Phänotypische und molekularbiologische Analyse der *A. thaliana flower-in-flower* Mutante

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anne Mohrholz

aus Suhl

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	14.06.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Harter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Claudia Oecking

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis V

Abbildungsverzeichnis VIII

Abkürzungsverzeichnis IX

1 Einleitung 1

1.1 Die Sprossarchitektur von *Arabidopsis thaliana* 1

1.2 Einleitung des Floreszenz-Programms 2

1.3 Beibehaltung des Blütenprogramms 6

1.4 Beibehaltung des vegetativen Programms 6

1.5 Die verwendeten *A. thaliana* Mutanten 7

1.6 Nachweis der Kausalität zwischen Phäno- und Genotyp 8

1.7 Identifikation einer kausalen Mutation 9

1.7.1 klassisches Mapping 11

1.7.2 Mapping-by-Sequencing 12

2 Material und Methoden 13

2.1 Allgemeines 13

2.1.1 Chemikalien 13

2.1.2 Bilddokumentation 13

2.1.3 Bildbearbeitung 13

2.2 Arbeiten mit Bakterien 14

2.2.1 Verwendete Bakterien-Stämme 14

2.2.2 Allgemeine Medien und Lösungen 14

2.2.3 Chemisch kompetente Zellen 15

2.2.4 Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterien 17

2.3 Arbeiten mit Arabidopsis thaliana 18

2.3.1 Verwendete Ökotypen und Linien 18

2.3.2 Anzucht der Pflanzen 19

2.3.3 Mapping der kausalen Mutation 20

2.4 Arbeiten mit Nicotiana benthamiana 22

2.4.1 Verwendeter Ökotyp 22
2.4.2 Anzucht der Pflanzen 22
2.4.3 Infiltration von N. benthamiana mit A. tumefaciens 22
2.5 Arbeiten mit DNA 25
2.5.1 Allgemeine Puffer und Lösungen 25
2.5.2 Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* 25
2.5.3 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien 26
2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 27
2.5.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA 30
2.5.6 Klonierungen 32
2.5.7 Restriktionen 32
2.5.8 DNA-Sequenzierung 33
2.6 Arbeiten mit Proteinen 34
2.6.1 Protein-Extraktion unter denaturierenden Bedingungen 34
2.6.2 Elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 35
2.6.3 Coomassie-Färbung 36
2.6.4 Proteintransfer (Western-Blot) 37
2.6.5 Immundetektion 37
2.6.6 DNA-Protein Interaktion (DPI)-ELISA 39
2.7 Geräte 43
2.8 Computerprogramme und Onlineressourcen 44
2.8.1 Verwendete Computerprogramme 44
2.8.2 Verwendete Onlineressourcen 44
3 Ergebnisse 45
3.1 Phänotypische Beschreibung der *Flower-in-Flo*wer Mutante 45
3.2 Überprüfung der Kausalität zwischen Transposon-Insertion und Phänotyp 48
3.3 Mapping der kausalen *fif*-Mutation 50
3.4 Überprüfung beschriebener LEAFY-Funktionen 58
4 Diskussion 64
4.1 Die *FLower-in-Flower* Mutante: Ein neues *LEAFY* Allele 64
4.2 Überprüfung der LFY^{fif} Eigenschaften 66

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation 66
4.2.2 DNA-Binde-Kapazität 66
4.2.3 Protein-Protein-Interaktion 67
4.2.4 Stabilität des Proteins 68
4.3 Der *fif* Phänotyp: Eine Floreszenz- zu Infloreszenztransformation 68
4.4 Das starke LFY-Allel *fif*: ein Erklärungsmodel 71
5 Zusammenfassung 72
6 Literaturverzeichnis 74
7 Lebenslauf 78
8 Anhang 79
A 1: Auflistung der verwendeten Primer 79
Überprüfung der DNA 79
Überprüfung der Transposoninsertion 79
Klassisches Mapping 79
Klonierung der LFY cDNA-Konstrukte 80
GATC sequenzierung 80
qDPI-ELISA 80
A 2: Verwendete Vektoren 81
A 3: Blüte der SALK_073291 Linie 82
Danksagung 83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Stilisierte Illustrationen der *A. thaliana* Sprossmorphologie. 2
Abb. 1.2: Funktionale Verbindung zwischen *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *AGAMOUS* (*AG*). 4
Abb. 1.3: Das ABCE Model der homöotischen Blütengene. 5
Abb. 1.4: Beschreibung der Transposon- und der T-DNA-Insertionsline. 7
Abb. 1.5: Schematische Übersicht einer rezessiven Ein-Gen-Vererbung. 10
Abb. 2.1: Verwendete Größenstandards. 28
Abb. 3.1: Blüten der Flower-in-Flower Mutante im Vergleich zum Wildtyp. 46
Abb. 3.2: Vergleich des Habitus und der Verzweigung von fif und No-0. 47
Abb. 3.3: Rückkreuzung der Mutante. 48
Abb. 3.4: Segregation von Phäno- und Genotyp in der zweiten Generation der Rückkreuzung. 49
Abb. 3.5: Erstellung der Mappingpopulation. 51
Abb. 3.6: Auskreuzung von fif. 52
Abb. 3.7: Identifikation des für den Phänotyp kausalen Chromosoms. 53
Abb. 3.8: Repräsentative PCR Analysen des klassische Mappings. 54
Abb. 3.9: Klassisches Mapping auf Chromosom 5. 54
Abb. 3.10: Ergebnis der Genomsequenzierung für Chromosom 1 bis 4 von fif. 56
Abb. 3.11: Ergebnis der Genomsequenzierung für Chromosom 5 von fif. 57
Abb. 3.12: Lokalisation des fif SNPs und dessen Überprüfung. 58
Abb. 3.13: Schematische Darstellung der verwendeten cDNA Konstrukte. 59
Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisation der Proteine LFY und LFYfif. 60
Abb. 3.15: Überprüfung der DNA-Binde-Kapazität. 61
Abb. 3.16: Protein-Protein Interaktion von LFY und LFYfif. 63
Abb. 4.1: Struktur eines C-terminalen LFY-Dimers gebunden an DNA. 65
Abb. 4.2: Regulatorische Netzwerke um LEAFY (LFY). 70
Abb. A 2: Schematische Illustrationen der verwendeten Vektoren. 81
Abb. A 3: Blütenphänotyp der Linie SALK_073291. 82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	*Amplified Fragment Length Polymorphisms*
AG	AGAMOUS
Amp	Ampicillin
AP	APETALA
AS	Aminosäuren
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basen Paare
CAP	*Cleaved Amplified Polymorphic*
CAL	CAULIFLOWER
cDNA	codierende Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
dCAP	*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI-ELISA	DNA-Protein-Interaktion-ELISA
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
fif	*Flower-in-Flower*
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
FLIP	*floral initiation process*
FRET	Förster resonance transfer
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
Gent	Gentamicin
GFP	*Green Fluorescent Protein*
h	Stunde
INDEL	INsertion/DELetion (PCR basierter Marker)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare

Abkürzungsverzeichnis

kDA	kilo Dalton
l	Liter
LFY	LEAFY
M	molare Masse [g/mol]
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar [mmol/l]
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
No-0	Nossen-0
ns	Nannosekunde
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	PISTILLATA
QTL	Quantitative Trait Locus (Region eines quantitativen Merkmals)
RAPD	*Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP	*Restriction fragment length polymorphisms*
RFP	*red fluorescent protein*
RFU	relative fluorescence units
RIKEN	Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 理化学研究所（*Rikagaku Kenkyūjo*), Japan
RIKEN BRC	RIKEN BioResource Center
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SAM	*shoot apical meristem*
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sek	Sekunde
SNP	single nucleotide polymorphism
Spec	Spektomycin
X	

Std.	Stunde
T-DNA	transferierte DNA
TF	Transkriptionsfaktor
TFL	TERMINAL FLOWER
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transkriptions-Start-Stelle
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGANS
UTR	Untranslatierter Bereich
v/v	*volume per volume*
Wt	Wildtyp
w/v	*weight per volume*
µm	Mikrometer

1 Einleitung

Allen Lebenden ist gemein, dass es sich zur Erhaltung der Art erfolgreich fortpflanzen muss. Im Falle der Pflanzen bedeutet dies, dass sie ortsgebunden nicht nur Keimen, sich zu adulten Pflanzen entwickeln und die jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen bewältigen müssen, sie müssen vor allem auch eine funktionsfähige und fertile Blüte ausbilden, welche eine Bestäubung und somit die Produktion von Samen erlaubt. All diese Entwicklungsschritte müssen, um zum reproduktiven Erfolg der Pflanze zu führen, genau aufeinander abgestimmt und jedes Organ spezifisch aufgebaut werden.

1.1 Die Sprossarchitektur von *Arabidopsis thaliana*

Während des Wachstums von *A. thaliana* etabliert das *shoot apical meristem* (SAM) die Sprossarchitektur und führt zu einer Serie von sich wiederholenden Primordien, welche sich zu einer Rosette mit enganliegenden Blättern oder lateralen Sprossen (Seitentriebe, Infloreszenzen) mit eigenem Apikalmeristem entwickeln (Pidkowich, Klenz, and Haughn 1999). Nach dem Wechsel vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum entwickeln sich meist alle der lateralen Apikalmeristeme zu Blüten. Der Sprossaufbau von *A. thaliana* kann demnach in drei strukturelle Typen unterteilt werden: „Typ 1“: Rosette, bestehend aus den Rosettenblättern und lateralen Meristemen, welche sich verzögert entwickeln; „Typ 2“: Infloreszenzen mit Tragblättern und eigenem Meristem, welches „Typ 2“ oder „Typ 3“ Strukturen hervorbringen kann und „Typ3“: Floreszenzen ohne Tagblätter, welche die Blüten ausbilden (Schultz and Haughn 1991). Die Einteilung der Sprossstrukturen in diese drei Kategorien scheint nicht immer genau genug zu sein, ermöglicht aber eine gute Beschreibung der Sprossarchitektur und deren, z.B. durch Mutationen hervorgerufenen, Veränderungen.

1.2 Einleitung des Floreszenz-Programms

Ein entscheidender Schritt für die Blütenentwicklung und damit für den reproduktiven Erfolg der Pflanze ist der Übergang von den Strukturen „Typ 2“ zu „Typ 3“. Durch verschiedene *A. thaliana* Mutanten, bei welchen die Floreszenzen durch Infloreszenzen oder Intermediate zwischen Floreszenzen und Infloreszenzen ersetzt sind, konnten Gene identifiziert werden, welche bei diesem Schritt eine entscheidende Rolle spielen. Die fünf Gene, die als Hauptregulatoren dieser Transformation von „Typ 2“ zu „Typ 3“ Strukturen gelten, werden als *floral initiation process* (FLIP) Gene bezeichnet. Dies sind namentlich *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *APETALA2* (*AP2*) und *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) (Pidkowich, Klenz, and Haughn 1999).

LFY und *AP1* stellen dabei die Hauptregulatoren dar. Pflanzen mit *loss-of-function* Mutationen in einem diese Gene zeigen eine starke Transformation von Floreszenzen zu Infloreszenzen. Doppelmutanten, welche keine der beiden Genfunktionen mehr aufweisen, bilden meist gar keine echten Floreszenzen mehr aus (Abb. 1.1, (Irish and Sussex 1990; Huala and Sussex 1992; Bowman et al. 1993)).

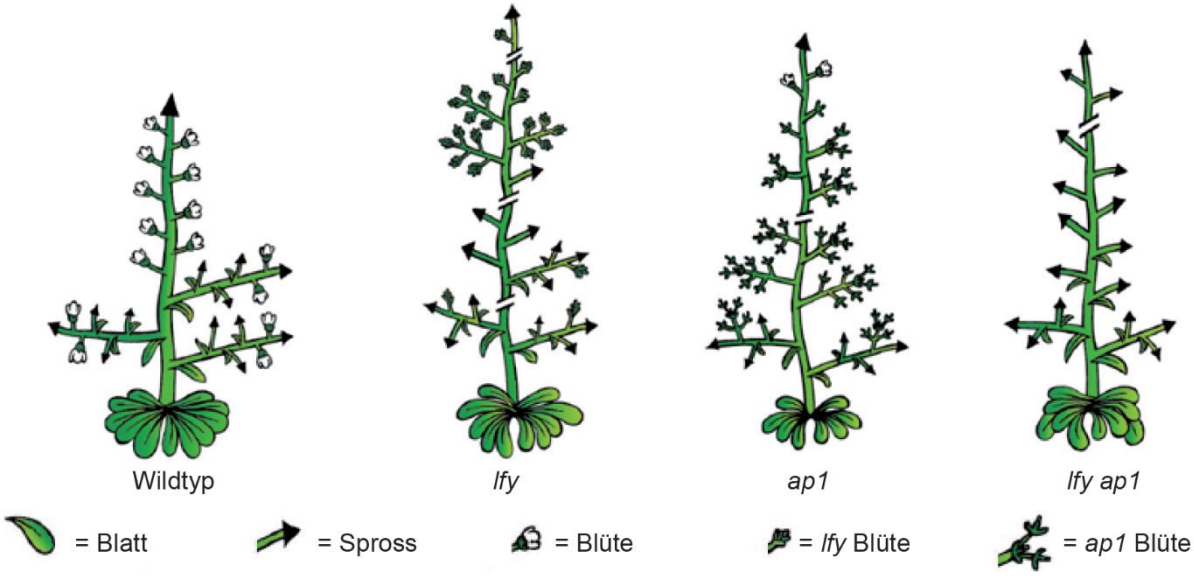

Abb. 1.1: Stilisierte Illustrationen der *A. thaliana* Sprossmorphologie. Der wildtypische (WT) Spross wächst indeterminiert und produziert Seitentriebe gefolgt von Blüten. *Loss-of-function* Mutationen in bestimmten Genen (*leafy* (*lfy*), *apetala1* (*ap1*)) beeinflusst den Blüteninitiationsprozess, was dazu führt, dass die WT Blüten durch Sprosse oder Intermediate zwischen Spross und Blüte ersetzt werden. Dabei sind die basalen Triebe stärker von der Transformation betroffen als die apikalen. Doppelmutanten von *lfy* und *ap1* bilden fast keine Blüten-ähnliche Strukturen mehr aus. Die Abbildung und deren Beschreibung wurde gekürzt von Pidkowich, Klenz, and Haughn (1999) übernommen.

Im Gegensatz dazu führt eine ektopische Expression von *LFY* oder *AP1* zu frühzeitigen Bildung von Floreszenzen (Weigel and Nilsson 1995; Mandel and Yanofsky 1995). Diese Gegensätzlichen Phänotypen von *loss-of-function* und überexprimierenden Mutanten zeigen, dass LFY und AP1 für die Aktivierung des Floreszenz-Programms notwendig sind. Beide Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und sind in Blütenprimordien exprimiert (Weigel et al. 1992; Mandel et al. 1992).

Das dritte FLIP-Gen, *CAL*, wurde durch eine rezessive Mutation entdeckt welche den *ap1*-Phänotypen dramatisch verstärkt (Bowman et al. 1993). Bis auf die terminalen Blüten, entwickeln die Blüten von *ap1* keine Kelch- und Kronblätter, sind in ihrer Entwicklung aber weiterhin determiniert. Im Unterschied dazu produziert das Floreszenzmeristem von *ap1 cal* indeterminiert viele laterale Meristeme, jedes mit weiteren Meristemen dritter oder höherer Ordnung, so dass die Blüte zu einer Masse an Apikalmeristem ohne ausdifferenzierte Organe wird (Bowman et al. 1993). Da sowohl die Proteinsequenz als auch die Expressionsorte von CAL und AP1 eine starke Übereinstimmung aufweisen, ist davon auszugehen, dass CAL funktional redundant zu AP1 ist (Kempin, Savidge, and Yanofsky 1995).

Die verschiedenen mutanten Phänotypen von *lfy*, *ap1* und *cal*, welche sich in der Stärke der Transformation von Floreszenz zu Infloreszenz steigern, je mehr der drei Gene betroffen sind, zeigen, dass es eine der Funktionen von LFY, AP1 und CAL zu sein scheint, sich gegenseitig hoch zu regulieren (Abb. 1.2).

Die gegenseitige, positive Beeinflussung der Expression von *LFY*, *AP1* und *CAL* stellt sicher, dass die unabhängig voneinander aktivierten FLIP-Gene in einem Blütenprimordium in ausreichend hohen Level vorliegen und somit die komplette Umstellung auf das Blütenprogramm gesichert ist.

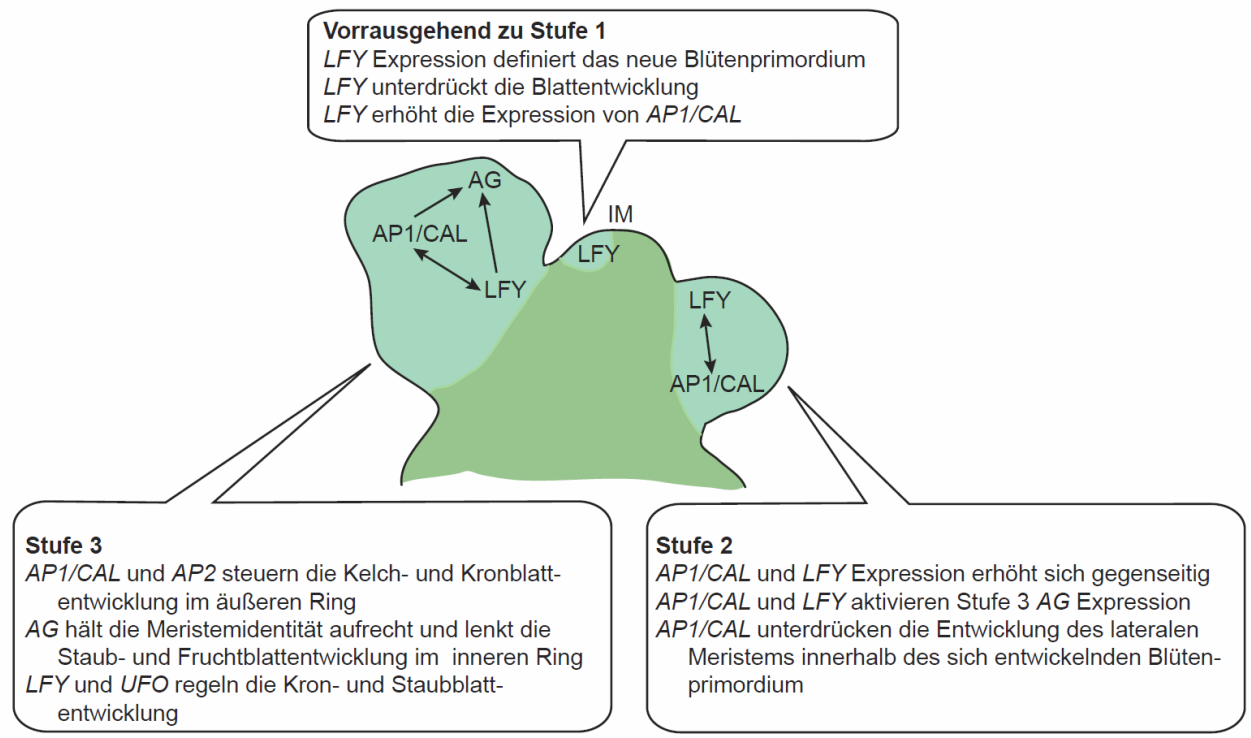

Abb. 1.2: Funktionale Verbindung zwischen *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *AGAMOUS* (*AG*). *LFY* ist vor allen anderen Genen des *floral initiation process* (FLIP) exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt ist es die Rolle von LFY, die Expression von *AP1*, *CAL* und *AG* zu steigern. Umgekehrt erhöhen AP1 und CAL die Expression von *LFY*. Einmal Exprimiert sind die FLIP-Gene nötig um verschiedene Aspekte der Blütenentwicklung zu regulieren. Zum Beispiel ist LFY für die Entwicklung von Kron- und Staubblättern nötig und beteiligt sich bei der Aktivierung von *AG*, während AP1 für die Kelch- und Kronblattentwicklung nötig ist und indirekt die Entwicklung von Staub- und Fruchtblättern durch die Aktivierung von *AG* beeinflusst. AG hält die Meristemidentität im Zentrum des Primordiums aufrecht und unterstützt die Entwicklung von Staub- und Fruchtblättern. IM: Infloreszenzmeristem, *UFO*: *UNUSUAL FLORAL ORGANS*; Abbildung und Abbildungsbeschriftung nach Pidkowich, Klenz, and Haughn (1999)

Dies ist vor allem auch deswegen wichtig, da LFY und AP1/CAL verschiedene Aspekte der Blütenentwicklung beeinflussen. So unterdrückt LFY z.B. die Blattentwicklung und fördert die Klasse B und C Aktivität (Abb. 1.2, Abb. 1.3.), während AP1/CAL eine Verzweigung unterdrückt und die Aktivität der Klassen A und C vorantreibt.

AP2 und *UFO* zählen ebenfalls zu den FLIP-Genen. Die Blüten von *ufo-2* weisen eine Reduktion der Kelch- und Staubblätter auf, während die Überexpression zu sehr vielen Kelchblättern und nicht fusionierten Fruchtblättern führt (Lee et al. 1997).

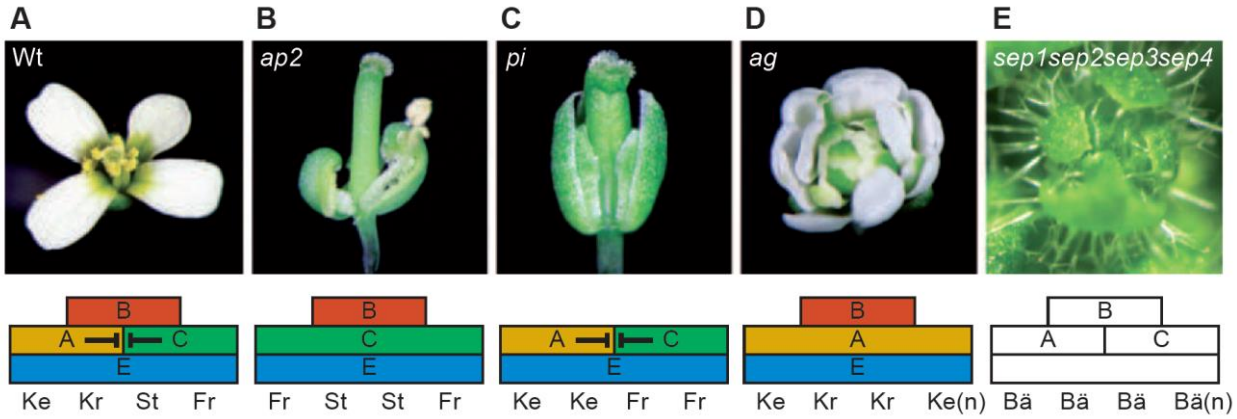

Abb. 1.3: Das ABCE Model der homöotischen Blütengene. (A) Die wildtypische *A. thaliana* Blüte besteht aus vier Ringen von Blütenorganen. Die Kelchblattidentität (Ke) im ersten Ring wird durch die Klasse A (*AP1*, *AP2*) Gene, die Kronblattidentität (Kr) im zweiten Ring durch die Gene der Klasse A und B (*AP3*, *PI*), die Staubblattidentität (St) im dritten Ring durch die Klassen B und C (*AG*) Gene und die Fruchtblattidentität (Fr) durch die Gene der Klasse C vermittelt. Die Klasse E Gene werden für die Spezifikation aller Organtypen benötigt. (B) Gezeigt ist die Blüte der *apetala2* (*ap2*) Mutante. Dieser Mutante fehlt die Klasse A Aktivität, weshalb sich die Klasse C Aktivität über alle Blütenorgane hinweg vorhanden ist. Die Blüte ist demzufolge aus Fruchtblättern im ersten, Staublättern in den beiden folgenden und Fruchtblättern im vierten Ring aufgebaut. (C) Gezeigt ist die Blüte von *pistillata* (*pi*), welche aus Kelchblättern in der ersten beiden und Fruchtblättern in den inneren beiden Ringen besteht. In dieser Mutante fehlt die Klasse B Aktivität, weswegen nur die Organe der Klasse A und C entwickelt werden. (D) Bei den Blüten von *agamous* (*ag*) fehlt die C Klassen Aktivität, weswegen die Klasse A Aktivität in allen Ringen vorhanden ist. Die Blüte hat im ersten Ring Kelchblätter gefolgt von zwei Ringen an Kronblättern. Diese Reihenfolge wiederholt sich indeterminiert im inneren Ringen. (E) Die Blüten einer vierfachen *sepallata* Mutante (*sep1 sep2 sep3 sep4*) bestehen ausschließlich aus sich wiederholenden Ringen aus Blatt-ähnlichen (Bä) Organen. Dieser Mutante fehlt die Klasse E Aktivität, weswegen die Klassen A, B und C Aktivitäten beeinträchtigt sind und die generelle Blütenbestimmung verloren geht. Die Blütenbilder der Abbildung und die Abbildungsbeschriftung sind von/nach Krizek and Fletcher (2005).

Zusammen mit LFY aktiviert UFO die Gene der Klasse B und gibt diesen durch seine lokal spezifische Expressionsverteilung im Blütenprimordium die örtliche Spezifität (Lee et al. 1997; Parcy et al. 1998). Der Blütenphänotyp von *ap2* Mutanten ist recht variabel. Während in *ap2-2* die ersten drei der vier Ringe an Blütenorganen betroffen sind, sind es in *ap2-1* nur die ersten zwei Ringe. Die Blüten von *ap2-2* haben an Stelle von Kelchblättern Fruchtblätter in reduzierter Zahl, die Kronblätter fehlen komplett und die Staubblätter sind in geringerer Zahl als beim Wildtyp vertreten. Bei *ap2-1* sind die Kelchblätter durch blattähnliche Strukturen ersetzt und die Kronblätter durch Organe die sowohl Staub- als auch Fruchtblattcharakteristika aufweisen (Drews, Bowman, and Meyerowitz 1991).

1.3 Beibehaltung des Blütenprogramms

In *A. thaliana* wird das Blütenprogramm, nachdem es einmal gestartet wurde, bis zum Ende durchgeführt. Eine Rückführung in das vegetative Wachstum ist unter normalen Bedingungen nicht möglich.

AGAMOUS (AG) ist bekannt dafür, die Organidentität von Staub- und Fruchtblättern und das begrenzte Wachstum der Blüte zu steuern. In den Blüten von *ag* sind die inneren zwei Ringe an Blütenorganen betroffen, wobei die Staubblätter zu Kronblättern und die Fruchtblätter zu weiteren, indeterminierten Blütenorganringen aus Kelch- und Kronblättern umgewandelt sind (Abb. 1.3 D und Bowman, Smyth, and Meyerowitz (1989)). Im Einklang mit diesen Funktionen wird *AG* erst nach den FLIP-Genen und spezifisch in den inneren zwei Blütenorganringen exprimiert (Bowman, Drews, and Meyerowitz 1991).

Die Tatsache, dass die indeterminierten Blüten von *ag*, nach Blühinduktion durch den Transfer in nichtinduktive Bedingungen (Kurztag), dazu zurückkehren, einen vegetativen Spross zu bilden (Mizukami and Ma 1997), belegt die Wichtigkeit von *AG* bei der Beibehaltung des Blütenprogramms und dessen Determination.

1.4 Beibehaltung des vegetativen Programms

Auch nach der Initiation des Blütenprogramms gehen nicht alle Meristeme einer Pflanze in dieses über. Das primäre Meristem und auch die frühen lateralen Meristeme, welche in den Achsen der Hochblätter (Cauline) entspringen, behalten ihr indeterminiertes, vegetatives Wachstum bei, produzieren dadurch weitere laterale Sprosse und prägen damit das Erscheinungsbild des Gesamtsprosses (Abb. 1.1). Demnach muss die Pflanze während der reproduktiven Wachstumsphase kontrollieren, welche Meristeme indeterminierte Infloreszenzen bleiben und welche zu determinierten Floreszenzen umgewandelt werden.

Ein Faktor, der maßgeblich zur Erhaltung des Infloreszenzmeristems beiträgt, ist *TREMINAL FLOWER 1* (*TFL1*). Mutationen in TFL1 führen zu Pflanzen, bei denen, nach Blühinduktion, alle apikalen Meristeme in Floreszenzmeristeme umgewandelt sind (Shannon and Meekswagner 1991; Alvarez et al. 1992). Übereinstimmend damit ist *TFL1* zu Beginn nur schwach im Sprossapex exprimiert, wird aber in den

Meristemen hochreguliert, welche weiterhin dem vegetativen Wachstum folgen sollen (Bradley et al. 1997). Auf welche Art und Weise TFL1 den FLIP genau reguliert, bzw. unterdrückt, ist nicht geklärt. Es wurde aber gezeigt, dass eine ektopische Expression von *TFL1* (*35S::TFL1*) weder die Expression von *LFY* noch die von *AP1* vollständig verhindert. Auch das Blühprogramm wird in 35S::TFL1 Pflanzen nicht ausnahmslos unterdrücken (Ratcliffe et al. 1998). Allerdings ist in diesen Pflanzen der Anstieg der Expression von *LFY* und *AP1* in den Blütenprimordien verzögert. Es ist also denkbar, dass TFL1 die Fähigkeit von LFY und AP1, die jeweils andere Expression anzuheben, behindert. Ob dies z.B. durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion bedingt ist, bleibt weiter zu klären.

1.5 Die verwendeten *A. thaliana* Mutanten

Mit dem Ziel, neue Faktoren zu finden, welche die Blütenentwicklung und deren Aufbau beeinflussen, wurde in RAPID (RIKEN Arabidopsis Phenome Information Database (Kuromori et al. 2006)) nach Mutanten gesucht, welche in Hinblick auf die Blütenarchitektur einen Phänotyp aufweisen und deren Insertion in einem Gen liegt, welches bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Blüte beschrieben wurde. Die Mutante, welche für diese Arbeit ausgewählt wurde, Namentlich 15-3794-1, wurde mit einer abnormalen Verzweigung, als semisteril und mit einer reduzierten Zahl an Kron- und Staubblättern beschrieben (Abb. 1.4. A, (Ito et al. 2002; Kuromori et al. 2004)).

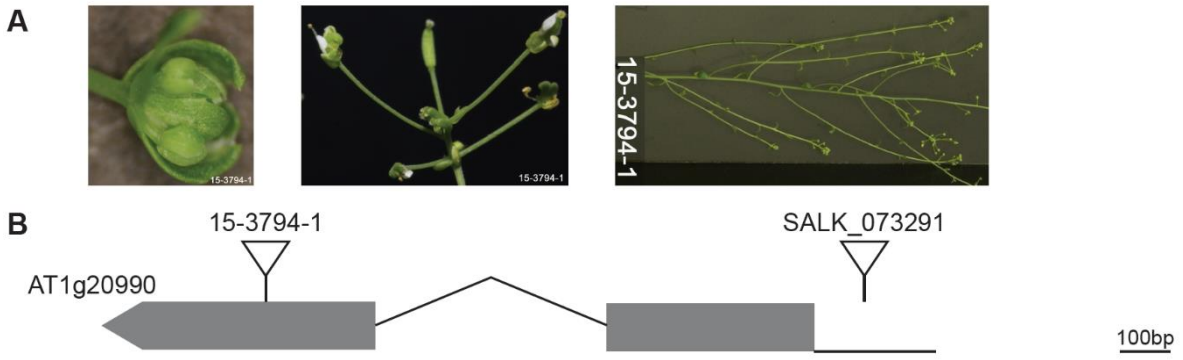

Abb. 1.4: Beschreibung der Transposon- und der T-DNA-Insertionsline. (A) Die hier abgebildeten Bilder sind von Kuromori et al. (2006) und zeigen die zuvor beschriebenen Aspekte des Phänotypen (von links nach rechts): reduzierte Anzahl an Kron- und Staubblättern und die abnormale Verzeigung. (B) Gezeigt ist maßstabgetreu der genomische Bereich des Gens *AT1g20990* mit dem potentiellen Promotorbereich (-), den beiden Exons (graue Kästen) und dem Intron (^). Ebenfalls angegeben sind die jeweiligen Insertionsstelle (Dreieck) des Transposons (15-3794-1) und der T-DNA (SALK_073291). Größenstandard: 100bp

Die Mutation, eine Transposoninsertion, liegt im zweiten Exon des Gens *AT1g20990* (Abb. 1.4 B) und ist im Nossen (No-0) Hintergrund. Das Produkt dieses Genes ist ein „Cysteine/Histidine-rich C1 domain family“-Protein mit einer konservierten DC1-Domäne. Bei Proteinen diese Klasse wird vermutet, dass sie Zinkionen (Zn^{2+}) binden und an intrazellulären Signalwegen teilhaben (Shinya et al. 2007; Miwa et al. 2008), was die Möglichkeit eröffnet, dass dieses Gen auch bei der Regulation der Floreszenz eine Rolle spielen könnte. Über die Expression dieses Genes ist bisher nichts bekannt (Arabidopsis eFP Browser (Winter et al. 2007)), weswegen eine potentielle Expression in der Blüte nicht ausgeschlossen werden kann.

Zum phänotypischen und analytischen Vergleich der Auswirkung der Transposon-insertion, wurde zusätzlich noch eine T-DNA-Insertionslinie bestellt. Diese Linie, SALK_073291 (Alonso et al. 2003), hat die Insertion im potentiellen Promotorbereich des Gens und ist im Col-0 Hintergrund. Bisher liegen keine phänotypischen Informationen zu dieser Linie vor.

1.6 Nachweis der Kausalität zwischen Phäno- und Genotyp

Für eine eindeutige Bestätigung der Kausalität zwischen Mutation und Phänotyp wird die zu untersuchende Linie mit ihrem Wildtyp gekreuzt und in den beiden folgenden Generationen auf die Verteilung von Phäno- und Genotyp hin analysiert.

In der ersten Generation (F_1) sind alle Pflanzen genetisch heterozygot für die Mutation. Der Phänotyp der Pflanzen zeigt hierbei, um welche Art von Vererbung es sich handelt. Sehen die F_1-Pflanzen wildtypisch aus, ist die Mutation rezessiv (Abb. 1.5 A). Im Entgegengesetzten Fall, einer dominanten Vererbung, zeigen alle Pflanzen der ersten Generation den mutanten Phänotyp (Mendel 1965).

Einfachheitshalber wird im weiteren Verlauf nur auf die rezessive Vererbung eingegangen. In diesem Fall spaltet sich die Population der zweiten Generation, nach Selbstbefruchtung der F_1-Pflanzen, in phänotypisch wildtypische und mutante Pflanzen auf. Ist ein einzelnes Gen für den mutanten Phänotyp verantwortlich, so sehen 25% der F_2-Pflanzen mutant aus (Abb. 1.5 A). Generell ist zu sagen, dass je mehr Gene/Mutationen für einen Phänotyp verantwortlich sind, desto geringer ist der Anteil an phänotypisch auffälligen Pflanzen in der zweiten Generation. So sind es z.B. bei zwei Genen schon nur noch ca. 6% der Pflanzen.

Hat man, wie in diesem Fall, Insertionslinien, bei denen der Ort der Insertion/Mutation bekannt ist, so kann man die Pflanzen der F_2-Generation spezifisch auf das Vorhandensein der Insertion testen. In dem beschriebenen Fall der rezessiven Vererbung, sollten alle phänotypisch auffälligen Pflanzen die Insertion homozygot tragen. Die wildtypischen Pflanzen tragen dann entweder keine, oder eine heterozygote Insertion. Zeigen die Ergebnisse, dass es wildtypische Pflanzen mit einer homozygoten, oder mutante Pflanzen mit heterozygoten bzw. keiner Insertion gibt, bedeutet dies, dass die getestete Insertionsstelle nicht kausal für den Phänotyp verantwortlich ist. In diesem Fall muss die kausale Mutation neu lokalisiert werden.

1.7 Identifikation einer kausalen Mutation

Für die Lokalisation (das Mapping) einer kausalen Mutation ist das Rückkreuzen der Mutante auf ihren eigenen Ökotypen nicht zielführend, da im Optimalfall (ohne spontane Mutationen z.B. bei der Nachzucht) nur ein einzelner Marker, und zwar die kausale Mutation selbst, diese beiden Linien unterscheidet. Daher wird die Mutante mit einem anderen Ökotyp ausgekreuzt. Die genetischen Unterschiede zwischen beiden Ökotypen können nachfolgend zur Lokalisation der Mutation genutzt werden. Durch die Auskreuzung wird eine Population erzeugt, in welcher die genetische Information beider Ökotypen vertreten ist. In der ersten Generation liegt die genetische Information beider Ökotypen und die kausale Mutation selbst, heterozygot vor (Abb. 1.5 B). Nach Selbstbefruchtung dieser Pflanzen können, bei einer Ein-Gen-Vererbung, die 25% phänotypisch mutanten Pflanzen genutzt werden, um die Mutation zu lokalisieren. Diese Pflanzen bilden die Mapping-Population. In all diesen Pflanzen liegt die Mutation, wie oben erklärt, homozygot vor. Da bekannt ist, in welchem Ökotypen die Mutation ist, werden die Genome dieser Pflanzen auf die Verteilung der Ökotypen hin analysiert. Durch das in der Meiose auftretende Crossing-over sind die Chromosomen der F_2-Pflanzen, über die gesamte Population betrachtet, mosaikförmig aus beiden Genomen zusammengesetzt (Abb. 1.5 B, (Belling 1933; Salome et al. 2012)). Dabei sollten die Stellen des Genoms, die nicht mit der Mutation in Verbindung stehen, also unabhängig von dieser vererbt werden, beide Genome zu jeweils 50% aufweisen.

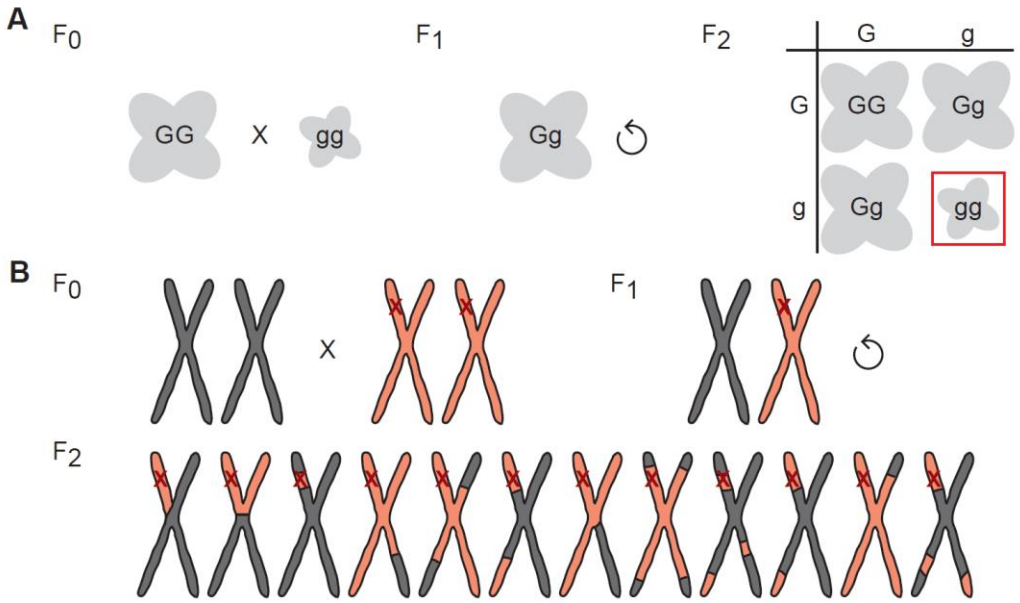

Abb. 1.5: Schematische Übersicht einer rezessiven Ein-Gen-Vererbung. Dargestellt ist eine Kreuzung zwischen einem Wildtyp (groß) und einer Mutante (klein) als Rück- (A) und Auskreuzung (B). (A) Kreuzt man einen homozygoten Wildtyp (GG) mit einer homozygoten Mutante (gg) sind bei einer rezessiven Vererbung alle Pflanzen der F_1-Generation phänotypische Wildtypen (Gg). Nach Selbstbefruchtung dieser Pflanzen ergibt sich in der zweiten Generation (F_2) ein Verhältnis von drei wildtypischen (75%) zu einer mutanten (25%) Pflanze, wobei zwei der drei wildtypischen Pflanzen heterozygot (Gg) für das rezessive Merkmal sind. (B) Gezeigt ist schematisch eine Auskreuzung auf chromosomaler Ebene. Dabei ist der verwendete Wildtyp (grau) ein anderer als der, der zu untersuchenden Mutante (rot). In diesem Beispiel befindet sich die Mutation (X) am oberen Ende des Chromosoms. Nach Kreuzung der beiden Ökotypen ist die erste Generation (F_1) sowohl für den genetischen Hintergrund, als auch die Mutation heterozygot. In der F_2-Generation sind hier exemplarisch nur Chromosome der 25% phänotypisch mutanter Pflanzen gezeigt. Durch das Crossing-over der Chromosomenpaare sind die einzelnen Chromosomen genetisch aus Teilen beider Ökotypen zusammengesetzt. Da die Mutation von Beginn an in dem roten Ökotyp war, ist auch in den chimären Chromosomen die Stelle, welche die Mutation trägt, immer aus diesem Ökotyp. So kann der Ort der Mutation mittels ökotypspezifischer Marker ermittelt werden.

Dies trifft vor allem auf die Chromosomen zu, auf welchen die kausale Mutation nicht liegt. Je näher man der Mutation kommt, desto höher wird der Anteil des Ökotypens, welcher die Mutation von Beginn an getragen hat. Im Bereich der Mutation selbst, sollten demnach alle Pflanzen der Mapping-Population den entsprechenden, anfänglichen Ökotypen aufweisen (Abb. 1.5 B F_2).

Zur Identifikation des Ortes der Mutation bzw. des QTLs (Quantitative Trait Locus) werden Unterschiede in den Genomen, so genannte Allele oder Marker, genutzt. Die beherrschenden Marker sind SNPs (single nucleotide polymorphism) und INDELs (Insertion and Deletion). Bei SNPs unterscheiden sich einzelne Basen einer Sequenz, weswegen sie sich gut durch Restriktionen nachweisen lassen, da der Basen-austausch zu einem Verlust, bzw. dem Hinzukommen, der Erkennungssequenz eines

bestimmten Restriktionsenzyms führen kann. Bei INDELs handelt es sich um unterschiedlich große Bereiche des Genoms, die entweder an einer weiteren Stelle inseriert wurden, oder gänzlich fehlen. INDELs sind leicht PCR-basiert nachzuweisen, wobei ausgenutzt wird, dass die PCR-Produkte eine unterschiedliche Größe, je nach Vorhandensein oder Fehlens eines Bereichs, aufweisen.

Um SNPs oder INDELs nachzuweisen können prinzipiell zwei Wege beschritten werden. Zum einen der klassische, bei welchem die Unterschiede in den beiden Genomen mittels PCR und/oder Restriktion unterschieden werden, und zum anderen die Genomsequenzierung, bei welcher die Gesamtheit des Genoms analysiert und verglichen wird.

1.7.1 klassisches Mapping

Bei einer der frühen Methoden des klassischen Mappings, RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) wird der Umstand ausgenutzt, dass bei der Restriktion eines gesamten Genoms mit einem Enzym, oder bestimmten Enzymkombinationen, spezifische Fragmentgrößenmuster entstehen (Botstein et al. 1980). Eine andere, jedoch PCR-basierte, Methode ist RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Hier werden kurze DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, um zufällige Bereiche des Genoms zu amplifizieren (Williams et al. 1990; Williams et al. 1993). Bei Benutzung definierter Primer-Paare ergibt sich eine Verteilung der Produktgrößen, welche spezifisch für den jeweiligen Ökotyp ist. Bei AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) werden diese beiden Methoden miteinander verbunden. Nach der Restriktion des Genoms in Fragmente, werden diese mit Adapter-Oligonukleotiden ligiert. Nachfolgend werden, durch mehrere PCR-Runden, nur spezifische Fragmente vervielfältigt. Dadurch wird die Komplexität des Fragmentmusters reduziert, was die nachfolgende Zuordnung und Interpretation erleichtert (Zabeau and Vos 1993; Vos et al. 1995). Eine neuere Methode mit so genannten CAP-Markern (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) kombiniert ebenfalls PCR und Restriktionsverdau. Nach einer PCR, deren Produkt über einen Polymorphismus (SNP) hinweggeht, wird dieses geschnitten, wobei ökotypspezifische Bandenmuster entstehen (Konieczny and Ausubel 1993). Sind SNPs bekannt, kann so ganz spezifisch auf diese getestet werden. Hierbei muss nur überprüft werden, ob eine Bestimmte Sequenz geschnitten wurde, oder nicht. Will man ganz spezifisch auf einen SNP zwischen zwei Genomen, bzw. die zu testende Mutation, testen, obwohl dadurch keine Änderung der

Erkennungssequenz eines Restriktionsenzyms hervorrufen wird, kann man mit Hilfe von modifizierten Primern eine Erkennungssequenz künstlich herstellen (Neff, Turk, and Kalishman 2002). In diesem Fall wird von dCAPs (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) gesprochen.

1.7.2 Mapping-by-Sequencing

Unter Verwendung der neuen Sequenzierverfahren (NGS, next generation sequencing) können ganze Genome schnell und effizient sequenziert werden (Schneeberger 2014).

Ausgangspunkt für das Mapping-by-Sequencing ist, wie beim klassischen Mapping auch, eine rekombinante Population homozygoter Pflanzen. Je nach Vorgehensweise kann diese Population durch Rückkreuzung auf den eigenen, oder Auskreuzung auf einen anderen Ökotyp erzeugt werden. Allerdings ist die Präzession des Mappings mit einer Auskreuzung genauer. So ergibt die Auswertung einer Sequenzierung mit 15-facher Abdeckung einer Population aus 100 rekombinanten Pflanzen einer Auskreuzung ein Mappingintervall von ca. sechs Genen, wohingegen der Intervall bei einer Rückkreuzung fast 60 Gene umfasst (James et al. 2013). Bei einer Auskreuzung kann also mit einer geringeren Zahl an Testpflanzen spezifischer gearbeitet werden.

Generell beruht das Mapping-by-Sequencing auf den unterschiedlichen Allelen (SNPs, INDELs) zweier Populationen. Nach Vorbereitung des rekombinanten Polls an Pflanzen (Mappingpopulation) und der Isolation deren genomischer DNA, wird diese als Pool sequenziert. Nachfolgend kann die Verteilung jedes einzelnen Allels der Probe analysiert und ausgewertet werden. Dabei ist es mit heutigen Methoden (SHOREmap) möglich, zeitgleich eine genomweite Genotypisierung und die Sequenzierung von Kandidatengenen durchzuführen (Schneeberger et al. 2009; Sun and Schneeberger 2015), wodurch nicht nur das kausale QTL, sondern die ganz spezifische Mutation identifiziert werden kann.

Durch diese Methode wird eine kausale Mutation schneller und genauer identifiziert als durch das klassische Mapping.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien analyserein von Sigma-Aldrich (Steinheim,D) und Roth (Karlsruhe, D) bezogen.

2.1.2 Bilddokumentation

Die in dieser Arbeit gezeigten Bilder von *A. thaliana* Pflanzen wurden mit der Digitalkamera Pentax Optio A40 aufgenommen. Einzelne Blüten und deren Organe wurden mit einem Binokular (MZ FL III Fluorescence Stereomicroscope, Leica) dokumentiert. Aufnahmen von DNA-Gelen wurden mit dem Geldokumentationssystem Gel Logic 100 Imaging System (Kodak) erstellt.

Die gezeigten mikroskopischen Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (Laser Scan Mikroskop, Typ DM RE (TCS SP8), Leica Microsystems GmbH). Diese Bilder wurden mit der Leica Confocal Software für Windows NT (Workstation 4.0) bearbeitet.

2.1.3 Bildbearbeitung

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop bzw. Adobe Illustrator bezüglich der Farbdarstellung, der Helligkeit, des Kontrastes, der Ausrichtung der aufgenommenen Objekte und deren Größe bearbeitet. Demnach können aus den gezeigten Abbildungen nur qualitative und keine quantitativen Schlüsse gezogen werden.

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Verwendete Bakterien-Stämme

Escherichia coli

NEB®5-alpha

Genotyp: *huA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Diese Zellen wurden für das propagieren von Vektoren verwendet.

DB3.1™

Genotyp: F- *gyr*A462 *end*A1 (sr1-*rec*A) *mcr*B *mrr hsd*S20 ∆(r_B-, m_B-) *sup*E44 *ara*-14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L20 (Sm^R) *xyl*-5 λ-*leu mtl*1

Die Zellen wurden nach Hanahan (1983) modifiziert und besitzen das Allel *gvrA462*, welches sie resistent gegen den toxischen Effekt des *ccdB*-Gens (Bernard and Couturier 1992) macht und dazu verwendet, um Gateway-Vektoren, welche das *ccdB*-Gen enthalten, zu propagieren.

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Genotyp: $F^–$ *ompT hsdS*$_B$ ($r_B^–$ $m_B^–$) *dcm*$^+$ $Tetr^r$ *gal* λ(DE3) endA Hte [*argU ileY leuW* Cam^r]

Diese Zellen wurden für die Expression von Proteinen verwendet.

Agrobacterium tumefaciens

GV3101::pMP90-RK

Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101::pMP90-RK ist ein Rifampicin resistentes Derivat des Stammes C58C1, aus welchem das Ti-Plasmid pTiC58 *traC* entfernt (Larebeke et al. 1974) wurde. Der Stamm wurden mit den „entwaffneten“ Vir-Ti-Helferplasmid pMP90 transformiert. Das Helferplasmid pMP90 ist ein Derivat von pTiC58 *trac nocc*, von welchem die gesamte T-Region deletiert und stattdessen eine Gentamycin-Resistenz inseriert wurde.

2.2.2 Allgemeine Medien und Lösungen

LB-Medium LB-Medium bzw. LB-Agar (Luria/Miller) wurde nach Angaben des Herstellers (Roth) angesetzt und anschließend autoklaviert.

Glaskügelchen Glasperlen Ø 2,85-3,45 mm

wurden sterilisiert und zum ausplattieren von Bakterien auf LB-Platten verwendet.

Antibiotika

Die genutzten Antibiotika wurden von den Herstellern Roth, D, Sigma, D oder Duchefa, NL bezogen und in den folgenden Konzentrationen für die Selektion eingesetzt.

	Stock [mg/ml]	Lösungsmittel	Selektion [µg/ml]	
			E. coli	*A. tumefaciens*
Ampicillin	100	H_2O	100	75
Kanamycin	50	H_2O	50	50
Gentamycin	40	H_2O	10	40
Spectinomycin	50	H_2O	50	100
Chloramphenicol	25	Ethanol	25	25
Rifampicin	50	DMSO	-	100

2.2.3 Chemisch kompetente Zellen

Medien und Lösungen

SOB (flüssig)		g/l
2% (w/v)	Bacto tryptone	20
0,5% (w/v)	Yeast extract	5
10 mM	NaCl (58,44g/mol)	0,5844
2,5 mM	KCl (74,56g/mol)	0,1864

Nach Lösung aller Bestandteile den pH-Wert auf 6,8 bis 7,0 einstellen und das Medium autoklavieren. Nachfolgend 10 ml/l steril filtrierte 2 M Mg^+ Stock-Lösung (1 M $MgCl_2$ + 1 M $MgSO_4$) hinzugeben. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

RF1		**RF2**	
100 mM	Rubidium Chlorid (RbCl)	10 mM	MOPS
50 mM	Manganese Chlorid ($MnCl_2$)	10 mM	Rubidium Chlorid (RbCl)
30 mM	Potassium Acetat ($C_2H_3KO_2$)	75 mM	Calcium Chlorid
10 mM	Calcium Chlorid	15%	Glycerol
15%	Glycerol		

Nach Lösung aller Bestandteile den pH-Wert von FR1 mit Essigsäure auf 5,8 und den von RF2 mit KOH oder HCl auf 6,1 bis 6,4 einstellen. Nachfolgend beide Lösungen steril filtrieren und bei 4°C lagern.

$CaCl_2$

0,5 M $CaCl_2$ und 20 mM $CaCl_2$

Beide Lösungen steril filtrieren, bei Raumtemperatur lagern und vor gebrauch auf Eis kühlen.

Escherichia coli

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wird zunächst der jeweilige Stamm auf einer LB-Platte (gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika; dann auch in den folgenden LB-Medien) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C propagiert. Am Morgen des folgenden Tages wird eine 5 ml LB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie inokuliert und über den Tag schüttelnd bei 28°C inkubiert. Am Abend werden mit dieser Vorkultur zweimal 200 ml SOB-Hauptkultur inokuliert und schüttelnd bei 25°C bis zu einer OD_{600} von 0,45 bis 0,55 kultiviert. Bei allen nachfolgenden Schritten sollte stets darauf geachtet werden, dass die Bakterien kalt bleiben. Das Arbeiten auf Eis im Kühlraum ist empfehlenswert. Auch alle benötigten Materialien und Lösungen sollten im Vorfeld gekühlt werden. Nach Erreichen der optimalen OD_{600} werden die Zellen in vier Falcons umgefüllt und zunächst für 15 min in Eiswasser inkubiert. Dann die Zellen bei 4°C und 2500 g für 10 min zentrifugieren. Nach Entsorgung des Überstandes werden die Zellen vorsichtig in jeweils 5 ml RF1 resuspendiert, in zwei Falcons zusammengeführt und das Volumen in jedem Falcon auf 20 ml aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation in Eiswasser werden die Zellen erneut bei 4°C und 2500 g für 10 min zentrifugiert. Nach Entsorgung des Überstandes werden die Zellen in jeweils 4 ml RF2 gelöst, in einem Falcon zusammengeführt und für 15 min in Eiswasser inkubiert. Nachfolgend werden wie Zellen aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Am nachfolgenden Tag werden die frisch Hergestellten chemisch kompetenten Zellen sowohl auf ihre Kompetenz als auch Hintergrundresistenz hin getestet. Hierfür wird zum einen ein Aliquot mit 1 µl pUC19 (10 pg/ µl) transformiert und die Entstehenden Kolonien ausgezählt, und zum anderen ein nicht transformiertes Aliquot auf LB-Platten mit jeweils allen häufig verwendeten Antibiotika (Amp, Gent, Spec, Kan) ausplatiert. Sollten die Zellen eine Hintergrundresistenz haben, oder eine Kompetenz von weniger als 5.10^6 müssen neue Zellen hergestellt werden.

Agrobacterium tumefaciens (GV3101)

Die Zellen werden zunächst in 10 ml LB-Rif/Gent über Nacht bei 28°C angezogen und morgens in eine 100 ml Kultur überführt. Diese wird weiter bei 28°C angezogen bis eine OD_{600} zwischen 05 und 0,8 erreicht wird. Nachfolgend werden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (5 min, 4000 g, 4°C) gesammelt. Dann das Pellet in 20 ml 0,15 M $CaCl_2$ (eisgekühlt) resuspendieren, durch Zentrifugation erneut sammeln (s.o.) und in 2 ml 20 mM $CaCl_2$ (eisgekühlt) lösen. Nachfolgend werden wie Zellen aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.4 Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterien

Escherichia coli

Anzucht

Die Zellen der beschriebenen *E.coli* Stämme wurden auf LB-Platten, welche das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Über-Nacht-Kulturen transformierter Bakterien wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum mit einer Einzelkolonie inokuliert und mindestens 16 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die LB-Platten können 2-3 Wochen bei 4°C gelagert werden.

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,5 µg - 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben, vorsichtig mit den Zellen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 45 sec. bei 42°C und anschließender Inkubation von 5 min auf Eis wurde 1 ml LB-Flüssigmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde 60 min bei 37°C geschüttelt. Die mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 30 sec) sedimentierten und in 100 µl resuspendierten Zellen wurden auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

Lagerung

Bakterien auf Platten können 2-3 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur langfristigen Lagerung der Bakterien wurden Glycerin-Kulturen angelegt, indem 0,8 ml einer Über-Nacht-Kultur der Bakterien zu 1 ml 60% Glycerin gegeben und mehrmals invertiert wurden. Anschließend wurden die Glycerin-Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C gelagert.

Agrobacterium tumefaciens (GV3101)

Anzucht

Transformierte Zellen des beschriebenen *A. tumefaciens* Stammes wurden auf LB-Platten, welche die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C inkubiert. Für Über-Nacht-Kulturen transformierter Bakterien wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotika mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 28°C geschüttelt.

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. 5 µl Plasmid-DNA wurde hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Inkubation in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen 5 min auf 37°C erhitzt. Danach wurde 1 ml LB-Flüssigmedium zugegeben und bei 28°C für 2-4 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (0,5 min, 14.000 rpm) konzentriert und auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert.

Lagerung

Siehe oben (Lagerung *E. coli*)

2.3 Arbeiten mit Arabidopsis thaliana

2.3.1 Verwendete Ökotypen und Linien

Col-0

Samen des Ökotypen Columbia (Col-0) wurden aus dem Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) bezogen

No-0

Samen des Ökotypen Nossen (No-0) wurden von RIKEN BRC Experimental Plant Division (http://epd.brc.riken.jp/en/seed) bezogen.

fif

Samen der Linie 15-3794-1 wurden von RAPID (RIKEN Arabidopsis Phenome Information Database, (Kuromori et al. 2006)) bezogen.

Salk_073291

Die Linie Salk_073291 (Alonso et al. 2003) wurde von NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) bezogen.

2.3.2 Anzucht der Pflanzen

Medien

Erde

Einheitserde Typ P und Typ T (Patzer, Sinntal-Jossa, D) im Mischungsverhältnis 1:1 verwendet. Die Erde wurde vor Verwendung gedämpft und in Töpfe mit sechs bzw. neun cm Durchmesser locker eingefüllt.

½ MS-Medium (Murashige and Skoog 1962)

Das MS-Salz (Basal Salt Mixture, DUCHEFA BIOCHEMIE B.V) wurde in halber Konzentration nach Angaben des Herstellers angesetzt. Im Falle von Festmedium wurden zusätzlich 7 g/l Phyto Agar hinzugegeben. Nachfolgend wurde das Medium autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

0,1% Phyto Agar

0,1% (w/v) Phyto Agar (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V) wurden in MilliQ H_2O Wasser gelöst, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Anzucht von Arabidopsis thaliana auf Erde

Zur Synchronisation der Keimung und zum Brechen der Samenruhe wurden die Samen zunächst in 0,1% Phyto Agar in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Da *A. thaliana* ist ein Lichtkeimer ist, wurden die Samen nachfolgend offen auf der Erde ausgelegt. Die Saat wurde in der ersten Woche mit einer Kunststoffhaube bedeckt, bis die Keimlinge die ersten Folgeblätter entwickelt hatten. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen angezogen:

Photoperiode	16 h Licht (7-23 Uhr)
Temperatur	18°C (Tag) / 15°C (Nacht)
Relative Luftfeuchtigkeit	55 bis 60%

Während der Wachstumsphase wurden die Pflanzen regelmäßig an Holzstäben hochgebunden, um eine Kreuzbestäubung zu vermeiden. Nach Erreichen der Samenreife wurden die Pflanzen in Papiertüten eingepackt und vollständig getrocknet.

Anzucht von Arabidopsis thaliana auf ½ MS-Platten

Zur Anzucht unter sterilen Bedingungen wurden die Samen nach Sterilisation auf ½ MS-Platten ausgelegt. Zur Synchronisation der Keimung und zum Brechen der Samenruhe wurden die Patten anschließend für mindestens eine Nacht dunkel bei 4°C gelagert und nachfolgend die Keimlinge in einer Dauerlichtkammer (24 h Licht, 22°C) angezogen. Die Keimlinge wurden dann entweder auf Erde umgesetzt und weiter in der Gärtnerei angezogen, oder direkt für Bild- bzw. Pflanzenmaterial weiterverwendet.

Sterilisation der Samen

Samen von *A. thaliana* wurden für 20 bis 30 min in 70 % Ethanol mit 0,05 % Triton-X-100 im Über-Kopf-Schüttler gewaschen. Das Detergenz Triton-X-100 bewirkt, dass die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt wird und die Samen vollständig durch die Flüssigkeit benetzt werden. Anschließend wurden die Samen für maximal 15 min mit 100 % Ethanol gewaschen und auf Filterpapier unter sterilen Bedingungen getrocknet.

2.3.3 Mapping der kausalen Mutation

klassisches Mapping

Für das klassische Mapping wurde zu Beginn die genomische DNA aus 100 phänotypischen *fif*-Pflanzen der F_2 der Auskreuzung mit Col-0 isoliert (siehe 2.5.2 Präparation genomischer DNA aus *A. thaliana*). Nachfolgend wurde zuerst in Pools von jeweils zehn Proben die grobe chromosomale Position der Mutation bestimmt, bevor mit den Einzelproben die Lokalisertion verfeinert wurde.

Für das Mapping wurden INDELs (Pacurar et al. 2012) und dCAPs (Konieczny and Ausubel 1993; Neff, Turk, and Kalishman 2002) verwendet. Die Lokalisation der Marker ist im Ergebnisteil Abb. 3.7 und 3.9. dargestellt. Eine Auflistung der Primerpaare befindet sich im Anhang (A1). Die Protokolle für die PCR und die Restriktionen folgt (2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und 2.5.7 Restriktionen).

mapping-by-sequencing

Für das Mapping der Mutation mittels Sequenzierung des ganzen Genoms wurde die DNA eines Pools von 425 phänotypischen *fif*-Pflanzen der F_2 der Auskreuzung mit Col-0 und zu Vergleichszwecken ein DNA-Pool aus 40 No-0 Pflanzen isoliert. Hierfür wurde jeweils das Blattmaterial von bis zu 20 Pflanzen vereint und die genomische DNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) nach Protokoll isoliert. Nachfolgend wurde die DNA-Konzentration aller Proben mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt und der Gesamtpool so zusammengesetzt, dass aus jedem Einzelpool jeweils 100µg DNA enthalten sind.

Die DNA wurde an das „Max Planck-Genome-centre Cologne“ versendet und dort auf einem Sequencer HiDeq2500 (Illumina) mit 35.000.000 read-pairs sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden von Korbinian Schneeberger und Hequan Sun (Abteilung Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) analysiert und ausgewertet (James et al. 2013; Schneeberger 2014).

2.4 Arbeiten mit Nicotiana benthamiana

2.4.1 Verwendeter Ökotyp

Nicotiana benthamiana L. cv. Samsun-NN

2.4.2 Anzucht der Pflanzen

Die Samen wurden auf angefeuchteter Erde (Einheitserde Typ P) ausgesät, und die Tabakpflänzchen nach zwei Wochen in kleine Töpfe (Ø 5cm; mit Einheitserde Typ P und Einheitserde Typ T (Patzer, Sinntal-Jossa, D) vermischt mit Sand im Mischungsverhältnis 1:1:1) vereinzelt. Die Pflanzen wurden von den zentralen Einheiten im Gewächshaus angezogen (14 h Licht, 20-23°C, 60% Luftfeuchtigkeit) und bereitgestellt. Im Alter von 4-5 Wochen hatten sie die richtige Größe für Infiltrations-Experimente.

2.4.3 Infiltration von N. benthamiana mit A. tumefaciens

Medien und Lösungen

Infiltrations-Medium (*N. benthamiana*)
5% Saccharose
0,01% Silwett
10 mM $MgSO_4$
100-200 µM Acetosyringon

wurden mit ddH_2O auf 100 ml aufgefüllt. Das Medium muss vor jeder Infiltration frisch hergestellt werden.

Infiltration von N. benthamiana mit A. tumefaciens

Lokalisationsstudien von Fusionsproteinen wurden im heterologen System von *N. benthamiana in planta* durchgeführt. Die rekombinanten Proteine wurden in Blättern von vier Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen transient exprimiert, indem die Tabakblätter mit einer Agrobakterien-Suspension infiltriert wurden. Die Agrobakterien inserierten das klonierte DNA-Fragment in das Genom der Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Hierfür wurden die Agrobakterien über Nacht in 5 ml Selektionsmedium (LB mit Antibiotika) angezogen. Die Zellen wurden für 15 min bei 4.000 rpm und 4°C sedimentiert. Diese wurden in 3 ml kaltem Infiltrations-Medium (*N. benthamiana*) resuspendiert und auf eine optische Dichte von OD_{600}= 0,7 bis 0,8 eingestellt. Die eingestellten Kulturen wurden mit dem p19-Agrobakterienstamm 1:1 gemischt und

mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Die p19-Agrobakterien tragen das p19-Konstrukt aus dem TBSV (*tomato bushy stunt virus*), welches posttranskriptionelles *Gene silencing* in den infiltrierten Geweben unterdrückt und somit die Proteinexpression der transient transformierten Gene verstärkt (Voinnet et al. 2003). Die Tabakpflanzen müssen 2-4 Stunden vor der Infiltration gut gewässert mit einer Plastikhaube bedeckt werden, damit sich die Stomata öffnen. Die Blätter wurden mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze ohne Nadel von der Blattunterseite durch die Öffnungen der Stomata mit der Zellsuspension infiltriert. Anschließend wurden die Pflanzen unter der Plastikhaube über Nacht inkubiert, welche am nächsten Morgen entfernt werden kann.

CLSM und FRET-FLIM

Zwei Tage nach der Infiltration von *N. benthamiana* konnte die Expression und Lokalisation der Proteine mittels CLSM (*confocal laser scanning microscopy*) untersucht werden. Weiter konnte mittels *Förster resonance energy transfer* (FRET), visualisiert durch *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) die Interaktion bzw. relative Nähe (1 bis 10 nm, (Jares-Erijman and Jovin 2003)) zweier Proteine in co-infiltrierten Blättern untersucht werden (Elgass et al. 2009; Schleifenbaum et al. 2010; Harter, Meixner, and Schleifenbaum 2012). Alle CLSM- und FLIM-Messungen wurden mit einem Leica TCS SP8 konfokalem Mikroskop, welches zusätzlich mit einer FLIM-Einheit (PicoQuant) ausgestattet ist, vorgenommen.

Die Bilder und Messungen wurden mit einem 63x/1,20 Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen.

Für die Anregung und Emission der Fluoreszenzproteine wurden bei eGFP die Einstellungen 488 nm und 495 bis 530 nm und für RFP die Bereiche 561 nm und 580 bis 630 nm verwendet. Die FLIM-Daten stammen von Messungen von neun bis 13 Zellkernen pro Fusionsprotein-Kombination. Für die Anregung von LFY-GFP und LFY^{fif}-GFP bei den FLIM-Experimenten wurde ein 420 nm gepulster Laser (LDH-P-C-470) verwendet und die Emission mit einem SMD Emission SPFLIM PMT von 495 bis 545 nm mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung unter Benutzung eines Picoharp 300 Moduls (PicoQuant) gemessen. Jedes Histogramm einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung wurde unter Verwendung der spezifisch gemessenen der IRF (instrument response function) geglättet und im Falle der Donor-Einzelproben gegen eine monoexponentielle und bei den restlichen Proben gegen eine biexponentielle

Zerfallsfunktion gefittet (modifiziert nach Hecker et al. (2015)). Dargestellt sind die Daten in Abb. 3.16 in Form eines Box Plots, welches mit dem Programm R (version 3.1.2, Copyright © 2014 The R Foundation for Statistical Computing) erstellt wurden und den Median, die 25%-Quartile, minimale und maximale Werte, als auch Ausreiser zeigt. Folgende Programmierung wurde zur Erstellung verwendet:

```
FLIMdaten<-read.csv("Dateiname.csv", header = T, sep = ";",dec = ".")
boxplot(FLIMdaten, outline=T, notch=F, border=T, conf=T, varwidth=T)
```

Die statistische Auswertung wurde mit JMP (Version 12.2.0) durchgeführt. Zum Test auf die Gleichheit der Varianz wurde der Levene-Test verwendet (df=4/51, F=7,1245, p=0,0001) und nachfolgend die statistische Signifikanz mit einem zweiseitigem, alle-Paare Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem alle-Paare Steel-Dwass als *post hoc* Test berechnet (modifiziert nach Ohmi et al. (2016)).

Die mikroskopischen Messungen und Auswertungen wurden mit Unterstützung von Nina Glöckner durchgeführt.

2.5 Arbeiten mit DNA

2.5.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM EDTA (pH 8,0)

Wurde in ddH_2O gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

Tris-Puffer (1-fach)	10 mM Tris/HCl (pH 8)

Wurde in ddH_2O gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.2 Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Medien und Lösungen

Edwards Puffer	200 mM Tris
(Extraktionspuffer)	250 mM NaCl
	25 mM EDTA
	0,5% (w/v) SDS

wurden in ddH_2O gelöst, mit HCl auf pH= 7,5 einstellen und bei RT lagern

Glaskügelchen	Glasperlen Ø 1,25-1,65 mm

Präparation genomischer DNA aus A. thaliana

Als Ausgangsmaterial der DNA-Präparation aus *A. thaliana* dienten Keimlinge oder Blattmaterial adulter Pflanzen. Das Material wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die genomische DNA zur Analyse von transgenen Linien wurde mit Hilfe der Edward-Methode isoliert (Edwards, Johnstone, and Thompson 1991).

Dazu wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäße geerntet und homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µl Edwards-Puffer wurde die Probe durch vortexen gemischt und 10 min bei 65°C inkubiert. Die auf Eis abgekühlte Probe wurde für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1:1 mit Isopropanol gemischt und zum Fällen der DNA mindestens 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur über Kopf getrocknet, in 50 µl H_2O vorsichtig resuspendiert und 10 min bei 65°C inkubiert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte OD_{260} von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Durch die Bildung des Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} konnte der Reinheitsgrad bestimmt werden. Werte, die kleiner als 2,0 sind deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Für die Messungen wurde der NanoDrop ND-1000 verwendet. Die DNA-Konzentration einer Lösung konnte auch durch Vergleich mit einem der Größenstandards auf dem Agarosegel abgeschätzt werden.

2.5.3 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien

Medien und Lösungen

Mini I	10 mM EDTA (pH 8,0)
	25 mM Tris/HCl (pH 8,0)

wurden in ddH_2O gelöst, autoklaviert und anschließend mit 25 µg/ml RNase versetzt.

Mini II	0,2 N NaOH
	1% (w/v) SDS
Mini III (100 ml)	60,0 ml 5 M Kaliumacetat
	11,5 ml Eisessig
	28,5 ml H_2O

Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Präp.)

Zur Überprüfung der Transformation von Bakterien-Kulturen und zur Gewinnung der Plasmide, wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse nach Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) isoliert. Es wurden je 2 mal 2 ml einer Übernachtkultur 30 sek bei 14.000 rpm abzentrifugiert, und das Sediment in 400 µl Mini I resuspendiert. Im Anschluss wurden je 100 µl der Lösungen Mini II, welche eine Perforierung der Bakterienzellwand zur Folge hatte und Mini III, welche den pH-Wert in der Lösung neutralisierte, zugegeben. Durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm wurden die Zellrückstände entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dieser 1:1 mit Isopropanol gemischt und 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet, in 50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8) aufgenommen und für 10 min bei 65°C inkubiert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Siehe „Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*“.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Polymerasen

***Taq*-Polymerase (rekombinant aus *E.coli*)**

Die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* wurde für analytische DNA-Amplifikationsreaktionen verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt keine 3’→ 5’ Exonucleaseaktivität (*proofreading*), was in einer relativ hohen Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide resultiert.

Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB (New England Biolabs©Inc.))

Die Phusion DNA-Polymerase ist eine synthetisch veränderte DNA-Polymerase des Bakteriums *Pyrococcus furiosus* mit zusätzlicher Prozessivitäts-steigernder Domäne. Die erhöhte Prozessivität resultiert in einer deutlich verringerten Fehlerrate im Vergleich zur *Taq*-Polymerase. Die Phusion DNA-Polymerase wurde für alle DNA-Amplifikationsreaktionen verwendet, welche nachfolgend für Klonierungen genutzt werden sollten.

DNA-Größenstandard

Als DNA-Größenstandards zur Größen- und Mengenabschätzung von DNA in Agarosegelen wurden die Marker λ *Pst*I und Genaxxon GenLadder 100bp + 1,5Kb verwendet. Die Größen der entsprechenden Banden sind in Abb. 2.1 A und Abb. 2.1 B angegeben.

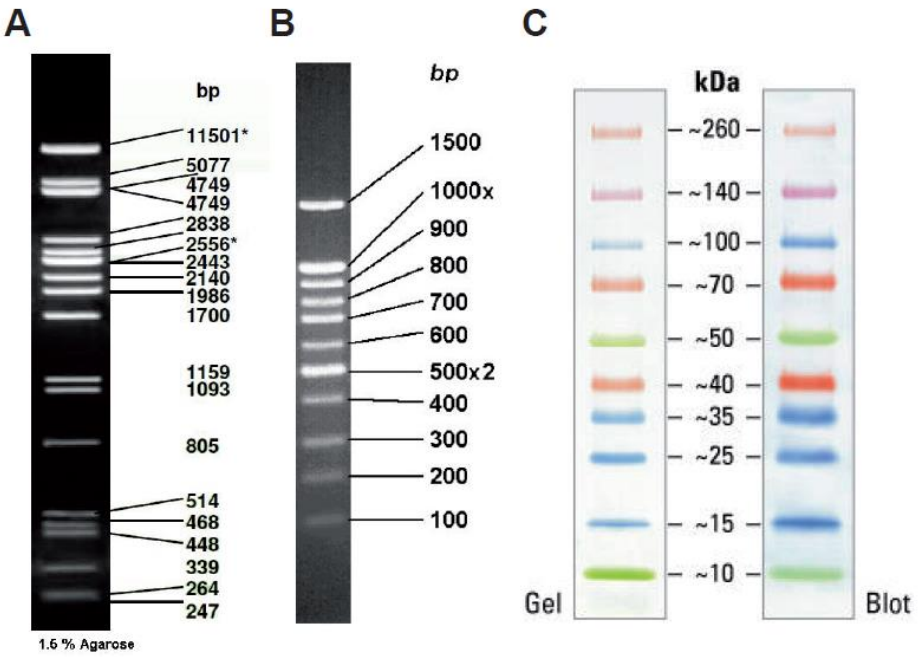

Abb. 2.1: Verwendete Größenstandards. Gezeigt sind die verwendeten Größenstandards für DNA (A, B) und Proteine (C). A) λ *Pst*I (homemade, Bild: www.taq-dna.com), B) Genaxxon GenLadder 100 bp + 1,5 Kb (www.genaxxon.com), C) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (www.thermofisher .com)

Der λ *Pst*I-Marker wurde im Labor durch Restriktion von λ-Phagen-DNA mit *Pst*I unter Verwendung des Herstellerprotokolls selber erzeugt, mit DNA-Ladepuffer versehen und bei -20°C gelagert.

Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang (A1) aufgelistet.

Puffer

10x PCR-Puffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4
500 mM KCl
25 mM $MgCl_2$

wurden in ddH_2O gelöst und in 1 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

50x dNTP-Mix 10 mM dATP (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
10 mM dCTP (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
10 mM dGTP (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
10 mM dTTP (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

wurden in ddH_2O gelöst und in 100 µl Aliquots bei –20°C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* nach dem Vorbild der DNA-Replikation. Hierfür werden ein eine hitzestabile DNA-Polymerase, Oligonukleotide (*Primer*), dNTPs, PCR-Puffer und eine Matrizen-DNA benötigt. Die Zielsequenz zwischen den Oligonucleotiden wird mit Hilfe eines Thermocyclers amplifiziert.

PCR-Reaktionsansätze

1	**Taq**-Polymerase:	
2	10x Puffer	2,5 µl
3	5x dNTP-Mix	1,5 µl
4	Sense-Primer (10 µM)	0,75 µl
5	Antisense-Primer (10 µM)	0,75 µl
6	Matrizen-DNA	1,0 µl
7	Taq-Polymerase	0,25 µl
8	H_2O	18,25 µl
9	**Phusion™**-Polymerase:	
10	5x Phusion-HF Buffer	4,0 µl
11	50x dNTP-Mix	0,4 µl
12	Sense-Primer (10 µM)	1,0 µl
13	Antisense-Primer (10 µM)	1,0 µl
14	Matrizen-DNA (10 pg/µl)	0,5 µl
15	Phusion-DNA-Polymerase	0,15 µl
16	H_2O	12,95 µl
17		
18		

In der Regel wurde ein so genannter Mastermix angesetzt, der alle Bestandteile enthielt, welche die unterschiedlichen Reaktionen gemeinsam hatten. Zu den Ansätzen wurden dann entweder die Primer oder die Matrizen-DNA einzeln zugegeben.

PCR-Programme

PCR-Programm für Reaktionen mit Taq-Polymerase

Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 35 x
Annealing	X°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Endelongation	72°C	10 min	

PCR-Programm für Reaktionen mit Phusion™-Polymerase

Denaturierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	10 sec	} 35 x
Annealing	X°C	20 sec	
Elongation	72°C	30 sec/kb	
Endelongation	72°C	10 min	

Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von den Primern und er verwendeten Polymerase gewählt und angepasst.

2.5.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Puffer

10x TBE 121,1 g Tris/Base
61,8 g H_3BO_3
7,5 g EDTA

wurden in 1 L VE-Wasser gelöst. Der pH-Wert beträgt 8,3 und muss nicht eingestellt werden.

10x TAE 0,4 M tris/Base
0,2 M Essigsäure
10 mM EDTA

wurden in VE-Wasser gelöst und der pH auf 8,3 eingestellt.

1x TBE/TAE

Der 1x Puffer findet als Gel- und Laufpuffer Verwendung und wurde durch eine 1:10 Verdünnung des jeweiligen 10x Puffers hergestellt.

10x DNA-Ladepuffer blau (50ml) 17,5 ml Glycerin
5 ml Bromphenolblau (0,4%)
27,5 ml 3x TE-Puffer

wurden gelöst und in 1 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

10x DNA-Ladepuffer orange 50% (v/v) Glycerin
0,2 M EDTA
0,05% (w/v) Orange G

wurden in MilliQ H_2O gelöst und in 2 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird mit Hilfe von elektrischer Spannung DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Für quantitative Auftrennungen wurde Midori Green Advance (NIPPON Genetics, 1:10 Verdünnung, 10 µl/50 ml) in TAE-Puffer, für quantitative Gele Ethidiumbromid (Endkonzentration von 0,5 µg/ml) in TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde 1% (w/v) Agarose in 1x Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Zur Auftrennung kleiner Banden wurde die Agarosekonzentration in einem 1:3 Mix aus Agarose und Agarose Tiny (Genaxxon) auf bis zu 5% (w/v) erhöht. Nach Abkühlen der Agarose auf ca. 60°C wurde Midori Green oder Ethidiumbromid zugegeben, alles in die Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Das erstarrte Gel wurde mit 1x Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit $^1/_{10}$ Volumen Ladepuffer (blau oder orange bei kleinen Banden) gemischt, in die Geltaschen gefüllt und mit 5-10 V/cm^2 aufgetrennt. Der im Gel enthaltene Farbstoff interkaliert in die DNA und wird durch Bestrahlung mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Durch Vergleich mit dem Größenstandard konnten die Größe der DNA sowie deren Menge abgeschätzt werden. Die Gele wurden fotographisch dokumentiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des Quick Gel Extraction Kits von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

2.5.6 Klonierungen

Gateway®

Gateway-Rekombinasen

pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	**(**Thermo Scientific™)
Gateway® LR Clonase™ Enzymmix	**(**Thermo Scientific™)
Gateway® BP Clonase™ Enzymmix	**(**Thermo Scientific™)

Gateway®-Rekombination

Das Gateway®-System (GW) ermöglicht ein schnelles ortsspezifisches rekombinieren von DNA-Fragmenten in Vektoren z.B. zur funktionellen Analyse oder Proteinexpression. Alle Reaktion (Topo, LR, BP) wurden in ½ Ansätzen nach Herstellerangaben durchgeführt (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf).

Vektoren

Vektorname	Selektionsmarker (Organismus)
pENTR/D-Topo (Thermo Scientific™)	Kanamycin (*E. coli*)
pDONR™207 (Invitrogen, D)	Gentamycin (*E. coli*)
pUGT1-Dest (A. Hahn)	Spectinomycin (*E.coli, A. tumefaciens*)
	Kanamycin (*A. thaliana*)
pB7RWG2-Dest (P. Hilson, R. Tsien)	Spectinomycin (*E.coli, A. tumefaciens*)
	Basta (*A. thaliana*)
pET-Dest42nGFP (L. Brand)	Ampicillin (*E.coli*)

Eine schematische Darstellung der Vektorkarten mit den wichtigsten Domänen ist im Anhang (A2) gezeigt.

2.5.7 Restriktionen

Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Alle analytischen und präparativen Spaltungen von DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen von Thermo Scientific™ nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit Hilfe des Programms ApE wurden die geeigneten Restriktionsenzyme ausgewählt.

2.5.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Produkten

Plasmid-DNA wurde mittels Mini-Präparation isoliert und zur Sequenzierung an GATC Biotech (Konstanz, D) geschickt. PCR-Produkte wurden ebenfalls bei GATC Biotech sequenziert.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Protein-Extraktion unter denaturierenden Bedingungen

Medien und Lösungen

L+L-Puffer (*Lyse and Load*)	50 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	4% (w/v) SDS
	8 M Harnstoff
	30% (v/v) Glycerin
	0,1 M DTT
	0,005% (w/v) Bromphenolblau

wurden in ddH_2O gelöst und in 0,5 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

Glaskügelchen	Glasperlen Ø 0,25-0,5 mm

Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial unter denaturierenden Bedingungen

Für die Proteinextraktion unter denaturierenden Bedingungen wurden in der Regel 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe von Glaskügelchen zu einem feinen Pulver zerkleinert. Dieses gefrorene Pulver wurde mit 150µl - 200 µl L+L-Puffer versetzt, und bei 95°C für 7 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Suspension mehrmals kräftig gemischt. Anschließend wurden die Zellbruchstücke für 5 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, der die denaturierten Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt, oder bei -20°C gelagert werden. Der Proteingehalt wurde über Coomassie-Färbung des SDS-Gels abgeschätzt.

Proteinextraktion aus Bakterien unter denaturierenden Bedingungen

Für die Proteinextraktion aus Bakterien wurden 2 ml einer Übernachtkultur bei 14.000 rpm für 1 min sedimentiert, mit 50 µl Glaskügelchen und 150 µl L+L-Puffer versehen und für 1 min gevortext. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf 95°C wurden die Proben abermals zentrifugiert und der Überstand für die Nachfolgenden Proteinbestimmungen verwendet.

2.6.2 Elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Materialien und Medien

Spannungsgerät	PowerPac™ Basic Power Supply (BIO-RAD)
Gelkammer	BIO-RAD-System
Sammelgel-Puffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8)
	0,2% (w/v) SDS

wurden zur Entfernung von nicht gelösten Bestandteilen filtriert (0,45 µm Filter) und bei Raumtemperatur gelagert.

Trenngel-Puffer	1 M Tris/HCl (pH 8,8)
	0,27 % (w/v) SDS

wurden zur Entfernung von nicht gelösten Bestandteilen filtriert (0,45 µm Filter) und bei Raumtemperatur gelagert.

APS (10 %)	1 g Amoniumpersulfat

Wurde in 10 ml ddH_2O gelöst und in 1 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

Sammelgel (4,5%, 1 Gel)	1 ml Sammelgel-Puffer
	0,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel 30, Roth, D)
	0,7 ml H_2O
	10 µl APS (10%)
	2 µl TEMED
Trenngel (10%, 1 Gel)	2,25 ml Trenngel-Puffer
	2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel 30, Roth, D)
	1,7 ml H_2O
	50 µl APS (10%)
	4 µl TEMED
10x SDS-Laufpuffer	30 g Tris
(Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)	144 g Glycine
	15 g SDS

wurde mit ddH_2O auf 1 L aufgefüllt und vor gebrauch auf 1x SDS-Laufpuffer verdünnt.

Protein-Größenstandard

Als Größenstandard für Proteine wurde der Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (www.thermofisher.com) verwendet. Die Größen der Banden sind in Abb. 2.1 C angegeben.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Der L+L-Puffer der denaturierenden Proteinextraktion dient gleichzeitig als Ladepuffer. Demnach kann dieses Proteinextrakt direkt mittels SDS-PAGE analysiert werden. Es wurde eine Stromstärke von 10 bis 15 mA pro Gel angelegt. Die Gelelektrophorese wurde kurz bevor der Ladepuffer das Gel verlassen hatte gestoppt.

2.6.3 Coomassie-Färbung

Medien und Lösungen

Coomassie-Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol
	10% (v/v) Eisessig
	0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

wurde mit ddH_2O auf 200 ml aufgefüllt und dunkel und kühl gelagert.

Entfärbelösung	10 % (v/v) Eisessig

Coomassie-Färbung: Proteinfärbung in SDS-Gelen

Um die Qualität und Quantität der Proteine auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu bestimmen, wurde dieses in Coomassie-Färbelösung für mindestens 20 min leicht geschüttelt. Hierbei wurden die Proteine durch Essigsäure im Gel fixiert und der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 bindet dabei an die basischen und aromatischen Aminosäurenseitenketten der Peptide. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung inkubiert, bis die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar waren. Hierfür kann ein mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung notwendig sein. Die Gele wurden gescannt und zusätzlich zur Lagerung zwischen *Gel Drying* Film (Promega, D) in einem Spannrahmen getrocknet.

2.6.4 Proteintransfer (Western-Blot)

Materialien und Medien

Spannungsgerät	PowerPac™ Basic Power Supply (BIO-RAD)
Blotkammer	Mini Trans-Blot® Cell (BIO-RAD)
PVDF-Membran	Immobilon® PVDF Membrane (Merck Millipore)
Whatman Papier	Whatman (Schleicher & Schell, GB005 Gel-Blotting Paper)
Transfer-Puffer (1 L)	14,3 g Glycin 6 g Tris/HCl 200 ml Methanol

wurde mit ddH_2O auf 1 L aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Western-Blot

Mittels *Wet Blot* wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zu Beginn kurz in 100% Methanol aktiviert und im Transferpuffer äquilibriert. Der *Wet Blot* wurde, wie von Towbin, Staehelin, and Gordon (1979) beschrieben, durchgeführt. In der Regel wurde der Transfer bei einer Stromstärke von 3 mA/cm^2 Membran und einer Spannung von 25 Volt für 90 min durchgeführt.

2.6.5 Immundetektion

Medien und Lösungen

TBS-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl
TBS-T-Puffer	TBS + 0,1 % Tween 20
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver

wird in TBS-T-Puffer gelöst. Der Puffer muss frisch hergestellt werden.

Antiseren	wurden nach Herstellerangaben TBS-T-Puffer angesetzt
Entwicklungspuffer A	100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$

NBT-Lösung (5% (w/v)) 50 mg/ml Nitrobluetetrazolium (NBT)

wurde in 70 % DMSO gelösten und 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

BCIP-Lösung (5% (w/v)) 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-phosphat-p-Tuloidin-Natriumsalz (BCIP)

wurde in DMSO gelösten und 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

AP-Färbelösung

33 µl BCIP

66 µl NBT

10 ml Entwicklungspuffer A

Die Färbelösung wurde immer frisch hergestellt werden.

Antikörper

Antikörper	Serum	gewonnen aus	Verdünnung	Hersteller
α-GFP	monoklonal	Maus	1:1000	Roche, Mannheim, D
α-mouse	polyklonal	Ziege	1:5000	BioRad, München, D

Immundetektion

Der Proteintransfer mittels Western-Blot bewirkt die Immobilisierung der Proteine auf der PVDF-Membran. Das ist eine Voraussetzung für die immunologische Analyse der Proteine, da diese nun nicht mehr in die umgebende Lösung diffundieren können. Die Immundetektion ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine aus dem Proteinextrakt mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die PVDF-Membran wurde nach dem Western-Blot in Blocking-Puffer für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proteine der im Blocking-Puffer enthaltenen Milch binden an die PVDF-Membran, so dass die ganze Membran mit Proteinen geblockt ist. Diese geblockte Membran wurde daraufhin nach dreimaligen Wachen in TBS-T-Puffer mit den primären Antikörpern, welche spezifisch an das zu detektierende Protein binden, für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch drei 10-minütige Waschschritte mit TBS-T-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert, welche die primeren Antikörper binden, und zusätzlich an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Es folgten wiederum drei 10-minütige Waschschritte mit TBS-T-Puffer, wodurch überschüssige Antikörper entfernt und Hintergrundfärbung vermieden werden kann. Die Membran wurde nun kurz in Entwicklungspuffer A äquilibriert, welcher

anschließend gegen die AP-Färbelösung ausgetauscht wurde. Diese enthält die Substrate NBT und BCIP, die von der an die sekundären Antiköper gekoppelten Alkalischen Phosphatase in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden kann. Sobald klare Banden zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch Spülen mit ddH_2O abgestoppt. Zur Dokumentation wurde die Membran getrocknet und anschließend durch Scannen digitalisiert.

2.6.6 DNA-Protein Interaktion (DPI)-ELISA

Materialien und Medien

Sonifikator	Sonoplus HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG)
Sonotrode	Sonoplus MS 72 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG)
Messgerät	TECAN Safire Reader
Mikrotiterplatte	384 Well Mikrotiterplatte (F-bottom, streptavidin-coated, black, Greiner 781997)
IPTG-Stock	0,5 M IPTG
Tris/NaCl	10 mM Tris/HCl (pH 7,5 bis 8) 100 mM NaCl
DPI-Ex-Puffer	4 mM HEPES (pH 7,5 mit KOH) 100 mM KCl 8% Glycerol (v/v) 0,2% BSA Biotin frei (Roth #0163.2) 5 mM DTT 1 µl/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 2mM in DMSO)
10x Annealing Puffer	400 mM Tris/HCl (pH 7,5 bis 8) 200 mM $MgCl_2$ 500 mM NaCl

Ds-Oligos (100 µl, 2 µM)	20 µl sense Oligo (10 µM)
	20 µl antisense Oligo biotinyliert (10 µM)
	10 µl 10x Annealing Puffer
	50 µl ddH_2O

wurden für 3 min bei 95°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Temperatur schrittweise (1°C/min) auf 28°C reduziert. So behandelte DS-Oligos können bei -20°C gelagert werden.

10x TBS-T_{ELISA}	200mM Tris-Base
	1,8 M NaCl

wurden in dd H20 gelöst und nachfolgend der pH auf 7,5 eingestellt. Zur Benutzung wurde der 10x Puffer 1:10 verdünnt und mit 0,1% (v/v) Tween-20 versetzt.

Blocking-Puffer	1% BSA Biotin frei in 1x TBS-T_{ELISA}
DPI-Dilution Puffer	4 mM HEPES (pH 7,5 mit KOH)
	100 mM KCl
	8% Glycerol (v/v)
	0,2% BSA Biotin frei
	1 mM DTT

GFP basierter DPI-ELISA

Protein Extraktion aus BL21-Zellen

Die mit dem entsprechenden Konstrukt transformierten Zellen wurden zunächst in einer 5 ml LB Vorkultur (incl. entsprechender Antibiotika) über Nacht bei 37°C angezogen und am folgenden Morgen in 200 ml frisches Medium überführt. Die Hauptkultur wurde dann für 2 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert und nachfolgend mit 1 mM IPTG (400µl 0,5 M/200 ml) induziert. Nach einem sechsstündigen Wachstum bei 37°C wurden die Zellen bei 2200g und 4°C für 20 min sedimentiert und in 50 ml kaltem Tris/NaCl resuspendiert. Nach wiederholtem Sedimentieren wurden die Zellen in 4 ml DPI-Ex-Puffer resuspendiert und durch Sonifikation (6x 15 sec. mit 70% Power und je 15 sec. Pause auf Eis) aufgebrochen. Darauf folgend wurden die Zelltrümmer erneut sedimentiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt.

Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration wurde der Umstand genutzt, dass das zu testende Protein mit GFP getaggt war. 15 µl jeder Probe in den Verdünnungen 1, 1:10

und 1:100 wurden auf eine 384 Well Mikrotiterplatte geladen und das GFP-Signal gemessen. Nachfolgend wurden alle Extrakte auf die Konzentration das jeweils am geringsten Konzentrierten angepasst und zur Kontrolle erneut gemessen. Gegebenenfalls wurde dieser Schritt so oft wiederholt, bis alle Extrakte ein einheitliches GFP-Signal zeigten.

DPI-ELISA

Allgemein wurden für alle Proben/Extrakte jeweils drei technische Replikate in drei Verdünnungen (unter Verwendung des DPI-Dilution Puffers) gemessen. Als Negativkontrolle wurde sowohl Extrakt aus Zellen, welche mit Leervektor transformiert waren, verwendet, als auch Proben ohne das zusetzten von Ds-Oligos. Als Positivkontrolle diente WRKY33^{cDBD} und dessen Bindung an *W2* (Brand et al. 2010). Generell wurde auch bei allen Waschschritten darauf geachtet, so viel Flüssigkeit wie möglich aus der Platte zu entfernen. Hierfür wurde die Platte so oft über Kopf auf frische Papiertücher geklopft, bis kein nasser Abdruck mehr hinterlassen wurde.

Für das immobilisieren der Ds-Oligos auf der Platte wurden pro Well je 2,5 µl Ds-Oligos mit 27,5 µl TBS-T$_{ELISA}$ versetzt, in die Wells gefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden alle Wells der Platte dreimal mit TBS-T$_{ELISA}$ (50 µl/Well) gewaschen, zum Blocken aller noch freien Flächen für 30 min bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer inkubiert und wieder dreimal gewaschen. Anschließend wurden die verschiedenen Proteinextrakte und –verdünnungen (30 µl/Well) auf die Wells mit den immobilisierten DS-Oligos gegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde viermal gewaschen (2x mit TBS-T$_{ELISA}$, 2x mit TBS$_{ELISA}$ um Luftbläschen im Well zu verhindern). Nach Zugabe von 15 µl TBS$_{ELISA}$ wurde das verbliebende GFP-Signal, gegeben durch gebundenes Protein, am TECAN Safire Reader mit folgenden Bedingungen gemessen:

Extinktion	488 nm, 2,5 nm Bandbreite
Emission	510 nm, 1,5 nm Bandbreite
Integration	500 µs
Z-Stack Messung	definiert die optimale Höhe der Messung im Well
Gain	optimiert durch das Gerät, oder 150 bzw. 200

Auswertung der Daten

Für die Auswertung der Daten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der drei technischen Replikate jeder Probe bestimmt und mittels t-Test mit der jeweiligen Negativ- und Positivkontrolle verglichen.

Optimierungsmöglichkeiten

Sollte das Signal bei den Verdünnungen nicht reduziert sein, wurden andere Verdünnungsverhältnisse getestet, um in den Messbaren Bereich des Gerätes zu gelangen. Bei unspezifisch hohen Signalen in allen Proben (auch Negativkontrolle), wurden die Waschschritte öfter wiederholt, um ein unspezifisches Binden der Proteine zu verringern. Sollten gar keine Signale gemessen worden sein, musste die Extraktion der Proteine wiederholt werden, da diese sehr Wahrscheinlich degradiert waren.

2.7 Geräte

Binokular	MZ FL III Fluorescence Stereomicroscope (Leica)
clean benche	Microflow Biological Safety cabinet (ASTEC)
Digitalkamera	Pentax Optio A40
Geldokumentation	Gel Logic 100 Imaging System (Kodak)
Inkubator	Schrank: HettCube 600 R (Hettich Lab Technology)
	Schüttler: New Brunswick™ Innova® 44R (Eppendorf)
Konfokales Mikroskop	Typ DM RE (TCS SP8) (Leica Microsystems GmbH)
MilliQ	Q-POD® (Merck Millipore)
NanoDrop	ND-1000 (NanoDrop products, Wilmington, USA)
PCR-Thermocycler	96 Universal Gradient, peqStar (Paqlab)
Photometer	GeneRay UV-Photometer (Biometra)
	BioPhotometer (Eppendorf)
Pipetten	Eppendorf Research (Eppendorf)
Scanner	Epson Expression 1600 (Epson)
Schütteltisch	Labor Shaker (Adolf Kühner AG, Basel, CH)
Spannungsgerät	PowerPac™ Basic Power Supply (BIO-RAD)
Sterilbanken	Cleanbench (Steril-Antares)
	BSB4A (Gelaire Flow Laboratories)
Über-Kopf-Schüttler	Multi Bio RS-24 (Biosan)
Vortex	Genie2™ (Bender & Hobein AG)
Zentrifugen	Tischzentrifugen: 5417R und 5417C (Eppendorf)
	5810R (Rotor: A-4-81) (Eppendorf)
	Induction Drive Zentrifuge Model J2-21M (Rotor: JA-14) (Beckman)

2.8 Computerprogramme und Onlineressourcen

2.8.1 Verwendete Computerprogramme

Adobe Acrobat 7.0 Professional (Adobe Systems Incorporated)

Adobe Illustrator CS2 (Adobe Systems Incorporated)

Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Incorporated)

ApE: A plasmid Editor v2.o.50 by M. Wayne Davis

EndNote X7 (Bilaney Consultants GmbH)

JMP®, Version 12.2.0 (64 bit), SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007

Microsoft Office Professional Edition 2003 (Microsoft Corporation)

Leica Confocal Software für Windows NT (Workstation 4.0) (Leica)

R Version 3.1.2 (2014-10-31), Copyright © 2014 The R Foundation for Statistical Computing

2.8.2 Verwendete Onlineressourcen

BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
ExPASy Translate Tool	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Arabidopsis eFP Browser	http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine *A. thaliana* Mutante phänotypisch zu beschrieben und molekularbiologisch zu analysieren. Hierbei wurden die Analysen zu Beginn auf eine Pflanze der Linie 15-3794-1 aufgebaut, welche den von RAPID (RIKEN Arabidopsis Phenome Information Database, (Kuromori et al. 2006)) in groben Zügen beschriebenen Phänotyp stabil und eindeutig zeigte. Im Folgenden wird diese Linie *Flower-in-Flower*, kurz *fif*, genannt.

3.1 Phänotypische Beschreibung der *Flower-in-Flo*wer Mutante

Die *A. thaliana* (Ökotyp No-0) Mutante *Flower-in-Flower* (*fif*) zeigt ihren stärksten, und vor allem namesgebenden, Phänotypen in der Blüte. Die Blüten von *A. thaliana* haben im Gegensatz zu vielen anderen Pflanzenspezies im Normalfall keine Hochblätter und bestehen aus vier konzentrischen Ringen von vier Kelchblättern im äußersten, vier Kronblättern im zweiten, sechs Staubblättern im dritten und zwei fusionierten Fruchtblättern im innersten Ring ((Müller 1961) und Abb. 3.1 C, D).

Im Gegensatz dazu sind die Blüten von *fif* abnormal entwickelt und bilden sekundäre Infloreszenzen aus. Die primären Blüten (Abb. 3.1 A1, B1) sind von Hochblättern umgeben. Kelch- und Kronblätter sind nur unvollständig entwickelt oder fehlen ganz. Dabei sind vor allem die Kronblätter betroffen, welche meist fehlen oder eine kelchblattähnliche Ausprägung zeigen. Die Staubblätter fehlen oder sind nur unzureichend entwickelt. Zusätzlich entwickeln sich unterschiedlich viele sekundäre Blüten. Fruchtblätter gibt es meist deutlich mehr als zwei, welche nicht oder nur teilweise miteinander verwachsen sind und so keinen funktionalen Fruchtknoten ausbilden. Die sekundären Blüten (Abb. 3.1 A2 bis 4, B2 bis 4), deren Zahl von null bis fünf pro Blüte variieren kann, sind kleiner als die primären Blüten und gleichen sich in ihrer Entwicklung mehr an den Wildtyp an. Sie sind nicht mehr von Hochblättern umgeben und auch ihre Kelch- und Kronblätter, wenn auch nicht immer in voller Anzahl vorhanden, sind denen des Wildtypens ähnlicher. Die Staubblätter sind meist in geringer Anzahl vorhanden und teilweise voll entwickelt. Die starke Variation der Staubblattentwicklung von Blüte zu Blüte ist auch in Abbildung 3.1 B gut zu sehen. Hier hat zum Beispiel die sekundäre Blüte B4 gar keine Staubblätter, während die Blüte

B2 wenige, vollentwickelte Staubblätter aufweist. Auch die Fruchtblätter, in geringerer Anzahl als in der primären Blüte, sind weitestgehend verwachsen und bilden so einen funktionalen Fruchtknoten aus. Die Unterschiede in der Blütenanatomie sind gut in einer schematischen Zusammenfassung des Blütenaufbaus (Abb. 3.1 D, E) zu erkennen. Durch die verschiedenen Ausprägungen der Blütenstruktur und Organe (Abb. 3.1 A, B, E) sind die primären Blüten zumeist steril, wohingegen die sekundären Blüten,

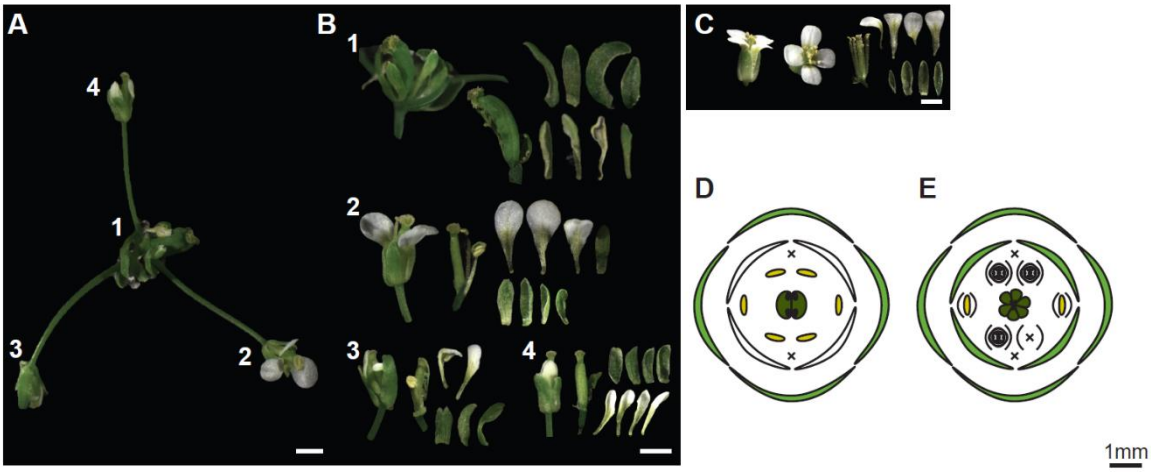

Abb. 3.1: Blüten der *Flower-in-Flower* Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind die Blüten von *fif* im Überblick (A) und detaillierten Bildern (B), wie auch die Blüte des Wildtyps (No-0, C). Jede wildtypische Blüte ist aus vier Kelchblättern, vier Kronblättern, sechs Staubblättern und zwei verwachsenen Fruchtblättern aufgebaut. Im Unterschied dazu sind die *fif* Blüten von Hochblättern umgeben. Des Weiteren fehlen die weißen Kronblätter meist oder sind kelchblattähnlich ausgebildet. Auch die Staubblätter sind nicht vollständig entwickelt oder fehlen ganz. Die Fruchtblätter, meist deutlich mehr als zwei, sind nur unzureichend verwachsen. Die sekundären Blüten bilden, wenn auch in geringerer Anzahl, weiße Kronblätter und zum Teil voll entwickelte Staubblätter aus. Die Fruchtblätter treten, im Vergleich zu der primären Blüte, in einer geringeren Anzahl auf und sind weitestgehend verwachsen. Schematische Diagramme fassen den Blütenaufbau von No-0 (D) und *fif* (E) zusammen. Größenstandard: 1mm; grün: Kelchblatt; weiß: Kronblatt; gelb: Staubblatt; dunkelgrün: Fruchtblatt; x: fehlendes Organ; (): nicht in allen Fällen zutreffend

in Abhängigkeit von den verschiedenen Kombinationen aus entwickelten Staubblättern und verwachsenen Fruchtblättern, eine geringe Fertilität aufweisen.

Neben den Blüten sind auch der Habitus und die Entwicklung der gesamten Pflanze verändert. *fif* blüht im Vergleich zum Wildtyp später (Weigel et al. 1992). In Abb. 3.2 sind Pflanzen im Alter von 6,5 Wochen gezeigt, welche parallel angezogen wurden. Die verzögerte Blütenentwicklung von *fif* im Vergleich zum Wildtyp (No-0) ist hier deutlich daran zu erkennen, dass bei No-0 (Abb. 3.2 A) schon fast alle Blüten zu Schoten weiterentwickelt sind, wohingegen bei *fif* (Abb. 3.2 B) noch gar keine Schoten

zu erkennen sind. Von Aussaat bis zum Ernten der Pflanzen braucht *fif* in etwas eineinhalb bis zweimal so viel Zeit wie No-0 (persönliche Beobachtung und Kommunikation mit Gert Huber und Johanna Schröter). Des Weiteren zeigt *fif* ein höheres und buschigeres Wachstum (Abb. 3.2 A, B). Dieses buschige Aussehen kommt nicht von den aus der Rosette hervorgehenden Nebentrieben, da sich deren Anzahl bei *fif* und No-0 nicht unterscheidet (Abb. 3.2 C). Im Gegensatz dazu wird das buschige Auftreten der *fif*-Mutante durch 4,5-mal mehr Seitenzweige (Abb. 3.2 C) erzeugt, welche von der Hauptachse oberhalb der Stängelblätter abgehen.

Insgesamt ist die *fif*-Mutante bei paralleler Anzucht mit No-0 in der Gärtnerei ab dem Zeitpunkt der ersten Blüte eindeutig mit bloßem Auge zu erkennen. Nicht nur ist *fif* größer und buschiger (Abb. 3.2), während der Blühphase erscheint *fif* durch das Fehlen der weißen Kronblätter auch fast ausschließlich grün.

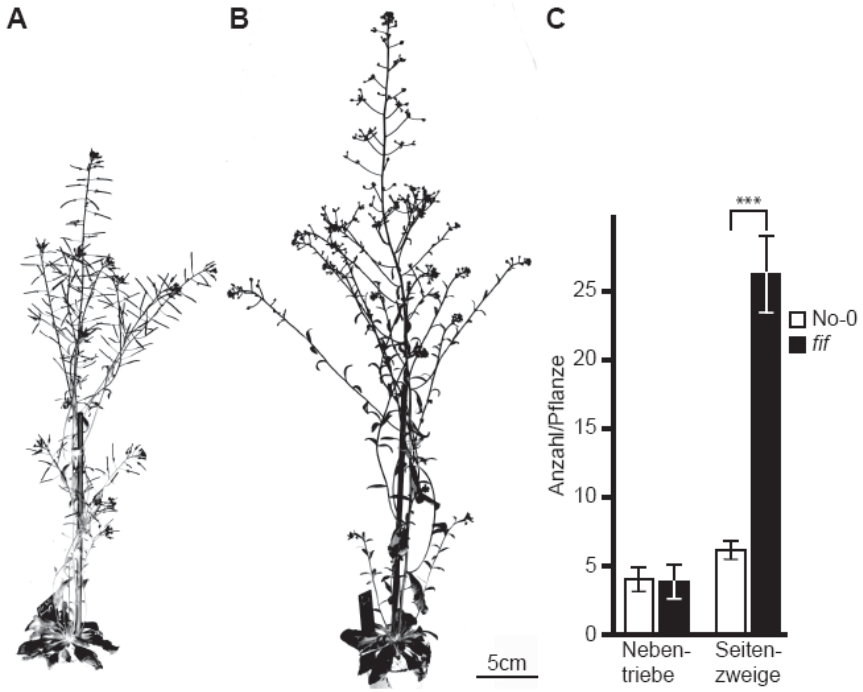

Abb. 3.2: Vergleich des Habitus und der Verzweigung von *fif* und No-0. Gezeigt sind 6,5 Wochen alte Pflanzen von No-0 (A) und *fif* (B). *fif* ist größer und hat eine verzögerte Entwicklung. Auch die Verzweigung ist bei *fif* verändert. Im Durchschnitt hat *fif* 4,5-mal mehr Seitenzweige (ausgehend von Stängelblättern) als No-0 (C, Seitenzweige). Im Gegensatz dazu ist die Zahl der Nebentriebe bei beiden Pflanzen gleich (C, Nebentriebe). Größenstandard: 5cm; ***: $p=2.10^{-23}$; $n_{No-0}=33$; $n_{fif}=25$; weiß: No-0; schwarz: *fif*

3.2 Überprüfung der Kausalität zwischen Transposon-Insertion und Phänotyp

fif ist eine *A. thaliana* Ds-Transposon Mutante, welche vom RIKEN-Institute (Ito et al. 2002; Kuromori et al. 2004) erzeugt und zur Verfügung gestellt wurde. Im Zuge der Untersuchungen der Linie durch das RIKEN BioResource Center im Vorfeld der Veröffentlichung, konnte das Ds-Transposon im zweiten Exon des Gens *At1g20990* lokalisiert werden. Zur Validierung des Phänotyps wurde eine weitere unabhängige transgene Linie verwendet, welche eine T-DNA Insertion im Promotorbereich dieses Genes enthält. Diese Linie, Salk_073291 (Alonso et al. 2003), bildet normale Blüten aus und zeigt auch im gesamten Wachstum in der Gärtnerei keinen phänotypischen Unterschied zum korrespondierenden Wildtyp (Col-0, Anhang A 3). Deswegen wurde nachfolgend die Kausalität zwischen der Transposon-Insertion und dem Phänotype überprüft.

Um zu überprüfen ob die Insertion des Transposons am beschriebenen genomischen Locus wirklich für den zu beobachtenden Phänotypen verantwortlich ist, wurde die *fif*-Mutante mit ihrem korrespondierenden Wildtyp (No-0) gekreuzt und in der F_2-Generation auf die Verteilung von Transposoninsertion und Phänotyp hin analysiert.

Für diese Analyse sind fünf unabhängige Kreuzungen von *fif* x No-0 und No-0 x *fif* hergestellt worden (Abb. 3.3). Bei allen Kreuzungen wurde darauf geachtet, dass sowohl primäre als auch sekundäre Blüten von *fif* verwendet wurden. Da in den folgenden Analysen weder die Richtung der Kreuzung, noch die verwendeten Blütenarten von *fif* eine Rolle spielten, wurden die Ergebnisse für die gezeigten Daten, unabhängig ihres Ursprungs, zusammengefasst.

Abb. 3.3: Rückkreuzung der Mutante. Eine Rückkreuzung von *fif* mit dem korrespondierenden Wildtyp No-0 (A) resultiert in F_1-Pflanzen mit wildtypisch aussehenden Blüten (B). Mittels PCR wurde die Kreuzung überprüft (C). Gezeigt ist ein Beispiel für die PCR-Analyse unter Nutzung eines Primer-Paares mit Transposonspezifität (C, oben, ~700bp) als auch eins Primer-Paares für den spezifischen, das Transposon umgebenden, genomischen Lokus (C, unten, 1013bp). Marker: λ *Pst*I (gezeigt die Banden (von oben nach unten) 1) 1159/1093, 2) 805, 3) 514/468/448)

In der ersten Generation wurden je fünf bis zehn F_1-Pflanzen jeder der fünf unabhängigen Kreuzungen phänotypisch charakterisiert und genotypisch analysiert. Dabei zeigten alle F_1-Pflanzen einen ausschließlich wildtypischen Phänotyp (Abb. 3.3 B). Eine erfolgreiche Kreuzung wurde mit Hilfe einer PCR-Analyse überprüft. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass mittels eines im Gen liegendem, das Transposon flankierenden Primer-Paars und einem transposonspezifischen Primer-Paar die genomische DNA von Pflanzen auf die Existenz und Zygotie des Transposons hin getestet werden kann. Unter Nutzung dieser zwei Primer-Paare konnte bei *fif* ausschließlich das Transposon (Abb. 3.3 C, oben) und im Wildtyp nur das genomische Fragment (Abb. 3.3 C, unten) nachgewiesen werden. Alle F_1-Pflanzen der Kreuzungen zeigten ein heterozygotes Ergebnis (Abb. 3.3 C), da sowohl das Transposon- als auch das Genspezifische Produkt vorliegt. Die Pflanzen der F_1-Generation sind demnach Nachkommen einer erfolgreichen Kreuzung. Der uniform wildtypische Phänotyp dieser Pflanzen zeigt, dass die dem *fif*-Phänotypen zugrundeliegende Mutation rezessiv ist.

Zur weiteren Analyse wurden die Pflanzen der F_1-Generation durch Selbstbefruchtung vermehrt und je 20 bis 30 Nachkommen von sechs verschiedenen F_1-Pflanzen sowohl phänotypisch als auch genotypisch analysiert. Circa ein Viertel (21,6%) der F_2-Pflanzen bildeten den *fif*-Phänotypen aus (Abb. 3.4 A).

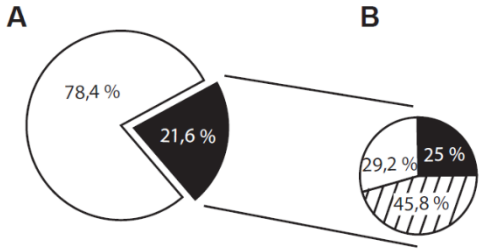

Abb. 3.4: Segregation von Phäno- und Genotyp in der zweiten Generation der Rückkreuzung. Die F_2-Generation der Rückkreuzung von *fif* weist etwa ein Viertel mutante Pflanzen (A) auf. Die Segregation des Genotyps dieser phänotypisch mutanten Pflanzen (B) zeigt ca. ¼ der Pflanzen mit jeweils keiner oder einer homozygoten Insertion und ca. ½ der Pflanzen mit heterozygoter Insertion. scharz: *fif* Phänotyp (A) bzw. homozygote Insertion (B); gestreift: heterozygote Insertion; weiß: Wildtyp Phänotyp (A) bzw. keine Insertion (B)

Im Widerspruch zu der Erwartung, dass all diese Pflanzen das Transposon homozygot tragen sollten, ist die genotypische Verteilung dieser Pflanzen aber die einer typischen Ein-Gen-Vererbung mit jeweils circa einem Viertel ohne beziehungsweise einer homozygoten Transposoninsertion und der Hälfte mit einer heterozygoten Insertion (Abb. 3.4 B). Dies zeigt, dass der *fif*-Phänotyp unabhängig von der Transposon-

Insertion segregiert und diese nicht für den Phänotyp verantwortlich ist. Desweitern zeigt die drei-zu-eins-Verteilung von wildtypischen zu phänotypischen *fif*-Pflanzen (Abb. 3.4 A), dass nur ein Gen für den Phänotyp verantwortlich ist.

3.3 Mapping der kausalen *fif*-Mutation

Durch die Rückkreuzung von *fif* auf den korrespondierenden Wildtyp No-0 konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Insertion des Transposons in das Gen *At1g20990* nicht für den Phänotyp verantwortlich ist. Des Weiteren zeigte die Rückkreuzung, dass eine einzelne, rezessive Mutation für den Phänotyp verantwortlich sein muss. Diese Mutation soll im weiteren Verlauf meiner Arbeit identifiziert werden.

Ein experimenteller Ansatz zur groben Identifikation des verantwortlichen Locus ist das „klassische Mapping“. Dabei wird bei einer rezessiven Mutation die zu charakterisierende Mutante mit einem differierenden Referenzökotyp gekreuzt. Anschließend werden daraus resultierende Pflanzen der F_2-Generation mit dem charakteristischen Phänotyp selektiert und weiter genetisch analysiert. Um die Mutation nachfolgend exakt lokalisieren und bestimmen zu können, werden die Pflanzen der sogenannten „Mappingpopulation“ einer Genomsequenzierung unterworfen. Die Kombination von „klassischem Mapping“ und Genomsequenzierung führt zu einer sicheren Identifikation des mutierten Locus. Das hier Beschriebene Vorgehen und die Erstellung der benötigten Mappingpopulation sind in Abb. 3.5 in einer Übersicht dargestellt.

Da die Mutation für *fif* im No-0-Hintergrund vorliegt, wurde die Mutante zur Erzeugung der „Mappingpopulation“ mit Col-0 ausgekreuzt (Abb. 3.5). Dabei zeigten alle 14 F_1-Pflanzen aus drei unabhängigen Kreuzungen in beide Richtungen (*fif* x Col-0 und Col-0 x *fif*), in Einklang mit der Rückkreuzung, einen wildtypischen Phänotyp. In der zweiten Generation wurden insgesamt 1582 Einzelpflanzen von acht der 14 ausgekreuzten F_1-Pflanzen phänotypisch charakterisiert.

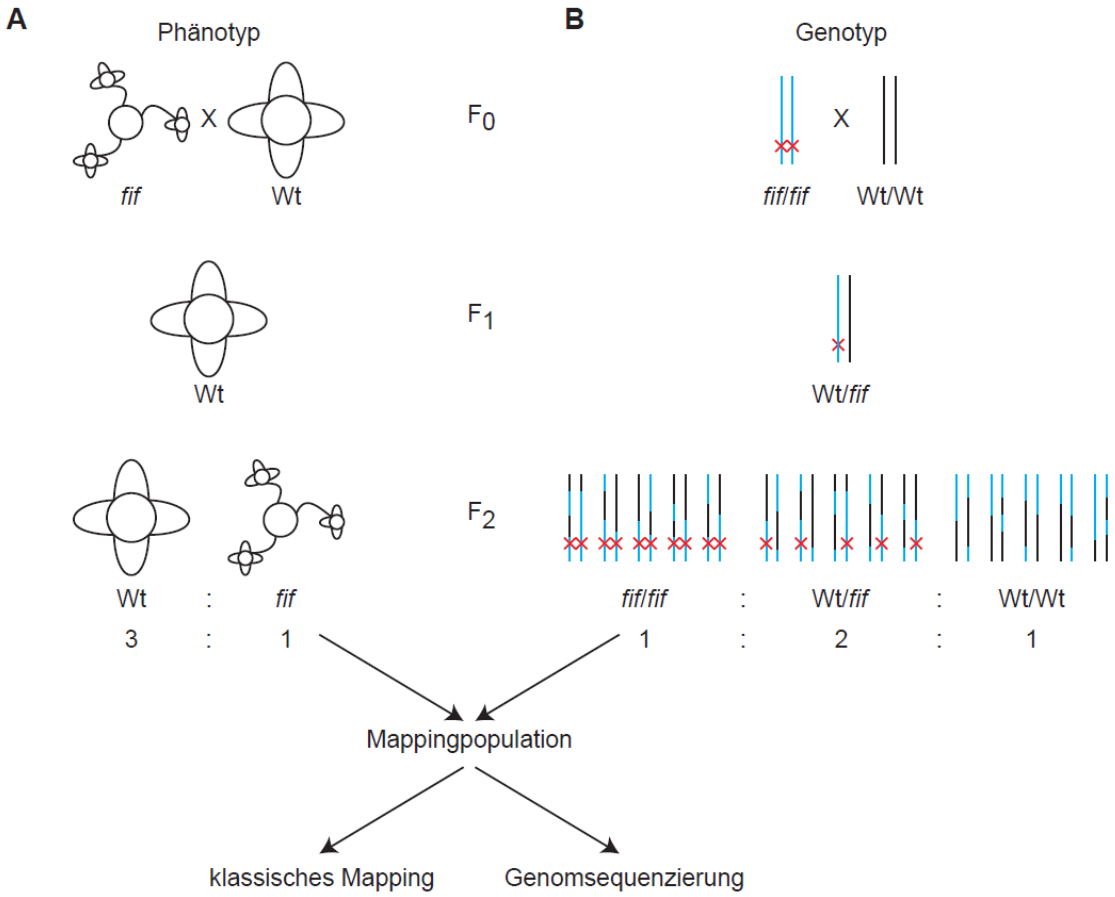

Abb. 3.5: Erstellung der Mappingpopulation. Gezeigt ist das Kreuzungsschema zur Erstellung der Mappingpopulation für jeweils den Phänotypen (A) und den Genotypen (B) einer rezessiven Ein-Gen-Vererbung. Durch Kreuzung der Mutante (*fif*, Ökotyp No-0) mit einem differierenden Referenzökotypen (Col-0) werden F_1-Pflanzen erzeugt, welche alle heterozygot für die Mutation sind und phänotypisch eine wildtypische Ausprägung zeigen. Durch Selbstbefruchtung dieser Pflanzen erhält man die F_2-Generation, die in einem Verhältnis von 3:1 wildtypische und phänotypisch mutante Pflanzen aufweist. Die phänotypischen *fif*-Pflanzen sind alle homozygot für die Mutation und bilden die Mappingpopulation. Diese wird sowohl für das klassische Mapping, als auch die Genomsequenzierung zur Identifikation der kausalen Mutation verwendet. blau: No-0 Genotyp; schwarz: Col-0 Genotyp; rotes Kreuz: Mutation

Der *fif*-Phänotyp ist dabei auch nach Kreuzung mit Col-0 zu erkennen (Abb. 3.6 A). Die Kontrollkreuzung der beiden phänotypisch sehr ähnlichen Wildtypen No-0 und Col-0 zeigte keine Auswirkung auf den Phänotyp der Nachkommen. Wildtypische Blüten (Abb. 3.6 B) sind phänotypisch nicht von No-0 oder Col-0 zu unterscheiden.

In Übereinstimmung mit der Rückkreuzung zeigten circa ein Viertel der Pflanzen, 437 aus 1582 (27,6%, Abb. 3.6 C), einen *fif*-Phänotyp. 425 der insgesamt 437 phänotypisch auffälligen F_2-Pflanzen wurden als Mappingpopulation verwendet und weiter genotypisch analysiert. Hierfür wurden die Blattproben aller 425 Pflanzen in Gruppen von 15 bis 20 Pflanzen gesammelt und die ersten 200 Pflanzen zusätzlich

einzeln beprobt. Nachfolgend wurde der Ort der Mutation durch klassisches Mapping eingeschränkt, die kausale Mutation mittels Genomsequenzierung identifiziert und der so gefundene Basenaustausch klassisch verifiziert. Als Kontrolle für die Sequenzierung wurden zeitgleich mit den 1582 *fif*-Pflanzen 40 No-0-Pflanzen angezogen und deren genomische DNA als Pool isoliert.

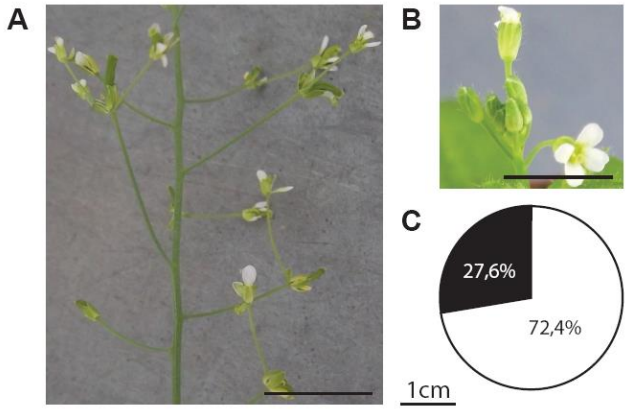

Abb. 3.6: Auskreuzung von *fif*. Die Pflanzen der F_2-Generation der Auskreuzung von *fif* mit dem Ökotyp Col-0 zeigt eine Aufspaltung in Pflanzen mit *fif*-Blüte (A) und solche mit wildtypischer Blüte (B). Dabei zeigen 27,6 % aller Pflanzen einen mutanten Phänotyp (C). Größenstandard: 1cm, schwarz: *fif*-Phänotyp, weiß: wildtypischer Phänotyp

Für die ersten Schritte des klassischen Mappings wurden INDEL-Marker (INsertion und DELetion) verwendet. Durch Produktlängenunterschiede lässt sich PCR-basiert eine genomische DNA-Probe (gDNA) dem jeweiligen Wildtyp, No-0 bzw. Col-0, zuordnen (Pacurar et al. 2012). Hierfür wurden zu Beginn vier Polls bestehend aus gDNA von jeweils 10 Pflanzen analysiert.

Um eine Zuordnung der Mutation auf ein bestimmtes Chromosom zu erlangen, wurden je zwei INDEL-Marker für die Chromosomen 1, 3 und 5 und je ein INDEL-Marker für die Chromosomen 2 und 4 gewählt (Abb. 3.7). Dabei zeigen die für Chromosom 2 und 3 gewählten Marker ein durchgängig heterozygotes Ergebnis, wie es, für von der kausalen Mutation unabhängige Bereiche des Genoms nach Auskreuzung, erwartet wird. Die Marker auf Chromosom 1 und 4 zeigen eine teilweise Verschiebung zu jeweils No-0 oder Col-0. Nur bei dem Marker Chr. 5 #37 (UPSC#5-22317 (Pacurar et al. 2012)) zeigen alle Pools ein ausschließlich No-0 spezifisches Ergebnis (Abb. 3.7).

Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft zwei der dabei durchgeführten PCR-Analysen. Allen gemein sind die gDNA-Proben von Col-0, No-0 und einer Kreuzung beider als Kontrollen und einer späteren vereinfachten Bandenzuordnung. Des Weiteren sind die Ergebnisse der vier verschiedenen Pools gezeigt. Im Falle des Markers am terminalen

Ende von Chromosom 4 (4-42, Abb. 3.8 A) sind drei der vier Pools heterozygot, während ein Pool, Nummer zwei, ein Col-0 spezifisches Ergebnis zeigt. Bei Marker 5-1, am Beginn von Chromosom 5 liegend, zeigen alle vier Pools ein heterozygotes Ergebnis (Abb. 3.8 B).

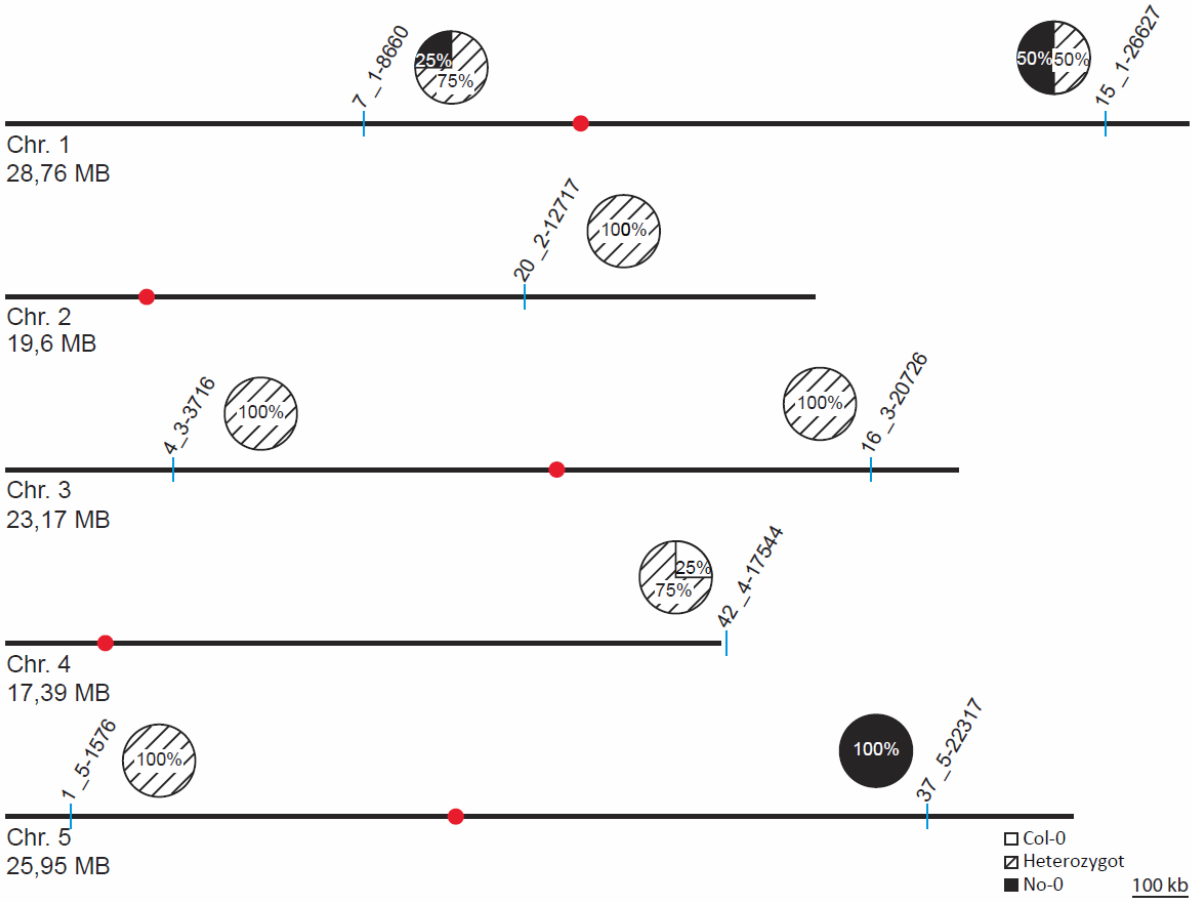

Abb. 3.7: Identifikation des für den Phänotyp kausalen Chromosoms. Schematisch gezeigt sind die fünf Chromosomen von *A. thaliana* und die Lokalisation der zu Beginn verwendeten INDEL Marker. Die dem jeweiligen INDEL zugeordneten Kuchendiagramme zeigen die Verteilung der Genotypen in den vier anfangs getesteten gDNA-Pools. Größenstandard: 100kb; roter Kreis: Zentromer; blaue Striche: INDEL; Beschriftung: interne Nummer_INDEL Name UPSC# (Pacurar et al. 2012); weiß: Col-0; schwarz: No-0; gestreift: heterozygot Col-0/No-0

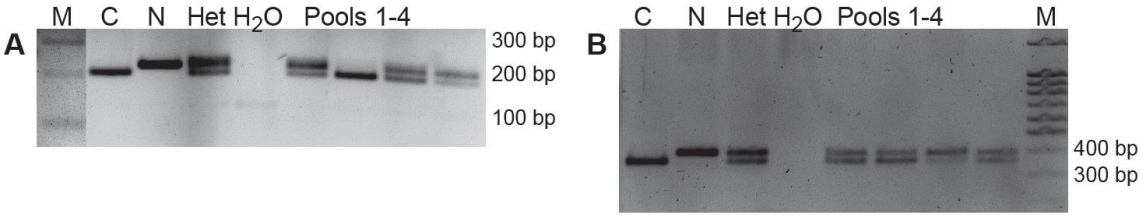

Abb. 3.8: Repräsentative PCR Analysen des klassische Mappings. Gezeigt sind PCR Analysen zum klassischen Mapping auf gDNA unter Nutzung von INDELs (Pacurar et al. 2012). Für die hier gezeigten Analysen wurden vier gDNA-Pools aus je 10 Pflanzen genutzt. Verwendet wurden die INDELs 4-42 (A) und 5-1 (B). Die Erhöhung des Kontrastes über der Markerspur dient ausschließlich der besseren Sichtbarkeit der einzelnen Banden (A). M: Marker (Genaxxon GenLadder 100bp + 1,5Kb), C: Col-0, N: No-0, Het: heterozygote F_1-Pflanze (Kreuzung Col-0 x No-0)

Darauf folgend wurde der q-Arm des fünften Chromosoms engmaschiger mit weiteren ökotypspezifischen Markern überprüft. Neben dem INDEL-Marker Chr.5 #37 wurden zwei weitere INDEL-Marker stromaufwärts und zwei SNP-basierte dCAP-Marker (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (Kover et al. 2009; Neff, Turk, and Kalishman 2002)) stromabwärts verwendet (Abb. 3.9 A). Die Verteilung der Genotypen von No-0 und Col-0 dieser Proben (Abb. 3.9 B) zeigt, dass der QTL (Quantitative Trait Locus) für den *fif*-Phänotypen und damit die kausale Mutation am terminalen Ende des q-Arms auf Chromosom 5 nahe des dCAP-Markers S5-24 liegen muss.

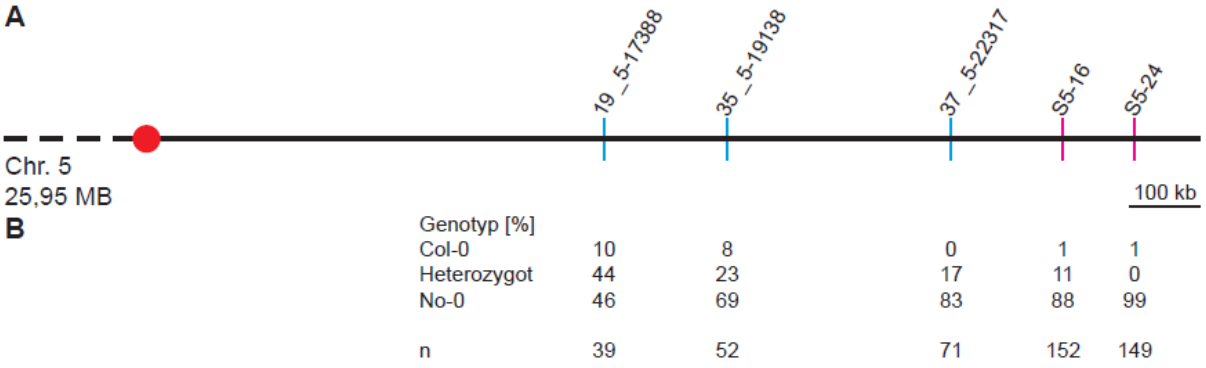

Abb. 3.9: Klassisches Mapping auf Chromosom 5. Gezeigt ist der q-Arm von Chromosom 5 mit den, für das Mapping verwendeten, INDELs (blau) und SNPs (rosa) (A). Den jeweiligen Markern sind die prozentualen Mappingergebnisse der Einzelproben zugeordnet (B). Größenstandard: 100kb; roter Kreis: Zentromer; blauer Strich: INDEL; Beschriftung: interne Nummer_INDEL Name UPSC# (Pacurar et al. 2012); rosa Strich: SNP (Kover et al. 2009; Neff, Turk, and Kalishman 2002); n: Anzahl getesteter Einzelpflanzen

Für eine genaue Identifikation der Mutation, über der ungefähren Chromosombereich (QTL) hinaus, wurde das gesamte Genom eins Pools von 245 homozygoten *fif* der

zweiten Generation der Auskreuzung sequenziert. Die Daten der Sequenzierung wurden von Korbinian Schneeberger und Hequan Sun (Abteilung Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) analysiert und in graphischer Form (Abb. 10 und 11) zusammengefasst. Diese stellen die Allel-Verteilung über das gesamte Genom da, wobei rote Punkte im Bereich von 0 bis 0,5 für Col-0 Allele und im Bereich von 0,5 bis 1 für No-0 Allele stehen. Die blaue Linie zeigt die mittlere Verteilung. Da die Mutation im No-0-Hintergrund vorliegt, erwarten wir an dem Locus, welcher an die Mutation gekoppelt ist, eine Verschiebung der Daten zu No-0 (0,5 ≤ 1). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des klassischen Mappings liegt die durchschnittliche Allel-Verteilung auf den Chromosomen 1 bis 4 bei 0,5 (Abb. 3.10), was den zu erwarteten, heterozygoten Zustand der Population nach einer Kreuzung wiederspiegelt. Am terminalen Ende von Chromosom 5 zeigt die Genomsequenzierung einen eindeutigen Peek in Richtung No-0 (Abb. 3.11 A).

Dieser Bereich ist konform mit dem mittels klassischen Mapping identifiziertem QTL. Bei einer Vergrößerung des entsprechenden 300 kb großen Bereiches der Sequenzierungsdaten (Abb. 3.11 B) ist zu erkennen, dass alle hier identifizierten Allele eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung mit No-0 zeigen. Darauf folgend wurden alle Allele dieses Bereiches spezifisch zwischen *fif* und No-0 abgeglichen.

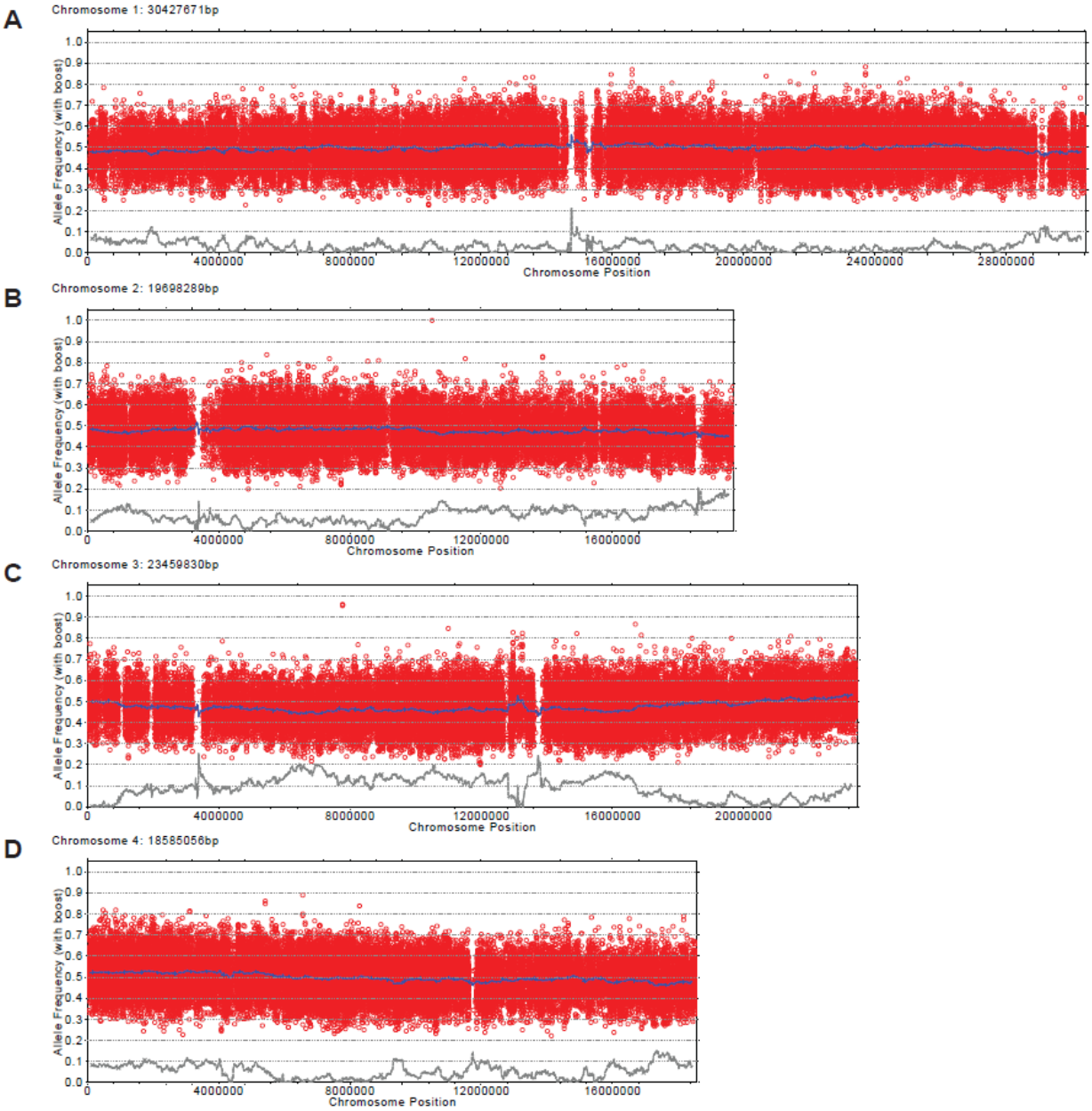

Abb. 3.10: Ergebnis der Genomsequenzierung für Chromosom 1 bis 4 von *fif*. Gezeigt sind die ausgewerteten Sequnezierergebnisse eines Pools von 245 homozygoten *fif* der zweiten Generation der Auskreuzung mit Col-0. Die Graphen wurden von Korbinian Schneeberger und Hequan Sun (Abteilung Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) erstellt. Gezeigt ist die Allel-Verteilung über das gesamte Genom, wobei rote Punkte im Bereich von 0 bis 0,5 für Col-0 Allele und im Bereich von 0,5 bis 1 für No-0 Allele stehen. Die blaue Linie zeigt die mittlere Verteilung. Die durchschnittliche Allel-Verteilung auf den Chromosomen 1 bis 4 liegt bei 0,5. (A) Chromosom 1, (B) Chromosom 2, (C) Chromosom 3, (D) Chromosom 4.

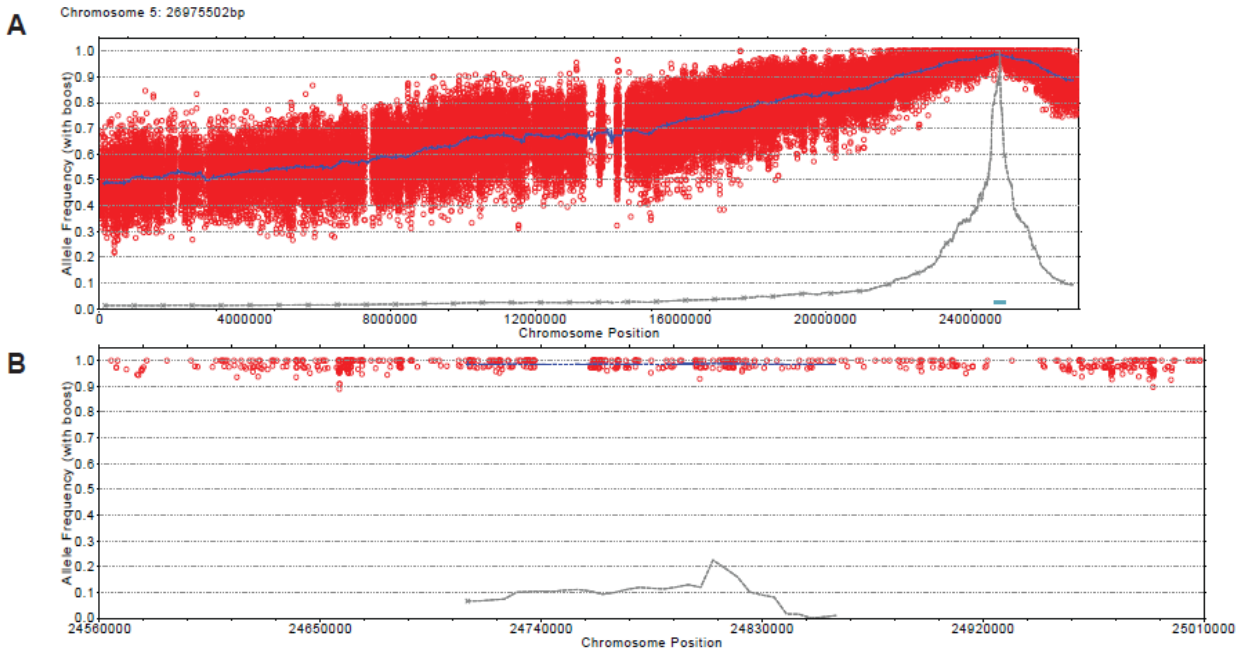

Abb. 3.11: Ergebnis der Genomsequenzierung für Chromosom 5 von *fif*. Gezeigt sind die ausgewerteten Sequnezierergebnisse eines Pools von 245 homozygoten *fif* der zweiten Generation der Auskreuzung mit Col-0. Die Graphen wurden von Korbinian Schneeberger und Hequan Sun (Abteilung Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) erstellt. Gezeigt ist die Allel-Verteilung über das gesamte Genom, wobei rote Punkte im Bereich von 0 bis 0,5 für Col-0 Allele und im Bereich von 0,5 bis 1 für No-0 Allele stehen. Die blaue Linie zeigt die mittlere Verteilung. Am terminalen Ende von Chromosom 5 ist ein eindeutiger Peek in Richtung No-0 (A). Die Vergrößerung eines 300 kb großen Abschnitts (in A blauer Balken) zeigt eine Übereinstimmung aller hier lokalisierten Allele mit No-0 (B).

Dabei konnte ein einzelner SNP ausgemacht werden, welcher sich in den beiden gDNA Pools von *fif* und No-0 unterscheidet, keine Silent-Mutation darstellt und demnach eine Auswirkung auf die resultierende Proteinsequenz hat. So ist die kausale Mutation an Stelle 24.845.552 auf Chromosom 5 identifiziert worden, welche einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin darstellt. Dieser SNP befindet sich im zweiten Exon von *LEAFY* (*LFY*, *At5g61850*, Abb. 3.12 A, B). Auf Proteinebene bedeutet dieser SNP einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin (Abb. 3.12 B). Dieser Aminosäureaustausch liegt in der DNA-Binde-Domäne von LFY, welche schon kristallisiert wurde (Hames et al. 2008). Wie in Abb. 3.12 B zu erkennen ist, ist die betroffene Aminosäure in der ersten α-Helix der DNA-Binde-Domäne. Der durch die Genomsequenzierung identifizierte SNP konnte auch in allen 143 einzeln gesammelten Pflanzenproben mittels spezifischen dCAP-Marker verifiziert werden (Abb. 3.12 C).

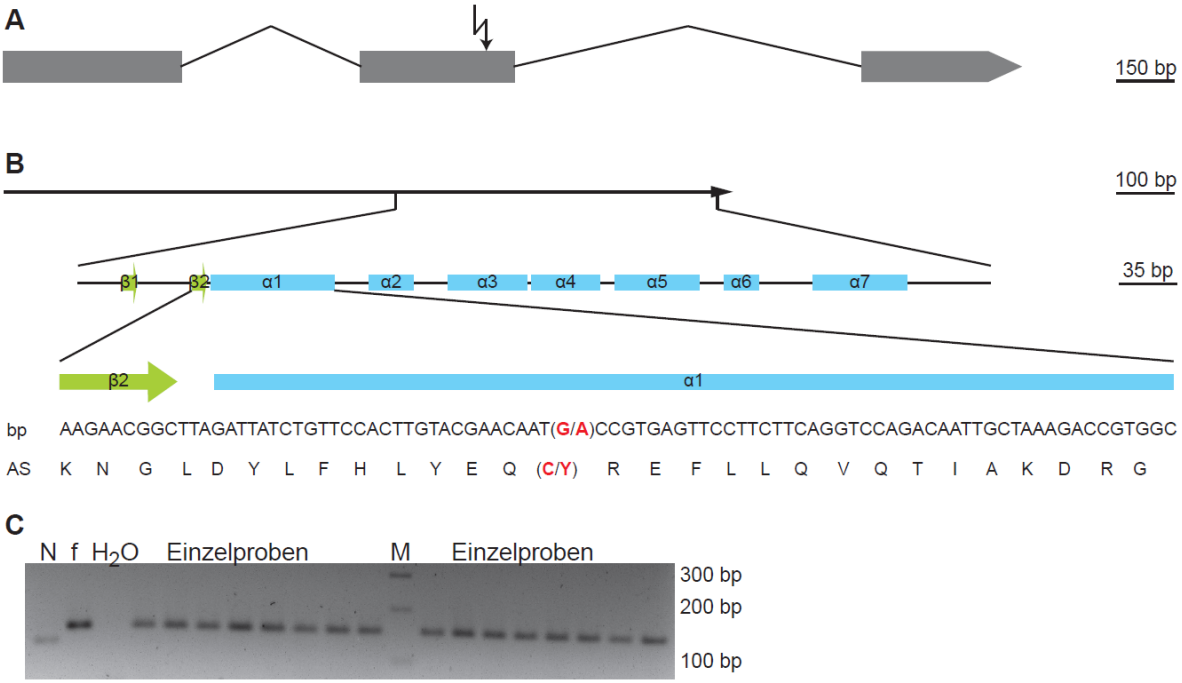

Abb. 3.12: Lokalisation des *fif* SNPs und dessen Überprüfung. Die identifizierte Mutation befindet sich im zweiten Exon von *LEAFY* (A). Dieser Bereich gehört zur ersten α-Helix der DNA-Binde-Domäne. Die Domänenstruktur incl. der cDNA- und Protein-Sequenz ist in B gezeigt. In rot ist der Basen- bzw. der Aminosäureaustausch gekennzeichnet (No-0/*fif*). Der SNP konnte in allen Einzelproben mittels spezifischen dCAP-Marker verifiziert werden (C, Beispiel PCR-Analyse). Größenstandard: 100 bp (A), 100 bzw. 35 bp (B), graue Boxen: Exon, Λ: Intron; Pfeil: Mutation; grüne Pfeile: β-Faltblatt; blaue Kästen: α-Helix; M: Marker (Genaxxon GenLadder 100bp + 1,5Kb); N: No-0; f: *fif*; Proteinstruktur (B) in Anlehnung an Hames et al. (2008)

3.4 Überprüfung beschriebener LEAFY-Funktionen

Nachdem die kausale Mutation in *LEAFY* (*LFY*) lokalisiert werden konnte, wurde nachfolgend die Funktionalität des mutierten Proteins (LFY^{fif}) untersucht. Hierbei lag der Fokus auf zuvor schon beschriebenen Eigenschaften von LFY wie subzelluläre Lokalisation, DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktion.

Hierzu wurde *LFY*- bzw. *fif* zunächst einmal für unterschiedliche Zwecke in verschiedene Vektoren kloniert (Abb. 3.13). Für die Expression in Pflanze wurden C-terminale Fusionen mit GFP oder RFP verwendet (Abb. 3.13 A, B). Im Gegensatz dazu ist die GPF-Fusion für die *E. coli* Expression N-Terminal (Abb. 3.13 C). Die Funktionalität von GFP-LFY als auch LFY-GFP wurde bereits durch Komplementation der starken *lfy-12* Mutante gezeigt (Wu et al. 2003). Die Richtung der verwendeten

Fusionen der Proteine bringt demnach keine Beeinträchtigung der Funktionalität mit sich, so dass die unterschiedlichen Konstrukte problemfrei verwendet werden können.

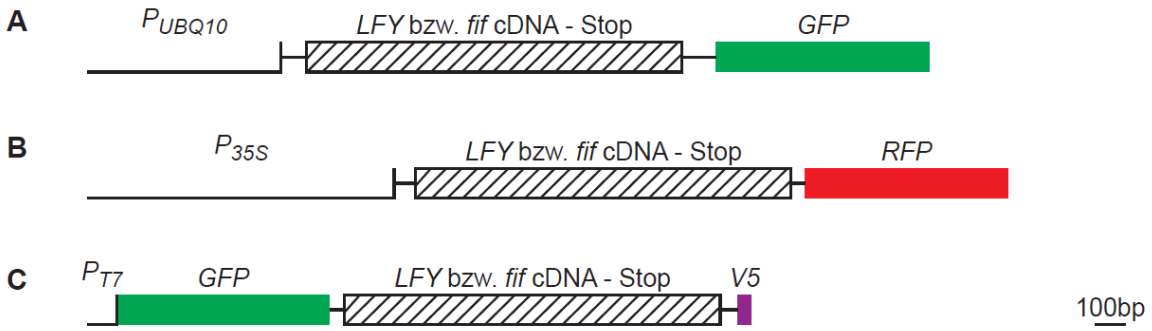

Abb. 3.13: Schematische Darstellung der verwendeten cDNA Konstrukte. Gezeigt sind die Konstrukte, welche jeweils mit der *LFY* oder *fif* cDNA in Volllänge (ohne Stopp) verwendet wurden. Als Pflanzenvektoren wurden der pUGT1-Dest (A, A. Hahn) und der pB7RWG2-Dest (B, P. Hilson & R. Tsien) verwendet welche jeweils eine C-terminale Fusion mit GFP bzw. RFP erzeugen. In beiden Vektoren wird das Fusionsprotein konstitutiv überexprimiert. Für die Expression beider Proteine in *E. coli* wurde eine Variante des pET-Dest42 (C, nicht publiziert, bereitgestellt von Luise H. Brand) verwendest, welche das Protein N-Terminal mit GFP fusioniert. Offenes Feld: Promotor; gestreift: cDNA *LFY* oder *fif*; grün: *GFP*; rot: *RFP*, lila: *V5* Epitop

Als erster Test der Proteinfunktion wurde überprüft, ob die subzelluläre Lokalisation von LFY^{fif} weiterhin der von LFY entspricht. Hierfür wurden C-terminale Fusionen der *LFY*- bzw. *fif*-cDNA (ohne Stopp) mit *GFP* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{UBQ10} (pUGT1-Dest, K. Schumacher (nicht publiziert), (Grefen et al. 2010)) verwendet. Beide Konstrukte wurden in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert und das GFP-Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine nach zwei Tagen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie detektiert. Hierbei konnte eine Übereinstimmende Lokalisation beider Proteine gezeigt werden (Abb. 3.14). Sie lokalisieren überwiegend im Zellkern, aber auch im Zytoplasma. Der Nukleolus ist bei der Kernlokalisation ausgespart. Die Verteilung der Fluoreszenzsignale ist teilweise punktiert und nicht gleichmäßig verteilt. Dies entspricht der schon bekannten intrazellulären Lokalisation von überexprimierten LFY in Tabak (Siriwardana and Lamb 2012a).

Nachfolgend wurde die Fähigkeit der DNA-Bindung untersucht. Hierfür wurden N-Terminal GFP-getagte, rekombinant in *E. coli* exprimierte, Proteine in einem GFP-Fluoreszenz basierten DPI-ELISA (Brand et al. 2010; Fischer, Boser, et al. 2016) verwendet (Abb. 3.15).

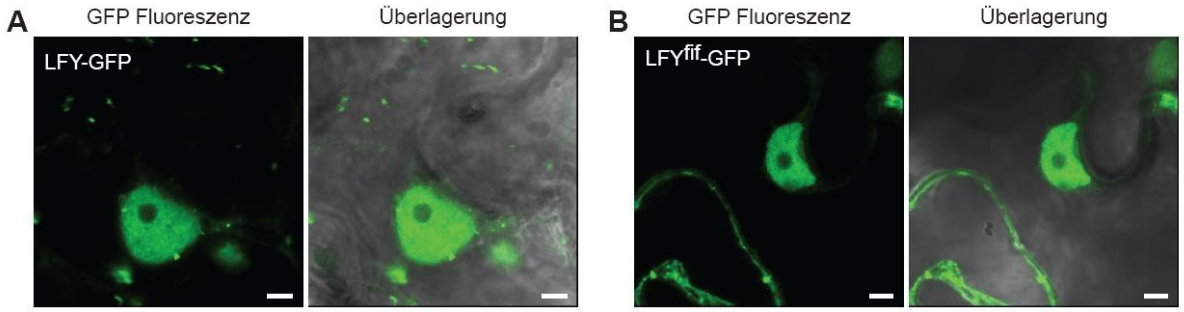

Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisation der Proteine LFY und LFY^{fif}. Gezeigt ist die subzelluläre Lokalisation von LFY-GFP (A) und LFY^{fif}-GFP (B) in *N. benthamiana* Blättern. Jeweils von links nach rechts ist die GFP-Fluoreszenz und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild gezeigt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte zwei Tage nach der Tabakinfiltration mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Größenstandard: 5 µm

Zur Überprüfung der Kapazität zur DNA-Bindung wurden LFY^{fif} und LFY mit je vier DNA-Proben getestet. Dies ist zum einen das Oligo-Paar *pAP1* und *pAP1m* (Winter et al. 2011). Dabei enthält *pAP1* das DNA-Motiv für die Bindung von LFY, welches bei *pAP1m* mutiert ist und so keine LFY-Bindung mehr erlaubt. Des Weiteren wurden noch zwei unabhängige Negativkontrollen verwendet. Dabei handelt es sich um ein DNA-Oligonukleotid dessen Sequenz vollständig unabhängig zu dem des LFY-Bindemotivs ist (*C28M12*), und um eine Probe welche keine DNA enthält (-). Hiermit lässt sich auf die unspezifische Bindung testen (Hintergrundsignal). Neben den LFY-internen Kontrollen wurden noch drei Gruppen an methodischen Kontrollen durchgeführt. Als Set zur methodischen Positivkontrolle dient die Bindung der C-terminalen Domäne von WRKY33 (WRKY33^{cDBD}) an *W2* bzw. die Nichtbindung an *W2neg* (Brand et al. 2013; Brand et al. 2010) und je ein Set mit allen verwendeten DNA-Oligonukleotiden zum einen mit freiem GFP, als auch mit ausschließlich Puffer, also ohne das zusetzen eines Proteins.

Die beiden Kontrollen zur Feststellung der unspezifischen Bindung, freies GFP bzw. Puffer an alle verwendeten DNA-Oligonukleotide, definieren die Hintergrund-GFP-Fluoreszenz. Diese liegt bei ca. 1500 RFU (relative fluorescence units) und ist in Abb. 3.15 durch eine waagerechte Linie gekennzeichnet. GFP-WRKY33^{cDBD} wurde als Positivtest für die Durchführung des DPI-ELISA verwendet. Wie von Brand et al. (2010) beschrieben, ist das GFP-Signal mit *W2* signifikant über dem des Hintergrundes (ca. 4000 RFU), wohingegen die Fluoreszenz der Proben mit *W2neg* bzw. ohne DNA (-) unter dem des Hintergrundes blieben (Abb. 3.15).

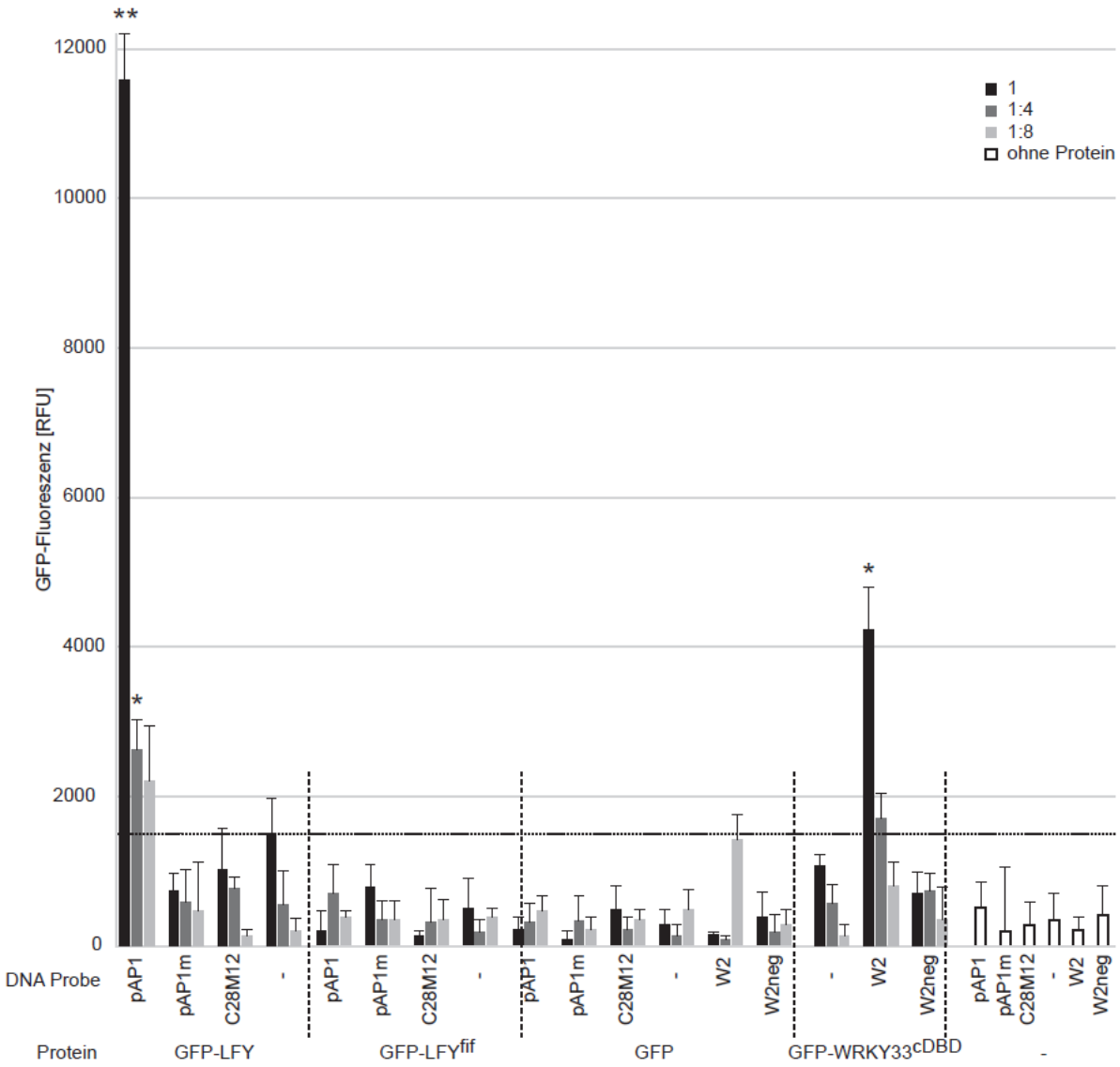

Abb. 3.15: Überprüfung der DNA-Binde-Kapazität. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz [RFU] von N-terminal GFP-getagten, rekombinant in *E. coli* exprimierten, Protein in einem GFP-Fluoreszenz basierten DPI-ELISA ((Brand et al. 2010),(Fischer, Böser, et al. 2016)). Getestet wurde die LFY- und LFY^{fif}-bindung zum einen an die DNA-Oligonukleotide *pAP1* und *pAP1m* (Winter et al. 2011) und zum anderen an C23m12, eine der LFY-DNA-Bindesequenz unabhängige Sequenz, und eine Probe ohne DNA (-). Außerdem gibt es drei Gruppen an methodischen Kontrollen: 1) Bindung der C-terminalen Domäne von WRKY33 (WRKY33^{cDBD}) an *W2* bzw. die Nichtbindung an *W2neg* (Brand et al. 2010; Brand et al. 2013) je ein Set mit allen verwendeten DNA-Oligonukleotiden zum einen mit freiem GFP, als auch ausschließlich mit Puffer. * bzw. **: t-Test Signifikanz <0,05 bzw. <0,01

GFP-LFY zeigt eine hoch signifikantes GFP-Signal bei der *pAP1*-Probe (11500 RFU) und keine Signale über dem Hintergrund bei den Proben *pAP1m*, *C28M12* und ohne DNA (-) (Abb.3.15). GFP-LFY bindet demnach nur an *pAP1*. Dies ist im Einklang mit Winter et al. (2011), welche die Bindung von LFY an *pAP1* gezeigt haben. GFP-LFY^{fif} wurde unter gleichen Bedingungen mit denselben DNA-Oligonukleotiden wie GFP-

LFY getestet. Dabei zeigt GFP-LFY^{fif} kein Signal, welches höher als das des Hintergrundes wäre. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen zeigt GFP-LFY^{fif} keine DNA-Binde-Kapazität.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Mutation von *fif* in der DNA-Binde-Domäne dazu führt, dass LFY^{fif} keine DNA-Binde-Eigenschaften mehr innehat, wurde getestet, ob auch die Protein-Protein-Interaktion beeinflusst ist. Hierfür wurde die schon bekannte LFY-LFY Interaktion (Siriwardana and Lamb 2012a) als Beispiel herangezogen. Getestet wurden sowohl die LFY^{fif}-LFY^{fif}-, also auch die LFY^{fif}-LFY-Interaktionen mittels FRET-FLIM. Als Negativkontrollen dienten Einzelproben von LFY^{fif}- beziehungsweise LFY-GFP (Abb. 3.16 A, LFY Donor, LFY^{fif} Donor). Die LFY-LFY Interaktion wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz Lebensdauer sowohl von LFY-GFP als auch LFY^{fif}-GFP signifikant reduziert ist, sobald diese mit LFY-RFP oder LFY^{fif}-RFP co-infiltriert vorliegen (Abb. 3.16 A).

Die Interaktionsstärken von LFY/LFY, LFY^{fif}-LFY^{fif} und LFY^{fif}-LFY unterscheiden sich nicht untereinander. LFY^{fif} hat also noch, im gleichen Umfang wie LFY, die Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion. Abbildung 3.14 B zeigt zu jeder der analysierten Proben ein repräsentatives Beispielbild der Fluoreszenz Lebensdauer in Falschfarbe, wobei der Farbverlauf von Blau zu Rot einer Fluoreszenz Lebensdauer von zwei bis drei Nannosekunden [ns] entspricht. Die eventuelle Beeinflussung der Proteinlokalisation durch die Co-infiltration von LFY^{fif} und LFY wurde ebenfalls überprüft. LFY und LFY^{fif} lokalisieren weiterhin sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Abb. 3.16 C). Die subzelluläre Lokalisation ist sowohl von der Kombination der beiden Proteine, als auch von der Art des verwendeten Tags (GFP oder RFP) unabhängig.

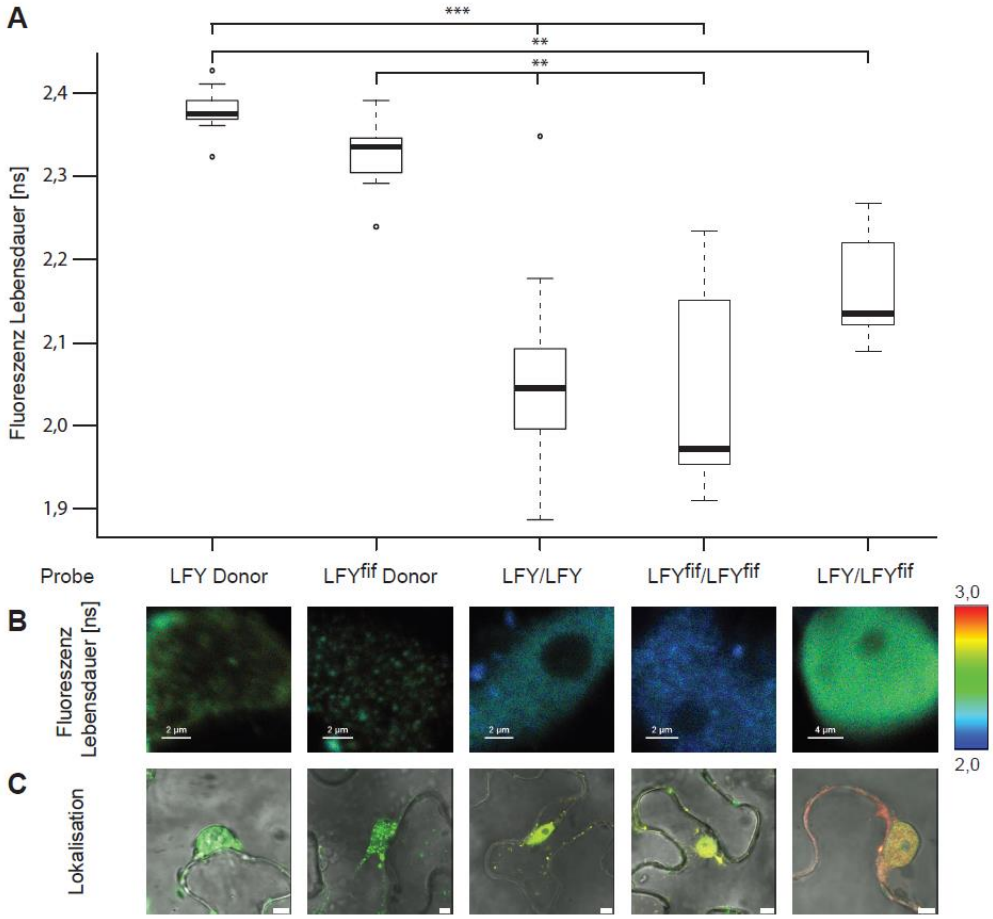

Abb. 3.16: Protein-Protein Interaktion von LFY und LFY^{fif}. Gezeigt ist die Auswertung der FRET-FLIM Analyse mit LFY und LFY^{fif} (A). Die beiden Donor-Proben dienen als Negativ-, LFY/LFY als Positivkontrolle (Siriwardana and Lamb 2012a). Des Weiteren sind zu jeder Probe repräsentative Bilder zur Fluoreszenz Lebensdauer (B) und Lokalisation (C) gezeigt. Größenstandards: (B) wie angegeben, (C) 5 µm, ** bzw. ***: Signifikanz bei nichtparametrischen Vergleichen für alle Paare mittels Dunn-Methode für gemeinsame Ränge <0,01 bzw. <0,001 (Dunn 1961)

4 Diskussion

Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Transposoninsertionslinie *fif* phänotypisch und molekularbiologisch charakterisiert werden. Dabei konnte nicht nur der Phänotyp beschrieben, sondern auch die kausale Mutation identifiziert und bestätigt werden. Das Weiteren wurden Funktionen des mutierten Proteins mit denen des wildtypischen abgeglichen, um den beschriebenen Phänotyp molekularbiologisch erklären zu können.

4.1 Die *FLower-in-Flower* Mutante: Ein neues *LEAFY* Allele

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Kausalität der zuvor von RIKEN beschriebenen Transposoninsertion (Ito et al. 2002; Kuromori et al. 2004) und dem Phänotyp überprüft.

Für diese Überprüfung wurde *fif* mit dem korrespondierenden Wildtyp (No-0) gekreuzt und die Nachkommen der ersten (F_1) und zweiten (F_2) Generation bezüglich der Verteilung von Phänotyp und Genotyp überprüft. In der ersten Generation zeigten alle Pflanzen ein heterozygotes Ergebnis für das Transposon und einen wildtypischen Phänotyp, was zeigt, dass die Mutation rezessiv ist (Abb. 3.3). In der zweiten Generation konnte gezeigt werden, dass die Transposoninsertion unabhängig von dem mutanten Phänotyp segregiert (Abb. 3.4). Obwohl der Phänotyp rezessiv vererbt wird, gab es phänotypische *fif*-Pflanzen ohne bzw. mit einer heterozygoten Insertion. Zusätzlich gab es wildtypische Pflanzen die eine homozygote Transposoninsertion aufwiesen. Diese unabhängige Segregation von Phäno- und Genotyp zeigt, dass die Transposoninsertion in das Gen *At1g20990* nicht für den Phänotyp verantwortlich ist. Das Vorhandensein von ca. 25% *fif*-Pflanzen in der zweiten Generation (Abb. 3.4) zeigt, dass der Phänotyp durch eine einzelne Mutation hervorgerufen wird.

Nach Auskreuzung von *fif* mit Col-0, und der phänotypischen Selektion von 425 *fif*-F_2-Pflanzen, aus acht unabhängigen Kreuzungen, konnte durch eine Genomsequenzierung eine spezifische Mutation (SNP) in *LEAFY* (*LFY*) identifiziert werden (Abb. 3.10 und 3.11). Die Auswertung der Sequenzierung und die Identifikation des SNP wurde von Korbinian Schneeberger und Hequan Sun (Abteilung Entwicklungsbiologie

der Pflanzen, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) durchgeführt.

Durch eine Überprüfung dieses SNP mittels dCAP-Markern in 143 Einzelpflanzen konnte die Mutation verifiziert werden (Abb. 3.12).

Die so identifizierte und verifizierte Mutation in LFY^{fif} hat einen Cystein zu Tyrosin Aminosäureaustausch in der ersten α-Helix der DNA-Bindedomäne (Abb. 3.12 B) zur Folge. Tyrosin ist wegen seines großen Seitenrestes eine eher seltene Aminosäure in α-Helices (Padmanabhan and Baldwin 1994). Es wäre demnach denkbar, dass das Einfügen dieser großen Seitengruppe die Struktur der α-Helix, oder gar die des ganzen Proteins zerstört.

In der von Hames et al. (2008) publizierten Kristallstruktur eins C-terminalen LFY-Dimers, welches an DNA gebunden ist (Abb. 4.1), ist zu erkennen, dass die durch die Mutation betroffene α-Helix im LFY-LFY-DNA-Komplex als eine Art Plattform dient und den dimeren Komplex auf der DNA stabilisiert. Eine Veränderung in dieser Struktur könnte demnach die Komplexstabilität von LFY^{fif} reduzieren oder eine DNA-Bindung gänzlich verhindern.

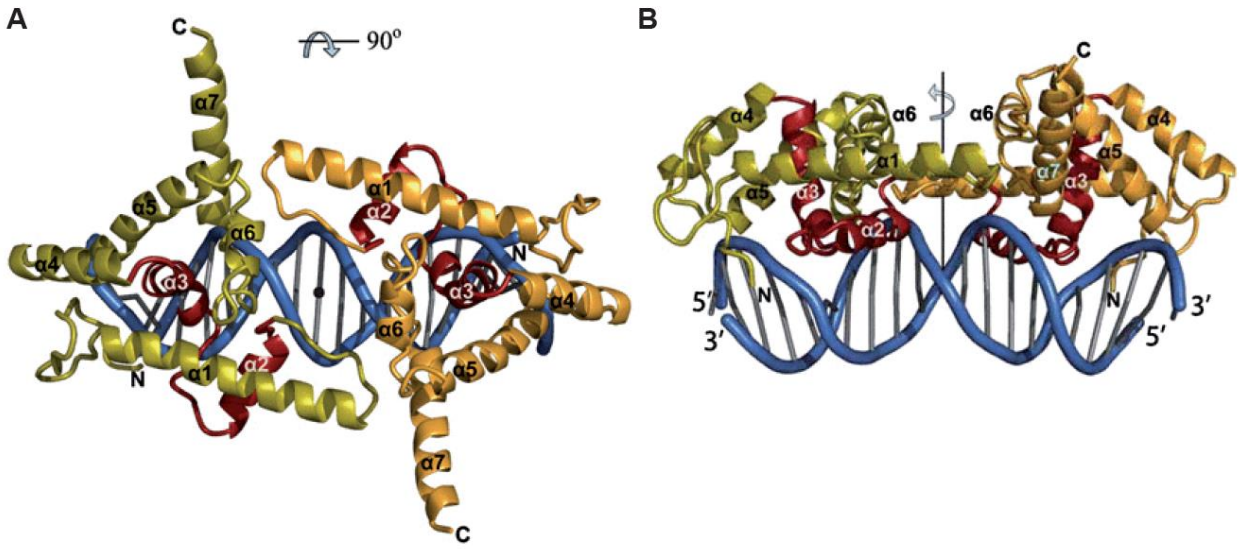

Abb. 4.1: Struktur eines C-terminalen LFY-Dimers gebunden an DNA. Gezeigt sind zwei orthogonale Ansichten eines C-terminalen LFY-Dimers (Aminosäuren 237-399) gebunden an DNA. Die jeweiligen Monomere sind olive und orange gefärbt mit dem Helix-turn-Helix-Motiv (HTH, Helices α2 und α3) in rot. Die DNA ist in blau dargestellt. Die Abb. und die Abbildungsunterschrift wurden gekürzt von Hames et al. (2008) übernommen.

Die Protein-Protein-Interaktion könnte ebenfalls betroffen sein. Auch wenn Siriwardana and Lamb (2012a) gezeigt habe, dass die DNA-Bindedomäne für die

Dimerisation der Proteine nicht notwendig ist, so ist ein Einfluss der veränderten Struktur auf die Protein-Protein-Interaktion nicht auszuschließen.

Durch eine generelle Veränderung der Proteinstruktur wäre auch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation möglich.

4.2 Überprüfung der LFY^{fif} Eigenschaften

Um die Unterschiedlichen Eigenschaften bzw. Funktionen von LFY mit denen der hier untersuchten Version LFY^{fif} zu vergleichen, wurden die subzelluläre Lokalisation, die DNA-Binde-kapazität und die Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion getestet.

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation

Für die Überprüfung der subzellulären Lokalisation wurden LFY-GFP und LFY^{fif}-GFP (Abb.3.13 A) in den Blättern von *N. benthamiana* expremiert und mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie detektiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation von LFY und LFY^{fif} nicht unterscheidet. Beide Fusionsproteine lokalisieren vorwiegend im Zellkern, exklusive des Nucleolus, und teilweise, in einer punktierten Verteilung, im Zytoplasma (Abb. 3.14). Diese Lokalisation stimmt mit der schon gezeigten Lokalisation von überexprimierten LFY in Tabak überein (Siriwardana and Lamb 2012a).

4.2.2 DNA-Binde-Kapazität

Da die Mutation von LFY^{fif} in der DNA-Bindedomäne liegt, wurde mittels GFP-basiertem DPI-ELISA (qDPI-ELISA, (Brand et al. 2010; Fischer, Boser, et al. 2016)) die DNA-Binde-Kapazität beider Proteine im Vergleich überprüft. Die generelle Funktionalität und der Hintergrund der Methode wurde durch drei Sets an methodischen Kontrollen getestet. Dies war zum einen ein Set mit der C-terminalen Domäne von WRKY11 (WRKY11^{cDBD}) welches an das Oligonukleotid *W2* bindet und dessen Bindung an *W2neg* unterbleibt (Brand et al. 2010; Brand et al. 2013). Dieses DNA-Bindeverhalten konnte in dem von mir durchgeführten qDPI-ELISA gezeigt werden (Abb. 3.15). Desweitern wurden zwei Sets an negativen Kontrollen verwendet. Dies war zum einen ein Test zur Messung der Hintergrundfluoreszenz von GFP, wofür freies GFP, welches nicht an DNA binden sollte, gegen alle verwendeten

Oligonukleotide getestet wurde. Zum anderen wurde das Hintergrundsignal der Platte und der verwendeten Chemikalien durch Verwendung von DNA-Proben zusammen mit Puffer überprüft. Keine der Negativkontrollen zeigt ein übermäßig hohes Signal, so dass es möglich war, die positiven Protein-DNA-Interaktionen auszulesen.

Um die DNA-Binde-Kapazität von LFY^{fif} im Vergleich zu LFY zu analysieren, wurde ein Set von vier Oligonukleotiden verwendet. Das Oligonukleotid *pAP1* sollte dabei zu einer positiven Interaktion führen. Bei der mutierten Version, *pAP1m* sollte keine Bindung mehr stattfinden (Winter et al. 2011). Des Weiteren wurde das Oligonukleotid *C28M12* verwendet, dessen Sequenz vollkommen unabhängig von der LFY-DNA-Bindesequenz ist und somit ebenfalls keine Bindung zulassen sollte. Als letzte Negativkontrolle wurden die Proteine gegen eine Probe getestet, in welcher keine DNA vorhanden war, womit die Hintergrundbindung der Proteine an die Platte getestet wurde. Bei dem Test von GFP-LFY gegen diese vier DNA-Proben ergab sich ein eindeutiges Fluoreszenzsignal mit *pAP1* und keine Signale über dem Hintergrundniveau für die anderen drei Proben. Da dieses Ergebnis den Erwartungen entspricht (Winter et al. 2011), ist der qDPI-ELISA demnach als Methode geeignet, um die LFY-DNA-Binde-Kapazität zu messen. Nachdem die Anwendbarkeit dieser Methode geklärt war, wurde LFY^{fif} gegen die gleichen Oligonukleotide wie LFY getestet. Dabei konnte kein positives Fluoreszenzsignal gemessen werden. LFY^{fif} bindet also nicht an die beschriebene LFY-DNA-Bindesequenz in *pAP1*. Bei einem qDPI-ELISA-Screen, in welchem alle möglichen Hexanukleotid-DNA-Motive vertreten sind (Brand et al. 2013), konnte bei keinem der DNA-Motive eine Bindung von LFY^{fif} nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von S. Hummel). Die Mutation in LFY^{fif} führt demnach dazu, dass die DNA-Binde-Kapazität von LFY verloren geht und keine DNA-Bindung mehr möglich ist.

4.2.3 Protein-Protein-Interaktion

Nachdem der Einfluss der Mutation in LFY^{fif} auf die DNA-Bindung gezeigt wurde, wurde überprüft, ob auch die Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion in diesem Protein verändert ist.

Für den Test auf Protein-Protein-Interaktionen wurden LFY und LFY^{fif} als C-terminale Fusionen mit GFP oder RFP (Abb. 3.13 A, B) transient in Blättern von *N. benthamiana* exprimiert und die Interaktion nachfolgend mittels FRET-FLIM analysiert. Als Negativkontrollen dienten LFY-GFP bzw. LFY^{fif}-GFP in Einzelproben. Hierbei lag die

Fluoreszenz Lebensdauer bei ca. 2,35 ns (Abb. 3.16 A). Da die Dimerisierung von LFY schon mittels BiFCs (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) gezeigt wurde (Siriwardana and Lamb 2012a), diente eine Probe, bei welcher LFY-GFP und LFY-RFP co-infiltriert vorlagen als Positivkontrolle. Die verkürzte GFP-Lebensdauer von 2,06 ns (Abb. 3.16 A), welche höchst-signifikant kürzer als die der Einzelproben ist, beweist eine räumliche Nähe der beiden LFY-Fusionsproteine und legt eine Interaktion nahe.

Nachdem die Dimerisierung von LFY gezeigt wurde, wurde überprüft ob LFY^{fif} mit sich selbst, oder LFY interagieren kann. Hierfür wurde LFY^{fif}-RFP mit LFY^{fif}-GFP oder LFY-GFP co-infiltriert und analysiert. Für LFY^{fif}/LFY^{fif} ergab sich dabei eine GFP-Lebensdauer von 2,04 ns und für LFY/LFY^{fif} eine von 2,17 ns (Abb. 3.16 A). Beide Werte sind hoch-signifikant kleiner als die der Einzelproben. Die so gezeigte räumliche Nähe legt nahe, dass LFY^{fif} weiterhin dazu befähigt ist Protein-Protein-Interaktionen einzugehen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Co-Infiltration von LFY und LFY^{fif} deren oben beschriebene subzelluläre Lokalisation nicht geändert wurde (Abb. 3.16 C).

4.2.4 Stabilität des Proteins

In den oben beschriebenen Experimenten wurden LFY und LFY^{fif} jeweils konstitutiv aktiv als Fluoreszenzproteinfusionen in *E. coli* oder *N. benthamiana* exprimiert. Dabei konnte bei keinem der Versuche eine veränderte Proteinstabilität von LFY^{fif} im Vergleich zu LFY festgestellt werden. Die Mutation in LFY^{fif} scheint demnach keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins zu haben.

4.3 Der *fif* Phänotyp: Eine Floreszenz- zu Infloreszenz-transformation

Für die *A. thaliana* Mutante *Flower-in-Flower* (*fif*) ist der extreme Blütenphänotyp charakteristisch und namensgebend. In der Blüte entwickelt sich fasst keines der Organe wildtypisch. Die Primären Blüten sind von Hochblättern umgeben, welche im Wildtyp nicht vorkommen (Müller 1961). Die Kronblätter sind kelchblattähnlich

ausgebildet oder fehlen ganz. Auch die Staubblätter sind nur selten voll entwickelt und zusätzlich nur in reduzierter Anzahl vertreten. Die Fruchtblätter, in deutlich höherer Zahl als im Wildtyp, sind nur unzureichend verwachsen und bilden so meist keinen funktionsfähigen Fruchtknoten aus (Abb. 3.1 A). Außerdem entstehen in den primären Blüten weitere Blüten zweiter oder teilweise sogar dritter Ordnung. Diese Blüten sind dem Wildtyp ähnlicher als die primären. Die Kelchblätter und auch einige der Kronblätter sind normal entwickelt. Die anderen Kronblätter fehlen oder sind kelchblattähnlich. Die Staubblätter kommen in einer höheren Anzahl vor als in den primären Blüten und sind auch öfter ausreichend entwickelt. Auch die Fruchtblätter, weniger als in den primären Blüten und mehr als im Wildtyp, sind weiter verwachsen und bilden so oft einen funktionsfähigen Fruchtknoten aus (Abb. 3.1 B).

Neben der Blüte ist auch die Architektur des gesamten Sprosses betroffen. Während sich die Anzahl der Nebentriebe, ausgehend von der Rosette, nicht von der Anzahl des Wildtypen unterscheidet, hat *fif* 4,5-mal so viele von Stängelblättern ausgehende Seitentriebe (Abb. 3.2).

Wie in der Einleitung beschrieben ist LFY einer der Hauptregulatoren des *floral initiation process* (FLIP). *LFY* ist vor allen anderen Genen dieses Prozesses exprimiert und kontrolliert die Expression der anderen Gene (Abb. 1.2). Des Weiteren kontrolliert LFY, zusammen mit anderen Faktoren, auch die Expression der homöotischen Blütengene der Klassen A, B, C und E und ist damit direkt oder indirekt an der Entwicklung aller Blütenorgane beteiligt. Die Komplexität des von LFY regulierten Netzwerkes, und umgekehrt des Netzwerkes, welches LFY reguliert, ist in Abb. 4.2 als Überblick gezeigt (Siriwardana and Lamb 2012b). Da LFY an so vielen regulativen Netzwerken beteiligt ist, ist der extreme Phänotyp von *fif* auch nicht verwunderlich.

Die vielen Seitentriebe von *fif* sind, im Einklang mit schon beschriebenen *lfy*-Mutanten, als eine Transformation von Floreszenz- zu Infloreszenzmeristemen zu betrachten. Diese Umwandlung ist mit dem altern der Pflanze, und dem anreichern anderer Regulatoren wie z.B. AP1/CAL, nur noch unvollständig, so dass sich Blüten entwickeln, welche noch teilweise eine Infloreszenzidentität haben und so sekundäre Blüten ausbilden. Weigel et al. (1992) haben in ihrer Publikation 15 verschiedene *lfy*-Allele phänotypisch beschrieben. Dabei fällt auf, dass die Mutationen von fünf der sechs als starke Allele eingestufte zu einem frühzeitigen Stopp-Codon führen. Die

Mutation des sechsten Allels (*lfy-15*) führt zwar zu keinem Stopp, aber dazu, dass ab Gln196 alle Aminosäuren neu geordnet sind.

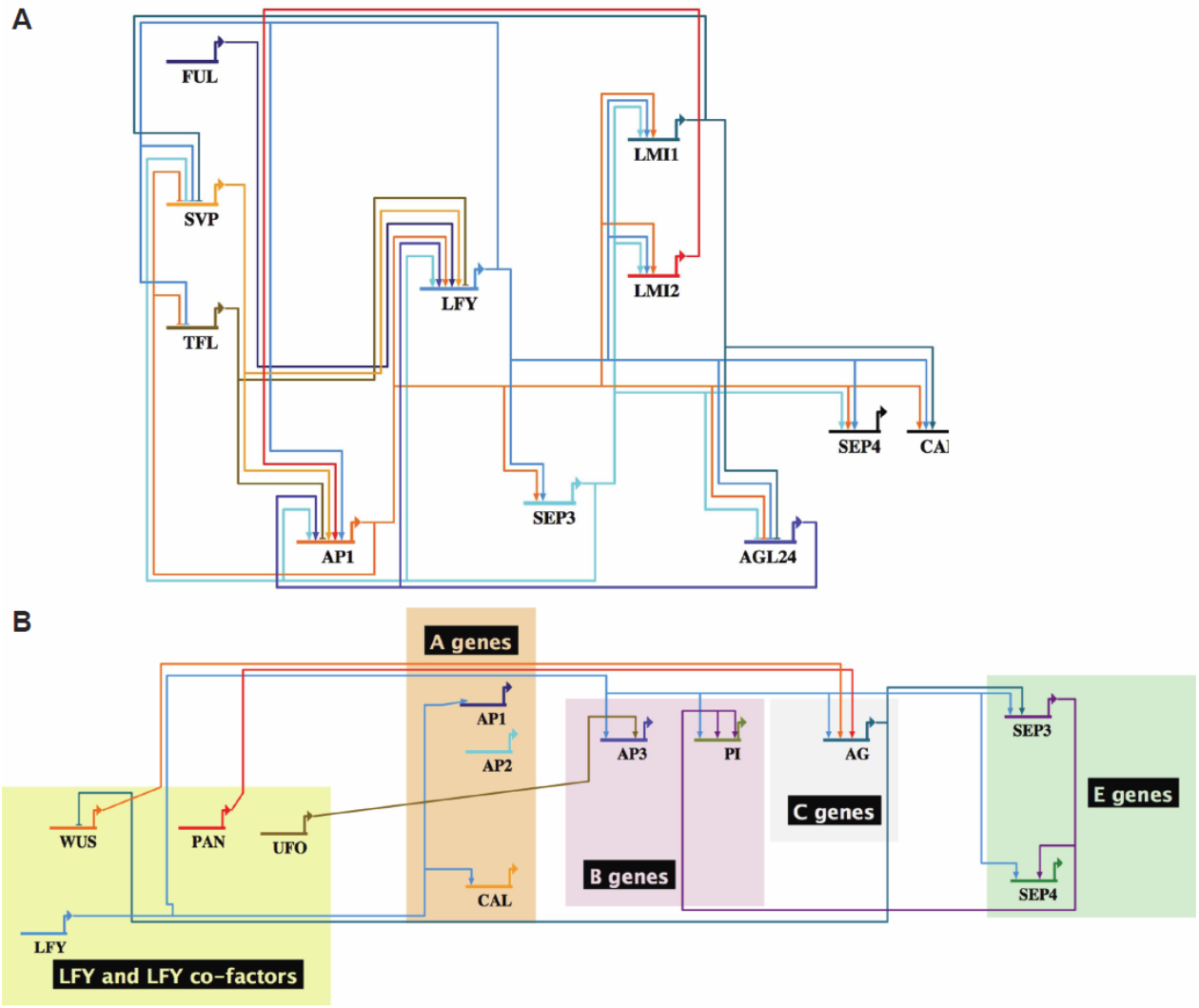

Abb. 4.2: Regulatorische Netzwerke um LEAFY (LFY). (A) Gezeigt ist, wie sich Floreszenz- und Infloreszenzmeristemgene gegenseitig regulieren. Dabei aktiviert LFY viele Transkriptionsfaktoren der Floreszenzmeristeme und wird in der eigenen Expression von diesen reguliert. (B) Gezeigt sind die verschiedenen Feedback-Loops, welche die Blütenorganidentität kontrollieren. LFY kontrolliert die Expression Klassen A, B, C und E der homöotischen Blütengene. Um die Rolle von LFY hervorzuheben sind die regulatorischen Interaktionen zwischen den homöotischen Genen nicht dargestellt. AGAMOUS (AG), AGAMOUS LIKE 24 (AGL24), APETALA (AP), CAULIFLOWER (CAL), FRUITFUL (FUL), LATE MERISTEM IDENTITY (LMI), PERIANTHIA (PAN), PISTILLATA (PI), SEPALLATA (SEP), SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), TERMINAL FLOWER 1 (TFL1), UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO), WUSCHEL (WUS). Die verschiedenen Farben der Pfeile dienen der besseren Nachvollziehbarkeit der jeweiligen Regulationswege. Die Abbildung wurde von Siriwardana and Lamb (2012b) übernommen.

Die anderen Mutationen, welche nur zu einem einzelnen Aminosäureaustausch führen, sind alle als schwache oder intermediäre Allele aufgeführt.

Obwohl *fif* auch nur einen Aminosäureaustausch, und kein frühzeitiges Stopp-Codon, aufweist, muss dieses neue Allel als stark eingestuft werden. So hat das als schwach anzusehende *lfy-5* Allel nur ca. 2,5-mal so viele Seitentriebe und auch eine wesentlich wildtypischere Blüte als *fif*. Das starke Allel *lfy-6* hat 3 bis 3,5-mal so viele Seitentriebe wie der Wildtyp und eine Blüte, die der der *fif* stark ähnelt.

4.4 Das starke LFY-Allel *fif*: ein Erklärungsmodel

Dass der Phänotyp von *fif*, trotz der vergleichsweise geringen Auswirkung der Mutation, so stark ist könnte mit den verbliebenen Proteineigenschaften von LFY^{fif} erklärt werden.

LFY^{fif} ist, da der Promotor von der Mutation nicht betroffen ist, an den gleichen Orten vorhanden wie LFY im Wildtyp. Da die DNA-Bindefähigkeit von LFY^{fif} aber nicht mehr vorhanden ist (Abb. 3.15), kann es seinen Funktionen als Regulator der Expression von anderen Faktoren nicht mehr nachkommen. Selbst wenn eine geringe Restfähigkeit zur DNA-Bindung, welche unter den gegebenen Umständen im qDPI-ELISA evtl. nicht nachweisbar war, verblieben ist, wäre LFY^{fif} nur im sehr reduziertem Maße dazu fähig, der regulatorischen Funktion von LFY nachzukommen. Des Weiteren ist LFY^{fif} weiterhin dazu in der Lage, mit anderen Proteinen zu interagieren (Abb. 3.16). Es ist demnach möglich, dass LFY^{fif} mit anderen Regulatoren interagiert, danach aber nicht an das entsprechende DNA-Bindemotiv binden kann. Damit wäre nicht nur die Funktion von LFY nicht mehr gegeben, sondern auch die Funktion des LFY-Interaktionspartner-Komplexes. LFY^{fif} könnte also andere Faktoren, mit welchen es interagiert, aus dem System ziehen. Damit wären zusätzlich zu LFY auch die Funktionen und regulatorischen Eigenschaften anderer Proteine Reduziert. Eine direkte physikalische Interaktion von LFY konnte schon mit UFO (Siriwardana and Lamb 2012a), LMI2 (Pastore et al. 2011) und SEP3 (Liu et al. 2009) gezeigt werden.

Die additive Wirkung der verlorengegangen DNA-Binde-Kapazität von LFY^{fif} und dem möglich austitrieren von Interaktionspartnern, könnte den starken Phänotyp von *fif* erklären.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Transposoninsertionslinie 15-3794-1 (Kuromori et al. 2006) phänotypisch und molekularbiologisch zu charakterisieren. Diese Linie wurde von RAPID (RIKEN Arabidopsis Phenome Information Database, (Kuromori et al. 2006)) zur Verfügung gestellt und die Transposoninsertion befindet sich im Gen *At1g20990*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Phänotyp dieser Linie, die fortan nach ihrem extremsten Merkmal, der Blüte in der Blüte (*Flower-in-Flower*), *fif* genannt wird, genauer beschrieben. Die primären Blüten von *fif* sind, im Gegensatz zu den wildtypischen Blüten, von Hochblättern umgeben. Kron- und Staubblätter kommen nur in reduzierter Anzahl vor. Dabei sind die Kronblätter meist kelchblattähnlich und die Staubblätter nicht vollständig entwickelt. Die Fruchtblätter kommen hingegen in einer höheren Anzahl vor, sind aber nur unzureichend verwachsen. Die sich zusätzlich entwickelnden sekundären Blüten weisen oft, wenn auch in reduzierter Anzahl, Kronblätter auf. Die Staubblätter sind auch hier in ihrer Anzahl reduziert, aber teilweise voll entwickelt. Die Fruchtblätter kommen in geringerer Anzahl als in der primären Blüte vor und sind oft so weit verwachsen, dass ein funktionsfähiger Fruchtknoten entsteht. Dies führt dazu, dass die Primären Blüten zumeist steril sind, die sekundären Blüten aber eine gewisse Fertilität aufweisen.

Zusätzlich zu dem Blüten-Phänotyp kommt bei *fif* noch eine erhöhte Verzweigung des Sprosses hinzu. Die Pflanzen weisen eine 4,5-mal höhere Anzahl an Seitentrieben auf, als der Wildtyp.

Bei der molekularbiologischen Charakterisierung der Mutante wurde anfangs die Kausalität zwischen der Transposoninsertion und dem Phänotyp überprüft. Mittels Rückkreuzung und Analyse der Verteilung von Phäno- und Genotyp konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Insertion nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist.

Durch eine Kombination aus klassischem Mapping und Genomsequenzierung konnte die kausale Mutation in LEAFY (LFY) lokalisiert und verifiziert werden. Diese Mutation, welche zu einem Cystein zu Tyrosin Austausch in der DNA-Binde-Domäne führt, hat zur Folge, dass LFY^{fif} nicht mehr an DNA bindet, aber weiterhin Protein-Protein-Interaktionen eingehen kann.

Der starke Phänotyp dieses neuen LFY-Allels kann durch die kombinatorische Wirkung eines nicht mehr an die DNA bindenden, aber mit anderen Faktoren interagierenden Transkriptionsfaktor erklärt werden. Dadurch geht nicht nur die LFY-Funktion verloren, sondern es wird auch die Funktionalität der Interaktoren reduziert.

6 Literaturverzeichnis

Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseeuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry, and J. R. Ecker. 2003. 'Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana', *Science*, 301: 653-7.

Alvarez, J., C. L. Guli, X. H. Yu, and D. R. Smyth. 1992. 'Terminal-Flower - a Gene Affecting Inflorescence Development in Arabidopsis-Thaliana', *Plant Journal*, 2: 103-16.

Belling, J. 1933. 'Crossing over and Gene Rearrangement in Flowering Plants', *Genetics*, 18: 388-413.

Bernard, P., and M. Couturier. 1992. 'Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes', *J Mol Biol*, 226: 735-45.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. 'Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms', *Am J Hum Genet*, 32: 314-31.

Bowman, J. L., J. Alvarez, D. Weigel, E. M. Meyerowitz, and D. R. Smyth. 1993. 'Control of flower development in Arabidopsis thaliana by APETALA1 and interacting genes', *Development*, 119: 721-43.

Bowman, J. L., G. N. Drews, and E. M. Meyerowitz. 1991. 'Expression of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene Agamous Is Restricted to Specific Cell-Types Late in Flower Development', *Plant Cell*, 3: 749-58.

Bowman, J. L., D. R. Smyth, and E. M. Meyerowitz. 1989. 'Genes Directing Flower Development in Arabidopsis', *Plant Cell*, 1: 37-52.

Bradley, D., O. Ratcliffe, C. Vincent, R. Carpenter, and E. Coen. 1997. 'Inflorescence commitment and architecture in Arabidopsis', *Science*, 275: 80-83.

Brand, L. H., C. Henneges, A. Schussler, H. U. Kolukisaoglu, G. Koch, N. Wallmeroth, A. Hecker, K. Thurow, A. Zell, K. Harter, and D. Wanke. 2013. 'Screening for protein-DNA interactions by automatable DNA-protein interaction ELISA', *PLoS One*, 8: e75177.

Brand, L. H., T. Kirchler, S. Hummel, C. Chaban, and D. Wanke. 2010. 'DPI-ELISA: a fast and versatile method to specify the binding of plant transcription factors to DNA in vitro', *Plant Methods*, 6: 25.

Drews, G. N., J. L. Bowman, and E. M. Meyerowitz. 1991. 'Negative Regulation of the Arabidopsis Homeotic Gene Agamous by the Apetala2 Product', *Cell*, 65: 991-1002.

Dunn, Olive Jean. 1961. 'Multiple Comparisons Among Means', *Journal of the American Statistical Association*, 56: 52-64.

Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. 'A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis', *Nucleic Acids Res*, 19: 1349.

Elgass, K., K. Caesar, F. Schleifenbaum, Y. D. Stierhof, A. J. Meixner, and K. Harter. 2009. 'Novel application of fluorescence lifetime and fluorescence microscopy enables quantitative access to subcellular dynamics in plant cells', *PLoS One*, 4: e5716.

Fischer, S. M., A. Boser, J. P. Hirsch, and D. Wanke. 2016. 'Quantitative Analysis of Protein-DNA Interaction by qDPI-ELISA', *Methods Mol Biol*, 1482: 49-66.

Fischer, Stefan M., Alexander Böser, Jan P. Hirsch, and Dierk Wanke. 2016. 'Quantitative Analysis of Protein–DNA Interaction by qDPI-ELISA.' in Reinhard Hehl (ed.), *Plant Synthetic Promoters: Methods and Protocols* (Springer New York: New York, NY).

Grefen, C., N. Donald, K. Hashimoto, J. Kudla, K. Schumacher, and M. R. Blatt. 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', *Plant Journal*, 64: 355-65.

Hames, C., D. Ptchelkine, C. Grimm, E. Thevenon, E. Moyroud, F. Gerard, J. L. Martiel, R. Benlloch, F. Parcy, and C. W. Muller. 2008. 'Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins', *EMBO J*, 27: 2628-37.

Hanahan, D. 1983. 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids', *J Mol Biol*, 166: 557-80.

Harter, K., A. J. Meixner, and F. Schleifenbaum. 2012. 'Spectro-Microscopy of Living Plant Cells', *Molecular Plant*, 5: 14-26.

Hecker, A., N. Wallmeroth, S. Peter, M. R. Blatt, K. Harter, and C. Grefen. 2015. 'Binary 2in1 Vectors Improve in Planta (Co)localization and Dynamic Protein Interaction Studies', *Plant Physiology*, 168: 776-+.

Huala, E., and I. M. Sussex. 1992. 'Leafy Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate Arabidopsis Floral Development', *Plant Cell*, 4: 901-13.

Irish, V. F., and I. M. Sussex. 1990. 'Function of the Apetala-1 Gene during Arabidopsis Floral Development', *Plant Cell*, 2: 741-53.

Ito, T., R. Motohashi, T. Kuromori, S. Mizukado, T. Sakurai, H. Kanahara, M. Seki, and K. Shinozaki. 2002. 'A new resource of locally transposed Dissociation elements for screening gene-knockout lines in silico on the Arabidopsis genome', *Plant Physiol*, 129: 1695-9.

James, G. V., V. Patel, K. J. V. Nordstrom, J. R. Klasen, P. A. Salome, D. Weigel, and K. Schneeberger. 2013. 'User guide for mapping-by-sequencing in Arabidopsis', *Genome Biology*, 14.

Jares-Erijman, E. A., and T. M. Jovin. 2003. 'FRET imaging', *Nature Biotechnology*, 21: 1387-95.

Kempin, S. A., B. Savidge, and M. F. Yanofsky. 1995. 'Molecular-Basis of the Cauliflower Phenotype in Arabidopsis', *Science*, 267: 522-25.

Konieczny, A., and F. M. Ausubel. 1993. 'A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers', *Plant Journal*, 4: 403-10.

Kover, P. X., W. Valdar, J. Trakalo, N. Scarcelli, I. M. Ehrenreich, M. D. Purugganan, C. Durrant, and R. Mott. 2009. 'A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to fine-map quantitative traits in Arabidopsis thaliana', *PLoS Genet*, 5: e1000551.

Krizek, B. A., and J. C. Fletcher. 2005. 'Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide', *Nature Reviews Genetics*, 6: 688-98.

Kuromori, T., T. Hirayama, Y. Kiyosue, H. Takabe, S. Mizukado, T. Sakurai, K. Akiyama, A. Kamiya, T. Ito, and K. Shinozaki. 2004. 'A collection of 11 800 single-copy Ds transposon insertion lines in Arabidopsis', *Plant Journal*, 37: 897-905.

Kuromori, T., T. Wada, A. Kamiya, M. Yuguchi, T. Yokouchi, Y. Imura, H. Takabe, T. Sakurai, K. Akiyama, T. Hirayama, K. Okada, and K. Shinozaki. 2006. 'A trial of phenome analysis using 4000 Ds-insertional mutants in gene-coding regions of Arabidopsis', *Plant Journal*, 47: 640-51.

Larebeke, N. Van, G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. 'Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability', *Nature*, 252: 169-70.

Lee, I., D. S. Wolfe, O. Nilsson, and D. Weigel. 1997. 'A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS', *Current Biology*, 7: 95-104.

Liu, C., W. Y. Xi, L. S. Shen, C. P. Tan, and H. Yu. 2009. 'Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes', *Developmental Cell*, 16: 711-22.

Mandel, M. A., C. Gustafsonbrown, B. Savidge, and M. F. Yanofsky. 1992. 'Molecular Characterization of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene Apetala1', *Nature*, 360: 273-77.

Mandel, M. A., and M. F. Yanofsky. 1995. 'A Gene Triggering Flower Formation in Arabidopsis', *Nature*, 377: 522-24.

Mendel, G. 1965. 'Experiments in Plant Hybridization', *British Medical Journal*, 1: 370-&.

Miwa, H., S. Betsuyaku, K. Iwamoto, A. Kinoshita, H. Fukuda, and S. Sawa. 2008. 'The Receptor-Like Kinase SOL2 Mediates CLE Signaling in Arabidopsis', *Plant and Cell Physiology*, 49: 1752-57.

Mizukami, Y., and H. Ma. 1997. 'Determination of Arabidopsis floral meristem identity by AGAMOUS', *Plant Cell*, 9: 393-408.

Müller, Andreas. 1961. 'Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh', *Die Kulturpflanze*, 9: 364-93.

Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures', *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97.

Neff, M. M., E. Turk, and M. Kalishman. 2002. 'Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis', *Trends Genet*, 18: 613-5.

Ohmi, Yuhsuke, Wataru Ise, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Hidehiro Fukuyama, Yoshihiro Baba, Masashi Narazaki, Hirofumi Shoda, Nobunori Takahashi, Yuki Ohkawa, Shuting Ji, Fumihiro Sugiyama, Keishi Fujio, Atsushi Kumanogoh, Kazuhiko Yamamoto, Nana Kawasaki, Tomohiro Kurosaki, Yoshimasa Takahashi, and Koichi Furukawa. 2016. 'Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis', *Nature Communications*, 7: 11205.

Pacurar, D. I., M. L. Pacurar, N. Street, J. D. Bussell, T. I. Pop, L. Gutierrez, and C. Bellini. 2012. 'A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven Arabidopsis accessions', *J Exp Bot*, 63: 2491-501.

Padmanabhan, S., and R. L. Baldwin. 1994. 'Tests for Helix-Stabilizing Interactions between Various Nonpolar Side-Chains in Alanine-Based Peptides', *Protein Science*, 3: 1992-97.

Parcy, F., O. Nilsson, M. A. Busch, I. Lee, and D. Weigel. 1998. 'A genetic framework for floral patterning', *Nature*, 395: 561-66.

Pastore, J. J., A. Limpuangthip, N. Yamaguchi, M. F. Wu, Y. Sang, S. K. Han, L. Malaspina, N. Chavdaroff, A. Yamaguchi, and D. Wagner. 2011. 'LATE MERISTEM IDENTITY2 acts together with LEAFY to activate APETALA1', *Development*, 138: 3189-98.

Pidkowich, M. S., J. E. Klenz, and G. W. Haughn. 1999. 'The making of a flower: control of floral meristem identity in IT>Arabidopsis/IT>', *Trends Plant Sci*, 4: 64-70.

Ratcliffe, O. J., I. Amaya, C. A. Vincent, S. Rothstein, R. Carpenter, E. S. Coen, and D. J. Bradley. 1998. 'A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants', *Development*, 125: 1609-15.

Salome, P. A., K. Bomblies, J. Fitz, R. A. Laitinen, N. Warthmann, L. Yant, and D. Weigel. 2012. 'The recombination landscape in Arabidopsis thaliana F2 populations', *Heredity (Edinb)*, 108: 447-55.

Sambrook, Joseph, Edward F Fritsch, and Tom Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold spring harbor laboratory press).

Schleifenbaum, F., K. Elgass, M. Sackrow, K. Caesar, K. Berendzen, A. J. Meixner, and K. Harter. 2010. 'Fluorescence intensity decay shape analysis microscopy (FIDSAM) for quantitative and sensitive live-cell imaging: a novel technique for fluorescence microscopy of endogenously expressed fusion-proteins', *Mol Plant*, 3: 555-62.

Schneeberger, K. 2014. 'Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens', *Nature Reviews Genetics*, 15: 662-76.

Schneeberger, K., S. Ossowski, C. Lanz, T. Juul, A. H. Petersen, K. L. Nielsen, J. E. Jorgensen, D. Weigel, and S. U. Andersen. 2009. 'SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing', *Nature Methods*, 6: 550-51.

Schultz, E. A., and G. W. Haughn. 1991. 'Leafy, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis', *Plant Cell*, 3: 771-81.

Shannon, S., and D. R. Meekswagner. 1991. 'A Mutation in the Arabidopsis Tfl1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development', *Plant Cell*, 3: 877-92.

Shinya, T., I. Galis, T. Narisawa, M. Sasaki, H. Fukuda, H. Matsuoka, M. Saito, and K. Matsuoka. 2007. 'Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism', *Plant and Cell Physiology*, 48: 1404-13.

Siriwardana, N. S., and R. S. Lamb. 2012a. 'A conserved domain in the N-terminus is important for LEAFY dimerization and function in Arabidopsis thaliana', *Plant Journal*, 71: 736-49.

———. 2012b. 'The poetry of reproduction: the role of LEAFY in Arabidopsis thaliana flower formation', *International Journal of Developmental Biology*, 56: 207-21.

Sun, H. Q., and K. Schneeberger. 2015. 'SHOREmap v3.0: Fast and Accurate Identification of Causal Mutations from Forward Genetic Screens', *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols, 2nd Edition*, 1284: 381-95.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350-4.

Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre, and D. Baulcombe. 2003. 'An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus', *Plant Journal*, 33: 949-56.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and et al. 1995. 'AFLP: a new technique for DNA fingerprinting', *Nucleic Acids Res*, 23: 4407-14.

Weigel, D., J. Alvarez, D. R. Smyth, M. F. Yanofsky, and E. M. Meyerowitz. 1992. 'LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis', *Cell*, 69: 843-59.

Weigel, D., and O. Nilsson. 1995. 'A Developmental Switch Sufficient for Flower Initiation in Diverse Plants', *Nature*, 377: 495-500.

Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers', *Nucleic Acids Res*, 18: 6531-5.

Williams, J. G., R. S. Reiter, R. M. Young, and P. A. Scolnik. 1993. 'Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers', *Nucleic Acids Res*, 21: 2697-702.

Winter, C. M., R. S. Austin, S. Blanvillain-Baufume, M. A. Reback, M. Monniaux, M. F. Wu, Y. Sang, A. Yamaguchi, N. Yamaguchi, J. E. Parker, F. Parcy, S. T. Jensen, H. Li, and D. Wagner. 2011. 'LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response', *Dev Cell*, 20: 430-43.

Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson, and N. J. Provart. 2007. 'An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets', *PLoS One*, 2.

Wu, X., J. R. Dinneny, K. M. Crawford, Y. Rhee, V. Citovsky, P. C. Zambryski, and D. Weigel. 2003. 'Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex', *Development*, 130: 3735-45.

Zabeau, M., and P. Vos. 1993. "Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting." In.: Google Patents.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne Mohrholz
Geburtsdatum und Ort	19.04.1985, Suhl
Nationalität	deutsch

Ausbildung

seit 10/2010	Doktorarbeit in der molekularen Pflanzenbiologie Universität Tübingen Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Pflanzenphysiologie, AG Harter
10/2004 bis 08/2010	Diplomstudium und Diplomarbeit Universität Tübingen Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Pflanzenphysiologie, AG Harter Titel: Molekularbiologische Charakterisierung der putativen MAP Kinase Kinase Kinasen Raf42 und Raf43 aus Arabidopsis thaliana und Analyse des putativ bidirektionalen Promotors
08/1995 bis 03/2004	Abitur Integrierte Gesamtschule Mainz

Stipendien

11/2010 - 10/2013	Promotionsstipendium nach dem Landes-graduierten-förderungsgesetz (LGFG) innerhalb eines Promotions¬verbundes
02/2014 & 07/2015	Reinhold-und-Maria-Teufel-Stiftung Finanzierung zweier Tagungsteilnahmen
02/2016	Klaus und Regina Großman-Stiftung Finanzierung einer Tagungsteilnahme

8 Anhang

A 1: Auflistung der verwendeten Primer

Überprüfung der DNA

			bp cDNA	bp gDNA
AM-Act2	S	ATGGCTGAGGCTGATGATATT	960	1060
AM-Act2	A	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC		

Überprüfung der Transposoninsertion

AM_Riken-Transp-Rev	CGATTTCGACTTTAACCCGACCGG
Transposon Det	CCGGTCGGGTTAAAGTCGAA
Transposon hinten raus (fwd)	cgtttccgtttccgtttacc
DS3-4 H-edge	TACCTCGGGTTCGAAATCGAT
DS5-3 G-edge	CCGTCCCGCAAGTTAAATATG

Klassisches Mapping

Marker		Sequenz	Marker	bp Col-0	bp No-0
7_1-8660	S	GCGGCACAACCTAAATGAAA	INDEL	189	168
	A	TGCATGCAATTATCACGTATG			
15_1-26627	S	GCAATTCATCAGCAGGAGGT	INDEL	245	261
	A	ATCAGGGAGCAAAATGCAAG			
20_2-12717	S	AAAATGGGGCCTAATACGTTG	INDEL	403	~180
	A	CAAAGGAAACACCTGCATCA			
4_3-3716	S	TAATGGTGGCCCAATCTCAT	INDEL	1482	613
	A	AATTCCAAATGGAGCCACAA			
16_3-20726	S	GGGCCCATTTCAACTAAGGA	INDEL	149	~160
	A	TCTCACAAGCCCAGTAAAAACT			
42_4-17544	S	CACCATTGACATTTGATGCAC	INDEL	214	234
	A	CCGTAGCTCCATTGGCTTAT			
1_5-1576	S	CAGCTCCGACGATGATGATA	INDEL	363	~420
	A	TGGAGTAATTGTTCCTTCACAAA			
37_5-22317	S	GCATTGAAATAGTGTTTTTAACCAAA	INDEL	132	152
	A	TGTTGGTTGCCACCTTATCA			

				Enzym		
19_5-17388	S	TTTTGCAAGTCCGTAGTCAATG	INDEL		110	121
	A	TTTGGTTTTGGAATTTCTTTTG				
35_5-19138	S	AACTCATGCAATGCGACATC	INDEL		182	164
	A	CCCGTCCATGATCTGTTTCT				
37_5-22317	S	GCATTGAAATAGTGTTTTTAACCAAA	INDEL		132	152
	A	TGTTGGTTGCCACCTTATCA				
S5-16	S	CACGAGAGATACctgcaaaacag	dCAP	DraII	160	134+26
	A	CAAACGCTTTTGAAATCATGGGT**C**C				
S5-24	S	GTAATACACAACAATGGGGAG	dCAP	Esp3I	244+43+26	287+26
	A	catattcgagttctgatgcacac				
5-LFY	S	TATCTGTTCCACTTGTACGAA**GT**AT	dCAP	AccI	150	129+21
	A	CATAAATTTCAAGATAATGAACGGTC				
5-LFY#2	S	TATCTGTTCCACTTGTACGAA**GC**AT	dCAP	SphI	129+21	150
	A	siehe 5-LFY				

Klonierung der LFY cDNA-Konstrukte

LFY-Fwd-cacc	caccATGGATCCTGAAGGTTTCACG
LFY-Rev_ohneStop	GAAACGCAAGTCGTCGCCG

GATC sequenzierung

M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC
pDonor-FP	TAACGCTAGCATGGATCTC
pDonor-RP	GCAATGTAACATCAGAGAT
LFY-intern-seqFw	GTACGAGGATTAATGTC

qDPI-ELISA

ELISA-AP1-F-Biotin	aaaaaGAAG*GACCA**G**TGG*TCCGTACaaaaa
ELISA-AP1-R	ttttGTACGGACCACTGGTCCTTCttttt
ELISA-AP1m3-F-Biotin	aaaaaGAAGGAAAA**G**TAATCCGTACaaaaa
ELISA-AP1m3-R	ttttGTACGGATTACTTTTCCTTCttttt
C28M12-F-Biotin	aaaaaaTTTATACTTGATCATaaCTTaaaa
C28M12-R	ttttAAGttATGATCAAGTATAAAttttt

A 2: Verwendete Vektoren

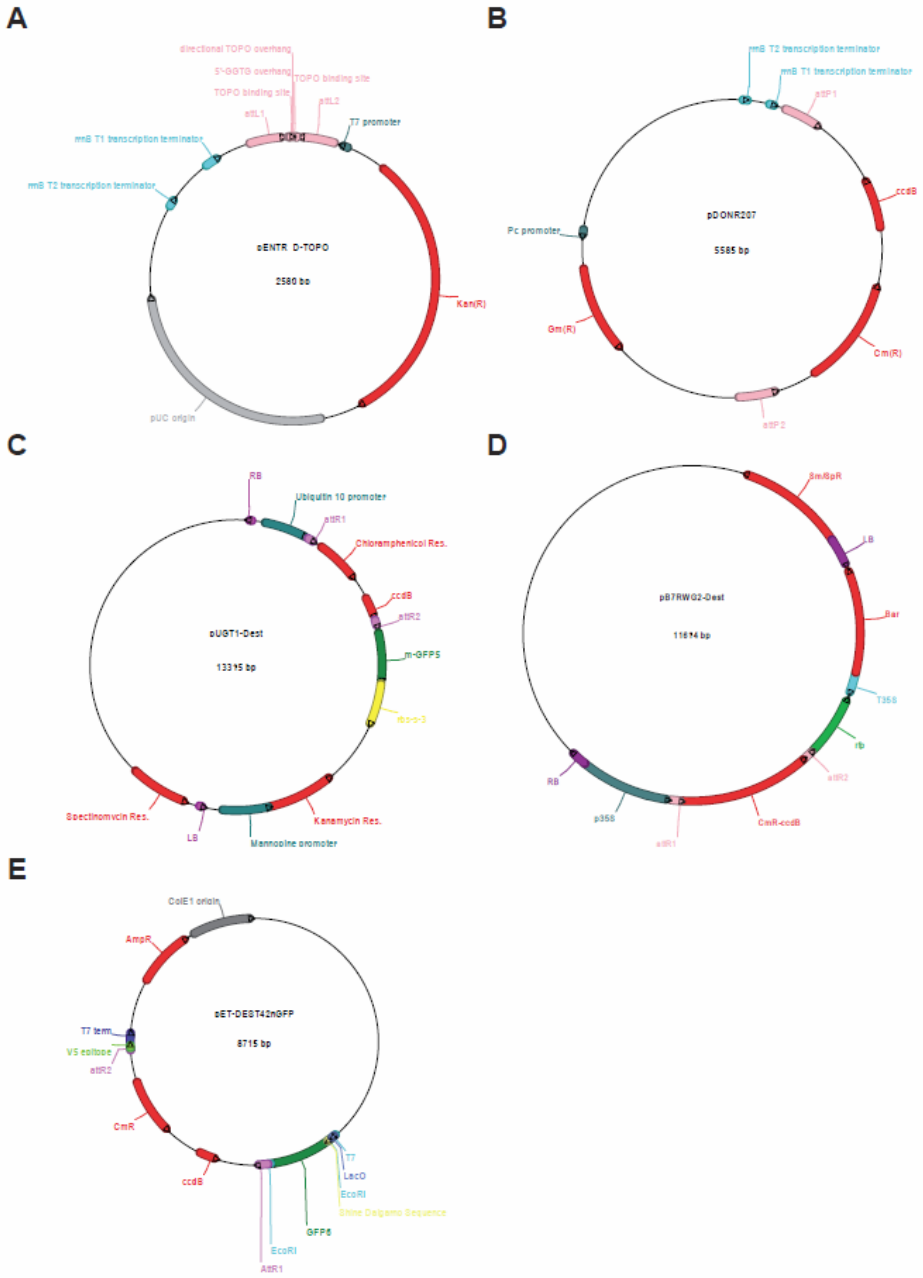

Abb. A 2: Schematische Illustrationen der verwendeten Vektoren. (A) Der pENTR/D-Topo (Thermo Scientific™) ist ein Entry-Klon für die Gateway-Klonierung. (B) Der pDONR™207 (Invitrogen, D) ist ebenfalls ein Entry-Klon für die Gateway-Klonierung. Er vermittelt allerdings in Bakterien eine Resistenz Gentamycin, was in kompatiebler zu den meisten Destination-Klonen macht. (C) Der pUGT1-Dest (A. Hahn) ist ein binärer Vektor, welcher eine C-terminale GFP-Fusion unter einem UBQ10-Promotor vermittelt. (D) Der pB7RWG2-Dest (P. Hilson, R. Tsien), ebenfalls ein binärer Vektor, vermittelt eine C-terminale RFP-Fusion unter einem 35S-Promotor. (D) Der pET-Dest42nGFP (L. Brand) ist ausschließlich für die Expression in *E. coli* gedacht und vermittelt eine N-terminale GFP-Fusion

A 3: Blüte der SALK_073291 Linie

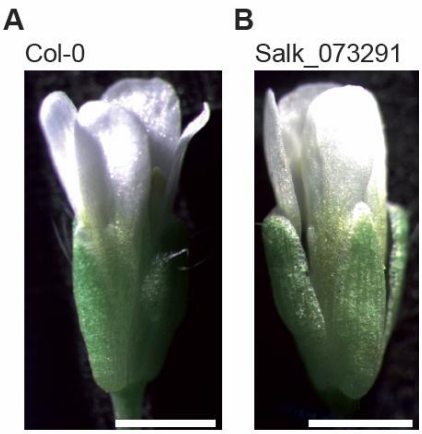

Abb. A 3: Blütenphänotyp der Linie SALK_073291. Gezeigt ist sind je ein Bild einer repräsentativen Blüte von Col-0 (A) und der Linie SALK_073291 (B). Bei den Blüten ist kein Unterschied in der Größe oder der Ausbildung der Blütenorgane zu erkennen. Größenstandard: 1mm

Danksagung

Ich möchte mich bei Klaus Harter für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Danke Klaus, dass Du uns so sein lässt, wie wir sind. Zudem bedanke ich mich für die Erstellung des Erstgutachtens.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens danke ich Prof. Dr. Claudia Oecking.

Danke Üner Kolukisaoglu, das Du immer mit Rat und Tat zur Stelle warst, auch und vor allem, wenn mal wieder was nicht so lief … und das kam ja hin und wieder vor.

Ein großer Dank gilt auch Bay 7 & 8. Ihr seid wirklich ein super Team, mit dem ich immer gerne zusammengearbeitet habe. Vor allem, aber nicht ausschließlich möchte ich hierbei Danke an Rebecca Dautel, Nina Jaspert (unser Satellit), Michael Heunemann, Andreas Hecker, Stefan Fischer, Natalie Krieger, Nina Glöckner und Juan Suarez sagen. Danke für den vielen Spaß im Lab, ohne den manche Tage noch härter gewesen wären, als sie es ohnehin schon waren.

Und ein riesen Danke an das Gärtnereiteam Johanna Schröter, Gert Huber und Sofia Riegger. Ohne Euch wären meine Pflänzchen nie so super gewachsen!

Bei Korbinian Schneeberger und Hequan Sun vom MPI in Köln möchte ich mich für die reibungslose und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Identifikation der Mutation bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Pflanzenphysiologen für die ständige Hilfsbereitschaft, die Offenheit und die tolle Arbeitsatmosphäre auf der Etage bedanken.

Frank … auch Dir ein riesen Danke dafür, dass Du mich die letzte Zeit so tapfer ertragen hast (und hoffentlich auch noch lange ertragen wirst).

Ein sehr großer Dank gilt vor allem meinen Eltern. Ohne das Wissen um das Rettungsnetz, welches mich immer auffangen würde, wäre vieles dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass es Euch gibt.