

## Summary

Plants as sessile organisms are capable to deal with a variety of abiotic and biotic environmental changes. Amino acid derived secondary metabolites as glucosinolates (GSLs) play a key function in the plant defense response in the order of Brassicales including the model organism *Arabidopsis thaliana*. Since GSLs have cancer-preventive properties and function as biopesticides and flavor compounds in crop plants, GSLs are of high public interest. Major advances have already been made in the field of GSLs resulting in the identification of the core biosynthetic pathway and its regulatory MYB – bHLH (basic helix loop helix) complex. Recent studies have set stronger focus on unraveling the role of GSLs and their breakdown products that are possibly responsible for metabolite sensing of GSL biosynthesis. However, the transcriptional regulatory feedback mechanism of GSL biosynthesis on a biochemical and molecular level remains scarcely understood.

In this study potential *cis*-regulatory modules of MYB and bHLH transcription factors (TFs) in promoters of GSL biosynthesis genes were identified using different experimental and theoretical approaches. It could be shown that the upstream part of the promoter *pCYP79B3* (-1772 bp  $\leq$ ) was not relevant for GSL biosynthesis. Hence, the focus was set on the downstream part of the promoter (-1353 – +84 bp) and further fragmented variants indicating that sequences -1091 – -161 and -465 – +231 (later referred to as *boxes 3\_4:GUS* and *boxes 4\_5:GUS*, respectively) play a crucial role for the MYB51 mediated  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity in *Arabidopsis* cells. Co-expression of the combinatorial MYB51 – bHLH05 complex in those cells led to a strong abolishment of transactivation indicating that bHLH05 might be directly involved in negatively regulating the transactivation potential of MYB51.

To study metabolite sensing in GSL biosynthesis, *Arabidopsis* cell culture (*ex vivo*) and *in planta* systems were used. The role of the region act like (ACT) domain of bHLH TF as a possible regulatory element in GSL metabolite sensing was analyzed in *Arabidopsis* cultured cells. Here, for the first time *Arabidopsis* cells overexpressing bHLH protein in the presence and absence of ACT domain were fed with exogenously applied allyl-GSL sinigrin (sin) to modulate GSL biosynthesis. Our results suggest that sin mediated stimulation of I3M (indolyl-3methyl GSL) takes place via bHLH protein. A direct involvement of the ACT domain of bHLH still remains puzzling.

Moreover, various potential components of metabolite sensing including bHLH TFs as putative sensors, atypical  $\beta$ -glucosidase PENETRATION (PEN) 2 as a potential generator and PEN3 as a transporter of the signaling molecule were studied in *Arabidopsis* wild-type and mutant

seedlings. Different treatment conditions aiming to induce a metabolite sensing response were applied and affected indolic and aliphatic GSL levels among different Arabidopsis genotypes. Our findings further support the hypothesis that GSL biosynthesis is regulated via a feedback response, however a direct contribution of bHLHs, PEN2 and PEN3 in metabolite sensing cannot be shown. Most probably other GSL catabolic pathways including myrosinase like proteins, which are activated by bHLH proteins, serve in metabolite sensing and might be good candidates that need to be investigated in future. Developmental stages, growth and treatment conditions seem to be very critical and have a huge impact on dynamically changing GSL synthesis and turnover rates. More studies investigating the exact mechanisms are necessary to further elucidate the role of metabolite sensing of GSL biosynthesis in Arabidopsis.

## Zusammenfassung

Pflanzen sind als sessile Organismen in der Lage mit einer Vielzahl von abiotischen und biotischen Umweltveränderungen umzugehen. In der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) einschließlich des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* spielen sekundäre Pflanzenstoffe wie Glukosinolate (GSLs), die aus Aminosäuren gebildet werden, eine Schlüsselfunktion in der pflanzlichen Abwehrreaktion. Da GSLs krebsvorbeugende Eigenschaften aufweisen und als Biopestizide und Aromastoffe in Nutzpflanzen fungieren, sind GSLs von generellem Interesse. Auf dem Gebiet der GSLs wurden bereits bedeutende Fortschritte erzielt, die sowohl zur Identifizierung des Kernbiosynthesewegs als auch des regulierenden MYB – bHLH (basic helix loop helix) Komplexes geführt haben. Jüngste Studien haben einen stärkeren Schwerpunkt auf die Aufklärung der Rolle der GSLs und ihrer Abbauprodukte gelegt, die möglicherweise für eine sogenannte metabolische Signalgebung der GSL-Biosynthese verantwortlich sind. Der transkriptionsregulatorische „Feedback-Mechanismus“ der GSL-Biosynthese ist auf biochemischer und molekularer Ebene jedoch kaum verstanden.

In dieser Studie wurden potenzielle *cis*-regulatorische Module von MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren (TFs) in Promotoren von GSL-Biosynthese genen mittels verschiedener experimenteller und theoretischer Ansätze identifiziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der „upstream“ befindende Teil des Promotors *pCYP79B3* (-1772 bp  $\leq$ ) für die GSL-Biosynthese nicht relevant war. Daher wurde der Fokus auf den „downstream“ gelegenen Teil des Promotors (-1353 - +84 bp) und weitere fragmentierte Varianten gelegt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Promotorbereiche -1091 – -161 und -465 – +231 (später als *boxes 3\_4:GUS* and *boxes 4\_5:GUS* bezeichnet) eine entscheidende Rolle für die MYB51 vermittelte GUS-Aktivität in *Arabidopsis*-Zellen spielen. Die Koexpression des kombinatorischen MYB51 – bHLH05 Komplexes in diesen Zellen führte zu einem stark abgeschwächten Effekt der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität, was darauf hindeutet, dass bHLH05 direkt an der negativen Regulierung des Transaktivierungspotenzials von MYB51 beteiligt sein könnte.

Um ein tieferes Verständnis der metabolischen Signalgebung bei der GSL-Biosynthese zu erlangen, wurden *Arabidopsis* Zellkulturen (*ex vivo*) und *in planta* Systeme verwendet. Die Rolle der „region act like“ (ACT) Domäne von bHLH TF als mögliches regulatorisches Element bei der „Feedback“ GSL-Antwort wurde in *Arabidopsis*-Zellen analysiert. Dabei wurden die *Arabidopsis*-Zellen, in welche bHLH mit und ohne ACT Domäne überexprimiert wurden, mit dem GSL Sinigrin (*sin*) gefüttert, um eine mögliche metabolische Signalgebung der GSL-Biosynthese zu stimulieren. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die durch *sin* vermittelte

Stimulation von I3M (Indolyl-3-Methyl-GSL) über bHLH TFs reguliert wird. Eine direkte Beteiligung der ACT-Domäne der bHLH TFs konnte bisher nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus wurden verschiedene potentielle Komponenten der metabolischen Signalgebung darunter bHLH TFs als mögliche Sensoren, die atypische  $\beta$ -Glucosidase PENETRATION (PEN) 2 als potentielle Synthase des Signalmoleküls und PEN3 als Transporter dieses Metabolites in Arabidopsis-Zellen untersucht. Unterschiedliche Behandlungsbedingungen, die darauf abzielten, eine metabolische Signalgebung zu induzieren, wurden angewandt. Diese Bedingungen beeinflussten die indolischen und aliphatischen GSL-Mengen der unterschiedlichen Genotypen. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die GSL-Biosynthese über eine metabolische Signalgebung reguliert wird. Es konnte bis dato jedoch nicht geklärt werden, ob bHLHs, PEN2 und PEN3 direkt an dieser Regulation beteiligt sind. Vermutlich könnten andere katabole GSL-Wege, einschließlich myrosinase-ähnlicher Proteine, die durch bHLH Proteine aktiviert werden und zur Metaboliterkennung dienen, gute Kandidaten für zukünftige Untersuchungen sein. Entwicklungsstadien, Wachstums- und Behandlungsbedingungen der Pflanzen scheinen einen kritischen Einfluss auf die, sich in kurzen Abständen ändernden GSL-Umsatzraten, zu haben. Um die Rolle der metabolischen Signalgebung der GSL-Biosynthese in Arabidopsis weiter aufzuklären, sollte der genaue Mechanismus in weiteren Studien untersucht werden.