinoidbiosynthese behindert. Durch das Fehlen dieser Schutzpigmente des Photosyntheseapparates ergrünen entsprechend behandelte Keimlinge nicht. *A.-thaliana*-Samen wurden 5 Tage lang in Petrischalen im Licht ( $> 100 \mu\text{E}$ ) auf Whatman-Papier gekeimt, das mit einer 3 ppm Lösung des Herbizids Norfluorazon (Novartis, Frankfurt) getränkt war. Die gebleichten Keimlinge wurden für 2 h in eine 0,25 %ige Lösung von Naturstoffreagenz A in  $3,75 \cdot 10^{-3} \%$  Triton X-100 überführt. Nach dieser Behandlung wurden sie an einem Fluoreszenzmikroskop (Axio-phot; Zeiss, Oberkochen; Anregung, 365 nm; Filterteiler, 395 nm; Emission, 420 nm) betrachtet und photographiert.

### 2.3.3 Kreuzungen

(Koorneef *et al.*, 1998)

Für Kreuzungen wurden Pflanzen ausgewählt, die gerade begonnen hatten zu blühen. Von einer Infloreszenz der Mutterpflanze wurden bis auf die drei großen Knospen, deren Öffnung unmittelbar bevorstand, alle jüngeren Knospen sowie bereits geöffneten Blüten mit einer feinen Pinzette entfernt (Dumont #5 und #7). Die verbliebenen Knospen wurden vorsichtig geöffnet und bis auf das Gynoeceum alle weiteren Blütenorgane entfernt. Von der als männlicher Elternteil fungierenden Pflanze wurde eine Blüte ausgewählt, die sich am selben Tag geöffnet hatte. Die Öffnung der Blüte wurde durch Quetschen mit der Pinzette an der Basis vergrößert, so daß die Antheren hervortraten. Durch leichtes Auftupfen der Staubbeutel auf die Narbe wurde der Pollen auf die Mutterpflanze übertragen. Die mütterliche Infloreszenz wurde mit einem Schild markiert, auf dem die Bezeichnungen beider Elternpflanzen sowie das Datum der Kreuzung vermerkt waren. Die Gynoeceen wurden am folgenden Tag noch einmal mit Pollen versehen. Einsetzendes Streckungswachstum und eine leichte Rotfärbung zeigten die erfolgreiche Befruchtung an. Bei beginnender Gelbfärbung der Schoten wurden kleine Papiertüten darüber gestülpt, um den Erhalt der Samen zu gewährleisten.

Bei Kreuzungen zwischen Pflanzen der Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta* wurden letztere als Mutterpflanzen gewählt, weil sie eine rezessive Mutation im *erecta* Gen tragen, die im homozygoten Zustand zu Pflanzen mit gedrungenem Wuchs führt. Auf diese Weise bildete das Auftreten von Pflanzen mit dem *erecta*-Phänotyp in der ersten Filialgeneration eine Kontrolle für eine unerwünschte Selbstung der Mutterpflanze.

### 2.3.4 Genetische Kartierung mit Hilfe von CAPS-Polymorphismen

(nach Konieczny und Ausubel, 1993)

In DNA-Abschnitten deren Position im Genom von *A. thaliana* bestimmt werden sollte, wurden durch Vergleich der genomischen Sequenzen Restriktionspolymorphismen zwischen den Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta* identifiziert. Aus diesen Sequenzen wurden gegenläufige Oligonukleotide stromauf- und abwärts des Polymorphismus abgeleitet. Mit diesen Primern wurden PCR-Amplifikationen auf je 100-200 ng genomischer DNA der 100 Recombinant Inbred-Linien (2.1.5) als Matrize durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 0,5 U

der *Taq*-Polymerase von Appligene/Oncor eingesetzt. Durch Agarosegelelektrophorese wurde überprüft, ob jeweils nur eine spezifische Bande amplifiziert wurde. Daraufhin wurden 15 µl der Reaktionsansätze mit dem Restriktionsenzym gespalten, dessen Erkennungssequenz zwischen den Ökotypen polymorph war. Die Produkte der Restriktionsspaltungen wurden im Agarosegel aufgetrennt und für jede der Linien der Genotyp des untersuchten Markers (*Col* oder *Ler*) bestimmt. Die Auswertung dieser Daten erfolgte am „Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre“ unter Verwendung der Kosumbi Funktion mit Hilfe des Programmes „Mapmarker I“ (Lander *et al.*, 1993). Die Position der Marker auf der RI-Karte kann dem Internet entnommen werden ([nasc.nott.ac.uk/new\\_ri\\_map.html](http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html))

Zur Bestimmung der Lokalisation des *F3H*-Gens wurden PCRs mit den Oligonukleotiden S4 und S21 durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden mit *Bcl*II gespalten. Als Kontrolle für die Funktionalität des Restriktionsenzym wurden je Ansatz 200 ng unmethylierter DNA des Plasmids UH140 eingesetzt, das zwei *Bcl*II-Erkennungsstellen enthält. Für *TTI* wurden Amplifikationen mit den Oligonukleotiden S117 und S126 durchgeführt und die erhaltenen Produkte mit *Mae*III gespalten. Das amplifizierte Fragment enthielt unabhängig vom Ökotyp mindestens eine Erkennungsstelle für dieses Enzym, so daß hier keine zusätzliche Schnittkontrolle erforderlich war.

### 2.3.5 Kartierung mit Hilfe der IGF-BAC Bibliothek

Auf dem IGF-BAC-Filter 79.1.151 sind 9216 Klone der IGF-BAC-Bibliothek jeweils zweimal aufgetragen (Mozo *et al.*, 1998). Diese Membran wurde für zwei Stunden bei 42°C in einem Volumen von 50 ml (200 mM Na-Phosphat, pH 7,2; 1 mM EDTA; 15% Formamid; 1% BSA; 7% SDS) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde (120 bp *Eco*RI-Fragment aus pSA62) erfolgte über Nacht in einem Volumen von 20 ml. Ungebundene Sonde wurden durch 2x20 min Waschen mit 2xSSC, 0,1% SDS bei 60°C vom Filter entfernt. Die Exposition erfolgte für 4 h bei -80°C. Bakterienstämme, die in der Koloniehybridisierung zu Signalen führten, konnten auf Grund ihrer Koordinaten identifiziert werden (F11O6, F3N5, F2B22, F10P4 und F4M12). Um das Ergebnis der Hybridisierung zu verifizieren, wurde aus positiven Klonen BAC-DNA gewonnen und 1,5 µg davon mit *Eco*RI und *Eco*RV gespalten. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und erneut mit dem *Eco*RI-Fragment aus pSA62 hybridisiert. Informationen über

die Lokalisation der Inserts der identifizierten IGF-BACs im Genom von *A. thaliana* wurden dem Internet entnommen ([www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi\\_mp\\_map/access.html](http://www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi_mp_map/access.html)).

Die Isolierung der DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. Dazu wurden ausgehend von einer einzelnen Kolonie 400 ml Kulturen in kanamycinhaltigem LB-Medium angezogen (50 µg/ml). Durch Zentrifugation (20 min, 6000xg, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert und schonend in 50 ml P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Nach Mischen mit 50 ml Puffer P2 und 5 min Inkubation bei RT wurden 50 ml eiskalter Puffer P3 zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und genomische Bakterien-DNA wurden durch Zentrifugation (30 min, 20000xg, 4°C) pelletiert, der Überstand filtriert und auf mit 10 ml QBT equilibrierte Tip-500 Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und anschließend die DNA mit 5x3 ml Puffer QC (65°C) eluiert. Nach einer Isopropanolfällung und Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde die DNA in 300 µl Tris/HCl pH 8,5 bei 4°C über Nacht gelöst.

### 2.3.6 Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE)

(modifiziert nach Frohman *et al.*, 1988)

Für 5'- und 3'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“) wurde jeweils das „5' / 3' RACE Kit“ (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Es enthält *Amv*-Reverse-Transkriptase, die bei Temperaturen von bis zu 55°C aktiv ist und somit eine Erststrangsynthese auch bei schwierigen Sekundärstrukturen der RNA erlaubt, sowie den Oligo-dT-Anchor-Primer. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus Oligo-dT-Primern, die ein A, C oder G am 3'-Ende tragen, so daß sie bevorzugt am inneren Ende von Polyadenylierungen binden.

Für die Bestimmung der Transkriptionsstartstelle von *AtF3H* wurde 1 µg Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt, die aus 8 h mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlten *A.-thaliana*-Suspensionskulturzellen isoliert worden war (Hartmann, 1997). Die cDNA-Synthese erfolgte für 1 h bei 55°C unter Verwendung des Primers S21. Nach Inaktivierung der reversen Transkriptase für 10 min bei 65°C wurde die cDNA mit Hilfe des „High Pure Kits“ gereinigt. Etwa die Hälfte der cDNA wurden anschließend für 3 min bei 94°C denaturiert und dann für 20 min bei 37°C polyadenyliert. Durch 10 min Inkubation bei 70°C wurde die Terminale Transferase inaktiviert. Ein Fünftel des Ansatzes wurde als Matrize in einer PCR mit dem Oligo-dT-

Anchor- und dem genspezifischen Primer S34 sowie *Taq*-Polymerase (Roche) eingesetzt. 1 µl Produkt dieser Reaktion wurde für eine zweite Amplifikation mit dem PCR-Anchor-Primer und dem verschachtelt zu S34 liegenden Primer S23 eingesetzt. Die resultierenden Produkte wurden in den Vektor pT7-Blue (Novagen, Madison, USA) ligiert.

Zur Bestimmung des 3'-Endes der *TT1*-cDNA wurden 4 µg Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt, die aus Schoten von *A. thaliana*-Pflanzen (Ökotyp Columbia) gewonnen wurde (Sprenger, 1997). In 2 aufeinander folgenden PCRs wurden die genspezifischen Primer S131 und 132 eingesetzt. Das resultierende Produkt konnte direkt sequenziert werden, wurde aber darüber hinaus auch in den pCR-TOPO-Vektor ligiert. Um den Transkriptionsstartpunkt von *AtTT1* zu bestimmen, wurden 0,2 µg polyA<sup>+</sup>-mRNA eingesetzt, die aus der oben genannten Gesamt-RNA aus Schoten gewonnen wurde (2.1.4). Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem Primer S134, für die vier folgenden PCR-Amplifikationen wurden die verschachtelt liegenden genspezifischen Primer S142, S143, S106 und 112 eingesetzt. Die Produkte wurden in den pCR-TOPO-Vektor ligiert.

### 2.3.7 Schnelle Vervielfältigung genomischer DNA-Enden (RAGE)

(modifiziert nach Cormack und Somssich, 1997)

An bekannte Sequenzen angrenzende DNA-Fragmente wurden mit der RAGE-Methode („rapid amplification of genomic ends“) amplifiziert. Dazu wurde 1 µg genomischer DNA mit 10 U eines Restriktionsenzym gespalten, das so gewählt wurde, daß es auf Grund der Häufigkeit seiner Erkennungssequenzen im Genom von *A. thaliana* zu Fragmenten einer Größe führte, die mittels PCR gut amplifiziert werden konnte. Diese Restriktionsspaltung wurde in einem 25 µl Ansatz in 1x-Reaktionspuffer der Terminalen Desoxynukleotid-Transferase (Roche) durchgeführt. Dadurch konnten die entstehenden Fragmente gleichzeitig im selben Puffer polyadenyliert werden (10 mM dATP; 25 mM CoCl<sub>2</sub>; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 U TdT; 1 h, 37°C). 2 µl des Reaktionsansatzes wurden als Matrize für eine erste PCR-Amplifikation verwendet. Diese wurde in einem 100 µl Ansatz mit einem spezifischen sowie dem MercuryTC-Primer (je 100 pmol) durchgeführt, der am Ende eines polyT-Anhangs zwei Nukleotide (TC) aufweist, die zu den überhängenden Enden der Restriktionsschnittstelle kompatibel sind. Es wurden 5 U *Taq*-Polymerase (Roche) eingesetzt und folgendes Profil verwendet: 30x (94°C, 15s; 56°C, 30s; 72°C, 1min). 1 µl dieser Reaktion wurde als Matrize für eine zweite

PCR-Amplifikation verwendet, bei der weiter nach auswärts liegende sowie der Mercury-Primer unter ansonsten identischen Reaktionsbedingungen eingesetzt wurden. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden mit dem „High Pure Kit“ aufgereinigt und in den pCR-TOPO-Vektor ligiert.

Zur Gewinnung von flankierenden DNAs der *En1*-Insertionen der Pflanze 5K60.3A wurde daraus isolierte genomische DNA mit *HinfIII* gespalten. In der ersten PCR wurden die transposonspezifischen Primer En205 für die linke bzw. En8130 für die rechte Seite eingesetzt. Für die zweite PCR fanden die weiter zu den Enden von *En1* hin gelegenen Primer En26 und En8202 Verwendung. Um ausgehend von einem so isolierten flankierenden DNA-Fragment die zur Verfügung stehende Sequenzinformation zu erweitern, wurde genomische *A.-thaliana*-DNA (Ökotyp Columbia) mit *HinfIII* oder *Sau96A* gespalten. In diesem Experiment wurden in der ersten PCR die spezifischen Primer S105 oder S106 und in der zweiten Reaktion S111 oder S112 eingesetzt.

### 2.3.8 Bestimmung und Analyse genomischer DNA-Sequenzen

Um ausgehend von einem Bereich bekannter DNA-Sequenz die Sequenzen angrenzender genomischer Regionen zu bestimmen, wurden neben der RAGE-Technik (2.3.7) noch verschiedene andere Methoden benutzt. Zum einen wurden aus der bekannten Sequenz Oligonukleotide abgeleitet, die ein direktes Sequenzieren von BAC-Klonen (2.3.5) ermöglichen. Die so erhaltenen Sequenzen wurde wiederum als Grundlage für das Entwerfen neuer in 3'- oder 5'-Richtung nach auswärts weisender Primer genutzt („primer walking“).

Zum anderen wurde einer der BAC-Klone (F3N5) mit *EcoRI* bzw. *HindIII* gespalten und die entstehenden Fragmente in den ebenso gespaltenen pBlueskriptSK-Vektor ligiert. Plasmid-DNA ausgewählter Klone der so entstandenen Bibliotheken wurde mit T3- und T7-Primern sequenziert. Zu sequenzierende Klone wurden zunächst auf Grund ihrer Hybridisierung mit dem *EcoRI*-Fragment aus SA62 und nachfolgend auf Grund ihrer Hybridisierung mit dem überlappenden Ende eines Klons aus der jeweils anderen Bibliothek identifiziert.

Die Bestimmung der vollständigen Sequenz eines 12 kb großen *SpeI*-Fragmentes des BAC-Klons F3N5 erfolgte schließlich unter Verwendung des „Genome Priming Systems GPS1“ (New England Biolabs). Das Prinzip dieses Systems ist, in einem Plasmid unbekannter Sequenz durch zufällige Integration eines modifizierten Tn7-Transposons (des sogenannten

Transprimers) Bindestellen für Sequenzierprimer zu schaffen. Der Transprimer befindet sich auf einem Donorplasmid und wird *in vitro* von TnsABC\* Transposase auf das Zielplasmid übertragen. Die Integration erfolgt weitgehend statistisch zufällig und nur in Zielplasmide, die noch keine Integration des Transprimers aufweisen. Der Transprimer enthält eine Antibiotika-Resistenz, die es ermöglicht, Plasmide mit erfolgter Integration zu selektieren. Donorplasmide sind nicht in der Lage, in normalen Laborstämmen zu replizieren (*ori*), und werden daher nicht weiter vermehrt.

Der Reaktionsansatz enthielt 100 ng pSK-F3N5-S/S12 (SA71, Amp<sup>r</sup>), 2 µl 10xGPS-Puffer, 1 µl pGPS1 (Transprimer, Kan<sup>r</sup>), 14 µl Wasser sowie 1 µl TnsABC\* Transposase. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl der Start-Lösung gestartet. Nach 1 h bei 37°C wurde sie durch 10 min Inkubation bei 75°C gestoppt. 10 µl des Ansatzes wurden in DH5α-Zellen transformiert und auf LB-Platten ausgestrichen, die sowohl Kanamycin als auch Ampicillin enthielten. Aus rekombinanten Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und die ungefähren Positionen der Transprimer-Insertionen durch Restriktionskartierung mit *EcoRI* bzw. *SpeI* bestimmt. Etwa 40 ausgewählte Klone wurden mit spezifischen Oligonukleotiden für die Enden des Transprimers sequenziert (GPSspe und GPSnot). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Sequencher-Programm (Version 3.1; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) zusammengefügt und schlecht repräsentierte Bereiche der Sequenz nachträglich mittels genspezifischer Sequenzierprimer vervollständigt (Anhang 8).

Zur Auswertung der Daten wurden neben den Programmen des GCG-Pakets (Testcodon, Motifs, Pileup, Compare, Dotplot; 2.1.7) folgende Computerprogramme eingesetzt:

- Vorhersage von Exon-Intron-Übergängen:  
[www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/) (Hebsgaard *et al.*, 1996)  
[genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN/genscan.cgi](http://genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN/genscan.cgi) (Burge und Karlin, 1997)
- Identifikation von Motiven in Aminosäuresequenzen:  
[www.expasy.ch/prosite/](http://www.expasy.ch/prosite/) (Hofmann *et al.*, 1999)
- Identifikation repetitiver Elemente:  
[ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker](http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker)

- Vergleich mit der Gendatenbank des NCBI:  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul *et al.*, 1990)
- Vorhersage von Modifikationen und Lokalisation von Proteinen:  
[psort.nibb.ac.jp:8800/](http://psort.nibb.ac.jp:8800/)
- Identifikation von Transkriptionsfaktorbindestellen:  
[pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html)
- Vergleich mehrerer Sequenzen:  
[www.toulouse.inra.fr/multalin.html](http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html) (Corpet, 1988)

### 2.3.9 RT-PCR

Für RT-PCR Reaktionen wurden zunächst die Konzentrationen der verwendeten Gesamt-RNA-Präparationen photometrisch bei 260 nm bestimmt. Nach Verdünnung auf etwa 200 ng/µl erfolgte eine genauere Bestimmung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes RiboGreen (Molecular Probes, Eugene, USA). Dazu wurden 5 µl der RNA-Lösungen mit 495 µl TE und 500 µl RiboGreen-Lösung (1:500 in TE) gemischt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm in einem Spektralfluorimeter (SFM25, Kontron, Neufahrn) bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm bestimmt. Basierend auf einer Eichkurve, die mit 10 bis 100 ng Gesamt-RNA erstellt worden war (J. Ehling, persönliche Mitteilung), wurden die Proben auf jeweils 100 relative Fluoreszenz-Einheiten entsprechend 100 ng/µl eingestellt.

Reverse Transkription und PCR-Amplifikation wurden entweder in zwei Schritten oder mit Hilfe des „Titan-one-tube RT-PCR-System“ (Roche) durchgeführt, das beide Reaktionen in dem selben Reaktionsansatz ermöglicht. Bei Verwendung des „One-tube-Systems“ wurde eine Stammlösung hergestellt, die in einem Volumen von 25 µl 1 µg RNA, je 0,8 µM Primer, 20 U RNasin Promega (Madison, USA), 1,6 mM dNTP-Mix und 10 mM DTT enthielt. Unmittelbar vor der RT-PCR wurden 25 µl einer zweiten Stammlösung zugegeben, die neben dem Reaktionspuffer (2x) die Enzymlösung enthielt. Dabei handelte es sich um die *Amv*-Reverse-Transkriptase, sowie eine Mischung aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerase. Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 50°C, die anschließende Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema: 94°C, 2 min; 10x (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C, 1 min); 40x (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C 1 min + 5 s je Zyklus); 68°C, 7 min, 4°C,∞.

Für eine Zwei-Schritt-Reaktion wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA mittels Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers (SKT17) in cDNA umgeschrieben. Ein Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl 1 µg RNA, 2 µl 10x Puffer, 1 µM Primer, 1 mM dNTP-Mix, 10 U RNasin sowie 4 U Enzym. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37°C und wurde durch 5 min Inkubation bei 95°C abgestoppt. Die Ansätze wurden mit dem „High Pure Kit“ (Roche) gereinigt. 20 ng cDNA wurden dann zu PCR mit dem „Advantage cDNA Polymerase Mix“ (Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Dieser enthält KlenTaq-1 DNA-Polymerase, *Tth*-Polymerase sowie TaqStart™-Antikörper für einen automatischen „hot start“ der Reaktion. Die Amplifikation des *TTI*-Transkripts erfolgte mit den genspezifischen Primern S105 und S130 unter Verwendung des folgenden Profils: 94°C, 1 min; 35x (94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 68°C, 1 min); 68°C, 5 min, 4°C,∞.

Als Kontrollreaktion für den Einsatz vergleichbarer cDNA-Mengen wurde eine PCR mit den Primern Actin2-1 und -2 durchgeführt, die spezifisch für das Transkript des *Actin2*-Gens sind. Für dieses Gen konnte eine konstitutive Expression in vielen Organen von *A. thaliana* gezeigt werden (An *et al.*, 1996). Für die Amplifikation wurde folgendes Schema verwandt: 94°C, 1 min; 25x (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C, 2 min); 68°C, 5 min, 4°C,∞. Die Analyse der Produkte erfolgte jeweils durch Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid.

### 2.3.10 Herstellung transgener Pflanzen

Die Herstellung transgener *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte, wie in Sprenger (1997) beschrieben. Dazu wurde der binäre Vektor pGPTV (Becker *et al.*, 1992) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des Ti-Plasmides handelt, das sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* propagiert werden kann. Zur Transformation von Pflanzen vorgesehene Plasmid-Konstrukte wurden daher zunächst im *E. coli*-Stamm DH5α amplifiziert und anschließend in Agrobakterien transformiert. Zur Herstellung transformationskompetenter Agrobakterien wurden 100 ml YEP-Medium (10 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl je l) mit 4 ml einer stationären Übernachtskultur des Stammes GV3101 pMP90 (Koncz und Schell, 1986) inokuliert und unter Schütteln bei 28°C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 inkubiert. Dabei erfolgte eine Selektion mit Gentamycin (25 mg/l, Resistenz im GV3101 Genom) und mit Rifampicin (100 mg/l) auf das Virulenzplasmid pMP90, das die zur Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom erforder-

derlichen Funktionen in *trans* zur Verfügung stellt. Die Bakterien wurden bei 4°C für 20 min bei 3000g abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. 200 µl Aliquots wurden in gekühlte Eppendorfgläser überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Höfgen (1988). Dazu wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 20 µg Plasmid-DNA versetzt und für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEP-Medium erfolgte unter Schütteln eine zweistündige Inkubation bei 28°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, 1 ml Überstand verworfen, im Restvolumen resuspendiert und auf YEP-Platten (100 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamycin, 100 mg/l Kanamycin) auf die Anwesenheit von pGPTV selektiert. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 28°C konnten Einzelkolonien identifiziert werden.

Die erfolgreiche Transformation wurde, wie in Sprenger (1997) beschrieben, mittels Koloniehybridisierung überprüft. Dazu wurde Bakterienmaterial auf eine Nylonmembran übertragen, die Zellen aufgebrochen, die daraus freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden und mit einer radioaktiv markierten Sonde für das transformierte Plasmid hybridisiert. Darüber hinaus wurde die Transformation auch mittels PCR überprüft. Dazu wurden spezifische Primer für das jeweils transformierte Plasmid sowie eine geringe Menge Bakterienkultur als Matrize eingesetzt.

Die Pflanzentransformation erfolgte durch Vakuuminfiltration nach der Methode von Bechtold (1993). Dazu wurden 500 ml Kulturen positiver Kolonien (LB, 100 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamycin, 100 mg/l Kanamycin) pelletiert und in Infiltrationsmedium (50 g/l Saccharose, 0,5x MS-Salze, 0,44 µM Benzylaminopurin, pH 5,8 mit KOH) resuspendiert. *A.-thaliana*-Pflanzen mit jungen sekundären Infloreszenzen wurden am Tag vor der Infiltration stark gewässert und mit einer durchsichtigen Plastikhaube bedeckt, um durch Öffnung der Stomata eine Erhöhung der Transformationseffizienz zu bewirken. Die Infloreszenzen wurden in die Bakteriensuspension getaucht und durch Anlegen eines Vakuums für 20 min infiltriert. Für die folgenden 2 Tage wurden die Pflanzen im Gewächshaus unter einer Haube kultiviert.

Zur Selektion von Transformanten wurden die Samen der infiltrierten Pflanzen durch 1 min Inkubation in 70% Ethanol und 1 min Inkubation in 100% Ethanol oberflächesterilisiert und

auf MS-Platten (10 g/l Saccharose, 0,5x MS-Salze, 0,5x Gamborg's Vitaminlösung, 250 mg/l Claforan, 100 mg/l Kanamycin, 6 g Agar-Agar, pH 5,7 mit KOH) ausgesät. Die Samen wurden für 24-48 h bei 4°C stratifiziert und in einem Klimaschrank gekeimt (20°C, 8 h Dunkel, 16 h Licht, ca. 100 µE). Pflanzen ohne Kanamycinresistenz waren nach etwa 10 Tagen wenig entwickelt und gelb. Transgene Pflanzen dagegen zeigten voll entwickelte grüne Keim- und Primärblätter. Sie wurden auf Erde überführt und im Gewächshaus weiter kultiviert.

### 2.3.11 GUS-Färbung

Der Nachweis von  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen erfolgte mit Hilfe einer synthetischen X-Gluc-Substratlösung (0,5 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glukuronat, 100 mM Na-Phosphat, 0,1% Triton X-100, 2 mM  $K_3Fe_6(CN)_6$ , pH 7). Keimlinge und Pflanzenteile wurden für 30 min unter Vakuum mit dieser Lösung infiltriert und anschließend darin für 36 h bei 37°C inkubiert. Substratlösung und Chlorophyll wurden mehrfach mit 96% Ethanol extrahiert und das Material danach durch Inkubation in 70% Glycerin wieder geschmeidig gemacht. Die Untersuchung des Materials erfolgte mit Hilfe eines Binokulars oder eines Axio-phot Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) und die Dokumentation mittels eingebauter Kameras unter Verwendung von Filmen der Firma Kodak.

### 2.3.12 Transfektion von *A.-thaliana*-Protoplasten

Protoplasten wurden nach einer modifizierten Methode von Dangl (1987) hergestellt. Dazu wurden 40 ml der *A.-thaliana*-Suspensionskultur At7 (2.1.5) sedimentiert (5 min, 1500 rpm, RT; Minifuge RF), in 0,24 M  $CaCl_2$ -Lösung gewaschen, erneut pelletiert (s.o.) und in 60 ml sterilfiltrierter Enzymlösung aufgenommen. Diese Lösung enthielt 0,7 g Zellulase („Onozuka R-10“, 1,0 U/mg) und 0,163 g Mazerozym (R-10, Pektinase 0,54 U/mg) der Firma Serva in 0,24 M  $CaCl_2$ . Die Suspension wurde auf 2 Petrischalen ( $\varnothing$  14,5 cm) verteilt und für 18 h bei 26°C und 20 rpm im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 40 rpm und eine Sedimentation der Protoplasten durch Zentrifugieren (s.o.). Anschließend wurden sie mit 0,24 M  $CaCl_2$  gewaschen, erneut zentrifugiert (s.o.) und mit 13 ml B5-Medium/0,4 M Saccharose resuspendiert (1x Gamborg's B5, 1 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 136 g Saccharose pro l, pH 7,5 mit NaOH). Intakte Protoplasten wurden zweimal flottiert (8 min, 800 rpm, RT) und vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Wie auch für alle

folgenden Pipettierschritte mit Protoplasten wurden dazu Einmalpipetten mit großen Öffnungen verwendet (Becton Dickinson; Meylan Cedex, F).

Die Transformation der Protoplasten mittels PEG-vermittelter DNA-Aufnahme erfolgte nach modifizierten Protokollen von Krens (1982), Hain (1985) und Lipphardt (1988). Dazu wurden 200 µl Protoplastensuspension in 10 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 µg Transfektions-DNA und 200 µl sterilfiltrierter PEG-Lösung (25% PEG 6000, 100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 450 mM Mannitol, pH 9,0 mit KOH) vorsichtig gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die DNA-Aufnahme durch Zugabe von 5 ml 275 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung (pH 6,0 mit KOH) gestoppt. Die Protoplasten wurden sedimentiert (8 min, 800 rpm, RT) und das Pellet in 7 ml B5/Saccharose aufgenommen.

In Experimenten mit Promotor-GUS-Konstrukten wurde 15 µg Reporterplasmid und 5 µg Standardisierungsplasmid (pBT10-*UBI-LUCm3*) eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde zu gleichen Teilen auf zwei Petrischalen (Ø 5cm) verteilt und für 8 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert oder mit UV-haltigem Licht bestrahlt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit 25 ml 0,24 M CaCl<sub>2</sub> versetzt, die Protoplasten sedimentiert (10 min, 2000 rpm, RT) und der Überstand bis auf etwa 1 ml abgesaugt. Anschließend wurden die Protoplasten resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt, erneut pelletiert, vom Überstand befreit, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für Kernlokalisationsstudien wurden je 20 µg der Plasmide pSK-35S-GFP und pSK-35S-AtTT1-GFP eingesetzt. Die Transfektionsansätze wurde für 20 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten am Axiovert Mikroskop (Zeiss) auf GFP-Fluoreszenz bei 515-565 nm nach Anregung bei 450-490 nm hin untersucht.

### **2.3.13 Aktivitätsmessungen von Reporterenzymen in Protoplastenextrakten**

Zur Bestimmung von Luciferase- und β-Glukuronidase-Aktivitäten wurden aus den transfizierten Protoplasten Extrakte hergestellt. Dazu wurden die Protoplasten in 800 µl Extraktionspuffer aufgeschlossen (100 mM K-Phosphat, pH 7,5, 1 mM DTT) und Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C; Eppendorf 5403). Die Proteinbestimmung im Überstand erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des „Protein assay“ Reagenz von BioRad. Die Aktivitäten der Reporterenzyme in den Protoplastenextrakten wurden nach einem modifizierten Verfahren nach Sprenger (1993) bestimmt.

Zur Messung der Luciferaseaktivität nach Wood (1991) wurden 10 µl des Protoplastenextraktes mit 100 µl Luciferase-Substrat-Lösung (20 mM Tricine; 1,07 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 2,67 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DDT; 270 µM CoenzymA; 470 µM Luciferin; 530 µM ATP; pH 7,8) versetzt. Die Messung erfolgte in einem Luminometer (Lumat LB 9501; Berthold, Köln), wobei die Summe der emittierten Photonen über ein Zeitintervall von 10 s integriert wurde.

Für die Bestimmung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität (modifiziert nach Jefferson, 1987) wurden 100 µl Protoplastenextrakt auf Eis mit 100 µl 4-MUG-Substratlösung (2 mM 4-Methylumbelliferyl-Glukuronid; 50 mM Na-Phosphat pH 7,0; 1 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach 20, 40 und 60min wurden je 20 µl des Ansatzes entnommen und zum Abstoppen der Reaktion in 1 ml 0,2 M  $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ -Lösung überführt. Mit Hilfe eines Durchflußfluorimeters (Filterfluorimeter LS-2B; Perkin Elmer, Überlingen) wurde die Fluoreszenz des Produktes 4-MU bei 455 nm nach Anregung bei 366 nm gemessen. Die spezifische GUS-Aktivität einer Probe wurde aus dem mittleren Anstieg der Fluoreszenz während eines 20 min Intervalls unter Berücksichtigung einer Gerätekonstante, dem eingesetzten Extraktvolumen und der darin enthaltenen Proteinmenge berechnet.

Jedes Transfektionsexperiment wurde achtmal wiederholt, wobei acht unabhängige Transfektionen mit vier verschiedenen Protoplastenpräparationen durchgeführt wurden. Die Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes (MS-Excel 5.0). Dabei wurde zunächst für jeden Ansatz das Verhältnis der GUS- zur Luciferase-Aktivität berechnet, sowie der Mittelwert dieser Quotienten für die acht Experimente. Zwei der Transfektionen, deren Quotient am stärksten von diesem Mittelwert abwich, wurden für die weitere Berechnung nicht mehr berücksichtigt. Zur Standardisierung der verbleibenden 6 Transfektionen wurde der Mittelwert aller Luciferaseaktivitäten eines experimentellen Blocks ermittelt und durch die spezifische Luciferase-Aktivität der betrachteten Transfektion dividiert. Mit dem so gewonnenen Korrekturfaktor wurde der spezifische GUS-Wert einer Transfektion multipliziert, so daß ein standardisierter, korrigierter GUS-Wert resultierte. Bei den in dieser Arbeit angegebenen spezifischen, standardisierten GUS'-Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte der korrigierten GUS-Werte der 6 Transfektionen, die mit dem gleichen

Konstrukt durchgeführt worden waren. Die entsprechenden Rohdaten sind in Anhang 4 angegeben. In den Abbildungen eingezeichnete Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Fehler des Mittelwertes. Eine vollständige Beschreibung des Verfahrens und der Auswertung findet sich in Hartmann (1997).

### 2.3.14 Herstellung bestimmter Plasmid-Konstrukte

Die in dieser Arbeit benutzten Plasmid-Konstrukte wurden unter Verwendung der in 2.1.4 genannten Vektoren, der in 2.1.2 aufgeführten Oligonukleotide sowie der unter 2.2 beschriebenen Methoden hergestellt. Für Amplifikationen mittels PCR wurde, soweit nicht anders angegeben, *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktion und Sequenzierung der Ligationsstellen überprüft. Mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden nach ihrer Klonierung vollständig sequenziert. In der folgenden Aufstellung sind in Klammern jeweils die Bezeichnungen der Plasmide in der SA-Klonsammlung angegeben.

#### F3H-Konstrukte

**pAtF3H-866** (SA3): Es wurde eine PCR mit genomischer Columbia Wildtyp DNA als Matrize sowie den Primern S1 (enthält die natürlich vorkommende *Bam*HI-Schnittstelle im Promotor) und S3 (zur Einführung einer *Nco*I-Schnittstelle am Start-ATG) durchgeführt. Das daraus resultierende Produkt wurde nach Spaltung mit *Bam*HI und *Nco*I in den entsprechend gespaltenen pBT10-GUS-Vektor (MS23) ligiert.

**pAtF3H-463** (SA4): Mit den Primern S2 (zur Einführung einer *Eco*RI-Schnittstelle) und S3 wurde eine PCR mit genomischer Columbia Wildtyp DNA als Matrize durchgeführt. Das Produkt wurde mit *Eco*RI und *Nco*I gespalten und in den entsprechend gespaltenen pBT10-GUS-Vektor (MS23) integriert.

**pAtF3H-382** (SA8): Das Konstrukt pAtF3H-382 wurde analog zu pAtF3H-463 hergestellt, wobei anstelle des Primers S2 der Primer S19 verwendet wurde.

**pAtF3H-229** (SA9): Auch die Herstellung von pAtF3H-229 erfolgte analog zu pAtF3H-463, wobei hier anstelle des Primers S2 der Primer S20 verwendet wurde.

**pAtF3H-463-mMRS1** (SA45): Die in diesem Konstrukt enthaltene Blockmutation wurde mittels der unter 2.2.1 beschriebenen PCR-Methode eingeführt. Dazu wurde zunächst eine

PCR mit pAtF3H-382 als Matrize sowie den Primern S36 (enthält die MRS1-Mutation) und H755 (MCS down) durchgeführt. Das resultierende Produkt wurde als Megaprimer mit dem Primer H1690 (GUS up) für eine zweite PCR auf der gleichen Matrize verwendet. Das Produkt dieser Reaktion wurde mit *EcoRI* und *NcoI* gespalten und zunächst in pAtF3H-382 (SA8) ligiert. Das resultierende Plasmid pAtF3H-382-mMRS1 (SA21) wurde zur Herstellung von pAtF3H-463-mMRS1 mit *XbaI* und *NcoI* gespalten. Das dabei entstehende 180 bp Fragment mit dem mutierten MRS1 wurde in den ebenso gespaltenen Vektor pAtF3H-463 (SA4) ligiert.

**pAtF3H-463-mMRS2** (SA44): Es wurde eine erste PCR mit den Primern S74 (enthält die MRS2-Mutation) und S2 (*EcoRI*-Schnittstelle down) unter Verwendung von pAtF3H-463 (SA4) als Matrize durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde als Megaprimer in einer zweiten PCR mit der gleichen Matrize und dem Primer S3 (*NcoI*-Schnittstelle up) eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde mit *EcoRI* und *NcoI* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor pAtF3H-463 (SA4) eingefügt.

**pAtF3H-463-mACS3** (SA43): Das Konstrukt pAtF3H-463-mACS3 wurde analog zu pAtF3H-463-mMRS2 hergestellt, wobei anstelle des Primers S74 der Primer S73 (enthält die ACS3-Mutation) verwendet wurde.

**pAtF3H-463-mACS4** (SA16): In einer ersten PCR wurden die Primer S30 (enthält die ACS4-Mutation) und H755 sowie pAtF3H-463 (SA4) als Matrize eingesetzt. Das Produkt dieser Reaktion wurde als Megaprimer in einer zweiten PCR mit der gleichen Matrize und dem Primer H1690 eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde mit *EcoRI* und *NcoI* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor pAtF3H-463 (SA4) ligiert.

**pAtF3H-463-mACS5** (SA15): Das Konstrukt pAtF3H-463-mACS5 wurde analog zu pAtF3H-463-mACS4 hergestellt, wobei anstelle des Primers S30 der Primer S29 (enthält die ACS5-Mutation) verwendet wurde.

**pAtF3H-463-dm** (SA48): Das 180 bp *XbaI/NcoI*-Fragment mit dem mutierten MRS1 aus pAtF3H-382-mMRS1 (SA21) wurde in den partiell ebenso gespaltenen Vektor pAtF3H-463-mACS4 (SA16) mit der ACS4-Mutation ligiert.

TT1-Konstrukte

**pSA62** (SA62): Flankierende DNAs von *En1*-Insertionen der Pflanze 5K60.3A wurde durch schnelle Amplifikation genomischer Enden (RAGE, 2.3.7) gewonnen und in den pCR-TOPO-Vektor (Invitrogen) ligiert.

**pSK-F3N5-S/S12** (SA71): Ein etwa 12 kb großes Fragment des *SpeI* gespaltenen BAC-Klons F3N5, das mit einem etwa 120 bp großen *EcoRI*-Fragment aus pCR-RAGE20 (SA62) hybridisierte, wurde in den *SpeI* gespaltenen Vektor pBluescriptSKII (Stratagene) ligiert.

**pGPTV-F3N5-S/S12** (SA73): Das Konstrukt pSK-F3N5-S/S12 (SA71) wurde mit *SpeI* gespalten und das resultierende etwa 12 kb große Fragment in den ebenso gespaltenen binären Vektor pGPTV-*TATA*-GUS (MS217) überführt.

**pBT-*AtTT1*-GUS** (SA86): Es wurde eine PCR mit den Primern T7 (MCS down) und S151 (zur Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle am Start-ATG) sowie pSK-F3N5-S/S12 (SA71) als Matrize durchgeführt. Dazu wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) verwendet. Zu einer Stammlösung, die in einem Volumen von 25 µl 100 ng DNA, je 0,6 µM Primer und 1,6 mM dNTP-Mix enthielt, wurden 25 µl Stammlösung 2 zugegeben, die neben dem Reaktionspuffer (2x) eine Mischung aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerase enthielt. Die Amplifikation erfolgte gemäß folgendem Profil: 94°C, 2 min; 10x (94°C, 15 s; 50°C, 30 s; 72°C, 3 min) 25x (94°C, 15 s; 50°C, 30 s; 72°C, 3 min + 5 s je Zyklus); 72°C, 7 min; 4°C, ∞. Das Produkt dieser Reaktion wurde mit *SpeI* und *NcoI* gespalten und die beiden resultierenden Fragmente getrennt aus dem Gel isoliert. Zunächst wurde nur das 1,9 kb große *SpeI/NcoI*-Fragment in den Vektor pBT10 (UH140) ligiert. Anschließend wurde das resultierende Plasmid mit *NcoI* linearisiert und auch das 1,4 kb große *NcoI*-Fragment des PCR-Produktes integriert.

**pGPTV-*AtTT1*-GUS** (SA87): Das Konstrukt pBT-*AtTT1*-GUS (SA86) wurde mit *SpeI* und *SacI* gespalten und das etwa 5,5 kb große Fragment, das den *TT1*-Promotor fusioniert an GUS enthielt, in den Vektoranteil des ebenso gespaltenen Plasmides pGPTV-*TATA*-GUS (MS217) überführt.

**pSK-35S-AtTT1-GFP** (SA81): Die *TT1*-cDNA wurde unter Verwendung von Gesamt-RNA aus Schoten von *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia mit dem „Titan-one-tube RT-PCR-System“ (Roche, 2.2.99) sowie den Primern S152 (zur Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle am Start-ATG) und S153 (zur Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle am Stop-Kodon) amplifiziert. Das Produkt wurde mit *NcoI* gespalten und durch Ligation in den ebenso gespaltenen Vektor pSK-35S-GFP (pAVA393) C-terminal an das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert.

**pBT8-35S-TT1** (SA91): Es wurde eine PCR mit den Primern S152 und S167 (zur Einführung einer *SacI*-Schnittstelle am Stop-Kodon) sowie pSK-AtTT1-GFP (SA81) als Matrize durchgeführt. Das Produkt wurde mit *SacI* und *NcoI* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor pBT8-35S-LUCm3 (MS 83) ligiert.

**pGPTV-35S-TT1** (SA92): Das Konstrukt p35S-TT1 (SA91) wurde mit *ClaI* und *SacI* gespalten und das 1,3 kb Fragment, das den 35S-Promotor und den TT1 Leserahmen enthielt, wurde in den ebenso gespaltenen Vektoranteil des Plasmides pGPTV-TATA-GUS (MS217) überführt.

#### DNA-Sonden

**pCR-Script-cDNA-AtF3H** (SA20): Es wurde eine PCR mit den Primern S4 und S6 unter Verwendung einer cDNA als Matrize durchgeführt, die durch reverse Transkription von Landsberg *erecta* Wildtyp Gesamt-RNA mit dem SKT17-Primer hergestellt worden war (Hartmann, 1997). Das resultierende Produkt wurde in den pCR-Script-Vektor (Stratagene) ligiert.

**pCR-TOPO-ZmEn1-links** (SA51): Mit den Primern En50 und En205 sowie dem Plasmid pACYC177/En1 als Matrize wurde eine PCR durchgeführt. Das Produkt wurde in den pCR-TOPO-Vektor (Invitrogen) integriert.

**pCR-TOPO-ZmEn1-rechts** (SA53): Die Herstellung des Konstruktes erfolgte analog zu pCR-TOPO-En1-links (SA51), wobei anstelle von En50 und En205 die Primer En7631 und En8141 Verwendung fanden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen verschiedener *transparent-testa*-Mutanten aus *A. thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *transparent-testa*-Mutanten aus *A. thaliana* verwendet. Dabei handelte es sich um die „klassischen“ Allele *tt1-8* sowie *tt10* und *ttg\**, die neu entdeckte Mutante *tt15* (N. Focks und C. Benning, persönliche Mitteilung) sowie 27 aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population (Wisman *et al.*, 1998) isolierte Linien, die den *tt*-Phänotyp zeigten. Zu Beginn der Arbeiten wurden Anzuchtbedingungen und Analysemethoden für die klassischen Allele etabliert, die es erlauben sollten, diese Linien auf Grund phänotypischer Merkmale sicher von einander zu unterscheiden. Diese Methoden sollten zunächst genutzt werden, um *tt15* in Relation zu den übrigen *tt*-Mutanten phänotypisch zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde ein effizientes Verfahren zur Typisierung der aus der *En1*-Population gewonnenen *tt*-Linien gesucht, das es ermöglichte, neue *tt6*-Allele oder Allele der bislang wenig untersuchten *tt*-Mutanten 1, 2, 8, 9 oder 10 für detailliertere Untersuchungen zu isolieren.

##### 3.1.1 Phänotypische Charakteristika der klassischen *tt*-Mutanten

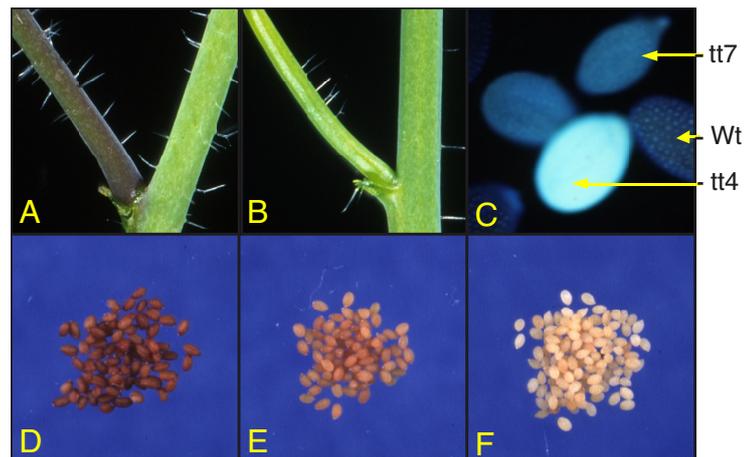
Die klassischen *transparent-testa*-Mutanten unterscheiden sich nicht nur in der Farbe ihrer Samen sondern auch in der Fähigkeit der Pflanzen, in verschiedenen Organen bestimmte Flavonoide zu bilden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Anzucht von *A.-thaliana*-Pflanzen dahingehend optimiert, daß die Pigmentierung ihrer vegetativen Teile mit bloßem Auge eindeutig zu erkennen war. Dazu wurden die Pflanzen im Gewächshaus oder in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach vier Wochen wurden sie für mindestens 20 h in einen mit UV-haltigem Weißlicht ausgestatteten Klimaschrank überführt. Unter diesen Bedingungen akkumulierten rote Pigmente in Blättern, an der Basis der Primärfloreszenz, auf Knospen und an Seitentrieben (Abbildung 4A) von Wildtyp-Pflanzen und den *tt*-Mutanten 1, 2, 7, 8 und 10. *tt8*-Pflanzen waren schwächer gefärbt als Landsberg *erecta* Wildtyp (*Ler*). Da sich

---

\* Als „klassisch“ sollen in dieser Arbeit *tt*-Mutanten bezeichnet werden, die in der Veröffentlichung von (Koornneef, 1990) beschrieben und über die „*Arabidopsis* Stock Center“ zu erhalten sind. Das war zu Beginn der Arbeiten für *tt9* nicht der Fall.

diese Mutation jedoch im Hintergrund eines anderen Ökotyps (vermutlich Enkheim) befindet, ist ein Vergleich mit *Ler* hier nur bedingt aussagekräftig. Wie in Abbildung 4B am Beispiel von *tt5* gezeigt, fehlte erwartungsgemäß bei den Strukturgenmutanten *tt3*, *4* und *5* die Pigmentierung ganz.

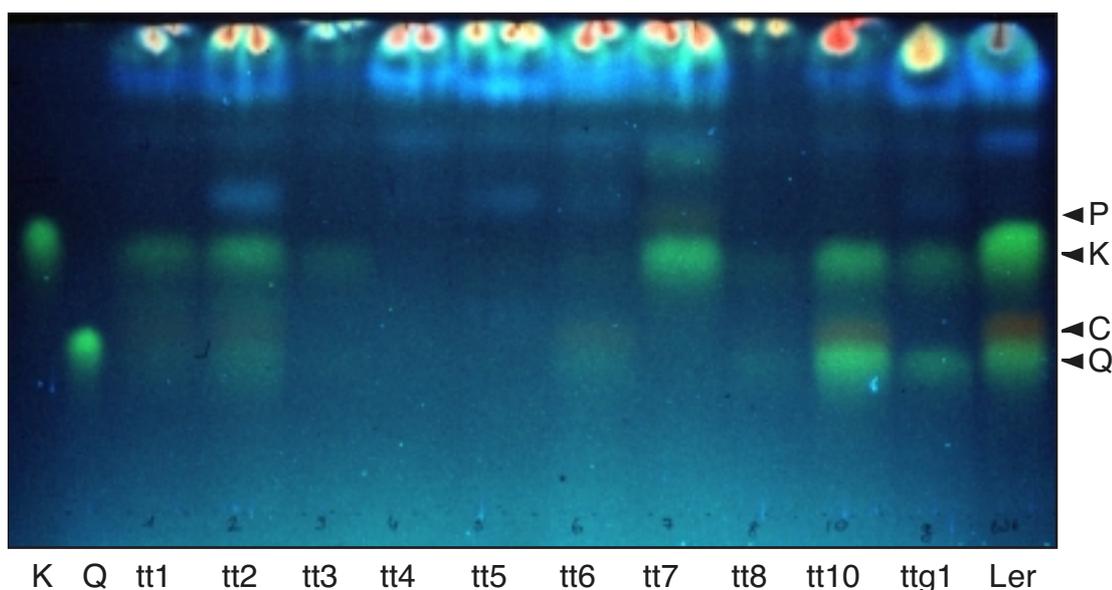
Die Samen von Wildtyp-Pflanzen, die unter den beschriebenen Bedingungen angezogen wurden, waren dunkelbraun, während die der Mutanten die publizierten Farbunterschiede aufwiesen. Die Samenfarbe von *tt6*, *7* und *10* war ein helleres Braun, die Samen von *tt1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *8* und *ttg* waren gelb. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Samen von Wildtyp (D), *tt6* (E) und *tt4* (F). Die Färbung der Samen im sichtbaren Licht kann jedoch in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen sowie der Dauer und Art der Lagerung variieren (Koornneef, 1990). Ein verlässlicheres Kennzeichen zur Unterscheidung der Mutanten konnte die Fluoreszenz der Samen bei Bestrahlung mit UV-Licht darstellen. Während intakte Wildtyp-Samen unter UV-Licht weitgehend dunkel erscheinen und nur punktuell blau fluoreszieren, ist für Samen der *tt*-Mutanten *4*, *5* und *6* beschrieben, daß sie unter diesen Bedingungen stark und für *tt3* und *ttg*, daß sie schwächer hellblau leuchten. Die Ursache dafür ist vermutlich die Fluoreszenz von Sinapinsäurederivaten im Embryo. Diese Substanzen sind auch in Wildtyp-Embryonen enthalten, sie werden aber erst durch das Fehlen von UV-Licht absorbierenden und dunkel gefärbten Pigmenten der Samenschale in den Mutanten sichtbar. Mit einem Fluoreszenzmikroskop konnten die beschriebenen Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz der Samen untersucht und bestätigt werden (Abbildung 4C). *tt7*-Samen zeigten darüber hinaus eine bislang nicht beschriebene schwache Fluoreszenz. Zusätzlich wies diese Mutante auch eine typische, ungleichmäßige Oberflächenstruktur auf, die sich klar von der der anderen *tt*-Mutanten unterschied.



**Abbildung 4: Zur Unterscheidung von *tt*-Mutanten herangezogene Merkmale.**

**A** zeigt die sichtbare Pigmentierung des Seitentriebes einer adulten *A.-thaliana*-Wildtyp-Pflanze nach 20 h Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht. **B** zeigt den gleichen Ausschnitt einer bestrahlten *tt5*-Pflanze. Die Mutante kann unter identischen Bedingungen keine Anthocyane bilden, weil deren Synthese auf Grund eines defekten *CFI*-Gens blockiert ist. In **C** ist die unterschiedliche Fluoreszenz von Wildtyp-, *tt4*- und *tt7*-Samen dargestellt. **D** zeigt Samen von Wildtyp-, **E** von *tt6*- und **F** von *tt4*-Pflanzen.

Eine qualitative Analyse der in den verschiedenen *tt*-Mutanten vorhandenen Flavonole und Anthocyanidine erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Dazu wurden die im Pflanzenmaterial enthaltenen Flavonoid-Glykoside einer sauren Hydrolyse unterzogen, die Aglyka mit Isoamylalkohol extrahiert und chromatographisch aufgetrennt (2.3.1). Das Ergebnis einer solchen Untersuchung ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Zur Herstellung der Extrakte wurde in diesem Fall jeweils ein Blatt einer 20 h UV-bestrahlten Pflanze verwendet. Auf Grund von Unterschieden in der Größe der Blätter, ihres physiologischen Zustandes und der erhaltenen UV-Dosis konnten aus diesem Experiment keine quantitativen Aussagen über die Flavonoidgehalte der Mutanten abgeleitet werden. Es veranschaulichte und bestätigte jedoch das von Shirley (1995) für die einzelnen Mutanten beschriebene Vorkommen von bestimmten Flavonolen und Anthocyanidinen: Die *tt*-Mutanten 1, 2, 6, 8 und 10 enthalten sowohl die Flavonole Quercetin und Kämpferol als auch das Anthocyanidin Cyanidin. Während in *tt3* und *ttg* vor allem Cyanidin fehlt, enthalten *tt4* und 5 weder Flavonole noch Anthocyane. Sehr deutlich ist auch zu erkennen, daß in *tt7* weder Quercetin noch Cyanidin vorkommen und statt dessen Kämpferol und das korrespondierende Anthocyanidin Pelargonidin gebildet werden.



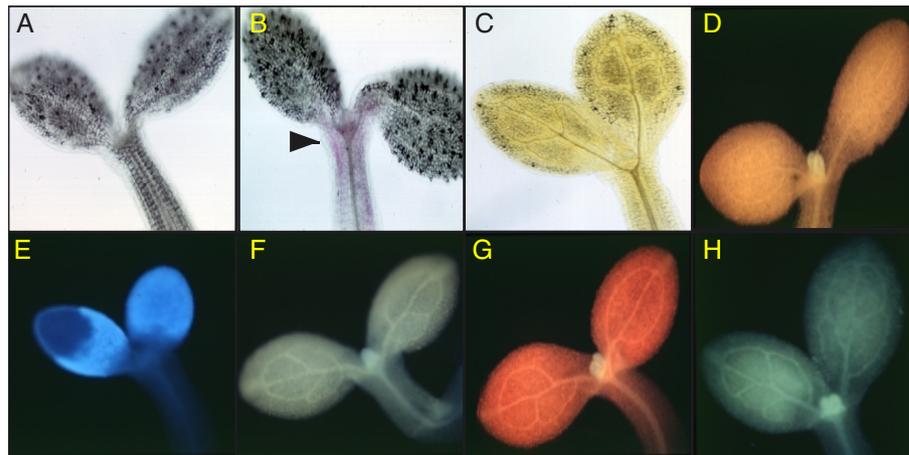
**Abbildung 5: Dünnschichtchromatographie von Flavonoid-Aglyka aus *tt*-Mutanten und Wildtyp.** Je ein Blatt einer 20 h UV-bestrahlten 6 Wochen alten Pflanze wurde 20 h bei Raumtemperatur in 1 ml 2 M HCl inkubiert und danach für 20 min auf 100°C erhitzt. Flavonoid-Aglyka wurden mit 50 µl Isoamylalkohol extrahiert und auf einer Zellulose-DC-Platte in Forstal aufgetrennt. Als Referenzsubstanzen dienten Quercetin (Q) und Kämpferol (K). Darüber hinaus sind rechts die Positionen von Cyanidin (C) und Pelargonidin (P) angegeben. Die Platte wurde unter UV-Licht (366 nm) fotografiert.

### 3.1.2 Differenzielle Färbung mit Naturstoffreagenz A

Die Kombination der bislang beschriebenen Merkmale allein war jedoch nicht ausreichend, um eine Unterscheidung aller *tt*-Mutanten zu gewährleisten. Vor allem *tt3*, *4* und *5* konnten nicht sicher identifiziert werden. Daher wurde zusätzlich eine differenzielle Färbemethode etabliert, die auf der charakteristischen Färbung bestimmter Metabolite des Phenylpropanstoffwechsels durch Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure 2-Aminoethylester) beruht. Dieses Reagenz verleiht unter anderem Quercetinderivaten eine orange und Kämpferolderivaten eine grüne Fluoreszenz (Sheahan und Rechnitz, 1992). Um störende Chlorophyllfluoreszenz zu verhindern, kann Pflanzenmaterial vor der Färbung durch Anwendung eines Herbizids gebleicht werden. Das Herbizid Norfluorazon (Zorial®) zum Beispiel beeinträchtigt die Karotinoidbiosynthese, indem es die Phytoen-Desaturierung verhindert. Durch das Fehlen von Karotinoiden, die den Photosyntheseapparat schützen, ergrünen Keimlinge nicht, die im Licht auf Norfluorazon angezogen werden.

Samen der verschiedenen *tt*-Mutanten und von Landsberg *erecta* Wildtyp wurden bei hoher Lichtintensität ( $> 100 \mu\text{E}$ ) auf einer verdünnten Norfluorazonlösung gekeimt. Keimlinge der *tt*-Mutanten 3, 4, 5, 6 und 7 blieben unter diesen Bedingungen weiß (Abbildung 6A). Auch die *tt*-Mutanten 1, 2, 8, 9, 10 und *ttg* sowie Wildtyp ergrünten nicht, akkumulierten jedoch in Kotletonen und Hypokotyl violette Anthocyane (Abbildung 6B). Diese Tatsache erlaubte somit bereits bei wenige Tage alten Keimlingen und ohne zusätzliche Färbung die Unterscheidung der beiden großen Gruppen von *tt*-Mutanten. Darüber hinaus konnten nach Behandlung mit Naturstoffreagenz A (2.3.2) Keimlinge der *tt3*-Mutante bereits im Weißlicht auf Grund einer deutlichen Orangefärbung erkannt werden (Abbildung 6C). Diese Färbung ist bislang in der Literatur nicht beschrieben und beruht wahrscheinlich auf einer Akkumulation von (Dihydro-) Quercetinderivaten, die wegen der in dieser Mutante fehlenden DFR-Aktivität nicht weiter umgesetzt werden können. Auch *ttg*-Keimlinge, in denen die Regulation der *DFR*-Expression gestört ist, zeigten im sichtbaren Licht eine leicht orange Färbung, während Keimlinge von *tt6*-Pflanzen rötlich gefärbt waren (Sheahan *et al.*, 1998). Alle übrigen *tt*-Keimlinge sowie der Wildtyp erschienen nach der Färbung leicht grünlich.

Bei Betrachtung unter UV-Licht fluoreszierten Wildtyp-Keimlinge auf Grund ihres Gehaltes an Quercetin-Glykosiden orange (Abbildung 6D). *tt1*, 2, 8, 9, 10 und *ttg* waren an Hand der Fluoreszenz nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Wie in Abbildung 6E dargestellt, leuchteten *tt4*-Keimlinge dagegen wie beschrieben bei UV-Bestrahlung deutlich hellblau (Sheahan und Rechnitz, 1993). Da in dieser Mutante auf Grund eines defekten *CHS*-Gens keine Flavonoide gebildet werden können (1.2.1 und Abbildung 5), wird die beobachtete Fluoreszenz auf Sinapinsäurederivate zurückgeführt. Der Gehalt an diesen Substanzen ist in *tt4* gegenüber dem Wildtyp erhöht, während er in der *tt5*-Mutante erniedrigt ist (Li *et al.*, 1993). Diese fluoresziert schwach gelblich (F), während *tt6*-Keimlinge durch eine rote Fluoreszenz gekennzeichnet sind (G). Die *tt7*-Mutante (H) schließlich zeigt eine deutliche grüne Fluoreszenz, die von Kämpferolderivaten herrührt (1.2.1 und Abbildung 5).



**Abbildung 6: Differenzielle Färbung gebleichter Keimlinge mit Naturstoffreagenz A.** *tt*- und Wildtyp-Samen wurden 5 Tage lang in Petrischalen im Licht auf Whatman-Papier gekeimt, das mit einer 3 ppm Lösung des Herbizids Norfluorazon getränkt war. Danach wurden sie für 2 h in eine 0,25 %ige Lösung von Naturstoffreagenz A in  $3,75 \times 10^{-3}$  % Triton X-100 überführt. Die Fluoreszenz der Keimlinge bei 420 nm nach Anregung bei 365 nm wurde an einem Mikroskop untersucht und photographiert. **A** zeigt einen gebleichten *tt3*- und **B** einen Landsberg *erecta* Wildtyp-Keimling vor der Färbung. Die Pfeilspitze markiert die im Hypokotyl akkumulierten Anthocyane. In **C** ist ein gebleichter und anschließend gefärbter *tt3*-Keimling unter Weißlicht abgebildet. **D-H** zeigen die charakteristische Fluoreszenz gefärbter Keimlinge von Wildtyp (D) sowie *tt4* (E), 5 (F), 6 (G) und 7 (H).

Die differenzielle Färbereaktion erlaubte nicht nur die bereits beschriebene Unterscheidung von *tt4*, 5, 6 und 7, sondern auch die Identifikation von *tt3*. Somit konnten alle *tt*-Mutanten, bei denen eine Mutation in einem Strukturgen der Flavonoidbiosynthese vorlag oder vermutet wurde, erkannt und unterschieden werden. In Kombination mit der Analyse der sonstigen phänotypischen Merkmale standen nun die Werkzeuge zur Verfügung, die neu entdeckte Mutante *tt15* zu charakterisieren. Darüber hinaus konnten mit diesen Methoden unter den aus der *En1*-Population isolierten *tt*-Mutanten gezielt diejenigen ermittelt werden, für die eine nähere Untersuchung wünschenswert erschien.

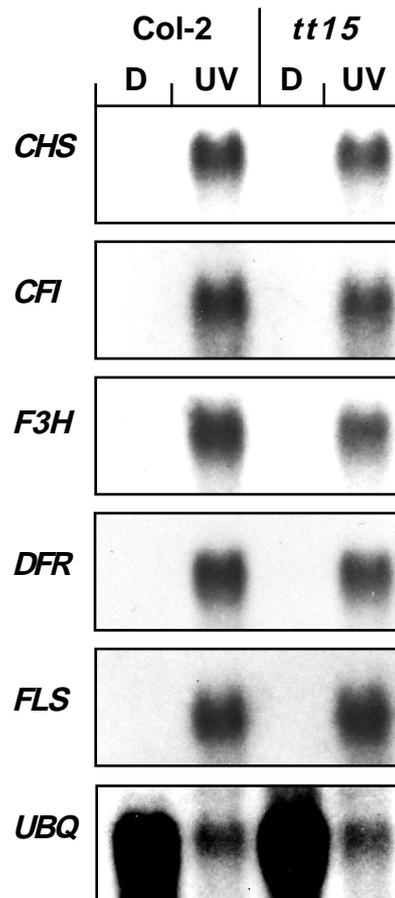
### 3.1.3 *tt15* - eine neue *tt*-Mutante

Beim Durchsuchen einer EMS-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population nach Mutanten der Samenentwicklung wurde von N. Focks eine Linie isoliert, die im Unterschied zu den dunkelbraunen Samen des Wildtyps blaß grünlich-braune Samen produzierte, die eine leicht reduzierte Dormanz aufwiesen. Testkreuzungen mit den klassischen und weiteren in der Gruppe von M. Koornneef isolierten *tt*-Mutanten ergaben, daß diese Linie keiner der bislang bekannten Komplementationsgruppen zuzuordnen war. Die Mutation in dieser Linie repräsentierte daher einen neuen *tt*-Lokus. Er wurde als *tt15* bezeichnet und konnte auf dem unteren Arm von Chromosom I lokalisiert werden (N. Focks und C. Benning, persönliche Mitteilung). Da über die Mutante keine weiteren Informationen vorlagen, sollte sie einer genaueren phänotypischen Charakterisierung unterzogen werden, um so eventuell Anhaltspunkte über die Natur des zu Grunde liegenden Defekts zu erhalten.

#### 3.1.3.1 Expression von Strukturgenen des Phenylpropanstoffwechsels

Um festzustellen, ob die *tt15*-Mutation die Expression von Genen des Phenylpropanstoffwechsels beeinflußt, wurden RNA-Gel-Blot-Analysen durchgeführt. Die verwendete RNA wurde aus Blättern von sechs Wochen alten *A.-thaliana*-Pflanzen der *tt15*-Mutante und des zugehörigen Wildtyps Columbia-2 isoliert. Die Pflanzen wurden zwei Tage dunkel gehalten und danach für 20 h mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlt. Wie aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt, ist nach einer Dunkeladaption in Wildtyp-Pflanzen keine Expression verschiedener Gene der Flavonoidbiosynthese mehr nachweisbar. UV-Induktion führt dagegen zur Akkumulation der entsprechenden mRNAs (Hartmann, 1997). Die Verwendung von Gesamt-RNA aus UV-bestrahltem Pflanzenmaterial stellte daher leicht detektierbare Transkriptmengen sicher. Darüber hinaus sollte es der Vergleich mit RNA aus dunkel gehaltenen Pflanzen erlauben, einen möglichen Einfluß der Mutation auf die Lichtregulation der Gene der Flavonoidbiosynthese zu untersuchen.

Die RNAs wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden für Gene des Phenylpropanstoffwechsels hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Expression von Flavonoidbiosynthesegenen in Blättern von *tt15* im Vergleich zum Wildtyp.** Aus Blättern dunkeladaptierter (D) bzw. mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlter (UV) Columbia-2- und *tt15*-Pflanzen wurde RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und nacheinander mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die für die Hybridisierungen verwendeten Sonden sind links von den Autoradiogrammen angegeben.

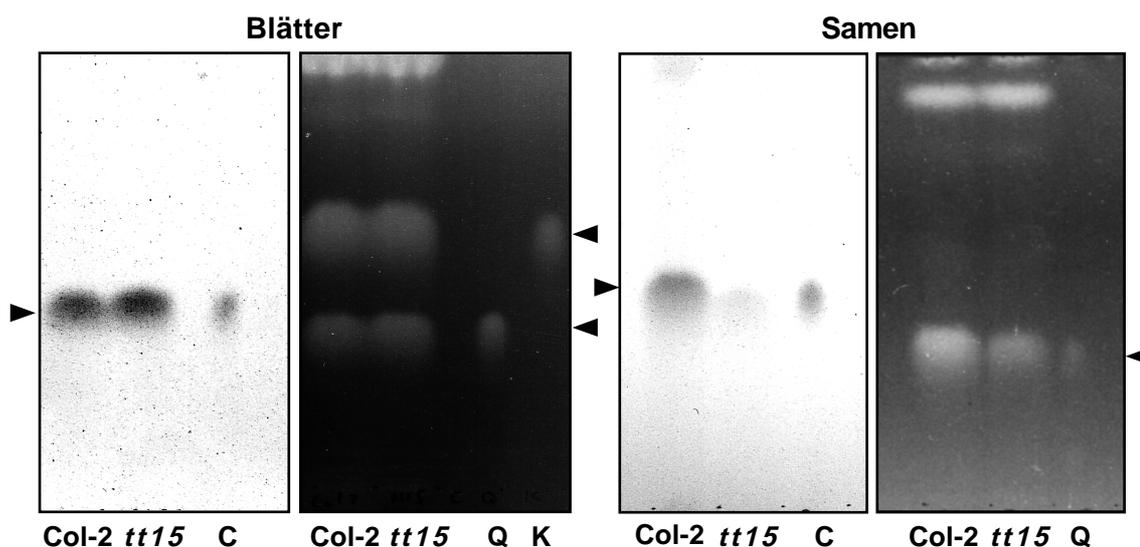
Wie erwartet, war in Blättern dunkel gehaltener Pflanzen keine der getesteten mRNAs nachweisbar. Die jeweiligen Transkripte akkumulierten jedoch nach Lichtinduktion. Dabei zeigte keines der untersuchten Gene in der *tt15*-Mutante eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Expression. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die Transkripte verschiedener Vertreter der *Polyubiquitin*-Genfamilie detektiert. Deren Expression ist zum Teil lichtreprimiert (Hartmann, 1997), so daß in den Spuren mit RNA aus dunkel gehaltenen Pflanzen sehr viel stärkere Signale nachgewiesen wurden, als in denen mit RNA aus UV-bestrahlten Pflanzen. Die Signalintensitäten der bestrahlten und der unbestrahlten Proben untereinander waren jedoch

weitgehend gleich. Dieses Experiment belegte, daß von Wildtyp und Mutante jeweils vergleichbare RNA-Mengen eingesetzt wurden. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, daß die *tt15*-Mutation keine Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Strukturgene des Phenylpropanstoffwechsels in den Blättern von *A. thaliana* hat. Auf diese Weise konnte jedoch nur eine kleine Auswahl an Genen getestet werden. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, daß andere Strukturgene oder Regulatoren der Flavonoidbiosynthese sehr wohl von der Mutation betroffen sind. Um dies zu überprüfen, sollte die Mutante auch biochemisch untersucht werden.

### 3.1.3.2 Flavonoidgehalt in verschiedenen Teilen der Mutante

Zur biochemischen Charakterisierung der Mutante wurden *tt15*-Keimlinge wie beschrieben auf Norfluorazon angezogen und die differenzielle Färbung mit Naturstoffreagenz A angewandt (2.3.2 und 3.1.2). Es zeigte sich, daß die Fähigkeit der Keimlinge, Anthocyane im Hypokotyl zu akkumulieren, durch die Mutation nicht beeinträchtigt wurde. Nach der Färbung wiesen die Keimlinge eine orange Fluoreszenz auf, die von der des Wildtyps nicht zu unterscheiden war. Auch die Fluoreszenz der Samen der *tt15*-Mutante unterschied sich nicht vom Wildtyp.

Der Flavonoidgehalt von UV-bestrahltem Blattmaterial sowie Samen wurde mittels Dünnschichtchromatographie genauer untersucht (2.3.1 und 3.1.1). Abbildung 8 zeigt Schwarz-Weiß-Photographien der entsprechenden Chromatographieplatten. Dieses Verfahren erlaubt eine kontrastreiche und damit deutliche Darstellung der beobachteten Substanzflecken. Es zeigte sich, daß in Blättern der *tt15*-Mutante die Zusammensetzung und der Gehalt an Flavonoid-Aglykonen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war. Im Unterschied dazu war in *tt15*-Samen der Cyanidingehalt reduziert. Darüber hinaus wiesen die Samen der Mutante auch eine Reduktion des korrespondierenden Flavonols Quercetin im Vergleich zum Wildtyp auf.



**Abbildung 8: *tt15* zeigt einen samenspezifischen Phänotyp.**

Dünnschichtchromatographische Analyse von Flavonoid-Aglyka, aus Columbia-2-Wildtyp und *tt15*-Mutante. 100 mg 20 h UV-bestrahltes Blattmaterial bzw. 6 mg Samen wurden 20 h bei RT in 1 ml 2 M HCl inkubiert und danach für 20 min auf 100°C erhitzt. Flavonoid-Aglyka wurden mit 50 µl Isoamylalkohol extrahiert und auf Zellulose-DC Platten in Forestal aufgetrennt. Es ist jeweils links eine Aufnahme in Weißlicht und rechts eine unter UV-Licht (366 nm) abgebildet. Als Referenzsubstanzen dienten Cyanidin (C), Quercetin (Q) und Kämpferol (K).

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen erlaubten in Anlehnung an ähnliche Tabellen von Shirley (1995) oder Bharti (1997) eine Einordnung von *tt15* relativ zu den schon beschriebenen klassischen *tt*-Mutanten. In Tabelle 1 sind beispielhaft *tt4* als Vertreter der Gruppe der Strukturgenmutanten und *tt1* als Vertreter der samenspezifischen oder regulatorischen Mutanten dargestellt. Die vorliegenden Daten zeigten, daß der Phänotyp der *tt15*-Mutante auf den Samen beschränkt ist, und sprachen dafür, daß es sich um eine samenspezifische Mutation handelte.

	Wt	<i>tt1</i>	<i>tt4</i>	<i>tt15</i>
Samenfarbe	braun	gelb	gelb	blaß grün-braun
Fluoreszenz der Samen	-	-	++	-
Quercetin in Samen	++	++	-	+
Cyanidin in Samen	++	-	-	+
Cyanidin in Blättern	++	++	-	++
Fluoreszenz mit Nat. A	orange	orange	blau	orange

**Tabelle 1: Phänotypische Eigenschaften der *tt15*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Wt) und ausgewählten klassischen *tt*-Mutanten.**

-, fehlt; +, vorhanden; ++, sehr ausgeprägt

### 3.1.4 Untersuchung von *tt*-Mutanten aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population

Bei der Herstellung einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population wurde eine Vielzahl von Pflanzen mit phänotypischen Auffälligkeiten beobachtet (Wisman *et al.*, 1998). Die dabei gefundenen Linien mit veränderter Samenfarbe wurden mir zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.\* Viele dieser Linien wurden unabhängig auch beim Durchmustern der Population auf Mutanten mit der Fähigkeit identifiziert, in Anwesenheit hoher Saccharose- oder Mannosekonzentrationen zu keimen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten noch drei weitere Linien isoliert werden, deren Samen weniger deutliche Farbabweichungen vom Wildtyp aufwiesen (J. Pego, A. Kortstee und S. Smeeckens, persönliche Mitteilung). Insgesamt standen damit für diese Arbeit 27 *tt*-Mutanten aus der *En1*-Population zur Verfügung. Um darunter die interessantesten Linien für weitere Untersuchungen zu ermitteln, wurden verschiedene ihrer phänotypischen Merkmale erfaßt (vgl. 3.1.1). Die Färbung mit Naturstoffreagenz A (2.3.2 und 3.1.2) ermöglichte es dabei, mit geringem Aufwand viele Keimlinge zu untersuchen und erlaubte so auch die Analyse von Pflanzen, die noch für den *tt*-Phänotyp segregierten. Darüber hinaus waren bei der Untersuchung vollständiger Keimlinge revertante Sektoren (1.3) direkt sichtbar, die bei der Bestimmung des Vorkommens von Flavonoiden in einer Mutante mittels Dünnschichtchromatographie zu falsch positiven Ergebnissen führen konnten. Das differenzielle Färbeverfahren war daher ein besonders effizientes und aussagekräftiges Mittel der Untersuchung der Linien aus der *En1*-Population und führte zur Identifizierung potentieller Allele bereits bekannter *tt*-Mutanten.

Um zu testen, ob eine *En1*-mutagenisierte Linie tatsächlich allelisch zu einer der klassischen *tt*-Mutanten war, wurde sie mit dieser Mutante gekreuzt (2.3.3). Lag in beiden Elternpflanzen eine Mutation im gleichen Gen vor, so erhielt die F1-Generation zwei defekte Allele dieses Gens. In der Nachkommenschaft der Kreuzung kam es daher nicht zur Komplementation des *tt*-Phänotyps, das heißt, die Pflanzen waren nicht in der Lage, in der Samenschale braune Pigmente zu synthetisieren. War eine *En1*-Linie als Allel einer klassischen *tt*-Mutante

---

\* Linien, die zusätzlich zu gelben Samen auch durch das Fehlen von Trichomen gekennzeichnet waren (*transparent testa glabra*, *tig*), wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

identifiziert, für die die molekulare Ursache der Mutation bekannt war, so konnte auch in der *En1*-Linie nach Mutationen in dem entsprechenden Gen gesucht werden. Dazu wurde versucht, mittels PCR von DNA der zu testenden Pflanze als Matrize mit spezifischen Primern für das fragliche Gen und das *En1*-Transposon ein Produkt zu amplifizieren. Wenn dies gelang, konnte es direkt sequenziert werden, um so die Anwesenheit des Transposons im jeweiligen Gen nachzuweisen. Konnte für eine Pflanze mit gen- und transposonspezifischen Primern kein Produkt amplifiziert werden, bestand die Möglichkeit, daß die Mutation auf einer Veränderung der Sequenz des untersuchten Gens nach Exzision des Transposons beruhte („footprint“; 1.3). Um das zu überprüfen, wurde unter Verwendung von spezifischen Primern mittels PCR der kodierende Bereich des zu untersuchenden Gens amplifiziert und anschließend sequenziert.

In der *En1*-Population wurden vorwiegend Linien mit auffällig deutlich gelben Samen identifiziert. Die Phänotypen der weitaus meisten dieser Linien betrafen nicht nur die Samenfarbe, sondern die Pigmentierung der gesamten Pflanze und konnten mit Hilfe des differenziellen Färbeverfahrens bestehenden Komplementationsgruppen zugeordnet werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Zuordnung der einzelnen Linien zu den klassischen *tt*-Mutanten.

<i>tt1</i>	<i>tt3</i>	<i>tt4</i>	<i>tt5</i>	<i>tt6</i>	<i>tt7</i>	nb
5K60.3	5M48	4AAR3	13.248	5G38.2	5R22	6AAH92
	5M56	5N16.1		5AAJ34		4AT122
	5M81	5K49.3		4I30-108		17.669
	5M86	5Q24				5V27
	5AAA52	5K5-108				5O94
	5AAA54	5L63 hell				
	6J62 hell	4AAM7				
	15.783.2	6AS137				

**Tabelle 2: transparent-testa-Mutanten aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population.** Dargestellt ist die Zuordnung der aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population isolierten Linien mit abweichender Samenfarbe zu den klassischen *tt*-Mutanten an Hand der Anhang 1 angegebenen Merkmale (nb, nicht bestimmt).

Eine detaillierte Übersicht über alle an den Linien beobachteten Merkmale findet sich in Anhang 1. Auffallend häufig konnten *tt3*- und *tt4*-Allele identifiziert werden. Die Sequenzuntersuchungen zeigten, daß sich nur in wenigen Pflanzen das Transposon noch in dem jeweiligen Gen befand. Zumeist enthielten die Mutanten einige zusätzliche Nukleotide in Exons von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese und waren somit stabil. Informationen zu den nachgewiesenen Insertionen und den putativen „footprints“ sind in Anhang 2 zusammengestellt.

Am interessantesten unter diesen Linien waren die neu isolierten *tt6*-Allele 5G38.2, 5AAJ34 und 4I30-108, weil sie die Möglichkeit boten, die Frage zu beantworten, ob der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält. Darüber hinaus eröffnete das *tt1*-Allel 5K60 die Chance, erstmalig einen Vertreter der Gruppe der samenspezifischen *tt*-Mutanten genauer zu charakterisieren. Diese Linien sollten daher im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht werden.

### 3.2 Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob das *F3H*-Gen dem *tt6*-Lokus entspricht

Im Unterschied zu *tt15* ist die *tt6*-Mutante nicht nur durch eine vom Wildtyp abweichende Samenfarbe sondern auch durch einen stark reduzierten Gehalt an Flavonolen in den vegetativen Pflanzenteilen gekennzeichnet. Auf Grund dieser Eigenschaften lag die Vermutung nahe, daß in dieser Mutante ein Schritt in der Flavonolbiosynthese blockiert sein könnte (1.2.1). Es wurde zunächst vermutet, daß es sich dabei um die Flavonolsynthase (FLS) handelt. Ein weiteres Gen, dessen Mutation zur Ausprägung des beschriebenen Phänotyps führen könnte, ist die Flavanon-3-Hydroxylase (*F3H*). Mit Hilfe ähnlicher Methoden, wie sie bereits für das *FLS1*-Gen angewandt worden waren (Hartmann, 1997), sollte im Folgenden die Frage beantwortet werden, ob das *AtF3H*-Gen dem *tt6*-Lokus zugeordnet werden kann.

#### 3.2.1 Kartierung des *F3H*-Gens im Genom und Vergleich mit der Position des *tt6*-Lokus

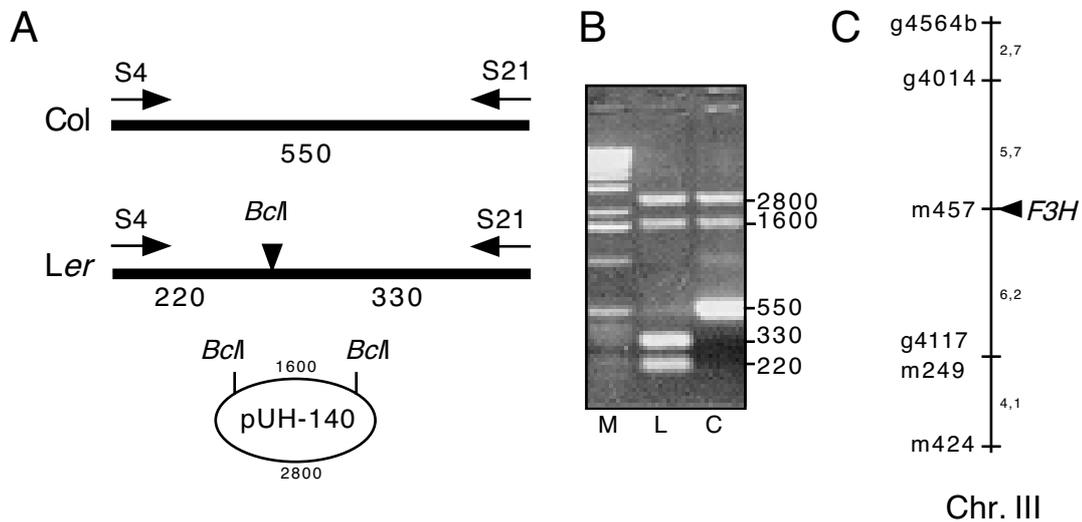
Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält, wurde ihre Lokalisation im Genom von *A. thaliana* auf eine mögliche Übereinstimmung hin untersucht. Die Position eines DNA-Abschnitts im Genom kann durch Analyse der Segregation eines damit verbundenen Markers in einer Kartierungspopulation bestimmt werden. Die dabei gewonnenen Daten erlauben über die Berechnung von Rekombinationshäufigkeiten mit bereits bekannten Markern eine relative Kartierung des untersuchten DNA-Abschnitts. Eine häufig benutzte Kartierungspopulation für *A. thaliana* wurde aus einer Kreuzung der Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* entwickelt (Lister und Dean, 1993). Dabei machte man sich zunutze, daß die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Parentallinien einer Kreuzung auf Grund von Rekombinationsereignissen in einer Vielzahl unterschiedlicher Kombinationen in die erste Filialgeneration vererbt werden. Diese genetische Variation wurde durch wiederholte Selbstung in Inzuchtlinien stabilisiert. In der Population dieser rekombinanten Inzuchtlinien (RI-Linien) wurde mittlerweile die Segregation (und damit die Lokalisation) von mehr als 500 unterschiedlichen Markern ermittelt, die nun als Bezugssystem für weitere Kartierungen dienen.

Eine Voraussetzung für die Kartierung eines Merkmals mit Hilfe dieser RI-Linien ist, daß sich das zu kartierende Merkmal zwischen den Ökotypen Landsberg und Columbia unterscheidet. Zur Kartierung eines DNA-Abschnitts eignet sich zum Beispiel ein Sequenzunterschied, der dazu führt, daß das Allel des einen Elternteils eine Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease aufweist, das des anderen jedoch nicht. Ein solcher Polymorphismus sollte für das *F3H*-Gen gefunden werden. Die genomische Sequenz dieses Gens war für den Ökotyp Landsberg *erecta* bereits veröffentlicht (GenBank Accession U33932). Aus dieser Sequenz wurden PCR-Primer abgeleitet, mit denen ein entsprechendes Fragment von genomischer DNA des Ökotyps Columbia mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert werden konnte. Die resultierende Sequenz ist im Anhang 6 angegeben (GenBank Accession AF064064). Ein Vergleich der so bestimmten mit der publizierten Sequenz ergab, daß eine Transition von C (Col) zu T (*Ler*) an Position +257 dazu führt, daß das *F3H*-Gen aus dem Ökotypen Landsberg an dieser Stelle eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *BclI* enthält, die dem aus Columbia fehlt. Dieser Polymorphismus konnte für die Kartierung des *F3H*-Gens mit den RI-Linien verwendet werden.

Der Vergleich der Columbia-*F3H*-Sequenz mit der aus Landsberg *erecta* ermittelten ergab darüber hinaus, daß sie sich in den kodierenden Bereichen in 18 Positionen unterscheiden. Fünfzehn der Mutationen betreffen die dritte Position von Kodons und führen auf Grund des degenerierten genetischen Codes nicht zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz. Eine Mutation betrifft die zweite Position eines Basentriplets und führt dazu, daß sich an Position 350 in der Landsberg Aminosäuresequenz ein Alanin, in der Columbia Sequenz dagegen Asparaginsäure befindet. Zwei Unterschiede betreffen die erste Position eines Kodons, aber nur einer davon führt zu einem Aminosäureaustausch: Asparagin 148 des Landsberg Proteins ist in Columbia durch Asparaginsäure ersetzt.

Für die Kartierung des *F3H*-Gens mit Hilfe der RI-Linien wurden, wie in Abbildung 9 dargestellt, genomische Fragmente, welche die polymorphe Sequenz enthielten, mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die genomischen DNAs von 100 RI-Linien als Matrizen eingesetzt (2.3.4). Die erhaltenen Produkte wurden mit *BclI* gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. An Hand des ökotypspezifischen Bandenmusters konnte für jede Linie die Herkunft des *F3H*-Gens bestimmt werden. Die Segregation des Polymorphismus in den Inzuchtlinien

ist im Anhang 3 zusammengefaßt. Die Analyse dieser Daten ergab, daß das *F3H*-Gen auf Chromosom III bei 67,7 cM nahe dem Marker m457 lokalisiert ist ([nasc.nott.ac.uk/new\\_ri\\_map.html](http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html)). Das korreliert mit der von Pelletier (1996) für das *F3H*-Gen bestimmten Position.



#### Abbildung 9: Bestimmung der Lokalisation des *F3H*-Gens im Genom.

Die Abbildung enthält in **A** eine schematische Darstellung der zwischen Landsberg und Columbia polymorphen Sequenz, der zur Amplifikation verwendeten Primer S4 und S21 sowie der aus einer Restriktionsspaltung mit *Bcl*I resultierenden Fragmentgrößen. Weiterhin ist die interne Plasmidkontrolle (UH140, dam<sup>r</sup>) dargestellt, die den Restriktionsansätzen hinzugefügt wurde, um die Funktionalität des Restriktionsenzym zu überprüfen. **B** zeigt das Resultat der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der Restriktionsspaltung (DNA-Größenstandard, M; *Ler*-PCR-Produkt, L; *Col*-PCR-Produkt, C). **C** illustriert das Ergebnis der Auswertung der Segregationsdaten. Dazu ist ein Ausschnitt des unteren Arms von Chromosom III schematisch dargestellt. Angegeben ist die Position des *F3H*-Gens und dessen Abstände zu einigen benachbarten Markern in cM.

Im nächsten Schritt mußte nun überprüft werden, ob die Position des *tt6*-Lokus mit der für das *F3H*-Gen ermittelten übereinstimmt. Der *tt6*-Lokus war ursprünglich ebenfalls auf dem unteren Arm von Chromosom III lokalisiert worden (Koornneef, 1990). Diese Position wurde jedoch später angezweifelt (J. Campanella und C. Town in Pelletier und Shirley, 1996). Wenn die *tt6*-Mutante tatsächlich ein defektes *F3H*-Gen enthalten sollte, dann müßte in der zweiten Filialgeneration (F<sub>2</sub>) einer Kreuzung dieser Mutante mit Wildtyp jede *tt6*-Samen erzeugende Pflanze dieses defekte *F3H*-Gen tragen. Sollte *tt6* dagegen ein von *F3H* unabhängiger Locus sein, so sollte es in der F<sub>2</sub> auch *tt6*-Samen erzeugende Pflanzen mit (intakten) Wildtyp *F3H*-

Allelen geben. Da sich die *tt6*-Mutation im Landsberg *erecta* Hintergrund befindet, konnte wiederum der *BcII*-Polymorphismus benutzt werden, um das potentiell defekte *Ler-F3H*-Allel in der geselbsteten Nachkommenschaft einer Kreuzung von *tt6* mit Columbia Wildtyp nachzuweisen. Der für diesen Marker ermittelte Genotyp der Pflanzen sollte dann mit der Farbe der von ihnen produzierten Samen korreliert werden.

Die *tt6*-Mutante wurde mit Columbia Wildtyp gekreuzt (2.3.3). Alle direkten Nachkommen dieser Kreuzung brachten, wie für eine rezessive Mutation zu erwarten, braune Samen hervor. In der zweiten Filialgeneration traten dem entsprechend etwa 25% Pflanzen auf, deren Samen die hellbraune Färbung der Mutante zeigten. Die genotypische Untersuchung dieser F<sub>2</sub>-Generation mit Hilfe des *BcII*-Polymorphismus zeigte, daß alle hell-samigen Pflanzen homozygot für das Landsberg *F3H*-Allel waren, während alle anderen Pflanzen zumindest ein Columbia *F3H*-Allel trugen (Tabelle 3). Der *tt6*-Phänotyp kosegregierte also streng mit dem *Ler-F3H*-Allel. Das deutete auf eine physische Kopplung beider Merkmale hin, was ein Anhaltspunkt dafür war, daß der *tt6*-Lokus tatsächlich das *AtF3H*-Gen enthält.

Genotyp ( <i>BcII</i> CAPS)	Phänotyp		Anzahl Pflanzen (rel. Anteil)
	Wildtyp	<i>tt</i>	
Col / Col	33	-	33 (1)
Col / <i>Ler</i>	67	-	67 (2)
<i>Ler</i> / <i>Ler</i>	-	27	27 (1)
Anzahl Pflanzen (rel. Anteil)	100 (3)	27 (1)	$\Sigma = 127$

**Tabelle 3: Ein *Ler* Marker kosegregiert mit dem *tt*-Phänotyp.**

Tabellarisch dargestellt ist die Auswertung der Untersuchung von 127 Pflanzen der zweiten Filialgeneration einer Kreuzung der *tt6*-Mutante (*Ler* Hintergrund) mit Col-0. An Hand des *BcII*-Polymorphismus (Abbildung 9) wurde für jede Pflanze die Herkunft der *F3H*-Allele getestet (Col, *Ler*, heterozygot). Die Farben der reifen Samen wurden mit denen der Parentallinien verglichen und entsprechend zugeordnet (dunkelbraun, Wildtyp; hellbraun, *tt*). Nur Pflanzen, die homozygot für das aus der *tt6*-Mutante stammende *Ler-F3H*-Allel waren, brachten hellbraune Samen hervor.

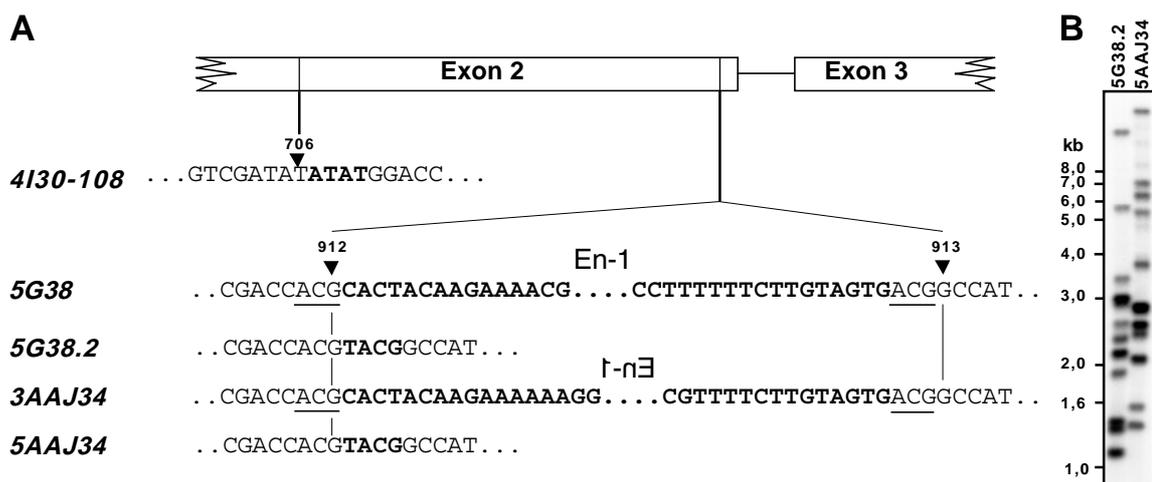


### 3.2.3 Isolierung von *F3H*-Insertionsmutanten und Untersuchung weiterer *tt6*-Allele

Die auf Grund ihrer helleren Samenfarbe aus der *En1*-Population isolierten Linien 5G38.2, 5AAJ34 und 4I30-108 zeigten in der differenziellen Färbung mit Naturstoffreagenz A die charakteristische rote Fluoreszenz von *tt6*. In Testkreuzungen waren alle drei Linien nicht in der Lage, die *tt6*-Mutation zu komplementieren (3.1.4). Parallel zu diesen Untersuchungen wurde die *En1*-Population auch nach einer Transposoninsertion im *F3H*-Gen durchsucht. Dazu wurde ein PCR-„screening“ (Baumann *et al.*, 1998) mit den im Transposon bindenden Oligonukleotiden En205 und En8130 sowie den genspezifischen Oligonukleotiden S4 und S7 durchgeführt. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten drei Linien mit einer Insertion im *F3H*-Gen identifiziert werden (5A45, 13728 und 5G38). Alle drei Linien produzierten dunkelbraune Samen. Es konnte daher davon ausgegangen werden, daß sie heterozygot für die Insertion im *F3H*-Gen waren. Die Linie 5G38 ist die Elterngeneration der bereits als *tt6*-Allel identifizierten Pflanze 5G38.2. Diese brachte, wie auch die beiden anderen auf Grund ihrer Samenfarbe identifizierten *tt6*-Allele, ausschließlich deutlich hellere Samen hervor als der Wildtyp. Das konnte bedeuten, daß sie homozygot für eine Transposoninsertion im *F3H*-Gen war oder beide Allele dieses Gens nach Exzision des Transposons durch einen „footprint“ zerstört waren.

Um zu überprüfen, ob die Defekte in den *F3H*-Genen der Linien 4I30-108, 5G38.2 und 5AAJ34 in der Anwesenheit des *En1*-Transposons bestanden, wurden PCRs mit transposon- und genspezifischen Primern durchgeführt, bei denen DNAs dieser Linien als Matrizen eingesetzt wurden. In keiner der Linien konnte ein Produkt amplifiziert werden. Das sprach dafür, daß in keiner der Linien eine Transposoninsertion im *F3H*-Gen vorlag. Daher wurden die *F3H*-Gene aus den Linien 5G38.2, 5AAJ34 und 4I30-108 auf andere Unterschiede zum Wildtyp hin untersucht. Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden dazu unter Verwendung genspezifischer Primer und genomischer DNA dieser Linien mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden direkt sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Es zeigte sich, daß jede der *F3H*-Sequenzen der Mutanten kurze duplizierte Elemente enthielt (Abbildung 11A). Diese waren in 5G38.2 und 5AAJ34 in Sequenz und Position identisch, obwohl durch DNA-Gel-Blot-Analysen gezeigt werden konnte, daß diese Pflanzen unabhängigen Linien mit völlig verschiedenen *En1*-Insertionsmustern entstammten (Abbildung 11B). Um festzustellen, ob es sich bei den duplizierten Elementen um „footprints“ des Transposons

handelte, wurden Vorfahren dieser Pflanzen auf das Vorhandensein einer Insertion an der entsprechenden Position hin untersucht. Dazu wurden genomische DNAs der Pflanzen 5G38 und 3AAJ34 als Matrizen in PCRs mit gen- und transposonspezifischen Primern eingesetzt. Für beide Pflanzen konnten Produkte amplifiziert und direkt sequenziert werden. Die Sequenzen zeigten, daß sich in beiden Pflanzen das *En1*-Transposon an exakt der selben Position in der Nähe eines Exon-Intron-Übergangs im *F3H*-Gen befand. Die Integrationen waren jeweils in unterschiedlicher Orientierung erfolgt, führten jedoch zu identischen „targetsite Duplikationen“ (Abbildung 11A). Da sich aus den Sequenzen der „targetsite Duplikationen“ zwanglos die der in der Nachkommenschaft gefundenen duplizierten Elemente ableiten ließen, konnte angenommen werden, daß es sich dabei tatsächlich um nach Exzision des Transposons zurückgebliebene „footprints“ handelte.



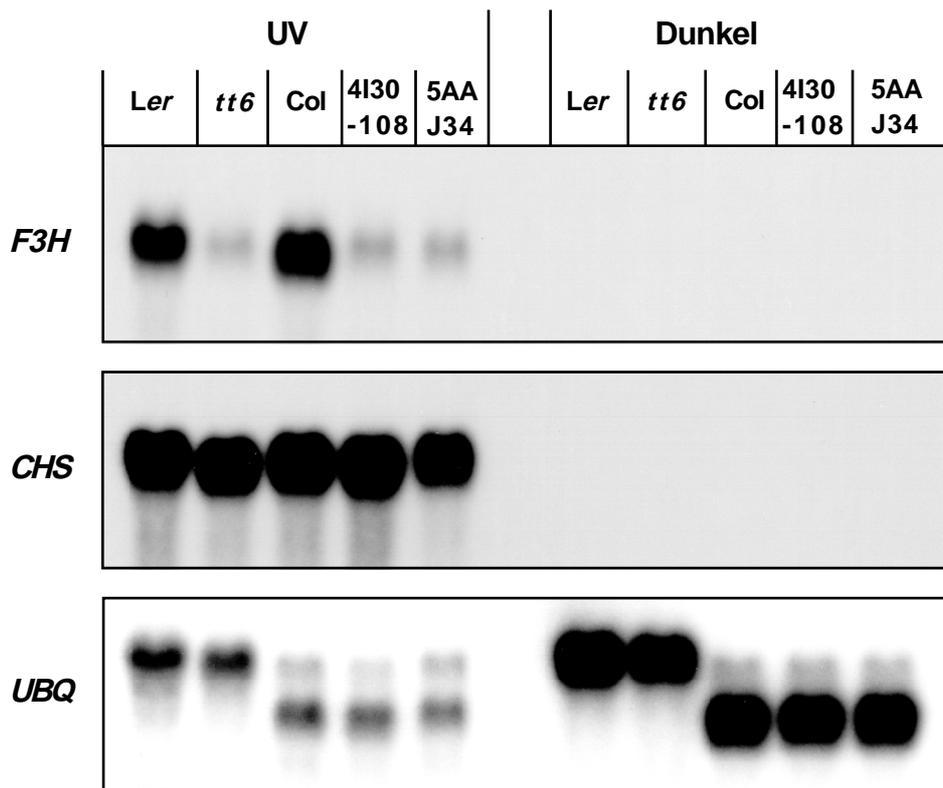
**Abbildung 11: Drei weitere *tt6*-Allele enthalten *En1*-Insertionen bzw. „footprints“ im *F3H*-Gen.** In A ist ein Vergleich von *F3H*-Sequenzen aus den neuen *tt6*-Allelen 5G38.2, 5AAJ34 und 4I30-108 sowie 5G38 und 3AAJ34 dargestellt. Die jeweiligen DNA-Abschnitte wurden mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Für die PCR wurden die *F3H*-spezifischen Primer S5 und S7 bzw. die transposonspezifischen Primer En205 und En8130 eingesetzt und genomische DNA als Matrize verwendet. Transposoninsertionen und „footprints“ sind fett gedruckt, „targetsite Duplikationen“ unterstrichen. **B** DNA-Gel Blot-Analyse der Linien 5G38.2 und 5AAJ34. Genomische DNA der beiden Linien wurde mit *HindIII* gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer für das 5'-Ende des *En1*-Transposons spezifischen Sonde.

Somit konnte für *tt6* und alle neuen *tt6*-Allele ein Defekt im *F3H*-Gen gezeigt werden. Es war äußerst unwahrscheinlich, daß in all diesen Linien jeweils eine weitere unabhängige Mutation vorlag, die zu dem beobachteten *tt*-Phänotyp führte. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnte daher gefolgert werden, daß der *tt6*-Lokus das *AtF3H*-Gen enthält.

### 3.2.4 Untersuchung der *F3H*-mRNA-Mengen in unterschiedlichen *tt6*-Allelen und Wildtypen

Ein Defekt in einem Gen, das wie *F3H* für ein Enzym eines frühen Schrittes der Flavonoidbiosynthese kodiert, sollte auch Auswirkungen auf die Fähigkeit der entsprechenden Mutante haben, Anthocyane und kondensierte Tannine zu bilden. Die klassische *tt6*-Mutante wies zwar stark reduzierte Flavonolgehalte auf, produzierte aber immer noch leicht pigmentierte Pflanzenteile und hellbraune Samen. Alle drei neu isolierten *tt6*-Allele zeigten eine hellere Samenfarbe, als die klassische *tt6*-Mutante. Das konnte auf eine stärkere Verkürzung oder geringere Stabilität der *F3H*-Transkripte in diesen Mutanten zurückzuführen sein. Im Folgenden sollten daher die *F3H*-mRNA-Mengen in den unterschiedlichen *tt6*-Allelen und Wildtypen verglichen werden.

RNA wurde aus zwei Tage dunkeladaptierten sowie anschließend für 20 h mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlten *A.-thaliana*-Pflanzen isoliert. Nach Auftrennung im Agarosegel und Übertragung auf eine Nylonmembran wurde sie mit einer radioaktiv markierten *F3H*-Sonde hybridisiert. Wie Abbildung 12 zeigt, war in dunkel gehaltenem Pflanzenmaterial keine *F3H*-mRNA nachweisbar. Nach Lichtinduktion akkumulierte sie in Landsberg und Columbia Wildtyp-Pflanzen, während die Mutanten *tt6*, 5AAJ34 und 4I30-108 deutlich verringerte Transkriptmengen aufwiesen. Alle Mutanten zeigten ungefähr gleich niedrige *F3H*-mRNA-Niveaus. Die Größen der Transkripte unterschieden sich nicht deutlich von denen der Wildtypen. Weitere Hybridisierungen mit Sonden spezifisch für andere Gene der Flavonoidbiosynthese, wie zum Beispiel *CHS*, zeigten, daß deren Expression in den Mutanten nicht beeinträchtigt war. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels diente eine Hybridisierung mit einer *Polyubiquitin*-Sonde (3.1.3.1). Die Größe der von dieser Sonde detektierten mRNAs unterscheidet sich bei Landsberg und Columbia (Hartmann, 1997).



**Abbildung 12:** Die *F3H*-Transkriptmenge ist in allen *tt6*-Allelen gegenüber dem Wildtyp verringert.

Dargestellt sind RNA-Hybridisierungsexperimente mit RNA aus dunkeladaptierten (Dunkel), bzw. mit nach Dunkeladaptation mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlten Pflanzen (UV). Es wurden die Mutanten *tt6*, 5AAJ34 und 4I30-108 mit den dazugehörigen Wildtypen *Ler* und *Col-0* untersucht. Die für die Hybridisierung verwendeten Sonden sind links von den jeweiligen Autoradiographien angegeben.

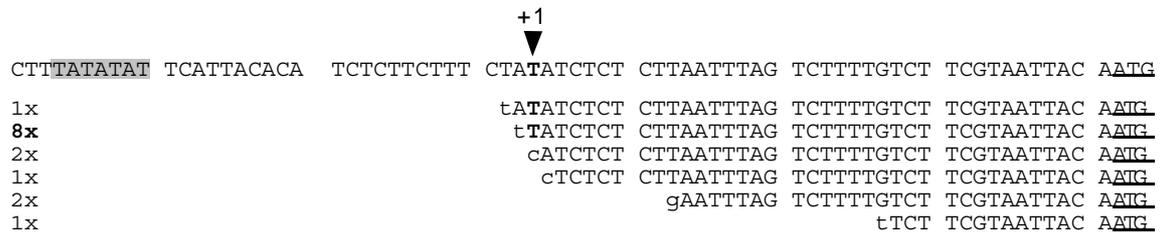
### 3.3 Untersuchungen zur lichtabhängigen Expression des *A. thaliana F3H*-Gens

Die im Rahmen der Untersuchung der *tt6*-Mutanten beobachtete Lichtinduktion der *F3H*-Expression im Wildtyp stimmte mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Pelletier und Shirley, 1996). Ein entsprechendes Expressionsmuster konnte U. Hartmann auch für *AtCHS*, *AtCFI* und *AtFLS* zeigen. Darüber hinaus war es ihr gelungen, in den Promotoren dieser Gene diejenigen *cis*-Elemente zu identifizieren, die die Lichtinduzierbarkeit vermitteln (Hartmann, 1997). Im Folgenden wurden für den *F3H*-Promotor analoge Experimente durchgeführt, um diese Untersuchungen zu vervollständigen. Dazu wurden die zu testenden Teile oder Modifikationen des Promotors mit dem offenen Leserahmen des bakteriellen *uidA*-Gens fusioniert, das für das Enzym  $\beta$ -Glukuronidase kodiert. Die so gewonnenen Reporterkonstrukte wurden in protoplastierte *A.-thaliana*-Suspensionskultur-Zellen transfiziert (2.3.12) und diese im Dunkeln inkubiert oder mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlt. Nach acht Stunden wurde die Aktivität des Reporterenzym bestimmt (2.3.13) und als direktes Maß der Promotoraktivität gewertet. Dabei wurde zunächst eine Reihe verschieden langer Promotorfragmente getestet, um herauszufinden welche Mindestlänge erforderlich ist, um Lichtaktivierbarkeit zu vermitteln. Innerhalb des so definierten Minimalpromotors wurden dann potentielle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren mittels PCR mutiert, um über den daraus eventuell resultierenden Verlust der Lichtresponsivität die für diese Funktion verantwortlichen Elemente zu identifizieren.

#### 3.3.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *AtF3H*

Analog zu den Promotoren von *CHS*, *CFI* und *FLS* wurde auch für den *F3H*-Promotor zunächst der Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Dazu wurden mit Hilfe der 5'-RACE Technik (2.3.6) 16 cDNAs isoliert und sequenziert. Das Ergebnis des Vergleichs dieser Sequenzen mit der genomischen *AtF3H*-Sequenz (GenBank Accession U33932) ist in Abbildung 13 dargestellt. Acht der isolierten RACE-cDNAs begannen mit einem Thymin 38 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Start-Kodons. Eine Sequenz begann bereits 179 bp weiter stromaufwärts, eine weitere war eine Base länger und die übrigen sechs Sequenzen waren kürzer. Ein TATA-Box-Motiv konnte 61 Nukleotide stromaufwärts des Start-ATGs lokalisiert werden.

Im gleichen Leserahmen mit diesem ATG befand sich sieben Tripletts stromaufwärts ein Stop-Kodon. Auf Grund dieser Anhaltspunkte wurde das Thymin 38 bp stromaufwärts des Start-ATGs als Transkriptionsstartpunkt (+1) von *AtF3H* definiert.



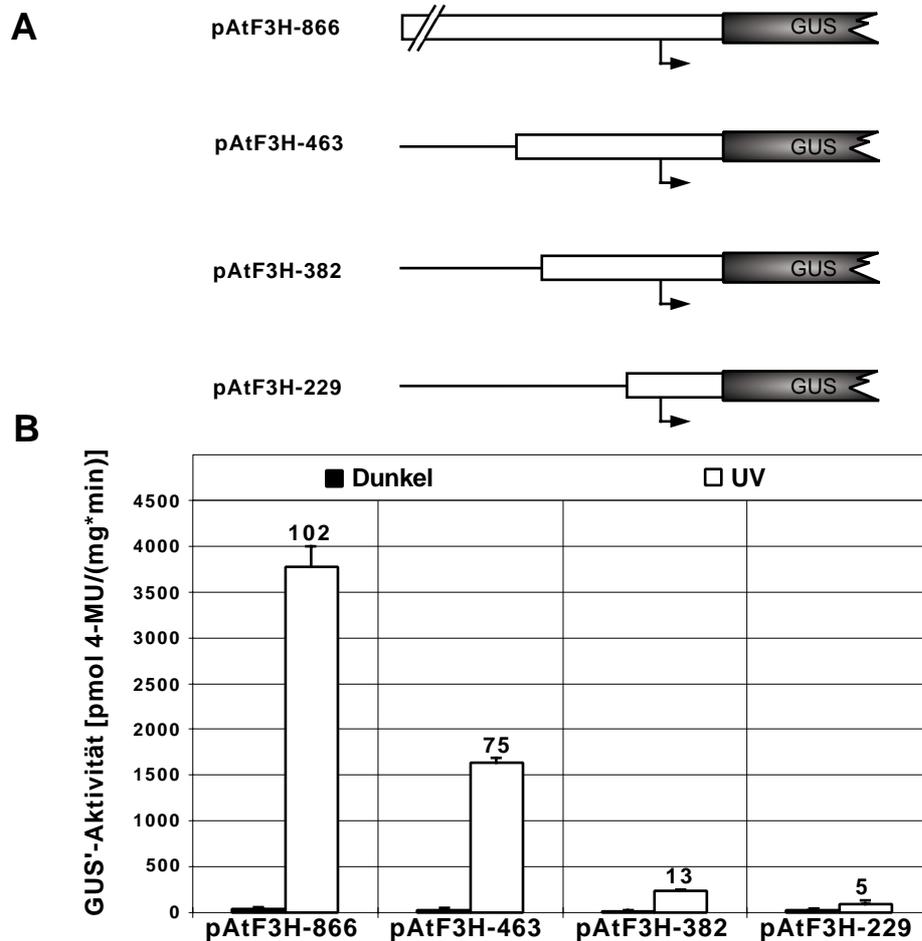
### Abbildung 13: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *AtF3H*.

Dargestellt sind die Sequenzen der 5'-Enden von 15 RACE-cDNAs. Die Produkte wurden mit dem „5'/3' RACE Kit“ (Roche, 2.3.6) erzeugt, in den Vektor pT7-Blue ligiert und sequenziert. Zum Vergleich ist oben die genomische Sequenz dargestellt; das TATA-Box-Motiv ist grau unterlegt. Das als Position +1 definierte Nukleotid ist fett gedruckt, das Start-ATG unterstrichen. Kleinbuchstaben am 5'-Ende der RACE-cDNAs bezeichnen Nukleotide, die nicht mit der genomischen Sequenz übereinstimmen.

### 3.3.2 Eingrenzung eines *F3H*-Minimalpromotors

Als operationaler Minimalpromotor wird das kürzeste Fragment eines Promotors verstanden, das noch in der Lage ist, eine bestimmte Antwort auf einen Stimulus zu vermitteln. Um einen solchen Promotor für die Lichtinduktion der *F3H*-Expression zu definieren, wurden unterschiedlich lange Abschnitte des 5'-untranslatierten Bereiches dieses Gens in Transfektionsexperimenten getestet. Wie in Abbildung 14 dargestellt, führten alle untersuchten Promotorfragmente im Dunkeln nur zu einer sehr geringen GUS-Aktivität. Nach Lichtinkubation dagegen vermittelte das 866 bp lange Fragment eine 99fach erhöhte GUS-Aktivität. Der Promotor des lichtabhängig exprimierten *F3H*-Gens konnte also in Transfektionsexperimenten durch Bestrahlung mit UV-haltigem Weißlicht aktiviert werden. Eine Verkürzung des Promotors auf 463 bp reduzierte zwar die erhaltene absolute GUS-Aktivität um etwa die Hälfte, die Lichtaktivierbarkeit blieb jedoch mit 75fach weiterhin hoch.

Ein deutlicher Verlust der Lichtaktivierbarkeit trat erst bei einer Deletion von 463 auf 382 bzw. 229 bp ein. Das 463 bp-Fragment war das kürzeste getestete Promotorfragment, das noch signifikant lichtinduzierbar war. Es mußte daher die für die Lichtinduzierbarkeit mindestens notwendigen *cis*-Elemente enthalten. Im Hintergrund des so eingegrenzten Minimalpromotors konnte nun die Identifizierung dieser Elemente erfolgen.



**Abbildung 14: Eingrenzung eines *F3H*-Minimalpromotors.**

Die zur Transfektion von *A. thaliana*-Protoplasten verwendeten Konstrukte sind in **A** schematisch dargestellt. **B** zeigt das Ergebnis von 6 unabhängigen Transfektionsexperimenten als Balkendiagramm. Die Transfektionen wurden mit p*UBILUC* standardisiert. Dargestellt sind die standardisierten GUS-Werte (GUS') mit Standardabweichungen. Die Zahl über den Lichtwerten gibt die Lichtinduktion des jeweiligen Konstruktes an. Die für die Standardisierung herangezogenen GUS- und Luciferase-Werte sind in Anhang 4 angegeben. Alle in den Abbildungen 14-17 dargestellten Werte entstammen dem selben experimentellen Block. Daher gelten jeweils die gleichen Mittelwerte der Luciferaseaktivitäten. Sie betragen im Dunkeln 13190 RLU/( $\mu\text{g} \times \text{s}$ ) und im Licht 10749 RLU/( $\mu\text{g} \times \text{s}$ ).

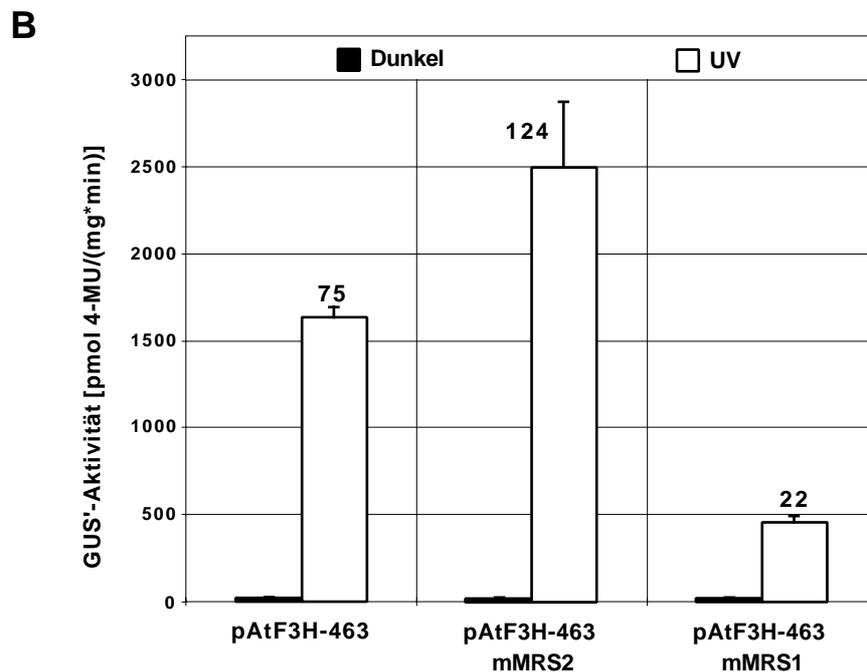
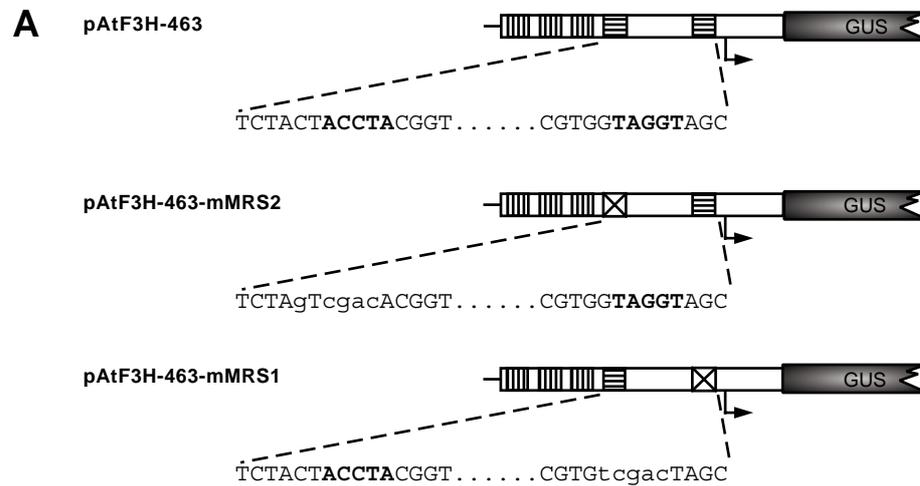
### 3.3.3 Definition funktioneller *cis*-aktiver ACE- und MRE-Sequenzen im *F3H*-Promotor

In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß vor allem zwei Arten von *cis*-aktiven Elementen für die Induktion der Promotoren der Gene der Flavonolbiosynthese durch UV-Licht notwendig sind: Zum einen Sequenzen, die das Motiv ACGT enthalten („ACGT-Containing Element“, ACE). Sie werden von Transkriptionsfaktoren gebunden, die eine basische Region und eine Leucin-Reißverschluß Domäne enthalten (bZIP). Zum anderen handelt es sich um Sequenzen, die von MYB-Transkriptionsfaktoren erkannt werden („MYB-Recognition Element“, MRE). Sie enthalten in ihrem Kern das Sequenzmotiv ACCTA. In den bisher untersuchten Promotoren bildeten ACE und MRE jeweils eine Lichtregulatorische Einheit („Light Regulatory Unit“, LRU), in der sie durch 17 (*AtCHS*) bis 29 (*AtCFI*) bp voneinander getrennt sind. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die lichtabhängige Expression des *F3H*-Gens durch vergleichbare Elemente im Promotor vermittelt wird.

#### 3.3.3.1 Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten MRS<sup>AtF3H</sup>

Zur Identifizierung mutmaßlicher *cis*-Elemente wurde die Sequenz des 463 bp langen *AtF3H*-Minimalpromotors auf das Vorhandensein von ACGT- und ACCTA-Motiven hin untersucht. Dabei wurde das palindromische Motiv ACGT fünfmal und das Motiv ACCTA zweimal gefunden, einmal auf dem kodierenden und einmal auf dem Gegenstrang. Diese putativen *cis*-Elemente werden im folgenden als ACS 1-5 („ACGT Containing Sequences“) und MRS 1 und 2 („MYB Recognition Sequences“) bezeichnet. Alle ACS liegen in der Nähe der weiter stromaufwärts gelegenen MRS2, während die nächste ACS von MRS1 deutlich weiter entfernt liegt. Um zu testen, ob eine der beiden MRS eine Rolle in der Lichtinduzierbarkeit des *F3H*-Promotors spielt, wurden in beide Sequenzen mittels PCR 5 bp umfassende Blockmutationen eingeführt. Mit den resultierenden Konstrukten wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, bei denen der Minimalpromotor als Kontrolle diente (Abbildung 15). Alle verwendeten Konstrukte führten im Dunkeln nur zu sehr geringen GUS-Aktivitäten. Die Mutation in MRS2 bewirkte keine Reduktion sondern sogar eine Steigerung der gemessenen GUS-Aktivität im Licht. Die Blockmutation in MRS1 führte dagegen zu einer Verringerung

der Lichtaktivierbarkeit des Promotors von 75- auf 22fach. Dieses Ergebnis legt nahe, daß MRS1 ein für die Lichtaktivierbarkeit des *F3H*-Promotors notwendiges Element darstellt. Da die Mutation dieser Sequenz jedoch nicht zum völligen Verschwinden der Lichtresponsivität führte, sollte als nächstes die Frage geklärt werden, ob auch in diesem Promotor zusätzlich noch eine ACGT-enhaltende Sequenz benötigt wird.



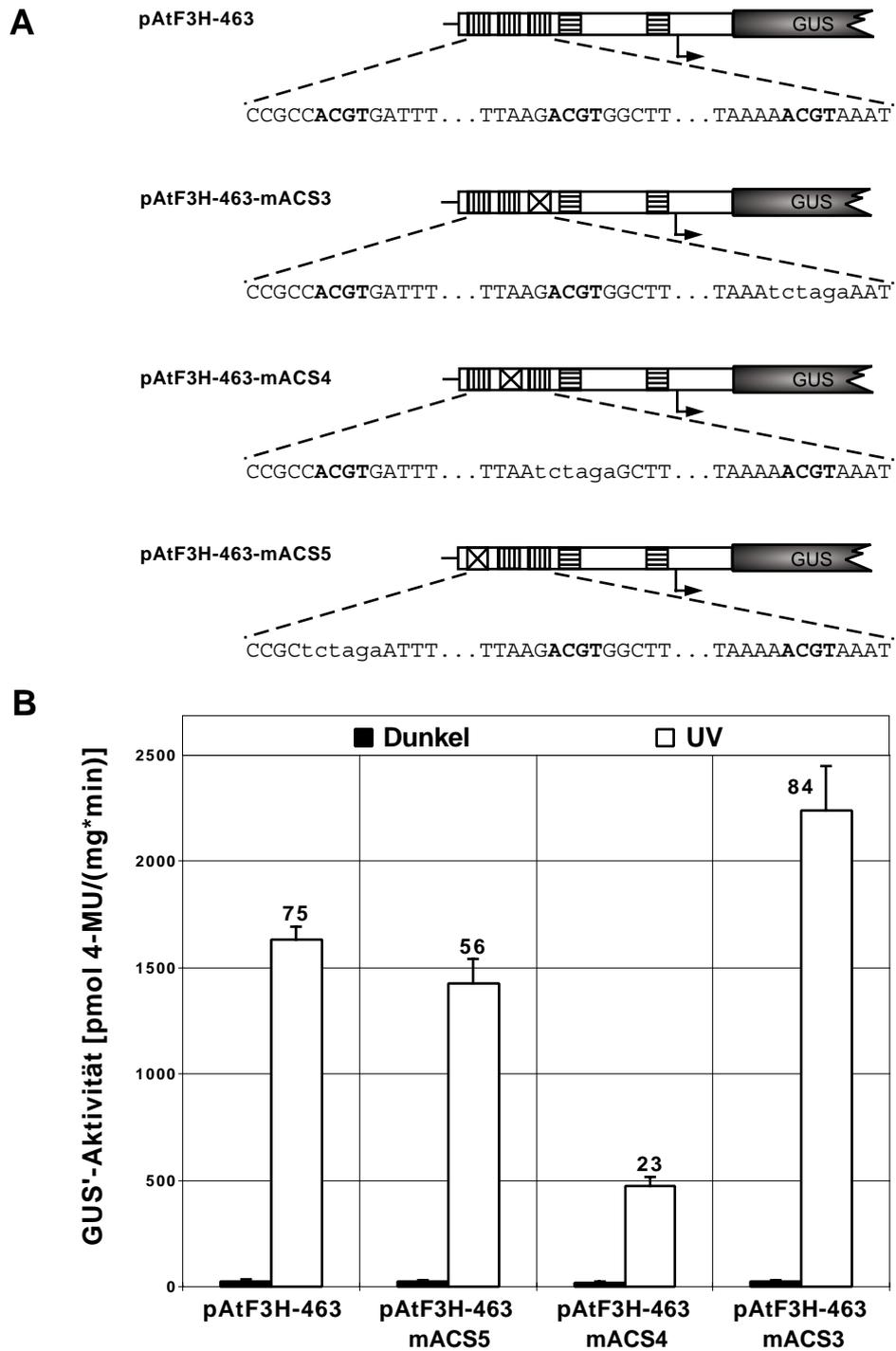
**Abbildung 15: Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten MRS<sup>AtF3H</sup>.**  
Legende siehe folgende Seite.

**Legende zu Abbildung 15 (siehe vorherige Seite):**

Die zur Transfektion verwendeten Konstrukte sind in **A** schematisch dargestellt. Mit horizontalen Streifen versehene Quadrate symbolisieren  $MRS^{AtF3H}$ , solche mit vertikalen Streifen  $ACS^{AtF3H}$ . Mutierte Versionen der *cis*-Elemente sind als Quadrate mit diagonalem Kreuz dargestellt. Unter den Konstrukten sind die jeweiligen Sequenzen angegeben. Dabei symbolisieren Großbuchstaben Wildtyp-Sequenzen, Kleinbuchstaben die der mutierten Elemente. Die Kernmotive sind durch Fettdruck hervorgehoben. **B** zeigt das Ergebnis von 6 unabhängigen Transfektionsexperimenten als Balkendiagramm, entsprechend Abbildung 14B.

**3.3.3.2 Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten  $ACS^{AtF3H}$** 

Die Verkürzung des *AtF3H*-Promotors von 463 bp auf 382 bp hatte zu einer deutlichen Reduktion der Lichtaktivierbarkeit von 75- auf 13fach geführt (Abbildung 14). Diese Beobachtung wäre durch den Verlust einer der darin enthaltenen ACSs (4 oder 5) zu erklären. Um zu überprüfen, ob und wenn ja welche von diesen Sequenzen tatsächlich für die Lichtantwort benötigt werden, wurden diese sowie zusätzlich ACS3 im Hintergrund des 463 bp-Promotors durch Einführen von Blockmutationen verändert und die resultierenden Konstrukte in Transfektionsexperimenten getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt. Alle verwendeten Konstrukte zeigten im Dunkeln nur sehr geringe GUS-Aktivität. Nach Lichtinkubation bewirkte der Minimalpromotor eine 75fach erhöhte GUS-Aktivität. Eine Mutation in ACS3 führte zu einer geringfügig höheren Lichtinduzierbarkeit des Promotors (84fach), während die Mutation von ACS5 diese leicht reduzierte (auf 56fach). Die Mutation von ACS4 dagegen verringerte die Lichtaktivierbarkeit des Promotors deutlich auf 23fach. Damit erschien es möglich, daß diese Sequenz notwendig ist, um gemeinsam mit MRS1 die Lichtinduzierbarkeit des *F3H*-Promotors zu vermitteln.

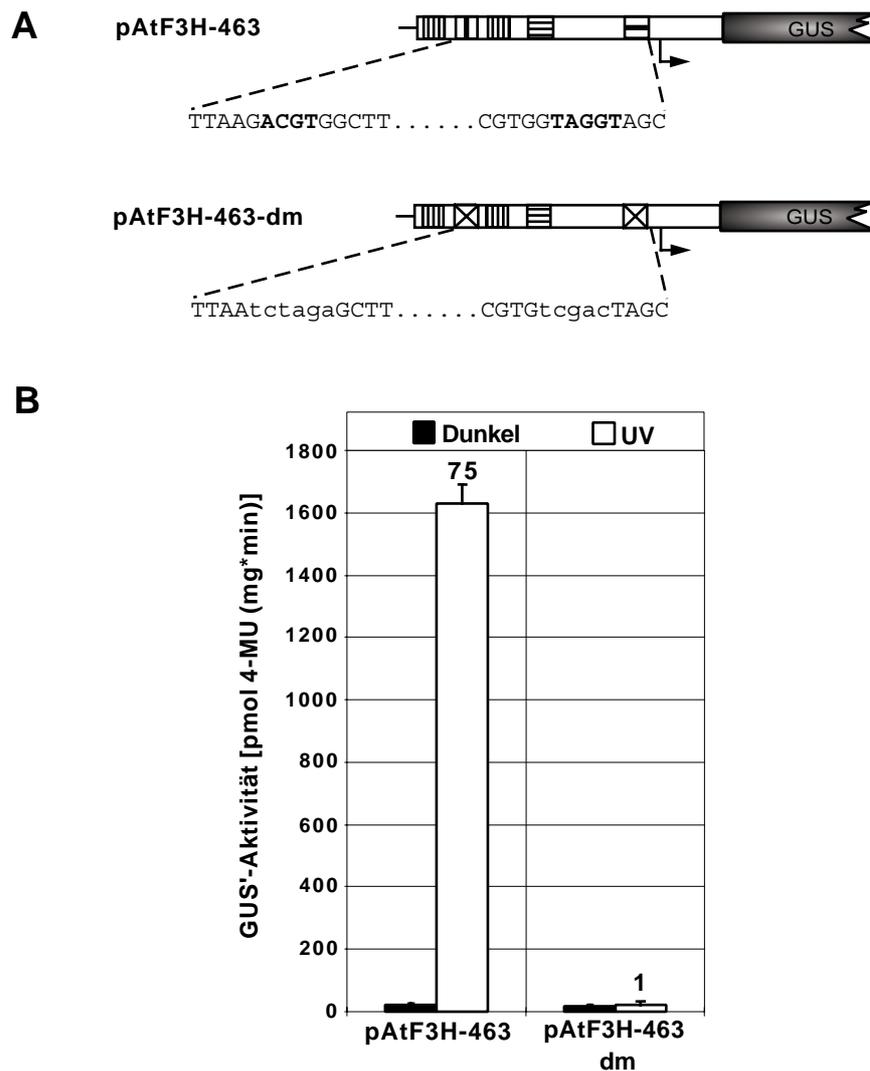


**Abbildung 16: Identifizierung einer an der Lichtinduktion beteiligten ACS<sup>AtF3H</sup>.**

Die zur Transfektion verwendeten Konstrukte sind in **A** schematisch dargestellt. Mit vertikalen Streifen versehene Quadrate symbolisieren ACS<sup>AtF3H</sup>, mit horizontalen Streifen MRS<sup>AtF3H</sup>. Mutierte Versionen der *cis*-Elemente sind als Quadrate mit diagonalem Kreuz dargestellt. Unter den jeweiligen Konstrukten sind die Wildtyp-Sequenzen und die der mutierten Elemente abgebildet. **B** zeigt das Ergebnis von 6 unabhängigen Transfektionsexperimenten als Balkendiagramm, entsprechend Abbildung 14B.

### 3.3.3.3 Identifizierung einer lichtregulatorischen Einheit im *AtF3H*-Promotor

Die Annahme, daß MRS1 und ACS4 gemeinsam für die Lichtinduzierbarkeit des *AtF3H*-Promotors notwendig sind, sollte überprüft werden, indem beide Sequenzen gleichzeitig im Hintergrund des Minimalpromotors mutiert wurden. Das resultierende Konstrukt wurde in *A. thaliana*-Protoplasten transfiziert und die Lichtaktivierbarkeit mit der des Minimalpromotors verglichen (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Die gleichzeitige Mutation von MRS1<sup>AtF3H</sup> und ACS4<sup>AtF3H</sup> führt zum völligen Verlust der Lichtinduzierbarkeit des *F3H*-Promotors.**

Die zur Transfektion verwendeten Konstrukte sind in **A** schematisch dargestellt. Das mit einem horizontalen Streifen versehene Quadrat symbolisiert MRS1<sup>AtF3H</sup>, das mit einem vertikalen Streifen ACS4<sup>AtF3H</sup>. Die sonstigen Symbole und Beschriftungen entsprechen Abbildung 15A. **B** zeigt das Ergebnis von 6 unabhängigen Transfektionsexperimenten als Balkendiagramm entsprechend Abbildung 14B.

Während beide Konstrukte im Dunkeln keine nennenswerte GUS-Aktivität bewirkten, war der Minimalpromotor wie erwartet deutlich lichtaktivierbar. Die gleichzeitige Mutation von MRS1 und ACS4 führte zu einem völligen Verschwinden dieser Lichtaktivierbarkeit. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, daß die Sequenzen MRS1 und ACS4 für die Lichtresponsivität des *AtF3H*-Promotors notwendig sind. Sie können daher in Analogie zu den bereits charakterisierten Promotoren von Genen der Flavonolbiosynthese als  $MRE^{AtF3H}$  und  $ACE^{AtF3H}$  bezeichnet werden. Die Induktion der *AtF3H*-Expression durch UV-haltiges Weißlicht wird damit durch die gleichen Promotorelemente vermittelt, die auch schon bei anderen Genen mit dem gleichen Expressionsmuster identifiziert worden waren.

### 3.4 Isolierung des *A. thaliana* *TTI*-Gens

Für die *A. thaliana* *tt*-Mutanten 1, 2, 9 und 10 sind bislang ausschließlich phänotypische Unterschiede zum Wildtyp beschrieben, welche die Samen der Pflanzen betreffen. Es wird vermutet, daß diese *tt*-Mutanten Defekte in Genen, deren Produkte an der Synthese kondensierter Tannine beteiligt sind, in differenziell exprimierten Strukturgenen oder in samenspezifischen Regulatoren der Flavonoidbiosynthese enthalten (Shirley *et al.*, 1995). Die Analyse solcher Gene und ihrer Expression könnte sowohl zum besseren Verständnis der Synthese kondensierter Tannine als auch von Mechanismen entwicklungs- und gewebe-spezifischer Genexpression beitragen. Bislang konnte noch für keine der oben genannten Mutanten das defekte Gen isoliert werden. Eine der *tt*-Linien, die in der *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population identifiziert wurden, repräsentierte jedoch ein neues Allel von *tt1*. Es sollte im Folgenden genutzt werden, um das *TTI*-Gen zu isolieren und so ein Mitglied der bislang wenig charakterisierten Gruppe von samenspezifischen *tt*-Mutanten näher zu untersuchen.

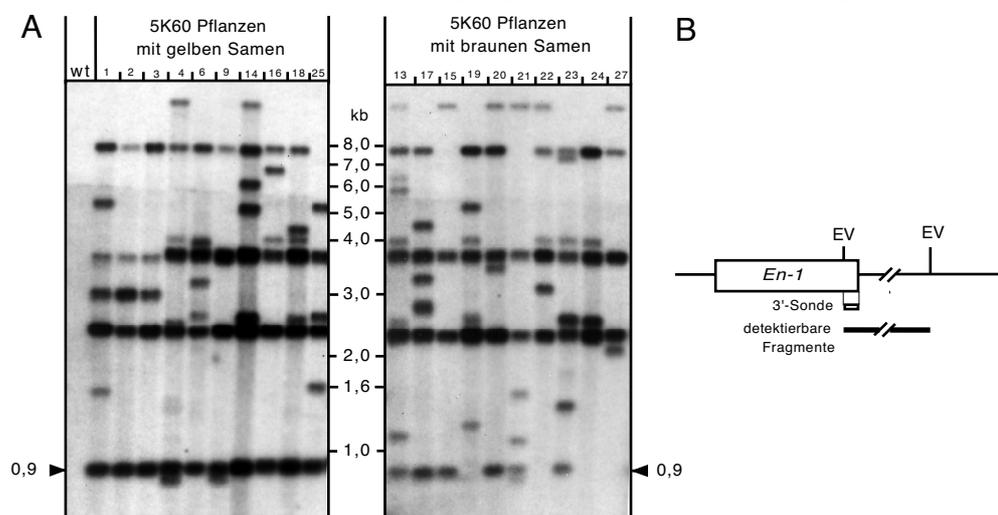
#### 3.4.1 Detektion einer *En1*-Insertion, die mit dem *tt*-Phänotyp kosegregiert, und Isolierung der flankierenden DNA

Die Nachkommen der Pflanze 5K60.3 konnten in einer Testkreuzung die *tt1*-Mutation nicht komplementieren (3.1.4). Das bedeutete, daß beide in der Kreuzung verwendeten Eltern ein defektes Allel des *TTI*-Gens trugen und vererbt hatten. Dieser Defekt konnte in der *En1*-Linie entweder die Anwesenheit des Transposons selbst oder ein bei seiner Exzision zurück gebliebener "footprint" sein. Durch Untersuchung einer Population von K60-Pflanzen, in der der *tt1*-Phänotyp aufspaltete, auf Kosegregation einer *En1*-Insertion mit dem Phänotyp sollte überprüft werden, ob sich das Transposon noch im *tt1*-Lokus befand. Als Mutterpflanze für den Aufbau einer solchen Population war die Pflanze 5K60 geeignet. Sie hatte ausschließlich braune Samen produziert, während ihre Tochter 5K60.3 und deren Nachkommenschaft nur gelbe Samen hervor brachten. Diese Beobachtung stimmte mit der Annahme überein, daß 5K60 heterozygot für eine Mutation im *tt1*-Lokus war. Aus Samen von 5K60 wurden daher Pflanzen herangezogen und deren Samenfarbe bestimmt. Wie erwartet, spaltete dieses Merkmal unter den Nachkommen der Pflanze 5K60 auf. 20 von 53 untersuchten Pflanzen produzierten

gelbe und 33 dunkelbraune Samen. Diese Pflanzen konnten nun durch DNA-Gel-Blot-Analysen darauf hin untersucht werden, ob eine Insertion des *En1*-Transposons mit dem *tt*-Phänotyp kosegregierte.

Dazu wurde aus den Pflanzen der segregierenden Population genomische DNA isoliert, endonukleolytisch gespalten, in Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen übertragen. Die Membranen wurden mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert, die für das *En1*-Transposon spezifisch ist. Wie Abbildung 18 zeigt, war mit dieser Sonde in einer Spur, die Wildtyp-DNA enthielt, kein Signal nachweisbar. Dagegen konnten in jeder der untersuchten K60-Pflanzen zwischen fünf und zehn hybridisierende Fragmente detektiert werden.

**Abbildung 18: Eine *En1*-Insertionsbande kosegregiert mit dem *tt*-Phänotyp.**



In **A** sind Ausschnitte von DNA-Gel-Blot-Analysen einer Population von 53 Nachkommen der Pflanze 5K60 dargestellt. 20 der Pflanzen produzierten gelbe und 33 dunkelbraune Samen. Genomische DNA dieser Pflanzen wurde mit *EcoRV* gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit einer transposonspezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (*EcoRI*-Fragment aus SA53). Zwischen den Autoradiogrammen sind die Fragmentgrößen der mit aufgetrennten Referenz-DNA markiert. Eine Bande von 0,9 kb fand sich in allen Pflanzen, die gelbe Samen hervorbrachten. **B** zeigt schematisch die Lage der verwendeten DNA-Sonde und der damit detektierbaren Fragmente.

Ein Fragment von 0,9 kb fand sich in allen Pflanzen, die gelbe Samen hervorbrachten, sowie in 16 der braunsamigen. Es fehlte dagegen in den 17 übrigen braunsamigen Pflanzen. Dieses Ergebnis konnte dadurch erklärt werden, daß alle Pflanzen, die gelbe Samen produzierten, homozygot für die durch dieses Fragment repräsentierte Insertion des *En1*-Transposons waren. Braunsamige Pflanzen waren dementsprechend entweder heterozygot für diese Insertion

oder homozygot Wildtyp. Auf Grund der strikten Kosegregation der Insertion mit dem *tt*-Phänotyp konnte davon ausgegangen werden, daß sich in den gelbsamigen Pflanzen das *En1*-Transposon tatsächlich im *TT1*-Gen befand.

Für die Gewinnung von DNA-Abschnitten, die die vermutete *En1*-Insertion im *TT1*-Gen flankierten, wurde aus der Nachkommenschaft von 5K60 die Pflanze Nummer 3 ausgewählt. Zur Unterscheidung von der direkt aus der *En1*-Population isolierten Pflanze 5K60.3 wird sie nachfolgend als 5K60.3A bezeichnet. 5K60.3A produzierte gelbe Samen und war daher wahrscheinlich homozygot für die gesuchte Insertion. Über die mit dem *tt*-Phänotyp kosegregierende Bande hinaus enthielt sie nur vier weitere *En1*-spezifische Signale (vgl. Abbildung 18). DNA-Fragmente, die diese Transposon-Insertionen flankierten, wurden mit der RAGE-Methode ("rapid amplification of genomic ends"; 2.3.7) gewonnen. Dazu wurde genomische DNA der Pflanze 5K60.3A mit dem Restriktionsenzym *HinfI* gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden polyadenyliert und als Matrize für eine erste PCR-Amplifikation mit einem oligo-dT-Primer sowie transposonspezifischen Oligonukleotiden verwendet. Bei dieser Reaktion entstanden keine nach Färbung mit Ethidiumbromid im Agarosegel sichtbaren Produkte. Aliquots der gereinigten Reaktionsansätze wurden als Matrize in einer zweiten PCR eingesetzt, die mit weiter zu den Enden des Transposons hin gelegenen Primern sowie einem zu dem oligo-dT kompatiblen Primer durchgeführt wurde. Diese Reaktionen führten zu verschiedenen im Gel sichtbaren Produkten von weniger als 500 bp Größe. Die Fragmente wurden in den pCR-TOPO-Vektor ligiert und sequenziert. Alle 14 untersuchten Sequenzen begannen mit Abschnitten, die dem 5'- oder 3'-Ende des *En1*-Transposons entsprachen. Das zeigte, daß es sich bei den isolierten DNA-Fragmenten tatsächlich um flankierende Bereiche von Transposon-Insertionen handelte. Ein Vergleich der Sequenzen untereinander ergab, daß sie vier Klassen jeweils bis auf die Länge der Polyadenylierung identischer Plasmide repräsentierten (Tabelle 4). Das bedeutete, daß flankierende DNAs von vier der vermuteten fünf Insertionen der Linie 5K60.3A isoliert werden konnten. Ein Vertreter jeder Klasse wurde in die Klonsammlung aufgenommen und für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Unter Verwendung der Algorithmen BlastN und BlastX wurden die Sequenzen der isolierten flankierenden DNAs mit der Gendatenbank des NCBI verglichen. Dieser Vergleich ergab, daß Klon SA65 eine *En1*-Insertion in einem Gen repräsentierte, das vermutlich für eine Kinase kodiert. Dieses Gen war im Genom von *A. thaliana* auf Chromosom II bei etwa 49 cM lokalisiert worden ([www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi\\_mp\\_map/access.html](http://www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi_mp_map/access.html)). Da für den *ttl*-Lokus eine Position auf Chromosom I ermittelt worden war (Koornneef, 1990), erschien es unwahrscheinlich, daß es sich bei dem in pSA65 integrierten Fragment um ein Teil des *TTI*-Gens handelte. Daher wurde mit diesem Fragment nicht weitergearbeitet. Klon SA63 repräsentierte eine Insertion in einem Gen, das für ein DNA-bindendes Protein kodiert, dessen Kartenposition jedoch unbekannt war. Klon SA64 zeigte Ähnlichkeit mit einer sauren Phosphatase, während für Klon SA62 keine signifikante Ähnlichkeit zu einer bereits bekannten Sequenz festgestellt werden konnte.

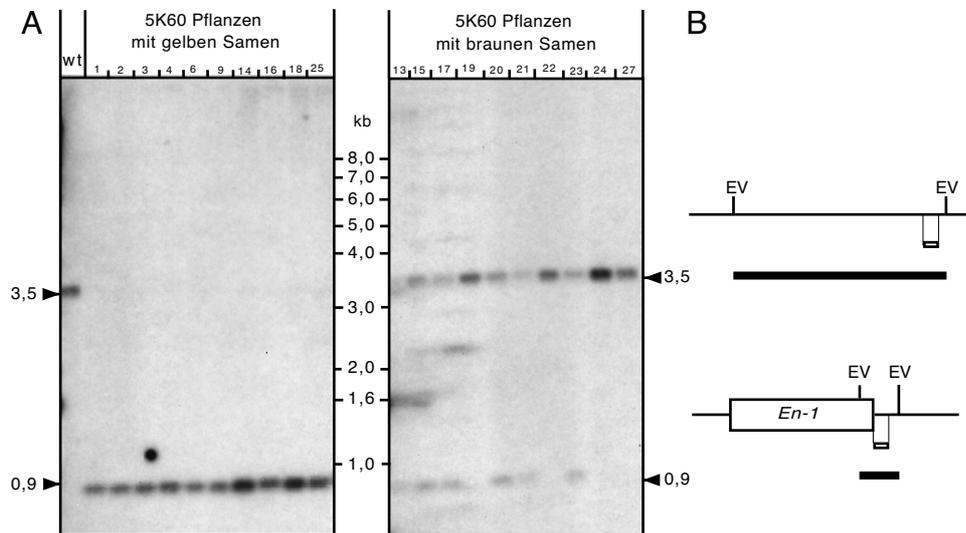
RAGE-Klon	<i>En1</i> -Seite	BlastN (% Ident.)	BlastX (% Ident.)	SA Nr.
10, 21, 8	3'	BAC F18A8 (100)	putative Kinase (100)	65
29, 32, 43, 44, 45	5'	EST Z25723 (Exonsequenz: 100)	DNA bindendes Protein (100)	63
37	5'	-	saure Phosphatase (35)	64
1, 6, 12, 20, 22	3'	-	-	62

**Tabelle 4: *En1*-Insertionen flankierende DNA-Fragmente aus der Pflanze 5K60.3A.**

Tabellarische Übersicht der mittels RAGE gewonnenen DNA-Fragmente, die *En1*-Insertionen in der Pflanze 5K60.3A flankieren. Angegeben ist die Nummer der jeweiligen RAGE-Klone, welche Seite des Transposons sie repräsentieren, die Ergebnisse des Vergleichs mit der Gendatenbank des NCBI sowie die Nummer des repräsentativen Klons in der SA-Klonsammlung.

Die in pSA62, 63 und 64 integrierten Fragmente wurden als Sonden benutzt um festzustellen, ob eines davon die mit dem *ttl*-Phänotyp kosegregierende *En1*-Insertionsbande detektierte. Dazu wurden die Fragmente durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* aus den Plasmiden gewonnen, radioaktiv markiert und zur Hybridisierung der Membranen mit den DNAs der segregierenden Population verwendet. Die Fragmente aus pSA63 und pSA64 detektierten *En1*-Insertionen, die nicht mit dem Phänotyp kosegregierten.

Wie Abbildung 19 zeigt, hybridisierte das Fragment aus pSA62 dagegen mit einer Bande, welche die gleiche Größe und das gleiche Segregationsverhalten zeigte wie die in 3.4.1 identifizierte Bande. Das *EcoRI*-Fragment dieses Klons konnte daher den Ausgangspunkt weiterer Experimente bilden.



**Abbildung 19: Eines der flankierenden DNA-Fragmente hybridisiert mit der kosegregierenden Bande.**

In **A** sind die nach Entfernen der *En1*-spezifischen Sonde mit dem *EcoRI*-Fragment aus pSA62 hybridisierten Membranen aus Abbildung 18 dargestellt. **B** zeigt schematisch die Herkunft der verwendeten DNA-Sonde und der damit detektierbaren Fragmente.

### 3.4.2 Lokalisierung der flankierenden DNA im Genom

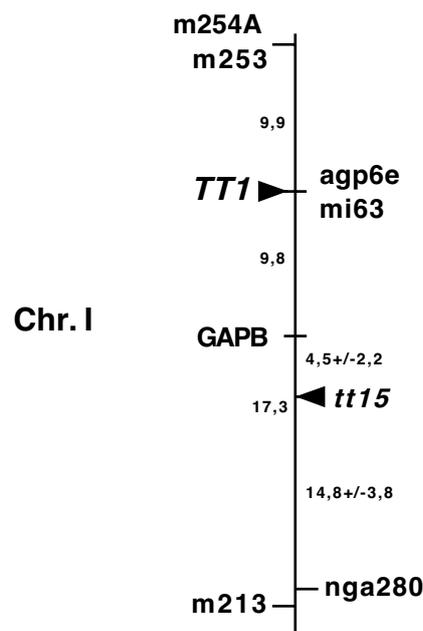
Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob es sich bei der gewonnenen flankierenden DNA tatsächlich um ein Stück des *TTI*-Gens handelte, sollte deren Lokalisation im Genom von *A. thaliana* ermittelt und mit der des *ttl*-Lokus verglichen werden. Die Bestimmung der Kartenposition der flankierenden DNA konnte sowohl durch Analyse der Segregation eines entsprechenden Markers in einer Kartierungspopulation als auch durch Hybridisierung von BAC-Bibliotheken erfolgen.

### 3.4.2.1 Kartierung mittels RI-Linien

Um die Lokalisation des flankierenden Fragmentes im Genom mit Hilfe der RI-Linien zu bestimmen, konnte wie schon für *F3H* die Segregation eines spezifischen CAPS-Markers in den RI-Linien untersucht werden (2.3.4 und 3.2.1). Dazu mußte ein geeigneter Polymorphismus in der Sequenz zwischen den Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta* gefunden werden. Da das Fragment nur 100 bp umfaßte, wurde zunächst die Länge der zur Verfügung stehenden Sequenzinformation vergrößert, um mit höherer Wahrscheinlichkeit einen Polymorphismus finden zu können. Hierzu wurde wiederum die RAGE-Methode angewandt (2.3.7 und 3.4.1) und genomische Columbia Wildtyp-DNA als Matrize für PCR eingesetzt. Die DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HinfI* oder *Sau96I* gespalten und polyadenyliert. Zusammen mit dem oligo-dT-Primer wurden in diesem Fall spezifische Primer für die PCR verwendet, deren Sequenzen aus der des flankierenden DNA-Fragmentes abgeleitet wurden. Die Produkte der ersten dienten als Matrize einer zweiten PCR mit einem zum oligo-dT-Primer kompatiblen sowie verschachtelt weiter zu den Enden des Fragments hin liegenden spezifischen Primern. Die Produkte dieser Reaktion wurden in den pCR-TOPO-Vektor ligiert und sequenziert. Mit dieser Methode konnten stromaufwärts 520 bp und stromabwärts 370 bp neuer Sequenzinformation gewonnen werden. Auf der Basis dieser Sequenzen konnten Oligonukleotide angefertigt werden, die es erlaubten, den entsprechenden DNA-Abschnitt aus Landsberg *erecta* zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die Sequenzen aus den beiden Ökotypen wurden miteinander verglichen und auf einen für die Kartierung geeigneten Polymorphismus hin untersucht. Der Sequenzvergleich ergab, daß ein Austausch von T nach C (an Position -52) in *Ler* zu einer Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *MaeIII* führte, die in Columbia fehlte.

Für die Kartierung wurden Oligonukleotide so gewählt, daß die damit amplifizierten PCR-Produkte aus beiden Ökotypen etwa 100 bp stromabwärts der polymorphen *MaeIII*-Schnittstelle jeweils eine weitere von diesem Enzym erkannte Sequenz enthielten. Nach Restriktionspaltung der PCR-Produkte konnten die aus dieser Schnittstelle resultierenden Fragmente als interne Kontrolle für die Funktionalität des Enzyms dienen (siehe Abbildung 22C). Mit den beschriebenen Oligonukleotiden wurden ausgehend von genomischer DNA der 100 RI-Linien die entsprechenden Fragmente mittels PCR amplifiziert, mit *MaeIII* gespalten und im Agaro-

segel aufgetrennt. Für jede Linie wurde die Identität des Markers (Landsberg oder Columbia, vgl. Anhang 3) bestimmt. Durch Auswertung der Segregationsdaten konnte der untersuchte Marker auf Chromosom I bei etwa 55 cM lokalisiert werden (in Abbildung. 20 bereits als *TT1* gekennzeichnet; [nasc.nott.ac.uk/new\\_ri\\_map.html](http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html)). Das stimmte sehr gut mit der für den *tt1*-Lokus ermittelten Position überein (Koornneef, 1990). Dieses Ergebnis war ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei dem isolierten Fragment tatsächlich um einen Teil des *TT1*-Gens handeln konnte.



**Abbildung 20: Genomische Lokalisation der flankierenden DNA.**

Dargestellt ist ein Ausschnitt der zentralen Region von Chromosom I. Links ist die Position des Markers „*TT1*“ und einiger benachbarten Marker angegeben. Sie wurde aus der Segregation eines mit dem flankierenden DNA-Fragment verbundenen *MaeIII*-CAPS-Polymorphismus in den RI-Linien ermittelt und stimmt mit der Position des *tt1*-Lokus überein. Auf der rechten Seite sind der *tt15*-Lokus sowie der SSLP-Marker *nga280* (siehe 3.4.2.2) mit den entsprechenden Abständen (N. Focks und C. Benning, persönliche Mitteilung) verzeichnet.

### 3.4.2.2 Kosegregation eines *Ler*-CAPS-Markers mit dem *tt1*-Phänotyp

Wie schon für *tt6* und das *F3H*-Gen wurde auch für *tt1* und das flankierende DNA-Fragment der gefundene Polymorphismus für die Auswertung einer Testkreuzung eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen Phänotyp und molekularem Marker zu überprüfen (vgl. 3.2.1). Dazu wurde die in Landsberg *erecta* Hintergrund befindliche *tt1*-Mutante mit Columbia Wildtyp gekreuzt. Alle direkten Nachkommen dieser Kreuzung produzierten Samen mit der braunen Farbe des Wildtyps. In der zweiten Filialgeneration traten wie erwartet etwa 25%

Pflanzen auf, die gelbe Samen hervorbrachten. Die Analyse der F2-Pflanzen mit Hilfe des *MaeIII*-Polymorphismus ergab, daß alle gelbsamigen Pflanzen homozygot für das Landsberg-Allel waren, während alle Pflanzen, die dunkelbraune Samen produzierten, zumindest ein Columbia-Allel trugen (Tabelle 5).

Genotyp ( <i>MaeIII</i> CAPS)	Phänotyp		Anzahl Pflanzen (rel. Anteil)
	Wildtyp	<i>tt</i>	
Col / Col	28	-	28 (1)
Col / <i>Ler</i>	67	-	67 (2)
<i>Ler</i> / <i>Ler</i>	-	32	32 (1)
Anzahl Pflanzen (rel. Anteil)	95 (3)	32 (1)	$\Sigma = 127$

**Tabelle 5: Das *Ler*-Allel der flankierenden DNA kosegregiert mit dem *tt1*-Phänotyp.**

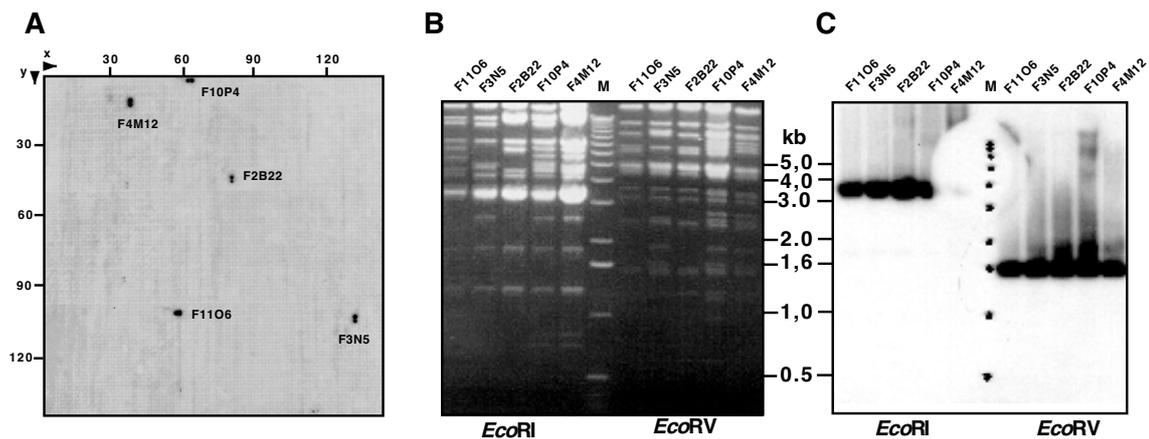
Tabellarisch dargestellt ist die Auswertung der Untersuchung von 127 Pflanzen der zweiten Filialgeneration einer Kreuzung der *tt1*-Mutante (*Ler* Hintergrund) mit Columbia Wildtyp. An Hand des *MaeIII*-Polymorphismus (vgl. 3.4.2) wurde für jede Pflanze die Herkunft der Allele der flankierenden DNA getestet (homozygot Col oder *Ler* oder heterozygot Col / *Ler*). Die Farben der reifen Samen wurden mit denen der Parentallinien verglichen und entsprechend zugeordnet (Wildtyp, dunkelbraun; *tt*, gelb). Nur Pflanzen, die homozygot für das *Ler*-Allel waren, brachten gelbe Samen hervor.

Für einige Pflanzen der gleichen F2-Population wurde auch das Verhalten eines zweiten, unabhängigen Markers analysiert, um auszuschließen, daß das für den *MaeIII*-Polymorphismus erzielte Ergebnis zufällig war. Es wurde der SSLP-Marker („simple sequence length polymorphism“) *nga280* ausgewählt, der bei 81 cM ebenfalls auf Chromosom I kartiert wurde (Bell und Ecker, 1994). Die genomischen DNAs von 80 Pflanzen wurden in PCRs mit spezifischen Primern für diesen Marker als Matrizen eingesetzt und die Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Columbia-Allele des Markers führten zu einem PCR-Produkt von 105 bp, während Landsberg-Allele ein 85 bp Produkt ergaben. Von den getesteten Pflanzen verhielten sich 21 für diesen Marker anders als für den *MaeIII*-CAPS-Polymorphismus (*Ler* für den CAPS-Marker, Col für *nga280* oder umgekehrt). Dieses Ergebnis zeigte, daß es in der benutzten F2-Population möglich war, Rekombinanten zwischen Markern zu identifizieren. Die Tatsache, daß keine Rekombinanten zwischen dem *Ler-MaeIII*-CAPS-Marker und dem *tt1*-Phänotyp nachgewiesen werden konnten, bestätigte damit, daß es einen physischen Zusammenhang zwischen dem den Polymorphismus enthaltenden Fragment und dem *tt1*-Lokus geben mußte.

### 3.4.2.3 Isolierung von BAC-Klonen, die mit der flankierenden DNA hybridisieren

Künstliche Bakterienchromosomen (“bacterial artificial chromosomes”, BACs) sind Vektoren, die große Abschnitte fremder DNA enthalten können. Sie können direkt sequenziert werden und eignen sich zum Beispiel als DNA-Quellen für Subklonierungen. Es erschien daher wünschenswert, genomische *A. thaliana*-BAC-Klone zu isolieren, die mit der flankierenden DNA hybridisierten. Dazu konnte die BAC-Bibliothek des Instituts für Genbiologische Forschung (IGF) verwendet werden. Sie besteht aus 10752 rekombinanten Klonen, die jeweils ein zusätzliches künstliches Bakterienchromosom tragen, das durchschnittlich 100 kb genomischer *A. thaliana*-DNA des Ökotyps Columbia enthält. Damit entspricht diese Bibliothek 7,5 Äquivalenten des haploiden *A. thaliana*-Genoms (Mozo *et al.*, 1998). Die Lokalisation vieler der BAC-Klone im Genom ist bekannt. Die vollständige Bibliothek ist auf einer Membran angeordnet erhältlich und kann so mittels Koloniehybridisierung durchsucht werden.

Als Sonde zum Durchsuchen der IGF-BAC-Bibliothek wurde das *EcoRI*-Fragment aus pSA62 (3.4.1) radioaktiv markiert. Es hybridisierte besonders stark mit den Klonen F1106, F3N5, F2B22, F10P4 und F4M12 (Abbildung 21A). Die zugehörigen Bakterienkolonien wurden über das Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes bezogen. Aus den Bakterien wurde unter Verwendung eines MIDI-Protokolls (2.3.5) BAC-DNA isoliert. Um die Qualität dieser DNA zu überprüfen, wurde sie mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA war hoch konzentriert und sehr gut schneidbar. Das Bandenmuster im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel deutete darauf hin, daß es sich jeweils um unterschiedliche Klone handelte (Abbildung 21B). Um das Ergebnis der Hybridisierung der BAC-Bibliothek zu verifizieren und die erhaltenen Klone auf ihre Integrität zu überprüfen, wurde die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert und diese erneut mit der flankierenden DNA-Sonde hybridisiert (s.o.). Alle Klone hybridisierten stark mit der Sonde und konnten somit als echt positiv angesehen werden. Darüber hinaus hatten die detektierten Fragmente in allen Klonen identische Größen (1,6 kb im *EcoRI*-Verdau und 3,5 kb im *EcoRV*-Verdau). Das sprach dafür, daß keiner der Klone in dem von der Sonde detektierten Bereich rearrangiert oder chimär war (Abbildung 21C).



**Abbildung 21: Isolierung von BAC-Klonen, die mit der flankierenden DNA hybridisieren.**

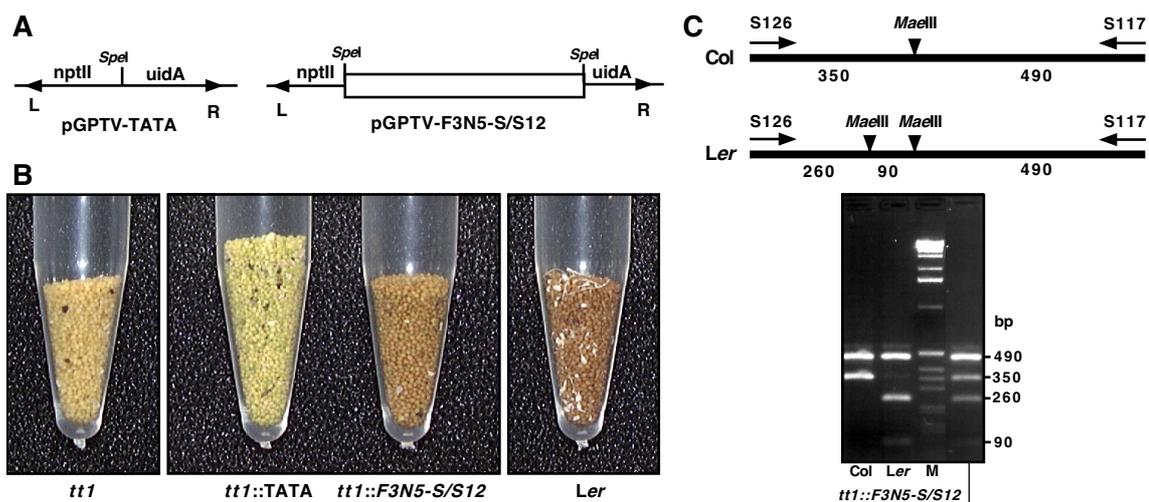
In **A** ist das Autoradiogramm des IGF-BAC-Filters Nr. 79.1.151 wiedergegeben, der mit dem radioaktiv markierten *EcoRI*-Fragment aus pSA62 hybridisiert wurde. Mit Hilfe des am Rand angegebenen Koordinatensystems konnten die Namen der bezeichneten positiven Kolonien ermittelt werden. **B** zeigt die aus den positiven Kolonien isolierte BAC-DNA nach Restriktionsspaltung mit den angegebenen Enzymen. 1,5 µg DNA wurden verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Diese BAC-DNA wurde auf eine Membran transferiert und erneut mit dem *EcoRI*-Fragment aus pSA62 hybridisiert. **C** zeigt das Autoradiogramm dieser Hybridisierung (DNA-Größenstandard, M).

Zum damaligen Zeitpunkt der Arbeiten war die Sequenz keines der identifizierten BAC-Klone in der Gendatenbank des NCBI verfügbar. Eine Überprüfung der Lokalisation der Klone im Genom von *A. thaliana* ergab, daß sie auf Chromosom I zwischen den Markern mi63 und agp6e verankert worden waren ([www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi\\_mp\\_map/access.html](http://www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi_mp_map/access.html)). Das stimmte völlig mit der mit Hilfe der RI-Linien für die flankierende DNA ermittelten Position überein (vgl. Abbildung 20). Alle isolierten BAC-Klone waren somit für weitere Analysen geeignet, es wurde aber im wesentlichen der Klon F3N5 verwendet.

### 3.4.3 Komplementation der *tt1*-Mutation

Wenn die isolierten BAC-Klone tatsächlich das *TT1*-Gen enthielten, sollte es möglich sein, damit die *tt1*-Mutation zu komplementieren. Um das zu überprüfen, wurde ein 12 kb großes *SpeI*-Fragment des BACs F3N5, das mit dem *EcoRI*-Fragment aus pSA62 hybridisierte, in die *SpeI*-Schnittstelle des binären Vektors pGPTV-TATA eingefügt. Das resultierende Plasmid pGPTV-F3N5-S/S12 und der als Kontrolle vorgesehene Ausgangsvektor pGPTV-TATA (Abbildung 22A) wurden in *Agrobacterium* transformiert. Die Transformation von *tt1*-Pflanzen erfolgte mittels Vakuuminfiltration (2.3.10). Transformanten wurden auf kanamycin-haltigem Medium selektiert und auf ihre Samenfarbe hin analysiert.

Zwei unabhängige *tt1*-Pflanzen, die mit pGPTV-F3N5-S/S12 transformiert worden waren, brachten braune Samen hervor, während mit dem leeren Vektor pGPTV-TATA transformierte *tt1*-Pflanzen gelbe Samen produzierten (Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Komplementation der *tt1*-Mutation.**

In **A** sind die zur Transformation von *tt1*-Pflanzen verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. **B** zeigt die erfolgreiche funktionelle Komplementation der *tt1*-Mutation durch Transformation mit pGPTV-F3N5-S/S12. Zum Vergleich sind *Ler*-Wildtyp-Samen, *tt1*-Samen und Samen mit der Vektorkontrolle pGPTV-TATA transformierter *tt1*-Pflanzen abgebildet. **C** zeigt, daß eine Transformante hemizygot für den mit dem *tt1*-Phänotyp kosegregierenden *MaeIII*-Marker ist. Genomische DNA aus einer dieser Pflanzen sowie Col- und *Ler*-Wildtyp wurde als Matrize in PCR mit den Primern S117 und S126 eingesetzt. Die resultierenden Produkte wurden mit *MaeIII* gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (DNA-Größenstandard, M).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den braunsamigen Pflanzen tatsächlich um pGPTV-F3N5-S/S12 transformierte *tt1*-Pflanzen handelte, wurden sie mit Hilfe des mit dem *tt1*-Lokus gekoppelten *MaeIII*-Polymorphismus untersucht. Unter Verwendung von genomischer DNA der Wildtypen bzw. Transformanten als Matrize wurde PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt (2.3.4 und 3.4.2). Die Produkte wurden mit *MaeIII* gespalten und im Agarosegel analysiert. Alle Transformanten waren hemizygot für die *MaeIII*-Schnittstelle (Abbildung 22C). Das war in Übereinstimmung mit der Annahme, daß es sich tatsächlich um *tt1*-Pflanzen (Ökotyp Landsberg *erecta*) handelte, die das *SpeI*-Fragment aus dem BAC-Klon F3N5 (Ökotyp Columbia) enthielten. Da somit das zur Transformation verwendete 12 kb große *SpeI*-Fragment hinreichend war, um die *tt1*-Mutation zu komplementieren, konnte gefolgert werden, daß es das *TT1*-Gen enthielt.

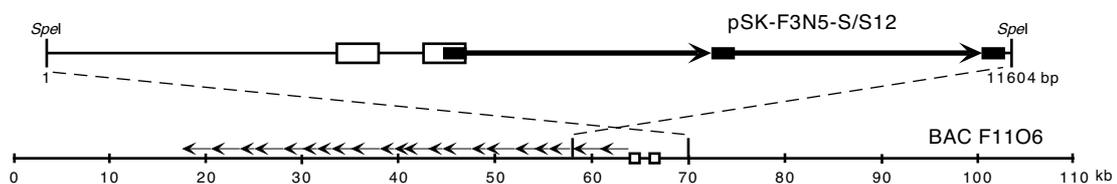
### 3.4.4 Bestimmung verschiedener Sequenzen

Im Folgenden wurden die vollständige genomische und die cDNA-Sequenz des *TT1*-Gens bestimmt, um Aufschluß über die Natur dieses Gens zu erhalten. Seine Sequenz wurde mit denen anderer bekannter Gene verglichen und auf konservierte Sequenzmotive hin untersucht, um so Anhaltspunkte für die Art des resultierenden Proteins und seine mögliche Funktion zu gewinnen. Darüber hinaus wurden die Sequenzen der *tt1*-Gene aus den Mutanten *tt1* und 5K60.3A ermittelt, um die molekularen Ursachen der Defekte in diesen Linien festzustellen.

#### 3.4.4.1 Bestimmung der genomischen Wildtyp-Sequenz

Um die für das *TT1*-Gen verfügbare Sequenzinformation zu erweitern, wurden die in 2.3.8 beschriebenen Methoden benutzt. Weder mittels "primer walking" noch mit Hilfe von *EcoRI*- und *HindIII*-Subklon-Bibliotheken konnte jedoch die vollständige Sequenz des 12 kb *SpeI*-Fragmentes des BACs F3N5 bestimmt werden. Das "primer walking" mußte abgebrochen werden, als es nicht mehr gelang, geeignete Sequenzierprimer zu entwerfen. Die resultierenden Sequenzen enthielten jeweils überlagernde Signale und waren daher nicht auswertbar. Die Identifikation weiterer überlappender Subklone wurde unmöglich, als zwei unabhängige Sonden mit den gleichen Klonen hybridisierten. Beide Phänomene konnte darauf zurückzuführen sein, daß die benutzten Plasmide repetitive Elemente oder Duplikationen enthielten.

Die vollständige genomische Sequenz der *TTI*-Region konnte schließlich mit Hilfe des "Genome Priming System" (GPS) der Firma NEB bestimmt werden (2.3.8). Dazu wurde das Plasmid pSK-F3N5-S/S12 (Amp<sup>r</sup>) mit dem 12 kb großen *SpeI*-Fragment aus BAC F3N5 gemäß der Vorschrift des Herstellers mit dem Transprimer 1 (pGPS-Kan<sup>r</sup>) versehen. Von sowohl ampicillin- als auch kanamycin-resistenten Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und mit Oligonukleotiden spezifisch für die Enden des Transprimers sequenziert. Das Sequenzierschema ist in Anhang 8 dargestellt. Die vollständige Sequenz wurde unter der Zugangsnummer AF190297 in der Gendatenbank des NCBI abgelegt und ist in Anhang 9 wiedergegeben. Die gewonnene Sequenzinformation wurde mit verschiedenen Computerprogrammen auf potentiell kodierende Bereiche und das Vorhandensein von Exon-Intron Übergängen hin untersucht (2.3.8). Diese Computeranalysen führten zu dem in Abbildung 23 schematisch dargestellten Modell eines Gens aus mindestens zwei Exons mit einer ausgedehnten Duplikation im 3'-Bereich des Gens. Die Duplikation besteht aus einer Wiederholung der Nukleotide 4690-8030 von Position 8030-11370 mit 96 % Identität. Die Nukleotide 4690-4870 finden sich im Anschluß daran noch in einer dritten Kopie.



### Abbildung 23: Bestimmung der Sequenz von pSK-F3N5-S/S12.

Im oberen Teil ist schematisch die mit Hilfe verschiedener Computerprogramme vorhergesagte genomische Struktur des *TTI*-Gens dargestellt. Nicht ausgefüllte hohe Rechtecke bezeichnen Exons. Die stromabwärts des *TTI*-Gens gelegene Duplikation wird durch Pfeile angegeben. Niedrige schwarze Rechtecke symbolisieren den innerhalb des *SpeI*-Fragmentes in drei Kopien hoher Ähnlichkeit vorhandenen 3'-Bereich von Exon 2. Der untere Teil der Abbildung gibt einen Überblick über die Lage des sequenzierten Bereiches auf dem BAC-Klon F1106 (AC018460). Wiederum symbolisieren weiße Rechtecke die putativen Exons und Pfeile weitere Kopien des in F3N5-S/S12 duplizierten Bereiches.

Erst im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde unter der Zugangsnummer AC018460 in der Gendatenbank des NCBI die Sequenz des BAC-Klons F1106 veröffentlicht. Dieser Klon hybridisierte sowohl mit dem flankierenden DNA-Fragment (3.4.2.3), als auch mit dem Ende des Klons F3N5 ([www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi\\_mp\\_map/access.html](http://www.mpimp-golm.mpg.de/101/mpi_mp_map/access.html)).

Die Sequenz von F11O6 stimmte von 69769 bis 58170 sehr gut mit der des Eintrages AF190297 überein und bestätigte damit die genomische Sequenz von *Tt1*. Eine genauere Untersuchung der Sequenz von F11O6 ergab, daß dieser BAC-Klon noch mindestens 22 mehr oder weniger vollständige direkte Wiederholungen des Elementes enthält, das innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten 12 kb dupliziert ist (Abbildung 23).

#### 3.4.4.2 Bestimmung der cDNA-Sequenz

Für *Tt1* konnte in keiner der darauf hin untersuchten Datenbanken eine EST-Sequenz identifiziert werden. Daher mußte die auf Grund der Computeranalysen vorhergesagte Exon-Intron-Struktur experimentell überprüft werden. Dazu wurde mittels RT-PCR mit genspezifischen Primern die *Tt1*-cDNA direkt amplifiziert und dann sequenziert. Wegen des vermutlich samenspezifischen Phänotyps der *tt1*-Mutante konnte davon ausgegangen werden, daß das *Tt1*-Gen im Verlauf der Samenentwicklung exprimiert wird. Daher wurde in der RT-PCR Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt, die aus Schoten von *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia isoliert worden war, die unreife Samen enthielten. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide wurden aus den von den Computerprogrammen vorhergesagten putativen Exon-Bereichen abgeleitet. Die mRNA wurde im gleichen Reaktionsansatz zunächst in die komplementäre DNA umgeschrieben und die cDNA mittels PCR vervielfältigt (2.3.9). Das resultierende Produkt wurde direkt sequenziert. Auf diese Weise konnte der vorhergesagte Exon-Intron-Übergang bestätigt werden. Wie in Abbildung 24 dargestellt, endet Exon 1 an 3' auf CAG, Exon 2 beginnt mit ATG. Das Intron beginnt am 5'-Ende mit den Nukleotiden GT und endet mit AG an 3'. Es gehört damit zu den kanonischen GT-AG-U2 abhängigen Introns (Brown *et al.*, 1996).

#### Legende zu Abbildung 24 (siehe folgende Seite):

Es ist die genomische Sequenz von *AtTt1* dargestellt. Nicht kodierende Bereiche sind in Klein- und kodierende in Großbuchstaben mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz darüber angegeben. Das TATA-Box-Motiv sowie das Start-ATG sind unterstrichen. Mit +1 ist das Ende der längsten 5'-RACE-cDNA gekennzeichnet. Repetitive Elemente sind mit unterbrochenen Linien unterstrichen, die konservierten Positionen der Zinkfinger-Motive fett gesetzt. Der 3'-Bereich des Gens ist bereits Teil des duplizierten Bereiches. Zum Vergleich ist hier die Sequenz der ersten Wiederholung angegeben. Die Nummerierung auf der linken Seite der Sequenz erfolgt relativ zum Transkriptionsstart, die Zahlen auf der rechten Seite bezeichnen Positionen im GenBank-Eintrag AF190297 (Anhang 9).

+1

-45 ttattatataatagtcagatttaaggaataaagaaaagattctcaaaacatttcatctc (3360)

M E S P P L Y E I S S S

16 tctccaacaactattcaccacattcaATGGAGTCACCACACTATACGAGATATCCTCAA

S S S E K P R H H F Q S L D L F P N L N

76 GCTCTTCTTCTGAAAACTTAGACACCATTTCCAATCCCTTGATCTCTTCCCTAACCTCA

Q N S C I N N T L I E P L P L I D R I N

136 ACCAAAACCTTTGATCAACAATACCCTAATTGAGCCTTTACCGCTTATTGATCGCATAA

L N S N L D L N P N P L Y A E E G E Q E

196 ACTTGAACCTAAACCTAGACCTAAACCTAATCCCTTGATGCGGAAGAGGAGAGCAAG

E E E E E E E D R E V D V D L H I G L P

256 AGGAGGAAGAAGAAGAAGAAGACCGTGAAGTGGACGTGGACTTACACATCGGCCCTTC

G F G K P S N D A K Q L K K R N G K E I

316 CTGGTTTTGGTAAACCAAGCAATGATGCTAAACAGCTGAAGAAGAGAAATGGGAAGGAGA

A T Y D A G K G I E N E L S G K A Y W I

376 TCGCCACATATGACCGGAAAAGGCATCGAGAATGAACTTTCCGGAAGGCATACTGGA

P A P E Q I L I G F T H F S C H V C F K

436 TCCCGGCGCGGAGCAAATTCATAGGGTTCACCTCATTTTTCTTGCCATGTATGCTTCA

T F N R Y N N L Q

496 AGACATTCATCGCTACAACAATCTTCAGgtacgagtcfaatatctcatgctgcttgcct

556 tttccatgcacaaacatatataataaattcattatagagttatatactcgggatctaat

616 gttatgagtttattcatatctataatatacatataatataatataatataatataat

676 tatataattctgaatttttgataaaaagctaaacaaccaggatttaatatagatgattac

736 ctttggatcttattatacaatttacaatttaatacaagtcactaatcgtgatttaatta

796 ctttttttgaagaaggttgtaataatataatttttatggtaaggttttcatgaaaata

856 attcatcacaactctttacatttttaaatgccttaactaaagctgaattcgaaaaagtt

916 gaaataaattatctactaagatttgattgactatagtttttaaatagttttcttttctcat

976 atatatattatcatagtagtcaaaacatttgattcaaaacttaatacacagattttctga

1036 atgaacattactatgctcggtaataatagatttttaaggaaccatgttatttctttt

M H

1096 attacttaaggaaacctttttggtttttggtgactctaataattatgaatatagATGCAC

M W G H G S Q Y R K G P E S L K G T Q P

1156 ATGTGGGGACATGGTTCACAATACAGGAAAGGACCGGAGTCACTGAAAGGCACACAGCCA

R A M L G I P C Y C C V E G C R N H I D

1216 CGAGCCATGTTAGGGATCCCTTGTACTGCTGCGTTGAAGGGTGCAGGAACCACATTGAC

H P R S K P L K D F R T L Q T H Y K R K

1276 CATCTCGTTCGAAGCCACTGAAAGACTTTAGGACGCTCCAAACGCACTACAAACGCAAA

H G H K P F S C R L C G K L L A V K G D

1336 CACGGACACAAACCTTCTCGTGTGCGCTTTGCGGTAAGCTTTTGGCTGTCAAGGGCGAT (4740)

|||||

accttctcatgctcgatttgcggtgagcttttggctgtaaaagggcgat (8078)

W R T H E K N C G K R W . . V C V C G S

1396 TGGCGAACACATGAGAAGAATTGTGGAACCGTTGG.....GTTTGCCTTTCGGTTC

|||||

tggtgaacacatgagaagaactgtgggaatatgggtttgctggtttgctggttc (8138)

D F K H K R S L K D H V K A F G S G H G

1449 TGATTTTAAACACAAACGTTCTCTTAAGGACCATGTTAAGGCGTTTGGTCTGGTCATGG

|||||

tgattttaaacacaaa.....cgtttgggctggttgtgg (8173)

P Y P T G L F E E Q A S N S S V S E T L

1509 GCCTTATCCAACCTGGTTTGTGTAAGAGCAGGCTTCTAATTCATCTGTCTCCGAGACTTT

|||||

gccttatcagactggttttttt.aatagcagacttctaatttatctgtctccagacttt (8232)

F F \*

1569 GTTTTTTAAatttgggcatcttttttct.ttcgcttatgaaatatctatttacttttagaa

|||||

gttcttttaaatgggcatcttttttctcttcgcttatggagtatctatttacttttagaa (8292)

## Abbildung 24: Sequenzanalyse des *TT1*-Gens.

Legende siehe vorherige Seite.

Das 3'- und das 5'-Ende der cDNA wurden mittels RACE bestimmt (2.3.6). Es wurde wiederum die aus Schoten gewonnene RNA als Matrize eingesetzt. Von fünf unabhängigen 5'-RACE-cDNAs wurden die Sequenzen bestimmt. Die längste dieser Sequenzen begann 41 bp stromaufwärts des Start-ATG. Diese Position ist in Abbildung 24 mit +1 gekennzeichnet. Ein TATA-Box-Motiv befindet sich zwischen -41 und -33. Das Produkt des 3'-RACE konnte direkt sequenziert werden. Darüber hinaus wurden die im Reaktionsansatz enthaltenen Fragmente auch in den pCR-TOPO-Vektor ligiert und Plasmid-DNA einzelner Klone sequenziert. Die Sequenz des PCR-Produktes wies ab Position +1727 einen poly-(A)-Anhang auf. Unter den 3'-RACE-cDNAs fand sich jedoch auch eine, bei der die Polyadenylierung 98 bp weiter stromaufwärts sowie eine, bei der sie 70 bp stromabwärts einsetzte. Die Position des poly-(A)-Anhangs variiert daher mindestens über einen Bereich von 168 bp. Somit beträgt die durchschnittliche Länge der *TT1*-cDNA 1102 bp. Sie enthält ein offenes Leseraster, das für ein Protein von 303 Aminosäuren mit einem daraus abgeleiteten Molekulargewicht von 34,5 kDa kodiert. Die cDNA-Sequenz ist in den Exon-Bereichen mit der genomischen Sequenz identisch. Sie wurde unter der Zugangsnummer AF190298 in der Gendatenbank des NCBI abgelegt und ist im Anhang 10 abgedruckt.

Die *TT1*-Sequenz wurde mittels verschiedener Computerprogramme auf Sequenzmotive hin untersucht (2.3.8). Wie in Abbildung 24 dargestellt befindet sich im Intron eine 116 bp lange Sequenzwiederholung des Motivs TA, während Exon 1 ein Mikrosatellitenmotiv enthält. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz kodiert es für einen Bereich in dem sich unter 13 Aminosäuren 11 Glutaminsäuremoleküle befinden. Darüber hinaus enthält das Protein vermutlich zwei Zinkfinger-Motive.

#### **3.4.4.3 Bestimmung der Sequenzen der *tt1*-Mutanten**

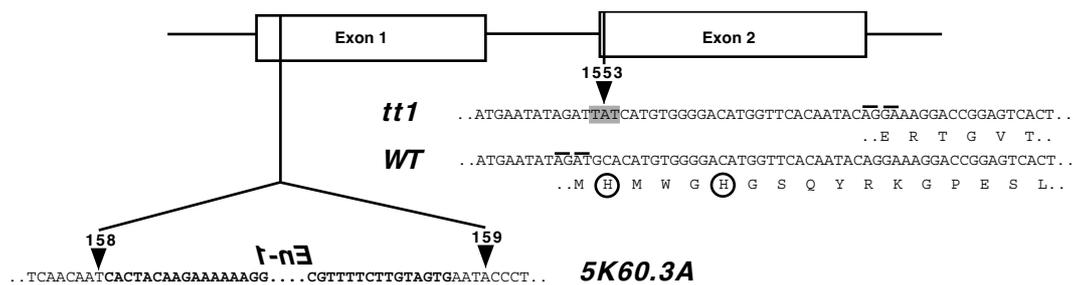
Die bislang nicht untersuchte Seite der *En1*-Insertion im *TT1*-Gen der Linie K60 wurde durch PCR mit einem gen- und einem transposonspezifischen Primer ausgehend von genomischer DNA der Pflanze 5K60.3A amplifiziert. Das Produkt wurde direkt sequenziert. Die Sequenz zeigte die erwartete Duplikation der ersten drei an das Transposon anschließenden Nukleotide der Zielsequenz. Wie Abbildung 25 zeigt, ist das Transposon in reverser Orientierung am Beginn des ersten Exons im *TT1*-Gen integriert und verhindert vermutlich schon allein durch seine Größe von 8 kb die Bildung korrekter mRNA.

Um zu überprüfen, ob auch der an der klassischen *tt1*-Mutante beobachtete Phänotyp auf einen Defekt im Leseraster des isolierten Gens zurückzuführen ist, wurde dessen vollständige Sequenz aus Landsberg *erecta* Wildtyp und der Mutante bestimmt. Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden mittels PCR von genomischer DNA als Matrize amplifiziert und die PCR-Produkte direkt sequenziert. Die Sequenzen wurden unter den Zugangsnummern AF190299 (*Ler*-Wildtyp) und AF190300 (*tt1*) in der Gendatenbank des NCBI abgelegt und sind in Anhang 11 und 12 wiedergegeben. Die Landsberg-Sequenz unterscheidet sich sowohl im kodierenden, als auch im nicht kodierenden Bereich von der Columbia-Sequenz. Der 5'-untranslatierte Bereich weist in 350 bp an drei Positionen Unterschiede auf, darunter die Transition an Position -52, die in Landsberg zum Entstehen der für die Kartierung verwendeten *MaeIII*-Schnittstelle führt (vgl. 3.4.2). Im 3'-Bereich finden sich sechs Unterschiede in 120 bp. Im Intron fehlen in der Landsberg-Sequenz 32 bp der TA-Wiederholung. Exon 1 unterscheidet sich zwischen den Ökotypen nicht. Exon 2 dagegen enthält drei Sequenzunterschiede, von denen zwei Auswirkungen auf die abgeleitete Aminosäuresequenz des Proteins haben: His-201 (Col) entspricht Asp-201 (*Ler*) sowie Leu-301 (Col) Phe-301 (*Ler*).

Die *tt1*-Sequenz weist gegenüber der korrespondierenden Landsberg-Wildtyp-Sequenz einzig an Position +1152-4 drei Basenaustausche auf (Abbildung 25). Dabei handelt es sich jeweils um Transversionen (GCA > TAT). Diese Mutation könnte auf zwei verschiedenen Wegen den *tt1*-Phänotyp hervorrufen. Erstens könnten durch sie die beiden ersten von Exon 2 kodierten Aminosäuren verändert werden: Met-162 sowie His-163, eine der vier stark konservierten Positionen des ersten putativen Zinkfinger-Motivs, würden jeweils durch Isoleucin ersetzt. Durch einen solchen Austausch würde der Zinkfinger zerstört und das resultierende Protein wäre vermutlich in seiner Funktion beeinträchtigt. Andererseits liegt die Mutation sehr nahe am Exon-Intron-Übergang. Da beim Spleiß-Vorgang bestimmte Nukleotide der mRNA mit den Spleißosomen-Komponenten interagieren, könnten die Basenaustausche zu einer Beeinträchtigung dieses Prozesses führen.

Um festzustellen, ob die Mutation tatsächlich zu einer Beeinträchtigung des Spleißens führt, wurde auch die cDNA-Sequenz von *tt1* untersucht. Dazu wurde RNA aus Schoten von *tt1*-Pflanzen unter Verwendung eines oligo-dT-Primers mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Ein Aliquot dieser cDNA wurde als Matrize für eine PCR-

Amplifikation mit genspezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (2.3.9). Die Produkte wurden in einen Vektor ligiert und sequenziert. Die Sequenzen von vier unabhängigen Fragmenten waren verglichen mit der Landsberg-*TTI*-cDNA um 32 bp verkürzt. Bei den fehlenden Basen handelte es sich um die ersten 32 Nukleotide des zweiten Exons. Wie in Abbildung 25 dargestellt, wird in *tt1* durch die Mutation nahe der ursprünglichen Spleiß-Akzeptor-Stelle offenbar deren Sequenz so verändert, daß eine weiter stromabwärts gelegene bevorzugt wird. Wenn auch weniger gut, so entspricht doch auch dieser Übergang dem publizierten Konsensus (Brown *et al.*, 1996). Exon 2 beginnt somit in *tt1* in einem anderen Leserahmen als in der Wildtypsequenz, in welchem das erste Zinkfinger-Motiv keine Fortsetzung findet, das zweite ganz fehlt und der ein vorzeitiges Stop-Kodon enthält. Die Anwesenheit dieser Mutation in *tt1* bestätigte noch einmal, daß es sich bei dem isolierten Gen um *TTI* handelte und gab einen Hinweis darauf, daß die Zinkfinger-Motive möglicherweise essentiell für die Funktion des Proteins sind.



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der *tt1*-Sequenzen der Mutanten.**

Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen des *tt1*-Gens aus Landsberg *erecta* Wildtyp, 5K60.3A und der *tt1*-Mutante. Die jeweiligen DNA-Abschnitte wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für die Amplifikation der bislang nicht untersuchten Seite der Insertion wurde genomische DNA der Pflanze 5K60.3A als Matrize in einer PCR mit den Oligonukleotiden S117 und En205 verwendet. Die *En1*-Insertion in 3'-5'-Orientierung ist durch Fettdruck hervorgehoben, die "targetsite" Duplikation unterstrichen. Die Herstellung der *tt1*-cDNA erfolgte mit Hilfe eines oligo-dT-Primers unter Verwendung von Gesamt-RNA aus *tt1*-Schoten. Für die anschließende PCR wurde die cDNA als Matrize sowie die Oligonukleotide S152 und S167 eingesetzt. Die drei gegenüber der Wildtyp-Sequenz veränderten Basen sind grau unterlegt. Die Exon-Intron-Übergänge sind durch Linien über den Nukleotiden sowie die zwei konservierten Histidine des ersten Zinkfinger-Motivs durch Kreise gekennzeichnet.

#### 3.4.4.4 TT1-ähnliche Proteine

Um mögliche *TT1*-ähnliche Gene zu identifizieren, wurden sowohl die isolierte cDNA als auch die genomische *TT1*-Sequenz mit der Gendatenbank des NCBI verglichen. Mit Hilfe des BlastX-Programms konnten sechs Datenbankeinträge identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäure-Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu TT1 aufwiesen. Fünf der Sequenzen waren genomischen Ursprungs, vier davon stammten aus *A. thaliana*, eine aus *Hordeum vulgare*. Bei der sechsten handelte es sich um eine EST-Sequenz, die aus einer cDNA-Bibliothek aus unreifen Samenschalen von *Glycine max* stammte.

Unter den *A. thaliana*-Sequenzen wiesen AL049660 und AC011438 die höchste Ähnlichkeit zu *TT1* auf. Bei der Annotation dieser Sequenzen wurden die Lage des putativen Introns wie in *TT1* zwischen den Kodons für die Aminosäuren Gln-161 und Met-162 angenommen. Bei der automatischen Annotation der beiden übrigen Datenbankeinträge wurde jeweils eine andere Position als Spleiß-Stelle erkannt. Indem sie auch in diesen Sequenzen analog zu der für *TT1* experimentell bestätigten gewählt wurde, konnte der Bereich sehr hoher Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit TT1 deutlich vergrößert werden. Die aus *A. thaliana* gewonnenen Sequenzen bestanden somit jeweils aus zwei 422 bis 816 bp großen Exons mit einem 796 bis 1095 bp großen Intron. Die DNA-Sequenzen der zweiten Exons wiesen zum Teil Identitäten von über 70 % auf. In Übereinstimmung damit finden sich die in Tabelle 6 dargestellten Ähnlichkeiten der Proteine vorwiegend in deren carboxyterminalen Bereichen. Dort liegen die in allen Sequenzen konservierten Zinkfinger-Motive sowie zwei putative Kernlokalisierungssignale (4.5.3).

% Identität (% Ähnlichkeit)	TT1	AL049660	AC011438	AC006085.9
AL049660	74 (81)			
AC011438	67 (79)	73 (86)		
AC006085.9	63 (72)	61 (67)	75 (86)	
AB025629	59 (69)	52 (62)	77 (91)	63 (70)

**Tabelle 6: Sequenzidentitäten zwischen TT1-ähnlichen Proteinen aus *A. thaliana*.**

Angegeben sind die Prozentzahlen identischer (bzw. in Klammern: ähnlicher) Aminosäuren der aus den *TT1*-ähnlichen Genen abgeleiteten Peptidsequenzen aus *A. thaliana* bezogen auf die gesamte Proteinlänge. Die Werte wurden mit Hilfe des Blast-Algorithmus berechnet.

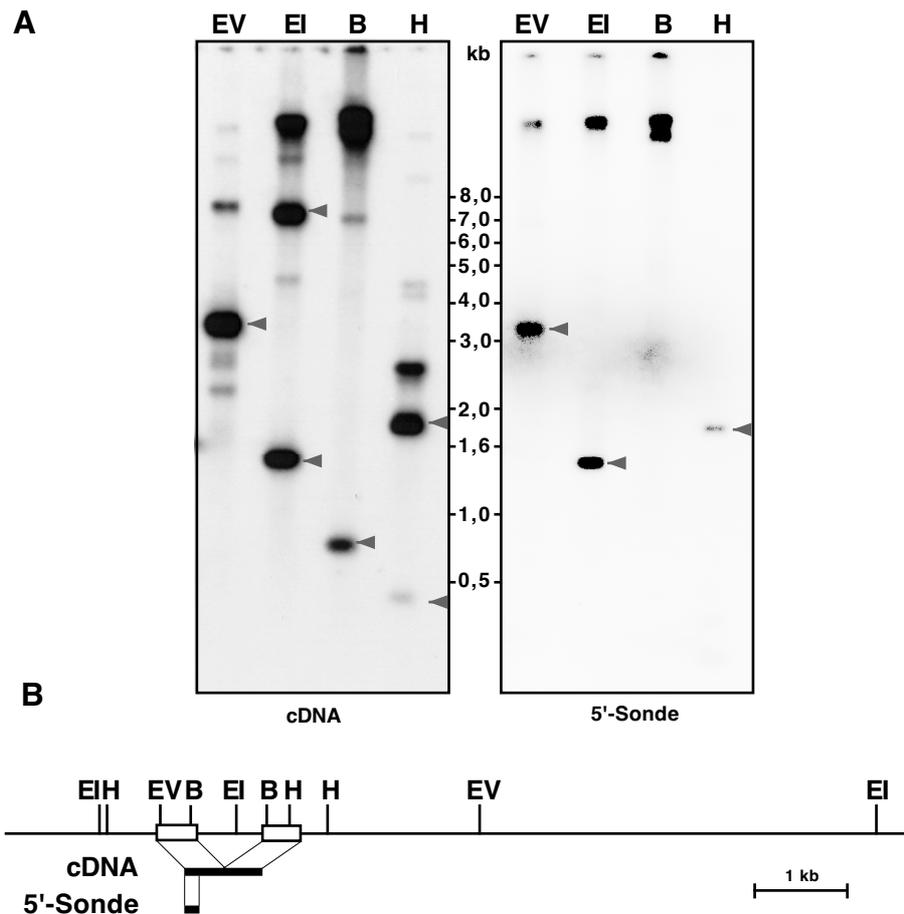
Um festzustellen, ob die so entdeckten Gene in *A. thaliana* exprimiert wurden, oder ob es sich um Pseudogene handelte, sowie um zu überprüfen, ob die Transkripte tatsächlich analog zu *TTI* prozessiert wurden, wurden sie mittels RT-PCR amplifiziert. Auf Grund der fehlenden ESTs war es möglich, daß die fraglichen Gene nur unter speziellen Bedingungen oder organspezifisch exprimiert wurden. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, die entsprechenden Transkripte zu detektieren, wurden aus verschiedenen Pflanzenorganen gewonnene RNAs (2.1.6) untersucht. Sie wurden zunächst in cDNAs umgeschrieben und dann als Matrize für PCR eingesetzt (2.3.9). Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden aus den entsprechenden GenBank-Einträgen abgeleitet. Nur für das Gen mit der Zugangsnummer AL049660 konnte eine Expression nachgewiesen werden. Sie war am stärksten in den Blüten sowie stark im Stengel und der Wurzel. Auch in Schoten und alten Blättern war AL049660-Transkript nachweisbar, jedoch nicht in jungen Blättern. Direktes Sequenzieren des PCR-Produktes ergab, daß die zugehörige mRNA tatsächlich analog zu *TTI* prozessiert wurde.

### 3.4.5 Genomische DNA-Gel-Blot-Analysen

Durch DNA-Gel-Blot-Analysen wurde überprüft, ob im *A.-thaliana*-Genom eine oder mehrere Kopien des *TTI*-Gens vorhanden sind. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß für RNA-Gel-Blot-Experimente zur Charakterisierung der *TTI*-Expression spezifische Sonden zur Verfügung standen. Es wurde die für die Isolierung der BAC-Klone und des *SpeI*-Fragmentes eingesetzte 5'-spezifische Sonde (*EcoRI*-Fragment aus pSA62) sowie die vollständige *TTI*-cDNA getestet.

Genomische DNA des *A.-thaliana*-Ökotyps Columbia wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Wie in Abbildung 26 dargestellt, hybridisierte die vollständige cDNA unter wenig stringenten Bedingungen nicht nur mit Banden, die auf Grund der in der genomischen Sequenz des *TTI*-Gens vorhandenen Restriktionsschnittstellen erwartet wurden. So wurden zum Beispiel in *EcoRI*- bzw. *EcoRV*-gespaltener DNA die schon aus der Untersuchung der BAC-Klone bekannten 1,6 bzw. 3,5 kb großen Banden detektiert (vgl. 3.4.2.3), die Sonde hybridisierte in den entsprechenden Spuren jedoch auch stark mit Fragmenten anderer Größen. Die vollständige cDNA ist daher nicht als Sonde für RNA-Gel-Blot-Experimente geeignet.

Im Gegensatz dazu konnten alle mit der für das 5'-Ende des *TTI*-Gens spezifischen Sonde detektierten Banden durch Restriktionsschnittstellen in der genomischen *TTI*-Sequenz erklärt werden. Daraus kann gefolgert werden, daß das *TTI*-Gen im haploiden Genom nur in einer Kopie vorliegt. Darüber hinaus ist die aus dem 5'-Bereich des *TTI*-Gens gewonnene Sonde geeignet, um in RNA-Gel-Blot-Experimenten spezifisch die Akkumulation des zugehörigen Transkriptes nachzuweisen.



**Abbildung 26: Genomische DNA-Gel-Blot-Analysen von *AtTTI*.**

In **A** sind die Ergebnisse von DNA-Gel-Blot-Analysen abgebildet. Je 5 µg genomische DNA des *A. thaliana*-Ökotyps Columbia wurden mit den über den Spuren angegebenen Restriktionsendonukleasen gespalten, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Diese wurde mit der unter den Autoradiogrammen angegebenen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und unter Bedingungen geringer Stringenz gewaschen (6xSSC; 0,5% SDS). Zwischen den Autoradiogrammen sind die Fragmentgrößen der mit aufgetrennten Referenz-DNA markiert. Die erwarteten Banden sind mit Pfeilspitzen markiert. **B** zeigt schematisch die Lage der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme in der *TTI*-Region (*EcoRV*, EV; *EcoRI*, EI; *BamHI*, B; *HindIII*, H) sowie die Herkunft der verwendeten DNA-Sonden. Weiße Rechtecke bezeichnen die beiden Exons des *TTI*-Gens.

### 3.4.6 Expressionsstudien

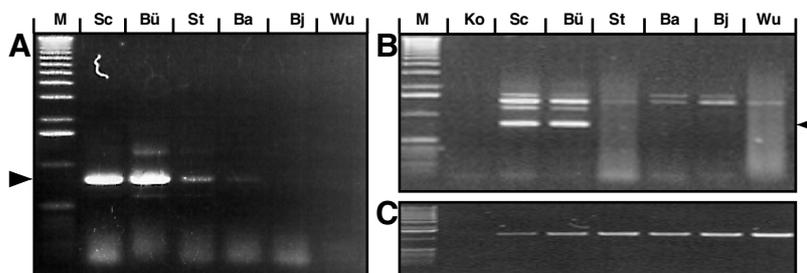
Um Anhaltspunkte für die Funktion von *AtTT1* zu erhalten, wurde das Expressionsmuster des Gens untersucht. Auf Grund der beschriebenen Beschränkung des Phänotyps auf den Samen, genauer die Samenschale, war zu vermuten, daß das Gen sowohl gewebe- als auch entwicklungspezifisch exprimiert sein würde. In RNA-Gel-Blot-Analysen wurde daher zunächst die Expression von *TT1* in unterschiedlichen Pflanzenorganen von *A. thaliana* untersucht. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA (2.1.6) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran überführt und mit der für den 5'-Bereich des *TT1*-Gens spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Auch bei Expositionszeiten von zwei Wochen war in keiner der Spuren ein klares Signal der erwarteten Größe nachweisbar. Statt dessen war eine starke Kreuzhybridisierung mit ribosomalen Banden zu beobachten. Um diesen Hintergrund zu verringern und das gewünschte Transkript anzureichern, wurde aus der Gesamt-RNA polyA<sup>+</sup> mRNA isoliert und davon 1 µg für Gel-Blot-Analysen eingesetzt. Aber auch auf diese Weise war kein *TT1*-Transkript detektierbar (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.6.1 Nachweis und relative Quantifizierung der *AtTT1*-mRNA mittels RT-PCR

Da es mittels RT-PCR bereits gelungen war, die *TT1*-cDNA zu amplifizieren, sollte im Folgenden versucht werden, mit dieser Methode Erkenntnisse über das Expressionsmuster von *TT1* zu gewinnen. Dazu wurde zunächst das "Titan-Kit" (Roche) eingesetzt (2.3.9). Etwa 1 µg Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Organen von *A. thaliana* wurden in einem Ansatz mit genspezifischen Oligonukleotiden zunächst in die komplementäre DNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Abbildung 27A zeigt, daß nur in den Ansätzen mit aus Schoten und Blüten gewonnener RNA nennenswerte Produktmengen gebildet wurden.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde es mit einem anderen Verfahren reproduziert. Hierzu wurden die RNAs zunächst fluorimetrisch quantifiziert. Gleiche RNA-Mengen wurden dann mit reverser Transcriptase und einem oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNAs wurden aufgereinigt und unter Verwendung der gleichen genspezifischen Primer wie mit dem "Titan-Kit" als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt (2.3.9). In allen Ansätzen traten mit dieser Primerkombination unspezifische Banden auf, die möglicherweise auf Verunreinigungen der eingesetzten RNA mit genomischer DNA zurückzuführen sind. Produkte der erwarteten Größe konnten nur ausgehend von Blüten- und Schoten-cDNA amplifiziert werden

(Abbildung 27B). Zur Überprüfung der Einheitlichkeit der eingesetzten cDNA-Mengen wurden Reaktionen mit Oligonukleotiden durchgeführt, die spezifisch für das Transkript eines konstitutiv exprimierten Gens waren (*Actin2*). Wie Abbildung 27C zeigt, konnte in dieser Kontrollreaktion mit allen verwendeten cDNAs ein Produkt der erwarteten Größe detektiert werden. Das Signal war bei Verwendung von Wurzel-cDNA am stärksten und bei Schoten-cDNA am schwächsten. Das deutete darauf hin, daß die Schoten cDNA am geringsten konzentriert war. Das mit den *TTI*-spezifischen Primern und dieser cDNA erhaltene Signal wäre nach Korrektur für die geringere Konzentration folglich noch stärker. Damit bestätigte dieses Experiment das Resultat der Reaktion mit dem "Titan-Kit". Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß das *TTI*-Gen vorwiegend in Blüten und Schoten exprimiert wird.



**Abbildung 27: Untersuchungen zur Expression von *AtTTI* mittels RT-PCR.**

In **A** ist das Ergebnis einer RT-PCR unter Verwendung des "Titan-One-Tube RT-PCR Kits" (Roche) dargestellt. Dazu wurde etwa 1 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen von *A. thaliana* mit den *TTI*-spezifischen Oligonukleotiden S105 und S130 in komplementäre DNA umgeschrieben und diese amplifiziert. **B** zeigt das Resultat einer Zwei-Schritt-Reaktion. Je 100 ng Gesamt-RNA wurden dazu mittels eines oligo-dT-Primers und Omniscript Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 20 ng der gereinigten cDNA wurden als Matrize für PCR mit S105 und 130 sowie dem Advantage Enzym eingesetzt. Pfeilspitzen markieren die Position des erwarteten 817 bp *TTI*-Fragmentes. **C** zeigt das Ergebnis einer Kontrollreaktion für den Einsatz gleicher cDNA-Mengen, die mit Primern für das *Actin2*-Transkript durchgeführt wurde. Abkürzungen: Schote, Sc; Blüte, Bü; seneszenztes Blatt, Ba; junges Blatt, Bj; Wurzel, Wu; Kontrolle (ohne cDNA), Ko; DNA-Größenstandard, M.

### 3.4.6.2 Herstellung und Analyse transgener *TTI*-Promotor-GUS-Pflanzen

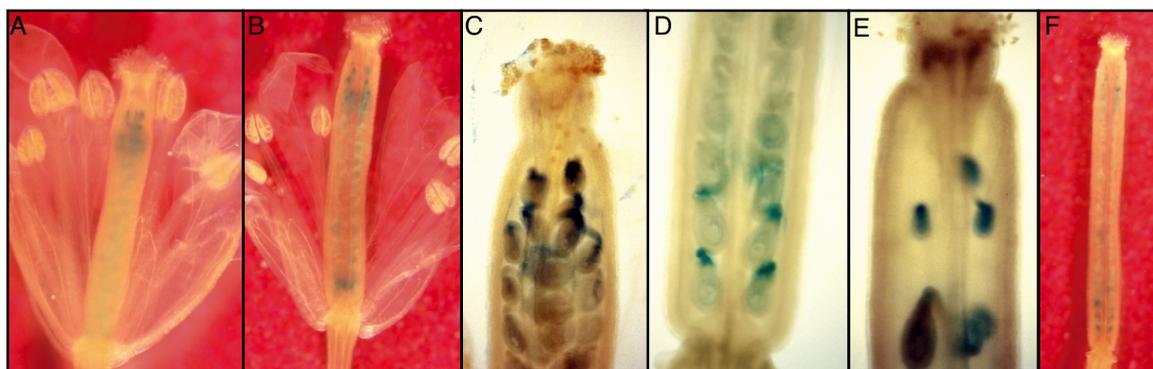
Für den *TTI*-Promotor war eine zeitlich begrenzte Aktivität in nur wenigen Zellen möglich. Die daraus resultierenden Transkriptmengen konnten für RNA-Gel-Blot-Analysen zu gering sein. Die gewebespezifische Analyse der Expression eines Gens kann jedoch auch mit Hilfe transgener Pflanzen erfolgen. Dazu wird der Promotor, der die zu untersuchende Expression vermittelt, mit dem offenen Leseraster eines Reportergens fusioniert und stabil in das Genom von *A. thaliana* integriert. Die Aktivität eines geeigneten Reporterenzym führt zu einer Verstärkung des Signals und erlaubt den Nachweis von Promotoraktivität mit hoher räumlicher Auflösung.

Um geeignete Bereiche des *TTI*-Promotors für die Herstellung von Reporterkonstrukten auswählen zu können, wurde er mit Hilfe des Programms TFSEARCH untersucht (2.3.8). Dieses Programm vergleicht eine gegebene Sequenz mit einer Datenbank von Transkriptionsfaktorbindestellen (TRANSFAC; Heinemeyer *et al.*, 1999) und identifiziert darin diejenigen Positionen, die hinreichend gut mit den jeweiligen Konsensussequenzen übereinstimmen. Diese Analyse ergab, daß stromaufwärts des Start-ATG erst bei Position -960 ein solches Motiv vorkommt. Es entspricht dem Konsensus, der von den Homöodomänenproteinen *AtHB-1* und *2* erkannt wird. Die in 5'-Richtung folgenden 1,4 kb enthalten potentielle Bindestellen für GT-1 ähnliche Faktoren (SBF-1, 4x), für Proteine vom Typ des homeotischen Blütengens *AGAMOUS* (1x) sowie für R2R3-MYBs wie *P* (1x) oder *MYB.Ph3* (1x). Dabei handelt es sich um Faktoren, für die entweder eine Beteiligung an der Regulation der Flavonoidbiosynthese (SBF1 und *P*) oder eine Expression in reproduktiven Pflanzenteilen beschrieben ist (*AGAMOUS*, *MYB.Ph3*). In weiteren 1000 bp stromaufwärts bis zur *SpeI*-Schnittstelle wurden mit dem verwendeten Verfahren keine weiteren möglichen Bindestellen lokalisiert.

Auf Grund der sehr weit stromaufwärts des Start-ATG gelegenen potentiellen *cis*-Elemente, wurden zur Herstellung eines Reporterkonstruktes 3 kb des genomischen 5'-Bereichs von *AtTTI* translational über das *TTI*-Start-Kodon mit dem Leseraster der  $\beta$ -Glukuronidase fusioniert. Diese Promotor-GUS-Fusion wurde in den binären Vektor pGPTV-Kan überführt, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und mittels Vakuuminfiltration auf *A.-thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia übertragen (2.3.10). Transformanten wurden auf kanamycinhaltigen Agarplatten selektiert. Nach etwa zehn Tagen wurden die Keimlinge auf

Erde überführt und bis zur Samenreife im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Aktivität des Reporterenzym  $\beta$ -Glukuronidase wurde über die Umsetzung von farblosem X-Gluc zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen. Dazu wurde das Substrat in Keimlinge bzw. Blätter und Infloreszenzen mit Schoten verschiedener Entwicklungsstadien infiltriert und anschließend das Chlorophyll durch ethanolische Extraktion aus dem Gewebe entfernt (2.3.11).

Nach zweitägiger Inkubation in der Substratlösung war in drei von sechs transgenen *AtTT1*-GUS-Pflanzen die Reporteragenaktivität nachweisbar. Während in Wildtyp und drei weiteren Pflanzen unter diesen Bedingungen keine Blaufärbung auftrat, war in den übrigen drei Pflanzen übereinstimmend GUS-Aktivität in geöffneten Blüten und sich entwickelnden Schoten zu beobachten. In geöffneten Blüten überragt das Gynoeceum die Antheren (Abbildung 28A und B) und die Bestäubung hat bereits stattgefunden (Stadium 15; Bowman, 1994). Die Untersuchung des Pflanzenmaterials am Lichtmikroskop ergab, daß die GUS-Aktivität auf die Funiculi und Integumente der Samenanlagen beschränkt war (Abbildung 28C und D). Sie war vor allem in den obersten und den untersten Samenanlagen junger Schoten nachweisbar (Abbildung 28B und F).



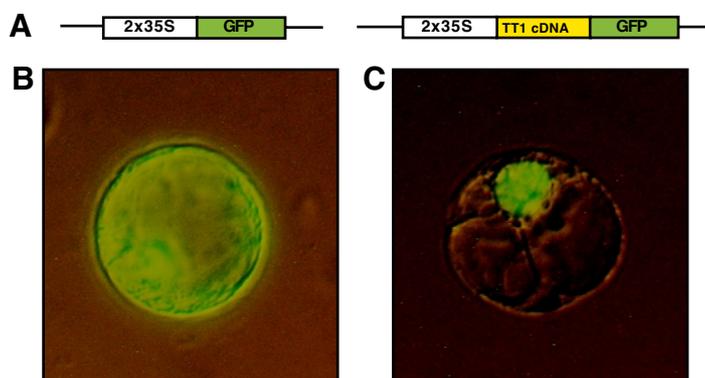
**Abbildung 28: X-Gluc-Färbungen transgener *AtTT1*-GUS-Pflanzen.**

Dargestellt sind X-Gluc gefärbte Blüten und Schoten transgener *AtTT1*-GUS-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien. **A** zeigt eine Blüte kurz nach der Befruchtung. Die GUS-Aktivität ist auf die apikalen Samenanlagen beschränkt. Ältere Blüten (**B**) und junge Schoten (**F**) zeigen GUS-Aktivität sowohl in apikalen als auch in distalen Samenanlagen. Sie ist auf die Funiculi und die Integumente beschränkt (**C** und **D**). Mit der verwendeten Methode ist GUS-Aktivität in Samenanlagen, die sich nicht mehr weiter entwickeln, nicht aber in älteren Samenstadien nachweisbar (**E**).

Die GUS-Aktivität konnte in Schoten bis zum Stadium 17, nicht jedoch in älteren Stadien beobachtet werden. Besonders auffällig war sie in Samenanlagen, die sich nicht weiter entwickelten (Abbildung 28E). Die Beschränkung der GUS-Aktivität auf die Samenanlagen geöffneter Blüten und junger Schoten bestätigte das mittels RT-PCR für *TT1* bestimmte Expressionsmuster.

### 3.4.7 Kernlokalisationsstudien

In der TT1-Aminosäuresequenz konnten mit Hilfe des PSORT-Programmes (2.3.8) zwei Abschnitte identifiziert werden, die jeweils drei basische Aminosäuren und ein Histidin enthielten (vgl. Abbildung 35). Für Sequenz-Motive dieser Zusammensetzung konnte gezeigt werden, daß sie als Kernlokalisierungssignale fungieren können (Raikhel, 1992). Da eine Lokalisierung des TT1-Proteins im Zellkern Anhaltspunkte für seine Funktion liefern könnte, wurde untersucht, ob das Protein tatsächlich in den Zellkern importiert wird. Dazu wurde die *TT1*-cDNA an den offenen Leserahmen des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert und unter die Kontrolle eines doppelten *35S*-Promotors gebracht. Dabei handelt es sich um einen Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, der in *A. thaliana* eine starke Genexpression in den verschiedensten Organen vermittelt (Sprenger, 1997). Das resultierende *35S*-TT1-GFP-Konstrukt wurde in *A.-thaliana*-Protoplasten transfiziert (2.3.12). Als Kontrolle dienten Transfektionen mit dem Ausgangsvektor *35S*-GFP. Die mikroskopisch sichtbare GFP-Fluoreszenz wurde zur Lokalisation der Proteine genutzt. Wie Abbildung 29 zeigt, führte Transfektion von *35S*-GFP allein zu einer diffusen Fluoreszenz im gesamten Protoplasten, also sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Das TT1-GFP-Fusionsprotein war dagegen vollständig im Zellkern lokalisiert.



**Abbildung 29:** Das TT1-GFP Fusionsprotein ist kernlokalisiert. Legende siehe Seite 113.

**Legende zu Abbildung 29 (vorherige Seite):**

In **A** sind die zur Transfektion benutzten Konstrukte schematisch dargestellt. **B** zeigt einen *A.-thaliana*-Protoplasten, der mit 35S-GFP (pAVA-393) transfiziert wurde, während **C** einen mit 35S-TT1-GFP (SA81) transfizierten Protoplasten zeigt. Die Protoplasten wurden für 20 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Die GFP-Fluoreszenz bei 515-565 nm wurde am Zeiss Axiophot Mikroskop durch Anregung mit Licht von 450-490 nm Wellenlänge nachgewiesen.

**3.4.8 Phänotypische Charakterisierung von *tt1***

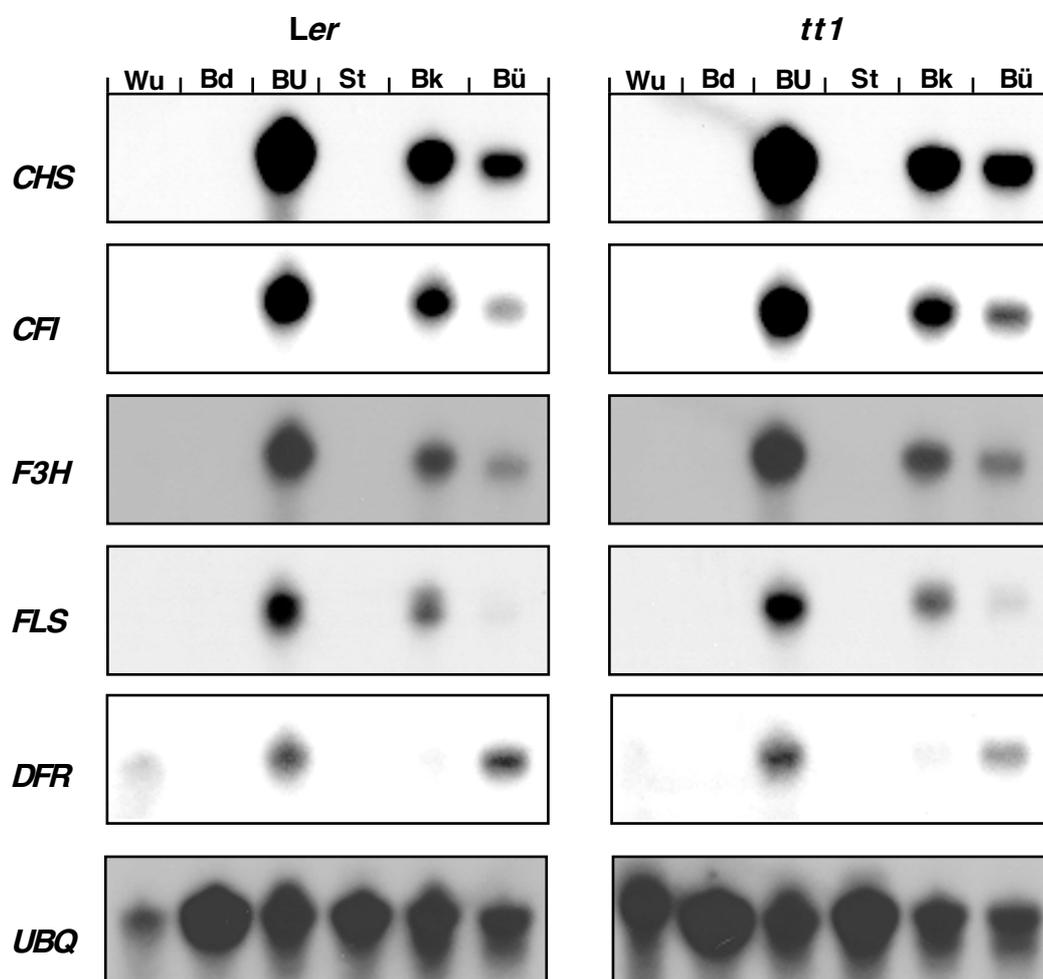
Um weitere Anhaltspunkte über die Funktion von TT1 zu erhalten, wurde die klassische *tt1*-Mutante einer genaueren phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Analog zu *tt15* wurde dazu die Expression von Strukturgenen des Phenylpropanstoffwechsels sowie der Flavonoidgehalt in verschiedenen Organen von Wildtyp und Mutante verglichen.

**3.4.8.1 Expression von Strukturgenen des Phenylpropanstoffwechsels**

Um zu überprüfen, ob die *tt1*-Mutation Auswirkungen auf die Expression von Genen des Phenylpropanstoffwechsels in unterschiedlichen Organen von *A.-thaliana*-Pflanzen hat, wurde die Expression von fünf dieser Gene in Landsberg *erecta* Wildtyp und *tt1*-Mutante untersucht. Die für die Gel-Blot-Analysen verwendete RNA aus Blättern wurde von 6 Wochen alten *tt1*- und *Ler*-Pflanzen isoliert, die zwei Tage dunkeladaptiert und danach für 20 h mit UV-haltigem Weißlicht bestrahlt wurden. RNA aus Wurzeln, Stengel, Knospen und geöffneten Blüten wurde von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert. Die RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden für Strukturgene des Phenylpropanstoffwechsels hybridisiert. Abschließend erfolgte eine Hybridisierung mit einer *Polyubiquitin*-Sonde. Die Transkriptmenge der *Polyubiquitin*-Genfamilie in verschiedenen Organen variiert stark. Daher erlaubten die erhaltenen Signalstärken zwar einen Vergleich der eingesetzten RNA-Mengen zwischen den gleichen Organen von Wildtyp und Mutante, nicht aber der Organe untereinander.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 30 dargestellt. Wie auf Grund vorangegangener Experimente zu erwarten, war in Stengelmateriale sowie in Blättern dunkel gehaltener Pflanzen keine der getesteten mRNAs nachweisbar. Nach UV-Induktion akkumulierten sie jedoch in Wildtyp und *tt1*-Mutante in vergleichbaren Mengen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die *tt1*-Mutation die UV-Induktion der Expression der unter-

suchten Gene nicht beeinträchtigt. Die möglicherweise vorhandene *DFR*-Expression in der Wurzel schien (nach Korrektur der Signalintensitäten für die unterschiedliche Beladung) in *tt1* gegenüber dem Wildtyp reduziert zu sein. Im Verlauf der Entwicklung von *A. thaliana* werden die für Enzyme der Flavonoidbiosynthese kodierenden Gene vor allem in Knospen und Blüten exprimiert. *FLS* zeigte hier eine stärkere Expression in Knospen, während *DFR* stärker in älteren Blüten exprimiert war. Auch in der entwicklungspezifischen Expression der betrachteten Strukturgene war jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und *tt1*-Mutante festzustellen. Diese Ergebnisse zeigten, daß die *tt1*-Mutation keine drastischen Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Gene in verschiedenen Teilen von *A. thaliana* hat.

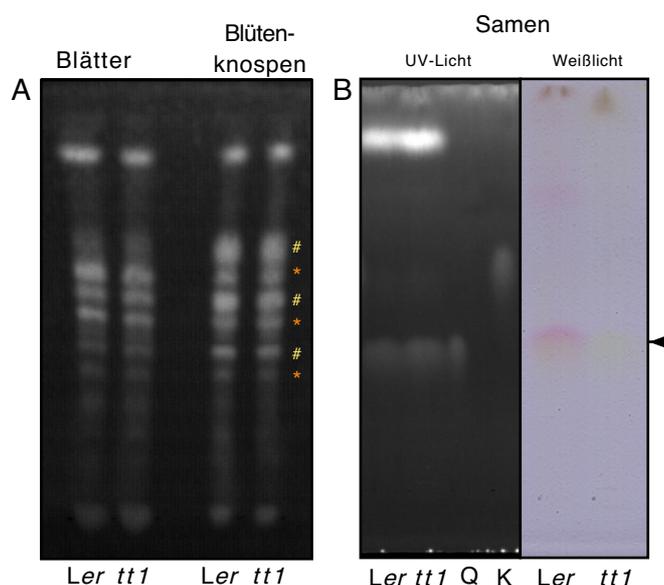


**Abbildung 30: Expression von Flavonoidbiosynthesegenen in verschiedenen Organen von *tt1* im Vergleich zum Wildtyp.**

Es sind RNA-Gel-Blot-Analysen mit RNA aus Blättern dunkeladaptierter bzw. mit nach Dunkeladaptation UV-Licht bestrahlter *tt1*- und *Ler*-Pflanzen sowie mit RNA aus verschiedenen Organen dargestellt. Die für die Hybridisierungen verwendeten DNA-Sonden sind links von den Autoradiogrammen angegeben. Abkürzungen: Wurzel, Wu; dunkeladaptiertes Blatt, Bd; UV-bestrahltes Blatt, BU; Stengel, St; Blütenknospe, Bk; Blüte, Bü.

### 3.4.8.2 Untersuchung des Flavonoidgehaltes verschiedener Pflanzenteile

Zur weiteren Charakterisierung der *tt1*-Mutante wurde ihr Gehalt an Flavonoiden in verschiedenen Organen genauer untersucht. Dazu wurden die in Samen enthaltenen Flavonoid-Glykoside einer sauren Hydrolyse unterzogen und mit Isoamylalkohol extrahiert. Diese Extrakte wurden auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und die Aglyka aufgetrennt. Die Flavonoid-Glykoside in Blatt- und Knospenmaterial wurden dagegen mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie (HPTLC) untersucht. Dazu wurden die Glykoside methanolisch extrahiert, auf HPTLC-Platten aufgetragen und chromatographiert (2.3.1). Abbildung 31A zeigt, daß in *tt1* das Spektrum und der Gehalt an Flavonoid-Glykosiden in Blättern und Blütenknospen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert ist. In Samen der *tt1*-Mutante ist jedoch im Unterschied zum Wildtyp kein Cyanidin nachweisbar, während der Gehalt des korrespondierenden Flavonols Quercetin nicht verändert zu sein scheint (Abbildung 31B). Diese Untersuchungen bestätigen, daß der Phänotyp der *tt1*-Mutante auf den Samen beschränkt ist.

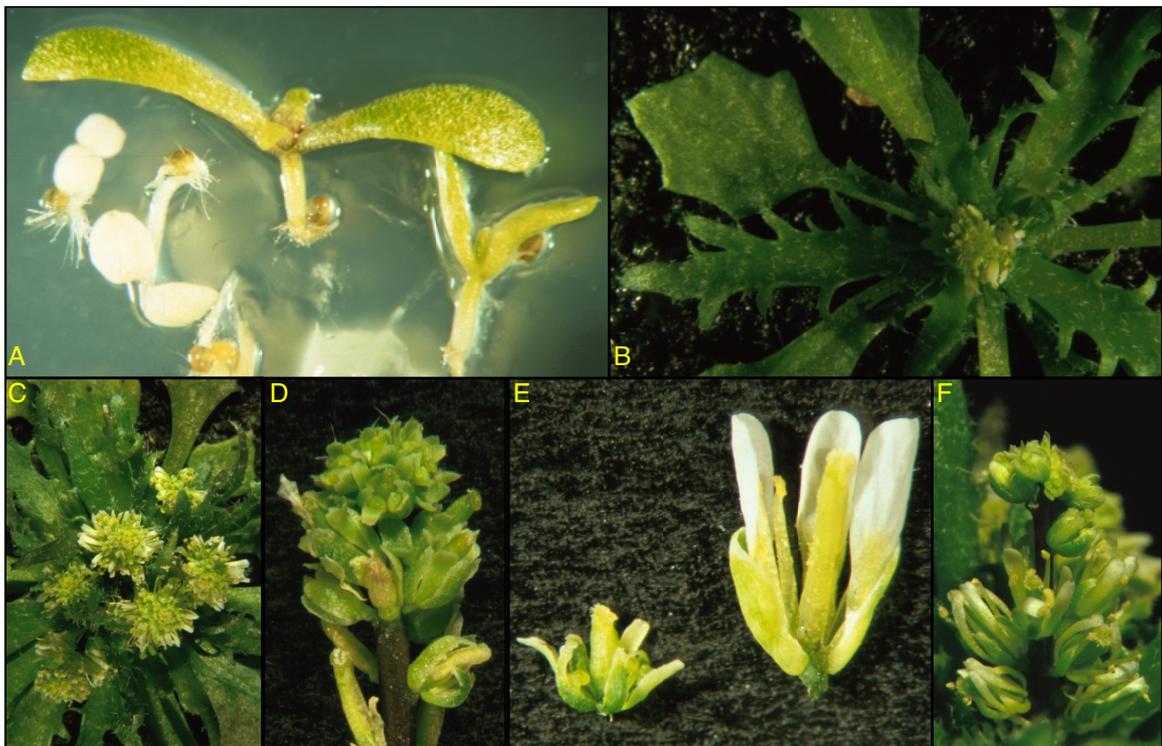


**Abbildung 31: *tt1* zeigt einen samenspezifischen Phänotyp.**

A zeigt die Untersuchung des Spektrums an Flavonoid-Glykosiden in Blättern und Blütenknospen aus *Ler*-Wildtyp und *tt1*-Mutante mittels HPTLC. Die Platte wurde unter UV-Licht photographiert. Die Positionen von Kämpferol-Glykosiden, die auf Grund ihrer gelben Fluoreszenz und durch Ko-Chromatographie von Vergleichsproben identifiziert wurden, sind mit #, orange fluoreszierende Banden, die vermutlich den korrespondierenden Quercetin-Glykosiden entsprechen, mit \* gekennzeichnet. In B ist die dünn-schichtchromatographische Analyse von Flavonoid-Aglyka dargestellt. Als Referenzsubstanzen dienten Quercetin (Q) und Kämpferol (K). Die Position von Cyanidin ist mit einer Pfeilspitze markiert.

### 3.4.9 Phänotypen von 35S-TT1-Pflanzen

Die Auswirkungen übermäßiger oder ektoptischer Expression eines Gens lassen vielfach Rückschlüsse auf die Funktion des Genproduktes zu. Zur Herstellung von Überexpressionspflanzen wurde daher die *TT1*-cDNA unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (s.o.) stabil in *A.thaliana*-Pflanzen transformiert (2.3.10). Primärtransformanden wurden auf kanamycinhaltigem Medium selektiert. Wie in Abbildung 32A dargestellt, zeigten 35S-TT1-Pflanzen im Vergleich zu Keimlingen, die mit der Vektorkontrolle transformiert worden waren, auffällig lange und schmale Kotyledonen.



**Abbildung 32: Phänotypen von 35S-TT1-Pflanzen.**

**A** zeigt unter gleichen Bedingungen angezogene Primärtransformanden von 35S-TT1- (oben links) und *TATA*-GUS-Pflanzen (rechts) sowie nicht kanamycinresistente Keimlinge (unten links). **B** und **C** zeigen die Pflanzen 2-2 und 2-3 in der Aufsicht. Auffällig sind die Blattformen sowie die Unterdrückung der Internodienstreckung. **D** zeigt eine Infloreszenz der Pflanze 2-2. Die Blüten sind sitzend, die Petalen stark reduziert. In **E** ist der Vergleich einer Blüte der Pflanze 2-2 (links) mit einer Wildtyp-Blüte (rechts) dargestellt. **F** zeigt die schmalen und verlängerten Petalen von Blüten der Pflanze 2-3.

Die Pflanzen wurden auf Erde überführt und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert. Im Unterschied zu den runden ersten Rosettenblättern von Wildtyp-Pflanzen waren die Blätter von 35S-TT1-Pflanzen markant eckig. Spätere Blätter der TT1-Überexpressions-Pflanzen waren im Unterschied zu den spatelförmigen, ganzrandigen oder leicht gesägten Blättern des Wildtyps eher lanzettlich, nicht klar in Blattstiel und Blattspreite gegliedert sowie auffällig gefiedert oder fiederspaltig (Abbildung 32B). Vermutlich in Abhängigkeit von der Stärke der Überexpression unterblieb die Streckung der Internodien der Infloreszenzen, so daß anstelle des sonst bei dem Ökotyp Columbia beobachteten traubenförmigen ein eher doldenförmiger Blütenstand gebildet wurde (Abbildung 32C). Bei vielen 35S-TT1-Pflanzen unterblieb darüber hinaus auch die Entwicklung der Blütenstiele (Abbildung 32D). Die Blüten dieser Pflanzen waren deutlich kleiner als die des Wildtyps und zeigten mehr oder weniger stark transformierte Petalen. Sie waren vielfach reduziert und grünlich wie Sepalen oder schmal und filamentös verlängert (Abbildung 32E und F). Die meisten der 35S-TT1-Pflanzen waren steril. Die beobachtete Vielzahl und Schwere der durch die ektopische Expression von *TT1* hervorgerufenen phänotypischen Veränderungen läßt auf eine wichtige Rolle dieses und verwandter Gene in der Regulation pflanzlicher Entwicklungsvorgänge schließen.

## 4 Diskussion

Ein großer Teil unseres heutigen Wissens über die Flavonoidbiosynthese stammt aus der Untersuchung von Pflanzen mit Mutationen in Genen, die für Enzyme oder Regulatoren dieses Stoffwechselweges kodieren. Für die vorliegende Arbeit wurden *A. thaliana transparent-testa*-Mutanten als System gewählt, um weitere Erkenntnisse über die Biosynthese von Flavonoiden und ihre Regulation zu gewinnen. Vor diesem Hintergrund wurde die neu entdeckte Mutante *tt15* ansatzweise charakterisiert sowie den Fragen nachgegangen, ob der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält und welche Elemente im Promotor dieses Gens seine Lichtinduzierbarkeit vermitteln. Der Schwerpunkt der Arbeit lag jedoch auf der Isolierung und einer ersten Charakterisierung des *TT1*-Gens, das die entwicklungs- und gewebespezifische Akkumulation von Flavonoiden in der Samenschale von *A. thaliana* beeinflusst.

### 4.1 *tt15* - eine neue *tt*-Mutante mit samenspezifischem Phänotyp

Die Mutante *tt15* repräsentiert einen neuen Locus, der die Farbe der Samen von *A. thaliana* beeinflusst (N. Focks und C. Benning, persönliche Mitteilung). Durch Untersuchungen des Flavonoidgehaltes von *tt15*-Material konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Mutation in den Samen zu einer Reduktion von Cyanidin und Quercetin führt, aber die Akkumulation von Flavonoiden in den vegetativen Pflanzenteilen nicht beeinträchtigt (3.1.3.2). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß *tt15* die für die Biosynthese von Anthocyanidinen benötigten Gene in Blättern in der gleichen Weise zu exprimieren vermag wie der Wildtyp (3.1.3.1). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Anthocyanidinbiosynthese in den vegetativen Teilen von *tt15*-Pflanzen intakt ist. Die vom Wildtyp abweichende Färbung der *tt15*-Samen könnte somit auf einen Defekt in einem gewebespezifisch exprimierten Strukturgen der Flavonoidbiosynthese zurückgehen. Allerdings liegen sowohl *CHS*, *CFI*, *DFR* als auch *F3H* nur in einer Kopie im Genom von *A. thaliana* vor (Feinbaum und Ausubel, 1988; Pelletier und Shirley, 1996; Shirley *et al.*, 1992) und Mutationen in diesen Genen haben deutliche Effekte auf die Samenfarbe. Daher scheint die Pigmentierung der Samen durch die Produkte dieser Gene und nicht durch die Aktivität eines parallelen, samenspezifischen Weges der Anthocyanidinbiosynthese zu erfolgen.

Da die Flavonoidbiosynthese durch verschiedene Stimuli und im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung streng reguliert wird (1.2.2), kann angenommen werden, daß die Akkumulation von Anthocyanidinen und kondensierten Tanninen in der Samenschale sowie die Pigmentierung vegetativer Pflanzenteile jeweils von spezifischen Faktoren kontrolliert werden. Die reduzierte Pigmentierung der Samen der *tt15*-Mutante könnte somit auf einen Defekt in einem samenspezifischen positiven Regulator der Pigmentierung zurückzuführen sein. Es erscheint jedoch auch möglich, daß das in *tt15* mutierte Gen ein Enzym kodiert, das an der Synthese der kondensierten Tannine beteiligt ist oder ein solches Gen reguliert. Andererseits könnte der im Vergleich zu vielen bislang in der Literatur beschriebenen *tt*-Mutanten recht unscheinbare Phänotyp von *tt15* auf eine Mutation zurückzuführen sein, die nicht zu einem vollständigen Verlust der Funktion des Genproduktes oder nur zu einem veränderten Expressionsmuster des Gens führt. Der unscheinbare Phänotyp ist vermutlich auch der Grund, warum andere *tt15*-Allele in bisherigen Studien zur Isolierung von Mutanten mit veränderter Samenfarbe unentdeckt geblieben sind.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erlaubten es, *tt15* in die Gruppe der samenspezifischen *tt*-Mutanten 1, 2, 8, 9 und 10 (Koornneef, 1990) einzuordnen. Um weitere Erkenntnisse über die zugrundeliegende Mutation zu gewinnen, ist es nötig, ähnlich wie bei der Charakterisierung der *ban*-Mutante, die Akkumulation von Intermediaten der Synthese kondensierter Tannine sowie die Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in sich entwickelnden *tt15*-Samen im Detail zu untersuchen (Devic *et al.*, 1999). Weitere Anhaltspunkte für die Funktion des TT15-Proteins sind schließlich von der Isolierung des entsprechenden Gens zu erwarten. Die von N. Focks durchgeführte Kartierung des *tt15*-Lokus im Genom (N. Focks und C. Benning, persönliche Mitteilung) ermöglicht es, hierzu einen „positional cloning“ Ansatz zu verfolgen (1.3), während die hier gegebene Beschreibung des Phänotyps die Grundlage für „forward genetic“ Ansätze, wie zum Beispiel die Isolierung einer Insertionsmutante, bilden kann.

## 4.2 Insertionsmutagenese in *A. thaliana* - ein effizientes Mittel zur Isolierung von Genen

Insertionsmutagenese eignet sich sowohl zur Identifikation von Genen, deren Mutation zu einer beobachtbaren Phänotypabweichung führt, als auch zur Isolierung von Pflanzen, in denen ein bestimmtes Gen eine Insertion enthält („forward“ und „reverse genetics“, 1.3). Beide Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit verfolgt. Ausgangspunkt des „forward genetic“-Ansatzes waren einige Pflanzen aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population (Baumann *et al.*, 1998; Wisman *et al.*, 1998), die hellere Samen produzierten als der Wildtyp. Die beobachtete Zusammensetzung dieser Stichprobe (3.1.4 und Anhang 1) kann an Hand verschiedener Überlegungen erklärt werden. Zum Beispiel sind Linien, die deutlich gelbe Samen hervorbringen, sehr viel auffälliger als solche, deren Samenfarbe sich nur schwach von der des Wildtyps unterscheidet. Daher konnten während der Herstellung der *En1*-Population 22 gelbsamige Linien, aber nur zwei mit hellbraunen Samen identifiziert werden. Da Mutationen in Strukturgenen, die für Enzyme früher Schritte der Flavonoidbiosynthese kodieren, mit hoher Wahrscheinlichkeit zu deutlichen Phänotypen führen, war zu erwarten, daß solche Linien in der Stichprobe überrepräsentiert sein würden. Darüber hinaus war auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, stabile Mutationen zu finden, weil diese im Unterschied zu solchen, die durch die Insertion eines aktiven Transposons hervorgerufen werden, auf jeden Fall in der nächsten Generation wieder auftreten. Weiterhin ließen vor allem Insertionen bzw. „footprints“ in Exons sichtbare Phänotypen erwarten. Die Tatsache, daß sie in vielen der Linien festgestellt werden konnten (Anhang 2), bedeutet demnach nicht, daß *En1* bevorzugt in kodierende Bereiche integriert, oder diese wieder verläßt. Vielmehr zeigt die Statistik bislang keine augenfällige Präferenz des Transposons für Insertionen in Introns oder Exons, Promotoren oder stromabwärts von kodierenden Regionen gelegene Bereiche. Es ist auch keine bevorzugte Orientierung relativ zum kodierenden Strang des Zielgens festzustellen (E. Wisman, persönliche Mitteilung). Die beiden unabhängigen Insertionen in jeweils unterschiedlicher Orientierung an der gleichen Position des *F3H*-Gens (3.2.3) stellen bislang die einzige Ausnahme vom statistisch zufälligen Insertionsverhalten dar. Nur an Hand eines größeren Datenbestandes kann entschieden werden, ob es sich dabei um ein rein zufälliges Ereignis oder um das Ergebnis eines sequenzabhängigen Vorganges handelt.

Die bislang dargestellten Überlegungen zur verwendeten Methodik der Mutantenisolierung erklären zum Teil die große Zahl der detektierten *tt3*- und *tt4*-Allele. Darüber hinaus ist sie wahrscheinlich auch in der Entstehung der benutzten *En1*-mutagenisierten Population begründet. Die gleichartigen Bezeichnungen der *tt3*-Allele M48, M56, M81 und M86 sowie AAA52 und AAA54 resultieren daher, daß diese Linien miteinander verwandt sind. Es liegt darum nahe zu vermuten, daß ihr Phänotyp auf je ein Integrationsereignis zurückzuführen ist, das auf einige Schwesterlinien vererbt wurde. Die Population wurde ausgehend von fünf Linien aufgebaut, die das Transposon enthielten, jedoch die für dessen Übertragung verwendete T-DNA verloren hatten (Wisman *et al.*, 1998). Insertionsorte, die bereits in der ersten Generation vorhanden waren, wurden in der Population konserviert, weil *En1* nach Exzision bevorzugt an nahe gelegenen Regionen des Genoms erneut integriert (Peterson, 1970). Das führte zu einer generellen Häufung von *En1*-Insertionen auf dem oberen Arm von Chromosom V, wo auch *TT4* liegt, sowie auf dessen unterem Arm, wo *TT3* kartiert (Koornneef, 1990).

Weitere Häufungen von Insertionen konnten auf den unteren Armen der Chromosomen I, II und III festgestellt werden (E. Wisman, persönliche Mitteilung). Auf Grund dieser Verteilung der Insertionen im Genom scheint es möglich, daß die Population zumindest auch *tt9*-, *tt10*- oder *tt15*- Allele enthält. Da diese jedoch sehr viel schwächere Phänotypen zeigen, war die Wahrscheinlichkeit, sie ohne gezieltes Durchsuchen der Population („screening“) zu entdecken, äußerst gering. Mit Hilfe eines solchen Ansatzes konnten in einer T-DNA-Population bereits *tt2*-, *tt8*- und *tt15*-Allele identifiziert werden (Nesi *et al.*, 1999). Daher sollte er auch auf die in dieser Arbeit benutzte *En1*-Population angewandt werden. Das gleiche gilt für andere Strategien, die in unterschiedlichen Populationen bereits erfolgreich zur Identifizierung verschiedener Mutanten der Flavonoidbiosynthese und ihrer Regulation eingesetzt wurden. Dazu gehört etwa die Suche nach Mutanten mit abweichender Samenentwicklung, die in einer T-DNA-Population zur Identifizierung der *ban*-Mutante führte (Albert *et al.*, 1997; Devic *et al.*, 1999), oder die Suche nach Pflanzen mit veränderter Pigmentierung vegetativer Teile, die in einer anderen *En1*-Population die Isolierung von *anl2* erlaubte (Kubo *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel für eine gezielte Vorgehensweise zur Isolierung von Mutanten stellt der Test auf veränderte Zucker-Toleranz dar, in dessen Verlauf auch *En1*-Linien mit veränderter Samenfarbe isoliert werden konnten (A. Kortstee, J. Pego und S. Smeekens, persönliche Mitteilung). Darunter befanden sich neben einigen bereits auf Grund ihrer gelben Samenfarbe identifizierten Linien auch drei weitere mit schwächeren Farbabweichungen vom Wildtyp (Anhang 1). Zwar gibt es vielfache Hinweise auf Verknüpfungen zwischen Zuckermetabolismus und Phenylpropanstoffwechsel (Mita *et al.*, 1997; Nemeth *et al.*, 1998), eine genaue Erklärung für einen Zusammenhang der im Rahmen dieses „screenings“ beobachteten Fähigkeit von Samen, in Anwesenheit hoher Saccharose- oder Mannosekonzentrationen zu keimen, mit dem *tt*-Phänotyp steht jedoch noch aus.

Schließlich könnte die *En1*-Population auch nach Mutanten der UV-Induktion der Flavonoidbiosynthese durchsucht werden. Dazu müßten die Pflanzen unter Bedingungen angezogen werden, die nicht zur Induktion dieses Stoffwechselweges führen (Licht < 20 µE; Jackson *et al.*, 1995). Diese Pflanzen müßten mit einem geeigneten Verfahren, wie dem Nachweis von Flavonolen, auf eine möglicherweise bereits vorhandene konstitutive Aktivierung des Stoffwechselweges getestet werden. Nach Induktion durch UV-Licht oder definierte andere Lichtqualitäten müßte ein erneuter Test erfolgen. Ein solches Vorgehen ist deutlich aufwendiger als beispielsweise die Identifizierung von Pflanzen, die bereits bei geringeren UV-Dosen Schäden aufweisen als der Wildtyp. Es hat aber den Vorteil, gezielt Pflanzen mit Mutationen in Genen der Flavonoidbiosynthese und ihrer Regulation zu identifizieren und nicht solche mit geringerer Vitalität oder defekter DNA-Reparatur (Harlow *et al.*, 1994; Lois und Buchanan, 1994). Begrenzender Faktor für die Effizienz eines solchen Ansatzes ist im wesentlichen der mit dem Testverfahren mögliche Probendurchsatz. Im Prinzip eignen sich dazu Dünnschichtchromatographie oder HPLC (Chapple *et al.*, 1992; Graham, 1991), die jedoch beide sehr zeitaufwendig sind. Eine Alternative bietet möglicherweise die Anwendung von Naturstoffreagenz A (3.1.2). Indem es spezifisch mit Flavonolen deutlich fluoreszierende Komplexe bildet (Sheahan und Rechnitz, 1992; Sheahan und Rechnitz, 1993), ermöglicht es den Einsatz weniger aufwendiger Systeme wie HPTLC, Papierchromatographie oder Mikrotiterplatten-Fluoreszenzlesegeräten zur Identifizierung von Mutanten mit veränderten Flavonoidgehalten.

### 4.3 *tt6* - eine klassische *tt*-Mutante enthält eine Mutation im *F3H*-Gen

Während mit *tt4* und *tt5* bereits Mutanten für CHS und CFI identifiziert worden waren, fehlte zu Beginn dieser Arbeit noch eine Mutante der *F3H*, die den dritten Schritt der Flavonoidbiosynthese katalysiert. Die dünnschichtchromatographische Analyse der Flavonoidgehalte von Blättern der *tt6*-Mutante zeigte, daß darin sowohl Flavonole, deren Synthese *FLS*-Aktivität benötigt, als auch Anthocyanidine, deren Synthese via *DFR* erfolgt, reduziert waren (3.1.1). Ähnliche Resultate hatten Shirley (1995) bei der Untersuchung von Keimlingen, Blättern und Blüten sowie Albert (1997) für Samen von *tt6*-Pflanzen erzielt. Diese Ergebnisse sprachen dafür, daß in *tt6* ein früher Schritt der Flavonoidbiosynthese gestört war und es stellte sich die Frage, ob es sich dabei um *F3H* handelte.

Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die von Pelletier (1996) ermittelte Position des *F3H*-Gens im *A. thaliana*-Genom überprüft und mit der des *tt6*-Lokus korreliert. Dazu wurde statt des in dieser Veröffentlichung verwendeten *EcoRI*-RFLP- ein *BclI*-CAPS-Marker und statt 24 der vollständige Satz von 100 RI-Linien verwendet (3.2.1). Das Ergebnis (Chromosom III bei m457) stimmte sowohl mit der von Pelletier (1996) für *F3H* gefundenen (zwischen m457 und g2778) als auch mit der ursprünglich für den *tt6*-Lokus bestimmten Position auf dem unteren Arm von Chromosom III überein (Koornneef, 1990; Koornneef, 1994). Darüber hinaus kosegregierte der für die Kartierung benutzte *Ler-F3H* CAPS-Marker streng mit dem *tt6*-Phänotyp (3.2.1). Diese Beobachtung sprach dafür, daß es sich bei der von J. Campanella und C. Town in Pelletier (1996) vorgeschlagenen Kartenposition für *tt6* auf dem oberen Arm von Chromosom V um einen Irrtum handelt, der eventuell auf eine Verwechslung mit *FLS* zurückzuführen ist.

In Übereinstimmung mit der Annahme, daß der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält, konnte in der *F3H*-Sequenz aus *tt6* eine Punktmutation nachgewiesen werden (3.2.2). Der festgestellte Basenaustausch kann durch das zur Herstellung der Mutante verwendete Mutagen Ethylmethylsulfonat (EMS) erklärt werden, das gewöhnlich Substitutionen von G:C nach A:T auslöst. Den genetischen Beweis brachte schließlich die Untersuchung von drei Transposon-Insertionsmutanten mit Insertionen im *F3H*-Gen, die jeweils in Testkreuzungen nicht in der Lage waren, die *tt6*-Mutation zu komplementieren (3.1.4). Wie durch die Analyse der *En1*-Insertionsmuster dieser Linien gezeigt werden konnte, handelte es sich dabei um unabhängige

*F3H*-Allele (3.2.3). Alle drei Linien führten zu stärkeren *tt*-Phänotypen als die klassische *tt6*-Mutation (*tt6-1*). Das deutete darauf hin, daß die Leserasterverschiebungen im zweiten Exon der *F3H*-Gene dieser Linien zu vollständig funktionslosen *F3H*-Proteinen führen, während die Punktmutation in *tt6-1* möglicherweise nicht vollständig wirkt. Diese Unvollständigkeit hatte bislang die Identifikation von *tt6-1* als *F3H*-Mutante behindert, obwohl auf Grund der Stellung des Enzyms im Stoffwechselweg erwartet werden konnte, daß sich eine entsprechende Mutante bereits unter den klassischen *tt*-Linien befand. Die Unvollständigkeit der Mutation in *tt6-1* könnte auch auf das Vorliegen eines weiteren Locus im Landsberg *erecta* Hintergrund zurückzuführen sein, der eine *F3H*-Aktivität vermittelt und im Columbia-Hintergrund der *En1*-Linien fehlt. Schließlich könnten die reduzierten *F3H*-mRNA-Mengen, die in allen Mutanten nach Lichtinduktion gefunden wurden (3.2.4), durch Destabilisierung der mRNAs durch vorzeitige Stop-Kodons erklärt werden (Que *et al.*, 1997).

Mit der Identifizierung von *tt6* als *F3H*-Mutante sind nunmehr in *A. thaliana* Mutanten in allen Schritten der Biosynthese der Flavonole bekannt. Da Flavonole auf Grund ihrer Struktur in der Lage sind, kurzwelliges energiereiches Licht zu absorbieren (Lois, 1994), wird ihnen eine Funktion als UV-Schutzpigmente zugeschrieben. In Übereinstimmung mit dieser Annahme akkumulieren in den Blättern von *A. thaliana*-Pflanzen nach UV-Bestrahlung Glykoside der Flavonole Kämpferol und Quercetin (1.2). Mutanten mit Defekten in Genen, deren Produkte für die Biosynthese dieser Komponenten benötigt werden, wie *tt4* und *5* oder *uvs*, weisen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht auf (Li *et al.*, 1993; Lois und Buchanan, 1994). Allerdings absorbieren Sinapinsäurederivate Licht der betreffenden Wellenlängen viel stärker als Flavonole (Landry *et al.*, 1995; Sheahan, 1996). Es stellt sich daher schon seit längerem die Frage, ob Flavonoide oder Sinapinsäureester die wesentlichen UV-Schutzpigmente in *A. thaliana* sind.

Die bislang zur Verfügung stehende klassische *tt5*-Mutante ist für Experimente zur Beantwortung dieser Frage wenig geeignet, weil sie zusätzlich zum *tt*-Phänotyp weitere Abweichungen vom Wildtyp zeigt (Bharti und Khurana, 1997; Shirley *et al.*, 1992). Diese könnten auf Rearrangements im Genom zurückgehen, die durch die zur Herstellung der Mutante verwendete Neutronenstrahlung verursacht wurden. Das in dieser Arbeit identifizier-

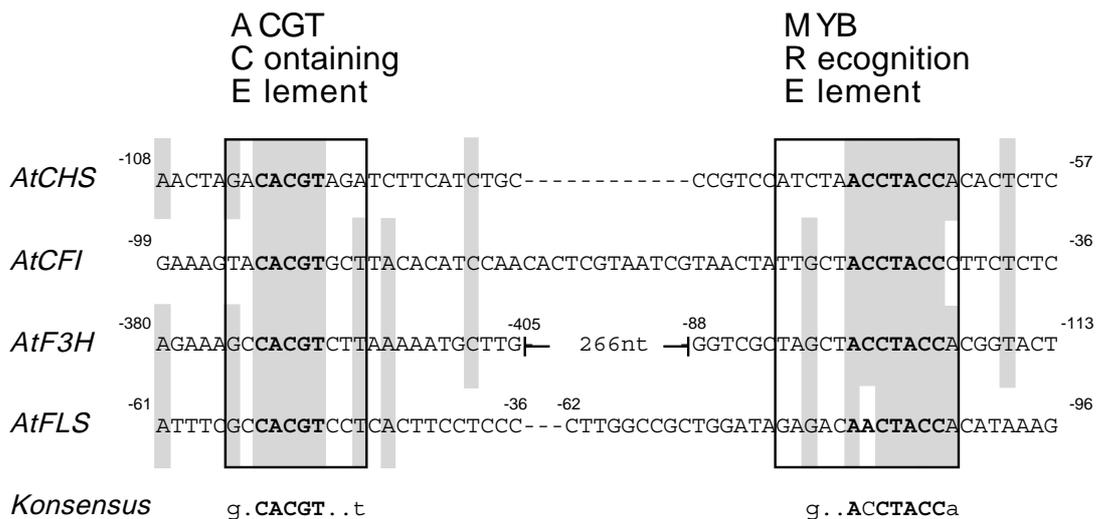
te neue *tt5*-Allel, die *F3H*-Null-Allele sowie die in einer vorangegangenen Arbeit identifizierte *FLS*-Mutante (Hartmann, 1997) eröffnen neue Möglichkeiten zur Untersuchung der UV-Schutzmechanismen in *A. thaliana*. Sie demonstrieren jedoch zugleich die Nachteile der Transposonmutagenese im Vergleich zur Verwendung von T DNA- oder chemischen Mutagenesensystemen. Das ist zum einen das mögliche Auftreten von revertanten Sektoren (1.3) in der *FLS*-Mutante, die auf der Insertion des Transposons im *FLS*-Gen beruht. Als Grundlage weiterer Arbeiten müßte zunächst in der Nachkommenschaft dieser Linie nach Pflanzen gesucht werden, in denen die Mutation bei einem Exzisionsereignis durch einen „footprint“ stabilisiert wurde. Zum anderen enthalten die Genome aller Linien durch die Anwesenheit mehrerer Insertionen und im Verlauf der Herstellung angehäufte „footprints“ mehr oder weniger starke Veränderungen. Diese Veränderungen müßten daher erst durch wiederholtes Rückkreuzen gegen Wildtyp entfernt werden, bevor die Mutanten in Bezug auf ihre UV-Resistenz sowie ihre Flavonoid- und Sinapinsäuregehalte mit dem Wildtyp verglichen werden könnten.

Der Gehalt an Sinapylestern ist in der klassischen *tt5*-Mutante geringer als im Wildtyp, während er in *tt4* höher liegt (Li *et al.*, 1993). Als Erklärung für diese Beobachtungen ist denkbar, daß bei einer Anhäufung von Intermediaten der Flavonoidbiosynthese auf Grund einer Blockmutation die Produkte des generellen Phenylpropanstoffwechsels in die Synthese von Sinapaten umgeleitet werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß in einem solchen Fall durch eine Rückkoppelung der Fluß von Metaboliten durch den generellen Phenylpropanstoffwechselweg herunter reguliert wird. Ein Anhaltspunkt für solche regulatorischen Effekte von Intermediaten auf die Balance zwischen Stoffwechselwegen ist zum Beispiel die Tatsache, daß in Bohnen-Suspensionszellen die Zugabe von *trans*-Zimtsäure, dem Produkt der PAL-Reaktion, die Induktion von *PAL* und *CHS* durch einen pilzlichen Elicitor verhindert (Loake *et al.*, 1991; Loake *et al.*, 1992). Untersuchungen neuer *tt5*- und *tt6*- Allele sowie der *FLS*-Mutante könnten somit auch neue Erkenntnisse über regulatorische Abhängigkeiten und Wechselwirkungen zwischen der Biosynthese von Sinapylestern und Flavonoiden ermöglichen.

#### 4.4 Die Regulation der lichtabhängigen Expression von *F3H* erfolgt über die gleichen *cis*-Elemente wie die von *CHS*, *CFI* und *FLS*

Zu den am besten untersuchten regulatorischen Vorgängen im Bereich der Flavonoidbiosynthese gehört ihre Induktion durch Licht (1.1.3). So werden zum Beispiel *CHS*, *CFI* und *FLS* bei Bestrahlung von *A. thaliana*-Pflanzen, -Zellen oder -Protoplasten mit UV-haltigem Weißlicht koordiniert exprimiert. Die Promotorstrukturen dieser Gene sind in Bezug auf die Lichtinduzierbarkeit schon sehr gut charakterisiert (Hartmann, 1997). Dazu wurde jeweils ein lichtresponsiver Minimalpromotor eingegrenzt, in dem dann je eine lichtregulatorische Einheit (LRU) definiert werden konnte. Auch die Expression von *F3H* ist lichtinduziert (3.2.4) und erfolgt koordiniert mit der der anderen Gene der Biosynthese von Flavonolen (Hartmann, 1997). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen am *F3H*-Promotor zeigten, daß die Länge des lichtinduzierbaren Minimalpromotors 483 bp beträgt (3.3.2), während bei *CHS*, *CFI* und *FLS* eine minimale Promotorlänge von 153 bp bis 164 bp ausreichend ist. Detailliertere Untersuchungen ergaben, daß im *F3H*-Promotor eine Kombination der gleichen *cis*-Elemente für die Lichtinduzierbarkeit verantwortlich ist wie in den übrigen Promotoren (3.3.3). Dabei handelte es sich um eine Sequenz mit dem Kernmotiv ACGT sowie eine, die dem Konsensus für MYB-Bindestellen entsprach (Argüello-Astorga und Herrera-Estrella, 1996). Um in Analogie zu den anderen Promotoren von „ACGT Containing Element“ ( $ACE^{AtF3H}$ ) und „MYB Recognition Element“ ( $MRE^{AtF3H}$ ) sprechen zu können, mußte definitionsgemäß nachgewiesen werden, daß die identifizierten Elemente von den entsprechenden Faktoren gebunden werden können. Die dazu nötigen Gelretardierungsexperimente wurden von U. Hartmann durchgeführt. In Abbildung 33 ist ein Vergleich der LRUs der vier bislang in *A. thaliana* untersuchten Promotoren von Genen der Flavonoidbiosynthese dargestellt.

Die abgeleitete Konsensussequenz der ACEs ist CACGT. Nur das im *CFI*-Promotor identifizierte ACE enthält am 3'-Ende ein G und erfüllt damit zugleich den Konsensus einer von bZIP-Faktoren erkannten G-Box (Foster *et al.*, 1994; Menkens *et al.*, 1995) und einer, auch als R-Motiv bezeichneten, bHLH-Bindestelle (CANNTG; Blackwell und Weitraub, 1990; Bodeau und Walbot, 1996). Die MRE-Konsensussequenz entspricht dem Konsensus P-Box-ähnlicher Motive (A/TACCA/TAA/CC; Sablowski *et al.*, 1994).



**Abbildung 33: Sequenzvergleich von  $LRU^{AtCHS}$ ,  $LRU^{AtCFI}$ ,  $LRU^{AtF3H}$  und  $LRU^{AtFLS}$ .**

Sequenzen, die in mindestens drei der untersuchten LRUs übereinstimmen sind grau unterlegt. Die ACE- und MRE-Sequenzen sind eingerahmt, wobei die jeweilige Kernsequenz fett gedruckt ist. Die schwarzen Balken unter den Sequenzen markieren die Nukleotide, die für die Promotoranalysen mutiert wurden. Unter dem Sequenzvergleich ist die abgeleitete Konsensussequenz angegeben.

Schon die Analyse der Promotoren von *CHS*, *CFI* und *FLS* hatte gezeigt, daß die Abstände zwischen den einzelnen Elementen der LRUs nicht streng konserviert sind (Hartmann, 1997). Während der Abstand zwischen diesen Elementen in den übrigen Promotoren jedoch nur 17 bp bis maximal 29 bp beträgt, sind sie im *F3H*-Promotor durch 278 Nukleotide voneinander getrennt. Wie in den Promotoren von *CHS* und *CFI* sind die lichtresponsiven *cis*-Elemente im *F3H*-Promotor so angeordnet, daß das MRE näher am Start-ATG liegt und sich das ACE weiter stromaufwärts befindet. Beide Elemente liegen im *F3H*-Promotor auf dem Gegenstrang, was jedoch für die Erkennung des palindromischen ACGT-Elementes durch die als Dimere bindenden bZIP-Faktoren wenig Bedeutung haben sollte. Im Vergleich dazu befindet sich im *FLS*-Promotor nur das MRE auf dem Gegenstrang und liegt im Unterschied zu den Promotoren der anderen drei Gene weiter stromaufwärts als das ACE.

Die Einführung von Mutationen in MRS2 sowie ACS3 und 5 hatte keinen deutlich negativen Einfluß auf die Lichtaktivierbarkeit des *F3H*-Promotors. Obwohl die Kernsequenzen dieser Elemente dem Konsensus eines MRE bzw. ACE entsprechen, scheinen sie somit für die Lichtregulation der *F3H*-Expression nicht essentiell zu sein. Für diese Beobachtung gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Falls MRS2, ACS3 oder 5 von den zugehörigen Faktoren gebunden werden, könnte es sein, daß diese auf Grund ihrer Lokalisation im Promotor weder direkt noch indirekt mit dem Transkriptionsapparat interagieren und so nicht an der Initiation der Transkription mitwirken können. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß diese Elemente auf Grund von abweichenden Basen in der Umgebung der Kernsequenz nicht oder nur schwach von den entsprechenden Faktoren gebunden werden. Eine solche Beeinflussung der Bindungsspezifität durch Positionen außerhalb des Kernmotivs konnte für bZIP-Faktoren in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden (Izawa *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1992). Eine schwache Bindung von Transkriptionsfaktoren an MRS2, ACS1-3 oder 5 könnte die beobachtete Restaktivität des *F3H*-Promotors nach alleiniger Mutation von ACE oder MRE erklären. Um die Ursache dieser Aktivität experimentell zu überprüfen, müßten weitere Reporterkonstrukte hergestellt und getestet werden, die Mutationen sowohl im ACE als auch in ACS1-3 oder 5 bzw. MRE und MRS2 enthalten.

Im Unterschied zu den Promotoren der anderen Gene der Flavonoidbiosynthese enthält der *AtF3H*-Promotor ein Element, das in Bezug auf seine Lage relativ zum Transkriptionsstart und von seiner Sequenz her die Kriterien für eine TATA-Box erfüllt (Joshi, 1987). Die unterschiedliche Organisation des *AtF3H*-Promotors im Vergleich zu denen von *CHS* und *CFI* auf der einen und *FLS* auf der anderen Seite könnte auf eine unter anderen Bedingungen als denen der UV-Induktion abweichende Regulation dieses Gens zurückzuführen sein. Beispiele dafür gibt es unter anderem aus *Z. mays* und *A. majus*. Im Verlauf der Blütenentwicklung von *A. majus* wird *F3H* gemeinsam mit *DFR*, nicht aber mit *CHS* und *CFI* reguliert (Jackson *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1991). Auch in Keimlingen von *Z. mays* erfolgt die Regulation der *F3H*-Expression gemeinsam mit *DFR*, nicht aber *CHS* (Deboo *et al.*, 1995; Taylor und Briggs, 1990).

Obwohl der *F3H*-Promotor also anders organisiert ist als die der anderen nach UV-Bestrahlung in *A. thaliana* koordiniert exprimierten Gene, sprechen verschiedene Daten dafür, daß ihre UV-Induktion durch die gleichen Faktoren reguliert wird: In den Promotoren aller vier Gene sind dieselben *cis*-Elemente kritisch für die Lichtinduzierbarkeit, für die Expression ist jeweils *de novo* Proteinsynthese nötig und in Bindungsstudien mit diesen Elementen und Proteinextrakten aus Zellkernen konnten jeweils Komplexe der gleichen Größe beobachtet werden (Hartmann, 1997 und Hartmann, persönliche Mitteilung). Die entsprechenden Faktoren könnten möglicherweise mit Hilfe von Mutanten der UV-Induktion der Flavonoidbiosynthese identifiziert werden (4.2). Es könnte jedoch auch eine „reverse“-Strategie, wie sie zur Identifikation von Insertionen im *F3H*-Gen benutzt wurde (3.2.3), zur Isolierung von Mutanten angewandt werden, die Insertionen in Genen für potentielle Regulatoren der Flavonoidbiosynthese aufweisen. Im Rahmen des *A.-thaliana*-Genomprojektes wurden bereits zahlreiche Sequenzen von Genen, die für Transkriptionsfaktoren vom MYB- oder bZIP-Typ kodieren, bestimmt, für die Insertionsmutanten die Verbindung zwischen Gen und Funktion herstellen könnten. Erste Ansätze in dieser Richtung zeigen jedoch, daß Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von Signaltransduktionswegen häufig entweder essentiell, redundant, oder nur unter ganz speziellen Bedingungen in bestimmten Geweben aktiv sind. Nullmutationen in den zugehörigen Genen sind daher vielfach entweder lethal oder führen nicht oder nicht zu einer auffälligen Abweichung des Phänotyps vom Wildtyp.

## 4.5 Die *TTI*-ähnlichen Gene - eine neue Klasse pflanzlicher Zinkfinger-Proteine

### 4.5.1 Die Isolierung des *TTI*-Gens

Auf Grund eines deutlich sichtbaren Phänotyps konnte die *ttl*-Mutante isoliert, der Gruppe der samenspezifischen *tt*-Mutanten zugeordnet sowie der zugehörige Locus kartiert werden (Koorneef, 1990). Eine weitere Beschreibung phänotypischer Eigenschaften erfolgte durch Shirley (1995) und im Zuge der Charakterisierung von *banyuls* erwies sich der *ban*-Phänotyp als epistatisch über *ttl* (Albert *et al.*, 1997). Auf Grund der Tatsache, daß eine *ttl/ban*-Doppelmutante sowohl vorzeitig rote Pigmente in der Samenschale akkumuliert als auch in der Lage ist, in einer an das Endothel angrenzenden Zellschicht im Bereich der Mikropyle des Samens Catechine zu bilden, wurde vermutet, daß es sich bei *TTI* um einen Regulator von *BAN* oder einer weiteren LCR-Aktivität handelt (Devic *et al.*, 1999). Darüber hinaus war jedoch bei Beginn dieser Arbeit wenig über *ttl* bekannt.

In dieser Arbeit gelang es, ausgehend von der Pflanze 5K60.3, die auf Grund ihrer gelben Samenfarbe in einer *En1*-mutagenisierten *A. thaliana*-Population identifiziert wurde und deren Nachkommen in Testkreuzungen die *ttl*-Mutation nicht komplementieren konnten (3.1.4), das *TTI*-Gen zu isolieren. Dazu wurde zunächst eine Kosegregationsanalyse durchgeführt, um zu zeigen, daß der *ttl*-Locus tatsächlich durch die Anwesenheit des Transposons markiert war (3.4.1). Dabei erwies es sich als vorteilhaft, daß die Zahl der Insertionen pro Linie der in dieser Arbeit verwendeten Population im Vergleich zu anderen transposonbasierten Systemen recht niedrig ist. Mit durchschnittlich sechs (Wisman *et al.*, 1998) liegt sie in einem Bereich, der die Anwendung von konventionellen DNA-Gel-Blot-Techniken zur Identifikation von Banden, die mit einem Phänotyp kosegregieren, sowie einfacher PCR-Methoden zu ihrer Isolierung erlaubt. Die RACE-Methode erwies sich als sehr effizientes Mittel der Gewinnung flankierender Sequenzen (3.4.2). Andere Möglichkeiten wären hier Inverse-, TAIL- oder Linker-PCR gewesen (zusammengefaßt in Maes *et al.*, 1999). Es konnten flankierende Bereiche von vier der vermuteten fünf Insertionen amplifiziert werden.

Die flankierenden DNAs, die auf Grund ihrer Kartenposition oder mangelnder Kosegregation mit dem *ttl*-Phänotyp nicht weiter untersucht wurden, repräsentierten Insertionen in Genen, die für ein DNA-bindendes Protein, eine putative Kinase sowie ein Protein mit Ähnlichkeit zu sauren Phosphatasen kodierten. Die Anwesenheit von mehreren Insertionen, die zu weiteren Phänotypen führen können, stellt einen Nachteil von Transposon- gegenüber T-DNA-Systemen dar. Aus diesem Grund und, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch revertante Sektoren zu vermeiden, wurde zur späteren Charakterisierung des *ttl*-Phänotyps die klassische EMS-Mutante verwendet. Andererseits wurde an der Linie 5K60 außer dem *ttl*-Phänotyp unter den verwendeten Bedingungen keine weiteren Unterschiede zum Wildtyp beobachtet.

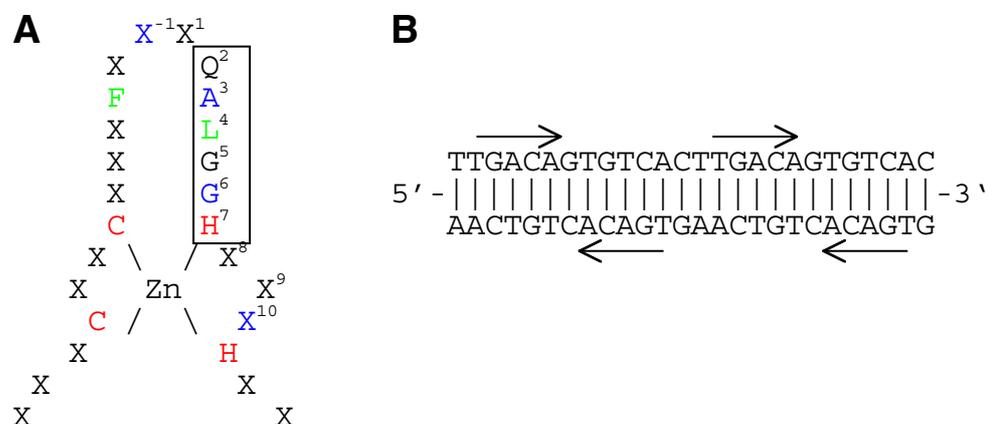
Die Komplementation des *ttl*-Phänotyps durch Transformation von *ttl*-Pflanzen mit einem DNA-Fragment, das mit der flankierenden DNA der kosegregierenden *EnI*-Insertion hybridisierte, bewies, daß das verwendete 12 kb große Fragment das *TTI*-Gen enthielt (3.4.6). Bei der Bestimmung der Nukleotidsequenz dieses Fragmentes erwies sich das GPS-Kit (2.3.8) als äußerst hilfreich und effizient. Es zeigte sich, daß die Sequenz eine ausgedehnte Wiederholung des Motivs TA sowie eine des Motivs AAG enthielt (3.4.7.1). Dabei handelt es sich um zwei der häufigsten in *A. thaliana* gefundenen Mikrosatelliten-Motive, für die ein genomweites Auftreten auch innerhalb kodierender Bereiche beschrieben ist (Depeiges *et al.*, 1995). Darüber hinaus enthielt die Sequenz eine ausgedehnte Duplikation. Diese Duplikation führte beim Versuch des „primer walkings“ dazu, daß die verwendeten Sequenzierprimer mehrere Bindestellen fanden und daher keine oder überlagernde Sequenzen lieferten. Auch die bei der Anwendung der „random subcloning“-Methode zur Bestimmung der Sequenz beobachteten Kreuzhybridisierungen konnten durch diese Duplikation erklärt werden.

Die Veröffentlichung der Sequenz des BAC-Klons F1106 bestätigte weitgehend die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten. Der innerhalb des 12 kb *SpeI*-Fragmentes duplizierte Bereich findet sich auf diesem BAC noch in über 20 mehr oder weniger vollständigen Wiederholungen. Häufungen repetitiver Elemente treten vor allem in zentromernahen Regionen auf, wo sie eventuell Funktionen bei der Segregation und der Bewahrung der Integrität der Chromosomen ausüben (Heslop-Harrison *et al.*, 1999). Das Zentromer von Chromosom I wurde in der Nähe des Markers m133 bei etwa 59 cM lokalisiert (Round *et al.*, 1997). Mit Hilfe der RI-

Linien und der IGF-BAC-Bibliothek konnte die von Koornneef (1990) für den *ttl*-Lokus bestimmte Position von etwa 55 cM in der Nähe des Zentromers von Chromosom I bestätigt werden (3.4.3-5). Die Zentromere der Chromosomen wurden auf Grund der Schwierigkeiten, die das Sequenzieren derartig komplexer repetitiver Bereiche bereitet, im Rahmen des *A. thaliana*-Genomprojektes zunächst ausgespart. Daher muß offen gelassen werden, ob es sich bei dem hier gefundenen Element um eine Sequenz handelt, die für die Zentromere aller *A. thaliana*-Chromosomen typisch ist.

#### 4.5.2 TT1 und ähnliche pflanzliche Zinkfinger-Proteine

Die Analyse der Sequenz des *TT1*-Gens mit verschiedenen Computerprogrammen ergab, daß es für ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu Zinkfinger-Proteinen kodierte (3.4.7). Der Begriff „Zinkfinger“ bezeichnet Sequenzmotive, in denen Cysteine und/oder Histidine mit einem oder mehreren Zink-Atomen lokale Peptidstrukturen mit spezifischen Funktionen ausbilden. Ein Beispiel für eine solche Struktur ist in Abbildung 34A dargestellt.



**Abbildung 34: Struktur eines pflanzlichen Zinkfinger-Motivs vom C2H2-Typ sowie der von ZPT2-1 erkannten DNA Sequenz.**

In **A** ist die generelle Struktur eines Zinkfinger-Motiven vom C2H2-Typ dargestellt. In allen bisher beschriebenen Motiven dieses Typs konservierte Positionen sind farblich hervorgehoben. Zink-bindene Aminosäuren sind rot, hydrophobe grün und die DNA kontaktierende blau dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit der ersten Position des putativen  $\alpha$ -helicalen Bereiches (+1). Der Kasten markiert das in vielen pflanzlichen Zinkfinger-Proteinen konservierte QALGGH-Motiv (nach Takatsuji, 1999, verändert). **B** zeigt die von ZPT2-1 in Gelretardierungsexperimenten gebundene DNA-Sequenz (Takatsuji *et al.*, 1994).

Nach der Anordnung der Zink-bindenden Aminosäuren werden verschiedene Gruppen von Zinkfinger-Motiven unterschieden (Takatsuji, 1998). Einige Klassen von Zinkfinger-Motiven sind Teil der DNA-Binde-Domänen von Transkriptionsfaktoren, während andere Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Mackay und Crossley, 1998).

Die in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *TT1* identifizierten Zinkfinger-Motive gehören zwei verschiedenen Typen an. Während das weiter C-terminal gelegene einen sogenannten imperfekten Finger vom C2HC-Typ darstellt, zeigt das erste Ähnlichkeit zu den in Transkriptionsfaktoren wie TFIIIA aus *Xenopus* oder KRÜPPEL aus *Drosophila* gefundenen Motiven (Rosenberg *et al.*, 1986). Es entspricht der Konsensus-Sequenz  $\underline{C}$ -X<sub>2</sub>- $\underline{C}$ -X<sub>3</sub>-F-X<sub>5</sub>-L-X<sub>2</sub>- $\underline{H}$ -X<sub>3</sub>- $\underline{H}$  und wird daher auch als C2H2-Typ bezeichnet. Die in dieser Sequenz konservierten Cysteine und Histidine dienen der Zink-Bindung, während die hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und Leucin für die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur benötigt werden. Der erste pflanzliche Zinkfinger des C2H2-Typs wurde im Protein ZPT2-1 aus *P. hybrida* entdeckt, das auf Grund seiner Interaktion mit dem Promotor eines Gens für ein Enzym des Shikimatweges identifiziert wurde (Takatsuji *et al.*, 1992). ZPT2-1 und verwandte Proteine enthalten zwei Zinkfinger-Motive des in Abbildung 34A dargestellten Typs. Sie binden jeweils spezifisch die in Abbildung 34B dargestellte DNA-Sequenz, die aus zwei kurzen invertierten Sequenzwiederholungen besteht. Vergleiche der Bindungsspezifität unterschiedlicher Proteine dieses Typs zeigten, daß der Abstand zwischen den beiden Zinkfinger-Motiven im Protein den bevorzugten Abstand zwischen den erkannten DNA-Abschnitten bestimmt (Takatsuji *et al.*, 1994). Mittlerweile sind mehr als 30 pflanzliche Gene bekannt, die für Proteine mit einem bis vier Zinkfinger-Motiven vom C2H2-Typ kodieren. Zu den am besten untersuchten Proteinen mit einem Motiv dieser Art gehört SUPERMAN aus *A. thaliana*, für das eine Funktion in der Regulation der Entwicklung verschiedener Blütenorgane gezeigt werden konnte (Sakai *et al.*, 1995). Weitere *A. thaliana* Proteine mit einem Zinkfinger sind ZFP1 bis 8 (Tague und Goodman, 1995). ZAT2 bis 12 sowie STZ, für das eine Rolle in der Salztoleranz nachgewiesen wurde (Lippuner *et al.*, 1996), enthalten zwei, ZAT1 drei C2H2-Zinkfinger-Motive (Meissner und Michael, 1997).

Zwei auffällige strukturelle Besonderheiten unterscheiden pflanzliche C2H2-Zinkfinger-Proteine von denen anderer Eukaryoten. Erstens sind die Abstände zwischen einzelnen Zinkfinger-Motiven relativ groß und variabel, während sie in tierischen Zinkfinger-Proteinen mit meistens sieben Aminosäuren kurz und von festgelegter Länge sind. Zweitens enthalten die weitaus meisten aus Pflanzen bekannten C2H2-Zinkfinger die konservierte Sequenz QALGGH (Takatsuji, 1999). Sie liegt in einem  $\alpha$ -helicalen Bereich der Struktur, der direkt mit der DNA interagiert, und enthält zwei der drei Positionen, die die DNA-Bindungsspezifität tierischer Zinkfinger-Proteine bestimmen [Jacobs, 1992 #1733]. *In vitro*-Bindungsstudien mit mutierten Proteinen haben gezeigt, daß diese Sequenz auch in Pflanzen die DNA-Bindung bestimmt (Kubo *et al.*, 1998). Für die Proteine ZPT2-2 und ZPT2-3 aus *P. hybrida* konnte gezeigt werden, daß auch die Position 10 die Bindungsspezifität beeinflusst (Takatsuji, 1996).

Nur zwei der bislang in der Literatur beschriebenen pflanzlichen C2H2-Zinkfinger-Proteine fehlt das QALGGH-Motiv: PCP1 aus *Solanum tuberosum* (Kühn und Frommer, 1995) und ID1 aus *Z. mays* (Colasanti *et al.*, 1998). PCP1 wurde isoliert, weil dieser Faktor einem Hefestamm mit defektem Saccharose-Transporter das Wachstum auf Saccharose ermöglicht. Dies geschieht vermutlich durch Aktivierung eines Transporters oder einer sekretierten Invertase. ID1 reguliert die Produktion eines Signals in den Blättern von *Z. mays*, das für den Übergang zur reproduktiven Entwicklung notwendig ist. Die für alle bislang erwähnten pflanzlichen Zinkfinger-Proteine vermuteten oder nachgewiesenen regulatorischen Funktionen legen nahe, daß es sich auch bei TT1 um ein regulatorisches Protein handelt.

*PCP1* und *ID1* sind die einzigen funktionell charakterisierten Sequenzen mit höherer Sequenzähnlichkeit zu *TT1*. Gemeinsames Merkmal der von ihnen kodierten Proteine ist, daß sie sowohl ein Zinkfinger-Motiv vom C2H2- als auch eines vom C2HC-Typ enthalten, die jeweils nicht das QALGGH-Motiv aufweisen. Die Genbank des NCBI enthält mittlerweile mehrere andere Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu *PCP1* und *ID1*.<sup>\*</sup> Es konnten jedoch darüber hinaus sechs Sequenzen identifiziert werden, die eine höhere Ähnlichkeit zu *TT1* aufweisen (3.4.8) und sich insgesamt deutlich von den beiden anderen Genen unterschei-

---

<sup>\*</sup> Beispiele für GenBank-Einträge mit höherer Ähnlichkeit zu *PCP1* und *ID1* sind etwa AC005936-43, AC005936-45, AC002330, AB005239, AB005240, AF0058757, AB005243 oder AB011483.

den. Es handelt sich dabei um vier genomische Sequenzen aus *A. thaliana*, eine EST-Sequenz aus *Glycine max* sowie ein genomisches Fragment aus *Hordeum vulgare*.

Während in PCP1 und ID1 die Zinkfinger-Motive aminoterminal lokalisiert sind, liegen sie in den TT1-ähnlichen Proteinen carboxyterminal. In diesem Bereich findet sich die größte Sequenzähnlichkeit zwischen den TT1-ähnlichen Proteinen (Abbildung 35). Die Ähnlichkeit beginnt bereits 16 Aminosäuren vor dem ersten Zinkfinger-Motiv, und endet erst etwa 30 Aminosäuren nach dem zweiten. Sie umfaßt auch den Bereich zwischen den Fingern, der eine Länge von 63 Aminosäuren hat. Nur das N-terminale Zinkfinger-Motiv enthält die in allen C2H2-Zinkfingern konservierten Positionen Phenylalanin und Leucin. Der C-terminale nicht kanonische Finger weist an diesen Positionen in TT1 anstelle des Phenylalanins ein Leucin und in allen TT1-ähnlichen Sequenzen anstelle des Leucins (+4) ein Tryptophan auf. Damit handelt es sich jeweils um konservative Ersetzungen der hydrophoben Aminosäuren, die für die Ausbildung der Sekundärstruktur benötigt werden. Die für die DNA-Bindungsspezifität verantwortlichen Aminosäuren unterscheiden sich jeweils zwischen dem ersten und dem zweiten Finger, sind jedoch in allen vier *A. thaliana*-Sequenzen identisch. Diese Beobachtungen könnten dafür sprechen, daß die C-terminalen Bereiche von TT1 und den TT1-ähnlichen Proteinen DNA-Bindedomänen darstellen, die jeweils ähnliche *cis*-Elemente erkennen.

**Legende zu Abbildung 35 (siehe folgende Seite):**

TT1-ähnliche Sequenzen („*TT1 like sequences*“, *TLS*) wurden in der Gendatenbank des NCBI mit dem Blast-Algorithmus identifiziert. *AtTT1* (AF190298, siehe Anhang 8), *AtTLS1* (AL049660), *AtTLS2* (AC011438), *AtTLS3* (AB025629), *AtTLS4* (AC006085.9), *GmTLS1* (AW278047), *HvTLS1* (AJ234704). Für AC006085.9 und AB025629 wurde gegenüber der Annotation der Datenbankeinträge, analog zu der für *TT1* und AL049660 experimentell bestätigten, eine andere Akzeptor-Spleiß-Stelle gewählt, um den Bereich der Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen zu vergrößern. Die farbige Kodierung der Aminosäuren innerhalb der Zinkfinger-Motive entspricht der in Abbildung 34A. Ein saurer Bereich in TT1 ist unterstrichen, die konservierten putativen Kernlokalisierungssignale sind eingerahmt.



Zu den im carboxyterminalen Bereich aller Sequenzen konservierten Domänen gehören auch zwei kurze Abschnitte von jeweils drei basischen Aminosäuren und einem Histidin (KRKH bzw. KHKR), die als Kernlokalisierungssignale dienen könnten (Raikhel, 1992). Die Ähnlichkeiten der Proteine im aminoterminalen Bereich dagegen sind gering. Viele der Sequenzen enthalten verschiedene serin- und/oder threoninreiche Abschnitte (z.B. *AtTT1*, *AtTLS2* und 4 zwischen Position 100 und 120 in Abbildung 35 oder *AtTLS1* zwischen 205 und 215). Solche Regionen werden häufig in Transkriptionsfaktoren gefunden und repräsentieren mögliche Phosphorylierungsstellen. Phosphorylierung kann die zelluläre Lokalisation, DNA-Bindung, Transaktivierung und den Umsatz von Transkriptionsfaktoren regulieren (Liu *et al.*, 1999). Weiterhin enthalten manche der Sequenzen Abschnitte, in denen wiederholt Leucine vorkommen (z.B. in *AtTT1* der Bereich 118-157, in *AtTLS3* 1-64 oder die offenbar in allen *A. thaliana*-Sequenzen konservierten Positionen 183-192). Für repetitive Leucin-Strukturen wie leucinreiche Wiederholungen („leucine-rich repeats“, LRR) konnte eine Beteiligung an Protein-Protein Wechselwirkungen nachgewiesen werden (Kobe und Deisenhofer, 1994). *TT1* enthält im aminoterminalen Bereich schließlich einen auffälligen Strang Glutaminsäure-Einheiten, während in den anderen Sequenzen vor allem Asparaginsäure und Prolin gehäuft auftreten. Diese drei Aminosäuren sind wichtige Bestandteile verschiedener Klassen von Aktivierungsdomänen (Mitchell und Tjian, 1989). Die mögliche Anwesenheit der verschiedenen erwähnten Domänen spricht ebenfalls dafür, daß es sich bei *TT1* und den *TT1*-ähnlichen um regulatorische Proteine handelt.

Obwohl das *TT1*-Gen im 3'-Bereich eine hohe Ähnlichkeit zu den vier anderen Sequenzen aufweist, sprechen die Ergebnisse der DNA-Gel-Blot-Analysen (3.4.9) und die Tatsache, daß die *tt1*-Mutation zu einer deutlich sichtbaren Phänotypabweichung führt, dafür, daß das *TT1*-Gen nur in einer Kopie im Genom von *A. thaliana* vorliegt. Die aus dem genomischen Fragment aus *H. vulgare* abgeleitete Peptidsequenz weist eine Identität von 72% und 82% Ähnlichkeit zu *TT1* auf. Allerdings enthält sie nur das Ende des ersten Zinkfinger-Motivs und den größten Teil des anschließenden Bereiches und erlaubt daher keine Aussage über die Anwesenheit eines zweiten Zinkfingers. Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit kann jedoch davon ausgegangen werden, daß es sich um ein *TT1*-ähnliches Protein handelt. Das könnte bedeuten, daß solche Proteine schon vor der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen

existierten. Die EST-Sequenz aus *G. max* belegt, daß TT1-ähnliche Gene auch in anderen Pflanzenarten als *A. thaliana* exprimiert werden. Da bei bisherigen Ansätzen zur Isolierung pflanzlicher C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Proteine jedoch häufig DNA-Sonden oder PCR-Primer verwendet wurden, die für das QALGGH-Motiv kodierende Sequenzen detektierten, konnte auf diese Weise bislang kein Protein ohne dieses Motiv isoliert werden. Die *TT1*-ähnlichen Gene einerseits und die *PCPI*- und *IDI*-ähnlichen Gene andererseits könnten somit zwei Untergruppen einer neuartigen Familie von pflanzlichen Zinkfinger-Proteinen darstellen. Als gemeinsames Merkmal dieser Gruppe könnte bis zur Schaffung einer positiven Definition auf der Grundlage eines umfassenderen Datenbestandes das Fehlen des QALGGH-Motivs angesehen werden.\*

#### 4.5.3 Mögliche Funktion von TT1

Um Anhaltspunkte für die möglicherweise von TT1 regulierten Vorgänge zu erhalten, wurde die Expression verschiedener Gene der Flavonoidbiosynthese in mehreren Organen von Landsberg *erecta* Wildtyp und *tt1*-Mutante untersucht (3.4.11.1). Es zeigte sich, daß weder die organspezifische Expression noch die UV-Induktion der Gene der Flavonoidbiosynthese in Blüten, Blütenknospen, Stengel und Blättern der Mutante deutlich beeinträchtigt war. Einzig die *DFR*-Expression in der Wurzel schien in *tt1*, nach Korrektur der beobachteten Signalintensitäten, reduziert zu sein. Diese Beobachtung muß unter Verwendung unabhängiger RNA-Proben und alternativer Methoden überprüft werden. Dazu könnten die Transkriptmengen mittels RT-PCR bestimmt oder Reporterkonstrukte wie *FLS::GUS* oder *DFR::GUS* in die *tt1*-Mutante transformiert oder eingekreuzt werden.

Die in Blättern und Blütenknospen von Wildtyp und *tt1*-Mutante nachgewiesenen Gehalte an Flavonoid-Glykosiden unterschieden sich nicht (3.4.11.2). Die Analyse von Flavonoid-Aglykonen in *tt1*-Samen zeigte dagegen, daß sie im Unterschied zum Wildtyp kein Cyanidin enthielten. Diese Beobachtung kann analog zu den für *tt15* angestellten Überlegungen dadurch erklärt werden, daß es sich bei TT1 um einen samenspezifischen Regulator der Biosynthese von Anthocyanidinen oder von kondensierten Tanninen handelt, deren Hydrolyse Cyanidin

---

\* Auch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen folgender ESTs enthalten Zinkfinger-Motive ohne den QALGGH-Konsensus: T04539 (*A. thaliana*), L47889 (*Brassica rapa*), AI621774.1 (*Z. mays*, cDNA aus Blatt Primordien), D47784 (*Oryza sativa*), AA754318 und AA754326 (*O. sativa*, cDNA aus unreifen Karyopsen). Aufgrund der Kürze der Sequenzen ist jedoch keine Aussage über die Anzahl der Zinkfinger im Protein möglich.

freisetzt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es besonders interessant, die Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in definierten Stadien sich entwickelnder *tt1*-Samen mit der in Wildtyp-Samen zu vergleichen. RNA für entsprechende Gel-Blot-Analysen könnte aus Schoten gewonnen werden. Die Untersuchung solcher RNA-Proben erlaubt jedoch keine Unterscheidung der Genexpression in den Schotenklappen von der in den Samen selbst. Aus isolierten Samen konnte im Rahmen dieser Arbeit keine hinreichende Menge RNA von akzeptabler Qualität gewonnen werden. Mögliche alternative Wege zur Untersuchung der Expression der Gene der Flavonoidbiosynthese in sich entwickelnden Samen wären *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden für die entsprechenden Transkripte (Devic *et al.*, 1999), die Konstruktion von Reporterlinien (s.o.) oder die Immundetektion der entsprechenden Proteine.

Die Expression des *TTI*-Gens konnte nur mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß das Gen in Blüten und Schoten exprimiert war (3.4.10.1). Die Untersuchung transgener Pflanzen, die *TTI*-Promotor-GUS-Fusionen enthielten, bestätigte dieses Ergebnis und erlaubte es, das durch den *TTI*-Promotor vermittelte Expressionsmuster räumlich und zeitlich weiter einzugrenzen (3.4.10.2). Der *TTI*-Promotor war in Blüten und Schoten der Stadien 14 bis etwa 17, also bis zur vollständigen Differenzierung des Embryos, in Funiculus und Integumenten der Samenanlagen aktiv. Die aus dieser streng begrenzten Aktivität resultierende *TTI*-mRNA war vermutlich in RNA-Proben, die aus ganzen Blüten bzw. Schoten unterschiedlichen Alters gewonnen wurden, so weit "verdünnt", daß sie mittels RNA-Gel-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine geringe Transkriptkonzentration erklärt vermutlich auch das Fehlen eines *AtTTI*-EST-Klons. Bei *G. max* war es dagegen möglich, eine cDNA-Bibliothek aus unreifen Samenschalen herzustellen, aus der ein EST für ein *TTI*-ähnliches Gen gewonnen werden konnte (4.5.2). Detailliertere Untersuchungen sind nötig, das Expressionsmuster von *AtTTI* genauer zu charakterisieren. Hierzu wäre es möglich, X-Gluc gefärbte Teile der Promotor-GUS-Pflanzen in Paraffin einzubetten und histologische Schnitte anzufertigen. Da es sich bei der als Reporterenzym verwendeten  $\beta$ -Glukuronidase jedoch um ein relativ stabiles Protein handelt, erlaubt dieses Verfahren keine präzise zeitliche Eingrenzung der *TTI*-Promotoraktivität. Diese könnte besser durch *in situ*-Hybridisierungen oder Immunlokalisation des TT1-Proteins untersucht werden, um sie mit den Ergebnissen für andere Gene der Flavonoidbiosynthese zu vergleichen.

Sollte sich das in den Samenschalen von *G. max* exprimierte Gen als homolog zu *TT1* erweisen, so böten sich die weitaus größeren Samen dieser Art als vereinfachtes Studienobjekt an.

Die beobachtete Reporterogenaktivität in Ovulen, die sich nicht weiter entwickeln, wirft die Frage auf, ob die *TT1*-Expression in allen kompetenten Geweben im Verlauf der Schotenentwicklung erfolgt, oder erst durch die Bestäubung ausgelöst wird. Diese Frage könnte beantwortet werden, indem die Antheren aus Knospen von *TT1*-Promotor-GUS-Pflanzen kurz vor deren Öffnung, und damit kurz vor der Selbstbestäubung, entfernt und die Gynoecien nach einigen Tagen mit X-Gluc gefärbt würden. Die Analyse transgener Pflanzen, die kürzere Promotor-GUS-Konstrukte enthalten, würde es schließlich erlauben, die für die zeitliche und räumliche Kontrolle der *TT1*-Expression verantwortlichen Promotorelemente einzugrenzen. Diese ließen möglicherweise Rückschlüsse auf die an sie bindenden Regulatoren zu oder erlaubten es sogar, sie mit Hilfe des Hefe "One-Hybrid"-Verfahrens (Li und Herskowitz, 1993) oder durch "DNA-Liganden-Screening" zu isolieren (Somssich und Weisshaar, 1996). Potentielle Regulatoren könnten dann als Effektoren in Kotransfektionsexperimenten in *A. thaliana*-Protoplasten mit *TT1*-Promotor-GUS-Konstrukten als Reporter eingesetzt und so auf ihre Funktionalität getestet werden.

Auf Grund der Beschränkung der Expression von *TT1* auf sich entwickelnde Samen verwundert es nicht, daß die *tt1*-Mutante keine feststellbaren Veränderungen in der Flavonoidakkumulation in Blättern und Knospen sowie keine deutlich veränderte Expression der Strukturgene der Flavonoidbiosynthese in verschiedenen Pflanzenteilen aufwies. Alle bislang gemachten Beobachtungen sprechen dafür, daß es sich bei *tt1* tatsächlich um eine samenspezifische Mutation handelt. Der Mechanismus, durch den TT1 die Pigmentierung der Samen beeinflusst, ist jedoch unbekannt. Die auf Grund von Sequenzvergleichen postulierte Anwesenheit zweier Zinkfinger-Motive im Protein legte die Vermutung nahe, daß es sich bei TT1 um ein regulatorisches Protein, eventuell um einen Transkriptionsfaktor handelt. Einen möglichen Hinweis auf eine Bedeutung der Zinkfinger-Motive des TT1-Proteins *in vivo* gab die Analyse der *tt1*-Mutante (3.4.7.3). Dabei konnte eine Mutation am Exon-Intron-Übergang des *tt1*-Gens festgestellt werden, die zu einer Leserasterverschiebung und zu einem vorzeitigen Stop-Kodon führt. Das daraus vermutlich resultierende Fehlen beider Zinkfinger am *tt1*-Protein führt offenbar zu einem vollständigen Funktionsverlust. Die Vermutung, daß es sich

bei TT1 um einen Regulator der Transkription handeln könnte, wird experimentell durch die nachgewiesene Lokalisation des Proteins im Zellkern unterstützt (3.4.12). Zur Überprüfung der Funktion der putativen Kernlokalisierungssignale wäre es in diesem Zusammenhang wünschenswert, die Lokalisation von TT1-GFP-Fusionsproteinen zu untersuchen, in denen sie deletiert oder durch Einführung von Mutationen verändert sind.

Einen weiteren Anhaltspunkt für eine regulatorische Funktion von TT1 lieferte die Vielzahl der durch Überexpression des *TT1*-Gens hervorgerufenen schweren phänotypischen Veränderungen und homeotischen Transformationen (3.4.13). Die ektopische Expression des Gens bewirkte vermutlich, daß das Protein zu Zeitpunkten und in Konzentrationen in Geweben vorlag, die von denen des Wildtyps deutlich abwichen. Die dadurch möglichen abweichenden Interaktionen mit anderen Proteinen führten zur Aktivierung oder Repression pflanzlicher Entwicklungsvorgänge, die sonst vermutlich einer strikten zeitlichen und räumlichen Kontrolle durch andere, möglicherweise TT1-ähnliche Proteine unterliegen. Einige der Funktionen dieser TT1-ähnlichen Proteine ließen sich z.B. durch die Analyse von Null-Mutanten nachweisen, die, sofern ihre Sequenzen bekannt sind, aus der in dieser Arbeit benutzten *En1*-Population isoliert werden könnten. Aufschlüsse über die Funktion von TT1 könnten auch durch detailliertere Untersuchungen der 35S-TT1-Pflanzen in Bezug auf die Effekte der Überexpression auf die Entwicklung der Samenanlagen, die zur Sterilität dieser Pflanzen führen, gewonnen werden.

Ein anderer experimenteller Ansatz um herauszufinden, welche Gene eventuell von TT1 reguliert werden, ist die Durchführung von Kotransfektionen, in denen TT1 als Effektor und Fusionen der Promotoren von potentiellen "Zielgenen" mit GUS als Reporter eingesetzt werden. Dafür bieten sich zunächst die Gene der Flavonoidbiosynthese an. Weitere potentielle "Zielgene" ließen sich mittels "differential display" Methoden ermitteln (Liang und Pardee, 1992). Mit diesem Verfahren könnten diejenigen Gene identifiziert werden, deren Expression sich zwischen der *tt1*-Mutante (oder einer 35S-TT1-Pflanze) und Landsberg *erecta* Wildtyp unterscheidet.

Sollte es sich bei TT1 um einen Transkriptionsfaktor handeln, so müßte das Protein DNA binden und/oder an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein. Ein Vergleich der in TT1 gefundenen Zinkfinger-Motive mit der Gendatenbank des NCBI ergab, daß bislang kein Protein, für das die erkannte DNA-Sequenz bekannt ist, in den Positionen, die die DNA-Bindungsspezifität bestimmen, eine Ähnlichkeit zu TT1 aufweist. Daher kann an dieser Stelle keine Vermutung über die eventuell von TT1 erkannte Sequenz angestellt werden. Solche Motive könnten durch “random binding site selection” Studien identifiziert werden (Howe und Watson, 1991). Die Frage, ob es sich bei dem auffälligen Glutaminsäurestrang um eine Aktivierungsdomäne handelt, ließe sich in Domänenaustauschexperimenten untersuchen. Andere Faktoren, die möglicherweise zu Protein-Protein-Interaktionen mit TT1 in der Lage sind, könnten mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid-Systems identifiziert werden (Bartel *et al.*, 1993). Schließlich sollte getestet werden, ob TT1 tatsächlich Zinkfinger-Strukturen ausbildet. Anhaltspunkte dafür könnte ein Verlust der Funktion des Proteins in Anwesenheit Zinkbindender Substanzen, der direkte Nachweis von Zink im Protein (vgl. Sawa *et al.*, 1999) oder die Aufklärung der Proteinstruktur liefern.

#### 4.6 Ausblick

Beispiele für weiterführende Fragestellungen, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, sowie mögliche experimentelle Ansätze zu ihrer Beantwortung sind im Detail bei der Diskussion der einzelnen Punkte bereits erwähnt worden. Generell erscheint es vielversprechend, den in dieser Arbeit gewählten Ansatz der Isolierung von Mutanten aus mittels Insertionsmutagenese gewonnenen *A. thaliana*-Populationen weiter zu verfolgen. Durch Anwendung von “reverse genetic screens” könnten beispielsweise Nullmutanten bestimmter MYB-, bHLH-, bZIP- oder Zinkfinger-Gene isoliert werden, um deren Rolle in der Induktion oder der entwicklungspezifischen Expression der Gene der Flavonoidbiosynthese zu untersuchen (4.4). Mittels gezielter und effizienter “forward genetic screens” könnten weitere regulatorische und Strukturgenmutanten der Flavonoidbiosynthese identifiziert und die betroffenen Gene isoliert werden (4.2).

Die anschließenden Untersuchungen sollten, wie für *tt1* skizziert, die phänotypische Charakterisierung der Mutante, die Expression des Gens und seine Regulation, die Lokalisation und Modifikation des Proteins, seine Interaktion mit DNA oder anderen Proteinen, mögliche Zielgene sowie die Isolierung und Charakterisierung verwandter Gene umfassen (4.5.3).

Schätzungen zufolge kodiert etwa 1% aller menschlichen Gene für Zinkfinger-Proteine (Mackay und Crossley, 1998). Sie sind damit vermutlich eine der größten Klassen von Transkriptionsfaktoren überhaupt und werden in tierischen Systemen schon seit längerem entsprechend intensiv erforscht. Pflanzliche Zinkfinger-Proteine sind dagegen noch bei weitem nicht so ausführlich charakterisiert wie andere Klassen von Transkriptionsfaktoren. Unter den Zinkfinger-Proteinen vom C2H2-Typ galt das Hauptaugenmerk bislang denen, die das QALGGH-Motiv enthalten. Die Isolierung von PCP1 und ID1 sowie die mit dieser Arbeit begonnene Charakterisierung von TT1 zeigen jedoch, daß noch weiteren Familien von Zinkfinger-Proteinen wichtige Rollen in der Biologie der Pflanzen zukommen. Die Bestimmung der vollständigen Nukleotidsequenz des Genoms von *A. thaliana* wird zeigen, wie groß hier die Zahl der Zinkfinger-Proteine ist. Durch die gezielte Anwendung der für dieses Modellsystem zur Verfügung stehenden Analysemethoden können diesen Proteinen Funktionen zugeordnet werden, um so unser Verständnis der Regulation entwicklungspezifischer und stimulusinduzierter Prozesse in Pflanzen zu erweitern.

## 5 Zusammenfassung

Die Flavonoidbiosynthese und ihre Regulation dienen schon seit langem als Modell zum Studium entwicklungsspezifischer und stimulusinduzierter Genexpression bei Pflanzen. Die Vorzüge dieses Systems, wie die Lebensfähigkeit von Mutanten und die leichte Nachweisbarkeit von abweichenden Phänotypen, wurden in dieser Arbeit auf ein System angewandt, das die Integration biochemischer, molekularer und genetischer Ansätze erlaubt: *Arabidopsis thaliana*. Durch Promotorstudien, die Charakterisierung vorhandener und die Isolierung neuer Mutanten konnten so neue Erkenntnisse über die Regulation von stimulusinduzierter sowie gewebe- und entwicklungsspezifischer Genexpression gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Projekte zum Abschluß gebracht werden, die in vorangegangenen Arbeiten begonnen wurden (Hartmann, 1997). Zum einen wurde die Analyse der Promotoren der bei der Biosynthese der Flavonole koordiniert exprimierten Gene durch Untersuchung des *F3H*-Promotors vervollständigt. Es zeigte sich, daß dieser eine Architektur aufweist, die sich von der der Promotoren von *CHS*, *CFI* und *FLS* unterscheidet. Die Lichtinduktion der *F3H*-Expression wird jedoch ebenso wie die von *CHS*, *CFI* und *FLS* durch ein ACGT-Element und ein MYB-Erkennungselement vermittelt. Die Beteiligung gleicher *cis*-Elemente an der Lichtinduktion aller untersuchten Gene spricht dafür, daß deren Expression durch die gleichen *trans*-Faktoren reguliert wird. Zum anderen wurde mit verschiedenen Methoden der genetische Nachweis erbracht, daß der *tt6*-Lokus das *F3H*-Gen enthält. Mit den *tt*-Mutanten 4, 5, 6 und 7 (*chs*, *cfi*, *f3h* und *f3'h*) sowie der *En1*-Linie 5P90, die eine Transposoninsertion im *FLS*-Gen aufweist, stehen nun Mutanten für alle Schritte der Biosynthese der Flavonole zur Verfügung.

Weiterhin konnte mit *tt15* eine neue *A. thaliana transparent-testa*-Mutante charakterisiert werden. In vegetativen Teilen dieser Mutante sind die Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese sowie die Gehalte an Flavonoiden gegenüber dem Wildtyp unverändert. *tt15*-Samen dagegen enthalten im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger Cyanidin und Quercetin. Das spricht dafür, daß das in dieser Mutante defekte Gen für einen samenspezifischen Regulator der Flavonoidbiosynthese oder für ein Enzym der Synthese kondensierter Tannine kodiert.

Auch *tt1* konnte als samenspezifische Mutante bestätigt werden. In dieser Mutante ist allerdings der Quercetingehalt der Samen gegenüber dem Wildtyp nicht verändert, während Cyanidin vollständig fehlt. Mit Hilfe eines neu isolierten Allels, das eine Insertion eines Transposons am *tt1*-Lokus trug, konnte das *TT1*-Gen isoliert werden. Die Identität dieses Gens wurde durch Komplementation der *tt1*-Mutation bestätigt. Mittels RT-PCR und Promotor-GUS-Fusionen konnte gezeigt werden, daß *TT1* vorwiegend in den Samenanlagen bestäubter Blüten und sich entwickelnder Schoten exprimiert wird. Der offene Leserahmen des *TT1*-Gens kodiert für ein Peptid von 303 Aminosäuren mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 34,5 kDa. Die Aminosäuresequenz von TT1 enthält ein Zinkfinger-Motiv vom klassischen C2H2- sowie eines vom imperfekten C2HC-Typ. Strukturen dieser Art können DNA binden oder Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Da für ein TT1-GFP-Fusionsprotein eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, daß es sich bei TT1 um ein Protein mit regulatorischer Funktion handelt. Damit wurden erstmalig Anhaltspunkte für eine Beteiligung von C2H2-Zinkfinger-Proteinen an der Regulation der Flavonoidakkumulation im Verlauf der Samenentwicklung gefunden. In der Genbank des NCBI konnten weitere Sequenzen aus *A. thaliana* und anderen Pflanzen identifiziert werden, die Zinkfinger-Motive mit hoher Ähnlichkeit zu TT1 aufweisen. Unter diesen Sequenzen ist vor allem der carboxyterminale Bereich hoch konserviert, der jeweils einen C2H2- und einen C2HC-Zinkfinger enthält, denen das in vielen pflanzlichen Zinkfinger-Proteinen konservierte QALGGH-Motiv fehlt. Die Überexpression von *TT1* in *A. thaliana* führte zu vielfältigen schweren Veränderungen in der Morphologie der Pflanzen. Daher kann angenommen werden, daß die TT1-ähnlichen Proteine eine neue Familie pflanzlicher Zinkfinger-Proteine mit wichtigen Funktionen in der Regulation pflanzlicher Entwicklungsvorgänge bilden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Albert, S., Delseny, M. und Devic, M.** (1997) *BANYULS*, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Journal*, **11**, 289-299.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. und Stark, G.R.** (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5350-5354.
- An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S. und Meagher, R.B.** (1996) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, **10**, 107-121.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. und Deng, X.-W.** (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Molecular Cell*, **1**, 213-222.
- Argüello-Astorga, G.R. und Herrera-Estrella, L.R.** (1996) Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiology*, **112**, 1151-1166.
- Azpiroz-Leehan, R. und Feldmann, K.A.** (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics*, **13**, 152-156.
- Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. und Fields, S.** (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach.*, D.A. Hatley, ed., Oxford University Press, Oxford; **1**, 153-179.
- Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B. und Wisman, E.** (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 729-734.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G.** (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Molecular Biology and Genetics*, **316**, 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R.** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology*, **20**, 1195-1197.

- Bell, C.J. und Ecker, J.R.** (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, **19**, 137-144.
- Bharti, A.K. und Khurana, J.P.** (1997) Mutants of *Arabidopsis* as a tool to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, **65**, 765-776.
- Bhatt, A.M., Lister, C., Crawford, N. und Dean, C.** (1998) The transposition frequency of *Tag1* elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines. *The Plant Cell*, **10**, 427-434.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.
- Blackwell, T.K. und Weitraub, H.** (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, **250**, 1104-1110.
- Bodeau, J.P. und Walbot, V.** (1996) Structure and regulation of the maize *Bronze2* promoter. *Plant Molecular Biology*, **32**, 599-609.
- Bouchez, D. und Höfte, H.** (1998) Functional Genomics in Plants. *Plant Physiology*, **118**, 725-732.
- Bowman, J.** (1994) Flowers. In Bowman, J. (ed.) *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Springer, New York, p. 139ff.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bradley, J.M., Davies, K.M., Deroles, S.C., Bloor, S.J. und Lewis, D.H.** (1998) The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *The Plant Journal*, **13**, 381-392.
- Britsch, L., Heller, W. und Griesebach, H.** (1981) Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with enzyme systems from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung*, **36c**, 742-750.
- Brown, J.W.S., Smith, P. und Simpson, C.G.** (1996) *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Molecular Biology*, **32**, 531-535.
- Burbulis, I.E., Iacobucci, M. und Shirley, B.W.** (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **8**, 1013-1025.

- Burbulis, I.E. und Winkel-Shirley, B.** (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 12929-12934.
- Burge, C. und Karlin, S.** (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology*, **268**, 78-94.
- Bürger, D.** (1971) Die morphologischen Mutanten des Göttinger Arabidopsis-Sortiments, einschließlich der Mutanten mit abweichender Samenfarbe. *Arabidopsis Information Service*, **8**, 36-42.
- Cardon, G.H., Frey, M., Saedler, H. und Gierl, A.** (1993) Mobility of the maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **3**, 773-784.
- Chang, C., Bowman, J.L., DeJohn, A.W., Lander, E.S. und Meyerowitz, E.M.** (1988) Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 6856-6860.
- Chapple, C.C.S., Shirley, B.W., Zook, M., Hammerschmidt, R. und Somerville, S.C.** (1994) Secondary metabolism in *Arabidopsis*. In Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R. (eds.), *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 989-1030.
- Chapple, C.C.S., Vogt, T., Ellis, B.E. und Somerville, C.R.** (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell*, **4**, 1413-1424.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.-H., Puente, P., Deng, X.-W. und Wei, N.** (1998) Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *The Plant Cell*, **10**, 673-684.
- Colasanti, J., Yuan, Z. und Sundaresan, V.** (1998) The *indeterminate* Gene Encodes a Zinc Finger Protein and Regulates a Leaf Generated Signal Required for the Transition to Flowering in Maize. *Cell*, **93**, 593-603.
- Cormack, R.S. und Somssich, I.E.** (1997) Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. *Gene*, **194**, 273-276.
- Corpet, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, **16**, 10881-10890.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *The EMBO Journal*, **6**, 2551-2556.

- de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J. und Koes, R.** (1997) The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes & Development*, **11**, 1422-1434.
- Deboo, G.B., Albertson, M.C. und Taylor, L.P.** (1995) Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers. *The Plant Journal*, **7**, 703-713.
- Deikman, J. und Hammer, P.E.** (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **108**, 47-57.
- Depeiges, A., Goubely, C., Lenoir, A., Cocherel, S., Picard, G., Raynal, M., Grellet, F. und Delseny, M.** (1995) Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, **91**, 160-168.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research*, **12**, 387-395.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G. und Delseny, M.** (1999) The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *The Plant Journal*, **19**, 387-398.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. und Paiva, N.L.** (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review. *Gene*, **179**, 61-71.
- Dixon, R.A. und Steele, C.L.** (1999) Flavonoids and Isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, **4**, 394-400.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO Journal*, **16**, 726-738.
- Dunsmuir, P., Bond, D., Lee, K., Gidoni, D. und Townsend, J.** (1988) Stability of introduced genes and stability in expression. In Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. and Verma, D.S. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. C1/1-17.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1349.
- Feinbaum, R.L. und Ausubel, F.M.** (1988) Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 1985-1992.

- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (1997) *PcMYB1*, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts *in vivo* with a light-regulatory promoter unit. *The Plant Journal*, **11**, 1079-1093.
- Ferrer, J.-L., Jez, J.N., Bowman, M.E., Dixon, R.A. und Noel, J.P.** (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology*, **6**, 775-784.
- Forkmann, G.** (1991) Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding*, **106**, 1-26.
- Forkmann, G., De Vlaming, P., Spribille, R., Wiering, H. und Schram, A.W.** (1986) Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **41**, 179-186.
- Foster, R., Izawa, T. und Chua, N.-H.** (1994) Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB Journal*, **8**, 192-200.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R.** (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 8998-9002.
- Goff, S.A., Cone, K.C. und Chandler, V.L.** (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development*, **6**, 864-675.
- Gong, Z.-Z., Yamazaki, M. und 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 and General Genetics*, **262**, 65-72.
- Graham, T.L.** (1991) A rapid, high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites. *Plant Physiology*, **95**, 584-593.
- Graham, T.L.** (1998) Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**, 135-144.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B. und Peterson, T.** (1994) The *myb*-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, **76**, 543-553.
- Hahlbrock, K. und Ragg, H.** (1975) Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **166**, 41-46.

- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbiß, H.H., Herrera-Estrella, L. und Schell, J.** (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Molecular General Genetics*, **199**, 161-168.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Harlow, G.R., Jenkins, M.E., Pittalwala, T.S. und Mount, D.W.** (1994) Isolation of *uvh1*, an Arabidopsis mutant hypersensitive to ultraviolet light and ionizing radiation. *The Plant Cell*, **6**, 227-235.
- Hartmann, U.** (1997) Untersuchungen zur lichtabhängigen Koregulation der Gene der Flavonol-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*. Universität zu Köln, Köln.
- Hartmann, U., Valentine, W.J., Christie, J.M., Hays, J., Jenkins, G.I. und Weisshaar, B.** (1998) Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. *Plant Molecular Biology*, **36**, 741-754.
- Hattori, T., Vasil, v., Rosenkranz, L., Hannah, L.C., McCarty, D.R. und Vasil, I.K.** (1992) The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *Cl* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes & Development*, **6**, 609-618.
- Hebsgaard, S.M., Korning, P.G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouze, P. und Brunak, S.** (1996) Splice site prediction in Arabidopsis thaliana DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, **24**, 3439-3452.
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F. und Wingender, E.** (1999) Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Research*, **27**, 318-322.
- Heller, W. und Hahlbrock, K.** (1980) Highly purified "Flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **200**, 617-619.
- Heslop-Harrison, J.S., Murata, M., Ogura, Y., Schwarzacher, T. und Motoyoshi, F.** (1999) Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of Arabidopsis chromosomes. *The Plant Cell*, **11**, 31-42.
- Heß, D.** (1999) *Pflanzenphysiologie*. Ulmer, Stuttgart.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9877.

- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. und Bairoch, A.** (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research*, **27**, 215-219.
- Holmes, D.S. und Quigley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, **114**, 193-197.
- Holton, T.A. und Cornish, E.C.** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 1071-1083.
- Howe, K.M. und Watson, R.J.** (1991) Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by *c-myb* protein. *Nucleic Acids Research*, **19**, 3913-3919.
- Izawa, T., Foster, R. und Chua, N.H.** (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *Journal of Molecular Biology*, **230**, 1131-1144.
- Jackson, D., Roberts, K. und Martin, C.** (1992) Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Anthirrinum majus*. *The Plant Journal*, **2**, 425-434.
- Jackson, J.A., Fuglevand, G., Brown, B.A., Shaw, M.J. und Jenkins, G.I.** (1995) Isolation of *Arabidopsis* mutants altered in the light-regulation of chalcone synthase gene expression using a transgenic screening approach. *The Plant Journal*, **8**, 369-380.
- Jacobs, G.H.** (1992) Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *The EMBO Journal*, **11**, 4507-4517.
- Jarillo, J.A. und Cashmore, A.R.** (1998) Enlightenment of the COP1-HY5 complex in photomorphogenesis. *Trends in Plant Science*, **3**, 161-163.
- Jefferson, R.J.** (1987) Assaying chimaeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, **5**, 387-405.
- Johnson, C.S. und Smyth, D.R.** (1998) The TTG2 gene of *Arabidopsis* encodes a WRKY family transcription factor that regulates trichome development and the production of pigment and mucilage in seed coats. *9th International Conference on Arabidopsis Research*, Madison, USA.
- Joshi, C.P.** (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translational start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Research*, **15**, 6643-6653.
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E. und 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.

- Klein, T.M., Roth, B.A. und Fromm, M.E.** (1989) Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 6681-6685.
- Kobe, B. und Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS*, **19**, 415-421.
- Koes, R., Souer, E., van Houwelingen, A., Mur, L., Spelt, C., Quattrocchio, F., Wing, J., Oppedijk, B., Ahmed, S., Maes, T., Gerats, T., Hoogeveen, P., Meesters, M., Kloos, D. und Mol, J.N.M.** (1995) Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 8149-8153.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. und Mol, J.N.M.** (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, **16**, 123-132.
- Kombrink, E. und Hahlbrock, K.** (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiology*, **81**, 216-221.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics*, **204**, 383-396.
- Konieczny, A. und Ausubel, F.M.** (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, **4**, 403-410.
- Koornneef, M.** (1981) The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis Information Service*, **18**, 45-51.
- Koornneef, M.** (1990) Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*, **27**, 1-4.
- Koornneef, M.** (1994) *Arabidopsis* Genetics. In Meyerowitz, E. and Somerville, C. (eds.), *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 89-120.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. und Stam, P.** (1998) Genetic Analysis. In Martinez-Zapater, J. and Salinas, J. (eds.), *Arabidopsis Protocols*. Humana Press, Totowa, USA, pp. 105-117.
- Koornneef, M., Luiten, W., de Vlaming, P. und Schram, A.W.** (1982) A gene controlling flavonoid 3'-hydroxylation in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*, **19**, 113-115.
- Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J. und Schilperoort, R.A.** (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, **296**, 72-74.

- Kubasek, W.L., Ausubel, F.M. und Shirley, B.W.** (1998) A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology*, **37**, 217-223.
- Kubasek, W.L., Shirley, B.W., McKillop, A., Goodman, H.M., Briggs, W. und Ausubel, F.M.** (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, **4**, 1229-1236.
- Kubo, H., Peeters, A.J.M., Aarts, M.G.M., Pereira, A. und Koornneef, M.** (1999) *ANTHOCYANINLESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **11**, 1217-1226.
- Kubo, K., Sakamoto, A., Kobayashi, A., Rybka, Z., Kanno, Y., Nakagawa, H., Nishino, T. und Takatsuji, H.** (1998) Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Research*, **26**, 608-616.
- Kühn, C. und Frommer, W.B.** (1995) A novel zinc finger protein encoded by a *couch potato* homologue from *Solanum tuberosum* enables a sucrose transport-deficient yeast strain to grow on sucrose. *Molecular and General Genetics*, **247**, 759-763.
- Kunze, R., Saedler, H. und Lönnig, W.-E.** (1997) Plant transposable elements. *Advances in Botanical Research*, **27**, 331-469.
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. und Dixon, R.A.** (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, **56**, 215-224.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Day, M.J., Lincoln, S.E. und Newberg, L.** (1993) Mapmarker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genetics*, **121**, 174-181.
- Landry, L.G., Chapple, C.C.S. und Last, R.L.** (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*, **109**, 1159-1166.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G. und Last, R.L.** (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell*, **5**, 171-179.
- Li, J.J. und Herskowitz, I.** (1993) Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*, **262**, 1870-1873.
- Liang, P. und Pardee, A.B.** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.

- Lipphardt, S., Brettschneider, R., Kreuzaler, F., Schell, J. und Dangel, J.L.** (1988) UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Anthirrhinum majus* chalcone synthase gene. *The EMBO Journal*, **7**, 4027-4033.
- Lippuner, V., Cyert, M.S. und Gasser, C.S.** (1996) Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild type yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 12859-12866.
- Lister, C. und Dean, C.** (1993) Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **4**, 745-750.
- Liu, L., White, M.J. und MacRae, T.H.** (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, **262**, 247-257.
- Lloyd, A.M., Walbot, V. und Davis, R.W.** (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science*, **258**, 1773-1775.
- Loake, G.J., Choudhary, A.D., Harrison, M.J., Mavandad, M., Lamb, C.J. und Dixon, R.J.** (1991) Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *The Plant Cell*, **3**, 829-840.
- Loake, G.J., Faktor, O., Lamb, C.J. und Dixon, R.A.** (1992) Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 9230-9234.
- Logemann, E., Block, A., Schulz, W., Somssich, I.E. und Hahlbrock, K.** (2000) Ultraviolet light selectively co-induces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **in press**.
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **163**, 16-20.
- Lois, R.** (1994) Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta*, **194**, 504-509.
- Lois, R. und Buchanan, B.B.** (1994) Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta*, **194**, 504-509.
- Long, S.R.** (1989) Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, **56**, 203-214.

- Lu, Y.-P., Li, Z.-S. und Rea, P.A.** (1997) *AtMRP1* gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 8243-8248.
- Mackay, J.P. und Crossley, M.** (1998) Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 1-4.
- Maes, T., De Keuleleire, P. und Gerats, T.** (1999) Plant tagnology. *Trends in Plant Science*, **4**, 90-96.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. und Walbot, V.** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, **375**, 397-400.
- Martienssen, R.A.** (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2021-2026.
- Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J. und Vrijlandt, E.** (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal*, **1**, 37-49.
- Mehrtens, F.** (1999) Untersuchungen zur Bedeutung von MYB-ähnlichen und bHLH-Faktoren für die Aktivierung der Promotoren von an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Strukturgenen in *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit*. Universität zu Köln, Köln.
- Meissner, R. und Michael, A.J.** (1997) Isolation and characterization of a diverse family of Arabidopsis two and three-fingered C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Molecular Biology*, **33**, 615-624.
- Menkens, A.E., Schindler, U. und Cashmore, A.R.** (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 506-510.
- Meyerowitz, E.M.** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, **56**, 263-269.
- Meyerowitz, E.M. und Sommerville, C.R.** (1994) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. und Nakamura, K.** (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, **11**, 841-851.
- Mitchell, P.J. und Tjian, R.** (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**, 371-378.

- Mol, J., Grotewold, E. und Koes, R.** (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science*, **3**, 212-217.
- Mol, J., Jenkins, G.I., Schäfer, E. und Weiss, D.** (1996) Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **15**, 525-557.
- Mol, J.N.M., Robbins, M.P., Dixon, R.A. und Veltkamp, E.** (1985) Spontaneous and enzymatic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. *Phytochemistry*, **24**, 2267-2269.
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker, J.R., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S. und Altmann, T.** (1999) A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics*, **22**, 271-275.
- Mozo, T., Fischer, S., Shizuya, H. und Altmann, T.** (1998) Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Molecular and General Genetics*, **258**, 562-570.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962) A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Nemeth, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Konczalman, Z., Stankovicstangeland, B., Bako, L., Mathur, J., Okresz, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Redei, G.P., Schell, J. und Koncz, C.** (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, **12**, 3059-3073.
- Nesi, N., Debaujon, I., Jond, C., Koornneef, M., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (1999) Characterisation of *Arabidopsis* T-DNA mutants affected in flavonoid metabolism in the seed coat. *10th International Conference on Arabidopsis Research*, Melbourne, Australia.
- Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T. und Arai, K.** (1987) High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods in Enzymology*, **154**, 3-28.
- Oyama, T., Shimura, Y. und Okada, K.** (1997) The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Development*, **11**, 2983-2995.

- Pelletier, M.K., Burbulis, I.E. und Shirley, B.W.** (1999) Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and endproducts in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology*, **40**, 45-54.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R. und Shirley, B.W.** (1997) Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **113**, 1437-1445.
- Pelletier, M.K. und Shirley, B.W.** (1996) Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. *Plant Physiology*, **111**, 339-345.
- Petersen, M., Strack, D. und Matern, U.** (1999) Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In Wink, M. (ed.) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Peterson, P.A.** (1970) The En mutable system in maize. III: Transposition associated with mutational events. *Theoretical and Applied Genetics*, **40**, 367-377.
- Procissi, A., Dolfini, S., Ronchi, A. und Tonelli, C.** (1997) Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. *The Plant Cell*, **9**, 1547-1557.
- Pruitt, R.E. und Meyerowitz, E.M.** (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology*, **187**, 169-183.
- Ptashne, M.** (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-689.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N.M. und Koes, R.** (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *The Plant Journal*, **13**, 475-488.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J. und Jorgensen, R.A.** (1997) The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *The Plant Cell*, **9**, 1357-1368.
- Raikhel, N.** (1992) Nuclear targeting in plants. *Plant Physiology*, **100**, 1627-1632.
- Rosenberg, U.B., Schröder, C., Preiss, A., Kienlin, A., Côté, S., Riede, I. und Jäckle, H.** (1986) Structural homology of the product of the *Drosophila Krüppel* gene with *Xenopus* transcription factor IIIA. *Nature*, **319**, 336-339.
- Round, E.K., Flowers, S.K. und Richards, E.J.** (1997) *Arabidopsis thaliana* centromere regions: Genetic map positions and repetitive DNA structure. *Genome Research*, **7**, 1045-1053.

- Sablowski, R.W.M., Moyano, E., Culianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C. und Bevan, M.** (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *The EMBO Journal*, **13**, 128-137.
- Sainz, M.B., Grotewold, E. und Chandler, V.L.** (1997) Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *The Plant Cell*, **9**, 611-625.
- Saito, K., Kobayashi, M., Gong, Z., Tanaka, Y. und Yamazaki, M.** (1999) Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *The Plant Journal*, **17**, 181-190.
- Sakai, H., Medrano, L.J. und Meyerowitz, E.M.** (1995) Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature*, **378**, 199-203.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarkar, G. und Sommer, S.S.** (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, **8**, 404-407.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E. und Okada, K.** (1999) FILAMENTOUS FLOWER, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes & Development*, **13**, 1079-1088.
- Schmelzer, E., Jahnen, W. und Hahlbrock, K.** (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 2989-2993.
- Schmidt, R., West, J., Love, K., Lenehan, Z., Lister, C., Thompson, H., Bouchez, D. und Dean, C.** (1995) Physical map and organization of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *Science*, **270**, 480-483.
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Cuypers, H., Peterson, P.A. und Saedler, H.** (1985) Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. *The EMBO Journal*, **4**, 591-597.
- Sheahan, J.J.** (1996) Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, **83**, 679-686.

- Sheahan, J.J., Cheong, H. und Rehnitz, G.A.** (1998) The colorless flavonoids of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). I. A model system to study the orthodihydroxy structure. *American Journal of Botany*, **85**, 467-475.
- Sheahan, J.J. und Rehnitz, G.A.** (1992) Flavonoid-specific staining of *Arabidopsis thaliana*. *BioTechniques*, **13**, 880-883.
- Sheahan, J.J. und Rehnitz, G.A.** (1993) Differential visualization of *transparent testa* Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Analytical Chemistry*, **65**, 961-963.
- Shirley, B.W.** (1998) Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research*, **8**, 415-422.
- Shirley, B.W.** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, **107**, 142-149.
- Shirley, B.W., Hanley, S. und Goodman, H.M.** (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. *The Plant Cell*, **4**, 333-347.
- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M. und Goodman, H.M.** (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, **8**, 659-671.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. und Haseloff, J.** (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, **6**, 1653-1663.
- Somssich, I.E. und Weisshaar, B.** (1996) Expression Library Screening. In Foster, G.D. and Twell, D. (eds.), *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. John Wiley & Sons Ltd., Leicester (U.K.), pp. 157-176.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**, 503-517.
- Sprenger, M.** (1993) Funktionsanalyse von DNA bindenden Proteinen durch Cotransfektionsexperimente in pflanzlichen Protoplasten. *Diplomarbeit*. Universität zu Köln, Köln.
- Sprenger, M.** (1997) Transkriptionsregulierende Eigenschaften DNA-bindender Faktoren des Chalkonsynthasepromotors aus *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*. Universität zu Köln, Köln.
- Stafford, H.A.** (1974) Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry*, **8**, 53-79.

- Stapleton, A.E. und Walbot, V.** (1994) Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology*, **105**, 881-889.
- Tague, B.W. und Goodman, H.M.** (1995) Characterization of a family of *Arabidopsis* zinc finger protein cDNAs. *Plant Molecular Biology*, **28**, 267-279.
- Takatsuji, H.** (1996) A single amino acid determines the the specificity for the target sequence of two zinc-finger proteins in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 219-223.
- Takatsuji, H.** (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **54**, 582-596.
- Takatsuji, H.** (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in conteporary plant science. *Plant Molecular Biology*, **39**, 1073-1078.
- Takatsuji, H., Mori, M., Benfey, P.N., Ren, L. und Chua, N.-H.** (1992) Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *The EMBO Journal*, **11**, 241-249.
- Takatsuji, H., Nakamura, N. und Katsumoto, Y.** (1994) A new family of zinc finger proteins in petunia: Structure, DNA sequence recognition, and floral organ-specific expression. *The Plant Cell*, **6**, 947-958.
- Tanaka, A., Tano, S., Chantes, T., Yokota, Y., Shikazono, N. und Watanabe, H.** (1997) A new *Arabidopsis* mutant induced by ion beams affects flavonoid synthesis with spotted pigmentation in testa. *Genes & Genetic Systems*, **72**, 141-148.
- Taylor, L.P. und Briggs, W.R.** (1990) Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *The Plant Cell*, **2**, 115-127.
- Taylor, L.P. und Jorgensen, R.** (1992) Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *Journal of Heredity*, **83**, 11-17.
- Trezzini, G.F., Horrichs, A. und Somssich, I.E.** (1993) Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Molecular Biology*, **21**, 385-389.
- van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N.M. und Stuitje, A.R.** (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. *The Plant Cell*, **4**, 253-262.
- Veit, M. und Pauli, G.** (1999) Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Natural Products*, **62**, 1301-1303.

- von Arnim, A.G., Deng, X.-W. und Stacey, M.G.** (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, **221**, 35-43.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. und Gray, J.C.** (1999) The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, **11**, 1337-1350.
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O. und Hahlbrock, K.** (1991a) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *The EMBO Journal*, **10**, 1777-1786.
- Weisshaar, B., Block, A., Armstrong, G.A., Herrmann, A., Schulze-Lefert, P. und Hahlbrock, K.** (1991b) Regulatory elements required for light-mediated expression of the *Petroselinum crispum* chalcone synthase gene. In Jenkins, G.I. and Schuch, W. (eds.), *Molecular Biology of plant Development*. The Company of Biologists Limited, Cambridge, UK, Vol. XLV, pp. 191-210.
- Weisshaar, B. und Jenkins, G.I.** (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 251-257.
- Williams, M.E., Foster, R. und Chua, N.-H.** (1992) Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *The Plant Cell*, **4**, 485-496.
- Wink, M.** (ed.) (1999) *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Wintersohl, U., Krause, J. und Napp-Zinn, K.** (1979) Phenylpropane derivatives in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabidopsis Information Service*, **16**, 76-77.
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P. und Saedler, H.** (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Molecular Biology*, **37**, 989-999.
- Wood, K.V.** (1991) The origin of beetle luciferases. *Bioluminescence and Chemiluminescence: current status*. Stanley P., Kricka L., Wiley J. and sons (eds.), Chichester, **1**.
- Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollman, P.C.H., Mol, J.N.M. und van Tunen, A.J.** (1994) Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *The Plant Journal*, **6**, 201-212.

## 7 Anhang

**Anhang 1: Charakteristika verschiedener *tt*-Mutanten aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population.**

In Anlehnung an (Shirley *et al.*, 1995) sind verschiedene Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *tt*-Mutanten aus einer *En1*-Population im Vergleich zu den klassischen *tt*-Mutanten dargestellt. Die in der Spalte „keine Kompl.“ bezeichneten Mutationen konnten in Testkreuzungen jeweils nicht komplementiert werden. In der Spalte „mut. Gen“ sind diejenigen Gene aufgeführt, in deren Sequenzen Mutationen nachgewiesen werden konnten (vgl. Anhang 2). Es gelten folgende Abkürzungen: -, fehlt; -/+, schwach ausgeprägt; +, vorhanden; ++, stark ausgeprägt; ?, unklares Ergebnis; /, nicht untersucht; \*, wächst in Anwesenheit hoher Saccharose Konzentrationen („sucrose insensitive growth“, *sig*); \*\*, identifiziert von A. Kortstee; div., segregiert für den *tt*-Phänotyp.

Pflanze	Sichtbare Pigm.		Fluoresz. Samen	DC (Blätter+UV)			Nat. A Färbung		keine Kompl.	mut. Gen
	Samen	Blätter		Anth.	Quer.	Käm.	Weißlicht	UV		
<i>tt1</i>	gelb	+	-	++	++	++	grün	orange		<i>TT1</i>
5K60.3	gelb	+	-	+	+	+	grün	orange	<i>tt1</i>	<i>TT1</i>
<i>tt2</i>	gelb	+	-	++	++	++	grün	orange		/
<i>tt3</i>	gelb	-	-/+	-	-/+	++	orange	orange		<i>DFR</i>
5M48	gelb	-	-	-	-	++	orange	orange	5M56	?
5M56	gelb	-	-	-	++	++	orange	orange	5M48	/
5M81	gelb	-	-	-	++	++	orange	orange	/	<i>DFR</i>
5M86*	gelb	-	-	-	-	++	orange	orange	/	/
5AAA52	gelb	-	-	-	++	++	orange	orange	5AAA54	/
5AAA54	gelb	-	-	-	++	++	orange	orange	5AAA52	<i>DFR</i>
6J62 hell*	gelb	-	-	-	-	++	orange	orange	/	?
15.783.2*	hellbraun	-	-	-	-/+	++	orange	orange	/	<i>DFR</i>
<i>tt4</i>	gelb	-	++	-	-	-	weiß	hellblau		<i>CHS</i>
4AAR3	gelb	-	++	-	-	-	weiß	hellblau	<i>tt4</i>	/
5N16.1*	gelb	-	+	?	-	-	weiß	hellblau	<i>tt4</i>	/
5K49.3	gelb	-	+	?	-	-/+	weiß	gelbl.	<i>tt4</i>	<i>CHS</i>
5Q24	gelb	-	++	-/+	-	-	weiß	gelbl.	<i>tt4</i>	/
5K5-108	gelb	-	+	?	-	-	weiß	blau	<i>tt4</i>	<i>CHS</i>
5L63 hell	gelb	-	+	-	-	-	weiß	blau	<i>tt4</i>	?
4AAM7	gelb	-	+	-	-	-	weiß	blau	/	?
6AS137	gelb	-	+	/	/	/	/	/	<i>tt4</i>	<i>CHS</i>
<i>tt5</i>	gelb	-	++	-	-	-/+	weiß	gelb		<i>CHI</i>
13.248*	gelb	-	-/+	-/+	-	-	weiß	gelb	<i>tt5</i>	<i>CFI</i>
<i>tt6</i>	hellbraun	-	++	++	-	-/+	rot	rot		<i>F3H</i>
5G38.2	gelb	-	-/+	?	-	-/+	rot	rot	<i>tt6</i>	<i>F3H</i>
5AAJ34	gelb	-	-/+	?	-	-	rot	rot	<i>tt6</i>	<i>F3H</i>
4I30-108	gelb	-	-/+	?	-	-	rot	rot	<i>tt6</i>	<i>F3H</i>
<i>tt7</i>	hellbraun	-/+	-	+	-	++	weiß	grün		<i>F3'H?</i>
5R22**	braun	-/+	-	+	-	++	weiß	grün	<i>tt7</i>	/
<i>tt8</i>	gelb	+	-	-/+	-/+	-/+	grün	orange		/
<i>tt10</i>	hellbraun	+	-	++	++	++	grün	orange		/
6AAH92	gelb	+	-	+	+	+	grün	orange	/	/
4AT122	hellbraun	+	-	++	-/+	++	grün	orange	/	/
17.669	div.	+	-	?	++	++	grün	orange	/	/
5V27**	div.	/	/	/	/	/	grün	orange	/	/
5O94**	div.	/	/	/	/	/	grün	orange	/	/
wt	braun	+	-	++	++	++	grün	orange		

## Anhang 2: Sequenzen von „targetsites“ Duplikationen und „footprints“ aus einer *En1*-mutagenisierten *A.-thaliana*-Population.

Es ist jeweils der Name der Pflanze und des Gens angegeben, aus denen die Sequenz der Insertion oder des „footprints“ durch Sequenzierung von PCR-Produkten bestimmt wurde. Insertionen in Exons sind mit „Ex.“, solche in Introns mit „In.“ gekennzeichnet. Integrationen von *En1* in der gleichen Orientierung relativ zu kodierenden Strang werden als „direkt“, solche in entgegengesetzter als „invers“ bezeichnet. Transposoninsertionen ( - - ) und „footprints“ sind fett gedruckt, „targetsites“ Duplikationen unterstrichen.

Pflanze	Insertionsort	<i>En1</i> -Orient.	Sequenz der Insertion	„footprint“ (Pflanze)
5M81	<i>DFR</i> , Ex.			AGCGCGCCGCCA
15.783	<i>DFR</i> , Ex.		GACAGTGAATGGAATGTTGGGGATA - -	
5K49.3	<i>CHS</i> , Ex.	invers	GCTAGGACTAAAGGAAGAGAAGATG - -	
4K5-108	<i>CHS</i> , In.	invers	- -TTTGGCATATATCTTCATTACATA	
10.348	<i>CFI</i> , Ex.	direkt	ATGGAAACAATTAGGGCTTTATACG - - ACGGACTGTGAAGCTAAAGCTGTGG	ATACGT <b>ACGGA</b> (13.248)
5G38	<i>F3H</i> , Ex.	direkt	TTTGTGTCGAATCTCGGCGACCACG - - ACGGCCATGTTAGTACTCTATCCAT	CCACGT <b>ACGGC</b> (5G38.2)
3AAJ34	<i>F3H</i> , Ex.	invers	TTTGTGTCGAATCTCGGCGACCACG - - ACGGCCATGTTAGTACTCTATCCAT	CCACGT <b>ACGGC</b> (5AAJ34)
4I30-108	<i>F3H</i> , Ex.			CGATAT <b>ATATGG</b>
5K60.3A	<i>DBP</i> , Ex.	direkt	GGCAGAGGAGAAGTTGGCCAACAAG - -	
5K60.3A	put. Kinase, Ex.	invers	CGCATCTTCACGTTTCAGCCAAATT - -	
5K60.3A	saure Phosp.	direkt	ACAAATCACGTCAACCTCTTAAATA - -	
5K60.3A	<i>TTI</i> , Ex.	invers	CAACCAAACTCTTGTATCAACAAT - - AATACCCTAATTGAGCCTTTACCGC	

### Anhang 3: Segregationsdaten genspezifischer CAPS-Polymorphismen für *AtF3H* und *AtTT1* in den RI-Linien.

C, Columbia; L, Landsberg *erecta*; -, kein PCR-Produkt.

NASC Nr.	Lister & Dean	Ökotyp Marker: TT1	Ökotyp Marker: F3H	NASC Nr.	Lister & Dean	Ökotyp Marker: TT1	Ökotyp Marker: F3H
1900	CL4	C	C	1950	CL209	C	C
1901	CL5	C	L	1951	CL217	L	C
1902	CL7	-	-	1952	CL214	C	C
1903	CL13	C	L	1953	CL231	L	L
1904	CL14	L	L	1954	CL232	L	L
1905	CL17	L	L	1955	CL235	C	C
1906	CL19B	L	C	1956	CL237	C	C
1907	CL25	L	C	1957	CL238	L	C
1908	CL29	C	L	1958	CL240	C	L
1909	CL30	L	C	1959	CL242	C	L
1910	CL32	L	L	1960	CL245	L	C
1911	CL33	L	L	1961	CL253	C	C
1912	CL34	L	L	1962	CL257	L	L
1913	CL35	L	C	1964	CL264	C	L
1914	CL36	C	C	1965	CL266	C	C
1915	CL37	C	C	1966	CL267	L	C
1916	CL46	C	-	1967	CL279	C	L
1917	CL52	L	C	1968	CL283	C	L
1918	CL54	C	C	1969	CL284	C	C
1919	CL59	C	C	1970	CL288	C	L
1920	CL62	C	C	1971	CL295	L	L
1921	CL67	C	C	1972	CL296	C	L
1922	CL68	L	-	1973	CL297	C	L
1923	CL71	L	L	1974	CL302	-	C
1924	CL79	C	C	1975	CL303	L	C
1925	CL84	-	L	1976	CL311	L	C
1926	CL90	-	L	1977	CL321	L	C
1927	CL107	L	C	1978	CL332	C	L
1928	CL113	L	L	1979	CL342	C	C
1929	CL115	C	C	1980	CL345	L	C
1930	CL123	C	L	1981	CL349	L	L
1931	CL125	C	L	1982	CL350	C	C
1932	CL131	C	C	1983	CL351	L	L
1933	CL160	L	L	1984	CL356	L	L
1934	CL161	C	C	1985	CL358	C	C
1935	CL166	C	L	1986	CL359	L	L
1936	CL167	C	L	1987	CL363	C	C
1937	CL173	C	L	1988	CL367	L	L
1938	CL175	L	L	1989	CL370	C	C
1939	CL177	C	L	1990	CL377	C	L
1940	CL179	C	C	1991	CL378	C	C
1941	CL180	-	L	1992	CL386	C	L
1942	CL181	L	C	1993	CL390	L	C
1943	CL182	L	C	1994	CL394	C	L
1944	CL188	C	L	1995	CL395	-	L
1945	CL190	L	L	1996	CL397	-	L
1946	CL191	C	L	1997	CL398	-	C
1947	CL193	C	-	1998	CL400	L	C
1948	CL194	-	L	1999	CL259	L	C
1949	CL199	C	C	4686	CL53	-	-

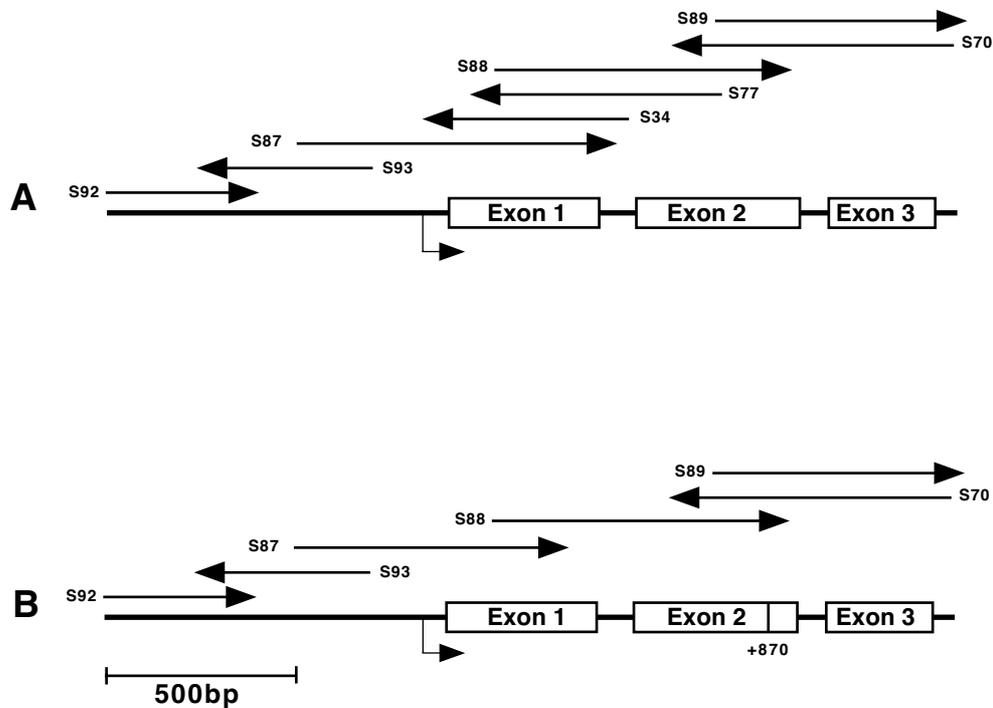
**Anhang 4: Rohdaten zu den Abbildungen 14-17.**

Die GUS-Aktivitäten sind in pMol 4-MU/(mg Protein x min) und die LUC-Aktivitäten in RLU/( $\mu$ g Protein x s) angegeben.

<b>Dunkelwerte:</b>											
Reporter	KonstruktNr.	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	
pAtF3H-866	SA3	74.6	37487	26.3	16.6	5396	40.5	8.0	2707	39.0	
pAtF3H-463	SA4	38.9	36154	14.2	14.1	7267	25.5	5.2	2982	22.8	
pAtF3H-382	SA8	43.5	33531	17.1	15.5	9519	21.5	5.5	2830	25.8	
pAtF3H-229	SA9	12.6	15348	10.8	12.5	8802	18.7	4.4	2176	26.8	
pAtF3H-463-MREm	SA45	37.6	39988	12.4	23.2	16809	18.2	6.7	3155	27.8	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	77.6	68469	14.9	17.9	11420	20.6	2.3	1361	21.9	
pAtF3H-463-dm	SA48	25.8	23188	14.7	9.4	8867	14.0	2.8	1970	19.0	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	24.4	16950	19.0	17.5	11203	20.6	5.9	2820	27.6	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	55.8	32949	22.3	21.2	16484	17.0	4.9	2786	23.2	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	26.5	22079	15.8	18.6	12314	19.9	6.3	3693	22.7	
Reporter	KonstruktNr.	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	
pAtF3H-866	SA3	6.8	2052	43.9	37.7	9610	51.7	11.7	7143	21.5	
pAtF3H-463	SA4	7.5	4496	22.1	19.2	8123	31.2	12.8	11526	14.6	
pAtF3H-382	SA8	8.7	10794	10.7	36.9	18504	26.3	13.4	19019	9.3	
pAtF3H-229	SA9	11.6	4311	35.4	15.2	10935	18.3	7.2	9152	10.4	
pAtF3H-463-MREm	SA45	8.2	3944	27.5	51.2	21236	31.8	6.4	11230	7.5	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	8.6	3911	28.9	22.3	10243	28.7	8.9	14121	8.3	
pAtF3H-463-dm	SA48	4.7	2862	21.7	15.0	8558	23.1	11.4	6153	24.5	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	8.6	2855	39.5	21.8	8179	35.2	7.7	10024	10.1	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	12.2	3344	48.0	29.9	11139	35.5	13.0	13074	13.1	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	6.2	2558	32.1	9.7	5710	22.4	12.4	19515	8.4	
Reporter	KonstruktNr.	Mittelwert MW-LUC	Mittelwert MW-GUS	Fehler MF-GUS +/-	Licht-induktion GUS			Mittelwert MW-GUS'	Fehler MF-GUS' +/-	Licht-induktion GUS'	
pAtF3H-866	SA3	10732	25.9	10.8	132			37.1	4.6	102	
pAtF3H-463	SA4	11758	16.3	5.0	111			21.7	2.7	75	
pAtF3H-382	SA8	15700	20.6	6.4	12			18.4	3.0	13	
pAtF3H-229	SA9	8454	10.6	1.6	7			20.1	3.9	5	
pAtF3H-463-MREm	SA45	16060	22.2	7.7	29			20.9	4.0	22	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	18254	22.9	11.3	17			20.6	3.3	23	
pAtF3H-463-dm	SA48	8599	11.5	3.4	1			19.5	1.8	1	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	8672	14.3	3.3	88			25.3	4.5	56	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	13296	22.8	7.5	108			26.5	5.3	84	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	10978	13.3	3.2	158			20.2	3.2	124	
<b>LUC-Mittelwert des experimentellen Blocks:</b>		13190									
<b>Lichtwerte:</b>											
Reporter	KonstruktNr.	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	
pAtF3H-866	SA3	8974.6	23367	4128.5	2288.7	6545	3758.9	1271.2	3071	4449.5	
pAtF3H-463	SA4	5518.7	36486	1625.9	1561.5	8848	1897.0	589.8	4157	1525.3	
pAtF3H-382	SA8	473.9	21272	239.5	137.1	6551	224.9	69.1	2538	292.5	
pAtF3H-229	SA9	158.0	16392	103.6	61.7	6724	98.6	19.2	2414	85.4	
pAtF3H-463-MREm	SA45	1697.4	39968	456.5	528.4	9969	569.8	196.9	4334	488.4	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	734.9	15582	506.9	552.0	8883	668.0	63.4	1550	439.3	
pAtF3H-463-dm	SA48	20.6	15020	14.7	15.8	10731	15.9	2.7	2462	11.7	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	2253.8	15761	1537.1	2073.0	11986	1859.1	549.6	5525	1069.3	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	5178.9	20683	2691.6	2149.4	11848	1950.1	500.7	2478	2172.5	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	2388.7	9676	2653.6	2145.3	12849	1794.8	745.6	3218	2490.4	
Reporter	KonstruktNr.	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	GUS	LUC	GUS'	
pAtF3H-866	SA3	943.9	3327	3049.9	4218.3	11153	4065.4	2747.7	9233	3199.0	
pAtF3H-463	SA4	609.1	4015	1630.7	993.0	7255	1471.3	1608.7	10565	1636.8	
pAtF3H-382	SA8	175.5	8757	215.5	366.6	14075	280.0	228.1	16333	150.1	
pAtF3H-229	SA9	35.6	5558	68.9	137.4	10132	145.8	47.3	6493	78.3	
pAtF3H-463-MREm	SA45	219.6	6794	347.4	957.9	18952	543.3	317.4	10089	338.1	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	152.9	3688	445.5	396.9	9897	431.1	491.2	15417	342.5	
pAtF3H-463-dm	SA48	7.3	2590	30.2	16.3	8826	25.7	25.1	6310	42.7	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	606.8	4421	1475.4	1120.8	8316	1448.9	920.0	8551	1156.6	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	1119.8	5389	2233.8	4165.5	15560	2877.7	1672.6	11943	1505.4	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	775.0	4095	2034.5	4022.4	10296	4199.3	2534.1	14944	1822.8	
Reporter	KonstruktNr.	Mittelwert MW-LUC	Mittelwert MW-GUS	Fehler MF-GUS +/-	Licht-induktion GUS			Mittelwert MW-GUS'	Fehler MF-GUS' +/-	Licht-induktion GUS'	
pAtF3H-866	SA3	9449	3407.4	1210.7	132			3775.2	225.2	102	
pAtF3H-463	SA4	11888	1813.5	762.8	111			1631.2	59.9	75	
pAtF3H-382	SA8	11588	241.7	61.9	12			233.8	20.8	13	
pAtF3H-229	SA9	7952	76.5	23.4	7			96.7	11.1	5	
pAtF3H-463-MREm	SA45	15018	652.9	238.6	29			457.3	39.7	22	
pAtF3H-463-ACEm	SA16	9169	398.5	102.9	17			472.2	44.7	23	
pAtF3H-463-dm	SA48	7323	14.6	3.4	1			23.5	4.8	1	
pAtF3H-463-ACS5m	SA15	9093	1254.0	300.8	88			1424.4	115.9	56	
pAtF3H-463-ACS3m	SA43	11317	2464.5	745.0	108			2238.5	203.2	84	
pAtF3H-463-MRS2m	SA44	9180	2101.8	502.0	158			2499.2	369.0	124	
<b>LUC-Mittelwert des experimentellen Blocks:</b>		10749									

**Anhang 5: Sequenzierschemata für *AtF3H*.**

In **A** ist das Sequenzierschema für die *AtF3H*-Sequenz aus dem Ökotyp Columbia (Genbank-Eintrag AF064064), in **B** das für die *Atf3h*-Sequenz aus der *tt6*-Mutante (Genbank-Eintrag AF064065) dargestellt. Über dem Genschema sind jeweils die zur Sequenzierung von PCR-Produkten herangezogenen Primer angegeben.



**Anhang 6: Genbank-Eintrag für die *AtF3H*-Sequenz aus dem Ökotyp Columbia.**

LOCUS AF064064 2240 bp DNA PLN 26-OCT-1998  
 DEFINITION *Arabidopsis thaliana* cultivar Columbia flavanone 3-hydroxylase  
 (F3H) gene, complete cds.  
 ACCESSION AF064064  
 NID g3790547  
 VERSION AF064064.1 GI:3790547  
 KEYWORDS .  
 SOURCE thale cress.  
 ORGANISM *Arabidopsis thaliana*  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;  
 Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
 eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;  
 Brassicales; Brassicaceae; *Arabidopsis*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2240)  
 AUTHORS Wisman,E., Hartmann,U., Sagasser,M., Baumann,E., Palme,K.,  
 Hahlbrock,K., Saedler,H. and Weisshaar,B.  
 TITLE Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *arabidopsis thaliana*  
 population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes  
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (21), 12432-12437 (1998)  
 MEDLINE 98445388  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2240)  
 AUTHORS Sagasser,M. and Weisshaar,B.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (06-MAY-1998) Abt. Biochemie, MPIZ,  
 Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..2240  
 /organism="*Arabidopsis thaliana*"  
 /cultivar="Columbia"  
 /db\_xref="taxon:3702"  
 /chromosome="III"  
 /note="close to m457"  
 mRNA join(837..1234,1325..1753,1837..>2124)  
 /gene="F3H"  
 /product="flavanone 3-hydroxylase"  
 gene 837..>2124  
 /gene="F3H"  
 CDS join(875..1234,1325..1753,1837..2124)  
 /gene="F3H"  
 /function="catalyzes the formation of dihydroflavonols  
 from flavanones"  
 /codon\_start=1  
 /product="flavanone 3-hydroxylase"  
 /protein\_id="AAC68584.1"  
 /db\_xref="PID:g3790548"  
 /db\_xref="GI:3790548"

```

/translation="MAPGTLTELAGESKLNKSFVRDEDERPKVAYNVFSDEIPVISLA
GIDDVDGKRGEICRQIVEACENWGFQVVDHGVDTNLVADMTRLARDFALPPEDKLR
FDMSGGKKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYPVRNRDYSRWPDKPEGWVKVTEEY
SERLMSLACKLLEVLSEAMGLEKESLTNACVDMQKIVVNYYPKCPQPDLTGLKRHT
DPGTITLLLQDQVGGIQAATRDNGKTWITVQPEGAFVVNLGDHGHFLSNGRFKNADHQ
AVVNSNSSRLSIATFQNPAPDATVYPLKVRERGEKAILEEPITFAEMYKRKMGRDLELA
RLKKLAKEERDHKEVDKPVQIFA"

```

```

BASE COUNT      644 a      427 c      469 g      700 t

```

```

ORIGIN

```

```

   1 tctttgttct gtatgggcct ttgactaact aaatggccca gcccgttcat aacattaatc
  61 atttaaaaaa tcacattgat ggtataacac taatTTTTTT tttcacaggt gtataaccaa
 121 ctaatataaa tatgcacatt cacttaaaat taactaatat cataaagagt attatggcgt
 181 ctgttttatt gtttatccat aactacatca atcaaataca agttgatata ctagttagaa
 241 cctaataactt taaaaatccg atcattaatt tatcttgtct gcttaagatt tttttttgt
 301 gaataagggt taattatctc atcaatacga tttagtaaaa agtctgtgca aaaattaatg
 361 acgattggga tttttgtaac gcaagcccgt accagaacat gtctccgcca cgtgatttct
 421 ccacagacca caagcatttt taagacgtgg ctttctatca accgttaaaa acgtaaatca
 481 tattaacccat gtgtctacta cctacgggtg aaacgaaact gtataacgct cctatcatat
 541 aatagtaaatg tgatacgttg gaatgtagcc aaaaagcata aaaaataaat agataattaa
 601 gtttataaatg ttttcctaca aaatattatt ataccgtatg tttttttat tttatTTTct
 661 gaagttaaaa acagatgtag ttagttgagt aaattgtgtt ctagaaagag aagagagagc
 721 agtagtaccg tggtaggtag ctagcgacct cttcgttcgt cagtcacac aagctttgaa
 781 agattttcag ctaccactct ctcttttata tattcattac acatctcttc tttctatatc
 841 tctcttaatt tagtcttttg tcttcgtaat tacaatggct ccaggaactt tgactgagct
 901 agccggagag tctaagctca actctaaatt tgtcaggac gaagatgaac ggcccaaagt
 961 cgcttacaat gtgtttagcg acgaaatccc ggtgatctct ctcgccggtg tcatgacgt
1021 cgatggaaaa agaggagaga tctgccgca gatcgttgag gcttgtgaga attggggcat
1081 cttccaagtg gtcgatcacg gcgctgatac taacttagtg gcggatatga ctctctcgc
1141 tctgtacttc tttgctttac ctccggaaga caagctcctg ttcgacatgt ccggtggtaa
1201 aaaaggagga ttcacgtctc ctatgcacct ccaggtaaaa gccacaccac aatcttctag
1261 gttaaatacgt taattatggt ttaatcttgc cgtaaagac ataataatta tactataaat
1321 acaggagagag gctgtgcaag attggagaga gattgtaacg ttttctcgt acccggtgag
1381 aacagagac tactcacggt ggccagataa gccggaaggt tgggtgaaag tgacggagga
1441 gtatagttag aggcttatga gtttggcttg taagcttctt gaggttttgt ctgaagctat
1501 gggctctgag aaagagtctc ttaccaatgc atgcgtcgat atggacaaa agattgttgt
1561 taattattac ccaaaatgcc ctacgctga tctaccctc ggactcaagc gtcacactga
1621 cctggaacc attaccttgc tgctacaaga ccaagtcggt ggattacaag ccacacgtga
1681 caatggcaag acatggatta cggttcagcc tgttgaagga gcgtttgtcg tcaatctcgg
1741 cgaccacggc catgttagta ctctatccat ttattggctt tttgtttct ctgtttttgg
1801 ttttgacttg gtcaatcttg atttgtcttg atgaagtttt tgagcaatgg gaggttcaag
1861 aatgctgatc atcaggccgt ggtgaactct aactcgagca gattatccat agccacgttc
1921 cagaaccccg cgccgatgc cacagtgtat cactgaaag taagagaagg agagaaggca
1981 atattggagg agccaatcac gtttgcgag atgtataaga gaaagatggg aagagatttg
2041 gagcttgctc gcctcaagaa gctggctaaa gaggagcgtg accacaaaga agttgacaag
2101 cctgtcgacc aaatcttctc ttagaatctt tgtgttcttg ctacttgtt gttgcgttgg
2161 ttctgttttg tacgttggtg ctgaaaatta tgctaggctc ggtgtgtttt gtgtttattt
2221 atgttctttc gaatcataaa

```

```
//
```

**Anhang 7: Genbank-Eintrag für die *Atf3h*-Sequenz aus der *tt6*-Mutante.**

LOCUS AF064065 2240 bp DNA PLN 26-OCT-1998  
 DEFINITION *Arabidopsis thaliana* cultivar Landsberg erecta mutant flavanone 3-hydroxylase (f3h) gene, f3h-1(tt6) allele, complete cds.  
 ACCESSION AF064065  
 NID g3790549  
 VERSION AF064065.1 GI:3790549  
 KEYWORDS .  
 SOURCE thale cress.  
 ORGANISM *Arabidopsis thaliana*  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;  
 Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
 eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;  
 Brassicales; Brassicaceae; *Arabidopsis*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2240)  
 AUTHORS Wisman,E., Hartmann,U., Sagasser,M., Baumann,E., Palme,K.,  
 Hahlbrock,K., Saedler,H. and Weisshaar,B.  
 TITLE Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *arabidopsis thaliana*  
 population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes  
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (21), 12432-12437 (1998)  
 MEDLINE 98445388  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2240)  
 AUTHORS Sagasser,M. and Weisshaar,B.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (06-MAY-1998) Abt. Biochemie, MPIZ  
 Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..2240  
 /organism="*Arabidopsis thaliana*"  
 /cultivar="Landsberg erecta"  
 /specimen\_voucher="NASC reference line NW87"  
 /db\_xref="taxon:3702"  
 /chromosome="III"  
 /note="from tt6 mutant line  
 close to m457"  
 mRNA join(837..1234,1325..>1708)  
 /gene="f3h"  
 /product="flavanone 3-hydroxylase"  
 gene 837..>1708  
 /gene="f3h"  
 /allele="f3h-1(tt6)"  
 CDS join(875..1234,1325..1708)  
 /gene="f3h"  
 /note="truncated protein"  
 /codon\_start=1  
 /product="mutant flavanone 3-hydroxylase"  
 /protein\_id="AAC68585.1"  
 /db\_xref="PID:g3790550"  
 /db\_xref="GI:3790550"

```

/translation="MAPGTLTELAGESKLNKSFVRDEDERPKVAYNVFSDEIPVISLA
GIDDVDGKRGEICRQIVEACENWGFQVVDHGVDTNLVADMTRLARDFALPPEDKLR
FDMSGGKKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYPVRNRDYSRWPKNKPEGWVKVTEEY
SERLMSLACKLLEVLSEAMGLEKESLTNACVDMQKIVVNYYPKCPQPDLTGLKRHT
DPGTITLLLQDQVGGLQATRDNGKWTWITV"

```

```

mutation          1706
                  /gene="f3h"
                  /note="only detected difference from wild type
                  sequence"
                  /replace="c"

```

```

BASE COUNT      640 a    432 c    467 g    701 t
ORIGIN

```

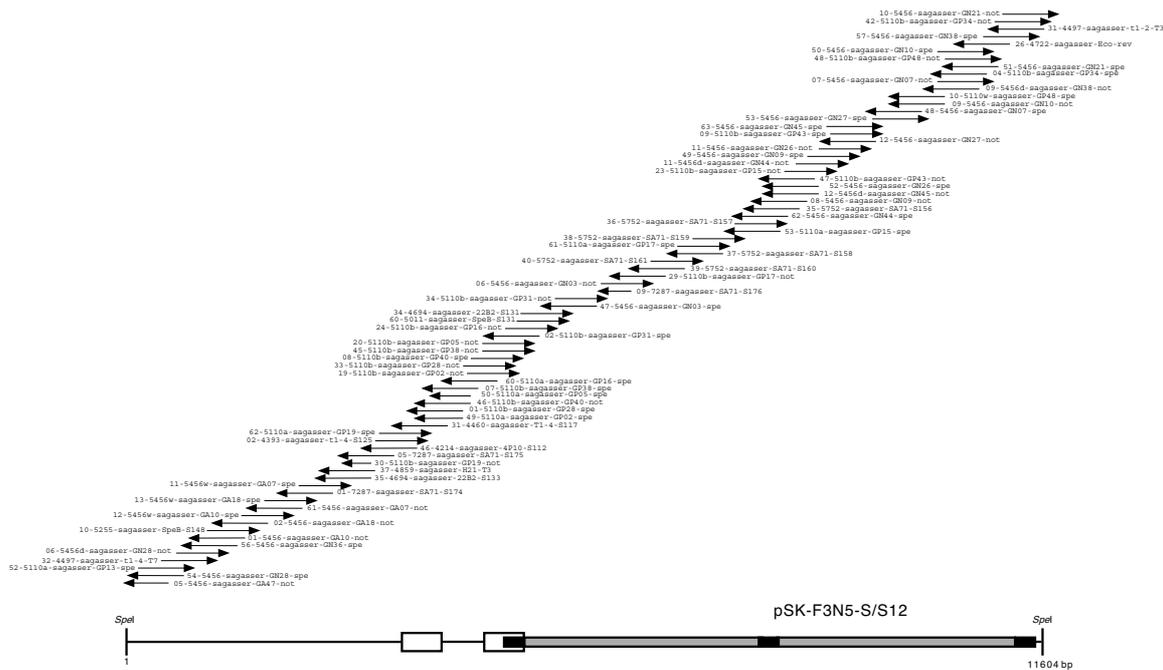
```

  1 tctttgttct gtatgggcct ttgactaact aaatggccca gcccgttcat aacattaatc
 61 atttaaaaaa tcacattgat ggtataacac taattttttt ttccacaggt gtataaccaa
121 ctaatataaa tatgcacatt cacttaaaat taactaatat cataaagagt attatggcgt
181 ctgttttatt gtttatccat aactacatca atcaaataca agttgatata ctagttagaa
241 cctaataactt taaaaatccg atcattaatt tatcttgtct gcttaagatt ttttttttgt
301 gaataagggt taattatctc atcaatacga tttagtaaaa agtctgtgca aaaattaatg
361 acgattggga tttttgtaac gcaagcccgt accagaacat gtctccgcca cgtgatttct
421 ccacagacca caagcatttt taagacgtgg ctttctatca accgtaaaaa acgtaaatca
481 tattaacccat gtgtctacta cctacgggtg aaacgaaact gtataacgct cctatcatat
541 aatagtaaatg tgatacgttg gaatgtagcc aaaaagcata taaaataaat agataattaa
601 gtttataaatg ttttcctaca aaatattatt ataccgatg tatttttttt tttattttct
661 gaagttaaaa acagatgtag ttagttgagt aaattgtgtt ctagaaagag aagagagagc
721 agtagtaccg tggtaggtag ctagcgacct cttcgttcgt cagtcacac aagctttgaa
781 agattttcag ctaccactct ctcttttata tattcattac acatctcttc tttctatatac
841 tctcttaatt tagtcttttg tcttcgtaat tacaatggct ccaggaactt tgactgagct
901 agccggagag tctaagctca actctaaatt cgtccgagac gaagacgaac gccctaaagt
961 cgcttacaat gtgtttagcg acgaaatccc ggtgatctct ctccgccgta tcgatgacgt
1021 cgatggaaaa agaggagaga tctgccgta gatcgtcgag gcttgtgaga attgggggat
1081 cttccaagtg gttgatcacg gcgctgatac taacttgggt gcggatatga ctgcctcgc
1141 tcgtgacttc tttgctttac ctccggaaga caagctccgt ttcgacatgt ccggtggtaa
1201 aaaagggtgga ttcacgtctc ctagtcacct ccaggtaaaa gccacaccac aatcttctag
1261 gttaaatacg taattatggt ttaatcttgc cgtaaagac ataataatta tactataaat
1321 acagggagag gctgtgcaag attggagaga gattgtaacg ttttctcgt acccggtgag
1381 aacagagac tactcacggt ggccaaataa gcctgaagga tgggtgaaag tgacggagga
1441 gtatagtgag aggcttatga gtttggcttg taagcttctt gaggttttgt ctgaagctat
1501 gggcttgag aaagagtctc ttaccaatgc atgcgtcgat atggaccaa agattgttgt
1561 taattattac ccaaaatgcc ctacagctga tctaccctc ggactcaagc gtcacactga
1621 ccctggaacc attaccttgc tgctacaaga ccaagtcggt ggattacaag ccacacgtga
1681 caatggcaag acctggatta cggtttagcc tgttgaagga gcgtttgcg tcaatctcgg
1741 cgaccacggt catgttagta ctctatccat ttattggctt ttttgtttct ctgtttttgg
1801 ttttgacttg gtcaaccttg atttgtcttg atgaagtttt tgagcaatgg gaggttcaag
1861 aatgctgatc atcaggccgt ggtgaactct aactcgagca gattatccat agccacgttc
1921 cagaaccccg cgccgatgc cacagtgtat ccaactgaaag taagagaagg agagaaggca
1981 atattggagg agccaatcac gtttgcgag atgtataaga gaaagatggg aagagatttg
2041 gagcttgctc gcctcaagaa gctggctaaa gaggagcgtg accacaaaga agttgccaag
2101 cctgtcgacc aaatcttctc ttagaatctc tgtgttcttg ctacttgtt gttgcgttgg
2161 ttctgttttg tacgttggtg ctgaaaatta tgctagcgc ggtgtgtttt gtgtttattt
2221 atgttctttc gaatcataaa

```

## Anhang 8: Sequenzierschema für *AtTT1*.

Dargestellt ist die Auswertung der mit dem GPS-Kit erhaltenen Sequenzen für das 12 kb *SpeI*-Fragment aus dem BAC-Klon F3N5 (Genbank-Eintrag AF190297). Die Pfeile im oberen Teil der Abbildung symbolisieren Länge und Orientierung ausgehend von Transprimerinsertionen gewonnener Sequenzen. Es sind jeweils die zugehörigen Dateinamen angegeben. Das Genschema im unteren Teil entspricht Abbildung 23.



**Anhang 9: Genbank-Eintrag für ein 12 kb *SpeI*-Fragment aus dem BAC-Klon F3N5, das das *AtTT1*-Gen des Ökotyps Columbia enthält.**

LOCUS AF190297 11604 bp DNA PLN 27-SEP-1999  
DEFINITION Arabidopsis thaliana cultivar Columbia Transparent Testa 1 (TT1)  
locus, complete sequence.  
ACCESSION AF190297  
KEYWORDS .  
SOURCE thale cress.  
ORGANISM Arabidopsis thaliana  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;  
Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;  
Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 11604)  
AUTHORS Sagasser, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B.  
TITLE Transparent Testa 1 - a zinc finger protein affecting catechin accumulation in the seed coat of Arabidopsis thaliana  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 11604)  
AUTHORS Sagasser, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (27-SEP-1999) Abt. Biochemie, MPIZ, Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..11604  
/organism="Arabidopsis thaliana"  
/strain="Columbia"  
/db\_xref="taxon:3702"  
/comment="sequenced subclone of BAC F3N5"  
/chromosome="I"  
/map="between mi63 and agp6e"  
TATA\_signal 3305..3313  
mRNA join(3346..3869,4495..5072)  
gene 3387..4923  
/gene="TT1"  
CDS join(3387..3869,4495..4923)  
/gene="TT1"  
/note="zinc-finger protein"  
/codon\_start=1  
/product="Transparent Testa 1"  
/note="duplication 4690..8030 and 8030..11370"  
  
/translation="MESPPLYEISSSSSSEKPRHHFQSLDLFPNLNQNSCINNTLIEP  
LPLIDRINLNSNLDLNPPLYAEEGEQEEEEEEEDREVDVDLHIGLPGFGKPSNDAK  
QLKKRNGKEIATYDAGKGIENELSGKAYWIPAPEQILIGFTHFSCHVCFKTFNRYNNL  
QMHMWGHGSQYRKGPESLKGTPRAMLGIPCYCCVEGCRNHIDHPRSKPLKDFRTLQT  
HYKRKHGHKPFSCRLCGKLLAVKGDWRTHEKNCGKRWVCVCGSDFKHKRSCLKDHVKAF  
GSGHGPYPPTGLFEEQASNSSVSETLFF"

BASE COUNT        3729 a    1706 c    1994 g    4175 t  
 ORIGIN

```

1 actagttgac cacatgaact aaacttcttg gacaatcatc aatggacaca tgttagcttt
61 gatttgctgt gaatttgttt tatctctcag tataattatc actttcttgt ttatgcttac
121 aatataatatt atggtttaga gttttgtttt acgattttgg atttaatgga taaagattag
181 ggattgaggg tttgagtta gggtaaggaa attaggcttt agtgtagagt ctcaagggtt
241 taaggtttac acaccacaaa ccatttgctt gtgtcaacaa cattgtatca tttttcaaaa
301 aaaattttgt tgaaggacct tgtattgata tatataaagc gaactgtttg gataagttta
361 tgtggacaat atatatggga tacataatta gaaacatagt ttaatctctg atatttgttg
421 ggaatatata atactactta ggtttaata tatagtattt catatgatgc gaactgtttg
481 gataagttta cgtggacaat atatatgtga tacataatta ggaacatagt ttaatatttg
541 atatttgttg ggaatatata attctactta cgcttaaata tttttatttg aattaaagca
601 tttcatataa tgtgaactgt ttgaatatgt ttacatggac aatataatatt ggatacataa
661 ttaggaacat agtttaatat ctgatatttg ttggaaatat ataataatag ttaagcttaa
721 atatttttat ttgatataat atttgactta aacattttta tttgattaaa ctaaatttta
781 acagatctta ccattaattt ttaacttgtt atctctatct aatgtcacgt atattgtttt
841 ttagtaattg gcaacaaaat taatttatct cctgtttttt ttccttctca cctttataag
901 ggtaaaatgg tcataaaatc agtaaaaaag gtggaaaagt gccactccc tcaaaagtgt
961 cataaacgtc caaactttct ccataaatgc cttattttgg aacattccat atagattata
1021 acttattata ggttataact tattatagtt acgttaatta tatgaatttc tattagttat
1081 cacacaatca aatattttta tcacaaaaat ttattaaaca ttttatatgt ggtagtataa
1141 tgcaataaca tattatatgt ggtggcataa tgcaacaaca tattatttgg ctacgaatct
1201 cctttatttt tcgtttatgt aacaacagta aaacggattg tttagcttga tattctatat
1261 tataataatc taaagttatt tttgtaaatt attttttttc caaattggat aaccaatcat
1321 agagttggta tttttttttt ttgttaaaat atatatatac tgaatatcga gttattgtgc
1381 atgacaattt atatggcgga cgagtttaaa tcgacattaa taacaattaa aatattatta
1441 atctaatact taaatactgg ttaaactacc aatttattat tcttaatacc acatattaaa
1501 catatctaact ctttactgat tcaataaaga ttgtgtgaaa caaaagtgtt cttgcaaaga
1561 attaataatg tacatagatt ttgttctggt agctagtact aaaatccatt aataaaaacta
1621 atacggtatc tttattgatc atgtaacatg aattattcat gtatatacaa ttgaccctat
1681 taattttgca taaatttcaa cttggcaaat tcattgattt tgtaaaccgt taattctgct
1741 aatttcacaa ttctcttgta cgctaaaaat ttatgcgat tatcgtattg atatgcaaat
1801 atcgaagaat ttatagtttt atatagtaga aatgaaggta tttgcaaac gagttctaac
1861 gtgaaataac actaattaat taattagagt ttgaacctac agagattcga cttgatccac
1921 ttgaaaaatt catttactct actaatttgg ttactccatg gaccatgatt atgctattct
1981 gtaggactct aacaactgac ttgacacaat ctctttcgtg aacaataatg ggttatattt
2041 ttttgttttg ttttttcgga caaattagcc acgttgcttt agaccatttt gtagttctta
2101 tcttgaatca aagtctcagc taaaaaaaaa aaaaaaacgc ttaaatccac tagctagact
2161 acgactacgt tggttaaatg ttttttttta aatacaatac attgaagtta aatatttgaa
2221 taaagaaaat ctaatcagca tgtatacagt atattagaag taatacttga tcagaaaaat
2281 aacatacaat aataaaaata taaaaaaaaat atgttagttt ttgggaatat tataattcta
2341 ctttcaatca aaataactaa aagaaataaa atcttcacac atagtggtaa taattggcta
2401 gtatgaatat tgaattgtgg agaccgga taatatttga ctaggcagaa attattgata
2461 tgtactaagt taataacctt gcaaagaaat tcttttagtg aaacgtgtac atttgtaaaa
2521 acagatttaa cactaaatct tgacttgtat atactattaa ttattccttt tctcttattg
2581 gtatgtcaaa tctagtgttt acaaaaccag aggtgttgac cgttagagag agaattaaac
2641 aacttacata catacaaac ataaccaaa aaaataataa taatgcatct tccataataa
2701 taataaatatg aattcaacat tagcattcat ttcattacce aaatccgaaa tttcattgat
2761 taaaattaat acaattgtat tgtagaaaag ctaaaagctt acgtaaatgc caaagatagt
2821 caaaaccctg caatgacaaa gttgcaaaa tcttgaagag tttgggtccac aaaatthaag
2881 gttcttgttt ttccactcta tttataggca aagagatgag acagagaaga ttaaattact
2941 tcttaacaaa ggttgttttc actcaaccac atgcattctc aagtgtctgc tctcaccatt
3001 cccaagatt cccatttact cacttctcta tttggtacgt aagtacaca atatgattct
3061 aaattatttt acacattatt cgttttgttc aacttgctt tcgactttcg taaacctata
3121 tagttcatcc aatattattc ggtaaattcg atatttatca atctttattc tcgtaggtta
3181 aaggagacga ttgatacgtg ggatctactt acgtatctgc atgattatta gttataaaaag

```

3241 ttattgcaaa cattaaatta ctttcataga gagcaatcat tatattaagg taatttaatt  
3301 ttattatata tagtcaagat ttaaaggaat aaagaaaaga ttctcaaac atttcatctc  
3361 tctccaacaa ctattcacca cattcaatgg agtcaccacc actatacgag atatcctcaa  
3421 gctcttcttc tgaaaaacct agacaccatt tccaatccct tgatctcttc cctaacctca  
3481 accaaaactc ttgtatcaac aataccctaa ttgagccttt accgcttatt gatcgcataa  
3541 acttgaactc aaacctagac ctaaacccta atcccttgta tgcggaagaa ggagagcaag  
3601 aggaggaaga agaagaagaa gaagaccgtg aagtggacgt ggacttacac atcggccttc  
3661 ctggttttgg taaaccaagc aatgatgcta aacagctgaa gaagagaaat ggggaaggaga  
3721 tcgccacata tgacgccgga aaaggcatcg agaatgaact ttccggaaag gcatactgga  
3781 tcccggcgcc ggagcaaatt ctcatagggg tcaactcattt ttcttgccat gtatgcttca  
3841 agacattcaa tcgctacaac aatcttcagg tacgagtcaa tatactctcat gcgcattgct  
3901 tttccatgca caaacatata taataaattc atcttataga gttatatctc cggatctaata  
3961 gttatgagtt tattcatatc tatatatata catatatata tatatatata tatatatata  
4021 tatataattc tgaatttatt tgataaaaagc taaacaacca ggatttaata gatgatttac  
4081 ctttggatct tattatacaa tttacaaatt taatcaagtc aactaatcgt gatttaatta  
4141 cttttttttg taagaagagt tggtaatata tttttttatg gtaatgtttt catgaaaata  
4201 attcatcaca actctttaca tttatttaat gccttaacta aagctgaatt cgaaaaagtt  
4261 gaaataaatt atctactaag atttgattga ctatagtttt taatagtttt cttttctcat  
4321 atatatatta tcatagtagt caaaacattt gattcaaact taaatacaca gatttcttga  
4381 atgaaacatt actatgctcg gtcaataata tgattttaag gaaccatggt atttcatttt  
4441 attacttaag gaaacctttt tgttttttgt tgactctaaa tattatgaat atagatgcac  
4501 atgtggggac atggttcaca atacaggaaa ggaccggagt cactgaaagg cacacagcca  
4561 cgagccatgt tagggatccc ttgttactgc tgcgttgaag ggtgcaggaa ccacattgac  
4621 catcctcgtt ccaagccact gaaagacttt aggacgctcc aaacgcacta caaacgcaaa  
4681 cacggacaca aacccttctc gtgtcgcctt tgcggtgaag ttttgctgt caagggcgat  
4741 tggcgaacac atgagaagaa ttgtggaaaa cgttgggttt gcgtttgctg ttctgatttt  
4801 aacacaaaac gttctcttaa ggaccatggt aaggcgtttg ggtctggtca tgggccttat  
4861 ccaactgggt tgtttgaaga gcaggcttct aattcatctg tctccgagac tttgtttttt  
4921 taaatttggg catctttttc tttcgcttat gaaatatcta tttacttttag aaaaataata  
4981 atgtggtatc taattgttcc aaattagtaa cacgaagtgt accattatat ttttcatcac  
5041 tacaaatggt attcagagaa aattatcatt aattgtctcg ttaaagatag aataggggtt  
5101 gaatttatca aatattaaaa acagatcaat acaaaattga ccatgcatat gcacttgaat  
5161 attctgattt ctttatgatg taatctcatt caagaaaagc tttgggaaaa tttcaacaaa  
5221 aaaaagaaat atttaatatt tgtcaataat aaaaccctcg aatttttttt ttctaattgg  
5281 aaaatcaact gatctcattg tgtattttta ttcttgaatt taattgagaa atcaactaat  
5341 ctattgctat ttttgtttgt atttatcttg ttttaattta catttaacat tttaaatatt  
5401 ttttttgatg gtacattgta tgattgtag tttgttattg aattgcagtt gtttttctta  
5461 aattaaaaaat ttgagtttgt aaataagttt tgcaacagtt gttgatgatg attccaagtc  
5521 atatttttat tcttttaaat ttaagaccaa atatttgata tatatggttg tcgaaagacc  
5581 taatatatag ccaatgatg tatttgggtt gatctageta gtctggttaa attgaaatac  
5641 tttctagatc aatgtcttgt tgacataaac gcttgtttta atatgcatca aagaaaaaaa  
5701 gaagaaatta ttttataaga ataataaatt gatcacgtac ttacatattt ttatgttttt  
5761 atgttattgt catggaaaaa aacaaatcat tagaattttt cataattcag aattggcaat  
5821 actcagggcg ccatctacag attcgggagc ttctttttgg agcaggaaca aaccactttt  
5881 catcaccgaa taattgattg ttgcagattt tcttgcaagc ttcatcaca atttcaggag  
5941 taggtttttt cgccgctttc aagcactcgt tttgtgcaca atgtttcaca cacattgtta  
6001 tactgtttga ttgagcaatg tgtgctgaaa acatcatcgt caatatagct acgattatta  
6061 aacactgca tgtttgaaat ccataacgt atcgttttta agtattagtg atgatttaat  
6121 acaaatgagt attacaaaat gttttactcc ttgtttatat ttgtgaagaa gataatttgg  
6181 tgggtaaatg ttggttagtct tgggtattta tatagtgaat ctaatggtgt ccatttttag  
6241 caattgtttt aaatatgttt cttgtttctc tatctagcaa acaaatctcg tagagtttctg  
6301 ttgtgcttta ctttttttagt tgtccaaaca aatttttgct atgaaaagag atcgtagctt  
6361 gcagatgtac ccatatgcaa ttttggtttt atttttagt cacatggtgt tacgagttat  
6421 tacgaatatt tattttaga gcagcataga tctattagat taaatctatt aaatggttca  
6481 gtgatatatg tgaatatgaa tacagtaacg gttccaatag cctctatttt ctctcctaga  
6541 caccattttc aagacacgcc acgtgcaagt ggggaaggag cttgcttgaa gaagaagata  
6601 tttttaggat ctaaaaatat ctttaacaga ctctgttcta ttataataa ggagagagat  
6661 cgatttagaa ggattatgct tttgatgttg tgagagtttt ttttgtcaga atttggccaa

6721 gcgatgtgct tgaggagaga tcaatgttga tctctatgtt atcgtgaggt tgaatgttca  
6781 ggcgaatgat tatgtttctg gatttgcatt ggttattggt ttgataatca gtcggatcat  
6841 ctttctattht gagtattgta tttgaaattg gagtttggga tatcaacaac ttaacattgg  
6901 tggataatga tgctgcaag aaacaattgg agttcctcat gggcggattc aagctactat  
6961 gccaatcggg ggtgcaattt ttggagatgt tgacttcgat ggaggaaacc ttgaagcгаа  
7021 tggtttgctg agtagagagg attgaaatct gatcgtattc agatgacggg agacagctgg  
7081 acctccggat cttcactaaa ggtaatccga agagtggatt gcgatgactg aagctcaatt  
7141 tcttggtggt gactatagtg agaaagacaa gttggcatgt gtttctgggt tttttgggtg  
7201 ccaagcaaaa ttttgattcc acaaggaact atcgtggatt ccgttcaata gttggagcca  
7261 ggtgaaggat ggtttattgt taacgtttgg aaacaatcgg gacaaaaagc gagtacttat  
7321 ggaactcgat cttgaaatga agcattggat caaagatttt gatcgcaaga gggaggcaca  
7381 taaatttctt gaatcagaag ctatcgttgt aagcgcacat agttaggaga tagtttсгаа  
7441 caaaaatggt gaagcaattc aggatataga gttgtcgggt ggagggtgact tgattgacaa  
7501 agattcaccg attcaggaga tcgctcaagt tcaaagaagg aattgattga gtcattgggt  
7561 gtttttgaga aattgcaagg tgcatttгта aagaacaatc gggatatacc accatttгgt  
7621 catcaaattc tcaatgagaa gcaagaggca aaccatgtgt tagataaact gtcctttaga  
7681 agacacaaac atcaaaagtgg gaagagaagt atatctccta aggacatttc caacccta  
7741 ttatttttaga gaaaaaactc taaattcttc tccaacccta ctctatatag aactctaaaa  
7801 tagagaaatc agcagaattg ttttatatat agagtgacta tattttcttc tatgttttag  
7861 agttgattgt tttatttata ctttagtcct tcaaatttaa ttttaattgaa tcgctcttct  
7921 cttctttgac tttcttctc ttctctgcca cgtcatcatc cacgtcatcc ttcgcttct  
7981 ctaaagaatg ctgaaatcgt tttctcacat acgtctgatg aaccttatca cccttctcat  
8041 gtcgcatttg cggtgagctt ttggctgtaa agggcgattg gtgaacacat gagaagaact  
8101 gtgggaaata ttgggtttgc cgtttgcggt tgcggttctg attttaaca caaacgtttg  
8161 ggcttggttg tgggccttat cagactgggt tttttaatag cagacttcta atttatctgt  
8221 ctccagact ttgttctttt aaatttgggc atcttttctt cttcgcttat ggagtatcta  
8281 tttacttttag aataataata caatgtggta tctaattggt ccaaattagg aacacaaagt  
8341 ctaccattac atttttcatc tctatattag ttaataacac aaatgtataa atgagaaaat  
8401 ggcttctatt gtttataata attactagaa atgtaattca gagaaaatta ttattaattg  
8461 tctcgtttaa gatagaatag ggtttgaatt tatcaaata gaaaaacaga tgaatacaaa  
8521 attgaccata catatgcact taaatattct gatttcttta tagtgtaatc tcattcaaga  
8581 aaagctttgg aaaaattcca acaaaaaaaaa aactatttta tatctgtgaa taattaaacc  
8641 cctgaatttt ttttattcta attggaaaat tggaaaatca actgatctat ttgtgtattt  
8701 ttcttcttga attaattgag aaattaacta atatgttggt atttgttgt atttatctta  
8761 tataattcaa catttaacat tttttttttt taactgggtac attgtatgat tgttagttg  
8821 ttactgaatt gcagttggtt tttcttcat taaaaattg agtttgtaaa taagttttgc  
8881 aacagttggt gatgataagt catattttta ttcttttaaa ttcaaggcca aatatttgat  
8941 atatatgttg gtcgaaagac ttaatatata gccaacgtac gtatttgggt tgatctagct  
9001 agtttggtta aatcgaaata ctctctagac caatgttttg ttgacataaa cacttgtttt  
9061 aatatgcatc aaaaattaaa ggaagaaatt attttataag aataatgaa tgatcacgta  
9121 cttacatatt tttatattgt tatgttataa tcatgaaaa acaaatcat taggagtttt  
9181 cataattcag aattggcaat acttaggcgc ccatctacag attcgggagc ttccttttg  
9241 agaaggaaca aaccactttt catcactgaa taattgattg ttgcagattt tcttgcaagc  
9301 tcatcacaa atttcaggag tagttttttt cgccgctttc aagcactcgt tttgtgcaca  
9361 atgtttcaca cacattgtta tactgtttga ttgagcaatg tgtgctgaaa acatcatcgt  
9421 caatataatt acgattatta aaactctgca tgtttgaaat ccataacgt atcgttttta  
9481 agtattagtг atgatttaat acaaatgagt attacaaaat gttttactcc ttgtttatat  
9541 ttgtgaagaa gatgatttgg tgggtaatgt tgggttagtc ttgggtgatt atatagtгаа  
9601 actaatgttg tccattttta gcaattgttt taaatatggt tcttgtttct ctctctagca  
9661 acaaatctt gttagagttc gttgtgcttt acttttttag ttgtccaaac aaattattgc  
9721 tatgaaaaga gatcgtagct tgcagatgta cccatatgcc attttgggtt tcttttgtag  
9781 tcacatgttg ttaagagttg ttacgaatat ttatttgtag agcagcatag atctattгаа  
9841 ttaaactctat taaatggttc agtgatatat gtgaaatgaa atacagtaac ggttccaatc  
9901 gcctctattht tctctcttag acaccatttt caagacacgc caagtгcaag tgggaaggaa  
9961 gattgcttga agaagaagat attttttaga tctataaata tctttaacag actctgttct  
10021 attataaata aggagagaga tcgattttaga gggattatgc ttttgatgt gtgagagttt  
10081 tttttgtag actttggcca agcgtatgtgt ttgaggagag attaatgttg atctctatgt  
10141 tatcgtgagg ttgaaatgtc aggcgaatgaa taatgtttct ggatttgcat tggttattgt

10201 tttgataatc agtcggatca tctttctatt tgagtattgt atttgaat ggagtttggg  
10261 atatcaacaa cttgacattg gtgcagtgaa actggttttg gtcaaactgt atgatggata  
10321 atgatgctgc gaaaaaaciaa ttggagtttc tctagggcgg attcaagtta ctatgccaat  
10381 ccggaggtgc aatttttgga gttgttgact tcgatggagg aaaccttgaa gcaagtgggt  
10441 tgcgcagtag agaggattga atctcgatcg atttcagatg acattagaca gctggacctc  
10501 cggatcttca ctaaaggtaa tccgaagagg ggattgcat gactgaagct caatttcttg  
10561 gtggtgacta tagtgagaaa gacaagttgg cgtgtgtttc tggttttttt ggtggtcaag  
10621 caaaattttg gttccacaag gaactatcgt ggattccgtt ccatagttgg agccaggtga  
10681 aggatggttt attgttaacg tttggaaaca atcgggacaa aaagcgagta cttatggaac  
10741 tcgatcttga aatgaaacat tggatcaaag attttgatcg caagagggag gcacataaat  
10801 ttcttgaatc agaagctatc gttgtaagcg catcaagtta ggagatagtt tcgaacaaaa  
10861 atgttgaagc aattcaagat acagagttgt cgggtggagg tgacttgatt gacaaagatt  
10921 caccgattca ggagatcgct caagttcaaa gaaggaattg attgagtcatt tggttgtttt  
10981 tgagaaattg caaggtgcat ttgtaaagaa caatcgggta tatccacat ttgttcatca  
11041 aattctcaat gagaagcaag aggcaacca tgtgttagat aaactgtccc ttagaagaca  
11101 caaacatcaa agtgggaaga gaagtatatc tcctaaggac atttccaacc ctactttatt  
11161 ttagagaaaa aactctaaat tcttctccaa ccctactcta tatagaattc taaaatagag  
11221 aatcagcag aattgtttta tatatagagt gactatattt tcttctatgt tttagagttg  
11281 attgttttat ttatacttta gtcttcaaa ttaatttaa ttgaatcgtc cttctcttct  
11341 ttgactttcc ttctcttctc tgccacgtca tcatccacgt catcttctgc ttctctaaa  
11401 gaatgctgaa tccgttttct cacatcgtc tgatgaacct tatcaccctt ctcatgtcgc  
11461 atttgcggtg agcttttggc tgtaaagggc gattggtgaa cacatgagaa gaactgtggg  
11521 aatattggg tttgccgttt gcggttgcgg ttctgatttt aaacacaaac gtttgggcct  
11581 ggttgtgggc cttatcagac tagt

//

**Anhang 10: Genbank-Eintrag für die *AtTT1*-cDNA aus dem Ökotyp Columbia.**

```

LOCUS       AF190298             1102 bp     mRNA             PLN             27-SEP-1999
DEFINITION  Arabidopsis thaliana cultivar Columbia Transparent Testa 1
              (TT1)
              cDNA, complete sequence.
ACCESSION   AF190298
KEYWORDS    .
SOURCE      thale cress.
  ORGANISM  Arabidopsis thaliana
              Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
              Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;
              eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;
              Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1102)
  AUTHORS   Sagasser,M., Hahlbrock,K. and Weisshaar,B.
  TITLE     Transparent Testa 1 - a zinc finger protein affecting catechin
              accumulation in the seed coat of Arabidopsis thaliana
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1102)
  AUTHORS   Sagasser,M., Hahlbrock,K. and Weisshaar,B.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (27-SEP-1999) Abt. Biochemie, MPIZ,
              Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..1102
                       /organism="Arabidopsis thaliana"
                       /strain="Columbia"
                       /db_xref="taxon:3702"
                       /chromosome="I"
                       /map="between mi63 and agp6e"
     gene               1..1102
                       /gene="TT1"
     CDS                42..954
                       /gene="TT1"
                       /note="zinc-finger protein"
                       /codon_start=1
                       /product="Transparent Testa 1"

/translation="MESPPLYEISSSSSSEKPRHHFQSLDLFPNLNQNSCINNTLIEP
LPLIDRINLNSNLDLNPPLYAEEGEQEEEEEEEDREVDVDLHIGLPGFGKPSNDAK
QLKKRNGKEIATYDAGKGIENELSGKAYWI PAPEQILIGFTHFSCHVCFKTFNRYNNL
QMHWGHSQYRKGPELKGTPRAMLGI PCYCCVEGCRNHIDHPRSKPLKDFRTLQT
HYKRKHGHKPFSCRLCGKLLAVKGDWRTHEKNCGKRWVCVCGSDFKHKRSLKDHVKAF
GSGHGPYPTGLFEEQASNSSVSETLFF"

```

---

BASE COUNT            334 a        250 c        222 g        296 t  
ORIGIN

```
1 aaaacatttc atctctctcc aacaactatt caccacattc aatggagtca ccaccactat
61 acgagatata ctcaagctct tcttctgaaa aacctagaca ccatttccaa tcccttgatc
121 ttttccctaa cctcaaccaa aactcttgta tcaacaatac cctaattgag cctttaccgc
181 ttattgatcg cataaacttg aactcaaacc tagacctaaa ccctaattcc ttgtatgcgg
241 aagaaggaga gcaagaggag gaagaagaag aagaagaaga ccgtgaagtg gacgtggact
301 tacacatcgg ccttcctggt tttggtaaac caagcaatga tgctaaacag ctgaagaaga
361 gaaatgggaa ggagatcgcc acatatgacg cgggaaaagg catcgagaat gaactttccg
421 gaaaggcata ctggatcccg gcgccggagc aaattctcat agggttcact ctttttctt
481 gccatgtatg cttcaagaca ttcaatcgct acaacaatct tcagatgcac atgtggggac
541 atggttcaca atacaggaaa ggaccggagt cactgaaagg cacacagcca cgagccatgt
601 tagggatccc ttgttactgc tgcgttgaag ggtgcaggaa ccacattgac catcctcgtt
661 ccaagccact gaaagacttt aggacgctcc aaacgacta caaacgcaa cacggacaca
721 aacccttctc gtgtcgcctt tgcggtaagc ttttggctgt caagggcgat tggcgaacac
781 atgagaagaa ttgtggaaaa cgttgggttt gcgtttgagg ttctgatttt aacacaaaac
841 gttctcttaa ggaccatggt aaggcgtttg ggtctggtca tgggccttat ccaactgggt
901 tgtttgaaga gcaggcttct aattcatctg tctccgagac tttgtttttt taaatttggg
961 catctttttc tttcgcttat gaaatatcta tttactttag aaaaataata atgtggatc
1021 taattgttcc aaattaggaa cacgaagtgt accattatat ttttcatcac tacaatggt
1081 attcagagaa aattatcatt aa
```

//

## Anhang 11: Genbank-Eintrag für die Sequenz des *AtTT1*-Gens aus dem Ökotyp Landsberg *erecta*.

LOCUS AF190299 1933 bp DNA PLN 27-SEP-1999  
DEFINITION Arabidopsis thaliana cultivar Landsberg erecta Transparent  
Testa 1 (TT1) gene, complete cds.  
ACCESSION AF190299  
KEYWORDS .  
SOURCE thale cress.  
ORGANISM Arabidopsis thaliana  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;  
Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;  
Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 1933)  
AUTHORS Sagasser, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B.  
TITLE Transparent Testa 1 - a zinc finger protein affecting catechin  
accumulation in the seed coat of Arabidopsis thaliana  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 1933)  
AUTHORS Sagasser, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (27-SEP-1999) Abt. Biochemie, MPIZ,  
Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1933  
/organism="Arabidopsis thaliana"  
/strain="Landsberg erecta"  
/db\_xref="taxon:3702"  
/chromosome="I"  
/map="between mi63 and agp6e"  
gene 327..1829  
/gene="TT1"  
CDS join(327..809,1401..1829)  
/gene="TT1"  
/note="zinc-finger protein"  
/codon\_start=1  
/product="Transparent Testa 1"  
  
/translation="MESPPLYEISSSSSSEKPRHHFQSLDLFPNLNQNSCINNTLIEP  
LPLIDRINLNSNLDLNPPLYAEEGEQEEEEEEEDREVDVDLHIGLPGFGKPSNDAK  
QLKKRNGKEIATYDAGKGIENELSGKAYWIPAPEQILIGFTHFSCHVCFKTFNRYNNL  
QMHMWGHGSQYRKGPESLKGTPRAMLGIPCYCCVEGCRNNIDHPRSKPLKDFRTLQT  
HYKRKHGHKPFSCRLCGKLLAVKGDWRTHEKNCGKRWVCVCGSDFKHKRSCLKDHVKAF  
GSGHGPYPPTGLFEEQASNSSVSETFFF"

BASE COUNT	622 a	357 c	324 g	630 t		
ORIGIN						
1	aaattat	acacatt	cgttttg	acacttg	tcgactt	taaacct
61	tagttcat	aatattat	ggtaaatt	atatttat	atctttat	tcgtaggt
121	aaggagac	ttgatac	ggatctac	acgtatct	atgattat	gttataaa
181	ttattgca	cattaaat	ctttcatag	gagcaat	tatatta	taactta
241	ttattatata	tagtcaag	ttaaagga	aaagaaa	ttctcaaa	atctcat
301	tctccaaca	ctattcac	cattcaat	agtcacc	actatac	gagatcc
361	gctcttct	tgaaaaac	agacacc	tccaatcc	tgatctct	cctaacct
421	acaaaact	ttgtatca	aataccct	ttgagcct	accgctt	gatcgcata
481	acttgaact	aaacctag	ctaaacc	atcccttg	tgcggaag	ggagagca
541	aggagga	agaagaag	gaagacc	aagtggac	ggacttac	atcggcct
601	ctggttt	taaacca	aatgatg	aacagct	gaagagaa	gggaagg
661	tcgccacata	tgacgcc	aaaggcat	agaatga	ttccgga	gcatact
721	tcccggc	ggagcaa	ctcatagg	tactcatt	ttcttgcc	gtatgctt
781	agacattca	tcgctaca	aatcttc	tacgagt	tatatct	gcgcat
841	tttccatg	caaacata	taataaat	atcttat	gttatat	cggatcta
901	gttatgag	tattcatat	tatatata	tataatt	aatttat	ataaaag
961	aacaacc	atntaat	tgatttac	ttggatc	ttataca	ataaaat
1021	atcaagtca	ctaactgt	tttaatt	tttttgta	aagagtt	aatatata
1081	tttatgg	tctttctat	aaaataat	atcacaac	tttacg	tttaatgc
1141	taactaa	tgaattcg	aaagttg	taaattat	actaag	gattggct
1201	agttttta	agttttct	tctcatata	atattat	agtagt	acatttg
1261	caaactta	tacacag	tcttgaat	aacattac	tgctcgg	ataatat
1321	tttaagga	catgttat	cattttat	cttaagg	cctttt	ttttgtg
1381	tctaaat	atgaatat	atgcacat	ggggacat	ttcaca	aggaaag
1441	cggagtc	gaaaggca	cagccac	ccatgtag	gatccct	tactgct
1501	ttgaagg	caggaaca	attgacc	ctcgttcc	gccactg	gactttag
1561	cgctcca	gcactaca	cgcaaac	gacacaa	cttctcg	cgctttg
1621	gtaagct	ggctgtca	ggcgatt	gaacacat	gaagaatt	ggaaaac
1681	gggtttg	ttgcggt	gattttaa	acaaacg	ccttaagg	catgtta
1741	cgtttg	tggtcat	ccttatcc	ctggttg	tgaagag	gcttcta
1801	catctgt	cgagact	ttttttta	tttgggt	ttttct	cacttat
1861	atatctat	actttaga	aataata	tgtgggt	aattgtt	caaatgga
1921	acgaagt	cca				

//

Anhang 12: Genbank-Eintrag für die Sequenz des *Att1*-Gens aus der *tt1*-Mutante

```

LOCUS       AF190300          1920 bp    DNA             PLN             27-SEP-1999
DEFINITION  Arabidopsis thaliana cultivar Landsberg erecta mutant
             transparent testa 1 (tt1) gene, complete cds.
ACCESSION   AF190300
KEYWORDS    .
SOURCE      thale cress.
  ORGANISM  Arabidopsis thaliana
             Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
             Tracheophyta; euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;
             eudicotyledons; core eudicots; Rosidae; eurosids II;
             Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1920)
  AUTHORS   Sagasser,M., Hahlbrock,K. and Weisshaar,B.
  TITLE     Transparent Testa 1 - a zinc finger protein affecting catechin
             accumulation in the seed coat of Arabidopsis thaliana
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1920)
  AUTHORS   Sagasser,M., Hahlbrock,K. and Weisshaar,B.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (27-SEP-1999) Abt. Biochemie, MPIZ,
             Carl-von-Linne-Weg 10, Koeln D-50829, Germany
FEATURES    Location/Qualifiers
  source     1..1920
             /organism="Arabidopsis thaliana"
             /strain="NASC reference line NW82"
             /db_xref="taxon:3702"
             /chromosome="I"
             /map="between mi63 and agp6e"
  gene       327..1829
             /gene="TT1"
             /allele="tt1-1"
  CDS        join(327..809,1401..1829)
             /gene="TT1"
             /note="mutant transparent testa 1 protein"
             /codon_start=1
             /product="tt1"

/translation="MESPPLYEISSSSSSEKPRHHFQSLDLFPNLNQNSCINNTLIEP
LPLIDRINLNSNLDLNPPLYAEEGEQEEEEEEEEEDREVDVDLHIGLPGFGKPSNDAK
QLKKRNGKEIATYDAGKGIENELSGKAYWIPAPEQILIGFTHFSCHVCFKTFNRYNNL
QERTGVTERHTATSHVRDPLLLLR"

```

BASE COUNT	617 a	353 c	320 g	630 t		
ORIGIN						
1	aaattat	acacatt	cgttttg	acacttg	tcgactt	taaacct
61	tagttcat	aatattat	ggtaaatt	atatttat	atctttat	tcgtaggt
121	aaggagac	ttgatac	ggatctac	acgtatct	atgattat	gttataaa
181	ttattgcaa	cattaaat	ctttcatag	gagcaat	tatatta	taactta
241	ttattatata	tagtcaag	ttaaagga	aaagaaa	ttctcaaa	atctcat
301	tctccaaca	ctattcac	cattcaat	agtcacc	actatac	atatac
361	gctcttct	tgaaaaac	agacacc	tccaatcc	tgatctct	cctaacct
421	acaaaaact	ttgtatca	aataccct	ttgagcct	accgctt	gatcgcata
481	acttgaact	aaacctag	ctaaacc	atcccttg	tgcggaag	ggagagca
541	aggagga	agaagaag	gaagacc	aagtggac	ggacttac	atcggcct
601	ctggtttt	taaacca	aatgatg	aacagct	gaagagaa	gggaagg
661	tcgccacata	tgacgccg	aaaggcat	agaatga	ttccggaa	gcatact
721	tcccggcg	ggagcaa	ctcatagg	tactcatt	ttcttgcc	gtatgctt
781	agacattca	tcgctaca	aatcttc	tacgagt	tatatct	gcgcat
841	tttccatg	caaacata	taataaat	atcttat	gttatat	cggatcta
901	gttatgag	tattcatat	tatatata	tataatt	aatttat	ataaaag
961	aacaaccag	atttaata	tgatttac	ttggatct	ttataca	tacaaatt
1021	atcaagtca	ctaactgt	tttaatt	tttttgta	aagagtt	aatatata
1081	tttatggta	tctttctat	aaaataat	atcacaac	tttacg	tttaatgc
1141	taactaaag	tgaattcg	aaagttg	taaattat	actaag	gattggct
1201	agttttta	agttttct	tctcatata	atattat	agtagt	acatttg
1261	caaacttaa	tacacag	tcttgaat	aacattac	tgctcgg	ataatat
1321	tttaagga	catgttatt	cattttat	cttaagg	ccttttt	ttttgtg
1381	tctaaat	atgaatat	attatcat	ggggacat	ttcaca	aggaaag
1441	cggagtc	gaaaggca	cagccac	ccatgttag	gatccct	tactgct
1501	ttgaaggg	caggaaca	attgacc	ctcgttcc	gccactg	gactttag
1561	cgctcca	gcactaca	cgcaaac	gacacaa	cttctcg	cgctttg
1621	gtaagct	ggctgtca	ggcgatt	gaacacat	gaagaatt	ggaaaac
1681	gggtttg	ttgcggt	gattttaa	acaaacg	ccttaagg	catgtta
1741	cgtttg	tggtcat	ccttatcc	ctggttg	tgaagag	gcttcta
1801	catctgt	cgagact	ttttttaa	tttgggt	ttttct	cacttat
1861	atatctat	actttaga	aataata	tgtggtat	aattgttc	aattagga

//

Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock danke ich für die Möglichkeit in der Abteilung Biochemie des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung zu promovieren und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Bernd Weißhaar für die engagierte Betreuung und intensive Unterstützung dieser Arbeit, die ermöglichte Teilnahme an verschiedenen Konferenzen sowie viele hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Schneider-Poetsch danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Dr. Ellen Wisman, Elvira Baumann, Nicole Schmitz und Anja Leihkauf danke ich für die Bereitstellung der *tt*-Mutanten aus der *En1*-mutagenisierten Population sowie die Durchführung des PCR-Screenings. Mein Dank gilt Ellen auch für viele anregende Gespräche und ihr „coaching“.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Ute Tartler für ihre Unterstützung.

Desweiteren möchte ich mich bei Lydia Bollenbach für die Bereitstellung der At7-Zellkultur sowie bei Ralf Schmidt, Thomas Gürtler und Guido Schmidt für die Pflege der Pflanzen bedanken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Biochemie, vor allem Jürgen Ehling, sowie insbesondere den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Weißhaar und der ADIS danke ich für die vielen Anregungen und Hilfestellungen, ihre fachliche und moralische Unterstützung und den Spaß, den wir zusammen hatten.

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

Die Bestimmungen der gültigen Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Promotion ist von PD Dr. Bernd Weißhaar betreut worden.

### **Teilpublikationen:**

**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.

Proc. Natl. Acad. Sci. **95**, 12432-12437.

**Focks, N., Sagasser, M., Weisshaar, B., and Benning, C.** (1999).

Characterization of *tt15*, a novel *transparent testa* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **208**, 352-357.

**Sagasser, M., Weisshaar, B., Hahlbrock, K.**

Transparent Testa 1 - a zinc finger protein affecting catechin accumulation in the seed coat of *Arabidopsis thaliana*.

Manuskript in Vorbereitung.