

**Phylogenetische und molekulare Charakterisierung pflanzlicher  
F-Box-Proteine mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von

Nadine Schumann

geb. am 07. Februar 1983 in Burg

Gutachter:

Prof. Dr. Dierk Scheel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Prof. Dr. Holger Deising (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Prof. Dr. Stefan Rensing (Philipps-Universität Marburg)

Datum der Verteidigung: 26.07.2013

Für meine Familie, für Andre und für mich.

„Beobachte das Schwimmen der Fische im Wasser,  
und du wirst den Flug der Vögel in der Luft begreifen.“  
(Leonardo da Vinci)

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die Bedeutung des Proteinabbaus als post-translationaler Regulationsmechanismus... 1</b>	<b>1</b>
1.1.1	Der Ubiquitinierungsprozess .....	1
1.1.2	Das 26S-Proteasom .....	2
1.2	<b>E3-Ligasen..... 3</b>	<b>3</b>
1.2.1	Der SCF-Komplex..... 4	4
1.3	<b>F-Box-Proteine (FBPs)..... 6</b>	<b>6</b>
1.3.1	Evolution von F-Box-Proteinen in Pflanzen .....	9
1.4	<b>F-Box-Proteine mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne (FBKs)..... 10</b>	<b>10</b>
1.5	<b>Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	<b>Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien..... 13</b>	<b>13</b>
2.2	<b>Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht..... 13</b>	<b>13</b>
2.2.1	Allgemeine Anzuchtbedingungen von <i>A. thaliana</i> ..... 13	13
2.2.2	Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	14
2.2.3	Kreuzung von <i>A. thaliana</i> ..... 14	14
2.2.4	Anzuchtbedingungen von <i>N. benthamiana</i> .....	14
2.2.5	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> .....	14
2.3	<b>Bakterien- und Pilzstämmen .....</b>	<b>15</b>
2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> ..... 15	15
2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	15
2.3.3	Kultivierung von <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000..... 16	16
2.3.4	Kultivierung von <i>B. cinerea</i> .....	16
2.3.5	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.3.6	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.4	<b>DNA-Analytik .....</b>	<b>17</b>
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> ..... 17	17
2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	17
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> ..... 17	17
2.4.4	PCRs..... 17	17
2.4.4.1	PCR zur Genotypisierung von <i>A. thaliana</i> .....	17
2.4.4.2	Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	18
2.4.4.3	Phusion-PCR..... 18	18
2.4.5	Agarosegelelektrophorese .....	19
2.4.6	DNA-Sequenzierung .....	19
2.4.6.1	Lokalisierung von T-DNA-Integrationsorten mittels Sequenzierung..... 19	19
2.5	<b>Klonierungsstrategien..... 20</b>	<b>20</b>
2.5.1	Gateway <sup>®</sup> -Klonierung .....	20
2.5.1.1	Anlagerung der <i>attB</i> -sites an das zu klonierende DNA-Fragment..... 20	20
2.5.1.2	BP- und LR-Rekombinationsreaktion .....	20
2.5.2.	Gerichtete Klonierung mit dem pENTR <sup>™</sup> /D-TOPO <sup>®</sup> System .....	21
2.5.3	Klonierung in pGBKT7 .....	22
2.5.4	Klonierung in pGADT7-rec .....	23
2.5.5	Konstruktion von amiRNAs .....	23
2.5.6	Herstellung von RNAi-Konstrukten..... 24	24
2.6	<b>RNA-Analytik .....</b>	<b>25</b>
2.6.1	RNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i> .....	25
2.6.1.1	RNA-Isolierung aus Schoten .....	25
2.6.2	RNA-Gelelektrophorese .....	26
2.6.3	cDNA-Synthese..... 26	26
2.6.4	quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	26

2.6.5	Micro-Array-Analysen .....	27
<b>2.7</b>	<b><i>Yeast-two-Hybrid-System</i></b> .....	<b>27</b>
2.7.1	Nachweis der Interaktion von FBKs und ASKs.....	27
2.7.2	<i>Yeast-two-Hybrid-Screen</i> gegen eine cDNA-Bibliothek.....	28
<b>2.8</b>	<b>Histochemischer Nachweis der <math>\beta</math>-Glucuronidase (GUS)-Aktivität <i>in planta</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.9</b>	<b>Phänotypische Charakterisierungen</b> .....	<b>29</b>
2.9.1	Bestimmung der Keimungsrate .....	29
2.9.2	Untersuchung von Primärwurzel- und Hypokotylllänge .....	29
2.9.3	Frischgewichtbestimmung nach elf18-Behandlung .....	30
2.9.4	Messung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion nach flg22-Behandlung.....	30
2.9.5	Bestimmung von Glukosinolatgehalten.....	30
2.9.6	Infektionsversuche mit <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	31
2.9.7	Infektionsversuche mit <i>B. cinerea</i> .....	31
<b>2.10</b>	<b>Homologie-basierte Modellierung von Proteinstrukturen</b> .....	<b>32</b>
<b>2.11</b>	<b>Phylogenetische Analysen</b> .....	<b>32</b>
2.11.1	Identifizierung von FBKs in verschiedenen pflanzlichen Genomen .....	32
2.11.2	Konstruktion von F-Box- und Kelch-Konsensussequenzen.....	33
2.11.3	Konstruktion phylogenetischer Bäume .....	33
2.11.4	Vergleiche von Kelch-Repeats innerhalb und zwischen Proteinen .....	33
2.11.5	Bestimmung der Anzahl gewonnener und verlorengangener FBKs.....	34
2.11.6	Berechnung von Sequenzunterschieden und <i>Sliding-Window</i> -Analysen .....	34
2.11.7	Korrelationsanalyse von Expressionsdaten .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Phylogenetische Analyse von FBKs in Landpflanzen</b> .....	<b>36</b>
3.1.1	<i>De novo</i> Identifizierung von FBKs in sieben Landpflanzenspezies .....	36
3.1.2	Evolution von FBKs in sieben Landpflanzenspezies .....	39
3.1.2.1	Kategorisierung von FBKs entsprechend ihrer evolutionären Konservierung .....	40
3.1.2.2	Evolutionäre Veränderungen in der Anzahl von Landpflanzen-FBKs.....	41
3.1.3	FBKs clustern entsprechend ihrer Anzahl an Kelch-Repeats.....	42
3.1.4	Chromosomale Organisation von <i>FBKs</i> .....	43
3.1.5	Superstabile und instabile FBKs weisen unterschiedliche Selektionsmuster auf.....	44
3.1.6	Phylogenetisch eng verwandte <i>AtFBKs</i> werden differentiell exprimiert.....	46
3.1.7	FBKs lokalisieren in den Zellkern und/oder ins Cytoplasma .....	48
3.1.8	FBKs zeigen relativ unspezifische ASK-Interaktionsmuster .....	49
3.1.9	Fazit .....	50
<b>3.2</b>	<b>Molekulare und funktionelle Charakterisierung von vier <i>FBKs</i> aus <i>A. thaliana</i></b> .....	<b>51</b>
3.2.1	Auswahl geeigneter Kandidatengene für einen revers-genetischen Ansatz .....	51
3.2.2	<i>FBK1-4</i> kodieren für <i>bona-fide</i> F-Box-Proteine .....	52
3.2.2.1	Transkriptanalysen in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>A. thaliana</i> .....	53
3.2.2.2	Analyse der Promotoraktivität von <i>FBK1-4</i> .....	53
3.2.2.3	Subzelluläre Lokalisation von <i>FBK1-4</i> .....	58
3.2.2.4	Nachweis der Interaktion von <i>FBK1-4</i> mit den ASK-Proteinen .....	59
3.2.2.5	<i>In silico</i> -Modellierung der Tertiärstruktur von <i>FBK1-4</i> .....	60
3.2.3	Generierung von Knock-Out- und Überexpressionslinien von <i>FBK1-4</i> .....	62
3.2.3.1	Verifizierung der T-DNA Position in SALK T-DNA-Insertionslinien von <i>FBK1-4</i> .....	62
3.2.3.2	Isolierung homozygoter SALK T-DNA-Insertionslinien .....	63
3.2.3.3	Nachweis reduzierter Transkriptmengen in den T-DNA-Insertionslinien.....	63
3.2.3.4	Reduzierung der Transkription von <i>FBK3</i> mittels amiRNAs.....	64
3.2.3.5	RNAi-basierter Ansatz zur Reduktion der Transkriptmengen von <i>FBK3</i> .....	66
3.2.3.6	Nachweis erhöhter Transkriptmengen von <i>FBK1-4</i> in Überexpressionslinien .....	67
3.2.4	Analysen zum Nachweis potentieller funktioneller Redundanz von <i>FBK1-4</i> .....	68

3.2.5	Micro-Array-Analysen .....	70
3.2.5.1	Verifizierung der Micro-Array-Ergebnisse mittels qRT-PCR.....	73
3.2.6	Phänotypisierung von Tripelmutante und Überexpressionslinien.....	74
3.2.6.1	Untersuchungen zur Jasmonat-Responsivität.....	74
3.2.6.2	Nachweis der Kopplung der <i>fbk4</i> -Mutation mit dem MeJA-Phänotyp .....	75
3.2.6.3	Komplementationsanalyse.....	76
3.2.6.4	Responsivität gegenüber endogenen und exogenen Elicitoren.....	77
3.2.6.5	Infektionsassay mit <i>P. syringae</i> und <i>B. cinerea</i> .....	80
3.2.6.6	Glukosinolatgehalte.....	81
3.2.7	Suche nach potentiellen Interaktoren von FBK1 und FBK2 mittels <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Screen .....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Phylogenetische Charakterisierung der FBK-Subfamilie .....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Evolution der Kelch-Repeat-Domäne in FBK-Proteinen .....	85
4.1.2	FBKs können entsprechend ihres Konservierungsgrades kategorisiert werden.....	87
4.1.3	Funktionelle Redundanz und Subfunktionalisierung von <i>AtFBKs</i> .....	89
4.1.4	Vergleich der FBKs mit anderen FBK-Subfamilien .....	90
<b>4.2</b>	<b>Molekulare und funktionelle Charakterisierung von <i>FBK1-4</i> aus <i>A. thaliana</i> .....</b>	<b>91</b>
4.2.1	FBK1-4 beeinflussen die Expression pflanzlicher Abwehrgene .....	92
4.2.2	FBK3: Ein negativer Regulator innerhalb der pflanzlichen Abwehr gegen Nematoden?.....	97
4.2.3	Ausblick.....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>111</b>

**Abkürzungen (allgemein)**

Abb.	Abbildung
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
ATS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Solution
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming unit</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
eV	<i>empty vector</i>
h	Stunde
HMM	Hidden-Markow-Model
IPB	Institut für Pflanzenbiochemie
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
mA	Milliamperere
MDa	Megadalton
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ML	Maximum-Likelihood
mM	Millimolar
MRCA	<i>most recent common ancestor</i>
n	Stichprobengröße
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NJ	Neighbour-Joining
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
<i>Pp</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
Prom	Promotor
<i>Pt</i>	<i>Populus trichocarpa</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RMA	Robust Multi-array Average
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
<i>Sb</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
sek	Sekunde(n)
<i>Sm</i>	<i>Selaginella moellendorffii</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
U	Unit

Ub	Ubiquitin
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultra-Violett
v/v	Volumen je Volumen
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
w/v	Masse je Volumen
YPDA	Yeast peptone/dextrose/adenine Media
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
35S	Promoter des Cauliflower-Mosaikvirus

**Abkürzungen chemischer Verbindungen**

ABA	Abscisinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
Ade	Adenin-hemisulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epi-BR	Epi-Brassinolid
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
His	Histidin
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
Leu	Leucin
LiCl	Lithiumchlorid
MeJA	Methyljasmonat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-morpholino)propan-sulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
PEG	Polyethylenglycol
SA	Salizylsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-galactopyranosid
(+)-7-iso	
-JA-L-Ile	Jasmonat-Isoleucin

**Abkürzungen von Genen/Proteinen und Domänen**

AFB	Auxin signaling F-Box-Protein	PR1	Pathogenesis-related gene 1
AFR	Attenuated far-red response	RING	Really interesting new gene
APC	Anaphase-promoting complex	RPN	Regulatory particle non-ATPase
ASK	Arabidopsis SKP1-like	RPT	Regulatory article triphosphatase
BCAT4	Branched-chain aminotransferase 4		RUB related to ubiquitin
bHLH	basic helix-loop-helix	SCF	S-Phase kinase associated protein/Cullin/F-Box
BTB	Broad complex/tramtrack/bric-abrac		
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated 1	SIB1	Sigma factor-binding protein 1
COI1	Coronatine insensitive 1	SON1	Suppressor of nim1-1
CRL	Cullin-RING ligase	TaCFBD	<i>Triticum aestivum</i> cyclin F-Box domain protein
CSN	COP9-Signalosom		
CUL	Cullin	TIR1	Transport inhibitor response 1
DCL	Dicer-like protein	TLP	F-Box-Protein mit TUB-Domäne
DDB1	DNA damage-binding 1		
EFR	EF-Tu receptor	TUB	Tubby
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu	WAK1	Cell wall-associated kinase 1
FBA	F-Box assoziiert	WDR	WD40-Repeat protein
FBK	F-Box-Kelch-Protein	WRKY	WRKY DNA-binding protein
FBP	F-Box-Protein	WSK1	SKP1-like Homologes aus Weizen
FKF1	Flavin-binding kelch-repeat F-Box 1		
FLS	Flagellin-sensing 2	YFP	Yellow fluorescent protein
GFP	Green fluorescent protein	ZTL	Zeitlupe
GUS	$\beta$ -Glucuronidase		
HECT	Homology to E6-AP C-terminus		
HR4	Homolog of RPW8 4		
HWS	Hawaiian skirt		
JAR1	Jasmonate resistant 1		
JAZ	Jasmonate Zim-domain		
JFK	Just one F-Box and kelch domain-containing protein		
LKP2	Lov kelch protein 2		
LOV	Light, oxygen, or vorage		
LOX2	Lipoxygenase 2		
LRR	Leucin-reicher Repeat		
LURP1	Late upregulated in response to <i>Hyaloperonospora parasitica</i>		
MAM1	Methylthioalkylmalate synthase 1		
MYB44	MYB domain protein 44		
ORF1	Open reading frame 1		
PAL2	Phenylalaninammoniumlyase 2		
PAS	Per-ARNT-Sim		
PBS1	Avrpphb Susceptible 1		
PCC1	Pathogen and circadian controlled 1		
PLA2A	Patatin-like protein 2a		
PP2A	Proteinphosphatase-Untereinheit 2A		
PR	Pathogenesis related		

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung des Proteinabbaus als post-translationaler Regulationsmechanismus

Eine Vielzahl pflanzlicher Prozesse wird durch die regulierte Neusynthese von Polypeptiden sowie durch den gezielten Abbau bestehender Proteine kontrolliert. Basierend auf diesen beiden grundlegenden Regulationsmechanismen werden bis zu 50 % aller pflanzlichen Proteine innerhalb einer Woche ersetzt (Vierstra 1993). Durch Entfernung missgefalteter oder beschädigter Proteine, die Aggregate bilden und somit toxisch für die Zelle werden können, trägt der Prozess des Proteinabbaus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei und gewährleistet die stete Bereitstellung freier Aminosäuren (Goldberg 2003). Zudem ermöglicht der gezielte Abbau kurzlebiger regulatorischer Proteine eine rasche Antwort auf intrazelluläre Signale und gewährleistet die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen (Vierstra 1996; Hellmann & Mark Estelle 2002). Der schnelle Abbau von Proteinen ist folglich für den pflanzlichen Organismus von zentraler Bedeutung, sei es zur Regulation der Transkription oder des Zellzyklus, als Antwort auf Umweltbedingungen oder zur Steuerung von Wachstum und Entwicklung.

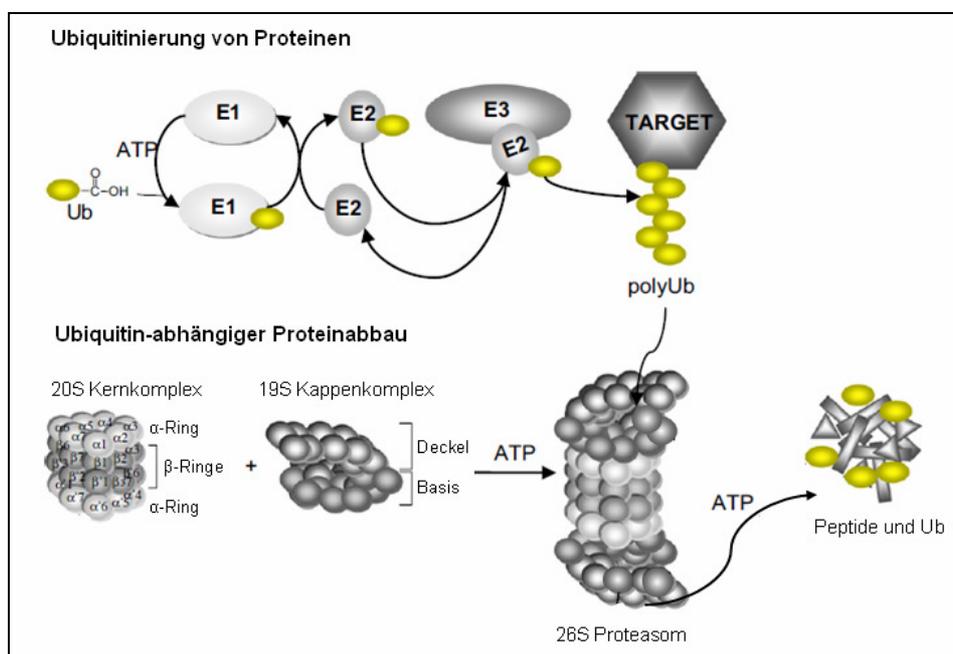
In Eukaryoten geschieht der Proteinabbau hauptsächlich über zwei unterschiedliche Wege. Zum einen wird über den lysosomalen Proteinabbau eine Vielzahl von Proteinen unspezifisch durch mehrere Proteasen in den Lysosomen oder der Vakuole abgebaut (Seglen & Bohley 1992; Ciechanover 2005). Die Kompartimentierung ermöglicht entsprechende Reaktionsbedingungen, so dass die Proteolyse exergon verlaufen kann. Zum anderen werden Proteine spezifisch über das Ubiquitin-26S-Proteasom abgebaut. Dieser Prozess verläuft im Cytoplasma, im Zellkern oder an Membranoberflächen, die mit den genannten Kompartimenten in Kontakt stehen (Ciechanover 2005). Als Erkennungssignal für den selektiven Proteinabbau durch das Ubiquitin-26S-Proteasom fungieren Ubiquitinmoleküle (Pickart & Eddins 2004).

### 1.1.1 Der Ubiquitinierungsprozess

Eine zentrale Rolle beim Proteinabbau durch das 26S-Proteasom spielt der Prozess der Ubiquitinierung. Dabei handelt es sich um eine Proteinmodifikation, bei der ein oder mehrere der acht kDa großen Ubiquitin (Ub)-Untereinheiten auf Zielproteine übertragen werden. Ub kommt ubiquitär in Eukaryoten vor, ist stark konserviert und sehr stabil (Pickart & Eddins 2004; Ciechanover 2005).

Der Ubiquitinierungsprozess umfasst drei wesentliche Schritte (Abb. 1.1). Zunächst kommt es zur Aktivierung des Ub. Hierbei katalysiert ein Ub-aktivierendes Enzym (E1) unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch die Ausbildung einer hochenergetischen Thioesterbindung zwischen einem Cysteinrest des E1-Enzyms und dem C-terminalen Glycerin des Ub. Das so aktivierte Ub wird daraufhin durch *trans*-Esterifizierung auf den Cysteinrest eines Ub-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Schließlich bindet ein Ub-ligierendes Enzym (E3) den Ub-E2 Komplex und katalysiert den Transfer des Ub auf das Zielprotein. Hierbei katalysiert die E3-Ligase die Ausbildung einer

Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ub und einem Lysinrest innerhalb des Zielproteins (Kurepa & Smalle 2008; Sadowski & Sarcevic 2010). Je nach Anzahl und Position der konjugierten Ub-Einheiten werden die ubiquitinierten Proteine destabilisiert, delokalisiert oder in ihrer Funktion verändert (Pickart & Fushman 2004). Beispielsweise beeinflussen reversible Monoubiquitinierungen häufig die Endocytose von Proteinen. Die Anlagerung mehrerer einzelner Ub-Moleküle (Multiubiquitinierung) hingegen, verändert oftmals die subzelluläre Lokalisation der Zielproteine (Sadowski & Sarcevic 2010). Die Modifizierung des Zielproteins mit einer Ub-Kette (Polyubiquitinierung), in der mindestens vier Ub-Untereinheiten durch sequentiellen Transfer über das Lysin 48 miteinander verbunden werden, markiert das Substrat stets für den Abbau im 26S-Proteasom (Thrower *et al.* 2000; Pickart & Fushman 2004; Cesari 2010; Sadowski & Sarcevic 2010).



**Abb. 1.1: Struktur des Ubiquitin/26S-Proteasoms und Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau (verändert nach Kurepa & Smalle 2008).** Die Markierung des Zielproteins für den Ubiquitin-abhängigen Abbau beginnt mit der Bindung des Ub durch das Ub-aktivierende Enzym (E1). Das aktivierte Ub wird anschließend auf das Ub-konjugierende Enzym (E2) übertragen, das zusammen mit einer Ub-Ligase (E3) die Verknüpfung des Ub mit dem Zielprotein vermittelt. Durch Übertragung mehrere Ub-Moleküle auf das Zielprotein kann es vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden. Das 26S-Proteasom besteht aus dem 20S-Kernkomplex sowie dem regulatorischen 19S-Kappenkomplex. Der Kernkomplex besteht aus zwei äußeren Ringen, die aus je sieben  $\alpha$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind, sowie zwei zentralen Ringen, die je sieben  $\beta$ -Untereinheiten umfassen. An einem oder beiden Enden des Kernkomplexes assoziiert der Kappenkomplex, der aus den zwei Subkomplexen Deckel und Basis besteht.

### 1.1.2 Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom ist ein zwei MDa großer, ATP-abhängiger, proteolytischer Komplex, der spezifisch Ub-konjugierte Proteine abbaut (Kurepa *et al.* 2009). Die Struktur des 26S-Proteasoms ist in Eukaryoten hoch konserviert und besteht aus zwei Untereinheiten, dem proteolytisch aktiven 20S Kernkomplex und dem regulatorischen 19S-Kappenkomplex (Abb. 1.1). Die Kernuntereinheit besteht aus vier heptameren Ringen, die zusammen eine Zylinderstruktur bilden. Der Zylinder weist eine so genannte  $\alpha_{1-7}/\beta_{1-7}/\beta_{1-7}/\alpha_{1-7}$ -Konfiguration auf. Das heißt, dass die zwei äußeren Ringe aus sieben  $\alpha$ -

Untereinheiten bestehen, während die zwei inneren Ringe aus sieben  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Röntgenkristallographische Analysen des Kernkomplexes von Hefe und Mensch zeigten, dass der Zylinder in seinem Innern über eine ATP- und Ub-unabhängige Proteasefunktion verfügt, die von den  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_5$ -Untereinheiten vermittelt wird (Groll *et al.* 1997; Unno *et al.* 2002). An den Enden des Zylinders formen die  $\alpha$ -Untereinheiten schmale Kanäle, so dass gewährleistet wird, dass nur ungefaltete Proteine ins Innere des Kernkomplexes gelangen. Flexible N-terminale Verlängerungen an den  $\alpha$ -Untereinheiten steuern diese Kanäle und kontrollieren somit den Eingang von Substraten sowie die Freilassung von Produkten.

An einem oder beiden Enden des Kernkomplexes ist je ein Kappenkomplex angelagert. Dieser vermittelt die Substratspezifität des 26S-Proteasoms indem er mit ungefalteten, polyubiquitinierten Zielproteinen interagiert und diese in das Innere des Kernkomplexes geleitet. Der Kappenkomplex ist aus zwei Subuntereinheiten aufgebaut, die als Deckel und Basis bezeichnet werden. Die Basis befindet sich direkt oberhalb des  $\alpha$ -Rings und besteht aus einem Ring von sechs AAA-ATPasen (REGULATORY PARTICLE TRIPHOSPHATAS [RPT] 1-6) sowie drei Nicht-ATPase Untereinheiten (REGULATORY PARTICLE NON-ATPASE [RPN] 1, 2 und 10) (Wollenberg & Swaffield 2001). Der Deckel umfasst acht weitere Nicht-ATPase Untereinheiten (RPN3, 5-9, 11 und 12). Zusammen bewerkstelligen Deckel und Basis die Erkennung und Entfaltung von Zielproteinen, entfernen kovalent gebundene Ub-Moleküle und delegieren die entfaltenen Polypeptide durch den  $\alpha$ -Ring des Kernkomplexes in dessen Innere. Die genaue Funktion der meisten Komponenten des Kappenkomplexes ist bislang noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass der ATPase-Ring der Basis mit seiner hydrolytischen Aktivität am Öffnen des  $\alpha$ -Rings und der Proteinentfaltung beteiligt ist (Hartmann-Petersen *et al.* 2003) und spezifische RPTs mit der Ub-Kette und weiteren Komponenten der Ub/26S-Proteasoms, wie den E3-Ligasen, interagieren (Xie & Varshavsky 2001; Lam *et al.* 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die RPN11 Untereinheit des Deckels eine Deubiquitinierungsaktivität aufweist und RPN5-7 beim Zusammenbau und der Stabilisierung der Untereinheiten des 26S-Proteasoms involviert sind (Verma *et al.* 2002; Yao & Cohen 2002; Santamaría *et al.* 2003).

### 1.2 E3-Ligasen

Während eine überschaubare Anzahl an E1- und E2-Isoformen bekannt ist, bilden die E3-Ubiquitinligasen eine strukturell diverse Enzymklasse, deren Mitglieder sich wesentlich in Aufbau und Funktionsweise unterscheiden. So kodieren allein im Genom von *A. thaliana* ca. 1600 Gene für eine E3-Ligase oder eine der E3-Ligase-Untereinheiten, was einem Genomanteil von etwa 5 % entspricht (Kurepa & Smalle 2008). Allen Vertretern der E3-Ub-Ligasefamilie ist jedoch gemein, dass sie die Substratspezifität innerhalb der Ub/26S-Proteasom-Maschinerie vermitteln. Die enorme Anzahl an verschiedenen E3-Ligasen gewährleistet, dass eine Vielzahl an verschiedenen Zielproteinen spezifisch erkannt, gebunden, polyubiquitiniert und schließlich im 26S-Proteasom abgebaut werden kann. Die als Monomere oder in multimeren Komplexen vorkommenden E3-Ub-Ligasen werden entsprechend ihrer

Funktionsweise und ihres strukturellen Aufbaus in verschiedene Familien gegliedert (Mazzucotelli *et al.* 2006). Die Gliederung erfolgt in zwei Hauptgruppen entsprechend der Anwesenheit einer HECT (Homology to E6-AP C-Terminus)-Untereinheit bzw. einer RING (Really Interesting New Gene)- oder U-Box-Domäne. Die E3-Ub-Ligasen vom Typ HECT gehen eine kovalente Bindung mit dem Ub ein bevor es auf das Zielprotein übertragen wird. Hierbei kommt es vorübergehend zur Ausbildung einer Thiolesterbindung zwischen dem Ub und einem konservierten Cysteinrest innerhalb der 350 Aminosäure langen HECT-Domäne (Schwarz *et al.* 1998). Während im Menschen mindestens 20 HECT-E3-Ligasen vorkommen, ist die Anzahl in *A. thaliana* mit bislang nur sieben identifizierten Mitglieder überschaubarer (Downes *et al.* 2003).

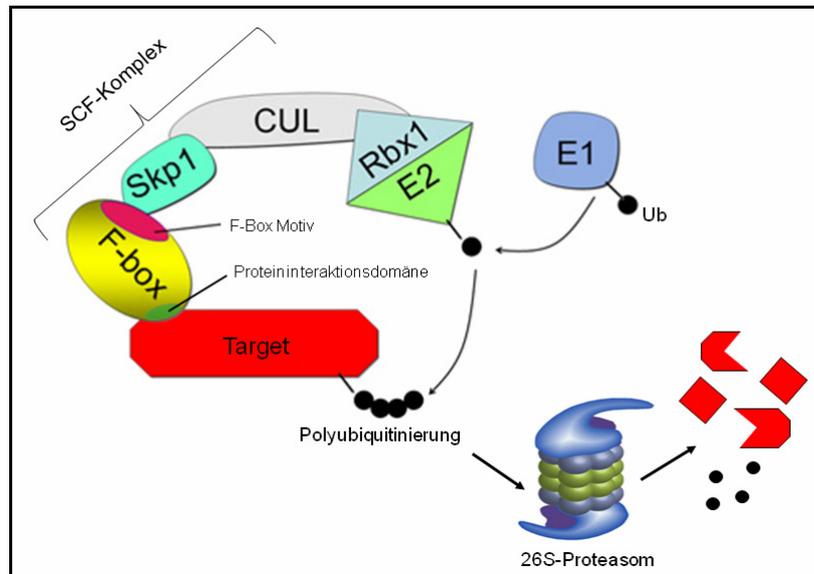
Im Gegensatz zu den E3-Ligasen vom Typ HECT, vermitteln E3-Ub-Ligasen mit RING- oder U-Box-Domäne den direkten Transfer des Ub vom E2-Enzym auf das Zielprotein, indem sie beide Komponenten binden und diese in räumliche Nähe zueinander bringen (Mazzucotelli *et al.* 2006). Sie sind entweder als monomere Proteine funktionell, indem sie über Bindestellen für das E2-Enzym und das Substrat verfügen, oder sie sind Bestandteil eines aus mehreren Komponenten bestehenden Enzymkomplexes. Die Gesamtheit der multimeren E3-Ligasen wird entsprechend ihrer essentiellen Bestandteile auch als Cullin-RING-Ligasen (CRLs) bezeichnet (Mazzucotelli *et al.* 2006; Vierstra 2009). Ihnen gemein ist ein Cullin (CUL), ein RING-BOX PROTEIN 1 (RBX1) sowie eine variable Anzahl weiterer Untereinheiten, die die Spezifität zu den Zielproteinen vermitteln.

Man unterscheidet vier verschiedene CRLs: (i) CRLs vom Typ CUL3/BTB (Broad complex/Tramtrack/Bric-abrac) beinhalten eines von ca. 80 BTB Proteinen, die über die namensgebende BTB-Domäne an CUL3 binden und gleichzeitig für die Rekrutierung des Zielproteins verantwortlich sind (Gingerich *et al.* 2005; Mazzucotelli *et al.* 2006). (ii) CUL4/DDB1 (DNA Damage-Binding 1) E3-Ligasen verfügen zum einen über ein DDB1-Protein, das als Adaptereinheit fungiert und die Bindung zwischen dem CUL4 und einem WDR (WD40-Repeat)-Protein vermittelt (Higa & Zhang 2007). WDR wiederum beinhaltet eine WD40-Protein-Interaktionsdomäne, mit der Zielproteine spezifisch gebunden werden. (iii) Der APC (Anaphase-Promoting Complex)-Komplex besteht aus elf oder mehr Untereinheiten, darunter Verwandte des Cullin (APC2) und RBX1 (APC11), die den katalytischen Kern bilden (Capron 2003; Fülöp & Tarayre 2005). (iv) Der SCF (S-Phase Kinase Associated Protein/Cullin/F-Box)-Komplex ist die am häufigsten in Pflanzen vorkommende multimere CRL.

### 1.2.1 Der SCF-Komplex

Ein SCF-Komplex ist typischerweise aus den vier Proteinuntereinheiten Cullin, S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1), F-Box-Protein und RBX1 zusammengesetzt (Abb. 1.2). Die Cullin-Untereinheit fungiert als Gerüst, das an seinem C-terminalen Ende mit RBX1 assoziiert ist, welches über eine RING-Finger-Domäne mit dem Ub-konjugierenden E2-Enzym interagiert (Zheng *et al.* 2002). Am N-Terminus des Cullins ist das SKP1-Protein gebunden. Dieses fungiert als Adapter und bindet ein F-Box-Protein. F-Box-Proteine vermitteln die Substratspezifität des SCF-Komplexes,

indem sie über eine C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne spezifisch Zielproteine rekrutieren und binden (Cardozo & Michele Pagano 2004). Obwohl das Genom von *A. thaliana* elf potentielle *Cullin*-Gene aufweist, wird angenommen, dass nur fünf dieser Gene für funktionelle Cullin-Proteine kodieren (*CUL1*, *CUL2*, *CUL3A*, *CUL3B*, *CUL4*). Zudem konnte bislang nur für *CUL1* und *CUL2* gezeigt werden, dass sie Bestandteile von SCF-Komplexen sind (Shen *et al.* 2002; Risseuw *et al.* 2003).



**Abb. 1.2: Aufbau einer E3 Ubiquitin-Ligase vom Typ SCF-Komplex (verändert nach Ariizumi & Steber, 2006).** Das F-Box-Protein bindet das Zielprotein spezifisch über seine C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne und interagiert mit einem SKP1 über das N-terminale F-Box-Motiv. Ein Cullin bindet als Gerüstprotein sowohl SKP1 als auch RBX1. RBX1 vermittelt die Bindung des SCF-Komplexes an das Ub-konjugierende Enzym (E2). Ub wird vom Ub-aktivierenden Enzym (E1) gebunden und auf das E2-Enzym transferiert. Anschließend erfolgt die Polyubiquitinierung des am SCF-Komplex gebundenen Zielproteins, das dadurch für den Abbau im 26S-Proteasom markiert wird.

Die *A. thaliana* Homologen der SKP1-Untereinheit werden auch als ARABIDOPSIS SKP1-LIKE (ASK) bezeichnet. Es gibt 21 ASK-Gene (Farrás *et al.* 2001), wobei *ASK6* und *ASK15* vermutlich Pseudogene sind, da ihre genomische Sequenz eine Leserasterverschiebung aufweist, die zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führt (Risseuw *et al.* 2003). Die Substratspezifität des SCF-Komplexes wird in *A. thaliana* durch mehr als 700 F-Box-Proteine vermittelt, die Ihre Substrate mittels variabler Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wie Leucin-reicher Repeats (LRRs), Kelch-Domänen, WD-40 Motive, F-Box-assoziiertes (FBA) Domänen oder Tubby (TUB)-Motive erkennen und rekrutieren (Andrade *et al.* 2001; Gagne *et al.* 2002; Risseuw *et al.* 2003; Xu *et al.* 2009). Voraussetzung für eine Erkennung und anschließende Bindung des Zielproteins durch das F-Box-Protein ist häufig eine vorangegangene Modifizierung des Targets, z. B. in Form von Phosphorylierungen (Koepp *et al.* 2001). Die Vielzahl an kombinatorischen Möglichkeiten, die sich aus den verschiedenen Einzelkomponenten innerhalb des SCF-Komplexes ergibt, gewährleistet, dass eine große Anzahl unterschiedlicher Zielproteine spezifisch für den Abbau im 26S-Proteasom rekrutiert und ubiquitiniert werden kann.

Die zyklische Assemblierung und Disassemblierung von SCF-Komplexen ermöglicht es, dass die verschiedenen Untereinheiten in neuer Kombination zusammengefügt werden können, ohne dass stets eine Neusynthese aller Komponenten erforderlich ist. Zudem stellt der Wechsel zwischen Assemblierung und Disassemblierung einen raschen Übergang von Aktivität und Inaktivität der SCF-Komplexe dar und gewährleistet somit eine hohe Flexibilität gegenüber sich verändernden Bedingungen. Die Zusammenlagerung des SCF-Komplexes und dessen Zerfall werden unter anderem durch das Ub-ähnliche Protein RELATED TO UBIQUITIN (RUB), CULLIN-ASSOCIATED NEDD8-DISSOCIATED 1 (CAND1) und das COP9-Signalosom (CSN) reguliert (Hotton & Callis 2008). CAND1 verhindert die Assemblierung des SCF-Komplexes, indem es sowohl an der N- als auch an der C-terminalen Domäne der Cullin-Untereinheit bindet und somit direkt mit den ASKs um deren Bindestelle am Cullin konkurriert (Zhang *et al.* 2008). Die Bindung von CAND1 an Cullin ist reversibel und kann durch die Aktivität von RUB aufgehoben werden. RUB bindet an einen konservierten Lysinrest innerhalb der C-terminalen Domäne des Cullin, bewirkt dadurch die Abspaltung von CAND1 und gewährleistet die Assemblierung des SCF-Komplexes (Wu *et al.* 2005). Die RUB-Modifizierung wiederum wird durch die Aktivität des CSN aufgehoben. Das CSN ist ein evolutionär konservierter Proteinkomplex, der aus acht Untereinheiten besteht, in den meisten Eukaryoten vorkommt und die Abspaltung des RUB vom Cullin bewirkt (Lyapina *et al.* 2001; Cope *et al.* 2002; Serino & Deng 2003). Das unmodifizierte Cullin kann dann erneut von CAND1 gebunden werden.

### 1.3 F-Box-Proteine (FBPs)

Die Substratspezifität des SCF-Komplexes wird durch die F-Box-Proteine (FBPs) vermittelt. Alle FBPs verfügen über ein gut konserviertes, ca. 50 Aminosäure langes F-Box-Motiv, das sich im N-terminalen Proteinbereich befindet und eine kompakte, trihelikale Struktur ausbildet, die für die Interaktion mit den SKP1-Untereinheit erforderlich ist (Kipreos & Pagano 2000; Schulman *et al.* 2000). Das F-Box-Motiv wurde in Anlehnung an das humane Protein Cyclin F benannt, in dem es erstmals beschrieben wurde (Bai *et al.* 1996). Darüber hinaus besitzen die meisten FBPs eine C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne, wie beispielsweise LRRs, Kelch-Repeats, FBA-Domänen, WD40-Repeats oder TUB-Motiv (Gagne *et al.* 2002; Xu *et al.* 2009). Es wird vermutet, dass diese Protein-Protein-Interaktionsdomänen für die Erkennung und Bindung der Zielproteine erforderlich sind. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von FBPs die innerhalb ihrer C-terminalen Region keines der bislang bekannten Proteininteraktionsmotive aufweisen. Entsprechend der vorliegenden Protein-Protein-Interaktionsdomäne wird die Familie der FBPs auch in kleinere Subfamilien untergliedert, deren Vertreter phylogenetisch enger miteinander verwandt sind als mit Mitgliedern anderer FBP-Subfamilien (Gagne *et al.* 2002). Die größten FBP-Subfamilien in *A. thaliana* bilden solche mit FBA-Domäne, LRR-Domäne oder Kelch-Repeats (Xu *et al.* 2009).

Die Aktivität der FBPs wird auf verschiedenen Wegen und Ebenen reguliert, z. B. durch Regulation der Proteinexpression, durch gezielten Abbau von FBPs oder durch Regulation der Assoziation mit

den anderen Untereinheiten des SCF-Komplexes (Kipreos & Pagano 2001). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass durch Homo- oder Heterodimerisierung mehrerer FBPs deren subzelluläre Lokalisation oder Affinität zum Substrat verändert (Welcker & Clurman 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Transkripte einiger FBPs Erkennungssequenzen nicht-kodierender RNAs darstellen (Navarro *et al.* 2006; Parry *et al.* 2009). Diese nicht-kodierenden RNAs werden auch als microRNAs bezeichnet. Basierend auf Sequenzkomplementaritäten binden sie die mRNAs der FBPs und beeinflussen deren Expression durch gezielten mRNA-Abbau.

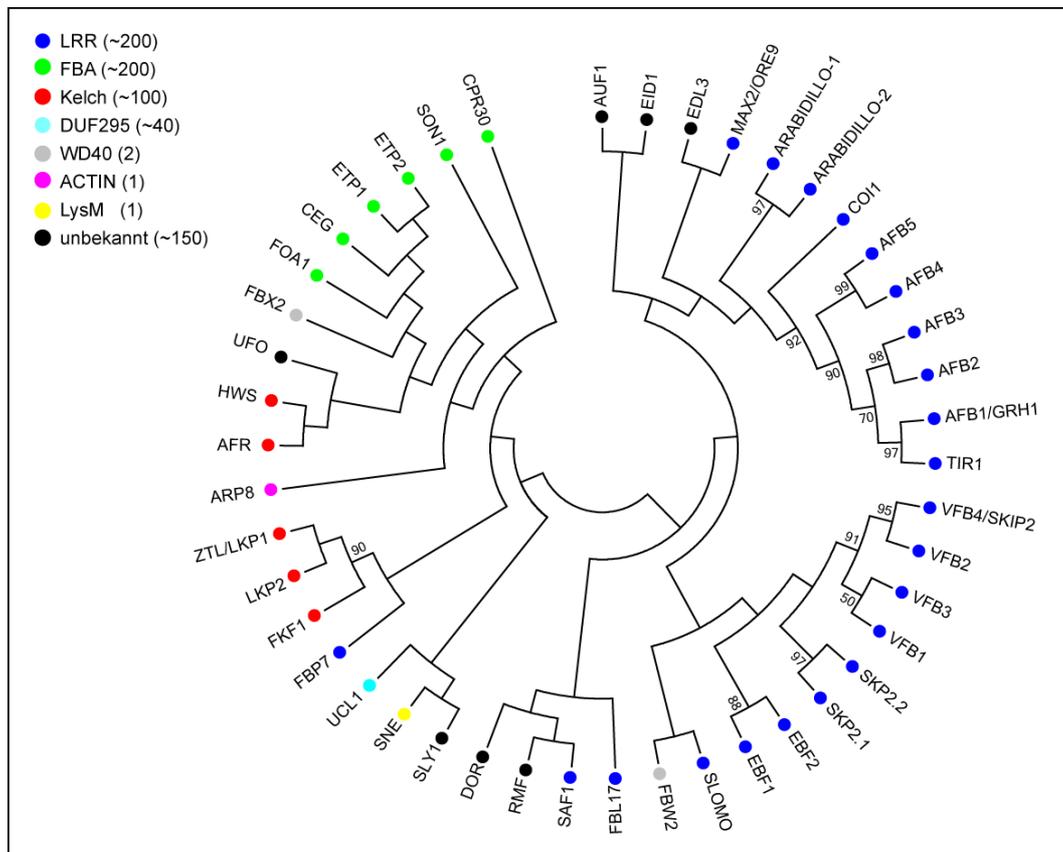
Zusätzlich zu ihrer Funktion als substratbindende Untereinheit eines SCF-Komplexes gibt es auch Beispiele für FBPs, die außerhalb von SCF-Komplexen funktionell sind (Hermand 2006). So konnte gezeigt werden, dass Mfb1 und Mdm30, zwei FBPs aus Hefe, die eine Rolle beim Erhalt der Mitochondrienmorphologie spielen, nicht Bestandteil eines *bona fide* SCF-Komplexes sind (Dürr *et al.* 2006). Auch Rcy1, ein Hefe-FBP das in der Regulation des Vesikeltransports involviert ist, agiert unabhängig vom 26S-Proteasom (Galan *et al.* 2001). In den genannten Fällen assoziiert das FBP zwar mit einem SKP1, allerdings in Abwesenheit der katalytischen Untereinheit, so dass es weder zur Ubiquitinierung noch zum Abbau des gebundenen Zielproteins kommt.

Die Anzahl an FBPs variiert stark von Spezies zu Spezies. Während im Genom von *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe* und der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* bislang 68, 74 (Jin *et al.* 2004), 33 (Ou *et al.* 2003), 18 (Hermand 2006) und 48 (Mahmood *et al.* 2012) FBPs identifiziert wurden, findet man in höheren Pflanzen eine weitaus größere Anzahl an Mitgliedern dieser Proteinfamilie. So wurden in den Genomen von *A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa* und *Vitis vinifera* bis heute 692, 337, 779 (Xu *et al.* 2009) und 156 (Yang *et al.* 2008) FBPs identifiziert. In den Leguminosen *Glycine max* und *Medicago truncatula* wurden kürzlich 480 bzw. 913 FBPs detektiert (Bellieny-Rabelo *et al.* 2013). Anders als z. B. tierische Organismen, zeichnen sich Pflanzen durch eine sessile Lebensweise aus. Somit kann vermutet werden, dass die enorme Expansion der F-Box-Proteinfamilie in Pflanzen unter anderem darin begründet liegt, dass sich Pflanzen, in stärkerem Maße als die meisten tierischen Lebewesen, rasch an wechselnde Umweltbedingungen anpassen müssen, um zu überleben. Die einzige bislang untersuchte nicht-pflanzliche Spezies, die eine mit den Pflanzen vergleichbare Anzahl an FBPs aufweist, ist *Caenorhabditis elegans* mit ca. 520 FBPs (Thomas 2006).

Durch die großen Unterschiede in der Anzahl der FBPs zwischen verschiedenen Pflanzenspezies (z. B. *A. thaliana* vs. *P. trichocarpa*) kann angenommen werden, dass weniger FBPs durch eine erhöhte Menge an Komponenten alternativer Ubiquitinierungswege, wie den E3-Ligasen vom Typ HECT, CUL3/BTB oder APC kompensiert werden. Diese Annahme konnte jedoch widerlegt werden (Yang *et al.* 2008).

In *A. thaliana* stellen FBPs mit einem Anteil von 2,5 % an der gesamten kodierenden Sequenz eine der größten Genfamilien dar (Gagne *et al.* 2002; Yang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009). Für ca. 50 % der in *A. thaliana* identifizierten FBP-kodierenden Gene liegen in Form von ESTs- und/oder Volllänge-cDNA-

Daten Hinweise für eine tatsächliche Expression vor (Yang *et al.* 2008). Interessanterweise sind von den ca. 700 FBPs in *A. thaliana* bislang weniger als 7 % funktionell charakterisiert (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Funktionell charakterisierte F-Box-Proteine von *A. thaliana*.** Der phylogenetische Baum basiert auf den Volllänge-Proteinsequenzen von 45 *A. thaliana* F-Box-Proteinen und wurde auf Grundlage der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei 1987) in MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) erstellt. Die Zahlen innerhalb des Baumes repräsentieren alle Bootstrap-Werte >50 resultierend aus 1000 Replikaten. Die F-Box-Proteine sind entsprechend ihrer C-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne farblich gekennzeichnet. Die Zahlen in der Legende geben die Anzahl der Gene innerhalb der einzelnen F-Box-Subfamilien wieder (Xu *et al.* 2009).

Nichtsdestotrotz verdeutlichen FBPs mit bekannter Funktion, dass sie als Module zur Substraterkennung in SCF-Komplexen eine Rolle in den verschiedensten physiologischen Prozessen der Pflanze spielen. So sind zahlreiche FBPs in Phytohormonsignalwegen involviert (Ruegger *et al.* 1998; Xu *et al.* 2002; Guo & Ecker 2003; Dill *et al.* 2004; Binder *et al.* 2007; Ho *et al.* 2008). Prominente Beispiele hierfür sind TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) und dessen Paraloge AUXIN SIGNALING F-BOX-PROTEIN 1-5 (AFB1-5), die Bestandteil eines Auxin-Co-Rezeptor-Komplexes sind (Dharmasiri *et al.* 2005; Kepinski & Leyser 2005; Parry *et al.* 2009; Greenham *et al.* 2011; Calderón Villalobos *et al.* 2012) oder CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1), das als Jasmonatrezeptor fungiert (Xu *et al.* 2002; Yan *et al.* 2009; Sheard *et al.* 2010). Des Weiteren spielen FBPs bei der Regulation der zirkadianen Uhr und der Photomorphogenese eine Rolle (Han *et al.* 2004; Sawa *et al.* 2007; Baudry *et al.* 2010; Takase *et al.* 2011; Ito *et al.* 2012). FBPs sind ebenso an der Blüten- und Wurzelentwicklung (Dong *et al.* 2006; Chae *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010), an Seneszenzprozessen (Woo *et al.* 2001) sowie an der Abwehr von Pathogene und Herbivore beteiligt (Kim & Delaney 2002; Gou *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2011; Gou *et al.* 2011).

### 1.3.1 Evolution von F-Box-Proteinen in Pflanzen

Aufgrund der Tatsache, dass FBPs eine der größten Proteinfamilien in Pflanzen darstellen, existieren bereits phylogenetische Studien zur molekularen Evolution in *A. thaliana* sowie in anderen Pflanzenspezies (einschließlich einzelliger Algen, Moose, Mono- und Dikotyledonen) (Gagne *et al.* 2002; Risseuw *et al.* 2003; Yang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009; Hua *et al.* 2011). Die systematische Suche nach Vertretern der F-Box-Proteinfamilie in verschiedenen Pflanzenspezies lieferte die Erkenntnis, dass die Anzahl an FBPs weder proportional zur Größe des betrachteten Genoms ist, noch mit der Wuchsform oder der Komplexität der Spezies korreliert. So weist *Selaginella moellendorffii*, das als Vertreter der Lycophyten den Moosfarnen zuzuordnen ist, deutlich mehr FBPs auf als beispielsweise die Samenpflanzen *V. vinifera*, *Zea mays* oder *Carica papaya* (Hua *et al.* 2011).

Des Weiteren ergaben Analysen phylogenetischer Bäume, die in den meisten der bislang durchgeführten Studien auf einem Alignment des F-Box-Motivs beruhen, dass Proteine mit gleicher oder ähnlicher Organisation der Domänen für gewöhnlich in gemeinsame Cluster gruppieren. Daher kann auf eine Co-Evolution des F-Box-Motivs mit der C-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne geschlossen werden (Gagne *et al.* 2002.; Xu *et al.* 2009). Interessanterweise bilden FBPs mit unbekannter C-terminaler Domäne entweder eigenständige Kladen oder gruppieren zusammen mit Proteinen anderer Domänen. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Entwicklungsgeschichte der FBPs mit unbekannter C-terminaler Domäne komplex ist (Xu *et al.* 2009).

Analysen zur chromosomalen Lokalisation von FBPs in *A. thaliana*, *O. sativa* und *P. trichocarpa* ergaben, dass viele von ihnen als Tandem-Repeats hintereinander auf dem gleichen Chromosom angeordnet sind. Daher wird vermutet, dass Tandemduplikationen eine wichtige Rolle bei der enormen Expansion dieser Proteinfamilie spielten (Gagne *et al.* 2002; Jain *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008). Außerdem sind zahlreiche FBPs der genannten Spezies in chromosomalen Regionen lokalisiert, die deutliche Syntenie aufweisen, was darauf hindeutet, dass segmentelle Duplikationen ebenfalls zur Expansion der FBPs beigetragen haben (Yang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass FBPs sowohl durch lokale Ereignisse, wie dem Austausch einzelner Domänen (*domain shuffling*), als auch durch genomweite Ereignisse (*whole genome duplication*) evolviert sind (Gagné *et al.* 2002; Yang *et al.* 2008). Neueste Transkriptannotationen lassen darauf schließen, dass die bisweilen enorme Expansion der FBPs mit einer hohen Anzahl an Geninaktivierungen einhergeht. Das heißt., dass duplizierte Gene zu Pseudogenen werden, indem sie durch Leserasterverschiebungen oder vorzeitige Stopcodons inaktiviert werden oder durch Retrotransposition Introns oder native Promotorregionen verlieren (Hua *et al.* 2011).

Die unterschiedlichen Entstehungsgeschichten der FBPs werfen die Frage auf, ob die evolutionären Muster der FBPs mit deren spezifischer Funktion korrelieren. Ein Vergleich von funktionell charakterisierten FBPs und ihren evolutionären Mustern unterstützt diese Annahme. Gene, die in relativ konservierte pflanzliche Prozesse wie der Embryogenese, Keimlings- und Blütenentwicklung,

Seneszenz oder zirkadianen Rhythmik involviert sind, weisen nur geringe Schwankungen in ihrer Genanzahl auf. Sie sind in hohem Maße in den unterschiedlichsten Pflanzenspezies evolutionär konserviert und unterliegen eher negativen Selektionsmechanismen. Im Gegensatz dazu sind Gene, die eine Rolle in relativ spezialisierten Prozessen, wie der Pollenerkennung oder der Abwehr von Pathogenen spielen, oft artspezifisch, unterliegen häufiger Genduplikationen und sind eher neutralen oder gar adaptiven Selektionsmechanismen ausgesetzt (Xu *et al.* 2009; Hua *et al.* 2011).

Vorangegangene Studien mit *A. thaliana*, *P. trichocarpa* und *O. sativa* zeigten, dass die verschiedenen F-Box-Subfamilien nicht einheitlich in den verschiedenen Pflanzenspezies evolviert sind. Stattdessen kann beobachtet werden, dass, je nach Spezies, FBPs mit bestimmter C-terminaler Domäne (z.B. LRRs, Kelch- und FBA-Domäne) schneller evolvierten als andere (Xu *et al.* 2009; Hua *et al.* 2011).

Die meisten der bislang durchgeführten phylogenetischen Analysen von FBPs beruhen ausschließlich auf einem Alignment des F-Box-Motivs, so dass die Sequenzinformationen der C-terminalen Domänen unberücksichtigt bleiben. Eine solche Herangehensweise kann daher nur ansatzweise Auskunft über die Phylogenie, Evolution und funktionelle Divergenz der einzelnen F-Box-Subfamilien liefern. Um ein besseres Verständnis dafür zu erhalten wie einzelne Subfamilien entstanden sind und wie sie sich im Laufe der Evolution verändert haben, ist es erforderlich den Fokus phylogenetischer Analysen auf individuelle F-Box-Subfamilien zu legen. Wie informativ derartige Ansätze sein können, zeigten bereits Studien zur genomweiten phylogenetischen Analyse kleinerer F-Box-Subfamilien, wie den FBPs mit TUB-Domäne (TLPs, Yang *et al.* 2008b) oder den *S-Locus F-Box-like genes* (Wang *et al.* 2004; De Franceschi *et al.* 2012).

Um herauszufinden, auf welche Weise eine der größten, weitestgehend uncharakterisierten F-Box-Subfamilien evolviert ist und durch welche Selektionsmuster sie sich auszeichnet, wurde der Fokus dieser Arbeit auf die genetische Analyse von F-Box-Proteinen mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne gelegt.

### **1.4 F-Box-Proteine mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne (FBKs)**

Das Kelch-Motiv wurde erstmals 1993 als ein 50 Aminosäure langes, sich sechsfach wiederholendes Element im Protein ORF1 (OPEN READING FRAME 1) von *D. melanogaster* beschrieben, das an der Entwicklung der Eikammer beteiligt ist. Namensgebend für das Kelch-Motiv war die *D. melanogaster* ORF1-Mutante *kelch* (Xue & Cooley 1993; Bork & Doolittle 1994). Unabhängig von der Anwesenheit einer F-Box kommt das Kelch-Motiv typischerweise als Serie von vier bis sieben Elementen vor, die zusammen eine Kelch-Repeat-Domäne bilden (Adams *et al.* 2000). Röntgenkristallstrukturanalysen der Kelch-Domäne einer pilzlichen Galaktose-Oxidase sowie des humanen Keap1-Proteins zeigten, dass jedes der sechs bzw. sieben Kelch-Motive ein viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt ausbildet. Die Gesamtheit der  $\beta$ -Faltblätter einer Kelch-Domäne bildet eine spezielle Tertiärstruktur, die als  $\beta$ -Propeller bezeichnet wird. Alle bislang beschriebenen  $\beta$ -Propeller-Strukturen verfügen über einen Mechanismus, über den der Ring aus  $\beta$ -Faltblättern geschlossen wird. Im Falle

der pilzlichen Galaktose-Oxidase verschließt ein N-terminaler  $\beta$ -Strang die Propellerstruktur. Im Falle des humanen Keap1 übernimmt ein C-terminaler Strangverschluss diese Aufgabe. Erste Hinweise dafür, dass Kelch-Domänen als Protein-Protein-Interaktionsdomänen fungieren, lieferten ebenfalls Analysen von Keap1. Ein Aminosäureaustausch innerhalb des zweiten  $\beta$ -Faltblattes der Kelch-Domäne von Keap1 reduziert dessen Fähigkeit zur Bindung an das Zielprotein Nrf2 (Li *et al.* 2004).

Die Sequenzidentität zwischen verschiedenen Kelch-Motiven ist relativ gering. Hochkonserviert sind nur zwei benachbarte Glycinreste am Ende des zweiten  $\beta$ -Stranges, ein Tyrosin im dritten sowie ein Tryptophan im vierten  $\beta$ -Strang (Adams *et al.* 2000; Andrade *et al.* 2001). Die geringen Sequenzübereinstimmungen und der variable Abstand zwischen dem Glycinpaar und den konservierten aromatischen Aminosäuren erschwert die Identifizierung von Kelch-Proteinen mittels konventioneller Suchprogramme wie BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Neben der F-Box-Domäne kommen Kelch-Repeats auch in Kombination mit anderen konservierten Proteindomänen vor. Ebenso sind Proteine bekannt, die neben den Kelch-Repeats keine zusätzlichen bekannten Domänen besitzen (Prag & Adams 2003; Leung *et al.* 2004; Mora-García *et al.* 2004).

Die Kombination aus Kelch-Domäne und F-Box-Motiv scheint sich vor allem im Pflanzenreich etabliert zu haben. So wurden in *A. thaliana* bislang 99, in *P. trichocarpa* 41 und in *O. sativa* 30 FBKs identifiziert (Xu *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu wurden in nicht-pflanzlichen Organismen nur sehr wenige FBKs gefunden, jeweils eines in *Homo sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und dem Malaria-Erreger *Anopheles gambiae* (Prag & Adams 2003; Sun *et al.* 2009).

Nur wenigen FBKs konnte bereits eine genaue Funktion zugeordnet werden. So sind von den ca. 100 FBKs in *A. thaliana* bislang nur fünf näher funktionell charakterisiert. ATTENUATED FAR-RED RESPONSE (AFR) ist ein positiver Regulator im Phytochrom A-abhängigen Lichtsignalweg (Harmon & Kay 2003). HAWAIIAN SKIRT (HWS) spielt eine Rolle bei der Entwicklung der Pflanzenorgane und ist somit an der Wachstumsregulation von *A. thaliana* beteiligt (González-Carranza *et al.* 2007). ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN-BINDING KELCH-REPEAT F-BOX 1 (FKF1) und LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), die zusätzlich zum F-Box-Motiv und der Kelch-Domäne noch über eine PAS (Per-ARNT-Sim)/LOV (Light, Oxygen, or Voltage)-Domäne verfügen, sind in die Regulation der zirkadianen Uhr involviert und steuern die Blühinduktion in Abhängigkeit von der Fotoperiode (Han *et al.* 2004; Sawa *et al.* 2007; Baudry *et al.* 2010; Takase *et al.* 2011; Ito *et al.* 2012). Die PAS/LOV-Domäne, die der F-Box vorgelagert ist, verleiht ZTL, FKF1 und LKP2 zudem die Eigenschaften eines Flavin-abhängigen Fotorezeptors (Kim *et al.* 2007; Demarsy & Fankhauser 2009; Ito *et al.* 2012). Neben den fünf erwähnten *A. thaliana* FBKs konnte dem humanen JUST ONE F-BOX AND KELCH DOMAIN-CONTAINING PROTEIN (JFK) eine Funktion als negativer Regulator des Tumorsuppressorgens p53 zugeordnet werden (Sun *et al.* 2009).

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Mit dem übergeordneten Ziel, ein detailliertes Bild von der Entstehungsgeschichte der FBPs zu erhalten, sollte beispielhaft für eine der zahlreichen FBP-Subfamilien eine systematische, phylogenetische Analyse in verschiedenen pflanzlichen Spezies durchgeführt werden. Für diese phylogenetischen Betrachtungen wurde eine der größten F-Box-Subfamilien, die FBPs mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne, herangezogen. Basis für diese Analysen ist eine *de novo* Identifizierung von FBKs in den vollständig annotierten Genomen der Landpflanzen *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, *O. sativa*, *Sorghum bicolor*, *Physcomitrella patens* und *S. moellenhoffii* sowie der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Durch die Konstruktion phylogenetischer Bäume und die Berechnung von Sequenzdiversitäten sollte untersucht werden, welchen evolutionären Mechanismen die FBKs unterliegen und welchen selektiven Kräften sie ausgesetzt sind. Um Aussagen über mögliche Subfunktionalisierungen von eng verwandten Genen treffen zu können, wurden die phylogenetischen Betrachtungen durch molekulare Analysen einer ausgewählten Klade von *A. thaliana*-Genen ergänzt. Diese molekularen Analysen umfassen Studien zur Genexpression, Protein-Protein-Interaktion sowie zur subzellulären Lokalisation.

Auf der Grundlage der phylogenetischen Studien sollte nachfolgend eine kleine Gruppe von *A. thaliana*-Genen ausgewählt werden, die sich für eine umfassende molekulare und funktionelle Charakterisierung eignet. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte mittels eines revers-genetischen Ansatzes, wobei die folgenden molekularbiologischen Vorgehensweisen verfolgt wurden:

- i) Nachweis der prinzipiellen Funktionalität der ausgewählten FBKs als *bona fide* F-Box-Proteine mittels Studien zur Genexpression, subzellulären Lokalisation und Interaktion mit den ASK-Adaptorproteinen des SCF-Komplexes
- ii) Konstruktion von Knock-Out-Linien sowie Überexpressionslinien für *loss-* und *gain-of-function* Studien
- iii) Micro-Array-Analysen zur Identifizierung pflanzlicher Prozesse und deren genetischer Komponenten, die transkriptionell durch die ausgewählten FBKs beeinflusst werden
- iv) Systematische Phänotypisierung der generierten Knock-Out- und Überexpressionslinien
- v) *Yeast-two-Hybrid*-Screen zur Identifizierung potentieller Substrate der ausgewählten FBKs

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien von folgenden Firmen bezogen:

- Enzyme: Applied Biosystems, Finnzymes, Invitrogen, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, Thermo Fischer Scientific
- Farbstoffe: Roth, Serva
- Laborchemikalien und Lösungsmittel: AppliChem, Merck, Roth, Serva, Sigma-Aldrich, Star Lab
- DNA-/Protein-Marker: Thermo Fischer Scientific
- Nährmedien: Clontech, Duchefa, Serva, Sigma-Aldrich
- Antibiotika und Phytohormone: Duchefa, Roth, Sigma-Aldrich
- Oligonukleotide: MWG-Biotech

### 2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Untersuchungen an *A. thaliana* wurden am Wildtyp Columbia-0 (Col-0) sowie an verschiedenen Mutanten und transgenen Linien durchgeführt, die sich ebenfalls alle im Col-0 Hintergrund befinden. Die verwendeten SALK T-DNA-Insertions-Linien wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) bezogen (Tab. 2.1). Alle Mehrfachmutanten, Überexpressionslinien und transgenen *A. thaliana* Linien wurden im Verlauf dieser Arbeit hergestellt.

Für die transiente Transformation von GFP-Fusions-Konstrukten wurde außerdem *Nicotiana benthamiana* verwendet.

**Tab. 2.1: SALK T-DNA-Insertionslinien, die von NASC bezogen wurden.** Angegeben sind jeweils die Bezeichnung der Mutante, das betroffene Gen sowie die SALK-Identifikationsnummer (SALK-ID).

T-DNA-Insertions-Linie	Betroffenes Gen	SALK-ID
<i>fbk1</i>	<i>AT1G15670</i>	SALK_014388c
<i>fbk2-1</i>	<i>AT2G80440</i>	SALK_129095
<i>fbk2-2</i>	<i>AT2G80440</i>	SALK_008497
<i>fbk3-1</i>	<i>AT2G44130</i>	SALK_143644
<i>fbk3-2</i>	<i>AT2G44130</i>	SALK_048698
<i>fbk4</i>	<i>AT3G59940</i>	SALK_080249

#### 2.2.1 Allgemeine Anzuchtbedingungen von *A. thaliana*

Für die Anzucht von *A. thaliana* wurde das Saatgut zunächst oberflächensterilisiert und zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Anschließend folgte die Aussaat auf steriles *A. thaliana* Solution (ATS)-Medium (Lincoln *et al.* 1990) versehen mit 0,5 % (w/v) Agargel und 1 % (w/v) Saccharose. Die Anzucht von Keimlingen erfolgte entweder unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) im Klimaschrank (Percival; CLF) bei 20°C und einer Lichtintensität von 250-290  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  oder unter

Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkel) in einer begehbaren Phytokammer (Johnson Controls) bei 22°C (Tag) bzw. 20°C (Nacht) und einer Lichtintensität von 100-110  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Sollten Pflanzen über das Keimlingsstadium hinaus kultiviert werden, wurden sie nach 10-12 Tagen vom ATS-Medium in Pflanztöpfe mit Erde (GS90-Vermikulit-Gemisch) transferiert. Die weitere Anzucht der Pflanzen erfolgte entweder im Klimaschrank oder der Phytokammer unter den genannten Lang- oder Kurztagbedingungen bzw. im Gewächshaus bei Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung und 20–22°C. Zur Anzucht von Pflanzen für die stabile Transformation wurde Saatgut ohne Vorbehandlung direkt auf Erde ausgesät und von Beginn an im Gewächshaus angezogen.

### 2.2.2 Stabile Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation sechs bis acht Wochen alter, blühender *A. thaliana* Pflanzen erfolgte nach der *Floral dip*-Methode (Logemann *et al.* 2006). Hierfür wurden transgene *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme auf selektivem, Antibiotika-haltigem LB-Agar-Medium pH 7,5 (1 % (w/v) Bacto Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1,5 % Agar Agar) ausplattiert und kultiviert, anschließend in flüssigem LB-Medium aufgenommen und auf eine OD<sub>600</sub> von 2,0 eingestellt. Zur Bakterienkultur wurde im Verhältnis 1:4 5 %ige (w/v) Saccharoselösung gegeben und Silwet-L77 in einer Endkonzentration von 0,03 % (v/v) appliziert. Die Pflanzen wurden schließlich mit den Infloreszenzen in die Bakteriensuspension getaucht, 10 sek darin geschwenkt, in eine Schale gelegt, mit Folie überdeckt und bis zum Folgetag inkubiert. Bis zur Samenreife wurden die Pflanzen weiterhin im Gewächshaus kultiviert. Nach der Ernte der Samen wurden diese oberflächensterilisiert, zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert, auf selektive ATS-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgelegt und im Langtag angezogen. Potentielle transgene Pflanzen wurden in Erde überführt und mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) genotypisiert.

### 2.2.3 Kreuzung von *A. thaliana*

Für die Kreuzung von *A. thaliana* Pflanzen wurden die Kelch-, Blüten- und Staubblätter ungeöffneter Knospen des weiblichen Kreuzungspartners mit einer Pinzette entfernt. Auf den verbleibenden Stempel wurde der Pollen des männlichen Kreuzungspartners übertragen.

### 2.2.4 Anzuchtbedingungen von *N. benthamiana*

Die Anzucht von *N. benthamiana* erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen auf Einheitserde Classic Kokos (45 % Weißtorf; 20 % Ton; 15 % Sodentorf; 20 % Kokosfaser), bei einer Tag-Temperatur von 23-25°C, einer Nacht-Temperatur von 19-24°C und einer Luftfeuchte zwischen 55 % und 75 %.

### 2.2.5 Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Für die transiente Transformation von *N. benthamiana* mit GFP-Fusionskonstrukten wurde eine 2 ml Übernachtkultur des transgenen *A. tumefaciens*-Stammes für 4 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Infiltrationsmedium (10 mM MES, pH 5,3-5,5; 10

mM MgCl<sub>2</sub>; 150 µg/ml Acetosyringone) resuspendiert und die Zellsuspension auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. In einem Verhältnis von 1:1 wurde die Zellsuspension mit dem ebenfalls auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellten *A. tumefaciens*-Stamm P19 gemischt und für 1 h bei 100 rpm schüttelnd inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension mit einer Spritze (ohne Kanüle) in die Blattunterseite von *N. benthamiana* injiziert und die behandelte Blattstelle farblich gekennzeichnet. Drei Tage nach der Injektion wurde eine Probe des behandelten Blattes mit einem Korkbohrer ausgestochen und am Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) analysiert.

### 2.3 Bakterien- und Pilzstämmе

Zur Vermehrung von Plasmiden in *Echerichia coli* wurden die Stämme DH5α und DB3.1 verwendet. Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 genutzt. Für Infektionsexperimente mit *A. thaliana* fand der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (von Dr. Marco Trujillo, IPB Halle) sowie der Pilz *Botrytis cinerea* (von Dr. Justin Lee, IPB Halle) Anwendung. Der *Yeast-two-Hybrid*-Screen erfolgte unter Verwendung der *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme Y2HGold und Y187 (von Clontech).

#### 2.3.1 Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* erfolgte zum einen durch Animpfen von 4 ml sterilem LB-Flüssig-Medium, das anschließend über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) und 180 rpm schüttelnd inkubiert wurde. Alternativ wurden Kulturen von *E. coli* und *A. tumefaciens* auf Platten mit sterilem LB-Agar-Medium angezogen. Bei dieser Kultivierungsmethode wurde *E. coli* über Nacht bei 37°C inkubiert, *A. tumefaciens* hingegen über zwei Tage bei 28°C. Die Selektion transgener Kulturen erfolgte durch Anzucht in/auf selektivem, Antibiotikum-haltigen LB-Flüssig/Agar-Medium. Die verwendeten Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Hygromycin, 100 µg/ml Carbenicillin, 100 µg/ml Rifampicin, 100 µg/ml Spectinomycin.

#### 2.3.2 Transformation von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Für die Transformation von *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* wurden jeweils 50 µl elektrokompetente Zellen mit 1-2 µl Plasmid-DNA gemischt und ihnen im Elektroporator ein elektrischer Impuls von 2,5 kV versetzt. Anschließend wurden die Zellen in 450 µl SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,05 % (w/v) NaCl; 0,36 % (w/v) Glukose) aufgenommen und 1 h bei 37°C (*E. coli*) bzw. 2 h bei 28°C (*A. tumefaciens*) bei 180 rpm schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden die Zellen durch zweiminütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet im Restüberstand resuspendiert und auf selektivem LB-Agar-Medium ausplattiert.

### 2.3.3 Kultivierung von *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

Die Anzucht des Bakterienstammes *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 erfolgte auf Platten mit sterilem King's B-Medium (Roth) versetzt mit 1 % (v/v) Glycerol, 50 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Kanamycin bei 28°C über 2 Tage.

### 2.3.4 Kultivierung von *B. cinerea*

Die Anzucht von *B. cinerea* erfolgte ausgehend von einer in 30 %iger Glycerol-Lösung und in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Probe des Pilzmyzels. Das Pilzmyzel wurde für zehn Tage bei 20°C auf Potato-Glucose-Agar (Fluka) inklusive 1,25 % (w/v) Kartoffelpüreepulver (Pfanni) und 10 % (w/v) zerkleinertem Pflanzenmaterial von *A. thaliana* kultiviert. Nach der Ausbreitung des Pilzmyzels auf der gesamten Platte, wurden von dessen Oberfläche die Pilzsporen mittels sterilen GamborgB5-Medium (Duchefa) inklusive 2 % Glukose abgeschwemmt.

### 2.3.5 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung der *S. cerevisiae*-Stämme Y187 und Y2HGold erfolgte zum einen über Nacht in 2 ml Flüssigkultur, die bei 30°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert wurde. Zum anderen wurden die Hefekulturen über drei Tage bei 30°C auf Platten mit sterilem Agar-haltigem Medium angezogen. Zur Anzucht der Wildtyp-Stämme Y187 und Y2HGold wurde das Vollmedium YPDA (2 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Agar Agar; 2 % (w/v) Dextrose; 0,003 % (w/v) Adeninhemisulfat) verwendet, zur Anzucht von transgenen Hefestämmen das Aminosäuremangelmedium Y-SD (0,675 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren; 2 % (w/v) Dextrose; 1×Dropout ohne Adenin (Ade), Histidin (His), Leucin (Leu), Tryptophan (Trp)).

### 2.3.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation der *S. cerevisiae* Stämme Y187 und Y2HGold wurden die Zellen einer entsprechenden 2 ml Übernachtskultur durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 120 µl 100 mM Litiumacetat resuspendiert und der Ansatz 5 min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

- 35 µl Hefezellen
- 240 µl 50 % (w/v) Polyethylenglycol
- 36 µl 1 M Litiumacetat
- 50 µl einzelsträngige Heringssperma-DNA (2 mg/ml; zuvor 5 min bei 100°C inkubiert)
- 5-15 µl Plasmid-DNA (0,1-5 µg)

Der Transformationsansatz wurde 30 sek durchmischt und 20 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurden die Hefezellen durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 50 µl bidest Wasser resuspendiert und der Ansatz auf selektivem Y-SD-Medium ausplattiert.

## 2.4 DNA-Analytik

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Genomische pflanzliche DNA, die als Template für eine PCR zur Genotypisierung verwendet werden sollte, wurde laut Herstellerprotokoll mit dem REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich) isoliert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Die Isolierung hochmolekularer genomischer DNA, die bei der Amplifizierung von zu klonierenden DNA-Fragmenten eingesetzt wurde, erfolgte laut Herstellerprotokoll mit dem Dneasy® Plant Mini Kit von Qiagen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Ausgehend von einer 4 ml Übernachtskultur erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* laut Herstellerprotokoll entweder mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas oder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

### 2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen wurden die transgenen Hefestämme auf einer Fläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> auf selektiven Y-SD-Platten ausgestrichen und über drei Tage bei 30°C kultiviert. Die Hefezellen wurden anschließend in 500 µl bidest Wasser aufgenommen, durch fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Aufschlusspuffer (2 % (v/v) Triton X-100; 1 % (v/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von ca. 300 mg Glaskugeln (Durchmesser: 425-600 µm) sowie 200 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:25:1 (v/v/v)) und anschließendes vierminütiges Durchmischen erfolgte der Aufschluss der Hefezellen. Der Ansatz wurde anschließend 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und 50-200 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von Natriumacetat (pH 5,0) auf eine Endkonzentration von 0,3 M und eine 20-minütige Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Abschließend wurde die DNA durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und nach dem Trocknen in 10 µl Wasser resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

## 2.4.4 PCRs

### 2.4.4.1 PCR zur Genotypisierung von *A. thaliana*

Zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien oder um die Zygotie transgener Konstrukte in transformierten Pflanzen nachzuweisen, wurde aus diesen genomische DNA mit dem REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich) isoliert. Die DNA wurde als Template in folgenden 10 µl Reaktionsansatz eingesetzt:

5 µl REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich)  
 0,75 µl *Forward*-Primer (20 µM)  
 0,75 µl *Reverse*-Primer (20 µM)  
 2 µl DNA-Extrakt  
 1,5 µl bidest Wasser

Die für die Genotypisierungs-PCRs verwendeten Primer sind in Tab. 7.1 zusammengefasst. Das thermische Profil für die Genotypisierungs-PCR ist in Tab. 2.2 dargestellt.

**Tab. 2.2: Thermisches Profil für die Genotypisierungs-PCRs.**

Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
35	95°C	20 sek	Denaturierung
	T <sub>m</sub> (Primer) – 5°C	30 sek	Primeranlagerung
	72°C	1 min/kb	Elongation
1	72°C	15 min	Abschließende Elongation

#### 2.4.4.2 Kolonie-PCR mit *E. coli*, *A. tumefaciens* und *S. cerevisiae*

Zum Nachweis von Plasmid-DNA in Kolonien von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *S. cerevisiae* wurde pro PCR-Ansatz jeweils eine Einzelkolonie vom selektiven Medium mit dem Zahnstocher gepickt und in folgenden 10 µl Reaktionsansatz eingerührt:

5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)<sup>TM</sup> (Fermentas)  
 0,75 µl *Forward*-Primer (20 µM)  
 0,75 µl *Reverse*-Primer (20 µM)  
 3,5 µl bidest Wasser

Für die Kolonie-PCR wurden entweder Vektor- oder Gen-spezifische Primer verwendet (Tab. 7.1). Das thermische Profil stimmt mit dem der Genotypisierungs-PCR (Tab. 2.2) überein.

#### 2.4.4.3 Phusion-PCR

Um DNA-Fragmente für eine sich anschließende Klonierung zu amplifizieren wurde hochmolekulare genomische DNA bzw. komplementäre DNA (cDNA) vom *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 in folgenden 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt:

0,5 µl Phusion<sup>TM</sup> Polymerase (Finnzymes)  
 10 µl 5× Phusion HF-Puffer  
 4 µl dNTPs (jeweils 2 mM dCTP, dGTP, dATP, dTTP)  
 1,5 µl DMSO  
 0,75 µl *Forward*-Primer (20 µM)  
 0,75 µl *Reverse*-Primer (20 µM)  
 1 µl genomische DNA (250 ng) bzw. cDNA (150 ng)  
 31,5 µl bidest Wasser

Das thermische Profil für die Phusion-PCR ist in Tab. 2.3 dargestellt.

**Tab. 2.3: Thermisches Profil für die Phusion-PCR.**

Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer	Phase
1	98 °C	2 min	Initiale Denaturierung
35	98 °C	10 sek	Denaturierung
	$T_m$ (Primer) + 3 °C	30 sek	Primeranlagerung
	72 °C	1 min/kb	Elongation
1	72 °C	10 min	Abschließende Elongation

#### 2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die in den PCRs amplifizierte DNA-Fragmente wurden in einem 1-2 %igen Agarosegel bei 100 mA für eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in 0,5×TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA) unter Erhitzen gelöst und mit 0,004 % (v/v) Serva DNA Stain G versehen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5×TBE-Puffer. Phusion-PCR-Ansätze wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 20 % Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylene-Cyanol FF; 30 % (v/v) Glycerin) versehen. Als Größenreferenz wurden die DNA-Marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder bzw. pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker von Fermentas verwendet. Die Detektion und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Transilluminator. Die Elution von DNA-Banden aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem GENE CLEAN® II-Kit von Qiagen.

#### 2.4.6 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 2 µg DNA zusammen mit 3 µl Primer (100 µM) und bidest Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Sequenzierung erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg). In der Regel wurden die Vektor-spezifische Standardprimer T7-Seq, M13uni (-21) oder M13rev (-29) (Tab. 7.1) verwendet.

##### 2.4.6.1 Lokalisierung von T-DNA-Integrationsorten mittels Sequenzierung

Um die exakte Position der T-DNA in T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana* zu verifizieren, wurde zunächst unter Verwendung des T-DNA-spezifischen Primers Lba1 (Tab. 7.1) sowie eines Primers, der spezifisch für das betroffene Gen ist, ein PCR-Produkt amplifiziert. Je nach Orientierung der T-DNA ist der Gen-spezifische Primer vorwärts oder rückwärts gerichtet. Als Template für die PCR diente genomische DNA der zu untersuchenden T-DNA-Insertionslinie. Der Reaktionsansatz der PCR sowie das thermische Profil stimmen mit dem in Abschnitt 2.4.4.1 beschriebenen überein. Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerprotokoll mit dem GENE CLEAN® II-Kit von Qiagen aufgereinigt und 7 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Lba1-Primer (100 µM) und bidest Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Dieser Ansatz wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert. Unter Verwendung des Multiple Sequence Alignment Programms ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) konnte durch ein Alignment der erhaltenen Sequenz mit der bekannten Sequenz der T-DNA (<http://signal.salk.edu/>) sowie des Gens von Interesse (TAIR: <http://www.arabidopsis.org/>) die genaue Position der T-DNA im Gen ermittelt werden.

## 2.5 Klonierungsstrategien

### 2.5.1 Gateway®-Klonierung

Die Gateway®-Technologie (Invitrogen) ist ein Klonierungsverfahren, das in Anlehnung an den Mechanismus der DNA-Insertion des Bakteriophagen  $\lambda$  entwickelt wurde und sich dessen sequenzspezifisches Rekombinationssystem über sogenannte *attachment sites* (*att-sites*) zunutze macht. Der allgemeine Ablauf ist in Abb. 2.1 zusammengefasst.

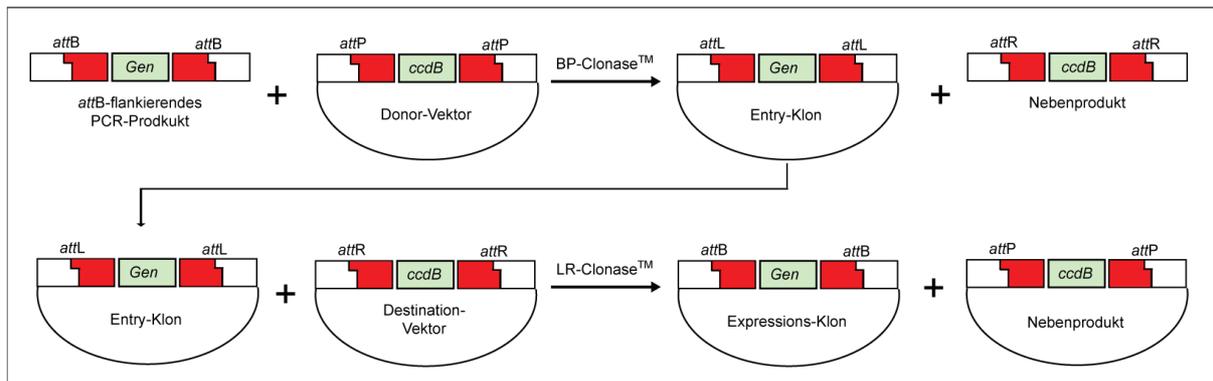


Abb. 2.1: Allgemeiner Ablauf der Gateway®-Klonierung (verändert nach Invitrogen „Gateway® Technology“, Version E (2003), Katalog-Nr. 12535-019 und 12535-027). Erläuterungen siehe Text.

#### 2.5.1.1 Anlagerung der *attB-sites* an das zu klonierende DNA-Fragment

Um die Integration des zu klonierenden DNA-Fragmentes mittels homologer Rekombination in den Donor-Vektor pDONR™221 (Invitrogen) zu ermöglichen, ist die Anlagerung von *attB-sites* an beide Enden des zu klonierenden DNA-Fragmentes erforderlich (Abb. 2.1). Die Anlagerung erfolgte während einer Phusion-PCR unter Verwendung von *attB*-Primern (Tab. 7.1). Deren Sequenz stellt eine Kombination aus der *attB-site* und den 24-26 ersten (*Forward-Primer*) bzw. letzten (*Reverse-Primer*) Basenpaaren des zu klonierenden DNA-Fragmentes dar. Um zu gewährleisten, dass ausschließlich die kodierende DNA-Sequenz (ohne Introns) kloniert wird, wurde im Falle von Genen, die innerhalb ihres *Open reading frames* (ORF) Introns aufweisen, cDNA von Col-0 als Template in die Phusion-PCR eingesetzt. Für die Klonierung von Promotorregionen oder Genen, die innerhalb ihres ORF keine Introns aufweisen, wurde hingegen hochmolekulare genomische DNA von Col-0 als Template verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf ihre korrekte Größe überprüft und anschließend aufgereinigt.

#### 2.5.1.2 BP- und LR-Rekombinationsreaktion

Während der BP-Rekombinationsreaktion erfolgt die homologe Rekombination zwischen *attB*-flankierendem PCR-Produkt und dem Donor-Vektor (Abb. 2.1). Das Produkt dieser Reaktion wird als Entry-Klon bezeichnet und stellt in diesem Fall den Vektor pDONR™221 dar, der das gewünschte DNA-Fragment enthält, das nun von sogenannten *attL-sites* flankiert wird. Für die BP-Reaktion wurde der Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix von Invitrogen verwendet und folgender Reaktionsansatz gewählt:

1-5  $\mu$ l *attB*-PCR-Produkt (5-50 ng)  
1-2  $\mu$ l pDONR<sup>TM</sup>221 (150 ng)  
1,5  $\mu$ l BP-Clonase<sup>TM</sup>  
ad. 8,5  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA)

Der Reaktionsansatz wurde mindestens 1 h bei 25°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1  $\mu$ l Proteinase K und zehnminütiger Inkubation bei 37°C abgestoppt. 1,5  $\mu$ l des BP-Reaktionsproduktes wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und die auf selektivem LB-Agar-Medium (inklusive 50  $\mu$ g/ml Kanamycin) gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit des Entry-Konstrukts überprüft. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung die korrekte Amplifizierung des klonierten DNA-Fragmentes überprüft. Im Anschluss erfolgte die LR-Rekombinationsreaktion, bei der das DNA-Fragment aus dem Entry-Vektor pDONR<sup>TM</sup>221 in einen *Destination*-Vektor übertragen wird. Einige der verwendeten *Destination*-Vektoren entstammen der pGWB-Serie (Nakagawa *et al.* 2007). Zur Konstruktion von Überexpressionslinien (35S::*Gen*) sowie für die Expression artifizieller Mikro-RNAs (amiRNAs) wurde der Vektor pGWB2 verwendet. Für die Klonierung von *Promotor*::*GUS*-Konstrukten diente pGWB3. Um Fusionsproteine mit einem C-terminalen GFP-Tag unter der Kontrolle eines nativen Promotors zu konstruieren wurde pGWB4 verwendet. Fusionsproteine mit einem C- bzw. N-terminalen GFP-Tag unter der Kontrolle des 35S-Promotor konnten mit dem Vektor pGWB5 bzw. pGWB6 generiert werden. *Destination*-Vektoren, die für *Yeast-two-Hybrid*-Ansätze verwendet wurden, sind pGADT7 und pGBST7 (beide von Prof. Ulla Bonas, MLU Halle-Wittenberg). Für die LR-Reaktion wurde der Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix von Invitrogen verwendet und folgender Reaktionsansatz gewählt:

1-5  $\mu$ l Plasmid-DNA vom Entry-Klon (150 ng)  
1-2  $\mu$ l *Destination*-Vektor (150 ng)  
1,5  $\mu$ l LR-Clonase<sup>TM</sup>  
ad. 8,5  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA)

Der Reaktionsansatz wurde mindestens 1 h bei 25°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1  $\mu$ l Proteinase K und zehnminütiger Inkubation bei 37°C abgestoppt. 1,5  $\mu$ l des LR-Reaktionsproduktes wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und die auf selektivem LB-Agar-Medium (inklusive 50  $\mu$ g/ml Kanamycin und 50  $\mu$ g/ml Hygromycin (pGWBs); 100  $\mu$ g/ml Spectinomycin (pGBST7); 100  $\mu$ g/ml Carbenicillin (pGADT7)) gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit des *Destination*-Konstrukts überprüft. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und für die Transformation in *A. tumefaciens* bzw. *S. cerevisiae* verwendet.

### 2.5.2. Gerichtete Klonierung mit dem pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> System

Alternativ zum Entry-Klon in pDONR<sup>TM</sup> 221 wurden für die Gateway-Klonierung auch Entry-Klone im Donor-Vektor pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) hergestellt. Die gerichtete Insertion des DNA-Fragmentes in pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> erfordert das Anfügen eines CACC-Überhanges am 5'-Ende des zu klonierenden DNA-Fragmentes. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Tab. 7.1 vermerkt. Für

die Klonierungsreaktion wurde das pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit von Invitrogen verwendet und folgender Reaktionsansatz gewählt:

1 µl pENTR™/D-TOPO®  
 0,5-4 µl PCR-Produkt mit 5' CACC-Überhang (20-100 ng)  
 1,5 µl 1:4 verdünnte Salzlösung  
 ad. 6 µl bidest Wasser

Der Klonierungsansatz wurde vorsichtig durchmischt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Transformation in elektrokompetente *E. coli* DH5α verwendet. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde mittels Sequenzierung auf die Korrektheit des Inserts geprüft und anschließend in die LR-Rekombinationsreaktion eingesetzt.

### 2.5.3 Klonierung in pGBKT7

Für den *Yeast-two-Hybrid*-Screen gegen die normalisierte *A. thaliana* cDNA-Bibliothek von Clontech erfolgte die Klonierung der *Bait*-Proteine in den Hefektor pGBKT7 von Invitrogen. Die gerichtete Insertion der Zielgene erfolgte entweder über die *EcoRI/BamHI*-Schnittstellen (für *AT1G15670* und *AT1G80440*) oder über die *NdeI/NcoI*-Schnittstellen (für *AT2G44130* und *AT3G59940*) in der *Multi-cloning site* des pGBKT7-Vektors. Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden zunächst durch Amplifikation in einer Phusion-PCR und unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 7.1) mit den Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme flankiert. Mit dem aufgereinigten Amplifikationsprodukten sowie mit dem Vektor pGBKT7 erfolgte eine Restriktion mit *EcoRI/BamHI* bzw. *NdeI/NcoI*. Folgende Ansätze wurden gewählt:

**Tab. 2.4: Ansätze zur Restriktion des Vektors pGBKT7 sowie der PCR-Produkte mit *EcoRI/BamHI* bzw. *NcoI/NdeI*.**

Komponenten	Vektor-Restriktion	PCR-Produkt-Restriktion
10× Fast Digest Buffer	8 µl	4 µl
<i>EcoRI</i> Fast-Digest bzw. <i>NcoI</i> Fast-Digest	4 µl	2 µl
<i>BamHI</i> Fast-Digest bzw. <i>NdeI</i> Fast-Digest	4 µl	2 µl
pGBKT7	5 µl (3 µg)	/
PCR-Produkt	/	20-30 µl (300-450 ng)
bidest Wasser	59 µl	ad 40 µl

Die *EcoRI/BamHI*-Restriktion wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und für 5 min bei 80°C abgestoppt. Die *NdeI/NcoI*-Restriktion wurde für 90 min bei 37°C inkubiert und für 15 min bei 65°C abgestoppt. Nach der Aufreinigung der Restriktionsansätze erfolgte eine T4-Ligation unter Verwendung folgenden Ligationsansatzes:

2 µl T4-Ligase-Puffer  
 1 µl T4-Ligase (1 U/µl)  
 10-15 µl Amplifikationsprodukt (*EcoRI/BamHI* bzw. *NcoI/NdeI*-behandelt; 100 ng)  
 1-2 µl pGBKT7 (*EcoRI/BamHI* bzw. *NcoI/NdeI*-behandelt; 100 ng)  
 ad. 20 µl bidest Wasser

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 22°C inkubiert und durch fünfminütige Inkubation bei 70°C abgestoppt. Die Ligationsansätze wurden für die Transformation in elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt und die Plasmid-DNA positiver Klone mittels Sequenzierung auf die Korrektheit des Inserts geprüft. Abschließend erfolgte die Transformation in den *S. cerevisiae* Stamm Y2HGold.

### 2.5.4 Klonierung in pGADT7-rec

Für die Verifizierung der im *Yeast-two-Hybrid*-Screen identifizierten Interaktoren, erfolgte deren Klonierung unter anderem in den *Sma*I-linearisierten Vektor pGADT7-rec von Clontech. Hierfür wurden die vollständigen kodierenden Regionen der zu klonierenden Gene mittels Phusion-PCR amplifiziert und die aufgereinigten Amplifikationsprodukte in folgenden *blunt-end* T4-Ligationsansatz eingesetzt:

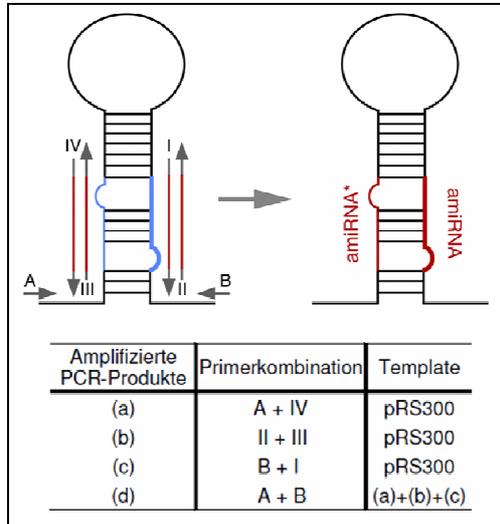
2  $\mu$ l T4-Ligase-Puffer  
2  $\mu$ l 50 % PEG 4000  
1  $\mu$ l T4-Ligase (5 U/ $\mu$ l)  
5-14  $\mu$ l Amplifikationsprodukt (300 ng)  
1  $\mu$ l pGADT7-rec (500 ng)  
ad. 20  $\mu$ l bidest Wasser

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 22°C inkubiert und durch fünfminütige Inkubation bei 70°C abgestoppt. 1-2  $\mu$ l Ligationsansatz wurde für die Transformation in elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt und die Plasmid-DNA positiver Klone mittels Sequenzierung auf die Korrektheit des Inserts geprüft. Abschließend erfolgte die Transformation in den *S. cerevisiae* Stamm Y187.

### 2.5.5 Konstruktion von amiRNAs

Die Auswahl zweier geeigneter amiRNA-Sequenzen für das Gen *AT2G44130* erfolgte nach Angaben von Schwab *et al.* (2006) und unter Anwendung des WMD2 Web MicroRNA Designers (<http://wmd2.weigelworld.org/>). Das Design entsprechender Primer für die Amplifizierung der zwei amiRNA-Vorläufer erfolgte unter Anwendung des „Oligo“-Tools der WMD2 Web MicroRNA Designer Plattform. Die Sequenzen der amiRNAs sowie der Primer sind in Tab. 7.2 aufgeführt. Für die Amplifizierung der amiRNA-Vorläufer wurde zunächst ein endogener Micro-RNA-Vorläufer, dessen Sequenz sich auf dem Plasmid pRS300 (von Prof. Detlef Weigel, MPI für Entwicklungsbiologie Tübingen) befindet, durch die artifiziellen amiRNA-Sequenzen ersetzt (Abb. 2.2). Hierfür wurden in drei einzelnen Phusion-PCRs die Primer A + IV (a), II + III (b) sowie B + I (c) mit einander kombiniert (Schwab *et al.* 2006). Die Primer I bis IV sind spezifisch für das Zielgen. Die Primer A und B flankieren den endogenen Micro-RNA-Vorläufer des Plasmids pRS300, von dem jeweils 1  $\mu$ l (10 ng) als Template in die Phusion-PCRs eingesetzt wurde. Durch kombinierten Einsatz von jeweils 1  $\mu$ l der PCR-Produkte (a), (b) und (c) als Templates in eine abschließende überlappende Phusion-PCR (d) mit den Primern A und B, erfolgte schließlich die Amplifizierung der vollständigen Sequenz des amiRNA-Vorläufers (Abb. 2.2). Diese Sequenz wurde durch BP-Rekombinationsreaktion in den Donor-Vektor pDONR<sup>TM</sup> 221 kloniert und das resultierende Entry-Konstrukt in elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde mittels

Sequenzierung auf die Korrektheit des Inserts geprüft. Um eine Überexpression der amiRNA-Vorläufer in *A. thaliana* zu ermöglichen, wurden die amiRNA-Konstrukte mittels LR-Rekombinationsreaktion in den binären Vektor pGWB2 übertragen. Die Transformation der amiRNA-Konstrukte in *E. coli* DH5 $\alpha$ , *A. tumefaciens* und *A.thaliana* schloss sich an.



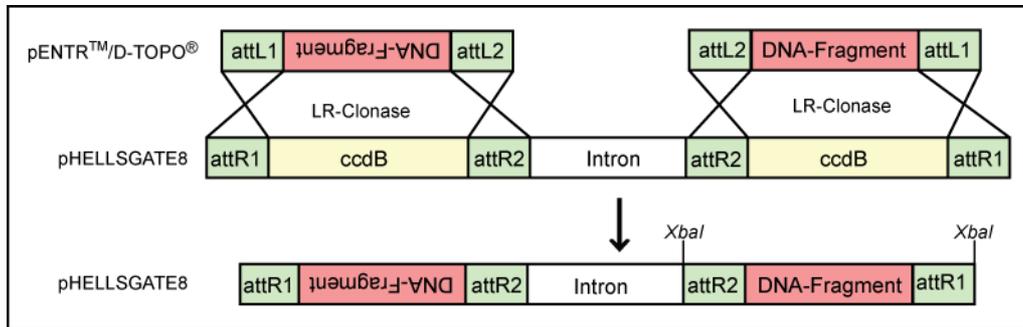
**Abb. 2.2: PCRs und Primer zur Konstruktion von amiRNAs (verändert nach Schwab et al., 2006).** Um die endogenen miRNA und miRNA\* Regionen (blau) des Plasmides pRS300 durch artifizielle Sequenzen (rot) zu ersetzen, wurden zunächst in drei einzelnen PCRs die Primer A + IV (a), II + III (b) sowie B + I (c) mit einander kombiniert. Die Primer I bis IV sind spezifisch für das Zielgen. Die Primer A und B basieren auf Sequenzen des Template-Plasmids pRS300. Durch kombinierten Einsatz der PCR-Produkte (a), (b) und (c) als Templates in eine überlappende PCR (d) mit den Primer A und B, erfolgte schließlich die Amplifizierung der vollständigen Sequenz des amiRNA-Vorläufers.

### 2.5.6 Herstellung von RNAi-Konstrukten

Für die Herstellung zweier RNAi-Konstrukte, die eine Reduktion der Transkriptmengen von *AT2G44130* bewirken sollten, erfolgte zunächst durch Phusion-PCR die Amplifizierung von zwei verschiedenen, ca. 400 Bp großen DNA-Fragmentes des Zielgens. Durch Einsatz spezifischer Primer (Tab. 7.1) wurden die DNA-Fragmente am 3'-Ende mit einem CACC-Überhang versehen. Als Template für die Phusion-PCR diente hochmolekulare genomische Col-0 DNA. Die aufgereinigten Amplifikationsprodukte wurden durch gerichtete Klonierung zunächst in den Vektor pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Anschließend erfolgte die Übertragung der DNA-Fragmente in den Vektor pHELLSGATE8 (vom CSIRO Division of Plant Industry; Helliwell & Waterhouse 2005) mittels LR-Rekombinationsreaktion. Die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  schloss sich an. Während der homologen Rekombination der DNA-Fragmente in den pHELLSGATE8-Vektor kann es vorkommen, dass das 800 Bp große Intron, welches später *Sense*- und *Antisense*-Strang der DNA-Fragmente miteinander verbindet (Abb. 2.3), seine Orientierung wechselt. Um Klone zu identifizieren in denen das Intron in der korrekten Orientierung vorliegt, wurde eine *Xba*I-Restriktion durchgeführt. Je nach Orientierung des Introns waren Fragmente detektierbar, die einen Größenunterschied von ca. 800 Bp aufwiesen. Folgender Restriktionsansatz wurde gewählt:

4  $\mu$ l 10 $\times$  Fast-Digest-Buffer  
 3  $\mu$ l Plasmid-DNA (1,5  $\mu$ g)  
 2  $\mu$ l *Xba*I Fast-Digest  
 30  $\mu$ l bidest Wasser

Der Restriktionsansatz wurde 7 min bei 37°C inkubiert und durch zwanzigminütige Inkubation bei 65°C abgestoppt. Konstrukte mit korrekt ausgerichtetem Intron wurden für die Transformation in *A. tumefaciens* und schließlich in *A. thaliana* verwendet.



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der LR-Rekombinationsreaktion zwischen dem Entry-Konstrukt in pENTR™/D-TOPO® und dem Destination-Vektor pHELLSGATE8.** Durch entgegengesetzte Anordnung der attR-sites im Vektor pHELLSGATE8 wird die Insertion der DNA-Fragmente in Sense- und Antisense-Ausrichtung ermöglicht. Die korrekte Orientierung des Introns wird durch den Restriktionsverdau mit XbaI nachgewiesen. Durch den XbaI-Verdau von Plasmiden mit falsch ausgerichtetem Intron entsteht ein 800 Bp größeres Fragment gegenüber Plasmiden mit korrekt orientiertem Intron.

## 2.6 RNA-Analytik

### 2.6.1 RNA-Isolierung aus *A. thaliana*

Die Isolierung von RNA aus Keimlingen, Blätter, Blüten, Knospen und Stängeln von *A. thaliana* erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Qiagen RNeasy Plant Mini Kit einschließlich DNaseI-Behandlung mit dem QIAGEN® RNase-Free DNase Set.

Die Isolierung von RNA aus Keimlingswurzeln von *A. thaliana* erfolgte am effizientesten unter Verwendung des Spectrum™ Plant Total RNA Kit von Sigma-Aldrich® einschließlich DNaseI-Behandlung mit dem QIAGEN® RNase-Free DNase Set. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### 2.6.1.1 RNA-Isolierung aus Schoten

Schoten weisen hohe Gehalte an Polysacchariden und anderen Verbindungen auf, die während der Isolierung von RNA mit konventionellen Methoden nicht entfernt werden können und somit zur Verunreinigung der RNA-Probe führen. Um dies zu vermeiden, erfolgte die Isolierung von RNA aus Schoten in abgeänderter Form nach dem Protokoll von Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa (2008). Das in flüssigem Stickstoff gemörserte Pflanzenmaterial wurde in 2 ml Extraktionspuffer (0,4 M LiCl; 0,2 M Tris pH 8,0; 25 mM EDTA; 1 % SDS) aufgenommen und nach Zugabe von 2 ml Chloroform gründlich durchmischt und für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 2 ml wassergesättigtem, saurem Phenol sowie 800 µl Chloroform versetzt und 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, mit einem Drittel des Volumens (ca. 800-900 µl) 8 M LiCl versehen, und die RNA über Nacht bei 4°C präzipitiert. Am Folgetag wurde der Ansatz 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 28 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) und 1 ml 96 %igen Ethanol sowie

einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C wurden Kohlenhydrate aus dem Ansatz entfernt. Der Überstand wurde mit 172 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) und 3 ml 96 %igen Ethanol versetzt und 2 h bei -20° C inkubiert. Nach 25-minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde schließlich in 40 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Im Anschluss wurde die so isolierte RNA einer weiteren Aufreinigung mit dem Qiagen RNeasy Plant Mini Kit einschließlich *DNaseI*-Behandlung mit dem QIAGEN® RNase-Free DNase Set unterzogen.

### 2.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 2 µg RNA in 13 µl RNA-Denaturierungspuffer (10 mM Natriumphosphat pH 6,5; 50 % (v/v) Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 10 mM EDTA pH 8,0) für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend mit 5 µl Ladebuffer (0,5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) Glycerin; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5 g/ml Ethidiumbromid) versehen und auf ein 1,7 %iges (w/v) denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 20 min bei 100 mA. Für die Herstellung des denaturierenden Gels wurden 2,5 g Agarose in 25 ml 10×MOPS-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; eingestellt auf pH 7,0) und 112,5 ml bidest Wasser durch Aufkochen gelöst und nach leichtem Abkühlen mit 12,5 ml Formaldehyd versehen. Als Laufpuffer diente 1×MOPS-Puffer.

### 2.6.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA durch reverse Transkription wurden in der Regel 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt und diese, entsprechend den Herstellerangaben, mit dem Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80°C.

### 2.6.4 quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Transkriptmenge von Genen erfolgte mittels qRT-PCR unter Verwendung des folgenden PCR-Ansatzes:

5 µl 5× Power SYBR-Green Mastermix (Applied Biosystems)  
4 µl Gemisch aus *Forward*- und *Reverse*-Primer (je 0,25 µM)  
1 µl cDNA (20 ng)

Die für die qRT-PCRs verwendeten Primer sind in Tab. 7.1 zusammengefasst. Das allgemeine thermische Profil für die qRT-PCR ist in Tab. 2.5 dargestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach Ablauf der Annealingzeit. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit dem Gerät Stratagene Mx3005P™ (Stratagene), die Auswertung der Daten mit der MxPro Software (Stratagene). Als *threshold fluorescence* wurde die Einstellung *background based* gewählt, die Daten exportiert und anschließend der *comparative expressions level* ( $2^{\Delta C_t}$ ) ermittelt. Zur Bestimmung des  $\Delta C_t$ -Wertes wurde als Referenzgen *PP2A* (*AT1G13320*) verwendet, das in *A. thaliana* für eine Phosphatase-Untereinheit kodiert und dessen Expression äußerst stabil ist (Czechowski *et al.* 2005). Unter der

Annahme, dass in jedem Zyklus der PCR eine Verdopplung der cDNA-Menge erfolgt, wird der  $2^{\Delta Ct}$ -Wert berechnet, der schließlich die relativen Transkriptmengen des Gens von Interesse im Verhältnis zum Referenzgen widerspiegelt.

**Tab. 2.5: Allgemeines thermisches Profil für die qRT-PCR.**

Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
1	95 °C	10 min
45	95 °C	30 sek
	$T_m$ (Primer) – 1 °C	30 sek
	72 °C	1 min/kb
1	95 °C	1 min
	$T_m$ (Primer) – 1 °C	30 sek
	95 °C	30 sek

### 2.6.5 Micro-Array-Analysen

Für die Micro-Array-Analysen wurde zum einen RNA aus Blüten von adulten Pflanzen im Blühstadium 15 (Alvarez-Buylla *et al.* 2010) isoliert, die unter Langtagbedingungen im Phytoschrank angezogen wurden. Zum anderen erfolgte die Isolierung von RNA aus neun Tage alten Keimlingen, die unter Langtagbedingungen auf ATS-Agar-Platten angezogen wurden. Die RNA wurde mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Intaktheit überprüft. Anschließend wurden 2 µg RNA in 10 µl bidest Wasser zum NASC International Affymetrix Service (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) versandt, wo die Hybridisierung auf den Affymetrix ATH1 GeneChip erfolgte. Die Auswertung der Micro-Array-Daten erfolgte mit dem Programm ArrayStar<sup>®</sup> der Firma DNASTAR. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Arrays herzustellen wurde das Robust Multi-array Average (RMA)-Verfahren mit Quantilnormalisierung angewendet. Die Selektion differentiell exprimierter Gene erfolgt mittels eines moderaten T-Tests. Die notwendige Korrektur der p-Werte aufgrund multiplen Testens wurde mittels eines Benjamini-Hochberg-Tests durchgeführt.

## 2.7 Yeast-two-Hybrid-System

### 2.7.1 Nachweis der Interaktion von FBKs und ASKs

Der Nachweis der Interaktion von ASK- und FBK-Proteinen erfolgte unter Verwendung einer *Yeast-two-Hybrid*-Methode, die auf dem GAL4-Reportersystem beruht (Fields & Song 1989). Der GAL4-Transkriptionsfaktor besteht natürlicherweise aus zwei Proteindomänen: einer DNA-Bindedomäne (GAL4-BD), über die der Transkriptionsfaktor an die GAL4-Bindestelle vor einem Reportergen im Hefegenom bindet, sowie einer Aktivierungsdomäne (GAL4-AD), über die die Rekrutierung der RNA-Polymerase erfolgt. Im hier durchgeführten *Yeast-two-Hybrid*-System wurden die beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors als Fusionsproteine ASK-Gal4-BD sowie FBK-Gal4-AD zusammen in einen Hefestamm exprimiert. Findet eine Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen statt, gelangen auch GAL4-AD und GAL4-BD in räumliche Nähe, so dass der

GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstruiert und die Transkription der nachgeschalteten Reportergene induziert wird.

Für die Erzeugung der FBK-Gal4-AD-Konstrukte wurden die vollständigen kodierenden Sequenzen der *FBKs* mittels Gateway-Klonierung in den Gateway-kompatiblen Vektor pGADT7 kloniert und das resultierende Konstrukt in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 (Paarungstyp „a“) von Clontech transformiert. Die fertigen ASK-Gal4-BD-Konstrukte im Expressionsvektor pGBKT7 (Clontech) wurden von der Kagawa-Universität in Japan (ASK4, 5, 7, 8, 19, 20A, 20B, 21) bzw. dem RIKEN Yokohama Institute (ASK1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17) zur Verfügung gestellt und während dieser Arbeit in den *S. cerevisiae*-Stamm Y187 (Paarungstyp „a“) von Clontech transformiert. Für den Interaktionsnachweis wurde jeweils einer der transgenen AH109-Stämme mit einem der transgenen Y187-Stämme gepaart, indem beide Stämme zusammen in 500 µl YPDA-Flüssigmedium für 15 bis 16 h bei 30°C und 120 rpm schüttelnd inkubiert wurden. Jeweils 80 µl der Paarungskultur wurden auf Y-SD-Agar-Medium (-Leu, -Trp) ausplattiert und angezogen. Einzelkolonien wurden gepickt, mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit der *ASK-Gal4-BD*- und *FBK-Gal4-AD*-Konstrukte überprüft und anschließend in Y-SD-Flüssigmedium (-Leu, -Trp) über Nacht vermehrt. Am Folgetag wurden 30 µl einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung auf Kontrollmedium (Y-SD/-Leu, -Trp) bzw. Selektivmedium (Y-SD/-Leu, -Trp, -His, -Ade) ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum von Kolonien auf selektivem Medium spiegelte die positive Interaktion der getesteten Proteine wieder.

### 2.7.2 *Yeast-two-Hybrid-Screen gegen eine cDNA-Bibliothek*

Um unbekannte Interaktoren von FBKs zu identifizieren, wurde ein *Yeast-two-Hybrid-Screen* gegen eine cDNA-Bibliothek von *A. thaliana* durchgeführt. Die von Clontech erworbene normalisierte cDNA-Bibliothek stellt eine repräsentative Mischung aller cDNAs aus elf *A. thaliana*-Gewebe dar, die jeweils an die GAL4-AD fusioniert sind. Die Klonierung der cDNA-Bibliothek erfolgte durch Clontech in den Vektor pGADT7-rec und die Expression im Hefestamm Y187. Das als *Bait* verwendete FBK-Protein wurde als *FBK-Gal4-BD*-Konstrukt im Vektor pGBKT7 (Clontech) kloniert und vom Hefestamm Y2HGold (Clontech) exprimiert. Die Durchführung des *Yeast-two-Hybrid-Screens* erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid Systems von Clontech. Aus Hefeklonen, die aufgrund ihres Wachstums auf selektivem Medium auf eine positive Interaktion schließen ließen, erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA und deren anschließende Sequenzierung mit dem Vektor-spezifischen Primer T7. Durch Nutzung der BLAST-Funktion von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnte ermittelt werden, von welchem Gen das mit dem FBK interagierende Protein kodiert wird. Um die Interaktion der im *Yeast-two-Hybrid-Screen* identifizierten potentiellen Interaktoren mit dem FBK-Protein zu verifizieren, wurden die Kandidatengene in pGBKT7 kloniert und im Hefestamm Y2HGold als BD-Fusion exprimiert. Im Gegensatz dazu, erfolgte die Expression der FBKs als AD-Fusion im Hefestamm Y187. Für den Interaktionsnachweis wurde jeweils einer der transgenen Y2HGold-Stämme mit einem der transgenen

Y187-Stämme, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, gepaart. Je eine gewachsene Kolonie wurde anschließend in Y-SD-Flüssigmedium (-Leu, -Trp) über Nacht vermehrt. Am Folgetag wurden 10 µl einer 1:10 Verdünnung auf Kontrollmedium (Y-SD/-Leu, -Trp) bzw. X-Gal haltigem Medium (Y-SD/-Leu, -Trp, +X-Gal) aufgetropft und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum von blauen Kolonien auf X-Gal haltigem Medium spiegelte die positive Interaktion der getesteten Proteine wieder.

### **2.8 Histochemischer Nachweis der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität *in planta***

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde direkt nach der Ernte vollständig mit GUS-Färbelösung (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 7,0; 5 mM Ferricyanid; 0,5 mM Ferrocyanid; 2 mM X-Gluc; 0,1 % (v/v) Triton X-100) bedeckt, 5 min vakuumfiltriert und 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Pflanzenmaterial bis zur Entfernung sämtlicher Pflanzenfarbstoffe mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Betrachtung und Dokumentation des gefärbten Pflanzenmaterials erfolgt am Stereomikroskop (Olympus SZX16) in Verbindung mit der Digitalkamera ColorView Illu und dem Dokumentationsprogramm cell<sup>^</sup>D der Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

### **2.9 Phänotypische Charakterisierungen**

#### **2.9.1 Bestimmung der Keimungsrate**

Zur Bestimmung der Keimungsrate von *A. thaliana*-Samen, wurde das Saatgut oberflächensterilisiert und anschließend jeweils 100 Samen auf ATS-Agar-Medium ausgelegt. Die Samen wurden für drei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und schließlich unter Langtagbedingungen im Phytoschrank inkubiert. Nach 0, 6, 9, 12, 20, 24, 28 und 36 h wurde unter dem Stereomikroskop die Anzahl an gekeimten Samen ausgezählt. Samen galten als gekeimt, sobald die Samenschale aufgebrochen war. Für jede der getesteten Pflanzenlinien wurde die Keimungsrate von vier unabhängigen Saatgutbatches ermittelt.

#### **2.9.2 Untersuchung von Primärwurzel- und Hypokotylllänge**

Zur Messung von Wurzel- und Hypokotylllänge wurde Saatgut der zu analysierenden Linien oberflächensterilisiert, für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und auf ATS-Agar-Medium ausgelegt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte zunächst für fünf Tage unter Langtagbedingungen im Phytoschrank. Anschließend wurden die Keimlinge auf neue ATS-Agar-Platten transferiert. Um den Einfluss verschiedener Phytohormone, Elicitoren und abiotischer Stressoren (osmotischer Stress, oxidativer Stress) auf das Wurzel- bzw. Hypokotylwachstum zu untersuchen, erfolgte der Transfer der fünf Tage alten Keimlinge auf ATS-Agar-Platten, die mit entsprechenden Zusätzen versehen wurden. Nach weiteren drei Tagen im Langtag wurden die Keimlinge fotografiert. Wurzel- und Hypokotyllängen wurden mit dem Programm RootDetection (<http://www.labutils.de/>) gemessen.

### 2.9.3 Frischgewichtbestimmung nach elf18-Behandlung

Um den Einfluss des exogenen Elicitors elf18 (von Dr. Justin Lee, IPB Halle) auf das Frischgewicht von *A. thaliana* Keimlingen zu untersuchen, wurde Saatgut der zu analysierenden Pflanzenlinien oberflächensterilisiert, für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und auf ATS-Agar-Medium ausgelegt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte zunächst für fünf Tage unter Langtagbedingungen im Phytoschrank. Anschließend wurden die Keimlinge in 48-Well-Platten überführt und in je 1 ml flüssigem ATS-Medium inklusive elf18 aufgenommen. Nach einer weiteren elftägigen Kultivierung der Keimlinge unter Langtagbedingungen im Phytoschrank wurde das Frischgewicht jedes Keimlings bestimmt.

### 2.9.4 Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach flg22-Behandlung

Die Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *A. thaliana* nach Behandlung mit dem Elicitor flg22 erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Trujillo (IPB Halle). Pflanzen wurden für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und aus den Rosettenblättern Blattscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden mit Wasser geflutet und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Wasser durch eine wässrige Luminol-Lösung (30 µg/ml Luminol, 20 µg/ml Peroxidase) ersetzt und der Reaktionsansatz 20 min inkubiert. Nach der Zugabe von 100 nM flg22 erfolgte die Messung der Lumineszenz mittels eines Luminometers.

### 2.9.5 Bestimmung von Glukosinolatgehalten

Die Messung von Glukosinolatgehalten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Douglas Grubb (IPB Halle). Hierfür wurde Saatgut der zu analysierenden Pflanzenlinien oberflächensterilisiert, für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und auf ½-Murashige-Skoog-Medium (Murashige und Skoog, 1962) ausgelegt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage unter Langtagbedingungen im Phytoschrank. Die anschließende Glukosinolatextraktion erfolgte in 96-Well-Platten aus den oberirdischen Pflanzenorganen einzelner Keimlinge.

Die Keimlinge wurden zunächst im Homogenisator aufgeschlossen, mit 600 µl 80 % (v/v) Methanol, inklusive 20 ng/ml des internen Standards Sinigrin, versehen, 1 h schwenkend inkubiert und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Zwischenzeitlich erfolgte die Vorbereitung der 96-Well Multi Screen Filterplatte (Millipore). Die Platte wurde mit je 200 µl DEAE Sephadex<sup>TM</sup> A-25 (GE Healthcare) pro Well beladen, 5 min inkubiert, 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In zwei aufeinanderfolgenden Schritten wurden zweimal 200 µl des aufgeschlossenen Pflanzenmaterials auf die Sephadex-Säule gegeben, 5 min inkubiert, bei 1000 rpm für 4 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nachfolgend wurde die Säule zweimal mit je 200 µl 80 % (v/v) Methanol versehen, jeweils 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zwei Waschschrte mit je 200 µl bidest Wasser schlossen sich an. Auf die Säule wurden schließlich 150 µl einer 1:7,5 in Wasser gelösten Sulphatase-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht im Dunkeln inkubiert. Durch abschließendes vierminütiges Zentrifugieren bei 1000 rpm

erfolgte die Elution der Glukosinolate. Die Messung der Glukosinolatgehalte erfolgte mittels Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) unter Verwendung des Acquity UPLC Systems der Firma Waters (Säule: HSS T3 C18 1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1  $\times$  100 mm; Lösungsmittel: Wasser (A), Acetonitril (B) Gradient: 1 % B 0,6 min, 20 % B 4 min, 20 % B 6 min, 100 % B 6,5 min, 100 % B 8 min; Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min bei 40°C). Die Detektierung der Glukosinolate erfolgte mittels eines Diodenarray-Detektors bei den Wellenlängen 226 nm und 280 nm. Die Retentionszeiten und die UV-Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte wurden mit denen des Standards Sinigrin verglichen.

### 2.9.6 Infektionsversuche mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

Für die Infektion mit *P. syringae* wurden fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen verwendet, die unter Kurztagbedingungen in einer Phytokammer angezogen wurden. Der verwendete *P. syringae* Stamm DC3000 wurde zunächst auf Platte angezogen. Anschließend wurden die Bakterien mit Wasser von der Platte geschwemmt, eine Bakteriensuspension mit der Konzentration  $5 \cdot 10^8$  cfu/ml hergestellt und diese mit 0,04 % (v/v) Silvett L-77 versehen. Mittels eines Zerstäubers wurden die Ober- und Unterseiten der Rosettenblätter mit der Bakteriensuspension besprüht. Gut gewässert und mit einem Deckel versehen erfolgte die Inkubation der Pflanzen für 3 h im Labor bzw. für 5 Tage unter Langtagbedingungen in der Phytokammer. Drei Stunden bzw. drei Tage nach der Infektion wurden pro Pflanzenlinie je zwölf Blätter von unterschiedlichen Pflanzen mit dem Skalpell abgeschnitten, 25 sek in 70 % (v/v) Ethanol sowie 30 sek in Wasser inkubiert und Blattscheiben mit 1 cm Durchmesser ausgestanzt. Je vier Blattscheiben wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und ergaben ein biologisches Replikat. Das Blattmaterial wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Wasser versehen, mit dem Homogenisator aufgeschlossen und auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit Wasser aufgefüllt. Zur Bestimmung der Bakterienzahl 3 h nach der Infektion wurden je 50  $\mu\text{l}$  des aufgeschlossenen Pflanzenmaterials auf selektives LB-Agar-Medium inklusive 50  $\mu\text{g/ml}$  Rifampicin und 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin ausplattiert und nach zweitägiger Inkubation bei 28°C die Anzahl gewachsener Kolonien ermittelt. Um das Bakterienwachstum drei Tage nach der Infektion zu ermitteln, wurden je 15  $\mu\text{l}$  einer  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  Verdünnung des aufgeschlossenen Pflanzenmaterials auf selektives LB-Agar Medium aufgetropft. Verdünnungen, die nach zweitägiger Inkubation Einzelkolonien aufwiesen, wurden ausgezählt.

### 2.9.7 Infektionsversuche mit *B. cinerea*

Für die Infektion mit *B. cinerea* wurden fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen verwendet, die unter Kurztagbedingungen in einer Phytokammer angezogen wurden. Nach Anzucht des Pilzes für 10 Tage auf PDA-Platten und anschließender Sporengewinnung (siehe Abschnitt 2.3.4), wurde mit Gamborg B5-Medium und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer eine Sporensuspension der Konzentration  $1 \cdot 10^6$  Sporen/ml hergestellt. Die Sporensuspension wurde mit 10 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (pH 6,4) versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Je 10  $\mu\text{l}$  der Sporensuspension wurden anschließend auf die Oberseite eines Blattes appliziert. Kontrollpflanzen wurden mit Gamborg B5-Medium inklusive 10 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (pH 6,4) anstelle der Sporensuspension behandelt. Gut gewässert und mit

einem Deckel versehen erfolgte die Inkubation aller Pflanzen für sechs Tage unter Langtagbedingungen in der Phytokammer. Abschließend wurden die behandelten Blätter fotografiert und die Blattfläche, auf der Symptome einer Infektion sichtbar waren, mit dem Programm ImageJ 1.44p ausgemessen.

## 2.10 Homologie-basierte Modellierung von Proteinstrukturen

Die Erstellung der Proteinmodelle erfolgte mit dem Programm PHYRE2 (Kelley & Sternberg 2009). Die als Templates fungierenden Proteinstrukturen, die die Basis für die Modellierung darstellen, sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst und entstammen der PDB-Datenbank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org); Bernstein *et al.* 1977). Hier angegeben ist auch die Anzahl an Aminosäuren, deren Position *ab initio* berechnet wurde, d.h. deren Positionierung nicht auf einem oder mehreren zugrunde liegenden Templates beruht, sondern anhand energetischer Berechnungen ermittelt wurde. Die Bewertung der erstellten Strukturmodelle erfolgte mit PROSAIL (Sippl 1993). Die Vorhersage der Sekundärstrukturen erfolgte mit PSIPRED (Version 3.0; Buchan *et al.* 2010).

## 2.11 Phylogenetische Analysen

### 2.11.1 Identifizierung von FBKs in verschiedenen pflanzlichen Genomen

Die Identifizierung von FBKs in den verschiedenen Pflanzengenomen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Aura Navarro-Quezada (Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB Halle). Die verwendeten Sequenzinformationen zu cDNAs und Proteinen der analysierten pflanzlichen Spezies entsprechen dem Stand vom März 2009 und wurden von folgenden Quellen heruntergeladen:

**Tab. 2.6: Quellen zu den analysierten pflanzlichen Genomen.**

Genom	Quelle
<i>A. thaliana</i>	TAIR ( <a href="ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair">ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair</a> , <a href="http://arabi_cds_v.090704">arabi_cds_v.090704</a> )
<i>P. trichocarpa</i>	Joint Genome Institute (Version 1.1, <a href="http://www.jgi.doe.gov/">http://www.jgi.doe.gov/</a> )
<i>V. vinifera</i>	Genoscope (Version 1, <a href="http://www.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/">http://www.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/</a> )
<i>O. sativa</i>	The Rice Genome Annotation Project ( <a href="http://osjaponica_cds300503">Osjaponica_cds300503</a> ; <a href="ftp://ftp.plantbiology.msu.edu/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs">ftp://ftp.plantbiology.msu.edu/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs</a> )
<i>S. bicolor</i>	Munich Information Center for Protein Sequences (Version 1.4; <a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/sorghum">http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/sorghum</a> )
<i>P. patens</i>	Joint Genome Institute (Version 1.1, <a href="http://www.jgi.doe.gov/">http://www.jgi.doe.gov/</a> )
<i>S. moellendorffii</i>	Joint Genome Institute (gefiltertes Model 3, <a href="http://www.jgi.doe.gov/">http://www.jgi.doe.gov/</a> )
<i>C. reinhardtii</i>	Joint Genome Institute (Version 1.1, <a href="http://www.jgi.doe.gov/">http://www.jgi.doe.gov/</a> )

Publizierte FBK-Proteinsequenzen (Gagne *et al.* 2002; Yang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009) wurden zunächst als Ausgangssequenzen verwendet, um mittels BLASTP und TBLASTN (Altschul *et al.* 1997) nach weiteren FBKs zu suchen. Alignments von putativen FBK-Sequenzen wurden mit ClustalX (Thompson *et al.* 2002) durchgeführt und anschließend manuell editiert. Für jedes der Sequenzmotive von Interesse wurde unter Verwendung des Weblogo Software Paketes (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) eine Konsensussequenz erstellt, mit deren Hilfe in einer BLAST-Suche weitere FBKs in pflanzlichen Genomen identifiziert werden konnten. Die so

identifizierten potentiellen FBKs wurden zusammen mit den bereits bekannten Sequenzen erneut zueinander ausgerichtet, um anschließend mit dem Programm Hmmbuild von der HMMER-Plattform (Eddy 1998) ein Hidden-Markow-Model (HMM) zu erstellen. Implementiert im Programm Hmmsearch wurde das HMM für eine erneute Suche nach FBKs in den sieben Genomen angewendet. Um die Anwesenheit von F-Box und Kelch-Domäne in den identifizierten Proteinsequenzen zu bestätigen, erfolgte ein Abgleich mit der Pfam-Datenbank (Finn *et al.* 2009) unter Anwendung des Hmmpfam-Paketes. Die Domänen von Interesse sind in Pfam wie folgt annotiert: PF00646 (F-Box), PF01344 (*Kelch domain 1*) und PF07646 (*Kelch domain 2*). Ausschließlich Sequenzen, die sowohl eine F-Box als auch ein oder mehrere der Kelch-Motive aufwiesen, wurden in nachfolgende Analysen eingeschlossen.

### **2.11.2 Konstruktion von F-Box- und Kelch-Konsensussequenzen**

Um die Konsensussequenz für die F-Box und das Kelch 2-Motiv zu erstellen, wurden die vollständigen Proteinsequenzen aller FBKs der sieben Pflanzenspezies mittels CLustalX (Thompson *et al.* 2002) ausgerichtet und das Alignment manuell editiert. Für die Konsensussequenzen der Motive Kelch 1, Kelch 3, Kelch 4 und Kelch 5 wurden nur solche FBK-Sequenzen zueinander ausgerichtet, die auch tatsächlich die entsprechenden Repeats aufwiesen. Lücken im Alignment wurden entfernt, sofern mehr als 75 % der Sequenzen eine Lücke an der entsprechenden Position aufwiesen. Die Position von F-Box und Kelch-Domänen wurden anhand der Pfam-Datenbank ermittelt.

### **2.11.3 Konstruktion phylogenetischer Bäume**

Alle identifizierten und bestätigten FBKs, einschließlich der Proteinsequenzen, die als Außengruppe dienten, wurden mit dem Programm Hmalign ausgerichtet und für die Konstruktion eines Neighbour Joining (NJ) Baumes verwendet. Die Konstruktion des phylogenetischen Baumes erfolgte in PHYLIP (Bootstrap 100, seqboot; Felsenstein 1989). Um die Robustheit des NJ-Baumes zu bestätigen, wurden zum Vergleich zusätzliche Phylogenien konstruiert, die repräsentative Sequenzen aus jeder der definierten Kladen des NJ-Baumes enthalten. Die Konstruktion dieser repräsentativen Bäume erfolgte mit der NJ-Methode, der Maximum Likelihood Methode (PHYLIP; Bootstrap = 100, amino acid substitution model, Jones-Taylor-Thornton Matrix), sowie dem Programms MrBayes 3.1.2. Um die Topologie der Bäume zu vergleichen, wurde ihre statistische Wahrscheinlichkeit mit einem Test von Shimodaira und Hasegawa (1999) bzw. von Kishino & Hasegawa (1989) berechnet und P-Werte mit einem Chi-Quadrat-Test (Strimmer & Rambaut 2002) ermittelt. Die Konstruktion der phylogenetischen Bäume erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Aura Navarro-Quezada (Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB Halle).

### **2.11.4 Vergleiche von Kelch-Repeats innerhalb und zwischen Proteinen**

Die vergleichende Analyse von Kelch-Repeats innerhalb und zwischen Proteinen erfolgte in Zusammenarbeit mit Carsten Kuhl (Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB Halle).

Die genetischen Abstände zwischen verschiedenen Kelch-Motiven innerhalb eines Proteins sowie zwischen unterschiedlichen Proteinen wurden mit der ProtDist-Funktion der PHYLIP-Plattform (Felsenstein 1989) berechnet. Um zu ermitteln, ob die Ähnlichkeit der Kelch-Motive innerhalb eines Proteins signifikant geringer ist als zwischen Proteinen, wurde die Test-Statistik  $d$  mittels eines Permutationstests mit einer Millionen Wiederholungen ermittelt. Die Test-Statistik  $d$  wurde wie folgt definiert:  $d = \text{Mittelwert (simKwP)} - \text{Mittelwert (simKbP)}$ , wobei simKwP für die Ähnlichkeit von Kelch-Motiven innerhalb eines Proteins steht und simKbP für die Ähnlichkeit von Kelch-Motiven zwischen verschiedenen Proteinen. Eine zunehmende Ähnlichkeit ist gekennzeichnet durch einen abnehmenden simKxP-Wert. Somit deutet ein Wert von  $d > 0$  darauf hin, dass die Ähnlichkeit von Kelch-Motiven innerhalb eines Proteins geringer ist als die Ähnlichkeit von Kelch-Motiven an der gleichen Position verschiedener Proteine. Alle Berechnungen wurden in R (Version 2.10.0; R Core Team 2012) durchgeführt.

### 2.11.5 Bestimmung der Anzahl gewonnener und verlorengangener FBKs

Um zu untersuchen wie sich die Anzahl an FBKs in den verschiedenen Pflanzenspezies über die Zeit verändert hat, wurde der NJ-Baum in 40 phylogenetische Kladen unterteilt und die Anzahl neu entstandener und verlorengangener FBKs für jede Klade ausgezählt. Es wurde angenommen, dass sich die Anzahl an FBKs, die bereits im ältesten gemeinsamen Vorfahren aller sieben Landpflanzenspezies (N1) präsent waren, aus der Anzahl an Kladen ergibt, die sowohl orthologe FBKs in niederen Landpflanzen als auch in Angiospermen aufweisen. FBKs in artspezifischen Kladen hingegen weisen keinerlei Orthologe in anderen Spezies auf und sind daher vermutlich erst in den einzelnen Landpflanzenspezies entstanden. Die Anzahl der FBKs an den Knotenpunkten (N2, N3, N4) ergab sich aus der minimalen Anzahl gemeinsamer Orthologen innerhalb einer Klade, die in allen Spezies der betrachteten Landpflanzengruppe vorkommen. Fehlt eine Spezies, wurde angenommen, dass Gene verloren gegangen sind. Übersteigt die Anzahl der FBKs einer Spezies die minimale Anzahl gemeinsamer Orthologe, wurde angenommen, dass Gene neu entstanden sind.

### 2.11.6 Berechnung von Sequenzunterschieden und *Sliding-Window*-Analysen

Um den Konservierungsgrad zwischen Sequenzen zu ermitteln und für die sich anschließende *Sliding-Window*-Analyse, wurde das Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutationen ( $K_a/K_s$ -Wert) berechnet. Hierfür wurden partielle Proteinsequenzen (F-Box- und Kelch-Domäne) aller *A. thaliana* und *A. lyrata* (Joint Genome Institute; genome.jgi-psf.org/Araly1) FBKs mit ClustalX zueinander ausgerichtet, ein NJ-Baum konstruiert und *Sliding-Window*-Paare definiert. Ein *Sliding-Window*-Paar besteht aus einem *A. thaliana*-FBK, das innerhalb des NJ-Baums eine Subklade mit genau einem orthologen *A. lyrata*-FBK bildet. Jedes *Sliding-Window*-Paar wurde erneut paarweise ausgerichtet und unter Verwendung des Programmes PAL2NAL (Suyama *et al.* 2006) einem Codon-Alignment unterzogen. Mittels DnaSP 5.0 (Librado & Rozas 2009) wurden die  $K_a/K_s$ -Werte berechnet. Die *Sliding-Window*-Plots wurden mit der *Sliding-Window*-Option (*Window size*: 150 bp;

*Step size*: 9 bp) von DnaSP 5.0 erstellt. Die *Sliding-Window*-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Kristian Ullrich (Abt. Molekulare Signalverarbeitung, IPB Halle) und Dr. Aura Navarro-Quezada (Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB Halle).

### **2.11.7 Korrelationsanalyse von Expressionsdaten**

Zur Erstellung des Dendrogramms für die Cluster-Analysen der Expressionsdaten, wurde das R-Paket pvclust (Suzuki & Shimodaira 2006) verwendet. Die Expressionsdaten der *A. thaliana*-FBKs entstammen der *AtGenExpress\_Extended tissue series* (Schmid *et al.* 2005). Nur 81 der 103 *A. thaliana* FBKs waren auf dem ATH1-Micro-Array repräsentiert. In pvclust wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt, indem die Pearson-Korrelation zur Bestimmung der Ähnlichkeit ( $\text{dist} = 1 - \text{cor}[x,y]$ ) zwischen den Expressionswerten der Gene sowie die UPGMA-Methode für das anschließende Clustering verwendet wurde. Um die Stabilität des Dendrogramms zu berechnen, wurden eine Bootstap-Analyse mit 1000 Wiederholungen durchgeführt. Die Korrelationsanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Carsten Kuhl (Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, IPB Halle).

### 3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse umfassen die phylogenetische Charakterisierung von F-Box-Proteinen mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne (FBKs) in sieben Landpflanzenspezies und der Grünalge *C. reinhardtii* (Abschnitt 3.1) sowie die molekulare und funktionelle Analyse von vier evolutionär konservierten *FBKs* aus *A. thaliana* (Abschnitt 3.2).

#### 3.1 Phylogenetische Analyse von FBKs in Landpflanzen

Um mehr darüber zu erfahren, wie FBPs evolviert sind und welchen Selektionsmechanismen sie unterliegen, wurde die FBK-Subfamilie beispielhaft zur Durchführung phylogenetischer Analysen und populationsgenetischer Studien herangezogen.

Die Suche nach FBKs in den vollständig sequenzierten und annotierten Genomen der Eudikotyledonen *A. thaliana* (*At*), *P. trichocarpa* (*Pt*) und *V. vinifera* (*Vv*), der Monokotyledonen *O. sativa* (*Os*) und *S. bicolor* (*Sb*), des Lycophyten *S. moellendorffii* (*Sm*) sowie des Bryophyten *P. patens* (*Pp*) führte zur *de novo* Identifizierung zahlreicher neuer FBKs. Die sich anschließende Konstruktion phylogenetischer Bäume lieferte Informationen darüber, welche evolutionären Mechanismen zur Entstehung und Ausbreitung der FBKs in den verschiedenen Landpflanzenspezies beigetragen haben. Mit besonderem Fokus auf die FBKs von *At*, gaben Berechnungen von Sequenzdiversitäten zudem Auskunft über charakteristische Selektionsmuster. Abschließend wurden die phylogenetischen Betrachtungen durch molekulare Analysen einer ausgewählten Klade von *At*-Genen ergänzt. Die hier eingeschlossenen Studien zur Genexpression, Protein-Protein-Interaktion sowie zur subzellulären Lokalisation ließen Schlussfolgerungen über mögliche Subfunktionalisierungen eng verwandter *AtFBKs* zu.

##### 3.1.1 *De novo* Identifizierung von FBKs in sieben Landpflanzenspezies

Um neue FBKs in *At*, *Pt* und *Os* zu identifizieren, wurde zunächst eine BLASTP-Suche durchgeführt. Als Ausgangssequenzen für diese Suche dienten artspezifische Konsensussequenzen, die von den Volllänge-Proteinsequenzen bereits publizierter FBKs abgeleitet wurden (Gagné *et al.* 2002; Jain *et al.* 2007; Xu *et al.* 2009). Zusätzlich konnten mit einer HMM-basierten Suche auch weniger konservierte FBKs in den zuvor genannten Spezies identifiziert werden. Dies ermöglichte auch die Identifizierung von FBKs in *Vv*, *Sb*, *Sm* und *Pp*, für die bis dato noch keine FBK-Sequenzen publiziert waren. Die Kombination der beiden Suchmethoden führte in den Eudikotyledonen *At*, *Vv* und *Pt* zur Identifizierung von 103, 36 bzw. 68 FBKs. Neununddreißig bzw. 44 FBKs konnten in den Monokotyledonen *Os* und *Sb* detektiert werden und 46 bzw. 71 FBKs in *Sm* und *Pp*, die im Folgenden der Gruppierung der niederen Landpflanzen zugeordnet werden (Tab. 3.1). Die Tatsache, dass FBKs in großer Anzahl nicht nur in Mono- und Eudikotyledonen sondern auch in niederen Landpflanzen präsent sind, zeigt, dass diese FBP-Subfamilie bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Geschichte der Landpflanzen expandiert ist.

Die Anwesenheit von F-Box und Kelch-Domäne in den identifizierten Proteinen wurde mit Hilfe der Pfam-Datenbank (Version 24.0; Stand: Oktober 2009; Finn *et al.* 2010) bestätigt. Zum Zeitpunkt der Analyse waren keine Informationen zur Anzahl an FBKs in *Vv*, *Sb*, *Sm* und *Pp* publiziert. Für die verbleibenden drei Spezies konnten mehr FBKs identifiziert werden als bislang veröffentlicht wurden. Gagné *et al.* (2002) identifizierten ursprünglich 98 FBKs in *At*, die durch die hier durchgeführte BLASTP- und HMM-basierte Suche ebenfalls wiedergefunden wurden. Drei dieser 98 Proteine (AT2G03460, AT2G29610, AT4G39750) wurden jedoch durch Pfam nicht als FBKs bestätigt und daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Zusätzlich zu den verbleibenden 95 *At*FBKs die von Gagné *et al.* (2002) identifiziert wurden, konnten zudem acht neue *At* Gene der Subfamilie der FBKs zugeordnet werden. In *Pt* und *Os* konnten nicht nur alle zuvor publizierten FBKs wiedergefunden, sondern auch deren Anzahl erhöht werden (*Os*: 39 FBKs in dieser Studie versus 25 FBKs von Jain *et al.* (2007); *Pt*: 68 FBKs in dieser Studie versus 40 FBKs von Xu *et al.* (2009)). Diese Zahlen verdeutlichen, dass die Kombination aus BLASTP- und HMM-basierten Suchalgorithmen effektiv zur Identifizierung bereits bekannter sowie zahlreicher neuer FBKs führte. Einige der neu identifizierten *At*FBKs wurden in vorangegangenen Studien noch der Kategorie „F-Box-Proteine mit unbekannter C-terminaler Domäne“ zugeordnet (Gagné *et al.* 2002). Dies macht deutlich, dass die hier gewählten Suchmethoden zu einer besseren Erkennung der Kelch-Domäne führen, was eine eindeutigere Klassifizierung von FBPs ermöglicht. Somit konnte die Anzahl neu identifizierten FBKs signifikant erhöht werden. Da die Kelch-Motive auf Sequenzebene jedoch nur schwach konserviert sind (Abb. 3.1), kann die Existenz weiterer, bislang undetektierter FBKs nicht ausgeschlossen werden.

**Tab. 3.1: Anzahl an FBKs in *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, *O. sativa*, *S. bicolor*, *S. moellendorffii* und *P. patens* (Schumann *et al.* 2011).**

Spezies	Anzahl an FBKs (K)	Anzahl an FBPs (F) <sup>a</sup>	Anzahl an Protein-kodierenden Genen (G) <sup>b</sup>	% (F/G) <sup>c</sup>	% (K/G) <sup>d</sup>	% (K/F) <sup>e</sup>
<i>A. thaliana</i>	103	692	27379	2.53	0.38	14.88
<i>V. vinifera</i>	36	156	30434	0.51	0.12	23.08
<i>P. trichocarpa</i>	68	337	41377	0.81	0.16	20.18
<i>O. sativa</i>	39	779	40838	1.91	0.10	5.01
<i>S. bicolor</i>	44	549	34496	1.59	0.13	8.01
<i>S. moellendorffii</i>	46	247	22273	1.11	0.21	18.62
<i>P. patens</i>	71	165	39727	0.42	0.18	43.03

<sup>a</sup> Anzahl an FBPs (*At*, *Os*, *Pt*: Xu *et al.* 2008; *Vv*: Yang *et al.* 2008; *Sb*, *Pp*, *Sm*: Superfamily 1.73 (Stand: August 2010; Gough *et al.*, 2001)

<sup>b</sup> Anzahl postulierter Protein-kodierender Gene (*At*: TAIR9; *Vv*, *Pt*, *Os*, *Sb*, *Sm*, *Pp*: Phytozome v. 5.0)

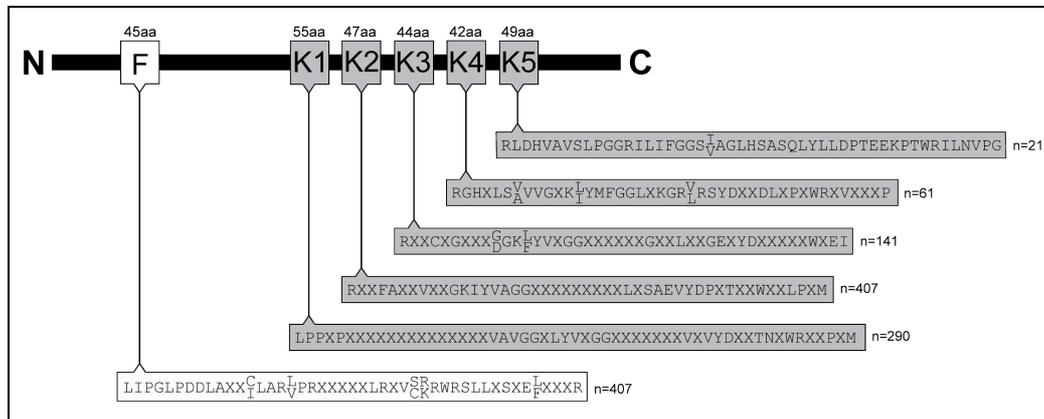
<sup>c</sup> Anteil an Genen, die für FBPs kodieren

<sup>d</sup> Anteil an Genen, die für FBKs kodieren

<sup>e</sup> Anteil an FBPs, die für FBKs kodieren

Unter den sieben analysierten Landpflanzen ist der Anteil an Genen, die für ein Mitglied der FBPs (F) bzw. für ein FBK (K) kodieren, am gesamten Protein-kodierenden Genom (G) von *At* am größten (F/G: ~ 2,5 %; K/G: ~ 0,4 %; Tab. 3.1). Der Anteil an FBK-kodierenden Genen an der Gesamtheit der F-Box-Gene ist jedoch bei den Dikotyledonen *Vv* und *Pt* höher (K/F: ~23,1 % bzw. 20,2 %). Da FBPs bekannt dafür sind, in den verschiedensten entwicklungsbiologischen Prozessen der Pflanzen involviert zu sein (Lechner *et al.* 2006), könnte man annehmen, dass weniger komplexe Landpflanzen

in ihrem Protein-kodierenden Genom einen geringeren Anteil an FBPs aufweisen als höhere Landpflanzen. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. So ist beispielsweise der Anteil an FBP-kodierenden Genen am Gesamtgenom des Moosfarns *Sm* (F/G: ~1,1 %) höher als der der Eudikotyledonen *Vv* und *Pt* (F/G: ~0,51 % bzw. 0,81 %). Interessanterweise gehört fast die Hälfte aller FBPs von *Pp* zur Subfamilie der FBKs (K/F: 43 %).



**Abb. 3.1: Konsensussequenzen von F-Box-Domäne (F) und Kelch-Repeats (K1-K5) pflanzlicher FBKs (Schumann *et al.* 2011).** Mit Ausnahme der Konsensussequenz für das K5-Motiv sind alle Aminosäuren, die mindestens 30 % Homologie zwischen den Sequenzen eines Alignments aufweisen, im Einbuchstabencode angegeben, solche mit weniger als 30 % Homologie als „X“. Aufgrund der geringen Anzahl an Sequenzen, die der Konsensussequenz für das K5-Motiv zugrunde liegen, sind hier alle Aminosäuren mit weniger als 50 % Homologie als „X“ dargestellt. Lücken im Alignment wurden entfernt, sofern mehr als 50 % der Sequenzen im Alignment eine Lücke an der gleichen Position aufwiesen. „n“ entspricht der Anzahl der dem jeweiligen Alignment und somit der Konsensussequenz zugrunde liegenden Sequenzen.

Im Gegensatz zur großen Anzahl an FBKs in den verschiedenen Pflanzenspezies ergab eine weitere Suche nach FBKs in der Interpro-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), dass Bakterien sowie die Bäckerhefe *S. cerevisiae* keine FBKs besitzen (Tab. 3.2). Tierische Modelorganismen wie *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* und *H. sapiens* sowie die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* weisen hingegen ein einziges FBK auf, das in allen Fällen drei konservierte Kelch-Repeats besitzt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es nur einen einzigen gemeinsamen Vorläufer der FBKs in Eukaryoten gab. Zu einer dramatischen Expansion dieser FBP-Subfamilie scheint es erst in den Landpflanzen gekommen zu sein.

**Tab. 3.2: Anzahl an FBKs in nicht-pflanzlichen Modellspezies. (Schumann *et al.* 2011).**

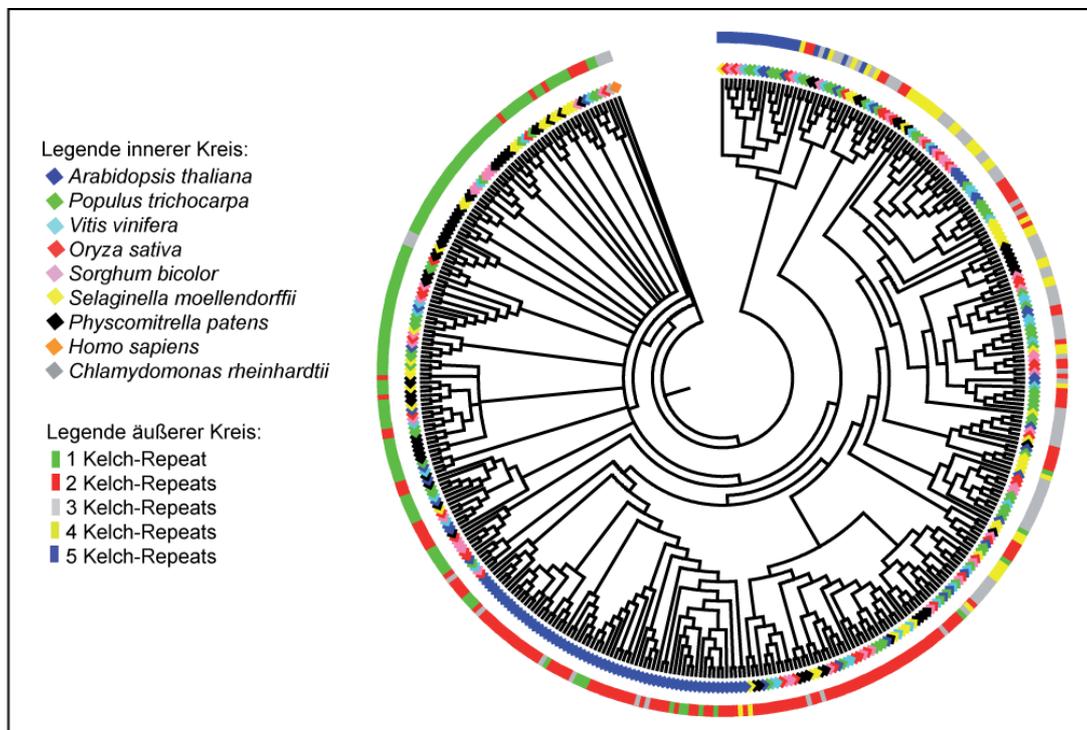
Spezies	Anzahl an FBKs	Anzahl an Kelch-Motiven (Pfam)	Protein ID
Bakterien	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	3	EDP09183 <sup>a</sup>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	3	Q9N3K6 <sup>b</sup>
<i>Drosophila melanogaster</i>	1	3	Q9W281 <sup>b</sup>
<i>Mus musculus</i>	1	3	Q6PDJ6 <sup>b</sup>
<i>Homo sapiens</i>	1	3	Q6P3S6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>GenBank ID; <sup>b</sup>Swiss Prot ID

### 3.1.2 Evolution von FBKs in sieben Landpflanzenspezies

Zur phylogenetischen Analyse der FBKs in den verschiedenen Landpflanzen wurde unter Verwendung der Neighbour-Joining (NJ)-Methode ein Baum konstruiert, der alle identifizierten FBKs der sieben betrachteten Spezies enthält (Abb. 3.2 und 7.1). Vorangegangene Studien beschäftigten sich vor allem mit der Analyse der gesamten FBP-Superfamilie. FBPs zeichnen sich jedoch durch eine Vielzahl unterschiedlicher C-terminaler Interaktionsdomänen aus, so dass die Konstruktion phylogenetischer Bäume bislang am praktikabelsten umsetzbar war, wenn ausschließlich die F-Box dem Alignment zugrunde lag. Durch die Analyse von FBPs mit der gleichen C-terminalen Interaktionsdomäne war es in dieser Arbeit möglich, die Aminosäuresequenz des Volllänge-Proteins zu verwenden. Der resultierende phylogenetische Baum spiegelt somit die Evolution von F-Box und Kelch-Domäne wieder. Die Außengruppe wird durch das bereits erwähnte humane FBK-Protein JFK (Sun *et al.* 2009) sowie durch das identifizierte FBK der Grünalge *C. reinhardtii* gebildet.

Um die Robustheit des NJ-Baumes zu überprüfen, wurde aus jede der 40 Kladen (Abb. 7.1) zufällig ein FBK ausgewählt und für die Konstruktion von drei repräsentativen Bäumen verwendet (Maximum-Likelyhood (ML)-, Bayesian- und NJ-Baum). Der repräsentative Baum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit bestätigt die Topologie des NJ-Baums aus Abb. 3.2 (Tab. 7.4). Daher kann geschlossen werden, dass die Topologie des NJ-Baumes die phylogenetischen Beziehungen zwischen den FBKs der verschiedenen Spezies akkurat wiedergibt.



**Abb. 3.2: Phylogenetischer Baum der FBKs von sieben Landpflanzenspezies (Schumann *et al.* 2011).** Dem Baum liegen 407 Volllänge-Proteinsequenzen der FBKs von *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera*, *O. sativa*, *S. bicolor*, *S. moellendorffii* sowie *P. patens* zugrunde. Als Außengruppen fungieren je ein FBK aus *C. reinhardtii* und *H. sapiens*. Der innere Farbring markiert die FBKs entsprechend der Spezies. Der äußere Farbring kennzeichnet die Anzahl an detektierten Kelch-Repeats.

### 3.1.2.1 Kategorisierung von FBKs entsprechend ihrer evolutionären Konservierung

Der NJ-Baum wurde in 40 Kladen unterteilt (Abb. 7.1). Die Bandbreite reicht von artspezifischen Kladen bis hin zu solchen, die FBKs aus allen sieben analysierten Spezies enthalten. Um eine evolutionäre Klassifizierung der Gene im NJ-Baum vornehmen zu können, wurde die von Thomas (2006) etablierte „stabil/instabil“ Terminologie übernommen und durch die Kategorien „superstabil“ und „ursprünglich“ ergänzt. Instabile Gene sind am wenigsten konserviert, da sie artspezifisch und somit ohne Orthologe in den anderen analysierten Spezies sind. Stabile Gene haben Orthologe in mindestens einer weiteren Spezies. Superstabile sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Orthologe in allen sieben analysierten Pflanzenspezies besitzen und somit den höchsten Grad evolutionärer Konservierung aufweisen. Es ist vorstellbar, dass superstabile Gene Funktionen innerhalb von Entwicklungsprozessen übernehmen, die in allen Landpflanzenspezies konserviert sind. Die Unterscheidung zwischen stabilen und superstabilen Genen spiegelt nicht in jedem Fall das tatsächliche evolutionäre Alter von Genen wieder, da die Möglichkeit des Verlustes von Genen in einzelnen Spezies berücksichtigt werden muss. Daher wurden Gene, die Orthologe in mindestens einem Eudikotyledon, einem Monokotyledon sowie einer niederen Landpflanzenspezies aufweisen der Kategorie „ursprünglich“ zugeordnet.

Insgesamt beinhaltet der NJ-Baum acht Kladen mit superstabilen Genen. In Abhängigkeit von der Spezies sowie der Anzahl an paralogen Genen innerhalb einer Spezies variiert der Anteil an superstabilen Genen von 11 % bis 38 % (Abb. 3.3). Während jede der betrachteten Spezies FBKs der Kategorie „stabil“ aufweist, konnten nur für *At* sowie die niederen Landpflanzen *Sm* und *Pp* instabile FBKs gefunden werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Identifizierung von instabilen Genen stark von der Auswahl der in der phylogenetischen Analyse einbezogenen Spezies abhängt. Die beiden Poaceen *Os* und *Sb* beispielsweise sind relativ eng miteinander verwandt. Ihr letzter gemeinsamer Vorfahre existierte vor ca. 40 Mio Jahren (<http://www.timetree.org>; Hedges *et al.* 2006). Daher ist die Existenz instabiler Gene, so wie sie hier definiert werden, für *Os* und *Sb* weniger wahrscheinlich als für Spezies mit weniger engen Verwandten innerhalb der Analyse, wie z. B. *At* und *Pt*, deren Aufspaltung vor ca. 109 Mio Jahren erfolgte (<http://www.timetree.org>; Hedges *et al.* 2006). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde nach Kladen innerhalb des NJ-Baumes gesucht, die Monokotyledonen-spezifisch sind. Da es nur eine Klade gibt, deren Gene spezifisch für *Os* und *Sb* sind (Abb. 7.1, Klade 24), kann angenommen werden, dass die meisten FBKs innerhalb dieser Spezies Funktionen übernehmen, die über die Monokotyledonen hinaus konserviert sind. Diese Vermutung wird auch dadurch belegt, dass die Mehrheit der FBKs in diesen Spezies zur Kategorie „ursprünglich“ oder „superstabil“ gehören (Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu findet man in *At* eine große artspezifische Klade mit instabilen Genen, die 64 % aller *At*FBKs beinhaltet. Dies weist darauf hin, dass ein Großteil der FBKs von *At* aus evolutionär jungen Duplikationsereignissen hervorgegangen ist. Alle instabilen *At*FBKs fallen gemeinsam in die Klade 22 (Abb. 7.1). Um heraus zu finden, wann diese artspezifische *At*Klade evolviert bzw. expandiert ist, wurde das Genom von *Arabidopsis lyrata*, einem engen

Verwandten von *At*, nach orthologen FBKs durchsucht. Für die Mehrheit der *At*FBKs, die in der Klade 22 liegen (37 von 66), konnten auch Orthologe in *A. lyrata* gefunden werden (Daten nicht gezeigt; Schumann *et al.* 2011). Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Expansion von FBKs dieser Klade noch vor der Aufspaltung in die beiden *Arabidopsis*-Spezies stattgefunden hat. Zudem können Orthologe dieser Klade auch in EST-Datenbanken anderer verwandter Brassicaceen-Spezies identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass Gene der *At*-Klade 22 zu einem Zeitpunkt evolviert sind, der nach der Aufspaltung von *Pt* und den Brassicaceen zu datieren ist.

Einige Kladen des phylogenetischen Baumes enthalten sowohl FBKs von *Sm* als auch *Pp*, jedoch keine FBKs aus Angiospermen (Abb. 7.1). Höchstwahrscheinlich sind die Vorläufer dieser FBKs in den Angiospermen verloren gegangen. Wie *At*, weisen zudem *Sm* und *Pp* einen großen Anteil artspezifischer/instabiler FBKs auf (11 % bzw. 27 %, Abb. 3.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Pt*, *Vv* sowie die beiden Monokotyledonen nur FBKs enthalten, die zwischen den Spezies konserviert sind, während *At* und die beiden niederen Landpflanzenpezies *Pp* und *Sm* zusätzlich instabile FBKs aufweisen.

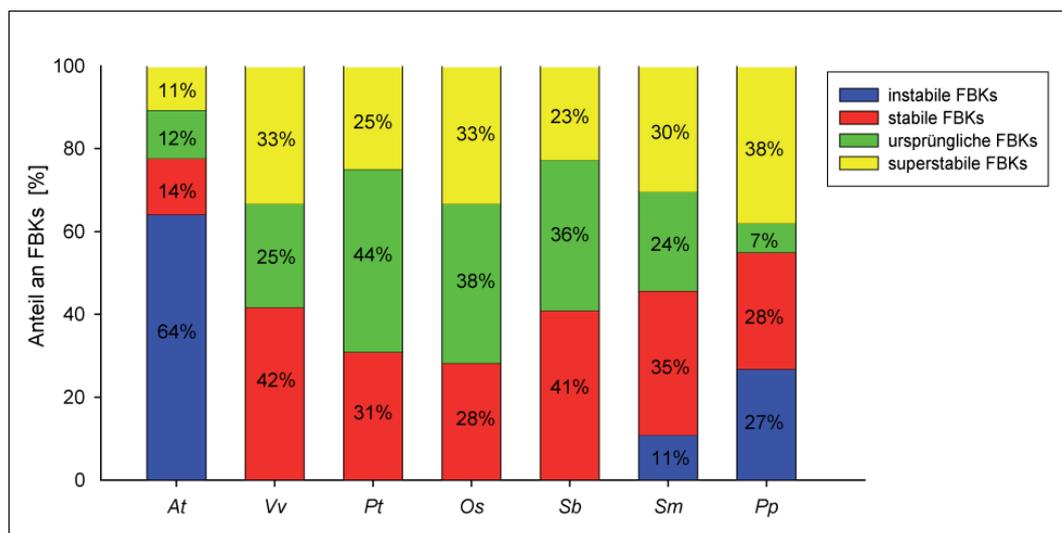


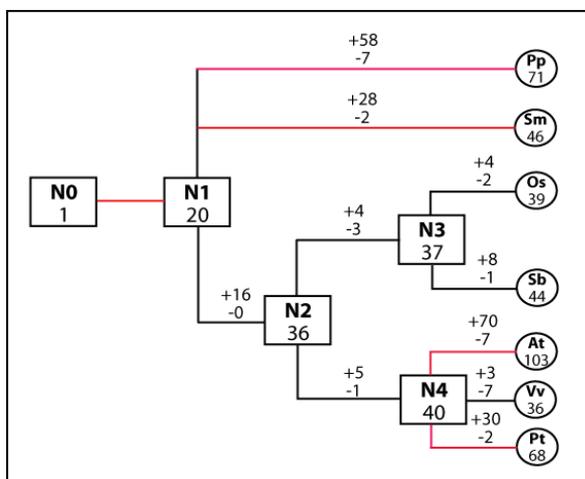
Abb. 3.3: Anteil an instabilen, stabilen, ursprünglichen und superstabilen FBKs in den sieben analysierten Landpflanzenpezies (Schumann *et al.* 2011).

### 3.1.2.2 Evolutionäre Veränderungen in der Anzahl von Landpflanzen-FBKs

Um Informationen darüber zu erhalten wie sich die Anzahl der FBKs im Laufe der pflanzlichen Evolution verändert hat, wurde die Anzahl der FBKs im ältesten gemeinsamen Vorfahren (MRCA: *Most recent common ancestor*) aller analysierten Landpflanzenpezies ermittelt. Anschließend konnte die Anzahl hinzugekommener und verlorengangener Gene für jede der sieben Spezies bestimmt werden. Die Auswertung des NJ-Baums (Abb. 3.2) führte zu dessen Unterteilung in 40 Kladen, wobei alle Gene innerhalb einer Klade als potentielle Orthologe angesehen werden können.

Die Mindestanzahl an FBKs, die vermutlich bereits im MRCA aller sieben Landpflanzenpezies (N1) präsent war, ergibt sich aus der Anzahl an Kladen, die sowohl orthologe FBKs in niederen Landpflanzen als auch in Angiospermen aufweisen (Abb. 3.4). Somit beträgt die Anzahl der ältesten

FBK-Vorläufer in Landpflanzen 20. Sechsendreißig FBKs wurden im MRCA der Angiospermen (N2) identifiziert, 37 FBKs im MRCA der Monokotyledonen (N3) sowie 40 FBKs im MRCA der Dikotyledonen (N4). Wenn man die Anzahl an Genen in den Vorläuferspezies mit denen in den sieben Landpflanzen vergleicht, scheint es, dass die Subfamilie der FBKs in den meisten der analysierten Spezies expandiert ist. Beispielsweise hat sich in *At*, seit dessen Abspaltung von den restlichen hier betrachteten eudikotyledonen Spezies, die Anzahl an FBKs um mehr als das 2,5-fache erhöht. Damit zeigt die Evolution der FBK-Subfamilie die gleiche Tendenz wie die gesamte F-Box-Superfamilie in *At*, die, seit der Aufspaltung von Mono- und Dikotyledonen vor ca. 180 Millionen Jahren (<http://www.timetree.org>; Hedges *et al.* 2006) um die dreifache Menge an Genen angewachsen ist (Xu *et al.* 2009). In *Vv* und *Os* blieb die Anzahl an FBKs seit dem Erscheinen der Angiospermen und der Aufspaltung von Mono- und Dikotyledonen weitestgehend unverändert.



**Abb. 3.4: Veränderung der Anzahl an FBKs während der Evolution von Landpflanzen.** Die Zahl in den Rechtecken und Kreisen entspricht der Anzahl der Gene in den Vorläuferspezies bzw. in der jeweiligen Landpflanzenspezies. Die Zahlen an den Linien geben die Anzahl hinzugekommener (+) bzw. verlorengangener (-) Gene wieder. Rote Linien repräsentieren Verzweigungen mit hoher Expansionsrate. N0, MRCA der Eukaryoten; N1, MRCA der Landpflanzen; N2, MRCA der Angiospermen; N3, MRCA der Monokotyledonen; N4, MRCA der Dikotyledonen. Die Länge der Linien ist nicht proportional zur evolutionären Zeit.

Während *C. reinhardtii* und tierische Spezies in der Regel nur ein einziges FBK aufweisen (Tab. 3.2), hat sich die Anzahl an FBKs im MCRA der Landpflanzen deutlich erhöht (N0→N1, Abb. 3.4). Ausgehend vom Landpflanzenvorläufer fand eine weitere Expansion der FBK-Subfamilie in den Genomen der niederen Landpflanzen *Sm* und *Pp* sowie im gemeinsamen Vorläufer von Mono- und Dikotyledonen statt. Vom MRCA der Angiospermen (N2) hin zum MRCA von Mono- bzw. Dikotyledonen (N3 bzw. N4) blieb die Anzahl an FBKs weitestgehend unverändert. Erst nach der Aufspaltung in die einzelnen eudikotyledonen Spezies kam es ein weiteres Mal zu einer starken Expansion der FBKs. Ein solches ungleichmäßiges Auftreten von Genexpansionsereignissen über die Zeit wurde bereits von Hanada *et al.* (2008) beschrieben. Sie zeigten, dass die Expansionsrate von Genen während der Aufspaltung älterer, ursprünglicher Spezies niedriger ist als während Aufspaltungen, die erst vor relativ kurzer Zeit erfolgten.

### 3.1.3 FBKs clustern entsprechend ihrer Anzahl an Kelch-Repeats

Der NJ-Baum zeigt, dass die FBKs entsprechend ihrer Anzahl an Kelch-Repeats clustern (Abb. 3.2., äußerer Farbring). Im Prinzip zeigt der Baum zwei große Gruppen, die vornehmlich FBKs mit einem (grün) bzw. zwei Kelch-Motiven (rot) enthalten und eine dritten Gruppe, die die FBKs mit einer

größeren Anzahl an Kelch-Motive beinhaltet. Innerhalb dieser dritten Gruppe findet sich eine Untergruppe, in der sich die FBKs mit fünf Kelch-Motiven (blau) konzentrieren.

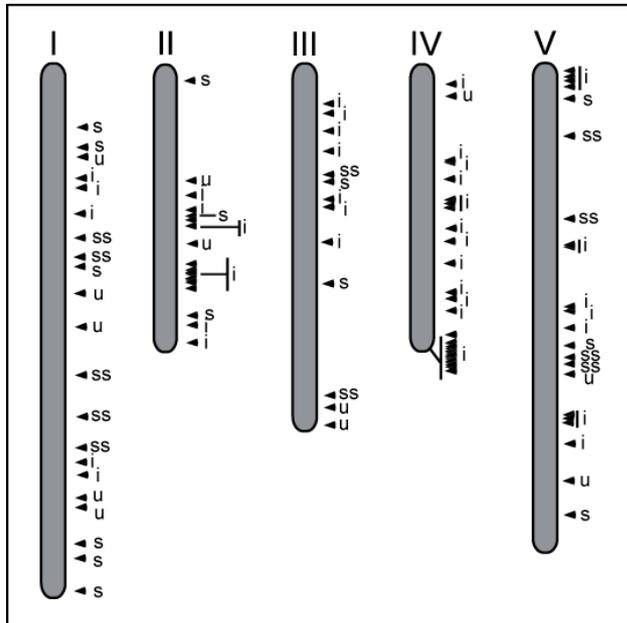
Ein Vergleich ergab, dass sich Kelch-Motive, die an der gleichen Position innerhalb verschiedener FBKs liegen, signifikant ähnlicher sind als verschiedene Kelch-Motive innerhalb eines Proteins (Abb. 7.2). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die verschiedenen Kelch-Motive nicht unabhängig in den unterschiedlichen FBK-Proteinen entstanden sind, sondern bereits in dem einen postulierten Vorläufer der FBKs vorhanden waren. In zahlreichen FBKs konnten hinter den von der Pfam-Datenbank als Kelch-Motive bestätigten Sequenz noch weitere Aminosäure-Motive identifiziert werden. Diese sind dem Kelch-Motiv sehr ähnlich aber nicht konserviert genug, um bei Pfam als solches erkannt zu werden. Es ist vorstellbar, dass diese konservierten Regionen rudimentäre Kelch-Motive darstellen, die im Begriff sind zu degenerieren. Das einzige FBK, das in *C. reinhardtii* identifiziert werden konnte, enthält drei Kelch-Motive (Tab. 3.2). Ebenso konnten im jeweils einzigen FBK, das in verschiedenen tierischen Spezies identifiziert wurde, drei konservierte Kelch-Motive mittels Pfam gefunden werden. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der älteste gemeinsame Vorläufer der eukaryotischen FBKs eine F-Box sowie drei konservierte Kelch-Repeats besaß.

#### 3.1.4 Chromosomale Organisation von *FBKs*

Die Hypothese, dass stabile und superstabile FBKs eher Funktionen in konservierten und ursprünglichen Prozessen der pflanzlichen Entwicklung und Physiologie ausüben, führt im Umkehrschluss zu der Annahme, dass die Gruppe der instabilen Gene permanenter Veränderung unterliegt, indem stetig neue Gene entstehen oder wieder verloren gehen (Thomas 2006). Aufgrund der Tatsache, dass ein Großteil der F-Box-Gene in Form von Tandem-Repeats auf den Chromosomen angeordnet sind, würde die von Thomas (2006) aufgestellte Hypothese die Vermutung zulassen, dass solche in Tandem-Repeats arrangierten Gene vornehmlich zur Kategorie „instabil“ gehören. Tatsächlich zeigt eine Analyse der chromosomalen Lokalisation der *FBKs* von *At*, der Spezies mit dem größten Anteil an instabilen Genen (64 %; Abb. 3.3), dass instabile Gene oft in Tandem-Repeats angeordnet sind. Stabile, ursprüngliche und superstabile *AtFBKs* hingegen, sind relativ gleichmäßig über die Chromosomen verteilt (Abb. 3.5).

Im Gegensatz zu *At*, wo 35 % aller *FBKs* als Tandem-Repeats arrangiert sind, weisen deutlich weniger *FBKs* von *Pt* (3 %), *Vv* (17 %), *Os* (5 %) und *Sb* (14 %) eine solche Anordnung auf. Dies deutet darauf hin, dass *FBKs* dieser Spezies vermehrt durch andere Mechanismen evolviert sind. Beispielsweise lieferten Analysen des *Pt*-Genoms Hinweise für ein Duplikationsereignis, das vor etwa 8-13 Millionen Jahren stattfand und ca. 92 % des Genoms von *Pt* beeinflusst hat (Sterck *et al.* 2005; Tuskan *et al.* 2006). In Übereinstimmung mit dem geringen Anteil an in Tandem-Repeats angeordneten *FBKs* von *Pt*, *Vv*, *Os* und *Sb* weisen diese Spezies auch keine instabilen FBKs auf (Abb. 3.3). Mit Ausnahme von *Pt* ist zudem die Gesamtzahl an FBKs in diesen Spezies weitestgehend unverändert im Vergleich zur Anzahl im entsprechenden Vorläufer (Abb. 3.4).

Aus den gezeigten Ergebnissen kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass erst nach der Abspaltung der Landpflanzen von dem gemeinsamen Vorläufer mit den einzelligen Grünalgen/*C. reinhardtii* eine erste dramatische Expansion der FBK-Subfamilie stattgefunden hat, die von einer zweiten Welle der Expansion gefolgt wurde, welche zum großen Teil auf Tandem-Duplikationen zurückzuführen ist.

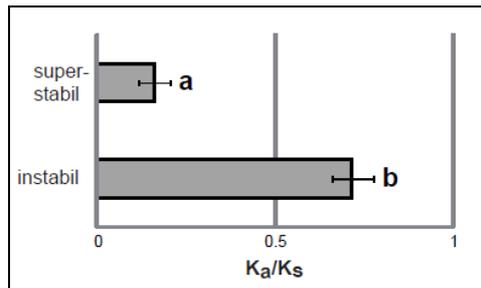


**Abb. 3.5: Chromosomale Verteilung von *AtFBKs*** (Schumann *et al.* 2011). Die schwarzen Dreiecke kennzeichnen die ungefähre Position der FBKs auf den entsprechenden Chromosomen. Die Buchstaben kennzeichnen die Klassifizierung der FBKs wie folgt: i, instabil; s, stabil; u, ursprünglich, ss, superstabil.

### 3.1.5 Superstabile und instabile FBKs weisen unterschiedliche Selektionsmuster auf

Unter der Annahme, dass stabile und superstabile FBKs vornehmlich Zielproteine erkennen, die in den verschiedenen Landpflanzenspezies hochkonserviert sind, würde man erwarten, dass die superstabilen FBKs selbst einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen. Im Gegensatz dazu würde man erwarten, dass Gene, die an artspezifischen Prozessen beteiligt sind, eher durch einen geringeren Konservierungsgrad gekennzeichnet sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Konservierungsgrad von instabilen und superstabilen *AtFBKs* sowie deren Orthologe aus *A. lyrata* bestimmt, indem das Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutationen ( $K_a/K_s$ ) berechnet wurde. Über den Konservierungsgrad hinaus gibt der  $K_a/K_s$ -Wert Auskunft darüber, welche Art von selektivem Druck auf ein Protein-kodierendes Gen wirkt. Homologe Gene, die einen  $K_a/K_s < 1$  aufweisen, evolvieren unter Einwirkung negativer Selektionsmechanismen, d.h. dass die meisten nicht-synonymen Nukleotidaustausche zur Letalität des Organismus führen oder dessen Fitness verringern. Gene unter negativer Selektion sind auf Sequenzebene hochkonserviert. Homologe Gene, die einen  $K_a/K_s > 1$  aufweisen, unterliegen hingegen positiven Selektionsmechanismen. Das Auftreten nicht-synonymer Mutationen ist bei dieser Form der Selektion nicht notwendigerweise letal, sondern kann dem Organismus einen Vorteil verschaffen, der seine Fitness erhöht. Die Folge solch positiver Selektion ist die Entstehung von Genen mit erhöhter Sequenzvariabilität. Zur Berechnung der  $K_a/K_s$ -Werte wurde zunächst für jedes instabile bzw. superstabile *AtFBK* die entsprechenden Orthologen in *A. lyrata* identifiziert (Daten nicht gezeigt; Schumann *et al.* 2011). In die Analyse mit eingeschlossen

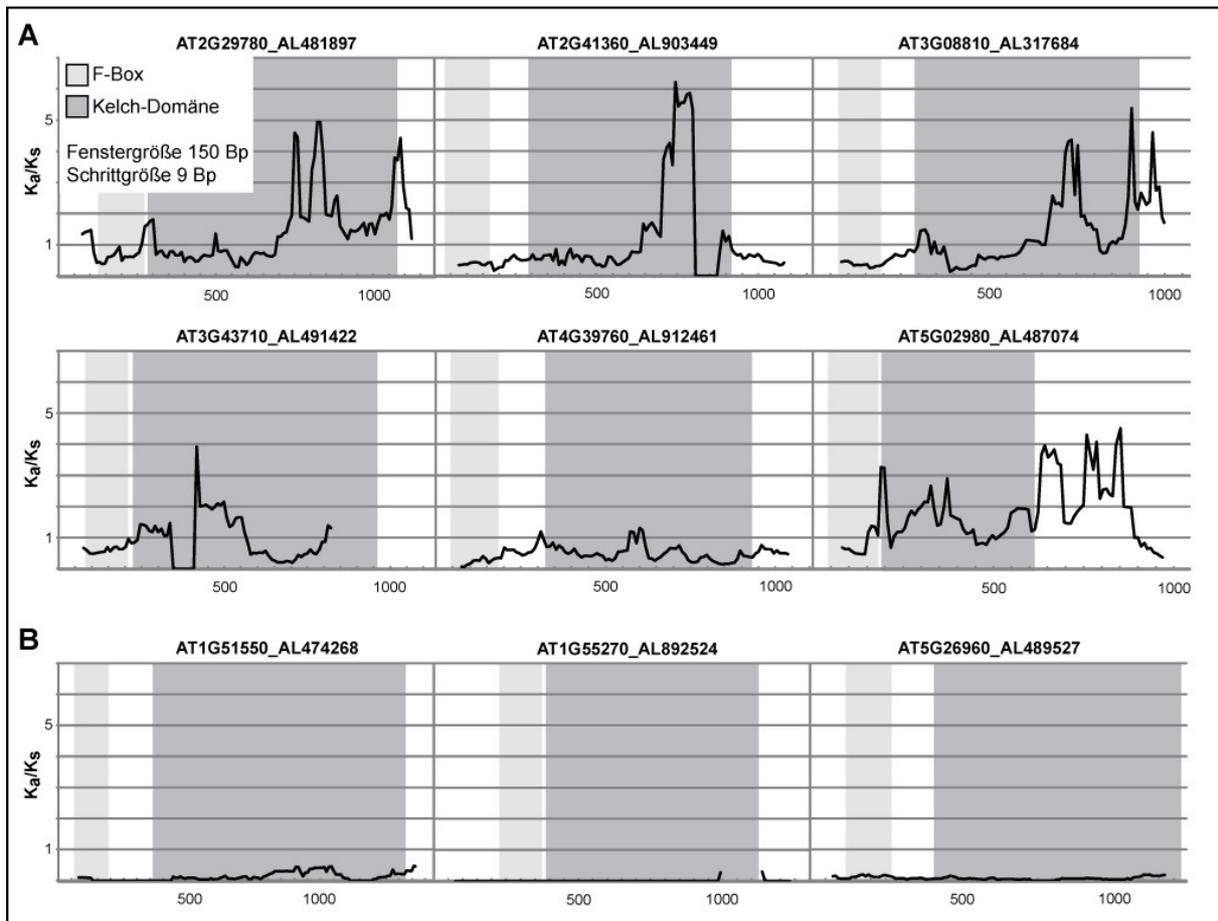
wurden nachfolgend nur die *AtFBKs*, denen exakt ein orthologes Gen von *A. lyrata* zugeordnet werden konnte. Ein gemittelter  $K_a/K_s$ -Wert von 0,16 für die kompletten kodierenden Regionen aller in der Analyse eingeschlossenen superstabilen *FBKs*, weist auf eine starke negative Selektion und somit auf einen hohen Konservierungsgrad dieser Gene hin (Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu, ergibt sich für die kodierenden Regionen der instabilen *FBKs* ein signifikant höherer  $K_a/K_s$ -Wert (0,72;  $P < 0,0001$ ), der auf eine eher neutrale Selektion und somit auf eine deutlich höhere Variabilität der Gensequenz hindeutet.



**Abb. 3.6: Gemittelte  $K_a/K_s$ -Werte von superstabilen (n = 10) und instabilen (n = 37) *AtFBKs* (Schumann *et al.* 2011).** Ausschließlich *AtFBKs* mit einem einzigen Orthologen in *A. lyrata* wurden berücksichtigt. Fehlerbalken entsprechen Standardfehlern. a und b kennzeichnen signifikante Unterschiede entsprechend einem Student's T-Test ( $P < 0,0001$ ).

Die gemittelten  $K_a/K_s$ -Werte von instabilen und superstabilen *FBKs* (Abb. 3.6) beziehen sich auf deren vollständige Protein-kodierende Region. Es ist es jedoch auch möglich, dass verschiedene Domänen innerhalb eines Proteins unterschiedlichen Selektionsdrücken unterliegen. Daher sollte untersucht werden, ob sich der Konservierungsgrad von F-Box und Kelch-Domäne in instabilen und superstabilen *FBKs* unterscheidet. Hierfür wurden *Sliding-Window*-Analysen mit einer Gruppe zufällig ausgewählter repräsentativer *FBKs* durchgeführt (Abb. 3.7). Die *Sliding-Window*-Analysen der instabilen *FBKs* zeigen deutlich mehrere Regionen innerhalb der Kelch-Domäne mit einem  $K_a/K_s \gg 1$  (Abb. 3.7\_A). Dies deutet auf eine positive Selektion der entsprechenden Proteinregionen hin. Darüber hinaus kann für die instabilen *FBKs* beobachtet werden, dass die F-Box generell niedrigere  $K_a/K_s$ -Werte aufweist als die C-terminale Proteinregion, die die Kelch-Repeats beinhaltet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in instabilen *FBKs* die F-Box-Domäne, über die die Bindung an die ASK-Adapteruntereinheit erfolgt und die somit für die Integration der *FBKs* in den SCF-Komplex erforderlich ist, in Folge natürlicher Selektion eher konserviert vorliegt. Im Gegensatz dazu scheint die Kelch-Domäne instabiler *FBKs* eine höhere Sequenzvariabilität aufzuweisen, was zur Erkennung neuer Zielproteine beitragen könnte.

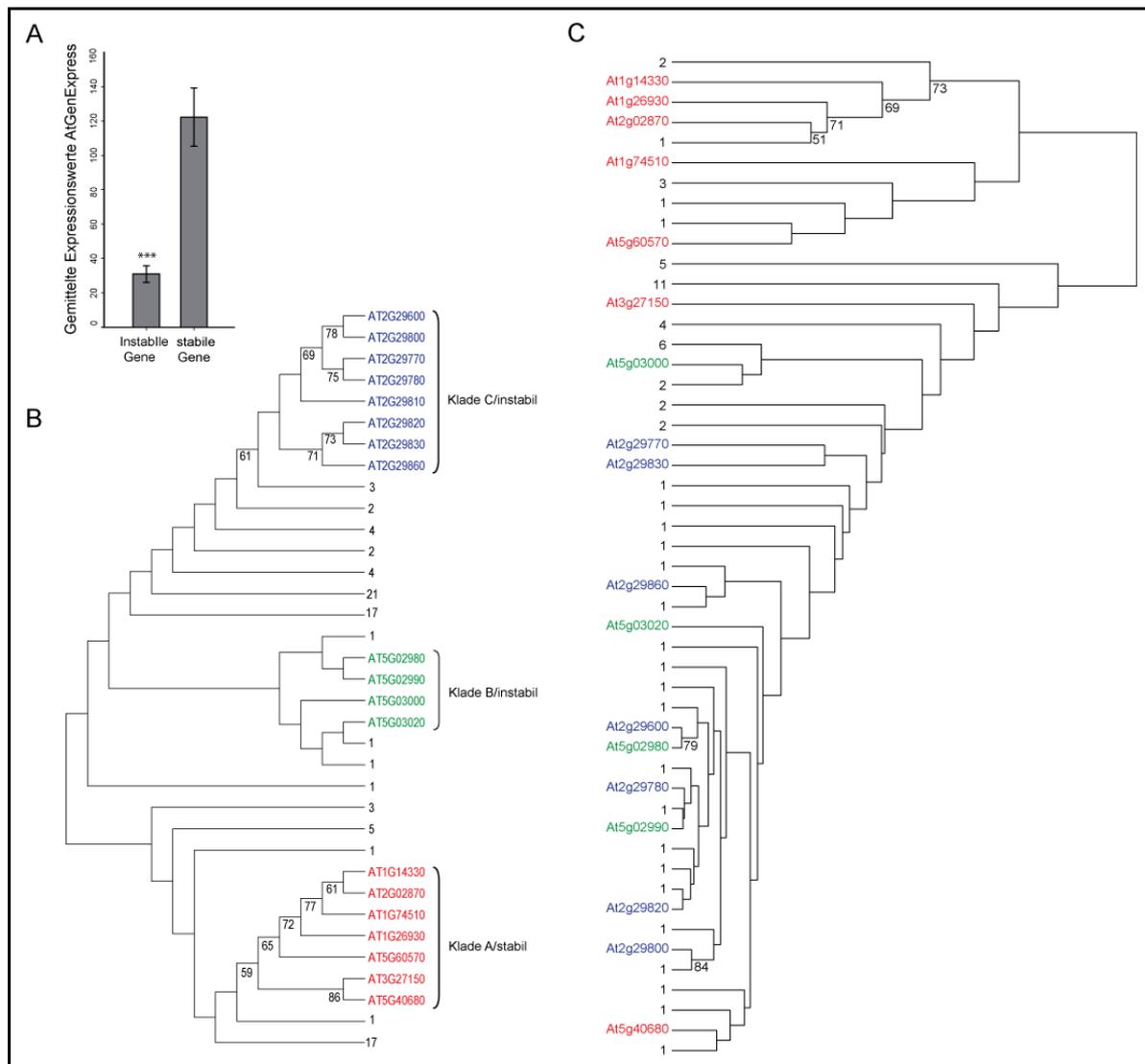
Im Unterschied zu den instabilen *FBKs* weisen die superstabilen *FBKs* über die gesamte Protein-kodierende Region einen  $K_a/K_s \ll 1$  auf. Hier scheinen folglich sowohl F-Box als auch Kelch-Domäne negativer Selektion zu unterliegen und somit hochkonserviert zu sein (Abb. 3.7\_B).



**Abb. 3.7:** *Sliding-Window-Analysen repräsentativer instabiler (A) bzw. superstabiler (B) FBKs* (Schumann et al. 2011). Für die *Sliding-Window-Analysen* wurden Nukleotidsequenzen von *A. thaliana* (gekennzeichnet durch die Identifizierungsnummern der Arabidopsis-Genom-Initiative) sowie orthologe Nukleotidsequenzen von *A. lyrata* (gekennzeichnet durch die Proteinidentifizierungsnummer des Joint Genome Institute) verwendet. Als Fenstergröße wurden 150 Bp und als Schrittgröße 9 Bp gewählt. Für das *A. lyrata* Protein 491422 konnte nur ein Teil der Protein-kodierenden Sequenz analysiert werden. Hellgraue Boxen markieren die Position der F-Box, dunkelgraue Boxen die Position der Kelch-Domäne.

### 3.1.6 Phylogenetisch eng verwandte *AtFBKs* werden differentiell exprimiert

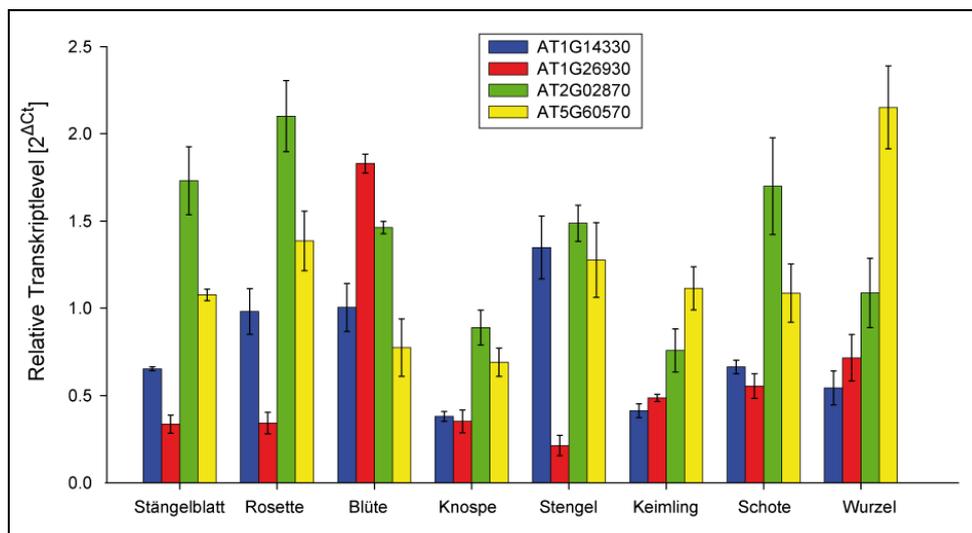
Genfamilien, die eine hohe Duplikationsrate aufweisen, unterliegen oftmals zahlreichen Pseudogenisierungsereignissen (Lynch & Conery 2000). Ursache hierfür ist häufig die funktionelle Redundanz der durch Duplikation auseinander hervorgegangenen Gene und der damit verbundenen Reduktion des Selektionsdruckes auf die individuellen Gene. Mutationen in duplizierten Genen, die zu deren Funktionsverlust führen, haben oftmals keine negativen Folgen für den Organismus, da die Funktion des Gens durch ein oder mehrere Paraloge übernommen wird. Da 52 % (34 von 66) der instabilen *AtFBKs* durch Tandem-Duplikationen entstanden sind (Abb. 3.5), sollte durch Auswertung öffentlich verfügbarer Expressionsdaten (*AtGenExpress\_extended tissue series*; Schmid et al. 2005; Toufighi et al. 2005) untersucht werden, ob diese hohe Duplikationsrate mit einer hohen Pseudogenisierungsrate korreliert. Die erhaltenen Ergebnisse sollten mit denen von stabilen (einschließlich ursprünglicher und superstabiler) *FBKs*, von denen nur 5 % (2 von 37) durch Tandem-Duplikation entstanden sind, verglichen werden.



**Abb. 3.8: Phylogenetisch eng verwandte *AtFBKs* zeigen differenzielle Expressionsmuster (Schumann et al. 2011).** **A**, Gemittelte Expressionswerte für stabile ( $n = 33$ ; inkl. ursprünglicher und superstabiler) sowie instabile ( $n = 45$ ) *AtFBKs*. Die Expressionsdaten wurden aus der *AtGenExpress\_Plus extended tissue series* (Schmid et al. 2005) extrahiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test ermittelt ( $P < 0,0001$ ). **B**, NJ-Baum der auf den Volllängeproteinsequenzen von 103 *AtFBKs* basiert. **C**, Clusteranalyse, basierend auf den Daten der *AtGenExpress\_Plus extended tissue series* von 78 *AtFBKs*, die die Co-Expression der Gene in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von *At* widerspiegelt. Die unterschiedliche Anzahl an *FBKs* in (**B**) und (**C**) resultiert aus 25 *FBKs*, die nicht auf dem ATH1-Microarray vorhanden sind. Kladen, die nicht von Interesse sind, wurden zusammengefasst und entsprechend der Anzahl der darin enthaltenen *FBKs* bezeichnet. Die Ziffern an den Gabelungen entsprechen Bootstrappwerten  $> 50$ .

Den Erwartungen entsprechend ist die durchschnittliche Expressionsrate der instabilen *FBKs* in den verschiedenen Geweben von *At* signifikant niedriger als für die stabilen Gene ( $P < 0,0001$ ; Abb. 3.8\_A). Hinzukommend weisen 58 % der instabilen *FBKs* (26 von 45 Genen, die auf dem ATH1-Array vorhanden sind) innerhalb der 86 betrachteten Gewebe oder Entwicklungsstadien einen durchschnittlichen Expressionswert von weniger als 25 auf (Daten nicht gezeigt; Schumann et al. 2011). Interessanterweise haben jedoch nur vier von diesen 26 instabilen *FBKs* für alle Gewebe einen Expressionswert, der unter 50 liegt. Das heißt, zumindest in ausgewählten Geweben/Entwicklungsstadien ist die Mehrheit der instabilen *FBKs* signifikant höher exprimiert

(>50). Diese Beobachtung lässt zwei Schlussfolgerungen zu: (i) dass instabile FBKs vermutlich einer temporären und/oder lokalen Spezialisierung unterliegen, was gegen die Tendenz einer generellen Pseudogenisierung sprechen würde, oder (ii) dass ein kontinuierlicher Degenerierungsprozess von gewebespezifischen, *cis*-regulatorischen Promotorregionen der instabilen FBKs in Gange ist, der in Zukunft zu deren vollständiger transkriptioneller Inaktivierung führt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche dieser beiden Möglichkeiten die wahrscheinlichere ist, sollte die Frage geklärt werden, ob phylogenetisch eng verwandte *AtFBKs* einheitliche oder unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Hierfür wurde erneut der Datensatz der *AtGenExpress\_extended tissue series* (Schmid *et al.* 2005; Toufighi *et al.* 2005) herangezogen. Sowohl phylogenetisch eng verwandte instabile FBKs (z.B. Klade B und C; Abb. 3.8\_B) als auch eng verwandte stabile *FBKs* (Klade A; Abb.3.8\_B), fallen nicht länger in ein Cluster, wenn sie entsprechend ihrer Co-Expression gruppiert werden (Abb. 3.8\_C). Die differentielle Expression von eng verwandten *FBKs* in verschiedenen Geweben von *At* konnte auch mittels qRT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.9). Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise dafür, dass ein Großteil der *FBKs* nach ihrer Entstehung durch Duplikation einer differentiellen Evolution der Genexpression unterliegt, wodurch die einzelnen Gene potentiell unterschiedliche Funktionen oder Spezifikationen erwerben. Auf Basis dieser Daten erscheint eine generelle Pseudogenisierung von *FBKs* nur wenig wahrscheinlich.



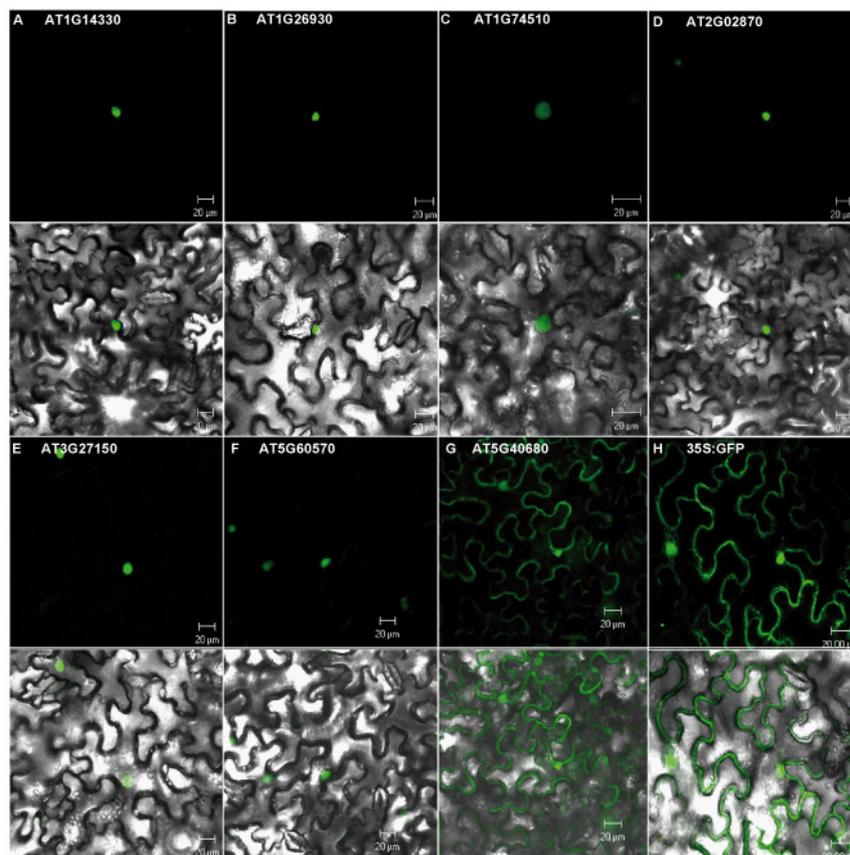
**Abb. 3.9:** Relative Transkriptlevel von vier der sieben phylogenetisch eng verwandten *AtFBKs* (vergleiche Klade A in Abb 3.8\_B; Schumann *et al.*, 2011). Stängel- und Rosettenblätter, Blüten, Knospen, Stängel und Schoten stammen von sechs Wochen alten *A. thaliana* Col-0 Pflanzen (Anzuchtbedingungen: Erde, Langtag, 20°C). Keimlinge (7 Tage) und Wurzeln von 12 Tage alten Keimlingen entstammen aus steriler Kultivierung (ATS-Platten, Langtag, 20°C). Die Balken entsprechen Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Drei der analysierten *FBKs* (*AT1G74510*, *AT3G27150* und *AT5G40680*) konnten nicht detektiert werden und sind daher nicht gezeigt.

### 3.1.7 FBKs lokalisieren in den Zellkern und/oder ins Cytoplasma

Posttranslationale Mechanismen können ebenfalls funktionelle Diversität bedingen. Dazu gehören beispielsweise die subzelluläre Lokalisation eines Proteins oder, im speziellen Falle der *FBKs*, deren Bindung an die verschiedenen ASKs, über die die Einbindung eines *FBK*-Proteins in einen

spezifischen SCF-Komplex erfolgt. Für die Analyse der subzellulären Lokalisation wurde *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation transient mit *35S::GFP-FBK*-Konstrukten transformiert. Diese Konstrukte kodieren für ein translationales Fusionsprotein aus dem grün-fluoreszierenden Protein GFP und jeweils einem der sieben FBKs aus Klade A (Abb. 3.8\_B). Die Fusionsproteine wurden konstitutiv unter dem 35S-Promotor exprimiert. Die Detektion des GFP-Signals erfolgte in Blattepidermiszellen am Laser-Scanning-Mikroskop.

Sechs der untersuchten FBKs lokalisieren ausschließlich in den Nukleus (Abb. 3.10\_A-F). AT5G40680 ist zusätzlich im Cytosol detektierbar (Abb. 3.10\_G). Die nukleäre und cytoplasmatische Lokalisation der FBKs stimmt mit der Lokalisation des 26S-Proteasoms überein, das ebenfalls im Cytosol und Zellkern aktiv ist (Book *et al.* 2009).



**Abb. 3.10: Subzelluläre Lokalisation von GFP-FBK-Fusionsproteinen in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* (Schumann *et al.* 2011).** GFP-FBK-Fusionsproteine, die unter dem 35S-Promotor exprimiert werden, lokalisieren in den Zellkern und/oder ins Cytosol von *N. benthamiana*-Epidermiszellen. Für jedes Fusionsprotein ist jeweils eine Aufnahme im Fluoreszenz-Modus (obere Abbildung) bzw. eine überlagerte Aufnahme im Fluoreszenz- und Hellfeldmodus (untere Abbildung) gezeigt.

### 3.1.8 FBKs zeigen relativ unspezifische ASK-Interaktionsmuster

Die spezifische Interaktion der FBKs mit 17 der 21 ASK-Adaptorproteinen wurde mittels eines *Yeast-two-Hybrid*-Systems untersucht. Für die Interaktionsstudien wurden die FBKs an eine GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert, während die ASKs an eine GAL4-DNA-Bindedomäne gekoppelt wurden. *ASK6* und *ASK15* wurden von den Interaktionsstudien ausgeschlossen, da sie vermutlich

Pseudogene darstellen (Seki *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2004). ASK12 und ASK18 wurden ausgeschlossen, da sie in dem hier verwendeten System Autoaktivität aufwiesen.

Abbildung 3.11 zeigt, dass die sieben analysierten FBKs weitestgehend unspezifisch mit einer Vielzahl verschiedener ASKs interagieren. Vergleichbare unspezifische ASK-Bindungen wurden zuvor auch für andere F-Box-Proteine, wie dem FBK-Protein ZTL, aufgezeigt (Risseeuw *et al.* 2003). Zudem interagieren sämtliche getestete ASKs mit mehreren FBKs, was die Fähigkeit der ASKs zur Integration in verschiedene SCF-Komplexe belegt. Die betrachteten FBKs interagieren mit 11 bis 17 der getesteten ASKs. Hierbei zeichnet sich ein Muster ab, bei dem AT1G26930, AT3G27150, AT5G60570 und AT5G40680 mit nahezu den gleichen ASK-Proteinen interagieren. Auch AT2G02870, AT1G74510 und AT1G14330 zeigen ein weitestgehend übereinstimmendes ASK-Interaktionsmuster. Innerhalb der 103 *A*FBKs bilden die sieben hier analysierten Proteine eine phylogenetische Klade (Abb. 3.8\_B, Klade A). In dieser Klade gruppieren AT2G02870, AT1G74510 und AT1G14330 am nächsten zueinander. Diese Daten lassen vermuten, dass AT2G02870, AT1G74510 und AT1G14330 über bestimmte, ihnen gemeinsame Sequenzeigenschaften innerhalb der F-Box-Domäne verfügen, die die Interaktion mit allen (bzw. nahezu allen) getesteten ASKs ermöglicht. Hingegen scheinen die Sequenzen der F-Box-Domänen von AT1G26930, AT3G27150, AT5G60570 und AT5G40680 spezifischer zu sein, so dass nur bestimmte ASKs gebunden werden können.

	AT1G14330	AT1G26930	AT1G74510	AT2G02870	AT3G27150	AT5G40680	AT5G60570
ASK1	Grey	White	White	White	White	White	White
ASK2	White						
ASK3	White						
ASK4	White						
ASK5	White						
ASK7	White						
ASK8	White						
ASK9	White						
ASK10	White						
ASK11	White						
ASK13	White						
ASK14	White						
ASK16	White						
ASK17	White						
ASK19	White						
ASK20	White						
ASK21	White						
LaminC	White						

**Abb. 3.11: Yeast-two-Hybrid-Analysen der spezifischen Interaktion von sieben ausgewählten FBK-Proteinen mit 17 ASK-Adaptorproteinen (Schumann *et al.* 2011).** An eine GAL4-DNA-Bindedomäne fusionierte ASKs wurden gegen FBKs getestet, die an eine GAL4-Aktivierungsdomäne gekoppelt wurden. Graue und weiße Boxen kennzeichnen positive bzw. negative Interaktionen. Humanes Lamin C fungiert als Negativkontrolle.

### 3.1.9 Fazit

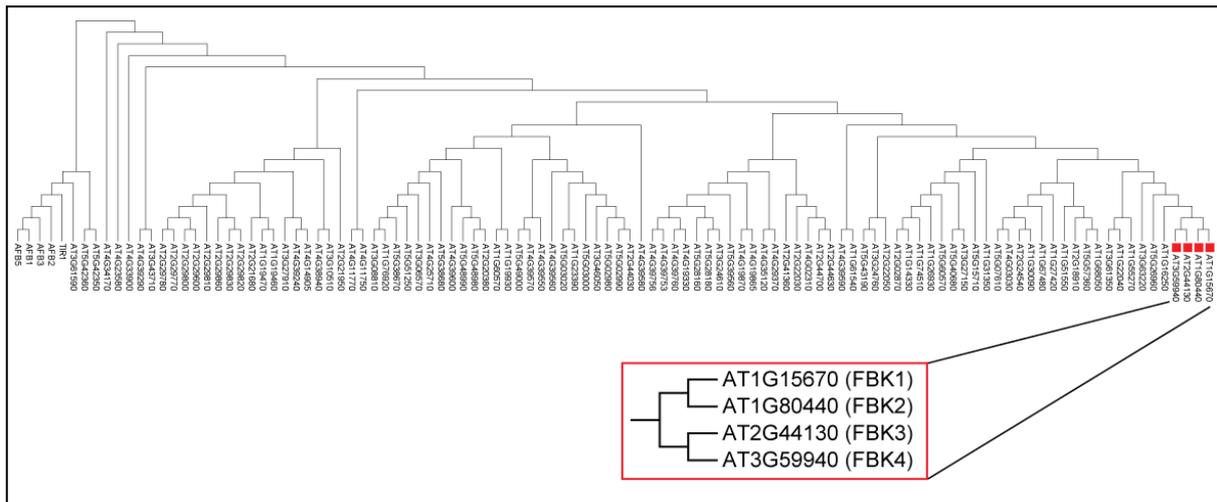
Während Genome nicht-pflanzlicher Eukaryoten nur ein einziges *FBK*-Gen aufweisen (Tab. 3.2), konnte in Landpflanzen eine dramatische Expansion der *FBK*-Subfamilie beobachtet werden (Tab. 3.1). Die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes aus den Volllänge-Proteinsequenzen der FBKs von sieben Landpflanzenspezies (Abb. 3.2) ermöglichte eine Kategorisierung der FBKs, die deren evolutionäre Stabilität widerspiegelt. Superstabile FBKs beispielsweise, besitzen Orthologe in allen

sieben Landpflanzenspezies und sind auf Sequenzebene hochkonserviert (Abb. 3.7\_B). Im Gegensatz dazu, besitzen artspezifische/instabile FBKs in der Regel eine Kelch-Domäne, die Signale positiver Selektion aufweist, was ihr adaptives Potential verdeutlicht (Abb. 3.7\_A). Zudem konnte aufgezeigt werden, dass sich *At*FBKs in ihrer subzellulären Lokalisation sowie in ihren ASK-Interaktionsmustern nur geringfügig unterscheiden (Abb. 3.10 und 3.11), jedoch erhebliche Unterschiede in ihren Expressionsmustern aufweisen (Abb. 3.8 und 3.9). Daher kann geschlussfolgert werden, dass eine mögliche funktionelle Differenzierung zum einen durch transkriptionelle Regulation, zum anderen durch das Einwirken positiver Selektionsmechanismen, insbesondere auf die Kelch-Domäne, zustande kommt.

## 3.2 Molekulare und funktionelle Charakterisierung von vier *FBKs* aus *A. thaliana*

### 3.2.1 Auswahl geeigneter Kandidatengene für einen revers-genetischen Ansatz

Trotz der enormen Anzahl von FBKs in *At* (103), konnte bislang nur fünf von ihnen eine konkrete biologische Funktion zugeordnet werden. Diese fünf FBKs sind an grundlegenden pflanzlichen Prozessen wie der Perzeption und Weiterleitung von Lichtsignalen (Harmon & Kay 2003; Kim *et al.* 2007; Demarsy & Frankhauser 2009; Ito *et al.* 2012), der Wachstumsregulation (González-Carranza *et al.* 2007) sowie der zirkadianen Rhythmik (Han *et al.* 2004; Sawa *et al.* 2007; Baudry *et al.* 2010) beteiligt. Die Tatsache, dass ausnahmslos alle bislang funktionell charakterisierten FBKs in pflanzliche Prozesse involviert sind, die in Landpflanzen hochkonserviert ablaufen, korreliert mit der Beobachtung, dass die fünf FBKs selbst hochkonserviert sind. Die phylogenetische Analyse der FBK-Subfamilie in sieben Landpflanzenspezies ergab, dass die Gene *AFR*, *HWS*, *ZTL*, *FKF1* und *LKP2* zur Kategorie der „ursprünglichen“ FBKs gehören. Sie haben Orthologe sowohl in verschiedenen mono- und eudikotyledonen Spezies, als auch in niederen Landpflanzen wie dem Moosfarn *Sm* (Abb. 7.1). Es gibt bislang keine Informationen über die genaue Funktion von artspezifischen, instabilen FBKs. Es scheint also, dass konservierte FBKs besonders gut für eine funktionelle Charakterisierung geeignet sind, da sie oftmals an grundlegenden pflanzlichen Prozessen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden für den hier durchgeführten revers-genetischen Ansatz FBKs ausgewählt, die in mehreren der analysierten Landpflanzenspezies konserviert vorliegen. Die vier ausgewählten FBKs werden im Folgenden als F-BOX-KELCH PROTEIN 1 bis 4 (FBK1/AT1G15670; FBK2/AT1G80440; FBK3/AT2G44130; FBK4/AT3G59940) bezeichnet (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: FBK1-4 bilden eine phylogenetisch distinkte Unterfamilie innerhalb der FBK-Subfamilie von *A. thaliana*.** Die Phylogenie beruht auf den Volllänge-Proteinsequenzen von 103 in *At* identifizierten FBKs. Die Außengruppe bilden die Auxinrezeptoren TIR1, AFB1, AFB2, AFB3 und AFB5, die zur Subfamilie der FBPs mit LRR-Domäne gehören. Das Alignment und die Konstruktion des Baumes erfolgten in MEGA5.

Alle vier *FBKs* sind stabile Gene. Während *FBK3* und *FBK4* Orthologe in *Vv* und *Pt* aufweisen, sind *FBK1* und *FBK2* zusätzlich in den Monokotyledonen *Sb* und *Os* konserviert (Abb. 7.1). Innerhalb der 103 *AtFBKs* bilden FBK1-4 eine phylogenetisch distinkte Unterfamilie (Abb. 3.12). Die Sequenzidentität der vier *FBKs* liegt auf Nukleotidebene zwischen 56 % und 75 % und auf Aminosäureebene zwischen 25 % und 68 % (Tab. 3.3). Aufgrund der geringen Größe von 1080 Bp bis 1236 Bp und der Abwesenheit von Introns, eignen sich alle vier Gene gut zum Klonieren. Ein weiterer Punkt, der *FBK1-4* zu geeignete Kandidaten für einen revers-genetischen Ansatz macht, ist die Verfügbarkeit von T-DNA-Insertionslinien. Zudem liegen die ausgewählten *FBKs* entweder ungekoppelt vor oder befinden sich, wie im Falle von *FBK1/AT1G15670* und *FBK2/AT1G80440*, an entgegengesetzten Enden des gemeinsamen Chromosoms. Dies ermöglicht die Herstellung multipler Mutanten durch Kreuzung.

**Tab. 3.3: Sequenzidentitäten zwischen *FBK1-4* auf Nukleotid- bzw. Aminosäureebene.**

Sequenzvergleich	Sequenzidentität auf Nukleotidebene	Sequenzidentität auf Aminosäureebene
FBK1 versus FBK2	75 %	68 %
FBK1 versus FBK3	57 %	28 %
FBK1 versus FBK4	58 %	25 %
FBK2 versus FBK3	56 %	26 %
FBK2 versus FBK4	58 %	29 %
FBK3 versus FBK4	72 %	62 %

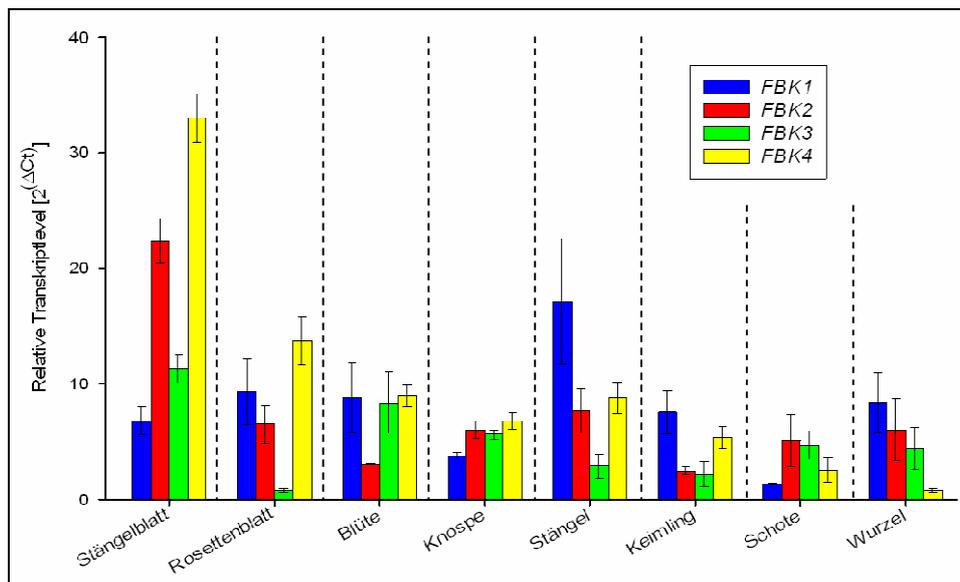
### 3.2.2 *FBK1-4* kodieren für *bona-fide* F-Box-Proteine

Um sicher zu stellen, dass die für die funktionelle Charakterisierung ausgewählten *FBKs* tatsächlich für *bona fide* FBPs kodieren, sollte zunächst untersucht werden, ob *FBK1-4* die grundlegenden Eigenschaften besitzen, durch die sich funktionelle FBPs auszeichnen. Ein FBP-kodierendes Gen kann als funktionell angesehen werden, wenn es in dem zu untersuchenden Organismus exprimiert wird,

das heißt, das Gen vollständig in seine mRNA transkribiert wird und somit ein Template für die sich anschließende Translation zur Verfügung steht. Des Weiteren sollten funktionelle FBPs in die gleichen zellulären Kompartimenten lokalisieren wie die restlichen Komponenten des Ub/26S-Proteasoms (Zellkern und/oder Cytoplasma; Book *et al.* 2009). Zudem wird vorausgesetzt, dass funktionelle FBPs an eine oder mehrere der ASK-Adapteruntereinheiten binden, um auf diese Weise in einen SCF-Komplex zu integrieren. Schließlich sollte eine funktionelle C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne vorhanden sein, die die spezifische Bindung zum Zielprotein gewährleistet.

### 3.2.2.1. Transkriptanalysen in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. thaliana*

Die Bestimmung relativer Transkriptmengen mittels qRT-PCR ergab, dass *FBK1-4* sowohl in Keimlingen als auch in allen analysierten Organen adulter Pflanzen exprimiert werden (Abb. 3.13). Dies lässt darauf schließen, dass keine generelle Pseudogenisierung der Gene vorliegt. Trotz der ubiquitären Expression aller vier *FBKs*, sind sie in den verschiedenen Entwicklungsstadien differentiell exprimiert. Während die höchsten Transkriptmengen für *FBK2* und *FBK4* in Stängelblättern nachgewiesen wurden, ist *FBK1* am stärksten im Stängel exprimiert. Mit Ausnahme der Rosettenblätter, wo *FBK3* nur sehr schwach exprimiert ist, weist es eine vergleichsweise einheitliche Expression in den übrigen Entwicklungsstadien und Pflanzenorganen auf.



**Abb. 3.13: Relative Transkriptlevel von *FBK1-4* in verschiedenen Pflanzenorganen und Entwicklungsstadien von *At*.** Stängel- und Rosettenblätter, Blüten, Knospen, Stängel und Schoten stammen von sechs Wochen alten *A. thaliana* Col-0 Pflanzen (Anzuchtbedingungen: Erde, Langtag, 20°C). Keimlinge (7 Tage) und Wurzeln von 12 Tage alten Keimlingen entstammen aus steriler Kultivierung (ATS-Platten, Langtag, 20°C). Die Balken entsprechen Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

### 3.2.2.2 Analyse der Promotoraktivitäten von *FBK1-4*

Um die Ergebnisse der qRT-PCR zu bestätigen sowie eine höhere Auflösung der Expression bzw. Promotoraktivität von *FBK1-4* zu erreichen, wurden die *FBK*-Promotoren in einem Gateway-kompatiblen binären Vektor mit einem *GUS*-Reportergen fusioniert. Anschließend wurde mittels eines

$\beta$ -Glucuronidase-Reporterassays die Promotoraktivität der vier *FBKs* in verschiedenen Entwicklungsstadien und Pflanzenorganen von *At* untersucht (Abb. 3.14 bis 3.16). Für die  $\beta$ -Glucuronidase-Färbungen wurden ausschließlich Pflanzenlinien verwendet, in denen das entsprechende *Prom<sub>FBK</sub>::GUS*-Konstrukt homozygot vorliegt.

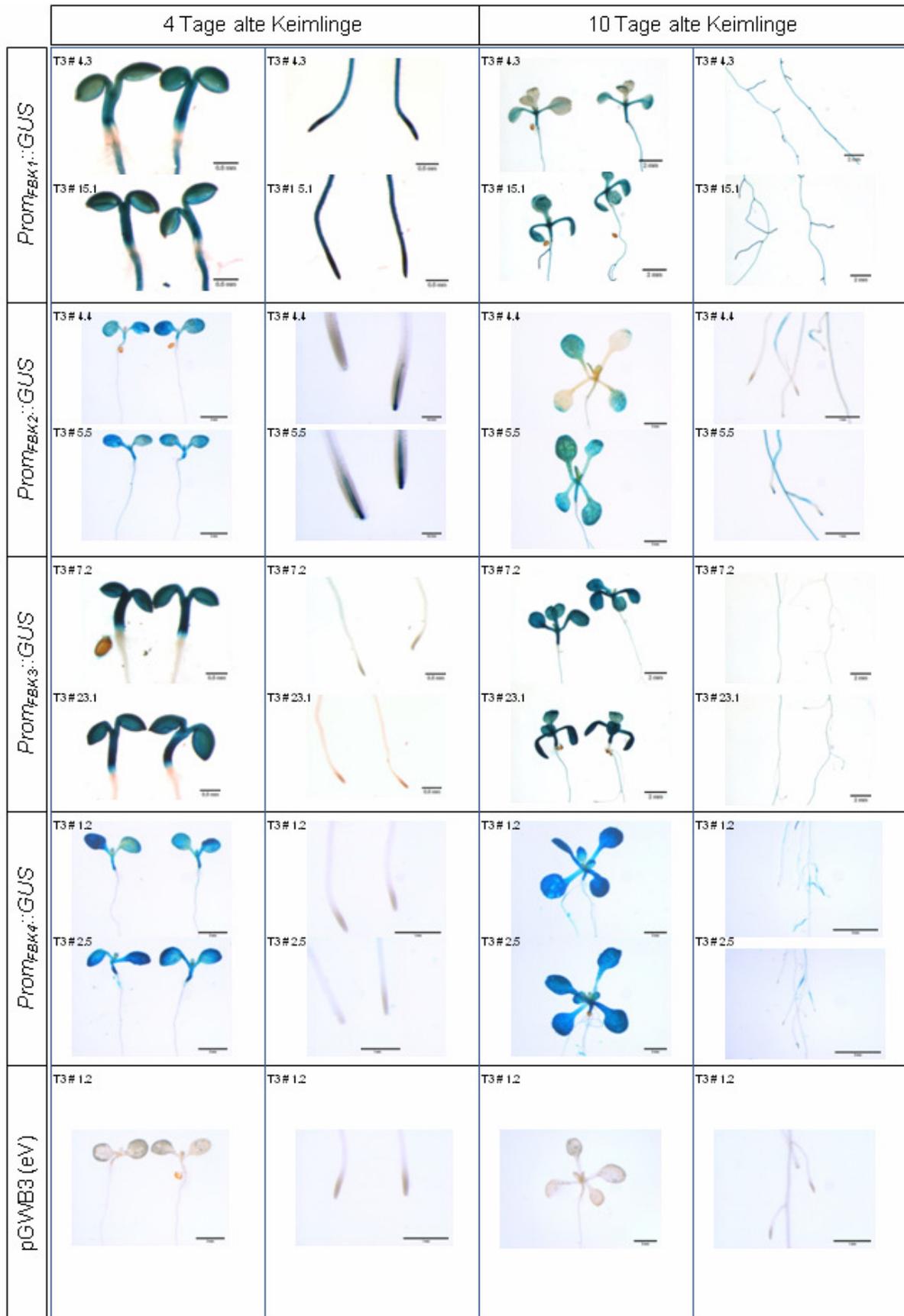
Eine starke Aktivität des *FBK1*-Promotors konnte sowohl im Embryonalstadium als auch in jungen Keimlingen detektiert werden (Abb. 3.14 und 3.16). Auch in adulten Pflanzen ist die Aktivität des *FBK1*-Promotors in allen analysierten Organen der Pflanze detektierbar. In Blättern ist der *FBK1*-Promotor vor allem im Vaskularsystem aktiv (Abb. 3.15).

Der *FBK2*-Promotor ist besonders in den frühen Entwicklungsstadien von *At* aktiv. Eine sehr starke *GUS*-Expression kann im Embryonalstadium beobachtet werden (Abb. 3.16). In sehr jungen, vier Tage alten Keimlingen ist der *FBK2*-Promotor vor allem in den Kotyledonen und im Hypokotyl sowie in der Wurzelspitze aktiv. Im späteren Keimlingsstadium ist die Aktivität dann in der gesamten jungen Pflanze detektierbar (Abb. 3.14). In adulten Pflanzen kann eine schwache *GUS*-Expression in Kelchblättern und in Schoten beobachtet werden. Konkrete Aussagen über die Aktivität des *FBK2*-Promotors in Stängel- und Rosettenblättern sind nicht möglich, da die analysierten unabhängigen Pflanzenlinien hier unterschiedliche Intensitäten der *GUS*-Expression aufweisen (Abb. 3.15). Die Mehrheit der analysierten *Prom<sub>FBK2</sub>::GUS*-Linien zeigen jedoch deutliche Aktivitäten des *FBK2*-Promotors im Vaskularsystem der Stängelblätter sowie in der gesamten Spreite des Rosettenblattes.

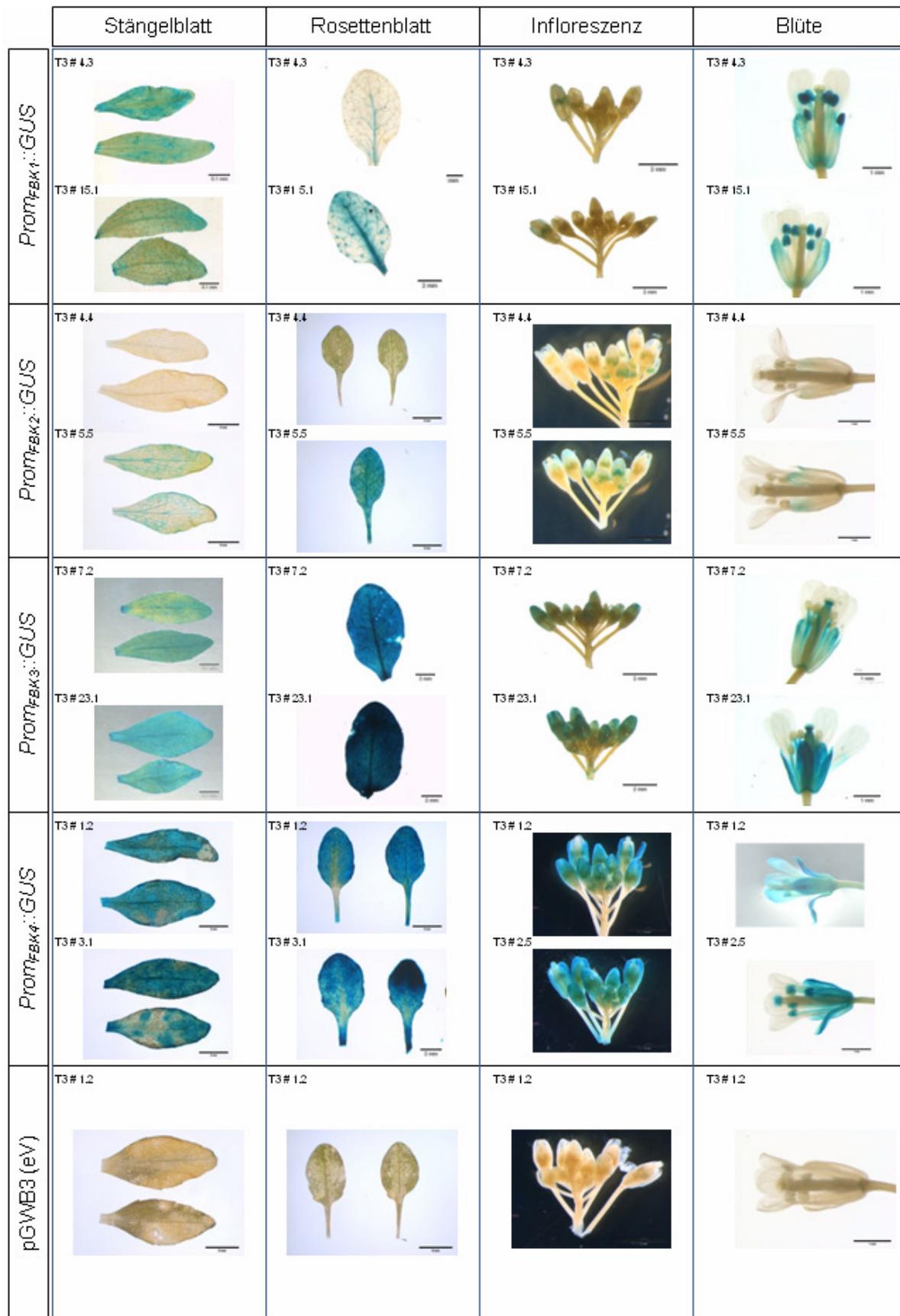
Der Promotor von *FBK3* weist sowohl in den frühen Entwicklungsstadien von *At* als auch in den verschiedenen Organen adulter Pflanzen eine sehr starke Aktivität auf. Vom Embryo über die Keimlingsstadien bis hin zu den unterschiedlichen Organen adulter Pflanzen kann eine starke *GUS*-Expression detektiert werden. Einzig in den Wurzeln sehr junger, vier Tage alter Keimlinge ist keine Aktivität des *FBK3*-Promotors zu beobachten. In nur sechs Tage älteren Keimlingen hingegen ist eine schwache *GUS*-Expression nachweisbar (Abb. 3.14).

Wie der *FBK3*-Promotor weist auch der Promotor von *FBK4* keinerlei Aktivität in Wurzeln von vier Tage alten Keimlingen auf (Abb. 3.14). In allen anderen betrachteten Entwicklungsstadien und Pflanzenorganen ist der *FBK4*-Promotor jedoch aktiv. Ähnlich wie der *FBK3*-Promotor kann eine sehr starke Aktivität des *Prom<sub>FBK4</sub>::GUS*-Konstruktes im Embryo, den verschiedenen Keimlingsstadien sowie in allen untersuchten Organen adulter Pflanzen beobachtet werden.

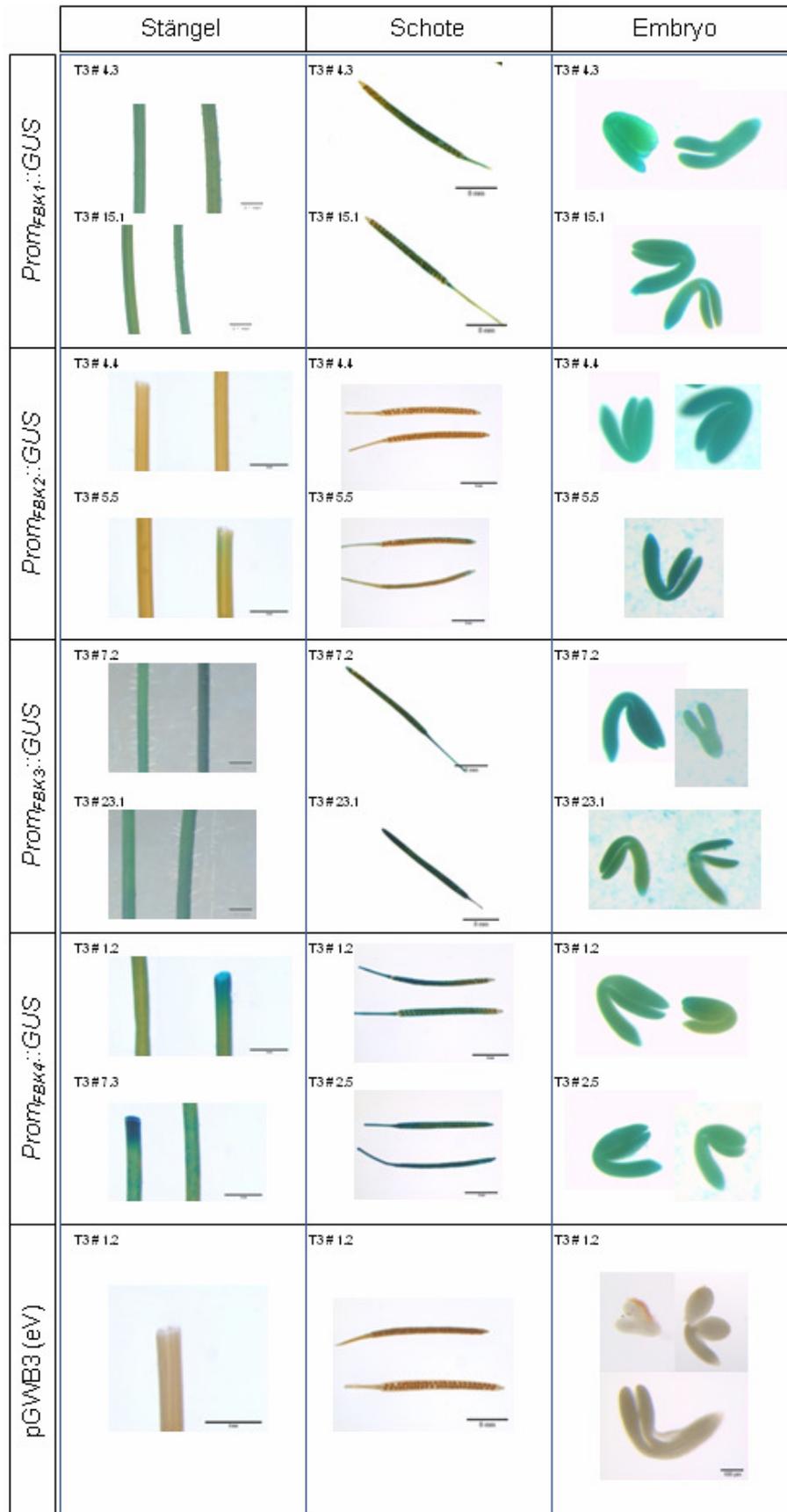
In Übereinstimmung mit den Resultaten der qRT-PCR (Abb. 3.13) ergab der  $\beta$ -Glucuronidase-Reporterassays, dass die Promotoren von *FBK1-4* in mehreren Entwicklungsstadien von *At* aktiv sind. Keiner der vier Promotoren weist eine besondere Spezifität für ein bestimmtes Stadium der pflanzlichen Entwicklung oder für ein bestimmtes Pflanzenorgan auf. Darüber hinaus zeigen die Promotoren von *FBK3* und *FBK4* nahezu identische Aktivitätsmuster.



**Abb. 3.14:** Nachweis der Promotoraktivität von *FBK1-4* mittels *GUS*-Reportersystem in vier und zehn Tage alten Keimlingen von *At*. Für jedes der vier *Prom<sub>FBK</sub>::GUS*-Konstrukte sind jeweils zwei repräsentative, unabhängige homozygote Linien gezeigt. pGWB3 (eV) fungiert als Negativkontrolle. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte auf ATS-Platten bei 20°C im Langtag. Der histochemische  $\beta$ -Glucuronidase-Assay wurde für 16 h bei 37°C durchgeführt.



**Abb. 3.15: Nachweis der Promotoraktivität von *FBK1-4* mittels *GUS*-Reportersystem in Stängel- und Rosettenblättern, Infloreszenzen sowie Blüten von *At*.** Für jedes der vier *Prom<sub>FBK</sub>::GUS*-Konstrukte sind jeweils zwei repräsentative, unabhängige homozygote Linien gezeigt. pGWB3 (eV) fungiert als Negativkontrolle. Die Ernte des Pflanzenmaterials erfolgte von 5-6 Wochen alten Pflanzen, die bei 20°C im Langtag angezogen wurden. Der histochemische  $\beta$ -Glucuronidase-Assay wurde für 16 h bei 37°C durchgeführt.

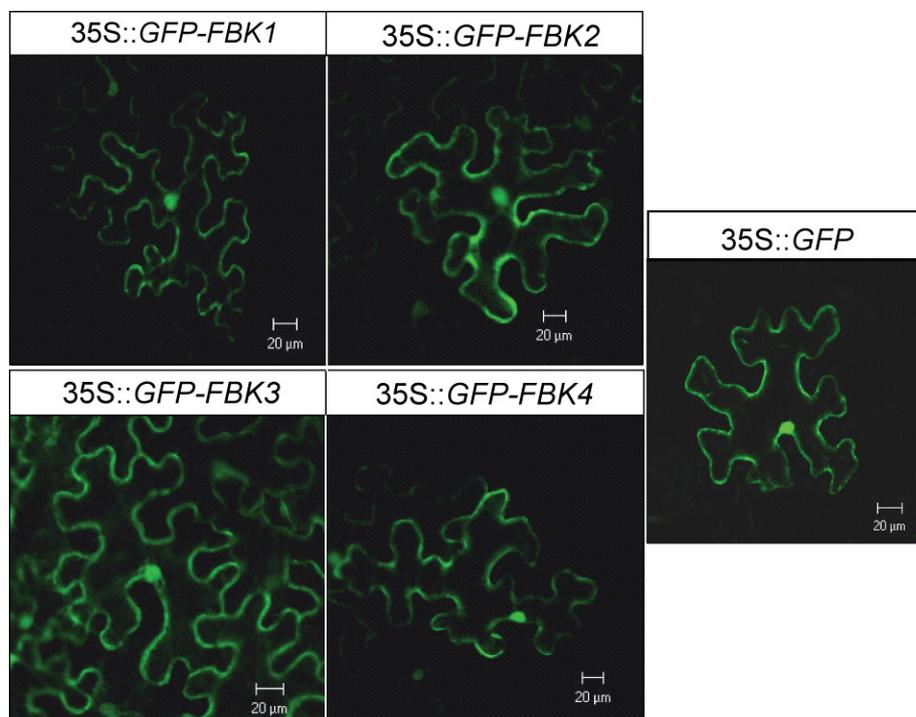


**Abb. 3.16: Nachweis der Promotoraktivität von *FBK1-4* mittels *GUS*-Reportersystem in Stängel, Schoten und Embryos von *At*.** Für jedes der vier *Prom<sub>FBK</sub>::GUS*-Konstrukte sind jeweils zwei repräsentative, unabhängige homozygote Linien gezeigt. pGWB3 (eV) fungiert als Negativkontrolle. Die Ernte der Stängel und Schoten sowie die Isolation der Embryonen erfolgten von 6 Wochen alten Pflanzen, die bei 20°C im Langtag angezogen wurden. Der histochemische  $\beta$ -Glucuronidase-Assay wurde für 16 h bei 37°C durchgeführt.

### 3.2.2.3 Subzelluläre Lokalisation von FBK1-4

Da der Abbau von Proteinen über das Ub/26S-Proteasom sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern erfolgt (Book *et al.* 2009), würde man erwarten, dass funktionelle FBKs ebenfalls in eines oder beide der genannten Zellkompartimente lokalisieren. Um dem nachzugehen, wurden *N. benthamiana* Pflanzen mit *35S::GFP-FBK*-Konstrukten transformiert. Alle vier getesteten Fusionsproteine lokalisieren sowohl in den Zellkern als auch ins Cytoplasma der Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* (Abb. 3.17). Die räumlichen Voraussetzungen für eine Integration von FBK1-4 in einen SCF-Komplex und somit auch in die Ub/26S-Proteasom-Maschinerie sind daher gegeben.

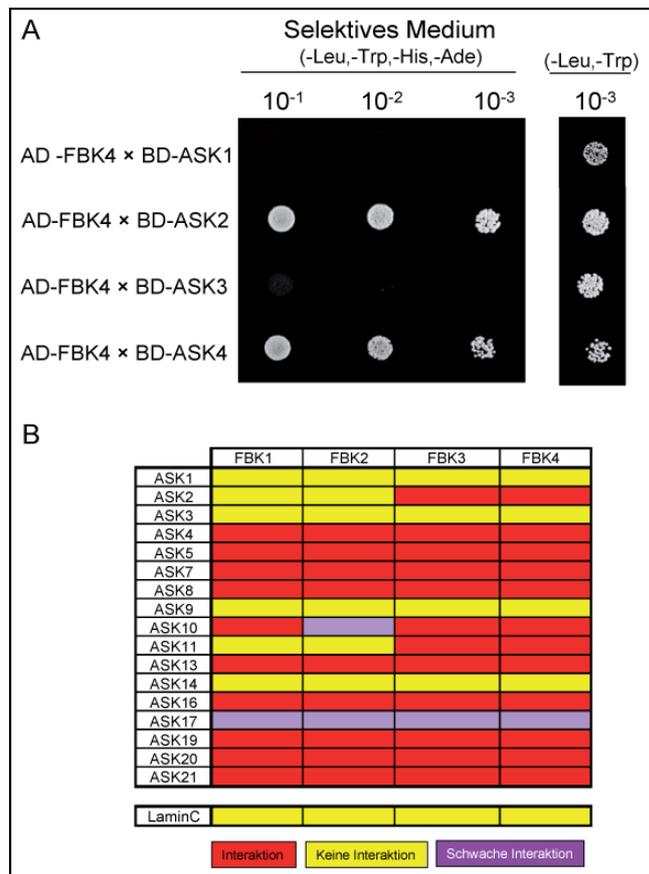
Zusätzlich zu den *35S::GFP-FBK*-Konstrukten wurden Konstrukte transient in *N. benthamiana* transformiert, die für ein GFP-FBK-Fusionsprotein kodieren, das unter dem jeweiligen nativen *FBK*-Promotor exprimiert wurde. Für keines dieser *Prom<sub>FBK</sub>::GFP-FBK*-Konstrukte konnte ein GFP-Signal in den Epidermiszellen der Tabakpflanzen detektiert werden. Auch in *At*-Pflanzen, die stabil mit den verschiedenen *Prom<sub>FBK</sub>::GFP-FBK*-Konstrukten transformiert wurden, konnte kein GFP-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da eine generelle Expression des GFPs unter den verschiedenen nativen *FBK*-Promotoren in *At* mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Abb. 7.3), kann eine fehlerhafte Konstruktion der *Prom<sub>FBK</sub>::GFP-FBK*-Konstrukte ausgeschlossen werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Expression des GFPs unter den nativen Promotoren zu schwach ist, um ein GFP-Fluoreszenzsignal zu erzeugen, welches stärker ist als die Autofluoreszenz der Pflanze und das somit mit dem Laser-Scanning-Mikroskop detektierbar wäre.



**Abb. 3.17: Subzelluläre Lokalisation von GFP-FBK-Fusionsproteinen in Blattepidermiszellen von transient transformierten *N. benthamiana*.** GFP-FBK-Fusionsproteine, die unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert wurden, lokalisieren in den Zellkern und ins Cytoplasma von *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die gezeigten Aufnahmen entstanden im Fluoreszenz-Modus.

### 3.2.2.4 Nachweis der Interaktion von FBK1-4 mit den ASK-Proteinen

Als selektive Untereinheiten von SCF-Komplexen interagieren FBPs über ihre F-Box-Domäne mit den ASK-Adapterproteinen. Um zu untersuchen, ob FBK1-4 tatsächlich in der Lage sind, eines oder mehrere der ASK-Proteine zu binden und somit in einen SCF-Komplex zu integrieren, wurde ein *Yeast-two-Hybrid*-Assays durchgeführt (Abb. 3.18\_A+B). Das Experiment erfolgte analog zu dem in Abschnitt 3.1.8 beschriebenen.



**Abb. 3.18: *Yeast-two-Hybrid*-Assays zum Nachweis der spezifischen Interaktion von FBK1-4 mit 17 ASK-Adaptorproteinen.** Die ASKs wurden an eine Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und im Hefestamm Y187 (Paarungstyp „ $\alpha$ “) exprimiert. FBK1-4 wurden an eine GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) gekoppelt und im Hefestamm AH109 (Paarungstyp „ $a$ “) exprimiert. **A**, Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des Interaktionstests von FBK4 mit ASK1, ASK2, ASK3 und ASK4. Eine positive Interaktion ist durch das Wachstum von Hefekolonien auf selektivem Medium gekennzeichnet. Das Wachstum auf dem Kontrollmedium (-Leu, -Trp) weist nach, dass die dem Interaktionsnachweis vorausgegangene Paarung der zwei Hefestämme erfolgreich war. **B**, Zusammenfassung der Ergebnisse des Interaktionstest von FBK1-4 mit 17 ASKs. Humanes Lamin C fungiert als Negativkontrolle.

Die Zusammenfassung der *Yeast-two-Hybrid*-Interaktionsstudien zeigt, dass alle vier FBKs mit einer Vielzahl der getesteten ASK-Proteine interagieren (Abb. 3.18\_B). FBK1-4 sind daher in der Lage, über ihre F-Box-Domäne in einen SCF-Komplex zu integrieren. Während FBK1 mit elf verschiedenen ASKs interagiert, bindet FBK2 an zwölf ASKs. FBK3 und FBK4 interagieren jeweils mit 13 ASKs. Die Interaktionen der vier FBKs mit ASK17 waren jeweils nur schwach detektierbar. Gleiches gilt für die Interaktion von FBK2 mit ASK10. Auffällig ist, dass die ASK-Interaktionsmuster von FBK1 und FBK2 bzw. FBK3 und FBK4 nahezu identisch sind. Sowohl für FBK1 und FBK2 als auch für FBK3 und FBK4 sind Interaktionen mit annähernd dem gleichen Set an ASK-Proteinen nachweisbar.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die hier getesteten FBKs mit 11-13 ASKs interagieren, besteht die Möglichkeit, dass die tatsächliche Anzahl an FBK/ASK-Interaktionen, die hier ermittelte noch übersteigt. So gelang Risseuw *et al.* (2003) der Nachweis, dass FBK2 und FBK4 auch an ASK1 binden. Interaktionen, die mit dem hier durchgeführten *Yeast-two-Hybrid*-Assay nicht bestätigt werden konnten. Mögliche falsch-negative Ergebnisse könnten das Resultat sehr stringenter

Selektionsbedingungen sein. So gibt es Hinweise darauf, dass zahlreiche stabile Interaktionen, die bei 20°C nachgewiesen wurden, bei einer Inkubationstemperatur von 30°C negativ waren (Risseeuw *et al.* 2003). Auch könnte das Ergebnis einzelner Interaktionstest davon abhängig sein, in welcher Kombination DNA-Binde- bzw. Aktivierungsdomäne an die Interaktionspartner fusioniert wurden.

### 3.2.2.5 *In silico*-Modellierung der Tertiärstruktur von FBK1-4

Kelch-Domänen sind in der Lage, einen sogenannten  $\beta$ -Propeller auszubilden (Ito *et al.* 1994; Adams *et al.* 2000; Li *et al.* 2004). Es liegen Hinweise dafür vor, dass die Ausbildung dieser Tertiärstruktur für die Interaktion mit anderen Proteinen erforderlich ist (Li *et al.* 2004). Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch FBPs mit C-terminaler Kelch-Domäne einen  $\beta$ -Propeller bilden, der die Bindung an das Zielprotein gewährleistet. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Wolfgang Brandt vom IPB in Halle, die Sekundär- und Tertiärstrukturen der F-Box und Kelch-Domänen von FBK1-4 mittels einer Homologie-basierten Modellierungsmethode erstellt. Hierfür wurde zunächst eine BLASTp-Suche mit den Volllänge-Proteinsequenzen der vier FBKs in der PDB-Datenbank durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, die Homologien in den relevanten Proteindomänen aufweisen und deren Tertiärstrukturen bereits aufgeklärt sind (Tab. 7.3). Die Tertiärstrukturen dieser Proteine fungierten dann als Gerüst für die *in silico*-Modellierung.

Die Modellierung ergab, dass die C-terminale Kelch-Domäne aller vier FBKs einen  $\beta$ -Propeller auszubilden scheint (Abb. 3.19\_B-E). Dieser  $\beta$ -Propeller besteht jeweils aus fünf Propellerblättern, die durch vier-strängige  $\beta$ -Faltblätter gebildet werden. Jedes der Kelch-Repeats innerhalb der Kelch-Domäne formt hierbei eines der viersträngigen Propellerblätter (Abb. 3.19, Abb. 7.4\_A+B). Es scheint also, dass FBK1-4, zusätzlich zu den drei gut konservierten und durch die Pfam-Datenbank bestätigten Kelch-Repeats (Abb. 3.19\_A), noch zwei weitere weniger konservierte Kelch-Motive aufweisen, die ebenfalls zur Ausbildung von viersträngigen Propellerblätter in der Lage sind und somit die Propellerstruktur komplettieren (Abb. 7.4\_A+B).

Die F-Box bildet ebenfalls Sekundärstrukturen aus. Im Falle von FBK1 und FBK4 werden durch die F-Box vier  $\alpha$ -Helices, im Falle von FBK2 und FBK3 drei  $\alpha$ -Helices geformt (Abb. 3.19\_B-E, Abb. 7.4\_A+B). Auf Ebene der Sekundärstruktur werden für den Bereich zwischen F-Box und Kelch-Domäne ebenfalls drei (FBK2) bzw. vier (FBK1, FBK3, FBK4)  $\beta$ -Stränge vorhergesagt, die aufgrund fehlender Wasserstoffbrückenbindungen jedoch nicht in der Lage zu sein scheinen, ein Propellerblatt auszubilden (Abb. 3.19, Abb. 7.4\_A+B). Stattdessen erscheinen sie in der Tertiärstruktur als ungeordnete Loops. Am C-terminalen Ende weisen FBK1-4 zudem einen abschließenden  $\beta$ -Strang auf, der möglicherweise für den Verschluss der Propellerstruktur erforderlich ist.



Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *FBK1-4* generell exprimiert werden und die entsprechenden Proteine, wie die übrigen Komponenten des Ub/26S-Proteasoms, in Zellkern und Cytoplasma lokalisieren. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass ASK1-4 mit verschiedenen ASK-Adapteruntereinheiten des SCF-Komplexes interagieren und ihre C-terminale Kelch-Repeat-Domäne in der Lage ist, einen  $\beta$ -Propeller auszubilden. Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich bei *FBK1-4* tatsächlich um funktionelle FBPs handelt, die in der Lage sein könnten, ein oder mehrere bislang unbekannte Substrate zu binden und in den SCF-Komplex zu integrieren.

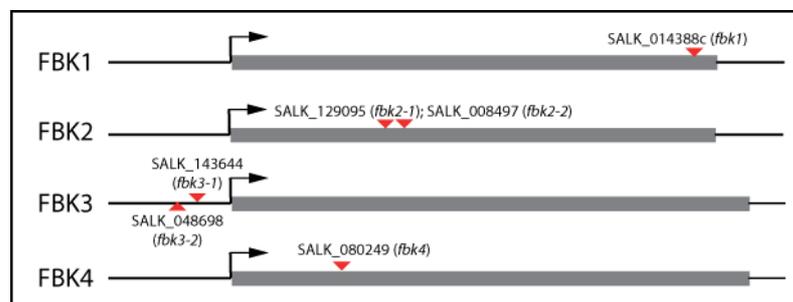
### 3.2.3 Generierung von Knock-Out- und Überexpressionslinien von *FBK1-4*

Da nachgewiesen werden konnte, dass *FBK1-4* die wichtigsten Merkmale funktioneller FBPs aufweisen (Abschnitt 3.2.2), sollte nachfolgend die Frage geklärt werden, innerhalb welcher biologischen Signal- oder Stoffwechselwege die vier FBKs funktionell sind.

Für die funktionelle Charakterisierung von *FBK1-4* wurde ein revers-genetischer Ansatz gewählt. Hierbei sollten Mutanten untersucht werden, in denen die Transkription von *FBK1-4* vollständig unterbunden oder partiell reduziert ist. Mit dem Ziel, die Gene von Interesse auszuschalten, wurden für *FBK1*, *FBK2* und *FBK4* homozygote T-DNA-Insertionslinien selektiert. Da für *FBK3* keine T-DNA-Insertionslinien mit deutlich reduzierten Transkriptmengen isoliert werden konnten, wurde versucht, mittels artifizierender Micro-RNAs (amiRNAs) sowie RNA-Interferenz (RNAi)-Konstrukten die Transkription zu unterbinden. Darüber hinaus sollten Überexpressionslinien erzeugt werden, die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Transkriptmengen von *FBK1-4* aufweisen.

#### 3.2.3.1 Verifizierung der T-DNA-Position in SALK T-DNA-Insertionslinien von *FBK1-4*

Die der SALK-Kollektion entstammenden T-DNA-Insertionslinien für *FBK1* (SALK\_014388c), *FBK2* (SALK\_129095 und SALK\_008497), *FBK3* (SALK\_143644 und SALK\_048698) und *FBK4* (SALK\_080249) wurden von NASC bezogen. Alle Linien befinden sich im Col-0 Hintergrund und wurden unter Verwendung des Vektors pROK2 generiert (Baulcombe *et al.* 1986).



**Abb. 3.20: Position der T-DNAs in den SALK T-DNA-Insertionslinien von *FBK1-4*.** Die Verifizierung der T-DNA-Position erfolgte mittels Sequenzierung, unter Verwendung des T-DNA-spezifischen LBA1-Primers. Rote Pfeile markieren die Position der T-DNA, schwarze Pfeile die Position des Startkodons. Die grauen Balken kennzeichnen Exons, schwarze Linien die 5'- bzw. 3'-untranslatierte Region des jeweiligen Gens. In Klammern sind die neuen Bezeichnungen der Mutanten angegeben.

Um Primer für die Selektion homozygoter Linien generieren zu können, sollte zunächst die exakte Position der T-DNAs im Genom der verschiedenen SALK-Linien verifiziert werden. Hierfür wurde

unter Verwendung des T-DNA-spezifischen LBa1-Primers aus der T-DNA heraus sequenziert. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die T-DNA der SALK-Linien von *FBK1*, *FBK2* und *FBK4* im Exon lokalisiert sind, wohingegen beide analysierten SALK-Linien von *FBK3* eine T-DNA im 5'-untranslatierten Bereich des Gens aufweisen (Abb. 3.20).

### 3.2.3.2 Isolierung homozygoter SALK T-DNA-Insertionslinien

Da die meisten der von NASC bezogenen T-DNA-Linien für das mutierte Allel segregieren, wurde mittels PCR nach homozygoten Individuen gesucht. Als homozygot identifizierte Pflanzen wurden vermehrt und in der nächsten Generation erneut genotypisiert, um die Homozygotie für die T-DNA-Insertion zu bestätigen.

Für die Genotypisierung wurden für jede zu analysierende Pflanze zwei PCRs durchgeführt (Tab. 3.4). Zum einen wurde eine Kombination aus Primern verwendet (*fbk\_frw* + *fbk\_rev*), die spezifisch für das Gen sind, in dem sich die T-DNA befinden soll. Zum anderen wurde ein T-DNA-spezifischer Primer (LBa1) mit einem der beiden genspezifischen Primer kombiniert. Die Wahl des genspezifischen Primers hängt hierbei von der Ausrichtung der T-DNA im Gen ab. Aus der Kombination der Resultate der beiden PCRs lässt sich schließlich der Genotyp ablesen (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4: Verwendete Primerkombinationen zur Bestimmung des Genotyps von T-DNA-Insertionslinien mittels PCR.**

Primerkombination	Amplifikation eines PCR-Produktes		
	1. <i>fbk_frw</i> + <i>fbk_rev</i>	Ja	Ja
2. <i>fbk_frw</i> + LBa1 bzw. LBa1 + <i>fbk_rev</i>	Nein	Ja	Ja
Genotyp	Wildtyp	heterozygot	homozygot

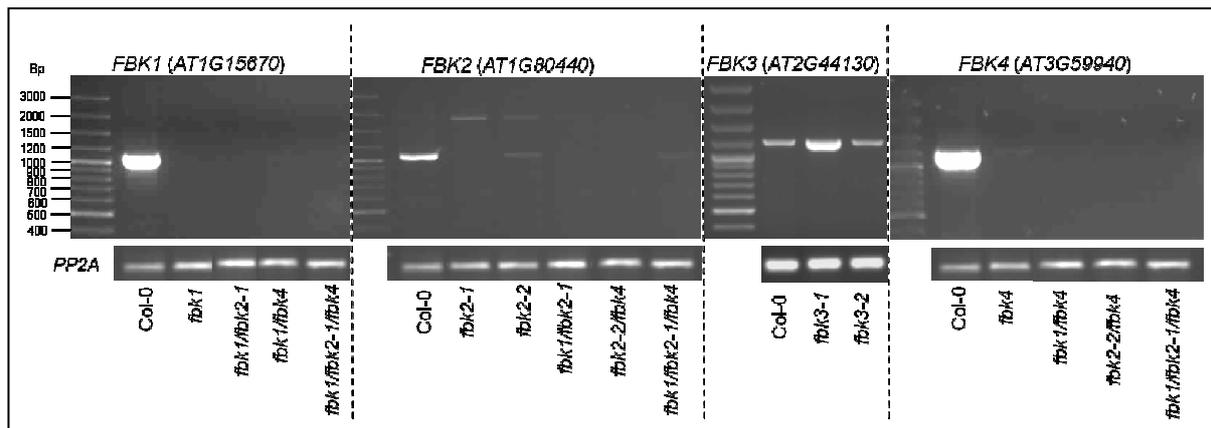
### 3.2.3.3 Nachweis reduzierter Transkriptmengen in den T-DNA-Insertionslinien

Um nachzuweisen, dass die Transkriptmengen der vier *FBKs* in den selektierten homozygoten T-DNA-Linien reduziert sind, wurde RNA aus Keimlingen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente anschließend als Template für eine PCR, um die Transkripte von *FBK1-4* zu amplifizieren. Als Kontrolle und zum Vergleich diente Wildtyp cDNA aus dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0.

Da für die PCR Volllänge-Primer verwendet wurden, die eine Amplifikation der Gene vom Start- bis zum Stoppkodon gewährleisten, sind für die PCRs, in der Col-0 cDNA als Template eingesetzt wurde, Banden folgender Größe zu erwarten: *FBK1* = 1080 Bp, *FBK2* = 1065 Bp, *FBK3* = 1230 Bp, *FBK4* = 1236 Bp. Die Transkripte von *FBK1-4* sind in korrekter Größe im Wildtyp nachweisbar (Abb. 3.21). Im Gegensatz dazu, sind in den T-DNA-Insertionslinien *fbk1*, *fbk2-1*, *fbk2-2* und *fbk4* entweder nur sehr schwache Banden in der korrekten Größe sichtbar, oder es können überhaupt keine Transkripte der entsprechenden *FBKs* mehr detektiert werden. Die T-DNA-Insertionslinien *fbk3-1* und *fbk3-2* weisen keine Reduktion der *FBK3*-Transkriptmengen auf. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür

könnte sein, dass diese beiden SALK-Linien T-DNAs besitzen, die im 5'-untranslatierten Bereich des *FBKs* lokalisiert sind und nicht, wie im Falle der übrigen T-DNA-Linien, im Exon (Abb. 3.20).

Da es Hinweise dafür gibt, dass mehrere der *FBKs* funktionelle Redundanz aufweisen (Abschnitt 3.2.4), wurden die T-DNA-Insertionslinien, die eine deutliche Reduktion der *FBK*-Transkription aufweisen, nachfolgend zur Generierung von multiplen Mutanten durch Kreuzung verwendet. Die Isolierung homozygoter Mehrfachmutanten erfolgte, wie unter Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben, mittels Genotypisierungs-PCR. Wie die Einzelmutanten, weisen auch die aus ihnen hervorgegangenen Doppel- und Tripelmutanten deutlich reduzierte Transkriptmengen von *FBK1-4* auf (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Detektion von RT-PCR-Produkten zum Nachweis reduzierter Transkriptmengen in homozygoten T-DNA-Insertionslinien von *FBK1-4*.** Die Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens *PP2A* liefert den Nachweis, dass gleiche Mengen cDNA als Template eingesetzt wurden. Für *FBK3* konnte keine SALK-Linie mit deutlich reduzierten Transkriptmengen identifiziert werden.

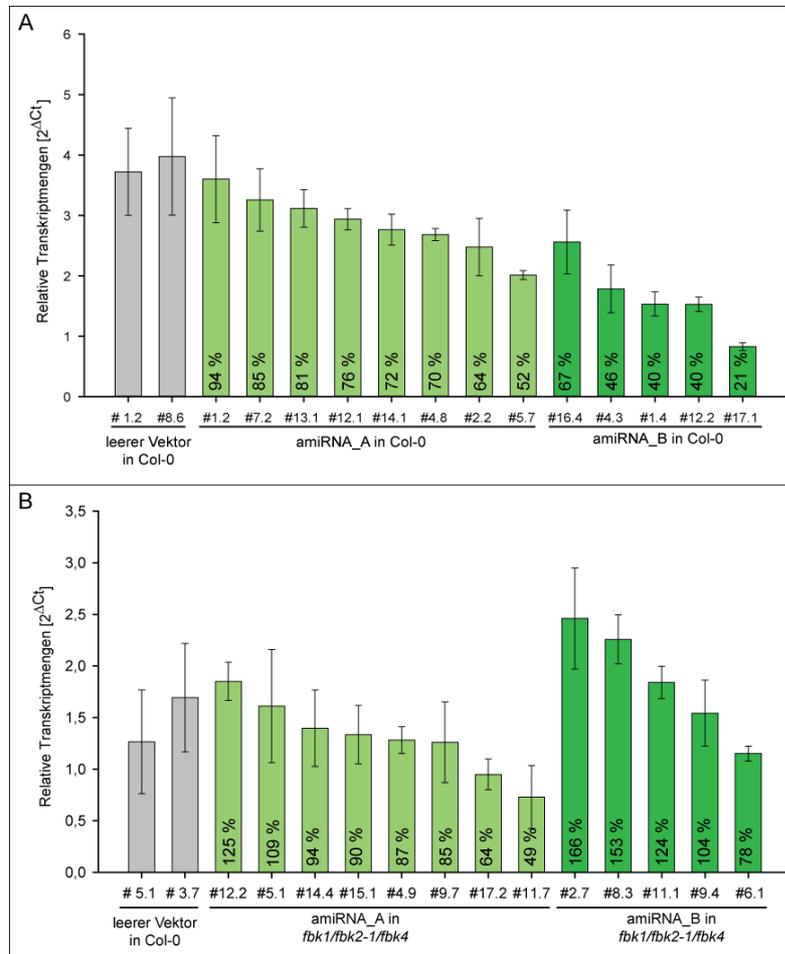
### 3.2.3.4 Reduzierung der Transkription von *FBK3* mittels amiRNAs

Da keine T-DNA-Insertionslinie identifiziert werden konnte, in denen die Transkription von *FBK3* deutlich gegenüber dem Wildtyp reduziert ist (Abb. 3.21), wurde stattdessen versucht, durch Konstruktion von amiRNAs und deren anschließende Transformation in den Wildtyp Col-0, eine Reduktion der *FBK3*-Transkriptmengen zu erzielen.

Micro-RNAs sind endogene einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Größe von 19-24 Ribonukleotiden, die die Expression von Zielgenen negativ regulieren, indem sie als Substratspezifische Untereinheit des sogenannten RNA-induzierten *Silencing* (*RISC*)-Komplexes fungieren (Bartel 2004; Chen 2005; Ouellet *et al.* 2006). Als Bestandteil des *RISC*-Komplexes können Micro-RNAs spezifisch mRNAs binden. Diese werden daraufhin durch die katalytische Aktivität einer weiteren Untereinheit des *RISC*-Komplexes, einem Mitglied der ARGONAUTE-Proteinfamilie, destabilisiert oder translational inhibiert (Höck & Meister 2008). Basierend auf diesem Prinzip können amiRNAs konstruiert werden, die spezifisch die mRNA von einem oder mehreren Genen von Interesse binden und somit deren Expression inhibieren (Schwab *et al.* 2006; Ossowski *et al.* 2008).

Zwei verschiedene amiRNA-Konstrukte (amiRNA\_A bzw. amiRNA\_B) mit Homologien zu unterschiedliche Regionen der *FBK3*-mRNA wurden in den binären Vektor pGWB2 (Nakagawa *et al.* 2007) kloniert und unter Kontrolle eines 35S-Promotors konstitutiv exprimiert. Mit dem Ziel *fbk3*-

Einzelmutanten zu generieren, wurde der Wildtyp Col-0 stabil mit den amiRNA-Konstrukten transformiert. Um eine Quadrupelmutante zu erzeugen, erfolgte zudem die Transformation der 35S::*amiRNA<sub>FBK3</sub>*-Konstrukte in die *fbk1/fbk2-1/fbk4* Tripelmutante. Durch Selektion auf die vom pGWB2-Vektor vermittelte Hygromycin-Resistenz, konnten mehrere unabhängige Linien identifiziert werden, in denen die amiRNA-Konstrukte homozygot vorliegen.



**Abb. 3.22: Beeinflussung der Transkription von *FBK3* durch amiRNAs.** Die Transkriptmengen von *FBK3* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Als Template für die PCR fungierte cDNA aus neun Tage alten Keimlingen unabhängiger homozygoter amiRNA-Linien im Col-0 (A) bzw. *fbk1/fbk2-1/fbk4* (B) Hintergrund. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, der sich aus je drei biologischen Replikaten ableitet. Der Anteil der Transkriptmengen von *FBK3* in den Mutanten gegenüber dem Mittelwert der beiden Kontrollen (leerer Vektor) ist als prozentualer Wert angegeben.

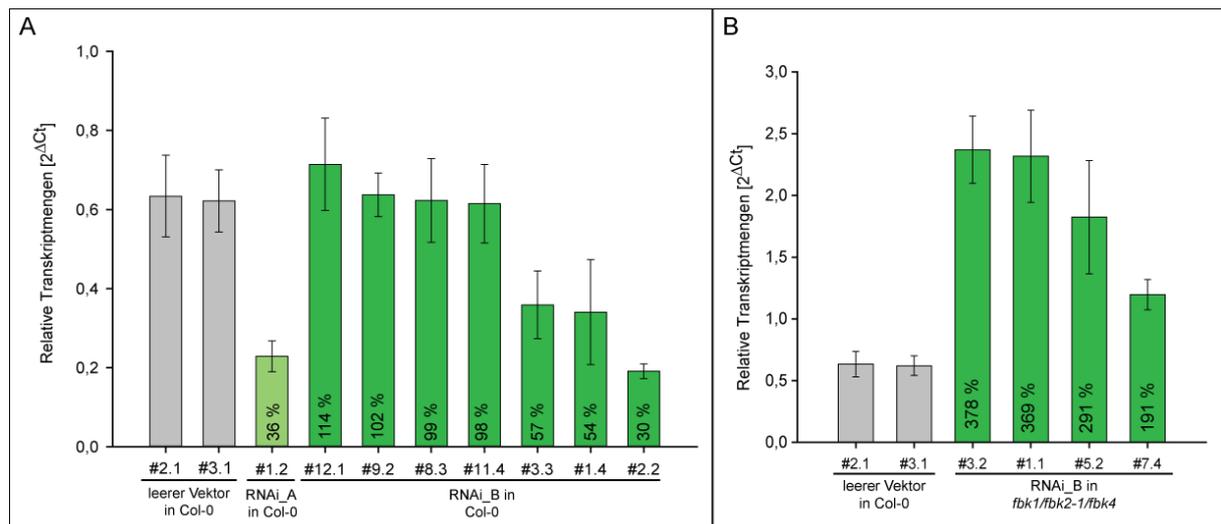
Mittels qRT-PCR wurde anschließend überprüft, ob die homozygoten amiRNA-Linien reduzierte *FBK3*-Transkriptmengen aufweisen (Abb. 3.22). Auf diese Weise konnte eine Mutante im Col-0 Hintergrund identifiziert werden, deren *FBK3*-Transkriptmengen auf 21 % des Wildtypgehaltes reduziert sind (Abb. 3.22\_A; #17.1). Darüber hinaus weisen zwei weitere Linien, die ebenfalls das amiRNA\_B Konstrukt enthalten, gegenüber der Kontrolle auf 40 % verringerte Transkriptmengen von *FBK3* auf (#1.4 und #12.2). Col-0 Linien, die das amiRNA\_A-Konstrukt aufweisen, zeigen eine Reduktion der *FBK3*-Transkripte um maximal 48 %. Das amiRNA\_B-Konstrukt, das im Wildtyp zu einer deutlichen Reduktion der *FBK3*-Transkriptmengen führt, bewirkt im Hintergrund der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* meist keine Inhibierung der *FBK3*-Expression (Abb. 3.22\_B). Auch das amiRNA\_A Konstrukt führt im Hintergrund der Tripelmutante wenn überhaupt nur zu einer moderaten Verringerung der Expression von *FBK3*.

Da der gewählte amiRNA-basierte Ansatz zwar zur Isolierung einer *fbk3*-Einzelmutante führte, die deutlich reduzierten *FBK3*-Transkriptmengen aufweist, jedoch keine entsprechende *fbk1/fbk2/fbk3/fbk4* Quadrupelmutante isoliert werden konnte, wurde parallel versucht, mittels RNAi-Konstrukten die *FBK3*-Expression zu reduzieren.

### 3.2.3.5 RNAi-basierter Ansatz zur Reduktion der Transkriptmengen von *FBK3*

Parallel zu den amiRNA-Linien wurden transgene Col-0 und *fbk1/fbk2-1/fbk4* Pflanzen generiert, die eines von zwei verschiedenen RNAi-Konstrukten tragen. Die RNAi-Konstrukte führen in der Pflanze zur Ausbildung von ca. 400 Bp langen doppelsträngigen RNA (dsRNA)-Molekülen (Helliwell & Waterhouse 2005). Diese dsRNAs werden in *At* durch spezielle Nukleasen, Vertretern der Dicer-like (DCL)-Familie, in 18-24 Bp lange *small interfering RNAs* (siRNA) zerlegt. Wie die Micro-RNAs, inhibieren auch siRNAs die Expression von Zielgenen, indem einer der beiden siRNA-Stränge in einen RISC-Komplex integriert und dadurch den Abbau von mRNAs vermittelt, die eine hohe Sequenzhomologie zur siRNA aufweisen.

Die Konstruktion der RNAi-Konstrukte (RNAi\_A bzw. RNAi\_B) erfolgte im binären Vektor pHELLSGATE8 (Helliwell & Waterhouse 2005). Anschließend wurden die Konstrukte in Col-0 und *fbk1/fbk2-1/fbk4* Pflanzen transformiert und später nach Linien gesucht, in denen die RNAi-Konstrukte homozygot vorliegen. Tripelmutanten, in denen das RNAi\_A-Konstrukt homozygot vorliegt, konnten nicht identifiziert werden. Mittels qRT-PCR konnten zwei RNAi-Linien im Col-0 Hintergrund identifiziert werden, die gegenüber der Kontrolllinie deutlich reduzierte Transkriptmengen von *FBK3* aufweisen (Abb. 3.23\_A; #1.2 und #2.2). Im Gegensatz dazu führte keines der RNAi-Konstrukte, das sich im Hintergrund der Tripelmutante befindet, zu einer Verminderung der *FBK3*-Transkriptmengen (Abb. 3.23\_B).



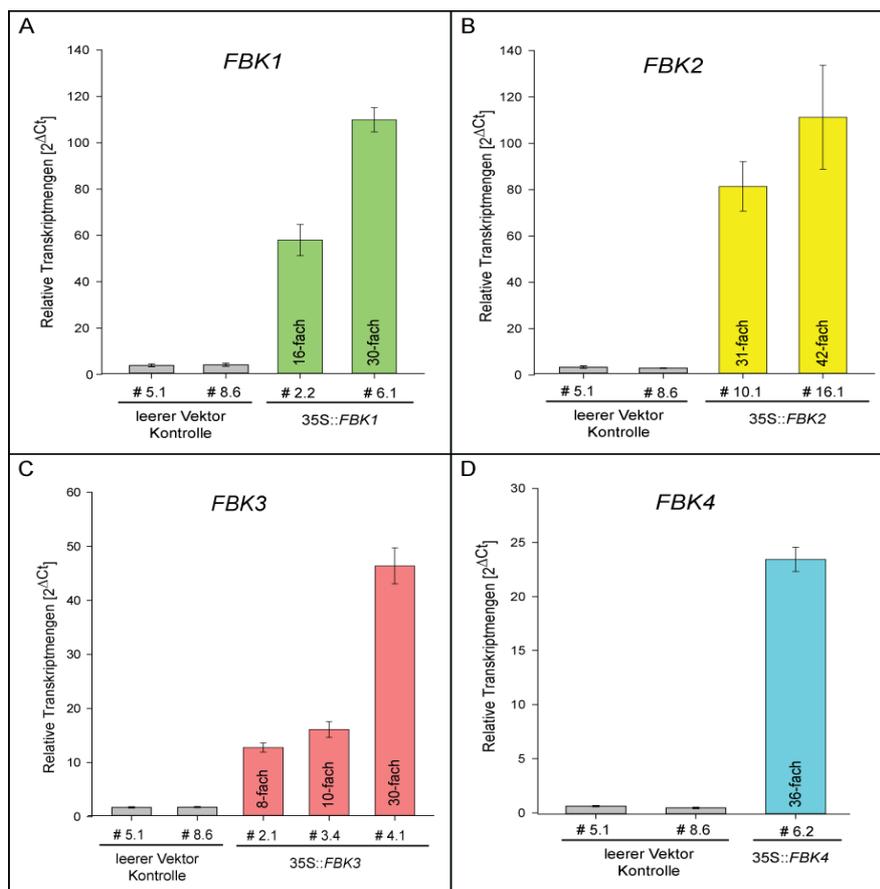
**Abb. 3.23: Beeinflussung der Transkription von *FBK3* durch RNAi-Konstrukte.** Die Transkriptmengen von *FBK3* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Als Template für die PCR fungierte cDNA aus neun Tage alten Keimlingen unabhängiger homozygoter RNAi-Linien im Col-0 (A) bzw. *fbk1/fbk2-1/fbk4* (B) Hintergrund. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, der sich aus je drei biologischen Replikaten ableitet. Der Anteil der Transkriptmengen von *FBK3* in den Mutanten gegenüber dem Mittelwert der beiden Kontrollen ist als prozentualer Wert angegeben.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass weder amiRNA- noch RNAi-Konstrukte eine Verringerung der *FBK3*-Transkriptmengen im Hintergrund der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Mutante bewirken, könnten Silencing-Effekte sein, die auf der Präsenz multipler 35S-Promotoren beruhen (Daxinger *et al.* 2008). Die Beobachtung, dass die *FBK3*-Transkriptmengen im Hintergrund der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Mutante oftmals gegenüber der Kontrolle erhöht sind (3.22\_B und 3.22\_B), könnte in der funktionellen Redundanz der *FBKs* begründet liegen, die dazu führt, dass der Ausfall eines oder mehrerer der vier *FBKs* durch eine Überexpression der verbliebenen intakten *FBKs* kompensiert wird (vergl. Abschnitt 3.2.4).

### 3.2.3.6 Nachweis erhöhter Transkriptmengen von *FBK1-4* in Überexpressionslinien

Mit dem Ziel Pflanzenlinien zu erzeugen, in denen jeweils eines der vier *FBKs* überexprimiert wird, wurden die Gene *FBK1-4* zunächst in den binären Vektor pGWB2 (Nakagawa *et al.* 2007) kloniert, wo sie unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors exprimiert wurden. Anschließend erfolgte die Transformation der Überexpressionskonstrukte in den Wildtyp Col-0. Nach der Selektion von Pflanzenlinien, in denen das jeweilige 35S::*FBK* Konstrukt homozygot vorliegt, wurden die Transkriptmengen von *FBK1-4* mittels qRT-PCR gemessen.

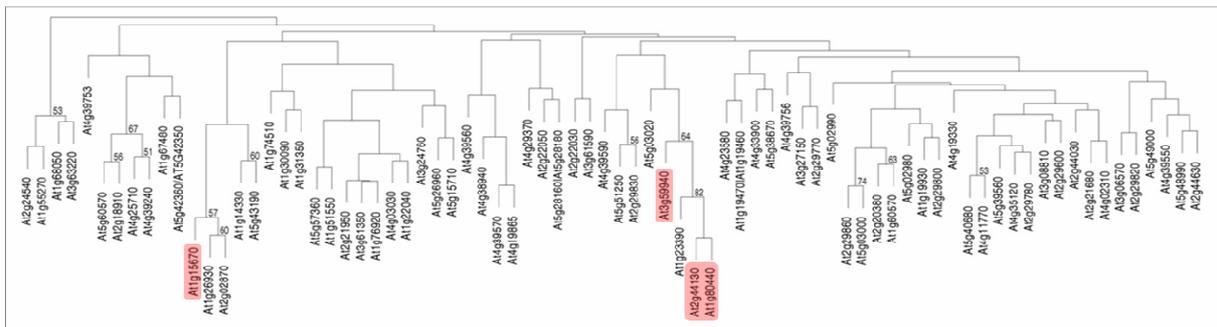
Für jedes der vier *FBKs* konnten eine oder mehrere unabhängige Überexpressionslinien identifiziert werden, die gegenüber den Kontrolllinien deutlich erhöhte Transkriptmengen aufweisen (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Q-RT-PCR zum Nachweis erhöhter Transkriptmengen von *FBK1-4* in Überexpressionslinien.** Als Template für die PCR fungierte cDNA aus acht Tage alten Keimlingen von unabhängigen homozygoten Überexpressionslinien. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, der sich aus je drei biologischen Replikaten ableitet. Die Erhöhung der Transkriptmengen von *FBK1-4* in den Überexpressionslinien gegenüber dem Mittelwert der beiden Kontrollen ist als X-facher Wert angegeben.

### 3.2.4 Analysen zum Nachweis potentieller funktioneller Redundanz von *FBK1-4*

Für einige FBPs, wie TIR1 und die AFBs (Dharmasiri *et al.* 2005), EIN2-TARGETING PROTEIN 1/2 (ETP1/2) (Qiao *et al.* 2009) sowie ZTL, FKF1 und LKP2 (Baudry *et al.* 2010; Ito *et al.* 2012; Lou *et al.* 2012), wurde bereits eine partielle funktionelle Redundanz aufgezeigt. Um zu überprüfen, ob auch die enge phylogenetische Verwandtschaft von *FBK1-4* (Abb. 3.12) auf eine (partielle) funktionelle Redundanz der vier *FBKs* schließen lässt, wurden zunächst öffentlich verfügbare Micro-Array-Daten der *Bio-Array Resource* (BAR)-Datenbank für eine Co-Expressionsanalyse herangezogen. Die in die Analyse einbezogenen Datensets beinhalten Informationen zur Responsivität von 81 der 103 *FBKs* des *A. thaliana* Ökotyps Col-0 nach Behandlung mit abiotischen Stressoren (*AtGenExpress\_Stress Series*), Pathogenen (*AtGenExpress\_Pathogen Series*) sowie Phytohormonen und deren Inhibitoren (*AtGenExpress\_Hormon Series*). Basierend auf diesen Expressionsdaten wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt, die zeigt, dass *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* eng zusammen gruppieren (Abb. 3.25). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Expression dieser drei Gene nach Behandlung mit abiotischen und biotischen Stressoren auf ähnliche Weise beeinflusst wird. Die Ähnlichkeit der Responsivität macht zumindest eine partielle funktionelle Redundanz wahrscheinlich.

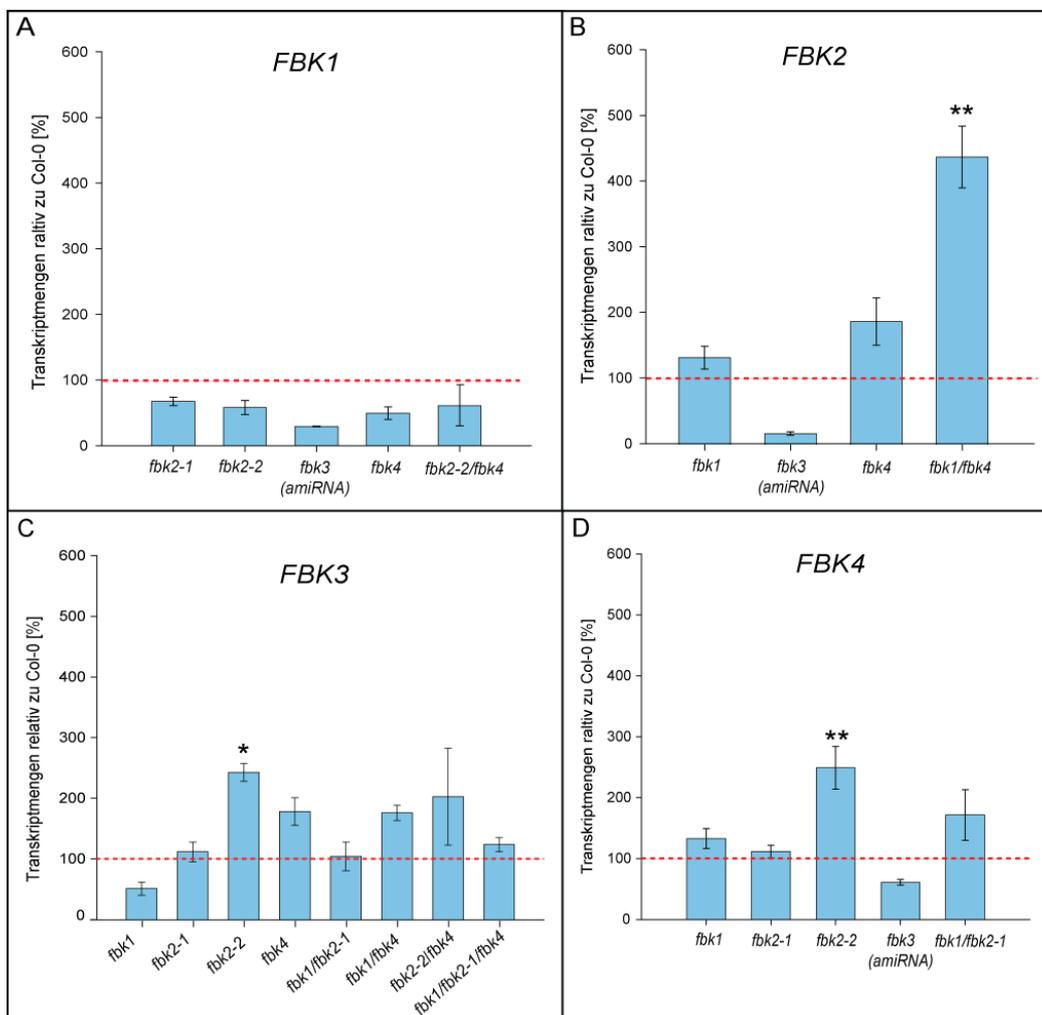


**Abb. 3.25: Drei der vier *FBKs* zeigen ähnliche Responsivität auf abiotische und biotische Stressoren.** Cluster-Analyse, basierend auf den Daten der *AtGenExpress\_Stress Series/Pathogen Series/Hormon Series* von 81 *AtFBKs*. Die Cluster-Analyse spiegelt die Co-Expression der Gene nach Behandlung mit verschiedenen biotischen und abiotischen Stressoren sowie Phytohormonen wieder. 22 der 103 *AtFBKs* sind nicht auf dem ATH1-Microarray vorhanden. Die Ziffern an den Gabelungen entsprechen Bootstrap-Werten > 50. *FBK1-4* sind rot unterlegt.

Homologe Gene mit partiell oder vollständig überlappenden Funktionen sind häufig durch negative Feedback-Loops co-reguliert. In Folge dessen kann der Ausfall eines der Gene zur Überexpression von einem oder mehreren der anderen homologen Gene führen. Auf diese Weise soll der Aktivitätsverlust des ausgefallenen Gens kompensiert werden (Kafri *et al.* 2009). Ob auch die hier untersuchten *FBK*-Gene auf diese Weise co-reguliert werden, sollte mittels Transkriptmessungen in den zuvor generierten Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten von *FBK1*, *FBK2* und *FBK4* (Abb. 3.21) sowie in einer der amiRNA-Linien von *FBK3* (amiRNA\_B in Col-0 # 17.1, Abb. 3.22\_A) untersucht werden.

Messungen der Transkriptmengen von *FBK1* in Mutantenlinien, in denen *FBK2*, *FBK3* und/oder *FBK4* inaktiv sind, bestätigen zunächst die Resultate der *in silico* Expressionsanalysen (Abb. 3.25), die darauf hindeuten, dass *FBK1* mit keinem der anderen drei *FBKs* co-reguliert zu sein scheint. Eine

Erhöhung der *FBK1*-Transkription in Einzel- und Doppelmutanten von *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* ist nicht zu beobachten (Abb. 3.26\_A). Zudem sind die Transkriptmengen von *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* in der *fbk1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant erhöht (Abb. 3.26\_B-D). Für *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* hingegen gibt es Hinweise auf eine Co-Regulation. So führt beispielsweise der Verlust von *FBK4* zur verstärkten Transkription von *FBK2* (Abb. 3.26\_B) und umgekehrt der Verlust von *FBK2* in *fbk2-2* zur Erhöhung der *FBK4*-Transkription (Abb. 3.26\_D). Interessanterweise zeigt die Doppelmutante *fbk1/fbk4* eine höhere *FBK2*-Expression als die *fbk1*- oder *fbk4* -Einzelmutante. Den Resultaten der Clusteranalyse widersprechend (Abb. 3.25), deutet dies auf ein Zusammenspiel von *FBK1*, *FBK2* und *FBK4* hin, bei dem *FBK2* vor allem dann in seiner Expression verstärkt wird, wenn mehrere der übrigen *FBKs* transkriptionell reprimiert sind. Bezüglich der *FBK3*-Expression kann beobachtet werden, dass sie zwar in *fbk2-2* signifikant erhöht ist, in allen anderen getesteten Mutanten jedoch nur moderat ansteigt oder auf WT-Niveau verbleibt (Abb. 3.26\_C).



**Abb. 3.26: Bestimmung der Transkriptmengen von *FBK1-4* in Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten von *FBK1-4*.** Dargestellt sind die Transkriptmengen von *FBK1-4* in den verschiedenen Knock-Out-Linien relativ zum Wildtyp Col-0 in %. Die Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Als Template für die PCR fungierte cDNA aus sieben Tage alten Keimlingen der verschiedenen Knock-Out-Linien sowie des Wildtyps Col-0. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, der sich aus je drei biologischen Replikaten ableitet. Die gestrichelte Linie markiert die Transkriptmengen im Wildtyp Col-0 (= 100 %). Zum Test der Signifikanz wurden eine einfaktorielle ANOVA auf Basis der  $\Delta$ Ct-Werte durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).

Sowohl die Cluster- als auch die Expressions-Analyse liefern Hinweise, die für eine funktionelle Redundanz von *FBK2* und *FBK4* sprechen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch *FBK1* und *FBK3* funktionelle Überlappungen mit *FBK2* und/oder *FBK4* aufweisen.

Für die sich anschließenden Analysen zur funktionellen Charakterisierung der vier FBKs bedeutet dies, dass der Einsatz einer Quadrupelmutante aus *FBK1-4* die Wahrscheinlichkeit maximieren würde, Unterschiede zur Wildtyp-Kontrolle zu detektieren. Für *FBK3* konnte bislang jedoch keine T-DNA-Insertionslinie mit deutlich reduzierter *FBK3*-Transkription isoliert werden (Abb. 3.21). Auch führte ein amiRNA- bzw. RNAi-basierter Ansatz nicht zur Generierung einer *fbk1/fbk2-1/fbk3/fbk4* Quadrupelmutante (Abb. 3.22\_B und 3.23\_B). Aus diesem Grund wurden die folgenden Analysen zur funktionellen Charakterisierung mit der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie mit den vier Überexpressionslinien von *FBK1-4* durchgeführt.

### 3.2.5 Micro-Array-Analysen

Eine Vielzahl der bereits funktionell charakterisierten FBPs (z.B. TIR1, COI1, ETP1/2), stellen Komponenten innerhalb von Signalwegen dar, über die die Expression anderer Gene reguliert wird (Ruegger *et al.* 1998; Xu *et al.* 2002; Yan *et al.* 2009; Qiao *et al.* 2009). Wenn auch *FBK1-4* in solchen Signalwege involviert sind, würde man veränderte Expressionsmuster in den Mutanten von *FBK1-4* erwarten, was Rückschluss auf die Funktion der *FBKs* zuließe. Um Informationen darüber zu erhalten, in welchem biologischen Signalweg die *FBKs* von Interesse involviert sind, wurden mit der verfügbaren Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* Micro-Array-Analysen durchgeführt. Die Micro-Array-Analysen erfolgten unter Verwendung des ATH1-Expressionsarrays von Affymetrix, der ca. 24000 *At*-Gene repräsentiert und die Identifizierung differentiell regulierter Gene im Vergleich zum Wildtyp ermöglicht. In separaten Ansätzen wurden unbehandelte, neun Tage alte Keimlinge sowie Blüten im Blühstadium 15 (Alvarez-Buylla *et al.* 2010) analysiert, da im Wildtyp-Hintergrund in diesen Entwicklungsstadien eine deutliche Expression aller vier *FBKs* nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13, 3.14, 3.15).

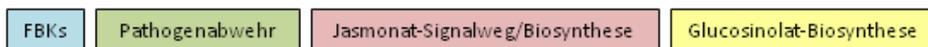
In Keimlingen der Tripelmutante konnten insgesamt 38 differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Davon sind 36 Gene in ihrer Transkription um mindestens das Zweifache gegenüber dem Wildtyp verringert (Tab. 3.5). Die beiden am stärksten in der Tripelmutante reprimierten Gene sind *FBK4* und *FBK2*. Zudem weist auch *FBK1* gegenüber dem Wildtyp deutlich reduzierte Transkriptmengen auf. Diese Ergebnisse belegen somit erneut den Status von *fbk1/fbk2-1/fbk4* als Tripelmutante. Auffällig ist, dass ein Großteil der übrigen reprimierten Gene, denen bislang eine biologische Funktion zugeordnet werden konnte (16 von 24), entweder an Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt ist und/oder eine Rolle bei Verwundungsreaktionen in Folge von Herbivorie spielt. So sind zwölf Gene (Tab. 3.5; grün markiert) unmittelbar an der Salicylsäure-abhängigen oder -unabhängigen Abwehr gegen Pilze, Bakterien oder Viren beteiligt. Zwei Gene (*JASMONATE RESISTANT 1* [*JARI*] und *LIPOXYGENASE 2* [*LOX2*]) sind Komponenten der Jasmonatbiosynthese bzw. des Jasmonatsignalweges. Außerdem finden sich unter den reprimierten Genen zwei

Komponenten der Glukosinolatbiosynthese (*BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4* [*BCAT4*] und *METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 1* [*MAM1*]). Sowohl das Phytohormon Jasmonat als auch die Familie der Glukosinolate stellen wichtige Komponenten der pflanzlichen Abwehr von *At* gegen Pathogene und Herbivore dar (Halkier & Gershenzon 2006; Koo & Howe 2009). Nur zwei Gene wurden identifiziert, deren Transkriptmengen mindestens zweifach gegenüber dem Wildtyp erhöht sind. Eines dieser Gene kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Motiv. Dem zweiten Gen konnte bislang noch keine Funktion zugeordnet werden.

**Tab. 3.5: Differenziell exprimierte Gene in neun Tage alten Keimlingen von *fbk1/fbk2-1/fbk4* mit einem signifikanten ( $P < 0,05$ ; Benjamini Hochberg korrigiert) Expressionsunterschied von mindestens zwei ( $\Delta\log_2 > 1$ ) im Vergleich zum Wildtyp Col-0.**

	Gen	AGI	Keimlinge: Col-0 vs. <i>fbk1/fbk2-1/fbk4</i> X-fache Reduktion gegenüber Col-0	Biologische Funktion
1	<i>FBK4</i>	AT3G59940	54,764	
2	<i>FBK2</i>	AT1G80440	42,372	
3	<i>PCC1</i>	AT3G22231	13,929	Antwort auf Bakterien und Pilze
4	<i>JAR1</i>	AT2G46370	13,861	Konjugation von MeJA to JA-Ile
5		AT3G59950	12,132	Autophagie, Proteintransport
6		AT2G44920	10,746	
7	<i>LURP1</i>	AT2G14560	7,506	Antwort auf Salizylsäure-Stimulus, Antwort auf Pilzbefall
8	<i>WAK1</i>	AT1G21250	5,984	Antwort auf Salizylsäure, Antwort auf Pilz- und Virusbefall
9	<i>ECS1</i>	AT1G31580	5,526	Abwehrreaktionen
10		AT5G03350	5,340	
11		AT2G25510	4,730	
12	<i>WRKY70</i>	AT3G56400	4,531	Komponente des Jasmonat- und Salizylsäuresignalweges
13	<i>PR1</i>	AT2G14610	3,671	Systemisch erworbene Resistenz (SAR)
14		AT5G35940	3,480	
15		AT5G52750	3,270	Transport von Metallionen
16	<i>SIB1</i>	AT3G56710	3,154	Antwort auf Bakterieninfektion
17		AT5G10760	2,920	Proteolyse
18		AT5G52760	2,919	Transport von Metallionen
19		AT2G41090	2,835	
20	<i>LOX2</i>	AT3G45140	2,575	Jasmonat-Biosynthese
21		AT3G45160	2,553	
22		AT3G60420	2,549	
23	<i>BCAT4</i>	AT3G19710	2,529	Glucosinolat-Biosynthese
24		AT4G14365	2,470	
25	<i>CRK6</i>	AT4G23140, AT4G23160	2,276	Phosphorylierung von Proteinen
26	<i>PLA2A</i>	AT2G26560	2,266	Oxylipin-Biosynthese, Antwort auf Virusbefall
27	<i>ATGSTF14</i>	AT1G49860	2,184	Katabolische Prozesse; Umsetzung von Toxinen
28	<i>PBS3</i>	AT5G13320	2,173	Antwort auf Pilz- und Bakterienbefall, Antwort auf Salizylsäure
29		AT5G25250, AT5G25260	2,121	
30	<i>FBK1</i>	AT1G15670	2,114	
31	<i>MAM1</i>	AT5G23010	2,086	Glucosinolat-Biosynthese
32	<i>ATNUDT6</i>	AT2G04450	2,075	Positiver Regulator des Salizylsäuresignalweges
33		AT3G16670	2,072	Antwort auf oxidativen Stress
34	<i>HR4</i>	AT3G26560, AT3G50480	2,035	Antwort auf andere Organismen
35		AT4G04840	2,013	Elektronentransportkette
36	<i>WRKY46</i>	AT2G46400	2,011	Transkription, Antwort auf Pathogene

	Gen	AGI	X-fache Erhöhung gegenüber Col-0	Biologische Funktion
1		AT2G16005	2,092	
2	<i>BHLH039</i>	AT3G56980	2,064	Transkription



In den Blüten von *fbk1/fbk2-1/fbk4* konnten insgesamt 15 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden (Tab. 3.6). Zehn dieser Gene weisen gegenüber dem Wildtyp mindestens zweifach reduzierte Transkriptmengen auf. Hierzu gehören *FBK1*, *FBK2* und *FBK4*. Auch *JAR1* ist in Blüten der Tripelmutante, wie auch in Keimlingen, in seiner Transkription deutlich reprimiert. Zwei weitere Gene, die sowohl in Keimlingen als auch in Blüten von *fbk1/fbk2-1/fbk4* stark reduzierte Transkriptmengen aufweisen, sind *AT3G59950*, das im Proteintransport involviert ist, sowie

*AT2G44920*, das funktionell bislang noch nicht eingeordnet werden konnte. Da *AT3G59950* unmittelbar neben *FBK4* (*AT3G59940*) liegt, ist nicht sicher, ob die differentielle Transkription von *AT3G59950* allein durch den Funktionsverlust eines der drei *FBKs* hervorgerufen wird. Es besteht auch die Möglichkeit, dass *AT3G59950* indirekt durch einen *trans*-Effekt der T-DNA, die im *FBK4* Gen lokalisiert ist, beeinflusst wird.

Fünf Gene sind in den Blüten der Tripelmutante gegenüber dem Wildtyp stärker exprimiert (Tab. 3.6). Darunter befindet sich zwei Gene (*AT3G59930* und *AT5G33355*), die für Defensine kodieren und die aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie nicht auf dem ATH1-Expressionschip unterscheidbar sind. Auch *AT3G59930* liegt unmittelbar neben *FBK4* (*AT3G59940*), so dass eine Beeinflussung der Transkription von *AT3G59930* durch die sich im *FBK4* Gen befindende T-DNA nicht ausgeschlossen werden kann.

**Tab. 3.6: Differentiell exprimierte Gene in Blüten von *fbk1/fbk2-1/fbk4* mit einem signifikanten ( $P < 0,05$ ; Benjamini Hochberg korrigiert) Expressionsunterschied von mindestens zwei ( $\text{Alog}_2 > 1$ ) im Vergleich zum Wildtyp Col-0.**

	Gen	AGI	Blüten: Col-0 vs. <i>fbk1/fbk2-1/fbk4</i>	Biologische Funktion
			X-fache Reduktion gegenüber Col-0	
1	<i>FBK4</i>	<i>AT3G59940</i>	24,405	
2		<i>AT3G59950</i>	10,714	Autophagie, Proteintransport
3		<i>AT2G44920</i>	8,774	
4	<i>FBK2</i>	<i>AT1G80440</i>	8,525	
5	<i>FBK1</i>	<i>AT1G15670</i>	3,286	
6	<i>JAR1</i>	<i>AT2G46370</i>	2,808	Konjugation von MeJA to JA-IIe
7	<i>ATHSFA2</i>	<i>AT2G26150</i>	2,435	Antwort auf Hypoxie; Hitzeaklimation
8	<i>CYP707A2</i>	<i>AT2G29090</i>	2,293	Lichtantwort; Abscisinsäure-Metabolismus; Dormanz
9		<i>AT1G68860</i>	2,180	Metabolische Prozesse
10	<i>ATGSTU3</i>	<i>AT2G29470</i>	2,003	Katabolische Prozesse; Umsetzung von Toxinen

	Gen	AGI	X-fache Erhöhung gegenüber Col-0	Biologische Funktion
1	<i>ATSD1</i>	<i>AT5G48850</i>	4,480	Antwort auf Schwefelmangel
2		<i>AT3G59930, AT5G33355</i>	3,760	Antwort auf Pilzbefall
3		<i>AT4G09470</i>	3,225	
4		<i>AT1G04770</i>	2,308	
5	<i>DIN10</i>	<i>AT5G20250</i>	2,145	Kohlenhydrat-Metabolismus; Kälteantwort



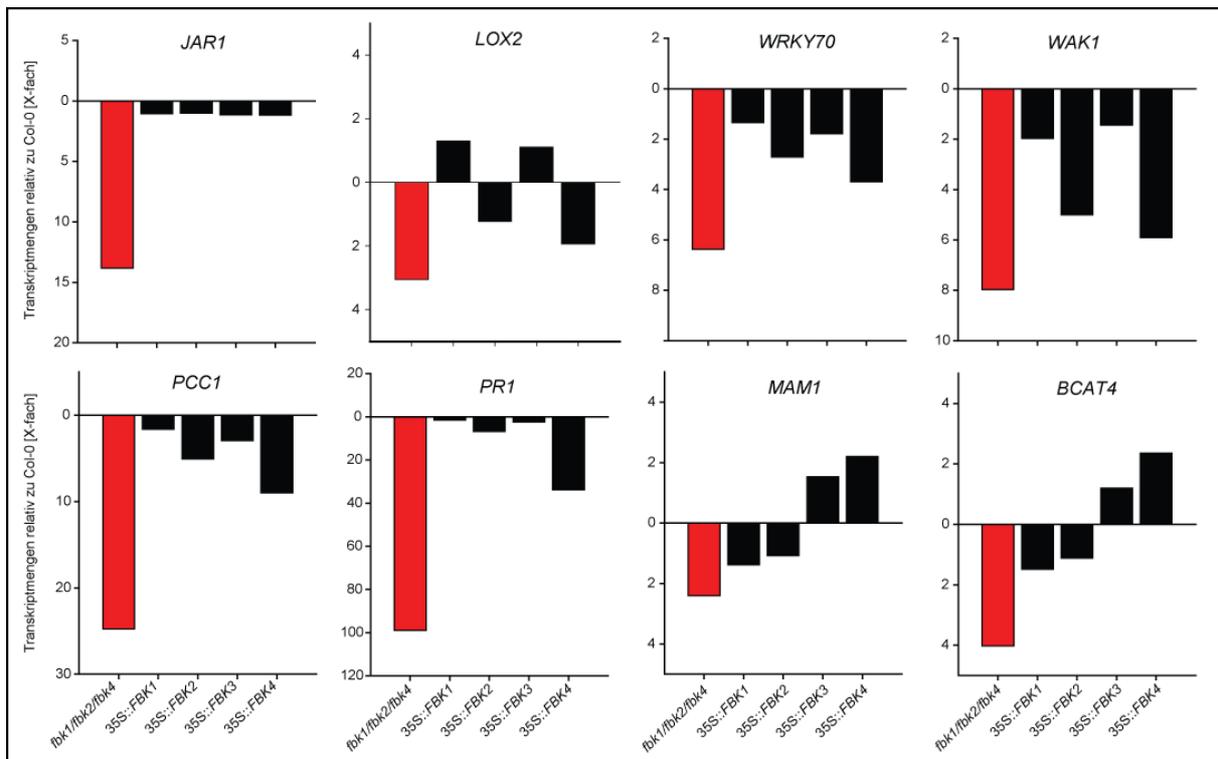
Zusätzlich zur Tripelmutante wurde auch mit Keimlingen und Blüten von jeweils einer Überexpressionslinie von *FBK1-4* Micro-Array-Analysen durchgeführt (Tab. 7.5 und 7.6). Erhöhte Mengen Transkript des jeweiligen konstitutiv überexprimierten *FBKs* konnten sowohl in Blüten als auch in Keimlingen der verschiedenen transgenen Linien nachgewiesen werden.

Die Mehrheit der Gene (9 von 12), die in Keimlingen der Tripelmutante gegenüber dem Wildtyp reprimiert sind und die eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen, weisen ebenfalls in mindestens zwei Überexpressionslinien reduzierte Transkriptmengen auf (Tab. 7.5). Die beiden in der Tripelmutante reprimierten Jasmonat-relevanten Gene *JAR1* und *LOX2* sind hingegen in keiner der vier Überexpressionslinien differentiell exprimiert. In den meisten Fällen zeigen die Überexpressionslinien somit nicht das erwartete, der Tripelmutante entgegengesetzte, Expressionsmuster. Ausnahmen stellen die beiden Gene der Glukosinolatbiosynthese, *BCAT4* und

*MAM1*, dar. Während *BCAT4* und *MAM1* im Hintergrund der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Mutante gegenüber dem Wildtyp reprimiert sind, weisen sie eine deutlich erhöhte Transkription in der *FBK4*-Überexpressionslinie auf (Tab. 7.5).

### 3.2.5.1 Verifizierung der Micro-Array-Ergebnisse mittels qRT-PCR

Zur Verifizierung der Micro-Array-Daten wurden die relativen Transkriptmengen von acht ausgewählten Genen in Keimlingen der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie in den Überexpressionslinien von *FBK1-4* gemessen. Die Gruppe der für die qRT-PCR ausgewählten Gene umfasst die zwei Jasmonat-relevanten Gene *JAR1* und *LOX2*, die beiden Glukosinolatbiosynthesegene *BCAT4* und *MAM1* sowie vier Vertreter von Genen, die eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen (*CELL WALL-ASSOCIATED KINASE 1* [*WAK1*], *PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1* [*PCC1*], *PATHOGENESIS-RELATED GENE 1* [*PR1*] und *WRKY DNA-BINDING PROTEIN 70* [*WRKY70*]). Wie zuvor im Micro-Array-Experiment, konnten auch mittels qRT-PCR für alle acht ausgewählten Gene deutlich reduzierte Transkriptmengen in der Tripelmutante gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 3.27 und 7.5). In Übereinstimmung mit den Micro-Array-Daten ist die Expression von *JAR1* in den Überexpressionslinien weitestgehend unverändert. Ebenso zeichnet sich eine verminderte Transkription von *LOX2* in der *FBK4*-Überexpressionslinie ab.



**Abb. 3.27: Verifizierung der Micro-Array-Daten mittels qRT-PCR für acht ausgewählte Gene.** Dargestellt sind die Transkriptmengen in der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Mutante (rot) bzw. in den Überexpressionslinien von *FBK1-4* (schwarz) relativ zum Wildtyp Col-0. Die Berechnung der Standardfehler und deren Darstellung als Fehlerbalken erfolgte ausschließlich auf Basis der  $2^{\Delta C_t}$ -Werte (vergleiche Abb. 7.5).

Die qRT-PCR-Daten bestätigen weiterhin, dass die hier analysierten Pathogen-induzierten Gene, zusätzlich zur Tripelmutante, in mindestens zwei der Überexpressionslinien transkriptionell reprimiert

sind. Am stärksten jeweils in 35S::*FBK2* und 35S::*FBK4*. Auch die zuvor in der Tripelmutante und der *FBK4*-Überexpressionslinie beobachteten entgegengesetzten Transkriptmengen von *BCAT4* und *MAM1* konnte mittels qRT-PCR verifiziert werden.

### 3.2.6 Phänotypisierung von Tripelmutante und Überexpressionslinien

Funktionelle Analysen allgemeiner Wachstumsphänotypen ergaben, dass weder die Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* noch die Überexpressionslinien von *FBK1-4* unter normalen Anzuchtbedingungen einen vom Wildtyp abweichenden Mutantenphänotyp aufweisen. In Hinblick auf die Keimungsrate sowie auf das Hypokotyl- und Wurzelwachstum beispielsweise, unterscheiden sich die untersuchten Mutantenlinien nicht vom Wildtyp (Abb. 7.6 und 7.7). Micro-Array-Analysen zeigten jedoch, dass zahlreiche Gene, die an Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt sind und/oder eine Rolle bei Verwundungsreaktionen in Folge von Herbivorie spielen, in *fbk1/fbk2-1/fbk4* differentiell exprimiert sind (Tab. 3.5 und 3.6). Auf diesen Ergebnissen basierend, wurde die Tripelmutante sowie die vier Überexpressionslinien zunächst auf konditionelle Phänotypen hin untersucht, die im Zusammenhang mit der Abwehr gegen Pathogene und/oder Verwundungsreaktion stehen.

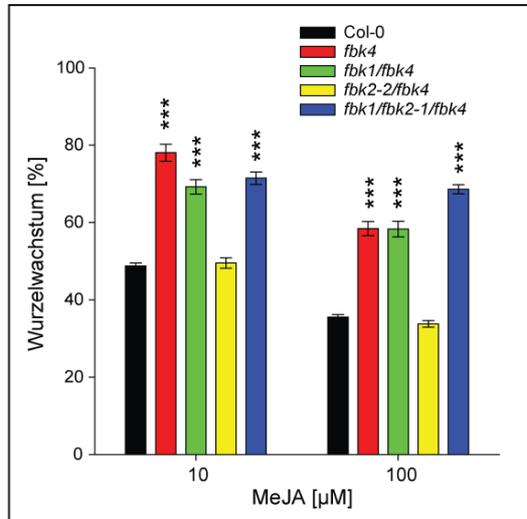
#### 3.2.6.1 Untersuchungen zur Jasmonat-Responsivität

Die Ergebnisse des Micro-Arrays zeigen, dass eines der Schlüsselgene des Jasmonat-Signalweges (*JAR1*) in der Tripelmutante differentiell exprimiert ist (Tab. 3.5 und 3.6, Abb. 3.27). Über den Jasmonat-Signalweg wird unter anderem die Aktivität zahlreicher Gene reguliert, die an Abwehrprozessen gegen mikrobielle Pathogene (Vijayan *et al.* 1998; Staswick *et al.* 1998) und herbivore Insekten (McConn *et al.* 1997) beteiligt sind.

Um zu untersuchen, ob die veränderte Expression von *JAR1* die Jasmonat-Responsivität der *FBK*-Mutanten beeinflusst, wurden Wurzelassays auf Methyljasmonat-haltigem Medium durchgeführt.

Methyljasmonat (MeJA) wird in der Pflanze zunächst durch eine MeJA-Esterase zu (+)-7-iso-JA umgesetzt. Durch die katalytische Aktivität von *JAR1* erfolgt im Anschluss die Konjugation von (+)-7-iso-JA an L-Isoleucin, so dass (+)-7-iso-JA-L-Ile (Jasmonat-Isoleucin) entsteht (Fonseca *et al.* 2009; Koo & Howe 2009). Jasmonat-Isoleucin stellt die bioaktive Form des Jasmonats dar, indem es an den SCF<sup>COI1</sup>-Komplex bindet und somit die Interaktion des F-Box-Proteins COI1 mit dessen Zielproteinen induziert (Fonseca *et al.* 2009). Diese Zielproteine, bei denen es sich um eine Familie von transkriptionellen Repressoren handelt, die als JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-Proteine bezeichnet werden, werden durch die Bindung an den SFC<sup>COI1</sup>-Komplex polyubiquitiniert und somit für den Abbau im 26S-Proteasom markiert (Pauwels & Goossens 2011). Infolge des Abbaus der JAZ-Proteine, wird die Transkription Jasmonat-responsiver Gene beeinflusst, wodurch unter anderem das Wurzelwachstum inhibiert wird (Wasternack 2007). Mutanten, die eine beeinträchtigte Expression von *JAR1* aufweisen, sollten folglich eine verminderte Jasmonat-Responsivität zeigen, die sich in Form eines gegenüber dem Wildtyp verstärkten Wurzelwachstums auf MeJA widerspiegelt. Tatsächlich

konnte eine solche verringerte Responsivität auf MeJA für die Einzelmutante *fbk4* sowie die Mehrfachmutanten *fbk1/fbk4* und *fbk1/fbk2-1/fbk4* nachgewiesen werden (Abb. 3.28).



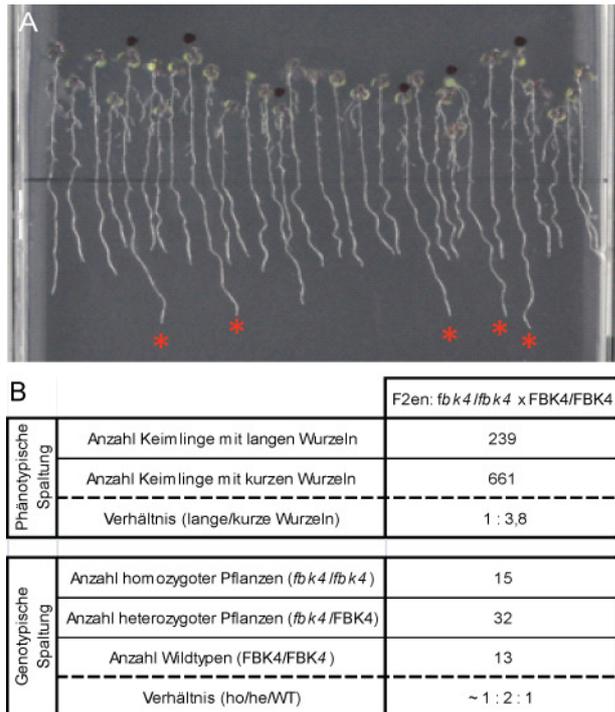
**Abb. 3.28: *fbk4* zeigt verringerte Responsivität auf MeJA.** Wurzelwachstum auf MeJA relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Die Keimlinge wurden zunächst fünf Tage bei 20°C im Langtag auf Medium ohne MeJA angezogen, anschließend auf Medium ohne bzw. mit 10 µM und 100 µM MeJA transferiert und weitere drei Tage bei 20°C im Langtag kultiviert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n ≥ 28). \*\*\* signifikanter Unterschied der log<sub>2</sub>-transformierten Messwerte im Vergleich mit Col-0 (p > 0,0001; zweifaktorielle Anova)

Diese Resultate deuten auf eine Beteiligung von *FBK4* an der Jasmonatantwort hin. Zunächst nicht zu erklären war die Beobachtung, dass die Doppelmutante *fbk2-2/fbk4* keine veränderte Jasmonat-Responsivität aufweist. Auch die Jasmonat-Responsivität der Mutanten *fbk1*, *fbk2-1*, *fbk2-2*, *fbk1/fbk2-1* sowie der Überexpressionslinien von *FBK1-4* ist nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Zumindest *FBK1* und *FBK2* scheinen folglich nur eine untergeordnete Rolle bei der Jasmonatantwort zu spielen.

### 3.2.6.2 Nachweis der Kopplung der *fbk4*-Mutation mit dem MeJA-Phänotyp

Um nachzuweisen, dass die verringerte Jasmonat-Responsivität der *fbk4* Mutante durch die T-DNA-Insertion im *FBK4* Gen verursacht wird und nicht etwa durch eine zweite Insertion unbekanntem Ursprungs, wurden F2-Individuen einer Rückkreuzung von *fbk4* mit dem Wildtyp Col-0 phänotypisch und genotypisch analysiert.

Die F2-Generation der Rückkreuzung von *fbk4* mit dem Wildtyp spaltet phänotypisch in einem Verhältnis von 1 zu 3,8 in Individuen mit langen und kurzen Wurzeln auf 10 µM MeJA (Abb. 3.29). Dieses Spaltungsverhältnis weist darauf hin, dass die verringerte Jasmonat-Responsivität der *fbk4* Mutante auf eine rezessive Mutation zurückzuführen ist, die nur dann zur Ausprägung kommt, wenn das mutierte Allel homozygot vorliegt. 60 Individuen, die deutlich verlängerte Wurzeln und somit verringerte Jasmonat-Responsivität aufwiesen, wurden anschließend in Hinblick auf die *fbk4*-Mutation mittels PCR genotypisiert. Unter der Annahme, dass es sich um eine rezessive Mutation handelt, die den Wurzelphänotyp bewirkt, sollten alle Keimlinge mit verlängerten Wurzeln homozygot für die *fbk4* Mutation sein. Die 60 analysierten F2en spalten jedoch im Verhältnis von 1:2:1 in homozygote (*fbk4/fbk4*), heterozygote (*fbk4/FBK4*) und Wildtyp (*FBK4/FBK4*) Individuen (Abb. 3.29\_B). Die verringerte Jasmonat-Responsivität wird folglich nicht durch die T-DNA im *FBK4*-Gen verursacht, sondern vermutlich durch eine weitere, vom *FBK4*-Locus entkoppelte Mutation oder zusätzliche T-DNA an unbekannter Position im Genom.



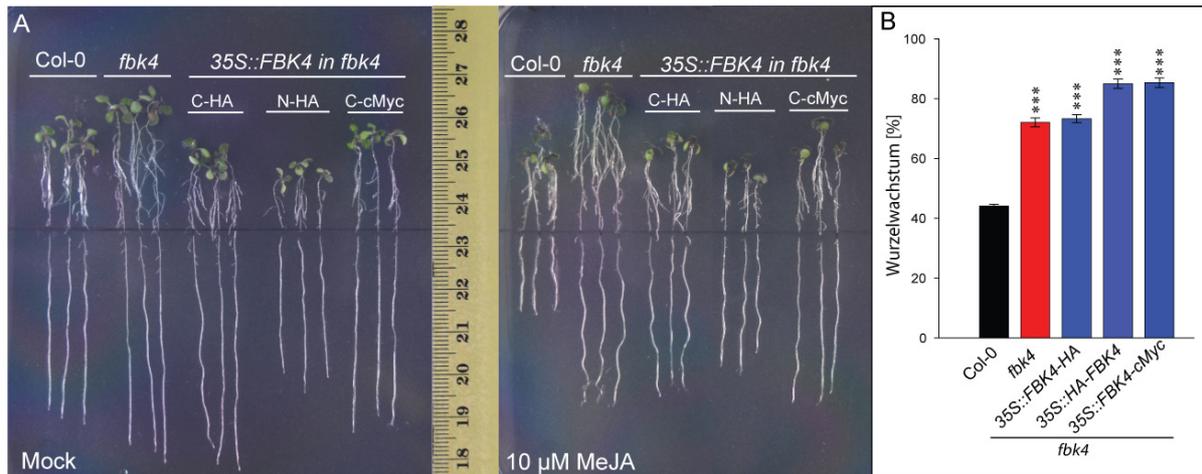
**Abb. 3.29: Die Jasmonat-Responsivität korreliert nicht mit dem *fbk4*-Genotyp.** **A:** Exemplarische F2en einer Rückkreuzung von *fbk4* mit dem Wildtyp Col-0, die auf 10  $\mu$ M MeJA in Individuen mit langen und kurzen Wurzeln spalten. Die Keimlinge wurden zunächst fünf Tage bei 20°C im Langtag auf Medium ohne MeJA angezogen, anschließend auf Medium mit 10  $\mu$ M MeJA transferiert und weitere drei Tage bei 20°C im Langtag inkubiert. \*Keimlinge mit langen Wurzeln, die genotypisiert wurden **B:** Phänotypische und genotypische Spaltungsverhältnisse von F2en einer Rückkreuzung von *fbk4* mit dem Wildtyp Col-0, nach Transfer auf 10  $\mu$ M MeJA. Zur Ermittlung des phänotypischen Spaltungsverhältnisses wurden insgesamt 900 F2-Individuen ausgewertet. Zur Bestimmung des genotypischen Spaltungsverhältnisses wurden 60 F2-Individuen, die ausnahmslos verlängerte Wurzeln auf 10  $\mu$ M MeJA aufwiesen, mittels Genotypisierungs-PCR analysiert.

### 3.2.6.3 Komplementationsanalyse

Einen weiteren Nachweis, dass die Mutation in *FBK4* nicht für den Jasmonat-gekoppelten Wurzelphänotyp verantwortlich ist, lieferte eine Komplementationsanalyse. Hierfür wurden in den Hintergrund der *fbk4*-Mutante verschiedene Konstrukte transformiert, durch die das Wildtyp-*FBK4* konstitutiv überexprimiert wird. Durch keines dieser Konstrukte konnte der Wildtyp-Phänotyp auf 10  $\mu$ M MeJA wieder hergestellt werden (Abb. 3.30). Daher kann geschlossen werden, dass die verringerte Jasmonat-Responsivität nicht durch die T-DNA-Insertion in *FBK4*, sondern durch eine Mutation in einem anderen Gen verursacht wird.

Die Feststellung, dass sich im Hintergrund der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* eine weitere Mutation unbekanntes Ursprungs befindet, erfordert eine differenziertere Interpretation der Ergebnisse des Micro-Arrays (Tab. 3.5 und 3.6). Es besteht die Möglichkeit, dass die veränderte Expression der in der Tripelmutante differentiell exprimierten Gene nicht allein auf den Defekt eines oder mehrerer der mutierten *FBKs* zurückzuführen ist. Die differentielle Expression der identifizierten Gene in der Tripelmutante könnte ebenso auf der unbekanntes Hintergrundmutation beruhen. Besonders für die differentiell exprimierten Gene *JAR1* und *LOX2* ist diese Annahme wahrscheinlich. Da diese Gene innerhalb des Jasmonat-Signalweges bzw. der Jasmonatbiosynthese funktionell sind, könnte ihre differentielle Expression unmittelbar mit dem Methyljasmonat-Phänotyp zusammenhängen. Die Mehrheit der in der Tripelmutante identifizierten, differentiell exprimierten Gene mit einer Funktion innerhalb der Pathogenabwehr der Pflanze, weist auch in einer oder mehrerer der vier *FBK*-Überexpressionslinien eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Expressionsrate auf (Tab. 7.5 und 7.6). Gleiches gilt für die Glukosinolatbiosynthesegene *BCAT4* und *MAMI*. Für diese Gene kann folglich weiterhin angenommen werden, dass ihre Expression durch die Aktivität von *FBK1-4* beeinflusst

wird. Demzufolge wurden die Mutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die vier *FBK*-Überexpressionlinien auch weiterhin verwendet, um nach Phänotypen zu suchen, die im Zusammenhang mit der Abwehr gegen Pathogene stehen. Hierbei wird berücksichtigt, dass sich, im Falle der Identifizierung eines Mutantenphänotyps, eine sofortige Komplementationsanalyse anschließen muss, um die *fbk*-Mutation als Ursache des Phänotyps zu bestätigen. Parallel erfolgte die Isolierung einer *fbk4*-Einzelmutante sowie einer *fbk1/fbk2/fbk4*-Tripelmutante, die frei von der erwähnten Hintergrundmutation ist und somit keine Resistenz auf MeJA aufweist.



**Abb. 3.30: Der Wurzelphänotyp der *fbk4*-Mutante auf MeJA kann vom Wildtyp-*FBK4* nicht komplementiert werden.** A: Wurzelassay auf Medium ohne (Mock) bzw. mit 10 µM MeJA. Die Keimlinge wurden zunächst fünf Tage bei 20°C auf Medium ohne MeJA angezogen, anschließend auf Medium ohne bzw. mit 10 µM MeJA transferiert und weitere drei Tage bei 20°C im Langtag inkubiert. B: Quantifizierung der Komplementationsanalyse aus A. Von jeweils  $n \geq 28$  Keimlingen wurde die Wurzellänge gemessen und das Wurzelwachstum in % auf 10 µM MeJA relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %) berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. \*\*\* signifikanter Unterschied der  $\log_2$ -transformierten Messwerte im Vergleich mit Col-0 ( $p < 0,0001$ ; zweifaktorielle Anova)

#### 3.2.6.4 Responsivität gegenüber endogenen und exogenen Elicitoren

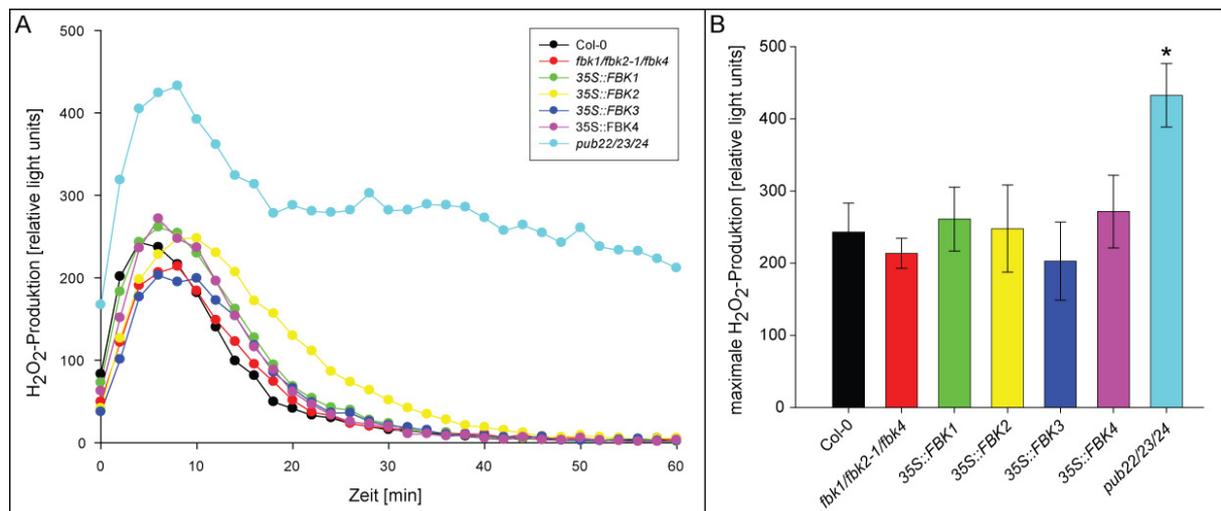
Zahlreiche Gene, die in *fbk1/fbk2-1/fbk4* und verschiedenen Überexpressionlinien differentiell exprimiert sind, spielen eine Rolle bei der Abwehr gegen Pathogene (Tab. 3.5; Abb. 3.27). Um zu untersuchen, ob die differentielle Transkription dieser Gene die Responsivität gegenüber Pathogenitätsfaktoren beeinflusst, sollte die Reaktionsfähigkeit der Tripelmutante und Überexpressionlinien nach Applikation verschiedener Elicitoren getestet werden.

Elicitoren sind Substanzen, die in Pflanzen Abwehrmechanismen gegen Herbivore und Pathogene induzieren. Entsprechend ihres Ursprungs unterscheidet man exogene und endogene Elicitoren. Zu den exogenen Elicitoren gehören unter anderem bakterielle Proteine wie der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) oder Flagellin (Gómez-Gómez & Boller 2002; Kunze *et al.* 2004). Spezifische Rezeptorkinasen, wie EF-TU RECEPTOR (EFR) und FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) aus *At*, erkennen diese bakteriellen Elicitoren, induzieren die pflanzlichen Abwehrmechanismen und vermitteln somit die Resistenz der Pflanze (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Chinchilla *et al.* 2006). Gleichzeitig werden wachstumsrelevante Prozesse in der Pflanze inhibiert. Ähnliche Wirkungen erzielen endogene

Elicitoren wie Salizylsäure (SA), die nach Pathogenbefall oder Verwundung in erhöhter Konzentration in der Pflanze nachgewiesen werden kann (Horvath & Chua 1996; Vernooij *et al.* 1994).

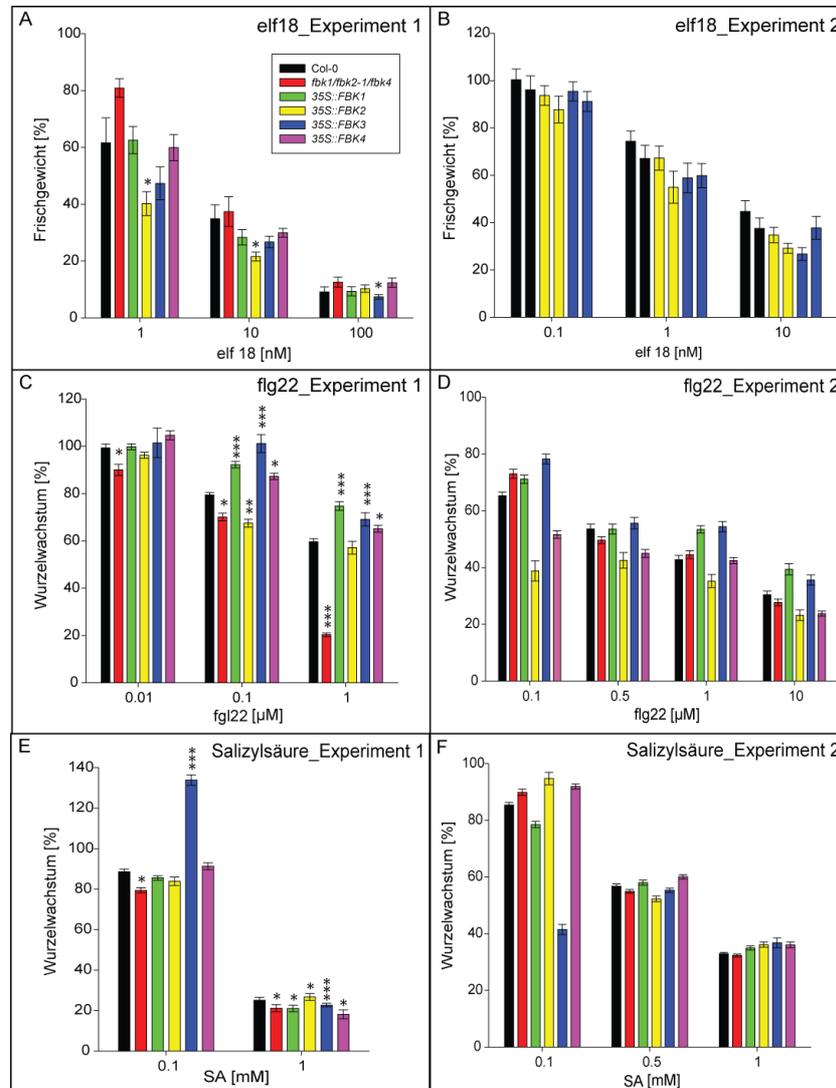
Ein essentieller Schritt bei der Erkennung von Elicitoren durch die Pflanze ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Pathogenbefall (Torres 2010). Im Rahmen der pflanzlichen Abwehrreaktion fungieren ROS, wie Superoxidionen und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), als Signalkomponenten und lokale Toxine (Chen & Schopfer 1999; Kovtun *et al.* 2000). So tragen ROS zur Aktivierung pflanzlicher Abwehrprozesse bei, indem sie die Expression zahlreicher Gene beeinflussen (Levine *et al.* 1994; Kotchoni & Gachomo 2006). Defekte innerhalb dieser ROS-Signalwege korrelieren oftmals mit einer verringerten Abwehrfähigkeit der Pflanze gegenüber Pathogenen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die *FBK*-Mutanten Veränderungen in der Perzeption von Pathogenitätsfaktoren aufweisen. Hierfür wurden *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die vier *FBK*-Überexpressionslinien mit dem exogenen Elicitor flg22 behandelt. Anschließend wurde die Produktion von  $H_2O_2$  in der Pflanze gemessen (in Zusammenarbeit mit Marco Trujillo, IPB Halle). Flg22 ist ein 22 Aminosäuren langes, synthetisches Derivat des bakteriellen Flagellins (Felix *et al.* 1999). Abb. 3.31\_A zeigt, dass der Verlauf der  $H_2O_2$ -Produktion in der Tripelmutante sowie in den Überexpressionslinien über den betrachteten Zeitraum von 60 min mit dem des Wildtyps Col-0 vergleichbar ist. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede in der maximalen Menge produzierten  $H_2O_2$  detektiert werden (3.31\_B). Daher kann geschlussfolgert werden, dass die *FBK*-Mutanten vollständig in der Lage sind, den exogenen Elicitor flg22 zu erkennen und darauf mit der Produktion von  $H_2O_2$  zu reagieren.



**Abb. 3.31: *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die vier *FBK*-Überexpressionslinien sind nicht in der  $H_2O_2$ -Produktion nach Behandlung mit flg22 beeinträchtigt.** (A) Messung der  $H_2O_2$ -Produktion nach Applikation von 100 nM flg22 über einen Zeitraum von 60 min. Die Messungen erfolgten an Rosettenblättern von Pflanzen, die für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden. *pub22/23/24* weist stark erhöhte  $H_2O_2$ -Produktion nach flg22 Behandlung auf (Trujillo *et al.* 2008) und dient als Positivkontrolle. (B) Menge an produzierten  $H_2O_2$  zum Zeitpunkt der maximalen  $H_2O_2$ -Produktion nach flg22-Behandlung (je nach Linie zwischen 4 min und 8 min). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n = 8). \* signifikanter Unterschied zu Col-0 (p < 0,05; Student's T-Test). Das Experiment wurde drei Mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Da die *FBK*-Mutanten in der Wahrnehmung der Pathogenitätsfaktoren nicht beeinträchtigt zu sein scheinen, stellt sich die Frage, ob die Mutanten Defekte in der Weiterleitung des Signals und somit in ihrer Responsivität gegenüber Pathogenitätsfaktoren aufweisen. Zur Klärung dieser Frage sollte die Responsivität von *fbk1/fbk2-1/fbk4* und den vier Überexpressionslinien gegenüber verschiedenen exogenen und endogenen Elicitoren untersucht werden.

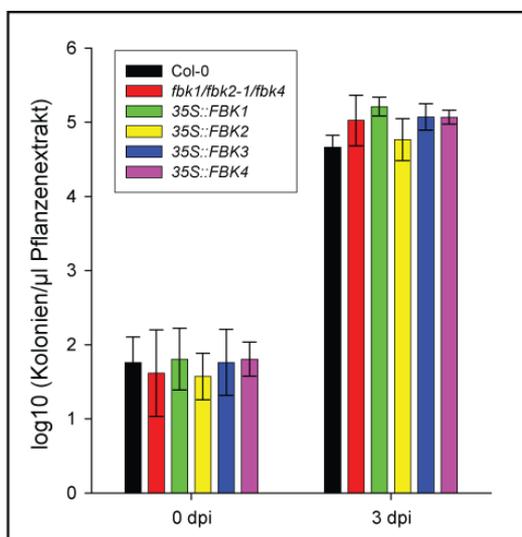


**Abb. 3.32:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen keine veränderte Responsivität gegenüber endogen und exogenen Elicitoren. **A:** Zur Bestimmung des Frischgewichtes relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %) wurden Keimlingen auf Medium ohne Zusatz angezogen (5 Tage, 20°C, Langtag) und anschließend in Flüssigmedium ohne (Mock) bzw. mit *elf18* weitere 11 Tage (20°C, Langtag) inkubiert ( $n \geq 11$ ). **B:** 35S::*FBK2* und 35S::*FBK3* zeigten im Experiment 1 (**A**) signifikante Unterschiede zu Col-0 und wurden daher, jeweils unter Verwendung zweier unabhängiger Saatgutbatches, erneut getestet, ohne dass die signifikanten Unterschiede bestätigt werden konnten. **C+E:** Wurzelwachstum auf *flg22* bzw. Salizylsäure relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Die Keimlinge wurden auf Medium ohne Zusätze angezogen (5 Tage, 20°C, Langtag) und anschließend auf Medium ohne (Mock) bzw. mit Elicitor transferiert und weitere 3 Tage (20°C, Langtag) inkubiert ( $n \geq 16$ ). **D+F:** Wiederholung des Experimentes aus (**C**) bzw. (**E**). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ , signifikanter Unterschied der log2-transformierten Messwerte im Vergleich mit Col-0; zweifaktorielle Anova.

Hierfür wurde zunächst das Frischgewicht von Keimlingen nach elf18-Applikation ermittelt. Elf18 ist ein synthetisches Peptid, das aus 18 Aminosäuren besteht, die dem N-terminalen Abschnitt des bakteriellen EF-Tu entsprechen und eine vergleichbare Elicitor-Aktivität aufweisen (Kunze *et al.* 2004). Zudem wurde das Wurzelwachstum nach Behandlung mit flg22 bestimmt. Erste Experimente deuteten auf eine erhöhte Responsivität der Überexpressionslinie *35S::FBK2* gegenüber elf18 bzw. der Tripelmutante *fbk1/fbk2-2/fbk4* gegenüber flg22 hin (Abb. 3.32\_A+C). Diese Beobachtungen konnten jedoch in nachfolgenden Experimenten nicht verifiziert werden (Abb. 3.32\_B+D). Auch nach Applikation des endogenen Elicitors Salizylsäure zeigten weder die Tripelmutante noch die Überexpressionslinien von *FBK1-4* reproduzierbare Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 3.32\_E+F). Die hier untersuchten *FBK*-Mutanten scheinen folglich nicht in ihrer Responsivität gegenüber verschiedenen Pathogenitätsfaktoren beeinträchtigt zu sein.

### 3.2.6.5 Infektionsassay mit *P. syringae* und *B. cinerea*

Zusätzlich zur Responsivität gegenüber Elicitoren wurde der direkte Einfluss des Gram-positiven Bakteriums *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 sowie des nekrotrophen Pilzes *B. cinerea* auf die *FBK*-Mutanten untersucht. Der virulente Stamm *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 dringt über die Blattoberfläche, durch Verwundungsstellen oder natürlichen Öffnungen wie den Stomata, in den Wirtsorganismus ein und vermehrt sich in der suszeptiblen Wirtspflanze innerhalb des interzellulären Raumes. Auf den Blättern infizierter Pflanzen erscheinen zunächst wässrige Läsionen, die später nekrotisch werden können (Katagiri *et al.* 2002).



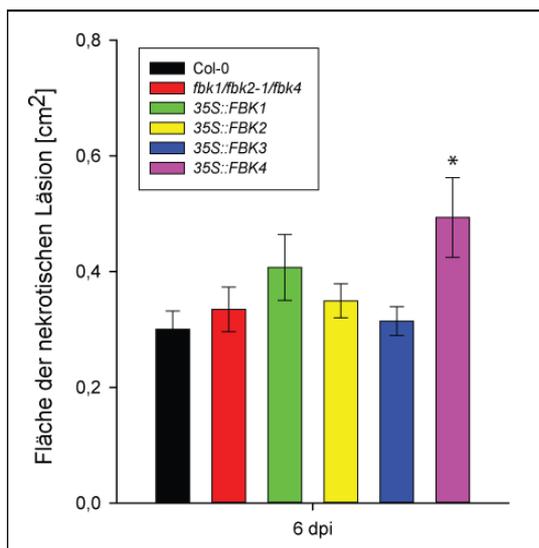
**Abb. 3.33:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen keine veränderte Responsivität gegenüber *P. syringae* Infektion. Fünf Wochen alte Pflanzen wurden bei 20°C im Kurztag angezogen und durch Besprühen mit einer Bakteriensuspension von  $5 \cdot 10^8$  cfu/ml mit *P. syringae* DC3000 infiziert. Null bzw. drei Tage nach der Infektion erfolgte die Ernte von Blattmaterial zur Bestimmung der Bakterienkonzentration. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen ( $n = 3$ ). Das Experiment wurde zwei Mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob *fbk1/fbk2-1/fbk4* oder die Überexpressionslinien von *FBK1-4* eine vom Wildtyp abweichende Responsivität gegenüber dem virulenten *P. syringae* Stamm DC3000 aufweisen, wurden die Rosetten der Mutanten sowie des Wildtyps mit einer Bakteriensuspension der Konzentration  $5 \cdot 10^8$  cfu/ml besprüht und nach null- bzw. dreitägiger Inkubationszeit der Bakterientiter im Innern der Rosettenblättern bestimmt. Drei Tage nach dem Besprühen mit der Bakterienlösung konnte ein deutlicher Anstieg des Bakterientiters in allen untersuchten Pflanzenlinien

beobachtet werden (Abb. 3.33). Ein Unterschied zwischen dem Wildtyp Col-0 und den untersuchten Mutantenlinien war jedoch nicht zu beobachten.

Der nekrotrophe Pilz *B. cinerea* zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus (>200 Pflanzenspezies, Jarvis 1977). Die Infektion mit *B. cinerea* induziert im Wirtsorganismus Zelltod, der zu ernsthafter Schädigung des Pflanzengewebes und schließlich zum Verfaulen von Pflanzenteilen oder der ganzen Pflanze führt (Prins *et al.* 2000; Van Kan 2006). Bei *A. thaliana* wird eine Infektion mit *B. cinerea* zunächst durch nekrotische Läsionen auf der Blattoberfläche sichtbar.

Um zu untersuchen, ob *fbk1/fbk2-1/fbk4* oder die Überexpressionslinien von *FBK1-4* eine vom Wildtyp abweichende Responsivität gegenüber *B. cinerea* aufweisen, wurde auf die Rosettenblätter der Mutanten sowie des Wildtyps eine Sporensuspension der Konzentration  $1 \cdot 10^6$  Sporen/ml getropft und nach sechstägiger Inkubationszeit die Fläche der nekrotischen Läsionen auf der Blattoberfläche gemessen. Die Überexpressionslinie *35S::FBK4* zeigte in einem ersten Experiment eine leicht erhöhte Suszeptibilität gegenüber der *B. cinerea*-Infektion (Abb. 3.34). Ob dieser Phänotyp auch in nachfolgenden Experimenten reproduzierbar ist, bleibt zu untersuchen.

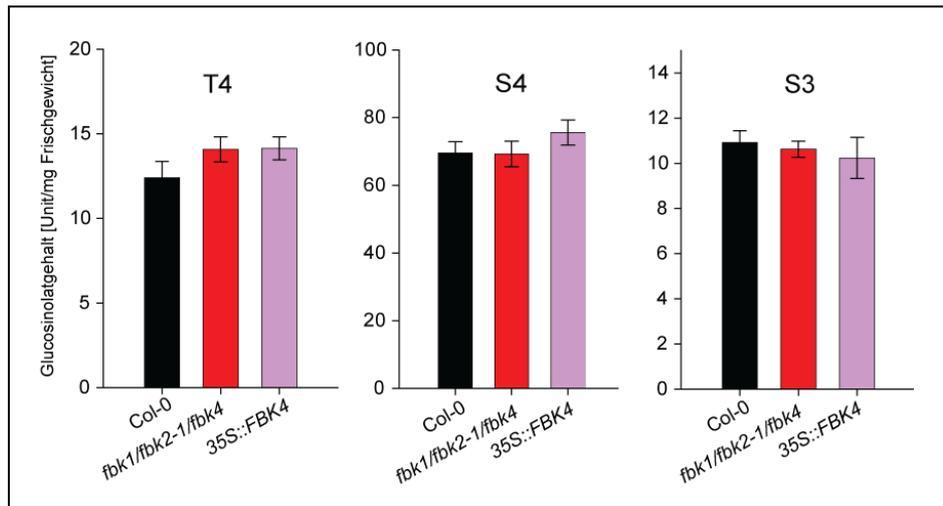


**Abb. 3.34: *35S::FBK4* zeigt leicht erhöhte Sensitivität gegenüber *B. cinerea*-Infektion.** Fünf Wochen alte Pflanzen wurden bei 20°C im Kurztag angezogen und durch Auftropfen einer Sporensuspension von  $1 \cdot 10^6$  Sporen/ml mit *B. cinerea* infiziert. Sechs Tage nach der Infektion wurde die Fläche der nekrotischen Läsionen auf der Blattoberfläche vermessen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern ( $n \geq 14$ ). Dieses Experiment wurde bislang einmal durchgeführt.

### 3.2.6.6 Glukosinolatgehalte

Zwei Gene, die sowohl in der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* als auch in der Überexpressionslinie *35S::FBK4* differentielle Expression gegenüber dem Wildtyp aufweisen, sind *BCAT4* und *MAMI*. Beide Gene zeigen in der Tripelmutante eine verringerte Transkription, wohingegen ihre Expression in *35S::FBK4* gegenüber dem Wildtyp verstärkt ist (Abb. 3.27). Sowohl *BCAT4* als auch *MAMI* kodieren für enzymatische Proteine, die im Zyklus der Kettenverlängerung von Methionin aktiv sind (J Kroymann *et al.* 2001; Schuster *et al.* 2006). Von diesem Methionin, dessen Seitenkette durch sequenzielle Anlagerung von einer bis sechs Methylgruppen verlängert wurde, leitet sich in *At* die Mehrheit der aliphatischen Glukosinolate ab (Hogge *et al.* 1988; Textor *et al.* 2004). Glukosinolate fungieren in Brassicaceae als Geruchs- und Geschmacksstoffe und spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr (Halkier & Gershenzon 2006).

Um zu untersuchen, ob die veränderten Transkriptmengen von *BCAT4* und *MAM1* in *fbk1/fbk2-1/fbk4* und *35S::FBK4* die Glukosinolatgehalte in den Mutanten beeinflussen, wurden mittels UPLC die Mengen der aliphatischen Glukosinolate 4-Methylthiobutyl (T4), 4-Methylsulphinylbutyl (S4) und 3-Methylsulphinypropyl (S3) (Haughn *et al.* 1991) bestimmt (in Zusammenarbeit mit Douglas Grubb, IPB Halle). Weder in der Tripelmutante, noch in der Überexpressionslinie von *FBK4* resultiert die differentielle Expression von *MAM1* und *BACT4* in einer Veränderung der Gehalte an aliphatischen Glukosinolaten (Abb. 3.35).



**Abb. 3.35: Die veränderten Transkriptmengen von *MAM1* und *BACT4* in *fbk1/fbk2-1/fbk4* und *35S::FBK4* haben keinen Einfluss auf die Gehalte an aliphatischer Glukosinolaten.** Bestimmung der Gehalte an aliphatischen Glukosinolaten aus den oberirdischen Organen von 18 Tage alte Keimlingen mittels UPLC (erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Douglas Grubb vom IPB in Halle). Die Keimlinge wurden unter Langtagbedingungen bei 20°C angezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n = 8). T4: 4-Methylthiobutyl; S4: 4-Methylsulphinylbutyl; S3: 3-Methylsulphinypropyl

Trotz der Hinweise aus den Micro-Array-Experimenten, die auf eine Rolle der *FBKs* an der Pathogenabwehr und Verwundungsreaktionen schließen ließen (Tab. 3.5 und Tab. 7.5), konnte bislang für die meisten der *fbk*-Mutanten kein konditioneller Phänotyp nachgewiesen werden, der im Zusammenhang mit der Abwehr gegen Pathogene und/oder Verwundungsreaktion steht. Weder scheinen *FBK1-4* an der Steuerung des für Verwundungsreaktionen essentiellen Jasmonat-Signalweges beteiligt zu sein (Abb. 3.29 und 3.30), noch eine Rolle bei der Reaktion auf die Elicitoren elf18, flg22 und Salicylsäure zu spielen (Abb. 3.31. und 3.32). Darüber hinaus konnte keine veränderte Responsivität der *FBK*-Mutanten gegenüber dem Bakterium *P. syringae* beobachtet werden (Abb. 3.33). Auch gegenüber dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* zeigten die meisten der untersuchten Mutanten keine veränderte Responsivität. Allein die Überexpressionslinie von *FBK4* zeigte in einem ersten Experiment eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Infektion mit *B. cinerea* (Abb. 3.34). Ob sich dieses Ergebnis auch in nachfolgenden Experimenten verifizieren lässt, muss noch geklärt werden. Auch zur Klärung der Frage, ob eines oder mehrere der vier *FBKs* an der Abwehr gegenüber weiterer, bislang nicht untersuchter Bakterien, Pilze, Nematoden oder herbivorer Insekten beteiligt ist, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Neben den Phänotypisierungs-Experimenten zur Identifizierung von Funktionen, die mit einer Pathogenantwort bzw. Verwundungsreaktion gekoppelt sind, wurden auf Basis von Micro-Array-Daten der BAR-Datenbank (<http://bar.utoronto.ca>) weitere Phänotypisierungs-Assays durchgeführt. Die Auswertung dieser öffentlich verfügbaren Micro-Array-Daten ergab, dass *FBK1-4* in unterschiedlichem Maße responsiv auf die Applikation verschiedener Phytohormone sind (Abb. 7.8). Darüber hinaus scheint die Expression von *FBK1* und *FBK3* nach Einwirkung von osmotischem Stress stark erhöht zu sein (Abb. 7.9\_A). Nicht zuletzt gibt es Hinweise für eine verstärkte *FBK2*-Expression nach Einwirken von oxidativem Stress (Abb. 7.9\_B). Aufgrund dieser Daten wurde in Wurzel- und Hypokotyl assays die Responsivität der Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie der Überexpressionslinien von *FBK1-4* gegenüber verschiedenen Phytohormonen (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure [2,4-D], Abscisinsäure [ABA], Epi-Brassinolid [Epi-BR], Gibberellinsäure [GA<sub>3</sub>] und Kinetin) bzw. Phytohormonvorläufern (1-Aminocyclopropan-carbonsäure [ACC]) sowie gegenüber verschiedenen osmotischen Stressoren (D-Glukose, Mannitol, Sorbitol, Natriumchlorid) und oxidativen Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Menadion) untersucht. In keinem dieser Experimente zeigten die Tripelmutante oder die Überexpressionslinien von *FBK1-4* reproduzierbare Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 7.10 bis 7.13), so dass eine Rolle von *FBK1-4* bei der Responsivität gegenüber den hier getesteten Substanzen weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Trotz umfangreicher Analysen ist eine Aussage zur konkreten biologischen Funktion von *FBK1-4* folglich bislang nicht möglich.

### 3.2.7 Suche nach potentiellen Interaktoren von FBK1 und FBK2 mittels *Yeast-two-Hybrid-Screen*

Zusätzlich zu Micro-Array-Analysen und phänotypischen Charakterisierungen könnte die Identifizierung der Zielproteine der FBKs dazu beitragen, ihre konkrete biologische Funktion zu entschlüsseln. Um potentielle Interaktionspartner der FBKs zu identifizieren, wurde ein *Yeast-two-Hybrid-Screen* durchgeführt. Hierbei kam eine normalisierte cDNA-Bibliothek (von Clontech) zur Anwendung, die auf elf verschiedene Gewebe von *At* zurückgeht. Innerhalb dieser Bibliothek liegen die einzelnen cDNA-Fragmente als GAL4-AD-Fusion vor. Daneben wurden zunächst Volllängekonstrukte von *FBK1* bzw. *FBK2*, die als GAL4-BD-Fusionsprotein exprimiert wurden, als *Bait*-Proteine eingesetzt.

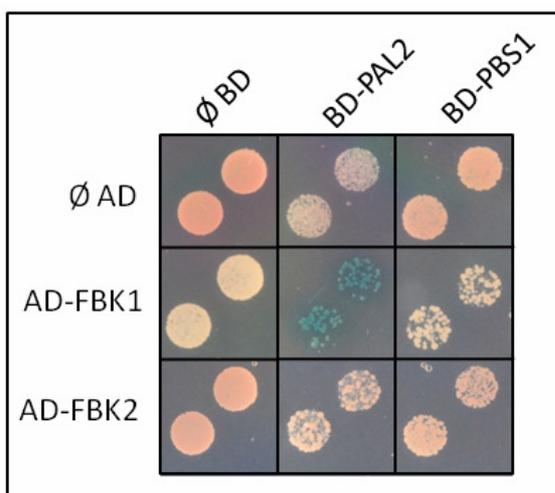
Der *Yeast-two-Hybrid-Screen* mit *FBK2* führte zur Identifizierung von insgesamt 42 positiven cDNA-Klonen. Vierzig dieser Klone konnten erfolgreich sequenziert werden. Insgesamt 32 Sequenzen hatten bei der anschließenden BLAST-Suche jeweils den besten Treffer für das gleiche Gen. Dieses Gen kodiert für das Enzym PHENYLALANINAMMONIUMLYASE 2 (PAL2). PAL2 katalysiert den ersten Schritt innerhalb der Phenylpropanoidsynthese (Rohde *et al.* 2004). Diese ist wiederum Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Sekundärmetabolite, wie z. B. Lignin, Flavonoide, Isoflavonoide, Cumarin und Stilbene. Diese Sekundärmetabolite spielen unter anderem eine Rolle bei Abwehrreaktionen der Pflanze gegen Pathogene und Herbivoren sowie bei der Kommunikation mit anderen Organismen (Ferrer *et al.* 2008). Für die verbliebenen acht Sequenzen ergab die BLAST-

Suche jeweils acht unterschiedliche Gene. Eines davon kodiert für die Serin-Threonin-Kinase AVRPPHB SUSCEPTIBLE 1 (PBS1). PBS1 spielt eine Rolle in der Resistenz von *At* gegenüber speziellen Stämmen des Bakteriums *P. syringae* (Swiderski & Innes 2001; Shao *et al.* 2003).

Der *Yeast-two-Hybrid*-Screen, bei dem FBK1 als *Bait*-Protein verwendet wurde, führte zur Identifizierung von mehr als 400 positiven Klonen, von denen zunächst 40 sequenziert wurden. Interessanterweise konnten fünf dieser Sequenzen ebenfalls PAL2 zugeordnet werden.

In keinem der beiden Screens konnte eines der 21 ASKs als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden. Mit Ausnahme von *ASK6* und *ASK15* wurde für alle *ASKs* nachgewiesen, dass sie in mindestens einem der Gewebe oder Entwicklungsstadien, aus denen sich die für den *Yeast-two-Hybrid*-Screen verwendete cDNA-Bibliothek ableitet, exprimiert werden (Takahashi *et al.* 2004; Dezfulian *et al.* 2012). Somit kann zumindest davon ausgegangen werden, dass alle *ASKs* in der normalisierten cDNA-Bibliothek repräsentiert sind. Zudem konnte für ein FBK aus Weizen (*Triticum aestivum*) bereits gezeigt werden, dass das Matchmaker™ Gold *Yeast-two-Hybrid*-System von Clontech geeignet ist, um potentielle Zielproteine von FBKs zu identifizieren (Hong *et al.* 2012). Für diesen Screen wurde das Weizen-FBK *TRITICUM AESTIVUM* CYCLIN F-BOX DOMAIN PROTEIN (TaCFBD) in voller Länge kloniert und als Köderprotein verwendet. Obwohl ein direkter Interaktionsnachweis von TaCFBD mit dem SKP1-like Homologen aus Weizen (WSK1) positiv war, führte der Screen selbst nicht zur Identifizierung von WSK1 (Hong *et al.* 2012).

Aufgrund der Funktion von PAL2 und PBS1 innerhalb der Pathogenabwehr von *At*, wurden beide Gene als Volllängekonstrukte (ohne Introns) kloniert und für eine Verifizierung der Interaktion mit FBK1 und FBK2 als Gal4-BD-Fusion in Hefezellen exprimiert. Die Interaktion von FBK1 mit PAL2 konnte bestätigt werden (Abb. 3.36). Nicht verifizierbar waren die Interaktionen von FBK2 mit PAL2 und PBS1. Ob FBK1 und PAL2 auch in *At* miteinander interagieren, bleibt zu untersuchen.



**Abb. 3.36: FBK1 interagiert mit PAL2 in Hefe.** *Yeast-two-Hybrid*-Interaktionsstudien zum Nachweis der spezifischen Interaktion von FBK1 und FBK2 mit PAL2 und PBS1. Die FBKs wurden an eine GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) gekoppelt und im Hefestamm Y187 (Paarungstyp „a“) exprimiert. PAL2 und PBS1 wurden an eine GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und im Hefestamm Y2HGold (Paarungstyp „A“) exprimiert. Die zwei jeweils zu testenden Hefestämme wurden gepaart und die erhaltenen diploiden Zellen zum Nachweis einer positiven Interaktion auf X-Gal haltigem Medium (Y-SD/-Leu, -Trp, +X-Gal) angezogen. Der Nachweis positiver Interaktionen erfolgt durch das Wachstum blaufärbter Kolonien.

## 4 Diskussion

FBPs gehören zu einer der größten und sich am schnellsten verändernden Proteinfamilien innerhalb des Pflanzenreiches (Hua *et al.* 2011). Entsprechend ihrer C-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne werden FBPs in verschiedene Subfamilien untergliedert. Es gibt bereits umfangreiche phylogenetische Studien in verschiedenen Pflanzenspezies (einschließlich einzelliger Algen, Moose, Mono- und Dikotyledonen), die die molekulare Evolution der FBP-Superfamilie in ihrer Gesamtheit beleuchten (Gagné *et al.* 2002; Risseeuw *et al.* 2003; Yang *et al.* 2008; Xu *et al.*, 2009; Hua *et al.* 2011). Nur eine detaillierte phylogenetische Analyse einzelner FBP-Subfamilien ermöglicht es jedoch, den Fokus von der F-Box-Domäne hin zur spezifischen Protein-Protein-Interaktionsdomäne zu verlagern. Aus diesem Grund und um herauszufinden, wie einzelne FBP-Subfamilien entstanden sind und sich im Laufe der Evolution verändert haben, wurde für die hier vorliegende Arbeit eine der größten FBP-Subfamilien im Pflanzenreich ausgewählt: FBPs mit C-terminaler Kelch-Repeat-Domäne. Phylogenetischen Analysen der FBK-Subfamilie in *At*, *Vv*, *Pt*, *Os*, *Sb*, *Pp* und *Sm* führten zur *de novo*-Identifizierung zahlreicher neuer FBKs. Durch die Konstruktion phylogenetischer Bäume und die Durchführung populationsgenetischer Analysen konnten Aussagen darüber getroffen werden, welchen evolutionären Mechanismen die FBKs unterliegen und welchen selektiven Kräften sie ausgesetzt sind. Indem die phylogenetischen Betrachtungen durch Studien zur Genexpression, Protein-Protein-Interaktion und subzellulären Lokalisation einer ausgewählten Klade von *At*-Genen ergänzt wurden, konnten zudem Aussagen über mögliche Subfunktionalisierungen von eng verwandten Genen getroffen werden. Auf Grundlage der phylogenetischen Studien konnte nachfolgend eine Gruppe von vier *AtFBKs* ausgewählt werden, die sich für eine umfassende molekulare und funktionelle Charakterisierung eignet. Eine prinzipielle Funktionalität der ausgewählten *AtFBKs* als *bona fide* FBPs konnte mittels Genexpressionsstudien, Detektion der subzellulären Lokalisation und Nachweis spezifischer ASK-Interaktionen nachgewiesen werden. Über einen revers-genetischen Ansatz wurde anschließend versucht, Informationen über eine mögliche biologische Funktion der *FBKs* zu erhalten. Mirco-Array-Analysen mit entsprechenden Überexpressionslinien sowie *Yeast-two-Hybrid*-Screens lieferten schließlich erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der *FBKs* von Interesse.

### 4.1 Phylogenetische Charakterisierung der FBK-Subfamilie

#### 4.1.1 Evolution der Kelch-Repeat-Domäne in FBK-Proteinen

In FBPs von Hefen, *Drosophila* und Säugern stellen WD40-Repeats und LRRs die vorherrschenden Substrat-rekrutierenden Proteindomänen dar (Skaar *et al.* 2009a; Skaar *et al.* 2009b). Für WD40-Domänen konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, eine dreidimensionale Proteinstruktur auszubilden, die als  $\beta$ -Propeller bezeichnet wird (Pashkova *et al.* 2010). Obwohl WD40-Domänen und Kelch-Repeats keine nennenswerten Sequenzhomologien aufweisen, bilden auch Kelch-Domänen als

Tertiärstruktur einen  $\beta$ -Propeller aus (Ito *et al.* 1994; Adams *et al.* 2000; Li *et al.* 2004). Daher wird angenommen, dass mehrere FBP-Subfamilien unabhängig voneinander und in Folge konvergenter Evolution die Fähigkeit zur Ausbildung eines  $\beta$ -Propeller entwickelt haben, um die Interaktion mit den Zielproteinen zu ermöglichen (Andrade *et al.* 2001).

FBK-Proteine sind evolutionär weit verbreitet. Man findet sie in zahlreichen pflanzlichen (Tab. 3.1) und verschiedenen tierischen Spezies (Tab. 3.2). Üblicherweise bilden jeweils fünf bis sieben Kelch-Repeats einen  $\beta$ -Propeller, wobei die einzelnen Propellerblätter aus viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern bestehen, die um eine gemeinsame zentrale Achse angeordnet sind (Adams *et al.* 2000; Prag & Adams 2003). Loop-Regionen unterschiedlicher Länge, die innerhalb eines oder zwischen verschiedenen  $\beta$ -Faltblättern liegen, ragen oberhalb, unterhalb oder an den Seiten der viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern heraus und erhöhen die Variabilität innerhalb der Bindeeigenschaften einzelner  $\beta$ -Propeller (Fülöp & Jones 1999; Jawad & Paoli 2002; Prag & Adams 2003). Die komplette Propellerstruktur wird durch Interaktionen zwischen dem ersten und dem letzten Propellerblatt geschlossen und stabilisiert. Der vollständige Kelch- $\beta$ -Propeller stellt eine funktionelle Einheit dar, die auch in Kombination mit zahlreichen anderen Proteindomänen vorkommt (Adams *et al.* 2000). So treten in Pflanzen Kelch-Repeats in Kombination mit verschiedenen N- und/oder C-terminalen Domänen auf, zu denen beispielsweise C-terminale Phosphatase-Domänen (Mora-García *et al.* 2004) oder N-terminale Acyl-CoA-Bindedomänen (Xiao & Chye 2009) gehören. Am häufigsten scheinen Kelch-Repeats jedoch in Kombination mit einer N-terminalen F-Box-Domäne vorzukommen. Die bereits funktionell charakterisierten pflanzlichen FBKs ZTL, FKF1 und LKP2 weisen fünf Kelch-Repeats auf. Damit erfüllen diese FBKs die Anforderungen, die nötig sind, um eine vollständig geschlossene und stabile Propeller-Struktur ausbilden zu können. In HWS und AFR hingegen finden sich laut Informationen der Pfam-Datenbank nur ein bzw. zwei Kelch-Repeats. Zudem verfügt die Mehrheit der in dieser Studie identifizierten pflanzlichen FBKs über weniger als drei Kelch-Repeats (Abb. 3.2). Es stellt sich folglich die Frage, ob auch FBKs mit nur ein oder zwei Kelch-Repeats in der Lage sind, einen funktionellen  $\beta$ -Propeller auszubilden. Eine Suche nach den 407 hier identifizierten FBKs innerhalb der Pfam-Datenbank ergab, dass ca. 65 % der FBKs nicht mehr als ein oder zwei Kelch-Repeats aufweisen. Da es unwahrscheinlich ist, dass diese Mehrheit an FBKs nicht funktionell ist, sind folgende Szenarien vorstellbar: (i) FBK-Proteine mit einer geringen Anzahl an Kelch-Repeats könnten sich als Dimere zusammenlagern, wodurch die Konstruktion eines vollständigen  $\beta$ -Propellers ermöglicht würde. (ii) FBKs mit nur einem oder zwei Kelch-Repeats bedienen sich eines komplett anderen Mechanismus, um mit Zielproteinen zu interagieren. (iii) Eine signifikante Anzahl dieser FBKs ist tatsächlich nicht mehr funktionell und stellt nur noch degenerierte Überreste einstmalig funktioneller FBKs dar. (iv) Aufgrund des schwachen Konservierungsgrades der Kelch-Motive sind die fehlenden Repeats zwar vorhanden, können jedoch nicht von Pfam erkannt werden.

In Übereinstimmung mit dem zuletzt genannten Punkt konnte im Rahmen dieser Arbeit für vier bislang uncharakterisierte *At*FBKs gezeigt werden, dass sie, zusätzlich zu den drei gut konservierten

und durch die Pfam-Datenbank bestätigten Kelch-Repeats (Abb. 3.19\_A), noch zwei weitere weniger konservierte Kelch-Motive aufweisen. Diese schwach konservierten Kelch-Motive sind ebenfalls zur Ausbildung von viersträngigen Propellerblättern in der Lage und komplettieren somit die Propellerstruktur (Abb. 3.19 und 7.4). Hinzukommend erkennen andere Algorithmen/Datenbanken wie Interpro, die ebenfalls der Identifizierung von Proteinmotiven dienen, in der Mehrheit der FBKs durchaus ein vollständiges  $\beta$ -Propeller-Motiv (IPR015915, IPR015916). Daher kann vermutet werden, dass die meisten pflanzlichen FBKs tatsächlich in der Lage zu sein scheinen, einen vollständigen  $\beta$ -Propeller auszubilden oder zumindest eine Tertiärstruktur formen, die dem  $\beta$ -Propeller sehr ähnelt.

Da die Pfam-Datenbank oftmals Kelch-Motive, die am C-terminalen Ende der Kelch-Domäne liegen, nicht mehr als solche erkennt kann man vermuten, dass der Konservierungsgrad der Kelch-Domäne zu ihrem C-terminalen Ende hin abnimmt. Dies könnte auf eine beginnende Degenerierung der Kelch-Domäne hindeuten. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich Kelch-Motive, die an der gleichen Position innerhalb verschiedener Proteine liegen, ähnlicher sind, als die verschiedenen Kelch-Motive innerhalb eines Proteins (Abb. 7.2). Bestätigt wird diese Beobachtung dadurch, dass es möglich war Spezies-übergreifend Konsensussequenzen zu erstellen, die spezifisch für jede Repeat-Position sind (Abb. 3.1). Außerdem gruppieren FBK-Proteine entsprechend der Anzahl ihrer Kelch-Repeats und nicht etwa entsprechend der dazugehörigen Spezies (Abb.3.2). Diese Daten sprechen dafür, dass die verschiedenen Kelch-Motive nicht unabhängig voneinander in den unterschiedlichen FBK-Proteinen entstanden sind, sondern bereits in einem gemeinsamen Vorläufer der FBKs vorhanden waren.

#### **4.1.2 FBKs können entsprechend ihres Konservierungsgrades kategorisiert werden**

Im Gegensatz zu tierischen Organismen, in denen jeweils nur ein FBK nachgewiesen werden konnte (Tab. 3.2), ist die FBK-Subfamilie in den hier analysierten Landpflanzen enorm expandiert (Tab. 3.1). Die phylogenetischen Zusammenhänge der zahlreichen identifizierten Landpflanzen-FBKs sowie des FBKs der Grünalge *C. reinhardtii* werden durch einen phylogenetischen Baum reflektiert (Abb. 3.2 und 7.1). Dieser Baum ermöglicht zudem die Identifizierung phylogenetischer Kladen, bestehend aus FBKs die entweder konserviert in mehreren Pflanzenspezies vorliegen oder aber artspezifisch sind. Mit einer ähnlichen Vorgehensweise führte Thomas (2006) eine detaillierte Studie zur Charakterisierung von FBPs in drei *Caenorhabditis*-Spezies durch. Der Autor gliederte die FBPs der *Caenorhabditis*-Spezies in die Kategorien „stabil“ und „instabil“. Er stellte die Hypothese auf, dass stabile Gene vermutlich evolutionär älteren Ursprungs sind und der spezifischen Erkennung endogener Substrate dienen. Instabile Gene hingegen entstehen durch *Birth-Death*-Evolution, unterliegen permanenten Veränderungen und sind vornehmlich in der Erkennung Organismus-fremder Proteine involviert (Thomas 2006). Dieser Hypothese entsprechend fand Thomas Belege dafür, dass die C-terminale Substratbindedomäne von instabilen Genen positiven Selektionsmechanismen unterliegt, wohingegen die Substratbindedomäne stabiler Gene durch negative Selektion gekennzeichnet ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die von Thomas (2006) etablierte „stabil/instabil“ Terminologie übernommen und durch die Kategorien „superstabil“ und „ursprünglich“ ergänzt. Darüber hinaus

konnten ähnliche Signaturen von natürlicher Selektion nachgewiesen werden, die auf *FBKs* von *At* einwirken. So weisen superstabile *AtFBKs* insgesamt sehr niedrige  $K_a/K_s$ -Werte auf, wodurch geschlussfolgert werden kann, dass die Evolution superstabiler *FBKs* stark durch negative Selektionsmechanismen geprägt ist (Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu sind die  $K_a/K_s$ -Werte instabiler *AtFBKs* signifikant höher und tendieren eher in Richtung neutrale Selektion. *Sliding-Window*-Analysen zeigten jedoch, dass das F-Box-Motiv und die C-terminale Kelch-Repeat-Domäne instabiler *FBKs* durch entgegengesetzte Selektionsmuster gekennzeichnet sind. Während in den meisten analysierten instabilen *FBKs* die F-Box-Domäne weitestgehend konserviert ist, beinhaltet die Kelch-Domäne einzelne Regionen, die hoch variabel sind und positiver Selektion unterliegen (Abb. 3.7\_A). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die C-terminale Kelch-Repeat-Domäne auf eine Art und Weise evolviert, die die Erkennung neuer Zielproteine ermöglicht. Hingegen kann angenommen werden, dass der hohe Konservierungsgrad der F-Box darin begründet liegt, dass das F-Box-Motiv für die Integration des *FBKs* und dessen Target in den SCF-Komplex erforderlich ist, indem es die Bindung zur ASK-Adapteruntereinheit vermittelt. Die meisten der 19 funktionellen *AtASKs* sind innerhalb ihrer C-terminalen Domäne, über die die Bindung an das F-Box-Motiv erfolgt, ebenfalls hoch konserviert (Risseuw *et al.* 2003). Da die Variabilität des SCF-Komplexes eher auf dessen vielfältige Kombinationsmöglichkeiten zwischen den ASKs und den ca. 700 FBPs beruht, ist im Regelfall keine permanente Anpassung der F-Box-Domäne an neue Zielproteine erforderlich.

Dass die Mehrheit der instabilen *FBKs* (64 %) in Tandem-Repeats angeordnet ist (Abb. 3.5), spricht zudem dafür, dass diese Gruppe von *FBKs* einer permanenten Veränderung unterliegt, die vor allem auf Tandem-Duplikationen zurückzuführen ist. Aufgrund der hohen Duplikationsrate instabiler *FBKs* kann angenommen werden, dass im pflanzlichen Genom zahlreiche Kopien dieser Gene zur Verfügung stehen, die neue Bindespezifitäten durch Sub- oder Neofunktionalisierung erwerben können. Stabile, ursprüngliche und superstabile *FBKs* hingegen, sind relativ gleichmäßig über die Chromosomen verteilt (Abb. 3.5) und weisen daher keine Anzeichen einer erhöhten Duplikationsrate auf.

Falls der große Anteil an instabilen *AtFBKs* tatsächlich Zielproteine rekrutiert, die eine Rolle bei der Anpassung an sich rasch verändernde abiotische und biotische Umwelteinflüsse spielen, würde dies erklären, weshalb bislang nur sehr wenige Mitglieder der FBP-Familie in vorwärtsgerichteten genetischen Screens identifiziert wurden. Da derartige Screens in der Regel darauf ausgelegt sind genetische Komponenten zu identifizieren, die an grundlegenden Mechanismen der pflanzlichen Entwicklung und Physiologie beteiligt sind, ist die Identifizierung von FBPs, die in adaptive Prozesse involviert sind, eher unwahrscheinlich. Dem entsprechend sind die wenigen, bislang funktionell charakterisierten *FBKs*, allesamt ursprüngliche Gene mit konservierten Funktionen. AFR, ZTL, FKF1, LKP2 und HWS fallen jeweils in phylogenetische Kladen mit Orthologen in mehreren Spezies (Abb. 7.1) und sind an grundlegenden physiologischen Prozessen von *At*, wie der Regulation der zirkadianen Uhr und Lichtantwort oder der Organentwicklung beteiligt. Wenig überraschend ist auch die

Feststellung, dass 43 der 45 bislang funktionell charakterisierten FBPs in *At* (Abb. 1.3), Orthologe in einer oder mehreren der sieben analysierten Landpflanzenspezies aufweisen (Daten nicht gezeigt). Eines der zwei Ausnahmen ist SUPPRESSOR OF NIM1-1 (SON1) (Kim & Delaney 2002). Das Substrat/Zielprotein von SON1 wurde bislang nicht identifiziert. Bekannt ist jedoch, dass SON1 eine Rolle bei der Pathogenantwort von *At* spielt und somit perfekt in Thomas' (2006) Kategorie der instabilen Gene passt, für die postuliert wird, dass sie artfremde Zielproteine erkennen und binden. Während in *At* FBKs der Kategorie „instabil“ vorherrschen, konnten nur sehr wenige oder gar keine instabilen FBKs in den anderen analysierten Pflanzenspezies identifiziert werden (Abb. 3.3). Der Hypothese von Thomas (2006) folgend, kann daher angenommen werden, dass die Mehrheit der FBKs in diesen Spezies an konservierten pflanzlichen Prozessen beteiligt ist. Für diese Vermutung spricht auch, dass mehr als 50 % der FBKs von *Vv*, *Pt*, *Os*, *Sb* und *Sm* in die Kategorie „ursprünglich“ oder „superstabil“ fällt (Abb. 3.3).

#### 4.1.3 Funktionelle Redundanz und Subfunktionalisierung von *At*FBKs

Die Gesamtanzahl an FBKs innerhalb der in dieser Studie analysierten Pflanzengenome war für *At* am größten. Daher ist diese Spezies gut geeignet, um an ihr die möglichen funktionellen Konsequenzen der Expansion einer Genfamilie zu untersuchen. Gagné *et al.* (2002) argumentieren, dass Sequenz-Alignments zwischen Mitgliedern der gleichen phylogenetischen Klade darauf hindeuten, dass die meisten *At*FBPs keine unmittelbaren funktionellen Paraloge aufweisen. Durch molekulare Charakterisierung zahlreicher FBPs wurde inzwischen jedoch das Gegenteil bewiesen. So konnte beispielsweise eine zumindest partielle funktionelle Redundanz für TIR1 und einige der AFBs bei der Auxin-Perzeption nachgewiesen werden (Nihal Dharmasiri *et al.* 2005; Calderón Villalobos *et al.* 2012). Des Weiteren wurden für EIN3-BINDING F-BOX-PROTEIN 1/2 (EBF1/2) bzw. für ETP1 und ETP2 überlappende Funktionen bei der Modulation der Ethylenperzeption aufgezeigt (Binder *et al.* 2007; Qiao *et al.* 2009; An *et al.* 2010; Zhao & Guo 2011). Außerdem übernehmen ZTL, FKF1 und LKP2 redundante Funktionen innerhalb der Regulation der zirkadianen Uhr und der Steuerung des Blühprozesses (Baudry *et al.* 2010; Ito *et al.* 2012). Obwohl für die Mehrheit der FBKs bislang keine Informationen zur Funktion vorliegen, deuten die genannten Beispiele darauf hin, dass funktionelle Überlappungen zwischen FBPs relativ häufig sind. Es ist vorstellbar, dass diese funktionellen Paraloge durch adaptive Selektion entstanden sind, um die Funktion des ursprünglichen Gens zu verstärken oder, innerhalb eines Subfunktionalisierungsprozesses, neue oder zusätzliche Funktionen zu erwerben (Demuth & Hahn 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen mit *At*FBKs (Abb. 3.8) unterstützen eher das zweite Szenario, in dem eine Subfunktionalisierung paraloger Gene postuliert wird. So zeigen Gene, die phylogenetisch eng verwandt sind, deutliche Unterschiede in ihrer transkriptionellen Regulation (Abb. 3.8\_B+C). Diese Beobachtung ist sowohl für phylogenetische Kladen zutreffend, deren Gene von einander entkoppelt vorliegen, als auch für solche, deren Gene in Tandem-Repeats organisiert sind. Die differentielle Transkription eng verwandter *At*FBKs scheint somit unabhängig vom genetischen Mechanismus zu sein, der zu ihrer Ausbreitung führte.

Instabile *AtFBKs* weisen durchschnittlich eine signifikant niedrigere Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien auf, als stabile *FBKs* (Abb. 3.8\_A). Anstatt in sämtlichen Geweben sehr niedrig exprimiert zu sein, weisen die meisten instabilen *FBKs* jedoch relativ hohe Expressionswerte in einigen wenigen Geweben/Entwicklungsstadien auf. Zum einen spricht dies für eine zeitliche oder räumliche Spezialisierung der instabilen *FBKs*. Zum anderen könnte es auf eine beginnende Pseudogenisierung dieser instabilen Gene hindeuten, die auf eine graduelle Degenerierung Gewebe-spezifischer *cis*-Elemente innerhalb der Promotorregion beruht.

Durch die molekulare Charakterisierung einer ausgewählten Klade von sieben *AtFBKs*, wurden relativ einheitliche Muster in Hinblick auf deren subzelluläre Lokalisierung (Abb. 3.10) sowie deren Interaktionen mit den verschiedenen ASKs (Abb. 3.11) aufgedeckt. Diese Beobachtungen zeigen, dass diese sieben *FBKs* in der Lage zu sein scheinen, in gleiche SCF-Komplexe zu integrieren und dass sie in den gleichen zellulären Kompartimenten vorliegen.

Basierend auf den vorliegenden Informationen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass nach einer enormen Expansion der *FBK*-Subfamilie in *At*, vornehmlich zwei genetische Mechanismen zur potentiellen Subfunktionalisierung von *AtFBKs* beitragen. Zum einen bewirkt die differentielle Regulation der Transkription eine funktionelle Diversifizierung von *FBKs*. Zum anderen modifizieren positive Selektionsmechanismen, die vor allem auf die Kelch-Domäne instabiler *FBKs* einwirken, die Substratspezifität der *FBKs*.

#### 4.1.4 Vergleich der *FBKs* mit anderen *FBP*-Subfamilien

Die in dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analyse der *FBKs* trägt zusammen mit genomweiten Studien weiterer *FBP*-Subfamilien dazu bei, die Entstehungsgeschichte der *FBP*-Familie in ihrer Gesamtheit besser zu verstehen. Vergleicht man die phylogenetischen Charakteristika der *FBKs* mit denen anderer *FBP*-Subfamilien, kommen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zu Tage.

Subfamilien-spezifische Muster finden sich beispielsweise im Mechanismus der Genduplikation. Während Tandemduplikationen eine wichtige Rolle bei der Expansion von *FBKs* (Abb. 3.5) und *FBPs* mit C-terminaler FBA-Domäne (*FBAs*) spielen (Navarro-Quezada *et al.* in Vorbereitung), expandieren *FBPs* mit C-terminaler TUB-Domäne (*TLPs*) vorwiegend durch segmentelle Duplikationen (Yang *et al.* 2008). Des Weiteren weisen die *FBK*- und *FBA*-Subfamilie in den meisten der analysierten Pflanzenspezies einen relativ geringen Anteil oder gar keine artspezifischen/instabilen Gene auf. Im Gegensatz dazu expandieren die *TLPs* vor allem artspezifisch.

Die *FBP*-Subfamilien unterscheiden sich zudem in ihrer Verbreitung in tierischen Organismen. Während Proteine mit TUB-Domäne und F-Box-Motiv bislang nur für Pflanzen beschrieben wurden (Lai *et al.* 2004; Yang *et al.* 2008) und *FBKs* außerhalb des Pflanzenreiches als *single-copy* Gene zu finden sind (Tab. 3.2), zeichnet sich die *FBA*-Subfamilie auch in nicht-pflanzlichen Organismen durch eine hohe Expansionsrate aus (Navarro-Quezada *et al.* in Vorbereitung).

Allen bislang untersuchten FBP-Subfamilien gemein ist, dass die durch Duplikationen entstandenen Gene durch ein hohes Maß an funktioneller Diversifizierung gekennzeichnet sind. Sowohl für FBKs als auch für FBAs und TLPs konnte gezeigt werden, dass diese funktionelle Diversifizierung zum einen auf gewebespezifischer Expression zum anderen auf positiver Selektion innerhalb der C-terminalen Protein-Interaktionsdomäne beruht (Abb. 3.7; Yang *et al.* 2008; Navarro-Quezada *et al.* in Vorbereitung). Für FBKs und FBAs wurde zudem nachgewiesen, dass Gene, die Orthologe in mehreren Spezies besitzen, auf Sequenzebene stärker konserviert sind als artspezifische/instabile Gene (Abb. 3.6; Navarro-Quezada *et al.* in Vorbereitung).

Ob weitere FBP-Subfamilien, wie FBPs mit C-terminalen LRR-Domäne, vergleichbare evolutionäre Muster aufweisen und ähnlichen Selektionsdrücken unterliegen oder auf eine ganz andere Weise als FBKs, FBAs oder TLPs evolviert sind, bleibt zu untersuchen.

Zusätzliche Einsichten in die Phylogenie von FBP-Subfamilien könnten populationsgenetische Analysen mit verschiedenen *Arabidopsis*-Spezies liefern, die durch das 1001 Genom-Projekt (Weigel & Mott 2009) realisierbar sind.

#### 4.2 Molekulare und funktionelle Charakterisierung von *FBK1-4* aus *A. thaliana*

Mit 103 Genen gehört die Subfamilie der FBKs zu einer der größten in *At* (Tab. 3.1). Allerdings ist bislang nur für fünf dieser *At*FBKs bekannt, in welchen pflanzlichen Prozessen sie involviert sind. Auffällig ist, dass diese bereits funktionell charakterisierten FBKs (AFR, HWS, ZTL, LKP2 und FKF1) in Prozesse eingebunden sind, die innerhalb der Landpflanzen hochkonserviert sind (Harmon & Kay 2003; Han *et al.* 2004; González-Carranza *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007; Sawa *et al.* 2007; Demarsy & Fankhauser 2009; Baudry *et al.* 2010; Ito *et al.* 2012).

Auch *FBK1-4* sind innerhalb der Landpflanzen konserviert. Sie gehören zur Kategorie der stabilen Gene und besitzen demnach Orthologe in weiteren mono- und eudikotyledonen Spezies (Abb. 7.1). Die Genpaare *FBK1/FBK2* sowie *FBK3/FBK4* weisen auf Nukleotidebene eine Sequenzidentität von > 70 % auf (Tab. 3.3). Zudem wurde für *FBK1* und *FBK2* gezeigt, dass sie in Chromosomenabschnitten lokalisiert sind, die deutliche Anzeichen von Syntenie aufweisen (Xu *et al.* 2009). Diese Daten sprechen dafür, dass *FBK1/FBK2* bzw. *FBK3/FBK4* durch segmentelle Duplikationsereignisse auseinander hervorgegangen sind.

Auch auf Proteinebene sind *FBK1/FBK2* bzw. *FBK3/FBK4* durch eine relativ hohe Sequenzidentität (68 % bzw. 62 %, Tab. 3.3) gekennzeichnet. Ähnlich hohe Übereinstimmungen ergeben sich beim Vergleich der Proteinsequenzen der Auxin-Co-Rezeptoren TIR1, AFB1, AFB2 und AFB3 (54-69 %) (Dharmasiri *et al.* 2005). Zudem gruppieren TIR1 und AFB1-5 in Gagné's Phylogenie der 694 *At*FBPs unmittelbar benachbart in eine gemeinsame Klade (Gagné *et al.* 2002). Aufgrund ihrer partiell redundanten Funktionen innerhalb des Auxin-Co-Rezeptor-Komplexes (Dharmasiri *et al.* 2005, Calderón-Villalobos *et al.* 2012) sind TIR1 und die AFBs folglich nicht nur strukturell enge Verwandte, sondern stellen auch funktionelle Homologe dar. Ähnliches scheint auf *FBK1-4* zuzutreffen. Hinweise hierfür liefern zum einen Untersuchungen zur Promotoraktivität von *FBK1-4*.

Unter Verwendung eines GUS-Reportersystems wurde gezeigt, dass die Promotoren von *FBK3* und *FBK4* in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von *At* nahezu identische Aktivitätsmuster aufweisen (Abb. 3.14 bis 3.16). Zum anderen ergaben Interaktionsstudien, die mit dem *Yeast-two-Hybrid*-System durchgeführt wurden, dass *FBK3* und *FBK4* mit exakt den gleichen ASK-Adaptorproteinen interagieren (Abb. 3.18\_B). Auch *FBK1* und *FBK2* stimmen in ihrem ASK-Interaktionsmuster nahezu überein. Hinzu kommt, dass die starken Übereinstimmungen in den ASK-Interaktionen nicht nur innerhalb der beiden Paare *FBK1/FBK2* und *FBK3/FBK4* vorhanden sind, sondern generell alle vier *FBKs* über ein ähnliches Set an ASKs in den SCF-Komplex integrieren. Tatsächlich bestehen die einzigen Unterschiede darin, dass *FBK3* und *FBK4*, im Gegensatz zu *FBK1* und *FBK2*, neben elf weiteren ASKs, zusätzlich mit *ASK2* und *ASK11* interagieren.

Auf eine zumindest partielle funktionelle Redundanz von *FBK1-4*, lässt auch eine Co-Expressionsanalyse schließen, die auf öffentlich verfügbaren Micro-Array-Daten basiert und Informationen zur Responsivität von *AtFBKs* gegenüber abiotischen Stressoren, Pathogenen sowie Phytohormonen und ihren Inhibitoren beinhaltet. Diese Cluster-Analyse ergab, dass *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* eng zusammen gruppieren und somit nach Behandlung mit verschiedenen abiotischen und biotischen Stressoren auf ähnliche Weise in ihrer Transkription beeinflusst werden (Abb. 3.25).

Nicht zuletzt könnte die Tatsache, dass bislang für keine der analysierten Einzel-, Doppel- oder Tripel-Mutanten von *FBK1-4* ein gegenüber dem Wildtyp veränderter Phänotyp beobachtet werden konnte, darauf hindeuten, dass der Ausfall eines oder mehrerer der vier *FBKs* durch verbliebene Vertreter dieser kleinen Genfamilie kompensiert wird. Würde diese Annahme zutreffen, könnte man erwarten, dass in den Knock-Out-Mutanten jeweils eines oder mehrere der noch intakten paralogen *FBKs* überexprimiert werden, um den Ausfall des inaktivierten Gens auszugleichen (Kafri *et al.* 2009). Messungen der Transkriptmengen von *FBK1-4* in den verschiedenen Knock-Out-Linien lieferten tatsächlich den Nachweis, dass einige der vier *FBKs* eine erhöhte transkriptionelle Aktivität aufweisen, wenn andere *FBKs* der kleinen Genfamilie nicht mehr funktionell sind (Abb. 3.26).

#### 4.2.1 *FBK1-4* beeinflussen die Expression pflanzlicher Abwehrgene

Über die genaue Funktion von *FBK1-4* ist bislang nur sehr wenig bekannt. Weder waren Mutantenlinien von *FBK1-4* charakterisiert, noch gab es Informationen darüber, welche Zielproteine von *FBK1-4* erkannt und für den Abbau im 26S-Proteasom markiert werden. Mit dem Ziel, Genaueres über die biologische Funktion von *FBK1-4* zu erfahren, wurden im Rahmen eines revers-genetischen Ansatzes entsprechende Mutantenlinien erzeugt bzw. isoliert. Zum einen wurde für jedes der vier *FBKs* eine Überexpressionslinie generiert, in der die Transkription des jeweiligen *FBKs* um mindestens das 30-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (Abb. 3.24). Zum anderen wurden, ausgehend von T-DNA-Insertionsmutanten, homozygote Knock-Out-Linien selektiert, die eine gegenüber dem Wildtyp stark reduzierte Expression von *FBK1*, *FBK2* bzw. *FBK4* aufweisen (Abb. 3.21). Aufgrund der zahlreichen Hinweise auf eine funktionelle Redundanz einer oder mehrerer der vier *FBKs*, wurde die Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* generiert. Da keine Knock-Out-Mutante für

*FBK3* isoliert werden konnte, wurde mittels amiRNA- bzw. RNAi-basierter Ansätze versucht, eine entsprechende Quadrupelmutante zu generieren. Diese Versuche blieben jedoch bislang erfolglos (Abb. 3.22\_B und 3.23\_B).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass weder amiRNA- noch RNAi-Konstrukte eine Verringerung der *FBK3*-Transkriptmengen im Hintergrund der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Mutante bewirkten, könnten *Silencing*-Effekte sein, die auf Sequenzhomologien zwischen dem 35S-Promotor des Transgens und dem 35S-Promotor einer der T-DNAs in der Tripelmutante beruhen. Dieser bereits beschriebene Effekt wird auch als *trans*-Inaktivierung bezeichnet. Er geht mit dem epigenetischen *Silencing* des Transgens bzw. mit dem Abbau der entsprechenden mRNA einher und kommt häufig in multiplen SALK- oder GABI-Kat T-DNA-Insertionslinien vor, da die Kanamycin-Kassette der T-DNA mit einem 35S-Promotor ausgestattet ist (Daxinger *et al.* 2008). Um derartige *Silencing*-Effekte zu umgehen, sollte zukünftig davon abgesehen werden, Transgene, die im Hintergrund einer SALK- oder GABI-Kat T-DNA-Insertionslinie funktionell sein sollen, mit weiteren 35S-Promotoren zu transformieren. Stattdessen sollten konstitutive Promotoren, wie der UBQ10-Promotor (Grefen *et al.* 2010), der keine starken Sequenzhomologien zur T-DNA aufweist, Anwendung finden.

Da weder die Einzel, Doppel- oder Tripelmutanten, noch die Überexpressionslinien von *FBK1-4* unter normalen Anzuchtbedingungen einen gegenüber dem Wildtyp veränderten Phänotyp aufweisen, sollten Micro-Array-Analysen Aufschluss darüber geben, innerhalb welcher biologischen Signalwege *FBK1-4* aktiv sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass zahlreiche FBPs (z. B. TIR1, COI1, ETP1/2) Komponenten innerhalb von Signalwegen darstellen und indirekt die Expression anderer Gene regulieren (Ruegger *et al.* 1998; Xu *et al.* 2002; Qiao *et al.* 2009; Yan *et al.* 2009). Die Ergebnisse des Micro-Arrays zeigten, dass viele der Gene, die in Keimlingen der *fbk1/fbk2-1/fbk4*-Mutante gegenüber dem Wildtyp in ihrer Expression inhibiert sind, entweder in Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt sind und/oder eine Rolle bei Verwundungsreaktionen in Folge von Herbivorie spielen (Tab. 3.5). So sind zwölf Gene unmittelbar an der Salizylsäure-abhängigen oder -unabhängigen Abwehr gegen Pilze, Bakterien oder Nematoden beteiligt. Hierzu gehört unter anderem: (i) *PR1*, das ein Markergen der Salizylsäure-abhängigen systemisch erworbenen Resistenz (SAR, für *Systemic acquired resistance*) ist und somit direkt in pflanzliche Abwehrprozesse gegen Pathogene involviert ist (Van Loon & Van Strien 1999; Hamamouch *et al.* 2011). (ii) *WRKY70* und *WRKY46*, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und positive Regulatoren der basalen Resistenz gegenüber *P. syringae* darstellen (Hu *et al.* 2012; Shim *et al.* 2013). (iii) *PCC1*, das als positiver Regulator innerhalb der pflanzlichen Abwehr gegenüber virulenten Oomyceten fungiert (Sauerbrunn & Schlaich 2004) und (iv) *WAK1*, von dem angenommen wird, dass es für einen Oligogalacturonid-Rezeptor kodiert und an Abwehrprozessen gegen pilzliche und bakterielle Pathogene beteiligt ist (Brutus *et al.* 2010). Zudem sind zwei Glukosinolatbiosynthesegene, *BCAT4* und *MAM1*, in der Tripelmutante transkriptionell inhibiert. Glukosinolate fungieren in Brassicaceen als Geruchs- und Geschmacksstoffe und spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr (Halkier & Jonathan

Gershenzon 2006). Als Komponenten der Jasmonatbiosynthese bzw. des Jasmonatsignalweges, sind außerdem *JAR1* und *LOX2* in Verwundungsreaktionen der Pflanzen sowie in Abwehrprozesse gegen mikrobielle Pathogene involviert (McConn *et al.* 1997; Vijayan *et al.* 1998; Staswick *et al.* 1998).

Es wurde gezeigt, dass die differentielle Expression von *JAR1* und *LOX2* in der Tripelmutante mit einer gegenüber dem Wildtyp verringerten Responsivität gegenüber MeJA korreliert (Abb. 3.28). Auch *fbk4* und *fbk1/fbk4* zeigten eine gegenüber dem Wildtyp verringerte Inhibierung des Wurzelwachstums. Daher wurde zunächst vermutet, dass *FBK4* eine Rolle in der Jasmonat-Antwort spielt. Kopplungs- und Komplementationsanalysen ergaben jedoch, dass ein Knock-Out von *FBK4* nicht für den beobachteten Mutantenphänotyp auf MeJA verantwortlich war (Abb. 3.29 und 3.30). Daher wurde geschlussfolgert, dass die veränderte Responsivität von *fbk4*, *fbk1/fbk4* und *fbk1/fbk2-1/fbk4* auf eine zusätzliche Mutation unbekanntes Ursprungs beruht, die an einer nicht bekannten Position innerhalb des Genoms lokalisiert ist.

Überraschend ist, dass diese unbekanntes Mutation, die vermutlich rezessiv ist und keine genetische Kopplung mit dem *FBK4*-Lokus aufweist (Abb. 3.29), über zwei Kreuzungen hinweg im Genom der *fbk1/fbk4*-Doppelmutante sowie der *fbk1/fbk2-1/fbk4* Tripelmutante erhalten geblieben ist. Bei dem hier gewählten Kreuzungsansatz liegt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine rezessive Mutation, die unabhängig vom *FBK4*-Lokus segregiert und somit keiner gezielten Selektion unterlag, auch in der Tripelmutante erhalten bleibt, bei 1:64. Es kann auch ausgeschlossen werden, dass die Mutation unbekanntes Ursprungs genetische Kopplung mit *FBK1* oder *FBK2* aufweist, da weder die Einzelmutanten *fbk1* und *fbk2-1*, noch die Doppelmutanten *fbk1/fbk2-1* und *fbk2-2/fbk4* den veränderten Wurzelphänotyp auf MeJA aufweisen. Der fehlende Mutantenphänotyp von *fbk2-2/fbk4* lässt zudem die Schlussfolgerung zu, dass bei der Generierung dieser Mutante die Hintergrundmutation herausgekreuzt wurde (Abb. 3.28).

Da die Tripelmutante *fbk1/fbk2-1/fbk4* eine zusätzliche Mutation unbekanntes Ursprungs enthält, müssen die Resultate des Micro-Arrays kritischer betrachtet werden. Ursächlich für die differentielle Genexpression in der Tripelmutante (Tab. 3.5 und 3.6) könnten sowohl die T-DNA-Mutationen in den *FBK*-Genen als auch die unbekanntes Hintergrundmutation sein.

Nichtsdestotrotz deuten auch die Micro-Array-Resultate der *FBK*-Überexpressionslinien darauf hin, dass *FBK1-4* an der transkriptionellen Regulation pflanzlicher Abwehrgene beteiligt sind. So sind auch in ein oder mehreren der Überexpressionslinien zahlreiche Abwehrgene differentiellem exprimiert. *WRKY70*, *WAK1*, *PCC1* und *PR1* beispielsweise zeigen eine deutliche Inhibierung ihrer Transkription in den Linien 35S::*FBK2* und 35S::*FBK4* (Abb. 3.27). Darüber hinaus zeigen vier weitere Gene (*LATE UPREGULATED IN RESPONSE TO HYALOPERONOSPORA PARASITICA* [*LURP1*], *SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1* [*SIB1*], *PATATIN-LIKE PROTEIN 2A* [*PLA2A*] und *HOMOLOG OF RPW8 4* [*HR4*]), die in pflanzliche Abwehrprozesse involviert sind (Orgil *et al.* 2007; Knoth & Eulgem 2008; Camera *et al.* 2009; Xie *et al.* 2010), deutlich reduzierte Transkriptmengen in den Überexpressionslinien von *FBK2* und *FBK4* (Tab. 7.5). Dies lässt vermuten, dass diese *FBKs* eine

Rolle als negative Regulatoren pflanzlicher Abwehrgene spielen. Viele der pflanzliche Abwehrgene sind unter nicht-induzierten Bedingungen, das heißt in Abwesenheit von Pathogenen und/oder entsprechender Elicitoren, nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert und werden erst nach Pathogenbefall der Pflanze induziert (Denoux *et al.* 2008). Es wäre möglich, dass die Funktion von *FBK2* und *FBK4* darin besteht, dass sie unter nicht-induzierten Bedingungen indirekt die Expression pflanzlicher Abwehrgene wie *PR1*, *WRKY70*, *WAK1* oder *PCC1* inhibieren, indem sie positive Regulatoren dieser Abwehrgene binden und für den Abbau im 26S-Proteasom markieren. Zu den direkten Zielproteinen von *FBK2/4* könnten Transkriptionsfaktoren gehören, die unter Einwirkung von biotischem Stress die Transkription der genannten Abwehrgene induzieren. Beispielhaft für derartige Transkriptionsfaktoren steht MYB DOMAIN PROTEIN 44 (MYB44), das als transkriptioneller Aktivator von *WRKY70* fungiert, indem es direkt an konservierte Sequenzelemente innerhalb des *WRKY70*-Promotors bindet (Shim *et al.* 2013). *WRKY70* selbst kodiert ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor, der wiederum die Aktivität von *PR1* positiv reguliert. Eine Folge dieser Genaktivierungskaskade ist unter anderem das Anschalten von Abwehrmechanismen gegenüber dem biotrophen Bakterium *P. syringae*.

Falls eines oder mehrere der vier FBKs unter nicht-induzierten Bedingungen als negative Regulatoren innerhalb der pflanzlichen Pathogenabwehr aktiv sind, könnten die *fbk*-Mutanten eine veränderte Responsivität gegenüber biotischen Stressoren zeigen. Es wäre vorstellbar, dass die konstitutive Überexpression eines oder mehrerer der *FBKs* dazu führt, dass die pflanzlichen Abwehrgene auch nach Pathogenbefall transkriptionell inhibiert werden. Die Konsequenz könnte eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber bestimmten Pathogenen sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Überexpressionslinien und die *fbk1/fbk2-1/fbk4*-Tripelmutante zunächst auf ihre Responsivität gegenüber den bakteriellen Elicitoren flg22 und elf18 untersucht. Insbesondere für die Überexpressionslinien von *FBK2* und *FBK4* wäre eine veränderte Responsivität gegenüber bakteriellen Elicitoren vorstellbar, da einige positive Regulatoren der Abwehr gegen das Bakterium *P. syringae* in diesen Pflanzen transkriptionell reprimiert sind. Hierzu gehören *WRKY70* (Shim *et al.* 2013), *PR1* (Cameron *et al.* 1999) und *SIB1* (Xie *et al.* 2010). Weder die Perzeption der bakteriellen Elicitoren, noch die Transduktion des Elicitorsignals scheinen jedoch in den Mutantenlinien beeinträchtigt zu sein (Abb. 3.31 und 3.32). Auch vermehren sich Bakterien vom Stamm *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 in den *fbk*-Mutanten im gleichen Maße wie im Wildtyp (Abb. 3.33). Folglich scheint die Abwehrreaktion gegenüber *P. syringae* in den *fbk*-Mutanten intakt zu sein.

Des Weiteren wurden *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* auf eine vom Wildtyp abweichende Responsivität gegenüber dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* untersucht. In einem ersten Experiment führt die Überexpression von *FBK4* zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *B. cinerea* (Abb. 3.34). Eines der Gene, das in den Resistenzmechanismen der Pflanze gegenüber *B. cinerea* involviert ist, ist *WAK1*. Die Überexpression von *WAK1* führt beispielsweise zu einer

verstärkten Resistenz gegenüber der Infektion mit *B. cinerea* (Brutus *et al.* 2010). Interessanterweise korreliert die erhöhte Suszeptibilität von der 35S::*FBK4*-Linie mit einer stark reduzierten *WAK1*-Transkription (Abb. 3.27). Dies spricht dafür, dass die in der 35S::*FBK4*-Linie stark reduzierte *WAK1*-Transkription zu einer beeinträchtigten Abwehr der Mutante gegenüber *B. cinerea* führt.

Trotz der Hinweise der Micro-Array-Experimente, die auf eine Rolle von *FBK2* und *FBK4* an der pflanzlichen Pathogenabwehr und Verwundungsreaktionen schließen lassen, konnte bislang für keine der *fbk*-Mutanten ein reproduzierbarer konditioneller Phänotyp nachgewiesen werden, der im Zusammenhang mit der Abwehr gegen Pathogene und/oder Verwundungsreaktion steht. Bevor eine Beteiligung der FBKs an der Pathogenantwort der Pflanze jedoch vollständig ausgeschlossen wird, sollten die *fbk*-Mutanten auf ihre Responsivität gegenüber weiteren, bislang nicht untersuchten Phytopathogenen wie Pilzen und Nematoden sowie herbivoren Insekten untersucht werden.

Als ein weiterer methodischer Ansatz zur Entschlüsselung der biologischen Funktion der FBKs dienen *Yeast-two-Hybrid*-Screens. Die Identifizierung der Zielproteine der FBKs könnte Informationen über die Signal- oder Stoffwechselwege liefern, in denen die FBKs funktionell sind.

Die Resultate des ersten *Yeast-two-Hybrid*-Screens, in dem *FBK1* als *Bait*-Protein verwendet wurde, deuten ebenfalls auf eine mögliche Funktion der FBKs innerhalb pflanzlicher Abwehrmechanismen hin. Bislang sprachen nur wenige Ergebnisse dieser Studie dafür, dass *FBK1* eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen könnte. So wies die *FBK1*-Überexpressionslinie keine differentielle Transkription der zahlreichen, in 35S::*FBK2* oder 35S::*FBK4* induzierten Abwehrgene auf (Tab.7.5). Auch waren die Glukosinolat-Biosynthesegene *BCAT4* und *MAMI* in 35S::*FBK1* kaum in ihrer Transkription verändert (Abb. 3.27).

Unter Verwendung von *FBK1* als *Bait*-Protein konnte jedoch *PAL2* als potentielles Zielprotein identifiziert und anschließend, in einem direkten Interaktionstest mit *FBK1*, auch als solches verifiziert werden (Abb. 3.36). Den initialen Schritt der Phenylpropanoidsynthese katalysierend (Rohde *et al.* 2004), ist *PAL2* an der Synthese zahlreicher Sekundärmetabolite beteiligt, die unter anderem eine Rolle bei Abwehrreaktionen der Pflanze gegenüber Pathogenen und Herbivoren spielen (Ferrer *et al.* 2008). *PAL2* gehört einer kleinen Genfamilie an, die in *At* aus vier Mitgliedern besteht (*PAL1-4*). Unter normalen Anzuchtbedingungen zeigt keine der vier *pal*-Einzelmutanten einen gegenüber dem Wildtyp veränderten Phänotyp (Rohde *et al.* 2004; Huang *et al.* 2010). Jedoch wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der PALs und einer funktionierenden Pathogenabwehr von *At* nachgewiesen. So sind Pflanzen, die mit einem PAL-Inhibitor behandelt wurden, vollständig suszeptibel gegenüber dem Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* (Mauch-Mani & Slusarenko 1996). Mit der Identifizierung von *PAL2* als potentielles Zielprotein von *FBK1* wird folglich eine Verbindung zwischen *FBK1* und der pflanzlichen Pathogenantwort geschaffen. Möglicherweise spielt *FBK1* eine Rolle bei der spezifischen Abwehrreaktion von *At* gegen Oomyceten wie *H. paratica*. Um dem nachzugehen, sollte zukünftig die Responsivität der Mutanten von *FBK1*, aber auch der Mutanten der anderen drei *FBKs*, gegenüber verschiedenen Oomyceten untersucht werden. Zuvor jedoch ist die

Verifizierung der Interaktion zwischen PAL2 und FBK1 *in planta* erforderlich. Ob auch FBK3 und FBK4 Zielproteine binden, die im Zusammenhang mit der pflanzlichen Pathogenantwort stehen, sollte durch die Durchführung weiterer *Yeast-two-Hybrid*-Screens ebenfalls analysiert werden.

#### 4.2.2 FBK3: Ein negativer Regulator innerhalb der pflanzlichen Abwehr gegen Nematoden?

Im Vergleich zur Überexpressionslinie von *FBK2* und *FBK4* sind in 35S::*FBK3* nur wenige Abwehrgene differentiell reguliert (*LURP1* und *PCCI*; Tab. 7.5). Nichtsdestotrotz liefert eine erst kürzlich erschienene Publikation Hinweise darauf, dass auch FBK3 eine Rolle als negativer Regulator innerhalb der pflanzlichen Abwehr spielt.

Curtis *et al.* (2012) zeigten, dass *At*-Mutanten mit reduzierter *FBK3*-Aktivität eine erhöhte Resistenz gegenüber dem pflanzenparasitischen Nematoden *Meloidgyne incognita* aufweisen. Die konstitutive Überexpression von *FBK3* hingegen bewirkt eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *M. incognita*. Es scheint also, dass durch die Aktivität von *FBK3* die Infektiosität des Nematoden zunimmt. Auf diesen Beobachtungen basierend, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass *M. incognita* während des Infektionsprozesses bestimmte Effektoren in die Pflanze überträgt, die die Expression von *FBK3* induzieren (Curtis *et al.* 2012). Es wird vermutet, dass es in Folge dessen zur Ausbildung eines SCF<sup>FBK3</sup>-Komplexes kommt, der durch die Markierung bestimmter Proteine für den Abbau im 26S-Proteasom dazu beiträgt, dass Abwehrprozesse in der Pflanze gehemmt werden, die andernfalls durch *M. incognita* induziert würden. Entsprechend dieser Hypothese könnte die Funktion von FBK3 *in planta* darin bestehen, die Abwehrreaktion in Abwesenheit von biotischem Stress zu inhibieren, um damit verbundene Nachteile für die Pflanze, wie ein hoher Energieverbrauch und Wachstumseinbußen, entgegenzuwirken.

#### 4.2.3 Ausblick

Um weitere Informationen zur biologischen Funktion von *FBK1-4* zu erhalten, sollten zunächst Mutanten von *FBK1-4* auf eine veränderte Responsivität gegenüber weiteren, bislang nicht analysierten Pathogenen untersucht werden. So gibt es Hinweise darauf, dass *FBK1-4* an der Abwehrreaktion gegen bestimmte Oomyceten- und Mehltauspezies beteiligt sind. Beispielsweise ist *LURP1*, das in den Überexpressionslinien von *FBK2*, *FBK3* und *FBK4* transkriptionell inhibiert ist (Tab. 7.5), an der Aktivierung der Abwehrreaktion von *At* nach Befall mit dem pathogenen Oomyzen *H. parasitica* beteiligt (Knoth & Eulgem 2008). Zudem spricht die Identifizierung von PAL2 als potentiell Zielprotein von FBK1 für dessen Beteiligung an der Abwehr gegenüber *H. parasitica*. Pflanzen, in denen die Aktivität der PALs beeinträchtigt ist, sind vollständig suszeptibel gegenüber *H. parasitica* (Mauch-Mani & Slusarenko 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ein homologes Gen von *HR4* aus *Arabidopsis lyrata* (RPW8.2) in *At* Resistenz gegenüber Vertretern der Mehltauordnung *Erysiphales* vermittelt (Orgil *et al.* 2007).

Zusätzlich zu den Überexpressionslinien von *FBK1-4* sollte für diese phänotypischen Analysen zukünftig eine *fbk1/fbk2/fbk3/fbk4*-Quadrupelmutante verwendet werden. Hierdurch würde sich die

Wahrscheinlichkeit erhöhen, einen Mutantenphänotyp zu beobachten, da Effekte, die auf einer möglichen funktionellen Redundanz von *FBK1-4* beruhen, ausgeschlossen werden könnten. Mit Abschluss der hier vorliegenden Arbeit liegt bereits eine *fbk1/fbk2-1/fbk4*-Tripelmutante vor, die durch Auskreuzung mit dem Wildtyp von der Hintergrundmutation befreit wurde und somit nicht länger den gegenüber dem Wildtyp veränderten Wurzelphänotyp auf MeJA zeigt. Diese neu generierte Tripelmutante könnte in Zukunft genutzt werden, um durch Kreuzung mit der durch Curtis *et al.*, (2012) generierten *fbk3*-Tilling-Mutante eine Quadrupelmutante zu erzeugen, in der die Transkriptmengen von allen vier *FBKs* deutlich reduziert sind.

Besonders interessant wäre es, die Responsivität der multiplen *fbk*-Mutanten sowie der verschiedenen Überexpressionslinien von *FBK1-4* gegenüber dem Nematoden *M. incognita* zu untersuchen. Da bereits für *At*-Mutanten mit reduzierter *FBK3*-Aktivität eine erhöhte Resistenz gegenüber *M. incognita* aufgezeigt werden konnte (Curtis *et al.* 2012), stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch in *fbk1/fbk2-1/fbk4* zu beobachten ist bzw. in einer Quadrupelmutante verstärkt auftritt. Ebenso könnte die Behandlung der Überexpressionslinien von *FBK1*, *FBK2* und *FBK4* mit *M. incognita* Aufschluss darüber geben, ob sich der Nematode neben *FBK3* weitere Mitglieder der hier untersuchten Genfamilie zu Nutze macht, um die Resistenzmechanismen der Pflanze zu beeinflussen.

Des Weiteren sollte die mittels *Yeast-two-Hybrid*-Screen nachgewiesene Interaktion zwischen *FBK1* und *PAL2* *in planta* verifiziert werden. Dieser Nachweis könnte beispielsweise *in vitro* durch Pull-down-Assays erfolgen. Genetische Konstrukte, die für die einzelnen *FBKs* in Kombination mit einem HA- oder MYC-Tag kodieren, wurden bereits im Verlauf dieser Arbeit generiert und in *At* transformiert. Der Nachweis der Interaktion *in vivo* könnte mittels Split-YFP erfolgen. Nicht zuletzt sollte die Suche nach Interaktoren von *FBK3* und *FBK4* mittels *Yeast-two-Hybrid* Screen fortgesetzt werden.

## 5 Zusammenfassung

Während *FBKs* in tierischen Organismen nur als *single-copy* Gene vorkommen, stellen sie in Pflanzen eine der größten FBP-Subfamilien dar. Phylogenetische Analysen der FBK-Subfamilie in sieben Landpflanzenspezies und der Alge *C. reinhardtii* zeigten, dass FBKs in Kategorien eingeteilt werden können, die ihre evolutionäre Stabilität widerspiegeln. Während evolutionär superstabile FBKs Orthologe in allen sieben Landpflanzenspezies besitzen und auf Sequenzebene hochkonserviert sind, zeichnen sich evolutionär instabile FBKs in der Regel durch eine Kelch-Domäne aus, die Signale von positiver Selektion aufweist, was ihr adaptives Potential verdeutlicht. Zudem ergaben molekularbiologische Untersuchungen von eng verwandten *AtFBKs*, dass sie sich in ihrer subzellulären Lokalisation sowie in ihren ASK-Interaktionsmustern nur geringfügig unterscheiden. Erhebliche Unterschiede finden sich jedoch in ihren Expressionsmustern. Eine postulierte funktionelle Diversifizierung kommt folglich zum einen durch transkriptionelle Regulation, zum anderen durch das Einwirken positiver Selektionsmechanismen, insbesondere auf die Kelch-Domäne, zustande.

Auf Basis der phylogenetischen Analysen wurden die vier konservierten *At*-Gene *FBK1-4* für eine revers-genetische Charakterisierung ausgewählt. *FBK1-4* kodieren für *bona-fide* FBPs und sind vermutlich in pflanzliche Abwehrprozesse gegen Pathogene involviert, da die Überexpression einiger der *FBKs* zur differentiellen Transkription zahlreicher pflanzlicher Abwehrgene führt. Es wird postuliert, dass *FBK1-4* als negative Regulatoren pflanzlicher Abwehrgene fungieren und in Abwesenheit von biotischem Stress die Pathogenabwehr inhibieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, J. *et al.* 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology*, 10(1), 17-24.
- Altschul, S.F. *et al.*, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-402.
- Alvarez-Buylla, E. R. *et al.*, 2010. Flower development. *The Arabidopsis Book*, Number 8.
- An, F. *et al.*, 2010. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(7), 2384-2401.
- Andrade, M.A. *et al.*, 2001. A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large Arabidopsis family of F-Box-Proteins. *Plant Molecular Biology*, 46(5), 603-614.
- Ariizumi, T. & Steber, M., 2006. Ubiquitin becomes ubiquitous in GA signaling. Aus *A Companion to Plant Physiology*, fünfte Edition von Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger; Kapitel 20, Essay 20.2
- Bai, C. *et al.*, 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86(2), 263-274.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-97.
- Baudry, A. *et al.*, 2010. F-Box-Proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *The Plant Cell*, 22(3), 606-622.
- Baulcombe, D.C. *et al.*, 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*, 321(6068), 446-449.
- Beamer, L.J. *et al.*, 2005. Conserved solvent and side-chain interactions in the 1.35 Å structure of the Kelch domain of Keap1. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 61(10), 1335-1342.
- Belliény-Rabelo, D. *et al.*, 2013. Impact of whole-genome and tandem duplications in the expansion and functional diversification of the F-Box family in legumes (Fabaceae). *PLoS ONE*, 8(2), e55127.
- Bernstein, F.C. *et al.*, 1977. The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *European Journal of Biochemistry*, 112; 80(2), 319-24.
- Binder, B.M. *et al.*, 2007. The Arabidopsis EIN3 binding F-Box-Proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *The Plant Cell*, 19(2), 509-523.
- Book, A.J. *et al.*, 2009. The RPN5 subunit of the 26s proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(2), 460-478.
- Bork, P. & Doolittle, R.F., 1994. Drosophila kelch motif is derived from a common enzyme fold. *Journal of Molecular Biology*, 236(5), 1277-1282.
- Brutus, A. *et al.*, 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9452-9457.
- Buchan, D.W.A. *et al.*, 2010. Protein annotation and modelling servers at University College London. , 38(Web Server issue), W563-W568.
- Calderón Villalobos, L.I.A. *et al.*, 2012. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, 8(5):477-85.
- Camera, S. L. *et al.*, 2009. The Arabidopsis Patatin-like Protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 22(4), 469-481.
- Cameron, R.K. *et al.*, 1999. Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 121-130.

- Capron, A., 2003. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin–protein ligase. *Trends in Plant Science*, 8(2), 83-89.
- Cardozo, T. & Pagano, M., 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(9), 739-751.
- Cesari, F., 2010. Protein degradation: Step by step. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), 6.
- Chae, E. *et al.*, 2008. An Arabidopsis F-Box-Protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development (Cambridge, England)*, 135(7), 1235-1245.
- Chaikuad A. *et al.*. Crystal structure of the kelch domain of human khl17.
- Chen, S. & Schopfer, P., 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 726-735.
- Chen, X., 2005. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5923-31.
- Cheng, Y.T. *et al.*, 2011. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35):14694-9
- Chinchilla, D. *et al.*, 2006. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell*, 18(2), 465-476.
- Ciechanover, A., 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(1), 79-87.
- Cope, G.A. *et al.*, 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, 298(5593), 608 -611.
- Curtis, R.H.C., 2012. The Arabidopsis F-box/Kelch repeat protein At2g44130 is up-regulated in giant-cells and promotes nematode susceptibility. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1):36-43.
- Czechowski, T. *et al.*, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 5-17.
- Daxinger, L. *et al.*, 2008. Unexpected silencing effects from T-DNA tags in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 13(1), 4-6.
- Decreux, A., *et al.*, 2006. In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*, 67(11), 1068-79.
- De Franceschi, P. *et al.*, 2012. Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the Pyrinae (Rosaceae). *Journal of Experimental Botany*, 63(11):4015-32.
- Demarsy, E. & Fankhauser, C., 2009. Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(1), 69-74.
- Demuth, J.P. & Hahn, M.W., 2009. The life and death of gene families. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(1), 29-39.
- Denoux, C. *et al.*, 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular plant*, 1(3), 423-445.
- Dezfulian, M.H. *et al.*, 2012. The SKP1-like gene family of Arabidopsis exhibits a high degree of differential gene expression and gene product interaction during development. *PLoS ONE*, 7(11), e50984.
- Dharmasiri, N. *et al.*, 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell*, 9(1), 109-119.
- Dill, A. *et al.*, 2004. The Arabidopsis F-Box-Protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell*, 16(6), 1392-1405.
- Dong, L. *et al.*, 2006. An auxin-inducible F-Box-Protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 60(4), 599-615.
- Downes, B.P. *et al.*, 2003. The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *The Plant Journal*, 35(6),729-742.

- Dunn Jr., M.A., 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in Cell Biology*, 4(4), 139-143
- Dürr, M. *et al.*, 2006. Nonredundant roles of mitochondria-associated F-Box-Proteins Mfb1 and Mdm30 in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17(9), 3745-3755.
- Eddy, S.R., 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 755-763.
- Farrás, R. *et al.*, 2001. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *The EMBO Journal*, 20(11), 2742-2756.
- Felix, G. *et al.*, 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18(3), 265-276.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.
- Ferrer, J. F. *et al.*, 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356-370.
- Fields, S. & Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-6
- Finn, R.D. *et al.*, 2009. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 38(Database), D211-D222.
- Firbank, S.J. *et al.*, 2001. Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: An unusual self-processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 12932-12937.
- Fonseca, S. *et al.*, 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 539-547.
- Fonseca, S. *et al.*, 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344-350.
- Fülöp, K. & Tarayre, S., 2005. Arabidopsis Anaphase-Promoting Complexes: Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle*, 4(8), 4084-4092.
- Fülöp, V. & Jones, D.T., 1999. Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 715-721.
- Gagne, J.M. *et al.*, 2002. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11519-24.
- Galan, J. *et al.*, 2001. Skp1p and the F-Box-Protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(9), 3105-3117.
- Gingerich, D.J. *et al.*, 2005. Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/Bric-a-Brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18810-18821.
- Goldberg, A.L., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895-899.
- Goldenberg, S. J. *et al.*, 2004. Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell*, 119(4), 517-528.
- Gomez-Gomez, L. & Boller, T., 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011.
- González-Carranza, Z.H. *et al.*, 2007. Hawaiian skirt: an F-box gene that regulates organ fusion and growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144(3), 1370-82.
- Gou, M. *et al.*, 2011. The F-Box-Protein CPR1/CPR30 negatively regulates R protein SNC1 accumulation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 69(3):411-20.
- Gou, M. *et al.*, 2009. An F-box gene, CPR30, functions as a negative regulator of the defense response in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 60(5), 757-770.

- Gough, J. *et al.*, 2001. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 903-919.
- Gray, C.H. *et al.*, 2009. Novel  $\beta$ -Propeller of the BTB-kelch protein Krp1 provides a binding site for Lasp-1 that is necessary for pseudopodial extension. , 284(44), 30498-30507.
- Greenham, K. *et al.*, 2011. The AFB4 auxin receptor is a negative regulator of auxin signaling in seedlings. *Current Biology*, 21(6):520-5
- Grefen, C. *et al.*, 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 64(2), 355-365.
- Groll, M. *et al.*, 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 286, 463-471.
- Guo, H. & Ecker, J.R., 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 115(6), 667-677.
- Halkier, B.A. & Gershenzon, J., 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 303-333.
- Hamamouch, N. *et al.*, 2011. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 355-364.
- Han, L. *et al.*, 2004. Formation of an SCF(ZTL) complex is required for proper regulation of circadian timing. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 40(2), 291-301.
- Hanada, K. *et al.*, 2008. Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiol.*, 148(2), 993-1003.
- Hao, B. *et al.*, 2007. Structure of a Fbw7-Skp1-Cyclin E Complex: Multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 26(1), 131-143.
- Harmon, F.G. & Kay, S.A., 2003. The F box protein AFR is a positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling. *Current Biology: CB*, 13(23), 2091-2096.
- Hartmann-Petersen, R. *et al.*, 2003. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 26-31.
- Haughn, G.W. *et al.*, 1991. Biochemical genetics of plant secondary metabolites in Arabidopsis thaliana : The Glucosinolates. *Plant Physiology*, 97(1), 217 -226.
- Hedges, S.B. *et al.*, 2006. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics*, 22(23), 2971 -2972.
- Helliwell, C.A. & Waterhouse, P.M., 2005. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods in Enzymology*, 392, 24-35.
- Hellmann, H. & Estelle, M., 2002. Plant development: Regulation by protein degradation. *Science*, 297(5582), 793 -797.
- Hermand, D., 2006. F-Box-Proteins: more than baits for the SCF? *Cell Division*, 1, 30.
- Hicke, L., Dunn, R., 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 141-172.
- Higa, L. A. & Zhang, H., 2007. Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Division*, 2(5).
- Ho, M.S. *et al.*, 2008. The utility F-box for protein destruction. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(13), 1977-2000.
- Höck, J. & Meister, G., 2008. The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2), 210-210.
- Hogge, L. *et al.*, 1988. HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of Arabidopsis thaliana and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 26(11), 551 -556.
- Hong, M.J. *et al.*, 2012. Wheat F-Box-Protein recruits proteins and regulates their abundance during wheat spike development. *Molecular Biology Reports*, 39(10):9681-96.

- Horvath, D.M. & Chua, N., 1996. Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Molecular Biology*, 31(5), 1061-1072.
- Hotton, S.K. & Callis, J., 2008. Regulation of cullin RING ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 467-489.
- Hu, Y. *et al.*, 2012. Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*, 185-186, 288-297.
- Hua, Z. *et al.*, 2011. Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift. *PLoS ONE*, 6(1), e16219.
- Huang, J. *et al.*, 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *PLANT PHYSIOLOGY*, 153(4), 1526-1538.
- Ito, N. *et al.*, 1994. Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase. *Journal of Molecular Biology*, 238(5), 794-814.
- Ito, S. *et al.*, 2012. LOV domain-containing F-Box-Proteins: Light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 5(3):573-82.
- Jain, M. *et al.*, 2007. F-Box-Proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiology*, 143(4), 1467-83.
- Jarvis, W.R., 1977. Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity: a guide to the literature.
- Jawad, Z. & Paoli, M., 2002. Novel sequences propel familiar folds. *Structure (London, England: 1993)*, 10(4), 447-454.
- Jin, J. *et al.*, 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-Box-Proteins. *Genes & Development*, 18(21), 2573-80.
- Jones, D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(2), 195-202.
- Kafri, R. *et al.*, 2009. Genetic Redundancy: New tricks for old genes. *Cell*, 136(3), 389-392.
- Katagiri, F. *et al.*, 2002. The Arabidopsis thaliana-*Pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis Book 1*: e0039.
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols*, 4(3), 363-371.
- Kepinski, S. & Leyser, O., 2005. The Arabidopsis F-Box-Protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041), 446-451.
- Kilian, J. *et al.*, 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal*, 50(2), 347-63.
- Kim, H.S. & Delaney, T.P., 2002. Arabidopsis SON1 is an F-Box-Protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 14(7), 1469-82.
- Kim, O. *et al.*, 2010. An Arabidopsis F-Box-Protein regulates tapetum degeneration and pollen maturation during anther development. *Planta*, 232(2), 353-366.
- Kim, W. *et al.*, 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449(7160), 356-60.
- Kipreos, E.T. & Pagano, M., 2000. The F-Box-Protein family. *Genome Biology*, 1(5), REVIEWS 3002.
- Kishino, H. & Hasegawa, M., 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *Journal of Molecular Evolution*, 29(2), 170-179.

- Knoth, C. & Eulgem, T., 2008. *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 22(1), 53-64.
- Koepp, D.M. *et al.*, 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of Cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*, 294(5540), 173-177.
- Koo, A.J.K. & Howe, G.A., 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1571-1580.
- Kotchoni, S.O. & Gachomo, E.W., 2006. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Bioscience*, 31(3), 289-404.
- Kovtun, Y. *et al.*, 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2940-2945.
- Kroymann, J. *et al.*, 2001. A gene controlling variation in Arabidopsis glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiology*, 127(3), 1077-1088.
- Kunze, G. *et al.*, 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496-3507.
- Kurepa, J. & Smalle, J.A., 2008. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, 90(2), 324-335.
- Kurepa, J. *et al.*, 2009. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 4(10), 924-927.
- Lai, C. *et al.*, 2004. Molecular analyses of the Arabidopsis TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiology*, 134(4), 1586-1597.
- Lam, Y.A. *et al.*, 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, 416(6882), 763-767.
- Lechner, E. *et al.*, 2006. F-Box-Proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 631-8.
- Leung, K. *et al.*, 2004. ACBP4 and ACBP5, novel Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Molecular Biology*, 55(2), 297-309.
- Levine, A. *et al.*, 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
- Li, X. *et al.*, 2004. Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54750-54758.
- Librado, P. & Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451 -1452.
- Lincoln, C., Britton, J.H. & Estelle, M., 1990. Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *Plant Cell*, 2(11), 1071-1080.
- Liu, J. *et al.*, 2002. NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120<sup>CAND1</sup>, an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Molecular Cell*, 10(6), 1511-1518.
- Logemann, E. *et al.*, 2006. An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods*, 2, 16.
- Lou, P. *et al.*, 2012. Preferential retention of circadian clock genes during diploidization following whole genome triplication in Brassica rapa. *The Plant Cell*, 24(6):2415-26.
- Lyapina, S. *et al.*, 2001. Promotion of NEDD8-CUL1 conjugate cleavage by COP9 Signalosome. *Science*, 292(5520), 1382 -1385.
- Lynch, M. & Conery, J.S., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494), 1151 -1155.
- Mauch-Mani, B. & Slusarenko, A., 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to Peronospora parasitica. *The Plant Cell*, 8(2), 203-212.
- Mazzucotelli, E. *et al.*, 2006. The e3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Current Genomics*, 7(8), 509-522.

- McConn, M. *et al.*, 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5473 -5477.
- Mizushima, T. *et al.*, 2007. Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCFFb1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), 5777-5781.
- Mora-García, S. *et al.*, 2004. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes & Development*, 18(4), 448-460.
- Mou, Z. *et al.*, 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935-944.
- Nakagawa, T. *et al.*, 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34-41.
- Navarro, L. *et al.*, 2006. A Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439.
- Niaz Mahmood, M.M.M., 2012. Members of Ectocarpus siliculosus F-box family are subjected to differential selective forces. *Interdisciplinary Bio Central*, 4, 1-7.
- Ogura, Y. *et al.*, 2008. Blue light diminishes interaction of PAS/LOV proteins, putative blue light receptors in Arabidopsis thaliana, with their interacting partners. *Journal of Plant Research*, 121(1), 97-105.
- Oñate-Sánchez, L. & Vicente-Carbajosa, J., 2008. DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1, 93.
- Orgil, U. *et al.*, 2007. Intraspecific genetic variations, fitness cost and benefit of RPW8, a disease resistance locus in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, 176(4), 2317-2333.
- Orlicky, S. *et al.*, 2003. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell*, 112(2), 243-56.
- Ossowski, S. *et al.*, 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 53(4), 674-90.
- Ou, C., Pi, H. & Chien, C., 2003. Control of protein degradation by E3 ubiquitin ligases in Drosophila eye development. *Trends in Genetics: TIG*, 19(7), 382-389.
- Ouellet, D.L. *et al.*, 2006. MicroRNAs in gene regulation: When the smallest governs it all. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006(4), 69616.
- Parry, G. *et al.*, 2009. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22540-22545.
- Pashkova, N. *et al.*, 2010. WD40 Repeat propellers define a ubiquitin-binding domain that regulates turnover of F Box Proteins. *Molecular Cell*, 40(3), 433-443.
- Pauwels, L. & Goossens, A., 2011. The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. , 23(9), 3089-3100.
- Pickart, C.M. & Fushman, D., 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6), 610-616.
- Prag, S. & Adams, J.C., 2003. Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics*, 4, 42.
- Pickart, C.M. & Eddins, M.J., 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1696(1-3), 55-72.
- Qiao, H. *et al.*, 2009. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-Box-Proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes & Development*, 23(4), 512-521.
- Reichelt, M. *et al.*, 2002. Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry*, 59(6), 663-671.
- Risseuw, E.P. *et al.*, 2003. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 34(6), 753-767.

- Rogers, M.S. *et al.*, 2008. Cross-link formation of the cysteine 228-tyrosine 272 catalytic cofactor of galactose oxidase does not require dioxygen. *Biochemistry*, 47(39), 10428-10439.
- Rohde, A. *et al.*, 2004. Molecular Phenotyping of the pal1 and pal2 Mutants of Arabidopsis thaliana Reveals Far-Reaching Consequences on Phenylpropanoid, Amino Acid, and Carbohydrate Metabolism. *The Plant Cell Online*, 16(10), 2749 -2771.
- Ruegger, M. *et al.*, 1998. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes & Development*, 12(2), 198-207.
- Sadowski, M. & Sarcevic, B., 2010. Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine. *Cell Division*, 5(1), 19.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406 -425.
- Santamaria, P.G. *et al.*, 2003. Rpn6p, a Proteasome subunit from Saccharomyces cerevisiae, is essential for the assembly and activity of the 26 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6687 -6695.
- Sauerbrunn, N. & Schlaich, N.L., 2004. PCC1 : a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta*, 218(4), 552-561.
- Sawa, M. *et al.*, 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5848), 261-5.
- Schmid, M. *et al.*, 2005. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*, 37(5), 501-506.
- Schulman, B.A. *et al.*, 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, 408(6810), 381-386.
- Schumann, N. *et al.*, 2011. Molecular evolution and selection patterns of plant F-Box-Proteins with C-terminal Kelch Repeats. *Plant Physiology*, 155(2):835-50.
- Schüpbach, T. & Wieschaus, E., 1991. Female sterile mutations on the second chromosome of Drosophila melanogaster. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics*, 129(4), 1119-36.
- Schuster, J. *et al.*, 2006. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(10), 2664-2679.
- Schwab, R. *et al.*, 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(5), 1121-33.
- Schwarz, S.E. *et al.*, 1998. Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12148 -12154.
- Seglen, P.O. & Bohley, P., 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*, 48(2), 158-172.
- Seki, M. *et al.*, 2002. Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science*, 296(5565), 141 -145.
- Serino, G. & Deng, X.-W., 2003. The COP9 Signalosome: Regulating plant development through the control of proteolysis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 165-182.
- Severi, E. *et al.*, 2008. Sialic acid mutarotation is catalyzed by the Escherichia coli  $\beta$ -Propeller Protein Yjht. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4841 -4849.
- Shao, F. *et al.*, 2003. Cleavage of arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science*, 301(5637), 1230 -1233.
- Sheard, L.B. *et al.*, 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322):400-5.
- Shen, W. *et al.*, 2002. Null mutation of AtCUL1 causes arrest in early embryogenesis in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell*, 13(6), 1916 -1928.

- Shim, J.S. et al., 2013. *AtMYB44* regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal*, 73(3), 483-495.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M., 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 16(8), 1114-1116.
- Shrivastava, T. & Ramachandran, R., 2007. Mechanistic insights from the crystal structures of a feast/famine regulatory protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. , 35(21), 7324-7335.
- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 17(4), 355-62.
- Skaar, J.R. et al., 2009a. SnapShot: F Box Proteins II. *Cell*, 137(7), 1358, 1358.e1.
- Skaar, J.R. et al., 2009b. SnapShot: F box proteins I. *Cell*, 137(6), 1160-1160.e1.
- Smalle, J. & Vierstra, R.D., 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 555-90.
- Smith, T. F. et al., 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*. 24(5), 181-185.
- Staswick, P.E. et al., 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal*, 15(6), 747-754.
- Sterck, L. et al., 2005. EST data suggest that poplar is an ancient polyploid. *The New Phytologist*, 167(1), 165-170.
- Strimmer, K. & Rambaut, A., 2002. Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 269(1487), 137-142.
- Sun, L. et al., 2009. JFK, a Kelch domain-containing F-Box-Protein, links the SCF complex to p53 regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10195-10200.
- Suyama, M. et al., 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucl. Acids Res.*, 34(suppl\_2), W609-612.
- Suzuki, R. & Shimodaira, H., 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(12), 1540-1542.
- Suzuki, Y. et al., 2009. Structural basis of tRNA modification with CO<sub>2</sub> fixation and methylation by butosine synthesizing enzyme TYW4. *Nucleic Acids Research*, 37(9), 2910-2925.
- Swiderski, M.R. & Innes, R.W., 2001. The *Arabidopsis* PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *The Plant Journal*, 26(1), 101-112.
- Prins, P.T., Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: *Fungal pathology / J.W. Kronstad (ed.)*. - Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2000. - ISBN 0-7923-6370-1.
- Takahashi, N. et al., 2004. Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes. *Plant & Cell Physiology*, 45(1), 83-91.
- Takase, T. et al., 2011. LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, depending on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 67(4):608-21.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Textor, S. et al., 2004. Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta*, 218(6), 1026-1035.
- Thomas, J.H., 2006. Adaptive evolution in two large families of ubiquitin-ligase adapters in nematodes and plants. *Genome Research*, 16(8), 1017-30.

- Thompson, J.D. *et al.*, 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al]*, Chapter 2, Unit 2.3.
- Thrower, J.S. *et al.*, 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19(1), 94-102.
- Torres, M.A., 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414-429.
- Toufighi, K. *et al.*, 2005. The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 43(1), 153-163.
- Trujillo, M. *et al.*, 2008. Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Current Biology*, 18(18), 1396-1401.
- Tuskan, G.A. *et al.*, 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), 1596-604.
- Unno, M. *et al.*, 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 angstrom resolution. *Structure*, 10, 609-18.
- Van Kan, J.A. L., 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247-253.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A., 2009. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97.
- Verma, R. *et al.*, 2002. Role of Rpn11 Metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S Proteasome. *Science*, 298(5593), 611 -615.
- Vernooij, B. *et al.*, 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell*, 6(7), 959-965.
- Vierstra, R.D., 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(6), 385-397.
- Vierstra, R.D., 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32(1-2), 275-302.
- Vijayan, P. *et al.*, 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7209-7214.
- Wang, L. *et al.*, 2004. Genome-wide analysis of S-Locus F-box-like genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 56(6), 929-945.
- Wasternack, C., 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. , 100(4), 681-697.
- Weigel, D. & Mott, R., 2009. The 1001 Genomes project for Arabidopsis thaliana. *Genome Biology*, 10(5), 107.
- Welcker, M. & Clurman, B.E., 2007. Fbw7/hCDC4 dimerization regulates its substrate interactions. *Cell division*, 2(7).
- Wollenberg, K. & Swaffield, J.C., 2001. Evolution of proteasomal ATPases. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), 962 -974.
- Woo, H.R. *et al.*, 2001. ORE9, an F-Box-Protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(8), 1779-1790.
- Wu, J. *et al.*, 2005. Neddylation and deneddylation regulate Cull1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol*, 7(10), 1014-1020.
- Xiao, S. & Chye, M.-L., 2009. An Arabidopsis family of six acyl-CoA-binding proteins has three cytosolic members. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 479-484.
- Xie, Y. *et al.*, 2010. The Arabidopsis gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses. , 33(5), 828-839.
- Xie, Y. & Varshavsky, A., 2001. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3056 -3061.

- Xu, G. *et al.*, 2009. Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 835-840.
- Xu, L. *et al.*, 2002. The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(8), 1919-1935.
- Xue, F. & Cooley, L., 1993. kelch encodes a component of intercellular bridges in Drosophila egg chambers. *Cell*, 72(5), 681-693.
- Yan, J. *et al.*, 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *The Plant Cell*, 21(8):2220-36.
- Yang, X. *et al.*, 2008. The F-box gene family is expanded in herbaceous annual plants relative to woody perennial plants. *Plant Physiology*, 148(3), 1189-1200.
- Yang, Z. *et al.*, 2008b. Genomewide comparative phylogenetic and molecular evolutionary analysis of tubby-like protein family in Arabidopsis, rice, and poplar. *Genomics*, 92(4), 246-253.
- Yao, T. & Cohen, R.E., 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, 419(6905), 403-407.
- Zhang, X. *et al.*, 2000. Structure of the AAA ATPase p97. *Molecular Cell*, 6(6), 1473-1484
- Zhang, W. *et al.*, 2008. Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in Arabidopsis supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8470 -8475
- Zhao, Q. & Guo, H., 2011. Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant*, 4(4), 626 -634.
- Zheng, N. *et al.*, 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416(6882), 703-709.
- Zipfel, C. *et al.*, 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-760.

## 7 Anhang

Tab. 7.1: Bezeichnungen, Sequenzen und Templates der verwendeten Primer

Primernamen	Sequenz	Template
<b>Primer zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien</b>		
AT1G15670b-L	GATCTAGGGTTTGTGGTTTG	<i>fbk1 (SALK_014388c)</i>
AT1G15670b-R	AGGCAACCCAAATATAAAATC	
AT1G80440-L	AAATATCTATAAAGCGGCACA	<i>fbk2-1 (SALK_129095)</i> <i>fbk2-1 (SALK_008497)</i>
AT1G80440-R	TATCCGGCAAAAACGTCCA	
AT2G44130a-L	ACGCTATACAGTGGTAAAAGC	<i>fbk3-1 (SALK_143644)</i> <i>fbk3-1 (SALK_048698)</i>
AT2G44130a-R	GAGAGTAAGCTACGCCAAGA	
AT3G59940a_L	TTGCCACTTCTCTTACCAAT	<i>fbk4 (SALK_080249)</i>
AT3G59940a_R	AAAACACCATAACCGACAAC	
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA
<b>Volllänge-Primer</b>		
FL_AT1G15670_F	ATGGAGCTTATTCCTGATCT	AT1G15670
FL_AT1G15670_R	TTATATCTCCAAGAAGCAAC	
FL_AT1G80440_F	ATGGAAGTTATCCCAATCT	AT1G80440
FL_AT1G80440_R	TTAGACCTCCAAGAAGCAGC	
FL_AT2G44130_F	ATGACTATGGAAGTGTGCGAA	AT2G44130
FL_AT2G44130_R	TCAAACATAGATTGAAGCAT	
FL_AT3G59940_F	ATGGGAGTGTCAAAGAAGAA	AT3G59940
FL_AT3G59940_R	TCAAACGTAGATTGAAGAAC	
<b>Primer für die qRT-PCR</b>		
014388/000312-F	TTGTCGCCGTGATCTGATGA	AT1G15670
014388/000312-R	ACCGATCACAACCAGGTTTCC	
SALK008497-672F	ACAACGAAGAGAAATGTGCGCT	AT1G80440
SALK008497-797R	ATCTGCCAGCATGGAATACCG	
salk143644-1644F	TGATTGGCGGTAAAAGAGAGAG	AT2G44130
salk143644-1782R	GCATGCGAAAATGGAAGAGTA	
Salk_080249-635F	CCGGAGGACATGATGATCAGA	AT3G59940
Salk_080249-780R	ACAAAATCCAGGATCCGTCG	
Salk_057062/058788_940F	ACTGAGATACCGAAATGTGCGC	AT1G14330
Salk_057062/058788_1052R	TCAGCATGATCAGCAGCATACA	
090104/085800-F	AGAGATTGCCGTTTTAGCGG	AT1G26930
090104/085800-R	CATCCATAAACACACCGGAACA	
SALK064299-1061F	AGCTTTATGCTGCGAATTACGC	AT1G74510
SALK064299-1209R	CACTAACTGATCCCCACAAGCC	
01299/078824-F	TGATCACGCCGATATGGAAGT	AT2G02870
01299/078824-R	AGCAAGTCCCCATCCGTTTAC	
044075/033101-395F	CGTGTGGACGATGTTTGACA	AT3G27150
044075/033101-496R	CGCAAAGCGATTCTTTATCTCC	
AT5G40680_520F	CGTATTGTGGTGTGGCGATA	AT5G40680
AT5G40680_648R	CTTGATTCCTCCAGCGAAAA	
AT5G60570-964F	ATGGTGGACTCGTCAAACGGT	AT5G60570
AT5G60570-1076R	CAAGAATTCACCACAATGCCCT	
PP2A 1338	AGACAAGGTTCACTCAATCCGTG	AT1G13320
PP2A 1412	CATTGAGACCAAACCTTTCAGC	
LOX2-F	TGCACGCCAAAGTCTTGTC	AT3G45140
LOX2-R	TCAGCCAACCCCTTTTGA	
PR1_182_F	GCTACGCAGAACAACAAAGAGGC	AT2G14610
PR1_243_R	CGCTACCCAGGCTAAGTTT	
WAK1_1009_F	TTCTTGTAACCACCATCGGC	AT1G21250
WAK1_1142_R	TGCTCCTGAGAGTCGTTGTG	
LURP1_433_F	GACACATTATTGCCACATG	AT2G14560
LURP1_531_R	CAATGAGAGATGCAATGAAGGCA	
PCC1_27_F	TTCCGTGCAAAAACCTTCAGA	AT3G22231
PCC1_133_R	CCCTTGGAGTTTGTCTCCAC	
WRKY70_236_F	ACGACGGCAAGTTTGAAGATTC	AT3G56400
WRKY70_313_R	CACGCTCCGATCTCTTTTTTCT	

Primernamen	Sequenz	Template
<b>Primer für die qRT-PCR</b>		
JAR1_193_F	GCTACTGACCCTGAAGAAGC	AT2G46370
JAR1_325_R	TGACTAGTTCAGAGCTTAAGGA	
MAM1_438_F	GAATGAGGTGGATGAGGAAACA	AT5G23010
MAM1_506_R	CTCCAAGTCGCCTCAATGT	
BCAT4_726_F	GCTCAAGGGCAATGTTGTATCG	AT3G19710
BCAT4_806_R	GGTAGCCGAAATCACGACACA	
<b>att-Site Primer</b>		
attB1-FBoxDa	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGTGGAAAGATCGGACATATTTG	AT1G14330
attB2-FBoxDaN	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGCAACCCATCACCGCGCAATT	
attB1-FBox54	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGTTGGAAGTCGTCTCGTGAT	AT1G26930
attB2-FBox54N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAACAATCATCACGGCGCAATT	
attB1-FBox171	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTGGAGGCTCCGAGTTATCTG	AT1G74510
attB2-FBox171N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAACATCCCATCACCGCACAAATT	
attB1-FBox200	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGTTGGAAGATCGATCACCAGAT	AT2G02870
attB2-FBox200N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGCAACCCATCACTGCACAATT	
attB1-FBox375	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGTTGACGCTAGGAGAAGATCAA	AT3G27150
attB2-FBox375N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACGCAATCATTACACAACAGTT	
attB1-FBox	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGTCATTGATGCTACAAAAAAT	AT5G40680
attB2-FBoxN	5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCAAGCATCACACAACAGTT	
attB1-FBox683	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCTGCGGAAGAGCATTGCAAT	AT5G60570
attB2-FBox683N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGCAACCCATCACTGCGCAGTT	
attB1-FBox21	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGGAGCTTATTCCTGATCTTCCCG	AT1G15670
attB2-FBox21N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATCTCCAAGAAGCAACCAGC	
attB2-FBox21C	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATCTCCAAGAAGCAACCAGCTTG	AT1G80440
attB1Pro-FBox21	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTCTTATCGTCTTGCGGTTGGGCCA	
attB2Pro-FBox21	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATCTTTTTAGAAAGTTTCAAGA	AT1G80440
attB1-FBox185	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGAACCTTATCCCAATCTTCCC	
attB2-FBox185N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGACCTCCAAGAAGCAGCCAGC	AT1G80440
attB2-FBox185C	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGACCTCCAAGAAGCAGCCAGCTTG	
attB1Pro-FBox185	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATAGTCATTAGCAGCCGCTGCCG	AT2G44130
attB2Pro-FBox185	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATCGAGAAAGTATCAAAGATTG	
attB1-FBox283	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGACTATGGAAGTGTGAAAAAAG	AT2G44130
attB2-FBox283N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAACATAGATTGAAGCATGCGGA	
attB2-FBox283C	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAACATAGATTGAAGCATGCGAAA	AT2G44130
attB1Pro-FBox283	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACACACGACAATAATTGGTGATG	
attB2Pro-FBox283	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACGAACCTAAACAAGTTTGAG	AT3G59940
attB1-FBox446	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGGAGTGTCAAAGAAGAAATCAG	
attB2-FBox446N	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAACGTAGATTGAAGAACACGAG	AT3G59940
attB2-FBox446C	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAACGTAGATTGAAGAACACGAGAA	
attB1Pro-FBox446	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGATCTCTTGTATGCTAGACTCCT	AT3G59940
attB2Pro-FBox446	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATTAGTTATTACCTAATTAGAGC	
<b>Primer zur Klonierung in pENTR™/D-TOPO®</b>		
200-3_pENTR_F	CACCCAGCTGAAGTACTCTG	AT2G02870
200-3_pENTR_R	CATATCTTCCAAAACTACA	
21-3/4_pENTR_F	CACCTATCCGTGTATAATAC	AT1G15670
21-3_pENTR_R	CATCTTTTTAGAAAGTTTCA	
21-4_pENTR_R	TATCTCCAAGAAGCAACCAG	AT2G44130
283-3_pENTR_F	CACCGACACACGACAATAAT	
283-3_pENTR_R	CATCGAACTTAAACAAGTTT	AT2G44130
446-1/2_pENTR_F	CACCATGGGAGTGTCAAAGA	
446-1_pENTR_R	TCAAACGTAGATTGAAGAAC	AT3G59940
446-2_pENTR_R	AACGTAGATTGAAGAACACG	
185-4_pENTR_F	CACCTTATAGTCATTCAGAC	AT1G80440
185-4_pENTR_R	GACCTCCAAGAAGCAGCCAG	
0-1/2_pENTR_F	CACCATGTCATTGATGCTAC	AT5G40680
0-1_pENTR_R	TTAAGCAAGCATCACACAAC	
0-2_pENTR_R	AGCAAGCATCACACAACAGT	

Primername	Sequenz	Template
<b>Primer zur Klonierung in pGBKT7</b>		
21_pGBKT7_F	CATGGAGGCCGAATTCATGGAGCTTATTCCTGATCTTCCC	AT1G15670
21_pGBKT7_R	GCAGGTCGACGGATCCTTATATCTCCAAGAAGCAACCAGC	
185_pGBKT7_F	CATGGAGGCCGAATTCATGGAACCTATCCCAATCTTCCC	AT1G80440
185_pGBKT7_R	GCAGGTCGACGGATCCTTAGACCTCCAAGAAGCAGCCAGC	
283_Ndel_F	GGAGGACCTGCATATGATGACTATGGAAGTGTGAAAAAG	AT2G44130
283_Ncol_R	AATTCGGCCTCCATGGTCAAACATAGATTGAAGCATGCGA	
446_Ndel_F	GGAGGACCTGCATATGATGGGAGTGTCAAAGAAGAAATCA	AT3G59940
446_Ncol_R	AATTCGGCCTCCATGGTCAAACGTAGATTGAAGAACACGA	
<b>Primer für die Konstruktion von siRNAs</b>		
RNAi1_AT2G44130F	CAGCAATGTCACGAATTGATTCCCG	AT2G44130
RNAi1_AT2G44130R	CACCTCCTGAAGCAGCAGCAGCACTCG	
RNAi2_AT2G44130F	CGCCGTTGGTATGGGTCTAAGGTTT	AT2G44130
RNAi2_AT2G44130R	CACCTCTCAGTCGTCATCTTCATCA	
<b>ASK-Primer</b>		
AKS1_F	CGCATATGGTTGAAGACGAC	AT1G75950
ASK1_R	TCATTCAAAGCCATTGGT	
ASK2_F	TAAGAGTTCGGATGGCGAAA	AT5G42190
ASK2_R	CGGATTTCTTCTGGGGTTTT	
ASK3_F	GTCCCAGACGATTAAGCACAT	AT2G25700
ASK3_R	AACGCCACCTGTCTCATT	
ASK4_F	AAGCACATGATTGAGGACGAC	AT1G20140
ASK4_R	GAACGCCCACTTGTCTCAT	
ASK5_F	CATGTTGAAGAGCTCCGATG	AT3G60020
ASK5_R	CGTTCTCGATGTTGAAGTGC	
ASK7_F	CATGTTGAAGAGCTCAGATGG	AT3G21840
ASK7_R	ATCCGCGACTGTTTGGTAAG	
ASK8_F	TTGAAGAGCTCCGAGGGTAA	AT3G21830
ASK8_R	AATCGCTGCTTCTTCCTCAG	
ASK9_F	CGCAGCCAATGCCAGATTAT	AT3G21850
ASK9_R	CGCGAATCTGCTCAGGAGTGT	
ASK10_F	AGCTCCGATGGTCACTCATT	AT3G21860
ASK10_R	GAACCGCTTCTTCTCCTCA	
ASK11/12_F	TCGAAGATGATCGTGTTGATG	AT4G34210/ AT4G34470
ASK11/12_R	TTGATCATGTCCGCAACAGT	
ASK13_F	TATGTTGCTGAGCTCCGATG	AT3G60010
ASK13_R	CCGGTGAAAATCGTTCTCG	
ASK14_F	TGTTTTGTCTAGCTCCGATGG	AT2G03170
ASK14_R	TTCTTCGGGTGTGAAATCGT	
ASK15_F	TGCAGATCGTAAAGCACCTG	AT3G25650
ASK15_R	CTTGCGAATCGCTTCTTCTT	
ASK16_F	GGTGGCTCGTAAATTGAAGG	AT2G03190
ASK16_R	TCGCGTCTTCTTCTCAGGT	
ASK17_F	TGGCTCGTAAGATGCAGATG	AT2G20160
ASK17_R	TTGAAAGCCCATTCTGTTCTT	
ASK18_F	GTGGCGGTAAGTTTCTGAT	AT1G10230
ASK18_R	AGTCCAAGCATTCTCCTTGC	
ASK19_F	CGTTGAAGACGATGATGACG	AT2G03160
ASK19_R	CCATCTTGCTCAAAGTCCA	
ASK20_F	TCCACGGATTCGACTACTGA	AT2G45950
ASK20_R	ATCAAGCAGTTCCTCATGG	
ASK21_F	CCAGCCATGTTAAGCCTGAT	AT3G61415
ASK21_R	GCTCATCGACATGTTCTTCCG	
<b>Vektor-spezifische Primer</b>		
amiRNA_A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	pRS300
amiRNA_B	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG	
M13rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	pDONR™221
M13uni (-21)	TGAAAACGACGGCCAGT	
pHG8_Intron_5	GGAATTCGGTACCCAGCTTGG	pHELLSGATE8
pHG8_Intron_3	CCAAGCTTATCGATTTCAACCC	

Primername	Sequenz	Template
<b>Vektor-spezifische Primer</b>		
Seq_pHG8	CCTTCCTCTATATAAGGAAGTT	pHELLSGATE8
Seq_pHG8_R	CGATCATAGGCGTCTCGCAT	
T7-Seq	TAATACGACTCACTATAGGGC	pGADT7, pGBKT7
3' AD.Seq	AGATGGTGCACGATGCACAG	pGADT7
3' DNA-BD-Seq	TTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGT	pGADT7, pGBKT7
pGBKT7-specif.	TGATTACGCCAAGCTTGCAT	pGBKT7
5'AD-LD-Primer	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC	pGADT7
3'AD-LD-Primer	GTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT	
<b>Sonstige Primer</b>		
LaminC F	AGTGCCTGAGGAGTTTAAGG	humanes <i>LaminC</i>
LaminC R	GAAGTCCAGTTCCTCCTTCAT	
UidA_L70	GATCGCGAAAACCTGTGGAAT	<i>GUS</i>
UidA_R424	TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG	
GFP_F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	<i>GFP</i>
GFP_R	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG	

**Tab. 7.2: Sequenzen der amiRNAs von *FBK3* (AT2G44130) und der dazugehörigen Primer.**

Name der amiRNA	Sequenz der amiRNA	Primername	Sequenz der Primer
amiRNA_A	TGAACGTAAACGTCTCTCGTG	AT2G44130_A1 (I)	GATGAACGTAAACGTCTCTCGTGTCTCTCTTTTGTATTCC
		AT2G44130_A2 (II)	GACACGAGAGACGTTTACGTTTCATCAAAGAGAATCAATGA
		AT2G44130_A3 (III)	GACAAGAGAGACGTTAACGTTCTTACAGGTCGTGATATG
		AT2G44130_A4 (VI)	GAAGAACGTAAACGTCTCTCTGTCTACATATATATTCCCT
amiRNA_B	TTTACCGCCAATCATTACGAC	AT2G44130_B1 (I)	GATTTACCGCCAATCATTACGACTCTCTCTTTTGTATTCC
		AT2G44130_B2 (II)	GAGTCGTAATGATTGGCGGTAATCAAAGAGAATCAATGA
		AT2G44130_B3 (III)	GAGTAGTAATGATTGCCGTAATTCACAGGTCGTGATATG
		AT2G44130_B4 (VI)	GAATTACCGCCAATCATTACTACTCTACATATATATTCCCT

**Tab. 7.3: PDB-IDs und Referenzen der für das Homologie-Modelling der vier FBKs verwendeten Templates und Anzahl der für jede Modellstruktur *ab initio* berechneten Aminosäuren.**

	AT1G15670	AT1G80440	AT2G44130	AT3G59940
PDB-ID der Templates	2ZWA (Suzuki <i>et al.</i> 2009)	2ZWA (Suzuki <i>et al.</i> 2009)	2ZWA (Suzuki <i>et al.</i> 2009)	2ZWA (Suzuki <i>et al.</i> 2009)
	1K3I (Firbank <i>et al.</i> 2001)	1NEX (Orlicky <i>et al.</i> 2003)	1NEX (Orlicky <i>et al.</i> 2003)	1NEX (Orlicky <i>et al.</i> 2003)
	3I17 (Chaikuad <i>et al.</i> )	1K3I (Firbank <i>et al.</i> 2001)	1K3I (Firbank <i>et al.</i> 2001)	1K3I (Firbank <i>et al.</i> 2001)
	2E32 (Mizushima <i>et al.</i> 2007)	3I17 (Chaikuad <i>et al.</i> )	2UVK (Severi <i>et al.</i> 2008)	2UVK (Severi <i>et al.</i> 2008)
	2UVK (Severi <i>et al.</i> 2008)	2OVQ (Hao <i>et al.</i> 2007)	2E32 (Mizushima <i>et al.</i> 2007)	1E32 (Zhang <i>et al.</i> 2000)
	2WOZ (Gray <i>et al.</i> 2009)	2OVR (Hao <i>et al.</i> 2007)	2WOZ (Gray <i>et al.</i> 2009)	2WOZ (Gray <i>et al.</i> 2009)
	2VZ1 (Rogers <i>et al.</i> 2008)	2UVK (Severi <i>et al.</i> 2008)	2VC1 (Shrivastava & Ramachandran 2007)	2VZ1 (Rogers <i>et al.</i> 2008)
		2E32 (Mizushima <i>et al.</i> 2007)		
		1ZGK (Beamer <i>et al.</i> 2005)		
		2WOZ (Gray <i>et al.</i> 2009)		
Anzahl der <i>ab initio</i> berechneten Aminosäuren	29	1	42	51

**Tab. 7.4: Vergleich der Topologie von drei repräsentativen Bäumen, konstruiert mit der Neighbor-Joining (NJ), Maximum-Likelyhood (ML) und Bayesian Methode (Schumann et al. 2011).** Die Statistik erfolgte unter Anwendung der Tests von Shimodaira-Hasegawa (p-SH, Shimodaira und Hasegawa 1999) and von Kishino-Hasegawa (p1-sKH, Kishino und Hasegawa 1989) mit dem Programm Treepuzzle (Schmidt und Von Haeseler 2007). Um die Wahrscheinlichkeiten (I) mit dem besten Baum (ML-Baum) zu vergleichen, wurde ein Chi-Quadrat Test durchgeführt.

Baum	I	ΔI	S.E.	p1-skH	p-SH	2ΔI	Chi-Quadrat	P-Wert
NJ	-30957.15	0	0.0024	1	0.737	0	0	0
ML	-30957.15	0	Bester Baum	1	1	0	0	0
Bayesian	-31069.27	112.12	22.7059	0	0	224.24	0.406	0.03

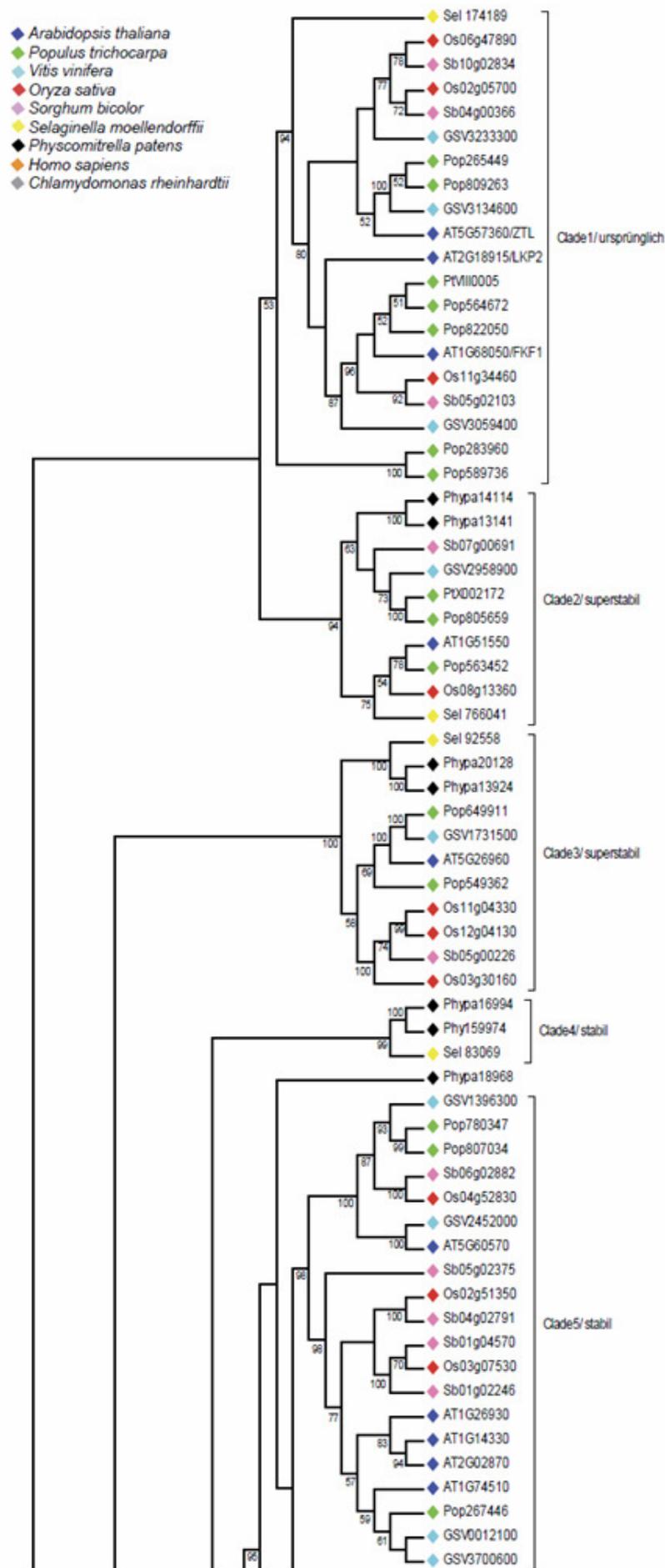
**Tab. 7.5: Differentiell exprimierte Gene in neun Tage alten Keimlingen von *fbk1/fbk2-1/fbk4*, mit einem signifikanten (P < 0,05; Benjamini Hochberg korrigiert) Expressionsunterschied von mindestens zwei (Alog<sub>2</sub> > 1) im Vergleich zum Wildtyp Col-0.** Für alle in der Tripelmutante differentiell exprimierten Gene sind auch die Expressionswerte in den vier Überexpressionslinien dargestellt (fett gedruckt: Δlog<sub>2</sub> > 1).

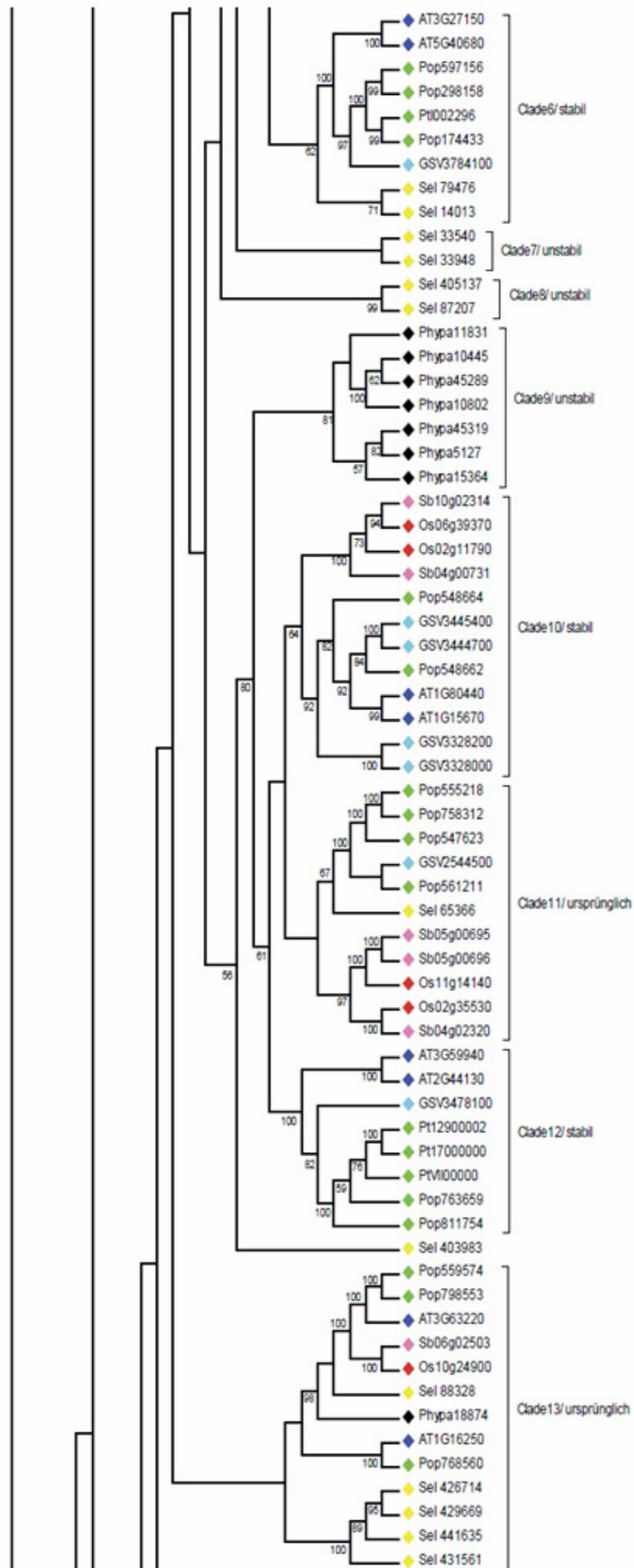
Gen	AGI	Keimlinge: X-fache Reduktion bzw. Induktion gegenüber Col-0				Biologische Funktion	
		<i>fbk1/fbk2-1/fbk4</i>	35S:: <i>FBK1</i>	35S:: <i>FBK2</i>	35S:: <i>FBK3</i>		
1 <i>FBK4</i>	A73G59940	<b>54,764</b>	1,089	1,230	1,010	<b>5,743</b>	
2 <i>FBK2</i>	A71G80440	<b>42,372</b>	1,089	<b>5,956</b>	1,116	1,152	
3 <i>PCC1</i>	A73G22231	<b>13,929</b>	1,539	<b>3,529</b>	<b>2,230</b>	<b>6,540</b>	Antwort auf Bakterien und Pilze
4 <i>JAR1</i>	A72G46370	<b>13,861</b>	1,066	1,093	1,055	1,001	Konjugation von MeJA zu JA-Ile
5	A73G59950	<b>12,132</b>	1,089	1,054	1,101	1,009	Autophagie, Proteintransport
6	A72G44920	<b>10,746</b>	1,061	1,039	1,004	1,063	
7 <i>LURP1</i>	A72G14560	<b>7,506</b>	1,337	<b>3,540</b>	<b>2,613</b>	<b>5,895</b>	Antwort auf Salizylsäure-Stimulus, Antwort auf Pilzbefall
8 <i>WAK1</i>	A71G21250	<b>5,984</b>	1,337	<b>5,198</b>	1,438	<b>4,216</b>	Antwort auf Salizylsäure, Antwort auf Pilz- und Virusbefall
9 <i>ECS1</i>	A71G31580	<b>5,526</b>	1,073	<b>2,342</b>	1,007	<b>2,043</b>	Abwehrreaktionen
10	A75G03350	<b>5,340</b>	1,480	<b>4,616</b>	1,910	<b>4,560</b>	
11	A72G25510	<b>4,730</b>	1,252	<b>2,920</b>	1,159	<b>2,672</b>	
12 <i>WRKY70</i>	A73G56400	<b>4,531</b>	1,302	<b>3,565</b>	1,735	<b>4,023</b>	Komponente des Jasmonat- und Salizylsäuresignalweges
13 <i>PR1</i>	A72G14610	<b>3,671</b>	1,257	<b>2,339</b>	1,679	<b>3,875</b>	Systemisch erworbene Resistenz (SAR)
14	A75G35940	<b>3,480</b>	1,055	1,571	<b>3,461</b>	<b>2,424</b>	
15	A75G52750	<b>3,270</b>	1,603	<b>2,860</b>	1,596	<b>2,333</b>	Transport von Metallionen
16 <i>SIB1</i>	A73G56710	<b>3,154</b>	1,192	<b>2,955</b>	1,634	<b>3,126</b>	Antwort auf Bakterieninfektion
17	A75G10760	<b>2,920</b>	1,233	<b>2,258</b>	1,559	<b>2,443</b>	Proteolyse
18	A75G52760	<b>2,919</b>	1,206	<b>2,300</b>	1,231	<b>2,729</b>	Transport von Metallionen
19	A72G41090	<b>2,835</b>	1,117	<b>3,020</b>	1,297	<b>2,118</b>	
20 <i>LOX2</i>	A73G45140	<b>2,575</b>	1,003	1,604	1,027	1,950	Jasmonat-Biosynthese
21	A73G45160	<b>2,553</b>	1,235	1,672	1,199	1,002	
22	A73G60420	<b>2,549</b>	1,272	<b>2,554</b>	1,231	1,684	
23 <i>BCAT4</i>	A73G19710	<b>2,529</b>	1,130	1,213	1,266	<b>2,687</b>	Glucosinolat-Biosynthese
24	A74G14365	<b>2,470</b>	1,047	<b>3,852</b>	1,319	<b>2,957</b>	
25 <i>CRK6</i>	A74G23140, A74G23160	<b>2,276</b>	1,214	<b>2,076</b>	1,714	<b>2,659</b>	Phosphorylierung von Proteinen
26 <i>PLA2A</i>	A72G26560	<b>2,266</b>	1,309	<b>2,372</b>	1,075	<b>2,905</b>	Oxylipin-Biosynthese, Antwort auf Virusbefall
27 <i>ATGSTF14</i>	A71G49860	<b>2,184</b>	1,109	1,096	1,192	1,099	Katabolische Prozesse; Umsetzung von Toxinen
28 <i>PBS3</i>	A75G13320	<b>2,173</b>	1,142	1,635	1,963	1,563	Antwort auf Pilz- und Bakterienbefall, Antwort auf Salizylsäure
29	A75G25250, A75G25260	<b>2,121</b>	1,025	<b>2,355</b>	1,192	1,520	
30 <i>FBK1</i>	A71G15670	<b>2,114</b>	<b>7,146</b>	1,171	1,061	1,456	
31 <i>MAM1</i>	A75G23010	<b>2,086</b>	1,044	1,007	1,490	<b>2,673</b>	Glucosinolat-Biosynthese
32 <i>ATNUD76</i>	A72G04450	<b>2,075</b>	1,115	1,875	1,225	1,748	Positiver Regulator des Salizylsäuresignalweges
33	A73G16670	<b>2,072</b>	1,232	1,391	1,399	1,525	Antwort auf oxidativen Stress
34 <i>HR4</i>	A73G26560, A73G50480	<b>2,035</b>	1,140	<b>2,114</b>	1,404	<b>2,447</b>	Antwort auf andere Organismen
35	A74G04840	<b>2,013</b>	1,351	1,015	1,960	<b>2,744</b>	Elektronentransportkette
36 <i>WRKY46</i>	A72G46400	<b>2,011</b>	1,336	1,912	1,326	1,893	Transkription, Antwort auf Pathogene
37	A72G16005	<b>2,092</b>	1,349	1,479	1,606	1,654	
38 <i>BHLH039</i>	A73G56980	<b>2,064</b>	1,178	1,467	1,462	1,202	Transkription

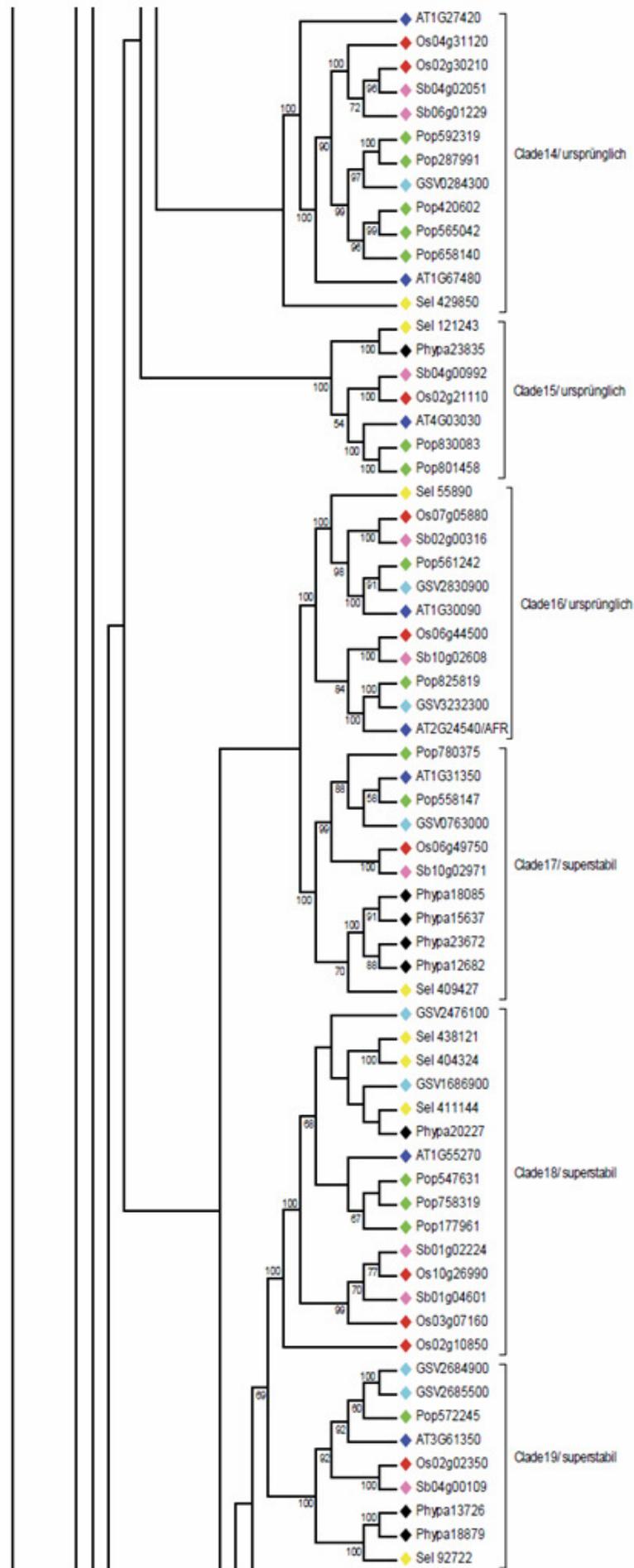
FBKs
Pathogenabwehr
Jasmonat-Signalweg/Biosynthese
Glucosinolat-Biosynthese

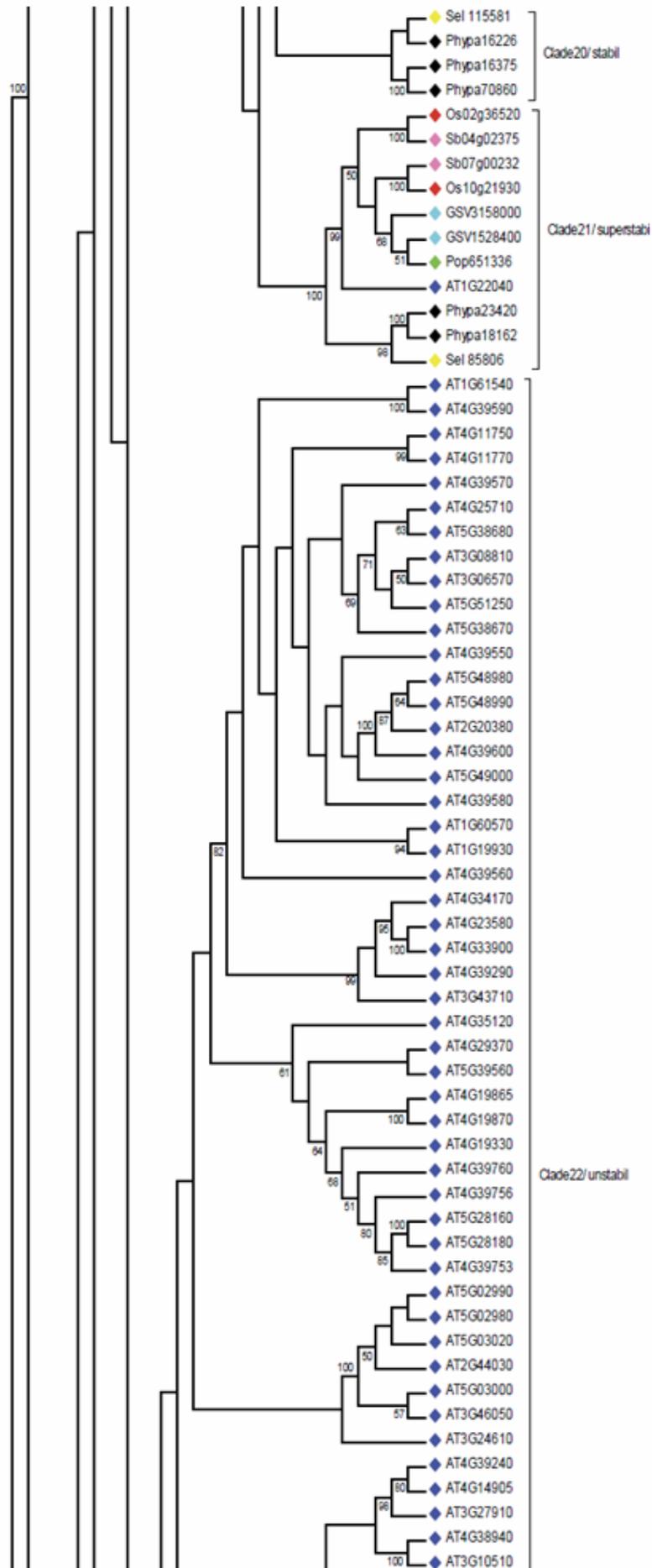
**Tab. 7.6: Differentiell exprimierte Gene in Blüten von *fbk1/fbk2-1/fbk4*, mit einem signifikanten (P < 0,05; Benjamini Hochberg korrigiert) Expressionsunterschied von mindestens zwei (Alog<sub>2</sub> > 1) im Vergleich zum Wildtyp Col-0.** Für alle in der Tripelmutante differentiell exprimierten Gene sind auch die Expressionswerte in den vier Überexpressionslinien dargestellt (fett gedruckt: Δlog<sub>2</sub> > 1).

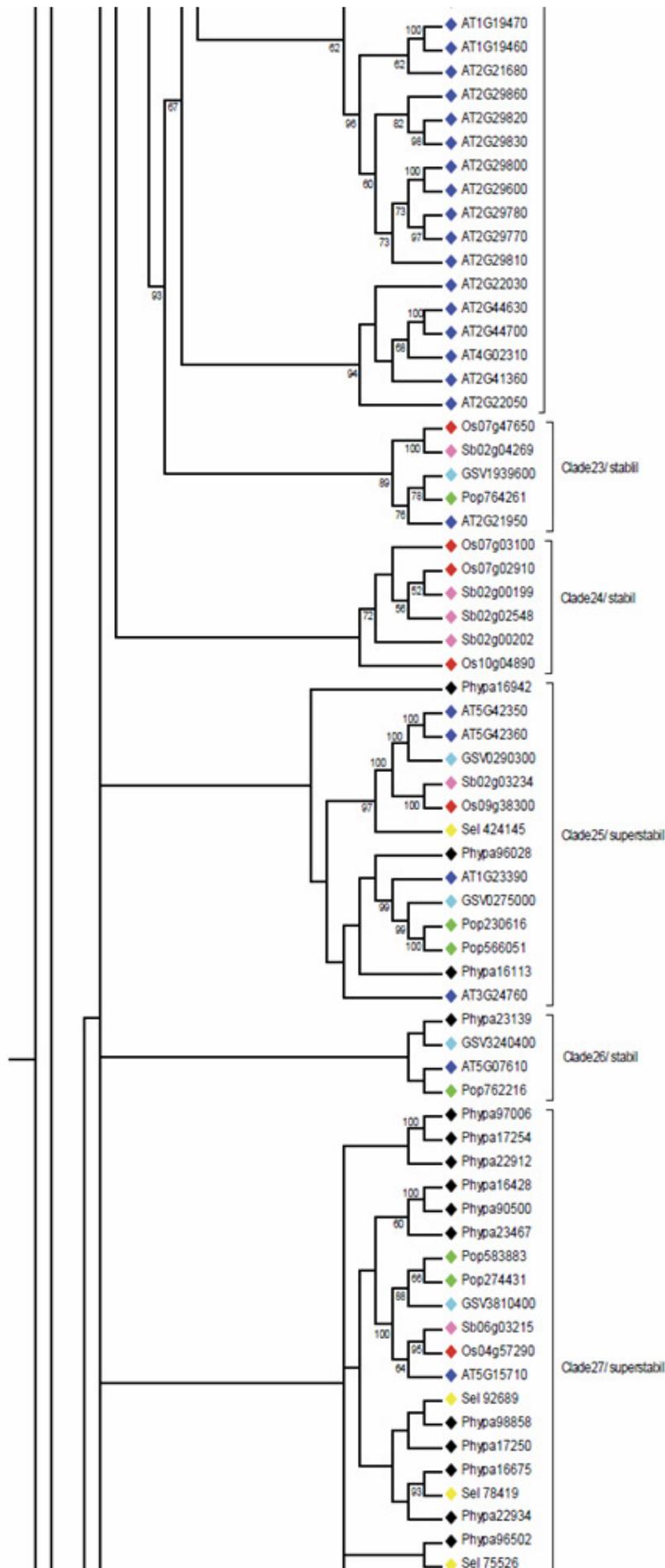
Gen	AGI	Blüten: X-fache Reduktion bzw. Induktion gegenüber Col-0				Biologische Funktion	
		<i>fbk1/fbk2-1/fbk4</i>	35S:: <i>FBK1</i>	35S:: <i>FBK2</i>	35S:: <i>FBK3</i>		
1 <i>FBK4</i>	A73G59940	<b>24,405</b>	1,760	<b>2,031</b>	<b>2,389</b>	<b>17,864</b>	
2	A73G59950	<b>10,714</b>	1,095	1,025	1,049	1,016	Autophagie, Proteintransport
3	A72G44920	<b>8,774</b>	1,009	1,143	1,242	1,187	
4 <i>FBK2</i>	A71G80440	<b>8,525</b>	1,704	<b>29,066</b>	<b>2,984</b>	<b>2,889</b>	
5 <i>FBK1</i>	A71G15670	<b>3,286</b>	<b>11,241</b>	1,206	1,774	1,501	
6 <i>JAR1</i>	A72G46370	<b>2,808</b>	1,074	1,087	1,093	1,029	Konjugation von MeJA zu JA-Ile
7 <i>ATHSFA2</i>	A72G26150	<b>2,435</b>	<b>2,365</b>	<b>4,587</b>	<b>4,748</b>	<b>6,075</b>	Antwort auf Hypoxie; Hitzeakklimation
8 <i>CYP707A2</i>	A72G29090	<b>2,293</b>	<b>2,179</b>	<b>2,511</b>	<b>2,813</b>	<b>2,543</b>	Lichtantwort; Abscisinsäure-Metabolismus; Dormanz
9	A71G68620	<b>2,180</b>	1,582	1,699	1,496	1,607	Metabolische Prozesse
10 <i>ATGSTU3</i>	A72G29470	<b>2,003</b>	1,520	1,598	1,033	1,303	Katabolische Prozesse; Umsetzung von Toxinen
11 <i>ATSD1</i>	A75G48850	<b>4,480</b>	1,356	1,871	<b>2,281</b>	<b>2,261</b>	Antwort auf Schwefelmangel
12	A73G59930, A75G33355	<b>3,760</b>	1,081	1,078	1,089	1,048	Antwort auf Pilzbefall
13	A74G09470	<b>3,225</b>	1,411	1,539	1,277	<b>2,392</b>	
14	A71G04770	<b>2,308</b>	1,247	1,503	<b>2,047</b>	1,938	
15 <i>DIN10</i>	A75G20250	<b>2,145</b>	<b>2,755</b>	<b>3,475</b>	<b>5,774</b>	<b>4,712</b>	Kohlenhydrat-Metabolismus, Kälteantwort

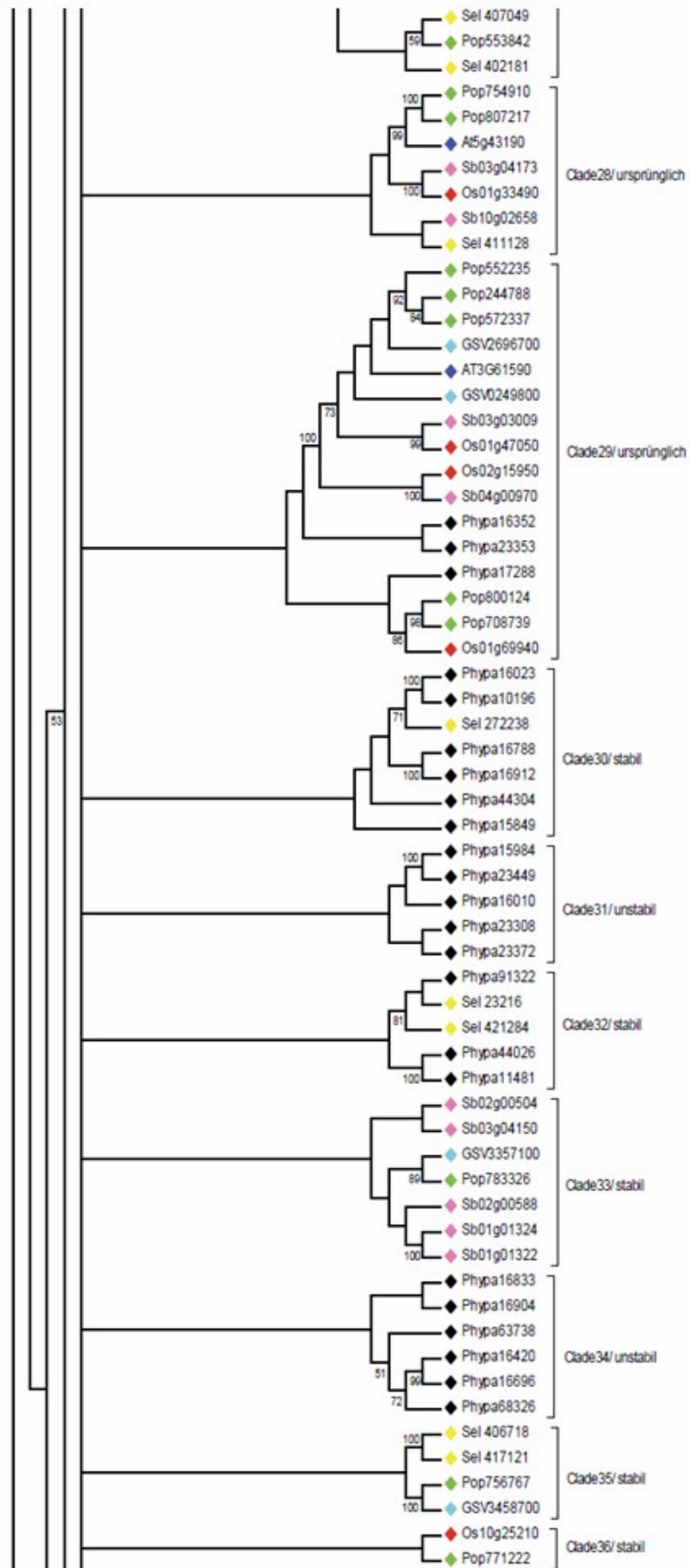


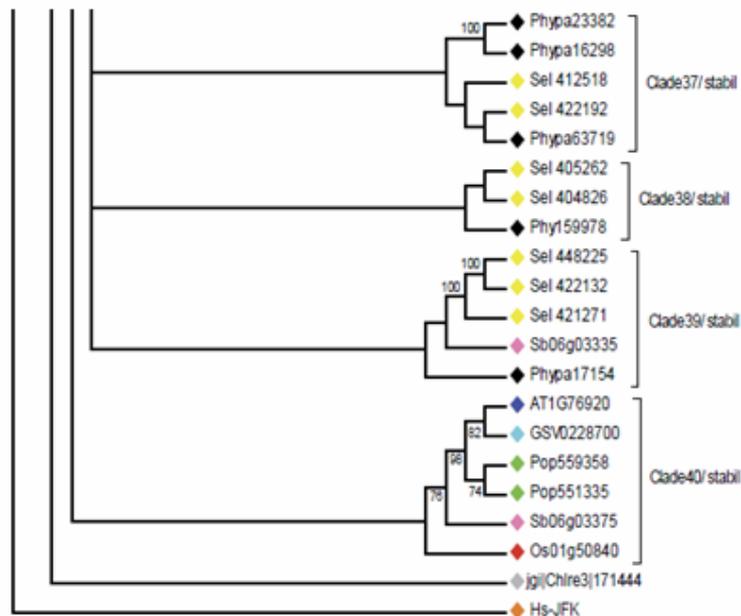




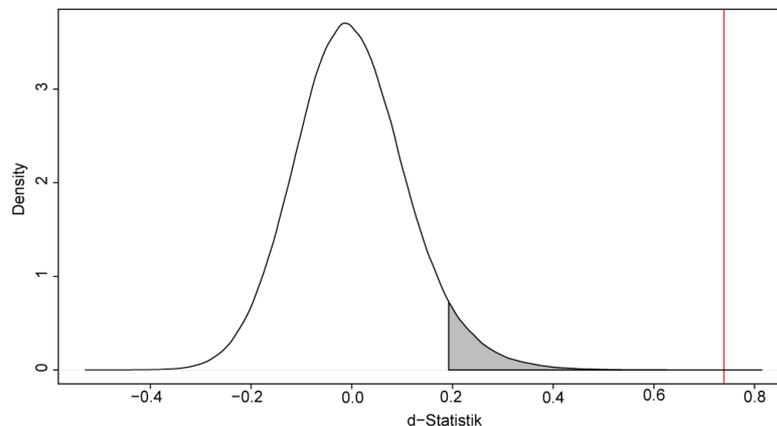




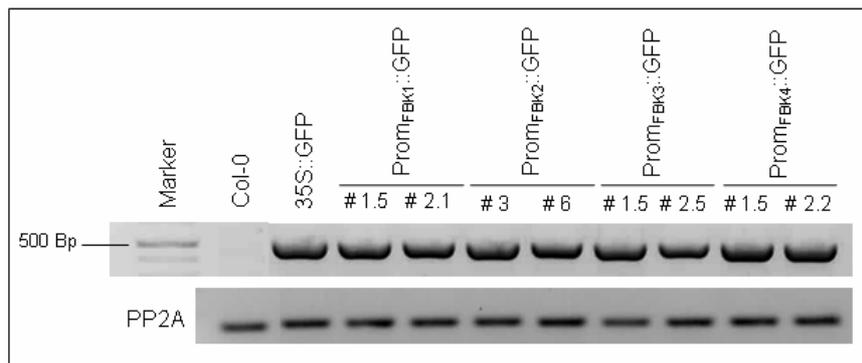




**Abb. 7.1: Phylogenetischer Baum der FBKs von sieben Landpflanzenspezies (Schumann et al. 2011).** Dem Baum liegen 407 Volllänge-Proteinsequenzen der FBKs von *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera*, *O. sativa*, *S. bicolor*, *S. moellendorffii* sowie *P. patens* zugrunde. Als Außengruppe fungieren je ein FBK aus *C. reinhardtii* und *H. sapiens*. Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen den Bootstrap-Werten  $>50$ . Der Farbcode verdeutlicht den Spezieshintergrund der FBKs. Die Kladen wurden wie folgt kategorisiert: (i) instabil: artspezifische Klade, (ii) stabil: Klade mit orthologen FBKs aus mindestens zwei Spezies, (iii) ursprünglich: Klade mit orthologen FBKs aus mindestens einer niederen Landpflanzenspezies, einer monokotyledonen und einer eudikotyledonen Spezies, (iv) superstabil: Klade mit orthologen FBKs in allen sieben analysierten Landpflanzenspezies.



**Abb. 7.2: Density Plot der Teststatistik  $d$ , ermittelt durch einen Permutationstest (eine Million Wiederholungen) (Schumann et al. 2011).** Die  $d$ -Statistik wird definiert als Differenz zwischen dem Mittelwert der Ähnlichkeit aller Kelch-Motive innerhalb eines FBKs und dem Mittelwert der Ähnlichkeit zwischen Kelch-Motiven in verschiedenen FBKs. Die Berechnung der genetischen Distanz zwischen verschiedenen Kelch-Motiven erfolgte mittels der Protdist-Funktion des PHYLIP-Programms (Felsenstein, 1989). Die rote Linie kennzeichnet den Wert der  $d$ -Statistik für die beobachtete Anordnung der Kelch-Motive. Der grau markierte Bereich markiert die kritische Region ( $\alpha = 0,05$ ), mit einem kritischen Wert  $D$  von 0,1923.



**Abb. 7.3: Detektion von RT-PCR-Produkten mittels Gelelektrophorese zum Nachweis der *GFP*-Expression in *Prom<sub>FBK</sub>::GFP* Linien.** Die Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens *PP2A* liefert den Nachweis, dass gleiche Mengen cDNA als Template eingesetzt wurden. Col-0 und 35S::*GFP* fungieren als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

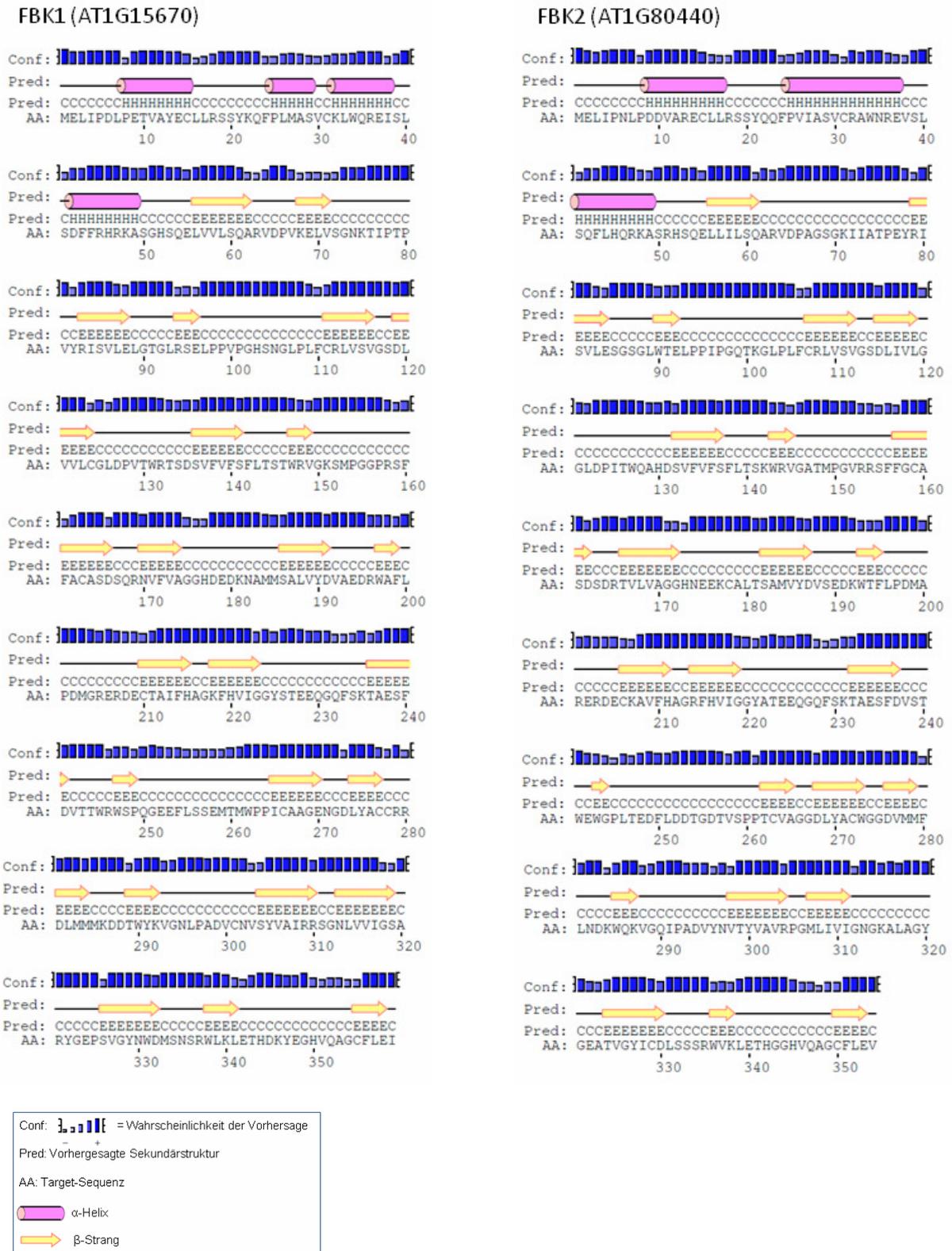
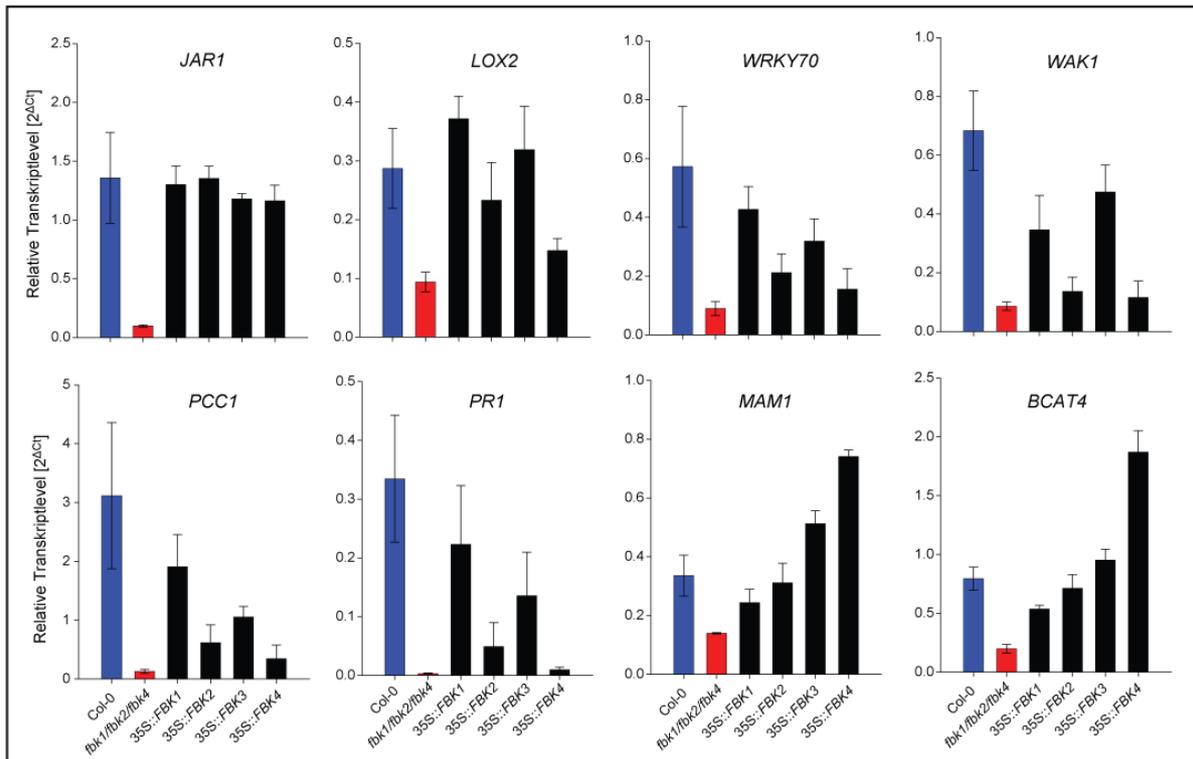
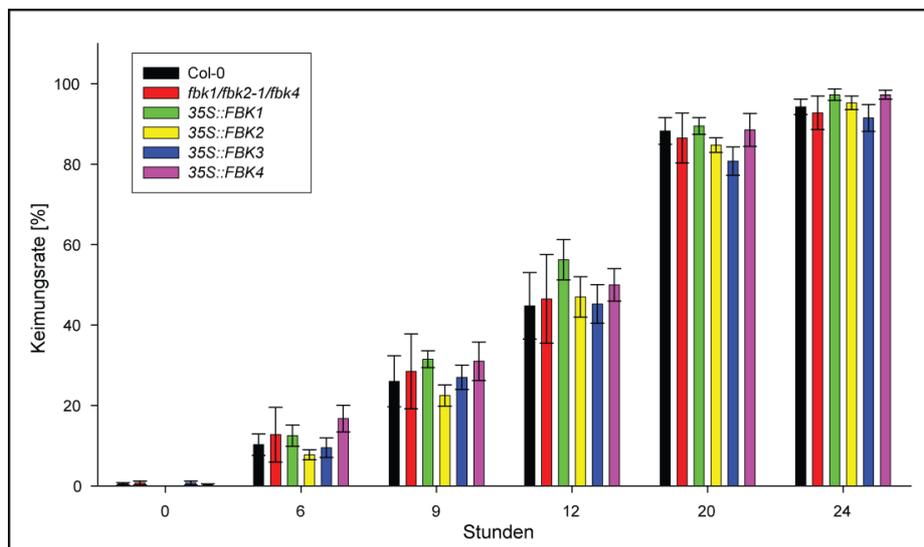


Abb. 7.4\_A: Vorhergesagte Sekundärstrukturen für FBK1 und FBK2.

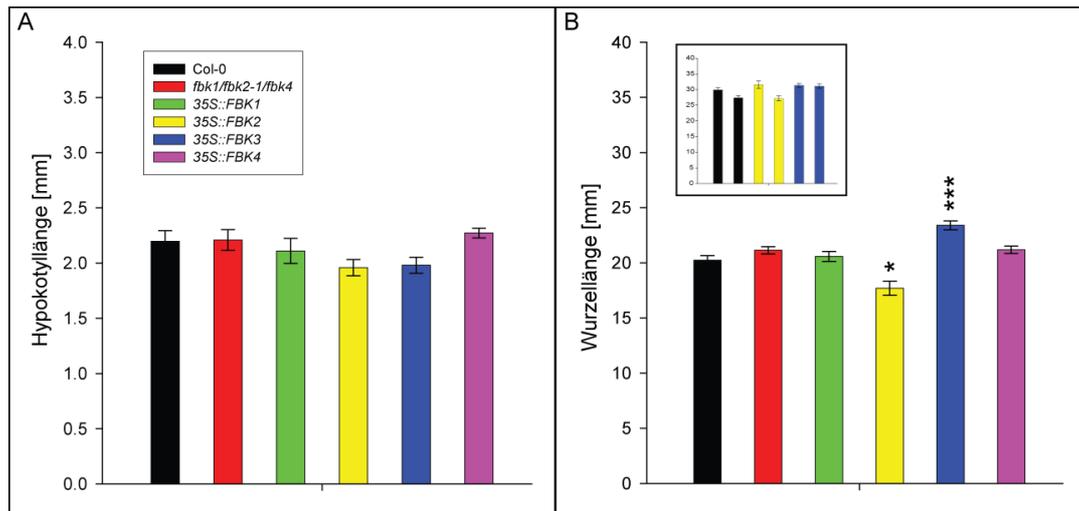




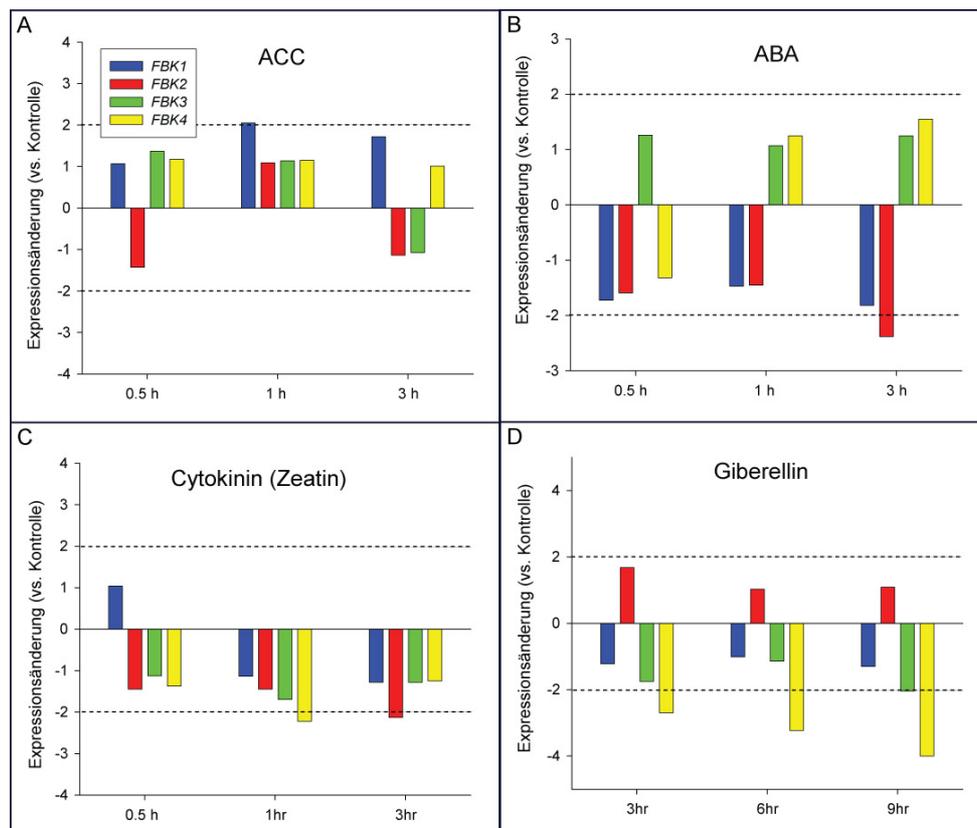
**Abb. 7.5: Verifizierung der Micro-Array-Daten mittels qRT-PCR für acht ausgewählte Gene.** Dargestellt sind die relativen Transkriptlevel in Col-0 (blau), der *fbk1/fbk2-1/fbk4*-Mutante (rot) bzw. in den Überexpressionslinien von *FBK1-4* (schwarz). Die Balken entsprechen gemittelten  $2^{\Delta Ct}$ -Werten von drei biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.



**Abb. 7.6: *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* sind nicht in der Keimung beeinträchtigt.** Zur Bestimmung der Keimungsrate wurde das Saatgut oberflächensterilisiert, anschließend 3 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und schließlich für die angegebenen Zeiträume steril inkubiert (ATS, 20°C, Langtag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n = 4 Saatgutbatches á 100 Samen).



**Abb. 7.7:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen kein verändertes Hypokotyl- und Wurzelwachstum unter Langtagbedingungen. **A+B:** Hypokotyl- bzw. Wurzellänge von Keimlingen, die zunächst 5 Tage steril angezogen (ATS, 20°C, Langtag), anschließend auf ATS-Medium transferiert und weitere 3 Tage inkubiert wurden (ATS, 20°C, Langtag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler ( $n \geq 31$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ , signifikanter Unterschied zu Col-0; Student's T-Test. Kleines Diagramm in **B:** *35S::FBK2* und *35S::FBK3* zeigten zunächst signifikante Unterschiede im Wurzelwachstum zu Col-0 und wurden daher, jeweils unter Verwendung zweier unabhängiger Saatgutbatches, erneut getestet, ohne dass die signifikanten Unterschiede bestätigt werden konnten.



**Abb. 7.8:** Expressionslevel von *FBK1-4* in 7 Tage alten Col-0 Keimlingen nach Behandlung mit 10  $\mu$ M ACC, 10  $\mu$ M ABA, 10  $\mu$ M Zeatin bzw. 10  $\mu$ M Giberellin A3, relativ zur Mock-Kontrolle. Die zugrunde liegenden Micro-Array-Daten entstammen der AtGenExpress\_Hormone Series der BAR-Datenbank.

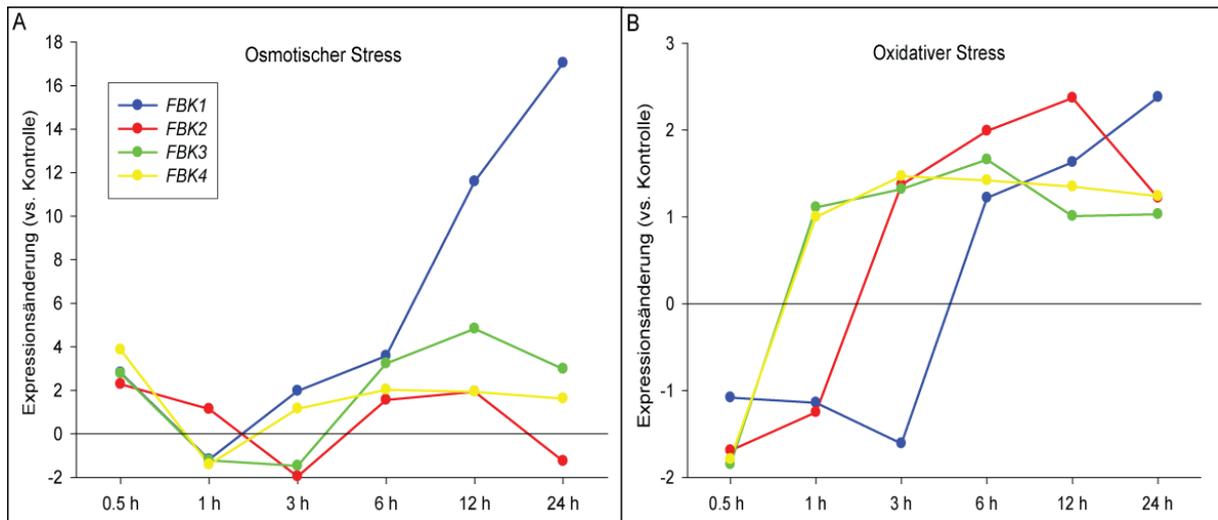


Abb. 7.9: Expressionslevel von *FBK1-4* in oberirdischen Organen von 18 Tage alten Col-0 Keimlingen nach Behandlung mit 300 mM Mannitol (A) bzw. 10  $\mu$ M Paraquat (B), relativ zur Mock-Kontrolle. Die zugrunde liegenden Micro-Array-Daten entstammen der AtGenExpress\_Abiotic stress Series (Kilian et al. 2007) der BAR-Datenbank.

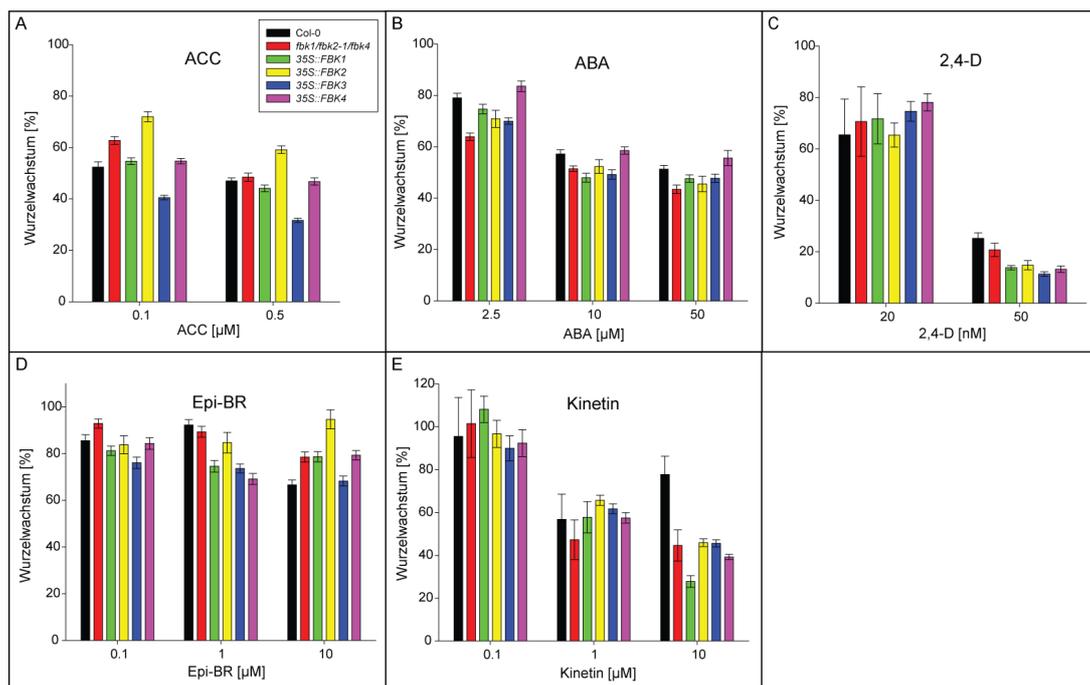
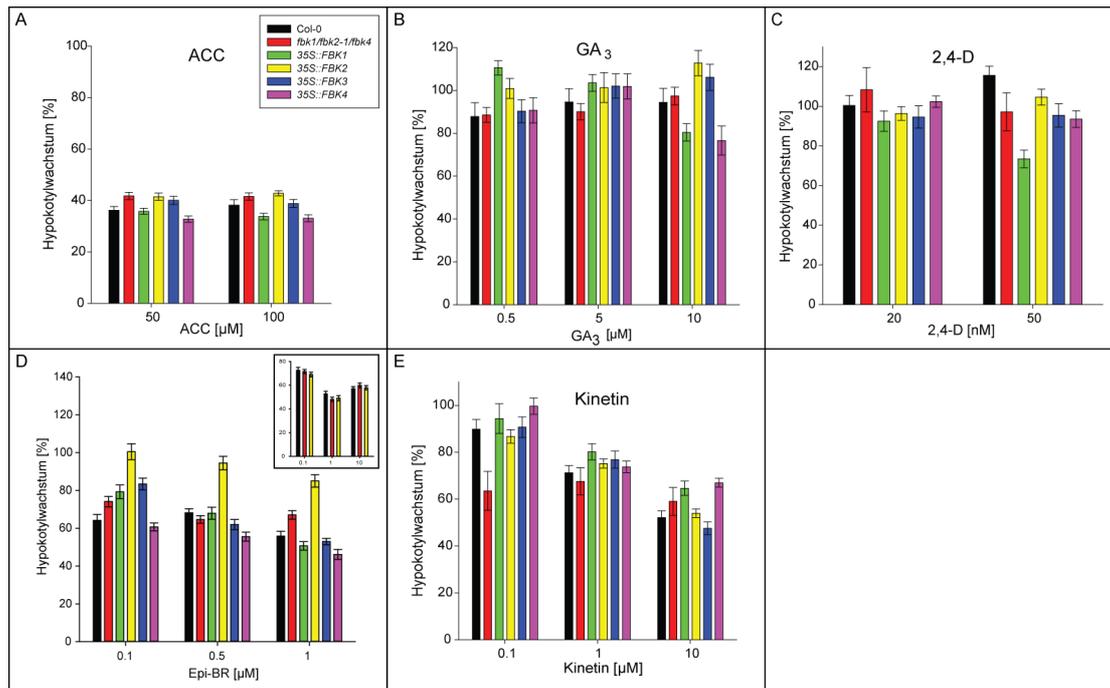
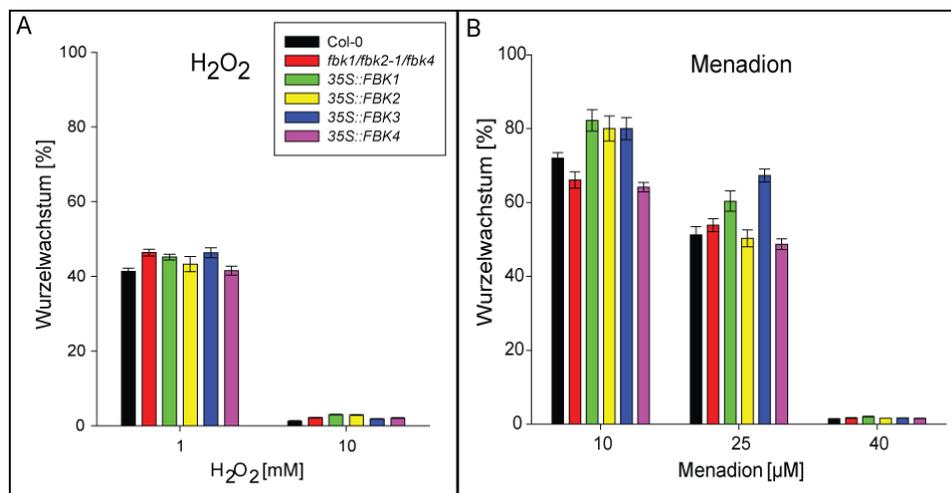


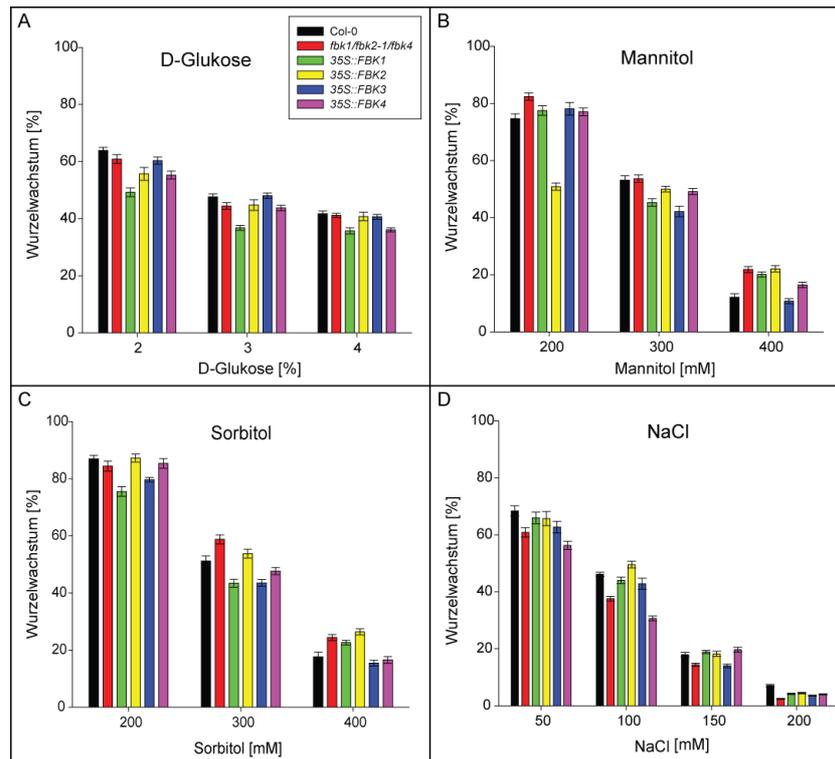
Abb. 7.10: *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen kein verändertes Wurzelwachstum durch Applikation verschiedener Phytohormone. A-E: Wurzelwachstum auf verschiedenen phytohormonhaltigen Medien relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Die Keimlinge wurden 5 Tage auf Medium ohne Phytohormon angezogen (ATS, 20°C, Langtag), anschließend auf Medium ohne (Mock) bzw. mit Phytohormon transferiert und weitere 3 Tage inkubiert (ATS, 20°C, Langtag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler ( $n \geq 23$ ).



**Abb. 7.11:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen kein verändertes Hypokotylwachstum durch Applikation verschiedener Phytohormone. A-E: Hypokotylwachstum auf verschiedenen phytohormonhaltigen Medien relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Nach zweitägigem Stratifizieren des Saatgutes erfolgte die Aussaat auf Medium ohne (Mock) bzw. mit Phytohormon. Die Samen wurden zunächst 3 h im Licht bei 20°C inkubiert und anschließend die Keimlinge für 5 Tage bei 20°C im Dunkeln angezogen. Kleines Diagramm in D: *fbk1/fbk2-1/fbk4* und *35S::FBK2* zeigten zunächst signifikante Unterschiede im Hypokotylwachstum zu Col-0 und wurden daher erneut getestet, ohne dass die signifikanten Unterschiede bestätigt werden konnten. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler ( $n \geq 10$  für Kinetin bzw.  $n \geq 19$  für ACC, 2,4-D,  $GA_3$  und BR).



**Abb. 7.12:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen, in Hinblick auf ihre Responsivität gegenüber oxidativen Stress, keine reproduzierbaren Unterschiede zum Wildtyp. Wurzelwachstum auf  $H_2O_2$  (A) bzw. Menadion (B) relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Die Keimlinge wurden zunächst 5 Tage auf Medium ohne Zusätze angezogen (ATS, 20°C, Langtag), anschließend auf Medium ohne (Mock) bzw. mit Zusatz transferiert und weitere 3 Tage inkubiert (20°C, Langtag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler ( $n \geq 16$ ).



**Abb. 7.13:** *fbk1/fbk2-1/fbk4* sowie die Überexpressionslinien von *FBK1-4* zeigen keine veränderte Responsivität gegenüber osmotischen Stress. Wurzelwachstum auf D-Glukose (A), Mannitol (B), Sorbitol (C) bzw. NaCl<sub>2</sub> (D) relativ zur Mock-Kontrolle (entspricht 100 %). Die Keimlinge wurden zunächst 5 Tage auf Medium ohne Zusätze angezogen (ATS, 20°C, Langtag), anschließend auf Medium ohne (Mock) bzw. mit osmotisch aktive Substanzen transferiert und weitere 3 Tage inkubiert (20°C, Langtag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (n ≥ 27).

### Danksagung

Mein Dank gilt zu aller erst Herrn Dr. Marcel Quint, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe dieses vielseitige Thema bearbeiten zu dürfen und der mir stets mit viel Interesse und wertvollem Rat als Mentor zur Seite stand. Vielen Dank für Deine konstruktive Kritik, Deine ausdauernde Erklärungsbereitschaft und Dein Vertrauen in mich, dass auch durch etwaige Rückschläge nicht erschüttert werden konnte.

Für Ihre unerschöpfliche Geduld Fragen zu beantworten, Ihre stets kompetenten Ratschläge und all die vielen aufmunternden Worte in schwierigen Zeiten danke ich Frau Dr. Carolin Delker. Carolin, Du bist unersetzbar!

Frau Anja Raschke, Frau Jana Trenner, Herr Kristian Ullrich, Frau Kathrin Denk und Frau Antje Hellmuth sind hauptverantwortlich dafür, dass es in über fünf Jahren keinen einzigen Tag gab, an dem ich nicht mit Freude zur Arbeit gegangen bin. Ich hätte mir keine besseren Kollegen wünschen können. Ich danke Euch für die vielen anregenden Diskussionen, Eure nicht enden wollende Hilfsbereitschaft in vielen Lebenslagen und Eure Herzlichkeit.

Für Ihre enorme Unterstützung im Rahmen des Phylogenie-Projektes bedanke ich mich bei Kristian Ullrich, Carsten Kuhl und besonders bei Frau Dr. Aura Navarro-Quezada.

Herr Dr. Marco Trujillo danke ich für die Durchführung der ROS-Messungen, Herr Dr. Douglas Grubb und Frau Birgitt Ortel für die Glukosinolatbestimmungen und Frau Eva Schulze für die *in silico* Modellierung der Proteinstrukturen.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des IPB, besonders aber bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Signalverarbeitung für das tolle Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Auch den zahlreichen Hiwis und Praktikanten, die über die Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein Dank.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: bei meiner Mutter Ramona und meinem Bruder Mario aber auch bei meinen Großeltern Waltraud und Manfred, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben konnten. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.

Mein größter Dank gilt Andre. Ohne Dich geht nichts.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, d. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nadine Schumann

# Lebenslauf

## Persönliche Informationen:

Name: Nadine Schumann  
Geburtsdatum, –Ort: 07. Februar 1983, Burg  
Familienstand: ledig

## Werdegang:

09/1989 – 06/2002 Schulausbildung (Grundschule und Gymnasium)  
06/2002 Abitur am Bismarck-Gymnasium Genthin  
10/2002 – 09/2007 Studium der Biologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Studienschwerpunkte:  
Genetik, Mikrobiologie, Biochemie, Entwicklungsbiologie  
Diplomarbeit  
Am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Prof. C. Wasternack)  
Thema: „Die Regulation der Jasmonatbiosynthese durch Licht in  
*Arabidopsis thaliana*“  
Seit 10/2007 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie  
in der AG Auxin-Signaltransduktion (Dr. Marcel Quint)

## Tagungsteilnahmen (Auszug):

### **Botanikertagung 2009 – Leipzig (06. - 11.09.2009)**

Poster: Nadine Schumann, Aura Navarro-Quezada, Marcel Quint  
Functional and phylogenetic analysis of kelch-repeat containing F-box proteins.

### **7<sup>th</sup> Tri-National Arabidopsis Meeting – Salzburg (15. – 18. 09. 2010)**

Poster: Nadine Schumann, Aura Navarro-Quezada, Kristian Ullrich, Carsten Kuhl, Marcel Quint:  
Evolutionary insights into plant F-box proteins with C-terminal kelch-repeats.

### **Plant Gene Discovery Technologies Conference – Wien (23. – 26.02.2011)**

Poster: Nadine Schumann, Antje Hellmuth, Marcel Quint:  
Molecular and functional characterization of four F-Box kelch proteins in *Arabidopsis thaliana*.

### **22<sup>nd</sup> International Conference on Arabidopsis Research – Madison (22. – 25. 06. 2011)**

Poster: Nadine Schumann, Aura Navarro-Quezada, Kristian Ullrich, Carsten Kuhl, Marcel Quint:  
Evolutionary insights into plant F-box proteins with C-terminal kelch-repeats.

## Publikationen:

Schumann, N., Navarro-Quezada, A., Ullrich, K., Kuhl, C. & Quint, M. (2011). Molecular Evolution and Selection Patterns of Plant F-Box-Proteins with C-terminal Kelch Repeats. *Plant Physiology*, 155(2):835-50.

Halle, d. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nadine Schumann

