

Technische Universität München

Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

Charakterisierung von *GNC* und *GNL/CGA1* als
Zielgene der Gibberellinantwort in *Arabidopsis*
thaliana.

René Richter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

2. Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

3. apl. Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz

Die Dissertation wurde am 06.03.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.06.2013
angenommen.

Danksagung

In erster Linie möchte ich diese Danksagung meiner geliebten Frau Alejandra und meinen beiden Kindern Sofia Citlali und Isabela Malinalli widmen, da sie mir viel Geduld und Zeit zukommen haben lassen, was mir die Möglichkeit gab, nicht nur das Beste für meine Dissertationsarbeit zu geben, sondern auch den sich einstellenden Erfolg mit der Verleihung des Dr.Heinrich-Baur-Förderpreises dadurch ermöglichen. Daher möchte ich auch diesen Preis mit dieser Danksagung mit meiner Familie teilen und werde ihnen dafür zu tiefst verbunden sein.

An zweiter Stelle möchte ich hier Jutta Elgner für die tatkräftige Unterstützung meiner Experimente danken. Sie erbrachte große Opfer in der Umsetzung meiner Wünsche, denn wie wir wissen, habe ich immer im großen Stil geplant und es gab nie eine Situation, in der sie dies nicht hätte mit höchster Genauigkeit realisieren können. Deshalb möchte auch ich Dir, liebe Jutta, mit diesen Worten die höchste Anerkennung schenken.

Weiterhin möchte ich Carina Behringer für ihre Hingabe zu meinen Projekten danken, da ich mit ihrer Hilfe meine Publikationen erst vervollständigen konnte.

Diesen Dank möchte ich ebenso den anderen Labormitgliedern aussprechen, da auch sie auf ihre Art und Weise mir den Arbeitsalltag angenehmer gestalteten.

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungen	VI
Tabellen	IX
Abkürzungen	X
1. Einleitung	1
1.1. Gibberelline	1
1.2. Der GA-Signalweg	4
1.2.1. Die DELLA-Repressorproteine	4
1.2.2. Der GA-Rezeptor GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1)	5
1.2.3. Der E3 Ubiquitinligase Komplex SCF ^{SLY1/SNZ/GID2}	7
1.2.4. Homöostaseregulation des GA-Signalwegs	8
1.2.5. SPINDLY (SPY) ist eine O-GlcNAc-Transferase und die <i>spy</i> Mutante zeigt einen konstitutiv aktivierten GA-Signalweg	9
1.2.6. Die DELLA-Repressorproteine interagieren mit den PIFs	11
1.3. Der Auxinsignalweg	12
1.3.1. Die Auxin-labilen Aux/IAAs sind Repressoren der Auxinantwort ...	12
1.3.2. Die ARF-Typ Transkriptionsfaktoren vermitteln die Auxinantwort ..	16
1.4. Zielsetzung meiner Dissertation	18
2. Zusammenfassung / Summary	21
2.1. Zusammenfassung	21
2.2. Summary	22

3. Ergebnisse	24
3.1. <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind Repressoren des GA-Signalwegs und primäre Zielgene der PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS	24
3.1.1. Identifizierung von der GA-Antwort nachgeschalteten Zielgenen	24
3.1.2. Analyse der T-DNA Insertionsmutanten	25
3.1.3. Verifizierung des Mikroarrayexperimentes für die GA-abhängige Regulation von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	27
3.1.4. <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind Repressoren der Keimung	29
3.1.5. Die <i>gnc</i> und <i>gnl</i> Mutanten zeigen eine veränderte Chlorophyllakkumulation	32
3.1.6. Genetische Suppression von <i>ga1</i> durch <i>gnc</i> und <i>gnl</i>	34
3.1.7. Phänokopie der GA-Defizienz durch Überexpression von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	35
3.1.8. <i>Feedback</i> -Regulation bekannter Komponenten des GA-Signaltransduktionsweges	38
3.1.9. <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind direkte Zielgene von PIF3	39
3.2. Der Auxin- und der GA-Signalweg konvergieren an der Regulation von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	43
3.2.1. Genetische Suppression der <i>arf2</i> Mutante durch <i>gnc gnl</i>	43
3.2.2. ARF2 und ARF7 sind Regulatoren von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	46
3.2.3. GA und <i>SPY</i> interagieren genetisch mit <i>ARF2</i>	53
3.2.4. ARF2 vermittelt eine GA-abhängige Repression der beiden GATAs <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	57
4. Diskussion	62
4.1. <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind Repressoren des GA-Signalwegs und primäre Zielgene der PIFs	63
4.2. Der Auxin- und GA-Signalweg konvergiert über die Regulation von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	68

5. Material und Methoden	77
5.1. Material	77
5.1.1. Bakterienstämme	77
5.1.2. Pflanzenmaterial	77
5.1.3. Antikörper	79
5.1.4. Marker	80
5.1.5. Enzyme	80
5.1.6. Vektoren	81
5.1.7. Kits	81
5.1.8. Chemikalien	81
5.1.9. Antibiotika	83
5.2. Methoden	84
5.2.1. Pflanzenarbeiten	84
5.2.1.1. Oberflächensterilisation der Samen und Wachstums- bedingungen	84
5.2.1.2. Genetische Kreuzungen	84
5.2.1.3. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
5.2.1.4. Selektion transgener Pflanzen	85
5.2.2. Physiologische Assays	86
5.2.2.1. Keimungsassay	86
5.2.2.2. Hypokotylelongationsassay	86
5.2.3. Histochemische Analyse	86
5.2.3.1. GUS-Färbung	86
5.2.4. Molekularbiologische Methoden	87
5.2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
5.2.4.2. Plasmid-DNA Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	87
5.2.4.3. PCR-Analyse	88
5.2.4.4. Promotor-GUS Klonierung	90
5.2.4.5. Gateway-Klonierung	91
5.2.5. Biochemische Arbeiten	91
5.2.5.1. Proteinextraktion	91
5.2.5.2. (Ko-) Immunpräzipitation	92

5.2.5.3. SDS-PAGE, Western-Blot und Western-Analyse	92
5.2.5.4. Coomassie-Färbung	93
5.2.5.5. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	94
5.2.5.5.1. <i>Crosslinking</i>	94
5.2.5.5.2. Kernisolierung	94
5.2.5.5.3. Chromatinpräparation	95
5.2.5.5.4. Quantifizierung der DNA	96
5.2.5.5.5. Immunpräzipitation von Protein-DNA Komplexen	96
5.2.5.5.6. Aufreinigung der DNA	97
5.2.5.6. RNA-Extraktion	98
5.2.5.6.1. RNA-Extraktion aus Keimlingen	98
5.2.5.6.2. RNA-Extraktion aus Samen	98
5.2.5.6.3. Verdau genomischer DNA	100
5.2.5.6.4. Reverse Transkription von RNA	100
6. Literaturverzeichnis	101
7. Publikationen	120
7.1. Erstautorenschaft	120
7.2. Koautorenschaft	120
8. Anhang	121
8.1. Anhang A: Oligonukleotide	121
8.2. Anhang B: Mutantenanalyse	131
9. Lebenslauf	140

Abbildungen

Abbildung 1: GA-Metabolismus der Landpflanzen.	1
Abbildung 2: Repräsentative Übersicht der Domänenstruktur der Familie der DELLA-Repressorproteine.	5
Abbildung 3: Der GA-GID1-DELLA-Komplex.	6
Abbildung 4: Der GA-Signalweg besitzt eine transkriptionelle <i>feedback</i> -Regulation	9
Abbildung 5: Post-translationale Mechanismen regulieren die Homöostase der GA-Signalwegkomponenten.	11
Abbildung 6: Die DELLA-Repressorproteine inaktivieren die PIFs durch die Ausbildung von DELLA-PIF-Heterodimeren.	12
Abbildung 7: Homo- und heterotypische Interaktionen zwischen den ARFs und den Aux/IAAs.	14
Abbildung 8: Der Kenntnisstand über den GA-Signalweg zu Beginn meiner Dissertationsarbeit.	20
Abbildung 9: Die beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind Homologe zueinander.	26
Abbildung 10: Die <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription ist durch GA reprimiert und setzt DELLA-Repressorproteindegradation voraus.	28
Abbildung 11: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> reprimieren die Keimung.	31
Abbildung 12: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> regulieren den Chlorophyll-metabolismus.	33
Abbildung 13: Die <i>gnc</i> und <i>gnl</i> Mutationen supprimieren den <i>ga1</i> Phänotyp.	35
Abbildung 14: <i>GNC</i> - und <i>GNL/CGA1</i> -Überexpressionslinien sind PAC-hypersensitiv, besitzen einen erhöhten Chlorophyllgehalt und blühen spät.	37
Abbildung 15: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> regulieren ihre eigene Transkription und die Homöostase der GA-Signalwegkomponenten.	39

Abbildung 16: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind direkte Zielgene der PIF Transkriptionsfaktoren.	41
Abbildung 17: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> sind der GA-, der DELLA- und PIF- Antwort nachgeschaltet.	42
Abbildung 18: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> interagieren genetisch mit <i>ARF2</i>	44
Abbildung 19: Weitere physiologische Analysen zur genetischen Interaktion zwischen <i>ARF2</i> und <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	45
Abbildung 20: Die Samengröße in den komplexen GA-Rezeptormutanten korreliert mit der Expression von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	46
Abbildung 21: <i>ARF2</i> reguliert die Transkription von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i>	47
Abbildung 22: <i>ARF2:GFP</i> bindet an die AuxRE der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Promotoren.	49
Abbildung 23: <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> interagieren genetisch mit <i>SLR</i> und <i>ARF7</i>	50
Abbildung 24: <i>ARF7:MYC</i> bindet an die AuxRE der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Promotoren.	52
Abbildung 25: Der GA-Signalweg ist in der <i>arf2</i> Mutante nicht beeinträchtigt.	53
Abbildung 26: Intermediäre Expressionslevel von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> in PIF1-TAP <i>arf2</i>	54
Abbildung 27: Eine Aktivierung des GA-Signalwegs führt zur Suppression des <i>arf2</i> Mutantenphänotyps.	55
Abbildung 28: Auxinmutanten zeigen einen verspäteten Blühzeitpunkt. ...	56
Abbildung 29: GA führt zu einer erhöhten <i>ARF2</i> Proteinabundanz.	58
Abbildung 30: GA beeinflusst nicht die <i>ARF7</i> Proteinabundanz.	60
Abbildung 31: Modell der GA- und Auxin-vermittelten Modulation der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription.	61
Abbildung 32: Modell der GA- und BR-vermittelten Modulation der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription.	67
Abbildung 33: Modell der Auxin-, GA- und BR-vermittelten Modulation der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription (1).	69

Abbildung 34: Modell der Auxin-, GA- und BR-vermittelten Modulation der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription (2).	73
Abbildung 35: Modell für die Konvergenz des GA-, Auxin-, BR-, CK- und Lichtsignalweges für die Regulation der <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> Transkription.	76
Abbildung B1: Zusammenfassung der untersuchten Mutanten für die Parameter Keimung und Hypokotylelongation, die im Microarray-Experiment als GA-reguliert identifiziert worden waren.	131
Abbildung B2: Gegenseitige Regulation von <i>GNC</i> und <i>GNL/CGA1</i> durch Bindung von GNC:GFP und YFP:GNL innerhalb ihrer Promotoren	139

Tabellen

Tabelle 1:	Übersicht GA-regulierter Prozesse in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
Tabelle 2:	Übersicht über <i>aux/iaa</i> Mutanten und Phänotypen.	14
Tabelle 3:	Übersicht über <i>arf</i> Mutanten und deren Phänotypen.	17
Tabelle 4:	Liste der in dieser Dissertationsarbeit verwendeten T-DNA Insertionslinien und transgenen Pflanzen.	77
Tabelle 5:	Liste von Primern für die PCR-basierende Genotypisierung der untersuchten Mutanten.	78
Tabelle 6:	Antikörper und <i>Beads</i>	79
Tabelle 7:	Marker.	80
Tabelle 8:	Enzyme.	80
Tabelle 9:	Vektoren.	81
Tabelle 10:	Kits.	81
Tabelle 11:	Chemikalien.	81
Tabelle A1:	Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR-basierende Genotypisierung der untersuchten Mutanten.	121
Tabelle A2:	Sequenzen der verwendeten Primer für die Klonierung der Promotor-GUS-Konstrukte.	124
Tabelle A3:	Sequenzen der verwendeten Primer für Gateway-basierende Klonierungen der Überexpressionslinien.	125
Tabelle A4:	Sequenzen der verwendeten Primer für ein 2step-Protokoll für die quantitative <i>Real-time</i> PCR.	125
Tabelle A5:	Sequenzen der verwendeten Primer für ein 3step-Protokoll für die ChIP-PCR.	127
Tabelle A6:	Liste der untersuchten T-DNA Insertionslinien.	129

ARF2	AUXIN RESPONSE FACTOR2
ARF7/NPH4	AUXIN RESPONSE FACTOR7/ NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4
ARF19	AUXIN RESPONSE FACTOR19
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
AuxRE	Auxinresponsives Element
BES1	BRI1-EMS-SUPPRESSOR1
BIN2	BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2
BR	Brassinosteroid
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1
BZR1	BRASSINAZOLE-RESISTANT1
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHX	Cycloheximid
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1
CPS/GA1	<i>ent</i> -Copolyldiphosphatsynthase/GA REQUIRING1
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DELLA	D, Asparaginsäure; E, Glutaminsäure; L, Leucin; L, Leucin; A, Alanin
EL1	EARLIER FLOWERING1
GA	Gibberellin
GAI	GA INSENSITIVE
GFP	Grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
GID1	GA INSENSITIVE DWARF1
GNC	GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON- METABOLISM INVOLVED
GNL/CGA1	GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1
GRAS	GAI, RGA, SCR
GSK3	GLYKOGENSYNTHASE-KINASE 3

H3K9ac	Acetylierte Form des Lysin 9 am Histone 3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure
HSL	Hormonsensitive Lipase
KS	<i>ent</i> -Kaurensynthase
LExLE	L, Leucin; E, Glutaminsäure; X = Aminosäure; L, Leucin; E, Glutaminsäure
MNT	MEGAINTEGUMENTA
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MSG2	MASSUGU2
ORE14	ORESARA14
PAC	Paclobutrazol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHYB	PHYTOCHROME B
PIC	Proteaseinhibitor Cocktail
PIF/PIL	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR/ PIF3- LIKE
<i>pifQ</i>	<i>pif1 pif3 pif4 pif5</i> Mutante
PIN	PIN-FORMED
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfon-säure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POR	PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASE
PSY	PHYTOENSYNTHASE
RGA/RGL	REPRESSOR of <i>ga1-3</i> / RGA-LIKE
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SCF	E3 Ubiquitinligase
SLR	SOLITARY ROOT
SLR1	SLENDER RICE1
SLY1	SLEEPY1
SNZ	SNEEZY

SPY	SPINDLY
SRL2	SHORT UNDER RED LIGHT2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPS	Terpensynthase
VHYNP	V, Valin; H, Histidin; Y, Tyrosin; N, Asparagin; P, Prolin
X-GlcA	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronsäure
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

1. Einleitung

1.1. Gibberelline

Gibberelline (GA) gehören zu der Klasse der Diterpenoide, deren Grundgerüst das ent-Gibberellan ist. Ihre Entdeckung geht auf den Pilz *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*) zurück, der für die "Bakanae"-Krankheit bei Reispflanzen verantwortlich ist (Hori, 1898). Der Pilz setzt GA frei, wodurch ein übermäßiges Streckungswachstum bei der Wirtspflanze erzielt wird. Als Folge davon fällt die Reispflanze unter ihrem eigenen Gewicht um. Darüber hinaus tritt Sterilität als weiteres Symptom auf (Kurosawa, 1926; Yabuta, 1935). GA findet man auch als natürlich vorkommendes Pflanzenhormon in Landpflanzen und es ermöglicht den Pflanzen die Steuerung der Keimung, des Streckungswachstums und des Blühzeitpunkts (Radley, 1956; Brian, 1958; Yasumura et al., 2007). Bis *dato* konnten 136 verschiedene GAs identifiziert werden, von denen jedoch nur GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇ eine eindeutige biologische Aktivität besitzen (Eriksson et al., 2006; Yamaguchi, 2008).

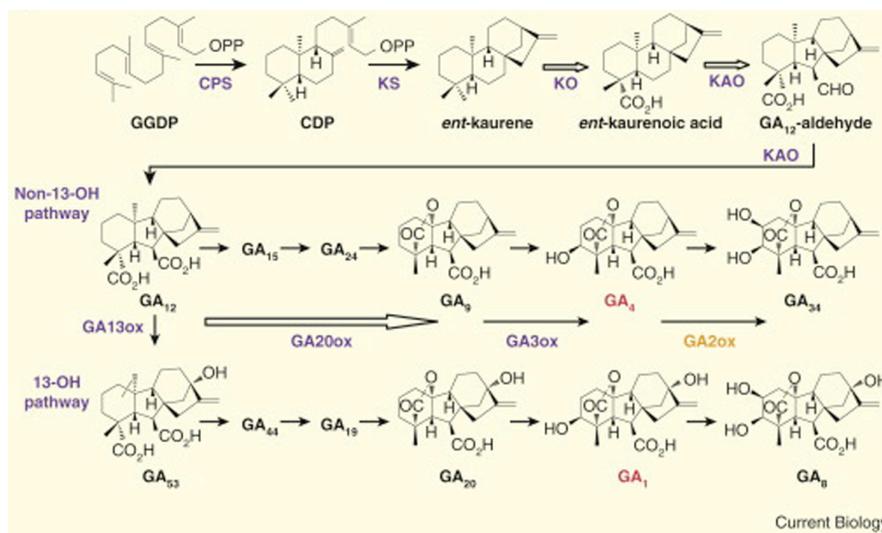


Abbildung 1: GA-Metabolismus der Landpflanzen. Die GA-Biosynthese beginnt mit GGDP und geht über die *ent*-Kaurene bis hin zu GA₁₂, das durch die Aktivität der GA20-Oxidasen und GA3-Oxidasen in die bioaktiven GAs GA₄ und GA₁ umgewandelt wird. Die Deaktivierung der bioaktiven GAs erfolgt über deren 2β-Hydroxylierung durch die GA2-Oxidasen. Aus Sun T.P. (2011).

Die Biosynthese der GAs beginnt mit dem Diterpen Geranylgeranyldiphosphat (GGDP) in den Plastiden. Eine Konversion des GGDP in das tetrazyklische Hydrogencarbonintermediat *ent*-Kauren findet in zwei aufeinanderfolgenden Schritten statt (Abbildung 1). Hierfür werden die enzymatischen Aktivitäten der Terpensynthase (TPS), der *ent*-Copolydiphosphatsynthase/GA-REQUIRING1 (CPS/GA1) und der *ent*-Kaurensynthase (KS) benötigt (Sun and Kamiya, 1994; Yamaguchi et al., 1998a). Anschließend wird das *ent*-Kauren über mehrere Stufen bis hin zum GA₁₂ oxidiert. Darauf folgen weitere Oxidationen, einmal am C-20 und dann am C-3 des Lactonrings mittels der GA20- und GA3-Oxidasen, durch die die bioaktiven GA₁, GA₃ und GA₄ gebildet werden (Chiang et al., 1995; Xu et al., 1995; Coles et al., 1999).

Mithilfe von chemischen Wachstumshemmern und auch durch Mutantanalysen konnten zahlreiche GA-kontrollierte entwicklungsabhängige und physiologische Prozesse in Reis, Gerste, Weizen, Erbse, Trauben, Tomaten und vor allem der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) entdeckt werden (Tabelle 1) (Lanahan and Ho, 1988; Sun et al., 1992; Peng et al., 1999b; Rademacher, 2000; Ikeda et al., 2001). Ein genaues Verständnis über diese GA-kontrollierten Prozesse könnte dabei helfen, dass im Rahmen der Pflanzenzüchtung die Ernteerträge weiter gesteigert werden können und die Umsetzung dessen mit molekularen Werkzeugen erreicht werden kann.

Tabelle 1: Übersicht GA-regulierter Prozesse in *Arabidopsis thaliana*.

GA-kontrollierte Prozesse	Referenz
Keimblattentwicklung während der Embryogenese	(Willige et al., 2011)
Keimung	(Debeaujon and Koornneef, 2000; Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008; Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009; Piskurewicz et al., 2009)

Ausbildung des Apikalhakens	(Alabadi et al., 2004; Gallego-Bartolome et al., 2011c; Willige et al., 2012)
(De-)Etiolierung	(Alabadi et al., 2004; Gallego-Bartolome et al., 2011a)
Elongation und Xylemexpansion des Hypokotyls	(Ragni et al., 2011; Chapman et al., 2012)
Tropismen	(Gallego-Bartolome et al., 2011b; Willige et al., 2011)
Chlorophyll- und Carotinoidakkumulation	(Richter et al., 2010; Cheminant et al., 2011)
Sproßelongation	(Silverstone et al., 1997; Dill and Sun, 2001; King et al., 2001)
Trichombildung	(Chien and Sussex, 1996; Gan et al., 2006; Gan et al., 2007)
Pollenreifung	(Cheng et al., 2004; Swain et al., 2004)
Blühinduktion	(Blazquez et al., 1998; Blazquez and Weigel, 2000; Porri et al., 2012)
Blütenbildung	(Achard et al., 2004; Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004; Griffiths et al., 2006; Hou et al., 2008)
Oxidativer Stress	(Achard et al., 2008a)
Kältestress	(Achard et al., 2008b)
Trockenstress	(Qin et al., 2011)
Phosphatmangel	(Jiang et al., 2007)
Pathogenabwehr	(Navarro et al., 2008; Hou et al., 2010)
Zellteilung	(Claeys et al., 2012)

1.2. Der GA-Signalweg

1.2.1. Die DELLA-Repressorproteine

Die DELLA-Repressorproteine sind transkriptionelle Regulatoren deren Aufgabe es ist, den GA-Signalweg zu reprimieren. Die Entdeckung der DELLAs geht auf die Identifizierung der Arabidopsismutanten *ga insensitive* (*gai*) und *repressor of ga1-3* (*rga*) zurück (Koornneef et al., 1985; Peng and Harberd, 1993; Silverstone et al., 1997). Die Klonierungen der beiden DELLA Gene *GAI* und *RGA* erlaubte ihre Positionierung in der Superfamilie der GRAS (*GAI*, *RGA*, *SCR*)-Typ Transkriptionsfaktoren (Silverstone et al., 1998; Pysh et al., 1999). Charakterisiert sind diese Transkriptionsregulatoren einerseits durch die C-terminale GRAS-Domäne und andererseits durch ihre N-terminale DELLA/VHYNP-Domäne (Abbildung 2) (Dill et al., 2001; Dill and Sun, 2001). Die GRAS-Domäne verleiht den DELLA-Repressorproteinen eine transkriptionelle regulatorische Funktion (Gallagher and Benfey, 2009). Die DELLA/VHYNP Domäne bestimmt die GA-abhängige Proteinstabilität der DELLAs (Dill et al., 2001; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass eine intakte GRAS-Domäne die akkurate Lokalisierung der GRAS Proteine im Nukleus gewährleistet (Gallagher and Benfey, 2009). Durch *in silico* Analysen konnten weitere Mitglieder aus der Subfamilie der DELLAs identifiziert werden, e.g. *RGA-LIKE1* (*RGL1*) (Wen and Chang, 2002), *RGL2* (Lee et al., 2002) und *RGL3* (Achard et al., 2008b; Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009). Analysen rezessiv als auch dominant vererbeter DELLA-Allele zeigten, dass *RGA*, *GAI* und insbesondere *RGL2* die Keimung reprimieren (Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008; Piskurewicz et al., 2009; Lee et al., 2012), wohingegen *RGA* und *GAI* die Hauptrepressoren der Sprosselongation sind (Silverstone et al., 1997; Dill et al., 2001). An der Blütenbildung sind hauptsächlich *RGA*, *RGL1* und *RGL2* beteiligt (Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die genetische Redundanz der 5 *Arabidopsis* DELLAs den Grad der Plastizität des GA Signalweges bedingt, da die DELLAs sich gegenseitig funktionell substituieren können. Weiterhin konnte eine funktionelle Konservierung und eine funktionelle Diversifizierung durch

Änderungen im Expressionsverhalten der einzelnen DELLAs nachgewiesen werden (Gallego-Bartolome et al., 2010).

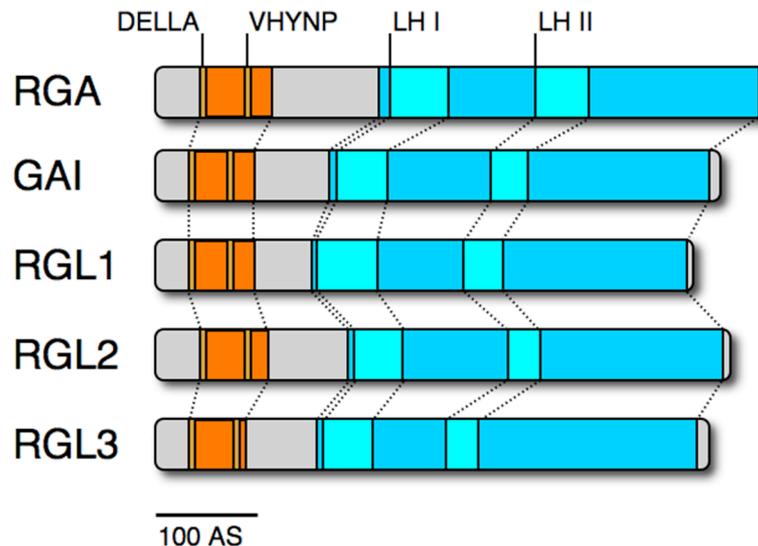


Abbildung 2: Repräsentative Übersicht der Domänenstruktur der Familie der DELLA-Repressorproteine. Orange, DELLA-Domäne; braun, DELLA und VHYNP Motiv innerhalb der DELLA-Domäne; blau, GRAS-Domäne; türkis, Leucin-Heptat-Repeat I (LH I) und LH II innerhalb der GRAS-Domäne.

1.2.2. Der GA-Rezeptor GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1)

Der GA-Rezeptor *GA INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*) wurde im Reis identifiziert und durch *in silico* Analysen konnten in *Arabidopsis* in der Folge 3 Orthologe GA-Rezeptoren *GID1a-c* isoliert werden. Die postulierte funktionelle Analogie der *Arabidopsis* GA-Rezeptoren konnte sowohl auf molekularer als auch auf genetischer Ebene demonstriert werden (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Willige et al., 2007). Genetische Interaktionsstudien zwischen den Funktionsverlustmutanten der DELLAs und den GA-Rezeptoren in Reis und *Arabidopsis* verhalfen *GID1* nicht nur im GA-Signalweg zu positionieren, sondern zeigten auch, dass die DELLAs epistatisch zu *GID1* sind. Der GA-Rezeptor *GID1* enthält ein degeneriertes Konsensussequenzmotiv, das dem der hormonsensitiven

Lipasen (HSL) gleicht, welches an der Koordination des bioaktiven GAs im GA-Rezeptor beteiligt ist (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Shimada et al., 2008).

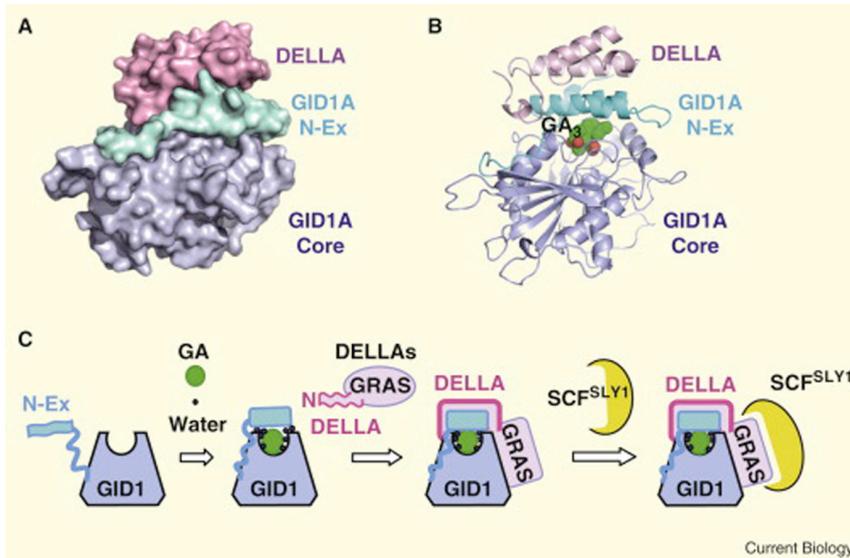


Abbildung 3: Der GA-GID1-DELLA Komplex. A-B, Kristallstruktur des Komplexes bestehend aus GA₃, GID1a und der N-terminalen Domäne des DELLA-Repressorproteins GAI. Repräsentatives Bild der molekulare Oberfläche (A) und als Richardson-Diagramm (B) des Komplexes. C, Ein Modell der GA-GID1-DELLA Interaktion und die darauffolgende Bindung des aktivierten Substrates durch den SCF^{SLY1} Komplex. Aus Sun, T.P. (2011).

Mechanistisch versteht man, dass der GA-Rezeptor GID1 das GA in einer Bindetasche über dessen N-terminale *helical switch* Region einschließt, was eine Konformationsänderung hervorruft (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Letztere ermöglicht die Interaktion des GA-Rezeptors GID1 mit den DELLA-Repressorproteinen über die DELLA, VHYNP und LExLE Motive der intrinsisch unstrukturierten DELLA-Domäne. Daher wird GA als ein positiv allosterischer Modulator angesehen (Abbildung 3) (Murase et al., 2008; Sun et al., 2010a). Eine Halbwertszeit für die Assoziation und Dissoziation des GAs mit dem Reis GA-Rezeptor GID1 in Abwesenheit der DELLA-Repressorproteine konnte in einem *in vitro* Assay mit 5 Minuten gemessen werden (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Dies deutet daraufhin, dass die

Interaktion mit einem der DELLA-Repressorproteine den GA-aktivierten GID1-Komplex stabilisiert (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Außerdem gibt es Unterschiede in den Bindungsaffinitäten zwischen den GA-Rezeptoren GID1a-c und den 5 *Arabidopsis* DELLA Proteinen (Suzuki et al., 2009). Die Komplexität in der phänotypischen Variation wird darüber hinaus durch die differenzielle Expressions der einzelnen GA-Rezeptoren und der DELLAs bestimmt (Suzuki et al., 2009).

1.2.3. Der E3 Ubiquitinligase Komplex SCF^{SLY1/SNZ/GID2}

Der erste Beweis für einen GA-induzierten und Proteasom-vermittelten Abbau der DELLA-Repressorproteine erfolgte durch eine beobachtete Stabilisierung des Gersteproteins SLN1 nach Verwendung von Proteasominhibitoren (Silverstone et al., 2001; Fu et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten mit den weiteren Entdeckung der beiden *Arabidopsis* F-Box Proteine *SLEEPY1* (*SLY1*) und *SNEEZY* (*SNZ*) und dessen Reis-Orthologen *GA INSENSITIVE DWARF2* (*GID2*) bekräftigt werden (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003). Die *sly1* und die *gid2* Mutanten waren die ersten Beispiele für Mutanten, die das volle Spektrum an GA-assoziierten, rezessiv vererbten Phänotypen widerspiegeln (Steber et al., 1998; Sasaki et al., 2003; Strader et al., 2004). F-Box Proteine konstituieren Untereinheiten der E3 Ubiquitin Ligase SCF (SKP1-CULLIN-F-BOX) Komplexe. Deren Aufgabe ist die Polyubiquitylierung der F-Box Protein-spezifischen Substrate für den 26S Proteasom-vermittelten Abbau (Vierstra, 2009). Interessanterweise besitzen die F-Box Proteine SLY1, SNZ und GID2 zwar die N-terminal gelegene F-Box Domäne, jedoch fehlt ihnen eine erkennbare Protein-Protein Interaktionsdomäne (Fu et al., 2004). Biochemische Analysen konnten darüber hinaus belegen, dass SLY1, SNZ und GID2 F-Box-Untereinheiten von SCF-Komplexen sind (Fu et al., 2004; Gomi et al., 2004). Es gibt viele Hinweise darauf, dass die DELLA-Repressorproteine Substrate der oben genannten F-Box Proteine darstellen. Erstens können in der *sly1* und *gid2* Mutante erhöhte Proteinmengen von RGA, GAI und SLR1 detektiert werden.

Zweitens führt eine GA-Behandlung zu keinem Abbau der genannten Repressoren (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003). Drittens kann eine Normalisierung des mutanten Phänotyps durch Einkreuzen der entsprechenden Funktionsverlustmutanten, e.g. *rga-24/gai-t6* in *sly1* und *slr1-1* in *gid2* erreicht werden (Sasaki et al., 2003; Dill et al., 2004). Letztlich erbrachten Hefe-2-Hybrid Untersuchungen sowie Split-YFP Analysen, *in-vitro pull-down* und Ko-Immunpräzipitations-Assays substantielle Beweise für eine GA-GID1-induzierte Interaktion zwischen der GRAS-Domäne der DELLAs und den F-Box Proteinen SLY1, SNZ und GID2 (Abbildung 3) (Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Hirano et al., 2010; Ariizumi et al., 2011).

1.2.4. Die Homöostaseregulation des GA-Signalwegs

Die Erhaltung eines funktionierenden GA-Signalweges erfordert das Vorhandensein eines Mechanismus, der nach dessen Aktivierung für die Wiederherstellung des Grundzustandes verantwortlich ist. Dies wird durch einen *feedback* Kontrollmechanismus erreicht, der sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell wirkt (Abbildung 4). Das Vorhandensein bioaktiver GAs ruft auf transkriptioneller Ebene die Rekrutierung der GA2-Oxidasen (GA2ox) hervor. Diese werden in zwei Klassen unterteilt, die C₁₉-GA2ox und die C₂₀-GA2ox. Genetische Analysen enthüllten, dass die Klasse der C₁₉-GA2ox, e.g. *GA2ox1-4* und *-6*, den Hauptweg der Inaktivierung von bioaktiven GA einnehmen (Rieu et al., 2008a). Zugleich wird die Transkription der GA-synthetisierenden und GA-aktivierenden Enzyme, e.g. *GA20-Oxidasen* (*GA20ox*) und *GA3-Oxidasen* (*GA3ox*), verstärkt eingestellt (Yamaguchi et al., 1998b; Rieu et al., 2008b). Folglich wird über die Inaktivierung der GAs die Stabilisierung der DELLA-Repressorproteine erreicht (Dill et al., 2001; Willige et al., 2007).

Die Expression der GA-Rezeptoren *GID1a-c* und des F-Box Proteins *SLY1* unterliegt ebenfalls der *feedback* Kontrolle, indem auch die Transkription dieser Gene in Antwort auf GA gemindert wird. Im Gegensatz dazu erfolgt eine verstärkte Transkription der DELLAs, e.g. von *RGA* und *GAI*,

wodurch der Pool an freien DELLA-Repressorproteinen wieder aufgefüllt werden kann (Iuchi et al., 2007; Willige et al., 2007; Zentella et al., 2007).

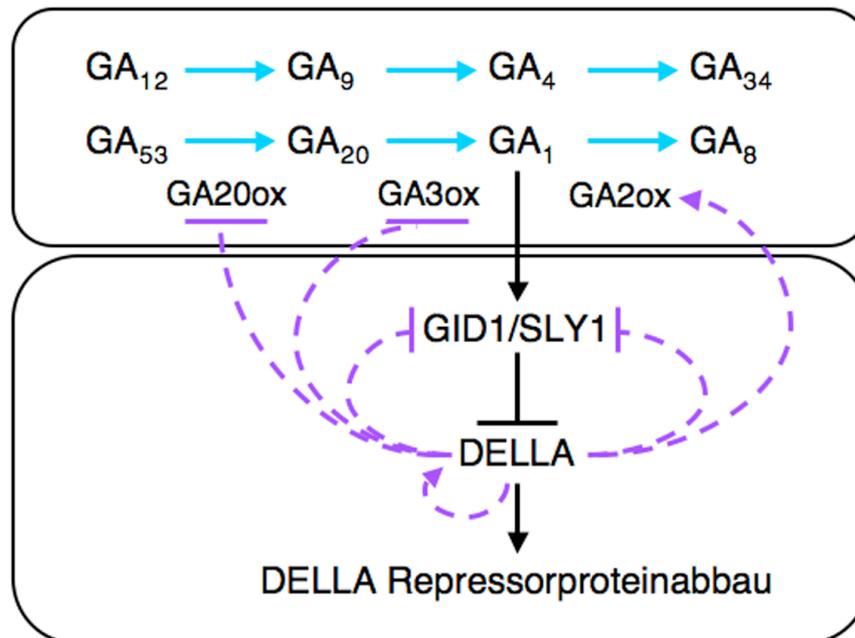


Abbildung 4: Der GA-Signalweg besitzt eine transkriptionelle *feedback-Regulation*. Das Vorhandensein von bioaktiven GAs führt zum proteasomalen Abbau der DELLA-Repressorproteine und infolgedessen wird die Transkription der *DELLAs* und der *GA2-Oxidasen* begünstigt. Hingegen wird die Transkription der *GA20-Oxidasen*, der *GA3-Oxidasen*, der GA-Rezeptoren *GID1a-c* und des F-Box Proteins *SLY1* gedrosselt. Pink, transkriptionelle Kontrolle; schwarze, direkte Kontrolle; blau, Biosynthese (Schwechheimer, 2008).

1.2.5. SPINDLY (SPY) ist eine O-GlcNAc-Transferase und die *spy* Mutante zeigt einen konstitutiv aktivierten GA-Signalweg

Wie von anderen zuvor gezeigt, konnten in der *spindly (spy)* Mutante stark erhöhte RGA Proteinmengen beobachtet werden (Silverstone et al., 2007). SPY ist eine N-Acetylglucosamin-Transferase (OGT) und interessanterweise zeigt die *spy* Mutante eine konstitutive Aktivierung des GA-Signalwegs, worauf man auf eine Änderung in der *feedback* Kontrolle des GA-Signalwegs

schloß (Jacobsen et al., 1996; Steiner et al., 2012). Die GA-Biosynthesemutante *ga1* ist durch ihre Unfähigkeit zu Keimen und in Kurztagbedingungen zu Blühen gekennzeichnet, was bedeutet, dass diese physiologischen Prozesse das GA absolut erfordern (Sun et al., 1992; Moon et al., 2003). Auf eindrucksvolle Weise konnte eine genetische Interaktion zwischen der *ga1* Mutante und der *spy* Mutante beobachtet werden, da die zuvor erwähnten physiologischen Prozesse in der *ga1 spy* Doppelmutante wieder vollständig/partiell normalisiert werden konnten (Abbildung 5) (Jacobsen and Olszewski, 1993; Wilson and Somerville, 1995; Swain et al., 2001). Deshalb hypothetisierte man, dass womöglich die DELLA-Repressorproteine Substrate dieser SPY-vermittelten O-GlcNAc-Modifikation sind und dass das Fehlen dieser O-GlcNAc-Modifikation an den DELLA Proteinen zum Verlust ihrer Repressorfunktion führen würde (Swain et al., 2001; Silverstone et al., 2007). Wie von anderen zuvor gezeigt, konnten weitere Modifikationen unbekannter Natur am RGA Repressorprotein in der *spy* Mutante beobachtet werden, was bedeutete, dass diese beobachteten Modifikationen keine O-GlcNAc-Modifikation sein konnten und es sich hierbei möglicherweise um Phosphorylierungen handeln könnten (Silverstone et al., 2007). Aus anderen Studien über GlcNAc-Transferasen weiss man, dass die GlcNAc-Transferasen dieselben Aminosäurereste an Proteinen GlcNAc-modifizieren, an denen auch Phosphorylierungen auftreten (Butkinaree et al., 2010; Olszewski et al., 2010). Interessanterweise konnten bisher nur Studien am Reis DELLA-Repressorprotein SLENDER RICE1 (SLR1) Phosphorylierungen belegen, die sowohl zu einer Änderung in der Stabilität des SLR1 Proteins führen, als auch die Aktivität des SLR1 Proteins regulierten (Dai and Xue, 2010).

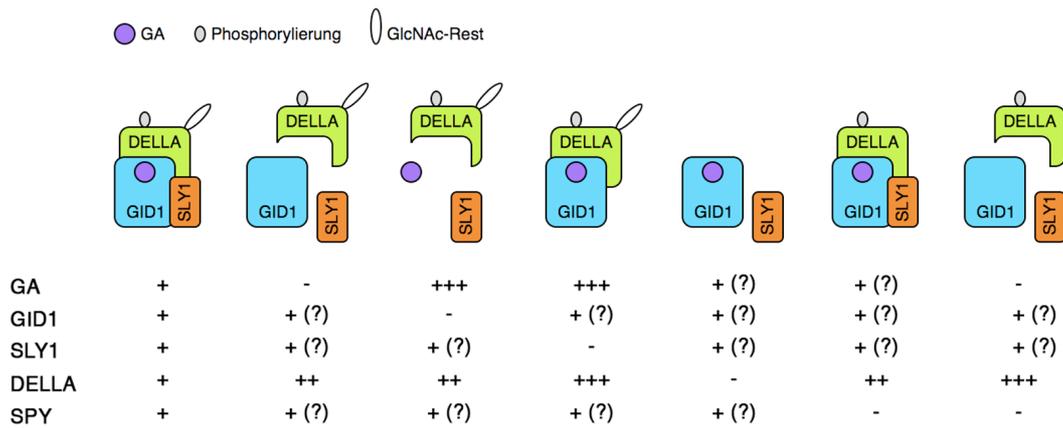


Abbildung 5: Post-translationale Mechanismen regulieren die Homöostase der GA-Signalwegkomponenten. Schematische Übersicht über die Mutanten des GA-Signalwegs. Oberes Panel zeigt den molekularen Mechanismus der GA-Mutanten. Unteres Panel illustriert die GA-, GID1-, SLY-, DELLA- und SPY-Level. Pink-farbener Kreis, GA; grauer Kreis, Phosphorylierung; weißer ovaler Kreis, GlcNAc-Reste. Modifiziert nach Schwechheimer, C. und Willige, B.C. (2009).

1.2.6. Die DELLA-Repressorproteine interagieren mit den PIFs

GA-Signalwegmutanten, bei denen die DELLA-Repressorproteine übermäßig akkumulieren, zeigen im Dunkeln stark verkürzte Hypokotyle (Alabadi et al., 2004). Der gleiche Phänotyp wurde zuvor von anderen für die Quadrupelmutante der *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs) PIF1, PIF3, PIF4 und PIF5 beschrieben, wovon man einen *Crosstalk* zwischen dem GA- und dem PIF-abhängigen Signalweg ableitete (Leivar et al., 2008; Shin et al., 2009). PIFs sind *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Typ Transkriptionsfaktoren deren bHLH-Domäne eine Plattform für die Interaktion mit den DELLA-Repressorproteinen bildet, so dass PIFs die Regulation ihrer Zielgene nicht ausführen können (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolome et al., 2010). Durch die Interaktion zwischen den DELLA-Repressorproteinen und den PIFs werden die PIFs von der Bindung an kanonische G-Boxen gehindert (Abbildung 6) (Martinez-Garcia et al., 2000; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Toledo-Ortiz et al., 2010; Sentandreu et al., 2011).

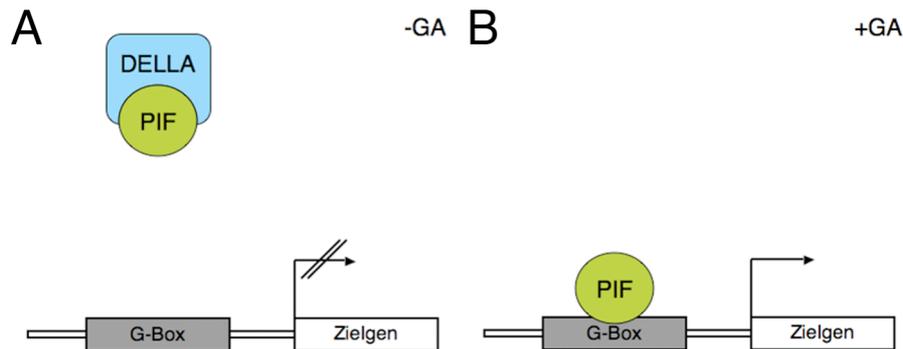


Abbildung 6: Die DELLA-Repressorproteine inaktivieren die PIFs durch die Ausbildung von DELLA-PIF-Heterodimeren. A, In Abwesenheit von GA können die DELLA-Repressorproteine mit den PIFs interagieren, wodurch die PIFs nicht an die G-Box ihrer Zielgene binden können und es zu keiner Expression der PIF-Zielgene kommt. **B,** In Anwesenheit von GA werden die DELLAs proteasomal abgebaut und die PIFs können die G-Boxen binden, wodurch die Expression der PIF-Zielgene induziert wird.

1.3. Der Auxinsignalweg

1.3.1. Die Auxin-labilen Aux/IAAs sind Repressoren der Auxinantwort

Das Pflanzenhormon Auxin nimmt eine wichtige Rolle in geradezu allen Aspekten der Entwicklung und des Wachstums von *Arabidopsis* ein (Depuydt and Hardtke, 2011). Auxin verstärkt die Interaktion zwischen den Auxinrezeptoren der Familie TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1/AUXIN F-BOX (TIR1/AFB) und den transkriptionellen Korepressoren der Auxinantwort, den Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/IAA) Proteinen und induziert den SCF^{TIR1/AFB}-vermittelten Abbau durch Ubiquitylierung der Aux/IAA (Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005; dos Santos Maraschin et al., 2009).

Die Familie der Aux/IAAs besteht aus 29 Mitgliedern, die durch einen hohen Grad an funktioneller Redundanz gekennzeichnet sind (Remington et al., 2004; Overvoorde et al., 2005). Die Aux/IAAs sind kurzlebige Proteine, die innerhalb weniger Minuten über das 26S Proteasom abgebaut werden können (Ramos et al., 2001; Zenser et al., 2001; Tian et al., 2003; Zenser et al.,

2003). Außerdem ruft Auxin eine rasche Transkription der Aux/IAAs hervor, die ihrerseits zu einer Dämpfung der Auxinantwort führt (Timpte et al., 1992; Ouellet et al., 2001). Eine Vielzahl an Aux/IAA *gain-of-function* Mutanten wurde aus genetischen Screens isoliert, die eine Fülle an eindrucksvollen Phänotypen zeigen (Tabelle 2). Die *solitary root (slr)/iaa14* Mutante, die eine Auxin-insensitive Variante des normalerweise Auxin-labilen SLR Proteins exprimiert, bildet keine Seitenwurzeln aus. Als weiteres Beispiel einer Auxin-insensitiven Mutante kann die *auxin response2 (axr2)/iaa7* Mutante genannt werden, in der nennenswerterweise die Wurzelhaarbildung beeinträchtigt ist (Timpte et al., 1994; Nagpal et al., 2000; Fukaki et al., 2002). Interessanterweise stellen *SLR/IAA14* und *AXR2/IAA7* innerhalb der Familie der Aux/IAAs die nächsten Verwandten zueinander dar (Remington et al., 2004; Lokerse and Weijers, 2009). Abgesehen von den Unterschieden, besitzen sie auch phänotypische Übereinstimmungen wie den Wurzel- und den Sproßagravitropismus (Muto et al., 2007b; Muto et al., 2007a).

Für alle bisher identifizierten Aux/IAA *gain-of-function* Mutanten konnte eine Auxininsensitivität beobachtet werden (Oono et al., 2002). Die dafür verantwortlichen Mutationen beruhen auf einem Aminosäureaustausch im kritischen Degron-Motiv GWPPV der Domäne II der Aux/IAAs (Ramos et al., 2001; Reed, 2001). Auffallenderweise existieren auch nicht-kanonische Aux/IAA (e.g. IAA20, IAA30 und IAA31), deren Domäne II gänzlich fehlt (Sato and Yamamoto, 2008). Wie erwartet, führen Überexpressionen dieser Aux/IAA zu Auxin-bezogenen Phänotypen. Des Weiteren besitzen die Aux/IAAs eine N-terminal gelegenen Domäne I, die das Repressormotiv LxLxL enthält, wodurch der Korepressor TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR) gebunden werden kann und infolgedessen den Aux/IAAs den Charakter eines transkriptionellen Repressors verleiht (Ulmasov et al., 1997b; Tiwari et al., 2001; Tiwari et al., 2004; Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008). Letztlich besitzen die Aux/IAAs am C-terminalen Ende die Domäne III und IV, die sowohl homotypische als auch heterotypische Interaktionen zwischen den Aux/IAA und den AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) vermittelt (Abbildung 7) (Kim et al., 1997; Ulmasov et al., 1999a).

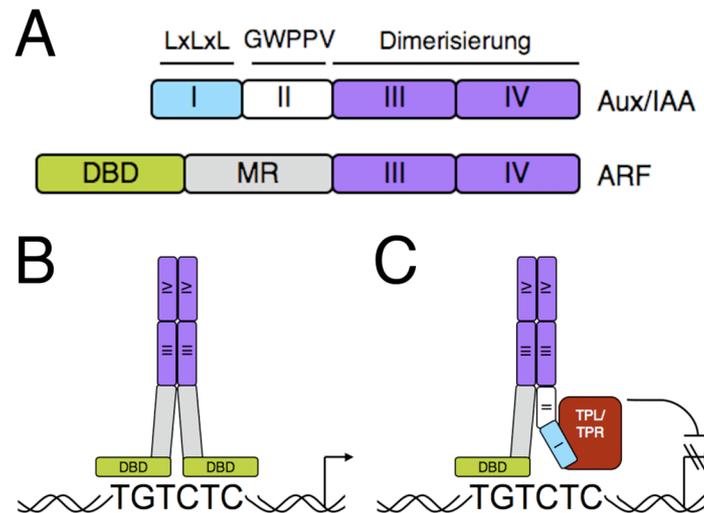


Abbildung 7: Homo- und heterotypische Interaktionen zwischen den ARFs und den Aux/IAAs. **A**, Übersicht über die Domänenstruktur der Aux/IAAs und der ARFs. Aux/IAA: Domäne I mit dem Repressormotiv LxLxL; Domäne II mit dem Degronmotiv GWPPV; Domäne III und IV vermitteln die Homo- und Heterodimerisierung. ARF: DBD, DNA-Bindedomäne; MR, Mittelregion; Domäne III und IV vermitteln die Homo- und Heterodimerisierung **B**, Homotypische Interaktion zwischen zwei ARFs, wodurch die Transkription des Zielgens initiiert wird. **C**, Heterotypische Interaktion zwischen einem ARF und einem Aux/IAA, wodurch der Korepressor TPL/TPR über die Domäne I des Aux/IAAs rekrutiert wird. Dies führt nach klassischer Ansicht zur transkriptionellen Repression des Zielgens (Lokerse and Weijers, 2009).

Tabelle 2: Übersicht über Aux/IAA Mutanten und Phänotypen.

Gen	Mutation	Phänotyp	Referenz
<i>IAA3</i>	<i>shy2</i>	kurze Hypokotyle und Blätter in Dunkelheit, Hyponstie der Blätter, längere Wurzelhaare	(Kim et al., 1996; Kim et al., 1998; Knox et al., 2003)
<i>IAA6</i>	<i>shy1</i>	kurze Hypokotyle in Dunkelheit, Hyponstie der Blätter	(Kim et al., 1996)
<i>IAA7</i>	<i>axr2</i>	kurze Hypokotyle in Dunkelheit, Hyponstie der Blätter, keine Wurzelhaare, agravitropische Wurzel und Sproß	(Timpote et al., 1992, 1994; Nagpal et al., 2000)

<i>IAA12</i>	<i>bdl</i>	Primärwurzel nicht vorhanden, Fusion der Kotyledonen, PIN-ähnliche Hauptinfloreszenz, Hyponstie der Blätter	(Hamann et al., 1999; Hamann et al., 2002)
<i>IAA14</i>	<i>slr</i>	keine Seitenwurzeln, wenige Wurzelhaare, agravitropische Wurzel und Hypokotyl	(Fukaki et al., 2002; Fukaki et al., 2005; Okushima et al., 2005b)
<i>IAA16</i>	<i>iaa16</i>	Lichtgewachsene Keimlinge besitzen ein kurzes und dunkelgewachsene Keimlinge besitzen ein langes Hypokotyl, leicht geöffneter Apikalhaken, weniger Wurzelhaare, agravitropische Wurzel, reduzierte Antherfilamentelongation, resistent gegenüber ABA-vermittelte Inhibition der Keimung und Wurzelelongation	(Rinaldi et al., 2012)
<i>IAA17</i>	<i>axr3</i>	kurze Hypokotyle und Blätter in Dunkelheit, Hyponstie der Blätter, keine Wurzelhaare, agravitropische Wurzel	(Leyser et al., 1996; Knox et al., 2003; Kim et al., 2006)
<i>IAA18</i>	<i>crane</i>	langes Hypokotyl, Fusion der Kotyledonen, verkürzte Wurzel bis wurzellos, Hyponastie der Blätter	(Uehara et al., 2008; Ploense et al., 2009)
<i>IAA19</i>	<i>msg2</i>	agravitrophisches und aphototrophisches Hypokotyl	(Tatematsu et al., 2004; Muto et al., 2007b)
<i>IAA28</i>	<i>iaa28</i>	wenige Seitenwurzeln, verminderte Apikaldominanz	(Rogg et al., 2001)

1.3.2. Die ARF-Typ Transkriptionsfaktoren vermitteln die Auxinantwort

Die Familie der ARFs besteht aus 23 Mitgliedern, die, wie zuvor für die Gruppe der Aux/IAAs beschrieben, auch eine Gruppe von funktionell hochredundanten Transkriptionsfaktoren bilden (Remington et al., 2004). Die Funktionsverlustmutanten der *ARFs* besitzen sowie die Auxin-insensitiven Mutanten der Aux/IAAs ein breites Spektrum an Phänotypen, die in einigen Fällen sogar komplementär zu denen der *Aux/IAA* Mutanten sind (Tabelle 3). Zum Beispiel zeigt die Doppelmutante *non-phototropic hypocotyl4 (nph4)/arf7 arf19* denselben seitenwurzellosen Phänotyp wie zuvor von anderen für die *Aux/IAA*-Mutante *slr* beschrieben wurde (Fukaki et al., 2002; Okushima et al., 2005b). Genetische Interaktionsstudien zwischen den beiden ARFs NPH4/ARF7 und ARF19, einerseits, und dem Aux/IAA SLR, andererseits, konnten klar definierte Epistasien demonstrieren, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Aux/IAAs die Aktivität der ARFs durch eine Interaktion mit den ARFs regulieren können (Fukaki et al., 2006). Erstaunlicherweise lassen sich auch *arf*-Mutanten finden, wie beispielsweise die *arf1* und *arf2* Mutanten, für die bisher noch keine komplementären *Aux/IAA gain-of-function* Mutanten gefunden werden konnten (Ellis et al., 2005). Bemerkenswerterweise ist die *arf2* Mutante eine der wenigen *arf*-Einzelmutanten, die einen starken Phänotyp hervorbringt (Tabelle 3), wodurch die *arf2* Mutante eine Sonderstellung unter den restlichen *arf*-Einzelmutanten einnimmt (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005a).

ARFs besitzen am N-Terminus eine B3-Typ DNA-Bindedomäne, die die Bindung an das Auxin responsive Element (AuxRE) mit der Sequenz TGT.CTC vermittelt, und eine C-terminale Domäne III und IV, die für die Ausbildung von homo- und heterotypischen Interaktionen zwischen den ARFs und den Aux/IAAs benötigt wird (Abbildung 7) (Ulmasov et al., 1997a, 1999a; Tiwari et al., 2003). Experimentelle Befunde legen nahe, dass die homotypischen Dimerisierungen zwischen den ARFs zu einer Erhöhung der DNA-Bindeaffinität der ARFs führen (Ulmasov et al., 1999a). Dies impliziert nicht nur kombinatorische Möglichkeiten der einzelnen ARF-Interaktionen

durch ARF-Koexpressionen, sondern auch durch die Interferenz der Aux/IAAs mit den bestehenden ARF-ARF Interaktionen. Erstaunlicherweise fehlt den ARFs ARF3, ARF13, ARF17 und ARF23 die Domäne III und IV, wodurch Dimerisierungen homo- und heterotypischer Natur ausgeschlossen werden können (Lokerse and Weijers, 2009). Dies sind rätselhafte Abweichungen von der kanonischen Grundstruktur der ARFs, die bisher nicht eingehender erklärt werden konnten. Des Weiteren besitzen ARFs eine hochgradig divergente Mittelregion (Domäne II), die ihrerseits die Aktivität der ARFs bestimmt (Abbildung 7). Karottenprotoplasten-Experimente offenbarten, dass ARFs mit Glutamin-reichen Mittelregionen (z.B. ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 und ARF19) synthetische Auxinpromotoren aktivieren und ARFs mit weniger stark Glutamin-reichen Mittelregionen (z.B. ARF1, ARF2, ARF3, ARF4 und ARF9) diese Promotoren reprimieren (Tiwari et al., 2003). Vor kurzem wurden die *Arabidopsis* und die Reis ARFs auf ihr Vermögen homo- und heterotypische Interaktionen hervorzubringen getestet, was eine Klassifizierung der ARFs in ARF+ und ARF- erlaubte (Shen et al., 2010; Vernoux et al., 2011). In der ARF+ Gruppe sind vornehmlich aktivatorische ARFs, die homo- und heterotypische Interaktionen zwischen den ARFs und den Aux/IAAs eingehen, wohingegen ARF- die repressorischen ARFs konstituieren, die weder homo- noch heterotypische Interaktionen mit ARFs oder Aux/IAAs eingehen können (Vernoux et al., 2011).

Tabelle 3: Übersicht über *arf* Mutanten und deren Phänotypen.

Gen	Mutation	Phänotyp	Referenz
<i>ARF1</i>	<i>arf1</i>	verstärkt den <i>arf2</i> Phänotyp	(Ellis et al., 2005)
<i>ARF2</i>	<i>arf2/mnt</i>	vergrößerte Samen, vergrößerte Kotyledonen, verspätete Blattseneszenz, verspätetes Blühen, kürzere Antherfilamente während der Anthesis, verspätete Abszission der Blütenorgane, verspätete	(Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005a; Schruff et al., 2006)

		Schotenreifung,	
<i>ARF7</i>	<i>nph4</i>	keine Seitenwurzeln, aphototropes und agravitropes Hypokotyl, kürzerer Sproß, epinastische Rosettenblätter	(Fukaki et al., 2006; Okushima et al., 2007)
<i>ARF19</i>	<i>arf19</i>	verstärkt den <i>arf7</i> Phänotyp	(Fukaki et al., 2006; Okushima et al., 2007)

1.4. Zielsetzung meiner Dissertation

Ziel meiner Dissertationsarbeit war die Identifizierung und weiterführende Charakterisierung von Zielgenen der GA-abhängigen Antwort, um das Pflanzenwachstum besser zu verstehen. Seit dem Beginn meiner Dissertationsarbeit ist das mechanistische Verständnis der GA-Perzeption und der GA-Signaltransduktion stetig gewachsen. Man versteht, dass der proteasomale Abbau der DELLA-Repressorproteine die Voraussetzung für ein normales und geregeltes Pflanzenwachstum ist. Des Weiteren legen einige Studien nahe, dass die DELLA-Repressorproteine eine besondere Gruppe an Transkriptionsfaktoren darstellen. Man war früher der Auffassung, dass Änderungen im Expressionsverhalten potentieller Zielgene der GA-Antwort durch eine direkte Bindung der DELLAs an die DNA hervorgerufen werden. Während meiner Dissertationsarbeit wurde diese Annahme jedoch zweifelsfrei widerlegt, da Interaktionen zwischen den DELLAs und einer Reihe von Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden, die nahe legten, dass DELLAs nur indirekt die Transkription regulieren. Dies zeigte zum ersten Mal, dass GA- und DELLA-vermittelte Prozesse über die Regulation der Interaktionspartner verlaufen (Abbildung 8).

Mit meiner Dissertationsarbeit wollte ich die Identität DELLA-regulierter Zielgene aufklären, um zu verstehen, inwiefern diese Zielgene die Entwicklung und das Wachstum von Arabidopsis beeinflussen. Des Weiteren unternahm ich Anstrengungen, die GA-Regulation der Gene mit den neuen

Erkenntnissen zu DELLA-Interaktoren und deren Signaltransduktionswege in Einklang zu bringen. Daher nutze und analysierte ich Daten einer globalen Genexpressionstudie, die im Labor von Prof. Dr. Claus Schwechheimer zuvor gewonnen worden waren. Physiologische Studien homozygoter Mutanten verhalfen mir bei der weitergehenden Charakterisierung und gaben mir zudem ein besseres Verständnis über die biologische Funktion der GA-regulierten Gene. Dies führte mich zur Identifizierung der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GATA*, *NITRATE-INDUCIBLE*, *CARBON-METABOLISM INVOLVED (GNC)* und *GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1 (GNL/CGA1)*. Aufgrund der Kenntnisse über die Interaktion der DELLAs mit den PIF Transkriptionsfaktoren wollte ich weiter verstehen, inwiefern die beiden GATAs auch PIF-abhängig reguliert sein können, um ihnen eine klar definierte Stellung in einem der den DELLAs nachgeschalteten Signalwege zu geben. Zur Beantwortung dieser und weiterer Fragestellungen führte ich Mutantanalysen, genetische Interaktionsstudien, sowie zellbiologische und biochemische Analysen durch.

Weiterhin galt mein Interesse der Fragestellung, inwiefern sich weitere Hormonsignalwege in der transkriptionellen Regulation der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* überschneiden können. Hinweise darauf erhielt ich aus Publikationen, die im Vorfeld meiner Arbeit *GNL/CGA1* als ein Zielgen der *PHYB*- und Zytokinin-vermittelten Antwort identifizierten. Außerdem war bekannt, dass Auxin den GA-Signalweg modulieren kann. Ferner zeigten mir globale Genexpressionsanalysen an Auxin-behandelten Wildtypkeimlingen, dass sich in der Tat Auxin-abhängige Änderung in der Transkriptabundanz für *GNC* und *GNL/CGA1* erkennen lassen. Daher widmete ich mich verstärkt in einem zweiten Projekt der Aufklärung der Auxin-abhängigen Regulation der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1*.

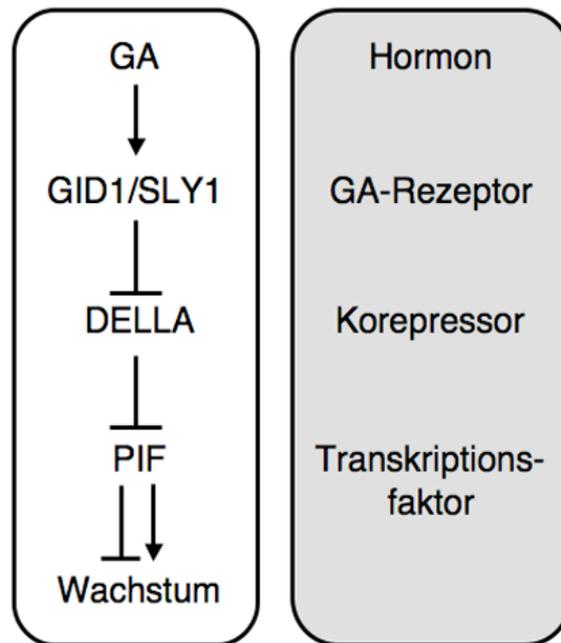


Abbildung 8: Der Kenntnisstand über den GA-Signalweg zu Beginn meiner Dissertationsarbeit. GA wird über den GA-Rezeptor gebunden, wodurch die DELLA-Repressorproteine erkannt werden. Die DELLAs werden proteasomal abgebaut, wodurch die PIFs Wachstumsprozesse steuern können.

2. Zusammenfassung / Summary

2.1. Zusammenfassung

GAs steuern eine Vielzahl an entwicklungsabhängigen Wachstumsprozessen und stellen somit eine wichtige Klasse an Phytohormonen dar. Zu Beginn meiner Dissertationsarbeit waren GA-abhängige Transkriptomanalysen vorhanden, die die GA-abhängigen Änderungen im Expressionsprofil zahlreicher Gene dokumentierten. Letztendlich gelang es diesen Genomanalysen jedoch nicht, diese identifizierten Zielgene der GA-Antwort in einen biologischen Kontext zu setzen.

Während meiner Dissertation gelang mir die Identifizierung der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* als wichtige Komponenten im GA-Signalweg. Ich konnte mit dieser Arbeit nicht nur die Fragestellung beantworten, ob die beiden GATAs den DELLA-Repressorproteinen nachgeschaltet sind, sondern auch zeigen, dass sie den PIF Transkriptionsfaktoren nachgeschaltet sind. Außerdem konnte ich belegen, dass *GNC* und *GNL/CGA1* direkte Zielgene des PIF3 Transkriptionsfaktors darstellen und dass weitere Mitglieder der PIF-Familie die beiden GATAs durch eine Bindung innerhalb ihrer Promotoren regulieren. Globale Genexpressionsanalysen konnten die Wichtigkeit der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* innerhalb des GA- und PIF-Signaltransduktionsweges weiter bekräftigen, da eine Vielzahl an PIF-regulierten Genen auch *GNC* und *GNL/CGA1* reguliert sind. Physiologische und phänotypische Untersuchungen der *GNC* und *GNL/CGA1* Mutanten und Überexpressionslinien konnten weiterhin zeigen, dass die beiden GATAs Repressoren der Keimung, des Blühzeitpunktes und der Seneszenz sind, während sie gleichzeitig das Grünungsverhalten der Pflanzen fördern.

Mit der Fragestellung nach der Einflussnahme von Auxin auf eine mögliche Kontrolle der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription konnte ich die Transkriptionsregulatoren ARF2, als einen Vertreter der ARF Transkriptionsfaktoren, und SLR, als einen Vertreter der Aux/IAAs, als Regulatoren der beiden GATAs finden. Weiterhin kann ich zwischen der *arf2* Mutante und der *slr* Mutante viele phänotypische Gemeinsamkeiten

aufdecken (zum Beispiel vergrößerte Samen und einen verspäteten Blühzeitpunkt), die zuvor von anderen übersehen worden waren und die ich mit einer Erhöhung der Transkriptabundanz von *GNC* und *GNL/CGA1* korrelieren konnte. ARF2 und ARF7 Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente erlaubten mir zu zeigen, dass die beiden GATAs sowohl der Auxin-unabhängigen ARF2- als auch der Auxin-abhängigen ARF7-Antwort nachgeschaltet sind. Mit der Stimulation des GA-Signalweges durch GA-Behandlungen und durch *gnc*, *gnl* und *spy* konnte ich den Beweis einer Suppression der *arf2* Mutante zeigen. Des Weiteren enthüllte ich mit meiner Arbeit einen neuen GA-basierten Mechanismus, der zu einer GA-abhängigen Stabilisierung des ARF2 Proteins führt und folglich die GA-Antwort ARF-regulierter Gene durch GA nahelegt.

Zusammenfassend gelang mir mit dieser Dissertation die Identifizierung zweier wichtiger Komponenten des GA-Signalweges, *GNC* und *GNL/CGA1*. Ich kann zeigen, dass die beiden GATAs eine Vielzahl von physiologischen und entwicklungsabhängigen Prozessen steuern, deren Feinabstimmung auch über den Auxinsignalweg geschieht.

2.2. Summary

GAs mediate a plethora of developmental processes and thereby constitute an important class of phytohormones. GA-dependent changes in the expression profile of a multitude of genes have been documented. However, a comprehensive understanding of GA-regulated target genes were completely missing when I started the work for this dissertation.

Through the identification of two GATA-type transcription factors *GNC* and *GNL/CGA1* I was able to place both into the GA-signaling pathway downstream from GA and DELLAs. Furthermore, I could show that the transcriptional control of both GATAs is integrated through the light-labile PIF3 transcription factor and probably other members of the PIF transcription factor family. Global gene expression analyses further substantiated the significance of the two GATAs *GNC* and *GNL/CGA1* in GA and PIF signaling since a strong overlap of genes that are regulated by PIFs, *GNC* and *GNL/CGA1* is

apparent. Furthermore, analysis at the physiological and phenotypic level of mutants as well as of lines that overexpress *GNC* and *GNL/CGA1* showed that both GATAs are repressors of germination, flowering and senescence whereas they are positive regulators of greening.

To answer the question whether auxin might have an influence on *GNC* and *GNL/CGA1* expression I found ARF2, a member of the ARF-type transcription factors, and SLR, a member of the Aux/IAA family of transcriptional co-repressors, as transcriptional regulators of both GATAs. Through the characterization of the *arf2* and *slr* mutants, I observed a strong phenotypic overlap between both mutants (e.g. increased seed size and delayed flowering) that had not been described until then and that the phenotypes observed in the mutants correlated with an increase in *GNC* and *GNL/CGA1* transcript abundance. In addition, ARF2 and ARF7 chromatin-immunoprecipitation experiments showed that ARF2 is downstream of an auxin-independent response machinery whereas ARF7 is downstream of an auxin-dependent response machinery. Through the stimulation of the GA signaling pathway, on the one hand through GA-treatments and on the other hand through the *gnc*, *gnl* and *spy* mutants, I could report the first documented suppression of the *arf2* mutant. Besides, I also reveal a new GA-based mechanism that stabilizes the ARF2 protein in a GA-dependent manner, which suggests that GA might also regulate ARF-target genes.

In summary, I identified *GNC* and *GNL/CGA1* as important components of the GA-signaling pathway. Furthermore, I showed that the two GATAs regulate a multitude of physiological as well as developmental processes, and that the fine-regulation of these processes is also integrated through the auxin-signaling pathway.

3. Ergebnisse

3.1. *GNC* und *GNL/CGA1* sind Repressoren des GA-Signalwegs und primäre Zielgene der PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS

Alle in dieser Dissertation präsentierten Experimente, mit Ausnahme der Microarray-Experimente und Auswertungen (Carina Behringer), wurden von mir durchgeführt.

3.1.1. Die Identifizierung von der GA-Antwort nachgeschalteten Zielgenen

Zu Beginn meiner Dissertationsarbeit verstand man die GA-Signaltransduktionskaskade, beginnend mit GA und dem GA-Rezeptor GID1 bis hin zur GA-abhängigen Proteolyse der DELLA-Repressorproteine (Schwechheimer, 2008; Sun, 2010). Gene, die der GA-Antwort nachgeschaltet sind, begann man gerade erst über globale Genexpressionanalysen zu identifizieren (Cao et al., 2005; Nemhauser et al., 2006; Willige et al., 2007; Zentella et al., 2007). Basierend auf einem im Labor durchgeführten Microarray-Experiment habe ich zunächst 49 Zielgene identifiziert, die ich aufgrund interessanter biochemischer Eigenschaften ihrer Genprodukte auswählte. Anschließend generierte ich homozygote T-DNA Insertionsmutanten dieser Gene und charakterisierte diese auf phänotypischer und physiologischer Ebene. Ziel dieser Analysen war es, vielversprechende Mutanten zu identifizieren und sie mit weiteren molekularbiologischen Mitteln zu untersuchen. Weiterhin wollte ich anhand dieser Mutanten die Rolle der Proteine im GA-Signalweg verstehen und ihnen eine genaue Position innerhalb des GA-Signalwegs zuschreiben.

Zur Ausgangsanalyse nutzte ich ein in unserem Labor durchgeführtes Microarray-Experiment (mit den Zugangsnummern GSM177119 bis GSM177121, *ga1* Experiment; GSM177122 bis GSM177124, *ga1* +GA Experiment; GSM177125 bis GSM177127, *gid1abc* Experiment; GSM177128

bis GSM177130, *gid1abc* +GA Experiment), das nach einer von mir durchgeführten Analyse 148 statistisch signifikant GA-regulierte Gene hervorbrachte (Willige et al., 2007). Eine Tabelle der untersuchten Zielgene und der erhältlichen T-DNA Insertionslinien kann der Tabelle A6 im Anhang entnommen werden.

3.1.2 Analyse der T-DNA Insertionsmutanten

GAs besitzen die Fähigkeit die Keimung und das Streckungswachstum des Hypokotyls zu fördern (Koornneef and van der Veen, 1980; Koornneef et al., 1985). Diese Eigenschaften von GA kann man sich für physiologische Untersuchungen zu Eigen machen. Des Weiteren kann der GA-Biosyntheseinhibitor Paclobutrazol (PAC) genutzt werden, um GA-defiziente Situation nachzuahmen (Rademacher, 2000). Der Einsatz beider Substanzen, GA und PAC, ermöglicht in physiologischen Assays die genauere Charakterisierung einer Mutante und deren Zuordnung als möglicher Regulator GA-abhängiger Prozesse. Zu diesem Zweck unterzog ich alle im Anhang aufgeführten T-DNA Insertionsmutanten (Anhang Tabelle A6) einem Screening, das (1) Aufschluss über das Keimungsverhalten und (2) über das Streckungsvermögen des Hypokotyls liefern sollte.

Den Keimungsassay führte ich auf GA- und PAC-haltigen 0,5x MS Medien über einen Zeitraum von sieben Tagen durch. Im Anschluß vermaß ich von diesen Keimlingen die Hypokotyle. Im Anhang B (Abbildung B1) befinden sich alle aus diesen beiden Untersuchungen gewonnenen Daten. Im Rahmen meiner Dissertationsarbeit legte ich für weitere Analysen den Schwerpunkt auf die Gene *GNC* (*GATA*, *NITRATE-INDUCIBLE*, *CARBON-METABOLISM INVOLVED*, AT5G56860) und *GNL/CGA1* (*GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1*, AT4G26150). T-DNA Insertionslinien (Tabelle 4 und 5) für beide Gene zeigen erhöhte Keimungsfrequenzen im Vergleich zur Wildtypkontrolle unter GA-defizienter Situation (Abbildung Anhang B1). Außerdem konnte ich ein verstärktes Streckungswachstum des Hypokotyls in den *gnc* und *gnl* Mutanten

beobachten. Dies war zuvor nur bei den Funktionsverlustmutanten *rga*, *gai* und *spy* als genetische Suppressoren der GA-Biosynthesemutante *ga1* gezeigt werden (Jacobsen and Olszewski, 1993; Jacobsen et al., 1996; Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1997; Dill and Sun, 2001; Swain et al., 2001). *GNC* und *GNL/CGA1* kodieren für GATA-Typ Transkriptionsfaktoren und stellen innerhalb der Familie der GATAs Paraloge dar. Daher habe ich für weitere Analysen auch *gnc gnl* Doppelmutanten generiert und diese für weitere Untersuchungen genutzt (Abbildung 9A und 9B) (Teakle et al., 2002; Manfield et al., 2007). Das zuvor erwähnte Microarray-Experiment hatte eine GA-vermittelte transkriptionelle Repression beider GATAs nahegelegt (Willige et al., 2007; Richter et al., 2010).

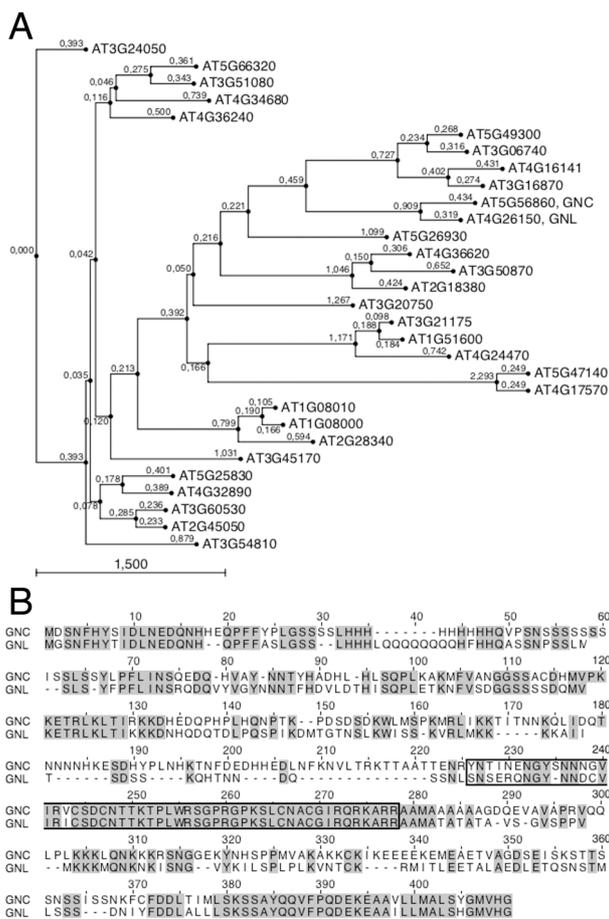


Abbildung 9: Die beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* sind Homologe zueinander. A, Phylogenetische Stammbaum-Analyse der GATA-Typ Familie absierend auf ClustalW Alignment. B, ClustalW Alignment der beiden GATA *GNC* und *GNL/CGA1*. Identische Aminosäuren sind schattiert (BLOSUM62 score), GATA-Box ist eingerahmt und C-terminale LLM-Domäne ist unterstrichen.

3.1.3. Verifizierung des Mikroarrayexperimentes für die GA-abhängige Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1*

Aufgrund der Homologie von *GNC* und *GNL/CGA1* konnte ich nicht ausschließen, dass Kreuzhybridisierungen der gespotteten *probes* auf den Affymetrix Chips mit den cRNAs auftreten. Als Konsequenz daraus würden die im Mikroarray-Experiment beobachteten transkriptionellen Änderungen für die beiden GATAs sich nicht für beide GATAs experimentell reproduzieren lassen. Daher wollte ich die Expression der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* mittels qRT-PCR überprüfen. Hierzu verglich ich die *GNC* und *GNL/CGA1* Expression in der GA-Biosynthesemutante *ga1* und der GA-Rezeptormutante *gid1abc* in unbehandelten Proben und nach einstündiger GA-Behandlung. Der Wildtyp und die *ga1* Mutante zeigten eine Reduktion sowohl der *GNC* als auch *GNL/CGA1* Transkripte. Im Gegensatz dazu blieben die Transkriptlevel von *GNC* und *GNL/CGA1* in der *gid1abc* Mutante weitgehend unverändert. In beiden Fällen korrelierte die *GNC* und *GNL/CGA1* Regulation mit der An- und Abwesenheit bzw. dem Abbau von RGA (Abbildung 10A – 10C). Dieses Experiment zeigte weiterhin, dass unter GA-Defizienz eine verstärkte Expression von *GNC* und *GNL/CGA1* im Vergleich zur Wildtypkontrolle vorliegt.

Die Identifizierung primärer Zielgene eines Signaltransduktionsweges erfordert die Aufklärung transkriptioneller Regulationen in kurzen Zeitabständen nach Initiierung der Signaltransduktion. Aus diesem Grund untersuchte ich die transkriptionelle Regulation der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* in Abhängigkeit der Zeit. Dabei stellte sich heraus, dass die stärkste GA-bedingte transkriptionelle Repression beider Zielgene bereits nach 30 Minuten eintrat, wobei eine vollständige Normalisierung nach vier Stunden zu beobachten war (Abbildung 10D). Interessanterweise sind, trotz der starken transkriptionellen Antwort der beiden Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1*, weder RGA noch GAI nach 30 Minuten vollständig abgebaut (Abbildung 10E und 10F). Dies mag sich dadurch erklären, dass die DELLA-Repressorproteine schon alleine durch eine GA-abhängige Interaktion mit *GID1*, und nicht nur durch ihren Abbau,

inaktiviert werden (Ariizumi and Steber, 2007). Zusammengenommen lassen die gewonnenen Daten über die Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1* den Schluss zu, dass beide GATA Gene primäre Zielgene der GA-Antwort darstellen.

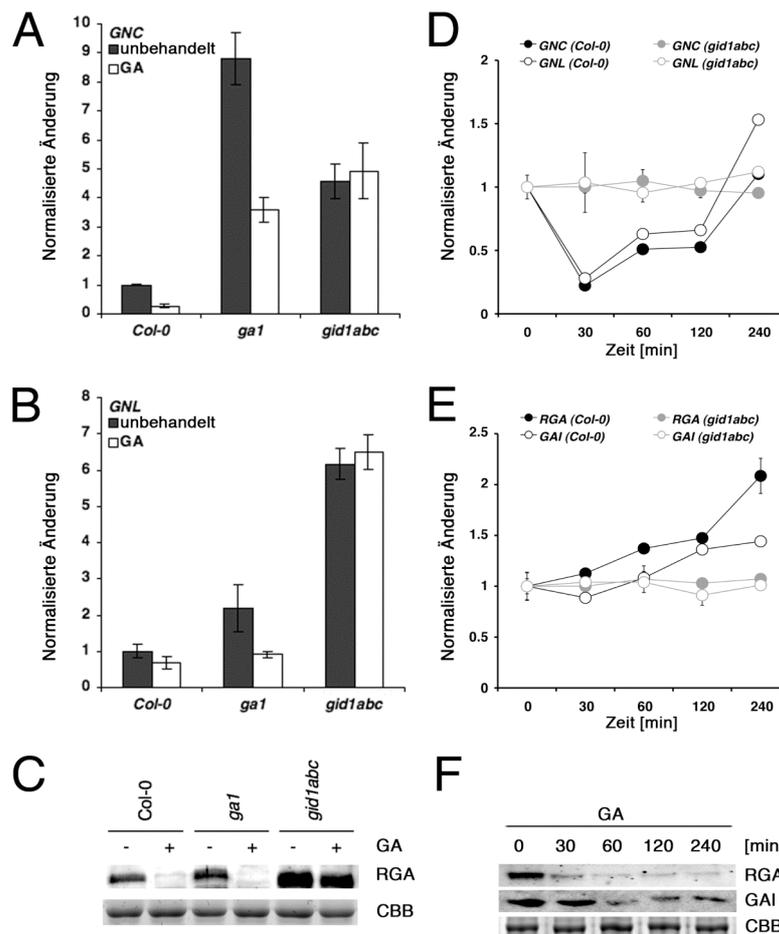


Abbildung 10: Die *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription ist durch GA reprimiert und setzt DELLA-Repressorproteinabbau voraus. A-B, Quantitative RT-PCR für die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* nach einstündiger GA-Behandlung. C, Anti-RGA Immunoblot der angegebenen Proben wie unter A und B. D-E, Zeitabhängiger Verlauf der *GNC* und *GNL/CGA1* (D) und *RGA* und *GAI* (E) Expression nach GA-Behandlung des Wildtypen und der *gid1abc* Mutante. F, Anti-RGA und anti-GAI Immunoblot für den Wildtypen nach GA-Gabe. CBB, Coomassie Brilliant Blau-gefärbtes Gel, Ladekontrolle.

3.1.4. *GNC* und *GNL/CGA1* sind Repressoren der Keimung

Die Funktionsverlustmutanten *gnc* und *gnl* zeigten in den ersten Keimungsassays erhöhte Keimungsraten im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Zudem untermauern die Ergebnisse mit PAC-behandelten Samen der jeweiligen Einzelmutanten die Hypothese, dass die beiden GATAs Repressoren der Keimung sind. Diese Hypothese wollte ich testen, indem ich über die Erstellung eines Expressionsprofils von *GNC* und *GNL/CGA1* während der Stratifizierung und der Keimung, und über ein Keimungsassay mit den *gnc* und *gnl* Mutanten, die Expression und den Beitrag beider GATAs zur Keimung ermitteln wollte.

Um den Einfluss von *GNC* und *GNL/CGA1* auf die Keimung zu verstehen, untersuchte ich mittels quantitativer *Real-time* PCR die differenzielle Genexpression beider Gene an stratifizierten und keimenden Samen. Dabei konnte ich beobachten, dass sowohl die Transkriptabundanz von *GNC* als auch die von *GNL/CGA1* durch die Stratifizierung zunimmt. Im Gegensatz dazu, nahmen die Transkripte beider GATAs nach dem Transfer in ambiente Keimungstemperaturen ab. Dieselbe Dynamik wurde zuvor für die transkriptionelle Regulation der DELLAs *RGA*, *GAI* und *RGL2* während der Stratifizierung und Keimung beobachtet (Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008). Interessanterweise werden die beiden DELLA-Repressorproteine *GAI* und *RGL2* über den gleichen Zeitverlauf mit ähnlicher Dynamik reguliert (Abbildung 11A – 11C). Dies zeigt, dass es eine Korrelation zwischen der DELLA-Repressorproteinabundanz und der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz während der Stratifizierung und Keimung gibt.

Die Befunde über die transkriptionelle Kontrolle der GATAs legten eine Rolle in der Keimung nahe. Ich untersuchte daher, ob der Verlust der *GNC* und *GNL/CGA1* Aktivität in den entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten zu einem Keimungsdefekt führt und ob, unter Bedingungen bei denen GA-Defizienz nachgeahmt wird, erhöhte Keimungsraten auftreten. Bekannt ist, dass GAs keinen direkten Einfluss auf die Endospermruptur haben, weshalb ich die Testaruptur als hier kritischen Keimungszeitpunkt definierte (Müller et al., 2006; Oh et al., 2007). In Keimungsassays, bei denen ich die Testaruptur

in kurzen Zeitintervallen quantifizierte, zeigte sich, dass sowohl die *gnc* und *gnl* Einzel- als auch die Doppelmutanten früher keimen als der Wildtyp und dass der Effekt in der Doppelmutante stärker ist als in der Einzelmutante (Abbildung 11D). Bisher wurde dies nur für die Doppelmutante *rga gai* und die *spy* Mutante beschrieben (Swain et al., 2001; Tseng et al., 2001; Penfield et al., 2006). Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der beiden GATAs für deren Rolle in der Keimungsrepression. Dieser Effekt konnte auch für den Verlauf der Keimung unter PAC-Bedingungen festgestellt werden (Abbildung 11E, Abbildung Anhang B1). Diese Befunde zeigen, dass *GNC* und *GNL/CGA1* in der Tat Repressoren der Keimung sind und ihre Abwesenheit in der *gnc gnl* Mutante eine erhöhte GA-Sensitivität bzw. GA-Antwort simuliert.

Des Weiteren lies dies vermuten, dass die beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* während der Keimung exprimiert sind. Für ein besseres Verständnis, wollte ich deshalb von mir erstellte Promotor-GUS Linien, *GNC_{Pro}:GUS* und *GNL_{Pro}:GUS*, im Verlauf der frühen Keimungsstadien auf histochemischer Ebene analysieren. Meine Expressionsanalyse zeigte, dass *GNC* und *GNL/CGA1* verstärkt im Endosperm vor und besonders während der Testaruptur exprimiert werden. Danach beschränkte sich die Expression von *GNC* auf die embryonale Wurzel und die von *GNL/CGA1* zunehmend auf die Kotyledonen (Abbildung 11F und 11G). Wie zuvor von Anderen gezeigt, hat der Keimungsregulator *RGL2* ein ähnliches Expressionsmuster für die von mir untersuchten Keimungsstadien (Penfield et al., 2006; Piskurewicz et al., 2008; Belin et al., 2009). Aus dem gewebespezifischen Expressionsverhalten von *GNC* und *GNL/CGA1* lässt sich schlussfolgern, dass beide Gene sowohl eine überlappende als auch eine differentielle Expression während der Keimung besitzen.

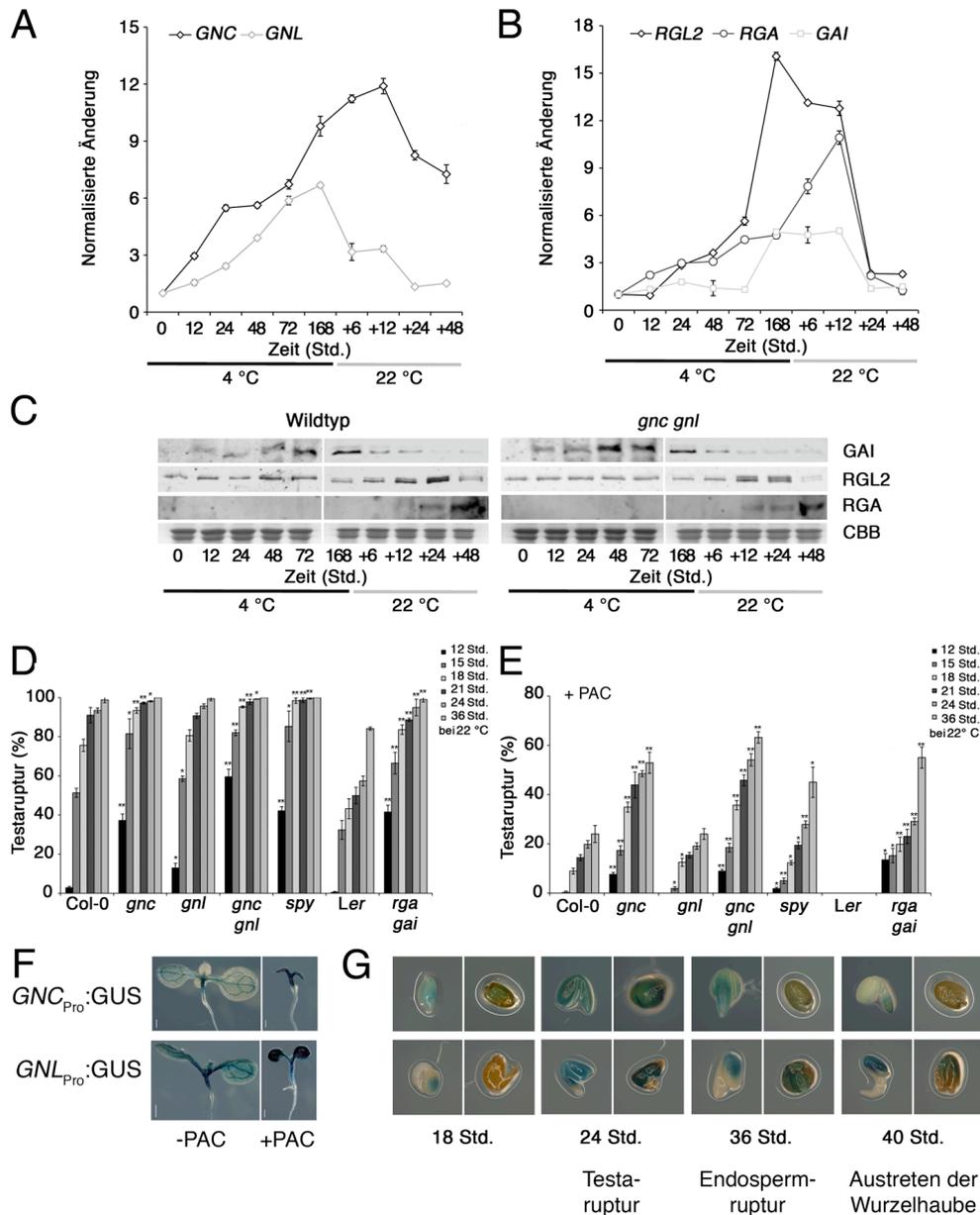


Abbildung 11: *GNC* und *GNL/CGA1* reprimieren die Keimung. A-B, Zeitabhängige Transkription von *GNC* und *GNL/CGA1* (A) und *RGL2*, *RGA* und *GAI*. C, Immunoblots mit Anti-GAI, Anti-RGL2 und Anti-RGA von Proteinextrakten aus Wildtyp und *gnc gnl* mutanten Samen. D-E, Quantifizierung der Testaruptur als Parameter für die Keimungsfrequenz von imbibierte Samen unter Kontroll- (D) und 1 μ M PAC-Bedingung (E). F, Histochemische GUS Färbung 7 Tage alter Keimlinge der Promotor:GUS-Fusionen von *GNC_{Pro}:GUS* und *GNL_{Pro}:GUS* unter Kontroll- und 1 μ M PAC-Bedingung. G, Histochemische GUS Färbung von *GNC_{Pro}:GUS* und *GNL_{Pro}:GUS* Samen während der Imbibierung. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**).

3.1.5. Die *gnc* und *gnl* Mutanten zeigen eine veränderte Chlorophyllakkumulation

Wie von Anderen zuvor beschrieben, konnte ich auch bei den *gnc* und *gnl* Mutanten eine Änderung im Grünungsverhalten feststellen (Bi et al., 2005; Mara and Irish, 2008). In einer Messung des Chlorophyllgehalts der *gnc* und *gnl* Mutanten sowie der GA-Signalwegmutanten *rga gai* und *spy* konnte ich eine quantitativ-signifikante Abnahme der Chlorophylle im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Abbildung 12A) (Bi et al., 2005; Mara and Irish, 2008). Ein Grund für den geringeren Anteil an Chlorophyllen könnte eine Misregulation der *PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDKTASEN* (*POR*) sein. Diese sind Schlüsselenzyme für einen der letzten Schritte im Chlorophyllbiosyntheseweg (Thomas, 1997; Vavilin and Vermaas, 2002). Um den geringeren Chlorophyllanteil in den Mutanten *gnc* und *gnl* zu erklären, untersuchte ich daher die Transkriptabundanz der drei Isoformen von *POR* aus Arabidopsis, und die *POR* Proteinlevel. Beide Ansätze konnten eindeutig belegen, dass es sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene zu einer Reduktion der *POR A*, *POR B* und *POR C* Expression in den Mutanten kommt, und dass der Effekt in der *gnc gnl* Doppelmutante verstärkt ist (Abbildung 12B – 12D). Dies lässt den Schluss zu, dass eine GA-vermittelte Änderung im Grünungsverhalten im Wildtypen über die GA-vermittelte Modulation der Transkription der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* läuft und sich dies vom Gehalt der *POR* ableiten lässt.

GAs reprimieren die Photomorphogenese und Chlorophylle werden in der Dunkelheit nicht gebildet, also auch in der Skotomorphogenese, wenn hohe GA-Levels im Keimling vorliegen (Alabadi et al., 2004; Achard et al., 2007). Während der Deetiolerung kommt es zur photochemischen Aktivierung der *POR*, wodurch die Chlorophyllbiosynthese eingeleitet wird (Suzuki et al., 1997). Mutanten des GA-Signaltranswegs zeigen eine differentielle Chlorophyllakkumulation während der Deetiolerung (Alabadi et al., 2008). Da *GNC* und *GNL/CGA1* eine transkriptionelle Einflussnahme auf die *POR* ausüben, wollte ich auch die Chlorophyllakkumulation in den

entsprechenden Mutanten während der Deetiolierung bestimmen, gleichzeitig das Transkriptprofil von *GNC* und *GNL* erstellen und nach einer Korrelation

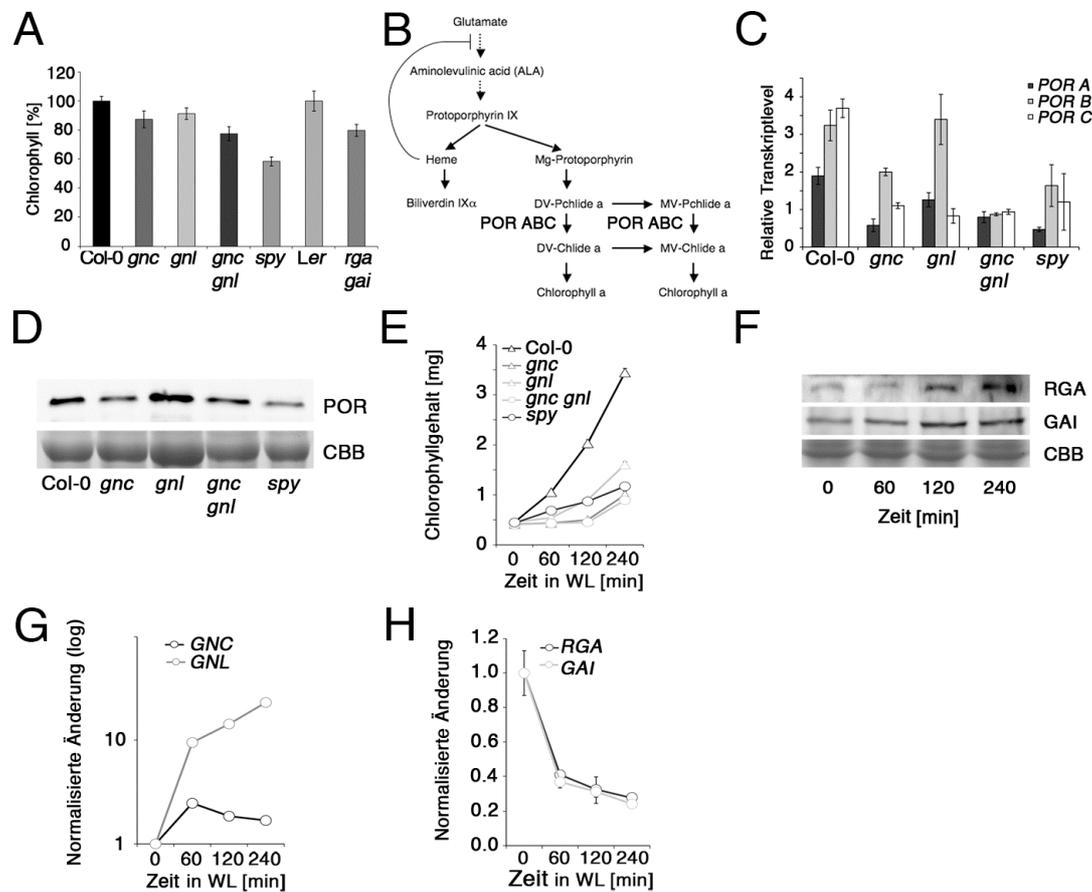


Abbildung 12: *GNC* und *GNL/CGA1* regulieren den Chlorophyllmetabolismus. **A**, Quantifizierung des Chlorophyllgehaltes in den *gnc* und *gnl* sowie den *spy* und *rga gai* Mutanten. **B**, Übersicht über den Chlorophyllbiosyntheseweg. **C-D**, Die Defekte in der Chlorophyllbiosynthese in den *gnc* und *gnl* Mutanten korrelieren mit der verringerten *POR* Transkription (**C**) und dem geringeren *POR* Proteingehalt (**D**). **E**, Quantifizierung der Chlorophyllakkumulation in den *gnc* und *gnl* sowie der *spy* Mutante während der Deetiolierung. **F-H**, *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription (**G**) korreliert mit der *RGA* und *GAI* Proteinakkumulation (**F**) sowie mit der Abnahme der *RGA* und *GAI* Transkription (**H**).

zwischen deren Expression und den DELLA-Repressorproteinen suchen. Hier konnte ich eine verminderte Akkumulation der Chlorophylle während der Deetiolierung in den *gnc* und *gnl* Mutanten beobachten (Abbildung 12E). Des

Weiteren konnte ich die Abhängigkeit der fehlenden Chlorophyllakkumulation mit der Notwendigkeit *GNC* und *GNL* während der Deetiolierung zu transkribieren, erklären. Darüber hinaus korrelieren auch hier, wie zuvor von mir für die Keimung gezeigt, die Transkriptlevel der beiden GATAs mit der Zunahme der DELLA-Repressorproteinlevel *RGA* und *GAI* während der Deetiolierung, und zugleich mit der Abnahme der *RGA* und *GAI* Transkripte (Abbildung 12F - 12H) (Alabadi et al., 2008; Schwechheimer, 2008). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Grünungsverhalten in *Arabidopsis* sowohl durch die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* als auch durch die DELLA-Repressorproteine bestimmt wird, wodurch es zu einer differentiellen Regulation der *POR* kommt, die wiederum den Protochlorophyllid-Metabolismus bestimmen.

3.1.6. Genetische Suppression von *ga1* durch *gnc gnl*

Die bisherigen Analysen von *GNC* und *GNL/CGA1* haben gezeigt, dass die beiden GATA-Faktoren DELLA-abhängig exprimiert werden. Dies führte zur Hypothese, dass eine genetische Suppression des *ga1* Phänotyps durch Einkreuzen der *gnc*, *gnl* und *gnc gnl* Mutanten in den *ga1* Hintergrund erzielt werden könnte. Um dies zu überprüfen, generierte ich die entsprechenden mutanten Kombinationen und testete sie auf das Vermögen die Rosettenblätter zu expandieren und das Blühverhalten zu normalisieren (Sun et al., 1992; Wen and Chang, 2002; Tyler et al., 2004; Yu et al., 2004). Eine dem Wildtypen annähernde Normalisierung der Rosettenblattexpansion konnte ich in der Tat in den *gnc ga1*, *gnl ga1* und *gnc gnl ga1* Mutanten beobachten. Jedoch nur die *gnc ga1* und *gnc gnl ga1* Mutanten etablierten Meristeme und Infloreszenzen (Abbildung 13A und 13B). Diese Analyse zeigt, dass *GNC* und *GNL/CGA1* nicht nur der DELLA-Repressorproteinantwort nachgeschaltet sind, sondern auch wichtige Repressoren im GA-defizienten Wachstum sind.

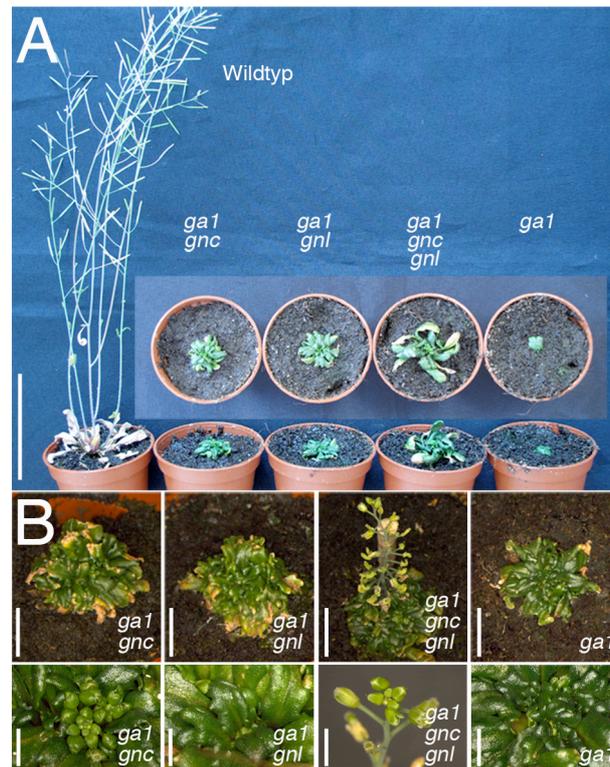


Abbildung 13: Die *gnc* und *gnl* Mutationen supprimieren den *ga1* Phänotyp. A-B, Partielle Suppression der Rosettenblattexpansion und des Blühzeitphänotyps in der GA-Biosynthesemutante *ga1* durch *gnc* und *gnl* Funktionsverlustmutanten. Phänotypen von 7- (A) und 14-Wochen (B) -alten Pflanzen. Unteres Panel in Abbildung B zeigt eine Vergrößerung der Meristeme und Infloreszenzmeristeme des darüberliegenden Panels. Maßstab: A, 5 cm; B, oberes Panel, 1 cm; B, unteres Panel, 2 mm

3.1.7. Phänokopie der GA-Defizienz durch Überexpression von *GNC* und *GNL/CGA1*

In der vorangegangenen Mutantanalyse der GA-regulierten Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1* fielen viele Merkmale auf, die zuvor ebenfalls für *rga gai* Doppelmutanten beschrieben worden waren (Dill and Sun, 2001; Tyler et al., 2004). Daher nahm ich an, dass eine Überexpression beider Zielgene Phänotypen hervorbringen könnten, die einem Verlust der GA-Signaltransduktion ähneln könnte. Als Marker für diesen postulierten phänotypischen Antagonismus zog ich das Grünungsverhalten, das Blühverhalten und das Keimungsverhalten heran. Die Überexpression von

GNC (GNC:GFP) und *GNL/CGA1* (YFP:GNL) brachte in der Tat Keimlinge hervor, deren Hypokotyle und Kotyledone dunkelgrün sind (Abbildung 14A und 14B). Zudem waren die Kotyledone stark hyponastisch. Des Weiteren konnte ich ein verspätetes Blühverhalten für die Überexpressionslinien registrieren, was sich in einer dramatischen Zunahme in der Anzahl der Rosettenblätter ausdrückt (Abbildung 14C und 14D). Eine Keimungsstudie, bei der ich die Testaruptur dokumentierte, zeigte für die beiden Überexpressionslinien GNC:GFP und YFP:GNL, dass sie unter Standardbedingungen keinen großen Einfluss auf die Keimung haben (Abbildung 14E und 14F). Im Gegensatz dazu konnte ich für die Überexpressionlinien eine kleinere Kotyledonenfläche messen. Zudem konnte eine GA-Behandlung der GNC:GFP und YFP:GNL Linien zu keiner Vergrößerung der Kotyledonenfläche führen (Abbildung 14G).

Darüber wollte ich verstehen, ob der *ga1* Phänotyp durch eine erhöhte *GNC* und *GNL/CGA1* Expression erklärt werden kann. Dies zeigte mir zumindest ansatzweise die genetische Suppression von *ga1* durch *gnc* und *gnl*. Um dies zu beantworten, wurde eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt, bei der die GNC:GFP und YFP:GNL Überexpression mit der *ga1* Mutante verglichen wurden (Carina Behringer). Interessanterweise zeigten beide Überexpressionslinien einen hohen Grad an Überschneidung auf globaler Transkriptionsebene, da mehr als die Hälfte aller differenziell regulierten Gene in GNC:GFP und YFP:GNL auch in der GA-Biosynthesemutante *ga1* misreguliert waren (Abbildung 14H). Das Microarray-Experiment zeigt damit, dass phänotypische Ähnlichkeiten nicht nur zwischen den Überexpressionslinien GNC:GFP und YFP:GNL sowie der GA-Biosynthesemutante *ga1* vorhanden sind, sondern auch auf Ebene der Genexpression bestehen. Damit wurde die Wichtigkeit beider Transkriptionsfaktoren als primäre Zielgene der GA-Antwort weiter bekräftigt.

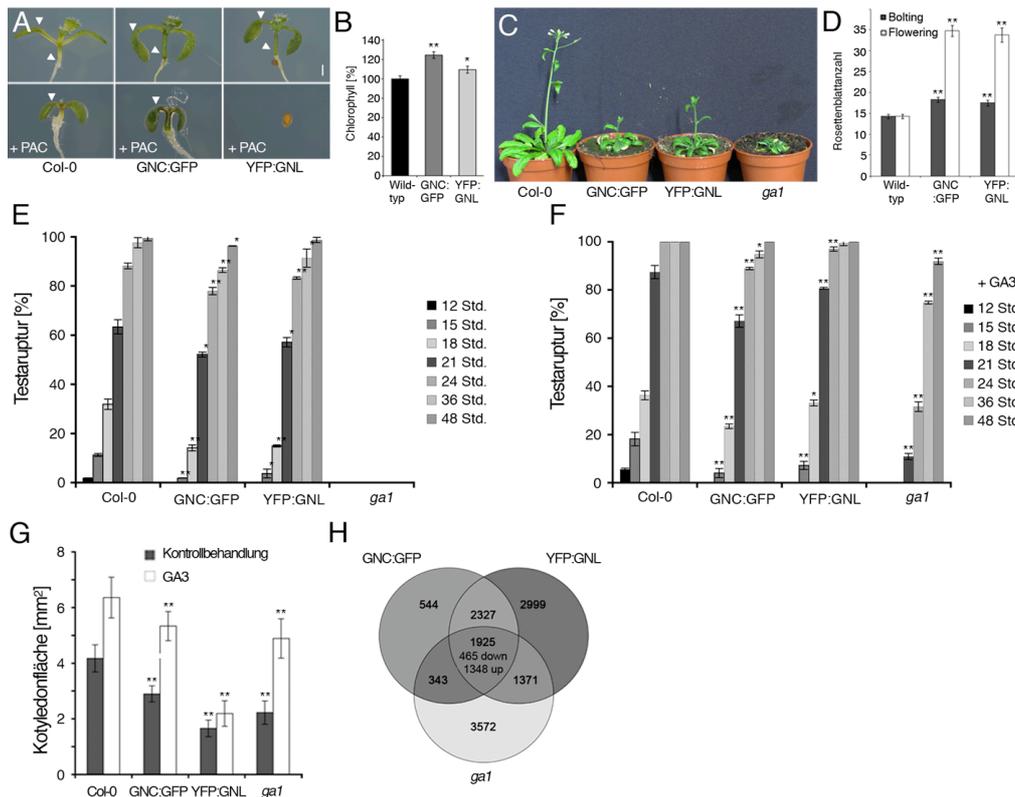


Abbildung 14: *GNC*- und *GNL/CGA1*-Überexpressionslinien sind PAC-hypersensitiv, besitzen einen erhöhten Chlorophyllgehalt und blühen spät. **A**, 10 Tage-alte Keimlinge, die *GNC* (*GNC:GFP*) und *GNL/CGA1* (*YFP:GNL*) überexprimieren und auf GM ohne/mit 0,5 μM PAC angezogen wurden. Die nach unten gerichteten Pfeilspitzen indizieren einen erhöhten Grad an Hyponastie der Petiolen in den Überexpressionslinien, der durch PAC im Wildtypen nachgeahmt werden kann. Die anderen Pfeilspitzen zeigen die verstärkte Chlorophyllakkumulation in den Hypokotylen auf. **B**, Quantifizierung des Chlorophyllgehaltes 8 Tage-alter Keimlinge. **C-D**, Phänotypen 5-Wochen-alter *GNC:GFP* und *YFP:GNL* T2 Pflanzen (**C**) und deren Blühzeitpunktanalyse (**D**) ($n = 12$). **E-F**, Keimungsassay: Quantifizierung der Testaruptur imbibierter Samen in Ab- und Anwesenheit von 10 μM GA3. Student's T-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**). **G**, Quantifizierung der Kotyledonenfläche 10 Tage-alter Keimlinge, die in An- und Abwesenheit von 1 μM GA3 angezogen wurden. **H**, Venn-Diagramm, das Transkriptomänderungen 5 Tage-alter *GNC:GFP*, *YFP:GNL* und *ga1* Keimlinge vergleicht. Zahlen geben die Anzahl differenziell exprimierter Gene in den entsprechenden Genotypen und ihren Schnittmengen wieder.

3.1.8. *Feedback*-Regulation bekannter Komponenten des GA-Signaltransduktionsweges

Transkriptionsfaktoren einer Genfamilie unterliegen oft einer Homöostaseregulation und beim Funktionsverlust eines Gens kann dieses durch ein Homologes ausgeglichen werden (Novillo et al., 2004). Zunächst wollte ich untersuchen, ob eine Homöostaseregulation in den Mutanten als auch in den Überexpressionslinien von *GNC* und *GNL/CGA1* für das jeweilig korrespondierende Homolog vorliegt. Eine quantitative *Real-time* PCR Analyse der *gnc* und *gnl* Mutanten für die betreffenden Situationen zeigte mir, dass eine solche Kompensationsregulation für die beiden GATAs existiert. Dabei kann beispielsweise der Verlust von *gnc* durch *GNL* und der Verlust von *gnl* durch *GNC* ersetzt werden (Abbildung 15A, Anhang Abbildung B2).

Homöostaseregulationen für den GA-Signalweg sind über negative *feedback* Mechanismen erklärt worden (Yamaguchi et al., 1998b; Rieu et al., 2008a; Rieu et al., 2008b; Schwechheimer, 2008). Die Phänotypen der *gnc gnl* Doppelmutante könnten sich auch dadurch erklären, dass eine erhöhte Sensitivität gegenüber GA besteht. Eine Expressionsanalyse bekannter Komponenten dieses *feedbacks*, wie beispielsweise *RGA*, *GAI*, *GID1* und *SLY1*, zeigte jedoch keine nennenswerte Änderung in ihrer Transkriptabundanz im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Hingegen konnte ich für *GA3OX1*, ein Enzym des GA-Anabolismus, eine Reduktion, und für *GA2OX2*, ein Enzym des GA-Katabolismus, eine starke Zunahme der Transkripte zeigen (Abbildung 15B – 15D)(Yamaguchi et al., 1998b; Rieu et al., 2008a). Dies legte den Schluss nahe, dass der GA-Katabolismus in der *gnc gnl* Doppelmutante höher ist als im Wildtyp. Als vermeintliche Konsequenz daraus detektierte ich erhöhte RGA Proteinlevel in den entsprechenden Mutanten (Abbildung 15E) (Silverstone et al., 2007). Als Zusammenfassung der Untersuchung über die Einflussnahme der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* auf den negative *feedback* Mechanismus konnte ich also zeigen, dass *GNC* und *GNL/CGA1* nachgeschaltete Signalkomponenten der DELLA-Repressorproteine sind und an der Regulation der GA-Homöostase beteiligt sind.

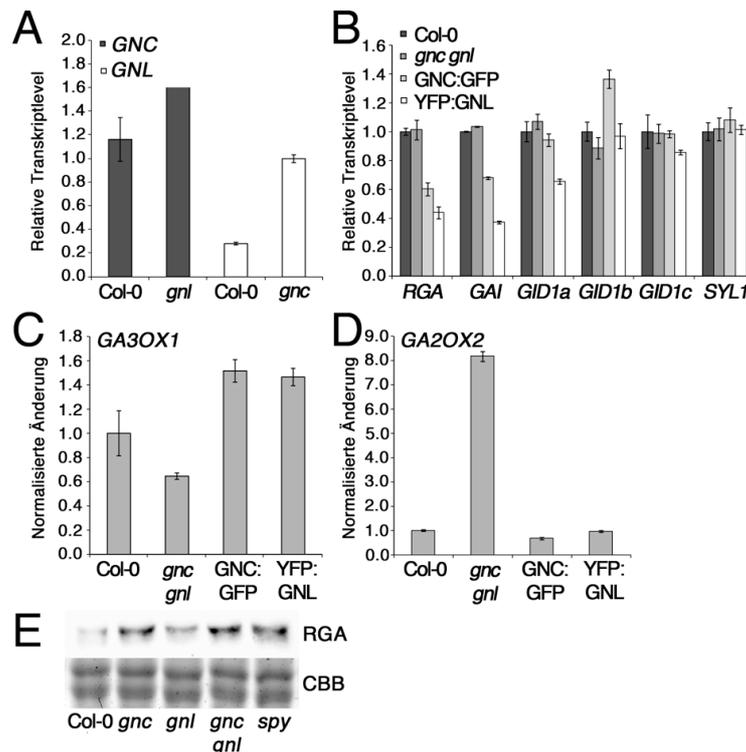


Abbildung 15: *GNC* und *GNL/CGA1* regulieren ihre eigene Transkription und die Homöostase der GA-Signalwegkomponenten. **A**, Transkription von *GNC* und *GNL* in der *gnl* und *gnc* Mutante. **B-D**, Expressionslevel verschiedener Gene des GA Signalwegs (**B**), *GA3OX1* (**C**), und *GA2OX2* (**D**) in der *gnc gnl* Funktionsverlustmutante und den *GNC* und *GNL* Überexpressionslinien. **E**, Immunoblot mit Anti-RGA von Proteinextrakten 5 Tage-alter Keimlinge.

3.1.9. *GNC* und *GNL/CGA1* sind direkte Zielgene von PIF3

Wie zuvor gezeigt, ändert sich die Transkriptabundanz der Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* während der Deetiolierung drastisch (Abbildung 12G). Des Weiteren hatte ich gezeigt, dass die DELLA-Repressorproteine maßgeblich für die GATA Transkription sind. Da bekannt ist, dass DELLA Proteine die PIF Transkriptionsfaktoren reprimieren, hypothetisierte ich, dass DELLAs die *GNC* und *GNL/CGA1* Expression über PIFs steuern (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolome et al., 2010). In diesem Fall sollte es zwischen den *pif* Mutanten und *PIF* Überexpressionslinien phänotypische und gegebenenfalls auch transkriptionelle Übereinstimmungen mit den *gnc* und *gnl* Mutanten und deren Überexpressionslinie geben (Monte et al., 2004; Leivar et al., 2008; Shin et

al., 2009; Stephenson et al., 2009). Darüber hinaus sollte es möglich sein, PIFs an den Promotoren der beiden Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* nachzuweisen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen führte ich eine Genexpressionsanalyse in den *pif* Mutanten durch. Hier zeigte sich eine verstärkte transkriptionelle Derepression der Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1*. Dahingegen konnte ich keine Änderung der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz in einer PIF3:MYC(6x) Überexpressionslinie feststellen (Abbildung 16A). Dies weist auf einen Regulationsmechanismus hin, bei dem die PIF Proteine direkte Repressoren von *GNC* und *GNL/CGA1* sein könnten. Folglich sollte ein Vergleich der Transkriptome von GNC:GFP und YFP:GNL mit der multiplen *pif1 pif3 pif4 pif5 (pifQ)* Mutante ähnliche Expressionsprofile geben (Zusammenarbeit mit Carina Behringer). Ein Vergleich der Transkriptome zeigte mir, dass in der Tat mehr als 80% der differentiell regulierten Gene in GNC:GFP und YFP:GNL ebenso in der komplexen *pifQ* Mutante fehlreguliert sind (Abbildung 16B).

Demzufolge existiert eine antagonistische Regulation gemeinsamer Zielgene, die sowohl durch die PIFs als auch durch die nachgeschalteten GATA-Typ Transkriptionsfaktoren GNC und GNL/CGA1 vermittelt wird.

Um zu untersuchen, ob *GNC* und *GNL/CGA1* direkte Zielgene der PIF Transkriptionsfaktoren sind, suchte ich einen 2,2kb bzw. 2kb umfassenden Promotorbereich der beiden GATAs nach G- und E-Boxen ab. In beiden Promotoren konnte ich dabei mindestens drei PIF3-Bindestellen vorhersagen (Bonven et al., 1995; Martinez-Garcia et al., 2000; Loots et al., 2002). In der Folge immunpräzipitierte ich mit PIF3:MYC erfolgreich Promotorfragmente von *GNC* und *GNL/CGA1* (Monte et al., 2004; Clack et al., 2009). Die ChIP-PCR konnte dann die spezifische Bindung von PIF3:MYC(6x) an eine für den *GNC* Promotor und an drei für den *GNL/CGA1* Promotor vorhergesagte Bindungsstellen bestätigen (Abbildung 16C – 16E). Ich schlussfolgerte daraus, dass beide GATA-Typ Transkriptionsfaktoren direkte Zielgene von PIF3 (und gegebenenfalls weiteren PIFs) sind (Abbildung 17).

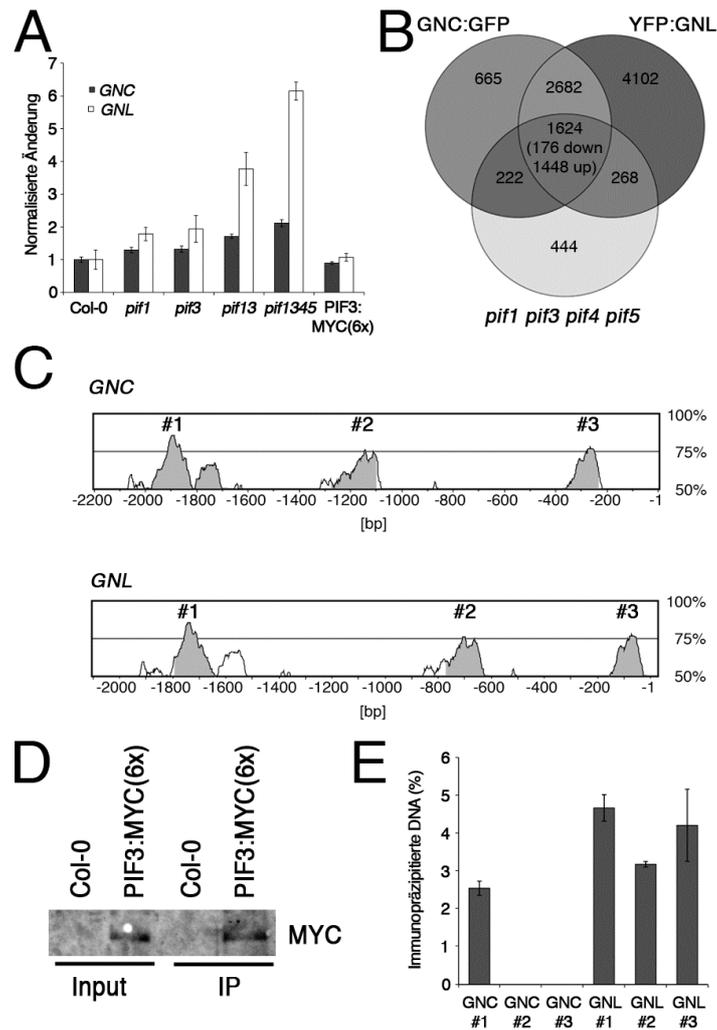


Abbildung 16: *GNC* und *GNL/CGA1* sind direkte Zielgene der PIF Transkriptionsfaktoren. **A**, Differenzielle Expression von *GNC* und *GNL/CGA1* in 5 Tage-alten, dunkelgewachsenen *pif* Mutantenkeimlingen und der *PIF*-Überexpressionslinie PIF3:MYC(6x). **B**, Venn-Diagramm, das Transkriptomänderungen 5 Tage-alter GNC:GFP, YFP:GNL und *pif1 pif3 pif4 pif5* Keimlinge vergleicht. Zahlen geben die Anzahl differenziell exprimierter Gene in den entsprechenden Genotypen und ihren Schnittmengen wieder. **C**, rVISTA Vorhersage von G-/E-Boxen in den Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1*. **D**, Immunoblot mit Anti-MYC, um PIF3:MYC(6x) im Gesamtextrakt (Input) und nach Chromatin-Immunpräzipitation (IP) nachzuweisen. **E**, Quantifizierung der PIF3:MYC(6x) Bindung an die vorhergesagten G-/E-Boxen in den Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1*.

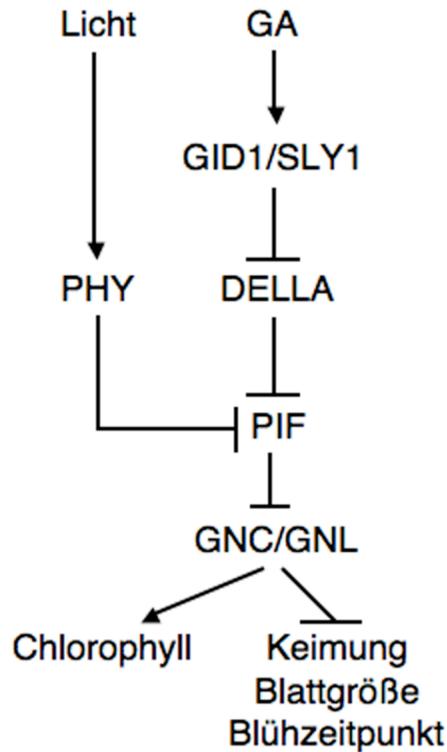


Abbildung 17: *GNC* und *GNL/CGA1* sind der GA-, der DELLA- und PIF-Antwort nachgeschaltet. GA führt zum Abbau der DELLAs und infolgedessen können die PIF-Typ Transkriptionsfaktoren die Expression der beiden PIF-Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1* reprimieren. Die Phytochrome (PHY) werden durch Licht aktiviert, wodurch die PIFs dem PHY-vermittelten Abbau über das Proteasom überführt werden. Dadurch werden die beiden GATAs dereprimiert. *GNC* und *GNL/CGA1* regulieren Prozesse wie die Keimung, den Blühzeitpunkt und den Chlorophyllgehalt.

3.2. Der Auxin- und der GA-Signalweg konvergieren an der Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1*

3.2.1. Genetische Suppression der *arf2* Mutante durch *gnc* und *gnl*

Aufgrund genetischer Interaktionsstudien war bekannt, dass die beiden Signalwege Auxin und GA eine gegenseitige Abhängigkeit haben, bei der z. B. veranschaulicht werden konnte, dass das Auxin eine Kontrolle auf den GA Metabolismus ausübt, wodurch die DELLA-Repressorproteinabundanz bestimmt wird (Fu and Harberd, 2003; Frigerio et al., 2006). Erstaunlicherweise fehlen jedoch für die beiden genannten Signalwege gemeinsame Zielgene, die die Funktionsweise dieses Crosstalks molekular erklären könnten. Während meiner Arbeit mit den Überexpressionslinien *GNC:GFP* und *YFP:GNL* beobachtete ich eine Vielzahl an phänotypische Übereinstimmungen mit der *arf2* Mutante, wie eine erhöhte Chlorophyllakkumulation, Änderung im Seneszenz- und Blühverhalten, verkürzte Stamenfilamente während der Anthesis, eine verspätete Abszission der Blütenorgane und stark vergrößerte Samen (Abbildung 18A – 18H, Abbildung 19A – 19E) (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005a; Lim et al., 2010; Wang et al., 2011).

Des Weiteren zeigte mir eine Analyse der Samengröße bei den GA-Rezeptormutanten *gid1a*, *gid1b* und *gid1c*, dass die Samen mit steigender Komplexität des mutanten Hintergrundes ebenso an Größe zunehmen, was gleichzeitig mit einer Erhöhung der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz korreliert (Abbildung 20A – 20C).

Um eine genetische Interaktion zwischen *GNC* und *GNL/CGA1* mit *ARF2* zu untersuchen, generierte ich *arf2*, *gnc*, *gnl* Doppel- und Tripelmutanten und untersuchte diese im Hinblick auf die zuvor erwähnten Parameter. In der Tat konnte ich eine genetische Suppression von *arf2* in *arf2 gnc* und *arf2 gnc gnl* beobachten. Eine Ausnahme hierfür bildete jedoch *arf2 gnl*, bei der keine Normalisierung des Mutanten *arf2* Phänotyps auftrat. (Abbildung 18D – 18H, Abbildung 19A – 19E). Dies mag zum einen in der

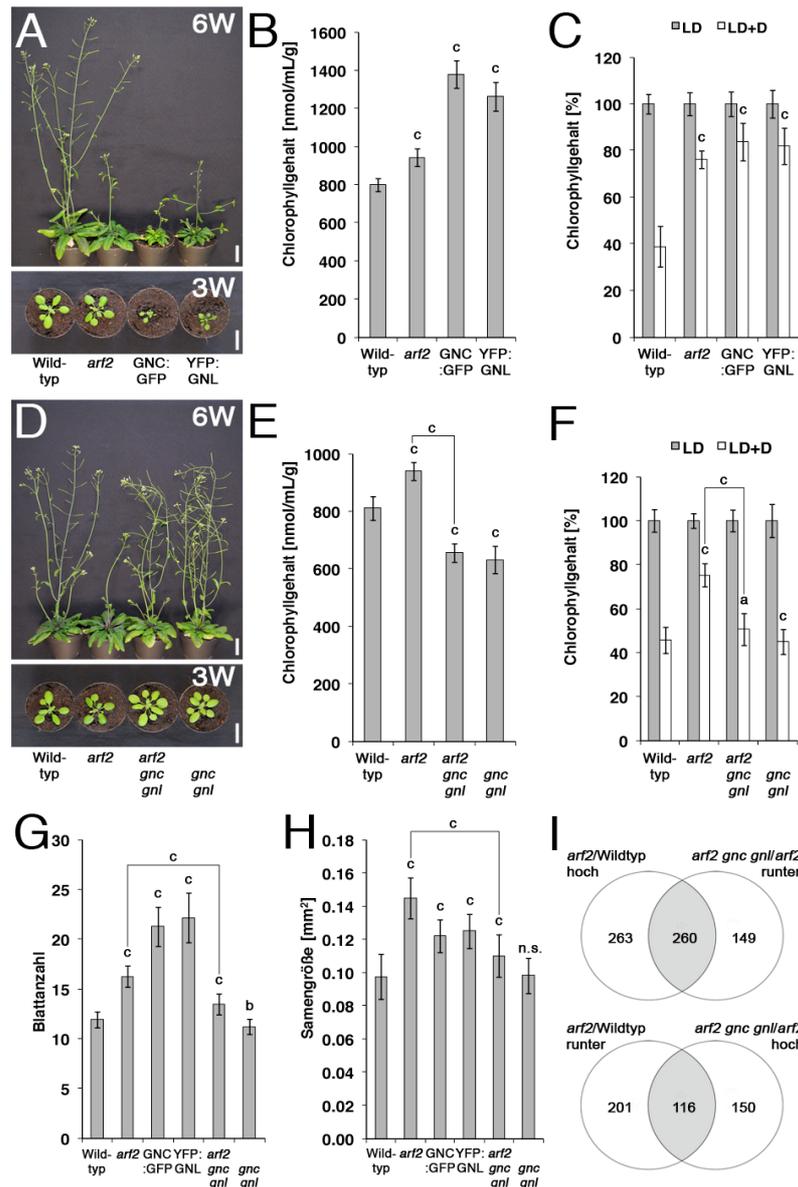


Abbildung 18: GNC und GNL/CGA1 interagieren genetisch mit ARF2. **A**, Repräsentatives Foto 6 Wochen (6W) und 3 Wochen (3W)-alter Pflanzen. Maßstab: 2 cm. **B**, Absoluter Chlorophyllgehalt 10 Tage-alter lichtgewachsener Keimlinge. **C**, Relativer Chlorophyllgehalt der Rosettenblätter vor (LD) und nach (LD+D) dem Transfer in Dunkelheit (Seneszenz-Assay). **D**, Repräsentatives Foto 6 Wochen (6W) und 3 Wochen (3W)-alter Pflanzen. Maßstab: 2 cm. **E**, Absoluter Chlorophyllgehalt 10 Tage-alter lichtgewachsener Keimlinge. **F**, Relativer Chlorophyllgehalt der Rosettenblätter vor (LD) und nach (LD+D) dem Transfer in Dunkelheit (Seneszenz-Assay). **G**, Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt des Sprossauswuchses. **H**, Absolute Quantifizierung der Samengröße in den entsprechenden Genotypen. **I**, Venn-Diagramm, das die Anzahl differenziell regulierter Gene zwischen den Wildtypen und *arf2* sowie *arf2* und *arf2 gnc gnl* aufzeigt. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

Natur des vermeintlich schwachen *gnl* Allels liegen und zum anderen durch die zuvor beschriebene Homöostaseregulation beziehungsweise die bekannte funktionelle Redundanz der beiden GATAs erklärt werden (Bi et al., 2005; Mara and Irish, 2008; Hudson et al., 2011). Daher kann ich schlussfolgernd sagen, dass die GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* mit *ARF2* genetisch interagieren. Ebenso konnte ich in einer globalen Transkriptionsanalyse zwischen dem Wildtypen, der *arf2* und der *arf2 gnc gnl* Mutante die Suppression des molekularen *arf2* Phänotyps nachweisen. Circa 45% aller Gene, die in *arf2* misreguliert sind, zeigen eine antagonistische Regulation in *arf2 gnc gnl* (Abbildung 18I).

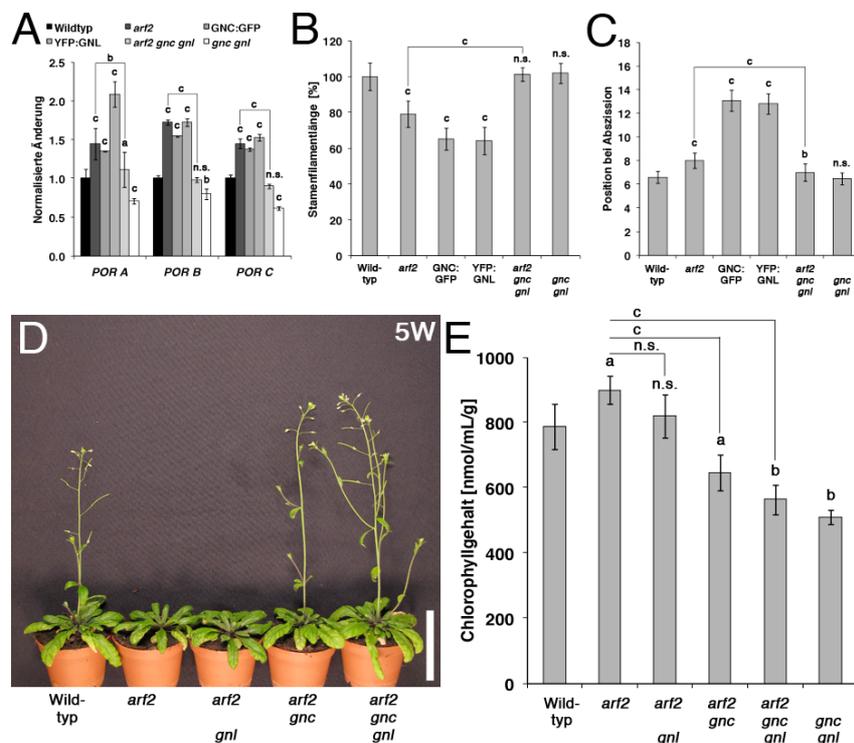


Abbildung 19: Weitere physiologische Analysen zur genetischen Interaktion zwischen *ARF2* und *GNC* und *GNL/CGA1*. **A**, Quantitative Genexpressionsanalyse der *POR A-C* in 10 Tage-alten Keimlingen. **B**, Stamenfilamentlänge im Blütenstadium 15. **C**, Blütenposition während der Blütenabszission. **D**, Repräsentatives Foto von unter Langtag angezogenen 5 (5W) Wochen-alten Pflanzen. **E**, Absolute Quantifizierung des Chlorophyllgehalts 10 Tage alter lichtgewachsener Keimlinge. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

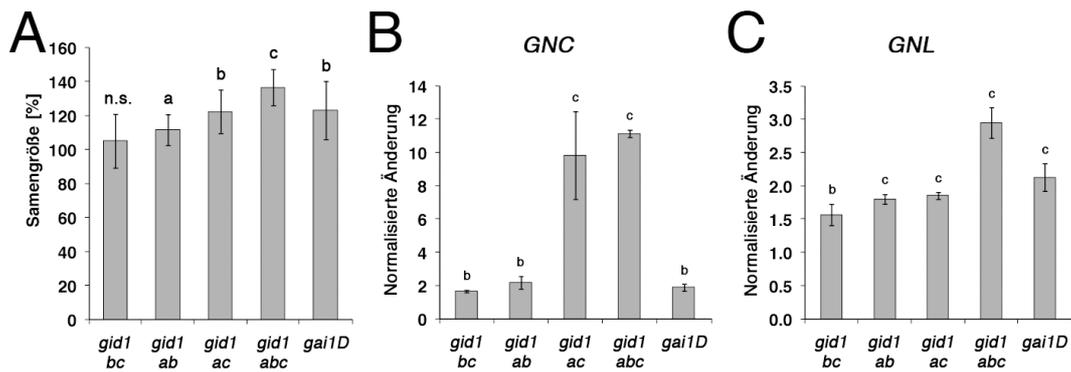


Abbildung 20: Die Samengröße in den komplexen GA-Rezeptormutanten korreliert mit der Expression von *GNC* und *GNL/CGA1*. **A**, Relative Quantifizierung der Samengröße verschiedener Kombinationen der GA Rezeptormutanten *gid1* und der *gain-of-function* Mutante *gai1D*. **B-C**, Quantifizierung der Transkriptabundanz von *GNC* (**B**) und *GNL* (**C**) in den *gid1* Mutanten und *gai1D*. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

3.2.2. ARF2 und ARF7 sind Regulatoren von *GNC* und *GNL/CGA1*

Die von mir gezeigte genetische Interaktion zwischen den beiden GATAs und *ARF2* ließ mich vermuten, dass *GNC* und *GNL/CGA1* womöglich direkte Zielgene von *ARF2* darstellen. Ferner konnte ich mittels einer quantitativen *Real-time* PCR zeigen, dass in der *arf2* Mutante erhöhte Transkriptmengen der beiden untersuchten Gene *GNC* und *GNL/CGA1* vorliegen (Abbildung 21A). Überdies konnte ich mit einer Histon-Chromatin-Immunpräzipitation gegen die acetylierte Form des Lysin 9 am Histon 3 (H3K9ac) zeigen, dass verstärkt acetylierte H3K9 Formen proximal vom ATG der beiden Gene *GNC* und *GNL/CGA1* vorliegen (Abbildung 21B). Es ist bekannt, dass eine Acetylierung der Histone H3 am Lysin 9 das Chromatin entspannt und damit die Zugänglichkeit der RNA-Polymerase II und infolgedessen die erhöhte Transkription der Zielgene möglich wird (Orphanides and Reinberg, 2000; Eisenberg and Shilatifard, 2006).

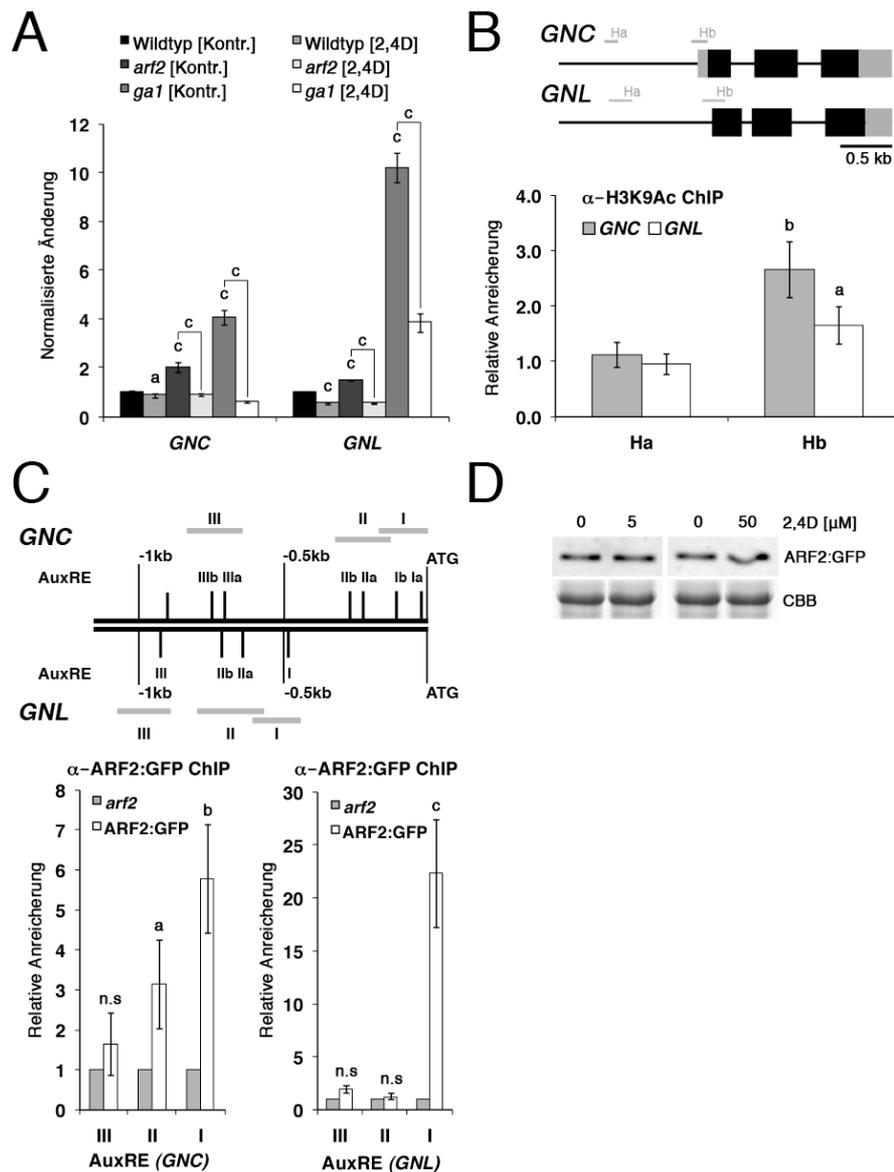


Abbildung 21: ARF2 reguliert die Transkription von *GNC* und *GNL/CGA1*. **A**, qRT Analyse der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression im Wildtypen und in den Mutanten *arf2* und *ga1* unter Kontroll- als auch 5 μ M 2,4D-Behandlung für 30 min. **B**, Schemata der *GNC* und *GNL/CGA1* Loci (oberes Panel). Schwarze Boxen, Exon; graue Boxen, UTR; Ha und Hb entsprechen der zwei Regionen, die nach der H3K9ac ChIP amplifiziert wurden. Die relative Anreicherung (*arf2*/Wildtyp) der Ha und Hb Amplifikationen nach ChIP-qPCR (unteres Panel) ist gezeigt. **C**, Schemata der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren. Römische Zahlen, vorhergesagte AuxRE; graue Balken, Promotorregionen, die für die ChIP Amplifikation ausgewählt wurden. Die relative Anreicherung (ARF2:GFP/*arf2*) der AuxRE nach ChIP-qPCR (unteres Panel) ist gezeigt. **D**, ARF2:GFP Immunoblot vom Gesamtextrakt nach einer Kontroll- und 5 μ M 2,4D-Behandlung nach 3 Stunden. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

Nach einer gezielten Suche nach kanonischen AuxREs, Bindestellen für ARF Transkriptionsfaktoren, in den Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1* konnte ich mehrere solcher AuxREs finden (Ulmasov et al., 1995; Ulmasov et al., 1997a). Mit einer ARF2::ARF2:GFP (ARF2:GFP) Linie führte ich dann eine Chromatin-Immunpräzipitation durch. Mithilfe der quantitativen *Real-time* PCR analysierte ich die Anreicherung von ARF2:GFP an den AuxREs der potentiellen Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1*. Dies zeigte, dass ARF2:GFP die proximal zum ATG gelegenen AuxREs in den Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1* bindet (Abbildung 21C und 21D). Daraus folgt, dass *GNC* und *GNL/CGA1* in der Tat direkte Zielgene von ARF2 darstellen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Auxin und als auch das Phytohormon Brassinosteroid einen starken Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Chromatin haben können (Vert et al., 2008; Walcher and Nemhauser, 2011). Auf der Grundlage dieser Beobachtung, testete ich eine mögliche Einflussnahme des Auxinanalogs 2,4D auf den Proteingehalt von ARF2:GFP. Außerdem wollte ich verstehen, ob Auxin-abhängige Änderungen in der Okkupanz von ARF2:GFP an den proximalen AuxREs der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren auftreten können. Hierfür unterzog ich ARF2:GFP Linien einer 30-minütigen und 3-stündigen Behandlung mit dem künstlichen Auxin 2,4D. In diesem Experiment beobachtete ich zum einen keine Änderungen in der Proteinabundanz von ARF2:GFP, zum anderen zeigt mir das ARF2:GFP ChIP-Experiment, dass nach 30-minütiger Auxinbehandlung keine Änderungen in der Anreicherung von ARF2:GFP an den proximalen AuxREs der beiden Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1* auftreten (Abbildung 21D, Abbildung 22). Zusammenfassend konnte ich also zeigen, dass Auxin zu keiner differenziellen Akkumulation des ARF2 Proteins und zu keiner Änderung im Bindungsverhalten des ARF2 Proteins an das Chromatin seiner beiden Zielgene *GNC* und *GNL/CGA1* führt.

ARFs wurden kürzlich entsprechend ihrer Fähigkeit Heterodimere mit den Aux/IAAs zu bilden in ARF+ und ARF- gruppiert. ARF2 wurde dabei als ARF- klassifiziert, da es scheinbar nicht mit Aux/IAAs interagieren kann (Vernoux et al., 2011). Erstaunlicherweise konnte ich in der *arf2* Mutante

immer noch eine Auxinresponsivität für die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* beobachten (Abbildung 21A). Dies lies mich mutmaßen, dass weitere ARFs dieselben ARF2-spezifischen AuxRE oder weitere von ARF2 nicht erkannte AuxREs in den *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren binden können.

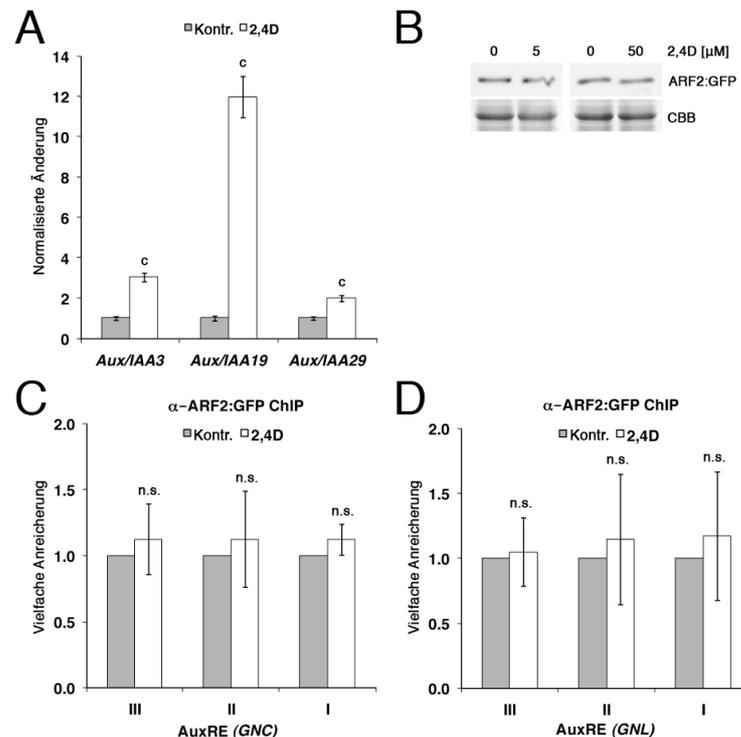


Abbildung 22: ARF2:GFP bindet an die AuxRE der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren. **A**, qRT-PCR Analyse der Auxin-regulierten Gene *Aux/IAA3*, *Aux/IAA19* und *Aux/IAA29* nach 30 minütiger 2,4D-Behandlung (5 µM). **B**, Anti-GFP Immunoblot gegen den Gesamtextrakt von ARF2:GFP Keimlingen, die für 30 Minuten Kontroll- und 2,4D-behandelt (5 µM) wurden. **C-D**, Anti-GFP ChIP und ChIP-qPCR Analyse der AuxREs in den *GNC* (C) und *GNL/CGA1* (D) Promotoren unter Kontroll- und 2,4D-Behandlung (5 µM) nach 30 Minuten. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

Die von mir dokumentierte Auxin-abhängige Änderung der Transkriptlevel der beiden GATAs in der *arf2* Mutante legte nahe, dass ARF+ Typ Transkriptionsfaktoren für dieses geänderte Transkriptionsverhalten verantwortlich sein könnten. Diese Hypothese findet interessanterweise eine

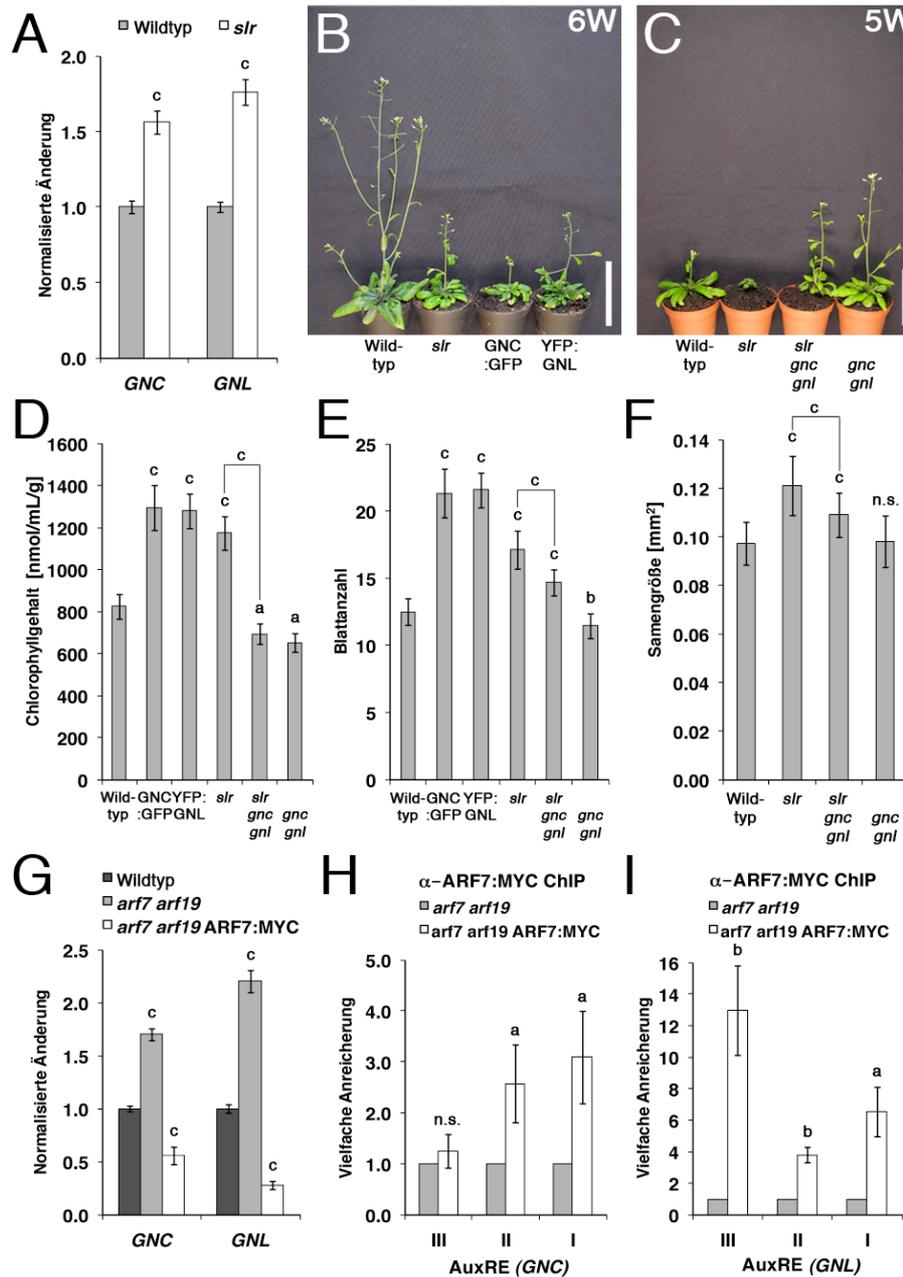


Abbildung 23: *GNC* und *GNL/CGA1* interagieren genetisch mit *SLR* und *ARF7*. **A**, qRT-PCR Analyse der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz in der *slr* Mutante. **B-C**, Repräsentative Fotos von 6 (6W) und 5 (5W) Wochen alten Pflanzen. Maßstab, 2 cm. **D**, Absoluter Chlorophyllgehalt 10 Tage alter lichtgewachsener Keimlinge. **E**, Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt des Sprossauswuchses. **F**, Absolute Quantifizierung der Samengröße in den entsprechenden Genotypen. **G**, qRT-PCR Analyse der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz in *arf7 arf19* und *arf7 arf19 ARF7:MYC*. **H-I**, ChIP-qPCR Resultat nach Anti-MYC ChIP (*ARF7:MYC*) der *AuxRE* in den *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren (Abbildung 24C). Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

Bestätigung darin, dass ich in der *slr/iaa14* Mutante, die eine stabilisierte Form des Aux/IAAs und ARF+ Repressors IAA14 exprimiert (Fukaki et al., 2002), für die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* erhöhte Transkriptmengen nachweisen konnte (Abbildung 23A). Darüberhinaus konnte ich phänotypische Übereinstimmungen in der Änderung des Grünungs- und Blühverhaltens sowie der Samengröße zwischen der *slr* Mutante und den *GNC*:GFP- und *YFP*:*GNL*-Linien beobachten (Abbildung 23B, 23D – 23F).

Direkte Interaktionen zwischen dem SLR Protein und den beiden ARFs *ARF7* und *ARF19* sind zuvor beschrieben worden und diese Tatsache legte nahe, dass *GNC* und *GNL/CGA1* Expression auch in der *arf7 arf19* Doppelmutante mißreguliert sein könnte (Fukaki et al., 2002; Fukaki et al., 2006; Okushima et al., 2007). In der Tat, konnte ich wie in der *slr* Mutante auch in der *arf7 arf19* Mutante eine Zunahme der Transkriptabundanz für *GNC* und *GNL/CGA1* beobachten. Im Gegensatz zur *arf7 arf19* Mutante zeigt die Überexpression von *ARF7* (*ARF7:MYC*) verringerte Transkriptlevel von *GNC* und *GNL/CGA1* (Abbildung 23A und 23G). Ein Test auf die Bindung von *ARF7:MYC* mittels ChIP belegt ebenso eine Anreicherung von *ARF7* an den AuxREs innerhalb der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren (Abbildung 23H und 23I). Interessanterweise führt gleichzeitig eine Auxinbehandlung zu einer erhöhten Bindung des *ARF7:MYC* Proteins an die AuxREs der Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1*, was auch ein Resultat einer Auxin-vermittelten Stabilisierung des *ARF7:MYC* Proteins sein könnte. Weiterhin testete ich die Transkriptmengen von *ARF7* in der *ARF7:MYC* Überexpressionslinie. Dabei zeigte sich, dass die *ARF7:MYC* Überexpressionslinie nur eine 2-fache Erhöhung der *ARF7* Transkriptabundanz über die Wildtyp-Transkriptmenge (Abbildung 24A). Folglich ist diese *ARF7:MYC* Linie dem Wildtyp zumindest ähnlich. Daher unterzog ich die *ARF7:MYC* exprimierende Linie einer Auxinbehandlung. Dies zeigte mir, dass eine verstärkte Anreicherung von *ARF7:MYC* an die AuxRE der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren nicht mit einer Erhöhung im *ARF7:MYC* Proteingehalt einhergeht (Abbildung 24B – 24D). Wie die phänotypischen und molekularen Beobachtungen nahelegen,

stellen folglich ARF2, ein Auxin-unabhängiges ARF-, und ARF7, ein Auxin-abhängiges ARF+, Repressoren von *GNC* und *GNL/CGA1* dar.

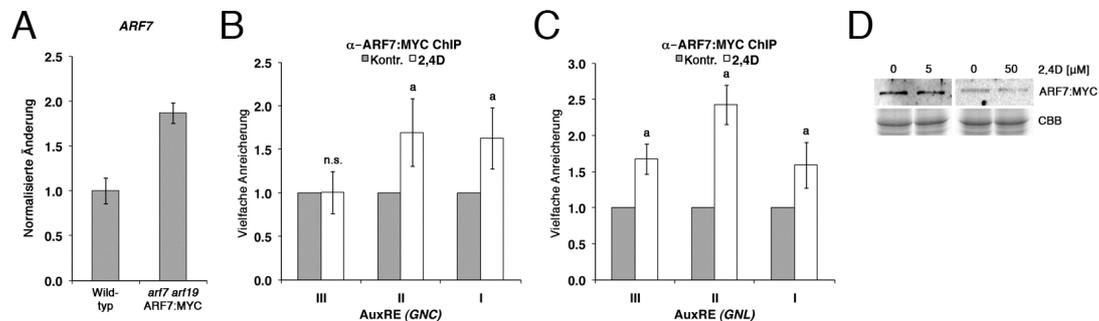


Abbildung 24: ARF7:MYC bindet an die AuxRE der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren. **A**, Quantitative Analyse der Transkriptabundanz von *ARF7* zwischen Wildtyp und *arf7 arf19* 35S::ARF7:MYC in 10 Tage alten, lichtgewachsenen Keimlingen. **B-C**, Anti-MYC ChIP und ChIP-qPCR Analyse der AuxRE in den *GNC* (B) und *GNL/CGA1* (C) Promotoren unter Kontroll- und 2,4D-Behandlung (5 μ M) nach 30 Minuten. **D**, Anti-MYC Immunoblot gegen den Gesamtextrakt von ARF7:MYC Keimlingen, die für 30 Minuten Kontroll- und 2,4D-behandelt (5 μ M) wurden. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

Die phänotypischen und molekularen Gemeinsamkeiten von *slr* verglichen mit denen von *GNC:GFP* und *YFP:GNL* ließen ebenso die Annahme zu, dass womöglich *GNC* und *GNL/CGA1* der *SLR*-abhängigen Antwort nachgeschaltet sein könnten. Daraufhin genierte ich eine *slr gnc gnl* Mutante, um diese Annahme zu testen. Die Messung der absoluten Chlorophyllkonzentration, des Blühverhaltens und der Samengröße in der *slr gnc gnl* Mutante konnten eindeutig eine Suppression dieser physiologischen Parameter im Vergleich zur *slr* Mutante aufzeigen (Abbildung 23C – 23F). Im Zusammenhang mit den molekularen Beweisen für ARF7 als einen direkten Transkriptionsregulator von *GNC* und *GNL/CGA1*, und der Tatsache, dass *SLR* mit ARF7 interagiert, rückt daher *SLR* als weiteren Auxin-abhängigern Regulator beider GATAs in das Gesamtbild.

3.2.3. GA und *SPY* interagieren genetisch mit *ARF2*

Wie zuvor beschrieben sind *GNC* und *GNL/CGA1* direkte Zielgene der GA- und der PIF-abhängigen Antwort. Eine Modulation ihrer Transkriptlevel wird durch die Änderung der steuernden Faktoren bestimmt (Richter et al., 2010). Die weitere Beobachtung, dass *ARF2* ebenfalls ein Repressor der beiden GATAs ist, lies die Schlussfolgerung zu, dass *GNC* und *GNL/CGA1* Knotenpunkte der Auxin- und GA-Signalwege repräsentieren. Als Konsequenz daraus testete ich die *arf2* Mutante auf ihre GA-Responsivität, um zu verstehen, ob der *arf2* Phänotyp als Konsequenz einer veränderten GA-Antwort zu erklären ist. In diesen Zusammenhang konnte ich zunächst zeigen, dass die GA-Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1* in der *arf2* Mutante immer noch besteht (Abbildung 27C). Darüberhinaus sah ich auch keine Unterschiede im Abbau des DELLA-Repressorproteins RGA, und ebenso keine in der Expression der GA-Rezeptoren *GID1a*, *GID1b* und *GID1c* (Abbildung 25). Dies zeigte auf, dass der GA-Signalweg in der *arf2* Mutante nicht beeinträchtigt ist, und dass *ARF2* und der GA-Signalweg unabhängig voneinander funktionieren. Als einen weiteren Ansatz, um die Unabhängigkeit

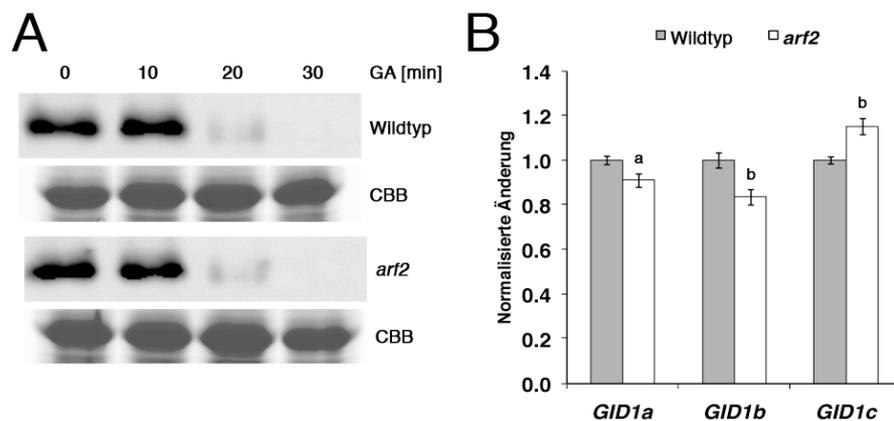


Abbildung 25: Der GA-Signalweg ist in der *arf2* Mutante nicht beeinträchtigt. **A**, Anti-RGA Immunoblot von Proteinextrakten 10 Tage-alter lichtgewachsener Wildtyp und *arf2* Keimlinge, die mit 100 μ M GA3 für die angegebene Zeit (Minuten) behandelt wurden. **B**, qRT-PCR Resultat für *GID1a-GID1c* Transkriptabundanz in 10 Tage-alten lichtgewachsenen Wildtyp- und *arf2* Keimlingen Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b).

der Auxin- und GA-Signalwege zu testen, kreuzte ich zum Beweis eine *PIF1-TAP* Überexpressionslinie in die *arf2* Mutante (Moon et al., 2008). Die Annahme hierbei war, dass die Stärke der Derepression der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription in der *arf2* Mutante durch *PIF1-TAP* gedämpft werden kann. Da ich in der Folge über qRT-PCR in *arf2 PIF1-TAP* im Vergleich zu *arf2* und *PIF1-TAP* intermediäre Transkriptlevel detektierte, sah ich meine Annahme bestätigt (Abbildung 26), dass der ARF2- und der GA/PIF-Signalweg unabhängig voneinander funktionieren. Die beobachtete Unabhängigkeit von Auxin und des GA-Signaltransduktionswegs auf Ebene der *GNC* und *GNL/CGA1* Regulation suggerierte, dass es möglich sein könnte, *arf2* Phänotypen durch GA-Gabe zu normalisieren. Daher habe ich die *arf2* Mutante über einen längeren Zeitraum mit GA behandelt und darüber

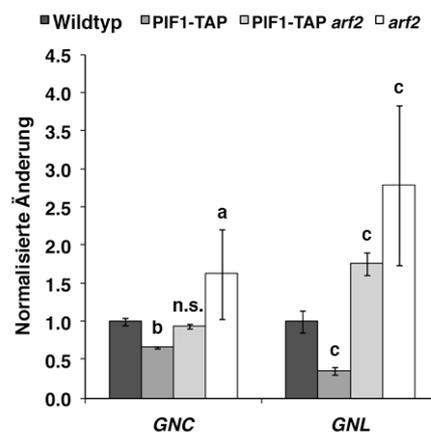


Abbildung 26: Intermediäre Expressionslevel von *GNC* und *GNL/CGA1* in *PIF1-TAP arf2*. Quantitative Analyse der Transkriptabundanz von *GNC* und *GNL/CGA1* 10 Tage-alter, lichtgewachsener Keimlinge angegebenen Phänotyps. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

hinaus die *spindly (spy)* Mutante in *arf2* eingekreuzt. Ich wählte die *spy* Mutante für dieses Experiment, da sie eine konstitutiv aktive GA-Antwort hat (Jacobsen and Olszewski, 1993). SPY modifiziert andere Proteine mit O-GlcNAc Resten und es wird diskutiert, ob das Fehlen dieser Modifikation an

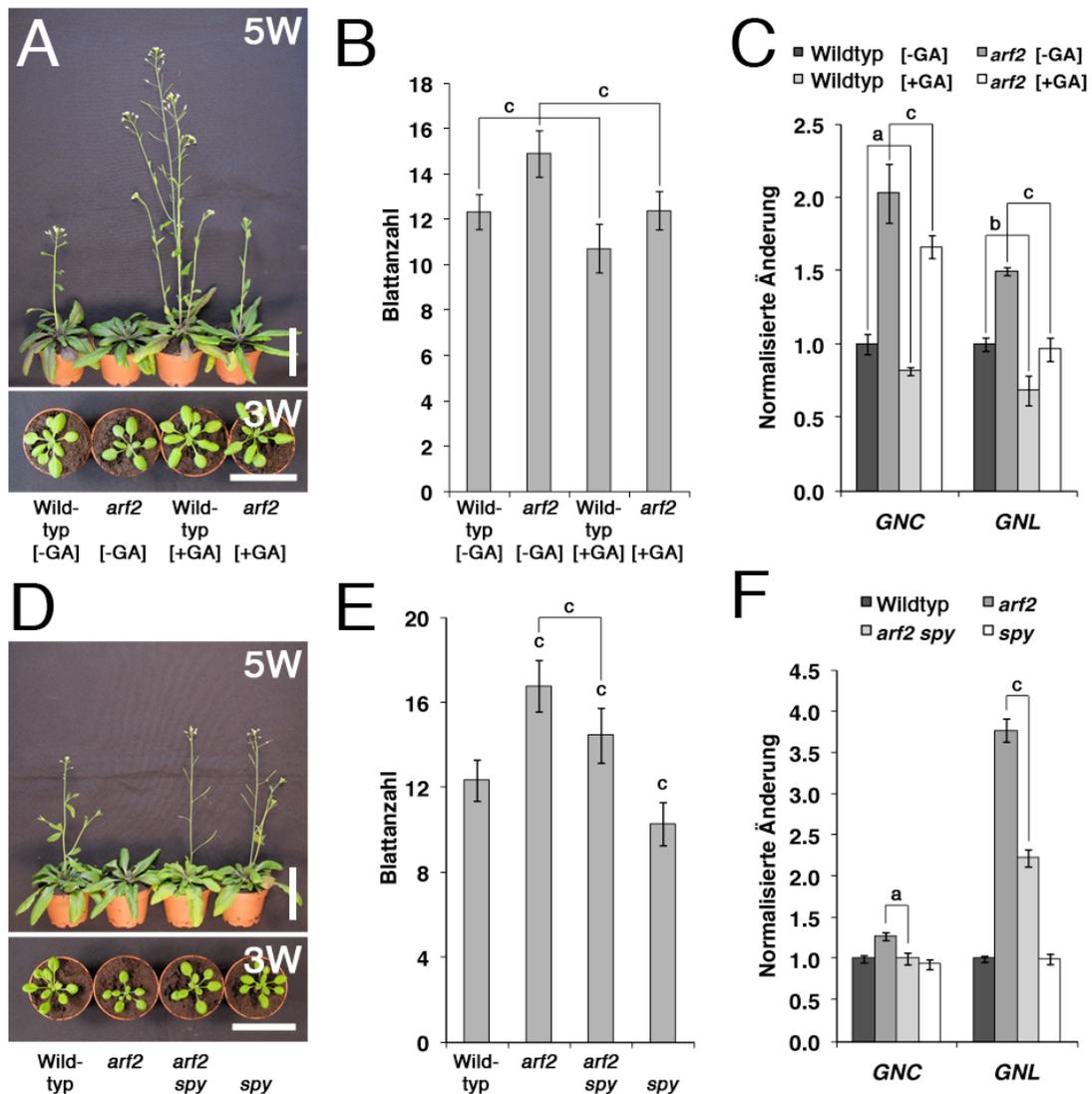


Abbildung 27: Eine Aktivierung des GA-Signalwegs führt zur Suppression des *arf2* Mutantenphänotyps. **A** und **D**, Repräsentative Fotos 5 (5W) und 3 (3W) Wochen-alter Pflanzen. Pflanzen in (**A**) wurden jeden zweiten Tag entweder ohne [-GA] oder mit 100 μ M GA3 [+GA] gewässert. **B** und **E**, Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt des Sprossauswuchses. **C** und **F**, qRT Analyse der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression. Expressionsanalyse in (**C**) nach 30-minütiger Kontroll- [-GA] und 100 μ M GA3-Behandlung [+GA]. Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

den DELLA-Repressorproteinen in der *spy* Mutante zum Verlust ihrer Aktivität führt (Jacobsen and Olszewski, 1993; Peng et al., 1999a; Silverstone et al., 2007; Steiner et al., 2012). Die Auswertung beider Experimente zeigte, dass

sowohl die GA-Behandlung als auch die *spy* zum Verlust des *arf2* mutanten Phänotyps führt (Abbildung 27). Ebenso zeigte die GA-Behandlung weiterer bekannter Mutanten des Auxinsignalweges (e.g. *arf7 arf19* und *arf2 arf7 arf19*) zumindest eine partielle Suppression des Blühphänotyps der Mutanten. Im Gegensatz dazu waren *GNC:GFP* und *YFP:GNL* Pflanzen, bei denen die GA-Regulation entkoppelt ist, GA-insensitiv und zeigten kein früheres Blühen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der beiden GATAs in der Regulation der Blühzeitkontrolle (Abbildung 28).

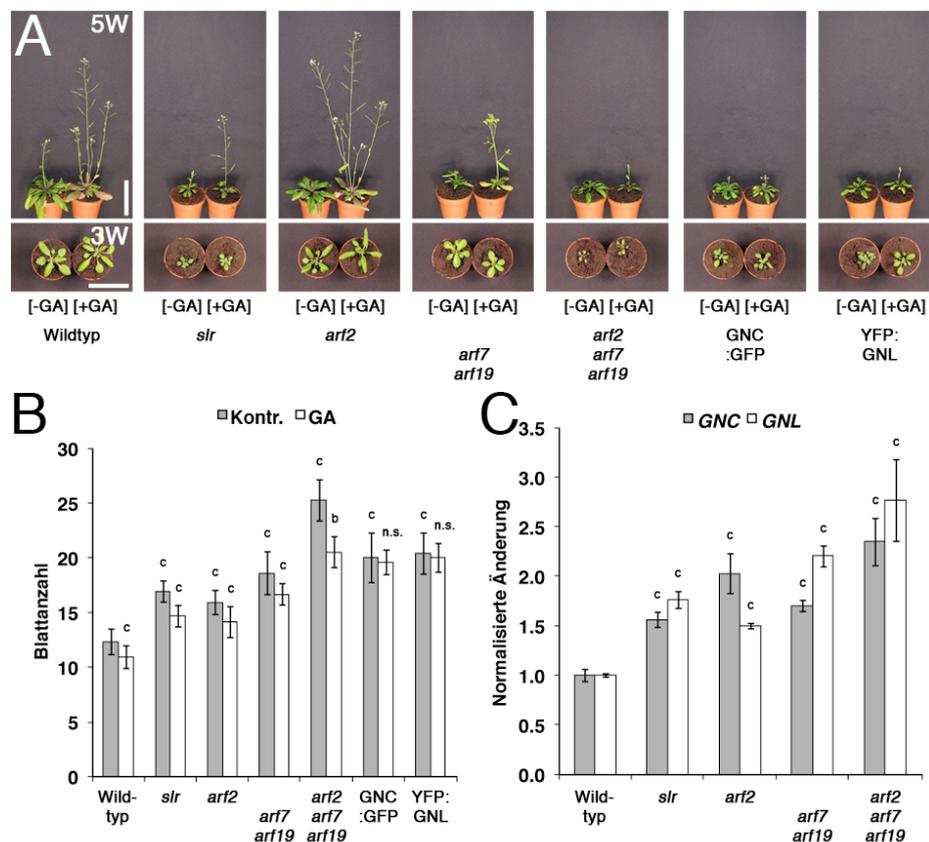


Abbildung 28: Die Auxinmutanten zeigen einen verspäteten Blühzeitpunkt. **A**, Repräsentative Fotos von 5 (5W) und 3 (3W) Wochen alten Pflanzen, die unter Langtag angezogen wurden. Die Pflanzen wurden jeden zweiten Tag einer Kontroll- (-GA) oder 100 μ M GA₃-Behandlung (+GA) unterzogen. **B**, Anzahl der Rosettenblätter zum Zeitpunkt des Sprossauswuchses unter Kontroll- (-GA) und 100 μ M GA₃-Behandlung (+GA). **C**, Quantifizierung der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz 10 Tage alter lichtgewachsener Keimlinge. Student's t-Test 0,01 $\leq P \leq$ 0,05 (a), 0,001 $\leq P \leq$ 0,01 (b), $P \leq$ 0,001 (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

3.2.4. ARF2 vermittelt eine GA-abhängige Repression der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1*

Um zu verstehen, ob der GA-Signalweg die Funktion von ARF2 und ARF7 beeinflusst, untersuchte ich in der Folge die transkriptionelle Regulation von *ARF2* als auch die des ARF2 Proteins. In einem Experiment, bei dem Keimlinge über einen Zeitraum von 8 Stunden in einem GA-haltigen Flüssigmedium inkubiert wurden, konnte ich eine Akkumulation von ARF2:GFP aufzeigen (Abbildung 29A). Um genauer zu verstehen, wie GA die ARF2:GFP Akkumulation reguliert, inkubierte ich Keimlinge mit GA und dem Proteinbiosyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX). Hier konnte ich beobachten, dass ARF2:GFP in beiden gewählten Bedingungen abgebaut wird, wohingegen es nach MG132 Gabe stabilisiert ist (Abbildung 29A). MG132 ist ein Inhibitor des 26S Proteasoms, was belegt, dass ARF2 durch das 26S Proteasom abgebaut wird. Andererseits scheint GA die Translation des Proteins zu stabilisieren (Abbildung 29A). Gleichermäßen konnte ich in einem ARF2:GFP CHIP-Experiment nach Gabe von GA eine verstärkte Anreicherung von ARF2:GFP an den proximalen AuxREs der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren zeigen. Im Gegensatz dazu, resultiert eine GA/CHX-Behandlung nicht in einer Anreicherung von ARF2:GFP (Abbildung 29B). Weiterhin konnte ich mittels einer qRT-Analyse für *GNC* und *GNL/CGA1* über denselben zeitlichen Verlauf eine GA-abhängige Repression der Transkriptabundanz im Wildtyp und in der *arf2* Mutante beobachten. Bemerkenswert ist hierbei jedoch die scheinbar schnelle Erholung der Transkription der beiden GATA Gene in der *arf2* Mutante (Abbildung 29C und 29D). Dies bedeutet, dass ARF2 für eine vollständige GA-Antwort bei der Regulation der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* benötigt wird.

Weiterhin testete ich die Möglichkeit einer differenziellen Proteinakkumulation von ARF7:MYC unter den gleichen zuvor für ARF2 benutzten Bedingungen. Interessanterweise konnte ich hier keine differenzielle Akkumulation des ARF7:MYC Proteins nach 8-stündiger Inkubation mit GA beobachten. Jedoch zeigen gleichzeitig die CHX-, CHX/GA- und CHX/MG132-Behandlungen, dass ARF7:MYC über das 26S

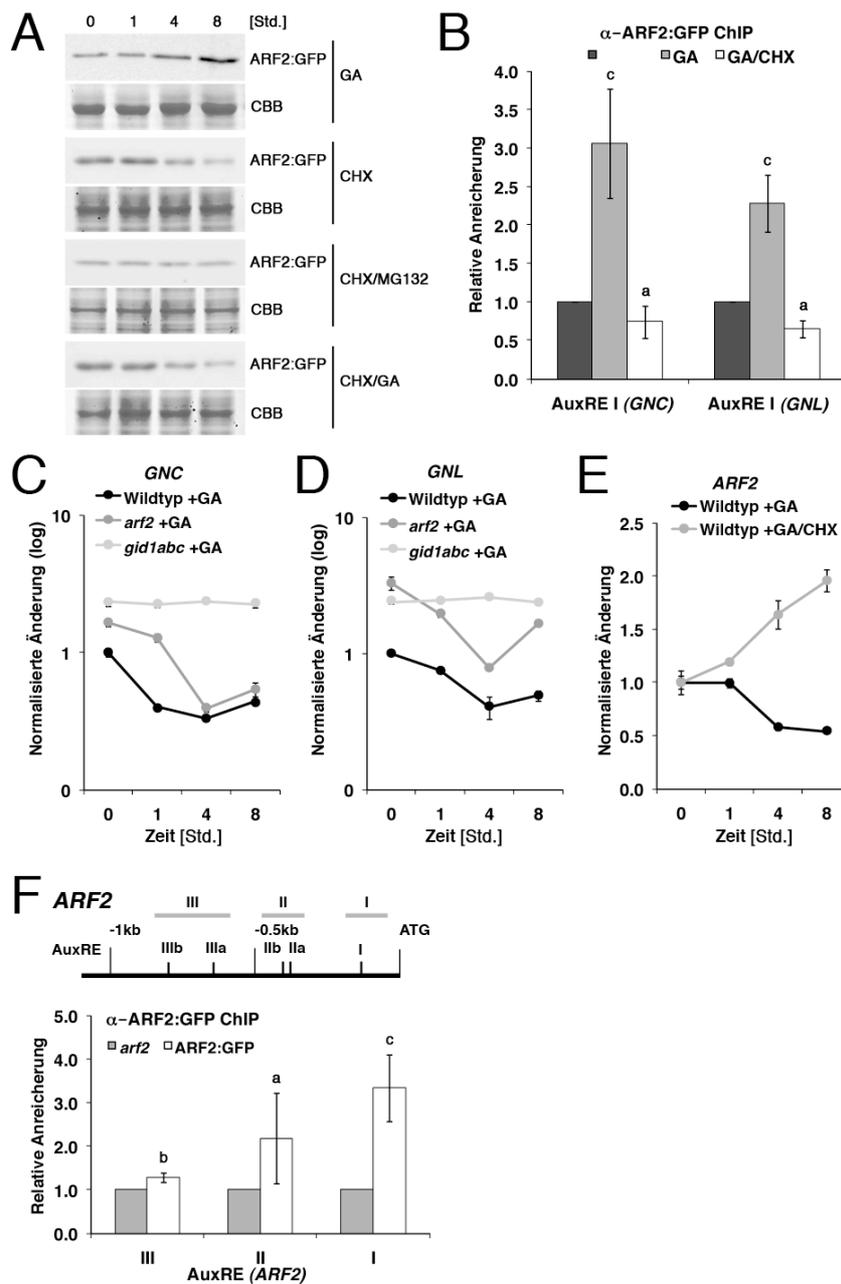


Abbildung 29: GA führt zu einer erhöhten ARF2 Proteinabundanz. **A**, ARF2:GFP Immunoblot-Analyse von 10 Tage-alten lichtgewachsenen Keimlingen, die mit 10 μM GA₃, 50 μM CHX und 100 μM MG132 behandelt wurden. **B**, ARF2:GFP ChIP-qPCR Analyse ausgewählter AuxRE in den Promotoren von *GNC* und *GNL/CGA1*. **C-E**, qRT-PCR Analyse für *GNC* (C), *GNL/CGA1* (D) und *ARF2* (E) nach Behandlung von 10 Tage-alten Keimlingen mit 10 μM GA₃ (C-E) und 50 μM CHX (E). **F**, Schema des *ARF2* Promotors mit den der vorhergesagten AuxRE (oberes Panel). ARF2:GFP ChIP-qPCR Resultat der vorhergesagten AuxRE im *ARF2* Promotor (unteres Panel). Student's t-Test $0,01 \leq P \leq 0,05$ (a), $0,001 \leq P \leq 0,01$ (b), $P \leq 0,001$ (c), n.s., statistisch nicht signifikant.

26S Proteasom abgebaut wird (Abbildung 30). Aus den Experimenten über das Verhalten der ARF Proteine unter Berücksichtigung des beobachteten Effektes von GA schlussfolgerte ich, dass nur ARF2, nicht jedoch ARF7, dieser post-translationalen Kontrolle unterliegt (Abbildung 31).

Als nächstes dehnte ich die Analyse der GA- und GA/CHX-Behandlung auf das Transkriptverhalten von *ARF2* aus. Interessanterweise konnte ich ein antagonistisches Verhalten zwischen der Akkumulation des ARF2:GFP Proteins und der des *ARF2* Transkripts beobachten. Dies lies auf eine negative *feedback* Kontrolle von ARF2 auf seine eigene Transkription schließen (Abbildung 29E). Durch eine gezielte Suche nach dem Vorhandensein kanonischer AuxREs im *ARF2* Promotor konnte ich mehrere solche Elemente identifizieren (Ulmasov et al., 1997a). Dies erlaubte mir die genauere Untersuchung der negativen *feedback* Kontrolle durch ARF2, indem ich ein ARF2:GFP ChIP-Experiment für die AuxRE des *ARF2* Promotors durchführte. In der Tat konnte ich für ARF2:GFP eine spezifische Bindung an proximal zum Translationsstart gelegene AuxREs des *ARF2* Promotors zeigen (Abbildung 29F).

Aufgrund der Beobachtung, dass GA zu einer Erhöhung der ARF2 Proteinlevel führt und ARF2 zugleich ein Repressor von *GNC* und *GNL/CGA1* ist, wollte ich die Dynamik des transkriptionellen Verlaufs beider Zielgene in Abhängigkeit von GA untersuchen. Dies zeigte mir, dass nicht nur das Vermögen in der *arf2* Mutante auf GA zu antworten weiterhin aufrecht erhalten ist, sondern auch, dass ARF2 für die volle Penetranz der GA-abhängigen Repression von *GNC* und *GNL/CGA1* benötigt wird. Diese Hypothese wurde zudem durch ein weiteres ARF2:GFP ChIP-Experiment bestätigt. Hier führte GA zu einer verstärkten Anreicherung von ARF2:GFP an jeweils einen der AuxREs in den *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren. Hingegen konnte ich dies nicht für die GA/CHX Situation beobachten, in der die ARF2 Proteinmengen nicht stabilisiert waren (Abbildung 29B). Dies unterstreicht die Wichtigkeit des ARF2 Proteins für die Regulation gemeinsamer Zielgene zweier unterschiedlicher Signalwege und auch für den Erhalt einer vollständigen GA-Antwort.

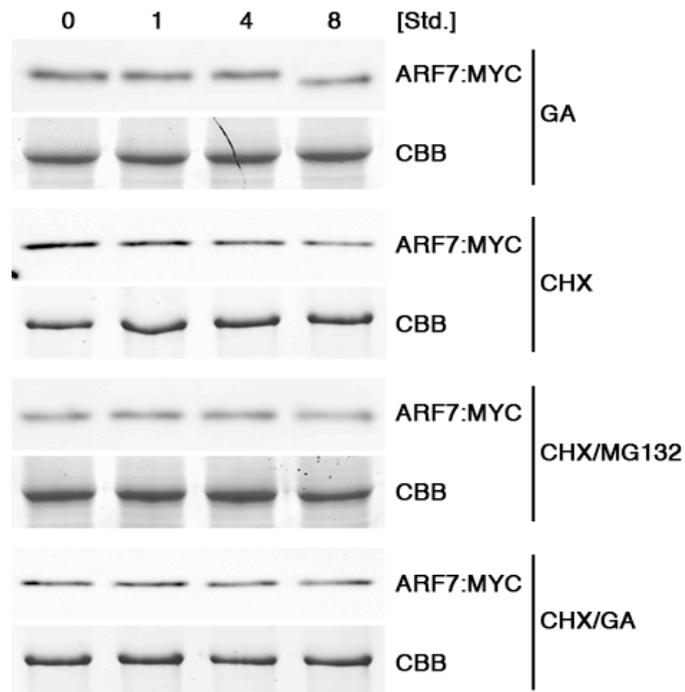


Abbildung 30: GA beeinflusst nicht die ARF7 Proteinabundanz. ARF7:MYC Immunoblot Analyse von 10 Tage-alten lichtgewachsenen Keimlingen, die mit 10 μM GA3, 50 μM CHX und 100 μM MG132 behandelt wurden.

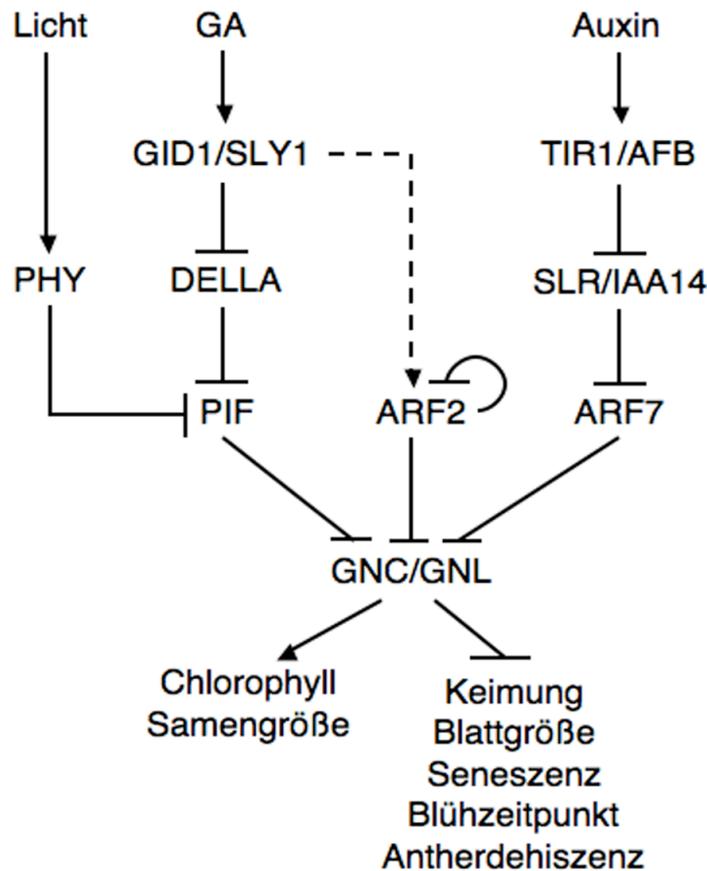


Abbildung 31: Modell der GA- und Auxin-vermittelten Modulation der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription. GA stimuliert den Abbau der DELLA-Repressorproteine, wodurch PIFs die Transkription von *GNC* und *GNL/CGA1* reprimieren. Licht reduziert über den Abbau der PIFs durch Phytochrome (PHY) die PIF-Aktivität. Auxin aktiviert hingegen ARF7 durch den Auxin-vermittelten Abbau von SLR. Dadurch kann ARF7 die *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription reprimieren. ARF2 ist ebenso ein Repressor der beiden GATAs und GA führt über einen noch unbekanntes Mechanismus zur Stabilisierung des ARF2 Proteins. Eine ARF2-Homöostaseregulation führt zumindest in Abwesenheit von GA zu einer Attenuation der *ARF2* Transkription.

4. Diskussion

Mit der „Grünen Revolution“ wurden in den 1960ern ertragreiche Weizen- und Reis-Sorten eingeführt, die im Verlauf von nur vier Jahrzehnten zu einer Verdopplung der Ernteerträge dieser Nutzpflanzen führte (Khush, 2001; Hedden, 2003). Die Identität von Zwergwuchs hervorrufenden und gleichzeitig Ernteertrag steigernden Gene wurde innerhalb der letzten 10 – 15 Jahre aufgeklärt. Kartierungen identifizierten dabei in Weizen und Reis jeweils Orthologe der *Arabidopsis* DELLA-Repressorproteine und Enzyme der GA-Biosynthese (e.g. GA20-Oxidasen und GA3-Oxidasen) als kausativ für den Zwergwuchs (Peng et al., 1999b; Monna et al., 2002; Sasaki et al., 2002; Spielmeier et al., 2002).

In *Arabidopsis* und Reis konnten in den letzten 15 Jahren eine Vielzahl an Komponenten des GA-Signalwegs identifiziert und charakterisiert werden. Man versteht weitgehend die Biosynthese der Gibberelline, deren Perzeption durch den GA-Rezeptor *GID1* und den GA-vermittelten Abbau der DELLAs über E3 Ubiquitinligasen (Schwechheimer, 2008). Weiterhin ist ein großes Repertoire an Mutanten bekannt, das aufzeigt, dass eine GA-Defizienz oder ein Block im GA-Signalweg zumeist einen stark pleiotropen Phänotyp hervorbringt. Dies wird durch die Interaktion der DELLAs mit einer stetig wachsenden Zahl an Transkriptionsfaktoren bedingt, die wiederum spezielle Einzelaspekte der GA-Antwort steuern (Schwechheimer, 2012).

In dieser Dissertationsarbeit wollte ich das Verständnis über den GA-Signalweg erweitern, indem ich nachgeschaltete Komponenten der GA-Antwort identifizieren und vertieft charakterisieren wollte. Mithilfe von Mutantanalysen wollte ich den genetischen und molekularen Grund der GA-Defizienz aufklären und das Verständnis über die Signaltransduktionskaskade des GA-Signalwegs erweitern. Meine Studien erlaubten mir die Identifizierung der homologen GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* als nachgeschaltete Komponenten des *Arabidopsis* GA-Signalwegs. Weiterhin zeigen die Funktionsverlustmutanten und Überexpressionslinien antagonistische Phänotypen, wobei die Überexpressionslinien der GATAs dem Mimikry einer

GA-Defizienz wie in der *ga1* Mutante sehr nahe kommen. In Anlehnung an die neuen Erkenntnisse über die beiden *Arabidopsis* GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* soll mit dieser Arbeit ebenso ein besseres Verständnis der „Grünen Revolution“ erhalten werden.

4.1. *GNC* und *GNL/CGA1* sind Repressoren des GA-Signalwegs und primäre Zielgene der PIFs

In meiner Dissertationsarbeit identifizierte ich die beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* als wichtige Zielgene der GA-, DELLA- und PIF-abhängigen Antwort. Phänotypische Analysen konnten antagonistische Regulationsweisen zwischen den Mutanten und den Überexpressionslinien für die Keimung, das Grünungsverhalten und des Blühzeitpunktes aufzeigen. Außerdem zeigten meine Studien, dass *GNC* und *GNL/CGA1* redundante Funktion haben. Die von mir beschriebenen Phänotypen belegen, dass diese GATA Faktoren eine wichtige Rolle in GA- und PIF-kontrollierten entwicklungsabhängigen Prozessen einnehmen (Schwechheimer and Willige, 2009). Außerdem konnte ich zeigen, dass die *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptabundanz nach Gabe von GA ab- und unter GA-Defizienz zunimmt. Durch Einkreuzen der *gnc* und *gnl* Mutanten in den *ga1* Hintergrund konnte ich eine partielle Suppression der GA-Defizienz von *ga1* erreichen. Daraus schlussfolgerte ich, dass beide Transkriptionsfaktoren wichtige Repressoren in einer GA-defizienten Situation darstellen. Angesichts der Tatsache, dass nur die *gnc gnl* Doppelmutation in der *ga1* Mutante eine deutliche Suppression gegenüber der *ga1* Einzelmutante erzielen konnte, kann erklärt werden, warum die GATAs zuvor von anderen durchgeführten Suppressorscreens nicht gefunden worden waren (Jacobsen and Olszewski, 1993; Wilson and Somerville, 1995; Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1997). Umgekehrt zeigte ein phänotypischer Vergleich der beiden Überexpressionslinien *GNC* und *GNL/CGA1* mit der *ga1* Mutante eine Vielzahl an phänotypischen Ähnlichkeiten, die auch auf molekularer Ebene durch eine vergleichende globale Genexpressionsanalyse gestützt wurden.

DELLA-Repressorproteine regulieren die Aktivität der PIFs durch Sequestration und verhindern damit deren Bindung an das Chromatin (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). In Hinblick auf die DELLA-abhängige Regulation der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkripte konnte ich überdies eine direkte Bindung von PIF3, exemplarisch für die Familie der PIFs, an die Promotoren der beiden GATAs demonstrieren. Verglichen mit *pif* Single- und Doppelmantanten konnte ich in der *pif* Quadrupelmutante (*pifQ*) die stärkste Derepression der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression beobachten. Weiterhin zeigte eine globale Transkriptomanalyse dieser *pifQ* Mutante mit den GATA Überexpressionslinien einen starken transkriptionellen Überlapp auf. Damit war ich in der Lage, PIF3 als Repressor der beiden GATAs zu positionieren. Bisher waren die PIF Transkriptionsfaktoren nur als transkriptionelle Aktivatoren beschrieben worden (Moon et al., 2008). Eine der ersten Ausnahmen hierbei bildete die *PHYTOENE SYNTHASE (PSY)*, die während meiner Dissertationsarbeit als ein direktes Zielgen einer Repression durch PIF1 identifiziert wurde (Toledo-Ortiz et al., 2010). Gestützt wurden diese Hinweise auf eine Repressoraktivität der PIFs durch globale Genexpressionsanalysen in Kombination mit ChIP Analysen. Dabei wurde herausgefunden, dass PIF1 und PIF3 sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren können (Monte et al., 2004; Oh et al., 2009; Sentandreu et al., 2011).

Weiterhin ist wichtig anzumerken, dass PIFs über die Phytochrome dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Ni et al., 1999; Al-Sady et al., 2006). *GNL/CGA1* war zuvor von anderen als ein Gen identifiziert worden, das lichtabhängig und *phyB*-abhängig induziert wird (Naito et al., 2007). Angesichts dieser Tatsache konnten *in silico* Analysen anschaulich eine Antikorrelation der beiden GATAs mit *evening-phased* Genen, wie zum Beispiel *PIF3* demonstrieren (Manfield et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass *GNC* und *GNL/CGA1* nicht nur lichtabhängig sondern auch PIF3-abhängig reguliert werden. Weitere Indizien für eine PIF-vermittelte Repression von *GNC* und *GNL/CGA1* kann man im Phänotyp der *phyB* Mutante finden. Diese sieht den beschriebenen Überexpressionslinien von PIF3, PIF4 und PIF5

auffallend ähnlich (Reed et al., 1993; Matsushita et al., 2003). Gekennzeichnet sind sie durch ein früheres Blühen und durch ihr hellgrünes Erscheinungsbild – Phänotypen, die ich für die *gnc gnl* Doppelmutante beschreiben konnte (Lorrain et al., 2008; Kumar et al., 2012). Viel interessanter ist jedoch die Beobachtung, dass die *phyB* Mutante mit der *ga1* Mutante genetisch interagieren kann und dass die *phyB* Mutante eine Vielzahl an Phänotypen der GA-defizienten *ga1* Mutante supprimiert (Blazquez and Weigel, 1999). Dies ließe sich durch eine in der *phyB* Mutante ausgeprägte Suppression der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression erklären. Folglich stellen *GNC* und *GNL/CGA1* wichtige Grundpfeiler der Licht-, *phyB*- und PIF-vermittelten Antwort dar.

PIF1 und PIF3 reprimieren auch die Entwicklung der Chloroplasten und die Biosynthese des Chlorophylls in dunkelgewachsenen Keimlingen (Moon et al., 2008; Stephenson et al., 2009). Zum Beispiel konnte für PIF1 eine direkte Bindung an den Promotor von *POR C* demonstriert werden und eine indirekte Regulation weiterer Biosynthesegene der Tetrapyrrole nachgewiesen werden (Huq et al., 2004; Moon et al., 2008). In Anbetracht der Tatsache, dass *GNC* und *GNL/CGA1* primäre Zielgene von PIF3 darstellen und unter Berücksichtigung der redundanten Funktion der PIFs, so scheinen *GNC* und *GNL/CGA1* essentielle Bestandteile für die Regulation der Chlorophylle in Licht zu sein, deren Expression von den PIFs geregelt sein mag (Richter et al., 2010; Hudson et al., 2011). Gleichfalls wird diese Hypothese durch die Beobachtung erklärt, dass Keimlinge der Überexpressionslinien im Dunkeln, ähnlich wie die *pifQ* Mutante, kürzere Hypokotyle haben (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf eine durch *GNC* und *GNL/CGA1* vermittelte photomorphogenetische Regulation schließen.

Kürzlich wurde beschrieben, dass die PIFs PIF1 und PIF4 und der BR-Regulator BZR1 kooperativ funktionieren und damit konnte die Ähnlichkeit zwischen dem Licht- und BR-abhängigen Signalwirkung erklärt werden (Oh et al., 2012). BR vermitteln weitgehend die gleichen physiologischen und zellulären Prozesse wie sie für GA und die PIFs beschrieben wurden (Jaillais and Chory, 2010; Jaillais and Vert, 2012). Interessanterweise wurden die

beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* als Zielgene dieser kooperativen Regulation beschrieben (Luo et al., 2010; Richter et al., 2010; Bai et al., 2012; Oh et al., 2012). Hierbei offenbaren Transkriptomanalysen eine BR-abhängige Repression beider GATAs und ferner konnte eine Bindung von BZR1 durch ChIP-Seq Analysen demonstriert werden (Sun et al., 2010b). In diesem Zusammenhang könnte also die DELLA-PIF und insbesondere die DELLA-BZR1 Interaktion für die transkriptionelle Kontrolle von *GNC* und *GNL/CGA1* maßgebend sein. Dabei moduliert die PIF-Aktivität die Stärke des transkriptionellen als auch des physiologischen *read-outs* der BZR1-vermittelten Antwort (Abbildung 32) (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Bai et al., 2012).

Außerdem wurde berichtet, dass *GATA2* und *GATA4* positive Regulatoren der Photomorphogenese sind und dass die Transkription der beiden GATAs über BR und BZR1 integriert ist (Luo et al., 2010). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass die beiden GATAs *GATA2* und *GATA4* in einem CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1)-vermittelten Prozess abgebaut werden können (Luo et al., 2010). Obwohl die beiden GATAs zu *GNC* und *GNL/CGA1* phylogenetisch nur entfernt verwandt sind, so teilen ihre Gene bzw. Mutanten eine Vielzahl an regulatorischen, physiologischen und morphologischen Eigenschaften (Luo et al., 2010; Richter et al., 2010). Dies lädt zur Hypothese ein, dass die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* womöglich ebenfalls einem COP1-vermittelten Proteinabbau unterliegen könnten.

Zusammenfassend konnte ich mit der Identifizierung der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des GA-Signalweges leisten. Interessanterweise werden die beiden GATAs über eine vielschichtige Kaskade der Derepression gesteuert, beginnend mit dem GA und endend in der Repression der GATAs (Abbildung 32). Darüber hinaus stellen sie wichtige Regulatoren einer Vielzahl an GA-vermittelten entwicklungsabhängigen Prozessen dar.

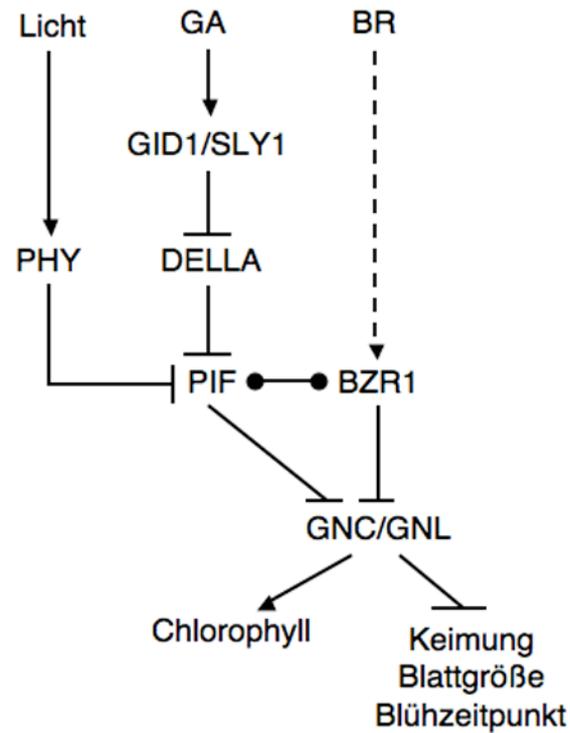


Abbildung 32: Modell der GA- und BR-vermittelten Modulation der GNC und GNL/CGA1 Transkription. Modifiziertes Modell der Abbildung 17, in der BR die Aktivität vom BR-Transkriptionsregulator BZR1 positiv reguliert, so dass PIFs und BZR1 Heterodimere ausbilden und die G-Boxen innerhalb ihrer Zielgene binden können, wodurch die Expression der PIF- und BZR1-Zielgene gesteuert wird. GNC und GNL/CGA1 konstituieren in dem präsentierten Modell auch BZR1-Zielgene (Modifikationen aus Sun et al., 2010; Oh et al., 2012).

4.2. Der Auxin- und der GA-Signalweg konvergieren an der Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1*

Mit dieser Arbeit konnte ich auch zeigen, dass *GNC* und *GNL/CGA1* gemeinsame kritische Zielgene des Auxin- und des GA-Signalwegs sind und dass sie gemeinsam wichtige physiologische Prozesse steuern. Weiterhin konnte ich demonstrieren, dass beide Signalwege parallel zueinander agieren. Außerdem erfolgt die Auxin-vermittelte Repression der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* direkt über bestimmte ARF Transkriptionsfaktoren. Über die Stimulation des GA-Signalweges, entweder durch GA-Behandlungen oder durch Einkreuzen der GA-Signalwegmutanten *gnc*, *gnl* und *spy* konnte ich jeweils die *arf2* Auxinantwortmutante zumindest partiell retten (Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 27). Dies veranschaulicht, dass *GNC* und *GNL/CGA1* wichtige Regulatoren der Auxin- und GA-Signalwege sind und dass die Aktivität des Auxinsignalwegs durch den GA-Signalweg moduliert werden kann (Abbildung 33).

Wenig Aufmerksamkeit wurde bisher den Mutanten der Auxinantwort im Zusammenhang mit deren physiologischen Funktionen geschenkt, da zumeist das Interesse in der Aufklärung ihrer Beteiligung an entwicklungsabhängigen und morphologischen Prozessen galt (De Smet et al., 2010). Nur wenige Mutanten wie beispielsweise *arf2*, *arf7/nph4*, *arf7/nph4 arf19* waren bislang mit physiologischen Defekten wie Änderungen im Grünungsverhalten, in der Seneszenz und im Blühzeitpunkt gebracht worden (Fukaki et al., 2002; Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005a; Okushima et al., 2007). Die Identität der relevanten Zielgene dieser Genexpressionsregulatoren war bisher im Verborgenen geblieben. Mit der Identifizierung von *GNC* und *GNL/CGA1* als direkte Zielgene von ARF2 und ARF7 konnte ich die molekulare Grundlage für die Phänotypen der *arf2* und *slr* Mutanten beschreiben. Meinem Wissen nach wurden bisher keine Suppressoren der *arf2* Mutanten gefunden. Daher kann man die genetische Suppression von *arf2*, und auch von *slr*, durch die *gnc* und *gnl* Mutanten als wichtigen Fortschritt im Verständnis dieser Regulatoren betrachten. Da ich durch eine globale Genexpressionsanalyse weiter zeigen kann, dass circa

45% der Gene, die in *arf2* misreguliert sind, in *arf2 gnc gnl* wieder normalisiert sind, wird dies weiter verdeutlicht.

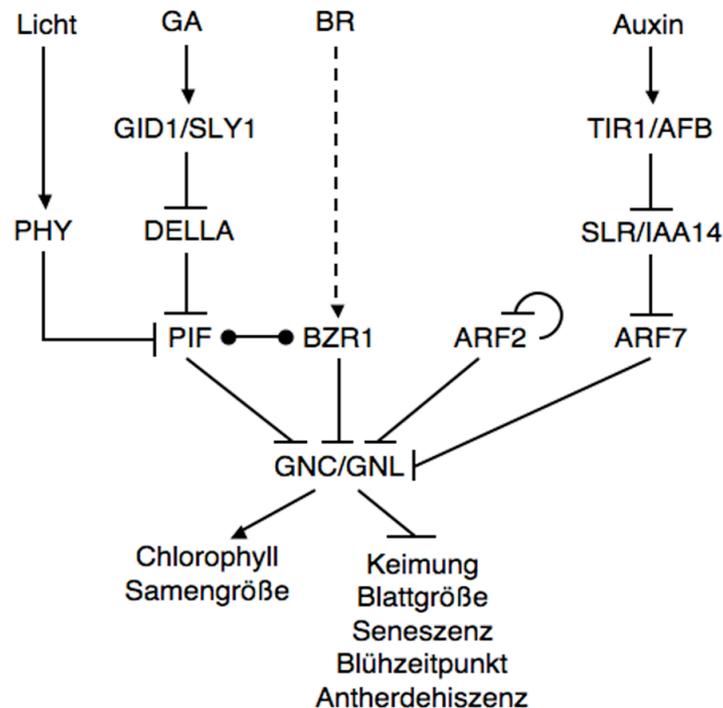


Abbildung 33: Modell der Auxin-, GA- und BR-vermittelten Modulation der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription (1). Modifiziertes Modell der Abbildung 32, in der Auxin den proteasomalen Abbau von SLR/IAA14 hervorruft, wodurch der Transkriptionsregulator ARF7 aktiviert wird, da die inhibitorische Interaktion zwischen ARF7 und SLR/IAA14 aufgehoben wird. Dadurch kann ARF7 an die AuxRE in den Promotoren der GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* binden und die Expression der beiden Gene reprimieren. ARF2 kann auch die AuxRE innerhalb der Promotoren der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* binden, wodurch eine Auxin-unabhängige Repression der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression erreicht wird. Darüber hinaus bindet ARF2 die AuxRE innerhalb seines eigenen Promotors, wodurch eine Attenuation der *ARF2* Expression erreicht wird.

Eine weitere Besonderheit dieser Arbeit liegt in der Neudefinierung der regulatorischen Charaktereigenschaft von ARF7. Bisher herrschte die Meinung, dass ARF7 ein Transkriptionsaktivator ist. Dies beruhte auf *in-vitro* Analysen in Karotten-Protoplasten, bei denen die ARFs entsprechend ihres Vermögens einen Reporter zu regulieren entweder in aktivierende oder reprimierende ARFs eingeteilt worden waren (Ulmasov et al., 1999b; Tiwari et

al., 2003). Zudem testete man dort die Bindung der ARFs an ein künstliches DR5 Element (Ulmasov et al., 1997a; Tiwari et al., 2003). Mittlerweile weiss man, dass die Umgebung der AuxREs eine wichtige Rolle für die ARF-Bindenspezifität haben (Ulmasov et al., 1997a; Ulmasov et al., 1997b). Folglich liefert meine Arbeit mit der Beobachtung einer direkten Bindung von ARF7 an die AuxREs innerhalb der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren den allerersten Beweis dafür, dass ARF7 auch *in planta* den Charakter eines Repressors haben kann.

Aufgrund der einfachen Form der Klassifizierung der ARFs in Aktivatoren und Repressoren, wurden Ambivalenzen für die Aktivität der ARFs ausgeschlossen (Vernoux et al., 2011). Eine globale Genexpressionsanalyse für die *arf7 arf19* Doppelmutante offenbarte jedoch, dass einer Vielzahl an ARF7- und ARF19-regulierten Genen die Auxinresponsivität in der *arf7 arf19* Doppelmutante verloren ging. Davon leitet man eine Dualität in der Funktionalität der ARFs ARF7 und ARF19 als Aktivatoren oder Repressoren ab (Okushima et al., 2005b). Interessanterweise besitzt ARF19 ein LxLxL Motiv und Hefe-2-Hybridstudien konnten ferner belegen, dass in der Tat zwischen ARF19 und dem Korepressor TOPLESS (TPL)/TPL-Related (TPR), welcher LxLxL Motive bindet, eine physische Interaktion existiert (Lokerse and Weijers, 2009; Causier et al., 2011). Spekulationen über eine heterotypische Interaktion zwischen den vermeintlich als aktivatorisch klassifizierten ARFs ARF7 und ARF19 kamen auf, die durch die Rekrutierung des transkriptionellen Korepressors TPL/TPR auch als Repressoren in einem hochmolekularen Komplex vorliegen und agieren könnten.

Ein überaus bemerkenswerter Phänotyp der *arf2* Mutante ist die vergrößerte Samenschale (Ellis et al., 2005). Dieser Phänotyp ist auf extra Zellteilungen der inneren und äußeren Integumente der Ovule zurückzuführen, was zu einer erhöhten Anzahl beider Zellreihen führt (Schruff et al., 2006). Mit der Beobachtung der erhöhten *GNC* und *GNL/CGA1* Transkriptlevel in *arf2* konnte ich überdies eine Korrelation zwischen der Transkriptabundanz und der Samengröße feststellen. Außerdem konnte ich

diese Zunahme gleichfalls für die Samen der GNC:GFP und YFP:GNL transgenen Linien beobachten. In Übereinstimmung mit den vorherigen Resultaten, dass *GNC* und *GNL/CGA1* Transkripte mit der Anwesenheit der DELLA-Repressorproteinen korrespondieren, konnte ich in der gleichen Weise für die einfachen und komplexen GA-Rezeptormutanten *gid1a-c* eine Zunahme in der Samengröße dokumentieren. Tatsächlich ist dies meinem Wissen nach der erste Bericht, in dem dem GA-Signalweg eine funktionelle Rolle in der Regulation der Samengröße zugeschrieben werden konnte. Bisher konnte nur über *in-situ* Hybridisierung der Nachweis von *RGL1* in den Integumenten offen gelegt werden, jedoch fehlt gänzlich eine Beschreibung und funktionelle Analyse zu *RGL1* und gegebenenfalls auch den Genen der anderen DELLA-Repressorproteine in diesem Gewebe (Wen and Chang, 2002).

Die Blattseneszenz ist ein entwicklungsabhängiger, genetisch festgelegter und programmierter Degenerationsprozess, der die Lebensspanne oder Langlebigkeit eines Blattes begrenzt (Lim et al., 2003). Charakterisiert ist sie durch das Einstellen der Photosynthese, einem starken Verlust an Chlorophyllen, der Desintegration von Zellorganellen und durch Lipidperoxidationen (Buchanan-Wollaston, 1997). Die primären Mediatoren der oxidativen Schäden der Blattseneszenz sind hierbei die reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass die *arf2/oresara14 (ore14)* Mutante die Blattseneszenz unterdrückt und dass dies vermeintlich über eine ROS Detoxifikation erfolgt (Lim et al., 2010). Im Rahmen meiner Studien konnte ich für den Fall der GNC:GFP und YFP:GNL Überexpression eine verzögerte Blattseneszenz beschreiben, die ebenfalls in der *arf2* Mutante zu beobachten ist. Einen Bezug zur ROS-abhängigen Regulation der Seneszenz durch die beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1*, und dies in Abhängigkeit zur *arf2* Mutante gesetzt, kann ich hier nicht nehmen, da meines Wissens bis heute keine Studien zu diesem Thema veröffentlicht wurden. Eine Verbindung könnte allenfalls die als vermindert beschriebene ROS Akkumulation in der *ga1* Mutante bringen (Achard et al., 2008a). Dabei stellen

die DELLA-Repressorproteine die Vermittler in der Rekrutierung ROS-detoxifizierender Enzyme dar und garantieren somit höhere Überlebensraten unter ROS-auslösenden Situationen (Achard et al., 2008a).

Eine wichtige Rolle für den Erhalt von fertilen Blüten liegt in der präzisen Koordination der Entwicklung der Stamen und des Pistills. Mutanten wie die des GA- (e.g. *ga1*, *sly1*, *gid1*) und die des Auxin-Signalweges (e.g. *arf2*, *arf6*, *arf8*) zeigen eine männliche Sterilität, die entweder auf eine reduzierte Elongation der Antherfilamente, auf eine verringerte Pollenreifung oder auf eine eingeschränkte Antherdehiszenz zurückgeht (Koornneef and van der Veen, 1980; Ellis et al., 2005; Nagpal et al., 2005; Griffiths et al., 2006). Für die GNC:GFP und YFP:GNL Überexpressionslinien konnte ich ebenfalls eine stark beeinträchtigte Fertilität beobachten (Daten nicht gezeigt). Der Grund dafür liegt im verringerten Streckungswachstum der Antherfilamente ähnlich wie für die *arf2* Mutante beschrieben. Des Weiteren verdeutlicht dies, dass die Kontrolle über die Expression der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* für den Reproduktionserfolg einer Pflanze während der Stamenentwicklung fein abgestimmt sein muss.

Unerwarteterweise konnte ich mit dieser Arbeit die vorherrschende Sichtweise über den Auxin-GA *crossstalk* mit der Enthüllung eines weiteren molekular definierten Mechanismus erweitern, bei dem GA zu einer Stabilisierung des ARF2 Repressorproteins führt (Abbildung 34). Daraus ergibt sich eine länger anhaltende Repression auf die Transkription der beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1*. Weiterhin ist die GA-vermittelte Stabilisierung von ARF2 dominant über die ARF2-vermittelte Repression der *ARF2* Transkription. Im Gegensatz dazu zeigen die Experimente für ARF7, dass die Kontrolle von GA auf die differenzielle Proteinakkumulation für ARF2 spezifisch zu sein scheint. ARF2 gehört zur Gruppe der ARF-, wohingegen ARF7 ein ARF+ ist (Vernoux et al., 2011). Möglicherweise beschränkt sich diese differenzierte GA-abhängige Kontrolle nur auf ARF2 und eventuell auf andere ARF- wie beispielsweise das ARF2-Homolog ARF1. Aufgrund des Fehlens einer Interaktion zwischen ARF2 und den Aux/IAAs vermag GA das Regulationsgleichgewicht zwischen ARF2 und ARF7, und eventuell anderen

ARF, zu verschieben. Infolgedessen kann ARF7 verstärkt von den *cis*-Elementen gemeinsamer Zielgene von ARF2 verdrängt werden und folglich wird die transkriptionelle Kontrolle von Auxin entkoppelt. Gemessen am Auxin-abhängigen ChIP Experiment für ARF2 und ARF7, könnten die beiden ARFs sich womöglich gegenseitig von der Bindung an die AuxREs der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren hindern. Ein Experiment unter Langzeitinkubation mit Auxin könnte dies klären. Davon könnte dann abgeleitet werden, dass die beiden Hormone Auxin und GA über Homöostaseregulation der beiden Gruppen von ARFs, ARF- und ARF+, aktiv die Bindungsaffinitäten der ARFs modulieren und kontrollieren können (Abbildung 34).

Die *slr* Mutante hat eindrucksvoll veranschaulicht, dass die Expression einer stabilisierten Form des andererseits Auxin-labilen Aux/IAAs zum

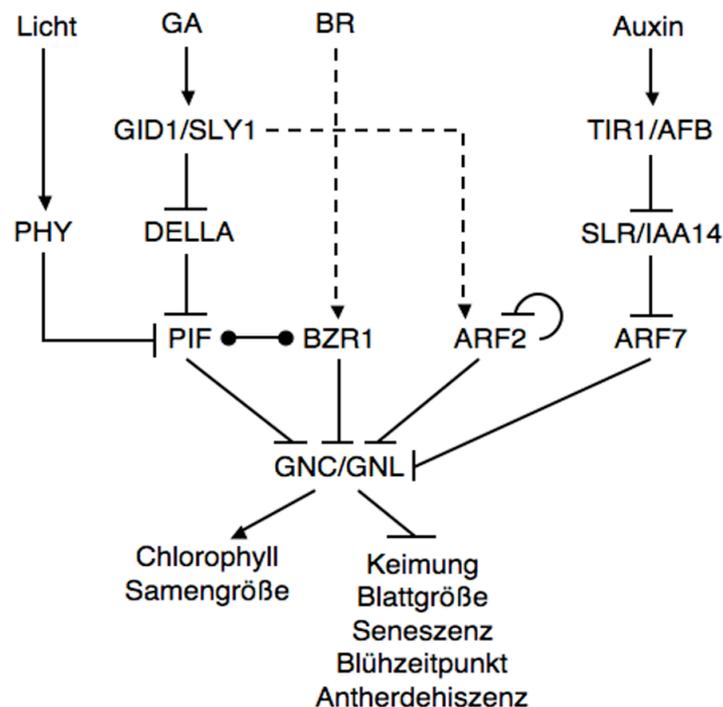


Abbildung 34: Modell der Auxin-, GA- und BR-vermittelten Modulation der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription (2). Modifiziertes Modell der Abbildung 33, in der GA zu einer Stabilisierung vom ARF2 Protein führt, wodurch ARF2 die AuxREs innerhalb der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren verstärkt besetzt und folglich deren Expression verstärkt reprimieren kann. Zugleich sichert dieser Mechanismus der post-transkriptionellen Kontrolle des ARF2 Proteins durch Bindung an seinen eigenen Promoter eine verstärkte Repression der *ARF2* Transkription.

gleichen Phänotyp wie die der Überexpression von *GNC* und *GNL/CGA1* führt. Weitere Aux/IAAs, wie beispielsweise *crane/iaa18* und *shy2/iaa3*, die Mutationen im Degronmotiv besitzen, zeigen Phänotypen, die sich auch durch eine erhöhte Expression der GATAs erklären ließen (Kim et al., 1996; Kim et al., 1998; Uehara et al., 2008; Ploense et al., 2009). Interessanterweise hat die *shy2/iaa3 gain-of-function* Mutante einen photomorphogenen Phänotyp im Dunkeln (Kim et al., 1998). Meine Studien über *GNC* und *GNL/CGA1* legen nahe, dass beide GATAs Determinanten der Photomorphogenese sind. Überdies konnte ich für *GNC* und *GNL/CGA1* erhöhte Transkriptlevel in der *shy2/iaa3* Auxinsignalwegmutante beobachten (Daten nicht gezeigt).

Einen weiteren *Crosstalk* konnte man für ARF2 und den BR-Signalweg beobachten, bei dem BRs die Inaktivierung der GLYKOGENSYNTHASE-KINASE 3 (GSK3) BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 (BIN2) hervorrufen, wodurch die BR-regulierte Kinase BIN2 das Vermögen den Transkriptionsregulator ARF2 zu phosphorylieren verliert und damit die Bindeaffinität von ARF2 für kanonische AuxREs innerhalb der Promotoren ARF2-abhängiger Zielgene erhöht (Abbildung 35) (Ulmasov et al., 1997a; Li et al., 2001; Li and Nam, 2002; Vert et al., 2008; Kim and Wang, 2010).

Brassinosteroide rufen auch die Expression der transkriptionellen Korepressoren IAA5 und MSG2/IAA19 hervor, wodurch der freie Pool der AuxIAAs verschoben wird und dadurch verstärkt heterotypische ARF-IAA Interaktionen ausgebildet werden (Nakamura et al., 2003). Für den von mir hier betrachteten Fall könnte man für *GNC* und *GNL/CGA1* ableiten, dass die Aktivierung des BR-Signalwegs in einer sekundären Antwort über die differenzielle Regulation der Aux/IAAs die damit verbundene ARF7-vermittelten Repression der *GNC* und *GNL/CGA1* Expression dämpft.

Des Weiteren ist bekannt, dass das Pflanzenhormon Zytokinin die photomorphogene Entwicklung dunkelgewachsener Keimlinge auslösen kann (Su and Howell, 1995). Interessanterweise konnte für *SHY2/IAA3* eine Zytokinin- und B-Typ *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1* (*ARR1*)- und *ARR12*-abhängige Regulation des Wurzelmeristemwachstums gezeigt werden (Sakai et al., 2000; Dello Iorio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010).

Die Tatsache, dass die Transkriptabundanz von *GNC* und *GNL/CGA1* in der *shy2/iaa3* gain-of-function Mutante erhöht ist, lässt einen weiteren *Crosstalk* zwischen den Hormonen Auxin, Zytokinin und GA möglich erscheinen. Dies könnte man in der Tat als Hinweis darauf deuten, dass die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* den molekularen Grund für den beobachteten Phänotyp in der *shy2/iaa3* Mutante sind.

Die B-Typ ARR_s stellen aktivatorische Transkriptionsfaktoren dar, zu denen ARR1 und dessen funktionelle Homologe ARR10 und ARR12 gehören (Sakai et al., 2000; Taniguchi et al., 2007; Ishida et al., 2008). Weitere Berichte zeigen, dass eine volle Zytokinin-abhängige Expression der beiden GATAs von der transkriptionellen Aktivität der ARR_s ARR1 und ARR10 abhängt (Brenner et al., 2005; Köllmer et al., 2011; Chiang et al., 2012). Andererseits wird die B-Typ ARR-abhängige Zielgenexpression durch die Attenuatoren der A-Typ ARR_s gedämpft (To et al., 2007). In einer A-Typ ARR7-abhängigen globalen Genexpressionsstudie konnte gezeigt werden, dass die beiden GATAs *GNC* und *GNL/CGA1* erhöhte Genexpressionslevel in der ARR7 Überexpressionslinie aufwiesen, was bedeutet, dass womöglich *GNC* und *GNL/CGA1* auch Zielgene von ARR7 darstellen könnten (Lee et al., 2007). ARR4, ein weiterer Vertreter der A-Typ ARR_s, besitzt das Vermögen mit der Pfr-Form des PHYB zu interagieren. Dies verhilft die Reversion des aktiven PHYB in die inaktive Pr-Form zu verhindern und verstärkt somit den PHYB-abhängigen Signalweg (Sweere et al., 2001). Eine Ausdehnung auf weitere Mitglieder der Klasse der A-Typ ARR für die Interaktion mit der Pfr-Form des PHYB konnte bisher nicht demonstriert werden. Es ist jedoch interessant anzumerken, dass womöglich durch A-Typ ARR_s hervorgerufene transkriptionelle Änderungen Zytokinin-regulierter Gene über das PHYB-PIF Modul verlaufen könnten (Abbildung 35).

Als Ausblick hierfür wäre von höchstem Interesse zu verstehen, inwiefern die A-Typ ARR_s die Expression von *GNC* und *GNL/CGA1* über das PHYB-PIF Modul steuern können und dies gegebenenfalls in einen physiologischen Kontext wie beispielsweise den der Kälteresistenz zu bringen. Zumindest konnten für die A-Typ ARR_s *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* und

ARR15 Änderungen in der Kälteakklimatisierung und der damit einhergehenden Kälteresistenz berichtet werden (Jeon et al., 2010; Shi et al., 2012). Darüber hinaus wäre die Aufklärung des Zusammenspiels des Zytokininsignalwegs und der Zytokinin-regulierten Aux/IAAs für eine kombinierte Regulation der beiden GATA-Typ Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL/CGA1* von enormer Bedeutung (Abbildung 35).

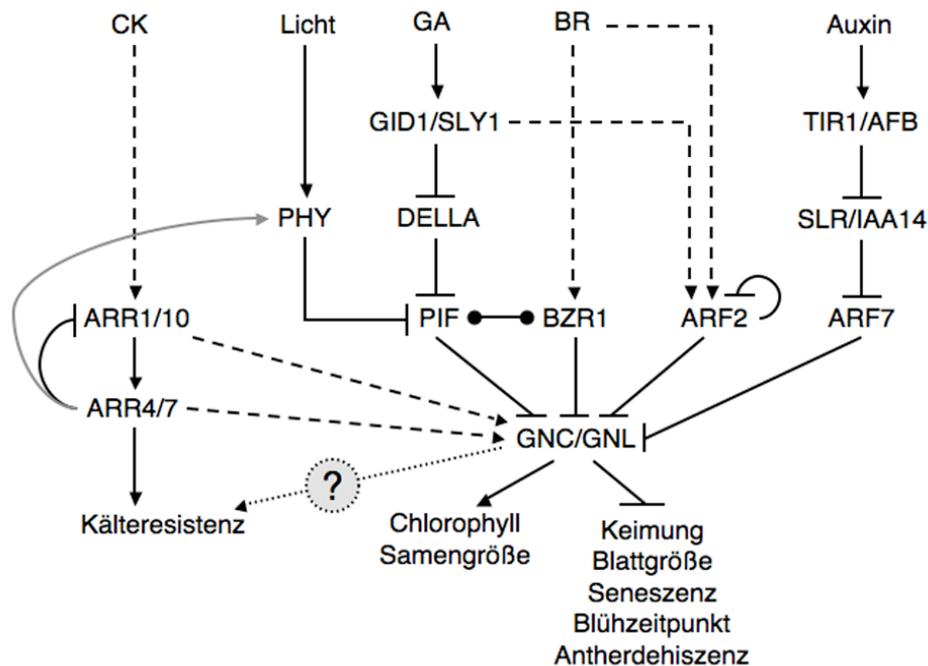


Abbildung 35: Modell für die Konvergenz des GA-, Auxin-, BR-, CK- und Lichtsignalweges für die Regulation der *GNC* und *GNL/CGA1* Transkription. Modifiziertes Modell der Abbildung 34, in der BR die ARF2-Aktivität über eine verstärkte Bindung von ARF2 an die AuxRE seiner Zielgene steuert (Vert et al., 2008). Das Phytohormon Zytokinin (CK) aktiviert die B-Typ ARRs *ARR1* und *ARR10*, wodurch sie die Transkription der beiden GATAs aktivieren (Chiang et al., 2012). Darüberhinaus initiieren sie die Transkription der A-Typ ARR wie beispielsweise *ARR4* und *ARR7*. *ARR7* besitzt zudem das Vermögen, die Expression von *GNC* und *GNL/CGA1* positiv zu regulieren (Lee et al., 2007). *ARR4* kann den freien Pool der Phytochrome (*PHY*) in der Pfr-Form erhöhen (blauer Pfeil), so dass *PIFs* verstärkt der *PHY*-abhängigen Proteolyse zugeführt werden können (Sweere et al., 2001). Außerdem sind *ARR4* und *ARR7* an der Regulation der Kälteresistenz beteiligt (Jeon et al., 2010; Shi et al., 2012), wodurch sowohl eine Verbindung zu einer ARR-abhängigen *GNC* und *GNL/CGA1* Regulation als auch zu einer ARR- und *GNC*- und *GNL/CGA1*-vermittelten Kälteresistenz bestehen könnte. Unterbrochener Pfeil, indirekte Kontrolle oder fehlender Beweis der direkten Kontrolle; durchgängiger Pfeil, direkte Kontrolle; gepunkteter Pfeil, vermuteter Mechanismus.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Bakterienstämme

Für Plasmidpropagationen wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene) [recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (tet^r)] genutzt. GATEWAY-bezogene Plasmidpropagationen wurden mit dem *Escherichia coli* Stamm DB3.1 (Invitrogen) [F-gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1] durchgeführt.

Die Agrobakterienstämme GV3101 pMP90 ohne und mit pSoup, sowie GV3101 pMP90 RK wurden für die Pflanzentransformation genutzt (Koncz et al., 1984; Lloyd et al., 1986; Prosen and Simpson, 1987; Hellens et al., 2000).

5.1.2. Pflanzenmaterial

Die für die Dissertationsarbeit verwendeten Wildtypen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* sind des Ökotyps Columbia (Col-0) und Landsberg *erecta* (Ler-0).

Tabelle 4: Liste der in dieser Dissertationsarbeit verwendeten T-DNA Insertionslinien und transgenen Pflanzen.

Pflanzenlinie	Referenz
<i>arf2-5, arf2-8</i>	(Okushima et al., 2005a)
<i>arf2-8 nph4-1 arf19-4</i>	(Ellis et al., 2005)
<i>ARF2::ARF2:GFP</i>	(Rademacher et al., 2011)
<i>ARF7:MYC nph4-1 arf19-1</i>	unveröffentlicht, Hidehiro Fukaki (Kobe Universität, Japan)
<i>ga1</i>	(Willige et al., 2007)
<i>gai1D</i>	(Peng and Harberd, 1993)
<i>gid1b-1 gid1c-2, gid1a-1 gid1b-1, gid1a-1 gid1c-2, gid1a-1 gid1b-1 gid1c-2</i>	(Willige et al., 2007)

35S::GNC:GFP, 35S::YFP:GNL	(Richter et al., 2010)
<i>nph4-1 arf19-4</i>	(Okushima et al., 2005b)
<i>pif1-1, pif3-3, pif1-1 pif3-3, pif1-1 pif3-3</i> <i>pif4-2 pif5-3</i>	(Leivar et al., 2008)
35S::PIF3:MYC(6x)	(Clack et al., 2009)
<i>rga-24 gai-t6</i>	(Peng and Harberd, 1993)
<i>rgl2-5</i>	(Piskurewicz et al., 2008)
<i>slr-1</i>	(Fukaki et al., 2002)
<i>spy-3</i>	(Jacobsen and Olszewski, 1993)
<i>spy-5</i>	(Swain et al., 2002)
<i>spy</i> (SAIL_1148_F12)	unveröffentlicht

Tabelle 5: Liste von Primern für die PCR-basierende Genotypisierung der untersuchten Mutanten. Die Primersequenzen für die PCR-basierende Genotypisierung können dem Anhang A der Tabelle A1 entnommen werden.

Mutante	Primerkombination für Genotypisierung		PCR-Produkt	Referenz
<i>arf2-5</i> SALK_041472	WT	ARF2 gLP + ARF2 gRP	1,8 kb	(Ellis et al., 2005)
	MUT	LBb1.3 + ARF2 gRP	1,3 kb	
<i>arf2-8</i> SALK_108995	WT	ARF2 gLP + ARF2 gRP	1,8 kb	(Ellis et al., 2005)
	MUT	LBb1.3 + ARF2 gLP	2,0 kb	
<i>ga1</i> SALK_109115	WT	GA1 gLP + GA1 gRP	1,5 kb	(Willige et al., 2007)
	MUT	LBb1.3 + GA1 gRP	1,0 kb	
<i>gai-t6</i>	WT	GAI 300 + GAI 302	1,0 kb	(Peng et al., 1997)
	MUT	GAI 300 + GAI 304	0,7 kb	
<i>gid1a-1</i> SALK_044317	WT	<i>gid1a-1</i> LP + <i>gid1a-1</i> RP		(Willige et al., 2007)
	MUT	LBb1.3 + <i>gid1a-1</i> RP		
<i>gid1b-1</i> Ds11_3970_1	WT	<i>gid1b-1</i> LP + <i>gid1b-1</i> RP		(Willige et al., 2007)
	MUT	SM + <i>gid1b-1</i> LP		

<i>gid1c-2</i> GABI_639F05	WT	<i>gid1c-2</i> gLPwt + <i>gid1c-2</i> gRPwt		(Willige et al., 2007)
	MUT	<i>gid1c-2</i> gLPm + <i>gid1c-2</i> gRPm		
<i>gnc-1</i> SALK_001778	WT	GNC gLP + GNC gRP	1,4 kb	(Bi et al., 2005)
	MUT	LBb1.3 + GNC gLP	0,9 kb	
<i>gnl-1</i> SALK_003995	WT	GNL gLP + GNL gRP	1,0 kb	(Bi et al., 2005)
	MUT	LBb1.3 + GNL gLP	0,8 kb	
<i>rga-24</i>	WT	RGA 205 + RGA 212	0,9 kb	(Silverstone et al., 1997)
	MUT	RGA 205 +RGA 253	0,7 kb	
<i>spy</i> SAIL_1148_F12	WT	SPY gLP +SPY gRP	1,0 kb	unveröffentlic ht
	MUT	LB3 + SPY gRP	0,7 kb	

5.1.3. Antikörper

Tabelle 6: Antikörper und *Beads*.

Antikörper	Verdünnung	Tier	Hersteller
α -GAI	1:500	Hase	(Willige et al., 2007)
α -GFP	1:2000	Hase	Invitrogen, Darmstadt
α -HA High Affinity			Roche, Mannheim
α -HA-HRP (3F10)	1:2000	Hase	Roche, Mannheim
α -Histone H3K9Ac, ChIP Grade (ab10812)		Hase	Abcam plc, Cambridge (UK)
α -rabbit-HRP	1:2000	Ziege	Sigma Aldrich, München
α -mouse-HRP	1:2000	Ziege	Sigma Aldrich, München
α -C-MYC	1:5000	Maus	Sigma Aldrich, München
α -C-MYC-Agarose			Sigma Aldrich, München
α -POR	1:3000	Hase	Agrisera, Vännäs (SE)
Protein A/G Plus- Agarose			Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

α -RGA	1:1000	Hase	(Willige et al., 2007)
α -RGL2	1.1500	Hase	(Piskurewicz et al., 2008)
Vector Fusion Aid GFP Kit			AXXORA, Lörrach

5.1.4. Marker

Tabelle 7: Marker.

Marker	Nutzung	Hersteller
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained	Protein	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

5.1.5. Enzyme

Tabelle 8: Enzyme.

Enzym	Hersteller
<i>Bgl</i> II	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Darmstadt
Dnase I, Rnase-frei	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
rDNase Set	Machery-Nagel, Düren
<i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Darmstadt
M-MuLV Rev. Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinase K	Sigma Aldrich, München
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
iQ SYBR Green	BioRad, München

5.1.6. Vektoren

Tabelle 9: Vektoren.

Vektorname	Nutzung	Hersteller
pDONR201	ENTRY-Vektor	Invitrogen, Darmstadt
pExtag-YFP	Destinationsvektor, Pflanzentransformation	MPIPZ, Köln
35S:GW-GFP	Destinationsvektor, Pflanzentransformation	MPIPZ, Köln

5.1.7. Kits

Tabelle 10: Kits.

Kit	Hersteller
PEQGold Plasmid Miniprep Kit1	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NucleoSpin RNA Plant II	Machery-Nagel, Düren

5.1.8. Chemikalien

Tabelle 11: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid 4K-Lösung (30%) 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agar für die Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Agarose, peqGOLD Universal	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat	Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
Carbenicillin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
Chloroform	Roth GmbH, Karlsruhe
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
N,N-Dimethylformamid	Roth GmbH, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid	Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 98%	Roth GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Roth GmbH, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
GA ₃	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
X-GlcA, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
D(+) Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Glykogen	AppliChem, Darmstadt
HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure	AppliChem, Darmstadt
Hexylenglycol	Roth GmbH, Karlsruhe
Hygromycin	Sigma Aldrich, München
Isoamylalkohol	Roth GmbH, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
MES, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	AppliChem, Darmstadt
Murashige und Skoog Salze	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
β-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
(S)-MG132	Biomol GmbH, Hamburg
Milchpulver Blotting Grade	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
1-Napthylessigsäure	Sigma Aldrich, München

Pflanzenagar	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
Roti-Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
Percoll	Sigma Aldrich, München
PIPES, 1,4-Piperazindiethansulfonsäure	Sigma Aldrich, München
Phosphinotricin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich, München
2-Propanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma Aldrich, München
Rifampicin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem (NL)
D(+)-Saccharose	Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Roth GmbH, Karlsruhe
Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem, Darmstadt
Tris-Hydrochlorid Pufferqualität	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure 37%	AppliChem, Darmstadt
Super Signal Femto West Substrat	Thermo Fisher Scientific, Bonn

5.1.9. Antibiotika

Escherichia coli Transformanten selektionierte ich entsprechend ihrer Plasmidresistenzgene. Dies erfolgte durch Supplementation der Medien mit entweder Ampicillin [100 µg/mL] oder Kanamycin [50 µg/mL].

Die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme kultivierte ich in Medien, die Gentamycin [30 µg/mL], Rifampicin [25 µg/mL], Kanamycin [50 µg/mL], Carbenicillin [20 - 50 µg/mL] und/oder Tetracyclin [10 µg/mL] enthielten.

Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte unter Verwendung von Phosphinotricin [20 µg/mL], Kanamycin [50 µg/mL] und Hygromycin [25 µg/mL].

5.2. Methoden

5.2.1. Pflanzenarbeiten

5.2.1.1. Oberflächensterilisation der Samen und Wachstumsbedingungen

Zur Oberflächensterilisation der Samen inkubierte ich die Samen in einer gesättigten Calciumhypochloridlösung für 10 Minuten auf dem Drehrad, bevor ich die Samen einmal mit 70% Ethanol wusch. Anschließend folgten vier weitere Waschschrte mit sterilem Wasser, bevor ich sie auf entweder GM- (Murashige und Skoog Salze, 4,2g/L; MES Monohydrat, 0,5g/L; D(+)-Saccharose, 10g/L; Agar, 6,5g/L; Kaliumhydroxid zum Einstellen des pH-Wertes, pH 5,8) oder 0,5x MS-Wachstumsmedien (Murashige und Skoog Salze, 2,1g/L; MES Monohydrat, 0,5g/L; Agar, 8,0g/L; Kaliumhydroxid zum Einstellen des pH-Wertes, pH 5,8) ausbrachte. Entsprechend dem Experiment erfolgten Stratifizierungen unter Dunkelheit bei 4°C für mindestens zwei Tage und Imbibierungen unter Langtag- (16 Stunden Weißlicht [$150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$] bei 21°C, 8 Stunden Dunkelheit bei 18°C) oder Kurztagbedingungen (8 Stunden Weißlicht [$150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$] bei 21°C, 16 Stunden Dunkelheit bei 18°C).

5.2.1.2. Genetische Kreuzungen

Alle F1 Nachkommen aus Kreuzungen sowie die daraus resultierenden F2 Nachkommen bestätigte ich über Genotypisierung auf Homozygotie der zu untersuchenden Loci. Für Kreuzungen bei denen ich das dominante *slr-1* Allel nutzte, selektierte ich die F1 und die F2 Nachkommen nach dem Fehlen der Seitenwurzeln. Kreuzungen, die GUS Markerlinien einschlossen, testete ich in der F1 Generation auf GUS Aktivität. Damit ich die homozygoten Linien für das GUS-Transgen finden konnte, testete ich die Segreganten der F2 Nachkommenschaft auf ihre GUS-Aktivität.

5.2.1.3. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzentransformation führte ich an blühenden Pflanzen, 5 bis 6 Wochen nach Aussaat, entsprechend dem „floral dip“ Protokoll von Clough et al. durch (Clough and Bent, 1998). Zuvor brachte ich die Vektor-DNA durch Elektroporation in die Agrobakterienstämme GV3101 pMP90 (Gentamycin, Rifampicin) oder GV3101 pMP90 RK (Gentamycin, Rifampicin, Kanamycin) ein. Eine Vorkultur erhielt ich durch Animpfen einer Kolonie in 5 mL flüssigem LB-Medium, supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika, und durch eine Inkubation bei 30°C über Nacht. Danach überführte ich diese in zwei konsekutive jeweils erneut über Nacht angesetzte Medien mit 200 mL und 1L. Letzteres Inokulat zentrifugierte ich bei 4000 *g* für 5 Minuten ab und resuspendierte dieses in 400 mL Transformationspuffer (Murashige und Skoog Salze 2,2g/L; MES Monohydrat 0,5g/L, Silwett-77 250 μ L/L; 6-BA 15 μ L/L). Die Blüteninfloreszenzen tauchte ich in das Resuspendat für 15 Sekunden ein, tropfte sie auf Papier ab, legte sie anschließend auf einem Pflanzentablett horizontal aus und verpackte sie mit einer Plastiktüte bis zum darauf folgenden Tag. Anschließend befreite ich die Blüteninfloreszenzen durch Besprühen mit Wasser von der Transformationslösung und stellte die Pflanzen senkrecht in eine Wachstumskammer, wo ich sie bis zur Samenreife anzog.

5.2.1.4. Selektion transgener Pflanzen

Für die Selektion transgener Pflanzen nach der Transformation plattierte ich die oberflächensterilisierten Samen ausschließlich auf 0,5x MS-Medium aus, das, gemäß dem Selektionsmarker, mit Antibiotika (Phosphinotricin, Kanamycin, Hygromycin) supplementiert worden war. Transgene Pflanzen identifizierte ich aufgrund der Fähigkeit GFP, YFP oder GUS zu exprimieren, was ich einerseits über Western-Blots und andererseits über GUS-Färbung nachweisen konnte. Weiterhin achtete ich darauf, dass für jedes transformiertes Konstrukt mindestens 20 unabhängige Transformanten gefunden wurden.

5.2.2. Physiologische Assays

5.2.2.1. Keimungsassay

Um die Keimungsrate unter Stratifizierungsbedingungen zu bestimmen, oberflächensterilisierte ich die Samen, plattierte sie auf 0,5x MS Medien aus und lagerte sie für zwei bis zu sieben Tage bei 4°C in Dunkelheit.

Um die Keimungsrate unter Imbibierungsbedingungen zu bestimmen, oberflächensterilisierte ich die Samen und plattierte sie auf 0,5x MS Medien aus. Nach der Stratifizierung und Imbibierung überführte ich die Samen in ambiente Wachstumstemperaturen. Anschließend klassifizierte ich die Samen anhand folgender Charakteristika: (i) Ruptur von Testa und (ii) Endosperm und (iii) Austreten der Wurzelhaube aus der Samenschale. Dies geschah nach erfolgter Stratifizierung zu den Zeitpunkten 12, 15, 18, 21, 24 und 36 Stunden, nach erfolgter Imbibierung nach 48 Stunden.

5.2.2.2. Hypokotylelongationsassay

Für licht- und dunkelgewachsene Hypokotylelongationsassays plattierte ich die oberflächensterilisierten und stratifizierten Samen auf 0,5x MS aus. Lichtgewachsene Keimlinge scannte ich nach fünf, gegebenenfalls auch nach sieben Tagen und dunkelgewachsene Keimlinge nach vier Tagen (EPSON PERFECTION V750 Pro). Die Hypokotyllängen wertete ich mit ImageJ64 (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) aus.

5.2.3. Histochemische Analyse

5.2.3.1. GUS-Färbung

Für die GUS-Färbung fixierte ich die relevanten Pflanzengewebe für 15 Minuten in n-Heptan, anschließend verwarf ich das n-Heptan und das Pflanzengewebe wurde im Abzug getrocknet. Samen aus unterschiedlichen Keimungsstadien fixierte ich für circa 12 Stunden bei -20°C in 20% Aceton.

Das Aceton nahm ich anschließend ab und das Material wurde im Abzug getrocknet. Die GUS-Färbelösung (58 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 1M Na_2HPO_4 ; 42 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 1M NaH_2PO_4 ; 0,1% Triton X-100; 0,5mM Kaliumferricyanid; 0,5mM Kaliumferrocyanid; 0,5mg/mL X-GlcA) inkubierte ich mit dem zu analysierenden Material bei 37°C im Dunkeln bis die erforderliche Färbung in ihrer gewünschten Intensität eintrat. Die Beendigung der Färbung erzielte ich durch das Verwerfen der GUS-Färbelösung und durch Zugabe von 70% Ethanol. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die GUS-Färbungen dokumentierte ich mit einem LEICA MZ16 Mikroskop.

5.2.4. Molekularbiologische Methoden

5.2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolierung der genomischen DNA entnahm ich Pflanzenmaterial, nahm es in 300 μL DNA-Extraktionspuffer (200mM Tris, pH 7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % SDS) auf, zermörsterte es mit einem Pistill in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß und inkubierte es für 10 Minuten bei 65°C. Anschließend versetzte ich die Lösung mit demselben Volumen an Phenol:Chloroform (1:1) pH 8,0, vortexte es und zentrifugierte es für 5 Minuten bei 16000 g ab. Die obere Phase mischte ich danach mit einem Volumen Isopropanol durch Vortexen und die DNA wurde durch Zentrifugation gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol und Trocknung des Pellets mithilfe eines Vakuundesiccators resuspendierte ich die DNA in 200 μL sterilem Wasser.

5.2.4.2. Plasmid-DNA Isolierung aus *Escherichia coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA entnahm ich aus einer Übernachtskultur 1 mL und zentrifugierte diese bei 16.000 g ab, verwarf den Überstand und resuspendierte das verbleibende Pellet in 300 μL Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM EDTA). Dem folgte die Zugabe von 300 μL Puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) und nach mehrfachem

Invertieren der P1/P2 Mixtur, gab ich 300 μL vom Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) zu. Das Resuspendat invertierte ich ausschließlich mehrfach und unterzog es einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 16.000 g . 750 μL des Überstandes versetzte ich mit demselben Volumen an Phenol:Chloroform (1:1) pH 8,0, vortexte es und zentrifugierte es für weitere 5 Minuten bei 16.000 g ab. Die gesamte obere Phase nahm ich ab, versetzte es mit einem Volumen Isopropanol, vortexte es und zentrifugierte es für 15 Minuten bei 16.000 g ab, um die Plasmid-DNA zu fällen. Das Plasmid-Präzipitat wusch ich einmal mit 70% Ethanol und mithilfe eines Vakuumkonzentrators (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg) trocknete ich die DNA. Anschließend resuspendierte ich die DNA in 50 μL sterilem Wasser (+ 10 mg/mL RNase).

5.2.4.3. PCR-Analyse

Zur Genotypisierung und Klonierung nutzte ich eine im Labor aufgereinigte Taq-Polymerase für die Amplifikation genomischer DNA-Fragmente aus *Arabidopsis thaliana* DNA als auch von Plasmid-DNA. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang A aufgelistet. Für einen Standard PCR-Ansatz von 50 μL pipettierte ich 5 μL genomische DNA, 5 μL 10x Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 25 mM MgCl_2), 5 μL dNTP-Mischung (Stock: 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 mM Oligonukleotid LP, 0,4 mM Oligonukleotid RP, 1 μL Taq-Polymerase und 22 μL steriles Wasser zusammen.

Eine Standard-PCR für eine Genotypisierung oder Kolonie-PCR erfolgte mit den BIO RAD Thermal Cycler L1000 und S1000. Ein Standard-Programm beinhaltete Schritt 1 mit 94°C für 5 Minuten, Schritt 2 mit 94°C für 30 Sekunden (Denaturierung), Schritt 3 mit 58°C für 30 Sekunden (Annealing), Schritt 4 mit 72°C für 1 Minute pro 1 kb (Elongation), mit anschließend 34 maliger Wiederholung der Schritte 2 bis 4. Danach erfolgte ein 72°C-Schritt für 6 Minuten und ein Abkühlen der PCR-Reaktion auf 12°C.

Für einen Standard PCR-Ansatz einer 2-Schritt quantitativen *Real-time*

PCR für 4 Replikate pipettierte ich 22,5 μL vom iQTM SYBR Green Supermix, 9 μL eines Primermixes LP+RP in einer Endkonzentration von 200 nM, 10 μL steriles Wasser und 3,5 μL der cDNA in einer Konzentration von 17,5 ng/ μL bis 30 ng/ μL zusammen und ich setzte 10 μL pro Reaktion ein. Ein Standard-2-Schritt-PCR Programm beinhaltete Schritt 1 mit 94°C für 7 Minuten, Schritt 2 mit 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung) und Schritt 3 mit 60°C für 15 Sekunden (Annealing und Elongation). Dabei wurden die Schritte 2 und 3 für weitere 39x wiederholt. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse beginnend mit 60°C und in 0,5°C Schritten wurden die Amplifikate aufsteigend bis 94°C aufgeschmolzen.

Für einen Standard PCR-Ansatz einer 3-Schritt quantitativen *Real-time* PCR mit 4 Replikaten für ChIP-Analysen pipettierte ich 11,1 μL vom iQTM SYBR Green Supermix, 4,5 μL eines Primermixes LP+RP in einer Endkonzentration von 200 nM, 2,7 μL steriles Wasser und 5 μL der ChIP-DNA zusammen und ich setzte 5 μL pro Reaktion ein. Ein Standard-3-Schritt ChIP-PCR Programm beinhaltete Schritt 1 mit 94°C für 7 Minuten, Schritt 2 mit 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung), Schritt 3 variierend von 54°C bis 60°C (entsprechend der Primer, Anhang A) für 15 Sekunden und Schritt 4 mit 72°C für 25 Sekunden, wonach die Schritte 2 bis 4 für weitere 49x wiederholt wurden. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse beginnend entsprechend der Primerkombination mit 54°C bis 60°C und in 0,5°C Schritten wurden die Amplifikate aufsteigend bis 94°C aufgeschmolzen. Für die Analyse der 2-step und 3-step qRT-PCR Läufe wurden die CT-Werte mit einem Housekeeping-Gen (z. B. UBC21, PP2A, ACT8) normalisiert, was bedeutete, dass die CT-Werte der analysierten Zielgene mit den CT-Werten des Housekeeping-Gens subtrahiert wurden und den ΔCT -Wert ergaben. Für die Berechnung des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes wurden die ΔCT -Werte der zu vergleichenden Genotypen und Behandlungen vom ΔCT -Wert der Kontrolle subtrahiert, was den $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert ergab. Anschließend wurde für die Berechnung der relativen Änderung der zu untersuchenden Situation der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert in die Formel $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ gesetzt (Pfaffl, 2001).

5.2.4.4. Promotor-GUS Klonierung

Ziel der Promotor-GUS Klonierung war die histochemische Analyse der *GNC*- und *GNL*-Promotoren und die anschließende Analyse der *in planta* *GNC*- und *GNL*-Expressionsmuster. Hierfür amplifizierte ich ein 2 kb Promotorfragment von *GNC* und *GNL* und verdaute die PCR-amplifizierten Promotorfragmente mit *Bgl*II und *Eco*RI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) für mindestens zwei Stunden bei 37°C. Hierfür brachte ich 150 ng des Vektors pCAMBIA1391z (Cambia, Brisbane (AUS)), einerseits, und 300 ng des zu verdauenden PCR-Amplifikats, andererseits, zusammen mit 5 µL des Restriktionspuffers, 10 Units der Enzyme *Bgl*II und *Eco*RI in ein Gesamtvolumen von 50 µL. Anschließend mischte ich ein Volumen einer gesättigten Phenol:Chloroform (1:1) mit dem Verdau durch Vortexen und führte eine Ethanol-fällung durch. Das resultierende Pellet nahm ich in 20 µL sterilem DNase-freiem Wasser auf.

Für die Ligation des *Bgl*II- und *Eco*RI-verdauten Promotoramplifikats pipettierte ich 100 ng pCAMBIA1391z, 300 ng vom *GNC*- und *GNL*-Promotoramplifikats, 2 µL des T4 DNA Ligase Puffers, 5 Units der T4 DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µL zusammen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und im Anschluß reinigte ich die Ligation mittels Phenol:Chloroform (1:1) und einer Ethanol-fällung auf.

Für die Propagation der *GNC*- und *GNL*-Promotor GUS-Ligation transformierte ich die Ligation in den *Escherichia coli* Stamm XL1 Blue (Invitrogen, Darmstadt). Nach dem Ausplattieren selektionierte ich sie auf LB-Kan Platten. Positive Klone identifizierte ich per Kolonie-PCR und verifizierte sie durch Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz). Ein verifizierter Klon wurde von mir daraufhin in den entsprechenden *Agrobacterium*-Stamm und im Anschluss in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia transformiert. Die Selektion brachte mehr als 20 transgene Pflanzen hervor, welche auf das Vorhandensein gleichmäßiger GUS Färbungen innerhalb der unabhängigen Transformanten getestet wurden.

5.2.4.5. Gateway-Klonierung

Um Überexpressionlinien der beiden Gene *GNC* und *GNL/CGA1* in Arabidopsis zu etablieren, amplifizierte ich den kodierenden Bereich von *GNC* und *GNL/CGA1* aus einer von mir hergestellten Arabidopsis Col-0 cDNA und klonierte die Konstrukte GNC:GFP und YFP:GNL über das Gatewaysystem (Invitrogen, Darmstadt; siehe Tabelle A3). Als Grundlage für die Klonierung diente hierfür das vom Hersteller bereitgestellte Protokoll für die BP- und LR-Reaktion. Die BP- als auch die LR-Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinase K und eine Inkubation von 10 Minuten bei 37°C gestoppt. Die BP- und LR-Reaktionen transformierte ich anschließend in *Escherichia coli* XL1 Blue und plattierte die Transformationen auf LB-Selektivmedium aus. Die putativ positiven LR-Klone testete ich über eine Kolonie-PCR auf die Anwesenheit des Inserts im Destinationsvektor und anschließend sequenzierte ich die positiven Klone (GATC Biotech, Konstanz).

Für die BP-Reaktion nutze ich 150 ng pDONR201, 150 ng des PCR-Amplifikats und 1 μ L des BP Clonase II Enzym-Mixes in einem 8 μ L Gesamtvolumen. Die BP-Reaktion inkubierte ich bei Raumtemperatur für 12 Stunden. Anschließend stoppte ich die BP-Reaktion, indem ich Proteinase K [1 U] hinzupipettierte und dies für 10 Minuten bei 37°C inkubierte.

Für die LR-Reaktion nutzte ich 150 ng vom BP-Klon und 150 ng des jeweiligen Destinationsvektors in einem 8 μ L Gesamtvolumen. Dazu pipettierte ich 1 μ L des LR Clonase II Enzym-Mixes und inkubierte die LR-Reaktion bei Raumtemperatur für 12 Stunden. Anschließend gab ich Proteinase K [1 U] zur LR-Reaktion zu und inkubierte dies für 10 Minuten bei 37°C, wodurch die LR-Reaktion gestoppt wurde.

5.2.5. Biochemische Arbeiten

5.2.5.1. Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion entnahm ich von Keimlingen und Samen (stratifiziert, imbibierte und keimend) Probenmaterial und frore sie in flüssigem Stickstoff für die darauffolgende Probenaufbearbeitung tief. Für die Proteinextraktion der

Keimlinge nutzte ich den HL-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,25% Triton X-100) und für die Proteinextraktionen aus Samen den SB-Puffer (10 mM Tris-Cl, 100 mM NaH₂PO₄; 8 M Harnstoff, pH 8,0) (Oh et al., 2006). Dem HL-Puffer wurde zudem ein Proteaseinhibitorcocktail pH 7,5 (1%; Sigma Aldrich), PMSF (0,1 μ M) und MG132 (10 μ M) zugegeben. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Pottern mit einem Gewebehomogenisator (Homogen, Schütt) und darauf folgender Zentrifugation bei 4°C und 16.000 *g*. Eine Bradford-Reihe mit dem Überstand des Zentrifugates zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels dem *Microplate Reader iMark* (BioRad, München) durchgeführt (Bradford, 1976). Insofern keine Immunpräzipitation folgte, wurde der Rest des Zentrifugates mit einem modifizierten Rezept des 5x Laemmli Puffers (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 30% Glycerol; 5% β -Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht (Laemmli, 1970).

5.2.5.2. (Ko-) Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden die Antikörper-gekoppelten *beads* vor Gebrauch mit Waschpuffer WB (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen. Im Anschluss wurden diese mit gleicher Konzentration an Proteinextrakt und equilibrierten Volumina (WB Puffer versetzt mit 1% Proteaseinhibitorcocktail, 0,1 μ M PMSF und 10 μ M MG132) beladen. Diese inkubierten für 1,5 bis zu 2,5 Stunden bei 4°C und unter ständiger Rotation auf einem Drehrad. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 2.400 *g* für 5 Minuten und drei konsekutive Waschschrte mit dem WB Puffer. Die *beads* wurden daraufhin in Laemmli Puffer resuspendiert und bei 95°C aufgekocht.

5.2.5.3. SDS-PAGE, Western-Blot und Western-Analyse

Für die Auftrennung der Proteine habe ich Trenngele verschiedener Prozentigkeit für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

(SDS-PAGE) gegossen. Ein 10% Trenngel setzt sich wie folgt zusammen: 1,87 mL Wasser; 1,10 mL 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS); 1,83 mL Acrylamid; 3,3 μ L TEMED und 28 μ L 10% APS. Ein Sammelgel setzt sich wie folgt zusammen: 1,25 mL Wasser; 0,55 mL 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS); 0,36 mL Acrylamid; 3,3 μ L TEMED und 28 μ L 10% APS.

Die Elektrophorese erfolgte mit einem *Electrophoresis Power Supply* EV202 (Consort) bei 120 V und 30 mA pro Trenngel (Laufpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,04% SDS), gefolgt vom Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (*Semi-Dry Blotting* Puffer: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 1,3 mM SDS; pH 8,3 mit NaOH eingestellt) mittels eines *Semidry Blotters* (PEQLab) bei 50 V und 2 mA pro Quadratcentimeter Membran (Renart et al., 1979).

Die geblotteten Membranen wurden in einer 3% Milchlösung in 1x PBS (1,39 M NaCl; 27 mM KCl; 125 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄) geblockt, mit nur 1x PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper über Nacht auf einem Schüttler (Heidolph Unimax 1010) bei circa 120 g und 4°C inkubiert. Dem schlossen sich 3 konsekutive Waschschrte mit 1x PBS an, gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären *Horseradish-peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörper. Die Immunoblots wurden mit Super Signal Femto West Substrat (Thermo Fisher Scientific, Bonn) inkubiert und mit einem LAS-4000 Mini-image Analyzer (Fujifilm) detektiert. Für die Detektion wurden die Immunoblots in 10 Sekundenintervallen unter Standardbedingungen exponiert und davon Fotos gemacht.

5.2.5.4. Coomassie-Färbung

Proteingele wurden für circa 1 Stunde in einer Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R-250, 0,5 g; Coomassie Brillant Blau G-250, 0,5 g; 100% Ethanol, 400 mL; Eisessig, 100 mL; steriles Wasser, 500 mL) inkubiert und anschließend mit einer Entfärbelösung (100% Ethanol, 400 mL; Eisessig, 100 mL; steriles Wasser, 500 mL) entfärbt. Diese Färbungen dienten als

Ladekontrollen der LAS-4000 Mini-image Analyzer detektierten Western-Blots.

5.2.5.5. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

5.2.5.5.1. *Crosslinking*

Für das *Crosslinking* tauchte ich 10 Tage-alte lichtgewachsene und 4 Tage-alte dunkelgewachsene Keimlinge im *crosslinking* Puffer CLB1 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 5,8; 1% Formaldehyd) ein. Um Protein-DNA-Verbindungen herzustellen setzte ich das Probenmaterial mit einem Dessikator zwei Mal für 5 Minuten unter Vakuum und anschließend ließ ich die Proben unter Normdruckverhältnissen für 20 Minuten stehen. Danach verwarf ich den CLB1-Puffer und es folgten zwei Waschschrte mit dem CLB2-Puffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 5,8; 0,3 M Glycin). Das Waschen der Proben erreichte ich ebenfalls über die Infiltration mit einem Dessikator. Anschließend wusch ich das Pflanzenmaterial zweimal mit sterilem Wasser, trocknete es mit Papier und froz es in flüssigem Stickstoff ein.

5.2.5.5.2. Kernisolierung

Für die Kernisolierung mörserte ich das Pflanzenmaterial unter Beigabe von flüssigem Stickstoff und überführte es in 50 mL Falcon Röhrchen, die mit 20 mL NEB-Puffer (1 M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH, pH 7,2; 10 mM MgCl_2 ; 5 mM β -Mercaptoethanol) gefüllt waren. Die Suspension filterte ich durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) und anschließend brachte ich die Suspension mit dem NEB-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 18 mL. Als Nächstes gab ich zur Suspension tropfenweise ein Volumen von 1,08 mL einer 20%igen Triton X-100 Lösung zu und ließ diese Suspension eine weitere Stunde auf einem Schüttler im Kühlkabinett bei 200 g inkubieren (Heidolph Unimax 1010), um die Zellkerne zu resuspendieren. Unterdessen bereitete ich in einem weiteren 50 mL Falcon ein zweilagiges Percoll *cushion*

(6 mL 75% unterhalb, 6 mL 35% oberhalb) vor. Die resuspendierten Kerne brachte ich durch seitliches Pipettieren am Falcon und ohne die Kerne mit dem Percoll *cushion* aufzuwirbeln auf die Oberfläche des Percoll *cushion*. Dem schloss ich eine Zentrifugation bei 2.500 *g* bei 4°C für 30 Minuten mit einem Ausschwingrotor (Megafuge 1.0R; Thermo Fisher Scientific) an, wonach die Kerne aus der Interphase als sichtbarer Grauschleier geerntet und in ein neues 50 mL Falcon pipettiert wurden. Anschließend brachte ich die Kerne mit dem GB-Puffer (0.5 M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH, pH 7,2; 10 mM MgCl₂; 1% (w/v) Triton X-100; 5 mM β-Mercaptoethanol) auf ein Gesamtvolumen von 20 mL und beschichtete die Oberfläche einer 6 mL 35%igen Percoll *cushion* vorsichtig mit den im GB-Puffer gelösten Kernen. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation mit dem Ausschwingrotor bei 4°C und 2.500 *g* für 10 Minuten an. Danach verwarf ich den Überstand und löste die pelletierten Kerne in 1 mL GB-Puffer. Nach einem Transfer des Kernresuspensats in ein neues 10 mL Falcon zentrifugierte ich das Resuspendat ein letztes Mal bei 2.500 *g* für 10 Minuten bei 4°C. Ich verwarf den Überstand ein weiteres Mal und froz das Pellet entweder in flüssigem Stickstoff ein oder nutzte es sofort für den nächsten Schritt der Chromatinpräparation.

5.2.5.5.3. Chromatinpräparation

Für die Chromatinpräparation resuspendierte ich die Kerne in 0,75 mL SB1-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5% SDS; 1% Proteaseinhibitorcocktail; 0,1 μM PMSF; 10 μM MG132) und inkubierte diese für 20 Minuten auf einem Drehrad bei 4°C. Anschließend mischte ich die gelösten Kerne mit 0,75 mL des SB2-Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 1% Proteaseinhibitorcocktail; 0,1 μM PMSF; 10 μM MG132) und sonifizierte diese drei Mal (Bandelin SONOPLUS; 25 Sekunden, 4 Zyklen, 50% Leistung). Danach zentrifugierte ich die Kernisolate für 15 Minuten bei 4°C und 11.000 *g* und aliquotierte anschließend den Überstand zu 150 μL und froz diese Aliquots in flüssigem Stickstoff ein.

5.2.5.5.4. Quantifizierung der DNA

Für die Quantifizierung der DNA gab ich zu 50 μL der Chromatinproben 200 μL SB3-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,25% SDS) und 5 μL Proteinase K (Sigma-Aldrich; 20 mg/mL Stocklösung) zu und inkubierte dies auf einem Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf) zuerst für eine Stunde bei 37°C und darauf folgend für 16 Stunden bei 42°C. Dies diente der Reversion der *crosslinks* zwischen Protein und Chromatin. Im Anschluss versetzte ich das Chromatin mit einem Volumen equilibriertem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,6), vortexte rigoros und zentrifugierte dies bei 16.000 g für 10 Minuten ab. Eine erneute Extraktion schloss ich mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,6) gleichen Volumens an und zentrifugierte dies erneut ab. Den Chromatin-enhaltenden Überstand pipettierte ich in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß und anschließend fällte ich das Chromatin durch Zugabe von zwei Volumen 100% Ethanol, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 μL Glykogen (10 mg/mL) und einer weiteren Inkubation bei -80°C für 4 Stunden zur Fällung. Der Chromatinfällung schloss ich eine Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g für 90 Minuten an, um die DNA zu pelletieren. Danach verwarf ich den Überstand, wusch das DNA-Pellet mit 70% Ethanol und trocknete es im Vakuumdesiccator. Das DNA-Pellet resuspendierte ich in 50 μL sterilem und DNase-freien Wasser bei 65°C im Heizblock für 10 Minuten. Danach bestimmte ich die Konzentration der DNA photometrisch (Gene Quant *pro*, Amersham Biosciences) und anschließend analysierte und fotografierte ich die fragmentierte DNA in einem 1,2%igen Agarosegel (EC3 Imaging System, UVP Biolmaging System).

5.2.5.5.5. Immunpräzipitation der Protein-DNA Komplexen

Für die Immunpräzipitation wurden gleiche Mengen an Chromatin (15 μg - 30 μg), die zuvor photometrisch bestimmt worden waren, eingesetzt. Die Volumina brachte ich mittels SB3-Puffer auf 200 μL und anschließend mischte ich dies mit 300 μL RIPA-F ohne SDS (50 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 140

mM NaCl, 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,1% Natriumdeoxycholat). In der Zwischenzeit wusch ich 50 μ L Protein A/G Plus-Agarose, und entsprechend der Anwendung, 50 μ L der Antikörper-gekoppelten *beads* mit RIPA-F mit SDS (0,1% SDS) zur Equilibrierung. Hiernach inkubierte ich die Protein A/G Plus-Agarose *beads* sowie das Chromatin im zuvor eingestellten Volumen von 500 μ L mit 5 μ L eines Pre-Immunsersums (PPI) für eine Stunde bei 4°C unter ständiger Rotation auf einem Drehrad. Hierbei diente das Pre-Immunsersum dem Entfernen von unspezifischen Komplexen von Chromatin. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 10.000 *g* für 2 Minuten. Vom Überstand nahm ich 50 μ L und mischte es mit 400 μ L SB3, was als Input Kontrolle dienen sollte. Die restlichen 450 μ L des Überstandes lud ich auf die 50 μ L der equilibrierten Antikörper-gekoppelten *beads*. Im Fall von Histonchromatin-Immunpräzipitationen pipettierte ich an dieser Stelle 5 μ L zu den 50 μ L Protein A/G Plus-Agarose *beads*. In beiden Fällen erfolgte eine weitere Inkubation für zwei bis vier Stunden im Kühlkabinett auf dem Drehrad. Anschließend zentrifugierte ich die Inkubationen bei 2.500 *g* für drei Minuten ab. Dem folgten vier Waschschrte mit jeweils 900 μ L RIPA-F mit SDS, so dass ich die immunpräzipitierte-DNA (IP-DNA) über zwei separate Extraktionsschritte mit 150 μ L des EB-Puffers (0,1 M Glycin, pH 2,5; 0,5 M NaCl; 0,05% Tween 20) von den *beads* eluieren konnte. Die eluierte IP-DNA mischte ich mit 150 μ L 10 mM Tris-HCl pH 7,4, so dass ich für die IP-DNA ein Gesamtvolumen von 450 μ L erhielt. Zu der Input-DNA Kontrolle und der IP-DNA pipettierte ich 5 μ L Proteinase K [20 mg/mL stock-Lösung], invertierte diese mehrfach und inkubierte anschließend die IP- und Input-DNA Proben bei 37°C für eine Stunde im Heizblock. Darauf folgte eine weitere Inkubation der Proben für vier Stunden bei 65°C, wodurch die Protein-DNA *Crosslinks* aufgehoben wurden.

5.2.5.5.6. Aufreinigung der DNA

Für die Aufreinigung der Input- und IP-DNA schloss ich nach der Reversion der *Crosslinks* eine zweimalige Extraktion der DNA mit 450 μ L

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,6) und einer Ethanolfällung, wie zuvor unter Punkt 5.2.4.1 beschrieben, an. Die pelletierte Input-DNA nahm ich in 250 μL und die IP-DNA in 50 μL sterilem Wasser auf. Dem folgte die Analyse mittels quantitativer *Real-time* PCR.

5.2.5.6. RNA-Extraktion

5.2.5.6.1. RNA-Extraktion aus Keimlingen

Für die Extraktion der RNA aus Keimlingen nutzte ich circa 100 mg Ausgangsmaterial und mittels RNA-Extraktions-Kit (Machery-Nagel, Düren) arbeitete ich diese auf. Das Pflanzenmaterial zermörserte ich unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff und versetzte dieses mit 350 μL RA1-Puffer (enthält 1% (v/v) β -Mercaptoethanol). Das Homogenisat pipetierte ich auf der vom Hersteller bereitgestellten lila Säule und zentrifugierte dieses bei 13.000 g für eine Minute ab. Den Durchfluss mischte ich mit einem Volumen von 70% Ethanol, belud damit die vom Hersteller bereitgestellte blaue Säule und ich zentrifugierte ihn bei 13.000 g für eine Minute ab. Dem schloss ich das Waschen der Silikamembran der blauen Säule mit 350 μL MDB (*Membrane Desalting Buffer*) an. Anschließend wurde der genomische DNA-Verdau auf der Silikamembran mit 10 μL rDNase und 90 μL rDNase-Reaktionspuffer gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Im Anschluss wusch ich die Säule mit 250 μL RA2-Puffer, dann einmal mit 600 μL und ein weiteres Mal mit 350 μL RA3-Puffer. Die Elution erfolgte mit 60 μL sterilem RNase-freiem Wasser für zwei Minuten bei 10.000 g . Die Konzentration der eluierten RNA bestimmte ich photometrisch.

5.2.5.6.2. RNA-Extraktion aus Samen

Für die Extraktion der RNA aus Samen (trocken, stratifiziert, imbibiert) überführte ich circa 100 mg Samen (entspricht einem Volumen von ungefähr 200 μL) in eine mit flüssigem Stickstoff tiefgekühlte Reibeschale (Vicient and Delseny, 1999). Die Samen zermörserte ich mit einem Pistill und

anschließend pipettierte ich 2 mL RNA-EB (8 M LiCl; 2% β -Mercaptoethanol) hinzu und mörserte erneut bis das Samenmaterial homogenisiert und im Puffer vollständig resuspendiert war. Das aus dem vorherigen Schritt gewonnene Resuspendat transferierte ich in ein 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß und inkubierte es für mindestens 12 Stunden bei 4°C. Für die weiteren Schritte der RNA-Extraktion aus Samen zentrifugierte ich das vorherige Resuspendat für vier Sekunden an. Danach überführte ich den Überstand in ein neues 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß. Eine weitere Zentrifugation folgte bei 16.000 *g* bei 4°C für 30 Minuten, worauf ich anschließend den Überstand verwarf und die pelletierte RNA mit kaltem Ethanol (70%) wusch. Die RNA trocknete ich nach dem Waschen für 15 Minuten mit dem Vakuumkonzentrator bei Raumtemperatur. Darauf folgte die Solubilisierung des Pellets mit 1 mL RNA-SB Puffer (100 mM NaCl; 25 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,5% SDS; 2% β -Mercaptoethanol), was ich mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,6) mischte, einige Male invertierte und für 15 Minuten bei 4°C und 16.000 *g* abzentrifugierte. Daraufhin mischte ich den Überstand jeweils zwei Mal mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), invertierte und zentrifugierte dies für 15 Minuten bei 4°C und 16.000 *g* ab. Die wässrige Phase transferierte ich in ein neues 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß, zudem versetzte ich diese mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat sowie 1,5 Volumen 100% Ethanol. Nach rigorosen Vortexen pelletierte ich die RNA letztendlich bei 4°C und 16.000 *g* für 30 Minuten. Anschließend verwarf ich den Überstand und gab 500 μ L einer 3 M Natriumacetat-Lösung auf das RNA-Pellet. Für die Solubilisierung der RNA vortexte ich für 1 Minute rigoros und pelletierte die RNA durch Zentrifugation danach erneut. Die pelletierte RNA wusch ich mit 70% Ethanol, trocknete diese mit dem Vakuumdesiccator für 10 min bei Raumtemperatur und nahm die RNA in 100 μ L sterilem RNase-freiem Wasser auf. Für die Konzentrationsbestimmung der RNA schloss ich eine photometrische Messung an.

5.2.5.6.3. Verdau genomischer DNA

Zur Elimination genomischer DNA nach der RNA-Extraktion aus Samen nutzte ich die DNase I (Fermentas). Hierfür nutzte ich einen Ansatz aus 1 μg RNA, 1 μL 10x DNase Puffer mit MgCl_2 [2,5 mM], aufgefüllt auf 9 μL mit DEPC-Wasser und 1 Unit der DNase I, den ich für 30 Minuten bei 37°C inkubierte. Nach der Inkubation pipettierte ich 1 μL 25 mM EDTA hinzu und inkubierte dies für 10 Minuten bei 65°C. Dem schloss ich eine Phenol:Chloroform (1:1) Extraktion und Ethanol-Präzipitation der RNA an, welche ich anschließend in 10 μL sterilem RNase-freiem Wasser aufnahm. Die Konzentration der RNA bestimmte ich darauf photometrisch.

5.2.5.6.4. Reverse Transkription der RNA

Für die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) inkubierte ich im ersten Schritt die RNA mit den oligo(dT) Oligonukleotide bei 65°C für 10 Minuten. Hierfür pipettierte ich den Mix1 zusammen, der 1 μg bis 2 μg RNA in 10 μL sterilem Wasser und 1 μL oligo(dT) [2 μM] enthielt. Für die reverse Transkription bereitete ich einen weiteren Mix vor, der aus 4 μL des 5x Reverse-Transkriptasepuffers, 2 μL dNTPs [1 μM] und 20 Units M-MuLV Reverse Transkriptase bestand und den ich mit dem Mix1 vermischte. Die reverse Transkription der RNA führte ich bei 42°C in einem Heizblock für 75 bis 90 Minuten durch. Im Anschluß inkubierte ich diese Reaktion bei 65°C für 10 Minuten, um die M-MuLV Reverse Transkriptase zu inaktiviert. Die cDNA verdünnte ich mit DNase-freiem Wasser, so dass ich Endkonzentrationen zwischen 17,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bis 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ erhielt.

6. Literaturverzeichnis

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., and Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131, 3357-3365.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P., and Genschik, P. (2008a). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* 18, 656-660.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008b). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20, 2117-2129.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., and Harberd, N.P. (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* 143, 1163-1172.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E., and Quail, P.H. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 23, 439-446.
- Alabadi, D., Gil, J., Blazquez, M.A., and Garcia-Martinez, J.L. (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134, 1050-1057.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., and Blazquez, M.A. (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 53, 324-335.
- Ariizumi, T., and Steber, C.M. (2007). Seed germination of GA-insensitive *sleepy1* mutants does not require RGL2 protein disappearance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 791-804.
- Ariizumi, T., Lawrence, P.K., and Steber, C.M. (2011). The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiol* 155, 765-775.
- Bai, M.Y., Shang, J.X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T.P., and Wang, Z.Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* 14, 810-818.
- Belin, C., Megies, C., Hauserova, E., and Lopez-Molina, L. (2009). Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* 21, 2253-2268.
- Bi, Y.M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T., and Rothstein, S. (2005). Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *Plant J* 44, 680-692.
- Blazquez, M.A., and Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 120, 1025-1032.

- Blazquez, M.A., and Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 889-892.
- Blazquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., and Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* 10, 791-800.
- Bonven, B.J., Nielsen, A.L., Norby, P.L., Pedersen, F.S., and Jorgensen, P. (1995). E-box variants direct formation of distinct complexes with the basic helix-loop-helix protein ALF1. *J Mol Biol* 249, 564-575.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L., and Schmulling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* 44, 314-333.
- Brian, P.W. (1958). Role of gibberellin-like hormones in regulation of plant growth & flowering. *Nature* 181, 1122-1123.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48, 181-199.
- Butkinaree, C., Park, K., and Hart, G.W. (2010). O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800, 96-106.
- Cao, D., Hussain, A., Cheng, H., and Peng, J. (2005). Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* 223, 105-113.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., and Davies, B. (2011). The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158, 423-438.
- Chapman, E.J., Greenham, K., Castillejo, C., Sartor, R., Bialy, A., Sun, T.P., and Estelle, M. (2012). Hypocotyl Transcriptome Reveals Auxin Regulation of Growth-promoting Genes through GA-Dependent and -Independent Pathways. *PLoS One* 7, e36210.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P., and Achard, P. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1849-1860.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055-1064.
- Chiang, H.H., Hwang, I., and Goodman, H.M. (1995). Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* 7, 195-201.
- Chiang, Y.H., Zubo, Y.O., Tapken, W., Kim, H.J., Lavanway, A.M., Howard, L., Pilon, M., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2012). Functional Characterization of the GATA Transcription Factors GNC and CGA1

- Reveals Their Key Role in Chloroplast Development, Growth, and Division in Arabidopsis. *Plant Physiol* 160, 332-348.
- Chien, J.C., and Sussex, I.M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 111, 1321-1328.
- Clack, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M., and Sharrock, R.A. (2009). Obligate heterodimerization of *Arabidopsis* phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* 21, 786-799.
- Claeys, H., Skirycz, A., Maleux, K., and Inze, D. (2012). DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol* 159, 739-747.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Coles, J.P., Phillips, A.L., Croker, S.J., Garcia-Lepe, R., Lewis, M.J., and Hedden, P. (1999). Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17, 547-556.
- Dai, C., and Xue, H.W. (2010). Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J* 29, 1916-1927.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480-484.
- De Smet, I., Lau, S., Voss, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E.H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., Naudts, M., Levesque, M.P., Ehrismann, J.S., Inze, D., Luschnig, C., Benfey, P.N., Weijers, D., Van Montagu, M.C., Bennett, M.J., Jurgens, G., and Beeckman, T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2705-2710.
- Debeaujon, I., and Koornneef, M. (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol* 122, 415-424.
- Dello Iorio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322, 1380-1384.
- Depuydt, S., and Hardtke, C.S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* 21, R365-373.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005). Plant

- development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9, 109-119.
- Dill, A., and Sun, T. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159, 777-785.
- Dill, A., Jung, H.S., and Sun, T.P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14162-14167.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392-1405.
- dos Santos Maraschin, F., Memelink, J., and Offringa, R. (2009). Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* 59, 100-109.
- Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2006). Leaving a mark: the many footprints of the elongating RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 16, 184-190.
- Ellis, C.M., Nagpal, P., Young, J.C., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., and Reed, J.W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4563-4574.
- Eriksson, S., Bohlenius, H., Moritz, T., and Nilsson, O. (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18, 2172-2181.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.M., and Deng, X.W. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475-479.
- Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., and Blazquez, M.A. (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142, 553-563.
- Fu, X., and Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421, 740-743.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16, 1406-1418.
- Fu, X., Richards, D.E., Ait-Ali, T., Hynes, L.W., Ougham, H., Peng, J., and Harberd, N.P. (2002). Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* 14, 3191-3200.
- Fukaki, H., Taniguchi, N., and Tasaka, M. (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J* 48, 380-389.

- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* 29, 153-168.
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., and Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* 44, 382-395.
- Gallagher, K.L., and Benfey, P.N. (2009). Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. *Plant J* 57, 785-797.
- Gallego-Bartolome, J., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2011a). DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 6, e23918.
- Gallego-Bartolome, J., Kami, C., Fankhauser, C., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2011b). A hormonal regulatory module that provides flexibility to tropic responses. *Plant Physiol* 156, 1819-1825.
- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Marin, J.A., Prat, S., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol Biol Evol* 27, 1247-1256.
- Gallego-Bartolome, J., Arana, M.V., Vandebussche, F., Zadnikova, P., Minguet, E.G., Guardiola, V., Van Der Straeten, D., Benkova, E., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2011c). Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in Arabidopsis. *Plant J* 67, 622-634.
- Gan, Y., Liu, C., Yu, H., and Broun, P. (2007). Integration of cytokinin and gibberellin signalling by Arabidopsis transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development* 134, 2073-2081.
- Gan, Y., Kumimoto, R., Liu, C., Ratcliffe, O., Yu, H., and Broun, P. (2006). GLABROUS INFLORESCENCE STEMS modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1383-1395.
- Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J* 37, 626-634.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3399-3414.
- Hamann, T., Mayer, U., and Jurgens, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development* 126, 1387-1395.

- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M., and Jurgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* 16, 1610-1615.
- Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* 19, 5-9.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42, 819-832.
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. (2010). Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* 22, 2680-2696.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19, 884-894.
- Hou, X., Hu, W.W., Shen, L., Lee, L.Y., Tao, Z., Han, J.H., and Yu, H. (2008). Global identification of DELLA target genes during Arabidopsis flower development. *Plant Physiol* 147, 1126-1142.
- Hudson, D., Guevara, D., Yaish, M.W., Hannam, C., Long, N., Clarke, J.D., Bi, Y.M., and Rothstein, S.J. (2011). GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in Arabidopsis. *PLoS One* 6, e26765.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., and Quail, P.H. (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305, 1937-1941.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* 13, 999-1010.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., and Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 49, 47-57.
- Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y.C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M., and Nakajima, M. (2007). Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* 50, 958-966.
- Jacobsen, S.E., and Olszewski, N.E. (1993). Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5, 887-896.
- Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A., and Olszewski, N.E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9292-9296.
- Jaillais, Y., and Chory, J. (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* 17, 642-645.

- Jaillais, Y., and Vert, G. (2012). Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nat Cell Biol* 14, 788-790.
- Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novak, O., Ku, S.J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.J., Strnad, M., and Kim, J. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 285, 23371-23386.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N.P., and Fu, X. (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145, 1460-1470.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446-451.
- Khush, G.S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* 2, 815-822.
- Kim, B.C., Soh, M.C., Kang, B.J., Furuya, M., and Nam, H.G. (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. *Plant J* 9, 441-456.
- Kim, B.C., Soh, M.S., Hong, S.H., Furuya, M., and Nam, H.G. (1998). Photomorphogenic development of the *Arabidopsis shy2-1D* mutation and its interaction with phytochromes in darkness. *Plant J* 15, 61-68.
- Kim, H., Park, P.J., Hwang, H.J., Lee, S.Y., Oh, M.H., and Kim, S.G. (2006). Brassinosteroid signals control expression of the *AXR3/IAA17* gene in the cross-talk point with auxin in root development. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 768-773.
- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11786-11791.
- Kim, T.W., and Wang, Z.Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61, 681-704.
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of *GAI* and *RGA*. *Genetics* 159, 767-776.
- Knox, K., Grierson, C.S., and Leyser, O. (2003). *AXR3* and *SHY2* interact to regulate root hair development. *Development* 130, 5769-5777.
- Köllmer, I., Werner, T., and Schmulling, T. (2011). Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and development. *J Plant Physiol* 168, 1320-1327.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z., and Schell, J. (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO J* 3, 1029-1037.
- Koornneef, M., and van der Veen, J.H. (1980). Induction and Analysis of Gibberellin Sensitive Mutants. *Theor. Appl. genet.* 58, 257-263.

- Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., P., v.L.-M.E., L., v.R., and Zeevaart, J.A.D. (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *PHYSIOL. PLANT* 65, 33-39.
- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alos, E., Alvey, E., Harberd, N.P., and Wigge, P.A. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* 484, 242-245.
- Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the nature of the substance secreted by the 'bakanae' fungus. *Nat. Hist. Soc. Formosa* 16, 213-227.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanahan, M.B., and Ho, T.H.D. (1988). Slender barley: A constitutive gibberellin-response mutant. *Planta* 175, 107-114.
- Lee, D.J., Park, J.Y., Ku, S.J., Ha, Y.M., Kim, S., Kim, M.D., Oh, M.H., and Kim, J. (2007). Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7*(ARR7) overexpression in cytokinin response. *Mol Genet Genomics* 277, 115-137.
- Lee, K.P., Piskurewicz, U., Tureckova, V., Carat, S., Chappuis, R., Strnad, M., Fankhauser, C., and Lopez-Molina, L. (2012). Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes Dev* 26, 1984-1996.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* 16, 646-658.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., and Quail, P.H. (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 18, 1815-1823.
- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (1996). Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* 10, 403-413.
- Li, J., and Nam, K.H. (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295, 1299-1301.
- Li, J., Nam, K.H., Vafeados, D., and Chory, J. (2001). BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127, 14-22.
- Lim, P.O., Woo, H.R., and Nam, H.G. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 8, 272-278.
- Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R., and Nam, H.G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot* 61, 1419-1430.
- Lloyd, A.M., Barnason, A.R., Rogers, S.G., Byrne, M.C., Fraley, R.T., and Horsch, R.B. (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 234, 464-466.

- Lokerse, A.S., and Weijers, D. (2009). Auxin enters the matrix - assembly of response machineries for specific outputs. *Curr Opin Plant Biol* 12, 520-526.
- Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science* 312, 1520-1523.
- Loots, G.G., Ovcharenko, I., Pachter, L., Dubchak, I., and Rubin, E.M. (2002). rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res* 12, 832-839.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C., and Fankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* 53, 312-323.
- Luo, X.M., Lin, W.H., Zhu, S., Zhu, J.Y., Sun, Y., Fan, X.Y., Cheng, M., Hao, Y., Oh, E., Tian, M., Liu, L., Zhang, M., Xie, Q., Chong, K., and Wang, Z.Y. (2010). Integration of light- and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in Arabidopsis. *Dev Cell* 19, 872-883.
- Manfield, I.W., Devlin, P.F., Jen, C.H., Westhead, D.R., and Gilmartin, P.M. (2007). Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family. *Plant Physiol* 143, 941-958.
- Mara, C.D., and Irish, V.F. (2008). Two GATA Transcription Factors Are Downstream Effectors of Floral Homeotic Gene Action in Arabidopsis. *Plant Physiol* 147, 707-718.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424, 571-574.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15, 1120-1130.
- Monna, L., Kitazawa, N., Yoshino, R., Suzuki, J., Masuda, H., Maehara, Y., Tanji, M., Sato, M., Nasu, S., and Minobe, Y. (2002). Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* 9, 11-17.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y., and Quail, P.H. (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16091-16098.
- Moon, J., Zhu, L., Shen, H., and Huq, E. (2008). PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9433-9438.

- Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G., and Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J* 35, 613-623.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Curr Biol* 20, 1138-1143.
- Müller, K., Tintelnot, S., and Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47, 864-877.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., and Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456, 459-463.
- Muto, H., Watahiki, M.K., and Yamamoto, K.T. (2007a). What Makes each Aux/IAA Gene Unique in its Gene Family, Expression Pattern or Properties of the Gene Product? *Plant Signal Behav* 2, 390-392.
- Muto, H., Watahiki, M.K., Nakamoto, D., Kinjo, M., and Yamamoto, K.T. (2007b). Specificity and similarity of functions of the Aux/IAA genes in auxin signaling of Arabidopsis revealed by promoter-exchange experiments among MSG2/IAA19, AXR2/IAA7, and SLR/IAA14. *Plant Physiol* 144, 187-196.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpote, C., Estelle, M., and Reed, J.W. (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol* 123, 563-574.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., Ecker, J.R., and Reed, J.W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132, 4107-4118.
- Naito, T., Kiba, T., Koizumi, N., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007). Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1557-1560.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I. (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* 46, 880-889.
- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2003). Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol* 133, 1843-1853.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D. (2008). DELLAs control plant immune responses by

- modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* 18, 650-655.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400, 781-784.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3985-3990.
- Oh, E., Zhu, J.Y., and Wang, Z.Y. (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* 14, 802-811.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.I., and Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J* 47, 124-139.
- Oh, E., Kang, H., Yamaguchi, S., Park, J., Lee, D., Kamiya, Y., and Choi, G. (2009). Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 403-419.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.S., Sun, T.P., Kamiya, Y., and Choi, G. (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 19, 1192-1208.
- Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., and Theologis, A. (2005a). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* 43, 29-46.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 118-130.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005b). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17, 444-463.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M. (2010). O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochim Biophys Acta* 1800, 49-56.
- Oono, Y., Ooura, C., and Uchimiya, H. (2002). Expression pattern of Aux/IAA genes in the *iaa3/shy2-1D* mutant of Arabidopsis thaliana (L.). *Ann Bot* 89, 77-82.
- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2000). RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407, 471-475.

- Ouellet, F., Overvoorde, P.J., and Theologis, A. (2001). IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* 13, 829-841.
- Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3282-3300.
- Penfield, S., Gilday, A.D., Halliday, K.J., and Graham, I.A. (2006). DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Curr Biol* 16, 2366-2370.
- Peng, J., and Harberd, N.P. (1993). Derivative Alleles of the *Arabidopsis* Gibberellin-Insensitive (*gai*) Mutation Confer a Wild-Type Phenotype. *Plant Cell* 5, 351-360.
- Peng, J., Richards, D.E., Moritz, T., Cano-Delgado, A., and Harberd, N.P. (1999a). Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* *gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* 119, 1199-1208.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11, 3194-3205.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., and Harberd, N.P. (1999b). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400, 256-261.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.
- Piskurewicz, U., and Lopez-Molina, L. (2009). The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant Signal Behav* 4, 63-65.
- Piskurewicz, U., Tureckova, V., Lacombe, E., and Lopez-Molina, L. (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO J* 28, 2259-2271.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., and Lopez-Molina, L. (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20, 2729-2745.
- Ploense, S.E., Wu, M.F., Nagpal, P., and Reed, J.W. (2009). A gain-of-function mutation in *IAA18* alters *Arabidopsis* embryonic apical patterning. *Development* 136, 1509-1517.
- Porri, A., Torti, S., Romera-Branchat, M., and Coupland, G. (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development* 139, 2198-2209.
- Prosen, D.E., and Simpson, R.B. (1987). Transfer of a Ten-Member Genomic Library to Plants Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotech* 5, 966-971.

- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18, 111-119.
- Qin, F., Kodaira, K.S., Maruyama, K., Mizoi, J., Tran, L.S., Fujita, Y., Morimoto, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). SPINDLY, a negative regulator of gibberellic acid signaling, is involved in the plant abiotic stress response. *Plant Physiol* 157, 1900-1913.
- Rademacher, E.H., Moller, B., Lokerse, A.S., Llavata-Peris, C.I., van den Berg, W., and Weijers, D. (2011). A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *Plant J* 68, 597-606.
- Rademacher, W. (2000). GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 501-531.
- Radley, M. (1956). Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* 178, 1070-1071.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., and Hardtke, C.S. (2011). Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell* 23, 1322-1336.
- Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O., and Callis, J. (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* 13, 2349-2360.
- Reed, J.W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 6, 420-425.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., and Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* 5, 147-157.
- Remington, D.L., Vision, T.J., Guilfoyle, T.J., and Reed, J.W. (2004). Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiol* 135, 1738-1752.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
- Richter, R., Behringer, C., Muller, I.K., and Schwechheimer, C. (2010). The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* 24, 2093-2104.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., and Phillips, A.L. (2008a). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 2420-2436.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G.,

- Phillips, A.L., and Hedden, P. (2008b). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J* 53, 488-504.
- Rinaldi, M.A., Liu, J., Enders, T.A., Bartel, B., and Strader, L.C. (2012). A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Mol Biol* 79, 359-373.
- Rogg, L.E., Lasswell, J., and Bartel, B. (2001). A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell* 13, 465-480.
- Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 24, 703-711.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299, 1896-1898.
- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G.S., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2002). Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416, 701-702.
- Sato, A., and Yamamoto, K.T. (2008). Overexpression of the non-canonical Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in Arabidopsis. *Physiol Plant* 133, 397-405.
- Schruff, M.C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., and Scott, R.J. (2006). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133, 251-261.
- Schwechheimer, C. (2008). Understanding gibberellic acid signaling - are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* 11, 9-15.
- Schwechheimer, C. (2012). Gibberellin signaling in plants - the extended version. *Front Plant Sci* 2, 107.
- Schwechheimer, C., and Willige, B.C. (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 12, 57-62.
- Sentandreu, M., Martin, G., Gonzalez-Schain, N., Leivar, P., Soy, J., Tepperman, J.M., Quail, P.H., and Monte, E. (2011). Functional Profiling Identifies Genes Involved in Organ-Specific Branches of the PIF3 Regulatory Network in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 3974-3991.
- Shen, C., Wang, S., Bai, Y., Wu, Y., Zhang, S., Chen, M., Guilfoyle, T.J., Wu, P., and Qi, Y. (2010). Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 61, 3971-3981.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., and Yang, S. (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 2578-2595.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, 520-523.

- Shin, J., Kim, K., Kang, H., S., Z.I., Bae, G., Lee, C.H., Lee, D., and Choi, G. (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7660-7665.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10, 155-169.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y., Martinez, E.C., and Sun, T.P. (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146, 1087-1099.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1555-1566.
- Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E., and Sun, T.P. (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 987-1000.
- Spielmeyer, W., Ellis, M.H., and Chandler, P.M. (2002). Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9043-9048.
- Steber, C.M., Cooney, S.E., and McCourt, P. (1998). Isolation of the GA-response mutant sly1 as a suppressor of ABI1-1 in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149, 509-521.
- Steiner, E., Efroni, I., Gopalraj, M., Saathoff, K., Tseng, T.S., Kieffer, M., Eshed, Y., Olszewski, N., and Weiss, D. (2012). The Arabidopsis O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell* 24, 96-108.
- Stephenson, P.G., Fankhauser, C., and Terry, M.J. (2009). PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7654-7659.
- Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, K.M., and Steber, C.M. (2004). Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12771-12776.
- Su, W., and Howell, S.H. (1995). The Effects of Cytokinin and Light on Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis* Seedlings Are Independent and Additive. *Plant Physiol* 108, 1423-1430.
- Sun, T., Goodman, H.M., and Ausubel, F.M. (1992). Cloning the Arabidopsis GA1 Locus by Genomic Subtraction. *Plant Cell* 4, 119-128.
- Sun, T.P. (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* 154, 567-570.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y. (1994). The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6, 1509-1518.
- Sun, X., Jones, W.T., Harvey, D., Edwards, P.J., Pascal, S.M., Kirk, C., Considine, T., Sheerin, D.J., Rakonjac, J., Oldfield, C.J., Xue, B., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2010a). N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of

- interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *J Biol Chem* 285, 11557-11571.
- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T.W., Ji, H., Wong, W.H., Rhee, S.Y., and Wang, Z.Y. (2010b). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 19, 765-777.
- Suzuki, H., Park, S.H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., Katoh, E., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Asami, T., and Nakajima, M. (2009). Differential expression and affinities of *Arabidopsis* gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J* 60, 48-55.
- Suzuki, J.Y., Bollivar, D.W., and Bauer, C.E. (1997). Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu Rev Genet* 31, 61-89.
- Swain, S.M., Tseng, T.S., and Olszewski, N.E. (2001). Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol* 126, 1174-1185.
- Swain, S.M., Muller, A.J., and Singh, D.P. (2004). The *gar2* and *rga* alleles increase the growth of gibberellin-deficient pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 694-705.
- Swain, S.M., Tseng, T.S., Thornton, T.M., Gopalraj, M., and Olszewski, N.E. (2002). SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol* 129, 605-615.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E., and Harter, K. (2001). Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294, 1108-1111.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319, 1384-1386.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T., and Oka, A. (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol* 48, 263-277.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E., and Yamamoto, K.T. (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 379-393.
- Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F., and Gilmartin, P.M. (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol* 50, 43-57.
- Thomas, H. (1997). Chlorophyll: a symptom and a regulator of plastid development. *New Phytologist* 136, 163-181.
- Tian, Q., Nagpal, P., and Reed, J.W. (2003). Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant J* 36, 643-651.

- Timpte, C., Wilson, A.K., and Estelle, M. (1992). Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. *Planta* 188, 271-278.
- Timpte, C., Wilson, A.K., and Estelle, M. (1994). The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* 138, 1239-1249.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15, 533-543.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16, 533-543.
- Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13, 2809-2822.
- To, J.P., Deruere, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 19, 3901-3914.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Rodriguez-Concepcion, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11626-11631.
- Tseng, T.S., Swain, S.M., and Olszewski, N.E. (2001). Ectopic expression of the tetratricopeptide repeat domain of SPINDLY causes defects in gibberellin response. *Plant Physiol* 126, 1250-1258.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 1008-1019.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693-698.
- Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M., and Fukaki, H. (2008). Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49, 1025-1038.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997a). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-1868.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999a). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* 19, 309-319.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999b). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5844-5849.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611-1623.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and

- highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.
- Vavilin, D.V., and Vermaas, W.F.J. (2002). Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 115, 9-24.
- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guedon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J.H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L., and Traas, J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* 7, 508.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J., and Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9829-9834.
- Vicient, C.M., and Delseny, M. (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal Biochem* 268, 412-413.
- Vierstra, R.D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 385-397.
- Walcher, C.L., and Nemhauser, J.L. (2011). Bipartite promoter element required for auxin response. *Plant Physiol* 158, 273-282.
- Wang, L., Hua, D., He, J., Duan, Y., Chen, Z., Hong, X., and Gong, Z. (2011). Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain Gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 7, e1002172.
- Wen, C.K., and Chang, C. (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14, 87-100.
- Willige, B.C., Ogiso-Tanaka, E., Zourelidou, M., and Schwechheimer, C. (2012). WAG2 represses apical hook opening downstream from gibberellin and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5. *Development* 139, 4020-4028.
- Willige, B.C., Isono, E., Richter, R., Zourelidou, M., and Schwechheimer, C. (2011). Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 2184-2195.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 1209-1220.
- Wilson, R.N., and Somerville, C.R. (1995). Phenotypic Suppression of the Gibberellin-Insensitive Mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108, 495-502.
- Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A. (1995). The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6640-6644.

- Yabuta, T. (1935). Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice. *Agr. Hort.* 10, 17-22.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59, 225-251.
- Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H., and Kamiya, Y. (1998a). The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 116, 1271-1278.
- Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G., Kamiya, Y., and Sun, T. (1998b). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 10, 2115-2126.
- Yasumura, Y., Crumpton-Taylor, M., Fuentes, S., and Harberd, N.P. (2007). Step-by-step acquisition of the gibberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Curr Biol* 17, 1225-1230.
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., and Meyerowitz, E.M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7827-7832.
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., and Callis, J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11795-11800.
- Zenser, N., Dreher, K.A., Edwards, S.R., and Callis, J. (2003). Acceleration of Aux/IAA proteolysis is specific for auxin and independent of AXR1. *Plant J* 35, 285-294.
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2007). Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3037-3057.

7. Publikationen

7.1. Erstautorenschaft

Richter R., Behringer C., Müller I.K. and Schwechheimer C. (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes & Development* 24, 2093-2104

Beitrag Dritter zur Publikation:

Figure 5H: Carina Behringer führte das Microarray-Experiment und die Analyse durch.

Figure 7B: Carina Behringer führte das Microarray-Experiment und die Analyse durch.

7.2. Koautorenschaft

Willige B.C., Isono E., **Richter R.**, Zourelidou M., and Schwechheimer C. (2011) Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23, 2184-2195

Eigener Beitrag zur Publikation:

Figure 7A: Wurzelgravitationsassay für Landersberg *erecta* (Ler), *ga1-3* und *ga1-3 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1 (ga1 della)*.

Figure S4: Wurzelgravitationsassay für die GA-Rezeptor *GID1* Mutanten *gid1ab*, *gid1ac*, und *gid1bc*.

Hakenjos J.P., **Richter R.**, Dohmann E.M.N., Katsiarimpa A, Isono E., and Schwechheimer C. (2011) MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiology* 156, 527-536

Eigener Beitrag zur Publikation:

Figure 3E: qRT-PCR Analyse der Auxin-responsiven Gene *IAA3* und *IAA13* beim Wildtyp und der *axr1-12* Mutante. Weiterhin Studium zur Responsivität dieser Gene in Antwort auf 5 μ M 2,4D und 10 μ M MLN4924.

Figure 4D-4E: qRT-PCR Analyse im Wildtyp für die Gene *FedA*, *RbcS1A*, *PsbA*, und *HY5*.

8. Anhang

8.1. Anhang A: Oligonukleotide

Tabelle A1: Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR-basierende Genotypisierung der untersuchten Mutanten.

Oligonukleotid	Sequenz
ANAC034 gLP	TGATATATGGCAATTGTATCCTCCACAACAAG
ANAC034 gRP	CTTTTGTACTCGGCACAATGATATTTCA
ARF1 gLP	AGCTAGTTGAAAATGTTAATGTGGATGAATGTTTC
ARF1 gRP	GGAGTTGAAGGGTAAGGTTGCATGTGAAATCAGT
ARF2 gLP	AGTACTGGCCACCGCATGGCATGCCA
ARF2 gRP	GCAGCATCATTCAAGTTGTTTCTCTG
BAS1 gLP	ATCCTCCTTTTTAACACCTCATTCCCTCTTTC
BAS1 gRP	CTCCGCCGCTCTATCAGCTTCAACAACGACT
BEL1 gLP	AGCTCAAGAGCTACTGAGTGAGTTTTGCAG
BEL1 gRP	GTATGTCACAGCTTGGTTACCGTACAA G
BTB/TAZ gLP	TGAAATCTTTATCGTGTGGCC
BTB/TAZ gRP	TTCATCTTCTGTGCCAATTCC
bZIP gLP	TGTATTGCAATTTCTCACCC
bZIP gRP	AAACCCTTTGAGATCGAATCC
CYCP3 gLP	CGAACACACTCACATTCACATG
CYCP3 gRP	TTTCGACATTGAATGAGAATCG
CYP71F2 gLP	ACCGTCTCTTCCGCCGCTTCGCTGAAAAATAC
CYP71F2 gRP	GACACAACCGAAAAGTCTCGGAAACTATGT
CYP85A2 gLP	GAATTCGTGCTGAAAATTGC
CYP85A2 gRP	ACCCGAGATTCAGATTCAATG
CXC gLP	ACGCGGTTTCTCATAAAGAGTCTCGTTTCAG
CXC gRP	CTGCCAAATGCATTTTTACATCCTTCACATCT
GA1 gLP	ACATTGTTGCATAGTTTGGAGGGGATGC
GA1 gRP	TGGAATATGTCCATTCGAGCTGATGCTGAGC
GAI 300	CTAGATCCGACATTGAAGGA

GAI 302	AGCATCAAGATCAGCTAAAG
GAI 304	TCGGTACGGGATTTTCGCAT
gid1a-1 gLP	GCCTAAGGCCTTTCATTGATC
gid1a-1 gRP	TACAAACGCCGAAATCTCATC
gid1b-1 gLP	TCACCTTCCGGTAGATAAGCC
gid1b-1 gRP	CTCCACTGCTTCCTAATTCCC
gid1c-2 gLPwt	ACCAGCTGATGCTGGCACTTCACCAAGT
gid1c-2 gRPwt	GGCATTCTGCGTTTACAAATGCAGCTATCT
gid1c-2 gLPm	CAGACAGTGGTTCCTCTCAATACA
gid1c-2 gRPm	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
GNC gLP	ACACTTATCACGCTGATCATCTCC
GNC gRP	TGTGGGAACACTTGTTGATAAGCTG
GNL gLP	TATCTGATGGTGGTTCATCATCAAG
GNL gRP	ATGCTAGATCATCGAAATAGATATTG
LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LBD4 gLP	TCCAAACAGAAAACCCTCTTG
LBD4 gRP	ATAATATAAACGGGTCCGGCCC
MATE gLP	CATTATTCTGAATTCAGGGATACTG
MATE gRP	GTATGCTTGGCCACAGATTGGTTCCA
MAX1 gLP	AGGTAATTCAGACCACTCAGGTTTTTCCATC
MAX1 gRP	GTGACCTTGTTAGATTGGAGTTTCAACAGCT
MLO12 gLP	AGAGCGATCACTAGAGGAAACACCAACATG
MLO12 gRP	GAGCATAGAGAGGTAGAGTGATGTAGCTG
MYB13 gLP1	CAACATTTGGCTTCCTTTGCTTTCA
MYB13 gLP2	AGCTGATAGATCGTGGCCTTAGCATTTCCTC
MYB13 gRP	GAACATCTTCGGATGACGTCGCGGA
MYB-like gLP1	CTATCCACTGAGCTACAGGCG
MYB-like gRP1	CTTCCTCTGTCCAAGGGACTC
MYB-like gLP2	GTTTGGGGATTCTATGTTGCC
MYB-like gRP2	AAGCTTCCTCCACACATAGAGC

NAM gLP	TCGATTATCGCCGATGTCGATATCTAC
NAM gRP	CATCAGGTGATGACAATGAAGCGTGTGA
PIF1 gLP	AGATCGTCGAAGACCTTGTTG
PIF1 gRP	GGGTGAAGATGATGATCTTATGG
PIF3 gLP	AGTCTGTTGCTTCTGCTACGC
PIF3 gRP	TTGCATAAGGCATTCCCATAC
POT gLP	ACATCATGGAGGAGCAAAGCAAGAACAAGATC
POT gRP	CTCATGTGTTTGGTGTGGGTGAGTTTACCA
PROTK1 gLP	CTATGCAATGATGCAATGCAC
PROTK1 gRP	TGTCCAGTCTAACTGCCCTTG
PROTK2 gLP	CTGCATGAAGCAATTGAGCCAAAAGTAG
PROTK2 gRP	ATCTCCATACTCCCTTCTCGCGTTCT
RAV1 gLP1	GTCCGGTTCATATCTCCTGTG
RAV1 gRP1	CATGGAGTGCCAGCTAGATTC
RAV1 gLP2	TTTTTCCAACCATTTAGCTCG
RAV1 gRP2	GAATCTAGCTGGCACTCCATG
RGA 205	TCGCTTAGTAGTTAGTACTC
RGA 212	GGTGATTTTCACGGTGGTTG
RGA 253	CATAGACCATAGTATTCGTGA
RING ZNF gLP	AGCAGCTTCACCATTGTCCTCTGCTGCAACTC
RING ZNF gRP	CTAAGCATTGATGTGGCTTGAAGGAGT
RLP29 gLP	CACTTATCACACGTCTCTCGACTCGATTTC
RLP29 gRP	TGAGAGATCGTTGGAGGGATTGTACCGGT
SCL3 gLP	TAGTCATGATTCCAAATCCACCTCATGCCATG
SCL3 gRP	GATACCGAGTATAGAGGTGATCTTGCCAGCA
SGR5 gLP	GTCACCACCACAAACACATCCACTCAG
SGR5 gRP	CAAGTGGGTTTCAGGGCAAACATAGACTC
SM	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA
SPL4 gLP	GTCTAGAGGTAGCATCAATCGTGGTGGCTC
SPL4 gRP	TCAGAGTGACCGTGGCTTTTGGTTAGTAGTTTC
SPY gLP (SAIL)	TGGTGGTTTATTCAGCGGTAG

SPY gRP (SAIL)	TCCAGCATAAGGGAATGTGTC
TINY gLP	ATGCATATAAAGTACGTACTTGATACTTGGGTAGCT
TINY gRP	GATGATCTAAACCGATCTTAATCAATTCTAT
TriHelix gLP	TGATGTTAACAAATGATTGGCCA
TriHelix gRP1	ATGTTTCATTGTCATGACCATGATG
TriHelix gRP2	CTATCACTAGCCATGGCTTGTTCTTGTGCTC
WAK1 gLP	GCTTCTTGGTCATTCTGCTTG
WAK1 gRP	TTGTGCTGACAAGATGTGACC
WRKY18 gLP	ACAGCTCCAGCAACGAAGATCATCATCATC
WRKY18 gRP	GAGAATCACGAGACTTGCAGAGTGAGT
WRKY70 gLP	ATCATACAAACCACACCAAGAGGAAAG
WRKY70 gRP	CAAGATAGATTCGAACATGAACTGAAGATAGA
XER gLP	TCCTGTAGATTGTATTACTATTGGTCG
XER gRP	TGAGCAAGCAAGAGACTTGAAG
ZIP11 gLP	ACGTTTCATAAGCGGTGTATCTCCTTATTTTC
ZIP11 gRP	CAAGTGTCCCATATCATAACAATGGCAATGA

Tabelle A2: Sequenzen der verwendeten Primer für die Klonierung der Promotor-GUS-Konstrukte.

Oligonukleotid	Sequenz
GNC-Pro <i>EcoRI</i> LP	AAGAATTCACCAAATCCTATAGTATGTGTTAG
GNC-Pro <i>BglII</i> RP	AAAGATCTTGATGAGATAAACAATGAAGACAC
GNL-Pro <i>EcoRI</i> LP	AAGAATTCCCAAACCTTTACTTGAATCTTGATGC
GNL-Pro <i>BglII</i> RP	AAAGATCTGACCGATAGAGATCGATGAAGCAC

Tabelle A3: Sequenzen der verwendeten Primer für Gateway-basierende Klonierungen der Überexpressionslinien.

Oligonukleotid	Sequenz
GNC-GFP attB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA TTC AAA TTT TCA TTA CTC G
GNC-GFP attB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC ACC GTG AAC CAT TCC ATA CGA CAG
YFP-GNC attB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAA CCG TGA ACC ATT CCA TAC G
YFP-GNL attB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGG TTC CAA TTT TCA TTA CAC
YFP-GNL attB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CCC GTG AAC CAT TCC GTG CGA TAG

Tabelle A4: Sequenzen der verwendeten Primer für ein 2step-Protokoll für die quantitative *Real-time* PCR.

Oligonukleotid	Sequenz
ACT8 2step-LP	GCAGCATGAAGATTAAGGTCGTGG
ACT8 2step-RP	TGTGGACAATGCCTGGACCTGCT
ARF2 2step-LP	ATGATGCTTGTGGTGACGA
ARF2 2step-RP	GAAGATTTTGCGAACCATGC
ARF7 2step-LP	GCTCATATGCATGCTCCACA
ARF7 2step-RP	GCAATGCATCTCTGTCATATTTGT
Aux/IAA3 2step-LP	CAAAGATGGTGATTGGATGCT
Aux/IAA3 2step-RP	TGATCCTTAGTCTCTTGACGTA
Aux/IAA19 2step-LP	AATTGTATCAAATTGTGAGAGGAAAA
Aux/IAA19 2step-RP	CGTTATCTCAAGCCCGAGTC
Aux/IAA29 2step-LP	CCGAGTCTTCAATAGTTTACGATG
Aux/IAA29 2step-RP	CGAATATGACGATGATGATAACTACC
GAI 2step-LP	AACTCGGCATGTTGTCCTG

GA2ox1 2step-LP	TCCCGATCACACTTCCTTCT
GA2ox1 2step-RP	GCTCTTGAACCTCCCATTG
GA2ox2 2step-LP	CCCCTCAAATTTTCCGTGA
GA2ox2 2step-RP	TCTCCAACACCTTGTACGACAC
GA3ox1 2step-LP	TGCCTTCCAAATCTCAAACC
GA3ox1 2step-RP	ACCGGTGAGAACTCAATGTC
GA3ox2 2step-LP	CCCTCCACGATTTCCGTA
GA3ox2 2step-RP	GCCAACTTTTGCATATGTTCTTC
GA20ox1 2step-LP	CATGGGTTTCAGCCATTG
GA20ox1 2step-RP	CTCTAAAGTAGTCCCGTTTTACGC
GA20ox2 2step-LP	GAAGCTTGACCAAACACG
GA20ox2 2step-RP	GCATCCGCTATTAGTGACTION
GAI 2step-RP	AAAGCGCGTGAACGAGAC
GID1a 2step-LP	GCTGCGAGCGATGAAGTTA
GID1a 2step-RP	AACCCATGTATTGAGAGGAACC
GID1b 2step-LP	TTTTGCTGGGTTTTGGAGAC
GID1b 2step-RP	CCATGTGTTGAGTGGGACAA
GID1c 2step-LP	CTTTTTGCGTTTTGATTGGTAA
GID1c 2step-RP	CCATGTATTGAGAGGAACCACTG
GNC 2step-LP	GCGTGATTAGGGTTTGTTG
GNC 2step-RP	CTTTGCCGTATAACCACATGC
GNL 2step-LP	CCATATCTCCCAACCTCTCG
GNL 2step-RP	TGGGCACCATTGATCAC
POR A 2step-LP	CCCTTCAAGCTGCTTCTTTG
POR A 2step-RP	GATGCTGAAGCATTAAATTTCC
POR B 2step-LP	CGAGAGCACATTCCTCTCTTC
POR B 2step-RP	GCTTGGATCACTCACACCT
POR C 2step-LP	GGATTGAATGGGCAAACAG
POR C 2step-RP	TGTAAGCCTTTGCTCCATCA
PP2A 2step-LP	TCTTTTCATGGGTGATTATGTTGA
PP2A 2step-RP	AACGAACTTTCAGTGCTACCAA

RGA 2step-LP	TACATCGACTTCGACGGGTA
RGA 2step-RP	GTTGTCGTCACCGTCGTTT
RGL2 2step-LP	CTGCGTTTCCAAAGGAAGAG
RGL2 2step-RP	GTCGGATCCTCTTGCTGCTA
SLY1 2step-LP	CAAAACGGCACAAGACGAG
SLY1 2step-RP	GCAGCCGATGTTAGTCCAGT
UBC21 2step-LP	TCCTCTTAACTGCGACTCAGG
UBC21 2step-RP	GCGAGGCGTGTATACATTTG

Tabelle A5: Sequenzen der verwendeten Primer für ein 3step-Protokoll für die CHIP-PCR.

Oligonukleotid	Sequenz
ARF2 AuxRE CHIP-LP05	AGGATGACTTAAATTGCTATA
ARF2 AuxRE CHIP-RP05	CTATTACCGGTTGTAACCATTTCC
ARF2 AuxRE CHIP-LP06	TGAAGCTGAGTTTTGACTACCTCTG
ARF2 AuxRE CHIP-RP06	CTAGTCTAGGCTTTATCGGAGTC
ARF2 AuxRE CHIP-LP07	ATCGAGTAATGTCAAGGAGCTA
ARF2 AuxRE CHIP-RP07	AGCAGACGATATCAACAAGAA
GNC AuxRE-LP01	TCCTTAGATCATTTAGTTAGCTT
GNC AuxRE-RP01	CATCCCACCTTAGTATTGCC
GNC AuxRE-LP02	TCACGTAATGCTAATTGACTC
GNC AuxRE-RP02	ACTAGATTTTATTAAATCGTATCAG
GNC AuxRE-LP03	GTGATTCTTCATGAATACAGTAG
GNC AuxRE-RP03	TGGAGAGTGAGAGCCACACAAATC
GNC AuxRE-LP04	GATTTGTGTGGCTCTCACTCTCC
GNC AuxRE-RP04	AGAGGTTACGTCGAGTCCATGGC
GNC AuxRE-LP05	TCATTGGTATGACATCCGGACTTG
GNC AuxRE-RP05	TGAGACACGAGCCAAACACACATGG
GNC AuxRE-LP06	ATGAATATAATAGAGACCATGTG
GNC AuxRE-RP06	TGATGAGATAAACAAATGAAGAC

GNC G-box ChIP-LP1	TGGATTGTCTCTTTGTGTGTG
GNC G-box ChIP-RP1	TCCATGATTGAGAGATAGG
GNC G-box ChIP-LP2	AATATTTATATAAATTAGGG
GNC G-box ChIP-RP2	ATTAAGAAAGTTGAAAATATATG
GNC G-box ChIP-LP3	ACAGAGACATAAGTACCCTAA
GNC G-box ChIP-RP3	TGATGAGATAAACAAATGAA
GNC H3K9 ChIP LP-Ha	GTGATTCTTCATGAATACAGT
GNC H3K9 ChIP RP-Ha	GATCCTTTTACTTGTTGTCT
GNC H3K9 ChIP LP-Hb	CGTCTATGATCTCTCTCAATC
GNC H3K9 ChIP RP-Hb	GACTTGATGATGATGATGATG
GNL AuxRE-LP01	GTCCTGAGTGACCTGTAAAC
GNL AuxRE-RP01	TCGCATGTGATTCATCAATAATC
GNL AuxRE-LP02	ACAGTGTATGCAATAGTTAATCAC
GNL AuxRE-RP02	AGCTACGTAATTTGAATTCAAG
GNL AuxRE-LP03	ATCATGATATGTGTGGCTCTTG
GNL AuxRE-RP03	GAGGTTACCGTGAGTACATCTG
GNL AuxRE-LP04	AGATCTCAGCCGTTGTAGTTCG
GNL AuxRE-RP04	GGGCAGAGACCAGTGTTATATA
GNL AuxRE-LP05	CTTCATCAGTCTCTAAACATGGCC
GNL AuxRE-RP05	CTGATTTGGTGAAAGATACATA
GNL G-box ChIP-LP1	ATGTATGTGGGGGGTCCTGAGTGA
GNL G-box ChIP-RP1	AGTATCATAAACACTTGATCTTTC
GNL G-box ChIP-LP2	TATCTACTTGTTATTTGTTATATG
GNL G-box ChIP-RP2	TCGCCCTTGTCAAACACTGTGG
GNL G-box ChIP-LP3	CTCCTAATTAACCTCTACTAGA
GNL G-box ChIP-RP3	GACCGATAGAGATCGATGAAG
GNL H3K9 ChIP LP-Ha	ACGAAATATTACAGATAGGA
GNL H3K9 ChIP RP-Ha	ATTCGAACTACAACGGCTGAGA
GNL H3K9 ChIP LP-Hb	CATAGTATAGCTTGGATCC
GNL H3K9 ChIP RP-Hb	GCTTGGTGATGAAAATGTTGT

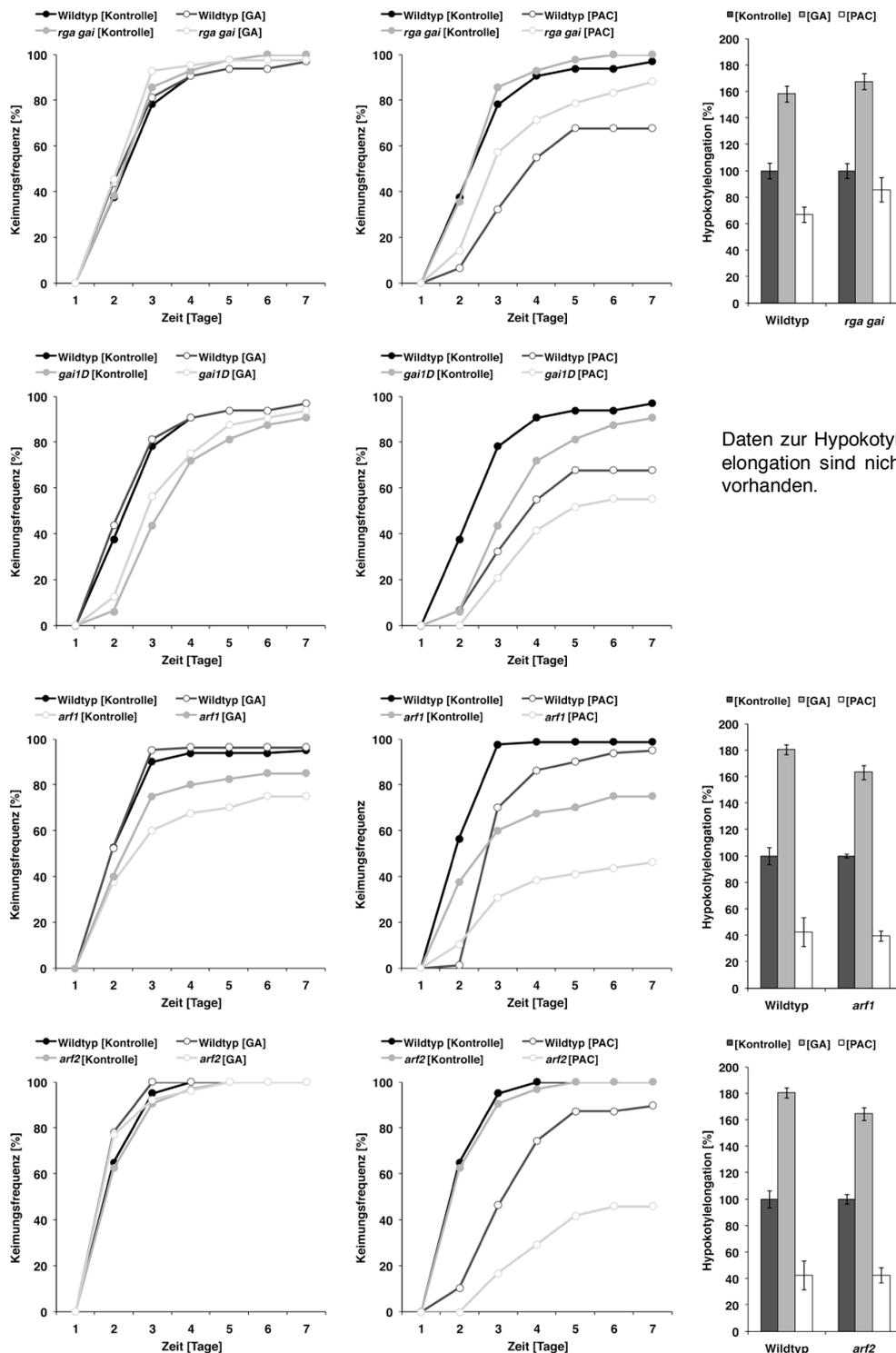
Tabelle A6: Liste der untersuchten T-DNA Insertionslinien.

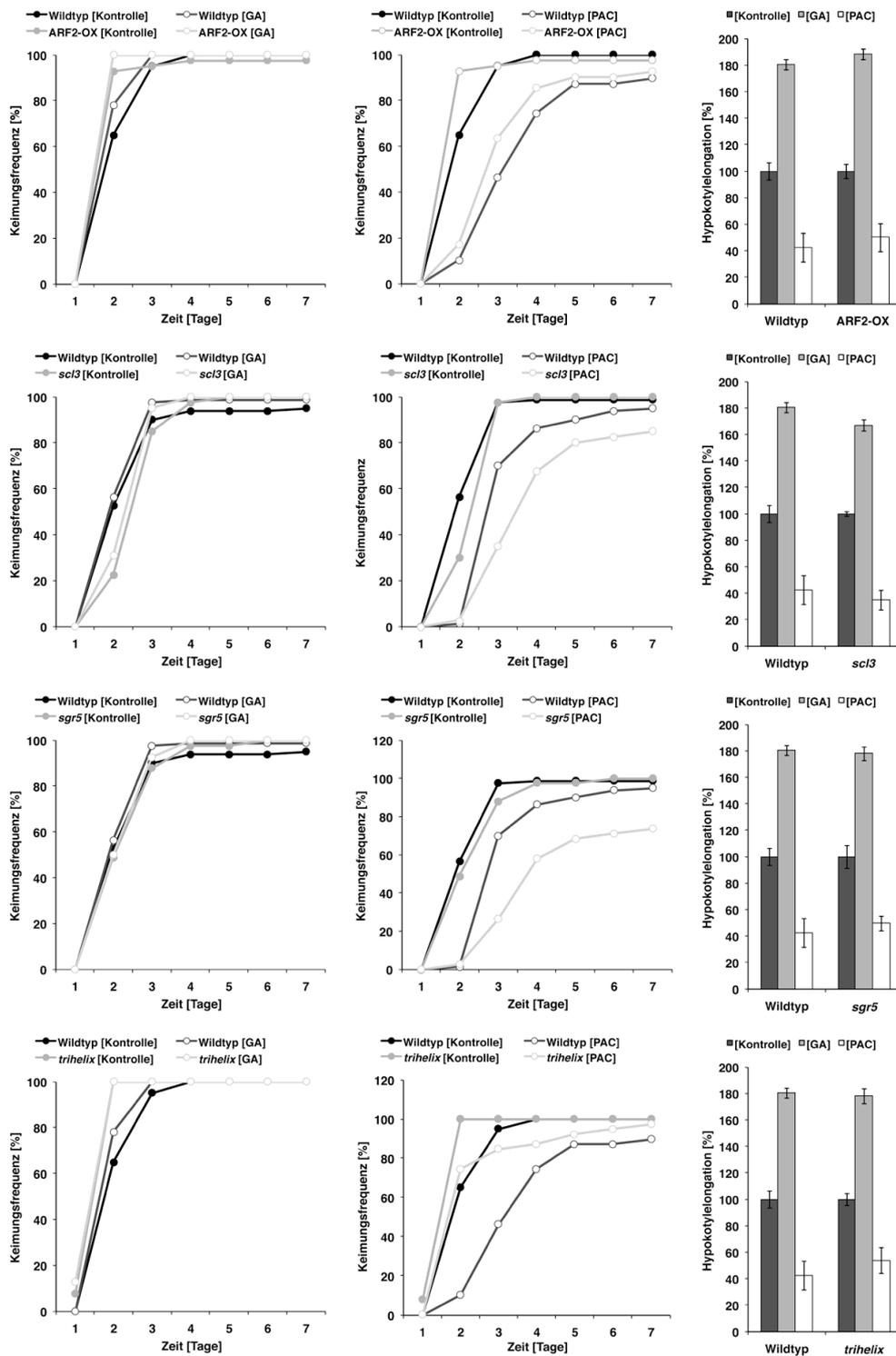
Kürzel	AGI	Genbezeichnung	T-DNA Insertionslinie	Ökotyp
TF1	AT5G41410	BEL1	SAIL_64_G10	Columbia
TF2	AT3G58120	bZIP	SM_3_19448	Columbia
TF3	AT1G50420	SCL3	SALK_002516	Columbia
TF4	AT3G04070	NAM	SALK_066615	Columbia
TF5	AT2G01940	SGR5	SALK_087765	Columbia
TF6	AT5G28300	Trihelix	SM_3_31494 SALK_079948	Columbia Columbia
TF7	AT1G06180	MYB13	SALK_044860 SALK_094506	Columbia Columbia
TF8	AT2G36080	RAV1	SALK_069174 SALK_146872	Columbia Columbia
TF9	AT1G31320	LBD4	SALK_018781	Columbia
TF10	AT3G11280	MYB-like	SALK_004053 SALK_025629	Columbia Columbia
TF11	AT2G02450	ANAC034	GT_5_102100	Landsberg <i>erecta</i>
TF12	AT3G56400	WRKY70	SALK_025198	Columbia
TF13	AT1G53160	SPL4	SALK_137581	Columbia
TF14	AT4G31800	WRKY18	SALK_093916	Columbia
TF15	AT3G22760	CXC	GT_3_37840	Landsberg <i>erecta</i>
TF16	AT4G32800	TINY-related	GABI_143C01	Columbia
TF17	AT1G59750	ARF1	SALK_041472	Columbia
TF18	AT4G26150	GNL/CGA1	SALK_003995	Columbia
TF19	AT5G56860	GNC	SALK_001778	Columbia
ST1	AT2G42800	RLP29	SALK_022220	Columbia
ST2	AT2G39200	MLO12	SAIL_50_C10	Columbia
ST3	AT2G04240	XER	SALK_075188	Columbia

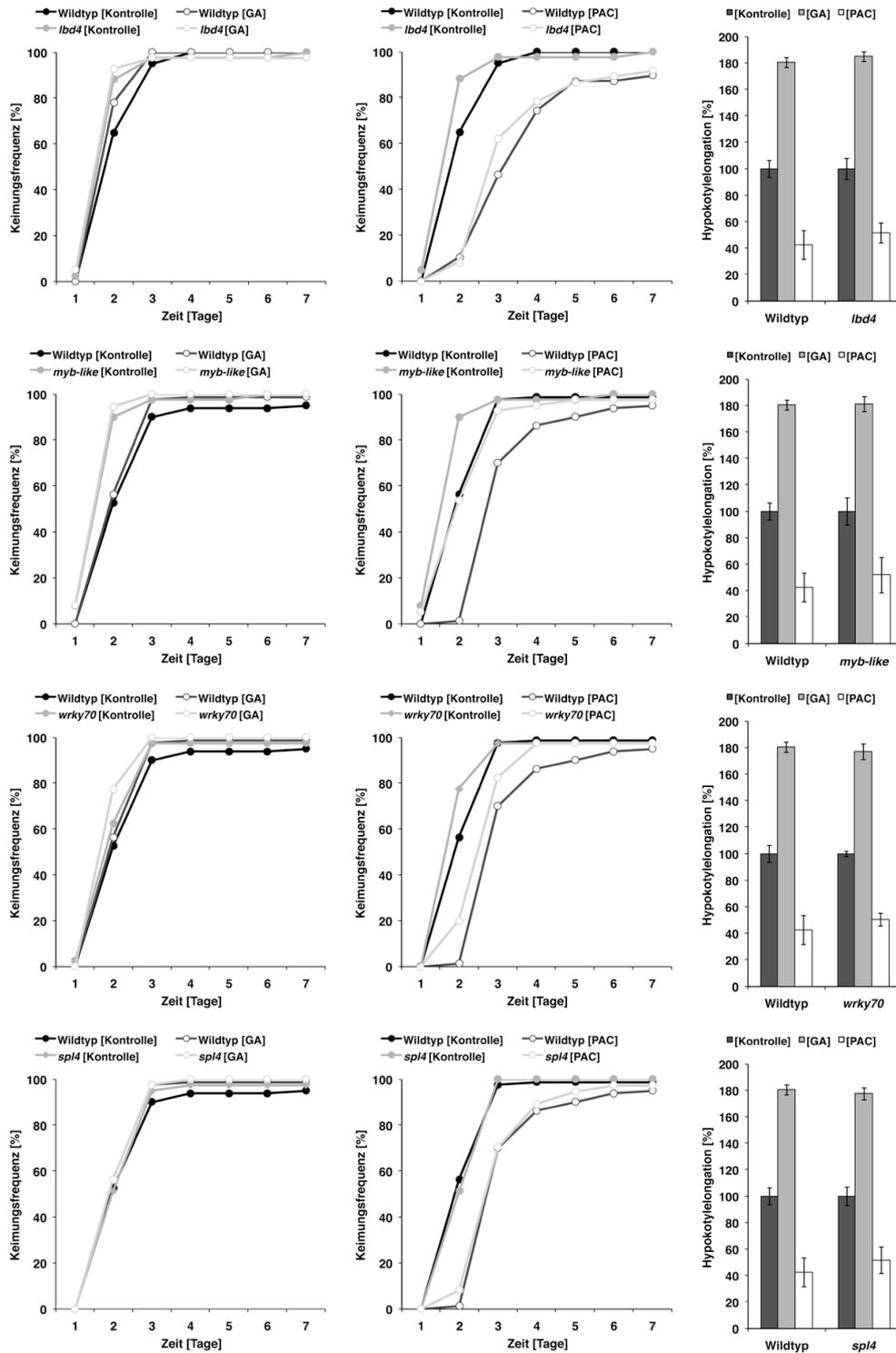
ST4	AT5G47610	RING Zinc Finger	SM_3_20173	Columbia
ST5	AT4G23200	Protein Kinase 1	SALK_033837	Columbia
ST6	AT1G56720	Protein Kinase 2	SALK_138916	Columbia
ST7	AT5G67480	BTB/TAZ	GT_3_16194	Landsberg <i>erecta</i>
ST8	AT1G21250	WAK1	SALK_107175	Columbia
BS1	AT2G26710	BAS1	SALK_006781	Columbia
BS2	AT3G30180	CYP85A2	SALK_056270	Columbia
BS3	AT5G57220	CYP71F2	SALK_123882	Columbia
BS4	AT2G26170	MAX1	SAIL_25_A05	Columbia
OT1	AT1G55910	ZIP11	SAIL_346_A08	Columbia
OT2	AT1G58340	MATE	SALK_067667 SALK_135933	Columbia Columbia
OT3	AT2G45080	CYCP3	GABI_662A04	Columbia
OT4	AT1G68570	POT	SALK_076121 SALK_130095	Columbia Columbia

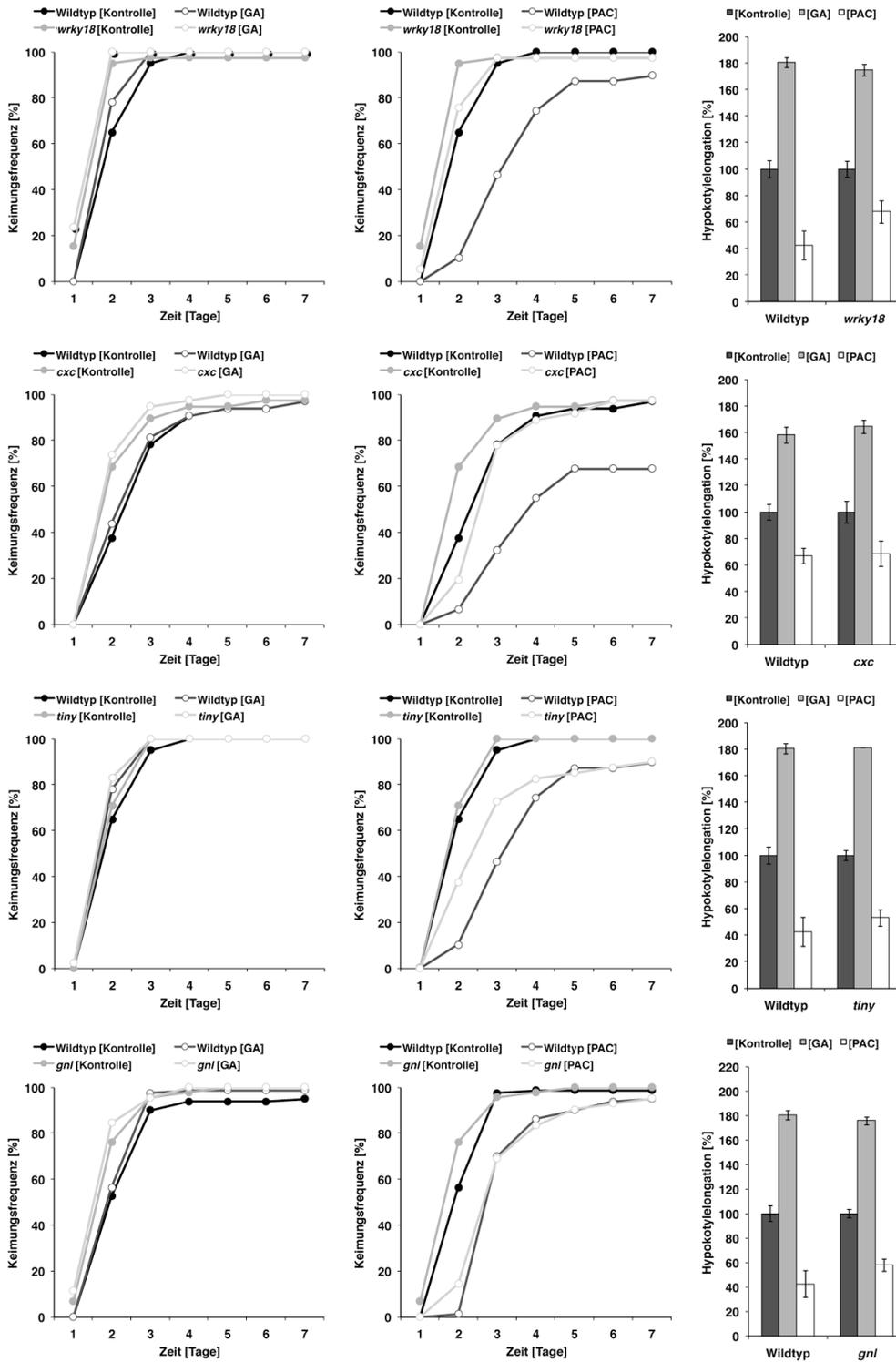
8.2. Anhang B: Mutantenanalyse

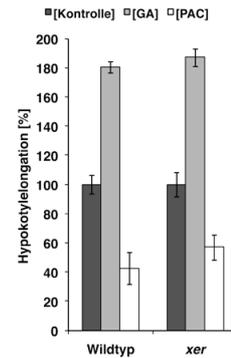
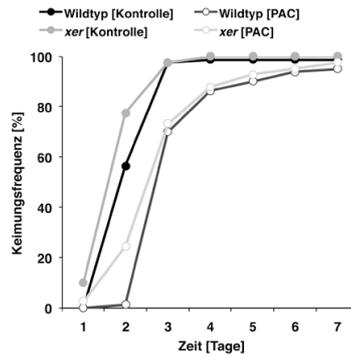
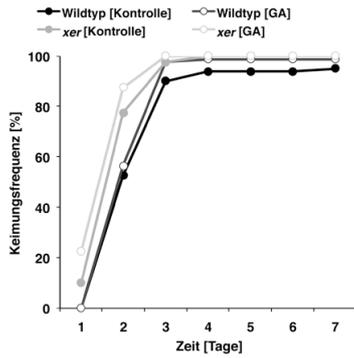
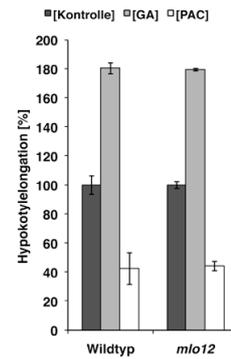
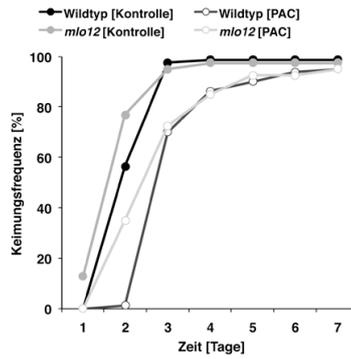
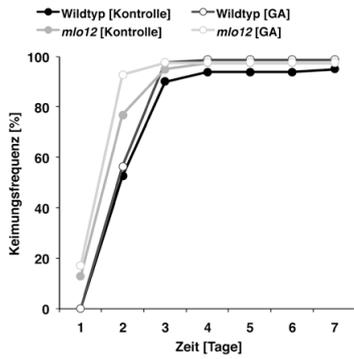
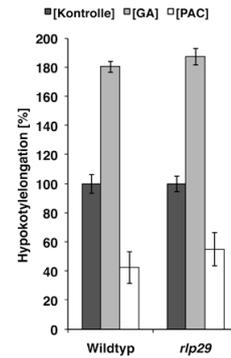
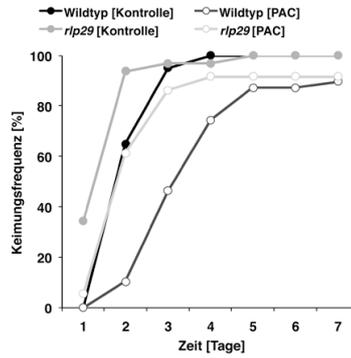
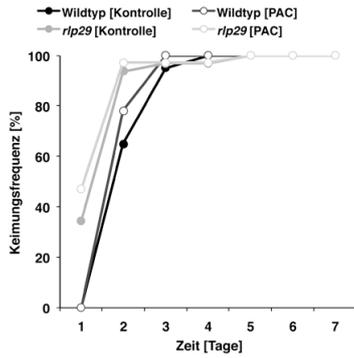
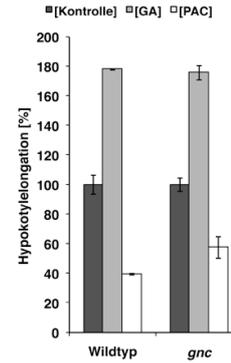
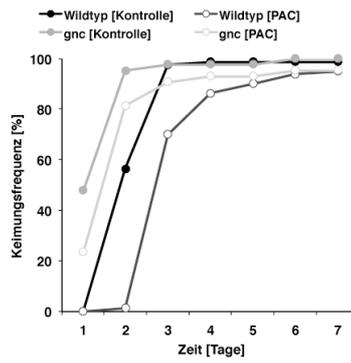
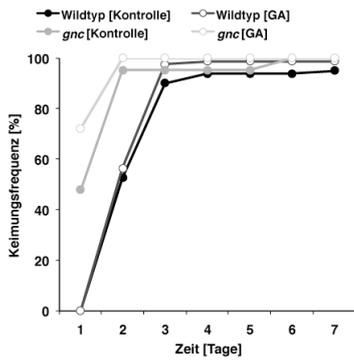
Abbildung B1: Zusammenfassung der untersuchten Mutanten für die Parameter Keimung und Hypokotylelongation, die im Microarray-Experiment als GA-reguliert identifiziert worden waren.

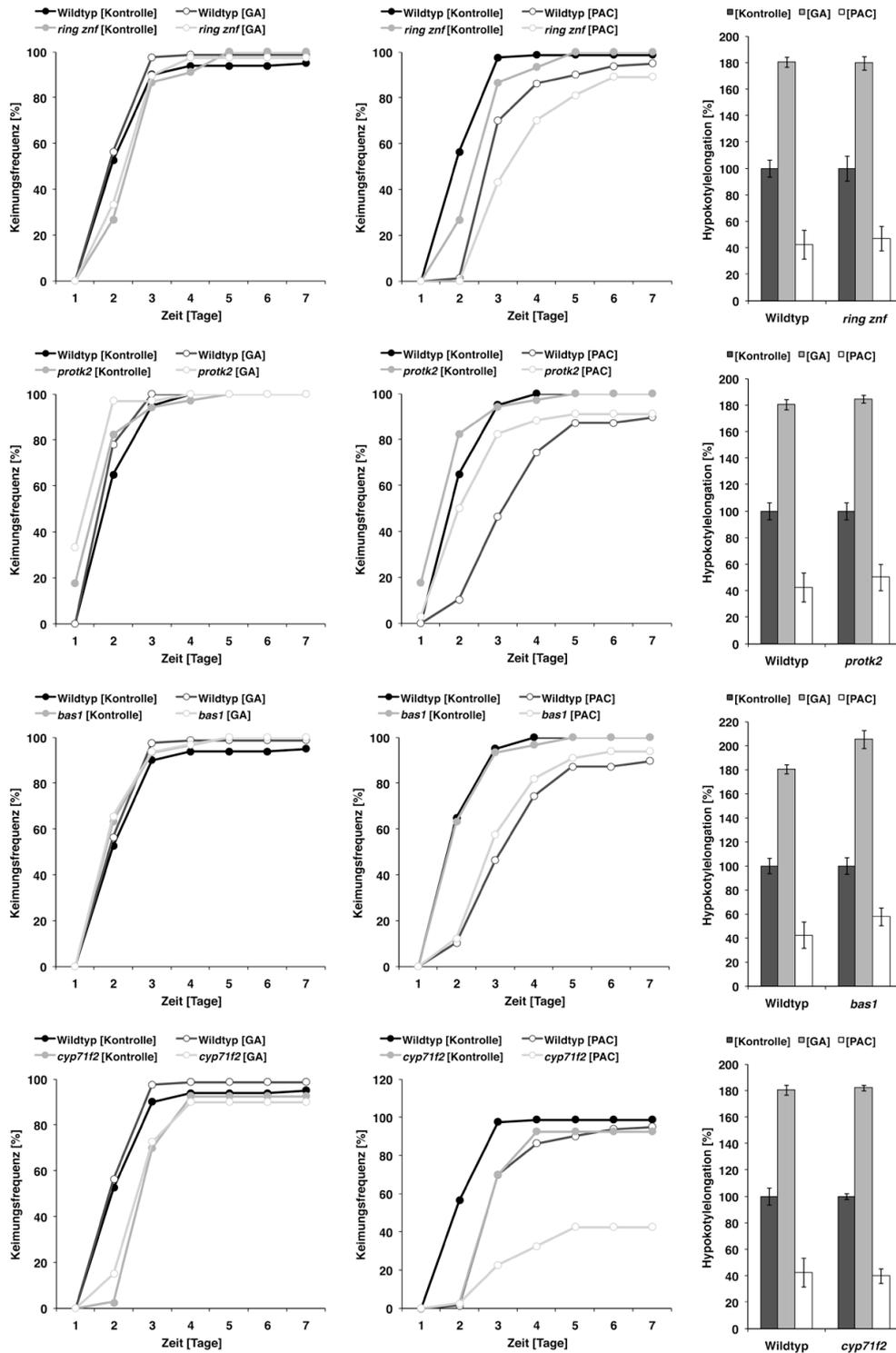


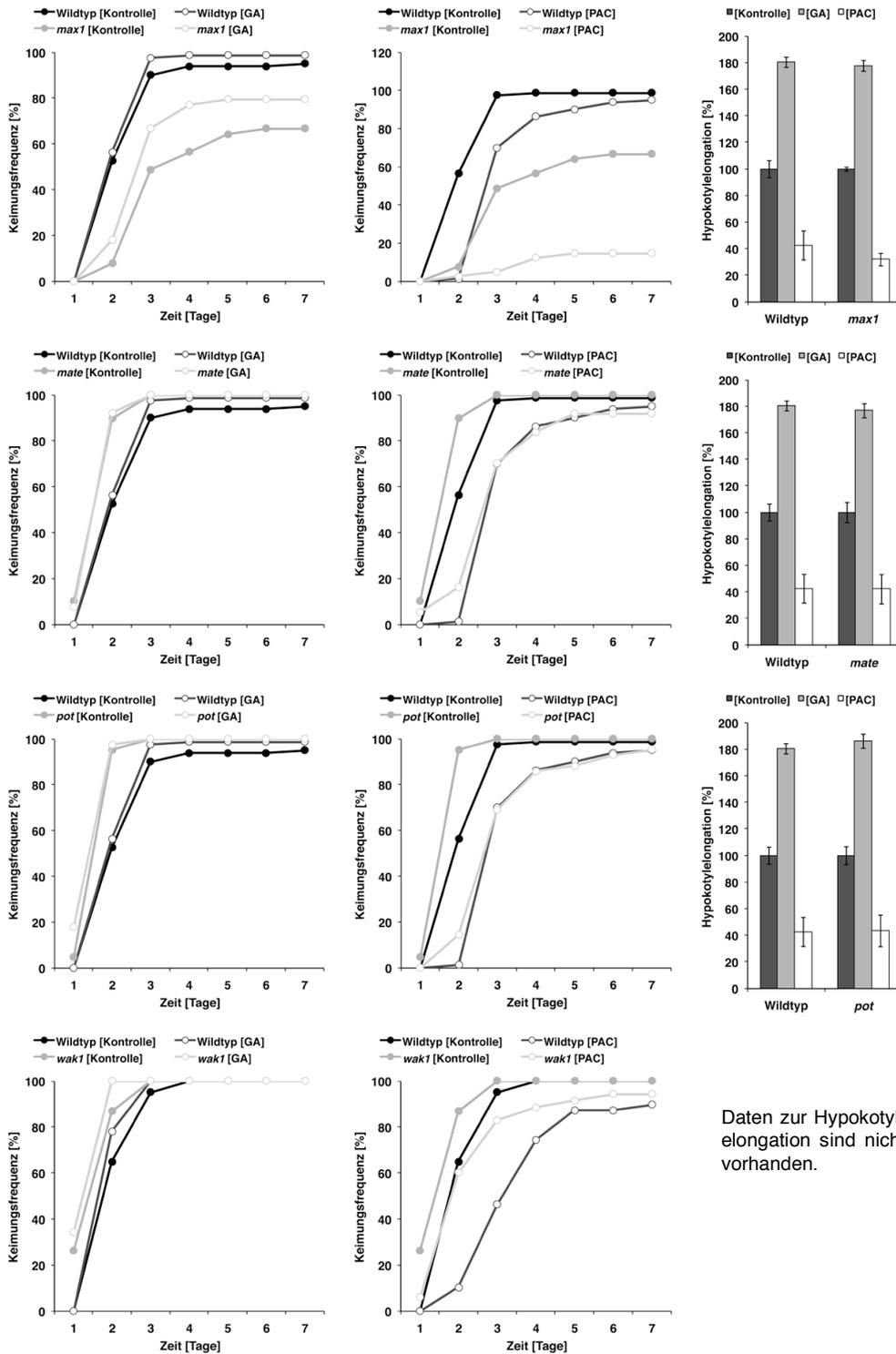




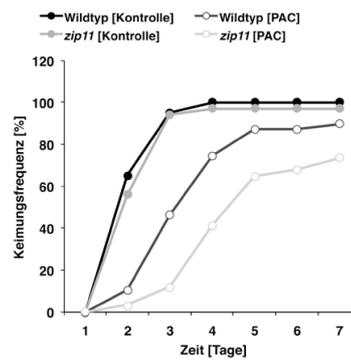
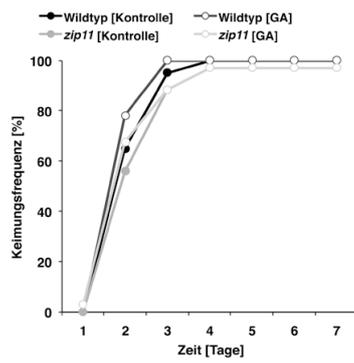




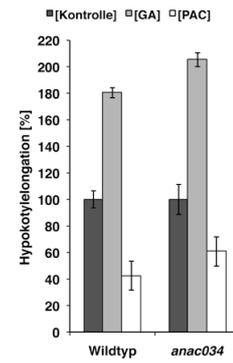
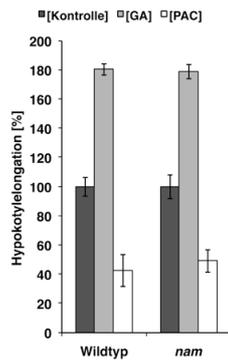




Daten zur Hypokotyl-elongation sind nicht vorhanden.



Daten zur Hypokotyl-elongation sind nicht vorhanden.



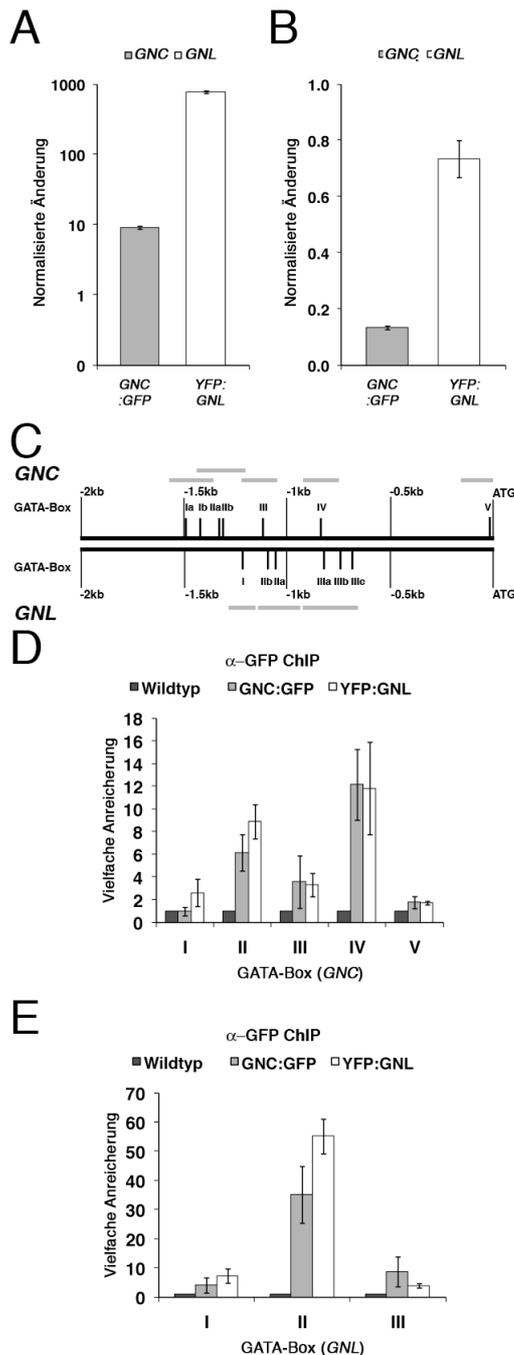


Abbildung B2: Gegenseitige Regulation von *GNC* und *GNL/CGA1* durch Bindung von *GNC:GFP* und *YFP:GNL* innerhalb ihrer Promotoren. **A**, Expressionsstärke des *GNC:GFP* und *YFP:GNL* Transgens in 10 Tage-alten Keimlingen. **B**, Transkription von *GNC* und *GNL* in der entsprechenden *YFP:GNL* und *GNC:GFP* Überexpressionslinie. **C**, Schema der *GNC* und *GNL/CGA1* Promotoren. Römische Zahlen, vorhergesagte GATA-Boxen; graue Balken, Promotorregionen, die für die ChIP-Amplifikation ausgewählt wurden. **D** und **E**, Die vielfache Anreicherung (*GNC:GFP* oder *YFP:GNL*/Wildtyp) an die GATA-Boxen des *GNC* (**D**) und *GNL* (**E**) Promotors nach ChIP-qPCR.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: René Richter
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtstag: 01.10.1980
Geburtsort: Pirna

Ausbildung

07/1999 Abitur, Rainer-Fetscher-Gymnasium, Pirna, Deutschland
10/2000 – 09/2002 Vordiplom der Biologie, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland
10/2002 – 09/2003 Diplom der Biologie Università Degli Studi Dell'Aquila, L'Aquila, Italien
10/2003 – 09/2006 Diplom der Biologie, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland
10/2006 – 06/2007 Diplomarbeit, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Lehrstuhl Entwicklungsgenetik bei PD Dr. Claus Schwechheimer, Tübingen, Deutschland
„Regulation und Interaktionen des Gibberellin-säurerezeptors GID1 aus Arabidopsis thaliana“
07/2007 – 10/2012 Dissertationsarbeit, Eberhard-Karls Universität Tübingen und Technische Universität München,

Freising – Weihenstephan, Lehrstuhl für
Systembiologie der Pflanzen bei Prof. Dr. Claus
Schwechheimer, Freising, Deutschland
*„Charakterisierung von GNC und GNL/CGA1 als
Zielgene der Gibberellinantwort in Arabidopsis
thaliana“*

Zertifikate

06/09 Computational and statistical aspects of
Microarray analysis (CSAMA09), Bioconductor
Course, Bressanone-Brixen, Italien

Preise

07/99 Karl-von-Frisch-Preis, Säsisches Ministerium für
Bildung, Dresden, Deutschland

06/12 Dr. Heinrich-Baur-Förderpreis, Technische
Universität München, Freising – Weihenstephan,
Deutschland

Patent

11/11 *„Modulation of germination, elongation growth and
flowering time in plants“*, EP 2 385 128 A1

Publikationen

Richter, R., Behringer, C., Muller, I.K., and Schwechheimer, C. (2010). The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* 24, 2093-2104.

Willige, B.C., Isono, E., Richter, R., Zourelidou, M., and Schwechheimer, C. (2011). Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 2184-2195.

Hakenjos, J.P., Richter, R., Dohmann, E.M., Katsiarimpa, A., Isono, E., and Schwechheimer, C. (2011). MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol* 156, 527-536.