

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung eines an der
Trichomentwicklung beteiligten MYB-Transkriptionsfaktors aus
*Nicotiana benthamiana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ursula Schäfer

geb. am 13. April 1971 in Augsburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. T.M. Kutchan, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle
2. Prof. Dr. M. Hülskamp, Universität Köln

verteidigt am 12. Juli 2005 in Halle an der Saale

urn:nbn:de:gbv:3-000008938

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008938>]

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	I
1.1 Trichome	1
1.1.1 Funktion, Bedeutung und Inhaltsstoffe der Trichome	1
1.1.1.1 Trichome ohne Drüsenfunktion (einfache Trichome).....	2
1.1.1.2 Trichome mit Drüsenfunktion (sezernierende Trichome).....	2
1.1.2 Entwicklung der Trichome unter Berücksichtigung der beteiligten Gene	3
1.1.2.1 Entwicklung eines einfachen Blatt-Trichoms von <i>A. thaliana</i>	4
1.1.2.2 An der Trichomentwicklung beteiligte Gene von <i>A. thaliana</i>	4
1.1.2.3 Andere an der Trichomentwicklung beteiligte Faktoren.....	7
1.1.2.4 Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion	7
1.1.2.5 Molekularer Hintergrund der Entwicklung von Trichomen	
mit Drüsenfunktion	8
1.1.3 Trichome unterschiedlicher <i>Nicotiana</i> -Arten.....	10
1.2 Transkriptionsfaktoren	11
1.2.1 Definition	11
1.2.2 Regulation der Genexpression	11
1.2.3 Die Transkription und ihre Regulation.....	11
1.2.4 MYB-Transkriptionsfaktoren.....	13
1.2.4.1 Kennzeichen der MYB-Transkriptionsfaktoren.....	13
1.2.4.2 Evolution und Vorkommen der MYB-Transkriptionsfaktoren.....	15
1.2.4.3 MYB-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen.....	15
1.3 Ausschalten von Genen.....	18
1.3.1 Ziel des Ausschaltens von Genen.....	18
1.3.2 „RNA interference“	18
1.3.3 Gezieltes Ausschalten von Genen mit Hilfe von RNAi.....	20
1.3.3.1 VIGS.....	20
1.3.3.2 Transformation mit einem „RNAi-Konstrukt“	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Pflanzen	22
2.1.2 Bakterien	23
2.1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	23
2.1.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23

2.1.3	Oligonucleotide	24
2.1.4	Vektoren	25
2.1.5	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	26
2.1.6	Geräte	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	28
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.2.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA.....	29
2.2.1.4	Isolierung von messenger-RNA	30
2.2.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelpurifikation).....	30
2.2.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
2.2.3	Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.2.4	Sequenzierung von DNA	31
2.2.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	31
2.2.5.1	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen.....	31
2.2.5.2	Ligation	31
2.2.5.3	Anhängen von 3'-A-Überhängen (Taq-tailing).....	32
2.2.5.4	Reverse Transkription	32
2.2.5.5	<i>In vitro</i> Transkription	32
2.2.6	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	33
2.2.6.1	Herstellung kompetenter Zellen	33
2.2.6.2	Transformation kompetenter Zellen.....	33
2.2.7	RACE	34
2.2.8	GenomeWalking.....	34
2.2.9	Gelelektrophorese.....	35
2.2.9.1	Trennung von DNA über Agarosegele.....	35
2.2.9.2	Trennung von RNA über Agarosegele.....	35
2.2.10	Blotting.....	35
2.2.10.1	Southern-Blot	35
2.2.10.2	Northern-Blot	36
2.2.11	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	36
2.2.12	Hybridisierung.....	36
2.2.12.1	Hybridisierung der Southern-Blots	36

2.2.12.2	Hybridisierung der Northern-Blots	36
2.2.13	Isolierung von Trichomen	36
2.2.14	Transfektion von <i>N. benthamiana</i> mit Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	37
2.2.15	Infiltration von <i>N. benthamiana</i>	37
2.2.16	Transformation von <i>N. benthamiana</i>	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Blattoberfläche von	
	<i>N. benthamiana</i>	39
3.2	Isolierung und Klonierung von MYB-Transkriptionsfaktoren aus	
	<i>N. benthamiana</i>	40
3.2.1	Amplifikation von Teilsequenzen verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren aus cDNA von <i>N. benthamiana</i>	40
3.2.2	Amplifikation der 3'-Enden verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren mittels RACE	41
3.3	Virus-induziertes Ausschalten der sechs aus <i>N. benthamiana</i> isolierten	
	MYB-Transkriptionsfaktoren.....	44
3.3.1	VIGS mittels Tabakmosaikvirus (TMV).....	44
3.3.2	VIGS mittels Tobacco-Rattle-Virus (TRV)	45
3.3.3	Silencing-Nachweis mit RT-PCR bei pTV-Pflanzen.....	51
3.3.4	Vergleich der mit TMV und TRV infizierten Pflanzen	52
3.4	Isolierung des 5'-Endes von <i>mybtri5</i> mittels GenomeWalking	
	und Amplifikation des Volllängeklons	53
3.5	Ermittlung der Kopienzahl und Expressionsanalysen von <i>mybtri5</i>.....	57
3.5.1	Southern Blot-Analysen zur Ermittlung der Kopienzahl von <i>mybtri5</i>	57
3.5.2	Expressionsanalysen von <i>mybtri5</i> mittels Northern Blot.....	57
3.6	Ausschalten von <i>mybtri5</i> mittels einer Transformation mit einem	
	RNAi-Konstrukt	61
3.6.1	Herstellung eines RNAi-Konstrukts von <i>mybtri5</i>	62
3.6.2	Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit einem RNAi-Konstrukt von	
	<i>mybtri5</i>	66
3.6.2.1	Nachweis der Transgenität mittels PCR- und Southern Blot-Analysen	67
3.6.2.2	Phänotyp der RNAi-Pflanzen.....	69
3.6.2.3	Quantifizierung der Trichome	74
3.6.2.4	Northern Blot zur <i>mybtri5</i> -Expression von Wildtyp- und RNAi-Pflanzen..	75

4	Diskussion.....	77
4.1	Trichome als Ansatzpunkt für „Metabolic Engineering“	77
4.2	Sequenzanalyse der aus <i>N. benthamiana</i> isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren.....	79
4.3	Funktionsanalyse von <i>mybtri5</i>	81
4.3.1	Ausschalten von <i>mybtri5</i> mittels VIGS.....	81
4.3.1.1	Phänotyp.....	81
4.3.1.2	Silencing-Nachweis.....	83
4.3.2	Ausschalten von <i>mybtri5</i> mittels eines RNAi-Konstrukts	84
4.3.2.1	Phänotyp.....	84
4.3.2.2	Silencing-Nachweis.....	85
4.3.3	Vergleich der VIGS-Pflanzen mit den RNAi-Pflanzen	85
4.3.4	Expressionsanalyse von <i>mybtri5</i>	86
4.3.5	Funktion von MYBTRI5.....	87
4.4	Ergebnis der Arbeit im Kontext mit anderen Arbeiten.....	88
4.5	Weiterführende Arbeiten	91
5	Zusammenfassung.....	93
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Anhang.....	101
7.1	DNA-Teilsequenzen, der in dieser Arbeit isolierten <i>myb</i>-cDNAs	101
7.2	Für den Stammbaum und den Aminosäuresequenzvergleich verwendete Proteinsequenzen	103
7.3	Ergebnisse der Trichomazählungen	104

Abkürzungsverzeichnis

Acetosyringin	3,5 Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon
amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dNTP	2' Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig (double-stranded)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Sunde(n) (hour)
kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
KOAc	Kaliumacetat
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
F	Faraday
M	molar
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat Heptahydrat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potentia hydrogenii
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
rNTP	Ribonukleotid-5'-Triphosphat
Rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
ss	einzelsträngig (single-stranded)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett

V	Volt
v.a.	vor allem
Vol	Volumen
z. B.	zum Beispiel
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Abkürzungen für Aminosäuren:

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

1 Einleitung

1.1 Trichome

Trichome sind seit der Entwicklung von Mikroskopen ein interessantes Forschungsgebiet für Botaniker. Bei Trichomen handelt es sich um einzellige oder mehrzellige Auswüchse der Epidermis mit oder ohne Fähigkeit zur Sekretion. Sie werden auch häufig als Pflanzenhaare bezeichnet. Trichome, die eine Sekretion aufweisen, werden als Trichome mit Drüsenfunktion bezeichnet im Gegensatz zu den einfachen Trichomen ohne Drüsenfunktion. Eine funktionelle Abgrenzung gegen Emergenzien ist nicht möglich. Der Unterschied zwischen Emergenzien und Trichomen liegt in ihrem gewebespezifischen Ursprung. Emergenzien werden im Gegensatz zu Trichomen nicht nur aus Epidermiszellen, sondern auch aus subepidermalem Gewebe gebildet (Strasburger *et al.*, 1991; Hallahan *et al.*, 2000). Einfache Trichome kommen auf fast allen Angiospermen und auf einigen Gymnospermen und Bryophyten vor (Uphof, 1962; Johnson, 1975). Trichome mit Drüsenfunktion finden sich auf 30% aller Gefäßpflanzen (Dell and McComb, 1978; Fahn, 2000). Sowohl alle vegetativen als auch alle reproduktiven Pflanzenteile können Trichome aufweisen. Allerdings handelt es sich bei Trichomen, die an unterirdischen Pflanzenteilen vorkommen, fast ausschließlich um Wurzelhaare (Werker, 2000).

Anfangs galt das Interesse für Trichome v.a. ihrer morphologischen und strukturellen Vielfalt. Dies hat sich im Laufe der Zeit gewandelt und auf die Erforschung der Trichome im Hinblick auf ihre Ultrastruktur, die Biochemie ihrer Inhaltsstoffe, ihre Differenzierung und Entwicklung, ihre physiologische und ökologische Funktion ausgedehnt (Hallahan *et al.*, 2000). Diesbezüglich stellen Trichome ein gutes Untersuchungssystem dar, da Trichome und auch die Stoffe, die sie sezernieren, relativ einfach isoliert werden können. Außerdem ist es für molekular-genetische Versuche von Vorteil, dass Trichome für die Pflanze unter Laborbedingungen meist nicht essentiell sind. Trichome sind meist gut sichtbar, wodurch Veränderungen leicht bemerkt werden können.

Da es in den oben genannten Bereichen noch viele offene Fragen gibt, stellen Trichome ein aktuelles Forschungsgebiet dar.

1.1.1 Funktion, Bedeutung und Inhaltsstoffe der Trichome

Trichome erfüllen in Abhängigkeit ihrer Lage auf der Pflanze und ihrer unterschiedlichen Morphologie vielfältige Aufgaben. Auf einer Pflanze können sich unterschiedliche

Trichomtypen mit verschiedenen Funktionen befinden. Je nach Entwicklungsstadium einer Pflanze oder eines Pflanzenorgans können Trichome zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt von unterschiedlich großer Bedeutung sein.

Trichome werden in zwei große Gruppen eingeteilt, in Trichome mit Drüsenfunktion und in Trichome ohne Drüsenfunktion. Da mit dieser Einteilung meist auch ein funktioneller Unterschied verbunden ist, sollen beide Gruppen getrennt voneinander besprochen werden.

1.1.1.1 Trichome ohne Drüsenfunktion (einfache Trichome)

Einfache Trichome können unterschiedliche Aufgaben besitzen je nach morphologischen und mechanischen Eigenschaften und je nach ihrer Lage auf der Pflanze. Derbe Borstenhaare zum Beispiel dienen häufig als Fraßschutz, wobei hier meist eine verkieselte Zellwand vorliegt. Eine dichte Behaarung kann die Transpiration beeinflussen. Auch tote Trichome besitzen oft noch eine bedeutende Funktion, z.B. als UV-Schutz. Trichome auf Samen spielen meist eine Rolle bei der Verbreitung der Samen durch den Wind oder durch Tiere, sie können aber auch dazu dienen die Samen im Boden zu verankern. Epiphytisch wachsende Pflanzen oder Pflanzen, die unter trockenen Bedingungen wachsen, besitzen Trichome, mit deren Hilfe die Pflanzen Wasser aus Nebel und Tau nutzen können. Außerdem gibt es einfache Trichome, die als hakige Klimmhaare ausgebildet werden (Strasburger *et al.*, 1991).

Der für den Menschen wohl bedeutendste und bekannteste Vertreter unter den einfachen Trichomen ist die Baumwolle. Die Baumwollfasern dienen der Pflanze zur Verbreitung ihrer Samen.

1.1.1.2 Trichome mit Drüsenfunktion (sezernierende Trichome)

Einige der bereits bei den einfachen Trichomen aufgelisteten Funktionen finden sich auch bei den sezernierenden Trichomen wieder. Die Hauptaufgabe dieser Trichome besteht jedoch im Schutz der Pflanze vor Herbivoren und Pathogenen durch die Produktion und Sekretion von Sekundärmetaboliten (Werker, 2000). Diese Substanzen wirken aufgrund ihrer Toxizität gegen Fraßfeinde und ihrer bakteriziden, viriziden, fungiziden oder allelopathischen (Allelopathie: chemische Hemmung der einen Art durch eine andere) Eigenschaften. Andere Stoffe weisen eine schleimige, klebrige Konsistenz auf und dienen so als „Klebfallen“ (Duke *et al.*, 2000). Auch bei fleischfressenden Pflanzen sind Trichome mit Drüsenfunktion von großer Bedeutung. Sie übernehmen dort wichtige Funktionen beim Anlocken, Fangen, Verdauen der Insekten und bei der Resorption der so erhaltenen Nährstoffe (Werker, 2000).

Aber auch bei anderen Pflanzen sezernieren Trichome Lockstoffe für Insekten (Duke *et al.*, 2000).

Meist handelt es sich um Sekundärstoffe, die in den Trichomen gebildet und gelagert werden. Die größte Gruppe stellen die Terpenoide und deren Derivate dar. Es handelt sich hierbei um Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene und Triterpene (Kelsey *et al.* 1984). Neben Terpenoiden kommen in den Trichomen noch Phenylpropanoide vor. Vertreter der dritten großen Gruppe der pflanzlichen Sekundärstoffe, die Alkaloide, sind in den Trichomen nur sehr selten zu finden (Wagner *et al.*, 2004). Eine weitere Substanzklasse, die in den Trichomen synthetisiert wird, sind Zuckerester von Fettsäuren (Neal *et al.*, 1990).

Viele Eigenschaften dieser Stoffe können für den Menschen von großem Nutzen sein. In den letzten Jahren, in denen wieder vermehrt auf Naturstoffe als Quelle beispielsweise für Pharmazeutika, Nutraceuticals (Lebensmittel, deren Zusatzstoffe pharmakologisch wirken sollen und zur Behandlung oder Vorbeugung von Krankheiten eingesetzt werden; aus Lebensmittellexikon.de, Massholder F.) und Pestizide zurückgegriffen wird, gewinnen die von den Trichomen sezernierten Stoffe zunehmend an Bedeutung (Duke *et al.*, 2000). Ein Beispiel hierfür ist Hypericin, das aus verschiedenen *Hypericum*-species gewonnen wird. Es wird bei leichten Depressionen eingesetzt. Außerdem besitzt es antivirale Eigenschaften und wird von HIV-Patienten oft begleitend eingenommen (Lavie *et al.*, 1995).

Häufig werden zu den Trichomen mit Sekretionsfunktion auch Hydathoden gezählt. Hydathoden dienen der Guttation (Abscheidung flüssigen Wassers in Tropfenform zur Aufrechterhaltung des Wasserstroms in der Pflanze bei wegfallender Transpiration). Es werden zwei Arten von Hydathoden unterschieden, zum einen passive und zum anderen aktive Hydathoden, wobei nur die aktiven zu den Trichomen mit Sekretionsfunktion zählen. Der Funktionsmechanismus der aktiven Hydathoden ist noch nicht geklärt. Der Austritt des Wassers erfolgt unabhängig vom Wurzelndruck. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass osmotisch wirksame Substanzen aktiv nach außen abgeschieden werden und Wasser dann aufgrund der Osmose nach außen diffundiert (Strasburger, 1991).

1.1.2 Entwicklung der Trichome unter Berücksichtigung der beteiligten Gene

Viele entwicklungsbiologische Forschungen wurden an Trichomen durchgeführt, da Trichome leicht zugänglich sind und somit Veränderungen bei Mutanten sehr einfach wahrgenommen werden können. Die meisten Untersuchungen wurden an Trichomen von *Arabidopsis thaliana* gemacht, da es sich hierbei um ein relativ einfaches, uniformes, unter Laborbedingungen nicht essentielles System handelt (Hülkamp und Kirik, 2000). In den

nächsten drei Abschnitten soll auf die Entwicklung der einfachen Trichome von *A. thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* eingegangen werden. Im Anschluss daran werden die Kenntnisse über die Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion und deren molekularer Hintergrund dargestellt.

1.1.2.1 Entwicklung eines einfachen Blatt-Trichoms von *A. thaliana*

Bei den Trichomen von *A. thaliana* handelt es sich um einzellige, einfache Trichome ohne Drüsenfunktion, die sich auf den Blättern, dem Stängel und den Sepalen befinden. Die Trichome auf dem Stängel sind unverzweigt. Die Trichome der Blätter und Sepalen bestehen aus einem einzelnen Stiel, aus dem beim Ökotyp *Landsberg erecta* drei Arme entspringen. Sie stellen eine physikalische Barriere gegen Insekten dar und schützen vermutlich Meristeme und Blatt-Primordien vor Schäden durch UV-Licht (Walker und Marks, 2000).

Erreicht das Blatt-Primordium eine Größe von 100 μm , kann man bereits die Vorläuferzellen der Trichome von den Protodermalzellen unterscheiden. Zu diesem Zeitpunkt besteht zwischen den Trichomen ein Abstand von vier Epidermiszellen, die sich während des Blattwachstums weiter teilen. Zwischen den anfangs angelegten Trichomen entstehen weitere Trichom-Anlagen bis das Blatt-Primordium eine Größe von 600 μm erreicht. Später werden keine weiteren Trichome angelegt (Walker und Marks, 2000). Während sich die Epidermiszellen weiter mitotisch teilen, durchläuft eine Trichomzelle vier Endoreduplikationen, d.h. es findet DNA-Replikation ohne Teilung des Nukleus und der Zelle statt, wodurch das Trichom am Ende einen Chromosomensatz von 32 n besitzt (Hülkamp *et al.*, 1994). Nach der ersten Endoreduplikation verändert die Zelle ihre Wachstumsrichtung und beginnt sich von der Blattoberfläche abzuheben. Die zweite bzw. dritte Endoreduplikation geht mit der ersten bzw. zweiten Verzweigung der Zelle einher. Während des vierten Endoreduplikationszyklus wächst das Trichom zu seiner vollen Größe aus (Schnittger und Hülkamp, 2002). Die Ausrichtung der Arme und der Winkel zwischen ihnen sind genau festgelegt (Hülkamp und Kirik, 2000).

1.1.2.2 An der Trichomentwicklung beteiligte Gene von *A. thaliana*

Wie oben beschrieben, vollzieht sich die Entwicklung von Trichomen auf Blättern nach einem genau festgelegten Ablauf (Zeitpunkt der Trichominitiation). Die Trichome besitzen ein definiertes Erscheinungsbild (Ausrichtung der Verzweigungen), und ihre Verteilung folgt einem bestimmten Muster (Abstand der Trichome zueinander). Diesen genau definierten Abläufen liegt ein Regulationssystem aus Faktoren zugrunde, die die Trichominitiation

fördern, die Entwicklung zum vollständigen Trichom bewirken und andererseits die Ausbildung von Trichomen in direkter Nachbarschaft zu einem anderen Trichom verhindern. Im Folgenden sollen die Funktion der wichtigsten bekannten Gene, die bei diesem Regulationssystem in *A. thaliana* eine Rolle spielen, bzw. die Proteine, für die diese Gene codieren, dargestellt werden.

Die wichtigsten Proteine, die an der Initiation einer Zelle zum Trichom oder der Inhibition der Trichombildung beteiligt sind, sind GLABROUS1 (GL1), GLABRA2 (GL2), GLABRA3 (GL3), ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3), TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1), TRIPTYCHON (TRY), CAPRICE (CPC), ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1).

Bei GL1 handelt es sich um einen R2R3 MYB-Transkriptionsfaktor, bei GL2 um einen Homöobox-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor und bei GL3 und EGL3 um „basic helix-loop-helix“ (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Das Gen *ttg1* codiert für ein WD 40 Protein und die Gene *try*, *cpc* und *etc1* codieren für „single repeat“ MYB-Transkriptionsfaktoren. Larkin *et al.* (2003) versuchen in einem Modell zu erklären, wie es zur Bildung der Trichome mit dem typischen Verteilungsmuster durch das Zusammenspiel der oben erwähnten Gene kommt. Larkin geht davon aus, dass am Anfang jede Protodermalzelle die Kompetenz besitzt ein Trichom auszubilden. Sie exprimieren eine bestimmte Menge an *gl1*, *gl3* und *ttg1*. Diese drei Transkriptionsfaktoren bilden zusammen einen Komplex, der die Transkription von *gl2*, *try* und *cpc* aktiviert. GL2 fördert die Entwicklung der Zelle, in der es gebildet wurde, zur Trichomzelle. TRY und CPC werden über Plasmodesmata in die benachbarten Zellen transportiert. Dort hemmen sie die Bildung des Komplexes aus GL1, GL3 und TTG1 vermutlich dadurch, dass TRY und CPC mit GL1 um die Bindung im Komplex konkurrieren (Serna, 2004). Hierdurch wird die Expression von GL1, GL2, TRY und CPC und vielleicht auch die von GL3 und TTG1 inhibiert. Da der Expressionslevel dieser Gene stochastischen Schwankungen unterliegt, kommt es zu unterschiedlichen Mengen an Transkriptionsfaktoren in den Zellen. Dies führt in den Zellen mit einer höheren Konzentration des Transkriptionskomplexes zu einer vermehrten Expression von TRY und CPC. Das wiederum bewirkt, dass diese Zellen Trichome ausbilden und ihre benachbarten Zellen in der Ausbildung von Trichomen stärker gehemmt werden als sie selbst. Bei diesem Modell von Larkin sind ETC und EGL3 noch nicht berücksichtigt. Da ETC eine Ähnlichkeit von 61% mit TRY und 60% mit CPC aufweist, wirkt es vermutlich auf ähnliche Art und Weise (Kirirk *et al.*, 2004). EGL3 hat zu GL3 eine 75%ige Homologie auf der Proteinebene, wodurch es eine ähnliche Wirkung wie GL3 besitzt (Zhang *et al.*, 2003). Im Folgenden soll nun näher auf das

Zustandekommen des Transkriptionskomplexes und auf die Funktion bzw. Wirkung der einzelnen Faktoren eingegangen werden.

GL3 kann mit seiner bHLH-Domäne im C-terminalen Bereich ein Homodimer (Larkin *et al.*, 2003) bzw. ein Heterodimer mit EGL3 ausbilden (Zhang, 2003). Zwischen den ersten 96 Aminosäuren von GL3 und den MYB-Domänen von GL1 kommt es zu einer starken Interaktion (Payne, 2000). Auch EGL3 kann mit GL1 interagieren (Zhang *et al.*, 2003). Sowohl GL1 als auch GL3 besitzen eine Aktivierungsdomäne für die Transkription bestimmter Gene (Larkin *et al.*, 2003). TTG1 interagiert mit GL3 (Payne, 2000) bzw. EGL3 (Zhang, 2003), nicht aber mit GL1. Somit kommt es, wie in Abb. 1.1 dargestellt, vermutlich zu einem Komplex, bei dem TTG1 mit einem GL3/GL3- bzw. GL3/EGL3-Dimer verbunden ist, das wiederum an GL1 gebunden ist. Über die Aktivierungsdomäne von GL1 und GL3 kommt es dann zur Aktivierung der Transkription von *gl2* und vermutlich auch von *cpc* und *try*. In den Nachbarzellen der Trichome werden anstelle von GL1 CPC bzw. TRY in den Komplex gebunden, wodurch die Transkription verhindert wird.

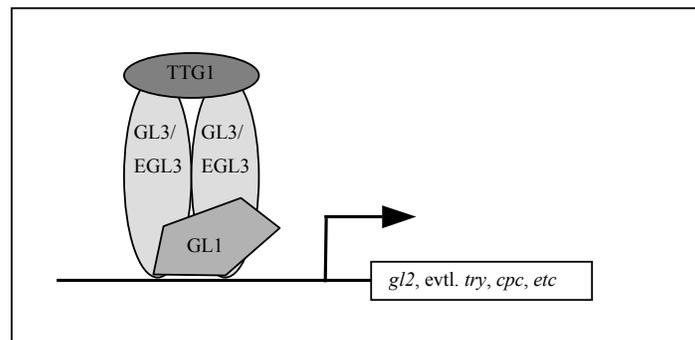


Abb. 1.1: Komplex zur Transkriptionsaktivierung. Der Komplex aus TTG1, GL3/EGL3 und GL1 bewirkt über die Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren GL3/EGL3 und GL1 die Transkription von *gl2* und anderen Genen. Wird GL3/EGL3 durch CPC oder TRY ersetzt, wird die Transkription gehemmt.

Das GL2-Protein spielt bei der Initiation des Trichoms und bei der Entwicklung des Trichoms eine wichtige Rolle, da bei *gl2*-Mutanten kleinere Trichome mit weniger Verzweigungen auftreten und bei einer geringen Überexpression von *gl2* die Zahl der Trichome steigt und teilweise Trichomcluster entstehen (Hülkamp *et al.*, 1994). *Gli*-Mutanten besitzen keine oder nur sehr wenige Trichome (Larkin *et al.*, 2003), woraus man schließen kann, dass GL1 v.a. wichtig für die Trichominitiation ist (Serna, 2004). GL3 und EGL3 wirken redundant und sind positive Regulatoren der Trichomentwicklung (Serna, 2004). Eine Mutation von *gl3* hat weitreichendere Auswirkungen als eine Mutation von *egl3* (Zhang *et al.*, 2003). Hierbei kommt es zu einer Reduktion der Trichomzahl, es finden weniger Endoreduplikationen statt,

die Trichome bleiben kleiner und besitzen weniger Verzweigungen (Hülskamp *et al.*, 1994). TTG1 ist nötig, damit GL3 und EGL3 ihre volle Funktion ausbilden können (Larkin *et al.*, 2003). TRY, CPC und ETC wirken redundant bei der Unterdrückung der Trichombildung (Kirirk *et al.*, 2004). Die stärkste Wirkung hat hierbei TRY, da eine Mutation in *try* die deutlichste phänotypische Veränderung der Trichommorphologie, des Verteilungsmusters und der Trichomzahl hervorruft. Es kommt zu einer Trichom-Cluster-Bildung und die Zahl der Endoreduplikationen nimmt zu, wodurch die Trichome größer werden und mehrere Verzweigungsarme besitzen (Hülskamp *et al.*, 1994).

1.1.2.3 Andere an der Trichomentwicklung beteiligte Faktoren

Es gibt noch weitere Faktoren, die an der Trichomentwicklung beteiligt sind. Auch bestimmte biotische und abiotische Faktoren können eine Rolle spielen, sodass die Pflanze innerhalb eines bestimmten Rahmens auf Umwelteinflüsse antworten kann.

Gibberellinsäure, ein pflanzliches Wachstumshormon, beeinflusst positiv die Ausbildung der Trichome und den Zeitpunkt der Trichomininitiation. Außerdem besitzt Licht vermutlich auch eine positive Wirkung auf die Trichombildung. Eine hohe relative Luftfeuchtigkeit scheint eine Reduktion in der Trichomzahl zur Folge zu haben (Walker und Marks, 2000).

1.1.2.4 Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion

Im Gegensatz zur Entwicklung der einfachen Trichome ist über die Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion nur sehr wenig bekannt, und es wurden hierzu nur wenige wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt. Die Entstehung dieser Trichome wird in drei Phasen unterteilt, die präsekretorische, sekretorische und postsekretorische Phase (Ascensao and Pais, 1998).

Trichome mit Drüsenfunktion bestehen meist aus mehreren Zellen. Ihre Anlage findet schon sehr früh in der Entwicklung des jeweiligen Organs, auf dem das Trichom entsteht, statt. Bei manchen Pflanzenarten werden auch später noch, z.B. beim Wachstum des Blattes, zusätzliche Trichome angelegt. Die Vorläuferzellen der Trichome teilen sich zeitlich parallel zu den sie umgebenden Epidermiszellen. Dabei ändern sie ihre Wachstumsrichtung, heben sich von der Epidermis ab und bilden ein Trichom aus (Glover and Martin, 2000). Je nachdem, ob es sich um ein uniseriatis oder multiseriatis Trichom mit einem ein- oder mehrzelligen Stiel und mit einem ein- oder mehrzelligen Kopf handelt, findet bei der Entwicklung des Trichoms eine unterschiedliche Anzahl an periklinalen und antiklinalen Zellteilungen statt (Werker, 2000). Ein Trichom kann aus einer oder mehreren

Protodermalzellen hervorgehen. Häufig bilden umliegende Epidermiszellen einen „Sockel“ um das Trichom. Meist ist mit der Mehrzelligkeit der Trichome auch eine funktionelle Differenzierung der einzelnen Zellen verbunden. Bei den Kopfzellen der Trichome handelt es sich um Drüsenzellen, die verschiedene Substanzen sezernieren (Glover und Martin, 2000). Am Ende der präsekretorischen Phase sind sie meist durch kleine Vakuolen und dichtes Cytoplasma, das viele Mitochondrien enthält, gekennzeichnet. In Abhängigkeit von den Inhaltsstoffen, die sie synthetisieren, treten unterschiedliche Zellorganellen vermehrt auf (Fahn, 2000). Die Stielzellen hingegen bilden meist eine Zentralvakuole aus, besitzen Chloroplasten, und ihre seitlichen Zellwände sind mit Cutin überzogen (Werker, 2000; Fahn, 2000).

In der sekretorischen Phase entsteht bei vielen Trichomen durch Abtrennung der Cuticula von den Zellwänden an der apikalen Seite der Drüsenzellen ein subcuticulärer Raum, in den die unterschiedlichen Substanzen sezerniert werden. Die Ausscheidung dieser Stoffe findet bei Nektar, Polysacchariden und lipophilen Substanzen wie z.B. Terpenen und Wachsen vermutlich durch einen granulokrinen Mechanismus statt. Bei Salz ausscheidenden Drüsen läuft dieser Vorgang wahrscheinlich eccrin ab. Aus dem subcuticulären Raum gelangt das Sekret entweder über kleine Poren, die die Cuticula durchsetzen, nach außen, oder es wird durch das Aufreißen der Cuticula freigesetzt (Fahn, 2000). Es gibt aber auch Trichome mit Drüsenfunktion, bei denen die Lagerung der sezernierten Stoffe in den Vakuolen der Drüsenzellen stattfindet (Duke *et al.*, 2000).

In der postsekretorischen Phase findet keine Sekretion mehr statt, und es beginnt die Seneszenz der Trichomzellen. In manchen Fällen bleibt die Basalzelle noch aktiv (Werker, 2000).

1.1.2.5 Molekularer Hintergrund der Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion

Über die Gene, die an der Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion beteiligt sind, weiß man nur sehr wenig. Von *Nicotiana tabacum* (Tabak), *Lycopersicon esculentum* (Tomate) und *Antirrhinum majus* (Löwenmäulchen) sind Mutanten bekannt, bei denen sich die Dichte oder die Form der Trichome verändert hat. Allerdings sind die Gene, die hierbei mutiert sind, meist nicht kloniert (Glover and Martin, 2000).

Bislang konnte nur bei R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren ein Einfluss auf die Entwicklung von sezernierenden Trichomen festgestellt werden. Mit MIXTA, einem MYB-Transkriptionsfaktor aus *A. majus*, wurden einige molekularbiologische Untersuchungen bezüglich der Trichomentwicklung in *N. tabacum* durchgeführt. MIXTA ist an der

Entwicklung der kegelförmigen Epidermiszellen der Petalen beteiligt, die im Vergleich zu Petalen mit einer glatten Epidermiszellschicht eine erhöhte Farbintensität aufweisen. Petalen mit einer intensiveren Färbung sind für Bestäuber attraktiver (Glover und Martin, 1998). *N. tabacum* besitzt drei unterschiedliche Trichomtypen, einfach-uniseriat-mehrzellige Trichome, drüsige Trichome mit einem 1-zelligen Stiel und mehrzelligen Kopf und Trichome mit Drüsenfunktion, die aus einem 4- bis 6-zelligen Stiel und einem 1- bis 6-zelligen Kopf bestehen (Meyberg *et al.*, 1991). Wird *mixta* in *N. tabacum* ektopisch exprimiert, bilden einige transgene Linien verglichen mit Wildtyp-Pflanzen vermehrt Trichome mit Drüsenfunktion aus. Es werden auch Trichome auf der Epidermis von Organen gebildet, die in der Wildtyp-Pflanze keine Trichome hervorbringen (Glover *et al.*, 1998). Einige transgene Linien zeigen keine Vermehrung der Trichomzahl, bilden aber kegelförmige Epidermiszellen auf ihren Blättern aus. Ob Trichome oder kegelförmige Epidermiszellen entstehen, hängt davon ab, zu welchem Zeitpunkt *mixta* in den Tabakpflanzen exprimiert wurde. Wird *mixta* zu einem Zeitpunkt der Blattentwicklung exprimiert, bei dem sich die Zellen noch teilen, werden Trichome ausgebildet. Findet die höchste Expression nach diesem Zeitpunkt statt, bilden sich kegelförmige Epidermiszellen (Glover, 2000). Payne *et al.* stellten fest, dass eine Überexpression von *cotmyba* aus *Gossypium hirsutum* (Baumwolle) in *N. tabacum* auch zu einer vermehrten Ausbildung von Trichomen führt. Eine Überexpression *cotmyba* und *mixta* in *A. thaliana* hingegen führt zu keiner Veränderung in der Trichombildung. Wird *gll*, ein an der Trichombildung in *A. thaliana* beteiligter MYB-Transkriptionsfaktor, in *N. tabacum* überexprimiert, hat dies ebenfalls keine Auswirkung auf die Trichomentwicklung. Dies könnte auf ein unterschiedliches Regulationssystem der Trichombildung in Arabidopsis und Tabak hinweisen (Payne *et al.*, 1999).

In *A. majus* wird sehr früh in der Entwicklung der Petalen, in der noch Zellteilung stattfindet, ein weiterer MYB-Transkriptionsfaktor, *ammybml1*, exprimiert. Dieser weist auf Proteinebene innerhalb der MYB-Domäne 86%ige Identität zu MIXTA auf. Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit, der hohen Expression während der frühen Entwicklungsphase der Petalen und den Ergebnissen der Überexpression von *mixta* in *N. tabacum* wird vermutet, dass MYBML1 an der Ausbildung von Trichomen auf den Petalen von *A. majus* beteiligt ist (Glover *et al.*, 1998).

1.1.3 Trichome unterschiedlicher *Nicotiana*-Arten

In *N. tabacum* kommen drei unterschiedliche Trichomtypen vor. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um einfach-uniseriat-mehrzellige Trichome, bei der zweiten um Trichome, die einen 1-zelligen Stiel und einen 8- bis 16-zelligen Kopf besitzen. Sie werden von einigen Autoren als Hydathoden bezeichnet, wobei noch nicht geklärt ist, ob sie tatsächlich die Funktion von Hydathoden besitzen. Zur dritten Gruppe gehören Trichome mit Drüsenfunktion, die sich aus einem 4- bis 6-zelligen Stiel und einem 1- bis 6-zelligen Kopf zusammensetzen. Die Anzahl der Kopfzellen nimmt mit zunehmendem Alter zu (Meyberg *et al.*, 1991) (s. Abb. 1.2).

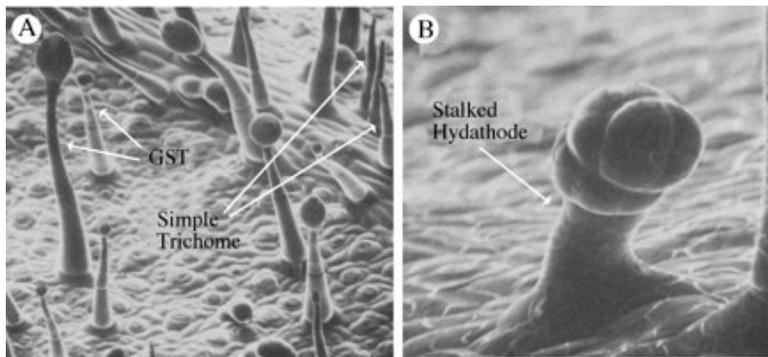


Abb. 1.2: Unterschiedliche Trichomtypen von *N. tabacum*. In Bild A sind einfach-uniseriat-mehrzellige Trichome (Simple Trichome) und Trichome mit Drüsenfunktion (GST=glandular stalked trichomes) zu sehen (110-fache Vergrößerung). Bild B zeigt eine Hydathode (700-fache Vergrößerung) (Aufnahme aus Wagner *et al.*, 2004).

In den Kopfzellen der Trichome von *N. tabacum* werden die Diterpene α - und β -4,8,13-Duvatrien-1,3-diol (DVT), Zuckerester, bei denen es sich um Furanoside handelt, und Cis-Abienol, ein Labdanoid, synthetisiert (Keene und Wagner, 1985; Kandra und Wagner, 1998; Guo *et al.*, 1994).

Von *N. glutinosa* ist bekannt, dass die Drüsenzellen der Trichome Labdandiol und Sclareol bilden und sezernieren können (Guo und Wagner, 1995).

In den Trichomen von *N. stocktonii* findet eine Acylierung von Nornicotin zu N-Acyl-Nornicotin statt. Die Synthese von Nicotin erfolgt in den Wurzeln. Anschließend wird es in den Spross transportiert und dort zu Nornicotin demethyliert (Zador und Jones, 1986). N-Acyl-Nornicotin findet sich auch in *N. repanda* und *N. nesophila*.

Die meisten hier aufgeführten Stoffe besitzen antimicrobielle Wirkung oder stehen im Zusammenhang mit Resistenzen gegen Blattläuse oder gegen andere Tabakschädlinge.

1.2 Transkriptionsfaktoren

1.2.1 Definition

Transkriptionsfaktor ist die „unspezifisch verwendete Bezeichnung für jedes Protein, das nötig ist, um bei Eukaryonten die Transkription zu beginnen oder zu regeln. Dazu gehören sowohl Genregulatorproteine als auch allgemeine Transkriptionsfaktoren.“ (Alberts *et al.*, 2004).

Die Genregulatorproteine werden auch als spezifische Transkriptionsfaktoren bezeichnet, sie werden nach ihrer DNA-Bindedomäne in unterschiedliche Familien eingeteilt.

1.2.2 Regulation der Genexpression

Verschiedene Zelltypen vielzelliger Organismen entstehen dadurch, dass je nach Zelltyp bei der Zelldifferenzierung unterschiedliche Gene exprimiert werden. Welche Gene in einer Zelle exprimiert werden und in welchem Umfang, wird auf verschiedensten Ebenen reguliert. Auf der Transkriptionsebene kontrollieren Transkriptionsfaktoren, wann und wie oft ein Gen in mRNA umgeschrieben wird. Weitere Regulationsmöglichkeiten ergeben sich durch das unterschiedliche Spleißen der Primär-RNA, durch die Auswahl, welche mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert wird, durch die Selektion der mRNA, die translatiert oder im Cytoplasma destabilisiert wird. Auch auf Proteinebene kann noch kontrollierend eingegriffen werden, indem die Proteine nach der Translation aktiviert, inaktiviert, abgebaut oder räumlich getrennt werden (Alberts *et al.*, 2004).

Transkriptionsfaktoren, die das Thema dieser Arbeit sind, spielen bei der Regulation der Genexpression nur auf Transkriptionsebene eine Rolle. Deshalb soll im folgenden auf die Transkription und ihre Regulation eingegangen werden.

1.2.3 Die Transkription und ihre Regulation

Für eine Transkription sind allgemeine Transkriptionsfaktoren (TFII = Transkriptionsfaktoren für die Polymerase II) nötig, die der RNA-Polymerase II helfen, an den Promotor zu binden und die beiden DNA-Stränge zu trennen, um die Transkription zu ermöglichen. *In vitro* beginnt der Vorgang mit der Anlagerung des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID an die TATA-Box. Hierdurch wird die Anlagerung weiterer allgemeiner Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II ermöglicht, sodass ein vollständiger Transkriptions-Initiationskomplex entstehen kann. Nach einer Konformationsänderung der RNA-Polymerase wird diese unter Beteiligung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren aus dem Komplex freigesetzt

und die Transkription kann am Transkriptionsstart beginnen. Damit es *in vivo* zur Ausbildung eines Transkriptions-Initiationskomplexes kommen kann, sind noch ein Mediator, Genregulatorproteine und Chromatin modifizierende Enzyme nötig. Genregulatorproteine und die Enzyme helfen den Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase an die als Chromatin verpackte DNA zu binden. Der Mediator stellt die Verbindung der Genregulatorproteine mit dem restlichen Transkriptions-Initiationskomplex her (s. Abb. 1.3) (Alberts *et al.*, 2004).

Genregulatorproteine (spezifische Transkriptionsfaktoren) bestehen meist aus zwei Domänen. Die eine bindet an eine für diesen Transkriptionsfaktor spezifische DNA-Sequenz (Enhancer). Bei der anderen handelt es sich um eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne, die die Transkription aktiviert oder hemmt. Ein aktivierend-wirkendes Genregulatorprotein beschleunigt die Transkriptionsinitiation dadurch, dass es die Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II an den Promotor vereinfacht. Dies geschieht, indem es direkt am Transkriptions-Initiations-Komplex angreift oder die Chromatinstruktur in der Nähe des Promotors verändert. Repressoren können auf unterschiedliche Weise wirken. Zum Beispiel kann die Konkurrenz von Aktivator und Repressor um die gleiche Enhancer-Sequenz oder die Bindung des Repressors an die Aktivierungsdomäne des Aktivators eine Transkription verhindern. Der Repressor kann aber auch eine Anlagerung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren an den Transkriptions-Initiationskomplex verhindern oder diesen so verändern, dass die RNA-Polymerase nicht mehr entlassen werden kann. Auch kann die Chromatinstruktur so verändert werden, dass keine Transkription mehr stattfinden kann (Alberts *et al.*, 2004).

Die Enhancer-Sequenz eines spezifischen Transkriptionsfaktors kann mehrere tausend Basenpaare vom Promotor des Gens, das transkribiert werden soll, entfernt sein. Die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor über den spezifischen Transkriptionsfaktor kommt dadurch zustande, dass der DNA-Strang eine Schleife bildet (s. Abb.1.3).

Im Gegensatz zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die an jeder Transkription durch die RNA-Polymerase II beteiligt sind und von denen es nur eine geringe Anzahl verschiedener Typen gibt, kommen bei Eukaryonten mehrere tausend unterschiedliche Genregulatorproteine (spezifische Transkriptionsfaktoren) vor. Beim Menschen schätzt man, dass von den 30.000 Genen, die für verschiedene Proteine codieren, 5-10% Genregulatorproteine exprimieren. Diese große Anzahl unterschiedlicher, spezifischer Transkriptionsfaktoren wird benötigt, weil für die Expression eines bestimmten Gens eine nur für dieses Gen spezifische Kombination aus mehreren Transkriptionsfaktoren nötig ist. Meist

lagern sich die Genregulatorproteine zu einem Proteinkomplex zusammen, wobei jedem einzelnen Protein eine bestimmte Funktion zugeordnet werden kann. Es ist möglich, dass ein Transkriptionsfaktor bei der Ausbildung eines solchen Komplexes nicht an eine DNA-Sequenz gebunden ist, sondern mit einer spezifischen Stelle eines anderen Transkriptionsfaktors interagiert. Die für die Expression eines bestimmten Gens nötige Kombination verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren ist von den in der jeweiligen Genkontrollregion vorkommenden Enhancer-Sequenzen und anderen in der Zelle exprimierten Transkriptionsfaktoren abhängig (Alberts *et al.*, 2004).

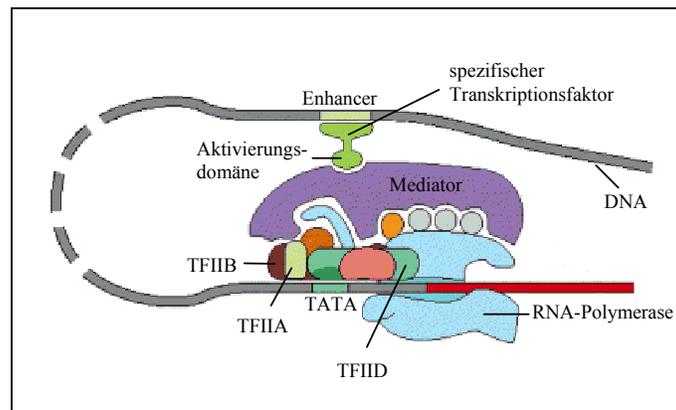


Abb. 1.3: Transkriptions-Initiations-Komplex. Abgebildet sind die verschiedenen am Transkriptions-Initiations-Komplex beteiligten Transkriptionsfaktoren. Außerdem ist die Schleifenbildung der DNA, durch die eine Interaktion zwischen dem Enhancer und Promotor über den spezifischen Transkriptionsfaktor ermöglicht wird, dargestellt. TFIIA, TFIIB und TFIIID sind allgemeine Transkriptionsfaktoren. (Darstellung aus Alberts *et al.*, 2004)

1.2.4 MYB-Transkriptionsfaktoren

1.2.4.1 Kennzeichen der MYB-Transkriptionsfaktoren

MYB-Transkriptionsfaktoren sind durch eine MYB-Domäne gekennzeichnet, mit der sie an eine spezifische DNA-Sequenz binden können. Diese MYB-Domäne setzt sich aus ein bis drei MYB-Motiven zusammen. Nach der Anzahl der MYB-Motive werden die MYB-Transkriptionsfaktoren in drei Gruppen eingeteilt. Proteine mit einem MYB-Motiv werden als MYB1R-Transkriptionsfaktoren bezeichnet, Proteine mit zwei MYB-Motiven als R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren und solche mit einer Wiederholung von drei MYB-Motiven als MYB3R-Transkriptionsfaktoren. Die Bezeichnung der unterschiedlichen Motive bezieht sich auf den menschlichen c-MYB-Transkriptionsfaktor, der drei MYB-Motive enthält, die von N- nach C-terminal als R1, R2 und R3 bezeichnet werden. Bei Transkriptionsfaktoren mit weniger als drei MYB-Motiven erfolgt die Benennung dieser repetitiven Elemente gemäß

ihrer Ähnlichkeit zu R1, R2 oder R3 aus c-MYB (Stracke *et al.*, 2001). Vergleicht man die zweiten bzw. dritten MYB-Motive zweier unterschiedlicher Proteine stellt man eine größere Ähnlichkeit fest als beim Vergleich des zweiten mit dem dritten MYB-Motiv desselben Proteins (Martin und Paz-Ares, 1997).

Ein MYB-Motiv umfasst eine Sequenz aus ca. 52 Aminosäuren und bildet drei α -Helices aus, von denen die zwei C-terminal gelegenen eine Helix-Turn-Helix-Struktur formen (Rabinowicz *et al.*, 1999). Jedes dieser MYB-Motive enthält an drei regelmäßig verteilten Positionen ein Tryptophan. Diese Tryptophan-Moleküle sind an der Ausbildung eines hydrophoben Kerns beteiligt (Ogata *et al.*, 1992). Aus Untersuchungen des c-MYB-Transkriptionsfaktors, einem MYB3R-Faktor, wurde geschlossen, dass nur das zweite und dritte MYB-Motiv für die sequenzspezifische DNA-Bindung nötig sind. Jeweils die C-terminal-gelegene Helix dieser beiden MYB-Motive passt genau in die große Furche des DNA-Strangs, wo sie an die Basen der DNA binden kann (s. Abb. 1.4). Es wird vermutet, dass die Erkennungshelix von R3 spezifisch mit dem essentiellen Kernmotiv der Erkennungssequenz interagiert, während die Erkennungshelix von R2 an benachbarte, weniger konservierte Sequenzen bindet (Ogata *et al.*, 1995). Für die R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren wird angenommen, dass die Bindung auf die gleiche Weise erfolgt. Die Anlagerung der MYB1R-Transkriptionsfaktoren an die DNA läuft vermutlich nach einem anderen Prinzip ab, da sie nur ein MYB-Motiv besitzen und die Erkennungshelix dieses Motivs einen relativ großen Unterschied zu den Erkennungshelices der R2R3- und der MYB3R-Transkriptionsfaktoren aufweist (Jin und Martin, 1999). Aus Studien mit einem menschlichen Telomerprotein mit nur einem MYB-Motiv geht hervor, dass dieses wie ein Protein mit einer Homöodomäne an die DNA bindet (Nishikawa *et al.*, 1998). Andere MYB1R-Faktoren interagieren vielleicht auf die gleiche Weise mit der DNA-Erkennungssequenz (Jin und Martin, 1999).

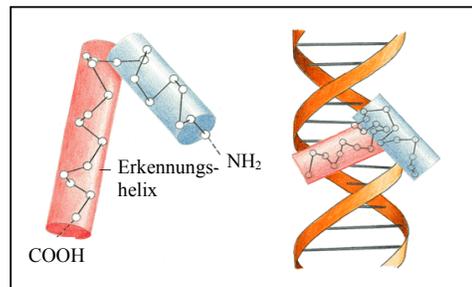


Abb. 1.4: Helix-Turn-Helix-Struktur. Links ist eine Helix-Turn-Helix-Struktur zu sehen. Bei der c-terminalen α -Helix handelt es sich um die DNA-Erkennungshelix (rot). Rechts ist dargestellt wie die Erkennungshelix in die große Furche der DNA bindet. Die N-terminale α -Helix (blau) hilft bei der Positionierung der Erkennungshelix. (aus Alberts *et al.*, 2004).

1.2.4.2 Evolution und Vorkommen der MYB-Transkriptionsfaktoren

Lipsick (1996) erstellte ein Modell zur Evolution der MYB-Transkriptionsfaktoren. Er geht davon aus, dass sich die MYB-Domäne dupliziert hat, wodurch Proteine mit mehreren MYB-Motiven entstanden. Anschließend fanden Duplikationen des gesamten Gens statt, aus denen durch Mutationen unterschiedliche MYB-Proteine hervorgingen. Da die MYB3R-Faktoren im Pflanzen- und Tierreich ähnliche Funktionen aufweisen, stammen diese vermutlich vom gleichen Vorläufer-Gen ab und wurden während der Evolution der Pflanzen und Tiere konserviert. Von *v-myb* Onkogen abgesehen finden sich nur bei Pflanzen R2R3 MYB-Faktoren. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass ihre Vermehrung erst nach dem Verlust von R1 eines MYB3R-Faktors stattgefunden hat (Jin und Martin, 1999; Lipsick, 1996).

Die weitaus größte Anzahl von MYB-Transkriptionsfaktoren kommt in Pflanzen vor. *A. thaliana* besitzt ca. 125 MYB-Transkriptionsfaktoren, während in anderen Eukaryonten weitaus weniger MYB-Proteine vertreten sind. Im Menschen sind bis jetzt 10 MYB-Transkriptionsfaktoren bekannt, in *Saccharomyces cerevisiae* finden sich 5 MYB-Proteine.

Das *v-myb* Onkogen aus dem Vogel-Myeloblastose-Virus ist das erste MYB-Protein, das isoliert wurde (Klempnauer *et al.*, 1982). Da *v-myb* große Ähnlichkeit zum c-MYB der Vertebraten besitzt, stammt es vermutlich von einem MYB3R-Gen aus Vertebraten ab. Wahrscheinlich erfolgte nach der Integration in das Virus-Genom die Deletion eines MYB-Motivs. (Romero *et al.*, 1998; Strack *et al.*, 2001).

Sehr nah verwandt zum v-MYB-Protein sind die c-MYB-, A-MYB- und B-MYB-Transkriptionsfaktoren, die in vielen Vertebraten vertreten sind und eine Rolle bei der Zellteilung und Differenzierung verschiedener Zelltypen spielen. Sie gehören zur Gruppe der MYB3R-Faktoren. In Insekten, Pflanzen, Pilzen und Schleimpilzen wurden ähnliche Gene entdeckt (Lipsick, 1996).

Vertreter der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren kommen mit Ausnahme von *v-myb* nur bei Pflanzen vor. Auf sie wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Zu den MYB1R-Transkriptionsfaktoren zählen Proteine, die die G-reichen Sequenzen der Telomere erkennen und in Hefen, Tieren und Pflanzen konserviert sind (Jin und Martin, 1999). Es finden sich aber auch Gene, die den Tag-/Nachtrhythmus regeln (Schaffer *et al.*, 2001).

1.2.4.3 MYB-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen

Bei den meisten pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren ist der erste Tryptophanrest in R3 durch eine andere aromatische oder hydrophobe Aminosäure ersetzt. Außerdem sind sechs

der acht mutmaßlich an die DNA bindenden Aminosäuren vollständig konserviert. Trotz dieser hohen Ähnlichkeit erkennen die pflanzlichen MYB-Proteine unterschiedliche DNA-Sequenzen. Dies kommt durch die Aminosäuren zustande, die den konservierten Aminosäuren benachbart sind, da sie die Spezifität und die Stärke der Bindung an das essentielle Kernmotiv beeinflussen (Martin und Paz-Ares, 1997).

Bei den Pflanzen findet man Vertreter aus allen der in Kapitel 1.2.4.1 genannten Gruppen.

Zur Gruppe der MYB3R-Faktoren gehören Aktivatoren (MYBA1 und MYBA2 aus *N. tabacum*) bzw. Repressoren (MYBB aus *N. tabacum*) der Transkription der Cyclin-Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (Ito *et al.*, 2001).

Unter den Vertretern der MYB1R-Faktoren in Pflanzen finden sich Proteine, die an Telomersequenzen binden oder die Transkription verschiedener Gene regulieren. Hierbei handelt es sich um Gene, die in Abhängigkeit des Zirkadian-Rhythmus unterschiedlich exprimiert werden. Außerdem wird die Expression von Genen reguliert, die an der Wurzelhaarbildung und an der Trichombildung beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um die bereits in Abschnitt 1.1.2.2 der Einleitung erwähnten CPC- und TRY-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* (Jin und Martin, 1999).

Die Arbeiten von Romero *et al.* (1998) und Rabinowicz *et al.* (1999), die sich mit der Analyse von R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* bzw. *Zea mays* beschäftigten, zeigen deutlich, dass die R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren die größte Gruppe der pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren darstellen.

Die pflanzlichen R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren lassen sich aufgrund ihrer DNA-Binde-Domäne in drei weitere Gruppen unterteilen, die Untergruppe A, B und C. Zur Untergruppe A gehören die, die dem c-MYB am ähnlichsten sind, d.h. die an die MBSI-Sequenz (T/CAACG/TGA/C/TA/C/T) binden. Von den aus *A. thaliana* isolierten MYB-Proteinen zählen ca. 10% zu dieser Gruppe. Bei Untergruppe B handelt es sich um eine sehr kleine Gruppe, der vier von den 97 (Stracke *et al.*, 2001) aus *A. thaliana* bekannten R2R3 MYB-Proteinen angehören. Die Untergruppe C umfasst die meisten R2R3 MYB-Proteine. Ein Großteil der hierzu gehörenden Transkriptionsfaktoren erkennen die MBSIIG-Bindestelle (T/CACCA/TAC/AC) (Romero *et al.*, 1998). Zu den R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren gehören noch drei weitere Gene, die sich keiner dieser Gruppen zuordnen lassen. Zwei davon, PHANTASTICA aus *A. majus* und ROUGHSHEATH 2 aus *Zea mays*, enthalten eine R3-Erkennungshelix, die sich in ihrer Sequenz sehr von denen der anderen R2R3-Faktoren und von c-MYB unterscheidet (Timmermans *et al.*, 1999). Diese zwei MYB-Proteine werden teils

als AmMYBPHAN-Untergruppe bezeichnet. Sie sind an der Bildung von Meristemen beteiligt (Jin und Martin, 1999).

Die Funktionen, die die Vertreter der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren innehaben, sind sehr vielfältig. Sie reichen von der Regulation der Enzyme des Sekundärstoffwechsels (Phenylpropan- und Flavonoidbiosynthese) und des Primärstoffwechsels (Tryptophan-Synthese) über die Kontrolle der Entwicklung und Determination bestimmter Zellformen bis hin zur Antwort auf bestimmte Umweltfaktoren, wie z.B. der Befall durch Pathogene oder geringe Sauerstoffkonzentration (Stracke *et al.*, 2001; Rabinowicz *et al.*, 1999).

Es ist auffällig, dass strukturell sehr ähnliche *myb*-Gene trotzdem unterschiedliche Funktionen durch Transkriptionskontrolle verschiedener Gene haben. Die Arbeit von Lee und Schiefelbein (2001) liefert hierfür ein gutes Beispiel. Sie konnten zeigen, dass die beiden Gene *werwolf* (*wer*) und *glabrous1* (*gll*) aus *A. thaliana*, die 57%ige Homologie in ihrer gesamten Aminosäuresequenz und 91%ige Homologie in der Aminosäuresequenz der MYB-Domänen besitzen, funktionell äquivalent sind. Dennoch sind sie für die Ausbildung unterschiedlicher Zelltypen zuständig. WER bildet Wurzelzellen aus, die keine Wurzelhaare hervorbringen, und GL1 induziert die Trichombildung. Dies ist auf das Vorhandensein unterschiedlicher *cis*-Regulatorsequenzen zurückzuführen, die die Expression von *wer* und *gll* auf unterschiedliche Zelltypen beschränken. Außerdem variieren die verschiedenen Zelltypen im Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren. Dies führt zur Ausbildung unterschiedlicher Transkriptionskomplexe (Lee und Schiefelbein 2001).

Unter den pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren finden sich hauptsächlich Aktivatoren, aber auch einige Repressoren. Als Aktivierungsdomäne dient meist eine amphipathische α -Helix (Jin und Martin, 1999). Bei der Untersuchung des C-terminalen Bereichs der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren von *A. thaliana* finden sich 22 Untergruppen mit eingeschränkter Sequenz-Konservierung (Kranz *et al.*, 1998). Diese Bereiche könnten Aktivierungsdomänen sein, da sie relativ sauer sind und reich an Glutamin und Prolin, zwei für Aktivierungsdomänen typische Aminosäuren. Es könnte sich aber auch um Repressionsdomänen handeln oder um Bereiche, die mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (Jin und Martin, 1999).

Von einigen der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie mit bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren. Grotewold *et al.* (2000) gelang es, den Bereich des C1 MYB-Proteins aus Mais zu identifizieren, der mit dem bHLH-Cofaktor R aus Mais interagiert. Hierbei handelt es sich um die erste Helix des R3 MYB-Motivs. Auch WER und

GL1 enthalten die Aminosäuren, die für die Interaktion mit bHLH-Proteinen notwendig sind (Lee und Schiefelbein 2001).

1.3 Ausschalten von Genen

1.3.1 Ziel des Ausschaltens von Genen

Beim Ausschalten von Genen wird versucht zu verhindern, dass ein Gen exprimiert wird und somit ein funktionsfähiges Protein gebildet wird. Dies wird mit dem Ziel durchgeführt, Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens bzw. auf das Protein, für das es codiert, zu ziehen. Denn man geht beim Vergleich von Organismen, bei denen ein Gen ausgeschaltet wurde, mit Wildtyp-Organismen davon aus, dass die auftretenden Unterschiede durch das entsprechende Genprodukt bedingt sind.

Gene können durch Mutation, z.B. chemisch oder durch Bestrahlung, oder durch das Einsetzen von Transposons ungezielt ausgeschaltet werden. Durch homologe Rekombination kann ein Gen gezielt ausgeschaltet werden. Weitere Möglichkeiten ein Gen gezielt auszuschalten sind das Virus-induzierte Ausschalten von Genen (VIGS = **v**irus **i**nduced **g**ene **s**ilencing) und die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzen mit bestimmten Konstrukten. Diese beiden Methoden machen sich das Phänomen des „RNA interference“ zu Nutze. Hier soll nur auf die beiden letzten Möglichkeiten eingegangen werden, da nur sie in dieser Arbeit zur Anwendung kommen.

1.3.2 „RNA interference“

„RNA interference“ (RNAi) oder „RNA silencing“ ist ein Phänomen, das in vielen eukaryontischen Organismen auftritt und zuerst bei Pflanzen entdeckt wurde. Hier wurde es anfangs als posttranskriptionales Ausschalten eines Gens (PTGS = **p**ost-**t**ranscriptional **g**ene **s**ilencing) bezeichnet (Meister und Tuschl, 2004). Bei Pilzen verwendete man den Begriff „quelling“. Zwar kommt RNAi bei Eukaryonten verschiedener Stämme vor, es unterscheidet sich aber teilweise im Mechanismus. Hier soll hauptsächlich auf RNAi in Pflanzen eingegangen werden. Es handelt sich hierbei um eine Strategie der Pflanze sich gegen Viren zu schützen, das Genom von Transposons frei zu halten und die Expression von Genen zu regulieren (Baulcombe, 2004).

Ausgelöst wird dieser Prozess durch doppelsträngige RNA (dsRNA = **d**ouble **s**tranded RNA) unterschiedlicher Länge. Sie wird in Pflanzen durch DICER-ähnliche Enzyme zu RNA-Duplices („small RNA“) abgebaut, die 21-26 Nukleotide umfassen. Bei diesen Enzymen

handelt es sich um Endonukleasen vom RNase-Typ III mit einer Domäne zur Bindung von dsRNA (Meister und Tuschl, 2004).

Die dsRNA kann verschiedenen Ursprungs sein. Eine Quelle können nicht codierende Gene sein, die aus einer fast komplementären invertierten Wiederholung von 20-50 Basenpaaren bestehen. Nach der Transkription entsteht eine sogenannte Haarnadelstruktur. Die beim Abbau dieser dsRNA entstehenden RNA-Duplices werden **micro** RNAs (miRNAs) bezeichnet. Sie regulieren u.a. die Expression von Genen (Meister und Tuschl, 2004). dsRNA kann aber auch bei der Replikation von RNA-Viren entstehen. Außerdem kann in Pflanzen durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP = **R**NA-**d**ependent **R**NA **p**olymerase) der komplementäre Strang zu einer einzelsträngigen RNA (ssRNA = **s**ingle **s**tranded RNA) auch ohne Primer gebildet werden. Die ssRNA kann von Viren oder vom Transkript eines Transgens stammen. Dies findet vermutlich bei der Cosuppression statt. Wie die Pflanze zwischen der mRNA eines Transgens und der eines endogenen Gens unterscheidet, ist unbekannt (Mello und Conte, 2004). Bei den Abbauprodukten dieser dsRNA spricht man von „**s**mall **i**nterfering“ RNAs (siRNAs). Sowohl siRNAs als auch miRNAs sind durch einen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende gekennzeichnet (Meister und Tuschl, 2004).

Argonaute-Proteine (Ago) sorgen vermutlich dafür, dass die siRNAs bzw. miRNAs korrekt an den RISC-Komplex (RISC = RNA-induced silencing complex) binden. Außerdem ist eine ATP-abhängige Helicase nötig, die für die Entwindung der siRNAs bzw. miRNAs sorgt (Meister und Tuschl, 2004). Nun lagern sich an diesen Komplex die zu den siRNAs bzw. miRNAs komplementären bzw. fast komplementären mRNAs an. Im Falle der siRNAs schneidet dann der RISC-Komplex die mRNA in der Mitte der komplementären Region (Meister und Tuschl, 2004). Dies läuft bei den miRNAs in den Pflanzen meist auch auf dieselbe Weise ab. In Tieren verhindert der RISC-Komplex in der Regel die Translation, und die mRNA wird nicht durch Schneiden abgebaut. Bisher ist eine miRNA in Pflanzen bekannt, die wie bei Tieren die Translation verhindert. Vermutlich tritt dieser Mechanismus auch bei Pflanzen häufiger auf. Außerdem wird diskutiert, dass auch beim Ausschalten von Transgenen die Verhinderung der Translation eine Rolle spielt (Baulcombe, 2004) (s. Abb.1.5).

Die Synthese einer dsRNA durch eine RdRP kann auch über einen Primer-abhängigen Mechanismus ablaufen. Hierbei wirken die primären siRNAs als Primer. Durch den anschließenden Abbau der dsRNA entstehen sekundäre siRNAs, die wiederum dafür sorgen, dass mehr entsprechende Ziel-RNA abgebaut wird. Dieser Mechanismus ist vermutlich bei der Virenabwehr nötig (Baulcombe, 2004).

1.3.3 Gezieltes Ausschalten von Genen mit Hilfe von RNAi

Mittels VIGS und einer Transformation von Pflanzen mit einem geeigneten Konstrukt kann man Gene gezielt ausschalten.

1.3.3.1 VIGS

Hierfür verwendet man in der Regel RNA-Viren. In das Genom dieser Viren wird an geeigneter Stelle ein Teil der cDNA-Sequenz des Gens, das in der Pflanze ausgeschaltet werden soll, eingebaut. Bei der Replikation des Virus in der Pflanze entsteht dsRNA, die zu siRNAs abgebaut wird (s. Abb.1.5). Ein Teil der entstandenen siRNAs ist komplementär zur mRNA des endogenen Gens. Diese mRNA wird dann wie oben beschrieben abgebaut und das entsprechende Protein entsteht nicht mehr in der Pflanze.

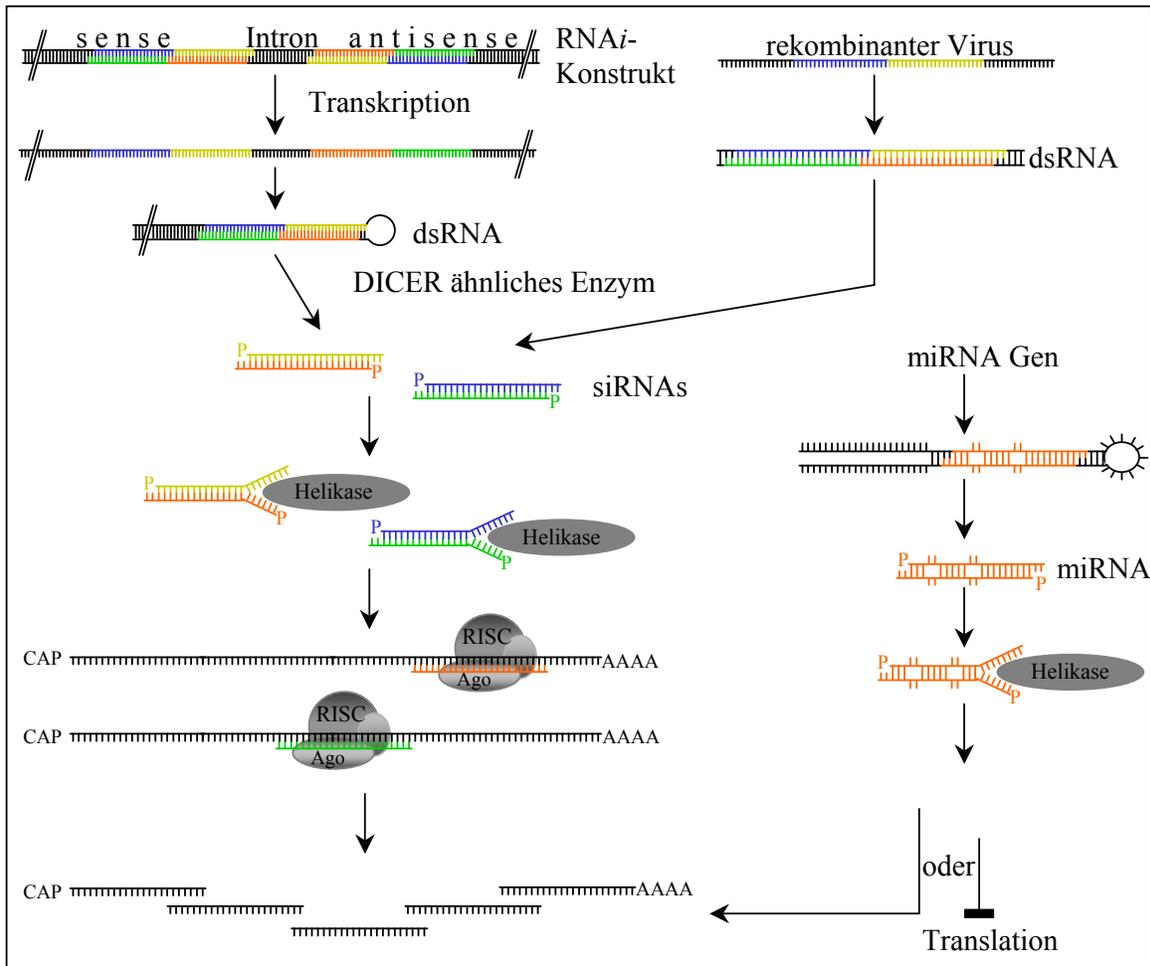


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Entstehung der dsRNA und des RNAi-Mechanismus. Die dsRNA, die das Phänomen des RNAi auslöst, entsteht in dieser Darstellung durch die Transkription eines RNAi-Konstrukts bzw. bei der Replikation eines rekombinanten Virus. Anschließend wird die mRNA des entsprechenden endogenen Gens abgebaut. Rechts im Bild ist die Regulation der Transkription durch miRNA dargestellt.

1.3.3.2 Transformation mit einem „RNAi-Konstrukt“

Hierbei werden Pflanzen mit Agrobakterien transformiert. Das Konstrukt, das in das Genom der Pflanze integriert wird, trägt einen Teil der cDNA-Sequenz des entsprechenden Gens in sense- und antisense-Richtung durch ein Intron voneinander getrennt. Findet nun eine Transkription in der Pflanze statt, bildet die mRNA eine sogenannte Haarnadelstruktur aus. Hierbei lagern sich die komplementären Sequenzen (sense und antisense-Sequenzen) aneinander. So entsteht dsRNA und es wird der gleiche Vorgang wie bereits unter 1.3.3.1 beschrieben in Gang gesetzt (s. Abb.1.5).

Zielsetzung

Aus der Arbeit von Glover *et al.* (1998) ist bekannt, dass eine ektopische Expression von *mixta*, einem MYB-Transkriptionsfaktor aus *A. majus*, in *N. tabacum* eine Vermehrung der Trichome mit Drüsenfunktion verursacht. Dies legt die Vermutung nahe, dass an der Entwicklung dieser Trichome ein MYB-Protein regulatorisch beteiligt sein könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob es in *N. benthamiana* endogene MYB-Transkriptionsfaktoren gibt, die Einfluss auf die Entwicklung von Trichomen haben. *N. benthamiana* wurde als Pflanze gewählt, da es sich bei ihr um eine Modellpflanze für Virus-induziertes Ausschalten von Genen (VIGS = virus induced gene silencing) handelt. VIGS stellt eine Methode dar, mit der man verglichen mit einer Agrobakterien-vermittelten Transformation relativ schnell ein bestimmtes Gen ausschalten kann.

Für diese Untersuchungen sollten mit degenerierten Primern aus der cDNA von *N. benthamiana* unterschiedliche Fragmente, die eine MYB-Domäne enthalten, amplifiziert werden. Um Rückschlüsse auf die Funktion dieser Gene zu ziehen, sollten diese Teilsequenzen in einen Tobacco-Rattle-Virus kloniert werden, mit dem anschließend VIGS durchgeführt wurde. Von den MYB-Transkriptionsfaktoren, deren Ausschalten eine phänotypische Veränderung bewirkt, sollte der Volllängeklon isoliert werden. Für weitere Untersuchungen dieser MYB-Proteine sollten stabil transformierte Pflanzen, bei denen die entsprechenden Gene ausgeschaltet sind, hergestellt werden. Dies sollte mit einem RNAi-Konstrukt durchgeführt werden. Eine stabile Transformation hat gegenüber VIGS den Vorteil, dass die Funktion der Gene während der ganzen Pflanzenentwicklung betrachtet werden kann und nicht wie bei VIGS erst ab dem Zeitpunkt der Infektion der Pflanzen mit dem Virus.

Da die Entwicklung von pflanzlichen Strukturen oft konserviert ist, kann man diese Ergebnisse vermutlich auch auf die Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion anderer, zumindest nah verwandter Arten übertragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Nicotiana benthamiana wurde unter kontrollierten Bedingungen in einer Phytokammer bei einem Tag/Nachtrhythmus von 16 h/8 h mit einer Tagestemperatur von 21 °C und einer Nachttemperatur von 19 °C und unter Standardtageslichtbedingungen (OSRAM L36 W/72-965 BIOLUX, München) kultiviert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60%.

Anzucht unter nicht sterilen Bedingungen:

Die Samen wurden zuerst in einer Petrischale zwischen zwei feuchten Zellstofftüchern zur Keimung gebracht. Nach ca. 7 Tagen wurden die Samen einzeln in einen Topf mit 6 cm Durchmesser pikiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Pflänzchen in größere Töpfe umgesetzt, in denen sie bis zur jeweiligen Verwendung verblieben. Zur Kultivierung wurde ein Gemisch aus Erde und Torf verwendet, dem für die Anzucht in den kleinen Töpfen Vermikulit beigemischt wurde.

Anzucht unter sterilen Bedingungen:

Für die Sterilisation der Samen wurden Samen mit 70% Ethanol 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des Ethanols wurden die Samen in chlorbleicher Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Samen wurden anschließend mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen bis kein Chlorgeruch mehr wahrgenommen werden konnte. Je sechs sterile Samen wurden in Phytokons (Durchmesser 9 cm, Höhe 10,5 cm, Fa. Sigma) angezogen. Als Medium wurde Murashige und Skoog Medium (Croy, 1993) mit 0,8% Pflanzenagar (Fa. Duchefa) verwendet, wobei die Konzentration der Makro- und Mikronährsalze um 50% reduziert wurde und die Saccharosekonzentration 2-3% betrug.

Für die Selektion auf transgene Pflanzen bzw. für die Unterdrückung des Agrobakterienwachstums wurden dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotikallösungen mit folgender Endkonzentration zugegeben:

Kanamycin (Fa. Sigma)	100 mg/l
Cefotaxim (Fa. Duchefa)	200 mg/l

Für die Transformationen wurden zur Förderung der Kallus- und Pflanzenbildung dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Hormonlösungen mit folgender Endkonzentration beigesetzt:

6-Benzylaminopurin (Fa. Sigma)	500 µg/l
Naphthylelessigsäure (Fa. Serva)	100 µg/l

2.1.2 Bakterien

2.1.2.1 *Escherichia coli*

Es kamen folgende *E. coli*-Stämme zur Anwendung

- *E. coli* DH5α (Fa. Clontech)
F⁻, *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, (rk⁻mk⁺), *recA1*, *relA1*, *supE44*, Φ80*lacZ*ΔM15, *thi-1*, Δ(*lacZYA-argFV169*)
- *E. coli* TOP10 (Fa. Invitrogen)
F⁻, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *recA1*, *deoR*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R), *endA1*, *nupG*

2.1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

In dieser Arbeit wurden folgende *A. tumefaciens* Stämme verwendet

- *A. tumefaciens* GV3101
pMP90RK, Gm^R, Km^R, Rif^R
- *A. tumefaciens* GV3101 pSA_RepA
pMP90RK, Gm^R, Km^R, Rif^R, pSA_RepA, Tet^R

Sowohl *E. coli* als auch *A. tumefaciens* wurden auf Agarplatten (1,5% Bakterien-Agar, Fa. Serva) oder in Suspensionskulturen (180-200 Umdrehungen pro Minute) mit Luria-Bertani Medium (Sambrook *et al.*, 1989) oder SOC Medium (Sambrook *et al.*, 1989) angezogen. Die Inkubationstemperatur betrug bei *E. coli* 37 °C und bei *A. tumefaciens* 28 °C. Um auf Antibiotikaresistenz vermittelnde Plasmide zu selektieren, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren die jeweilige sterilfiltrierte Antibiotikallösung mit folgender Endkonzentration zugegeben:

Ampicillin (Fa. Sigma)	100 mg/l
Gentamycin (Fa. Duchefa)	7 mg/l
Kanamycin (Fa. Sigma)	50 mg/l

Rifampicillin (Fa. Merck)	20 mg/l
Spectinomycin (Fa. Sigma)	100 mg/l
Tetracyclin (Fa. Sigma)	5 mg/l

2.1.3 Oligonucleotide

Die für Sequenzierungsreaktionen und PCR-Amplifikationen verwendeten Oligonucleotide wurden bei der Firma MWG Biotech bestellt. In folgender Tabelle sind die wichtigsten Oligonucleotide, die in der Arbeit verwendet wurden, aufgeführt.

Tab. 2.1: verwendete Oligonucleotide;

Bezeichnung	Sequenz	Orientierung	Verwendung
pMYB 5'	5'-AA(AG) (AT)(GC)(AGCT) TG(CT) (AC)G(AGCT) (CT)T(AGCT) (AC)G(AGCT) TGG-3'	sense	Amplifikation von Myb-Teilsequenzen
pMYB 3'	5'-CCA (AG)TA (AG)TT (CT)TT (AGCT)A(CT) (AGCT)T(GC) (AG)TT (AG)TC-3'	antisense	Amplifikation von Myb-Teilsequenzen
MYB race3' Tri 5	5'-ACT CCA TGC CCT TCT TGG AAA CAG-3'	sense	RACE
GeneRacer™ 3' Primer	5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'	antisense	RACE (Bestandteil des Kit)
MYB T5 5' Pst I	5'-ATG GCC TGC AGA AGA GGT GTC GGT TAC GGT G-3'	sense	Klonierung von MybTri5/180 in BSG-TMV
MYB T5 3' Xho I	5'-GTT CCC TCG AGC CAG TAG TTC TTA ATT T-3'	antisense	Klonierung von MybTri5/180 in BSG-TMV
MYB Tri5 pTV 5'	5'-GGG CCC CGA CCA ACT TGG TCC TAA T-3'	sense	Klonierung von MybTri5/600 in pTV
MYB Tri5 pTV 3'	5'-ACT AGT CAA GTC CTA AAG TTA AAC CTA-3'	antisense	Klonierung von MybTri5/600 in pTV; Test auf Transgenität
NbMYB T5 5' RT	5'-TGG AAA GGA TGC TGC TAA CC-3'	sense	RT-PCR
NbMYB T5 3' RT	5'-CAA GAT TGT CTT CGC CGT TT-3'	antisense	RT-PCR
Actin 1	5'-ATG GCA GAC GGT GAG GAT ATT CA-3'	sense	Kontrolle für RT-PCR
Actin 2	5'-GCC TTT GCA ATC CAC ATC TGT TG-3'	antisense	Kontrolle für RT-PCR
MYBTri5- pKAN 5'	5'-GGA TCC CTC GAG CGA CCA ACT TGG TCC TAA T-3'	sense	Herstellung des RNAi-Konstruktes
MYBTri5- pKAN 3'	5'-ATC GAT GAA TTC CAA GTC CTA AAG TTA AAC CTA-3'	antisense	Herstellung des RNAi-Konstruktes
npt II sense	5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3'	sense	Test auf Transgenität
npt II antisense	5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'	antisense	Test auf Transgenität
pKAN 4388 5'	5'-CAC TAT CCT TCG CAA GAC C-3'	sense	Test auf Transgenität
MYB ra5' Tri5 2.Ver.	5'-GCC ATG TGA CTT AGG TTA GCA GCA TCC-3'	antisense	GenomeWalking
nested MYB race5' Tri5	5'-CCT GTT TCC AAG AAG GGC ATG GAG T-3'	antisense	GenomeWalking
AP1	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	sense	GenomeWalking (Bestandteil des Kit)
AP2	5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3'	sense	GenomeWalking (Bestandteil des Kit)

2.1.4 Vektoren

pGEM[®]-T Easy (Fa. Promega) ist ein 3,0 kb großer, linearisierter Klonierungsvektor aus dem pGEM[®]-T Easy Klonierungskit. Die 3'-terminalen Thymidinüberhänge ermöglichen eine T/A-Klonierung von mit *Taq* DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten. Das Plasmid ermöglicht eine Selektion auf Ampicillin-Resistenz und durch α -Komplementierung des β -Galactosidase-Gens (*lacZ*) eine Blau-Weiß-Selektion.

pCR[®]4-TOPO[®] (Fa. Invitrogen) ist ein 3,96 kb großer, linearisierter Klonierungsvektor, der im TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing enthalten ist. Auch dieser Vektor erlaubt durch die 3'-terminalen Thymidinüberhänge eine T/A-Klonierung von mit *Taq* DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten. Die Zyklisierung erfolgt bei diesem Plasmid nicht wie bei den anderen hier erwähnten Vektoren durch eine DNA-Ligase, sondern durch die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase. Der Vektor besitzt ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen als Selektionsmarker.

pKANNIBAL (CSIRO Plant Industry; Wesley *et al.*, 2001) ist ein 5,9 kb großer, zirkulärer Klonierungsvektor. Er wurde für die Herstellung von RNAi-Konstrukten für Pflanzentransformationen entwickelt.

Der Vektor enthält innerhalb einer Expressionskassette zwei multiple Klonierungsstellen, die durch ein Intron der Pyruvathosphatkinase aus *Flaveria trinervia* voneinander getrennt sind. Ein DNA-Fragment, das mit Oligonucleotiden (Primern), die die Schnittstellen und Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme enthalten, amplifiziert wurde, kann somit gerichtet in sense- und antisense-Richtung, durch ein Intron voneinander getrennt, kloniert werden.

Als Promotor für die Expressionskassette wurde der 35S Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus (CaMV 35S) verwendet. Außerdem besitzt die Expressionskassette den Terminator des Octopinsynthase-Gens (OCS) aus *A. tumefaciens*.

Die Expressionskassette ist beiderseits von einer *Not* I-Schnittstelle flankiert, sodass diese Expressionskassette auf einfache Weise in den binären pART27 Vektor kloniert werden kann. Das Plasmid trägt ein Kanamycin-Resistenzgen, das außerhalb der Expressionskassette liegt.

pART 27 (CSIRO Plant Industry; Wesley *et al.*, 2001) ist ein binärer Vektor, der für die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien entwickelt wurde. Das Plasmid besitzt

zwischen den linken und rechten Bordersequenzen der T-DNA (*A. tumefaciens*) eine *Not I*-Schnittstelle, in die die DNA-Fragmente kloniert werden können, die dann ins Genom der Pflanze integriert werden sollen. Außerdem befindet sich innerhalb der T-DNA ein Kanamycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines Promotors und eines Terminators der Nopalinsynthase (NOS) aus *A. tumefaciens* als Selektionsmarker für transgene Pflanzen. Zusätzlich trägt dieser Vektor außerhalb der T-DNA ein Gen, das eine Spectinomycin-Resistenz vermittelt.

BSG-TMV (Large-Scale Biology Corporation) ist ein Vektor, der zum virusinduzierten Ausschalten von Genen entwickelt wurde und auf der cDNA des Tabak-Mosaik-Virus beruht. Er besitzt eine RNA-Bindestelle für die T7 RNA-Polymerase und ein Ampicillin-Resistenzgen.

pTV00 (Sainsbury Laboratory and Plant Biosciences Limited, Norwich, UK; Ratcliff *et al.*, 2001) ist ein Teil eines binären Vektorsystems, das zum virusinduzierten Ausschalten von Genen in Pflanzen entwickelt wurde. pTV00 basiert auf der cDNA der RNA 2 des Tobacco-Rattle-Virus. Das Plasmid trägt zwischen der linken und rechten Seite der T-DNA einen Bereich, der von einem CaMV 35S-Promotor und einem NOS Terminator kontrolliert wird. In diesem Bereich befindet sich die oben genannte cDNA und eine multiple Klonierungsstelle, in die die Gene bzw. Genfragmente, die in der Pflanze ausgeschaltet werden sollen, kloniert werden. Außerhalb dieses Bereiches besitzt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen.

pBINTRA6 (Sainsbury Laboratory and Plant Biosciences Limited, Norwich, UK; Ratcliff *et al.*, 2001) ist der zweite Teil des oben genannten binären Vektorsystems, der innerhalb der linken und rechten Seite der T-DNA einen Volllängeklon der RNA 1 des Tobacco-Rattle-Virus unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors und Terminators trägt. Dieser Bereich wird durch ein Intron unterbrochen um eine Expression bei der Vermehrung in Bakterien zu verhindern.

2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Kits

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka, Merck, Roche, Serva oder Sigma bezogen. Die Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammen von den Firmen Invitrogen, New England Biolabs, Promega oder Roche.

Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Milli-Q_{plus} Anlage (Millipore, Schwalbach) hergestellt.

Radiochemikalien:

[α -³²P]-dATP, 3000 Ci/mmol Biomedicals, ICN

Kits:

Oligotex [®] mRNA Midi Kit	Qiagen
QIAprep [®] Miniprep Kit	Qiagen
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
GeneRacer [™] Kit Version F	Invitrogen
pGEM [®] -T Easy Vektor System I	Promega
Megaprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences
Universal GenomeWalker [™] Kit	Clontech

DNA- und RNA Längenstandards und Nucleotide:

1 kb Marker	New England Biolabs
100 bp Marker	New England Biolabs und Roche
RNA Marke	Fermentas
dNTPs	Promega

2.1.6 Geräte

Zentrifugen:	5415 D Tischzentrifuge, Eppendorf
	5810 R, Eppendorf
	3K18, Sigma
	Sorvall [®] RC-26 Plus, DuPont
	Sorvall [®] RC-28S, DuPont
	SpeedVac [®] SPD111V, Thermo Savant
PCR-Maschinen	GeneAmp [®] PCR System 9700, PE Applied Biosystems
	Mastercycler Gradient, Eppendorf
	Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH

Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Wissenschaftliche Technische Werkstätten
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE111, Büchi
Sequenzierer	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer bzw. 3100- <i>Avant</i> Genetic Analyzer, Applied Biosystem
Elektroporator	GENE PULSER® II, BioRad
Gelapparatur	Gelkammern und Gelträger, Biometra Spannungsquelle PHERO-stab. 500, Biotec-Fischer
Geldokumentationssystem	Gel Doc 1000-System, BioRad
Spektrofluorometer	SPECTRA MAX GEMINI, Molecular Devices
Hybridisierungsöfen	Typ 400 HY-E, Bachofer

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

In flüssigem Stickstoff fein gemörstertes Gewebe wurde in Lysis-Puffer (10mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 1% SDS; 4% Polyvinylpolypyrrolidon; 1 mM EDTA pH 8,0; 14 mM β -Mercaptoethanol; pro 1 g Gewebe 3,5 ml Puffer) und dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (Roth) aufgenommen und 30 min bei RT extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation erfolgten nochmals zwei weitere Extraktionen der wässrigen Phase zuerst mit Phenol-Chloroform, dann mit reinem Chloroform. Anschließend wurden die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase mit 0,1 Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol 1-2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Im Anschluss daran fand eine selektive Fällung der RNA mit 1 Vol. 6 M Lithiumchlorid bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht statt. Die im Überstand befindliche genomische DNA wurde hierauf mit 0,1 Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet in TE-Puffer vorsichtig resuspendiert. Befand sich noch RNA in den Proben, wurde diesen noch RNase A zugegeben.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

E. coli

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml bzw. 50 ml Bakterien-Übernachtskulturen gewonnen. Die Isolierung erfolgte im Mini- bzw. Midimaßstab unter Verwendung des QIAprep[®] Miniprep Kits bzw. QIAGEN[®] Plasmid Midi Kits nach den Protokollen des Herstellers.

A. tumefaciens:

Das Pellet einer 10 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde in 200 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 20 µg/ml RNase A) aufgenommen und mit 300 µl 0,2 M NaOH/1% SDS Lösung vorsichtig gemischt bis die Lösung klar wurde. Nach der Zugabe von 3 M KOAc pH 4,8 und einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14000 rpm. Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, RT) wurde die wässrige Phase nochmals mit Chloroform extrahiert. Anschließend an die Phasentrennung (Zentrifugation 1 min, 14000 rpm, RT) wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1 Vol. 100% Isopropanol (auf -20 °C vorgekühlt) präzipitiert (10 min, 14000 rpm, RT). Nach dem Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde die DNA in sterilem Wasser aufgenommen.

2.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Hierfür wurde das entsprechende pflanzliche Gewebe in flüssigem Stickstoff fein gemörsert, in 1-2 ml Trizol (0,8 M Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M NaOAc pH 5,2; 5% Glycerin; 38% Phenol) pro 0,1 g Pflanzenmaterial aufgenommen und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Bei größeren Mengen eingesetzten Pflanzenmaterials wurde an dieser Stelle noch ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt, um die groben Pflanzenteile abzutrennen. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit 0,2 Vol. Chloroform für 30 min bei RT. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wässrige Phase zur Fällung der RNA mit 0,5 Vol. Isopropanol und 0,5 Vol. 1,2 M Natriumcitrat/0,8 M NaCl 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol in sterilem Wasser aufgenommen.

Bei der Aufarbeitung von stark polysaccharidhaltigen Geweben wie jungen Blättern oder Blüten wurde nach der Chloroformextraktion zusätzlich eine Polysaccharidfällung mit

0,25 Vol. 100%igem Ethanol und 0,11 Vol. 5 M Kaliumacetat (1 h bei 4 °C) durchgeführt. Mit dem Überstand wurde anschließend, wie oben beschrieben, weiterverfahren.

2.2.1.4 Isolierung von messenger-RNA

Die messenger-RNA wurde aus Gesamt-RNA, die nach der unter 2.2.1.3 beschriebenen Methode isoliert wurde, gewonnen. Hierfür wurde der Oligotex[®] mRNA Midi Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelpurifikation)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick[®] Gel Extraction Kits nach dem Herstellerprotokoll isoliert.

2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren fand photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Alternativ wurden auch Messungen mit einem Spektrophotometer durchgeführt, wobei die Nukleinsäuren hierbei mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Hierfür wurde für DNA PicoGreen[®] und für RNA RiboGreen[®] (Fa. Molecular Probes) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.3 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde von K.B. Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Fallona, 1987) und ermöglicht die gezielte Amplifikation eines bestimmten DNA-Fragments. Mit Hilfe zweier spezifischer oder degenerierter Oligonukleotide (Primer), die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks sind, und mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen wird dieser DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Ein Zyklus aus Denaturierung (94 °C, 30 sec), Anlagerung der Primer (45-60 °C, 30 sec) und Synthese der DNA (72 °C, 1-3 min) wurde 25-35 mal wiederholt. Diesem Prozess ging eine einmalige Denaturierung der DNA-Matrize (94 °C, 3-5 min) voraus, und er wurde mit einer End-Elongation (72 °C, 7 min) abgeschlossen. Zur Anwendung kamen *Taq*- (*Thermus aquaticus*) und *Pfu*- (*Pyrococcus furiosus*) DNA Polymerase, die mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet wurden. Es wurde stets eine Negativkontrolle, die statt einer DNA-Matrize Wasser enthielt, mitgeführt.

Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen, wurde bei der RACE- und GenomeWalking Methode an eine erste PCR noch eine sogenannte nested PCR angeschlossen. Hierfür wurde

als Matrize 1 µl einer 1:50 Verdünnung der ersten PCR eingesetzt und es wurden Primer verwendet, die benachbart zu den Primern der ersten PCR an das zu amplifizierende DNA-Fragment binden.

2.2.4 Sequenzierung von DNA

Zum Einsatz für die Sequenzierung kam das BigDye[®] cycle sequencing system (Fa. Applied Biosystems), das auf der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977) beruht. Die Didesoxynukleotide sind bei diesem System nicht radioaktiv markiert, sondern je nach Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff. Die eigentliche Sequenzierung nach der Amplifikation erfolgte in einem Sequenzierer der Fa. Applied Biosystems. Hierbei handelt es sich im Prinzip um eine Kapillarelektrophorese, wobei mit Hilfe eines Lasers die vier unterschiedlichen Farben detektiert werden können und sich somit aufgrund der Längenauftrennung eine Nukleotidsequenz ergibt.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.5.1 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Um Plasmide bzw. DNA-Fragmente für spätere Klonierungsarbeiten an bestimmten Schnittstellen mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wurde für 1 µg DNA ca. 1 Unit Enzym eingesetzt. Die Reaktion fand mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern unter dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms statt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 1 h. Um einen möglichst kompletten Verdau sicherzustellen, fand eine Restriktion über Nacht statt.

Genomische DNA wurde grundsätzlich über Nacht mit 5 Units pro µg DNA für Southern Blots bzw. 32 Units pro µg DNA für GenomeWalking verdaut.

2.2.5.2 Ligation

Ligationen mit dem pGEM[®]-T Easy-Vektor wurden mit der T4 DNA Ligase und dem zugehörigen Puffer aus dem pGEM[®]-T Easy Klonierungskits bei einer Inkubationszeit von 1 h und Raumtemperatur durchgeführt.

Alle anderen Ligationen erfolgten mit einer T4 DNA Ligase von Promega bei 16 °C über Nacht.

Für einen Ligationsansatz wurden 50 ng Vektor und die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragments eingesetzt.

Die Ligation mit dem pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor wurde nach Angaben des Herstellers mit den Bestandteilen des TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing durchgeführt.

Für Transformationen wurde jeweils die Hälfte des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.5.3 Anhängen von 3'-A-Überhängen (*Taq-tailing*)

Um eine T/A-Klonierung mit einem mit *Pfu* DNA-Polymerase amplifizierten DNA-Fragment durchzuführen, muss an das 3'-Ende des Fragments ein Adenin angehängt werden (*Taq-tailing*). Hierfür wurde das PCR-Produkt nach einer Gelaufreinigung mit 0,25 mM dATP und 2,5 Units *Taq* DNA-Polymerase und dem entsprechenden Reaktionspuffer für 20 min bei 72 °C inkubiert.

2.2.5.4 Reverse Transkription

Eine reverse Transkription wird durchgeführt, um RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Wird als Primer ein Oligo d(T)₁₂₋₁₈-Primer verwendet, wird nur messenger RNA transkribiert. Die so erhaltene Erst-Strang-cDNA kann später als Matrize für eine PCR verwendet werden.

Die Erst-Strang-cDNA Synthese wurde mit SuperScript[™] II RNase H⁻ Reverser Transkriptase (Fa. Life Technologies) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.5 *In vitro* Transkription

Bei einer *in vitro* Transkription wird DNA in RNA mit Hilfe einer RNA-Polymerase umgeschrieben. Für die vorliegende Arbeit war dies nötig, um das BSG-TMV-Plasmid in RNA zu transkribieren, die für die Transfektion der *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet wurde. Folgender Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert:

1 µg *Kpn* I verdauter BSG-TMV-Vektor

1,2 µl 20mM rNTP

2 µl 10 mM cap-Analog

2 µl 10 x Transkriptionspuffer

1 µl RNase Inhibitor

1 µl T7 RNA-Polymerase

ad 20 µl H₂O

2.2.6 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

2.2.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli

Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Hanahan, 1983; Hanahan *et al.*, 1991).

Kompetente *E. coli* TOP10 waren Bestandteil des TOPO TA Cloning[®] Kit.

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens wurde bei 28 °C in 25 ml MiniA-Medium (60 mMol K₂HPO₄, 33 mMol KH₂PO₄, 7,5 mMol (NH₄)₂SO₄, 1,7 mMol Tri-Natrium-Citrat x 2 H₂O, 0,8 mMol MgSO₄ x 7 H₂O, 0,2% Glucose, pH 7,0) mit Rifampicin ca. 1-2 Tage angezogen bis die optische Dichte bei 600 nm 1,0 betrug. Nach einer Zentrifugation von je 1,5 ml Bakterienkultur bei 3000 rpm und 4 °C wurden die Bakterienpellets dreimal mit eisgekühltem, sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400 μ l sterilem Wasser resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden zu je 40 μ l aliquotiert.

Alle kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.6.2 Transformation kompetenter Zellen

E. coli

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der Hälfte des Ligationsansatzes (Herstellung siehe 2.2.4.2) vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an einen Hitzeschock (30 sec, 42 °C) zur Aufnahme der Plasmide in die Zellen und kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen zur Regeneration der Zellwand mit 200 μ l LB oder SOC-Medium in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion bei 37 °C über Nacht inkubiert.

A. tumefaciens

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte durch Elektroporation unter der Anwendung eines Elektroporators nach Anweisungen des Herstellers. Das Plasmid wird hierbei durch einen elektrischen Impuls von 1,8 kV bei 50 μ F und 400 Ω in die Bakterienzellen aufgenommen. Bei einer Inkubation der Bakterien in SOC Medium für mind. 2 h bei 28 °C findet die Regeneration der Zellwand statt. Im Anschluss daran werden die Bakterien auf einer LB-Agarplatte unter entsprechender Antibiotika-Selektion bei 28 °C bis zu 2 Tagen inkubiert.

2.2.7 RACE

Um die vollständige cDNA Sequenz eines Gens mit einer bekannten Teilsequenz zu erhalten, wurde der Gene RacerTM Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, wobei 200 ng messenger RNA (mRNA) von jungen Blättern eingesetzt wurden. Das Gene Racer-Protokoll basiert prinzipiell auf der RACE Methode (Frohmann *et al.*, 1988; Ohara *et al.*, 1989). RACE steht für **r**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds. Die Anwendung dieses Kits soll gewährleisten, dass nur Volllänge-Transkripte amplifiziert werden.

Das Prinzip beruht darauf, dass nur die Transkripte der mRNA mit einer CAP-Struktur bei der Amplifikation des 5'-Endes berücksichtigt werden. Aufgrund der Behandlung der RNA mit „calf intestinal phosphatase“ (CIP) und einer anschließenden Abspaltung der CAP-Struktur durch „tobacco acid pyrophosphatase“ (TAP), besitzt nur noch intakte mRNA einen 5'-Phosphatrest. Wodurch nur an diese intakte mRNA RNA-Nukleotide, an die später Primer für die Amplifikation der 5'-Enden binden, ligieren. Anschließend erfolgt eine reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern. (Maruyama and Sugano, 1994; Schaefer, 1995; Volloch *et al.*, 1994)

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel isoliert, einem *Taq*-tailing unterzogen, anschließend in einen pGEM[®]-T Easy Vektor kloniert und sequenziert.

2.2.8 GenomeWalking

Diese Methode kann verwendet werden, um unbekannte genomische Sequenzen, die zu einer bereits bekannten Sequenz benachbart sind, zu ermitteln (Siebert *et al.*, 1995). In dieser Arbeit kam sie zur Anwendung, um das 5'-Ende des Transkriptionsfaktors *mybtri5* zu klonieren, da dies mit der RACE-Methode nicht gelang. Hierfür wurde der Universal GenomeWalkerTM Kit nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt, jedoch unter der Verwendung anderer Restriktionsendonukleasen. Im Prinzip werden bei dieser Methode Aliquots genomischer DNA mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut und Adaptoren an beide Enden der so erhaltenen DNA-Fragmente ligiert. Anschließend erfolgt eine PCR mit einem genspezifischen und einem Adaptor-homologen Primer, auf die wiederum eine nested PCR folgt.

2.2.9 Gelelektrophorese

2.2.9.1 Trennung von DNA über Agarosegele

Die Auftrennung von DNA erfolgte über 1%ige Agarosegele. Für Gele, die später geblottet wurden, wurde als Laufpuffer und zur Herstellung des Gels 0,5 x TBE Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Bei allen anderen DNA-Gelen diente 1 x TAE als Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde den Gelen mit Ausnahme derer, die zum Blotten verwendet wurden, kurz vor dem Gießen Ethidiumbromid (2 ng/ml Gel) zugegeben. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit 0,2 Vol. Ladepuffer (8 mM Orange G; 0,9 M Saccharose) versetzt. Die Auftrennung erfolgte für Gele, die zum Blotten verwendet wurden, bei 24 V über Nacht, bei allen anderen Gelen bei 50-100 V 0,5-2 h.

2.2.9.2 Trennung von RNA über Agarosegele

Für die Auftrennung von RNA wurden 1,2%ige denaturierende Agarosegele verwendet [1% (w/v) Agarose; 20 mM MOPS; 5 mM NaOAc; 1 mM EDTA; 0,74% (v/v) Formaldehyd; pH 7,0]. Um die RNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde den Gelen kurz vor dem Gießen Ethidiumbromid (2 ng/ml Gel) zugegeben. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit 0,2 Vol. Ladepuffer [80 mM MOPS; 20 mM NaOAc; 8 mM EDTA; 2,7% (v/v) Formaldehyd; 20% (v/v) Glycerin, 31% (v/v) Formamid; 0,16% (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung; pH 7,0] versetzt und 5 min bei 65 °C denaturiert.

2.2.10 Blotting

2.2.10.1 Southern-Blot

Durch Southern-Blots kann die Kopienzahl, mit der ein bestimmtes Gen im Genom vorliegt, ermittelt werden oder getestet werden, ob ein Organismus transgen ist.

Pro aufgetragener Probe kamen 20 µg verdauter, genomischer DNA zum Einsatz. Die DNA-Gele für Southern-Blots (s. 2.2.8.1) wurden 30 min bei RT in ethidiumbromidhaltigem Wasser (1:35000 1% Ethidiumbromidlösung:Wasser) inkubiert, um anschließend unter UV-Licht die Auftrennung der DNA auf dem Gel zu kontrollieren. Im Anschluss daran fand eine 30 minütige Denaturierung mit 0,5 M NaOH statt. Daraufhin wurde die DNA vom Gel durch die Kapillar-Transfer Methode (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran (Biodyne® B 0,45 µ, PALL Corporation) überführt und durch „UV-Crosslinking“ (UV Stratalinker™ 1800, Stratagene) an die Membran gebunden.

2.2.10.2 Northern-Blot

Northern-Blot Analysen können für Expressionsanalysen herangezogen werden.

Die RNA-Gele (s. 2.2.8.2) wurden für 30 min bei RT in 10 x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M NaOAc) geschwenkt. Der eigentliche Blotvorgang wurde, wie bei den Southern-Blots beschrieben, durchgeführt. Die Menge eingesetzter Gesamt-RNA betrug 10-25 µg.

2.2.11 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden mit dem Megaprime DNA Labelling Kit nach dem Protokoll des Herstellers angefertigt. Als radioaktiv markiertes Nukleotid wurde [α - 32 P]-dATP verwendet. Zum Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotide wurden Sephadex Säulchen (ProbeQuantTM G-50 Micro Column, Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die Sonde wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.12 Hybridisierung

2.2.12.1 Hybridisierung der Southern-Blots

Nach einer 3-stündigen Prähybridisierung der Blots bei 55 °C mit einer Hybridisierungslösung (ExpressHyb, BD Biosciences) wurde die Sonde (s. 2.2.11) zugegeben und es erfolgte die Hybridisierung bei 55 °C über Nacht (mind. 16 h). Am folgenden Tag wurden die Blots 3 x 10 min bei RT mit 2 x SSC, 0,1% SDS und anschließend 2 x 20 min bei 50 °C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen, in Saran-Folie (Fa. Roth) eingewickelt und für 1-3 Tage auf einem Phosphorimagerscreen (Fa. Molecular Dynamics) exponiert. Dieser Screen wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet.

2.2.12.2 Hybridisierung der Northern-Blots

Die Vorgehensweise ist genau die gleiche wie bei der Hybridisierung der Southern-Blots. Der einzige Unterschied besteht in den Temperaturen für die Prähybridisierung bzw. Hybridisierung und in den Waschschrritten. Die Prähybridisierung bzw. Hybridisierung erfolgte bei einer Temperatur von 62 °C. Gewaschen wurden die Blots 3 x 15 min bei RT mit 2 x SSC, 0,1% SDS und 2 x 20 min bei 62 °C mit 1 x SSC, 0,1% SDS.

2.2.13 Isolierung von Trichomen

Um Trichome für eine spätere RNA-Isolation zu isolieren wurden Blätter und Stängel von *N. benthamiana* Pflanzen auf Trockeneis gekühlt, wodurch die Trichome gefrieren und

leichter abbrechen. Die Blätter bzw. Stängel wurden dann auf einer Glasplatte, die in eine Schüssel mit flüssigem Stickstoff taucht, mit einem Backpinsel mit Plastikborsten abgebürstet, wodurch die Trichome abbrechen und direkt im flüssigen Stickstoff eingefroren wurden. Zur Entfernung von Verunreinigungen durch Pinselhaare oder größere Pflanzenstücke wurde der flüssige Stickstoff mit den Trichomen durch ein Sieb mit einer Maschenweite von ca. 0,5 mm (Fa. Sigma) filtriert (Wang E. *et al.*, 2001).

2.2.14 Transfektion von *N. benthamiana* mit Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Bei der Transfektion von Pflanzen mit TMV wird nicht der komplette Virus übertragen, sondern nur die „nackte“ RNA. Hierfür wurde der Ansatz der *in vitro*-Transkription aus 2.2.5.5 in 100 µl FES-Puffer (0,1 M Glycin; 0,06 M K₂HPO₄; 1% Natriumpyrophosphat; 1% Macaloid; 1% Celite; pH 8,5) aufgenommen, und pro Pflanze wurden je 25 µl dieses Ansatzes auf 1-2 Blättern tröpfchenweise verteilt und vorsichtig mit dem Finger eingerieben. Die Pflanzen waren bei der Transfektion 4-5 Wochen alt.

2.2.15 Infiltration von *N. benthamiana*

A. tumefaciens, die entweder pBINTRA6 oder ein pTV-Konstrukt tragen, wurden in 1 ml Flüssigmedium bei 28 °C für ca. 8 h in einem Schüttler angezogen und nach Zugabe von nochmals 7 ml Medium über Nacht unter den gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Nach einer Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in einem Infiltrationspuffer [1 mM MES pH 5, 10 mM MgCl₂, 100 µM Acetosyringin] gelöst, bis die optische Dichte bei 600 nm 1,0 betrug. Nach einer Inkubation von 1-4 h wurden die Suspensionen, die die Bakterienkultur mit pBINTRA6 enthalten, mit denen, die die Bakterienkultur mit dem jeweiligen pTV-Konstrukt enthalten, im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Infiltration dieser Mischung fand an der Blattunterseite von 4-5 Wochen alten Pflanzen mit Hilfe einer sterilen Einmalspritze statt, wobei pro Pflanze je zwei Blätter infiltriert wurden. Als Kontrolle für den Einfluss, den die Infiltration hat, wurden Pflanzen nur mit Infiltrationspuffer infiltriert. Um Symptome, die auf die Infektion mit dem Virus an sich zurückzuführen sind, zu erkennen, wurden Pflanzen, die mit einem Gemisch aus pBINTRA6 und pTV00 ohne cDNA infiltriert wurden, als Kontrolle mitgeführt.

2.2.16 Transformation von *N. benthamiana*

Für die Transformation wurden 8-9 Wochen alte, steril angezogene Pflanzen (s. 2.1.1) verwendet. Wenn keine weiteren Angaben gemacht werden, wurde ein etwas abgewandeltes

Murashige und Skoog Medium (Croy 1993) und zwar mit halber Konzentration an Makro- und Mikronährsalzen und 2% Saccharose verwendet. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Eine *A. tumefaciens*-Kultur, die das zu transformierende Plasmid enthält, wurde in 20 ml YEB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit Rifampicillin und Spectinomycin 2 Tage kultiviert. Nach einer Zentrifugation folgte eine Resuspension des Bakterienpellets in 20 ml 10 mM MgSO₄, und nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 20 ml MS-Medium resuspendiert. 1 cm² große Blattstückchen von *N. benthamiana* wurden in die Bakteriensuspension getaucht, auf Filterpapier abgetupft und mit der Blattoberseite nach unten auf MS-Medium mit Hormonen (s. 2.1.1) in Pflanzenpetrischalen überführt. Nach einer 2-tägigen Inkubation bei 28 °C im Dunkeln wurden die Blättchen auf MS-Medium mit Hormonen und Antibiotika umgesetzt und in einer Phytokammer bei 23 °C unter Standardtageslichtbedingungen (OSRAM L36 W/72-965 BIOLUX, München) und einem Tag/Nachtrhythmus von 16 h/8 h kultiviert. Es erfolgte alle 2 Wochen eine Umsetzung auf frisches Medium. Wenn sich Kalli gebildet hatten, die zu groß für Petrischalen waren, fand eine Umsetzung in Phytokons (Höhe 7,5 cm, Durchmesser 9 cm) statt. Sobald aus den Kalli kleine Sprosse wuchsen, die mind. 5 cm groß waren, wurden diese möglichst weit unten am Stängel abgeschnitten und in MS-Medium (3% Saccharose) mit Antibiotika in Phytokons gesteckt. Hatten die Pflanzen Wurzeln gebildet und eine bestimmte Größe erreicht, wurden sie in Erde umgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Blattoberfläche von *N. benthamiana*

In dieser Arbeit soll ein MYB-Transkriptionsfaktor isoliert werden, der die Entwicklung der Trichome auf dem vegetativen Teil von *N. benthamiana*-Pflanzen beeinflusst. Deshalb wurde am Anfang der vorliegenden Arbeit eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von der Blattoberfläche der *N. benthamiana*-Pflanzen von Klaus Adler (IPK, Gatersleben) angefertigt. Nach diesem Foto können die Trichome dieser *Nicotiana*-Art in zwei Gruppen eingeteilt werden, in Trichome mit einem 1-zelligen Stiel und einem 4-zelligen Kopf und Trichome mit einem 4-zelligen Stiel und einem 1-zelligen Kopf (s. Abb. 3.1). Zum einfacheren Verständnis werden die Trichome der ersten Gruppe aufgrund ihrer Größe als kurze Trichome und die der zweiten Gruppe als lange Trichome bezeichnet. Über die Inhaltsstoffe von den *N. benthamiana*-Trichomen ist in der Literatur nur sehr wenig zu finden. Die Bildung von Zuckerestern wird in einer Veröffentlichung von Kroumova und Wagner (2003) genannt. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Gattung *Nicotiana* kann davon ausgegangen werden, dass *N. benthamiana* in ihren Trichomen auch Diterpene synthetisiert.

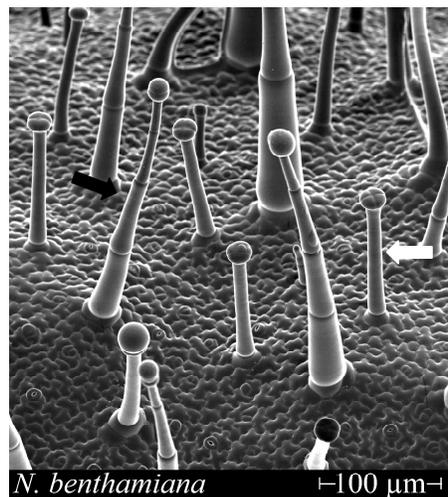


Abb. 3.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Blattoberfläche von *N. benthamiana*. Es sind zwei unterschiedliche Trichomtypen zu erkennen, Trichome mit 1-zelligem Stiel und 4-zelligem Kopf (weißer Pfeil) und Trichome mit mehrzelligem Stiel und 1-zelligem Kopf (schwarzer Pfeil).

3.2 Isolierung und Klonierung von MYB-Transkriptionsfaktoren aus *N. benthamiana*

3.2.1 Amplifikation von Teilsequenzen verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren aus cDNA von *N. benthamiana*

MYB-Transkriptionsfaktoren sind durch eine MYB-Domäne gekennzeichnet, die an spezifische Stellen der DNA bindet. Diese Domäne besteht aus zwei bis drei Wiederholungen eines MYB-Motivs, das wiederum aus drei α -Helices besteht, von denen zwei eine Helix-Turn-Helix Struktur bilden. Den hochkonservierten Bereich der α -Helices, die die spezifischen DNA-Sequenzen erkennen, machten sich Rabinowicz *et al.* (1999) für die Herstellung degenerierter Primer zu Nutze (s. Abb. 3.2). Diese wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

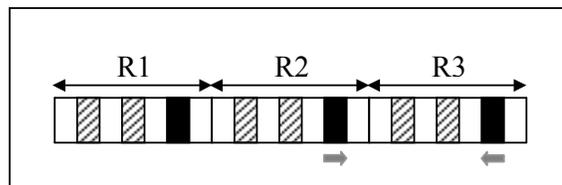


Abb. 3.2: Schema einer MYB-Domäne. R1, R2, R3 stellen jeweils ein MYB-Motiv dar. Die α -Helices sind schraffiert bzw. schwarz dargestellt. Bei den schwarzen α -Helices handelt es sich um die DNA-Erkennungs-Helices. Die grauen Pfeile kennzeichnen die Bindestellen der degenerierten Primer.

Aus isolierten Trichomen (s. 2.2.13) und jungen Blättern (bis 3 cm) von *N. benthamiana* wurde Gesamt-RNA (s. 2.2.1.3) isoliert, die zur Herstellung von cDNA (s. 2.2.5.4) verwendet wurde. Aus dieser cDNA wurden durch PCR mit Hilfe degenerierter Primer (Rabinowicz *et al.* 1999) mehrere Sequenzen, die ein MYB-Motiv enthalten, amplifiziert. Da diese Primer an die Sequenzen binden, die für die DNA-Erkennungs-Helices codieren, wird ein PCR Produkt erwartet, das eine Größe von ungefähr 180 bp hat. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 3.3), aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.1.5), in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert (s. 2.2.6.2). Von der Transformation wurden verschiedene Kolonien gepickt, Übernachtskulturen angezogen und anschließend wurde eine Plasmid-Isolation (s. 2.2.1.2) durchgeführt. Abschließend wurden die Inserts der Plasmide sequenziert (s. 2.2.4). Es folgte eine Datenbankabfrage mit BLAST, um aus den erhaltenen Sequenzen die auszuwählen, die ein MYB-Motiv enthalten.

Auf diese Weise wurden sechs unterschiedliche Teilsequenzen isoliert.

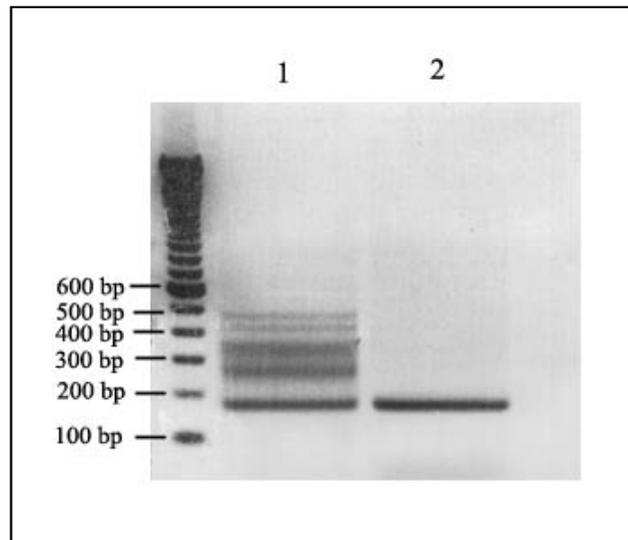


Abb. 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation von *myb*-Teilsequenzen mit degenerierten Primern. Für die Klonierung wurde jeweils die unterste Bande verwendet. Spur 1 zeigt die Produkte der PCR mit Trichom-cDNA als Matrize. Spur 2 zeigt die Produkte der PCR mit Blatt-cDNA als Matrize.

3.2.2 Amplifikation der 3'-Enden verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren mittels RACE

Um die Volllängesequenzen der sechs isolierten *myb*-cDNAs zu amplifizieren wurde ein RACE (s. 2.2.7) durchgeführt. Die hierfür nötigen genspezifischen Primer konnten auf der Grundlage der in 3.2.1 erhaltenen Teilsequenzen ermittelt werden. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten (s. Abb. 3.4), extrahiert, in pGEM[®]-T Easy kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Von den Transformationsplatten wurden jeweils mehrere Kolonien für Übernachtskulturen gepickt, und im Anschluss an eine Plasmidpräparation wurden die erhaltenen PCR-Produkte sequenziert. In allen sechs Fällen gelang eine vollständige Amplifikation der 3'-Enden bis zum Stoppcodon. In Abb. 3.5 sind die Aminosäuresequenzen dieser sechs Teilsequenzen im Vergleich dargestellt.


```

                *           280           *           300           *           320
NbMYBBL11 : ----- : -
NbMYBBL14 : GKDDLT SFSFDE TADLF----- : 277
NbMYBTRI1 : VSFN I LKDVQENSNETKLFMEDSAVEWDWQEI AEDRREVWFWPEETGQDNMSINHSWPLWDSTDTE : 325
NbMYBTRI5 : GQSSSGLIQGFTHLENI VGNGEDNLVDDNNSNYWNTILNSCTLLPADSPVF----- : 312
NbMYBTRI11 : TGVQMDNYMGSCYGFEDNRFNWNNFHYLVTSPIGSPVF----- : 299
NbMYBTRI30 : DMLNNK P STTLEGLDWKDMNNLVF PFPPLVVSNNEVHQHGTLLEEGALNELRYPRD----- : 317
DwMYB1 : NEQNS EDGCNDS DNAECGSCVDVEE SEGEEDENKNYWSS I LNLVNSSSPN S P P P V F----- : 317

                *           340           *
NbMYBBL11 : ----- : -
NbMYBBL14 : ----- : -
NbMYBTRI1 : LLQNCTNEITVEMGSNQNHSA LVAEYSLVAWLLS : 359
NbMYBTRI5 : ----- : -
NbMYBTRI11 : ----- : -
NbMYBTRI30 : ----- : -
DwMYB1 : ----- : -

```

Abb. 3.5: Aminosäuresequenzvergleich der Teilsequenzen der isolierten MYB. Als Vergleich wurde eine diesem Bereich entsprechende Teilsequenz von MYB1 von *Dendrobium* hybrid Woo Leng, die eine hohe Homologie zu NbMYBTRI5 aufweist, angegeben. Die Angaben über die Aminosäuren, die die Helices bilden, wurden aus Martin und Paz-Ares J. (1997) übernommen. Die Aminosäuresequenzen, die hellgrau unterlegt sind, stellen die Motive dar, nach denen die R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* in Untergruppen eingeteilt werden können (Stracke *et al.*, 2001) (NbMYBBL11: Untergruppe 4; NbMYBBL14: Untergruppe 1.1; NbMYBTRI5 und NbMYBTRI11: Untergruppe; siehe Diskussion 4.2).

Eine Amplifikation der 5'-Enden mittels RACE gelang jedoch bei keiner der erhaltenen *myb*-cDNAs.

Um die Verwandtschaft der MYB-Proteine aus *N. benthamiana* mit anderen pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren zu ermitteln, wurde ein Stammbaum erstellt. Hierfür wurden von NbMYBTRI5 die vollständige Proteinsequenz (durch GenomeWalking isoliert; s. 3.4) und von den anderen *N. benthamiana* MYB-Transkriptionsfaktoren die in Abb. 3.5 angegebenen Teilproteinsequenzen verwendet. Für die Erstellung dieses Stammbaumes wurden außerdem MYB-Transkriptionsfaktoren herangezogen, die laut Datenbankabfrage mit BLAST eine hohe Ähnlichkeit zu denen von *N. benthamiana* aufweisen, und MYB-Proteine, die eine Rolle bei der Trichomentwicklung spielen. Nach diesem Stammbaum gruppieren NbMYBTRI5 und NbMYBTRI11 mit AmMIXTA und AmMYBML. Diese beiden Proteine aus *A. majus* stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung von kegelförmigen Epidermiszellen und der Bildung von drüsigen Trichomen. In dieser Arbeit wurde kein MYB-Transkriptionsfaktor isoliert, der mit AtMYB0GL1 gruppiert. Dieses MYB-Protein ist an der Trichomentwicklung in *A. thaliana* beteiligt.

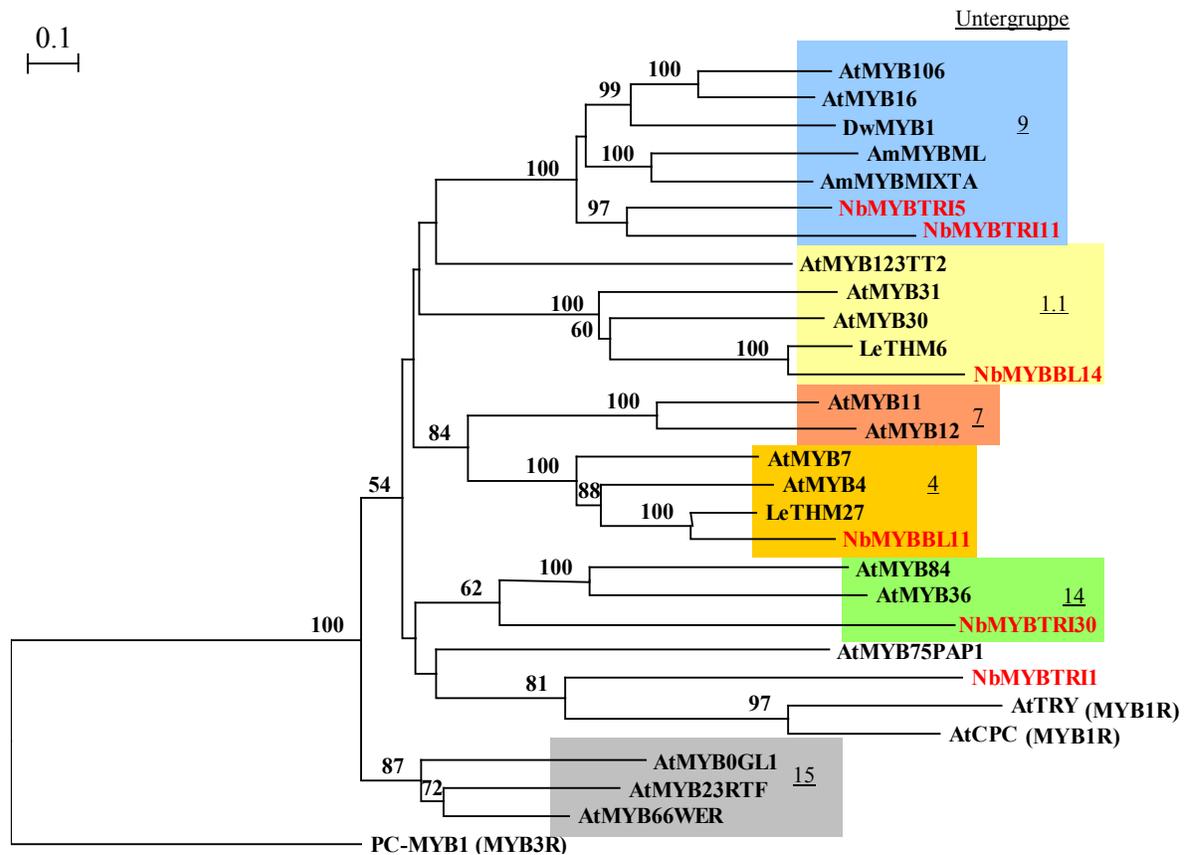


Abb. 3.6: Stammbaum verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren. Die aus *N. benthamiana* isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren wurden mit MYB-Transkriptionsfaktoren verglichen, die höchste Homologie zu diesen aufweisen, und mit MYB-Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie an der Trichombildung in *A. thaliana* beteiligt sind. Ein MYB-Transkriptionsfaktor aus *A. thaliana* (PC-MYB1), der eine Wiederholung von drei MYB-Motiven aufweist, wurde als „outgroup“ verwendet. Der Stammbaum wurde mit der Treecon Software erstellt (Van de Peer und De Wachter, 1994). Das dafür nötige Alignment der Proteine wurde mit ClustalW 1.83 durchgeführt (Thomopson *et al.*, 1994). Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um Bootstrap-Werte, die eine Aussage über die Verlässlichkeit der einzelnen Cluster machen. Es wurden nur Bootstrap-Werte über 50 aufgeführt. Die Angabe über die Untergruppen entspricht der Einteilung der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* nach Stracke *et al.* (2001).

3.3 Virus-induziertes Ausschalten der sechs aus *N. benthamiana* isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei unterschiedliche Viren für das Virus-induzierte Ausschalten bestimmter Gene (VIGS = virus induced gene silencing) zum Einsatz. Es handelt sich dabei um den Tabak-Mosaik-Virus (TMV) und den Tobacco-Rattle-Virus (TRV).

3.3.1 VIGS mittels Tabakmosaikvirus (TMV)

Die ca. 180 bp langen Teilsequenzen der sechs in 3.2.1 isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren wurden aus dem pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor amplifiziert, in den die jeweiligen

myb-Teilsequenzen kloniert wurden. Hierfür kamen genspezifische Primer zum Einsatz, von denen der sense-Primer eine Restriktionsschnittstelle für *Pst* I und der antisense-Primer eine Restriktionsschnittstelle für *Xho* I aufweist. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert, mit *Pst* I und *Xho* I verdaut, in einen mit *Pst* I und *Xho* I geschnittenen BSG-TMV-Vektor kloniert und in *E.coli* DH5 α transformiert. Von den transformierten Bakterien wurden Kolonien gepickt und Übernachtskulturen für die Plasmidpräparation angezogen. Die Klonierung wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte eine Linearisierung des Plasmids durch einen Restriktionsverdau mit *Kpn* I, damit eine *in vitro*-Transkription durchgeführt werden konnte. Danach fand eine Transfektion von je fünf vier Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen statt (s. 2.2.14). Zur Kontrolle, ob die *in vitro*-Transkription und die Transfektion der Pflanzen funktioniert hatte, wurde ein Virus-Plasmid, das ein Gen für ein grünfluoreszierendes Protein (*gfp*) trägt, der gleichen Vorgehensweise unterzogen. Um Symptome, die durch die Infektion der Pflanzen mit dem Virus verursacht wurden, von denen zu unterscheiden, die auf dem Ausschalten von Genen beruhen, wurden als Kontrolle Pflanzen mit leerem Virus infiziert.

Die Pflanzen, bei denen die jeweils unterschiedlichen *myb*-Gene ausgeschaltet worden waren, zeigten keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen, die mit dem leeren Virus infiziert worden waren. Die mit TMV:*gfp* transfizierten Kontrollpflanzen fluoreszierten grün. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Transfektion erfolgreich war und das Nicht-Vorhandensein phänotypischer Veränderungen nicht auf methodische Fehler zurückzuführen ist.

3.3.2 VIGS mittels Tobacco-Rattle-Virus (TRV)

Alle sechs 180 bp großen Teilsequenzen, die in 3.2.1 isoliert werden konnten und in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert wurden, wurden durch einen Restriktionsverdau mit *Apa* I und *Spe* I wieder aus dem Vektor ausgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Gelextraktion gereinigt. Anschließend fand eine Ligation dieser Teilsequenzen in einen ebenfalls mit *Apa* I und *Spe* I geschnittenen pTV00-Vektor statt.

Zusätzlich wurde von jeder isolierten *myb*-cDNA ein ca. 600 bp großes Fragment in einen pTV00-Vektor kloniert. Hierfür wurden 600 bp große Teilfragmente aus dem jeweiligen pGEM[®]-T Easy-Plasmid, das das 3'-RACE-Produkt trägt, mit den entsprechenden genspezifischen Primern amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass PCR-Produkte erhalten wurden, die im 3'-Bereich des Gens liegen und noch einen Teil des 3'-untranslatierten Bereichs umfassen. Die so amplifizierten Fragmente wurden über eine

Gelpurifikation aufgereinigt, in einen pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert und transformiert. Die Ligation wurde durch eine Sequenzierung der Plasmide, die aus einer Übernachtskultur gewonnen wurden, überprüft. Die 600 bp-Teilsequenzen wurden durch einen Restriktionsverdau mit *Apa* I und *Spe* I aus dem Plasmid wieder ausgeschnitten und in einen *Apa* I und *Spe* I verdauten pTV00-Vektor ligiert.

Die 180 bp- bzw. 600 bp-Fragmente werden in der folgenden Arbeit z.B. für *mybtri5* als MybTri5/180 bzw. als MybTri5/600 bezeichnet. Die Benennung erfolgt für die anderen *myb*-Gene entsprechend.

Die so erhaltenen pTV:Myb/180- bzw. pTV:Myb/600-Vektoren wurden in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Plasmide sichergestellt. Im Anschluss daran wurden die Plasmide in Agrobakterien transformiert (s. 2.2.6.2). Von jeder Transformation wurde eine Kolonie gepickt und eine Übernachtskultur angelegt. Die Transformation wurde hier mittels PCR überprüft, wobei 2 μ l der Übernachtskultur als Matrize dienten und Primer zum Einsatz kamen, die benachbart zur multiplen Klonierungsstelle des pTV00-Vektors binden. In allen Fällen konnte eine Bande der entsprechenden Länge beobachtet werden. Die Übernachtskultur wurde weiterhin für die Infiltration von *N. benthamiana* Pflanzen verwendet (2.2.15), und für spätere Infiltrationen wurden aus diesen Übernachtskulturen Glycerol-Stocks hergestellt. Es wurden je sechs Pflanzen pro Konstrukt infiltriert. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit leerem Vektor oder nur mit Puffer infiltriert.

Nur bei den Pflanzen, die mit pTV:MybTri5/180 bzw. pTV:MybTri5/600 infiziert wurden, konnte eine phänotypische Veränderung festgestellt werden. Vergleicht man die ganzen Pflanzen miteinander stellt man fest, dass die mit Virus-infizierten Pflanzen gegenüber den Puffer-Kontroll-Pflanzen kleiner sind. Zwischen den pTV:MybTri5/180- bzw. pTV:MybTri5/600-Pflanzen und den pTV00-Pflanzen ist kein Unterschied zu erkennen (s. Abb. 3.7). Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, hat sich die Wuchsform der Blätter an sich nicht verändert. Auffällig ist der glatte Blattrand der Pflanzen, die mit pTV:MybTri5/180 bzw. pTV:MybTri5/600 infiltriert wurden, im Gegensatz zu dem mit pTV00-infizierten Pflanzen. Außerdem weisen diese Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (pTV00) eine glänzendere Blattoberfläche auf.

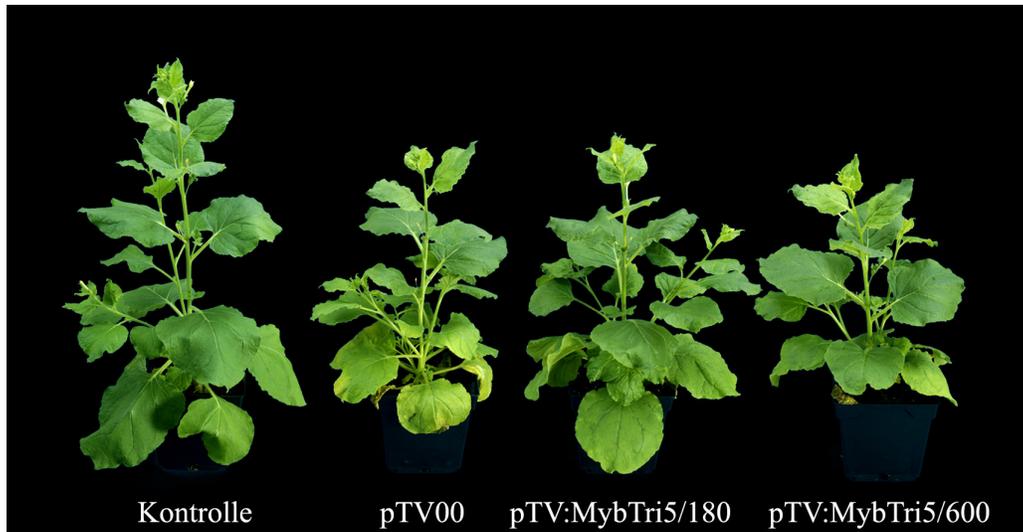


Abb. 3.7: Vergleich der Wuchsform und Größe von mit verschiedenen Virus-Konstrukten infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. In der Wuchsform unterscheiden sich die mit Virus infizierten Pflanzen nicht von der Kontrollpflanze, die mit Puffer infiltriert wurde. Bezüglich der Größe ist zwischen den Virus-infizierten Pflanzen und der Puffer-Kontroll-Pflanze ein Unterschied zu erkennen, zwischen den unterschiedlichen Virus-infizierten Pflanzen jedoch nicht.

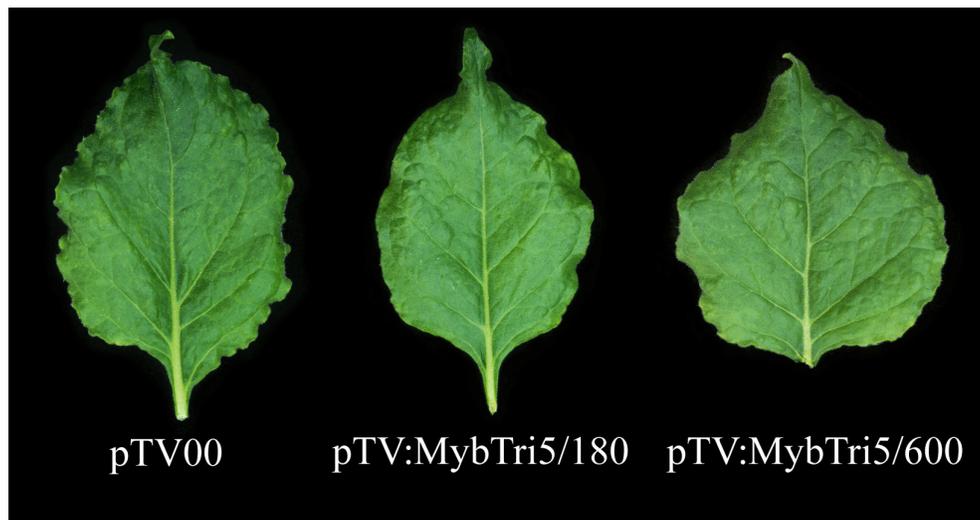


Abb. 3.8: Vergleich einzelner Blätter von mit verschiedenen Virus-Konstrukten infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Bei den Pflanzen, die mit pTV:MybTri5/180 infiltriert wurden, ist der glatte Blattrand im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen (pTV00) am deutlichsten zu sehen. Aber auch die pTV:MybTri5/600-Pflanzen zeigen eine Glättung des Blattrandes.

Wie in Abb. 3.9 und der ESEM-Aufnahme (environmental scanning electronic microscopy; Abb. 3.10) bei näherer Betrachtung zu erkennen ist, weisen die pTV:MybTri5/180- bzw. pTV:MybTri5/600-Pflanzen eine Reduktion in der Anzahl der Trichome auf, deren Stiele aus mehreren Zellen bestehen (lange Trichome).

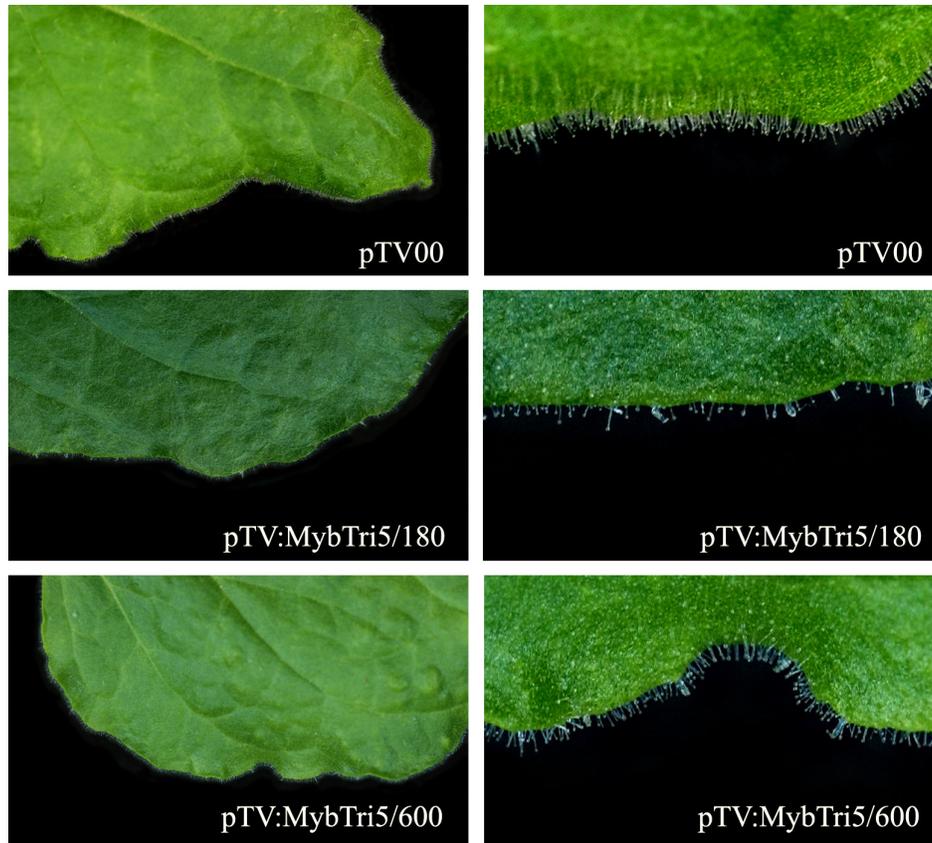


Abb. 3.9: Vergleich einzelner Blattausschnitte von mit verschiedenen Virus-Konstrukten infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Bei den mit pTV:MybTri5/180 bzw. 600 infiltrierten Pflanzen ist eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Trichome im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen zu erkennen. Bei den mit pTV:MybTri5/180 infiltrierten Pflanzen ist die glänzendere Epidermis zu sehen.

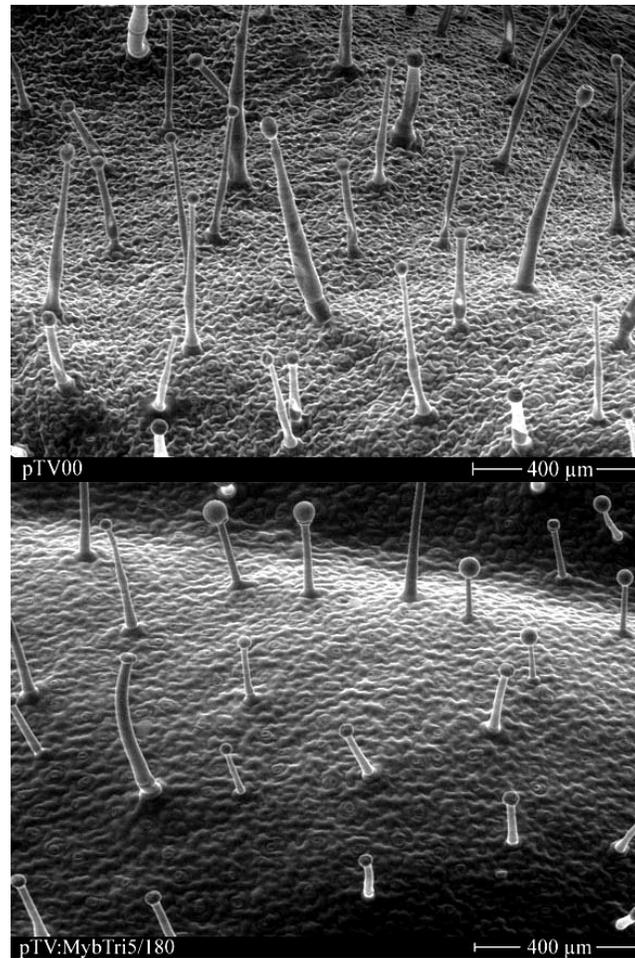


Abb. 3.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Blattoberflächen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mit pTV:MybTri5/180 infiltrierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen weniger lange Trichome aufweisen.

Um zu testen, ob sich die Zahl der Trichome verändert hat, wurde mit Hilfe eines Stereomikroskops die Zahl der langen Trichome und die Zahl der Trichome mit 1-zelligem Stiel (kurze Trichome) gezählt. Zur Überprüfung der Signifikanz der Änderungen wurde der Student t-Test angewandt. Pro Viruskonstrukt wurden je 3 Pflanzen für die Auswertung herangezogen. Von jeder Pflanze wurden drei Blätter untersucht, wobei je Blatt acht 2 mm² große Flächen ausgezählt wurden. Es wurden Blätter ausgewählt, die am Hauptstängel aufeinander folgten und zwischen 4 und 8 cm lang waren. Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl der langen Trichome bei den mit pTV:MybTri5/180 und bei den mit pTV:MybTri5/600 infiltrierten Pflanzen verglichen mit den Kontroll-Pflanzen (mit pTV00 infiziert) signifikant ($\alpha = 0,05$) reduziert ist. Bei der Anzahl der kurzen Trichome lag keine signifikante Veränderung ($\alpha = 0,05$) vor. Die Gesamtzahl der Trichome weist eine

signifikante Verringerung auf ($\alpha = 0,05$) (s. Tab. 3.1 und Abb. 3.11). Die Ergebnisse der Auszählung sind im Anhang detailliert aufgeführt.

Tab. 3.1: Trichomzahlen von mit verschiedenen Viruskonstrukten infizierten Pflanzen

pTV00	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²			pTV: MybTri5/180	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²		
	lange Trichome	kurze Trichome	Σ		lange Trichome	kurze Trichome	Σ
Pflanze 1	10	28,6	38,6	Pflanze 1	2,8	18,1	20,9
Pflanze 2	13,1	18,1	31,2	Pflanze 2	3,4	18,0	21,4
Pflanze 3	13,4	20,7	34,1	Pflanze 3	2,9	19,7	22,6
Mittelwert	12,2	22,5	34,7	Mittelwert	3,0	18,6	21,6

pTV: MybTri5/600	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²		
	lange Trichome	kurze Trichome	Σ
Pflanze 1	6,5	23,0	29,5
Pflanze 2	6,4	22,1	28,5
Pflanze 3	6,3	20,8	27,1
Mittelwert	6,4	22,0	28,4

Von jeder Pflanze wurden drei am Hauptstängel aufeinander folgende Blätter ausgewählt. Pro Blatt wurde von je acht willkürlich ausgewählten Flächen von einer Größe von 2mm² die Anzahl der Trichome ermittelt. Für jeden Trichomtyp wurde für die einzelnen Pflanzen der Mittelwert aus den erhaltenen Zahlen gebildet.

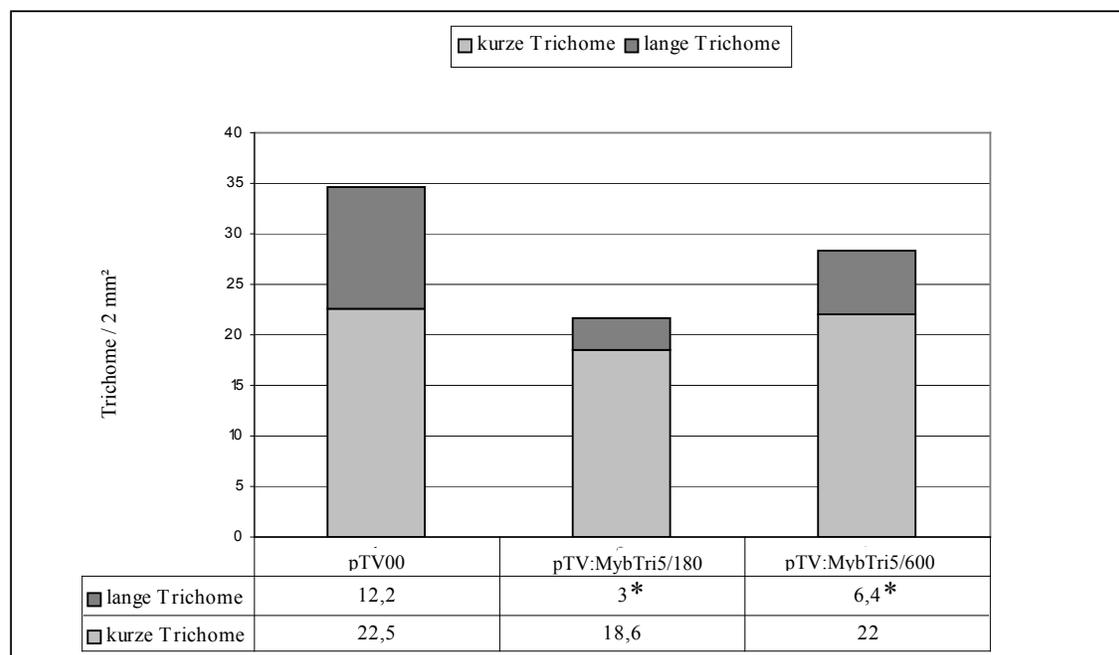


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der Trichomzahlen von mit verschiedenen Viruskonstrukten infizierten Pflanzen. Es liegt eine signifikante Verringerung der Gesamtzahl der Trichome und der langen Trichome bei den mit pTV:MybTri5/180 und pTV:MybTri5/600 infizierten Pflanzen im Vergleich zu den mit pTV00 infizierten Pflanzen vor, aber keine signifikante Veränderung der kurzen Trichome. Die Werte für diese Grafik wurden aus der Tab. 3.1 übernommen. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Zahlen geben die signifikanten Veränderungen ($\alpha = 0,05$) an.

3.3.3 Silencing-Nachweis mit RT-PCR bei pTV-Pflanzen

Das Ausschalten von Genen mittels VIGS findet posttranskriptional statt, d.h. die DNA wird transkribiert und die daraus resultierende mRNA wird abgebaut, sodass keine Translation mehr stattfinden kann. Dies bedeutet, dass in Pflanzen, in denen ein Gen durch VIGS ausgeschaltet wurde, die entsprechende mRNA in geringerer Menge vorhanden sein müsste als in den Pflanzen, die mit leerem Virus infiziert sind. Dies kann durch eine quantitative RT-PCR nachgewiesen werden. Der Nachweis fand mit Blüten statt, da sich bei Northern Blot-Analysen herausgestellt hatte, dass dort die Expression von *mybtri5* am höchsten ist (s. 3.5.2). Aus geschlossenen Blüten von je sieben 11 Wochen alten pTV00-, pTV:Tri5/180- bzw. pTV:Tri5/600-Pflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA wurde zur Herstellung von cDNA verwendet, mit der dann die quantitative PCR durchgeführt wurde. Die Primer wurden so gewählt, dass ein 607 bp großes Fragment am 3'-Ende des Gens amplifiziert wird (Bindestellen der Primer s. Abb. 3.15). Um zu gewährleisten, dass gleiche Mengen der verschiedenen cDNAs eingesetzt wurden, wurde als Kontrolle eine PCR zur Amplifikation des *aktin*-Gens durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.12 zu sehen. Bei den pTV:MybTri5/180-Pflanzen zeigt sich im Vergleich zu den pTV00-Pflanzen eine geringe Reduktion der entsprechenden mRNA. Bei den pTV:MybTri5/600-Pflanzen ist eine deutlichere Verringerung zu sehen.

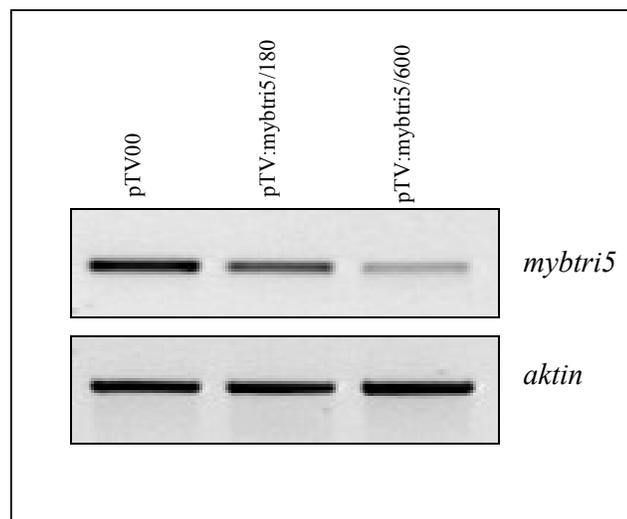


Abb. 3.12: Quantitative RT-PCR. Bei den Pflanzen, die mit pTV:MybTri5/180 bzw. mit pTV:MybTri/600 infiziert sind, ist im Vergleich zu den Pflanzen, die mit leerem Virus infiziert sind, eine Reduktion der entsprechenden mRNA zu erkennen. Als Kontrolle diente eine PCR zur Amplifikation von *aktin*.

3.3.4 Vergleich der mit TMV und TRV infizierten Pflanzen

Um die Auswirkungen, die eine Infektion von *N. benthamiana*-Pflanzen mit Tabak-Mosaik-Virus hat, mit denen zu vergleichen, die eine Infektion mit Tobacco-Rattle-Virus hat, wurden Pflanzen parallel angezogen und im selben Alter mit TMV:gfp bzw. pTV:gfp infiziert oder unbehandelt weiter kultiviert. Das Ergebnis hierzu findet sich in Abb. 3.13. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine mit TRV-infizierte Pflanze weit weniger virusbedingte Symptome aufweist als eine TMV-infizierte Pflanze. Bei TRV ist fast kein Einfluss der Infektion auf das Wachstum zu erkennen, die Blätter weisen jedoch einen gewellteren Blattrand auf als die Kontrollpflanzen. Bei den mit TMV infizierten Pflanzen ist ein deutlich vermindertes Wachstum zu erkennen, die Blattform hat sich gegenüber den Kontrollpflanzen stark verändert und der Blattrand zeigt eine stärkere Wellung. Außerdem weisen die Blätter der TMV-infizierten Pflanzen starke sklerotische Veränderungen auf, die bei den TRV-infizierten Pflanzen kaum zu finden sind. Auch ist bekannt, dass TRV im Gegensatz zu TMV Meristeme infiziert. Dies bedeutet, dass mit diesem Virus auch Gene ausgeschaltet werden können, die eine Rolle bei der Entwicklung von Pflanzenorganen oder -geweben spielen. Hierfür spricht auch, dass Pflanzen, die mit einem MybTri5-Viruskonstrukt infiziert wurden, nur im Falle von TRV eine Reduktion der Trichome aufweisen, nicht aber bei TMV. Aus diesen Gründen, wurden die meisten der bereits oben beschriebenen Untersuchungen nur mit TRV durchgeführt.

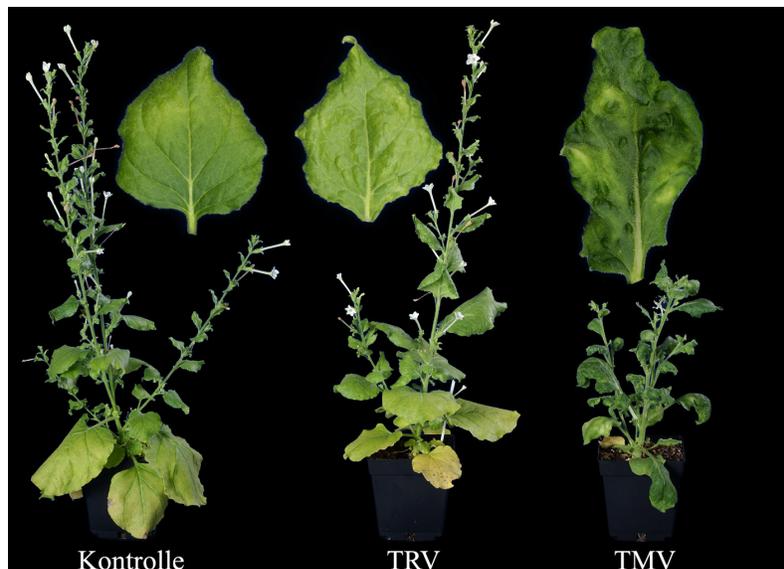


Abb. 3.13: Vergleich von TRV, TMV infizierten Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen. Bei der Infektion mit TMV ist eine deutliche Veränderung in der Pflanzenentwicklung (Reduktion des Wachstums, Veränderung der Blattform, sklerotische Veränderungen der Blätter) zu erkennen. TRV-infizierte Pflanzen weisen eine weitaus geringere Veränderung auf.

3.4 Isolierung des 5'-Endes von *mybtri5* mittels GenomeWalking und Amplifikation des Volllängeklons

Wie sich bei den in 3.3 beschriebenen VIGS-Experimenten herausstellte, zeigten nur Pflanzen, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet wurde, phänotypische Veränderungen. Deshalb wurde nur für diese cDNA die Volllängesequenz mittels GenomeWalking ermittelt (s. 2.2.8). Die genspezifischen Primer wurden aus den in 3.2.1 und 3.2.2 erhaltenen Sequenzen abgeleitet. Die aus der nested PCR erhaltenen PCR-Produkte (s. Abb. 3.14) wurden durch eine Gelpurifikation isoliert. Nach einer Klonierung in pGEM[®]-T Easy und einer Transformation in *E.coli* DH5 α wurden von Übernachtskulturen Plasmide isoliert, deren Inserts anschließend sequenziert wurden.

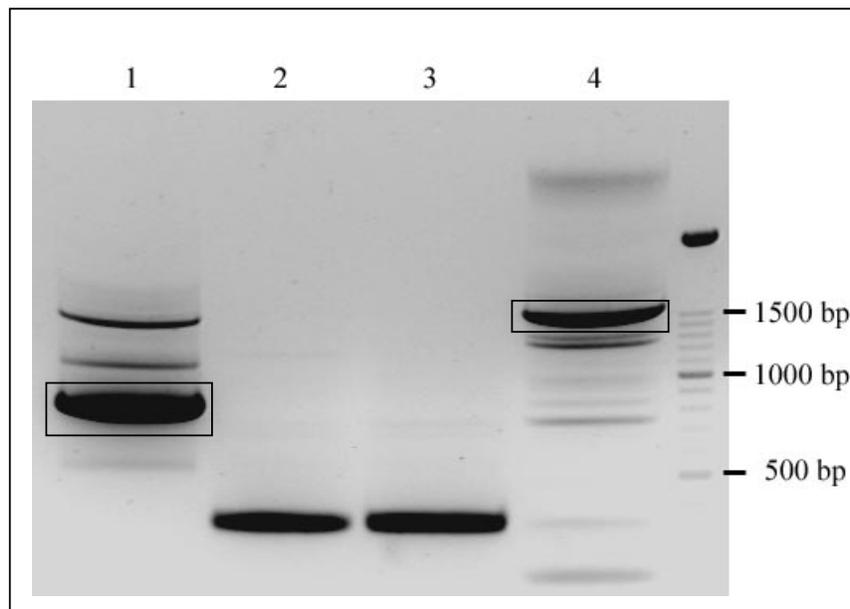


Abb. 3.14: Gelelektrophoretische Auftrennung der nested PCR-Produkte aus GenomeWalking. Spur 1 zeigt die PCR-Produkte bei der Verwendung *Hpa* I verdauter genomischer DNA als Matrize. Spur 2, 3, 4 zeigen jeweils die PCR-Produkte bei der Verwendung *Sca* I, *Pvu* II bzw. *Stu* I verdauter genomischer DNA. Aus dem Gel extrahiert und kloniert wurden nur die gekennzeichneten Banden in Spur 1 und 4.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit bekannten *myb*-Sequenzen aus der Datenbank verglichen, um das Startcodon zu ermitteln. Anschließend wurde der Volllängeklon aus einer cDNA amplifiziert, die aus jungen Blättern gewonnen wurde. Die PCR wurde mit einem sense-Primer, der mit dem Startcodon beginnt, und einem antisense-Primer, der mit dem Stoppcodon endet, durchgeführt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in pGEM[®]-T Easy kloniert und anschließend sequenziert. Die erhaltene Volllängesequenz ist in Abb. 3.15 dargestellt. In Abb. 3.16 findet sich ein Vergleich von NbMYBTRI5 mit vier anderen MYB-

Transkriptionsfaktoren, die eine hohe Homologie zu NbMYBTRI5 aufweisen. Die Funktion von MYB1 aus *Dendrobium* sp. und von MYB25 aus *Gossypium hirsutum* ist unbekannt. MYBML aus *Antirrhinum majus* spielt vermutlich eine Rolle in der Entwicklung von Trichomen auf den Petalen (Glover *et al.*, 1998). MIXTA aus *A. majus* ist an der Entwicklung der kegelförmigen Epidermiszellen der Petalen beteiligt, die die Farbintensität im Vergleich zu Petalen mit einer glatten Epidermiszellschicht erhöhen (Noda *et al.*, 1994). Das „myb related protein 1“ aus *Petunia hybrida* besitzt eine ähnliche Aufgabe wie MIXTA (van Houwelingen *et al.*, 1998).

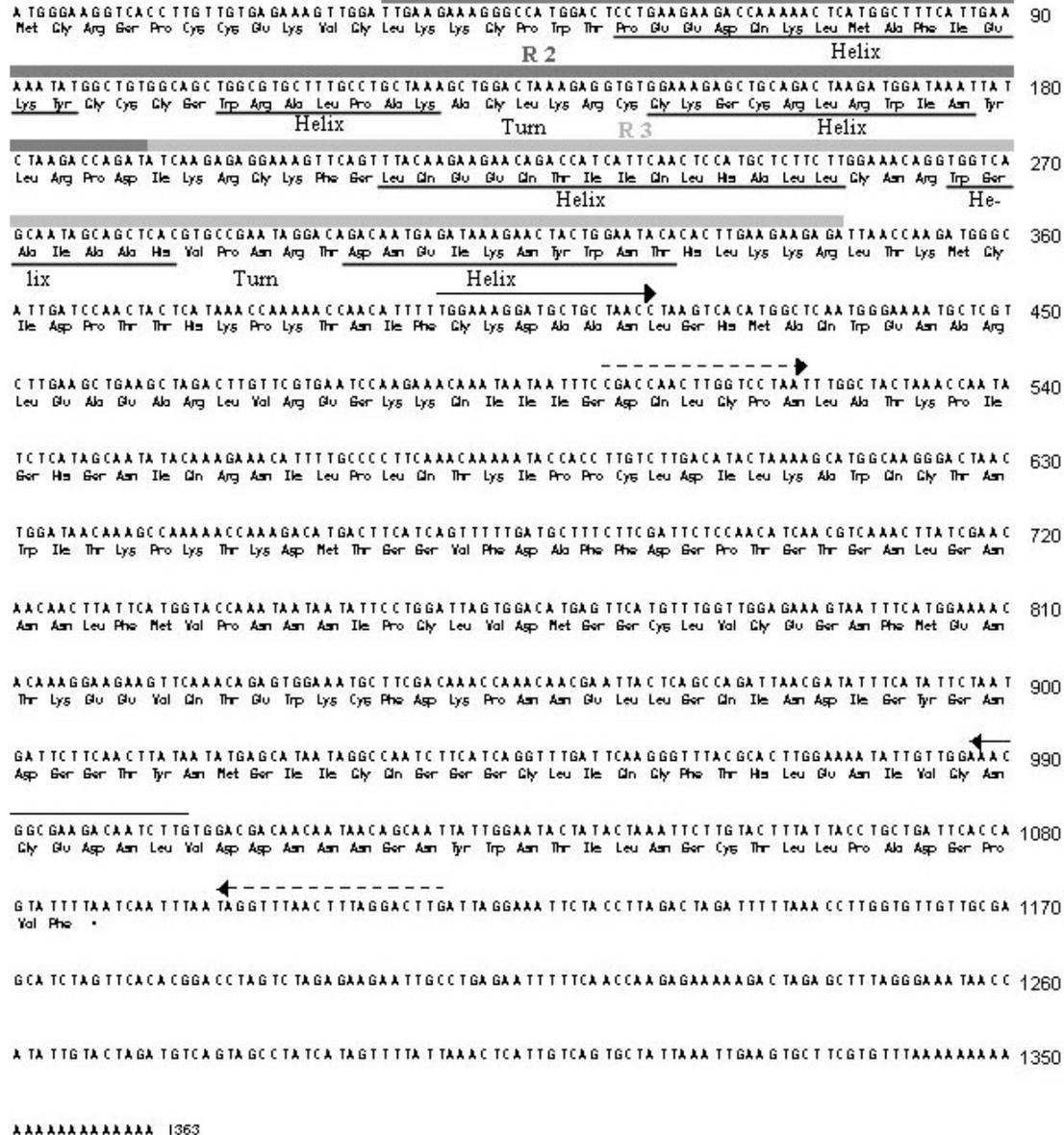


Abb. 3.15: Nukleotid- und translatierte Aminosäuresequenz des *mybtri5*-cDNA-Volllängeklons. Die Kennzeichnung der Aminosäuren, die die MYB-Motive (R2, R3) und die Helices bilden, erfolgte nach Martin und Paz-Ares (1997). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Bindestellen für die Primer der RT-PCR (s. 3.2.3). Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die Bindestellen der Primer zur Amplifikation der 600 bp großen Teilsequenz der *mybtri5*-cDNA für die Herstellung der Viruskonstrukte (s. 3.2.2), der RNAi-Konstrukte (s. 3.6.1) und der Sonde für Northern und Southern Blots.

3.5 Ermittlung der Kopienzahl und Expressionsanalysen von *mybtri5*

3.5.1 Southern Blot-Analysen zur Ermittlung der Kopienzahl von *mybtri5*

Um herauszufinden, wie oft *mybtri5* im Genom vorliegt, wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt (2.2.10, 2.2.11, 2.2.12). Dazu wurde von *N. benthamiana* Wildtyp-Pflanzen genomische DNA isoliert. Je 20 µg der genomischen DNA wurden mit *EcoR* I, *Ban* I bzw. *Kpn* I über Nacht verdaut. Die Enzyme für den Verdau wurden so gewählt, dass sie nicht, wie *EcoR* I, oder einmal, wie *Ban* I und *Kpn* I, innerhalb des Fragments schneiden, das als Matrize für die Herstellung der Sonde dient. Die Sondensequenz wurde so ausgewählt, dass sich dort kein Intron befindet, sie entspricht MybTri5/600 (Sequenz für die Herstellung der Virus- und RNAi-Konstrukte). Da bei der mit *EcoR* I verdauten genomischen DNA (keine Schnittstelle innerhalb des Sondenbereichs) zwei Banden und bei der mit *Ban* I bzw. *Kpn* I verdauten genomischen DNA (eine Schnittstelle innerhalb des Sondenbereichs) vier Banden zu sehen sind, liegt *mybtri5* in zwei Kopien im Wildtyp-Genom vor (s. Abb. 3.17).

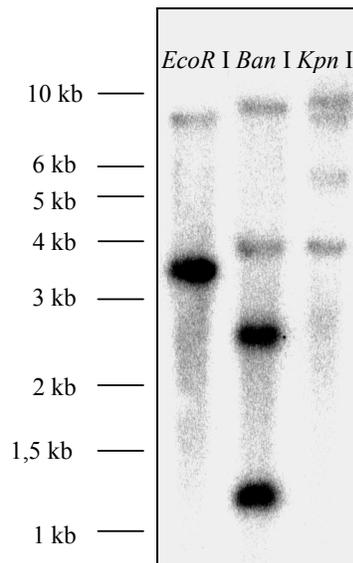


Abb. 3.17: Southern Blot zur Ermittlung der Kopienzahl von *mybtri5*. Bei der mit *EcoR* I verdauten genomischen DNA finden sich zwei Banden, bei der mit *Ban* I bzw. *Kpn* I verdauten genomischen DNA finden sich vier Banden. Daraus lässt sich folgern, dass *mybtri5* in zwei Kopien im Genom vorliegt.

3.5.2 Expressionsanalysen von *mybtri5* mittels Northern Blot

Um zu analysieren, in welchem Gewebe und zu welchem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung *mybtri5* exprimiert wird, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt (2.2.10, 2.2.11, 2.2.12). Aus den verschiedenen Pflanzengeweben wurde Gesamt-RNA isoliert, von der

jeweils gleiche Mengen auf ein RNA-Gel aufgetragen wurden (s. RNA-Ladekontrollen). Als Template für die Sonde diente MybTri5/600, das zur Herstellung des Viruskonstrukts und zur Herstellung des RNAi-Konstrukts verwendet wurde.

Um zu ermitteln, in welchen Pflanzenteilen *mybtri5* exprimiert wird, wurden von acht ca. 10 Wochen alten Pflanzen Blüten und Blätter in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, verschiedene Stängelabschnitte und Wurzeln geerntet. Die daraus gewonnene RNA wurde für einen Northern Blot verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.18 dargestellt. Die höchste Expression findet sich in den sich entwickelnden Blüten und im oberen Stängelbereich, aber auch in den jungen Blättern ist eine Expression zu erkennen.

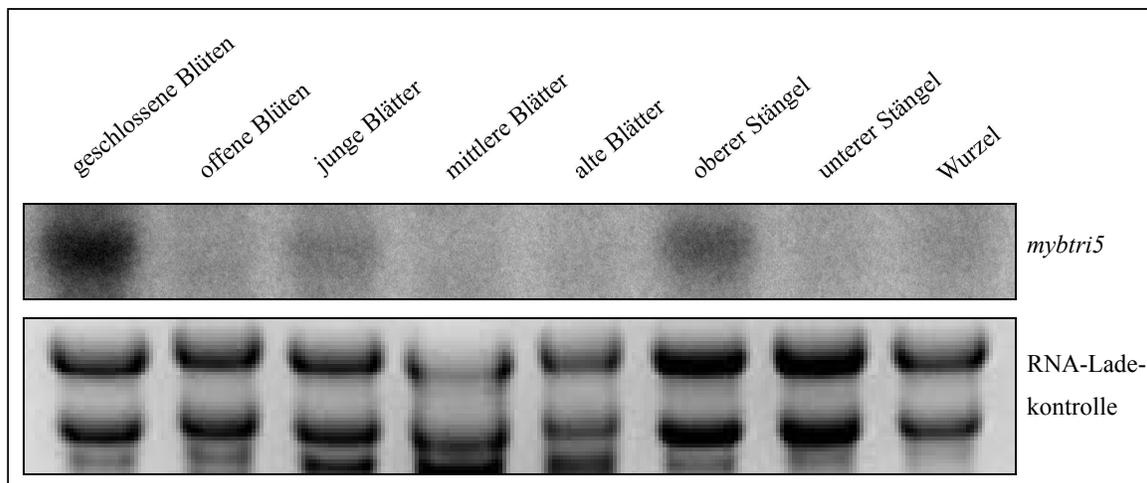


Abb. 3.18: Northern Blot zur Expressionsanalyse von *mybtri5* in verschiedenen Organen. Es wurde die Expression in folgenden Pflanzenteilen untersucht: sich entwickelnde Blüten, bereits geöffnete Blüten, junge Blätter bis max. 2,5 cm, mittlere Blätter zwischen 6 und 8 cm, alte Blätter vom untersten Teil der Pflanze (> 11 cm), oberer Stängelabschnitt (15 cm), unterer Stängelabschnitt (10 cm), Wurzeln. In den sich entwickelnden Blüten und im oberen Stängelteil ist eine deutliche Expression zu erkennen. In den jungen Blättern kann eine geringe Expression festgestellt werden.

Da die Expression von *mybtri5* in den sich entwickelnden Blüten am größten ist, wurden die Blüten näher untersucht. Es wurde von 10 Pflanzen Calyx (Sepalen), Corolle (Petalen) und Gynoeceum von Blüten mit noch nicht geöffneter Krone gesammelt. In Abb. 3.19 ist deutlich zur erkennen, dass *mybtri5* nur in der Krone exprimiert wird.

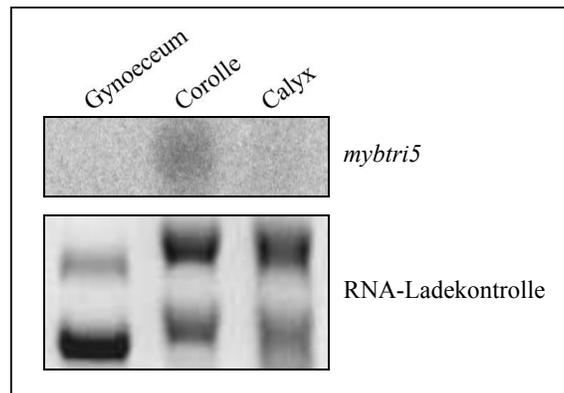


Abb. 3.19: Northern Blot zur Expressionsanalyse von *mybtri5* in sich entwickelnden Blüten. Verglichen wird die Expression von *mybtri5* im Gynoecium, der Corolle und dem Calyx sich entwickelnder Blüten. Nur in der Corolle ist eine deutliche Expression festzustellen.

Um eine nähere Aussage darüber machen zu können, in welchem Entwicklungsstadium der Pflanze *mybtri5* exprimiert wird, wurden weitere Northern-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden Pflanzen gesät, nach zehn Tagen pikiert, und nach 30 Tagen umgesetzt. Zwanzig Tage nach der Aussaat wurden die ersten Pflanzen geerntet und anschließend noch viermal im Abstand von je zehn Tagen weitere Pflanzen. Das gesammelte Pflanzenmaterial, die Anzahl der verwendeten Pflanzen und das Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Abb. 3.20 zeigt die organspezifische Expression von *mybtri5* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Eine deutliche Expression von *mybtri5* ist im Wachstumspunkt von 20 bis 50 Tage alten Pflanzen zu erkennen. Bei 60 Tage alten Pflanzen kann nur noch ein schwaches Signal nachgewiesen werden. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis des Northern Blots zur organspezifischen Expressionsanalyse in adulten Pflanzen (s. Abb. 3.17) überein, bei dem sich im oberen Stängelbereich, der in diesem Fall den Wachstumspunkt mit einschließt, eine deutliche Expression zeigt. Außerdem wird *mybtri5* im oberen Stängelabschnitt von 30 bis 50 Tage alten Pflanzen exprimiert. In diesem Bereich ist bei 40 Tage alten Pflanzen ein deutliches Signal zu erkennen. Hingegen zeigen die entsprechenden Gewebsabschnitte der 30 und 50 Tage alten Pflanzen nur eine relativ schwache Bande.

Tab. 3.2: Pflanzenmaterial, das für die Northern Blots zur Expressionsanalyse von *mybtri5* während der Pflanzenentwicklung verwendet wurde

Alter der Pflanze [Tage]	Anzahl der verwendeten Pflanzen	Verwendete Pflanzenteile	Abkürzungscode für Northern
1. Ernte 20 Tage alte Pflanzen	360	Gesamter oberirdischer Teil (=Wachstumspunkt)	1-1
		Wurzel	1-2
2. Ernte 30 Tage alte Pflanzen	20	Wachstumspunkt bis maximale Blattlänge von 1,5 cm noch verbleibender oberirdischer Teil	2-1
		Wurzel	2-2
		Wurzel	2-3
3. Ernte 40 Tage alte Pflanzen	15	Wachstumspunkt bis maximale Blattlänge von 2 cm	3-1
		Blätter 4-7 cm	3-2
		Stängel ohne Wachstumspunkt	3-3
		Wurzel	3-4
4. Ernte 50 Tage alte Pflanzen	5	Wachstumspunkt bis maximale Blattlänge von 2 cm einschließlich Blütenanlagen	4-1
		Blätter 3-5 cm	4-2
		Blätter 8-11 cm	4-3
		oberer Stängel (oberste 5 cm) ohne Wachstumspunkt	4-4
		unterer Stängel (unterste 5 cm)	4-5
		Wurzel	4-6
5. Ernte 60 Tage alte Pflanzen	8	Wachstumspunkt bis maximale Blattlänge von 2 cm einschließlich Blütenanlagen	5-1
		Blätter 3-5 cm	5-2
		Blätter 8-11 cm	5-3
		oberer Stängel (oberste 5 cm) ohne Wachstumspunkt	5-4
		unterer Stängel (unterste 5 cm)	5-5
		Wurzel	5-6

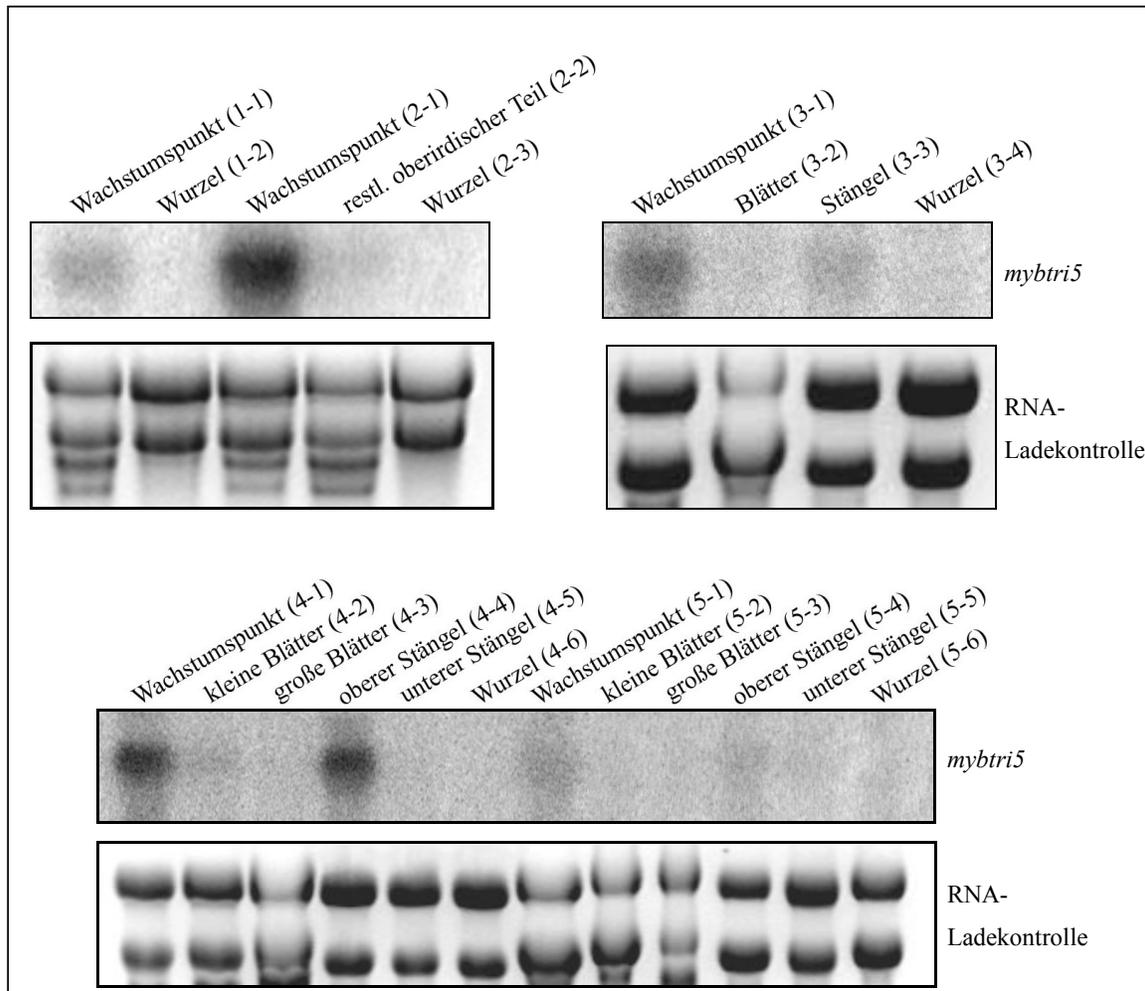


Abb. 3.20: Northern Blot zur Expressionsanalyse von *mybtri5* während der Pflanzenentwicklung. Während der gesamten Pflanzenentwicklung ist eine Expression im Wachstumspunkt (1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1) zu erkennen, die bei den 30 (2-1), 40 (3-1) und 50 (4-1) Tage alten Pflanzen am höchsten ist. Auch im Stängel bzw. im oberen Teil des Stängels ist eine Expression zu erkennen (3-3, 4-4, 5-4). Der Abkürzungscode für die aufgetragenen Proben ist aus Tab 3.4 zu entnehmen.

3.6 Ausschalten von *mybtri5* mittels einer Transformation mit einem RNAi-Konstrukt

Da das Ausschalten von Genen mittels VIGS erst ab dem Zeitpunkt der Infektion der Pflanzen mit dem Virus, d.h. erst wenn die Pflanzen 5-6 Wochen alt sind, beginnt, können Rückschlüsse über die Funktion des ausgeschalteten Gens erst ab diesem Entwicklungsstadium gezogen werden. Um die Funktion des betroffenen Gens in früheren Entwicklungsstadien der Pflanze zu erkennen, muss eine stabile, d.h. eine erbliche Transformation durchgeführt werden, sodass das betroffene Gen bereits bei der Keimung ausgeschaltet wird, wenn zu diesem Zeitpunkt schon eine Expression stattfindet.

Für eine stabile Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet ist, wurden *N. benthamiana*-Pflanzen mit einem RNAi-Konstrukt transformiert.

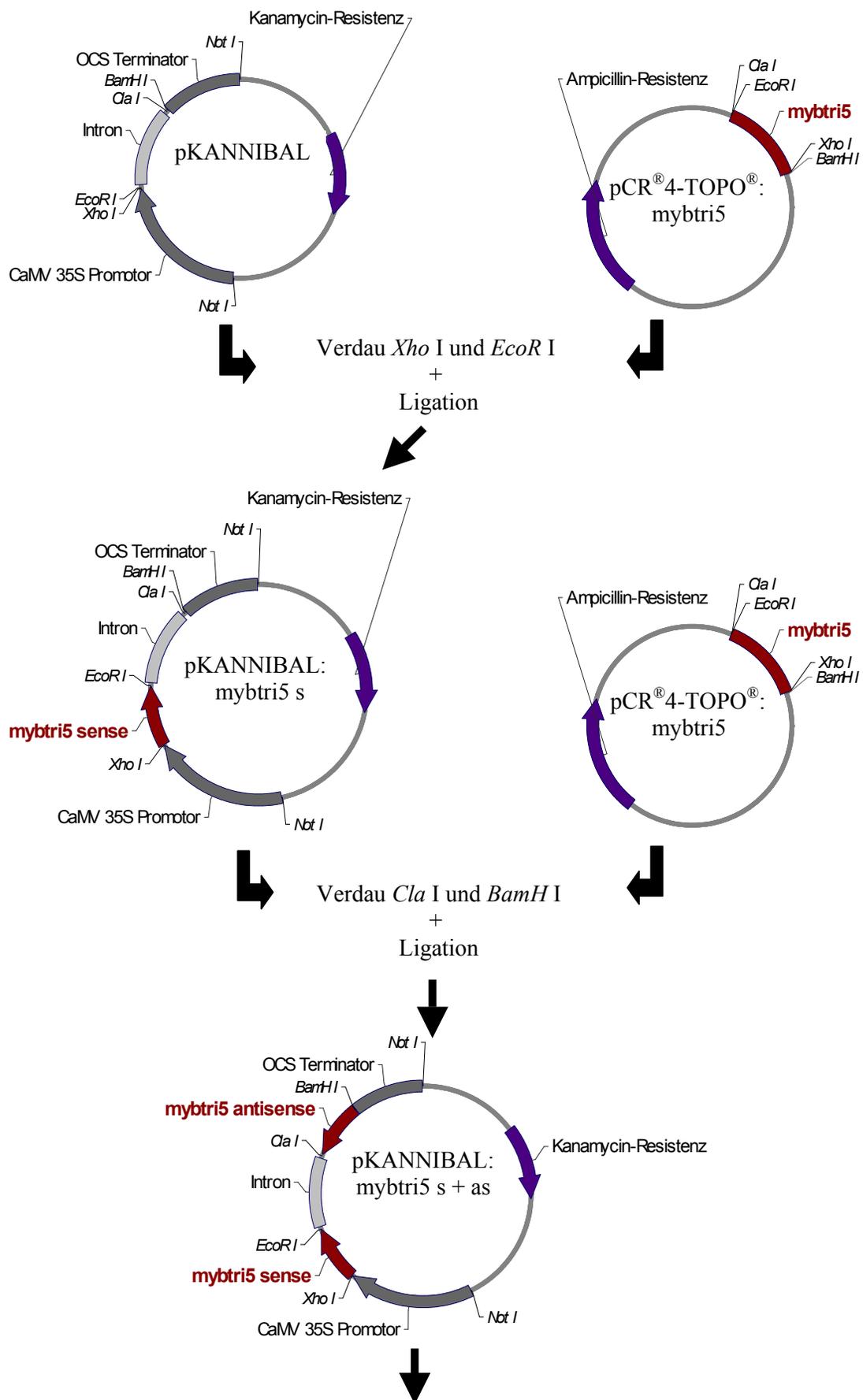
3.6.1 Herstellung eines RNAi-Konstrukts von *mybtri5*

Die Herstellung eines RNAi-Konstrukts fand unter der Zuhilfenahme des pKANNIBAL-Klonierungsvektors (CSIRO Plant Industry) (s. 2.1.4) statt. Das im Folgenden beschriebene Vorgehen zur Anfertigung des RNAi-Konstrukts ist in Abb. 3.21 schematisch dargestellt.

Aufgrund der Ergebnisse von Wesley (2001) wurde für das RNAi-Konstrukt eine ca. 600 bp große cDNA-Sequenz im 3'-Bereich von *mybtri5* ausgewählt (Primerbindestellen für die Amplifikation dieses Abschnitts s. Abb. 3.15). Diese Sequenz wird in der weiteren Arbeit als MybTri5/600 bezeichnet. Bei der Auswahl dieses Fragments musste darauf geachtet werden, dass sich wegen späterer Klonierungsarbeiten innerhalb dieser DNA-Sequenz keine *Not* I-Schnittstelle befindet. Diese Teilsequenz wurde mit den Primern MYB Tri5 pKAN 5' und MYB Tri5 pKAN3' aus dem pGEM[®]-T Easy-Plasmid amplifiziert, das das 3'-RACE-Produkt von *mybtri5* trägt (aus 3.2.2). Die Sequenz dieser Primer setzt sich aus einem Teil zusammen, der dem 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden Fragments komplementär ist, und einem Teil, der die Sequenzen für die Schnittstellen von *EcoR* I und *Xho* I bzw. *BamH* I und *Cla* I enthält. Diese Schnittstellen mussten so ausgewählt werden, dass zwei in der ersten multiplen Klonierungsstelle des pKANNIBAL-Vektors vorkommen und die anderen zwei in der zweiten multiplen Klonierungsstelle. Die MybTri5/600-Sequenz darf aber keine dieser Schnittstellen aufweisen.

Das mit diesen Primern amplifizierte DNA-Fragment wurde in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ligiert. Im Anschluss daran wurden dieses Plasmid und der pKANNIBAL-Vektor getrennt voneinander einem Restriktionsverdau mit *Xho* I und *EcoR* I unterzogen. Das aus dem Topo-Vektor ausgeschnittene MybTri5/600 wurde in den mit *Xho* I und *EcoR* I verdauten pKANNIBAL-Vektor ligiert. Mit dem so erhaltenen pKANNIBAL mit MybTri5/600 in sense-Richtung als Insert wurde ein weiterer Restriktionsverdau durchgeführt, um den Vektor an der zweiten multiplen Klonierungsstelle zu öffnen. Dies ermöglichte eine Ligation des MybTri5/600-Fragments, das hierfür mit *BamH* I und *Cla* I aus dem pCR[®]4-TOPO[®]:MybTri5/600 ausgeschnitten wurde, in antisense-Richtung in den pKANNIBAL-Vektor. Auf diese Weise wurde ein Vektor erhalten, der eine Expressionskassette mit der ausgewählten Teilsequenz in sense- und antisense-Richtung durch ein Intron voneinander getrennt enthält.

Bei der in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise wurde jede Klonierung durch eine Sequenzierung der Plasmide nach einer vorhergehenden Vermehrung des jeweiligen Plasmids in *E. coli* überprüft. Die durch PCR oder Restriktion erhaltenen MybTri5/600-Fragmente und die durch Restriktion erhaltene Expressionskassette wurden vor der weiteren Verwendung einer Gelpurifikation unterzogen. Mit dem Restriktionsansatz des pKANNIBAL-Vektors wurde jeweils eine PCR-Purifikation (Kit von Qiagen) durchgeführt, um die kurzen DNA-Fragmente, Enzyme und Puffer zu entfernen.



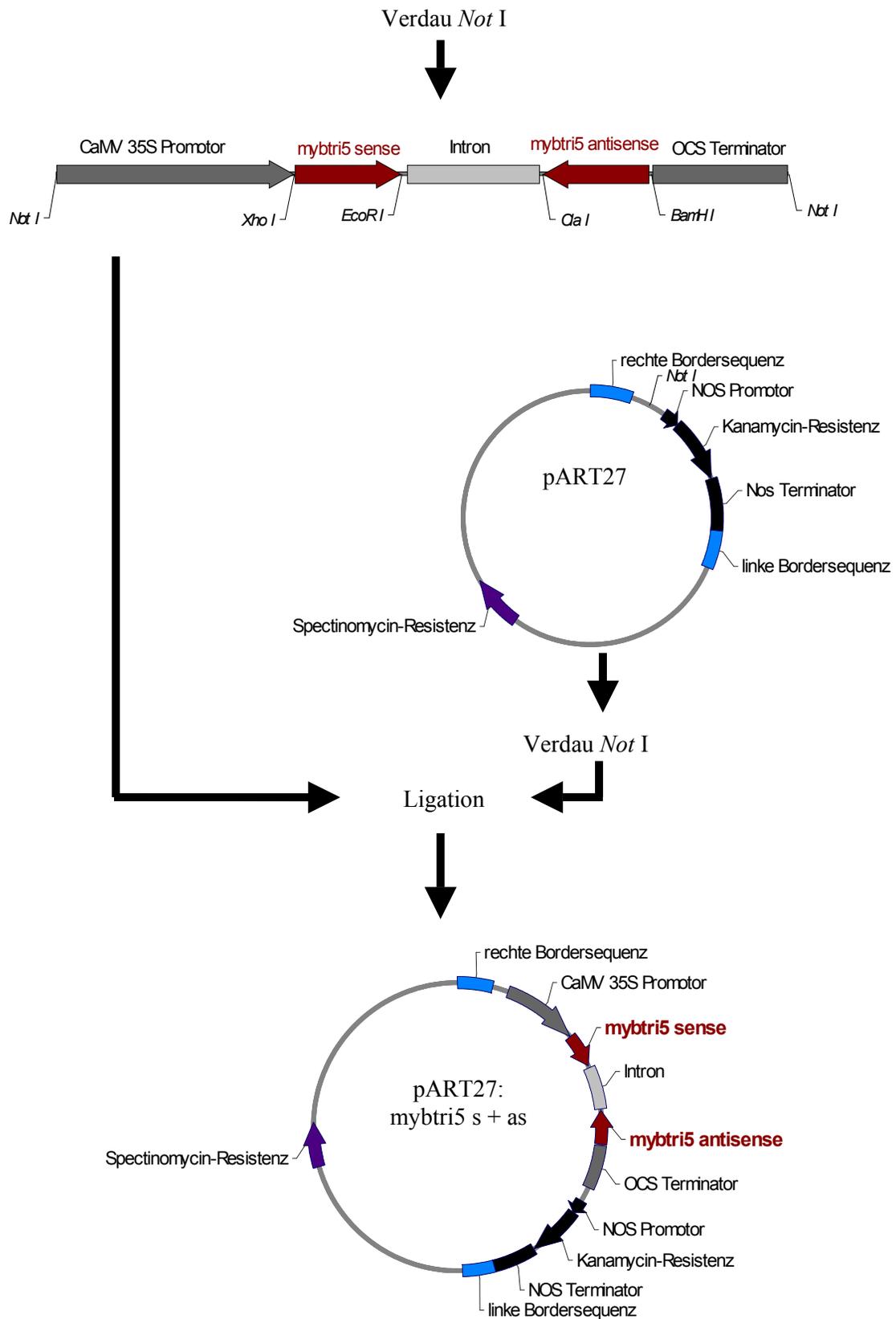


Abb. 3.21: Klonierungsschema für die Herstellung des RNAi-Konstrukts.

3.6.2 Transformation von *N. benthamiana* mit einem RNAi-Konstrukt von *mybtri5*

Aus dem in 3.6.1 hergestellten pKANNIBAL-Vektor, der MybTri5 in sense- und antisense-Richtung enthält, wurde mit *Not I* die Expressionskassette ausgeschnitten und in einen *Not I* verdauten pART27-Vektor ligiert (s. Abb. 3.21).

Abschließend wurde der so erhaltene pART27-Vektor in *A. tumefaciens* transformiert. Diese Transformation wurde mittels PCR überprüft, wobei als Matrize Plasmide dienten, die aus von der Transformationsplatte gepickten Übernachtskulturen isoliert wurden. Die einzige positive Kolonie wurde dann zur Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet. Diese Transformation wurde, wie in 2.2.16 beschrieben, durchgeführt.

Auf diese Weise wurden insgesamt 29 transgene Pflanzen erhalten, wobei es sich um 12 unabhängige Transformationslinien handelt. Jede dieser Pflanzen wurde zur Samengewinnung bis zur Samenreife herangezogen. Um sicher zu stellen, dass die Pflanzen sich nur selbst bestäubten, wurden die Pflanzen ab dem Blütezeitpunkt mit Papiertüten bedeckt. Bei dieser T₀-Generation war es schwierig Aussagen darüber zu machen, ob sich der gleiche Phänotyp zeigt wie bei den VIGS-Pflanzen, da sich durch das Anziehen der Pflanzen in Phytokons und durch den Stress des Umtopfens auf Erde der Phänotyp der Pflanzen gegenüber Pflanzen, die nur auf Erde kultiviert wurden, verändert. Deshalb wurden von jeder T₀-Pflanze 10 Tochterpflanzen (T₁-Generationen) angezogen. Diese wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops darauf untersucht, ob sie den gleichen Phänotyp aufweisen wie die VIGS-Pflanzen. In Tab. 3.3 ist dargestellt, wie viele der untersuchten Pflanzen diesen Phänotyp aufweisen. Die Bezeichnung der Pflanzen wurde so festgelegt, dass verschiedene Buchstaben verschiedene Transformationslinien bezeichnen. Die Zahlen spiegeln die unterschiedlichen Individuen wider, d.h. in der T₀-Generation stammen Pflanzen mit demselben Buchstaben aber unterschiedlicher Ziffer (z.B. F4 und F1) von demselben Kallus, d.h. derselben Transformationslinie ab. In den folgenden Generationen wird dieser Code jeweils um eine Ziffer erweitert. Dies bedeutet für die T₁-Generation z.B. bei demselben Buchstaben und derselben ersten Ziffer (z.B. F4-1 und F4-2), dass die Pflanzen von derselben Mutterpflanze stammen. Die Unterscheidung ist deshalb wichtig, da Pflanzen, die von demselben Kallus stammen, genetisch identisch sein können.

Tab. 3.3: Anzahl der Pflanzen mit Tri5-Phänotyp in der T₁-Generation

T ₀ -Generation	Anzahl der Pflanzen mit Tri5-Phänotyp : Anzahl der Pflanzen ohne Tri5-Phänotyp (T ₁ -Generation)	T ₀ -Generation	Anzahl der Pflanzen mit Tri5-Phänotyp : Anzahl der Pflanzen ohne Tri5-Phänotyp (T ₁ -Generation)
A6	0:10	H3	1:9
B2	0:10	H4	0:10
B3	0:10	I5	10:0
B7	0:10	I6	9:1
D1	0:10	I7	8:2
D2	0:10	I9	9:1
D3	0:10	J1	0:10
E2	1:8	J2	0:10
E8	0:10	L3	0:10
F1	9:1	L4	0:10
F3	6:4	L5	0:10
F4	9:1	L6	0:10
G1	6:4	N1	5:5
H1	0:10	N2	7:3
H2	0:10		

Von jeder erhaltenen T₀-Pflanze wurden 10 T₁-Pflanzen angezogen. Dargestellt ist das Verhältnis der T₁-Pflanzen, die einen *tri5*-Phänotyp zeigen, zu denen, die keinen *tri5*-Phänotyp aufweisen. Fett gedruckt sind die Transformationslinien, die einen *tri5*-Phänotyp aufweisen. Als *tri5*-Phänotyp werden Pflanzen bezeichnet, die eine Reduktion der Trichomzahl, einen glatten Blattrand und eine glänzende Epidermis verglichen mit Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit wurden zwei Transformationslinien (F4 und I7) ausgewählt, die einen eindeutigen *tri5*-Phänotyp (Reduktion der Zahl der langen Trichome, glatter Blattrand, glänzendere Epidermis) aufweisen. Von je drei T₁-Pflanzen mit *tri5*-Phänotyp dieser beiden Transformationslinien wurde genomische DNA isoliert und die Anzahl der Trichome quantifiziert.

3.6.2.1 Nachweis der Transgenität mittels PCR- und Southern Blot-Analysen

Um nachzuweisen, dass die für die weiteren Untersuchungen ausgewählten Pflanzen transgen sind, wurde mit der genomischen DNA der unterschiedlichen T₁-Pflanzen eine PCR zum Nachweis des Resistenzgens (*npt II*) mit *npt II*-spezifischen Primern durchgeführt. Zusätzlich wurde noch eine PCR mit Primern gemacht, von denen der eine in der Promotorregion der Expressionskassette und der andere genspezifisch an das MybTri5/600-Fragment bindet. Wie in Abb. 3.22 zu sehen ist, ist die PCR bei allen transgenen Pflanzen positiv. Dies zeigt, dass es sich bei diesen Pflanzen tatsächlich um transgene Organismen handelt.

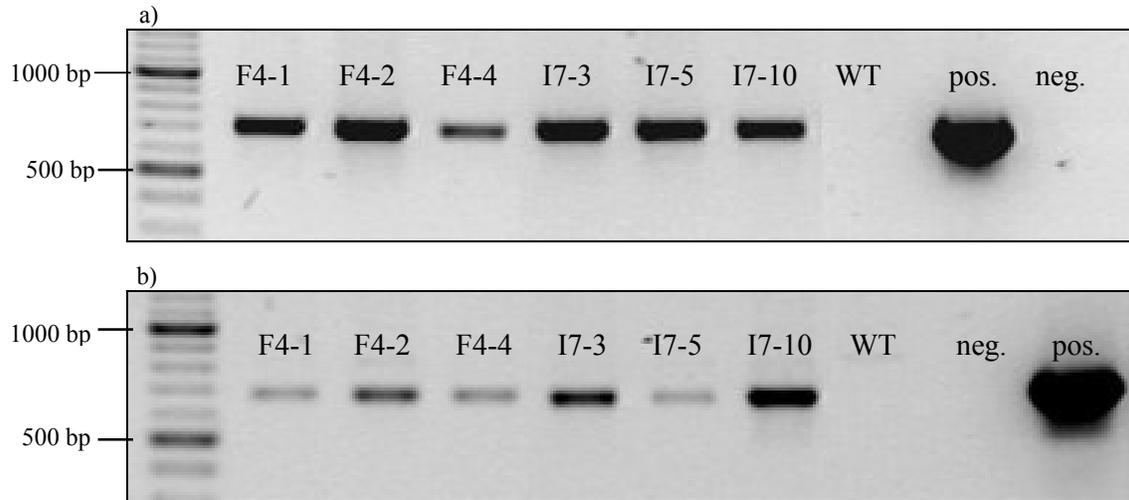


Abb. 3.22: Nachweis auf Transgenität. a: PCR zur Amplifikation des Resistenzgens; b: PCR zur Amplifikation des 600 bp großen Fragments von MybTri5, das in sense- und antisense-Richtung transformiert wurde. Als Kontrolle wurde genomische DNA einer Wildtyp-Pflanze (WT) eingesetzt. Als Positivkontrolle (pos.) wurde pART27, der MybTri5/600 in sense- und antisense-Richtung enthält, verwendet. In der Negativkontrolle (neg.) wurde genomische DNA durch Wasser ersetzt.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden noch Southern Blots durchgeführt. Diese stellen eine zuverlässigere Methode für den Nachweis auf Transgenität dar als PCR-Analysen. Denn es ist möglich, dass PCR-Analysen noch Spuren von Agrobakterien nachweisen, die zur Transformation verwendet wurden und deren Unterdrückung nicht vollständig gelang, und somit einen falsch positiven Nachweis liefern. Für die Southern-Analyse wurde die genomische DNA mit *EcoR* I verdaut. Dieses Enzym schneidet nicht innerhalb von MybTri5/600 und dem Intron, das zwischen dem in sense- und antisense-Richtung klonierten MybTri5/600-Fragment liegt. Als Matrize für die Herstellung der Sonde wurde MybTri5/600 verwendet. Das Ergebnis hierzu ist in Abb. 3.23 zu sehen. Bei der genomischen DNA der Wildtyp-Pflanzen finden sich zwei Banden, bei den transgenen Pflanzen finden sich mindestens vier Banden. Aufgrund des ausgewählten Enzyms sprechen die zwei Banden bei der Wildtyp-DNA dafür, dass das Gen in zwei Kopien im Genom vorhanden ist (s. auch 3.5.1). Jede zusätzliche Bande bei den transgenen Pflanzen deutet darauf hin, dass die zu transformierende DNA pro zusätzliche Bande einmal ins Genom integriert wurde. Wie zu erwarten ist, weisen Pflanzen, die von derselben Mutterpflanze abstammen, das gleiche Bandenmuster auf.

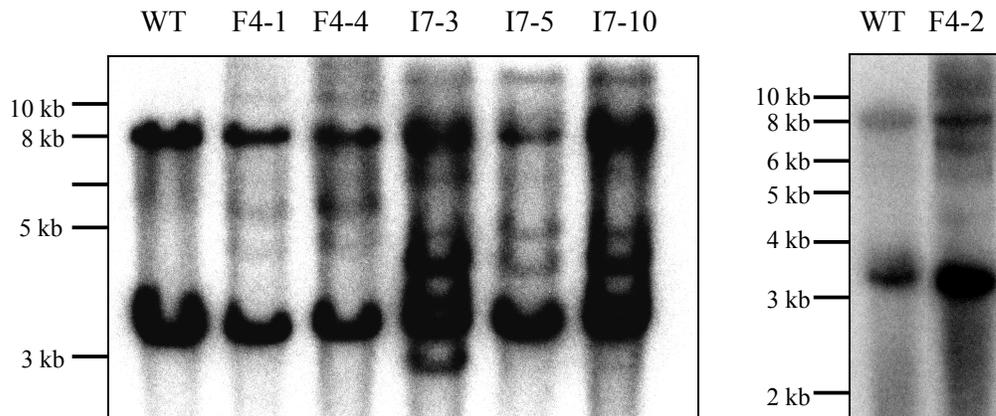


Abb. 3.23: Southern Blot-Analysen zum Nachweis der Transgenität von RNAi-Pflanzen. Die genomische DNA der transgenen Pflanzen weist mehr Banden als die Wildtyp-Pflanzen auf. Dies spricht dafür, dass die zu transformierende DNA ins Genom integriert wurde. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes mybtri5/600-Fragment verwendet. Analysiert wurden die Pflanzen, deren Trichomzahlen ermittelt wurden (s. 3.6.2.3).

3.6.2.2 Phänotyp der RNAi-Pflanzen

Die Darstellung des Phänotyps der RNAi-Pflanzen findet immer anhand von Pflanzen der T₁-Generation statt.

Beim Vergleich von Wildtyp-Pflanzen mit gleichaltrigen transgenen Pflanzen ist in Größe und Wuchsform der Pflanzen kein Unterschied zu erkennen (s, Abb. 3.24).



Abb. 3.24: Vergleich der Wuchsform und Größe einer Wildtyp-Pflanze (WT) mit Pflanzen der beiden unterschiedlichen transgenen Linien (F4, I7). Es ist bezüglich Größe und Wuchsform kein nennenswerter Unterschied zu erkennen.

Die Blattform der Wildtyp-Pflanzen unterscheidet sich ebenfalls nicht von der Blattform der RNAi-Pflanzen. Auffällig jedoch sind die glatten Blattränder der F4- und I7-Pflanzen im Gegensatz zu den gewellten Blattränder der Wildtyp-Pflanzen und die glänzendere Epidermis der transgenen Pflanzen (s. Abb. 3.25). Bereits bei der makroskopischen Betrachtung der Blattränder in Abb. 3.25 zeigt sich, dass die transgenen Pflanzen eine geringere Anzahl langer Trichome aufweisen als die Wildtyp-Pflanzen. Bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist dann deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der langen Trichome reduziert ist (s. Abb. 3.26).

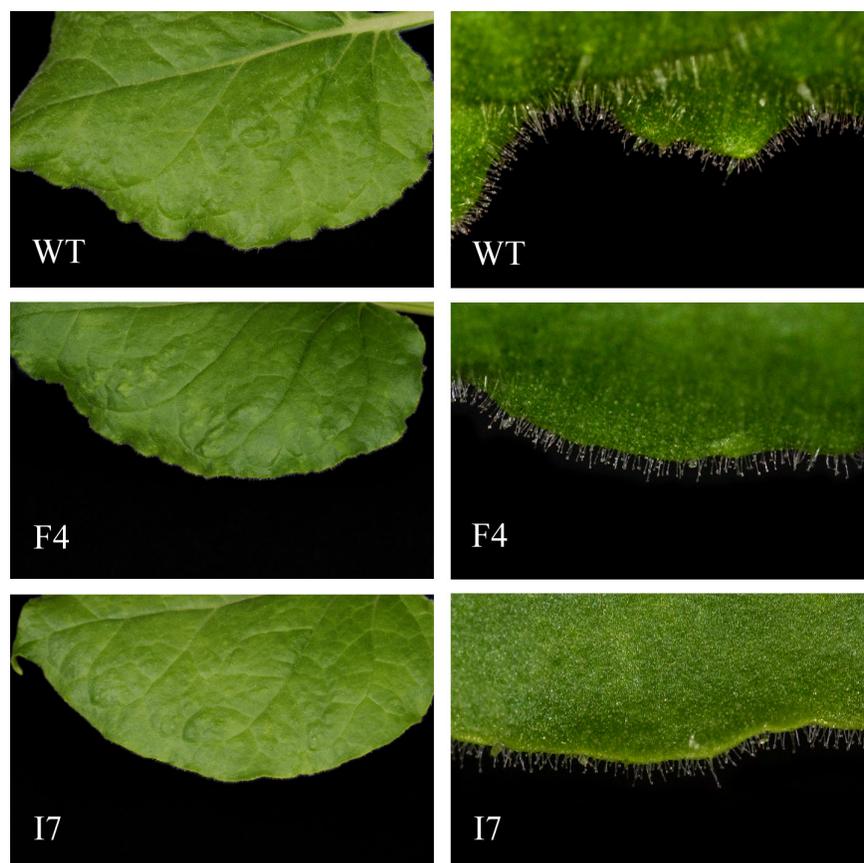


Abb. 3.25: Vergleich der Blattränder transgener Pflanzen mit Wildtyp-Pflanzen. Bei beiden transgenen Linien (F4, I7) ist zu erkennen, dass der Blattrand dieser Pflanzen weniger gewellt ist als bei der Wildtyp-Pflanze (WT). Zudem ist eine Reduktion in der Anzahl der langen Trichome zu erkennen. V.a. bei F4 ist auch eine glänzendere Blattoberfläche zu sehen.

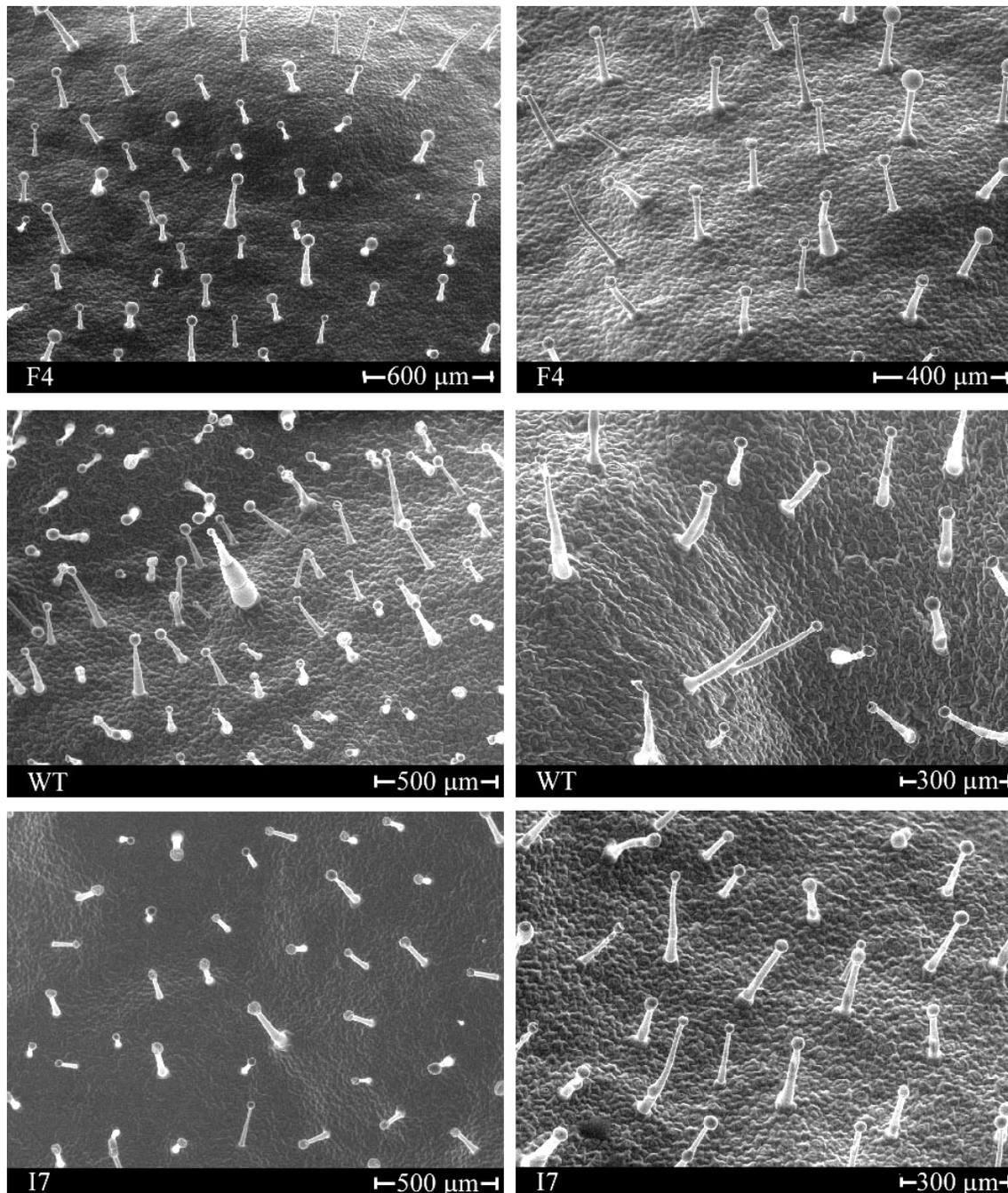


Abb. 3.26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Blattoberflächen von Wildtyp-Pflanzen (WT) und transgenen Pflanzen (F4, I7). Bei den transgenen Pflanzen ist eine Reduktion in der Anzahl der langen Trichome zu erkennen.

Wie sich in den Northern Blot-Analysen herausstellte, ist *mybtri5* in den sich entwickelnden Blüten und v.a. in der Krone am stärksten exprimiert. Deshalb wurden die Blüten der transformierten Pflanzen auf phänotypische Veränderungen hin geprüft. Betrachtet man den Kelch, kann man wie auf den Blättern eine Reduktion der Trichomzahl finden (s. Abb. 3.27).



Abb. 3.27: Stereomikroskopische Aufnahme der Kelche transgener und Wildtyp-Pflanzen. Bei den transgenen Pflanzen (F4) ist im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen eine Reduktion in der Trichomzahl zu erkennen.

Die Krone zeigt trotz starker Expression von *mybtri5* keine phänotypischen Veränderungen. MYBTRI5 weist hohe Homologie zu MYBML aus *Antirrhinum majus* auf, das vermutlich eine Rolle in der Entwicklung von Trichomen auf den Petalen (Glover *et al.*, 1998) spielt, und zu MIXTA aus *A. majus*, das an der Entwicklung der kegelförmigen Epidermiszellen der Petalen beteiligt ist (Noda *et al.*, 1994). Daher wurde die Krone der transformierten *N. benthamiana*-Pflanzen auf Veränderungen in der Trichomzahl und in der Form der Epidermiszellen untersucht. Die Petalen von *N. benthamiana* weisen nur auf der Außenseite Trichome auf. Ihre Anzahl und Entwicklung ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert (s. Abb. 3.28). Auch zeigen die Epidermiszellen auf der Innenseite der Petalen im oberen Bereich, in dem sich die Blüte öffnet, keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und RNAi-Pflanzen (s. Abb. 3.29).

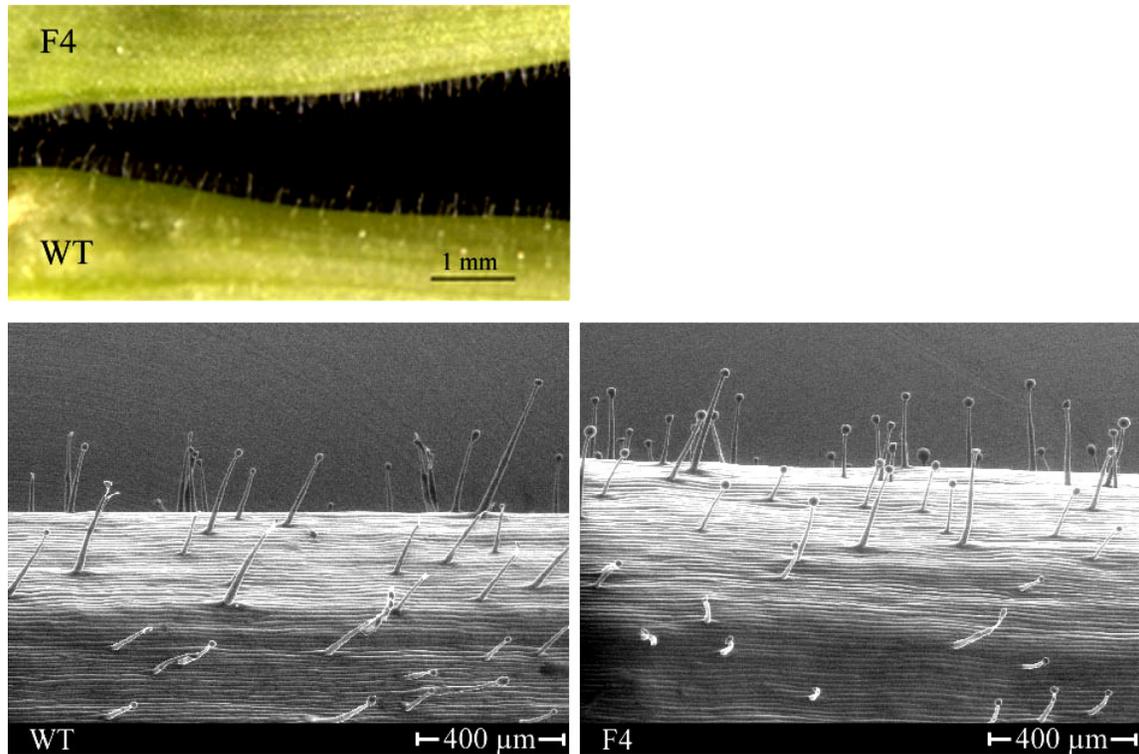


Abb. 3.28: Stereomikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Außenseite der Blütenkrone. Abgebildet ist der Bereich der Krone, in dem die Petalen zu einer Röhre verwachsen sind. Dort ist keine Veränderung in der Form und der Anzahl der Trichome zu erkennen.

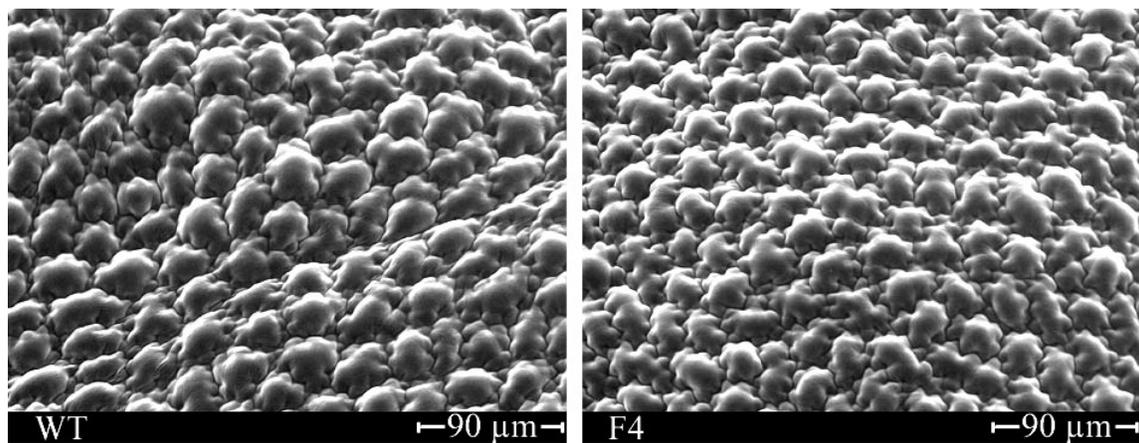


Abb. 3.29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Epidermis auf der Innenseite der Blütenkrone. Die Bilder stammen von dem Bereich der Innenseite der Blütenkrone, an dem sich die Blüte öffnet und die Petalen eine Krone bilden. Es ist kein Unterschied in der Form der Epidermiszellen und der Oberflächenstruktur der Epidermis zu erkennen.

3.6.2.3 Quantifizierung der Trichome

Die Quantifizierung erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den VIGS-Pflanzen (Beschreibung s. 3.3.2). Das Ergebnis hierzu ist in Tab. 3.4 dargestellt, und eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 3.30. Eine genaue Auflistung der Zählungen ist im Anhang beigefügt.

Tab. 3.4: Vergleich der Trichomzahlen der RNAi-Pflanzen mit Wildtyp-Pflanzen

Wildtyp	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²			RNAi-Pflanze	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²		
	lange Trichome	kurze Trichome	Σ		lange Trichome	kurze Trichome	Σ
Pflanze 1	16,1	13,5	29,6	F4-1	2,9	23,7	26,6
Pflanze 2	15,6	14,8	30,4	F4-2	2,9	24,0	26,9
Pflanze 3	14,8	14,8	29,6	F4-4	2,7	20,8	23,5
Mittelwert	15,5	14,3	29,8	Mittelwert	2,8	22,8	25,6
				RNAi-Pflanze	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²		
					lange Trichome	kurze Trichome	Σ
				I7-3	4,3	22,0	26,3
				I7-5	3,8	17,9	21,7
				I7-10	3,5	13,8	17,3
				Mittelwert	3,9	17,9	21,8

Die Auszählung der Trichome erfolgte wie bei den VIGS-Pflanzen (s. 3.3.2). Von drei am Hauptstängel aufeinander folgenden Blättern jeder Pflanze wurden pro Blatt je acht willkürlich ausgewählte Flächen (2mm²) ausgezählt. Nach Trichomtyp getrennt wurde für jede einzelne Pflanze der Mittelwert aus den erhaltenen Zahlen gebildet.

Diese Daten wurden wie in 3.3.2 dem Student t-Test unterzogen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) in der Zahl der langen Trichome (Reduktion) der RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen. Die Anzahl der kurzen Trichome ist bei der Linie F4 signifikant erhöht ($\alpha = 0,05$), bei der Linie I7 findet sich kein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) im Vergleich zum Wildtyp. Betrachtet man die Gesamtzahl der Trichome, d.h. die Summe der langen und kurzen Trichome, findet sich bei beiden Transformationslinien eine signifikante Reduktion ($\alpha = 0,05$).

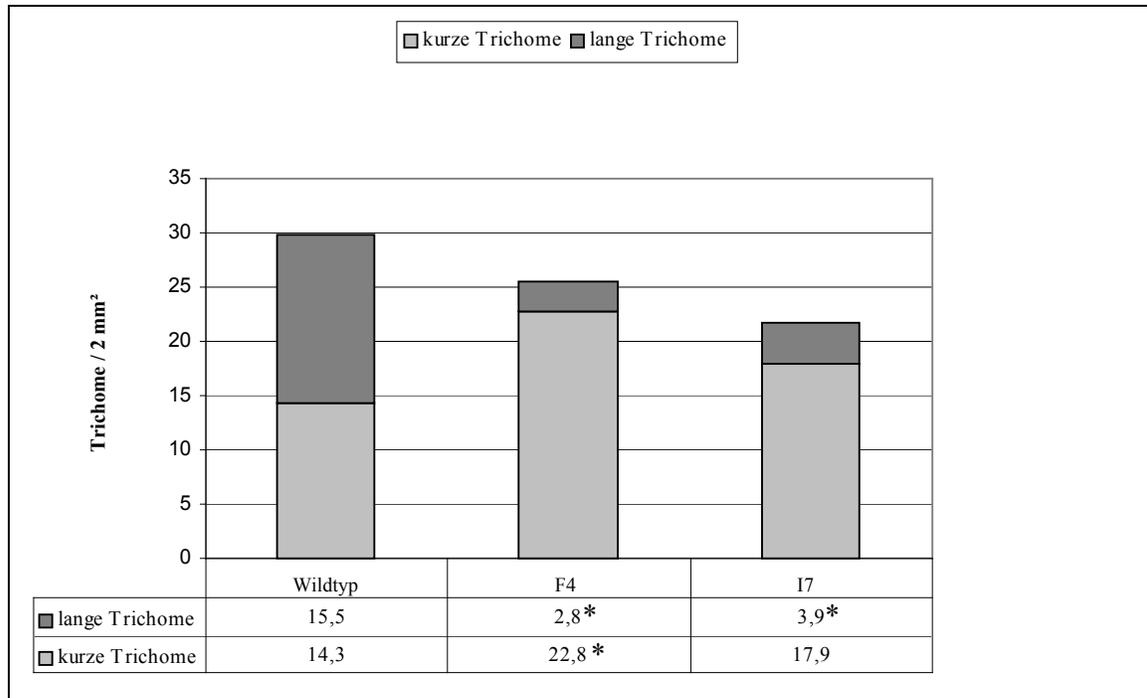


Abb. 3.30: Graphischer Vergleich der Trichomzahlen von Wildtyp-Pflanzen mit RNAi-Pflanzen. Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der langen Trichome und der Gesamtzahl der Trichome bei den transgenen Pflanzen (F4, I7) verglichen mit den Wildtyp-Pflanzen. Außerdem ist ein signifikanter Anstieg in der Zahl der kurzen Trichome bei F4, nicht aber bei I7 zu erkennen. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Zahlen geben die signifikanten Veränderungen ($\alpha = 0,05$) an.

3.6.2.4 Northern Blot zur *mybtri5*-Expression von Wildtyp- und RNAi-Pflanzen

Das Ausschalten von Genen mittels RNAi findet wahrscheinlich auf ähnliche Weise wie bei VIGS statt. Wird das RNAi-Konstrukt in der Pflanze transkribiert, bildet sich eine sogenannte „Haarnadelstruktur“ aus, bei der es sich um doppelsträngige RNA handelt, die dann durch DICER zu siRNAs abgebaut wird. Dies führt vermutlich zum Abbau der mRNA des endogenen *mybtri5*-Gens. Demzufolge müsste die mRNA-Menge des *mybtri5*-Gens in den RNAi-Pflanzen geringer sein als in den Wildtyp-Pflanzen. Um dies zu überprüfen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus geschlossenen Blüten und dem oberen 15 cm langen Stängelabschnitt von 10 Wochen alten Wildtyp- bzw. RNAi-Pflanzen verwendet. Blüten bzw. Stängel wurden deshalb ausgewählt, da sich bei Northern Blot-Analysen zur Lokalisation der Expression von *mybtri5* herausgestellt hatte, dass diese Gewebe bei adulten Pflanzen die höchste Expression aufweisen (s. 3.5.2). Das Ergebnis hierzu findet sich in Abb. 3.31. Im besten Fall würde man erwarten, dass sich im Wildtyp bei ca. 1400 bp eine Bande findet (dies ist die zu erwartende Länge von *mybtri5*) und bei den transgenen Pflanzen keine Bande oder zumindest eine mit schwächerer Intensität. Auch nach wiederholter Durchführung der Northern-Analyse (mehrmaliges Aufarbeiten der RNA,

Blotten und Herstellen der Sonde) wurde kein solches Ergebnis erzielt. In Abb. 3.32 ist ein Blot dargestellt, der das erhaltene Ergebnis widerspiegelt. Man findet Banden bzw. Schmier unterhalb 300 bp bei den RNAi-Pflanzen. Bei den Wildtyp-Pflanzen ist kein Signal zu erkennen. Diese Tatsache erstaunt, da Wildtyp-RNA aufgetragen wurde, die auch für den Blot in 3.5.2 für die Expressionsanalyse in adulten Pflanzen verwendet wurde. Der Grund für das fehlende Signal könnte darin liegen, dass der Blot stringenter gewaschen werden musste als die Blots zur Expressionsanalyse, da nach den üblichen Waschschrritten noch hohe Radioaktivität zu messen war. Durch die zusätzlichen Waschschrritte ist das Signal bei den Wildtyp-Pflanzen ziemlich schwach und durch die hohe Signalintensität der RNAi-Pflanzen nicht mehr messbar. Bei den Banden, die bei den RNAi-Pflanzen zu sehen sind, handelt es sich vielleicht um Abbauprodukte der *mybtri5* mRNA. Ihre Intensität ist vermutlich deshalb so hoch, da die Expressionskassette des RNAi-Konstrukts einen sehr starken Promotor (CaMV 35S-Promotor) trägt. Dies führt zu einer großen Menge an Transkript, das dann, da es eine „Haarnadelstruktur“ bildet, d.h. als doppelsträngige RNA vorliegt, abgebaut wird.

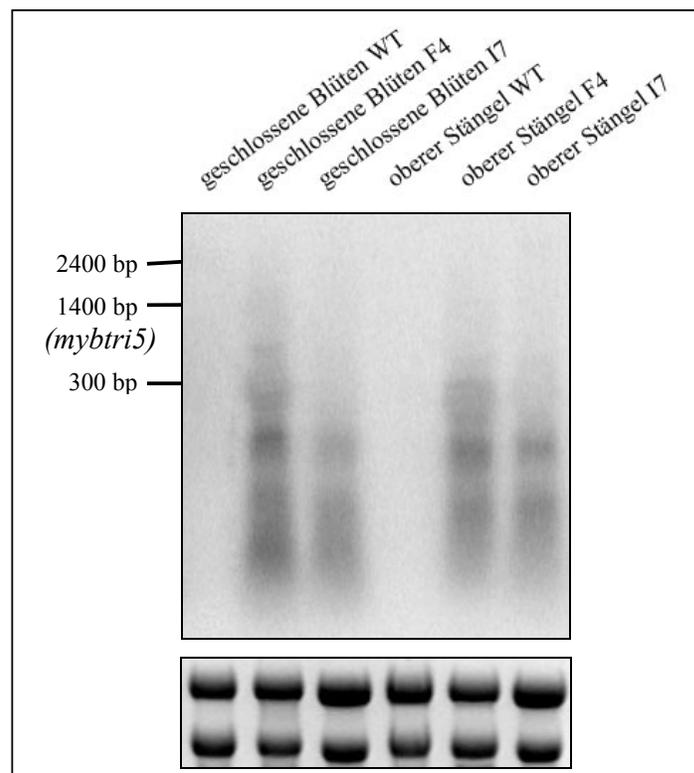


Abb. 3.31: Northern Blot zur Bestimmung der mRNA-Menge von *mybtri5* in RNAi-Pflanzen verglichen mit Wildtyp-Pflanzen. Es wurde Gesamt-RNA von geschlossenen Blüten und oberem Stängel von Wildtyp- und RNAi-Pflanzen untersucht.

4 Diskussion

4.1 Trichome als Ansatzpunkt für „Metabolic Engineering“

Pflanzen bilden viele Sekundärstoffe, die für den Menschen von großer Bedeutung sind und in vielen Bereichen zur Anwendung kommen. Für manche dieser Stoffe ist die chemische Synthese oder die biotechnologische Herstellung nicht möglich oder zu teuer. Deshalb werden sie direkt aus den Pflanzen extrahiert.

Durch „metabolic engineering“ versucht man eine höhere Ausbeute der Stoffe in den jeweiligen Pflanzen zu erlangen oder die gewünschte Substanz von einer anderen Pflanzenart oder in einer Zellkultur synthetisieren zu lassen, die unter geringerem Aufwand kultiviert werden kann. Man versucht dies durch Überexpression bestimmter Gene, durch gezieltes Ausschalten von Genen oder durch die Expression von exogenen Genen zu erreichen. Diese Gene codieren meist für Enzyme. In den letzten Jahren jedoch wurde auch versucht Transkriptionsfaktoren auszuschalten oder zu überexprimieren. Da sie meist mehrere Schritte eines Stoffwechselwegs kontrollieren, hat dies meist einen stärkeren Effekt (Broun, 2004).

Ein wichtiges Ziel des „metabolic engineering“ stellen Trichome dar. Bei der Baumwollfaser, einem einfachen, unizellulären und dem wohl wirtschaftlich bedeutendsten Trichom, wird versucht, die Qualität der Fasern zu verbessern und den Ernteertrag zu erhöhen (Kim und Triplett, 2001). Von der Baumwolle abgesehen gilt das Interesse hauptsächlich Trichomen mit Drüsenfunktion, da in ihnen viele Stoffe gelagert und teils synthetisiert werden, die für die Menschen durch ihre medizinische Wirkung (z.B. Artemisinin, Hypericin), als Aroma- und Duftstoffe und in der Kosmetikindustrie (z.B. Sklareol) von Bedeutung sind (Wagner *et al.*, 2004). Bei Artemisinin handelt es sich um eine Substanz, die gegen Malaria eingesetzt wird und in den Trichomen von *Artemisia annua* gebildet wird. Sie wird immer noch direkt aus den Pflanzen gewonnen, da die Herstellung in Zellkulturen nur geringen Erfolg hatte (Woerdenbag *et al.*, 1992). Duke *et al.* (2000) schlagen vor, die Bildung des Sesquiterpens Artemisinin durch die Hemmung der Synthese von Monoterpenen zu erhöhen, da beide Stoffwechselwege als Ausgangsstoff Isopentenylpyrophosphat verwenden. Bei Tabak und Pfefferminze zum Beispiel gelang es, die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Trichome zu verändern. Wang *et al.* (2001) konnten ein Gen ausschalten, das für die Cembratrienol-Hydroxylase codiert. Dadurch erhöhte sich in den Trichomen die Cembratrienol-Konzentration, und der Gehalt an Cembratriendiol verringerte sich. Dies ist mit einer erhöhten Resistenz gegen Blattläuse verbunden. Eine andere Möglichkeit den Ertrag eines bestimmten,

in den Trichomen gebildeten Stoffes zu steigern, wäre die Dichte der Trichome zu erhöhen. Es stellt sich hierbei allerdings die Frage, ob jedes einzelne Trichom dann seine Produktivität beibehält (Duke *et al.*, 2000).

Bei den bis jetzt erwähnten Beispielen handelt es sich um Substanzen, die von Natur aus in den Trichomen der jeweiligen Pflanzen vorkommen. Es wäre aber auch denkbar durch geeignete Transformation und sich daraus ergebender Expression exogener Gene den Stoffwechsel einer bestimmten Pflanzenart so zu verändern, dass sie eine gewünschte Substanz in den Trichomen herstellt. Dies könnte einerseits dazu dienen, diesen Stoff später zu isolieren („molecular farming“) und entsprechend zu verwenden. Andererseits könnte den Pflanzen dadurch eine Resistenz gegen Herbivoren oder Mikroben vermittelt werden.

Trichome besitzen für die Realisierung dieser Vorhaben einige sehr günstige Eigenschaften. Trichome kommen meist in hoher Dichte und auf dem ganzen oberirdischen Teil der Pflanze vor, sodass die gewünschte Substanz in relativ großen Mengen hergestellt werden kann. Wagner (1991) gibt an, dass es theoretisch möglich ist beim Anbau von einem Hektar Tabak unter normalen Kulturbedingungen 225 kg Sekret zu ernten, wenn die Pflanze 10% des Blatttrockengewichts an Sekret bildet. Außerdem ist die Isolierung des gewünschten Produkts relativ einfach. Unter Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels kann man die von den Trichomen sezernierte Substanz von der Pflanzenoberfläche einfach und relativ rein abwaschen (Wagner, 1991). Die Lagerung von Stoffen im subcutikulären Raum, die in anderen Geweben der Pflanze autotoxisch wären, stellt eine weitere günstige Eigenschaft der Trichome dar. Für Pflanzen, denen durch Transformation eine Resistenz vermittelt wurde, ist es vorteilhaft, die entsprechende Substanz in den Trichomen zu bilden, da die Pflanzenoberfläche den Hauptangriffspunkt für Herbivoren und Pathogene darstellt (Duke *et al.*, 2000). Bei Nutzpflanzen bringt die Produktion dieser Stoffe ausschließlich in den Trichomen den Vorteil, dass Trichom-freie Pflanzenteile ohne die Aufnahme dieses Produkts verzehrt werden können (Wang *et al.*, 2002). Um zu verwirklichen, dass die gewünschten Verbindungen nur in den Trichomen gebildet werden, sind Trichom-spezifische Promotoren nötig. Wang *et al.* (2002) gelang es einen solchen Promotor zu isolieren. Es handelt sich hierbei um den Promotor des Gens (CYP71D16) aus *N. tabacum*, das für die bereits oben erwähnte Cembratrienol-Hydroxylase codiert.

Um die Trichome für die hier erwähnten, vielfältigen Möglichkeiten nutzen zu können, muss man einerseits die entsprechenden Stoffwechselwege genau untersuchen. Andererseits ist es gerade unter dem Gesichtspunkt der Steigerung des Ertrages (durch Erhöhung der

Trichomzahl) wichtig, das System der Trichome v.a. im Hinblick auf ihre Entwicklung zu erforschen.

Die Entwicklung des Systems Trichom ist auch deshalb von Bedeutung, da Kenntnisse in diesem Bereich vielleicht auf die Entwicklung anderer Systeme übertragbar sind. Von *A. thaliana* ist bekannt, dass es Parallelen bei der Entwicklung der Trichome, der Wurzelhaare und der Stomata gibt. Hierbei handelt es sich allerdings um einfache unizelluläre Trichome. Ob die Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion auch Parallelen zur Entwicklung anderer Systeme aufweist, ist nicht bekannt.

4.2 Sequenzanalyse der aus *N. benthamiana* isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren

Bei der Amplifikation verschiedener MYB-Transkriptionsfaktoren aus der cDNA von Trichomen und jungen Blättern mit degenerierten Primern und einem anschließenden 3'-RACE wurden sechs unterschiedliche Teilsequenzen erhalten. In Abb. 4.1 sind die Aminosäuresequenzen der MYB-Domäne dargestellt. Da nur von *mybtri5* das 5'-Ende mittels GenomeWalking ermittelt wurde, fehlen in Abb. 4.1 die Sequenzen für einen großen Teil von R2 mit Ausnahme von *mybtri5*. Bei MYB-Transkriptionsfaktoren findet man pro MYB-Motiv drei konservierte Tryptophan-Reste, wobei das erste Tryptophan von R3 bei den meisten pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren durch eine andere aromatische oder hydrophobe Aminosäure ersetzt ist. Im vorliegenden Fall wurde es entweder gegen Phenylalanin oder Isoleucin ausgetauscht. Die acht Aminosäuren der Erkennungshelices von R2 und R3, die mutmaßlich an die DNA binden, sind in Abb. 4.1 mit grau (konserviert in allen pflanzlichen MYB) und hellgrau (konserviert in 80%) unterlegt (Solano *et al.*, 1997). Die Kennzeichnung der Helices wurde aus der Veröffentlichung von Martin und Paz-Ares (1997) übernommen. Diese beruht auf einem Vergleich mit c-MYB. Die Bildung der Helix von R2 kann jedoch nicht genau so stattfinden, da die Sequenz in diesem Bereich ein Prolin enthält, das eine Helix-Struktur eigentlich beendet.

Stracke *et al.* (2001) teilen die R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* aufgrund beschränkt konservierter Bereiche C-terminal der MYB-Domäne in Untergruppen ein. Diese Klassifizierung basiert auf der Einteilung von Kranz *et al.* (1998) in 22 Untergruppen. Vier der sechs aus *N. benthamiana* erhaltenen MYB-Transkriptionsfaktoren lassen sich eindeutig aufgrund konservierter Motive einer dieser Untergruppen zuordnen. NbMYBTRI5 und NbMYBTRI11 gehören der Untergruppe 9, NbMYBBL11 der Untergruppe 4, NbMYBBI14 der Untergruppe 1.1 an (s. Abb. 3.4). NbMYBTRI30 hat nach BLAST eine hohe Ähnlichkeit

mit den Mitgliedern der Gruppe 14, wobei diese kein bestimmtes C-terminales Motiv besitzen, sondern durch ein besonderes R2 MYB-Motiv gekennzeichnet sind. Da R2 von NbMYBTRI30 nicht sequenziert wurde, ist eine eindeutige Zuteilung in diese Gruppe nicht möglich. NbMYBTRI1 besitzt nach einem BLAST-Ergebnis hohe Ähnlichkeit mit der Untergruppe 7, wobei es das entsprechende Motiv nicht aufweist. Betrachtet man den Stammbaum, gruppieren bis auf NbMYBTR1 alle anderen in dieser Arbeit gefundenen MYB-Transkriptionsfaktoren mit Mitgliedern der entsprechenden Untergruppen (s. Abb. 3.5).

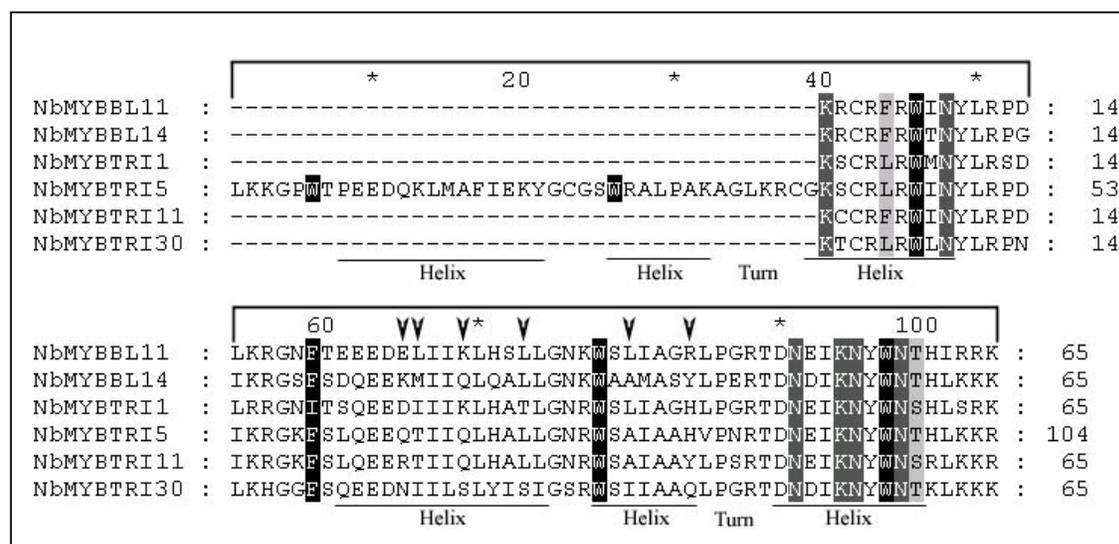


Abb. 4.1: Aminosäuresequenzvergleich der MYB-Domänen der aus *N. benthamiana* isolierten MYB-Transkriptionsfaktoren. Die konservierten Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die Tryptophane bzw. die Aminosäuren, die das erste Tryptophan des R3 ersetzen, sind schwarz unterlegt. Die Aminosäuren, die an DNA binden, sind dunkelgrau für 100%ige bzw. hellgrau für 80%ige Konservierung markiert. Die Kennzeichnung der Helices erfolgte nach Martin und Paz-Ares (1997). Die Pfeile markieren das Aminosäure-Motiv [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R (Zimmermann *et al.*, 2004) in der Sequenz von NbMYBBL11, das wahrscheinlich auf eine Bindestelle für ein bHLH-Motiv hinweist.

Jiang *et al.* (2004) haben diese Einteilung nochmals überarbeitet. Hierfür haben sie 130 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* und 86 aus *Oryza sativa L. ssp. indica* auf gemeinsame Motive im C-terminalen Bereich und auf gemeinsame Exon-Intron-Strukturen untersucht. Daraus ergab sich eine Einteilung in 42 Untergruppen, von denen 19 durch C-terminal konservierte Bereiche gekennzeichnet sind. Die meisten in dieser Arbeit isolierten MYB-Proteine lassen sich nicht nach dieser neuen Einteilung eingruppiert, da die Lage der Introns nicht bekannt ist. Bei NbMYBTRI5 und NbMYBTRI11 ist jedoch eine Zuteilung zur Untergruppe G03 aufgrund zweier konservierter C-terminaler Motive sehr wahrscheinlich (s. Abb. 3.14). Die Funktion der Motive, die für beide Einteilungsmodelle verwendet wurden, ist in den meisten Fällen unbekannt. Jedoch finden sich in einigen Untergruppen durchaus

Transkriptionsfaktoren mit ähnlichen Aufgaben, sodass vermutet werden kann, dass diese Motive eine bestimmte Funktion wahrnehmen. Eine endgültige Einteilung in Untergruppen wird erst dann möglich sein, wenn bekannt ist, ob die Motive bestimmte Aufgaben besitzen. Für die Regulation der Transkription ist meist ein Zusammenspiel von mehreren Transkriptionsfaktoren nötig. So weiß man von einigen MYB-Transkriptionsfaktoren, dass sie mit bHLH-Proteinen interagieren. Grotewold *et al.* (2000) identifizierten vier Aminosäuren in der ersten α -Helix von R3 des C1 MYB-Transkriptionsfaktors aus *Z. mays*. Sie sind für die Interaktion mit R, einem bHLH-Protein aus *Z. mays*, verantwortlich. Diese vier Aminosäuren konnten jedoch in keiner Proteinsequenz der in dieser Arbeit isolierten MYB-Faktoren gefunden werden. Eine Arbeit von Zimmermann *et al.* (2004) untersuchte unterschiedliche R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana*, die mit bHLH-Proteinen interagieren. Die Autoren konnten sechs konservierte Aminosäuren ermitteln, die für die Interaktion zuständig sind, wobei sich drei der von Grotewold ermittelten Aminosäuren darunter befinden. NbMYBBL11 weist diese Aminosäuren auf (s. Abb. 4.1). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Domäne, die für die Interaktion zwischen MYB- und bHLH-Proteinen verantwortlich ist, zwischen verschiedenen Pflanzenarten konserviert ist (Zimmermann *et al.*, 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass NbMYBBL11 mit einem bHLH-Protein interagiert, die anderen *N. benthamiana*-MYB-Faktoren wahrscheinlich keine Interaktion aufweisen.

4.3 Funktionsanalyse von *mybtri5*

4.3.1 Ausschalten von *mybtri5* mittels VIGS

4.3.1.1 Phänotyp

Von allen Pflanzen, die mit den verschiedenen Viruskonstrukten (TMV bzw. TRV mit den unterschiedlichen cDNAs der aus *N. benthamiana* stammenden MYB-Transkriptionsfaktoren) infiziert wurden, zeigten nur die mit einem bestimmten TRV-Konstrukt infizierten Pflanzen eine phänotypische Veränderung. Hierbei handelte es sich um einen TRV, der eine Sequenz von *mybtri5* trug. Diese Pflanzen wiesen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen v.a. eine signifikante Reduktion ($\alpha=0,05$) in der Gesamtzahl der Trichome und in der Zahl der drüsigen Trichome mit mehrzelligem Stiel auf. Außerdem ließen sie einen glatten Blattrand und eine glänzendere Blattoberfläche erkennen. Diese Veränderungen ergaben sich nur, wenn *mybtri5* mit Hilfe des TRV ausgeschaltet wurde und nicht mit TMV. Beim TRV handelt es sich um einen Virus, der im Gegensatz zu TMV auch Meristeme infiziert (Ratcliff *et al.*, 2001). Dies

ist nötig, wenn Gene ausgeschaltet werden sollen, die an einem entwicklungsbiologischen Prozess beteiligt sind wie z.B. der Anlage von Pflanzenorganen. Von *A. thaliana* ist bereits bekannt, dass die Initiation der Trichome schon sehr früh in der Blattentwicklung erfolgt. Da nur bei der Verwendung von TRV eine Reduktion in der Trichomzahl auftrat, ist dies ein Hinweis darauf, dass auch die Trichome von *N. benthamiana* sehr früh in der Blattentwicklung angelegt werden, und dass *mybtri5* schon zu diesem Zeitpunkt an der Trichomentwicklung beteiligt ist.

Außerdem sind die weiteren bereits bekannten Vorteile von TRV gegenüber anderen Viren wie dem TMV in dieser Arbeit deutlich zu erkennen. Bei der Infektion von TRV und TMV, die beide ein *gfp*-Gen tragen, sind bei den TMV-Pflanzen eindeutig stärkere virusbedingte Symptome zu sehen. Sie weisen sklerotische und nekrotische Blätter, Veränderungen in der Blattform und reduziertes Wachstum auf. Dies kann die Effekte, die das Ausschalten eines Gens bewirken, überdecken. Somit konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verwendung des TRV entscheidende Vorteile hat.

Vergleicht man Pflanzen, bei denen *mybtri5* durch pTV:MybTri5/180 ausgeschaltet wurde, mit Pflanzen, bei denen das Ausschalten durch pTV:MybTri5/600 erfolgte, stellt man fest, dass die Anwendung von pTV:MybTri5/180 effektiver ist. Es besteht ein signifikanter Unterschied in den Trichomzahlen der pTV:MybTri5/180-Pflanzen und der pTV:MybTri5/600-Pflanzen. Worauf dies beruht, ist unklar. Dass unterschiedlich große Sequenzen des endogenen Gens, die in den Virus-Vektor kloniert wurden, unterschiedliche Effekte aufweisen, ist bekannt. Um ein Gen auszuschalten, reichen meist schon 23 bp große, 100% zum endogenen Gen identische Sequenzen aus (Thomas *et al.*, 2001). Oft jedoch sind längere Stücke nötig bzw. weisen längere Stücke eine höhere Wirksamkeit auf. Allerdings weiß man auch, dass bei VIGS zu lange Inserts hinderlich sein können, da sich der Virus dann nicht mehr so leicht in der Pflanze ausbreiten kann. Im Falle von TRV liegt diese Grenze bei 1,5 kB (Burch-Smith *et al.*, 2004). Burch-Smith *et al.* (2004) verwendeten 300-500 bp große Sequenzen. Im vorliegenden Fall wäre es denkbar, dass sich der TRV mit MybTri5/180 schneller in der Pflanze ausbreitet als TRV mit MybTri5/600 und auch rascher in den Wachstumspunkt der Pflanze gelangt, in dem *mybtri5* exprimiert wird. Somit könnte erklärt werden, dass im Falle von pTV:MybTri5/180 *mybtri5* früher ausgeschaltet wird als mit pTV:MybTri5/600 und daher ein größerer Effekt erkennbar wird.

Andererseits könnte es auch einen Einfluss haben, dass die Sequenzen zum Klonieren in den viralen Vektor aus verschiedenen Bereichen des Gens stammen, wodurch unterschiedliche siRNAs entstehen. Es ist bekannt, dass unterschiedliche siRNAs verschieden starke

Wirkungen auf das Ausschalten eines bestimmten Gens haben können. Je nach Sequenzzusammensetzung der einzelnen siRNAs weisen verschiedene siRNA-Duplicates unterschiedliche thermodynamische Eigenschaften auf. Ein bestimmtes thermodynamisches Muster verursacht ein effektiveres Silencing (Khvorova *et al.*, 2003). Beim Schneiden der doppelsträngigen RNA des Virus entstehen viele unterschiedliche siRNAs. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Zusammensetzung aus thermodynamisch günstigen und ungünstigen siRNAs zwischen pTV:MybTri180 und pTV:MybTri600 tatsächlich so stark variiert, dass sie bemerkbar ist.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass bei den pTV:MybTri5/180-Pflanzen nicht nur *mybtri5* ausgeschaltet wurde, sondern vielleicht zusätzlich ein anderer MYB-Transkriptionsfaktor. Da in diesem Fall ein Bereich der MYB-Domäne in den viralen Vektor kloniert wurde, gibt es in *N. benthamiana* bestimmt mehrere MYB-Proteine mit identischen Sequenzen, die größer als 23 bp sind. Allerdings müsste dieser MYB-Transkriptionsfaktor dann auch eine Funktion in der Entwicklung der Trichome besitzen. Bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA von *mybtri11* kloniert, die eine hohe Identität zu *mybtri5* aufweist. Sie beträgt im Bereich der MYB-Domäne 87% (hierbei ist zu beachten, dass *mybtri11* nicht ganz kloniert wurde) und im restlichen Bereich 27% auf Proteinebene. In den 180 bp-Sequenzen, die in den pTV-Vektor kloniert wurden, gibt es einen Bereich von 29 bp, der 100%ige Identität aufweist. Trotzdem zeigen die pTV:mybtri11/180-Pflanzen keine den pTV:mybtri5/180-Pflanzen ähnlichen Symptome. Dies unterstreicht, dass für das Ausschalten eines Gens oft ein identischer Sequenz-Bereich nötig ist, der mehr als 23 bp umfasst (Burch-Smith *et al.*, 2004).

4.3.1.2 Silencing-Nachweis

Bei VIGS handelt es sich um das posttranskriptionale Ausschalten eines entsprechenden Gens. Man geht davon aus, dass zuerst eine Transkription stattfindet und dass die jeweilige mRNA anschließend abgebaut wird. Somit muss sich bei den Pflanzen, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet wurde, die mRNA Menge verringert haben. Dies kann durch eine quantitative RT-PCR nachgewiesen werden. Bei den pTV:MybTri5/180- und den pTV:MybTri5/600-Pflanzen ist eine schwächere Bande zu sehen als bei den pTV00-Pflanzen. Dies weist einen Abbau der mRNA nach. Die Bande der pTV:MybTri5/180-Pflanzen zeigt ein stärkeres Signal als die pTV:MybTri5/600-Pflanzen. Eigentlich würde man das Gegenteil erwarten, da die pTV:MybTri5/180-Pflanzen einen stärkeren „Silencing“-Effekt zeigen. Dieses Ergebnis könnte an der gewählten Methodik liegen. Ein Northern Blot würde eine genauere, sensitivere

Methode darstellen, um einen Abbau der jeweiligen mRNA nachzuweisen. Der Nachteil der quantitativen RT-PCR liegt darin, dass die verwendete RNA-Menge zwar durch eine *aktin*-Kontrolle genau festgelegt wird, aber eine minimale Veränderung dieser Menge z.B. durch Pipettierungenauigkeit aufgrund der Amplifikation in der PCR große Auswirkungen haben kann. Allerdings wurde in dieser Arbeit bewusst eine RT-PCR durchgeführt, da für einen Northern-Blot nur eine Sonde außerhalb des MYB-Motivs verwendet werden kann, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Sonde darf aber auch nicht die Sequenz enthalten, die für die Herstellung von pTV:MybTri5/600 verwendet wurde, da bei der Isolation der RNA aus den infizierten Pflanzen auch die Virus-RNA isoliert wird und diese somit ein Signal auf dem Blot geben würde. Deshalb wäre nur noch eine relativ kurze Sequenz für eine Sonde in Frage gekommen. Dies hätte problematisch werden können, da es sich bereits bei den Expressionsanalysen als schwierig erwies, mit einer längeren Sonde ein gutes Signal zu erhalten.

4.3.2 Ausschalten von *mybtri5* mittels eines RNAi-Konstrukts

4.3.2.1 Phänotyp

Die beiden Transformationslinien (F4 und I7) zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die Pflanzen, bei denen *mybtri5* durch ein TRV-Konstrukt ausgeschaltet wurde. Die Pflanzen beider Transformationslinien wiesen eine glänzendere Epidermis und einen glatten Blattrand im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen auf. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl der Trichome und der Anzahl der drüsigen Trichome mit mehrzelligem Stiel (lange Trichome). Betrachtet man die Anzahl der kurzen Trichome, stellt man fest, dass sie sich bei der Linie F4 signifikant erhöht hat, bei Linie I7 nicht. Beim Blick auf die Gesamtzahl der Trichome fällt auf, dass bei I7 ein stärkerer Rückgang in der Zahl der Trichome zu verzeichnen ist als bei F4 (signifikanter Unterschied zwischen F4 und I7). Dies kann daran liegen, dass trotz gleicher Transformation (gleiches Konstrukt, parallele Transformation) aufgrund der Integration der Expressionskassette an eine andere Stelle im Genom die Expression nicht zum gleichen Zeitpunkt in gleichem Maße stattfindet und somit in diesem Fall das Ausschalten von *mybtri5* einmal etwas später erfolgt. Glover *et al.* (1998) exprimierten MIXTA aus *A. majus* in *N. tabacum*. Bei der gleichen Transformation erhielten sie Transformationslinien, die MIXTA zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimierten. Die Linien, die MIXTA sehr früh exprimierten, bildeten zusätzliche Trichome auf den Blättern

aus. Die Linien mit später Expression bildeten nur kegelförmige Zellen auf der Blattepidermis aus.

4.3.2.2 *Silencing-Nachweis*

Da beim Ausschalten eines Gens mittels RNAi die mRNA des endogenen Gens über bereits beschriebene Mechanismen abgebaut wird (s. Einleitung 1.3.3.2), würde man in den Wildtyp-Pflanzen bei einem Northern Blot eine entsprechende Bande erwarten und in den Transformationslinien keine. Dieser Nachweis konnte so nicht erbracht werden. Es wurde abgeklärt, dass dies nicht auf einen methodischen Fehler zurückzuführen ist. Bei den transgenen Pflanzen sind im Bereich von 300 bp und darunter Banden und Schmier zu sehen. Dies könnte auf Abbauprodukte der entsprechenden mRNA hinweisen. Beim Wildtyp findet sich keine Bande auf der Höhe, auf der sie von der mRNA von *mybtri5* zu erwarten wäre. Vermutlich ist dieses Signal aufgrund der starken Signale mutmaßlicher Abbauprodukte bei den Linien F4 und I7 nicht mehr detektierbar. Hinzu kommt, dass der Blot stringenter gewaschen werden musste als die anderen Northern Blots in dieser Arbeit, die mit derselben Sonde hybridisiert wurden. Die Ursache für die hohe Signalintensität liegt an der Verwendung eines starken Promotors für die Expressionskassette. Zusätzlich zeigt *mybtri5* auch in den Geweben, in denen es am stärksten exprimiert ist, eine geringe Intensität, da Transkriptionsfaktoren in der Regel nicht sehr stark exprimiert werden.

Einen eindeutigeren Silencing-Nachweis würde eine Western Blot-Analyse mit einem MYBTRI5 spezifischen Antikörper liefern.

4.3.3 Vergleich der VIGS-Pflanzen mit den RNAi-Pflanzen

Sowohl bei den VIGS-Pflanzen als auch bei den Pflanzen der Linien F4 und I7 ging das Ausschalten von *mybtri5* mit einer Reduktion der Gesamtzahl der Trichome und der Trichome vom Typ I einher. Die Pflanzen der Linie F4 zeigen als einzige eine Erhöhung in der Zahl der kurzen Trichome. Ein direkter Vergleich der VIGS-Pflanzen mit den RNAi-Pflanzen ist nicht möglich, da man die erhaltenen Zahlen auf die Kontrollen, d.h. die Wildtyp- bzw. pTV00-Pflanzen beziehen muss. Betrachtet man die Reduktion in der Gesamtzahl der Trichome, weist das Ausschalten von *mybtri5* mit pTV:mybtri5/180 den stärksten Effekt auf. Dies könnte, wie bereits in 4.3.1.1 ausgeführt, daran liegen, dass für dieses Konstrukt ein anderer Teil der cDNA verwendet wurde als bei den anderen Konstrukten. Pflanzen, bei denen für die Herstellung des Virus-Konstrukts bzw. des RNAi-Konstrukts die gleiche 600 bp große Sequenz verwendet wurde, zeigen ähnlich starke phänotypische Veränderungen. Die

pTV:MybTri5/600-Pflanzen liegen mit einer Reduktion der Gesamtzahl der Trichome auf 82% zwischen F4 mit 86% und I7 mit 73%. In diesem Fall hat VIGS und RNAi ungefähr dieselbe Wirkung. Dies bezieht sich allerdings nur auf den Zeitpunkt, ab dem die Pflanze mit dem Virus infiziert wurde, und auf den Teil der Pflanze, der anschließend angelegt wurde.

Beim Vergleich der RNAi-Pflanzen mit den VIGS-Pflanzen konnten keine zusätzlichen phänotypischen Veränderungen mehr festgestellt werden. Da man bei transgenen Pflanzen unter Verwendung des CaMV 35S-Promotors davon ausgehen kann, dass das entsprechende Konstrukt sehr früh exprimiert wird, ist anzunehmen, dass *mybtri5* bei der phänotypischen Entwicklung außer bei der Trichombildung keine weiteren Funktionen mehr besitzt.

Tab. 4.1: Vergleich der Trichomzahlen

Pflanzen	durchschnittliche Trichomzahl / 2 mm ²	Reduktion der Gesamtzahl der Trichome [%]
pTV00	34,7	100%
pTV:MybTri5/180	21,6	62%
pTV:MybTri5/600	28,4	82%
Wildtyp	29,8	100%
F4	25,6	86%
I7	21,8	73%

Angegeben sind die Mittelwerte der Gesamtzahl der beiden Trichomtypen und der jeweilig prozentuale Rückgang bezogen auf die Kontrollen. Die Daten stammen aus den Tabellen 3.1 und 3.4.

4.3.4 Expressionsanalyse von *mybtri5*

Betrachtet man die Northern-Blots, stellt man fest, dass *mybtri5* in jedem Entwicklungsstadium der Pflanzen im Wachstumspunkt exprimiert wird (s. Abb. 3.18). Außerdem ist im oberen Bereich des Stängels ab dem Entwicklungsstadium, ab dem der Stängel getrennt von anderem Pflanzengewebe gesammelt wurde, eine deutliche Expression zu erkennen (s. Abb. 3.18). Bei adulten Pflanzen, bei denen die verschiedenen Gewebe genauer untersucht wurden, findet man eine deutliche Expression in den sich entwickelnden Blüten, in jungen Blättern und im oberen Stängelbereich (s. Abb. 3.16). Bei den sich in der Entwicklung befindenden Blüten konnte die Expression in den Petalen lokalisiert werden (s. Abb. 3.17).

Da das Ausschalten von *mybtri5* eine Reduktion der Trichomzahl zur Folge hat, kann man davon ausgehen, dass es für die Initiation der Trichombildung zuständig ist. Für diese Funktion ist eine Expression vor dem Zeitpunkt, zu dem die Trichome angelegt werden, nötig. Dies erklärt die Expression in den Wachstumspunkten. In sehr jungen Blättern findet sich vielleicht deshalb ein Signal, da beim Wachstum der Blätter noch neue Trichome angelegt werden, oder weil die *mybtri5*-Transkripte noch nicht ganz abgebaut wurden. Die relativ

starke Expression im oberen Stängelbereich der adulten Pflanzen (s. Abb. 3.17) verglichen mit dem Stängel jüngerer Pflanzen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Probe den Wachstumspunkt miteinschließt. Bei den jüngeren Pflanzen deuten die Signale des oberen Stängelbereichs darauf hin, dass dort noch Trichome angelegt werden.

Die hohe Expression in den Petalen der sich entwickelnden Blüten ist schwer zu interpretieren. Da sich die Petalen der Wildtyp-Pflanzen nicht von denen der transgenen Pflanzen unterscheiden, scheint *mybtri5* in der Entwicklung der Petalen keine Funktion zu haben. Es ist fast auszuschließen, dass das erhaltene Signal von einem anderen *myb*-Gen stammt, das eine hohe Homologie zu *mybtri5* aufweist, da als Sonde eine Sequenz aus dem gering konservierten C-terminalen Bereich verwendet wurde und der Blot relativ stringent gewaschen wurde. Die Identität im C-terminalen Bereich beträgt z.B. bei *mixta* und *mybml1*, zwei phylogenetisch sehr nah verwandten und somit sehr ähnlichen Genen aus *A. majus* nur ca. 41% auf DNA-Ebene (Perez-Rodriguez *et al.*, 2005). Dies würde für eine unspezifische Bindung einer Sonde, die zu einem der beiden Gene in diesem Bereich homolog ist, an das jeweils andere Gen bei stringenten Waschschrritten nicht ausreichen. Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die hohe Expression in den Petalen könnten sein, dass MYBTRI5 dort tatsächlich keine Rolle spielt aufgrund fehlender anderer Transkriptionsfaktoren, die für die Transkriptionsregulation eines Gens nötig sind, oder dass die Funktion nicht erkannt wurde. Diesbezüglich sollte das Mesophyll der Petalen genauer betrachtet werden. In der Arbeit von Perez-Rodriguez *et al.* (2005) wurde MYBML1 aus *A. majus*, das eine hohe Homologie zu MYBTRI5 aufweist, ektopisch in *N. tabacum* exprimiert. Dies hatte unter anderem eine Verdickung des Mesophylls der Petalen in den Tabakpflanzen zur Folge.

4.3.5 Funktion von MYBTRI5

Da das Ausschalten von *mybtri5* bei jeder der verwendeten Methoden eine Reduktion in der Zahl der drüsigen Trichome mit mehrzelligem Stiel (Typ I) und in der Gesamtzahl der Trichome zur Folge hat, kann man davon ausgehen, dass MYBTRI5 an der Initiation der Entwicklung der Trichome vom Typ I beteiligt ist. Somit wurde zum ersten Mal ein Gen kloniert, für das nachgewiesen werden konnte, dass es in der Pflanze seines Ursprungs die Entwicklung drüsiger Trichome im vegetativen Bereich der Pflanze beeinflusst. Ob es auch einen Einfluss auf die Ausbildung von kurzen Trichomen hat, müsste noch näher untersucht werden, da die einzigen Pflanzen, die eine Veränderung in der Zahl dieser Trichome

aufweisen, in der Linie F4 zu finden sind. Hierfür wäre eine Überexpression von *mybtri5* in *N. benthamiana* sehr hilfreich.

Welchen Einfluss MYBTRI5 auf die Epidermis hat, konnte nicht geklärt werden. Ob die glänzendere Erscheinung der Epidermis bei den Pflanzen, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet wurde, nur auf die geringere Trichomdichte zurückzuführen ist, oder ob ein anderer Grund vorliegt, ist unklar. Für eine tatsächlich auftretende Veränderung spricht, dass sich bei der Präparation der Pflanzen für eine normale rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (nicht ESEM) die Epidermis bei den Pflanzen ablöst, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet wurde. Allerdings konnten bei einem Blattquerschnitt unter dem Lichtmikroskop keine Veränderungen gegenüber den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden.

Bei der Diskussion über die Funktion von MYBTRI5 sollte man immer im Auge behalten, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Expression eines anderen Gens kontrolliert. Es wäre zum Beispiel möglich, dass MYBTRI5 die Expression eines Gens aktiviert, das wiederum die Initiation von Trichomen auslöst. Es könnte aber auch sein, dass MYBTRI5 wie der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktor GL1 aus *A. thaliana*, der an der Entwicklung der Trichome beteiligt ist, die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors reguliert.

4.4 Ergebnis der Arbeit im Kontext mit anderen Arbeiten

Am besten untersucht ist die Entwicklung der einfachen Trichome von *A. thaliana*. Bei der Initiation dieser Trichome ist der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktor GL1 beteiligt. Dieser interagiert nach einem Model von Larkin *et al.* (2003) direkt oder indirekt mit weiteren Transkriptionsfaktoren, um die Transkription von *gl2* zu regulieren (s. 1.1.2.2). Eine direkte Interaktion kommt mit GL3 und EGL3, beides bHLH-Transkriptionsfaktoren, zustande.

MYBTRI5 weist zu GL1 nur eine geringe Ähnlichkeit auf (56%ige Identität bzw. 68%ige Homologie innerhalb der MYB-Domäne und 4%ige Identität bzw. 12%ige Homologie im C-terminalen Bereich). Bei MYBTRI5 konnten keine konservierten Aminosäuren gefunden werden, von denen bekannt ist, dass sie für eine Interaktion mit einem bHLH-Transkriptionsfaktor verantwortlich sind (s. 4.2). Dies sind Hinweise darauf, dass die Entwicklung von drüsigen Trichomen, zumindest was die Beteiligung von interagierenden MYB- und bHLH-Proteinen betrifft, anders verläuft als die Entwicklung einfacher Trichome in *A. thaliana*. Dies stimmt mit der Aussage von Payne *et al.* (1999) überein, dass die Differenzierung der einfachen Trichome von *A. thaliana* und der drüsigen Trichome von *N. tabacum* durch unterschiedliche regulatorische Gene kontrolliert wird. Payne *et al.* (1999)

folgern dies, weil eine Expression von *gll* in *N. tabacum* keine Veränderungen bewirkt. Unterstützt wird diese Aussage noch durch eine Arbeit von Wang *et al.* (2004), die Parallelen in der Entwicklung der einfachen unizellulären Trichome in Baumwolle zu denen in *A. thaliana* aufzeigt. Es konnte eine Beteiligung eines MYB-Transkriptionsfaktors, der Ähnlichkeit mit GL1 aus *A. thaliana* aufweist, und eines Homeobox(HOX)-Transkriptionsfaktors, der Ähnlichkeit zu GL2 aus *A. thaliana* besitzt, nachgewiesen werden. Wird MIXTA, ein R2R3 MYB-Transkriptionsfaktor aus *A. majus*, in *N. tabacum* ektopisch exprimiert, führt dies je nach dem Zeitpunkt der Expression auf den Blättern zur Ausbildung kegelförmiger Epidermiszellen oder zu einer Erhöhung der Zahl der mehrzelligen, einfachen Trichome und der drüsigen Trichome mit mehrzelligem Stiel (Glover *et al.*, 1998). Auch die Cotyledonen bilden Trichome und kegelförmige Epidermiszellen aus, obwohl beim Wildtyp dort keine Trichome zu finden sind (Payne *et al.* 1999). Die Anzahl der drüsigen Trichome mit einzelligem Stiel ist hierbei nicht betroffen. Außerdem ist auf den Blättern ein Rückgang in der Dichte der Stomata zu verzeichnen (Glover *et al.*, 1998). Payne *et al.* (1999) konnten im Gegensatz zu Glover *et al.* (1998) auch eine Veränderung im Phänotyp der Wurzeln feststellen, die aber noch näher untersucht werden muss. MIXTA ist in *A. majus* für die Ausbildung kegelförmiger Epidermiszellen in der inneren Epidermis der Petalen zuständig (Noda *et al.*, 1994). Eine Überexpression dieses Gens in *A. majus* stimuliert auch die Ausbildung von kegelförmigen Epidermiszellen und vielzelligen Trichomen auf den Blättern (Martin *et al.*, 2002). Dies alles spricht dafür, dass an der Initiation der Trichome in *Nicotiana* ein dem MIXTA ähnlicher MYB-Transkriptionsfaktor beteiligt ist. Hierbei handelt es sich bei *N. benthamiana* vermutlich um das in dieser Arbeit klonierte *mybtri5*-Gen. MYBTRI5 weist eine hohe Ähnlichkeit zu MIXTA auf (84%ige Identität bzw. 93%ige Homologie im Bereich des MYB-Motivs und 21%ige Identität bzw. 33%ige Homologie im C-terminalen Bereich). Sie gehören beide zur selben Untergruppe G03 nach Jiang *et al.* (2004) bzw. 9 nach Stracke *et al.* (2001). Die ektopische Expression von MIXTA verändert den Phänotyp der transgenen *N. tabacum*-Pflanzen nicht nur bezüglich der Trichomentwicklung. Aus diesem Grund und aufgrund der Funktionen von MIXTA in *A. majus*, könnte MYBTRI5 in *N. benthamiana* auch noch andere Aufgaben besitzen. Jedoch konnte beim Ausschalten von *mybtri5* im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderung der Petalen, des Wurzelwachstums und der Anzahl der Stomata festgestellt werden. Allerdings könnte sich ein Einfluss von MYBTRI5 auf diese Eigenschaften eventuell erst durch eine Überexpression von *mybtri5* bemerkbar machen. Von dem Einfluss, den MIXTA auf die Ausbildung der Stomata hat, ist bekannt, dass dieser eigentlich nur indirekt ist. Man hat festgestellt, dass die Schließzellen und in *N. tabacum* auch

die den Schließzellen benachbarten Zellen weder Trichome noch eine Kegelform hervorbringen und die Anlage von Trichomen vor der Anlage von Stomata stattfindet (Martin *et al.*, 2002). Auf der abaxialen Seite der Petalen konnte bei den *N. benthamiana*-Pflanzen, bei denen *mybtri5* ausgeschaltet wurde, keine Reduktion in der Trichomzahl festgestellt werden. Außerdem weisen die Petalen der Wildtyp-Pflanzen auf der Innenseite keine kegelförmigen Epidermiszellen und auch keine Trichome auf. Durch eine Überexpression könnte festgestellt werden, ob MYBTRI5 in der Lage wäre dort eine Veränderung auszulösen. Allerdings muss man bei der Interpretation von Überexpressionsanalysen bedenken, dass durch die Verwendung eines starken Promotors das entsprechende Gen, in diesem Fall der Transkriptionsfaktor, in Geweben exprimiert wird, in denen er bei Wildtyp-Pflanzen nicht exprimiert wird. Dies kann durch Interaktionen mit Promotoren oder mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Regulation eines bestimmten Gens führen, die im Wildtyp so nicht stattfinden würde (Payne *et al.*, 1999).

Ein weiterer MYB-Transkriptionsfaktor, der eine hohe Homologie zu MYBTRI5 aufweist und im Zusammenhang mit der Ausbildung von Trichomen steht ist MYBML1 (MIXTA like 1) aus *A. majus* (MYB-Motiv: 84%ige Identität, 94%ige Homologie; C-terminaler Bereich: 26%ige Identität, 41%ige Homologie). Perez-Rodriguez *et al.* (2005) fanden heraus, dass MYBML1 für die Bildung von Trichomen auf dem ventralen Blütenblatt, für die Ausbildung kegelförmiger Epidermiszellen in einem bestimmten Bereich des ventralen Blütenblatts und für die Verstärkung dieses Blütenblatts durch Verdickung des Mesophylls zuständig ist. Eine ektopische Expression dieses Gens in *N. tabacum* bewirkt nur im Bereich der Blüte eine Veränderung. Hier kommt es auf den Petalen und Karpellen zur Ausbildung von vielzelligen Trichomen und zur Ausbildung kegelförmiger Epidermiszellen. Letztere wurden auch auf den Bracteen, Sepalen und Stamina gebildet. Außerdem ergab sich eine Verdickung des Mesophylls der Petalen (Perez-Rodriguez *et al.*, 2005). Dies könnte einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von *mybtri5* in den Petalen der sich entwickelnden Blüten von *N. benthamiana* sein. Denn *mybtri5* weist dort eine hohe Expression auf. Aber bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten, wie bereits oben erwähnt, keine Veränderungen der Petalen beim Ausschalten von *mybtri5* festgestellt werden. Somit sollte das Mesophyll dieser Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen näher betrachtet werden.

Diese Vergleiche legen die Vermutung nahe, dass die Entwicklung drüsiger Trichome in verschiedenen Pflanzenarten einem ähnlichen Muster folgt. Gleiches scheint auch für die Entwicklung einfacher Trichome verschiedener Pflanzenarten zuzutreffen. Jedoch wird die

Entwicklung unterschiedlicher Trichomtypen offensichtlich durch unterschiedliche regulatorische Proteine kontrolliert.

4.5 Weiterführende Arbeiten

Um weitere Rückschlüsse auf die Funktion von *mybtri5* zu ziehen, müsste das Gen in *N. benthamiana* mit Hilfe eines sense-Konstrukts überexprimiert werden. Um nähere Aussagen über den Zeitpunkt und die genaue Lokalisation der Expression von *mybtri5* machen zu können, sollte eine *in-situ*-Hybridisierung angefertigt werden, oder nach erfolgter Klonierung des Promotors von *mybtri5* eine Transformation mit einem Promotor-GUS-Konstrukt durchgeführt werden.

Die Ausbildung von Trichomen mit Drüsenfunktion scheint anders abzulaufen als die Entwicklung einfacher Trichome. Um dies nochmals zu bestätigen, könnte man das in dieser Arbeit klonierte Gen *mybtri5* entweder in *A. thaliana* z.B. unter der Verwendung eines CaMV 35S-Promotors oder unter der Verwendung des Promotors von *gll* (an der Trichomentwicklung in *A. thaliana* beteiligt) exprimieren.

An der Entwicklung einfacher Trichome in *A. thaliana* sind viele Faktoren beteiligt. Dies trifft für die Ausbildung von drüsigen Trichomen, die ein differenzierteres System als die einfachen Trichome darstellen, mit Sicherheit auch zu. In *A. majus* hat man in der Promotorregion von AmMYBML1 Erkennungssequenzen für MADS-Box-Transkriptionsfaktoren gefunden und festgestellt, dass Pflanzen mit einer Mutation in einem MADS-Box-Transkriptionsfaktor eine geringere Expression von AmMYBML1 aufweisen (Perez-Rodriguez *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von MYBTRI5 mit diesem Protein könnte man die Promotorregion von *mybtri5* auf mögliche Bindestellen für MADS-BOX-Proteine untersuchen. Falls der Promotor solche Sequenzen aufweist, sollte man versuchen aus *N. benthamiana* MADS-BOX-Proteine zu isolieren. Diese könnten dann über das Hefe-One-Hybrid-System oder EMSA-Analysen (EMSA = electrophoretic mobility shift assay) auf Interaktionen mit dem Promotor von MYBTRI5 getestet werden und bei auftretenden Interaktionen in *N. benthamiana* ausgeschaltet oder überexprimiert werden.

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei MYBTRI5 um einen Transkriptionsfaktor, der an der Regulation eines oder mehrerer Gene, beteiligt ist. Diese Gene besitzen wiederum eine Funktion in der Initiation von Trichomen. Eine mögliche Vorgehensweise ein solches Gen zu isolieren wäre es, die Expression der Gene von den Wildtyp-Pflanzen mit denen der RNAi-

Pflanzen mittels Makro-Arrays zu vergleichen. Die Gene, die unterschiedlich exprimiert werden, stellen potentielle Kandidaten dar, die von MYBTRI5 reguliert werden.

5 Zusammenfassung

Eine Untersuchung von Glover *et al.* (1998) legt die Vermutung nahe, dass nicht nur an der Entwicklung einfacher Trichome in *A. thaliana* ein MYB-Transkriptionsfaktor beteiligt ist, sondern auch an der Entwicklung von Trichomen mit Drüsenfunktion. In dieser Arbeit sollte versucht werden diesen Transkriptionsfaktor aus *N. benthamiana* zu klonieren.

1. Durch eine PCR mit degenerierten Primern konnten aus der cDNA von Trichomen und jungen Blättern sechs unterschiedliche Teilsequenzen, die ein MYB-Motiv enthalten, isoliert werden. Mittels RACE gelang in allen sechs Fällen die vollständige Amplifikation der 3'-Enden bis zum Stoppcodon.
2. Zum Ausschalten der jeweiligen Gene in den Pflanzen wurde die Methode des VIGS (VIGS = virus induced gene silencing) angewendet. Hierfür wurden die aus der PCR mit degenerierten Primern erhaltenen Teilsequenzen jeweils in einen viralen Vektor, der auf einem Tabak-Mosaik-Virus basiert, und in einen viralen Vektor, der auf einem Tobacco-Rattle-Virus (TRV) basiert, kloniert. Des Weiteren wurden noch ca. 600 bp große Sequenzen aus dem C-terminalen Bereich jeder erhaltenen *myb*-cDNA in den TRV-Vektor kloniert.
3. *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit diesen unterschiedlichen Virus-Konstrukten infiziert. Nur die Pflanzen, die mit dem Tobacco-Rattle-Virus infiziert worden waren, der Sequenzen von *mybtri5* trug, wiesen eine phänotypische Veränderung auf. Sie zeigten im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen eine signifikante Reduktion der Zahl der drüsigen Trichome mit mehrzelligem Stiel, die bei gleichbleibender Anzahl Trichome mit einzelligem Stiel eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl der Trichome zur Folge hatte. Außerdem besaßen sie im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen ein glänzendere Epidermis und einen glatten Blattrand.
4. Die vollständige Sequenz von *mybtri5* wurde durch GenomeWalking erhalten. Das Gen konnte durch das Vorhandensein bestimmter Motive im 3'-Bereich der Untergruppe 9 (nach Stracke *et al.*, 2001) bzw. G03 (Jiang *et al.*, 2004) der pflanzlichen MYB-Proteine zugeordnet werden. Eine Sequenz, die auf eine Interaktion mit einem bHLH-Transkriptionsfaktor hinweist, konnte nicht gefunden werden.

5. Mit Hilfe der VIGS-Pflanzen kann man frühestens ab dem Zeitpunkt der Infektion mit dem Virus Rückschlüsse auf die Funktion des ausgeschalteten Gens ziehen. Da die Infektion der Pflanzen erst in einem Alter von 4-5 Wochen stattfindet, könnte es durchaus sein, dass MYBTRI5 in der Entwicklung vom Samen bis zu einer 4-5 Wochen alten Pflanze weitere Funktionen wahrnimmt, die durch VIGS nicht erkannt werden können. Daher wurden *N. benthamiana*-Pflanzen mit einem RNAi-Konstrukt transformiert. Um zu gewährleisten, dass überall in der Pflanze und schon sehr früh in der Entwicklung dieses Konstrukt exprimiert wird, wurde ein starker Promotor (CaMV 35S) verwendet. Diese transgenen Pflanzen bestätigten das Ergebnis, das bereits von den VIGS-Pflanzen erhalten wurde. Es kam zu keinen zusätzlichen phänotypischen Veränderungen.
6. Durch Northern Blot-Analysen konnte die Expression von *mybtri5* in der Pflanze bestimmt werden. Es ergab sich in jedem Entwicklungsstadium der Pflanze eine Expression im Wachstumspunkt. Außerdem zeigten die Blots auch im oberen Stängelbereich und in jungen Blättern ein Signal. Dies unterstützt die Aussage, dass MYBTRI5 an der Initiation von Trichomen beteiligt ist, da in diesen Geweben Trichome angelegt werden. Auffällig ist allerdings die hohe Expression von *mybtri5* in sich entwickelnden Blüten. Nachdem dort keine Veränderung bei den VIGS- bzw. transgenen Pflanzen festgestellt werden konnte, bleibt die Funktion dieses Gens in diesem Gewebe unklar.
7. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *myb*-Gen von *N. benthamiana* kloniert und auf seine Funktion untersucht werden. Somit wurde zum ersten Mal ein Gen kloniert, für das nachgewiesen werden konnte, dass es in der Pflanze seines Ursprungs die Entwicklung drüsiger Trichome im vegetativen Bereich der Pflanze beeinflusst. Außerdem konnte die Aussage, dass an der Entwicklung von einfachen Trichomen und drüsigen Trichomen unterschiedliche regulatorische Proteine beteiligt sind, untermauert werden.

6 Literaturverzeichnis

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Ascensao L., Pais M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* **81**: 263-271

Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363

Broun Pierre (2004) Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 202-209

Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., Dinesh-Kumar S.P. (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal* **39**: 734-746

Croy R.R.D., Hames B.D., Rickwood D. (1993) Plant molecular Biology, LabFax, Information Press Ltd, Oxford, UK

Dell B., McComb A.J. (1978) Plant Resins – Their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research* **6**: 227-316

Fahn A. (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75

Frohmann M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1998) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002

Glover B.J., Martin C. (1998) The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity* **80**: 778-784

Glover B.J., Perez-Rodriguez M., Martin C. (1998) Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* **125**: 3497-3508

Glover B.J. (2000) Differentiation in plant epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* **51**: 497-505

Glover B.J., Martin C. (2000) Specification of epidermal cell morphology. *Advances in Botanical Research* **31**: 193-217

Guo Z., Wagner G. (1995) Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana glutinosa*. *Planta* **197**:627-632

Guo Z., Severson R.F., Wagner G.J. (1994) Biosynthesis of the diterpene cis-abienol in cell-free extracts of tobacco trichomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**: 103-108

- Hallahan D.L., Gray J.C. (2000)** Preface. *Advances in Botanical Research* **31**: XXIII-XXIV.
- Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R. (1991)** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 63-113
- Hülkamp M., Kirik V. (2000)** Trichome differentiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Advances in Botanical Research* **31**: 237-260
- Hülkamp M., Misera S., Jürgens G. (1994)** Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555-566
- Ito M., Araki S., Matsunaga S., Itoh T., Nishihama R., Machida Y., Doonan J.H., Watanabe A. (2001)** G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant Cell* **13**: 1891-1905
- Jiang C., Gu X., Peterson T. (2004)** Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of *Arabidopsis* and *Oryza sativa* L. ssp. *indica*. *Genome Biology* **5**: R46.1-11
- Jin H., Martin C. (1999)** Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Molecular Biology* **41**: 577-585
- Johnson H.B. (1975)** Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review* **41**: 233-253
- Kandra L., Wagner G. J. (1988)** Studies of the site and mode of biosynthesis of tobacco trichome exsclate components. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **265**: 425-432
- Keene C.K., Wagner G.J. (1985)** Direct demonstration of divatrienediol biosynthesis in glandular heads of tobacco trichomes. *Plant Physiol.* **79**:1026-1032
- Kelsey R.G., Reynolds G.W., Rodriguez E. (1984)** The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In "Biology and Chemistry of Plant Trichomes" (E. Rodriguez, P.L. Healey, I. Mehta, eds) pp.187-241. Plenum, New York
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena D. (2003)** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**: 209-216
- Kim H.J., Triplett B.A. (2001)** Cotton fiber growth *in planta* and *in vitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiol.* **127**: 1381-1366
- Kirik V., Simon M., Hülkamp M., Schiefelbein J. (2004)** The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **268**: 506-513
- Klempnauer K.H., Gonda T.J., Bishop J.M. (1982)** Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**: 453-463

- Kranz H.D., Denekamp M., Raffaella G., Jin H., Leyva A., Meissner R.C., Petroni K., Urzainqui A., Bevan M., Martin C., Smeekens S., Tonelli C., Paz-Ares J., Weisshaar B. (1998)** Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**(2): 263-276
- Larkin J.C., Brown M.L., Schiefelbein J. (2003)** How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 403-430
- Laue G., Preston C.A., Baldwin J.T. (2000)** Fast track to the trichome: induction of N-acyl normicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*. *Planta* **210**: 510-514
- Lavie G., Mazur Y., Prince A.M., Pascual D., Liebes L., Levin B., Meruelo D. (1995)** Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion* **35**: 392-400
- Lee M.M., Schiefelbein J. (2001)** Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* **128**: 1539-1546
- Lipsick J.S. (1996)** One billion years of Myb. *Oncogene* **13**: 223-235
- Martin C., Paz-Ares J. (1997)** MYB transcription factors in plants. *TIG* **13**(2): 67-73
- Martin C., Bhatt K., Baumann K., Jin H., Zachgo S., Roberts K., Schwarz-Sommer Z., Glover B., Perez-Rodrigues M. (2002)** The mechanics of cell fate determination in petals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**: 809-813
- Maruyama K., Sugano S. (1994)** Oligo-Capping: A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**: 171-174
- Meister G., Tuschl T. (2004)** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349
- Mello C.C., Conte Jr D. (2004)** Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342
- Meyberg M., Krohn S., Brümmer B., Kristen U. (1991)** Ultrastructure and secretion of glandular trichomes of tobacco leaves. *Flora* **185**: 357-363
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350
- Neal J.J., Tingey W.M., Steffens J.C. (1990)** Sucrose esters of fatty acids in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* settling and probing by green peach aphid. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 487-497
- Nishikawa T., Nagadoi A., Yoshimura S., Aimoto S., Nishimura Y. (1998)** Solution structure of the DNA-binding domain of human telomeric protein hTRF1. *Structure* **6**(8): 1057-1065

Noda K.-I., Glover B.J., Linstead P., Martin C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* **369**: 661-664

Ogata K., Hojo H., Aimoto S., Nakai T., Nakamura H., Sarai A., Ishii S., Nishimura Y. (1992) Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6428-6432

Ogata K., Morikawa S., Nakamura H., Hojo H., Yoshimura S., Zhang R., Aimoto S., Ametani Y., Hirata Z., Sarai A., Ishii S., Nishimura Y. (1995) Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain of c-MYB. *Nature Struct. Biol.* **2**: 309-320

Ohara O., Dorit R.L., Gilbert W. (1989) One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5673-5677

Payne T., Clement J., Arnold D., Lloyd A. (1999) Heterologous *myb* genes distinct from *GL1* enhance trichome production when overexpressed in *Nicotiana tabacum*. *Development* **126**: 671-682

Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156(3)**: 1349-1362

Perez-Rodriguez M., Jaffe F.W., Butelli E., Glover B.J., Martin C. (2005) Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers. *Development* **132**: 359-370

Rabinowicz P.D., Braun E.L., Wolfe A.D., Bowen B., Grotewold E. (1999) Maize *R2R3 Myb* Genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**: 427-444

Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D.C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* **25(2)**: 237-245

Romero I., Fuertes A., Benito M.J., Malpica J.M., Leyva A., Paz-Ares J. (1998) More than 80 *R2R3*-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **14(3)**: 273-284

Saiki R., Short S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1352

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467

Schaefer B.C. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**: 255-273

- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E. (2001)** Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 113-123
- Schnittger A., Hülskamp M. (2002)** Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**: 823-826
- Serna L. (2004)** A network of interacting factors triggering different cell fates. *Plant Cell* **16**(9): 2258-2263
- Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. (1995)** An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087-1088
- Solano R., Fuertes A., Sánchez-Pulido L., Valencia A., Paz-Ares J. (1997)** A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity of plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J. Biol. Chem.* **272**(5): 2889-2895
- Stracke R., Weber M., Weisshaar B. (2001)** The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 447-456
- Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A.F.W. (1991)** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Auflage neu bearbeitet von Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky A. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D.C., Maule A.J. (2001)** Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant Journal* **25**: 417-425
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994)** CLUSTAL W. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680
- Timmermans M.C.P., Hudson A., Becraft P.W., Nelson T. (1999)** ROUGHSHEATH2: A MYB protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* **284**: 151-153
- Uphof J.C.T. (1962)** Plant hairs. *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, **5**: 1-206
- van de Peer Y., De Wachter R. (1994)** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**: 569-570
- van Houwelingen A., Souer E., Spelt K., Kloos D., Mol J., Koes R. (1998)** Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **13**(1): 39-50
- Volloch V., Schweitzer B., Rits S. (1994)** Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta-globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2507-2511

- Wagner G.J. (1991)** Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiol.* **96**: 675-679
- Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W. (2004)** New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* **93**: 3-11
- Walker A.R., Marks M.D. (2000)** Trichome initiation in *Arabidopsis*. *Advances in Botanical Research* **31**: 219-236
- Wang E., Gan S., Wagner G.J. (2002)** Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L.. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1891-1897
- Wang E., Wang R., DeParasis J., Loughrin J.H., Gan S., Wagner G.J. (2001)** Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat. Biotechnol.* **19**: 371-374
- Werker E. (2000)** Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* **31**: 1-35
- Wesley S. V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M. (2001)** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**(6): 581-590
- Woerdenbag H.J., Pras N., van Uden W., De Boer A., Battermann S., Visser J.F., Malingré T.M. (1992)** High peroxidase activity in cell cultures of *Artemisia annua* with minute Artemisinin contents. *Natural Product Letters* **1**: 121-128
- Wu X.-M., Lim S.-H., Yang W.-C. (2003)** Characterization, expression and phylogenetic study of *R2R3-Myb* genes in orchid. *Plant Molecular Biology* **51**: 959-972
- Zador E., Jones D. (1986)** The biosynthesis of a novel nicotine alkaloid in the Trichome of *Nicotiana stocktonii*. *Plant Physiology* **82**: 479-484
- Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne C.T., Lloyd A. (2003)** A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development* **130**: 4859-4869
- Zimmermann I.M., Heim M.A., Weisshaar B., Uhrig J.F. (2004)** Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like bHLH proteins. *Plant Journal* **40**: 22-34

7 Anhang

7.1 DNA-Teilsequenzen, der in dieser Arbeit isolierten *myb*-cDNAs

nbmybbl11

AAGAGGTGTCGATTCAGGTGGATTAATTACTTAAAGACCTGATCTTAAACGCGGTAATTTCACTGAAGA
AGAAGATGAACTCATTATCAAACCTCCATAGCCTTCTTGGTAACAAGTGGTCACTTATAGCGGGAAGATT
ACCCGGAAGAACAGACAACGAGATAAAGAATTATTGGAATACACATATAAGAAGGAAGCTTTTGAGT
AGGGGAATTGATCCAACAACACATAGGCTAATGGGTGAACCTACTGGTACACAAAAAATGACAACAA
TTTCTTTTGTGCTGATGATCAAGAACAGAAGATTAAGATCAGCCCCGAATTCGAGACGATGAACAAG
GAAGAAAAAGATCATGAAATTCAGAACGATGTCTGATTTGAATCTTGAGCTTAGAATCAGTCTCCTCC
TCATAATCAACAAAATCAACTTGATCATCATCAAGAGCAAATTTTTTGTGTTTTACATGTAGTTTGGG
TATACAAAATAGTAAAGATTGCAGTTGCAGTAGTAAAAATAGTAATGGAAATGGTTGTAGTAATATTA
TAAATATGAATATGAACATTTCTGGTTATGATTTTTTAGGGTTAAAGAATAATGGTCTAGTTTTGGACT
ATAGAACCTTGAAACTAAGTGATTAGATTTGTATTATGATCTTTAATTTTCTGTATGTAGAAAAAAT
ATAAGAATGTCAAGAGAGAATTAAGTGAATTAGTTAAGAATATTATTTTTCTAGCTAAAAA

nbmybbl14

AAAAGGTGTAGGTTCCGATGGACTAACTACCTTAGGCCAGGGATAAAGAGGGGTAGCTTCTCAGATCA
AGAAGAGAAGATGATTATCCAGCTACAAGCTCTTTTAGGCAACAAAATGGGCTGCAATGGCTTCGTATC
TACCAGAGAGAACAGACAACGACATTAAAAACTACTGGAATACACATCTAAAGAAAAAGATGAAAA
TCTTGAAGAAAAATGCTCTGGAGATAATGATCTATTCTCAGTAGAAAAATGGTCATAATTTGTCATCTTC
AAACTCAACCTCTAGGGGCCAATGGGAAAGAACACTTCAAGCTGATATAAACATGGCCAAAAAGGCTT
TACATAACGCCTTGTCACTTGAAAACCTCAACCCCATATATTAACAAGAAACCCCAAGTCCAAAGTTTCTA
CCTATGCATCAAGTACTGAGAATATAGCCAGATTGCTACAAGGATGGATGACAAGTTCTTCTCCACAA
ACAATTCTGAGAATTCAAAACTTCATCTAACAACATTGCAGCCACAACCTGATTCATCTTCTGTGATG
GGACTCCAAGTGCAGAAAGCAAAGTAGGTGGAATGGTGTAAATGGAAGCGTTGGAGTCACTTTTTGGG
TTGGAGTCGTCAATTTGAAAGGTCAAGTTCAGATCAGTTATCTGAAACAGCATCACCTGAGGCAAGTAA
ATTACAAGTTGAAATCAAGAAAGAAGAAAATACTAACTCACAAGTGCCTTGTGAGTTATGCTAGAGA
ATTGGCTGCTTGATGAAAATACCATTTCATGGGAAAGACGATTTGACTAGCTTCTCTTTTGTAGAACTG
CTGACCTTTTTTAGAAGGATTTTATTTTGTATAGTAGTAATCTTTTGACGGATTTCTAGAAAAA
AAAAAACAACACTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGAC

nbmybtri1

AAGTCGTGTCGGCTGCGATGGATGAATTACTTGAGGTCTGATTTGAGGAGAGGTAACATAACTTCTCA
AGAGGAAGACATAATCATCAAGTTACATGCAACTTTGGGTAACAGATGGTCTCTAATAGCGGGACATT
TACCAGGTAGAACAGACAATGAGATTAAAAACTATTGGAACCTCATCTAAGCAGAAAAGTTGAAAGC
TTAAGGATTTCAAGCGACGATAAGCTGCCTCAAGCCGTAGTTGATTTGGCTAATAGAGGAACTTTGAA
CCCTATCAAATGTAGAGTTTCGCACAATAAAGAAAAAAGAAGTCTTAAAAAAGTCTGCTTCAAGTTTGT
CAGAGCCTAAAAAACCTAAAGAAAGTAATGAACCTTTAAATTCAATAGTTCCTATGCCCTCAACTCTA
AACATGGAAAAAGAGGCCTTATCTAGCTCTATTAGCTCATGGCTAGATGGAAATGCCATGGAAGAGGT
AGCAAACGTAGCTGCGCCAAATCCTTGGTCAGAGTCTAGAGTGGTCCAGAGCAACCTTAGTTCAGATA
ATGGGATGGAATGGCTTACGAAATTATGCCAATGGTTCATGGACGATCAAGATACGGACGTAATGAA
TTCATTTTACTGTTTGTAGACGACGGGCAAGGAGAAAAAGTAACCAACGAGGCAGAAAATAAAGGTG
GGACCACGAACAGAAGCAATGAACATAACGACAAAGACCAGATAATAAAATGGTATCAAGTGAAGA
TACACAACCTGGAGAGTAGTCCAGAGAGTGATGCTGTATCCTTTAATATTCTGAAAGATGTACAAGAGA
ATAGCAACGAAACGAAATTATTTATGGAAGATAGTGCAGTTGAATGGGATTGGCAAGAGATAGCTGAA
GACAGGAGAGAAGTATGGCCATGGGAAGAAACAGGGCAAGACAACATGTCAATTAATCACAGTTGGC
CGCTATGGGAT
AGTACTGACACTGAGTTACTTCAAATTTGCACGAATGAAATAACGGTGGAAATGGGTTCCAACCAAAA
CCATAGTGCCCTTGTGCTGAGTACTCCCTTGTGCTTGGCTTTTGTCTTAGCTGCTTCTGATTTGATGCG
AAATGGCACTGCTTCTGATCAGTTTGTAAAGTAGGATAGACGTCGTAATTTGAGAGCACTCTGCAGCAT
AGAACAAGACAGTCTTTTGGTTTTGTGTAGCATATTTTTAATGGGAATGCCAGTTATGCACATATT

nbmybtri11

AAGTGTGTAGGTTCCGTTGGATCAACTATCTAAGGCCAGATATCAAGAGAGGAAAGTTCAGTTTACA
AGAAGAAAGAACTATCATTTCAGCTTCATGCTCTTCTTGGAAACAGATGGTCAGCAATAGCAGCTTATTT
GCCCAGCAGAACAGACAACGAGATAAAAAATTATTGGAACACGTTTGAAGAAGAGATTAACAAAA
ATGGGCATTGATCCAATGACTCACAAGCCAAAAATCACAACAACATTGATGGTAGCTCAAATGATCA
ATGTAAGTATGTTGCAAACCTTAGTCATATGGCTGAATGGGAAAGTGCAAGACTTGAAGCAGAAGCAA
GACTTGTTCGTAGATCAAAAGATCACTCTAAATTCCTCCTCAATAACACTCGCAACAATAACAACAATA
ATAATAACAACACTACGTCGTTTCACAACCTTATTATCAACTTCCTTGTCTTGACATATTAAGCATGGC
AAAGGGCAAGCACAAAATTACCAACAACAAATGACATTAGTTCTATTGTTCTTGATGGTTTTGCTAACA
AAAACCTCGAATCATCGATACCATCAACGTTAAATTCCTCGGGTAATTTGTTTCATGAGCAATGTATCAA
CTACTACAGAAGTTGGTGACCAAAATCTTCCTTTGTCTACAATCATATGTTTGGAAAATCCTTGCCCAA
CAAAGATGTCCAACAGACCTTCCAAGTTTTATGCAAGAGTTTTTCAGAGCTACTTGATCATGCGGAAT
ATACACAAAATTCAGCAAATAATTTACTGGAGTACAGATGGATAATTATATGGGAAGCTGCTATGGG
GATTTTGAAGATAACAGATTTAATTGGAACAACCTCCATTATTTGGTTACTTCACCAATTGGTTCTCCGG
TATTCTGAAGAGTTCATATGTTGTTACGTTCTATTAAGGAGATATTAGGATAAGTTGTTAAAAATAACGG
GATAGGACAATTGACATGTCCAGATAATTCTGAAGAAACACTGTTGGCTGTTATTTTTCTACTTTTTTAA
GTTTAACTGAGTTTTTAATGATTAT

nbmybtri30

AAGACTTGCAGGTTACGTTGGTTAAACTATCTGCGACCAAAATCTCAAGCACGGTGGATTCTCTCAAGAA
GAAGATAACATTATTTGAGCCTCTATATCAGTATTGGAAGCAGGTGGTCTATTATTGCAGCACAACCT
CCAGGAAGAAGACTGATAATGACATAAAAAACTACTGGAACACCAAGCTGAAGAAGAAGTTATTTGGAA
AACAGCGCAAAAATCTTAGAGGTAAAAGCCAAAAACAAGGATCAAGAAAGGGAGAGATCAAATGA
ATAGATCCATGGACTCTCACAACAATATTGACACAAACCTAGTTGGTCTGAGTTTCTATCCTGCAAC
CAATACCATACTCAAATGATGAACCACGTTACAACAAGGATCACACTTCTATTAGAAAGTTGTTGATG
AAACTGGAGGAAAATTCTATGATGATGATGATAAACCAATGAGTGGAGCACTAAATCCTTACTATGA
TCCTATGGATAATTCTTTGATGCATCCAATATATCACAATTCTATAAAATTTGATATCTTCTGCTCCAATG
GGTGTCATGAACACGTCTCCTTTCACAAATTCTCATGAGTACTACGTGGATGGGAAAGCAGTCTGCTGG
GCTGACTGACTGACTGACTGAGAAACAAAAGCTAGGGGAGCCAATGGGATCAGATACCACAGTAG
CCCTAGCACTAAACTATGGATGCAATTCTACCACTGAGCTTGAGCATATGGGGTACACTAATCCACAA
AAATTAGATGATTTTAAAATGTTATACGAGGATATGCTTAATAATAAACCTTCAACTACTTTGGAAGGA
GGCTTGGACTGGAAAGATATGAACAACCTGGTGTTCCTTCCCTCCTCTAGTTGTTTCCAACAATGAA
GTTTATCAACATGGCACTTTGCTTGAAGAAGGTGCACTTAATGAGCTTAGGTACCCTAGGGATTAATAA
ATATTTTTGTAAATTTTGTGTTGACATTGTAATTTTCTTGAAGATAGACCTGGTGATTAATGTGTTTCGT
TGGAGAACTCAAATAAATACGTTGTGCTGCTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

7.2 Für den Stammbaum und den Aminosäuresequenzvergleich verwendete Proteinsequenzen

Name	Accession-number
aus <i>Anthirrinum majus</i> :	
AmMIXTA	X79108
AmMYBML1AtMYB0GL1	AJ006292
aus <i>Arabidopsis thaliana</i> :	
AtMYB4	AF062860
AtMYB7	U26937
AtMYB11	AF062863
AtMYB12	AF062864
AtMYB16	X99809
AtMYB23RTF	Z68158
AtMYB30	AF062873/AJ007289
AtMYB31	X90383/X90387
AtMYB36	AF062878
AtMYB66WER	AF062900/AF126399
AtMYB75PAP1	AF062908/AF325123
AtMYB84	Y14209
AtMYB106	AF249309
AtMYB123TT2	AF371981
AtTRY	AY161286
AtCPC	NM_130205
PC-MYB1	AF151646/AF188677
aus <i>Dendrobium</i>	
DwMYB1	AF485892
aus <i>Gossypium hirsutum</i>	
GhMYB25	AF336283
aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	
LeTHM6	X99134
LeTHM27	X95296
aus	
PhMYBRP1	Z13996

7.3 Ergebnisse der Trichomauszählungen

Tab. 7.1: Auszählungsergebnis von drei pTV00-Pflanzen (s. 3.3.2)

pTV00 Pflanze 1	lange Trichome	kurze Trichome	pTV00 Pflanze 2	lange Trichome	kurze Trichome	pTV00 Pflanze 3	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	9	24	1-1	11	14	1-1	15	28
1-2	9	40	1-2	12	18	1-2	15	15
1-3	7	32	1-3	9	16	1-3	14	25
1-4	10	30	1-4	14	29	1-4	20	28
1-5	9	29	1-5	10	26	1-5	20	33
1-6	10	32	1-6	13	27	1-6	12	22
1-7	11	23	1-7	15	22	1-7	9	19
1-8	10	37	1-8	9	19	1-8	15	18
2-1	10	34	2-1	16	17	2-1	11	19
2-2	11	39	2-2	14	18	2-2	9	11
2-3	13	28	2-3	12	15	2-3	11	19
2-4	12	42	2-4	13	18	2-4	10	18
2-5	9	33	2-5	11	18	2-5	14	18
2-6	13	24	2-6	11	19	2-6	16	14
2-7	8	23	2-7	14	20	2-7	13	22
2-8	15	28	2-8	12	20	2-8	19	15
3-1	7	26	3-1	20	14	3-1	11	22
3-2	9	21	3-2	16	14	3-2	11	20
3-3	11	24	3-3	15	13	3-3	14	20
3-4	10	19	3-4	14	15	3-4	14	16
3-5	10	26	3-5	17	21	3-5	13	23
3-6	8	29	3-6	11	13	3-6	11	26
3-7	11	24	3-7	13	16	3-7	11	26
3-8	8	20	3-8	12	13	3-8	13	20
Summe	240	687	Summe	314	435	Summe	321	497
Mittelwert	10	28,625	Mittelwert	13,0833333	18,125	Mittelwert	13,375	20,7083333

Tab. 7.2: Auszählungsergebnis von drei pTV:MYBTri5/180-Pflanzen (s. 3.3.2)

pTV:MYBTri5/180 Pflanze 1	lange Trichome	kurze Trichome	pTV:MYBTri5/180 Pflanze 2	lange Trichome	kurze Trichome	pTV:MYBTri5/180 Pflanze 3	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	5	34	1-1	5	34	1-1	5	19
1-2	2	23	1-2	2	25	1-2	2	16
1-3	4	32	1-3	4	33	1-3	4	23
1-4	3	19	1-4	4	19	1-4	4	26
1-5	4	21	1-5	3	19	1-5	3	32
1-6	2	18	1-6	2	20	1-6	4	28
1-7	2	15	1-7	3	15	1-7	3	18
1-8	2	16	1-8	3	16	1-8	3	21
2-1	4	14	2-1	4	14	2-1	2	17
2-2	4	14	2-2	5	11	2-2	1	14
2-3	1	19	2-3	3	18	2-3	3	22
2-4	1	15	2-4	3	13	2-4	2	21
2-5	5	19	2-5	5	19	2-5	4	21
2-6	2	16	2-6	2	17	2-6	3	19
2-7	3	21	2-7	5	18	2-7	3	22
2-8	1	13	2-8	1	13	2-8	2	16
3-1	4	19	3-1	4	19	3-1	0	21
3-2	3	13	3-2	2	14	3-2	2	21
3-3	3	15	3-3	3	13	3-3	2	21
3-4	1	15	3-4	1	17	3-4	0	15
3-5	6	18	3-5	4	16	3-5	5	13
3-6	2	16	3-6	5	15	3-6	4	13
3-7	2	15	3-7	5	19	3-7	5	17
3-8	1	15	3-8	3	15	3-8	4	16
Summe	67	435	Summe	81	432	Summe	70	472
Mittelwert	2,79166667	18,125	Mittelwert	3,375	18	Mittelwert	2,91666667	19,6666667

Tab. 7.3: Auszählungsergebnis von drei pTV:MYBTri5/600-Pflanzen (s. 3.3.2)

pTV:MYBTri5/600 Pflanze 1	lange Trichome	kurze Trichome	pTV:MYBTri5/600 Pflanze 2	lange Trichome	kurze Trichome	pTV:MYBTri5/600 Pflanze 3	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	6	26	1-1	7	19	1-1	3	25
1-2	4	25	1-2	4	17	1-2	7	23
1-3	6	20	1-3	3	18	1-3	9	20
1-4	3	20	1-4	3	17	1-4	7	16
1-5	8	28	1-5	8	20	1-5	2	16
1-6	5	29	1-6	11	15	1-6	4	17
1-7	10	24	1-7	11	17	1-7	2	15
1-8	12	28	1-8	4	14	1-8	4	16
2-1	5	26	2-1	9	33	2-1	14	24
2-2	4	25	2-2	9	30	2-2	12	24
2-3	4	26	2-3	8	30	2-3	8	26
2-4	4	17	2-4	7	17	2-4	12	22
2-5	5	18	2-5	11	22	2-5	12	31
2-6	8	20	2-6	4	23	2-6	4	25
2-7	2	19	2-7	8	32	2-7	7	25
2-8	11	24	2-8	5	31	2-8	5	24
3-1	5	17	3-1	3	17	3-1	6	14
3-2	11	29	3-2	5	22	3-2	7	18
3-3	5	23	3-3	6	20	3-3	8	21
3-4	5	23	3-4	3	24	3-4	5	18
3-5	11	22	3-5	7	22	3-5	6	20
3-6	8	21	3-6	3	18	3-6	3	20
3-7	8	20	3-7	10	28	3-7	2	17
3-8	6	21	3-8	4	24	3-8	2	23
Summe	156	551	Summe	153	530	Summe	151	500
Mittelwert	6,5	22,9583333	Mittelwert	6,375	22,0833333	Mittelwert	6,29166667	20,8333333

Tab. 7.4: Auszählungsergebnis von drei Wildtyp-Pflanzen (3.6.2.3)

Wildtyp Pflanze 1	lange Trichome	kurze Trichome	Wildtyp Pflanze 2	lange Trichome	kurze Trichome	Wildtyp Pflanze 3	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	16	13	1-1	20	10	1-1	14	17
1-2	12	18	1-2	12	11	1-2	15	23
1-3	15	15	1-3	11	16	1-3	16	14
1-4	18	11	1-4	15	22	1-4	20	15
1-5	17	16	1-5	13	10	1-5	14	22
1-6	16	13	1-6	13	12	1-6	13	11
1-7	18	7	1-7	18	9	1-7	15	10
1-8	16	18	1-8	19	13	1-8	17	9
2-1	15	17	2-1	17	11	2-1	14	16
2-2	18	16	2-2	13	18	2-2	12	15
2-3	19	11	2-3	12	12	2-3	12	16
2-4	23	9	2-4	16	8	2-4	21	16
2-5	18	12	2-5	15	8	2-5	10	26
2-6	18	21	2-6	8	15	2-6	20	21
2-7	17	13	2-7	14	13	2-7	16	14
2-8	19	7	2-8	13	6	2-8	20	17
3-1	16	11	3-1	16	24	3-1	11	11
3-2	9	16	3-2	19	32	3-2	17	11
3-3	10	17	3-3	15	20	3-3	13	8
3-4	20	10	3-4	20	24	3-4	12	17
3-5	13	11	3-5	17	16	3-5	16	10
3-6	12	11	3-6	29	17	3-6	12	12
3-7	21	9	3-7	14	9	3-7	12	15
3-8	11	21	3-8	15	18	3-8	14	10
Summe	387	323	Summe	374	354	Summe	356	356
Mittelwert	16,125	13,4583333	Mittelwert	15,5833333	14,75	Mittelwert	14,8333333	14,8333333

Tab. 7.5: Auszählungsergebnis von drei RNAi-Pflanzen der Linie F4 (3.6.2.3)

F4-1	lange Trichome	kurze Trichome	F4-2	lange Trichome	kurze Trichome	F4-4	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	4	23	1-1	3	25	1-1	2	22
1-2	3	23	1-2	2	19	1-2	4	20
1-3	2	20	1-3	2	29	1-3	2	18
1-4	3	23	1-4	3	11	1-4	3	24
1-5	2	16	1-5	4	21	1-5	4	26
1-6	2	25	1-6	2	23	1-6	3	26
1-7	3	15	1-7	5	14	1-7	3	17
1-8	1	23	1-8	2	19	1-8	2	21
2-1	5	29	2-1	2	27	2-1	3	15
2-2	3	21	2-2	2	33	2-2	4	23
2-3	5	24	2-3	1	30	2-3	4	20
2-4	0	24	2-4	8	25	2-4	1	18
2-5	4	16	2-5	2	21	2-5	2	18
2-6	5	26	2-6	2	26	2-6	4	19
2-7	2	18	2-7	2	30	2-7	4	16
2-8	3	23	2-8	4	24	2-8	1	20
3-1	2	26	3-1	2	28	3-1	1	21
3-2	1	36	3-2	4	27	3-2	4	22
3-3	4	31	3-3	3	25	3-3	2	19
3-4	2	38	3-4	1	20	3-4	2	23
3-5	3	27	3-5	5	25	3-5	4	20
3-6	3	27	3-6	2	21	3-6	2	23
3-7	3	18	3-7	5	26	3-7	2	22
3-8	4	17	3-8	1	28	3-8	1	25
Summe	69	569	Summe	69	577	Summe	64	498
Mittelwert	2,875	23,7083333	Mittelwert	2,875	24,0416667	Mittelwert	2,6666667	20,75

Tab. 7.6: Auszählungsergebnis von drei RNAi-Pflanzen der Linie I7 (3.6.2.3)

I7-3	lange Trichome	kurze Trichome	I7-5	lange Trichome	kurze Trichome	I7-10	lange Trichome	kurze Trichome
1-1	4	21	1-1	3	19	1-1	6	15
1-2	8	17	1-2	3	19	1-2	3	12
1-3	5	28	1-3	3	23	1-3	3	13
1-4	2	24	1-4	3	19	1-4	6	17
1-5	4	28	1-5	5	14	1-5	5	6
1-6	4	22	1-6	4	15	1-6	4	16
1-7	6	27	1-7	4	14	1-7	7	15
1-8	6	26	1-8	5	24	1-8	7	11
2-1	7	22	2-1	3	26	2-1	4	17
2-2	4	18	2-2	2	16	2-2	4	15
2-3	6	24	2-3	5	19	2-3	3	14
2-4	4	21	2-4	5	19	2-4	4	13
2-5	5	27	2-5	3	16	2-5	2	18
2-6	3	20	2-6	2	13	2-6	4	13
2-7	4	24	2-7	5	14	2-7	3	13
2-8	4	27	2-8	3	17	2-8	4	13
3-1	5	17	3-1	3	16	3-1	1	12
3-2	4	22	3-2	5	21	3-2	3	14
3-3	4	19	3-3	5	16	3-3	1	17
3-4	3	19	3-4	4	18	3-4	1	13
3-5	3	20	3-5	4	16	3-5	3	12
3-6	2	21	3-6	5	18	3-6	2	15
3-7	4	18	3-7	4	18	3-7	3	14
3-8	3	15	3-8	3	20	3-8	2	14
Summe	104	527	Summe	91	430	Summe	85	332
Mittelwert	4,3333333	21,9583333	Mittelwert	3,7916667	17,9166667	Mittelwert	3,5416667	13,8333333

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. T.M. Kutchan für die Überlassung dieses interessanten Themas. Sie hat mir als „Wald- und Wiesenbiologin“ die Chance gegeben mich in einem völlig anderen Bereich der Biologie an einem so gut ausgestatteten Institut weiterzubilden.

Herrn Dr. J. Page danke ich für die Einführung in die Grundlagen der molekularbiologischen Techniken, und v.a. in der Anfangszeit für seine Geduld, wenn die RNA wieder einmal auf wundersame Weise verschwunden war oder so ähnlich klingende Substanzen wie Agar und Agarose vertauscht wurden.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. K. Springob für das sorgfältige und kritische Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und für die fachlichen Diskussionen beim Zusammenschreiben. Ohne ihr ehrliches Interesse am Thema meiner Arbeit und ihre Aufmunterung hätte ich diese vielleicht nicht zu Ende geschrieben. Außerdem hatten wir privat und im Labor eine lustige Zeit.

Bei Herrn Dr. K. Adler (IPK, Gatersleben) und Herrn Syrowatka (Martin-Luther-Universität, FA Physik, Halle) bedanke ich mich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, bei CSIRO Plant Industry für die Überlassung der pKANNIBAL- und pART27-Vektoren, bei der Large-Scale Biology Corporation für den Tabak-Mosaik-Virus und beim Sainsbury Laboratory für den Tobacco Rattle Virus.

Besonders möchte ich Frau V. Dietl danken, die mir die Grundlagen der Laborarbeit (trotz Wurstfinger) erfolgreich beigebracht hat. Vor allem aber hatte sie immer ein offenes Ohr, wenn ich mal wieder jemanden zum Reden brauchte und wurde mit der Zeit zu einer Freundin, auf die man sich verlassen kann.

Danken möchte ich auch Frau Dr. S. Frick, Frau B. Ortel und Frau S. Wegener, die mir das Anfertigen von Northern- und Southern Blots erklärt haben.

Gemeinsam mit Frau Dr. M. Weid habe ich so manchen Frust, den die wissenschaftliche Arbeit so mit sich bringt, überstanden. Trotz ihrer hohen Belastung durch Familie und Beruf hatte sie dennoch Zeit zum Zuhören.

Bei Frau H. Alpermann fand ich für viele meiner Probleme besonderes Verständnis, da wir im selben Boot saßen und uns über so manche Dinge gemeinsam wundern konnten.

A. Flier und T. Grothe haben mir den Einstieg in Halle sowohl im Labor als auch privat ziemlich erleichtert.

Frau J. Nagel war v.a. am Ende meiner Laborarbeit stets offen für fachliche Diskussionen.

Bei Frau A. Kohlberg möchte ich mich für die Fotos in meiner Arbeit bedanken.

Den Gärtnern des Instituts danke ich für das Versorgen meiner Pflanzen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen langjährigen Augsburger Freundinnen S. Egger und S. Geiger, die immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Außerdem hat mir die Zusammenarbeit mit den Kollegen aus unterschiedlichsten Kulturen besondere Freude bereitet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ursula Schäfer
geboren am 13.4.1971 in Augsburg
ledig

Ausbildung

1977 - 1981 Grundschole an der Neuschwansteinstraße,
Augsburg

1981 - 1990 Allgemeine Hochschulreife
Maria-Ward-Gymnasium, Augsburg

1991 - 1993 Ausbildung zur Tierheilpraktikerin
Deutsche Paracelsusschule für Naturheilverfahren,
München

1993 - 1999 Studium der Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität, München
Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Berufstätigkeit

1999 - 2000 Rezeptionistin
Physioteam Hochzoll, Augsburg

2000 - 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin
Promotion bei Prof. Dr. T. M. Kutchan
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Abt. Naturstoffbiotechnologie, Halle (Saale)

Halle an der Saale, den 23. März 2005

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle an der Saale, den 23. März 2005