

Charakterisierung von
 β -Ketoacyl-CoA-Synthasen
aus *Arabidopsis thaliana*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich- Wilhelms- Universität zu Bonn

vorgelegt von
Isabel Briesen
aus Heidelberg

Bonn 2008

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich- Wilhelm Universität Bonn.

1. Referent: PD Dr. Rochus Franke
2. Referent: Prof. Dr. Lukas Schreiber

Tag der Promotion: 09.04.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Oberirdische Grenzflächen	1
1.2	Unterirdische Grenzflächen	2
1.3	Zusammensetzung des Suberins	4
1.4	Biosynthese der langkettigen Fettsäuren	5
1.5	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Chemikalien	10
2.2	Pflanzenanzucht	10
2.2.1	Anzucht auf Erde	10
2.2.2	Sterile Anzucht in Petrischalen	10
2.3	Datenbankanalysen	11
2.4	Abiotische Stressbedingungen zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von KCS- Genen	12
2.4.1	Salzstress	12
2.4.2	Osmotischer Stress	12
2.4.3	Wundstress	12
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen	13
2.5.1	RNA Extraktion aus unterschiedlichen Organen mittels LiCl-Methode	13
2.5.2	RNA Präparation aus Keimlingen mittels TriReagent®	13
2.5.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	14
2.5.4	Verwendete Primer	14
2.5.5	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	14
2.5.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.5.7	Gelelektrophorese	17
2.6	Herstellung transgener Pflanzen	17
2.6.1	BP-Reaktion	18
2.6.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) und Selektion von positiven Klonen	19
2.6.3	Durchführung eines Restriktionsverdau	19
2.6.4	Sequenzierung von Plasmiden	20
2.6.5	LR-Reaktion	20
2.6.6	Herstellung kompetenter Zellen von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>) und Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	21
2.6.7	Transformation von <i>Arabidopsis</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	21
2.6.8	Anlegen von Glycerinstocks zur Langzeitlagerung von Klonen	22
2.7	GUS- Färbung	22
2.8	Mikroskopische Untersuchungen	22
2.9	Probenaufbereitung für gaschromatographische Analysen	23
2.9.1	Suberinextraktion aus Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen	23
2.9.2	Suberinextraktion aus Wurzeln zehn Tage alter Keimlingen	23
2.9.3	Samenlipidextraktion	24
2.9.4	Blattwachsextraktion	24
2.9.5	Cutinextraktion	24
2.9.6	Umesterung – Borontrifluorid/Methanol (BF ₃ /MeOH)	24
2.9.7	Umesterung – Methanolische Salzsäure (MeOH/HCl)	25
2.9.8	Derivatisierung	25
2.9.9	Gaschromatographie	26

3	Ergebnisse	27
3.1	Auswahl von Kandidatengene aus der KCS Familie	27
3.1.1	Organspezifische Expressionsanalysen mittels <i>Expressed Sequence Tags</i> (EST).....	27
3.1.2	Organspezifische Expressionsanalysen mittels <i>Massively Parallel Signature Sequencing</i> MPSS (MPSS):.....	27
3.1.3	Organspezifische Expressionsanalysen mittels Microarraydaten	28
3.1.4	Organspezifische Expressionsanalysen mittels RT-PCR.....	29
3.1.5	Untersuchungen zur Expression der Kandidatengene mittel Promotor-Reporter-Gen- Fusionen	31
3.2	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der Kandidatengene unter abiotischen Stressbedingungen	35
3.2.1	Expressionsänderung unter Salzstress.....	35
3.2.1.1	Ergebnisse der RT-PCR nach Salzstress.....	35
3.2.1.2	Microarraydaten- Analyse der Genexpression der Kandidatengen unter Salzstress38	
3.2.2	Änderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress	41
3.2.2.1	Ergebnisse der RT-PCR unter osmotischen Stress	41
3.2.2.2	Änderung der Expression unter osmotischen Stress - Microarraydaten	42
3.2.3	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der Kandidatengene nach Verwundung.....	45
3.2.3.1	Histochemische Untersuchungen zur Induktion von Suberinisierung nach Verwundung.....	45
3.2.3.2	Ergebnisse der RT-PCR- Analysen nach Verwundung	46
3.2.3.3	Microarraydatenanalyse der Genexpression der Kandidatengene nach Verwundung.....	48
3.2.3.4	Ergebnisse der Verwundung der <i>Prom_{KCS}-GUS</i> - Pflanzen	50
3.3	Gaschromatographischen Analysen	51
3.3.1	Nachweis des transkriptionellen Knockouts sowie der Überexpression von <i>KCS04</i> 51	
3.3.2	Nachweis des transkriptionellen Knockouts für die Kandidatengene.....	54
3.3.3	Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen	56
3.3.3.1	Analyse von Suberin	56
3.3.3.1.1	Analyse des Suberins der Wurzeln fünf Wochen alter Arabidopsis- Pflanzen	56
3.3.3.1.2	Analyse des Suberins von Wurzeln zehn Tage alter Arabidopsis- Pflanzen ...	60
3.3.3.2	Analyse der Samenlipide von <i>Arabidopsis</i>	63
3.3.3.3	Analyse des Cutins von <i>Arabidopsis</i> - Blättern	66
3.3.3.4	Analyse des Wachses von <i>Arabidopsis</i> - Blättern.....	68
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
3.4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS04</i>	70
3.4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS08</i>	70
3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS11</i>	71
3.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS16</i>	72
3.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS17</i>	73
3.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>KCS21</i>	73

4	Diskussion	74
4.1	Auswahl der Kandidatengene.....	74
4.1.1	Organspezifische Expression mittels öffentlicher Daten und RT-PCR.....	75
4.1.2	Gewebespezifische Expression mittels <i>Prom_{KCS}-GUS</i> - Studien.....	76
4.2	Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene unter Stressbedingungen	77
4.2.1	Änderung der Expression unter osmotischem Stress und Salzstress	77
4.2.2	Änderung der Expression nach Verwundung.....	80
4.3	Gaschromatographische Analysen	81
4.3.1	Analyse des Suberins fünf Wochen alter Pflanzen	81
4.3.2	Analyse des Suberins zehn Tage alter Pflanzen.....	83
4.3.3	Analyse der Samenlipide.....	84
4.3.4	Analyse des Cutins.....	85
4.3.5	Analyse des Wachses	85
4.3.6	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	86
5	Zusammenfassung	90
6	Summary	91
7	Literatur	92
8	Anhang	99
8.1	Tabelle der KCS aus <i>Arabidopsis</i>	99
8.2	Verwendete Lösungen und Medien.....	100
8.3	Chemikalienliste.....	102
8.4	Primer	102
8.5	Berechnung der Schmelztemperatur von PCR-Primern.....	104
8.6	Berechnung der Anlagerungs-Temperatur einer PCR	104
8.7	Verwendete Vektoren.....	104
8.8	Promotor-Reporter-gen- Studien	105
8.9	DNA- Größenmarker.....	105
8.10	Analytische Daten	106
8.10.1	Analyse des Suberins der Wurzeln fünf Wochen alter <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen.....	106
8.10.2	Analyse des Suberins zehn Tage alter <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen	112
8.10.3	Analyse von <i>Arabidopsis</i> - Samenlipide	118
8.10.4	Analyse des Cutins von <i>Arabidopsis</i> -Blättern	125
8.10.5	Analyse des Wachses von <i>Arabidopsis</i> Blättern	130
8.10.6	Analyses des Wachses von <i>Arabidopsis</i> - Blüten	135

Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Bereits charakterisierte KCS aus <i>Arabidopsis</i>	7
Tabelle 2: RT-PCR Reaktionsansatz Reagenz Ausgangskonzentration	15
Tabelle 3: Temperatur-Programm für die RT-PCR.....	15
Tabelle 4: RNA/Primer Mix	15
Tabelle 5: cDNA Synthese Mix.....	16
Tabelle 6: PCR Reaktionsansatz	16
Tabelle 7: Temperatur-Programm für die PCR	17
Tabelle 8: Ansatz des Restriktionsverdau	19
Tabelle 9: Temperaturprogramme für die gaschromatographischen Analysen	26
Tabelle 10 Die KCS-Familie aus <i>Arabidopsis</i>	99
Tabelle 11: Chemikalienliste	102
Tabelle 12: Verwendete Primer	102
Tabelle 13: Auflistung aller verwendeter Primer mit der jeweiligen Sequenz.....	103
Tabelle 14: Auflistung der bearbeiteten Gene mit Salk Notation, <i>Arabidopsis</i> Gen Index (AGI) und Name der genutzten Bacs	104
Tabelle 15: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter <i>kcs04-</i> und <i>35S::KCS04-kcs04-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	106
Tabelle 16: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter <i>kcs08-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	108
Tabelle 17: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter <i>kcs11-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	109
Tabelle 18: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter <i>kcs16-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	110
Tabelle 19: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter <i>kcs21-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	111
Tabelle 20 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter <i>kcs04-</i> und <i>35S::KCS04-kcs04-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	112
Tabelle 21 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter <i>kcs08-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	114
Tabelle 22 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter <i>kcs11-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	115
Tabelle 23 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter <i>kcs16-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	116
Tabelle 24 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter <i>kcs21-</i> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	117
Tabelle 25: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs04-</i> , <i>35S::KCS04-</i> und <i>35S::KCS04-</i> <i>kcs04-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp	118
Tabelle 26: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs04-</i> , <i>35S::KCS04-</i> und <i>35S::KCS04-</i> <i>kcs04-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp	119
Tabelle 27 Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs08-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp ..	121
Tabelle 28 Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs11-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp...	122
Tabelle 29: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs16-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp .	123
Tabelle 30: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus <i>kcs21-</i> Samen im Vergleich zum Wildtyp .	124
Tabelle 31: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus <i>kcs08-</i> Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	126
Tabelle 32: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus <i>kcs11-</i> Blättern im Vergleich zum	

Wildtyp.....	127
Tabelle 33: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus <i>kcs16</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	128
Tabelle 34: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus <i>kcs21</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	129
Tabelle 35: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs08</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	131
Tabelle 36: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs11</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	132
Tabelle 37: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs16</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	133
Tabelle 38: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs21</i> - Blättern im Vergleich zum Wildtyp.....	134
Tabelle 39: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs04</i> - und <i>35S::KCS04-kcs04</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	136
Tabelle 40: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs08</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	138
Tabelle 41: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs11</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	139
Tabelle 42: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs16</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	140
Tabelle 43: Absolute Verteilung der Wachsmonomeren aus <i>kcs21</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	141
Tabelle 44: Homologievergleich der 21 <i>KCS</i> -Gene.....	142

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Cuticula (verändert nach Kunst und Samuels 2003).	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wassertransports über eine Wurzel im primären Zustand (verändert nach Steudle 2000).	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Suberinstruktur (nach Bernards 2002).	5
Abbildung 4: Schema des Elongationsprozesses einer aktivierten Fettsäure.	6
Abbildung 5: Dendrogramm der <i>KCS</i> - Genfamilie in <i>Arabidopsis</i> .	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der BP-Reaktion (A) und LR-Reaktion (B) (verändert nach Invitrogen).	18
Abbildung 7: Vektorkarten des Expressionsklon von <i>Prom_{KCS04}-GUS</i> (A) und Überexpression von <i>KCS04</i> (B).	20
Abbildung 8: Umesterung des Suberinpolymers in seine monomeren Bestandteile.	25
Abbildung 9: Transkripthäufigkeit der <i>KCS</i> - Gene in Wurzeln.	28
Abbildung 10: Organspezifische Expression der Kandidatengene nach Genevestigator.	29
Abbildung 11: Organspezifische Expression der Kandidatengene.	31
Abbildung 12: Aufsicht der Wurzel eines Keimlings, welcher den Vektor pMDC164 trägt.	32
Abbildung 13: Gewebespezifische Expression von <i>CYP86A1</i> .	33
Abbildung 14: Gewebespezifische Expression von <i>SCR</i> .	33
Abbildung 15: Aufsicht und Querschnitt von Wurzeln fünf Wochen alter <i>Prom_{KCS}-GUS</i> -Pflanzen.	34
Abbildung 16: Aufsicht und Querschnitt von Wurzeln zehn Tage alter <i>Prom_{KCS}-GUS</i> - Pflanzen.	35
Abbildung 17: RT-PCR- Analyse der Expression von <i>RD29A</i> unter Salzstress.	36
Abbildung 18: Expressionsänderung der Kandidatengene unter Salzstress.	38
Abbildung 19: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter Salzstress laut Genevestigator.	39
Abbildung 20: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter Salzstress laut AtGenExpress.	40
Abbildung 21: Expressionsänderung von <i>RD29A</i> unter osmotischem Stress.	41
Abbildung 22: Expressionsänderung von <i>KCS04</i> und <i>KCS17</i> unter osmotischem Stress.	42
Abbildung 23: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress laut Genevestigator.	43
Abbildung 24: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress nach AtGenExpress.	44
Abbildung 25: Bildung eines Wundperiderms an <i>Arabidopsis</i> - Blättern.	46
Abbildung 26: Expressionsänderung von <i>PAL</i> nach Verwundung.	47
Abbildung 27: Expressionsänderung von <i>KCS04</i> und <i>KCS17</i> nach Verwundung.	48
Abbildung 28: Veränderung der Expression der Kandidatengene nach Verwundung nach Genevestigator.	49
Abbildung 29: Veränderung der Expression der Kandidatengene nach Verwundung laut AtGenExpress.	50
Abbildung 30: Verwundete Blätter von <i>Prom_{KCS}-GUS</i> - Pflanzen.	51
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Gen- Locus <i>KCS04</i> .	52
Abbildung 32: Expression von <i>KCS04</i> in Blättern von Wildtyp- und Überexpressionslinien.	53
Abbildung 33: RT-PCR- Analysen zur Bestimmung des Expressionslevels von <i>KCS04</i> in Blüten von Wildtyp-, Knockout- und Überexpressionslinien.	54
Abbildung 34: Schematische Darstellung der Gen- Loci At2G15090/ <i>KCS08</i> (A),	

At2G26640/ <i>KCS11</i> (B), At4G34250/ <i>KCS16</i> (C) und At5g04530/ <i>KCS21</i> (D).....	55
Abbildung 35: Nachweis des transkriptionellen Knockouts der Kandidatengene.....	56
Abbildung 36: Zusammensetzung des Wurzelsuberins fünf Wochen alter Pflanzen in Wildtyp und <i>KCS04</i> transgenen Pflanzen.....	58
Abbildung 37: Zusammensetzung des Wurzelsuberins fünf Wochen alter Pflanzen in Wildtyp und <i>KCS</i> - Mutanten.....	59
Abbildung 38: Zusammensetzung des Wurzelsuberins zehn Tage alter Pflanzen in Wildtyp und <i>KCS04</i> transgenen Pflanzen.....	61
Abbildung 39: Zusammensetzung des Wurzelsuberins zehn Tage alter Pflanzen in Wildtyp und <i>KCS</i> - Mutanten.....	63
Abbildung 40: Zusammensetzung der Samenlipide in Wildtyp und <i>KCS04</i> transgenen Pflanzen.....	65
Abbildung 41: Zusammensetzung der Samenlipide in Wildtyp und <i>KCS</i> - Mutanten.....	66
Abbildung 42: Zusammensetzung des <i>Arabidopsis</i> - Blattcutins in Wildtyp und <i>KCS</i> - Mutanten.....	68
Abbildung 43: Zusammensetzung des <i>Arabidopsis</i> - Blattwachses in Wildtyp und <i>KCS</i> - Mutanten.....	69
Abbildung 44: Vektorkarte des Donorvektors.....	104
Abbildung 45: Vektorkarten der Zielvektoren.....	105
Abbildung 46: Querschnitt einer <i>Prom_{KCS11}-GUS</i> - Wurzel (A) und einer <i>Prom_{KCS16}-GUS</i> - Wurzel (B).....	105
Abbildung 47: 100 bp DNA Größenmarker (Roth, Karlsruhe; www.carlroth.com).....	105
Abbildung 48: Zusammensetzung des Wurzelsuberins von <i>kcs08</i> , <i>kcs11</i> , <i>kcs16</i> und <i>kcs21</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	107
Abbildung 49: Zusammensetzung des Wurzelsuberins von <i>kcs08</i> , <i>kcs11</i> , <i>kcs16</i> und <i>kcs21</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	113
Abbildung 50: Zusammensetzung der Samenlipide aus <i>kcs08</i> -, <i>kcs11</i> -, <i>kcs16</i> - und <i>kcs21</i> - Samen im Vergleich zum Wildtyp.....	120
Abbildung 51: Zusammensetzung des Blattcutins von <i>kcs08</i> , <i>kcs11</i> , <i>kcs16</i> und <i>kcs21</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	125
Abbildung 52: Zusammensetzung des Blattwachses von <i>kcs08</i> , <i>kcs11</i> , <i>kcs16</i> und <i>kcs21</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	130
Abbildung 53: Zusammensetzung des Wachses von <i>kcs04</i> - und 35S:: <i>KCS04-kcs04</i> - Blüten im Vergleich zum Wildtyp.....	135
Abbildung 54: Absolute Zusammensetzung des Blütenwachses von <i>kcs08</i> , <i>kcs11</i> , <i>kcs16</i> und <i>kcs21</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	137

Abkürzungen:

ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
μE	Strahlungsflussdichte [W/m^2]
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary DNA</i>)
cm^2	Quadratcentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
g	Gramm
GC/FID	Gaschromatograph gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor
GC/MS	Gaschromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunden
INRA	<i>National Institute for Agronomical Research</i>
KCS	β -Ketoacyl-CoA-Synthase
M	Molar
Me	Methyl
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPSS	<i>Massively Parallel Signature Sequencing</i>
MW	arithmetischer Mittelwert
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
SALK	<i>The Salk Institute for Biological Studies</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stabw	Standardabweichung
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
v/v	Volumen pro Volumen
VLCFA	langkettige Fettsäuren (engl. <i>very long chain fatty acids</i>)
w/v	Masse pro Volumen
xg	x- fache Erdbeschleunigung
ω -OH-Säure	ω -Hydroxycarbonsäure
α,ω -Disäure	α,ω -Dicarbonsäure
Säure	Monocarbonsäure

1 Einleitung

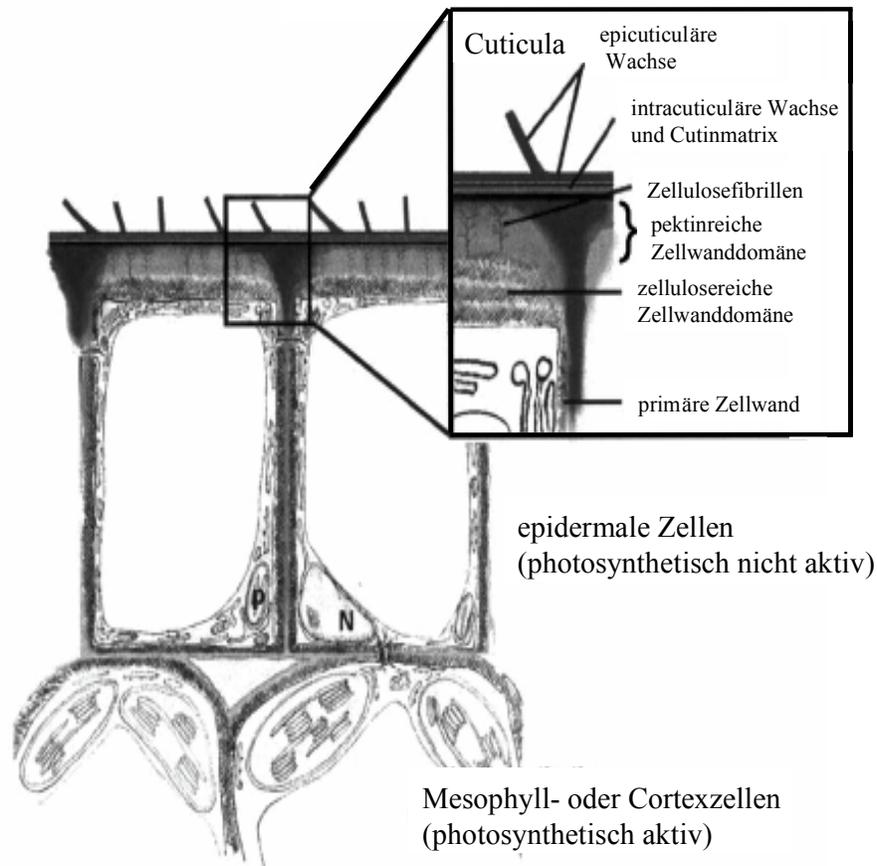
Bei dem Übergang von der aquatischen zur terrestrischen Lebensweise wurden an die Pflanzen neue Herausforderungen gestellt. Zum einen mussten sie sich vor Austrocknung schützen, zum anderen mussten sie aufgrund des fehlenden Auftriebs des Wassers an Land mechanische Stabilität gewährleisten. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, entwickelten die Pflanzen verschiedene Arten von Zellwandmodifikationen.

Durch die Einlagerung von Lignin waren Pflanzen in der Lage aufrecht zu wachsen und durch Ausbildung lignifizierter Leitgefäße war es möglich trotz großer Spannungsbelastung in den Gefäßen Wasser vom Boden bis in die Spitze zu transportieren (Lewis und Yamamoto 1990, Boudet 2000, Boerjan *et al.* 2003). Der aromatische Charakter des Lignins stellte zudem einen Schutz vor Pathogenbefall dar (Moerschbacher *et al.* 1990).

Zur Abgrenzung der Pflanzen gegenüber der Umwelt sowie zum Schutz vor Austrocknung entwickelten sich an den Grenzflächen weitere Zellwandmodifikationen, die den Stoffaustausch der Pflanze mit der sie umgebenden Umwelt oberirdisch wie auch unterirdisch kontrollieren mussten.

1.1 Oberirdische Grenzflächen

Die oberirdischen Grenzflächen müssen, um einen effektiven Schutz vor Austrocknung bieten zu können, abdichtend sein (Schönherr *et al.* 1979, Becker *et al.* 1986, Kerstiens 1996). Jedoch muss zusätzlich gewährleistet sein, dass die Pflanzen CO₂ aufnehmen und O₂ abgeben können. Ebenso müssen die Grenzflächen für die photosynthetische Strahlung durchlässig sein und gleichzeitig den Photosyntheseapparat vor zu intensiver Strahlung schützen (Pfündel *et al.* 2006). Des Weiteren müssen die Grenzflächen die Pflanze vor Auswaschung (*leaching*) von Nährstoffen bei Regen oder Nebel bewahren. Aus diesem Grunde sind alle oberirdischen Pflanzenorgane im primären Zustand von einer Cuticula überzogen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Cuticula (verändert nach Kunst und Samuels 2003).
N: Zellkern; P: Plastid.**

Die Cuticula besitzt eine Dicke von 0,1 bis 10 μm und ist oft sogar weniger durchlässig für Wasser als künstlich hergestellte Polymere gleicher Dicke (Riederer und Schreiber 2001). Die Cuticula ist der Epidermis aufgelagert und besteht aus einer Cutinschicht aus hauptsächlich C_{16} und C_{18} Hydroxysäuren mit ein- und aufgelagerten Wachsen (Espelie *et al.* 1980, Kolattukudy 1980, Walton 1990, Nawrath 2002). Die Wachse, die sich aus artspezifischen Anteilen von Alkanen, Alkoholen, Fettsäuren, Aldehyden und Estern zusammensetzen (Walton 1990, Riederer und Schreiber 2001, Nawrath 2002, Jenks *et al.* 2002), vermindern die Durchlässigkeit für Wasser und darin gelöste Stoffe um ca. eine Größenordnung (Vogt *et al.* 1983, Schönherr und Riederer 1989). 2002 konnten Graça *et al.* darüber hinaus auch Glycerin als Bestandteil des Cutins bestimmen.

1.2 Unterirdische Grenzflächen

Die unterirdischen Grenzflächen lassen sich in äußere und innere Grenzfläche unterteilen. Als äußere Barriere, die die direkte Grenzfläche zwischen Pflanze und Boden darstellt, findet man in

primären Wurzeln die mit Wurzelhaaren versehene Rhizodermis. Diese ist sehr kurzlebig und wird während der Ontogenese der Wurzel von der darunterliegenden Hypodermis (bzw. Exodermis, bei Vorhandensein von Casparyschen-Streifen) ersetzt (Enstone *et al.* 2003). Als innere Barriere, die den Zentralzylinder vom Cortex trennt, findet man die Endodermis.

Die Endodermis, wie auch häufig die Exodermis, ist durch das Vorhandensein des Casparyschen-Streifens charakterisiert. Der Casparysche-Streifen ist eine Einlagerung der antiklinalen Zellwände mit aromatischen und aliphatischen Substanzen, Suberin und auch Lignin, welche zusätzlich kovalent mit der Zellmembran verbunden sind (Wilson und Peterson 1983, Schreiber *et al.* 1994). Im sekundären und tertiären Stadium der Endodermis werden die Zellen mit weiteren Suberineinlagerungen, in Abbildung 2 als Suberinlamelle bezeichnet, abgedichtet (Kroemer 1903). Lediglich so genannte Durchlasszellen werden nicht weiter suberinisiert. Abbildung 2 zeigt die möglichen Wege des Wassers und der darin gelösten Substanzen in der Wurzel. Da die Suberineinlagerungen in den Zellwände apoplastische Barrieren darstellen, wird vermutlich hier der weitere Transport über den symplastischen oder transzellulären Weg kontrolliert geführt.

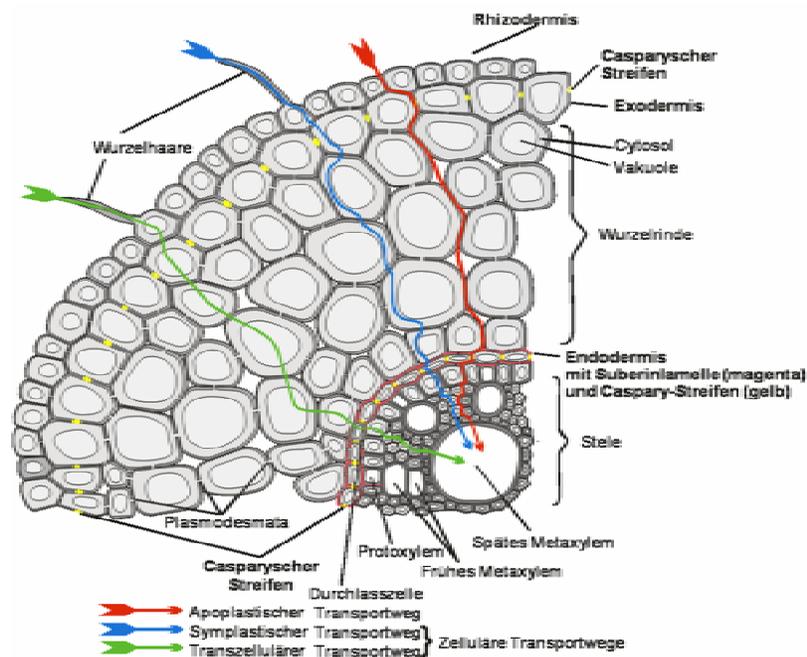


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wassertransports über eine Wurzel im primären Zustand (verändert nach Steudle 2000).

Farbig dargestellt sind die drei möglichen Transportwege von Wasser und gelösten Teilchen in den Zentralzylinder. Der rot dargestellte apoplastische Transportweg sollte durch die Endodermis mit Suberinlamelle und Casparyschen-Streifen stark verringert werden.

An diese unterirdischen Grenzflächen werden unterschiedliche Anforderungen gestellt. Zum Beispiel sollen Wasser und darin gelöste Stoffe aufgenommen werden. Andererseits muss bei

Bodentrockenheit verhindert werden, dass der Pflanze Wasser entzogen wird. Ebenso ist es wichtig die Wurzeln der Pflanze vor Pathogenbefall und Aufnahme von schädlichen Substanzen zu schützen (Zimmermann *et al.* 2000, Hose *et al.* 2001). Dies macht deutlich, dass die suberinisierten Grenzflächen keine statischen Gebilde sein können, sondern sich der Grad der Suberinisierung in Anpassung an die Umweltbedingungen variabel sein sollte. Es ist bekannt, dass Pflanzen unter Salzstress vermehrt Suberin einlagern (Reinhardt und Rost 1995, Schreiber *et al.* 2005a) um sich vor Wasserverlust und Aufnahme von Ionen in toxischer Konzentration zu schützen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich auch die Suberinmenge in Wurzel von *Arabidopsis thaliana* erhöht. *Arabidopsis*- Pflanzen die auf salzhaltigem Boden gewachsen sind haben doppelt so viel Suberin als Kontrollpflanzen (unveröffentlichte Daten). Ein weiteres Beispiel ist das Periderm der Kartoffelknolle (*Solanum tuberosum*), welches auch aus Suberin besteht (Bernards und Lewis 1998). Es konnte gezeigt werden, dass nach Verwundung ein aus suberinisierten Zellwänden bestehendes Wundperiderm gebildet wird (Schreiber *et al.* 2005b, Yang und Bernards 2006).

Suberinisierte Zellwände sind auch in oberirdischen Pflanzenteilen zu finden, wo sie als Kork sekundäre Organe gegen die Umwelt abdichten (Bernards und Razem 2001) und auch die Bündelscheidenzellen der C4- Pflanzen besitzen eine Suberinlamelle (Espelie *et al.* 1982).

1.3 Zusammensetzung des Suberins

Suberin ist ein Polyester und besteht aus 2 Domänen, einer aliphatischen und einer aromatischen (Abbildung 3), die über Glycerin miteinander verbunden sind (Graça und Pereira 1997, Bernards 2002). Der aliphatische Anteil besteht aus langkettigen α,ω -Disäuren, ω -Hydroxysäuren, 2-Hydroxysäuren, primären Alkoholen und primären Monocarbonsäuren (Kolattukudy 1980, Schreiber *et al.* 1999, Franke *et al.* 2005) mit Kettenlängen zwischen C_{16} bis C_{32} (C = Anzahl der Kohlenstoffatome). Die aromatische Domäne besteht hauptsächlich aus Monolignolen und Hydroxyzimtsäuren (Zeier und Schreiber 1997, Bernards und Razem 2001, Bernards 2002) und ist mit der Zellwand verbunden. Der aliphatische Charakter des Suberins erfüllt die Anforderung einer Transportbarriere (Zimmermann *et al.* 2000, Hose *et al.* 2001) wohingegen der aromatische Charakter des Suberins einen effektiven Schutz gegenüber Pathogenen aufweist.

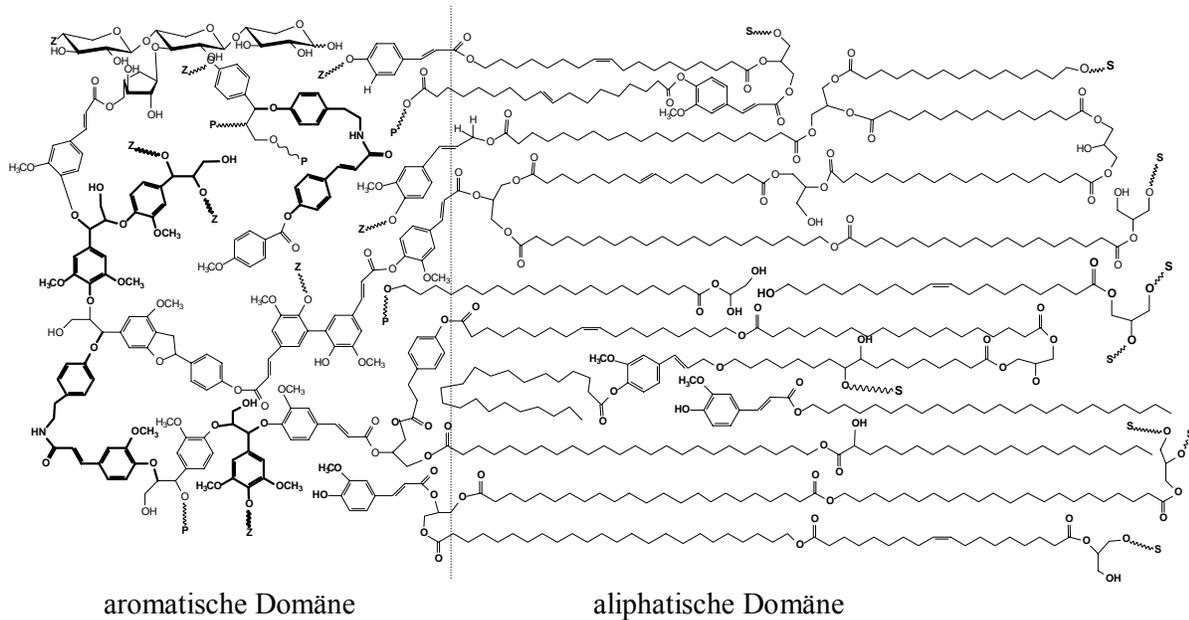


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Suberinstruktur (nach Bernards 2002). Links ist die aromatische Domäne, welche mit den Zellwandpolysacchariden verknüpft ist, und rechts die aliphatische Domäne dargestellt.

1.4 Biosynthese der langkettigen Fettsäuren

Vorläufermoleküle für Cutin wie auch für Suberin sind sehr langkettige Fettsäuren (*very long chain fatty acids* - VLCFA), die durch Cytochrom P450- abhängige Monooxygenasen funktionalisiert (Pinot *et al.* 1993, Pinot *et al.* 1999, Wellesen *et al.* 2001, Broun *et al.* 1998) und dann untereinander, sowie mit Glycerin, verestert werden (Graça und Pereira 1997, Moire *et al.* 1999, Bernards 2002). Die VLCFA kommen allerdings nicht nur im Cutin und Suberin vor, sondern werden auch zur Bildung von Wachsen, Samen- und Membranlipiden benötigt.

Die Biosynthese der VLCFA findet vermutlich an einem membrangebundenen, im Endoplasmatischen Retikulum befindlichen Multienzymkomplex statt (Millar und Kunst 1997). Die C₁₆ und C₁₈ Fettsäuren, die im primären Stoffwechsel in den Plastiden gebildet werden, müssen zunächst aktiviert und dann mit Malonyl-CoA kondensiert werden. Es folgt eine Reduktion, eine Dehydrierung und eine weitere Reduktion. Analog zur Fettsäurebiosynthese im Primärmetabolismus wird auf diese Weise die Kettenlänge pro Zyklus um zwei Kohlenstoffatome verlängert (Fehling und Mukherjee 1991). Millar und Kunst konnten 1997 zeigen, dass der erste Schritt, die Kondensation durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (KCS), der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und die Reduktasen, wie auch die Dehydratasen, ubiquitär in der Pflanze vorhanden sind. Daher kann postuliert werden, dass die KCS die Menge und Kettenlänge der

VLCFA kontrollieren. Aufgrund ihrer kettenverlängernden Tätigkeit werden die KCS auch Elongasen genannt (von Wettstein-Knowles 1982).

Dieser vierstufige Elongationsprozess ist in Abbildung 4 dargestellt.

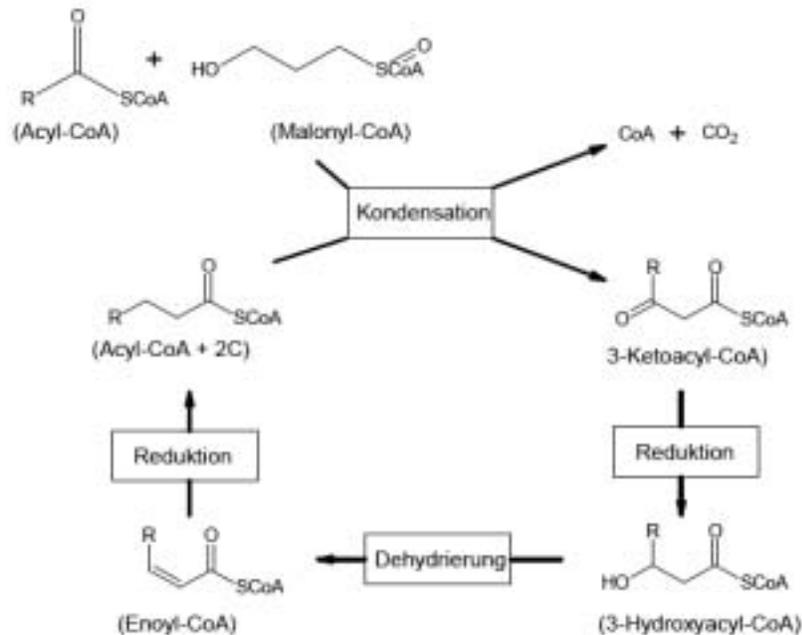


Abbildung 4: Schema des Elongationsprozesses einer aktivierten Fettsäure.
(<http://www.danfortcenter.org/jaworski/condensingenzyme.htm>; verändert).

Einige Mitglieder der KCS- Genfamilie wurden bereits in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* charakterisiert (Tabelle 1). Es zeigt sich, dass die Expression von KCS- Genen ist zum Teil sehr spezifisch ist. *FAEI* wird beispielsweise nur in Samen exprimiert und ist entscheidend für die Zusammensetzung der Samenlipide (James *et al.* 1995, Millar und Kunst 1997).

Die Gene wurden meist aufgrund von phänotypischen Veränderungen in Mutanten in einem *forward genetics* Ansatz gefunden und darauf hin untersucht. Ein Beispiel ist *FIDDLEHEAD* (*FDH*). Dieses KCS- Gen konnte durch ein Screening gefunden werden. Pflanzen in denen *FDH* nicht funktionsfähig ist, weisen Organfusionen auf, was auf eine Beteiligung von *FDH* in der Cuticulaentwicklung schließen lässt (Yephremov *et al.* 1999). Ein weiteres KCS- Gen, *HIC*, scheint spezifisch an der Entwicklung der Schließzellen der Stomata beteiligt zu sein. Das Fehlen von *HIC* führte zu einem höheren Stomataindex (Gray *et al.* 2000).

Tabelle 1: Bereits charakterisierte KCS aus *Arabidopsis*.

Name	Angenommene Funktion in	Literatur
FAE1	Samenlipidbiosynthese	James <i>et al.</i> (1995), Millar und Kunst (1997)
KCS1	Wachs-/ Suberinbiosynthese	Todd <i>et al.</i> (1999), Krampitz (2006)
FDH	Cuticulaentwicklung	Yephremov <i>et al.</i> (1999)
HIC	Cuticulaentwicklung	Gray <i>et al.</i> (2000)
CER6/CUT1	Wachsbiosynthese	Hooker <i>et al.</i> (2002)
CER60	Wachsbiosynthese	Hooker <i>et al.</i> (2002)
SUE	Suberinbiosynthese	Briesen (2004)
DAISY	Suberinbiosynthese	Höfer (2005)

In *Arabidopsis* konnten aufgrund von Homologievergleichen mit bekannten KCS 21 KCS gefunden werden (Abbildung 5, Kunst und Samuels 2003; Briesen 2004).

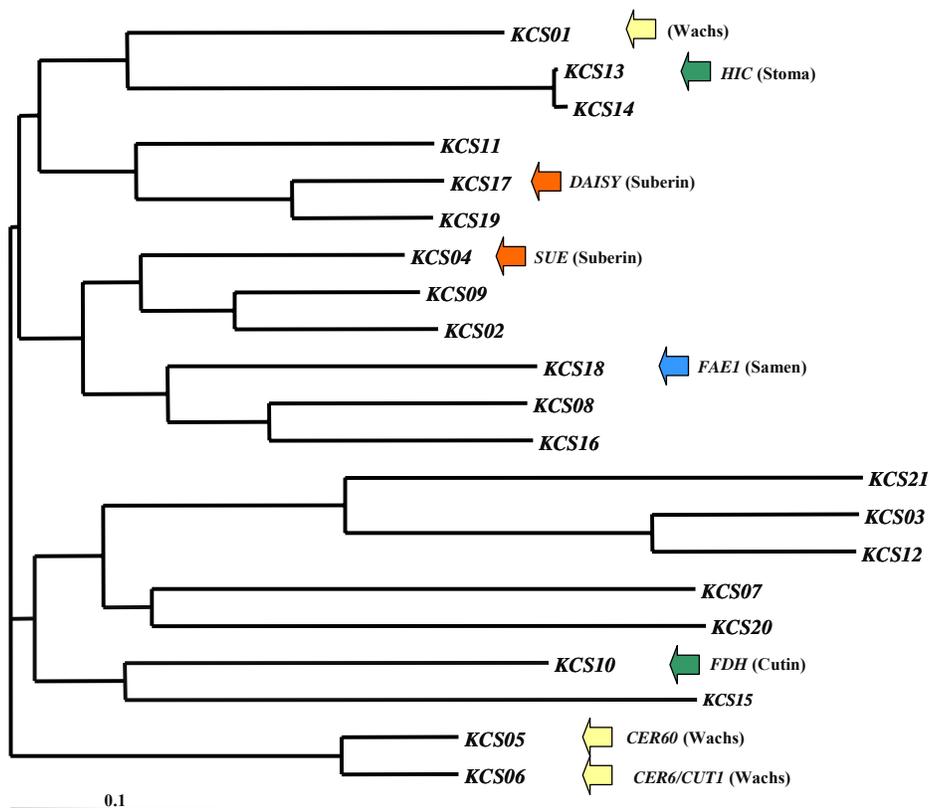


Abbildung 5: Dendrogramm der KCS- Genfamilie in *Arabidopsis*.

Mit Pfeilen markiert sind die Gene, für deren Produkte bereits eine Beteiligung an der Wachs- (gelb), Samenlipid- (blau), Cutin- (grün) oder Suberinbiosynthese (rot) gezeigt werden konnte. (verändert nach Briesen 2004).

Suberin kommt in *Arabidopsis* vornehmlich in den Wurzeln vor (Briesen 2004, Franke *et al.*

2005). In einem *reverse genetics* Ansatz wurden *SUE* (At1g19440), *KCSI*(At1g01220) und *DAISY* (At1g04220) bereits in unserer Arbeitsgruppe näher untersucht und allen dreien konnte ein Einfluss auf die Suberinbiosynthese zugesprochen werden. Der Ausfall von *SUE* führte zu einer Gesamtverminderung des Suberins um ca. 20% (Briesen 2004). Wohingegen der Ausfall des Gens *KCS01* zu mehr als doppelt soviel Suberin in der Mutante führt (Krampitz 2006), was vor allem auf eine Akkumulation der ω -Hydroxy- und α , ω -Disäuren zurückzuführen ist. *DAISY* scheint spezifisch für die Verlängerung von C_{20} zu C_{22} und C_{24} verantwortlich zu sein (Höfer 2005). Ebenso wurden in unserer Arbeitsgruppe *DAISYII* (Emsermann 2007) aufgrund starker Wurzelexpression untersucht. Jedoch konnte diesem Genprodukt keine direkte Beteiligung an der Suberinbiosynthese zugesprochen werden. Für den *Arabidopsis* Gen Index (AGI) der aufgeführten *KCS*- Gene siehe Anhang (Tabelle 10).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es Gene zu finden, die an der Suberinbiosynthese beteiligt sind und deren Funktion zu klären. Das Fernziel ist mehr über die Suberinbiosynthese zu erfahren, bzw. Pflanzen mit veränderter Suberinmenge oder –zusammensetzung zu erhalten, um somit die Funktion von Suberin als Barriere besser studieren zu können. Der nächste Schritt wäre dann, das Suberin bestimmter Nutzpflanzen gezielt zu verändern, um diese resistenter gegenüber unvorteilhaften Umweltbedingungen zu machen.

Aufgrund der molekularen Vorteile sowie der leichten Handhabung von *Arabidopsis* soll zunächst die Biosynthese von Suberin an *Arabidopsis* studiert werden und dann das erhaltene Wissen auf Nutzpflanzen übertragen werden.

Der aliphatische Teil des Suberins ist ein Polyester aus sehr langkettigen Fettsäuren und deren Derivaten. Daher wurde die Familie der *KCS*, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Kettenverlängerung zu sehr langkettigen Fettsäuren katalysieren, näher untersucht.

Da in *Arabidopsis* Suberin hauptsächlich in der Wurzel vorkommt, sollen zunächst die *KCS*-Gene, die eine Expression in der Wurzel zeigen identifiziert werden. Die Expression in verschiedenen Organen sowie das Expressionsmuster in der Wurzel soll detailliert mittels RT-PCR und Promotor-Reportergen- Studien untersucht werden. Des Weiteren soll überprüft werden ob abiotische Bedingungen, welche einen Einfluss auf die Suberinisierung haben, einen Effekt auf die transkriptionelle Regulation der Kandidatengene hat und ob sich davon auf eine Beteiligung der Gene an der Suberinbiosynthese schließen lässt.

Zusätzlich sollen Pflanzen, in denen jeweils ein Kandidatengen ausgeschaltet ist analysiert werden. Neben dem Wurzelsuberin, sollten auch Cutin, Wachs und Samenlipide untersucht werden, da auch diese langkettige Fettsäuren und deren Derivate enthalten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle genutzten Reagenzien wurden von den Firmen Fluka, Roth oder Macherey und Nagel bezogen. Nähere Beschreibungen sind im Anhang 8.3 aufgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde autoklaviertes MilliQ-Wasser benutzt.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Anzucht auf Erde

Die Samen der Versuchspflanzen, sowie des entsprechenden Wildtyps, wurden vom *Nottingham Arabidopsis thaliana Stock Center* (NASC) bezogen. Diese Pflanzen hatten den genetischen Hintergrund des *Arabidopsis thaliana* Ökotypus Columbia 8. Außerdem wurden Knockout-Linien über das *National Institute for Agronomical Research* (INRA) (<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/>) bezogen, diese hatten den genetischen Hintergrund Wassilewskija.

Die Samen wurden auf Erde (Floradur Typ 1, Floragard, Oldenburg) in einer Klimakammer in einem Tag/Nacht Rhythmus von 16 zu 8 h bei einer Tagestemperatur von 22 °C und Nachttemperatur von 20 °C kultiviert. Die Erde in den Anzuchtgefäßen wurde zunächst mit Wasser getränkt, das mit Dünger (Flory 3 verde, Planta, Regenstauf) und dem Insektizid Confidor Wg70 (Imidacloprid, Bayer Crop Science, Langenfeld) versetzt war. Alle weiteren Bewässerungen wurden mit Leitungswasser durchgeführt. Die Samen wurden in geeigneten Abständen auf die feuchte Erde ausgesät. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurden die Pflanzengefäße für ca. fünf Tage mit einer Plastikhaube bedeckt. Die durchschnittliche Belichtungsstärke auf Höhe der Blattrosetten betrug $135 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.2 Sterile Anzucht in Petrischalen

Um Keimlinge untersuchen zu können wurden *Arabidopsis*- Samen auf MS-Agar (siehe Anhang 8.2) angezogen. Dazu wurden die Samen vorher für 25 min mit Samensterilisationslösung (siehe Anhang 8.2) sterilisiert und anschließend mehrfach mit sterilem MilliQ-Wasser gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden dann gleichmäßig auf MS-Agarplatten verteilt. Um die Pflanzen vor Austrocknung durch Verdunstung zu schützen, wurden die Platten mit Parafilm® verklebt. Die Kultivierung erfolgte anschließend unter den oben beschriebenen Bedingungen in einer

Klimakammer.

2.3 Datenbankanalysen

Die öffentlich zugänglichen Datenbanken des TAIR-Projekts (www.Arabidopsis.org) wurden auf *Expressed Sequence Tags* (ESTs) untersucht. ESTs entsprechen kurzen cDNA-Abschnitten und somit den exprimierten Genen. Die Datenbank wurde speziell nach ESTs durchsucht, welche aus Wurzelgeweben stammten. Um die Daten untereinander vergleichen zu können, wurden die ESTs aus Wurzelgewebe relativ zur Gesamtanzahl der ESTs ausgewertet.

Des Weiteren wurden verfügbare *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS)- Daten (Brenner *et al.* 2000; <http://mpss.udel.edu/at/>) ausgewertet. MPSS ist eine Technik, die quantitativ die Genexpression aller Gene, ob bekannt oder unbekannt, einer Probe misst. Die relative Häufigkeit der MPSS- Signale in verschiedenen Organen wurde für ein Gen bestimmt. Die Anzahl der Signale aus der Wurzel wurde der Anzahl der Signale des Organs mit größter Anzahl gegenübergestellt.

Darüber hinaus wurden auch die Microarraydatenbanken von Genevestigator (Zimmermann *et al.* 2004; www.genevestigator.ethz.ch) analysiert. Der *Response Viewer* von Genevestigator gibt einen Mittelwert über verschiedene Zeiten zwischen sechs bis 24 Stunden von zwei Replikaten an. Für die Expressionsuntersuchungen wurden die absoluten Werte für ein Gen auf die jeweiligen Werte von *ACTIN* bezogen. *ACTIN* wird häufig als Referenzgen gewählt (z.B. Sunkar *et al.* 2003), da es ein konstitutiv exprimiertes Gen ist, von dem angenommen wird, es sei ubiquitär in jeder Zelle exprimiert. Dies ermöglichte eine relative Darstellung der Expression der einzelnen *KCS*.

Für detaillierte Aussagen über eine mögliche Induktion einzelner Gene durch verschiedene Stressfaktoren wurden auch die verfügbaren Daten von AtGenExpress (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) extrahiert und ausgewertet. Hier wurden die Proben in verschiedene Zeitpunkte der Probennahme unterteilt und die Pflanzen in oberirdisches und unterirdisches Pflanzenmaterial aufgeteilt. Für die Auswertung wurde für jedes Gen der Wert nach entsprechender Behandlung (Verwundung, Salz- oder osmotischer Stress) auf den der Kontrollpflanzen normiert.

2.4 Abiotische Stressbedingungen zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von KCS- Genen

2.4.1 Salzstress

Arabidopsis- Pflanzen wurden auf MS-Agar angezogen und nach sieben Tagen auf MS-Agar mit 0, 50, 100 oder 200 mM NaCl umgesetzt. Es wurden Keimlinge direkt (t 0), 4 (t 4), 24 (t 24) oder 31 (t 31) nach dem Umsetzen geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. In diesen Proben wurde das Expressionslevel des stressinduzierten Markergens *RD29A* bestimmt. Das *Arabidopsis*- Gen *RD29A* (*RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29A*) ist ein gut untersuchtes Gen, das häufig als Referenzgen für osmotischen bzw. Salzstress genutzt wird (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993a, Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993b, Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994, Hooker *et al.* 2002, Sunkar *et al.* 2003, Zhu *et al.* 2005).

2.4.2 Osmotischer Stress

Arabidopsis- Pflanzen wurden auf MS-Agar, dem 5% Polyethylenglykol (PEG 8000) zugefügt wurde, angezogen. Als Kontrolle wurden parallel auch Pflanzen auf herkömmlichem MS-Agar angezogen. Nach 14 Tagen wurden je zweimal ca. 100 mg Keimlinge geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Analog zu dem Salzstressexperiment wurde auch in diesen Proben das Expressionslevel des stressinduzierten Markergens *RD29A* bestimmt.

2.4.3 Wundstress

Blätter von fünf Wochen alten *Arabidopsis*- Pflanzen wurden mit ca. 15 Nadeln (0,5 mm Durchmesser) pro cm² verletzt. Als Kontrolle wurden Blätter vor der Verwundung sowie zu jedem verwundeten ein unverwundetes Blatt geerntet. Für die Expressionsstudien mittels RT-PCR wurden Wildtyp- Pflanzen verwendet. 0, 1, 4 und 24 h nach Verwundung wurden Blätter genommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. In diesen Proben wurde auch das Expressionslevel des molekularen Markergens *PAL* bestimmt. *PAL* kodiert für eine Phenylalanin-Ammonium-Lyase des Phenylpropanstoffwechsels und wird nachweislich durch Verletzung induziert (Ohl *et al.* 1990). Damit sollte überprüft werden, ob die Verletzungen durch die Nadeln in den Pflanzen einen wundinduzierten Stress auslösen.

Des Weiteren wurden Blätter von Promotor-Reporter-Gen- Fusions- Pflanzen (siehe 2.6) verletzt und die nach 2 h geernteten Blätter in X-Gluc-Puffer (siehe Anhang 8.2) inkubiert.

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 RNA Extraktion aus unterschiedlichen Organen mittels LiCl-Methode

Um das Expressionslevel eines Gens in verschiedenen Organen von *Arabidopsis* zu untersuchen, wurde aus diesen mittels LiCl-Methode RNA gewonnen. Vorherige Tests zeigten, dass die Ausbeute von RNA aus Schoten bei Extraktion mittels LiCl-Methode verglichen zur TriReagent®-Methode (siehe 2.5.2) besonders hoch ist. Für die Präparation der RNA wurden jeweils ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörser zu feinem Pulver homogenisiert. Das Pulver wurde gemeinsam mit 500 µl warmen RNA-Extraktionspuffer (siehe Anhang 8.2) in ein Reaktionsgefäß gegeben und die Suspension für 30 s gut durchmischt. Dazu kamen 250 µl Chloroform:Isoamylalkohol (1:1 v/v), danach folgten 30 s mischen. Das Gemisch wurde für 5 min bei 20000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde mit 350 µl 4 M LiCl versetzt und nochmals für 30 s gemischt. Es folgte die Fällung der RNA über Nacht bei 4 °C. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 20000 xg für 20 min und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl DEPC Wasser (siehe Anhang 8.2) gelöst. Daraufhin wurde die RNA mit 25 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 250 µl Ethanol erneut gefällt und für 2 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 20000 xg bei 4 °C für 10 min erfolgte die erneute Pelletierung. Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol gewaschen, im Vakuum-Exsikkator getrocknet und anschließend in 25 µl DEPC Wasser gelöst.

2.5.2 RNA Präparation aus Keimlingen mittels TriReagent®

Ca. 100 mg gefrorenes Pflanzenmaterial wurden mit einem Metallpistill, welcher vorher in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, für ca. 10 s pulverisiert. Anschließend wurden 500 µl TriReagent® (siehe Anhang 8.2) zugegeben. Das Material wurde für 10 s homogenisiert und weitere 500 µl TriReagent® wurden zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 20000 xg. Die obere Phase wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Zur Fällung der RNA wurde ein Volumen eiskaltes Isopropanol zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10000 xg wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 5 min bei Raumtemperatur

und 10000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Daraufhin erfolgte das Resuspendieren der RNA in 40 µl DEPC Wasser.

2.5.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Alle RNA Proben sollten auf eine Konzentration von 200 ng/µl eingestellt werden. Dazu wurde die Extinktion der jeweiligen Lösungen mittels Photometer in einer Quarzküvette bei 260 nm gemessen.

Für RNA gilt:

$$OD_{260} \cdot 1 = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Die RNA-Proben wurden alle auf die gleiche Konzentration verdünnt und mittels Gelelektrophorese (siehe 2.5.7) überprüft.

2.5.4 Verwendete Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind dem Anhang 8.4 zu entnehmen. Tabelle 12 zeigt die Primer geordnet nach Einsatzgebiet, Tabelle 13 enthält die jeweilige Sequenz der Primer. Bei allen RT-PCRs wurden neben den *KCS*- spezifischen Primern auch Primer, die einen Teil des *ACTIN2*- Gens (At5G09810) amplifizieren, eingesetzt. Die ermittelten Werte konnten somit, vergleichbar wie die Daten der Datenbankanalysen (siehe 2.3), auf *ACTIN* normiert werden.

2.5.5 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis des transkriptionellen Knockouts sowie zur Untersuchung der organspezifischen Expression wurde das One Step RT-PCR-KitTM von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Dazu wurde folgender RT-PCR- Reaktionsansatz nach Angaben des Herstellers zubereitet (Tabelle 2). Der Primermix bestand aus gleichen Anteilen aus zwei Gen- spezifischen sowie zwei *ACTIN*- spezifischen Primern. Das genutzte Temperaturprogramm kann Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 2: RT-PCR Reaktionsansatz

Menge [μ l]	Reagenz	Konzentration
12,5	Reaktionsmix	2 X
1	RNA	200 ng/ μ l
0,8	Primermix	50 pmol/ μ l
1	SuperScript TM III RT/Platinum [®] Taq Mix	5 U/ μ l
9,7	DEPC- Wasser	

Tabelle 3: Temperatur-Programm für die RT-PCR

Für die Berechnung der primerspezifischen Anlagerungstemperatur siehe Anhang 8.5 und 8.6.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
cDNA Synthese	50	50
Denaturierung	94	2
30 Zyklen:		
Denaturierung	94	0,25
Anlagerung der Primer	Primerabhängige Temperatur	0,5
Verlängerung	68	1
Abschließende Verlängerung	68	5

Um die Expression der Kandidatengene nach Verwundung und Salzstress zu untersuchen, wurde zunächst mittels Superscript III Reversen TranskriptaseTM (Invitrogen) RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden folgende Komponenten zu einem RNA/Primer Mix (Tabelle 4) in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt und nach 5 min Inkubation bei 65 °C, für mindestens 1 min auf Eis abgekühlt.

Tabelle 4: RNA/Primer Mix

Menge	Reagenz	Konzentration
5 μ l	RNA	200 ng/ μ l
1 μ l	OligodT	50 μ M
1 μ l	dNTP	10 mM
3 μ l	DEPC- Wasser	

Darauf folgte die Zugabe von 10 μl cDNA Synthese Mix (Tabelle 5).

Tabelle 5: cDNA Synthese Mix

Menge	Reagenz	Konzentration
2 μl	RT-Puffer	10 X
4 μl	MgCl ₂	25 mM
2 μl	DTT	0.1 M
1 μl	RNaseOUT™	
1 μl	SuperScript™III RT	200 U/ μl

Je 1 μl dieses Ansatzes diene als Matrize in einer PCR (siehe 2.5.6).

2.5.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCRs wurden nach dem gleichen Schema durchgeführt. Der PCR-Reaktionsansatz kann der Tabelle 6 und das Temperaturprogramm der Tabelle 7 entnommen werden. Für die Zusammensetzung des 10 X PCR-Puffers siehe Anhang 8.2.

Tabelle 6: PCR Reaktionsansatz

Menge [μl]	Reagenz	Konzentration
2,5	PCR-Puffer	10 X
0,5	dNTPs (Fermentas)	10 mM
0,25	je Primer	50 pmol/ μl
0,25	Taq-Polymerase (Axon GmbH, Deutschland)	5 U/ μl
auf 24	MilliQ Wasser	
1	Matrize	

Tabelle 7: Temperatur-Programm für die PCR

Für die Berechnung der primerspezifischen Anlagerungstemperatur siehe Anhang 8.5 und 8.6.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Denaturierung	94	5
30 Zyklen:		
Denaturierung	94	0,5
Anlagerung der Primer	primerabhängige Temperatur	1
Verlängerung	72	1
Abschließende Verlängerung	72	10

2.5.7 Gelelektrophorese

Alle Proben, die über Gelelektrophorese aufgetrennt werden sollten, wurden mit 6 X Ladebuffer (siehe Anhang 8.2) vermischt. Es wurden 1%ige Agarosegele angefertigt, für Fragmente größer 5000 bp wurden 0,8%ige Gele angefertigt. Dem Agarosegel wurde 0,05% Ethidiumbromid zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegung einer Spannung von 80 Volt. Die Gele wurden anschließend unter UV- Licht photographiert. Zur quantitativen Auswertung wurde das Agarosegel mit einem Typhoon Imager eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Programm ImageQuant (Version 5 Amersham Biosciences, Freiburg) quantifiziert.

Als Größenmarker wurde eine 100 bp DNA- Leiter eingesetzt (siehe Anhang Abbildung 47).

2.6 Herstellung transgener Pflanzen

Es wurden zum einen Promotor-Reportergen- Fusionen hergestellt, zum anderen wurden Überexpressionskonstrukte hergestellt, in dem die kodierende Sequenz von *KCS04* hinter den Promotor des Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV) (Odell *et al.* 1985), fortan als 2X 35S bezeichnet, kloniert wurde. Die Klonierungen wurden mit Hilfe des Gateway®-Systems durchgeführt, welches die Eigenschaft der Rekombinasen aus dem λ Phagen ausnutzt für bestimmte Sequenzen spezifisch zu sein und somit DNA-Fragmente richtungsspezifisch in andere spezifische Sequenzen zu integrieren. Dieser zweistufige Prozess (Abbildung 6) besteht aus einer BP-Reaktion (Abbildung 6A), in der ein PCR-Produkt in einen Donorvektor (siehe Abbildung 44) rekombiniert wird und einer LR-Reaktion (Abbildung 6B), in der die gewünschte

Sequenz aus dem Eingangsklon in einen Zielvektor (siehe Anhang Abbildung 45) rekombiniert wird. Als Zielvektoren wurden über die Universität Zürich pMDC-Vektoren bezogen (Curtis und Grossniklaus 2003). Die Erfolge der jeweiligen Reaktion konnten aufgrund von Resistenzgenen auf den Vektoren (Eingangsklon: Zeocin, Expressionsklon: Kanamycin) überprüft werden.

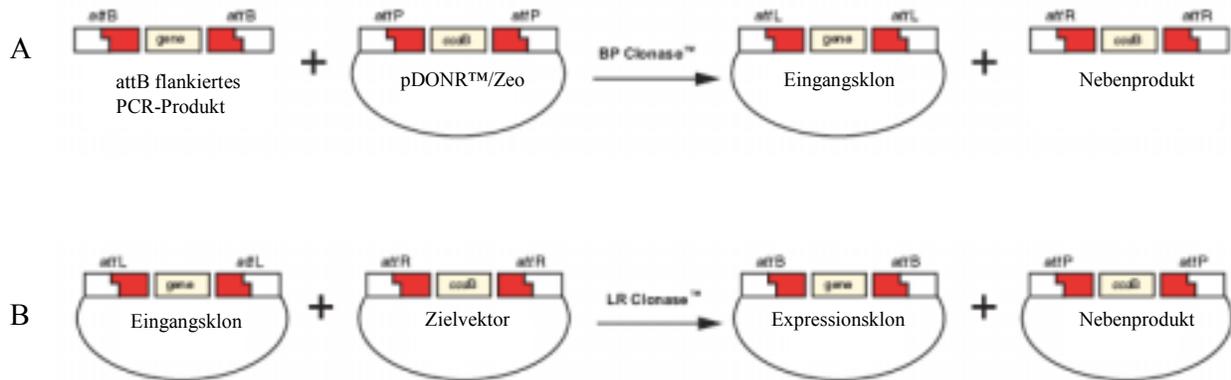


Abbildung 6: Schematische Darstellung der BP-Reaktion (A) und LR-Reaktion (B) (verändert nach Invitrogen).

Im ersten Schritt, der BP-Reaktion (A), wird ein mit attB-Stellen flankiertes DNA Fragment durch eine Rekombinase in den Donorvektor (pDONR™/Zeo) kloniert. Es entstehen der Eingangsklon sowie ein Nebenprodukt. *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen des Stammes DH5 α , die dieses Nebenprodukt aufgenommen haben, sind aufgrund des für einen DNA- Gyrase Hemmer codierenden *ccdB* Gens auf dem Vektor nicht überlebensfähig. Im zweiten Schritt (B) findet eine Rekombination zwischen den attL und attR Stellen des Eingangsklons und Zielvektors statt. Es entsteht der Expressionsklon und wiederum ein für *E. coli* letales Nebenprodukt.

2.6.1 BP-Reaktion

Mit einer fehlerkorrigierenden DNA Polymerase (AccuPrime™ PFX Polymerase, Invitrogen) wurden die putativen Promotorregionen bzw. die kodierende Sequenz des zu untersuchenden *KCS*- Gens amplifiziert. Die genutzten Primer sind im Anhang in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgeführt, die Durchführung der PCR wird in 2.5.6 beschrieben. Weil die Primer an beiden Enden über Gateway Adapter verfügen, besitzen die DNA Fragmente an beiden Enden so genannte attB-Stellen. Als Matrize dienen BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) (siehe Anhang), deren DNA mittels Plasmid Midi Kit® (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt wurden.

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und durch Gelelution nach den Angaben des Herstellers (QIAquick® PCR Purifikation Kit, Protokoll 2002, Qiagen) aufgereinigt. Auf dem Donorvektor (pDONR™/Zeo) sind die zu den attB- Stellen passenden attP- Stellen vorhanden. Die Rekombination findet zwischen den attB- und attP- Stellen statt. Die BP-Reaktion wurde mit dem Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix nach

Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.6.2 Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) und Selektion von positiven Klonen

200 µl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (nach Inoue *et al.* 1990) des Stammes DH5α wurden mit dem jeweiligen BP-Reaktionsansatz für 30 min in Eiswasser inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock von 42 °C für 30 s und erneute Inkubation in Eiswasser für 5 min. Die Bakterien wurden mit 0,8 ml SOC-Medium (siehe Anhang 8.2) versetzt und für 60 min bei 37 °C geschüttelt.

Der Ansatz wurde zur Selektion auf mit Zeocin (50 µg/mg) versetzte LB-Agarplatten (siehe Anhang 8.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden von Einzelkolonien Flüssigkulturen mit 5 ml LB-Medium inklusive Zeocin (50 µg/ml) in 15 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert und anschließend eine Plasmidpräparation nach dem Protokoll Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) durchgeführt.

2.6.3 Durchführung eines Restriktionsverdaus

Um zu verifizieren, dass es sich um positive Klone, in Hinsicht auf das gewünschte Plasmid, handelt, wurden Aliquots der Plasmidextrakte mittels Restriktionsenzymen (Promega, Invitrogen und Fermentas) für 1 h bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Jedes Plasmid wurde mit mindestens zwei verschiedenen Enzymen inkubiert. Die Enzyme wurden so ausgewählt, dass eines einmal, das andere mindestens zweimal den Vektor schneidet. Außerdem wurde darauf geachtet, dass sich die Schnittstellen sowohl in dem Bereich des Ursprungsvektors als auch auf dem des durch PCR erhaltenen DNA-Fragments liegen.

Tabelle 8: Ansatz des Restriktionsverdaus

Es wurden 4 µl von 50 µl Plasmidextrakt aus 2.6.2 eingesetzt.

Reagenz	Menge [µl]
Plasmid	4
10 X Puffer	1
Restriktionsenzym	0,5
MilliQ Wasser	4,5

2.6.4 Sequenzierung von Plasmiden

Jeweils ein identifizierter positiver Klon wurde durch die Firma *4 base lab* (Reutlingen, Deutschland) sequenziert. Es wurden die Standardprimer M13 Forward und M13 Reverse (siehe Anhang Tabelle 13) genutzt.

2.6.5 LR-Reaktion

Die LR-Reaktion wurde mit dem Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Zielvektor für *Prom_{KCS}-GUS*- Konstrukte diente pMDC164 und für die Überexpression pMDC32 (je 150 ng/μl) (Abbildung 45). Die aus der LR-Reaktion resultierenden Expressionsklone sind als Vektorkarten exemplarisch für *KCS04* in Abbildung 7 dargestellt. Die jeweiligen LR Ansätze wurden anschließend in *E. coli* Zellen des Stammes DH5α transformiert (siehe 2.6.2).

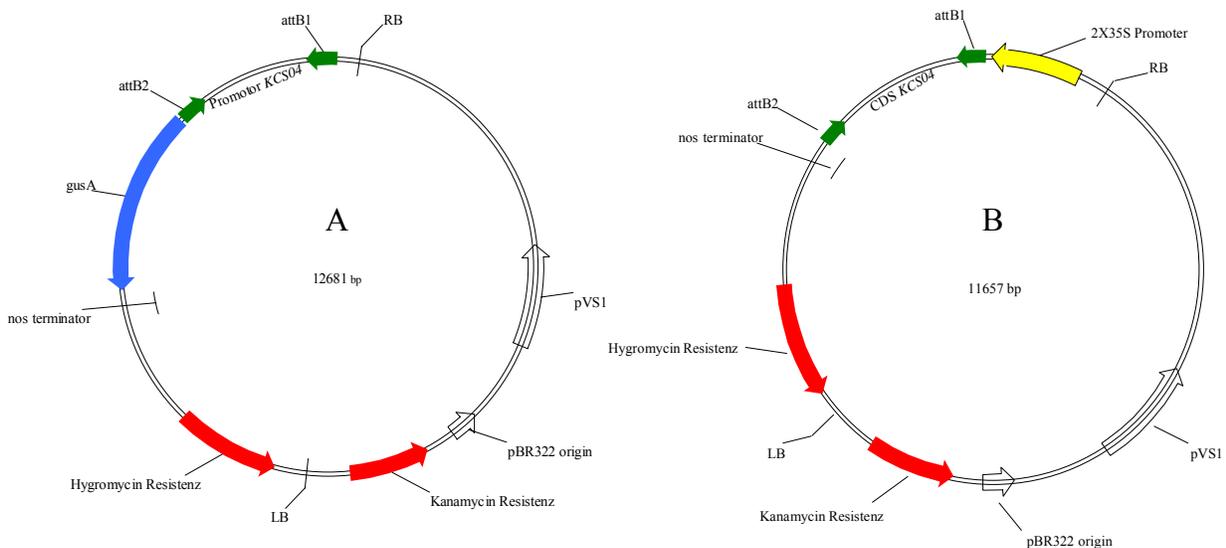


Abbildung 7: Vektorkarten des Expressionsklon von *Prom_{KCS04}-GUS* (A) und Überexpression von *KCS04* (B). Exemplarisch für alle *Prom_{KCS}-GUS*- und Überexpressionskonstrukte. Es wurde jeweils als Zielvektor pMDC164 (Promotor-Reportergen- Fusion) bzw. pMDC32 (Überexpression) in die LR- Reaktion eingesetzt.

Legende der Vektorbeschriftung:

2X 35S Promoter: zwei in Serie geschaltete 35S Promotoren

GusA (blau): kodierende Region des β -Glucuronidase-Gens

attB1, attB2 (grün): Erkennungsmotive der LR-Rekombinase

nos terminator: Terminator des Nopalalin-Synthase-Gens

Hygromycin Resistenz (rot): Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin

Kanamycin Resistenz (rot): Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin

RB, LB: Sequenzmotive, wichtig für *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte *Arabidopsis* Transformation

pBR322 origin: Replikationsursprung des pBR322-Plasmids (Bolivar *et al.* 1977)

pVS1: Replikationsursprung für die Vermehrung des Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*

2.6.6 Herstellung kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) und Transformation von *A. tumefaciens*

Zellen von *A. tumefaciens* des Stammes GV3101pMP90, die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin aufweisen, wurden auf LB-Medium mit Rifampicin (10 µg/ml) ausgestrichen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28 °C wurden 20 ml LB-Medium mit frischgewachsenen Kolonien angeimpft und über Nacht bei 28 °C geschüttelt. Mit diesen 20 ml wurden dann 100 ml LB-Medium angeimpft und erneute vier Stunden geschüttelt. Die Kulturen wurden anschließend 20 min bei 4 °C und 3000 xg zentrifugiert, das Pellet in 10 ml kaltem TE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 1 ml LB-Medium wurde die Suspension, welche kompetente *A. tumefaciens* enthält, aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Je 1 µl des ebenfalls durch Restriktionsverdau verifizierten Expressionsklon aus 2.6.5 wurde zu 200 µl kompetenter *A. tumefaciens* Zellen gegeben. Nach Durchmischen wurden die Ansätze zunächst 5 min in Eiswasser und dann 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Der Hitzeshock erfolgte bei 37 °C im Wasserbad für 5 min. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium folgte unter Schütteln eine Inkubation bei 28 °C für 3 h. Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) und Rifampicin (10 µg/ml) ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Es wurden Kolonien ausgewählt, in Flüssigkultur vermehrt und mittels Restriktionsverdau überprüft (siehe Tabelle 8).

2.6.7 Transformation von *Arabidopsis* mit *A. tumefaciens*

Arabidopsis- Pflanzen wurden mittels „Floral-Dip“ Methode (Clough und Bent 1998) transformiert. Dazu wurde der jeweilige Expressionsklon zunächst in 10 ml LB-Medium mit Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) unter schütteln über Nacht bei 28 °C vorinkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 300 ml LB-Medium mit Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) angeimpft und nochmals über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000 xg für 15 min pelletiert und anschließend in Inokulationsmedium (siehe Anhang 8.3) resuspendiert. In dieses Medium wurden dann die Infloreszenzen fünf Wochen alter *Arabidopsis*- Pflanzen zweimal für 10 s eingetaucht. Die Pflanzen wurden dann bis zur vollständigen Schotenentwicklung gewässert. Die geernteten, getrockneten Samen konnten dann auf MS-Platten mit 30 µg/ml Hygromycin selektioniert werden.

2.6.8 Anlegen von Glycerinstocks zur Langzeitlagerung von Klonen

Von allen Klonen, die letztendlich genutzt wurden, wurden Glycerinstocks angelegt. Dafür wurde von einer Übernachtflüssigkultur 0,7 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,3 ml sterilem 50% Glycerin vermischt. Anschließend wurden die Klone in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7 GUS- Färbung

Um die Relevanz der Ergebnisse der Promotor-Reporter-Gen-Studien überprüfen zu können wurden zunächst Kontrollkonstrukte hergestellt. Neben den *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen wurden auch *Prom_{SCR}-GUS*- Pflanzen hergestellt. *SCARECROW (SCR)* wird nachweislich in der Endodermis exprimiert (Di Laurenzio *et al.* 1996, Malamy und Benfey 1997), daher konnte mit dem *Prom_{SCR}-GUS*- Konstrukt überprüft werden, ob es mit unseren Vektoren und den gewählten Bedingungen möglich ist GUS- Aktivität in der Endodermis nachzuweisen. Als weitere Kontrollen standen *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Pflanzen (René Höfer) zur Verfügung. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass CYP86A1 an der Bildung des Suberins in der Wurzel von *Arabidopsis* beteiligt ist (René Höfer, unveröffentlichte Daten). Der Knockout von CYP86A1 führt zu einem verminderten Gehalt an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Insgesamt hat *cyp86a1* 60% weniger Suberin als der Wildtyp. Der Vergleich des Expressionsmusters der *KCS*- Kandidaten Gene mit dem des *CYP86A1* sollte einen Hinweis darauf geben, ob die Kandidaten-*KCS* eventuell auch an der Suberinbiosynthese beteiligt sind. Außerdem wurden auch Pflanzen auf GUS- Aktivität analysiert, die nur mit dem GUS-Zielvektor pMDC164 transformiert wurden (Matthias Krampitz), um ausschließen zu können, dass allein der Vektor zu einer artifiziellen Blaufärbung führt.

Die Untersuchungen auf GUS- Aktivität wurden nach Debrouwer und de Block (1992) durchgeführt. Dazu wurden ganze Keimlinge oder Pflanzenorgane in X-Gluc-Puffer (siehe Anhang 8.2) bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen und um aus den oberirdischen Pflanzenteilen das Chlorophyll auszuwaschen, wurde das Pflanzenmaterial in 70% Ethanol (technischer Reinheitsgrad) geschwenkt.

2.8 Mikroskopische Untersuchungen

Die *Arabidopsis*- Wurzeln, welche mittels Microtom geschnitten werden sollten, wurden bis zu 8 Tage, jedoch mindestens über Nacht in Fixierlösung (siehe Anhang 8.2) fixiert. Die Wurzeln

wurden dann in einem Einbettmedium (Neg-50, Richard-Allan Scientific, USA) auf einen Objektisch gegeben und mittels der Gefriervorrichtung des Gefriermikrotoms (Cryostat HM 500 M, Microm) auf - 20 °C gefroren, um dann 10-20 µm dünne Schnitte anzufertigen. Die Schnitte wurden auf Objektträger übertragen und in einem Tropfen Glycerin:Wasser (1:1; v/v) aufgenommen. Einige Schnitte bzw. Blätter wurden mit Sudan 7B nach Brundrett *et al.* (1991) gefärbt. Dazu wurde auf die Schnitte bzw. Blätter in Sudan 7B (0,1%; w/v) in PEG-400:90% Glycerin (1:1; v/v) gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte bzw. Blätter zweimal mit Glycerin:Wasser (1:1) gewaschen. Die lipophilen Bestandteile werden durch diese Behandlung intensiv rot angefärbt.

Im Lichtmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Göttingen) wurden die Schnitte auf die Sudan 7B Färbung untersucht, im Fluoreszenz-Mikroskop konnte die Autofluoreszenz aromatischer Bestandteile betrachtet werden. Über eine an das Mikroskop angeschlossene DXM1200-Kamera (Nikon Corporation, Japan) wurden die erhaltenen Bilder digital aufgezeichnet und mit Hilfe der Software Photoshop® 7.0 (Adobe Systems, USA) bearbeitet.

2.9 Probenaufbereitung für gaschromatographische Analysen

2.9.1 Suberinextraktion aus Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen

Es wurden je vier Parallelen, bestehend aus je fünf bis sieben Pflanzen eingesetzt.

Die Wurzeln fünf Wochen alter, wie in 2.2.1 beschrieben angezogener Pflanzen, wurden aus der Erde ausgegraben und unter Leitungswasser gereinigt. Anschließend wurden die Wurzeln mit einer Enzymlösung (2% v/v Zellulasen (Celluclast, Novo Nordisk, Denmark), 2% v/v Pektinasen (Trenolin, Erbslöh) in 10⁻² M Zitratpuffer) in einem Erlenmeyerkolben vakuumfiltriert. Durch diese Behandlung werden alle kohlenhydratreichen Bestandteile der Zellwand abgebaut.

Die Wurzelenzymlösung wurde nach einer Woche erneuert. Nach einer weiteren Woche wurde die Enzymlösung durch Chloroform:Methanol (1:1) ausgetauscht um die löslichen Lipide zu extrahieren. Nach weiteren acht Tagen wurden die Wurzeln im Vakuum-Exsikkator getrocknet und anschließend gewogen.

2.9.2 Suberinextraktion aus Wurzeln zehn Tage alter Keimlingen

Die, wie in 2.2.2 beschrieben, sterilisierten Samen wurden auf MS-Agar ausgesät. Nach zehn Tagen wurden die Wurzeln der Keimlinge geerntet und direkt mit Chloroform:Methanol (1:1) extrahiert. Nach einer Woche und dreimaligen Wechseln des Chloroform:Methanols (1:1) wurden

die Wurzeln auf Teflonplättchen zunächst unter dem Abzug und dann im Exsikkator getrocknet. Nach einer weiteren Woche wurden die Wurzeln gewogen und in drei Parallelen je ca. 3 mg aufgeteilt.

2.9.3 Samenlipidextraktion

Je Parallele wurden ca. 2 mg Samen abgewogen und in ein mit Chloroform gespültes Reaktionsgefäß gegeben. Die Samen wurden 16 h bei 80 °C mit BF_3/MeOH umgeestert (siehe 2.9.6).

2.9.4 Blattwachsextraktion

Für die Analyse der Blattwachse wurden je Genotyp vier Parallelen untersucht. Je Parallele wurden nacheinander sechs Blätter 10 s in 6 ml Chloroform getaucht und sofort mit 5 µg Tetracosan (C_{24} -Alkan) intern standardisiert. Das Chloroform wurde mittels eines Stickstoffstroms auf ca. 50 µl eingedampft. Zur Bestimmung der Blattflächen wurden die Blätter in eine Folie gelegt und eingescannt, um anschließend über die Anzahl der Pixel in Adobe Photoshop® 7.0 die Blattfläche zu berechnen.

2.9.5 Cutinextraktion

Je zwei Parallelen der Blätter der Wachsproben wurden zu einer Cutinprobe zusammengefasst. Um auch hier insgesamt vier Parallelen zu haben, wurden noch zwölf weitere Blätter geerntet. Je Parallele wurden zwölf Blätter, deren Wachs bereits extrahiert wurde, in 50 ml Chloroform:Methanol (1:1) extrahiert. Das Chloroform:Methanol (1:1) wurde innerhalb einer Woche drei bis viermal ausgetauscht. Nach einer Woche wurden die totalextrahierten Blätter unter dem Abzug getrocknet.

2.9.6 Umesterung – Borontrifluorid/Methanol (BF_3/MeOH)

Um die monomeren Bestandteile des Polymers der fünf Wochen alten Wurzeln zu erhalten, wurden ca. 4 mg einer Parallele mittels 2 ml BF_3/MeOH (~10% BF_3 in Methanol, Fluka Taufkirchen) in einem 4 ml Reaktionsgefäß bei verschlossenem Deckel 16 h bei 70 °C umgeestert. Je Parallele wurden dann 2 ml Natriumhydrogencarbonat in ein 4 ml Glasgefäß vorlegt. Die umgeesterten, mit 10 µg Dotriacontan (C_{32} -Alkan) intern standardisierten Proben wurden zu dem Natriumhydrogencarbonat gegeben um die Reaktion abzustoppen. Anschließend wurde insgesamt dreimal mit 1 ml Chloroform extrahiert und zweimal mit 1 ml Wasser

gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurden die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß wurde das Lösungsmittel mit Hilfe eines Stickstoffstroms bis auf ca. 50 μl eingedampft.

2.9.7 Umesterung – Methanolische Salzsäure (MeOH/HCl)

Um die monomeren Bestandteile des Polymers (Suberin zehn Tage alter Pflanzen, Samenschale, Cutin) zu erhalten, wurden die Samen, die Wurzeln oder die Blätter einer Parallele mittels 4 ml 1 N methanolischer Salzsäure (Fluka, Taufkirchen) 2 h bei 80 °C umgeestert. Die Proben wurden anschließend mit 10 μg Dotriacontan für Wurzeln und Samen bzw. 250 μg Dotriacontan für Blätter intern standardisiert. Die freigesetzten hydrophoben Bestandteile wurden dreimal mit 1 ml Hexan extrahiert und das Hexan jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem es unter einem Stickstoffstrom bis auf ca. 50 μl eingedampft wurde.

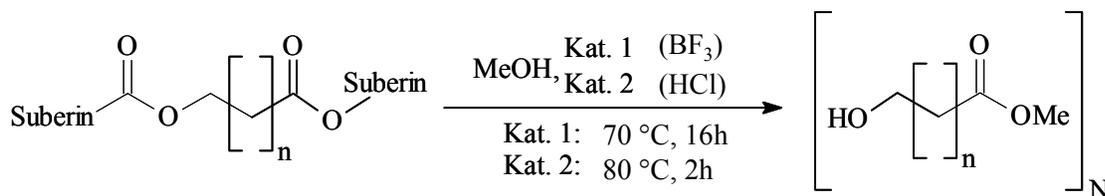
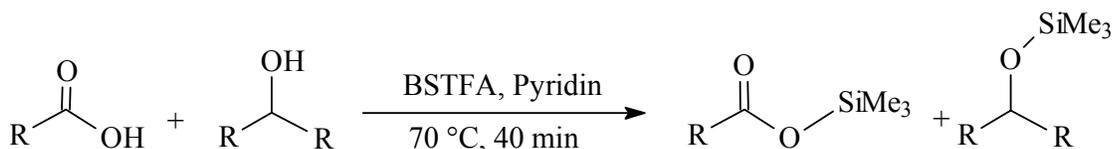


Abbildung 8: Umesterung des Suberinpolymers in seine monomeren Bestandteile.

Bei der Umesterung des Suberins der Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen wurde BF_3 als Katalysator eingesetzt (siehe 2.9.6), bei dem Suberin der Wurzeln zehn Tage alter Keimlinge, den Samen und dem Cutinpolymer wurde HCl als Katalysator eingesetzt (siehe 2.9.7).

2.9.8 Derivatisierung

Alle Proben wurden vor der Injektion in den Gaschromatographen derivatisiert. Da zwischen polaren organischen Verbindungen starke Wechselwirkungen auftreten können und es außerdem zu einer Haftung der Substanzen an die Säule des Gaschromatographen kommen kann, ist es wichtig die freien Hydroxyl- wie auch Carboxylgruppen zu maskieren. Zur Erhöhung der Flüchtigkeit werden die polaren Gruppen daher in die entsprechenden Trimethylsilylether und -ester überführt. Dazu wurden die Proben mit 20 μl Pyridin und 20 μl Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) versetzt und 40 min auf 70 °C erhitzt.



Gleichung 1: Überführung der polaren Carboxyl- und Hydroxylgruppen in unpolare, leichter flüchtige Derivate.

2.9.9 Gaschromatographie

Die derivatisierten Proben wurden zunächst mit 150 µl Chloroform verdünnt und dann 1 µl mit einer Kapillarspritze (*on-column-injection*) direkt auf die Säule (DB-1, 30 m x 0,32 mm, 0,1 µm (J&W)) des Gaschromatographen (Hewlett Packard, 5890 Series II Plus) gegeben.

Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flussrate von 2 ml min⁻¹.

Tabelle 9: Temperaturprogramme für die gaschromatographischen Analysen

Suberin/ Samenlipide/ Cutin	Wachs
Injektion bei 50 °C	Injektion bei 50 °C
2 min bei 50 °C	2 min bei 50 °C
10°C/min bis 150 °C	40°C/min bis 200 °C
1 min bei 150°C	2 min bei 200°C
3°C/min bis 310°C	3°C/min bis 310°C
15 min bei 310°C	30 min bei 310°C

Mittels der Gaschromatographie werden die einzelnen Komponenten einer Probe zeitlich über die Säule nach Unterschieden in Polarität und Kettenlänge aufgetrennt.

Für die qualitative Bestimmung wurde ein Gaschromatograph (GC) gewählt, welcher an einen Massenspektrometer (MS) gekoppelt ist. Durch Elektronenbeschuss werden die Moleküle ionisiert, nehmen somit Energie auf und zerfallen in für sie typische, stabile Fragmente und können so anhand typischer Fragmentmuster bestimmt werden.

Für quantitative Bestimmungen wurde eine Kopplung mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) gewählt, welcher linear auf die Anzahl von verbrannten Kohlenstoffatomen reagiert. Die Signale werden digitalisiert und von einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet. Mit Hilfe eines geeigneten Auswertungsprogramm (HP-Chemstation, Hewlett Packard Corporation, USA) ist es möglich anhand der Fragmentmuster die Substanz, bzw. anhand der Fläche unter den Peaks, basierend auf den internen Standard, den Gehalt der jeweiligen Substanz zu bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl von Kandidatengenen aus der *KCS* Familie

Um aus den 21 *KCS*- Genen in *Arabidopsis* geeignete Kandidaten auszuwählen, wurden zunächst öffentliche Datenbanken nach wurzelexprimierten *KCS*- Genen durchsucht. Die Expression der daraufhin ausgewählten Kandidaten wurden mittels RT-PCR und Promotor-Reportergen- Fusionen detailliert untersucht.

3.1.1 Organspezifische Expressionsanalysen mittels *Expressed Sequence Tags* (EST)

Um die EST Daten (www.Arabidopsis.org) untereinander vergleichen zu können, wurden die ESTs aus Wurzelgewebe durch die Gesamtanzahl der verfügbaren ESTs geteilt und in Abbildung 9A graphisch dargestellt. Für die Gene *KCS07*, *KCS12* und *KCS20* waren zu diesem Zeitpunkt weder EST Daten aus der Wurzel noch aus anderen Organen verfügbar. Für die Gene *KCS13* und *KCS14*, die zu 98% homolog auf Aminosäureebene sind (siehe Anhang Tabelle 44) gab es nur einen gemeinsamen EST, welcher nicht aus Wurzelgewebe stammte.

Für die Gene *KCS01*, *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS17*, *KCS19* und *KCS21* waren ESTs aus Wurzelgewebe vorhanden. Für *KCS04* konnten insgesamt neun ESTs gefunden werden, wovon vier aus der Wurzel stammten. Für *KCS17* stammten zwei von 20 ESTs aus Wurzelgewebe. Diese beiden Gene (*KCS04* und *KCS17*) wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es wurde für beide eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese in der Wurzel postuliert (Briesen 2004, Höfer 2005). Basierend auf den EST Daten sind *KCS21* (1/9; EST aus Wurzel/EST Gesamt), *KCS11* (1/10) und *KCS08* (1/10) wurzelexprimiert. *KCS01* (2/20) und *KCS19* (1/16) zeigten ebenfalls ESTs aus Wurzelgewebe.

3.1.2 Organspezifische Expressionsanalysen mittels *Massively Parallel Signature Sequencing MPSS* (MPSS):

Die relative Häufigkeit der MPSS- Signale (<http://mpss.udel.edu/at/>) eines Gens aus der Wurzel wurde der relativen Häufigkeit der Signale des Organs mit größter Häufigkeit gegenüber gestellt und in Abbildung 9B graphisch dargestellt. Die meisten MPSS Signale aus Wurzeln konnten für das Gen *KCS04* gefunden werden (53 (= Anzahl der MPSS- Signale aus Wurzel)/ 42 (= Anzahl der Signale aus Organ mit den meisten Signalen); Schote (= Organ mit den meisten Signalen)). Weil für *KCS04* und *KCS11* (siehe unten) die meisten Signale aus der Wurzel stammten, wurde die Signalanzahl aus Wurzel der Anzahl des Organs mit zweitgrößter

Anzahl gegenübergestellt und das jeweilige Organ in Klammer genannt.

Weitere starke Signale aus den Wurzeln gab es für *KCS11* (12/10; Blüte), *KCS09* (25/26; Blüte), *KCS19* (195/447; Blüte), *KCS17* (24/295; Schote), *KCS01* (12/215; Schote), *KCS08* (2/53; Blüte), *KCS05* (5/244; Blüte), *KCS03* (3/203; Schote) und *KCS06* (3/962; Blüte). Kein MPSS Signal wurde für *KCS16* (0/0) und *KCS18* (0/0) gefunden. Damit festigte sich die Annahme, dass *KCS04*, *KCS08*, *KCS11* und *KCS17* wurzelexprimiert seien.

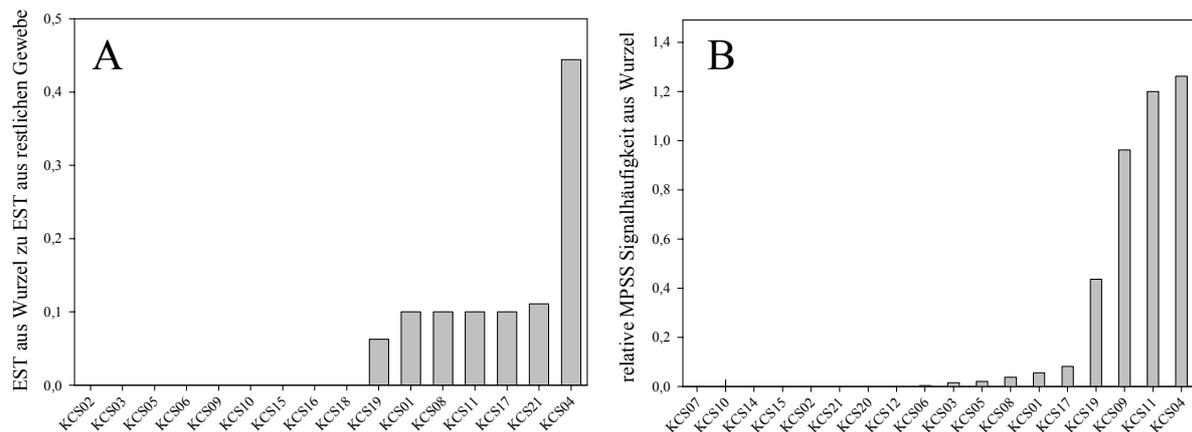


Abbildung 9: Transkripthäufigkeit der KCS- Gene in Wurzeln.

Dargestellt ist das Verhältnis der verfügbaren ESTs aus Wurzelgewebe zu ESTs aus restlichem Gewebe (A) bzw. MPSS- Signale aus Wurzel zu MPSS-Signalen aus Organ mit größter relativer Häufigkeit (B).

KCS04, *KCS08*, *KCS11*, *KCS17* und *KCS21* wurden aufgrund der EST- und MPSS- Daten für weitere Untersuchungen ausgewählt. Für *KCS16* konnte zwar kein EST aus Wurzelgewebe und keine MPSS- Signale gefunden werden, jedoch wiesen weitere Microarraydaten (Birnbauer *et al.* 2003) auf eine Expression in der Wurzel hin, weshalb auch *KCS16* weiter untersucht wurden. *KCS01* und *KCS19* sind laut EST- und MPSS- Daten auch wurzelexprimiert, dies konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe mittels RT-PCR und *Prom_{KCS}-GUS*- Färbungen bestätigt und die Gene näher charakterisiert werden (Krampitz 2006, Emsermann 2007).

Die Gene *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16*, *KCS17* und *KCS21* wurden aufgrund der Expression in Wurzeln weiter untersucht und werden in der Arbeit als Kandidatengene bezeichnet.

3.1.3 Organspezifische Expressionsanalysen mittels Microarraydaten

Für die Kandidatengene wurden zusätzlich Microarraydaten der Datenbank Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch) untersucht. Die Expression der Kandidaten in Wurzel, Stängel, Blatt, Schote und Blüte wurde auf die jeweilige Expression von *ACTIN* in diesen Organen normiert und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Auch hier zeigte *KCS04*, verglichen zu der Expression in anderen Organen, die stärkste Expression in der Wurzel. Für *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* wurde auch eine starke Expression

in Wurzeln nachgewiesen, wenn auch die höchste Expression dieser Gene in Schoten zu finden war. *KCS08* ist laut den Microarraydaten von Genevestigator in der Wurzel exprimiert, jedoch ansteigend stärker in Stängel, Blatt, Schote und am stärksten in der Blüte. *KCS21* hingegen ist sehr stark in der Schote exprimiert aber zeigt kaum Expression in der Wurzel.

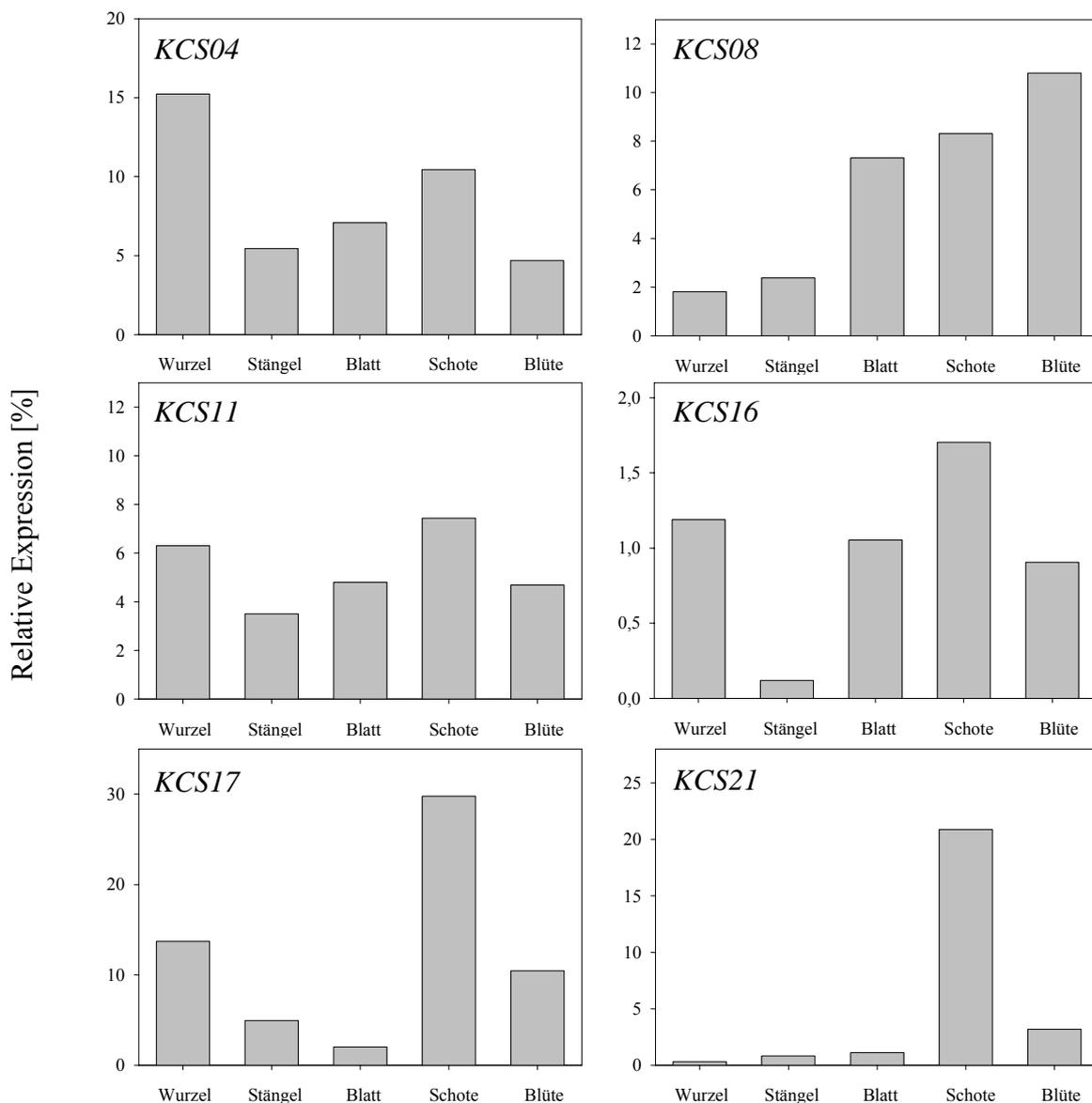


Abbildung 10: Organspezifische Expression der Kandidatengene nach Genevestigator.
Dargestellt ist die organspezifische, auf *ACTIN* (= 100%) normierte Expression der Kandidatengene.

3.1.4 Organspezifische Expressionsanalysen mittels RT-PCR

Um die Expression der Kandidatengene im Detail zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Blüten, Schoten, Blättern, Stängeln und Wurzeln extrahiert. Um eine detaillierte Aussage über die Expression in der Wurzel machen zu können, wurden neben den Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen auch die Wurzeln von zehn und

20 Tage alten Keimlingen untersucht. Dies sollte eine Unterscheidung zwischen Expression in vorwiegend primären bzw. sekundären Wurzeln ermöglichen. Zusätzlich zu den jeweiligen genspezifischen wurden auch *ACTIN*-spezifische Primern in der RT-PCR eingesetzt, um das durch die Densitometrie ermittelte Signal normieren zu können.

Wie in Abbildung 11 zu sehen, zeigen *KCS04*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* ein hohes Expressionslevel in Wurzeln. Auffällig ist, dass die Signalstärke für diese Gene mit zunehmendem Alter der Wurzel abnimmt. Für *KCS08* konnte in der Wurzel fünf Wochen alter Pflanzen keine Expression nachgewiesen werden, jedoch in Wurzeln 20 Tage alter Keimlinge die dritthöchste Expression aller untersuchten Organe. *KCS21* zeigte eine sehr geringe Expression in den Wurzeln der untersuchten Altersstadien. Die höchste Expression konnte für dieses Gen in Blüten und Schoten nachgewiesen werden.

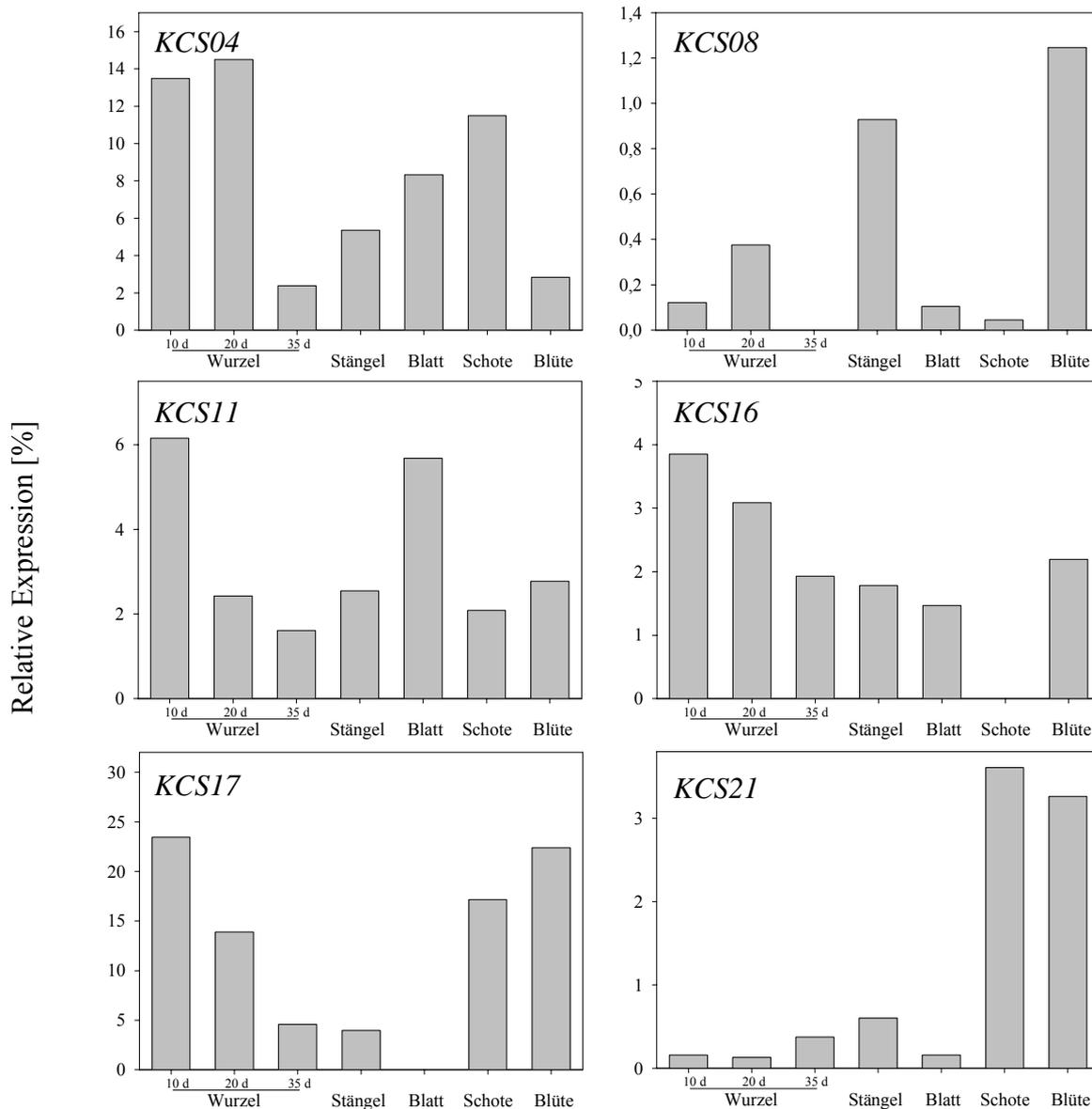


Abbildung 11: Organspezifische Expression der Kandidatengene.

Dargestellt ist die densitometrisch ermittelte, auf *ACTIN* (= 100%) normierte, durch RT-PCR bestimmte Expression der Kandidatengene in unterschiedlichen Pflanzenteilen. Für die Bestimmung der Expressionsrate in der Wurzel wurden Wurzeln von zehn Tage (10 d), 20 Tage (20 d) und 35 Tage (35 d) alten Pflanzen untersucht.

3.1.5 Untersuchungen zur Expression der Kandidatengene mittel Promotor-Reporter-Gen-Fusionen

Um das Expressionsmuster der Kandidatengene zusätzlich zu der bisher untersuchten Organspezifität auch auf Gewebeebene zu untersuchen, wurden die putativen Promotoren (1.3 bis 2.5 kb vor dem ATG) der Kandidatengene mit einem β -Glucuronidase-Gen fusioniert. Mit diesem Konstrukt wurden *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Mittels einer histochemischen Färbung konnten die Aktivitäten der *KCS*-Promotoren in Form der von der Glucuronidase-Aktivität herrührenden Blaufärbung in acht bis 15 unabhängigen Transformanten beobachtet

werden.

Zunächst wurden Kontrolllinien untersucht. Die GUS- Färbung eines Keimlings, der den „leeren“ Zielvektor pMDC164 ohne inklonierten Promotor trägt, führte erwartungsgemäß in dem gesamten Keimling zu keiner nachweisbaren GUS- Aktivität. Abbildung 12 zeigt die Wurzel eines solchen Keimlings die ebenso keine Blaufärbung zeigt.



Abbildung 12: Aufsicht der Wurzel eines Keimlings, welcher den Vektor pMDC164 trägt. Pflanzen wurden mit einem Vektor (pMDC164) transformiert, der nur das *GUS*- Gen aber keinen *KCS* Promotor enthält. Es konnte in acht unabhängigen primären Transformanten nach 24 Stunden keine GUS- Aktivität nachgewiesen werden. um= μm.

Die GUS- Färbung der *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Pflanzen (Abbildung 13) zeigt in der Aufsicht eine deutliche Blaufärbung in der Wurzel. In den Querschnitten der primären Wurzel kann man erkennen, dass wie erwartet die Endodermis blau gefärbt ist. Wie auch schon in Abbildung 13A zu erkennen ist war die Färbung in einigen Bereichen der Wurzel eher fleckig (*patchy*) als gleichmäßig blau. Dieser Eindruck bestätigt sich auch in den Querschnitten B und C wo zu sehen ist, dass stellenweise die gesamte Endodermis wohingegen an anderen Stellen nur einige Zellen der Endodermis gefärbt sind.

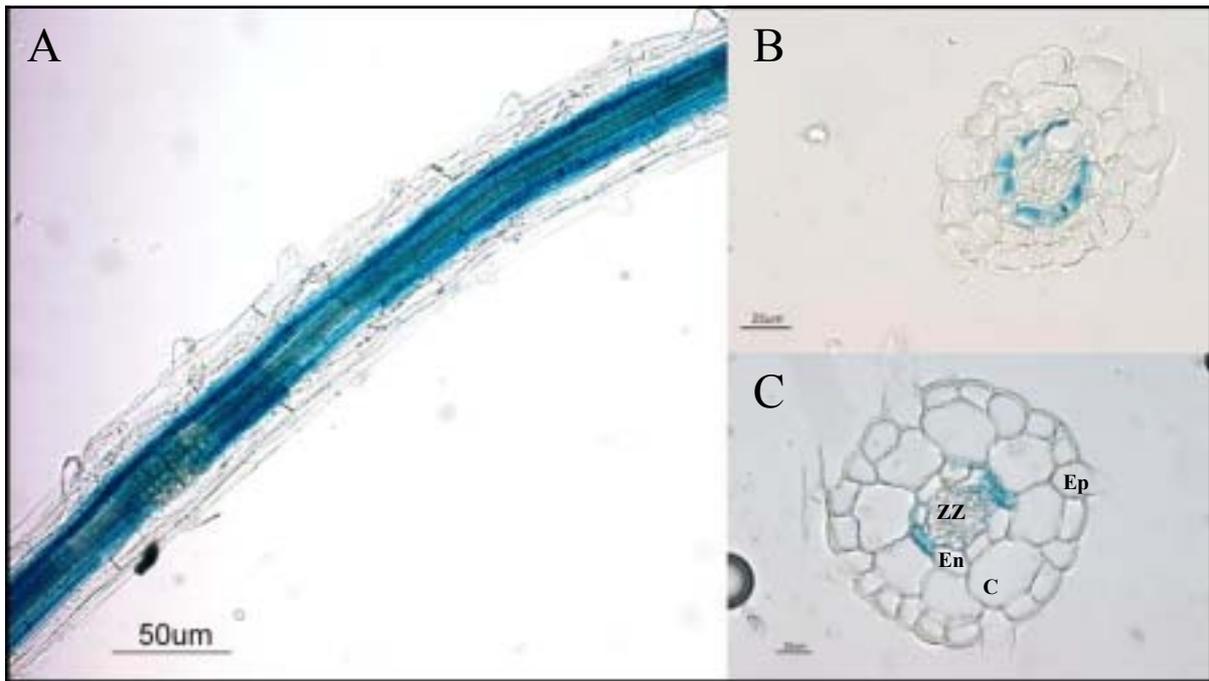


Abbildung 13: Gewebespezifische Expression von *CYP86A1*.

Auf GUS- Aktivität getestete Wurzel eines 14 Tage alten *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Keimlings in der Aufsicht (A) und im Querschnitt (B,C). Die Abbildungen zeigen, dass die Wurzel stark blau gefärbt ist. Der Querschnitt macht die Spezifität der Färbung in der Endodermis deutlich. Diese Muster zeigte sich bei zehn unabhängigen primären Transformanten nach zwei Stunden Inkubation in GUS- Lösung.

ZZ= Zentralzylinder, En= Endodermis, C= Cortex, Ep= Epidermis; um= µm.

Die Färbung der *Prom_{SCR}-GUS*- Pflanzen ergab ein vergleichbares Bild zu den *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Pflanzen (Abbildung 14). Auch bei diesen Pflanzen ist eine starke Färbung, zum Teil aller, zum Teil nur einzelner Zellen der Endodermis sichtbar (Abbildung 14B). Bei diesen Pflanzen ist auch der Zentralzylinder leicht gefärbt.

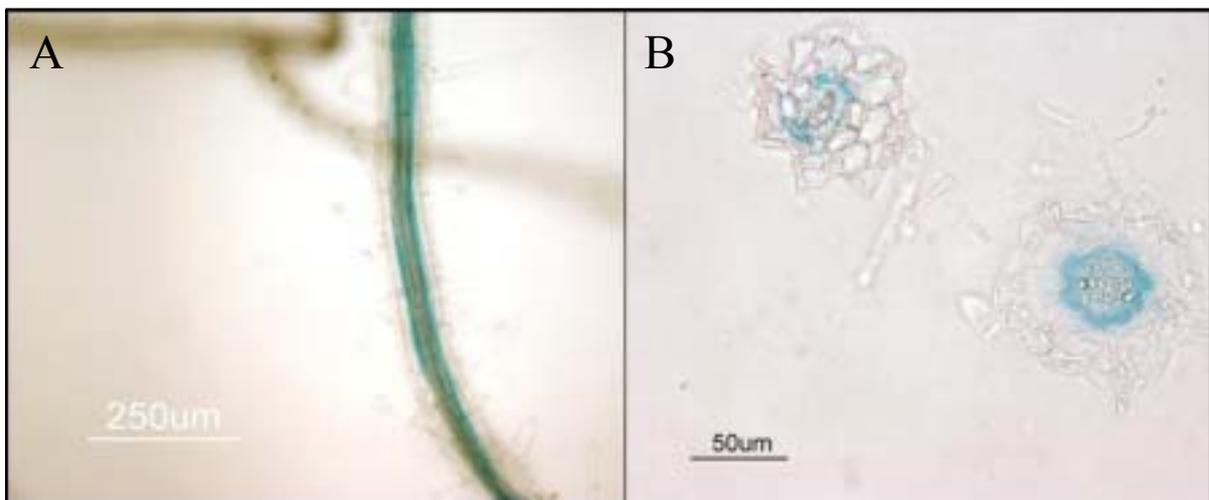


Abbildung 14: Gewebespezifische Expression von *SCR*.

Auf GUS- Aktivität getestete Wurzel eines 14 Tage alten *Prom_{SCR}-GUS*- Keimlings in der Aufsicht (A) und im Querschnitt (B).

Die Abbildungen zeigen, besonders im Querschnitt, eine Färbung der Endodermis sowie stellenweise des Zentralzylinders. Diese Muster zeigte sich bei acht unabhängigen primären Transformanten nach zwei Stunden Inkubation in GUS- Lösung. um= µm.

Um mehr über die Expression der *KCS*- Kandidatengene zu erfahren und somit Rückschlüsse

auf deren Funktion machen zu können, wurden die Wurzeln fünf Wochen alter *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen sowie die von zehn Tage alten Keimlingen in GUS- Lösung inkubiert. Sowohl in der Gesamtansicht, wie auch in den mikroskopisch untersuchten Querschnitten der *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen konnte keine GUS- Aktivität in sekundären Wurzelgeweben nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die Sudan- Färbung eines Querschnitts einer sekundären Wurzel in Abbildung 15E zeigt jedoch ein suberinisiertes Gewebe an. Allerdings konnte bei *KCS04* (A), *KCS11* (C) und *KCS17* (E) eine deutliche Blaufärbung in den Seitenwurzeln, also in Wurzeln im primären Zustand beobachtet werden. *KCS08* (B) und *KCS16* (D) zeigten auch eine Blaufärbung in der Seitenwurzeln jedoch deutlich schwächer. Das es sich bei den Wurzel in denen eine GUS- Aktivität gezeigt werden konnte um Primärwurzeln handelt, konnte durch Querschnitte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Bei *KCS21* (F) konnte weder in sekundären noch in primären Bereichen der Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen eine Färbung nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster konnte in acht unabhängigen Transformanten beobachtet werden.

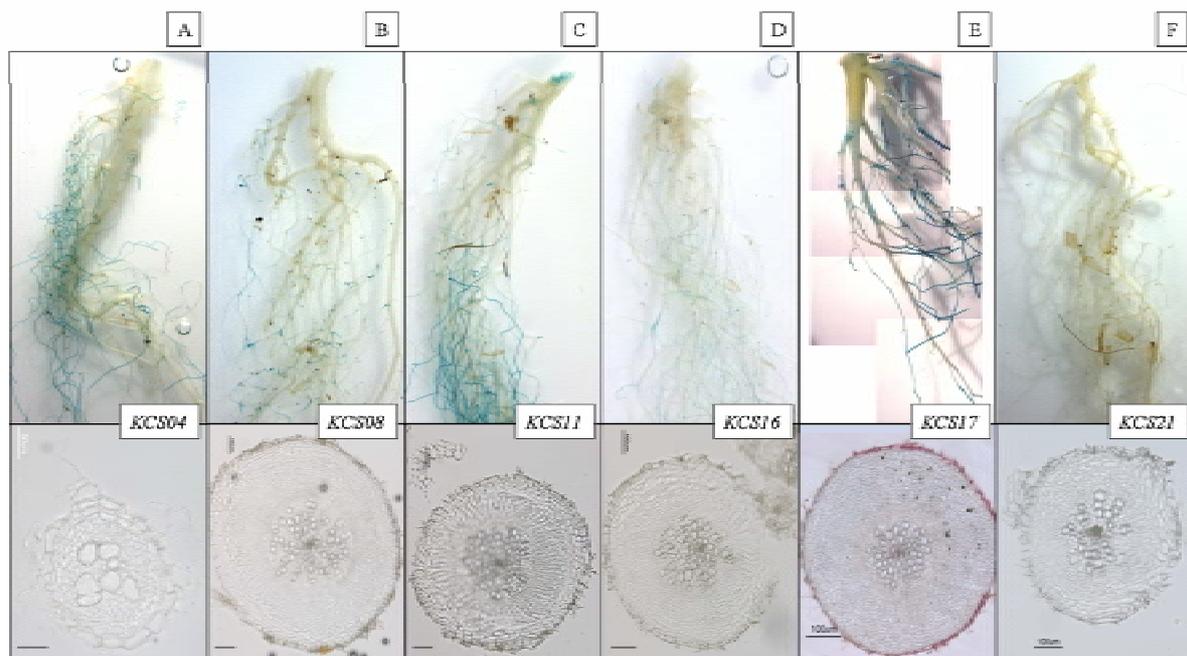


Abbildung 15: Aufsicht und Querschnitt von Wurzeln fünf Wochen alter *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen. Auf GUS- Aktivität getestete Wurzel von *Prom_{KCS}-GUS*- Fusionspflanzen. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengenen *KCS04* (A), *KCS08* (B), *KCS11* (C), *KCS16* (D), *KCS17* (E) und *KCS21* (F) in Wurzeln 5 Wochen alter Pflanzen. Die Wurzeln wurden zwei Stunden in GUS-Lösung inkubiert und in der Aufsicht fotografiert. Außerdem wurden von diesen Pflanzen Querschnitte von sekundären Wurzeln angefertigt. Die Photos von *KCS17* (E) wurden von René Höfer bereitgestellt, der Querschnitt wurde mit dem lipophilen Farbstoff Sudan 7B angefärbt. Balken entspricht 50 µm bei A, 100 µm bei B bis F.

Die Analyse der Expression der *KCS* in Wurzeln von zehn Tage alten Keimlingen (Abbildung 16) zeigte im Querschnitt für alle Kandidaten eine Blaufärbung des Zentralzylinders. Wie allerdings in der Aufsicht zu sehen ist, ist bei *KCS08* (B) und *KCS21* (F) nicht die gesamte

Primärwurzel gefärbt. Bei *KCS04* (A), *KCS11* (C), *KCS16* (D) und *KCS17* (E) hingegen weist die gesamte Primärwurzel einen blaugefärbten Zentralzylinder auf. Die Blaufärbung von *Prom_{KCS11}-GUS*- Pflanzen (C) war bei drei von acht untersuchten Pflanzen nicht auf die Stele beschränkt, sondern auch die Endodermis und Cortexzellen sind stellenweise blau gefärbt.

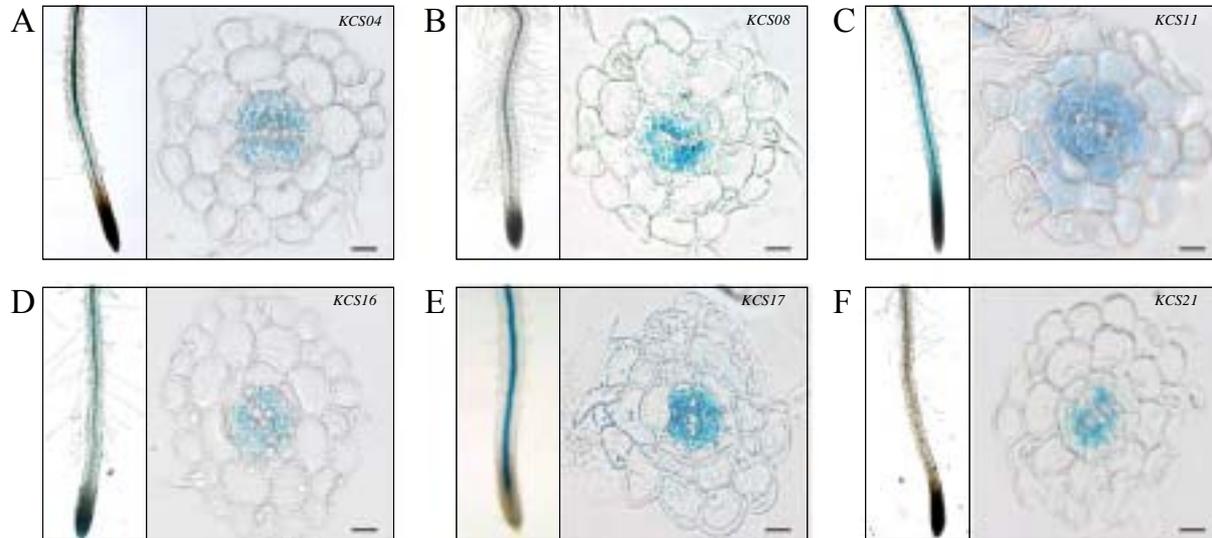


Abbildung 16: Aufsicht und Querschnitt von Wurzeln zehn Tage alter *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen.

Auf GUS- Aktivität getestete Wurzel von *Prom_{KCS}-GUS*- Fusionspflanzen. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengenen *KCS04* (A), *KCS08* (B), *KCS11* (C), *KCS16* (D), *KCS17* (E) und *KCS21* (F) in Wurzeln zehn Tage alter Pflanzen. Die linke Bildhälfte zeigt die Aufsicht der Wurzeln, rechts ein Querschnitt durch die primäre Wurzel. Dargestellt ist je ein Keimling von acht untersuchten unabhängigen Transformanten, die jeweils eine Blaufärbung in der Stele zeigten. Balken entspricht 25 µm; linke Bildhälfte ohne Balken.

3.2 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der Kandidatengene unter abiotischen Stressbedingungen

3.2.1 Expressionsänderung unter Salzstress

Da *Arabidopsis* bei Salzstress vermehrt Suberin bildet, sollte überprüft werden, ob sich die Expression der Kandidatengene unter Salzstress (50, 100, 200 mM NaCl) bzw. osmotischem Stress (5% PEG) ändert. Zur Überprüfung, ob diese Behandlung in den Pflanzen einen durch Salz verursachten Stress auslöst, wurde zunächst das Expressionslevel des stressinduzierten Markergens *RD29A* in den Proben bestimmt (Abbildung 17).

3.2.1.1 Ergebnisse der RT-PCR nach Salzstress

Die Expression des stressinduzierten Markergens *RD29A* in sieben Tage alten Keimlingen liegt bei t 0 unter der Nachweisgrenze (Abbildung 17). Nach Umsetzen auf 200 mM NaCl steigt die Expression von *RD29A*, bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert, zunächst nach vier Stunden auf 3235% und nach 24 Stunden weiter auf 61021%. Nach 31 Stunden sinkt das Levels wieder,

ist jedoch immer noch deutlich höher als die Kontrolle nach 24 Stunden. Schon das Umsetzen der Keimlinge auf eine andere MS-Agar-Platte führt zu einer messbaren Expression nach vier Stunden. Daher wurden alle Berechnungen auf den jeweiligen Kontrollwert (= 100%), also die Proben, die zur gleichen Zeit von den 0 mM NaCl MS-Platten genommen wurden, bezogen.

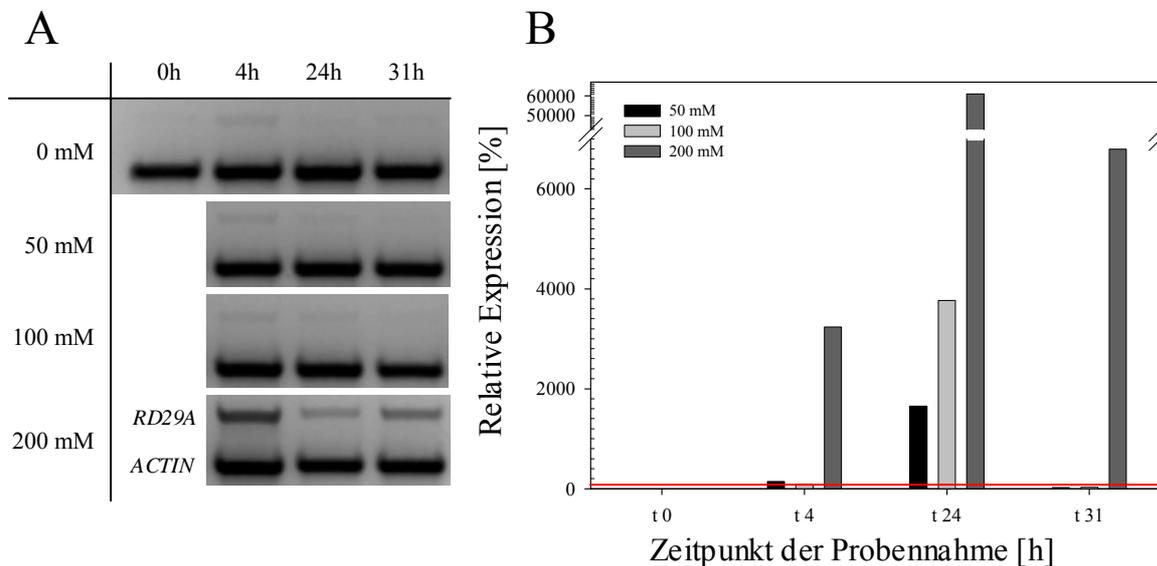


Abbildung 17: RT-PCR- Analyse der Expression von *RD29A* unter Salzstress.

Agarosegel der RT-PCR- Produkte für *RD29A* (A), durch Densitometrie ermittelten Werte (B).

Dargestellt ist die relative Expression des durch Trocken- und Salzstress induzierten Gens *RD29A*. Sieben Tage alte Keimlinge wurden auf MS-Platten mit 0 mM, 50 mM, 100 mM oder 200 mM NaCl umgesetzt. Die Expression wurde direkt vor dem Umsetzen (t 0) sowie vier (t 4), 24 (t 24) und 31 Stunden (t 31) danach bestimmt. Expression in Kontrolle zu gleicher Zeit (=100%) ist als roter Strich dargestellt.

Die RNA Proben, in denen das Expressionslevel von *RD29A* untersucht wurden, wurden auch für RT-PCRs verwendet, in denen die Expression der Kandidatengene untersucht werden sollte. Die Ergebnisse der RT-PCR- Analysen der Genexpression der Kandidatengene unter Salzstress ist in Abbildung 18 dargestellt. *KCS04*, *KCS08*, *KCS11* und *KCS16* wurden in den sieben Tage alten ungestressten Keimlingen exprimiert, die Expression von *KCS17* und *KCS21* liegt bei den gewählten Bedingungen unter der Nachweisgrenze. Die Expression von *KCS04* bleibt nach Umsetzung auf verschiedene Salzkonzentrationen nahezu gleich. Einzig das Umsetzen auf Platten mit 100 mM NaCl- Konzentration führte nach 31 Stunden zu einer Erhöhung der Expression auf knapp 197%. Die Expression von *KCS08* ist 24 Stunden nach Umsetzen auf 50 mM NaCl induziert (auf 233%). Das Umsetzen auf 100 mM NaCl- Platten führt auch zu einer erhöhten Expression. Nach vier Stunden erreicht die Expression ein Level von 161%, das nach 24 Stunden auf 152% absinkt. Nach 31 Stunden ist bei keiner der untersuchten NaCl- Konzentrationen ein erhöhtes Level festzustellen. *KCS11* wird nicht durch Salzstress induziert. Vier Stunden nach Umsetzen auf 100 mM und 24 Stunden nach Umsetzen auf 50 mM ist eine Repression (auf 69 bzw. 32%) des Gens zu beobachten. *KCS11* scheint durch alle gewählten

Salzkonzentrationen nach 31 Stunden reprimiert zu werden. Das Expressionslevel von *KCS16* erhöht sich durch 100 mM NaCl- Konzentration nach vier Stunden auf 685%. In den Keimlingen die längere Zeit (24- 31 Stunden) 100 mM NaCl ausgesetzt waren ist keine erhöhte Expression von *KCS16* feststellbar. Nach 31 Stunden führt sowohl eine NaCl- Konzentration von 50 mM (auf 416%), als auch eine von 200 mM (auf 1297%) zu einer Induktion von *KCS16*. Die Expression von *KCS17* erhöht sich durch alle gewählten NaCl- Konzentrationen nach vier Stunden. Mit steigender Salzkonzentration erhöht sich auch die Expression von *KCS17* (auf 565, 2447 bzw. 4715%). Nach 24 und 31 Stunden nähert sich die Expression wieder dem Wert der Kontrollpflanzen.

KCS21 wird durch 200 mM NaCl nach vier Stunden induziert (auf 263%). Nach 24 Stunden sinkt das Expressionslevel ab und nach 31 Stunden ist keine Expression mehr feststellbar. Durch Umsetzen auf 50 mM NaCl steigt die Expression von *KCS21* über 24 Stunden (108%) auf 133% nach 31 Stunden.

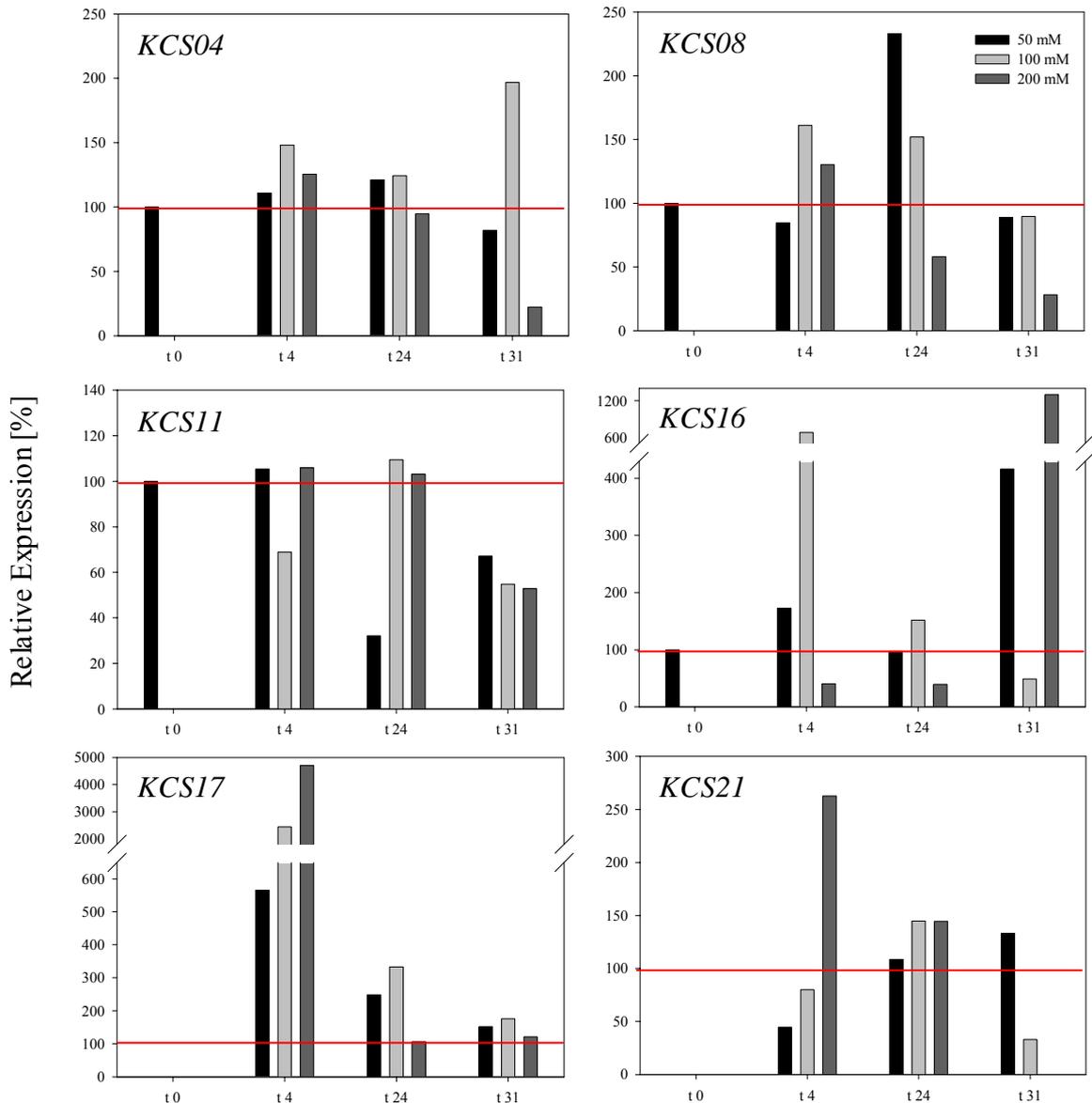


Abbildung 18: Expressionsänderung der Kandidatengene unter Salzstress.

Dargestellt ist die relative Expression des jeweiligen KCS-Gens. Keimlinge wurden auf MS-Platten mit 0 mM, 50 mM, 100 mM oder 200 mM NaCl umgesetzt. Die Expression wurde vor dem Umsetzen (t 0) sowie nach vier (t 4), 24 (t 24) und 31 Stunden (t 31) bestimmt. Hier gezeigt ist eines von zwei Experimenten, die das gleiche Ergebnis lieferten. Expression in Kontrolle zu gleicher Zeit (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

3.2.1.2 Microarraydaten- Analyse der Genexpression der Kandidatengene unter Salzstress

Parallel dazu wurde das Expressionslevel der Kandidaten- KCS nach Salzbehandlung aus den Microarraydaten der Genevestigatordatenbank extrahiert und ausgewertet. In Abbildung 19 ist dargestellt wie sich die Expression der jeweiligen Gene in den gestressten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen verändert. Es ist auch hier zu sehen, dass *RD29A* durch Salzbehandlung stark induziert wird. Im Vergleich zur Expression von *RD29A* in den

Kontrollpflanzen steigt die Expression auf 432%. Ebenso zeigen die Microarraydaten, dass die Gene *KCS17* und *KCS21* induziert werden. Ihr Expressionslevel steigt durch Salzbehandlung auf 205% bzw. 382% (*KCS21* bzw. *KCS17*) an. Bei den Genen *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* sowie bei *ACTIN* ist keine erhöhte Expression feststellbar.

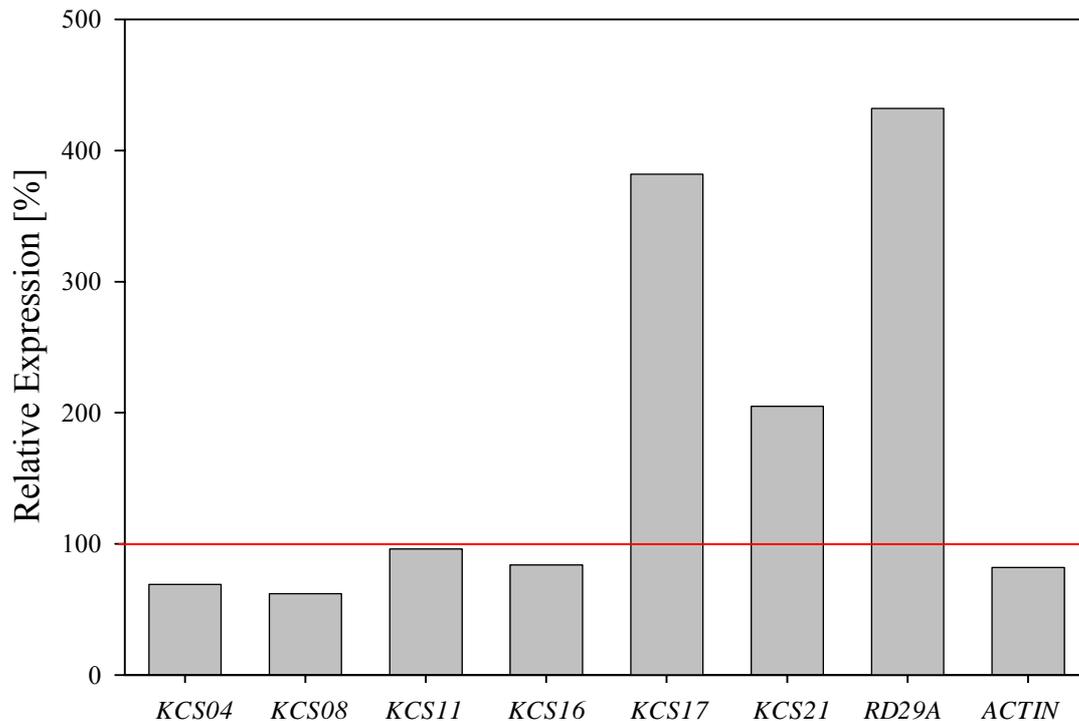


Abbildung 19: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter Salzstress laut Genevestigator. Dargestellt ist die Veränderung der Expression durch Salzstress (150 mM NaCl) des jeweiligen Gens im Vergleich zur Expression in Kontrolle. Die Expression in Kontrolle (=100%) ist als roter Strich dargestellt.

Detaillierte Daten zur Expression in *Arabidopsis* sind über AtGenExpress (www.arabidopsis.org/ino/expression/ATGenExpress.jsp) zugänglich. In Abbildung 20 sind die extrahiert und ausgewerteten Daten dargestellt.

KCS04 zeigt in unterirdischen Organen nach der Behandlung keine veränderte Expression, wohingegen in oberirdischen Organen eine leicht steigende Expression nach 12 bis 24 Stunden erkennbar ist. *KCS08* und *KCS16* hingegen zeigen oberirdisch eher eine verminderte Expression und unterirdisch eine leicht erhöhte Expression nach einer Stunde, die direkt wieder nach drei Stunden auf den Wert der Kontrolle abfällt. Für *KCS11* konnte ober- wie auch unterirdisch lediglich eine reduzierte Expression gezeigt werden. *KCS17* und *KCS21* zeigen beide eine stark erhöhte Expression in oberirdischen Organen. Die Expression von *KCS17* steigt nach drei Stunden an und erreicht nach sechs Stunden ihr Maximum von 3317%. Danach gleicht sich das Expressionslevel wieder dem in der Kontrolle an. Auch in unterirdischen Organen führt der Salzstress zu einer verstärkten Expression von *KCS17*. Es kann nach einer

Stunde eine erhöhte Expression festgestellt werden, die allerdings bald wieder absinkt und nach 12 bis 24 Stunden wieder ansteigt. Die erhöhte Expression von *KCS21* ist erst nach 24 Stunden feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt erreicht das Expressionslevel 794% der Kontrolle. Unterirdisch lässt sich für dieses Gen keine Expressionsänderung durch Salzstress feststellen.

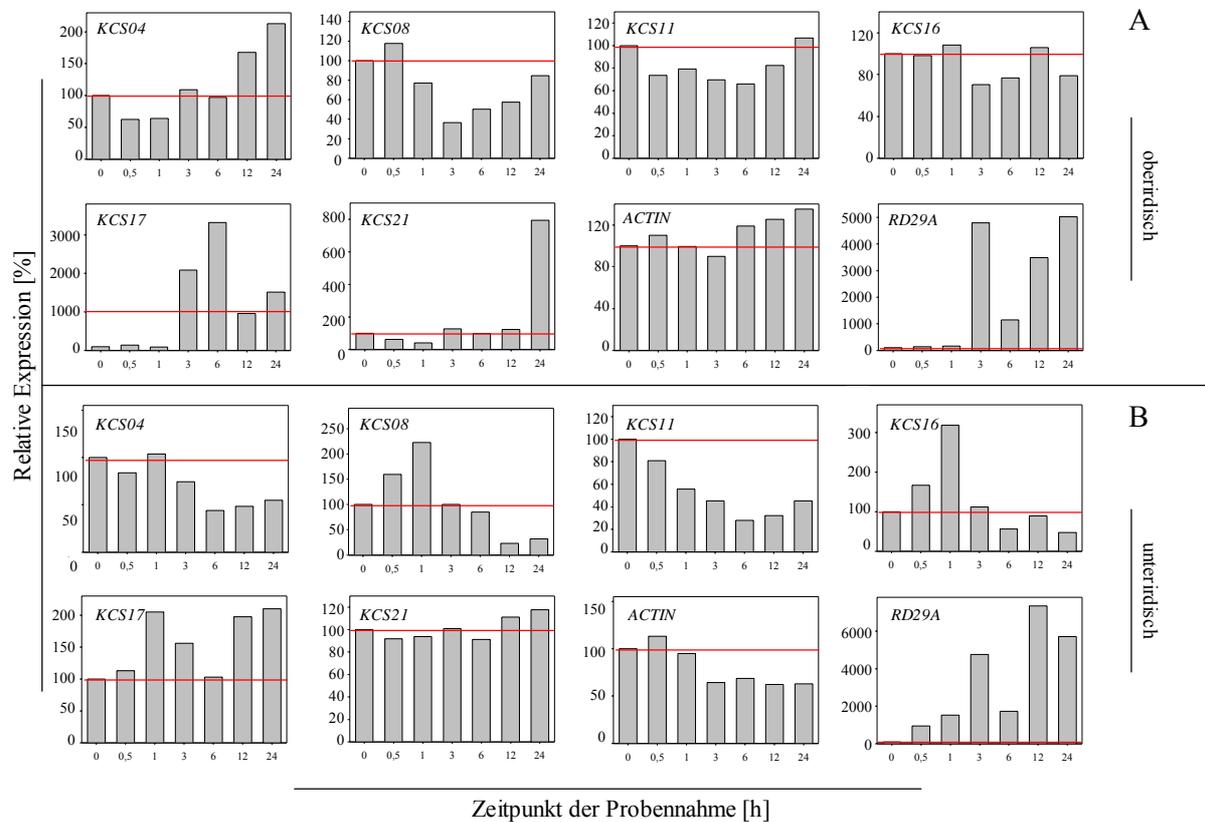


Abbildung 20: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter Salzstress laut AtGenExpress. Dargestellt ist die Veränderung der Expression des jeweiligen Gens durch Salzstress in oberirdischen (A) und unterirdischen Pflanzenteilen (B). Die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach NaCl-Behandlung (150 mM) wurde der jeweiligen Expression in den unbehandelten Kontrollpflanzen gegenübergestellt. Die Expression in der Kontrolle (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

3.2.2 Änderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress

Um zu prüfen welchen Einfluss osmotisch wirksame Substanzen auf die Expression der ausgewählten *KCS*- Gene haben, wurde die Expression der *KCS*- Gene nach osmotischem Stress bestimmt. Auch hier wurde das Expressionslevel des durch osmotischen Stress induzierten Markergens *RD29A* als Kontrolle bestimmt.

3.2.2.1 Ergebnisse der RT-PCR unter osmotischen Stress

Die Expression von *RD29A* in den Kontrollen (0% PEG) erreicht ca. 25% der Expression von *ACTIN* (Abbildung 21). In den mit PEG behandelten Proben steigt die Expression von *RD29A* stark an und erreicht ca. 90% der Expression von *ACTIN*. Die Expression von *RD29A* steigt somit durch osmotischen Stress stark an und erreicht 348% des Kontrollwerts (0% PEG).

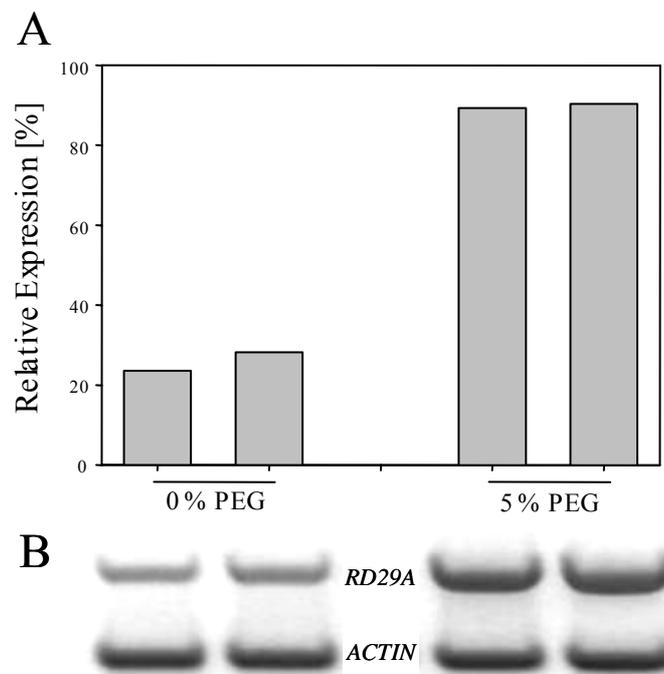


Abbildung 21: Expressionsänderung von *RD29A* unter osmotischem Stress.

Densitometrisch ermittelte Werte (A) des Agarosegel für *RD29A* (B).

Dargestellt ist die relative Expression des durch Trocken- und Salzstress induzierbaren Gens *RD29A*. Keimlinge wurden auf MS-Platten mit 0% bzw. 5% PEG angezogen. Die Expression wurde nach 14 Tagen bestimmt. Hier gezeigt ist das Ergebnis von zwei Experimenten. Expression von *ACTIN* = 100%.

In diesen Proben wurde auch die Expression von *KCS04* und *KCS17* untersucht (Abbildung 22). Vergleichbar zu den Ergebnissen des Salzstress zeigte sich ebenfalls, dass *KCS17* durch osmotischen Stress induzierbar ist. Das Expressionslevel von *KCS17* in den Kontrollpflanzen entspricht ca. 2% des Levels von *ACTIN*. Nach osmotischem Stress steigt das Expressionslevel von *KCS17* auf ca. 14% des Levels von *ACTIN* an. Bezogen auf die Expression in den Kontrollpflanzen erhöht sich die Expression von *KCS17* nach 5%iger PEG Behandlung auf ca.

479%. Bei *KCS04* ist eine leicht erhöhte Expression feststellbar. Die Expression in den Kontrollpflanzen beträgt ca. 19% der von *ACTIN*. In den behandelten Proben erreicht die Expression von *KCS04* ca. 27% der von *ACTIN*. Allerdings war im Mittel die Expression in den PEG-behandelten Proben nur ca. 46% höher als in den Kontrollen.

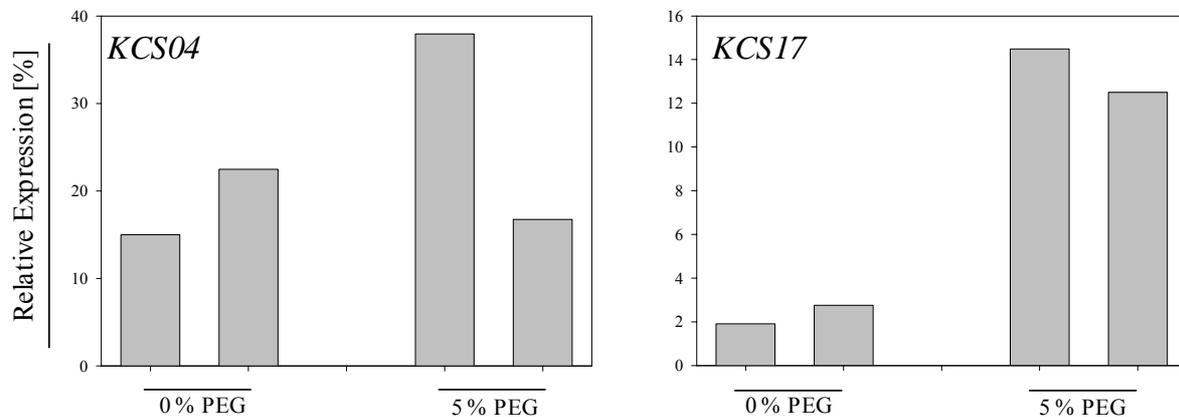


Abbildung 22: Expressionsänderung von *KCS04* und *KCS17* unter osmotischem Stress. Dargestellt ist die relative Expression der beiden Kandidatengene. Keimlinge wurden auf MS-Platten mit 0% bzw. 5% PEG angezogen. Die Expression wurde nach 14 Tagen bestimmt. Hier gezeigt ist das Ergebnis von zwei Experimenten. Expression von *ACTIN* = 100%.

3.2.2.2 Änderung der Expression unter osmotischen Stress - Microarraydaten

Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Analyse der Daten von Genevestigator. In diesen Versuchen wurden die Pflanzen nicht mit PEG, sondern mit dem osmotisch wirksamen Mannitol (300 mM) behandelt. Unter diesen Bedingungen zeigt sich für *KCS04*, dass keine Induktion durch osmotischen Stress nachgewiesen werden kann. Die Expression von *KCS17* stieg durch Behandlung mit osmotisch wirksamen Mannitol (300 mM) auf 445% an. Ebenso konnte eine Induktion von *KCS21* festgestellt werden, dessen Expressionslevel sich auf 322% erhöhte. Die Expression von *KCS08*, *KCS11* war nach der Behandlung unter dem Expressionslevel der Kontrolle. *KCS16* sowie *ACTIN* zeigten keine Expressionsänderung nach Mannitol Behandlung. Wie zu erwarten erhöhte sich das Expressionslevel von *RD29A* durch Mannitol sehr stark, bis auf 2577%.

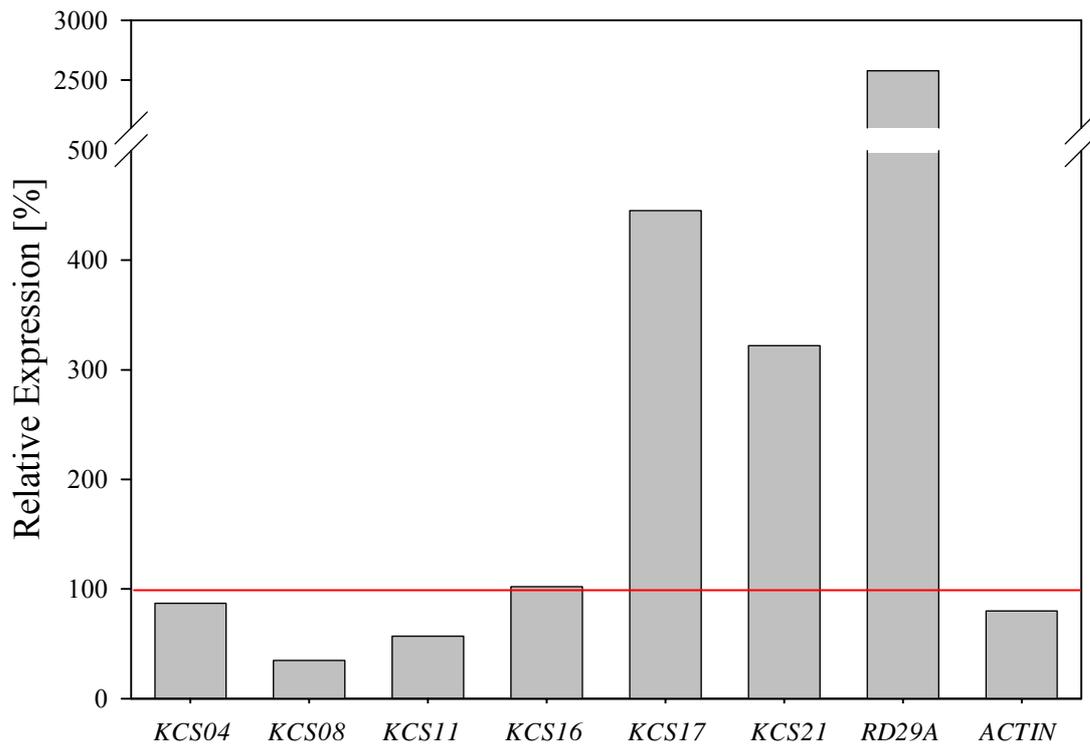


Abbildung 23: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress laut Genevestigator.

Dargestellt ist die Veränderung der Expression des jeweiligen KCS- Gens durch Mannitol (300 mM). Die Expression in der Kontrolle (=100%) ist als roter Strich dargestellt.

Die Auswertung der bei AtGenExpress verfügbaren Microarraydaten ermöglichte eine detaillierte Analyse der transkriptionellen Regulation der Kandidaten- KCS- Gene. Auch in diesen Versuche wurden Pflanzen mit dem osmotisch wirksamen Mannitol behandelt.

Vergleichbar zu der Expressionsänderung durch Salzstress (Abbildung 20) änderte sich auch das Expressionsmuster der KCS nach Mannitol- Behandlung. *KCS04* zeigt eine erhöhte Expression in oberirdischen Organen, die nach 12 Stunden einsetzt und nach 24 Stunden ihr Maximum erreicht (253%). Unterirdisch sinkt die Expression eine Stunde nach Behandlung unter den Wert der Kontrolle. Für *KCS08* und *KCS16* lässt sich oberirdisch ein Absinken der Expression nach einer Stunde feststellen, wohingegen unterirdisch für beide Gene eine erhöhte Expression nachweisbar ist. *KCS08* wird eine halbe Stunde nach Behandlung verstärkt exprimiert und erreicht nach einer Stunde das Expressionsmaximum von 193% des Kontrollwerts. Die Expression von *KCS16* ist erst nach einer Stunde erhöht, hält das Expressionslevel von ca. 285% des Kontrollwerts noch nach drei Stunden und sinkt nach sechs Stunden wieder ab. Für *KCS17* lässt sich deutlich eine Steigerung der Expression zeigen. Unterirdisch steigt die Expression schon nach einer Stunde an, wohingegen oberirdisch erst

nach drei Stunden ein erhöhtes Expressionslevel feststellbar ist. Unter- wie auch oberirdisch ist nach sechs Stunden das Expressionsmaximum von 386% bzw. 6111% des Kontrolllevels erreicht. Nach zwölf Stunden fällt das Level wieder ab. Für *KCS21* ist nur in oberirdischen Organen eine erhöhte Expression feststellbar. Nach zwölf Stunden steigt die Expression und erreicht nach 24 Stunden 1195% der Kontrolle.

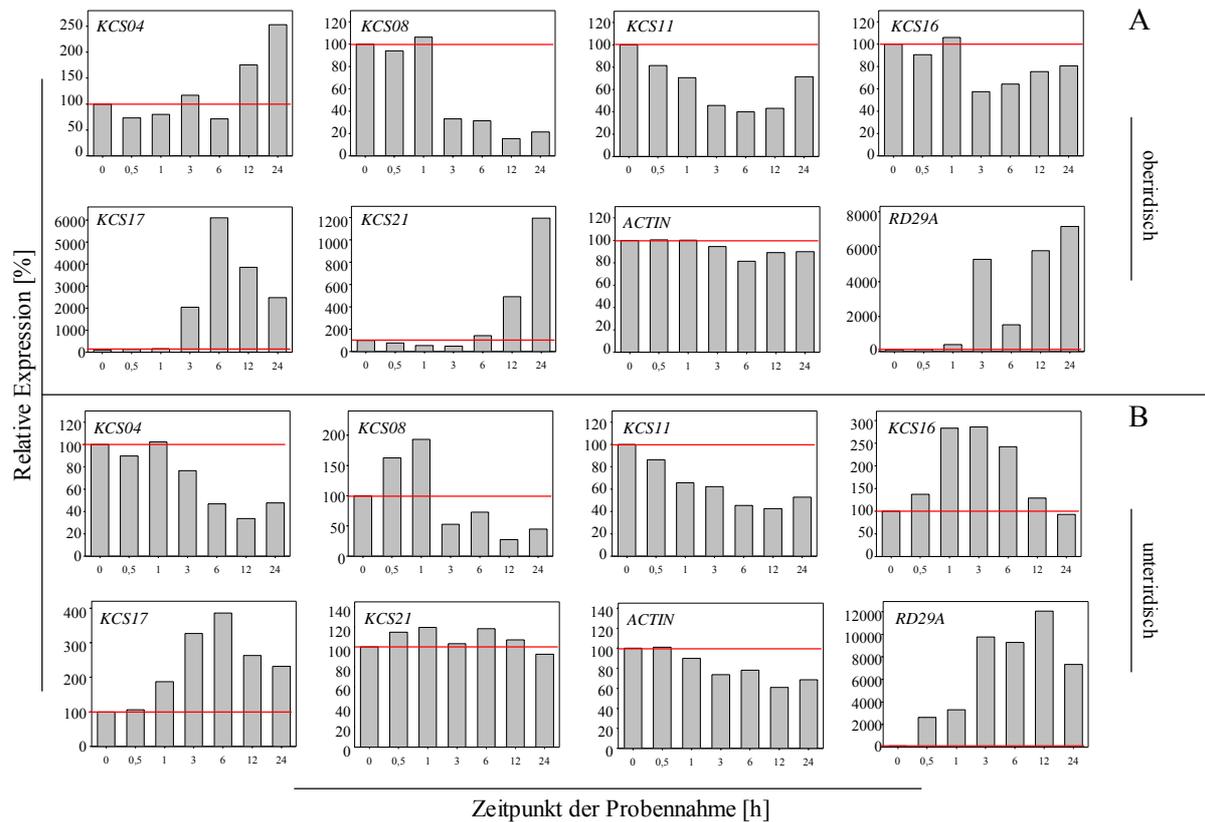


Abbildung 24: Veränderung der Expression der Kandidatengene unter osmotischem Stress nach AtGenExpress.

Dargestellt ist die Veränderung der Expression des jeweiligen Gens durch Salzstress in oberirdischen (A) und unterirdischen (B) Pflanzenteilen. Die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mannitol-Behandlung (300 mM) wurde der jeweiligen Expression in den unbehandelten Kontrollpflanzen gegenübergestellt. Die Expression in der Kontrolle (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

3.2.3 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der Kandidatengene nach Verwundung

Da bekannt ist, dass Pflanzen nach Verwundung ein aus suberinisierten Zellwänden bestehendes Wundperiderm bilden, sollte überprüft werden, ob auch *Arabidopsis* nach Verwundung mit Suberinisierung antwortet. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die Kandidatengene durch Verwundung induziert werden und dies eventuell als Hinweis auf eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese zählen könnte.

3.2.3.1 Histochemische Untersuchungen zur Induktion von Suberinisierung nach Verwundung

Es wurden *Arabidopsis*- Blätter an der Pflanze mit Nadeln verletzt und nach einem Tag sowie nach einer Woche Proben genommen. Außerdem wurden sofort nach dem Verwunden Blätter genommen und die Wundreaktion in Chloroform:Methanol (1:1) abgestoppt. Da sich Suberin aus einer aliphatischen und einer aromatischen Domänen zusammensetzt, konnte die Suberinisierung auf zwei unterschiedliche Arten beobachtet werden, durch Lichtmikroskopie nach histochemischer Färbung und durch Fluoreszenzmikroskopie.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Lichtmikroskopie denen der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber gestellt. Die Blätter wurden nach Inkubation in Chloroform:Methanol mit Sudan 7B angefärbt. Sudan 7B ist ein lipophiler Farbstoff der suberinisierte Zellwände rot anfärbt.

Bereits nach einem Tag (Abbildung 25B) ließ sich eine Veränderung an den Verwundungsstellen erkennen. Nach einer Woche (Abbildung 25C) konnte man deutlich, vor allem in der Vergrößerung (Abbildung 25D) erkennen, dass sich die Zellwände der Zellen der verwundeten Bereiche rot anfärben lassen.

Die Blätter, die sofort nach Verwundung in Chloroform:Methanol kamen, zeigten im Lichtmikroskop keine veränderten, anfärbbaren Zellwände und auch keine Autofluoreszenz im Bereich der Verwundung (Abbildung 25A und E). Doch bereits nach einem Tag ist die Autofluoreszenz rund um die Verwundung recht intensiv (Abbildung 25F). Auch nach einer Woche ist deutlich eine Autofluoreszenz an den verwundeten Stellen sichtbar (Abbildung 25G und H). Die Autofluoreszenz könnte einen Hinweis auf die aromatische Domäne des Suberins geben. Damit lässt sich aus den roten Zellwänden und der Autofluoreszenz schließen, dass *Arabidopsis* verletzte Stellen mit einem Wundperiderm abschließt.

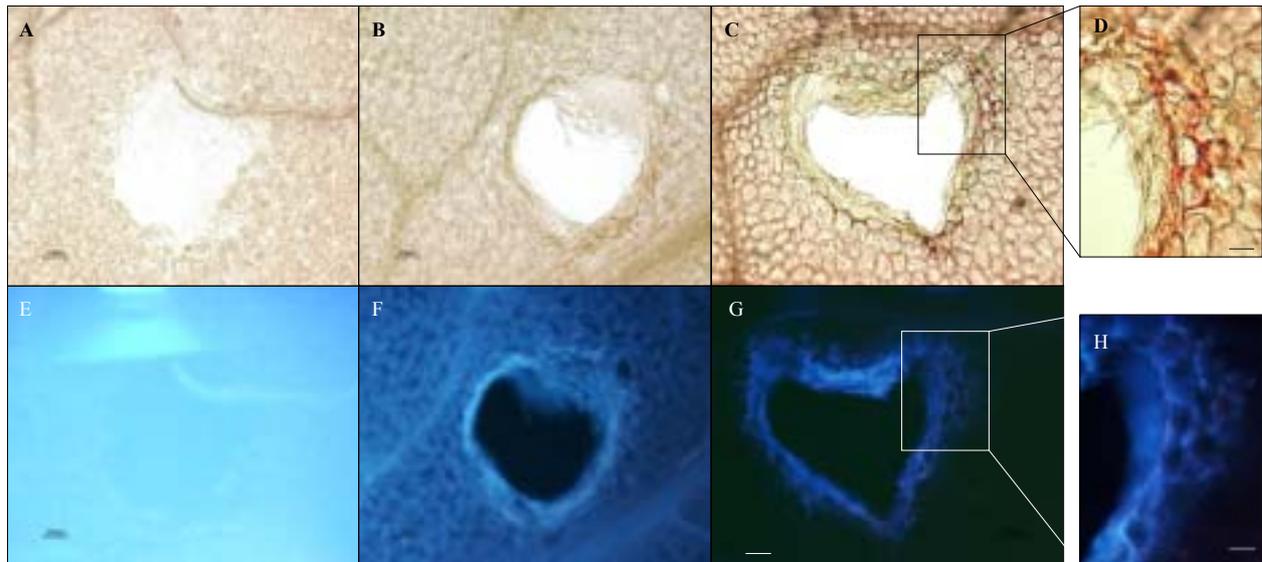


Abbildung 25: Bildung eines Wundperiderms an *Arabidopsis*- Blättern.

Blätter wurden mit Nadeln verwundet und die Verwundungsreaktion sofort (A, E), nach einem Tag (B, F) oder nach einer Woche (C, G) in Chloroform:Methanol abgestoppt. A-C zeigen verwundete Blätter nach Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Sudan 7B. E-G zeigen A-C bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop. D zeigt einen Ausschnitt aus C, H einen Ausschnitt aus G. Balken entspricht 100 µm bei A-C und E-G, 50 µm bei D und H.

3.2.3.2 Ergebnisse der RT-PCR- Analysen nach Verwundung

Um das Expressionslevel ausgewählter *KCS*- Gene nach Verwundung zu untersuchen, wurde aus verletzten Blättern RNA gewonnen. Als Kontrolle wurde zunächst in diesen Proben das Expressionslevel des wundinduzierten Gens *PAL* bestimmt.

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse einer RT-PCR- Analyse mit *PAL*- spezifischen Primern dargestellt. Das Agarosegel in Abbildung 26A zeigt, dass die Expression von *PAL* nach einer Stunde in verwundeten Blättern im Vergleich zur Expression in unverletzten Blättern (t 0) ansteigt. Außerdem wird deutlich, dass sie in den unverwundeten Kontrollblättern zum Zeitpunkt t 1 und t 4 niedriger als in den verwundeten Blättern ist. Die durch Densitometrie ermittelten Werte bestätigen diesen Eindruck. Die Expression von *PAL* steigt vier Stunden nach Verwundung in Relation zu t 0 auf 193% an. Um tageszeitliche Schwankungen auszuschließen, wurde die Expressionsrate in den verletzten Blättern relativ zur Expression in den unverletzten Kontrollen dargestellt (Abbildung 26B). Die Expression von *PAL* erhöht sich bezogen auf die Expression in der Kontrolle nach einer Stunde auf 256%, nach vier Stunden auf 302%. Nach 24 Stunden ist keine erhöhte Expression mehr feststellbar.

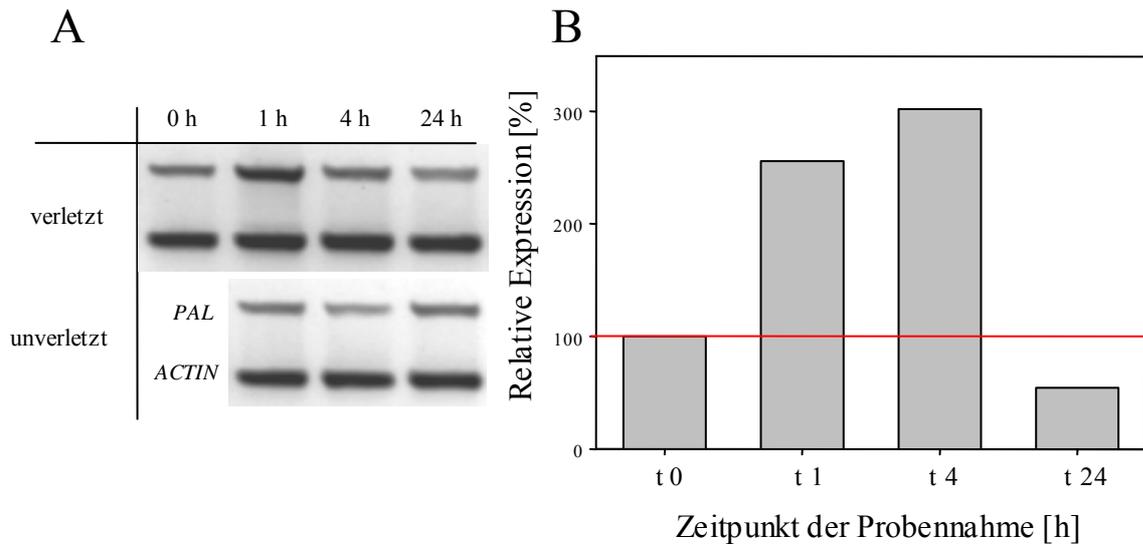


Abbildung 26: Expressionsänderung von *PAL* nach Verwundung.

Agarosegel für *PAL* (A), durch Densitometrie ermittelte Werte (B).

Dargestellt ist die relative Expression des durch Verwundung induzierbaren Gens *PAL*. Blätter wurden verletzt und Proben nach einer (t 1), vier (t 4) und 24 Stunden (t 24) geerntet. Als Kontrolle wurde vor dem Verletzen (t 0) sowie zu jedem Zeitpunkt neben dem verletzten auch ein unverletztes Blatt genommen. Die Expression in der unverletzten Kontrolle zu gleicher Zeit (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

Die RNA, mit der die Expression von *PAL* untersucht wurde, wurde auch für RT-PCRs genutzt in denen das Expressionslevel von *KCS04* und *KCS17* bestimmt werden sollte. Wie Abbildung 27 zeigt, steigt das Expressionslevel von *KCS04* durch Verwundung leicht an. Nach einer Stunde erreicht das Expressionslevel 138% des t 0- Wertes. Bezieht man die Expressionswerte auf die jeweiligen Kontrollen zu gleicher Zeit, so erhöht sich die Expression nach einer Stunde auf 176% und fällt nach vier Stunden auf 161%.

KCS17 hingegen erreicht nach einer Stunde 356% des Anfangswerts t 0. Bezieht man das Expressionslevel auf die unverletzte Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (= 100%), so wird deutlich, dass es nach einer Stunde auf 216% und nach vier Stunden auf 349% ansteigt (Abbildung 27). Nach 24 Stunden gleicht sich das Expressionslevel von *KCS17* wieder dem Level der Kontrolle an.

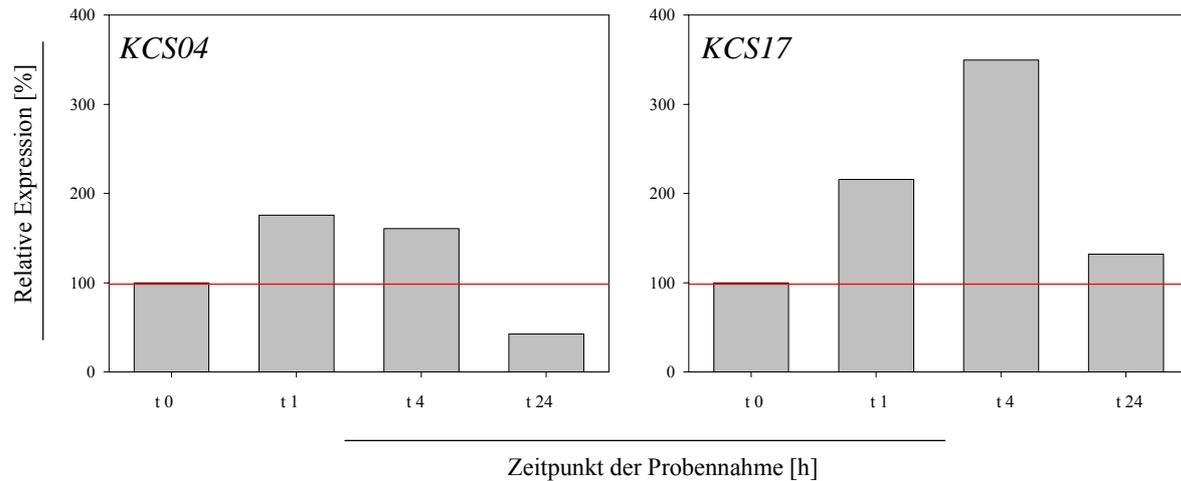


Abbildung 27: Expressionsänderung von *KCS04* und *KCS17* nach Verwundung. Dargestellt ist die relative Expression der beiden Kandidatengene. Blätter wurden verletzt und Proben nach einer (t 1), vier (t 4) und 24 Stunden (t 24) geerntet. Als Kontrolle wurde vor dem Verletzen (t 0) sowie zu jedem Zeitpunkt neben dem verwundeten auch ein unverwundetes Blatt genommen. Die Expression in der unverletzter Kontrolle zu gleicher Zeit (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

3.2.3.3 Microarraydatenanalyse der Genexpression der Kandidatengene nach Verwundung

In Abbildung 28 ist zu sehen, dass die Expression von *KCS17* nach Verwundung ansteigt (auf 153%), wohingegen die von *KCS04* abnimmt. Für *KCS08*, *KCS16*, und *KCS21* ist keine Steigerung der Expression nach Verwundung feststellbar. Die Expression von *KCS11* wird durch Verwundung erhöht. Sie erreicht 123% der Expression in der Kontrolle.

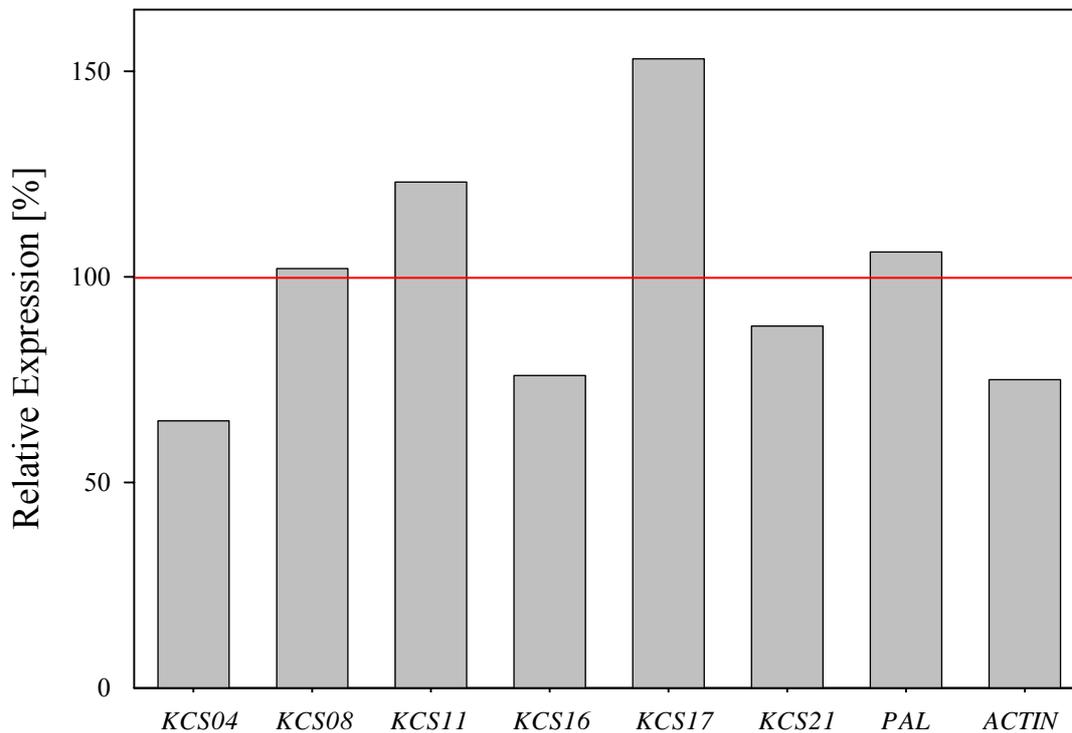


Abbildung 28: Veränderung der Expression der Kandidatengene nach Verwundung nach Genevestigator. Dargestellt ist die Veränderung der Expression durch Verwundung des jeweiligen Gens. Die Expression in der unverletzten Kontrolle (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

Die verfügbaren Daten von AtGenExpress wurden ebenso analysiert und graphisch dargestellt (Abbildung 29).

Für *KCS04* kann in den oberirdischen Pflanzenteilen eine Erhöhung der Expression auf 150% nach 0,25 Stunden festgestellt werden. Zu den anderen Zeitpunkten, wie auch unterirdisch schwankt das Expressionslevel um das in der Kontrolle. Für *KCS08* und *KCS16* kann in den unterirdischen Pflanzenteilen eine Veränderung der Expression auf 168% bzw. 203% lediglich nach einer Stunde gezeigt werden. Die Expression von *KCS11* zeigt hier durch Verwundung keine veränderte Expression. Für *KCS21* kann eine leicht erhöhte Expression (143%) nach einer Stunde in unterirdischen Organen gezeigt werden.

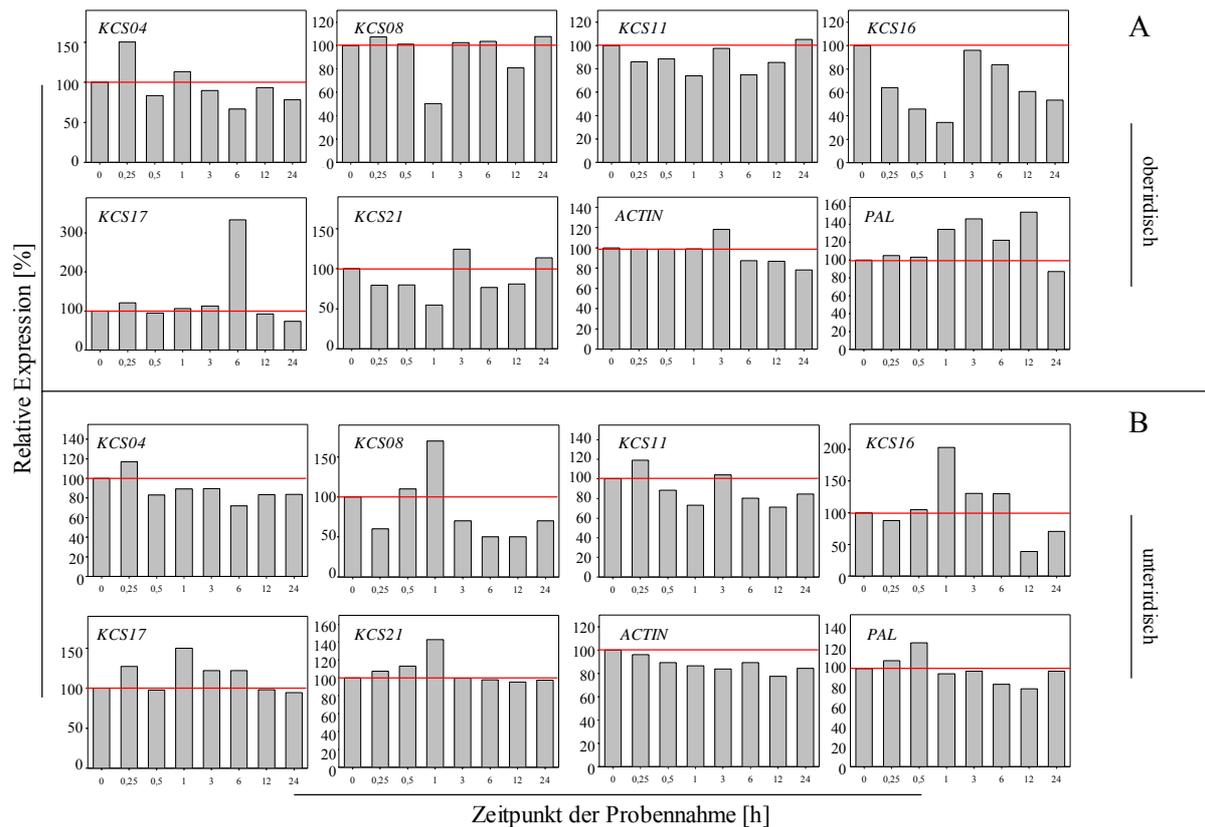


Abbildung 29: Veränderung der Expression der Kandidatengene nach Verwundung laut AtGenExpress. Dargestellt ist die Veränderung der Expression des jeweiligen Gens in oberirdischen (A) und unterirdischen (B) Pflanzenteilen. Die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung wurde der jeweiligen Expression in den unbehandelten Kontrollpflanzen gegenübergestellt. Die Expression in der Kontrolle (= 100%) ist als roter Strich dargestellt.

3.2.3.4 Ergebnisse der Verwundung der *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen

Zusätzlich zu den RT-PCRs und Microarray- Analysen, wurden auch die *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen bezüglich der Induzierbarkeit von *KCS*- Genen untersucht. Hierzu wurden Blätter dieser Pflanzen verwundet und nach zwei Stunden für eine Stunde in GUS-Lösung inkubiert.

In Abbildung 30 ist zu sehen, dass sich bei den Blättern transgener Promotor-*GUS*- Pflanzen der Gene *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* rund um die Verwundung eine Blaufärbung zeigte. Stark gefärbt sind auch die Stellen, an denen die Blätter von den Pflanzen abgetrennt wurden. Parallel wurden auch unverletzte Blätter in GUS-Lösung inkubiert, was lediglich zu einer Färbung der durch Abtrennung verletzten Stellen führte (Daten nicht gezeigt).

Die Wundstellen bei *KCS04*, *KCS08* und *KCS21* blieben völlig farblos. Wiederholungen des Versuchs mit verschiedenen Färb- und Verwundungszeiten führten zu den gleichen Ergebnissen.

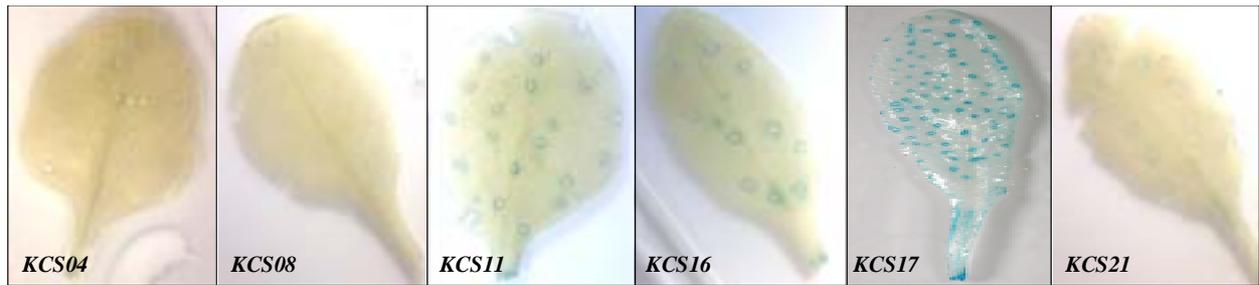


Abbildung 30: Verwundete Blätter von *Prom_{KCS}-GUS*- Pflanzen.

Blätter von *Prom_{KCS}-GUS*- Fusionspflanzen wurden mit Nadeln verletzt. Zwei Stunden nach der Verletzung wurden die Blätter von der Pflanze entfernt und für eine Stunde in GUS-Lösung inkubiert.

3.3 Gaschromatographischen Analysen

3.3.1 Nachweis des transkriptionellen Knockouts sowie der Überexpression von *KCS04*

KCS04 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Da die Charakterisierung einer Mutante zeigte, dass ein Insert in diesem Gen einen Einfluss auf die Suberinbiosynthese hat, wurden neben einem weiteren transkriptionellen Knockout auch Überexpressionslinien untersucht. Dazu wurde vor die kodierende Sequenz des Gens *KCS04* der 2X 35S Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV), ein starker konstitutiver Promotor, mittels Gateway Technologie kloniert. Mit diesem Konstrukt wurden dann sowohl Wildtyp- Pflanzen (35S::*KCS04*) als auch *KCS04* Knockout- Pflanzen (35S::*KCS04-kcs04*) transformiert.

Eine schematische Darstellung des Lokus von *KCS04* in Wildtyp, Knockout *kcs04* und den Überexpressionskonstrukten ist in Abbildung 31 zu sehen.

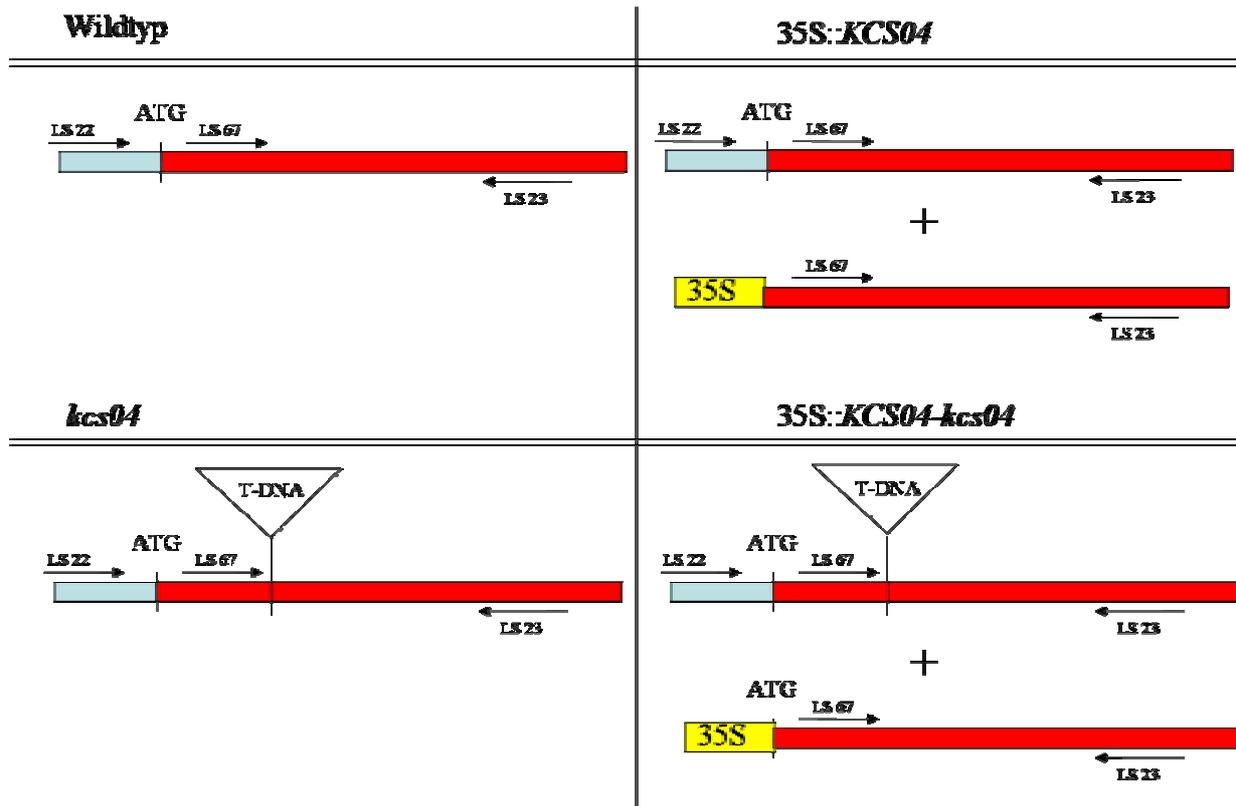


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Gen- Locus *KCS04*.

Dargestellt ist der *KCS04*- Locus in Wildtyp, der Knockout Mutante (*kcs04*) und zwei Überexpressionslinien. Unter Kontrolle des 2X 35S-Promotors (gelber Kasten) wurde die kodierende Sequenz von *KCS04* in den Wildtyp (35S::*KCS04*) und in die Knockout Mutante (35S::*KCS04-kcs04*) eingebracht. Gekennzeichnet ist der Anfang der kodierenden Sequenz (ATG), die Lage der verwendeten Primer (LS22, LS23 und LS67) und der T-DNA Insertion.

Mittels RT-PCR sollte gezeigt werden, dass das Einbringen des Überexpressionskonstrukts auch zu einer Anhäufung des *KCS04* Transkripts führt.

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR- Analysen der Expression von *KCS04* sind in Abbildung 32 zu sehen. Die erhaltenen Expressionswerte wurden auf *ACTIN* normiert. Mit beiden Primerkombinationen erreicht das Level der Expression von *KCS04* in den untersuchten Wildtyp- Pflanzen zwischen ein bis vier Prozent des *ACTIN* Levels. Mit der Primerkombination LS67/ LS23 (siehe Abbildung 31 und Anhang 8.4) lässt sich ein Teil der kodierenden Sequenz amplifizieren. Es ist zu erkennen, dass sich in den Pflanzen die das 35S::*KCS04*- Konstrukt tragen verglichen zum Wildtyp mehr Transkript anhäuft. Das Expressionslevel steigt im *kcs04*- Hintergrund auf 16 bis 174%. Im Wildtyphintergrund (35S::*KCS04*) erreicht die Expression ein Level zwischen 56 bis 209%. Somit lässt sich eine Erhöhung der Expression von *KCS04* auf 1021 bis 11050% im *kcs04*- Hintergrund (35S::*KCS04-kcs04*) feststellen. Im Wildtyphintergrund (35S::*KCS04*) erreicht die Expression relativ zum Level im Wildtyp zwischen 3550 bis 13232%.

Die Ergebnisse der RT-PCR mit dem Primerpaar LS22/ LS23 sind ebenfalls in Abbildung 32

dargestellt. Da der Primer LS22 (siehe Abbildung 31 und Anhang 8.4) nicht in der kodierenden Sequenz, sondern in der untranslatierten Region (UTR) vor dem Startkodon bindet, ist kein Produkt für die Knockout- Pflanzen, die mit 35S::*KCS04* transformiert wurden, zu erwarten. Hiermit lässt sich zum einen erneut bestätigen, dass bei *kcs04* tatsächlich ein transkriptioneller Knockout vorliegt. Zum anderen konnte so bestätigt werden, dass das hohe Transkriptlevel, das durch LS67/ LS23 erhalten wurde, wirklich auf das 35S::*KCS04* Konstrukt zurückzuführen ist. Das Expressionslevel, das man mit der Kombination LS22/ LS23 erhält entspricht demnach dem des Wildtyps und erreicht zwischen 0,5 und 4% des *ACTIN* Levels.

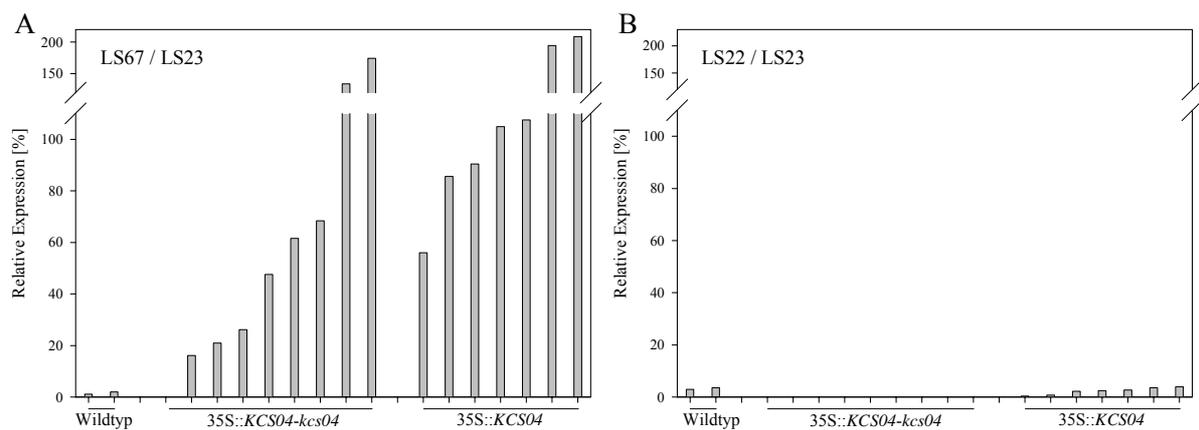


Abbildung 32: Expression von *KCS04* in Blättern von Wildtyp- und Überexpressionslinien.

Ergebnisse der RT-PCR mit dem Primerpaar LS67/ LS23, welche beide an der kodierenden Sequenz binden (A). Ergebnisse einer RT-PCR mit dem Primerpaar LS22/ LS23, wobei LS22 vor dem Startkodon bindet (B). Dargestellt ist die densitometrisch ermittelte Signalstärke im Wildtyp, in der Überexpressionsmutante im Knockout (35S::*KCS04-kcs04*) – und Wildtyphintergrund (35S::*KCS04*). Expression von *ACTIN* = 100%.

Für analytische Untersuchungen wurden von der 35S::*KCS04-kcs04*- Linie, die in Abbildung 32 die höchste Expression zeigte, homozygote Pflanzen isoliert. Außerdem wurde *kcs04-2*, eine weitere T-DNA Insertionslinie, hinzugezogen. In den ausgewählten Pflanzen wurde erneut das Expressionslevel bestimmt und auf *ACTIN* normiert.

In Abbildung 33A zeigt sich, dass das Expressionslevel von *KCS04* in den hier untersuchten Pflanzen ca. 50% des *ACTIN* Levels erreicht. In 35S::*KCS04-kcs04* erreicht es ca. 200%. Verglichen zur Expression in Wildtyp- Pflanzen erhöht sich die Expression von *KCS04* in den Überexpressionspflanzen (35S::*KCS04-kcs04*) im Schnitt auf ca. 330%. In der Knockoutlinie *kcs04* konnte wie erwartet kein Transkript nachgewiesen werden.

In Abbildung 33B und D sind die Ergebnisse der zweiten Knockoutlinie *kcs04-2* dargestellt. In Wildtyp konnte ein mit in Abbildung 33A vergleichbares Transkriptlevel (ca. 50% der Expression von *ACTIN*) erreicht werden. Erwartungsgemäß konnte in *kcs04-2* lediglich die *ACTIN*- spezifische Bande erzielt werden.

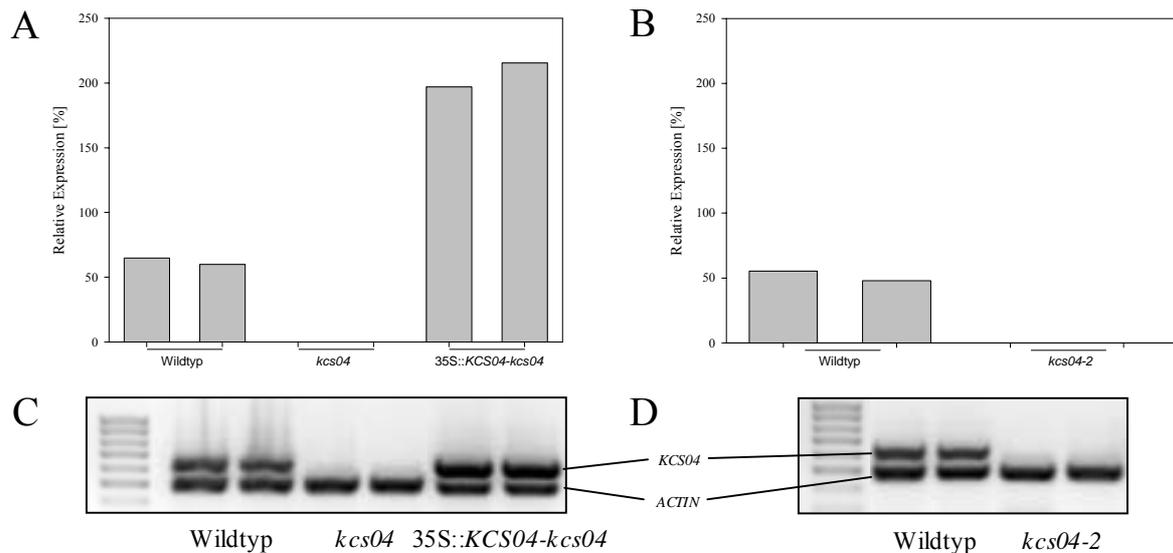


Abbildung 33: RT-PCR- Analysen zur Bestimmung des Expressionslevels von *KCS04* in Blüten von Wildtyp-, Knockout- und Überexpressionslinien.

Ergebnis der densitometrischen Bestimmung der Expression von *KCS04* in Wildtyp, Knockout *kcs04* und Überexpressionsmutante 35S::*KCS04-kcs04* (A) und korrespondierendes Agarosegel (C).

Ergebnis der densitometrischen Bestimmung der Expression in Wildtyp und der zweiten Knockout- Linie *kcs04-2* (D) und korrespondierendes Agarosegel (D).

Untere Bande (480 bp) entspricht dem *ACTIN*- Fragment, die obere Bande (670 bp) dem *KCS04*- Fragment; Expression von *ACTIN* = 100%.

3.3.2 Nachweis des transkriptionellen Knockouts für die Kandidatengene

Für die weiteren Kandidatengene wurden über NASC T-DNA-Insertionsmutanten bestellt. Von diesen Samen wurden Pflanzen isoliert, die bezüglich der T-DNA-Insertion homozygot sind. Ob die integrierte T-DNA tatsächlich auch zu einem transkriptionellen Knockout führt, sollte in einer RT-PCR gezeigt werden.

In Abbildung 34 sind schematisch die Loci der Kandidatengene dargestellt, zusätzlich die in den RT-PCRs verwendeten Primer (siehe Anhang 8.4) sowie die Position der T-DNA markiert.

Die Insertion sollte zu einem Verlust des vollständigen Transkripts führen, daher konnten auch Primerpaare gewählt werden, die nicht die Insertionsstelle umschließen.

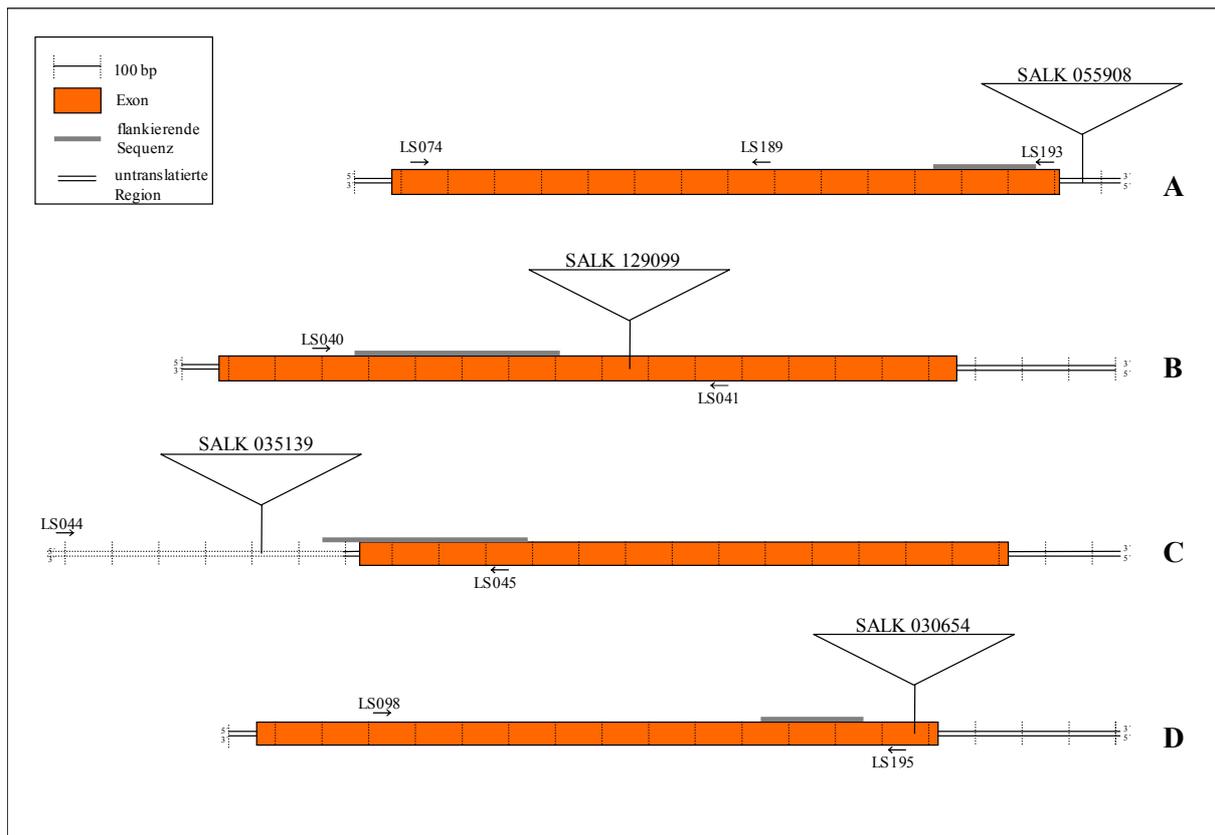


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Gen- Loci At2G15090/*KCS08* (A), At2G26640/*KCS11* (B), At4G34250/*KCS16* (C) und At5g04530/*KCS21* (D).

Markiert ist die insertflankierende Sequenz (grau), die putative Position der T-DNA Insertion (Dreieck) und die Positionen der genutzten genspezifischen Primer (Pfeile).

Abbildung 35 zeigt die Agarosegele in denen das RT-PCR Produkt, zum Nachweis des Knockouts, aufgetrennt wurde. Zusätzlich zu den jeweils genspezifischen Primern wurde in den RT-PCR-Ansatz auch Primer zugegeben, die einen Teil des konstitutiv exprimierten Gens *ACTIN* amplifizieren. Somit erhält man bei Einsatz von Wildtyp RNA neben der genspezifischen auch eine Bande welche das *ACTIN*- Fragment (480 bp) darstellt. Unter Verwendung von RNA aus den Knockout- Pflanzen sollte es nicht möglich sein das jeweilige *KCS*- Fragment sondern nur das *ACTIN*- Fragment amplifizieren zu können. Es konnte gezeigt werden, dass es für alle Gene mit den jeweils ausgesuchten Primern möglich war das spezifische Fragment in Wildtyp- cDNA zu amplifizieren, welches in den putativen Knockout- Pflanzen nicht auftritt. Da aufgrund der vorhandenen *ACTIN*- Bande auszuschließen ist, dass ein methodischer Fehler vorliegt, konnte für alle Kandidatengene ein transkriptioneller Knockout nachgewiesen werden.

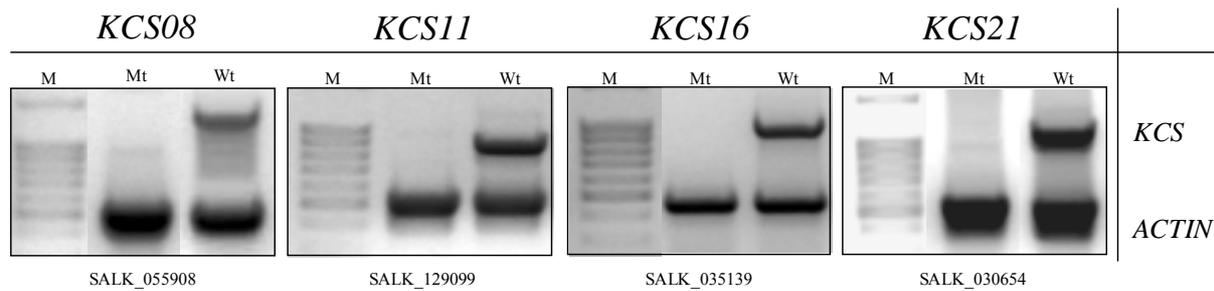


Abbildung 35: Nachweis des transkriptionellen Knockouts der Kandidatengene.

Dargestellt sind die Ergebnisse einer RT-PCR mit je *KCS*- und *ACTIN*- spezifischen Primern. Untere Bande (480 bp) entspricht dem *ACTIN*- Fragment, die obere Bande dem *KCS*- Fragment. Größenmarker (M), putativer Knockout (Mt), Wildtyp (Wt).

3.3.3 Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen

3.3.3.1 Analyse von Suberin

Um herauszufinden, ob eines der Kandidatengene an der Suberinbiosynthese beteiligt ist, wurde das Suberin der Wurzeln untersucht. Die Qualität und Quantität des Suberins der jeweiligen Knockout- Pflanzen wurde mit der des Wildtyps verglichen. Zum einen wurde das Suberin fünf Wochen alter Pflanzen zum anderen das Suberin zehn Tage alter Keimlingen untersucht.

3.3.3.1.1 Analyse des Suberins der Wurzeln fünf Wochen alter *Arabidopsis*- Pflanzen

Durch die Analyse des Wurzelsuberins konnten 23 dem Suberin zugeordnete Stoffe nachgewiesen werden. Eine Auflistung der einzelnen Monomere ist im Anhang sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt (siehe Anhang 8.10.1). Es konnten Monocarbonsäuren (in Abbildungen als Säuren abgekürzt) mit Kettenlängen von C₁₆ bis C₂₄, Alkohole mit Kettenlängen von C₁₈ bis C₂₄, ω-Hydroxysäuren (in Abbildungen als ω-OH Säuren abgekürzt) mit Kettenlängen von C₁₆ bis C₂₄, α,ω-Dicarbonsäuren (in Abbildungen als α,ω-Disäuren abgekürzt) mit Kettenlängen von C₁₆ bis C₂₄ und die 2-Hydroxytetracosansäure (in Abbildungen als 2-OH-Säure abgekürzt) gefunden werden. Außerdem wurde die einfach sowie die zweifach ungesättigte Form der ω-Hydroxyoctadecansäure gefunden. Auch die α,ω-Dicarbonsäure mit der Kettenlänge C₁₈ konnte in einfach ungesättigter Form nachgewiesen werden. Als Hauptbestandteil mit ca. 27% des Gesamtsuberins konnte die ω-Hydroxyoctadiensäure gefolgt von der Octadecendicarbonsäure (knapp 12%) identifiziert werden. Mit etwa 54% war die Stoffklasse der ω-Hydroxycarbonsäuren die am häufigsten vorkommende Gruppe. Pro Milligramm extrahiertem, unverdaulichem Zellwandmaterial konnten im Wildtyp 28,8 µg (± 3,0 µg/mg) Gesamtsuberin nachgewiesen werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Knockout von *KCS04* zu einer Verminderung des Gesamtsuberin um ca. 20% führt (Briesen 2004). Unter der Annahme *KCS04* spiele eine zentrale Rolle in der Suberinbiosynthese, wurde die Analyse von *kcs04* wiederholt und zusätzlich Wurzeln von Pflanzen analysiert, die *KCS04* überexprimieren (35S::*KCS04-kcs04*). Es konnte nicht bestätigt werden, dass durch eine Insertion in *KCS04* weniger Suberin gebildet wird (Abbildung 36). Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen der zweiten Knockout Linie *kcs04-2* (Daten nicht gezeigt). Allerdings führte die Überexpression von *KCS04* zu einer signifikanten (Stern) Anhäufung fast aller Suberinmonomere (Abbildung 36A). Lediglich die Hexadecansäure und die ω -Hydroxyhexacosansäure akkumulierten nicht in 35S::*KCS04-kcs04*. Besonders ausgeprägt ist die Anreicherung bei den α,ω -Disäuren (Abbildung 36B). Verglichen zum Wildtyp hat die Überexpressionsmutante 134% mehr dieser Substanzgruppe. Auch die Monocarbonsäuren (+ 96%), Alkohole (+ 130%), ω -Hydroxycarbonsäuren (+ 104%) sowie die 2-Hydroxycarbonsäure (+ 42%) sind in der Überexpressionsmutante verstärkt vertreten. Wie Abbildung 36C zeigt, sind Substanzen aller Kettenlängen betroffen. Am geringsten akkumulieren Substanzen mit Kettenlänge C₂₆ (+ 15%), am deutlichsten ist der Effekt bei Substanzen mit Kettenlänge C₂₂ (+ 134%) zusehen. Betrachtet man das Gesamtsuberin so lässt sich feststellen, dass 35S::*KCS04-kcs04* 211% und *kcs04* 94% des Gesamtsuberin des Wildtyps hat.

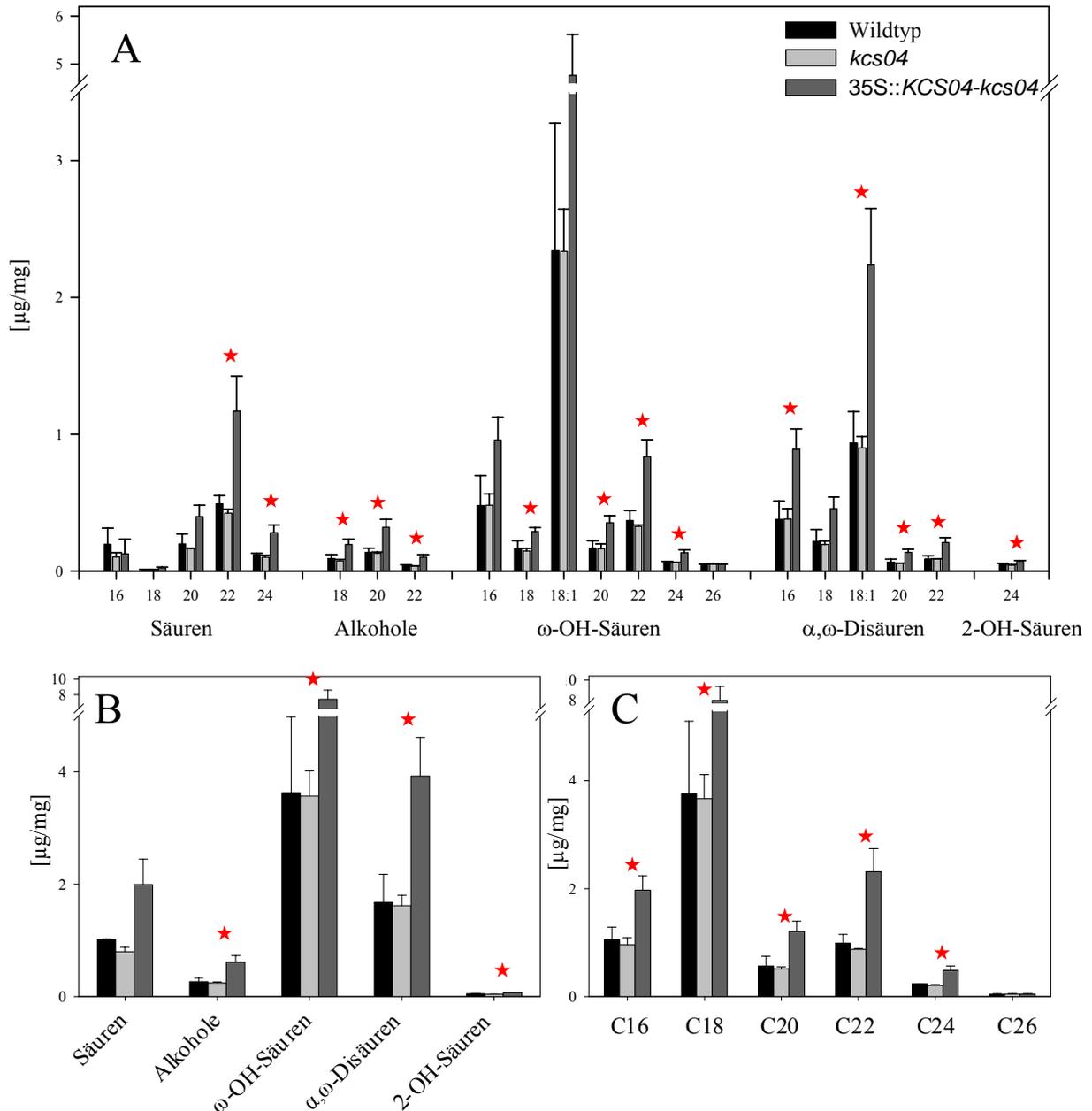


Abbildung 36: Zusammensetzung des Wurzeluberins fünf Wochen alter Pflanzen in Wildtyp und *KCS04* transgenen Pflanzen.

Die Wurzeln wurden mittels BF3/MeOH umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Zusammensetzung des Suberins aus den verschiedenen Monomeren (A) bzw. Stoffklassen (B) und Kettenlängen (C) der T-DNA Insertionsmutante *kcs04* sowie der Überexpressionsmutante *35S::KCS04-kcs04* ist der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus drei Parallelen, jede Parallele repräsentiert das Wurzelmaterial von fünf bis sieben Pflanzen.

Stern: signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *35S::KCS04-kcs04*; Signifikanzniveau > 95%.

Neben *kcs04* wurde auch das Suberin der Knockout- Pflanzen der vier weiteren Kandidaten analysiert und mit dem des Wildtyps verglichen.

Die Hauptkomponente des Suberins bei allen vier Knockout- Pflanzen war, wie im Wildtyp, die ω -Hydroxyoctadiensäure mit ca. 27% in *kcs08*, *kcs11* und *kcs21* (Tabelle 16 bis Tabelle 19). In *kcs16* machte sie ca. 26% aus. Wie auch im Wildtyp war die Octadecendicarbonsäure die

zweithäufigste Komponente mit ca. 11% in *kcs08*, *kcs11* und *kcs16*. In *kcs21* stellt sie knapp 12% des Gesamtsuberins. Auch die Masse des Gesamtsuberins unterschied sich kaum von der des Wildtyps, für *kcs08* konnten ca. 28,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($\pm 1,5 \mu\text{g}/\text{mg}$), für *kcs11* ca. 27,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($\pm 4,4 \mu\text{g}/\text{mg}$), für *kcs16* ca. 28,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($\pm 2,3 \mu\text{g}/\text{mg}$) und für *kcs21* ca. 29,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($\pm 2,3 \mu\text{g}/\text{mg}$) nachgewiesen werden.

In Abbildung 37 ist das Ergebnis der Analyse fünf Wochen alter Wurzeln in der Kettenlängenverteilung dargestellt. Da der Ausfall einer Elongase aufgrund ihrer kettenverlängernden Eigenschaft am deutlichsten in der Kettenlängenverteilung werden sollte, wurde diese Darstellung gewählt.

Der Knockout von *KCS08* führt zu keinen signifikanten Veränderungen der Suberinzusammensetzung. Auch *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* haben nahezu die gleiche Zusammensetzung wie der Wildtyp.

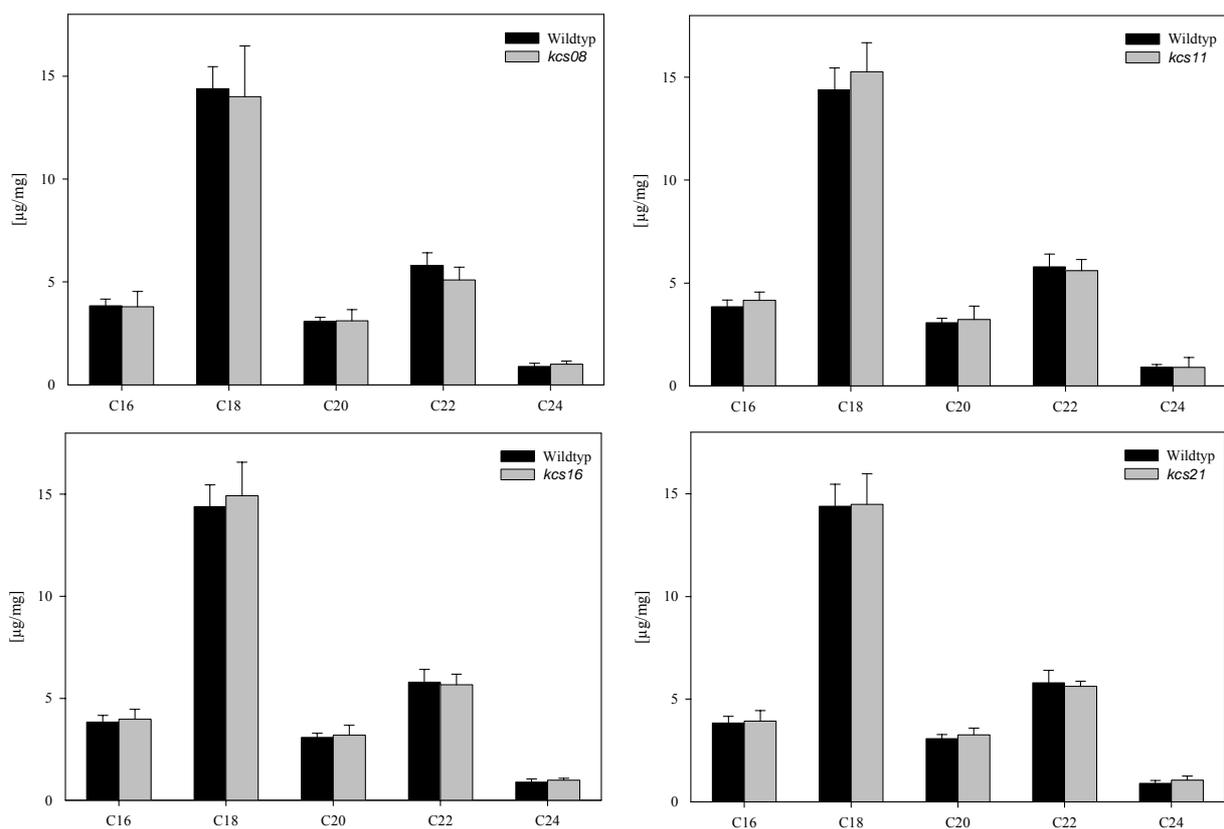


Abbildung 37: Zusammensetzung des Wurzelsuberins fünf Wochen alter Pflanzen in Wildtyp und KCS-Mutanten.

Die Wurzeln wurden mittels BF3/MeOH umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Kettenlängenverteilung des Suberins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert das Wurzelmaterial von fünf bis sieben Pflanzen.

3.3.3.1.2 Analyse des Suberins von Wurzeln zehn Tage alter *Arabidopsis*- Pflanzen

Bei der Analyse des Suberins der Wurzeln zehn Tage alter Keimlinge konnten 28 Substanzen dem Suberin zugeordnet werden. Eine Auflistung der einzelnen Monomeren ist im Anhang sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt (siehe 8.10.2). Das Suberin der Wurzeln zehn Tage alter Pflanzen hatte nahezu dieselbe Zusammensetzung wie das fünf Wochen alter Pflanzen (Abbildung 36). Allerdings waren Unterschiede bei den Monocarbonsäuren festzustellen. In den jungen Wurzeln konnten neben der gesättigten, auch die einfach und zweifach ungesättigte C₁₈ Monocarbonsäure gefunden werden (Abbildung 38). Weitere Unterschiede waren in der Substanzklasse der 2-Hydroxysäuren festzustellen. Es konnten neben 2-Hydroxytetracosan auch die Vertreter mit Kettenlänge C₂₀, C₂₂, C₂₆, sowie die ungesättigte Form der 2-Hydroxytetracosansäure nachgewiesen werden. Die Hauptsubstanz war, wie in den fünf Wochen alten Wurzeln, die ω-Hydroxyoctadiensäure mit ca. 20% des Gesamtsuberins, gefolgt von der Octadecendicarbonsäure, mit ca. 17%.

Um Hinweise auf die Funktion von *KCS04* in jungen, primären Wurzeln zu bekommen wurden auch hier sowohl der Knockout (*kcs04*) als auch die Überexpressionsmutante (35S::*KCS04-kcs04*) untersucht.

In Abbildung 38A ist zu erkennen, dass der Knockout von *KCS04* in nahezu allen Monomeren zu einer teils signifikanten (Stern) Verminderung führt. Abbildung 38B zeigt, dass in *kcs04* weniger Monocarbonsäuren, ω-Hydroxysäuren und α,ω-Dicarbonsäuren vorhanden sind (18 - 19%). Bei den Alkoholen ist kein Unterschied feststellbar und die 2-OH-Säuren akkumulieren leicht in *kcs04*. In Abbildung 38C wird deutlich, dass sich der Knockout verstärkt auf die Substanzen mit Kettenlänge C₁₈ und C₂₂ auszuwirken scheint. Die Analyse von Suberin aus Pflanzen, die *KCS04* nicht mehr exprimieren wurde wiederholt. Eine erneute Analyse von *kcs04* sowie die Analyse von *kcs04-2* ergaben jedoch ein von diesen Ergebnissen abweichendes Bild. Bei diesen Analysen führte der Knockout von *KCS04* zu einer leichten Akkumulation aller Substanzen (Daten nicht gezeigt).

Durch das Wiedereinbringen der kodierenden Sequenz mit 2X 35S-Promotor in die Knockout-Pflanzen wird wieder annähernd das Wildtyplevel erreicht.

Insgesamt besitzt *kcs04* nur 85%, wohingegen 35S::*KCS04-kcs04* 92% des Wildtypsuberins aufweisen kann.

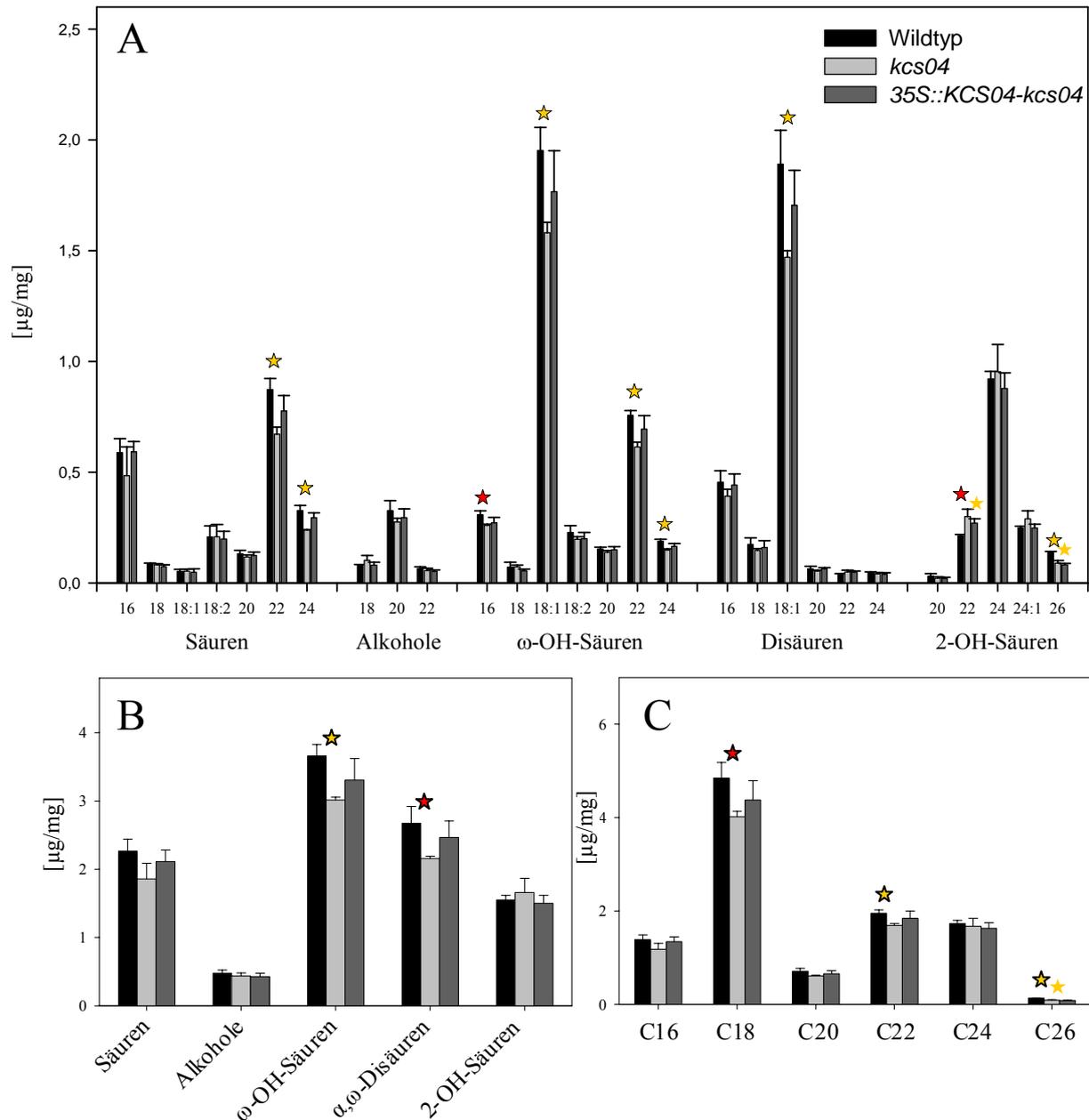


Abbildung 38: Zusammensetzung des Wurzeluberins zehn Tage alter Pflanzen in Wildtyp und *KCS04* transgenen Pflanzen.

Die Wurzeln wurden mittels MeOH/HCl umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Zusammensetzung des Suberins aus den verschiedenen Monomeren (A) bzw. Stoffklassen (B) und Kettenlängen (C) der T-DNA Insertionsmutanten *kcs04* sowie der Überexpressionsmutante *35S::KCS04-kcs04* ist der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg getrocknetes, vereinigtes Wurzelmaterial.

Gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%; roter Stern: Signifikanzniveau > 95%.

Stern mit schwarzem Rahmen: signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *kcs04*; ohne Rahmen: signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *35S::KCS04-kcs04*.

Weil das Ausschalten der Kandidatengene *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS21* keinen Effekt auf das Suberin ausgewachsener Pflanzen hatte und die RT-PCR-Studien gezeigt hatten, dass die *KCS*-Gene in jungen Wurzeln stärker exprimiert sind, wurde das Suberin zehn Tage alter Knockout-Pflanzen analysiert.

In Abbildung 39 ist das Ergebnis der Analyse der jeweiligen Knockout- Pflanzen dem Wildtyp gegenübergestellt. Der Ausfall der Gene *KCS08*, *KCS11* und *KCS16* führt zu einer leichten Akkumulation der Substanzen aller Kettenlängen. Bei Betrachtung der einzelnen Monomere festigt sich dieser Eindruck (Abbildung 49).

Die Ausnahme bilden in *kcs08* die ungesättigte Monocarbonsäure der Kettenlänge C_{18} und die 2-Hydroxycarbonsäuren mit Kettenlänge größer als C_{20} , welche nicht akkumulieren sondern signifikant vermindert vorliegen. Dieser Effekt auf die 2-Hydroxysäuren wird auch in der Kettenlängenansicht deutlich (Abbildung 39), wo die einzige signifikante Veränderung in *kcs08* bei der Kettenlänge C_{26} , was der 2-Hydroxyhexacosansäure entspricht, auftritt.

In *kcs11* ist in der Kettenlängenverteilung keine signifikante Akkumulation erkennbar (Abbildung 39). Betrachtet man die einzelnen Monomere (Abbildung 49) wird deutlich, dass die Monocarbonsäuren $\geq C_{20}$ sowie die Octadecendicarbonsäure signifikant akkumulieren.

Ein ähnliches Bild zeigt sich für *kcs16* (Abbildung 39). Auch hier sind, bezogen auf die Kettenlängenverteilung, keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Jedoch sind einige Änderungen in der Zusammensetzung der Monomere auf einem signifikantem Level (Abbildung 49). Die C_{24} Monocarbonsäure, der C_{20} Alkohol und die Octadecendisäure akkumulieren, wohingegen die zweifach ungesättigte Octadecansäure signifikant vermindert vorliegt.

Durch den Knockout von *KCS21* lassen sich weder qualitative noch quantitative Veränderungen des Suberins beschreiben (Abbildung 39). Die einzige Ausnahme macht der Alkohol mit Kettenlänge C_{20} , welcher in *kcs21* signifikant akkumuliert (Abbildung 49).

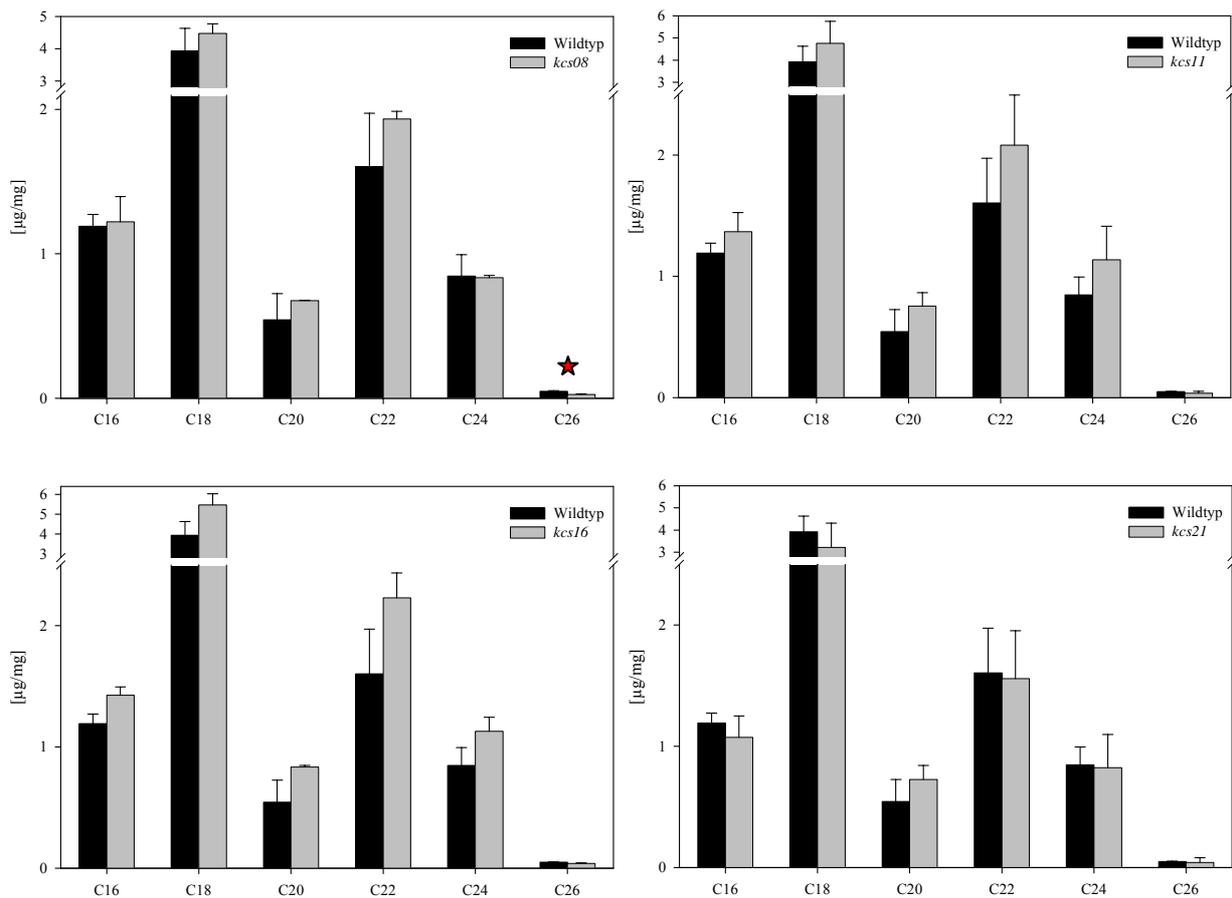


Abbildung 39: Zusammensetzung des Wurzelsuberins zehn Tage alter Pflanzen in Wildtyp und KCS-Mutanten.

Die totalextrahierten Wurzeln wurden mittels MeOH/HCl umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Kettenlängenverteilung des Suberins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg getrocknetes, vereinigtes Wurzelmaterial.

Roter Stern: Signifikanzniveau > 95%.

3.3.3.2 Analyse der Samenlipide von *Arabidopsis*

Wegen der Expression in Schoten und der Tatsache, dass die Samenlipide wie auch die suberinisierte Samenschale Ziel für VLCFA sind, wurden zusätzlich die Samenlipide untersucht.

Die Analyse der Gesamtsamenlipide erbrachte 22 Monomere (siehe 8.10.3). Die Substanzklasse der Monocarbonsäuren machten 99% der Gesamtlipide aus. Die Hauptsubstanz, die zweifach ungesättigte Monocarbonsäure der Kettenlänge C₁₈ stellte ca. 50% der Lipide. Des Weiteren wurden auch Alkohole (C₁₈ bis C₂₀), ω-Hydroxycarbonsäuren (C₂₂ und C₂₄), α,ω-Dicarbonsäuren (C₁₈ und C₂₄) und 2-Hydroxycarbonsäuren (C₂₄ und C₂₆) gefunden.

Auch bei den Samenlipiden, besonders deutlich in Abbildung 40B, zeigt sich bei *kcs04* eine verminderte Menge aller Substanzklassen. Die Ausnahme bilden die α,ω-Dicarbonsäuren.

Signifikant ist die Abnahme der Substanzen mit Kettenlänge C₁₆ und C₂₂ (Abbildung 40C).

Die Überexpression in der Knockout- Pflanze (35S::*KCS04 kcs04*) kompensiert diese Minderung und führt zumindest bei Kettenlängen C₁₆ bis C₂₀ zu einer hoch signifikanten Akkumulation der Substanzen verglichen mit dem Wildtyp. Beispielsweise entspricht der Gehalts an C_{18:2} Monocarbonsäure in *kcs04* nur 86% des in Wildtyp. Die Überexpression von *KCS04* im Knockouthintergrund führt zu einer Akkumulation der C_{18:2} Monocarbonsäure (122% der Wildtypmenge). In der Überexpression sind von der zweifach ungesättigten C₁₈ Monocarbonsäure somit ca. 20% mehr als im Wildtyp und ca. 40% mehr als im Knockout zu finden.

Auch die Überexpression von *KCS04* im Wildtyp (35S::*KCS04*) führt zu einer mit 35S::*KCS04-kcs04* vergleichbaren Akkumulation aller Substanzen.

Im Anhang sind die Ergebnisse weiterer Überexpressionslinien gezeigt (Tabelle 26). Es konnte der gleiche Effekt, allerdings mit geringerem Signifikanzniveau, gezeigt werden.

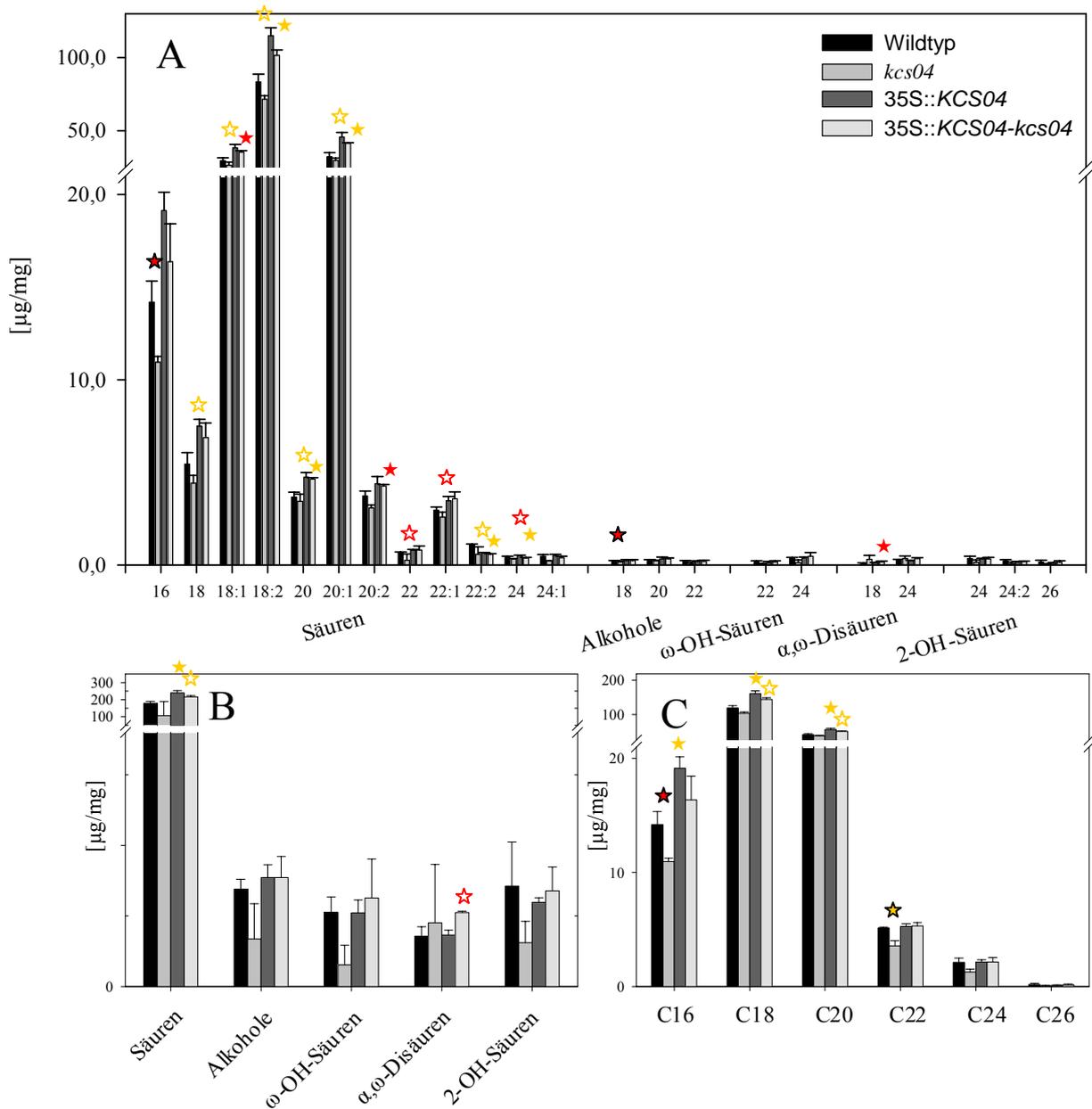


Abbildung 40: Zusammensetzung der Samenlipide in Wildtyp und *KCS04* transgenen Pflanzen.

Die getrockneten Samen wurden mit methanolischer Salzsäure umgeestert. Nach Derivatisierung wurden die Bestandteile mittels GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus drei Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg zusammengefasste Samen.

Die absolute Zusammensetzung der Gesamtsamenlipide aus den verschiedenen Monomeren (A) bzw. Stoffklassen (B) und Kettenlängen (C) der T-DNA Insertionsmutante *kcs04*, den Überexpressionsmutanten 35S::*KCS04-kcs04* und 35S::*KCS04* ist der des Wildtyps gegenübergestellt.

Roter Stern: Signifikanzniveau > 95%; gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%.

Stern mit schwarzem Rahmen: Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout *kcs04*; ohne Rahmen: Unterschiede zwischen Wildtyp und Überexpressionsmutante 35S::*KCS04-kcs04*; mit farbigem Rahmen: Unterschied zwischen Wildtyp und Überexpressionsmutante 35S::*KCS04*.

Auch die Ergebnisse der vergleichende Analyse der Lipide der Samen in den jeweiligen Knockouts der weiteren Kandidatengene und der des Wildtyps wurden für die Darstellung nach Kettenlängen sortiert (Abbildung 41). Eine Auflistung der einzelnen Monomere ist im Anhang sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt (Abbildung 50, Tabelle 28 bis Tabelle 30).

In *kcs08* akkumulieren die Monomere der Samenlipide um insgesamt 16%. Signifikant ist die Akkumulation jedoch nur bei Substanzen mit Kettenlänge C₂₂ (Abbildung 41).

Der Knockout von *KCS11* und *KCS16* hat einen ähnlichen Effekt auf die Zusammensetzung der Samenlipide. Jedoch ist hier die Akkumulation nur bei Substanzen mit Kettenlänge C₂₀ signifikant. Insgesamt hat *kcs11* ca. 10%, *kcs16* ca. 7% mehr Gesamtsamenlipide als der Wildtyp (Tabelle 28 und Tabelle 29).

Der Knockout von *KCS21* hat einen signifikanten Einfluss auf die Lipidbausteine mit Kettenlängen C₁₆, C₁₈ und C₂₀. Am stärksten betroffen sind die Substanzen mit Kettenlänge C₂₀, sie haben verglichen zum Wildtyp ca. 41% mehr Bestandteile. Insgesamt hat *kcs21* 11% mehr Gesamtsamenlipide (Tabelle 30).

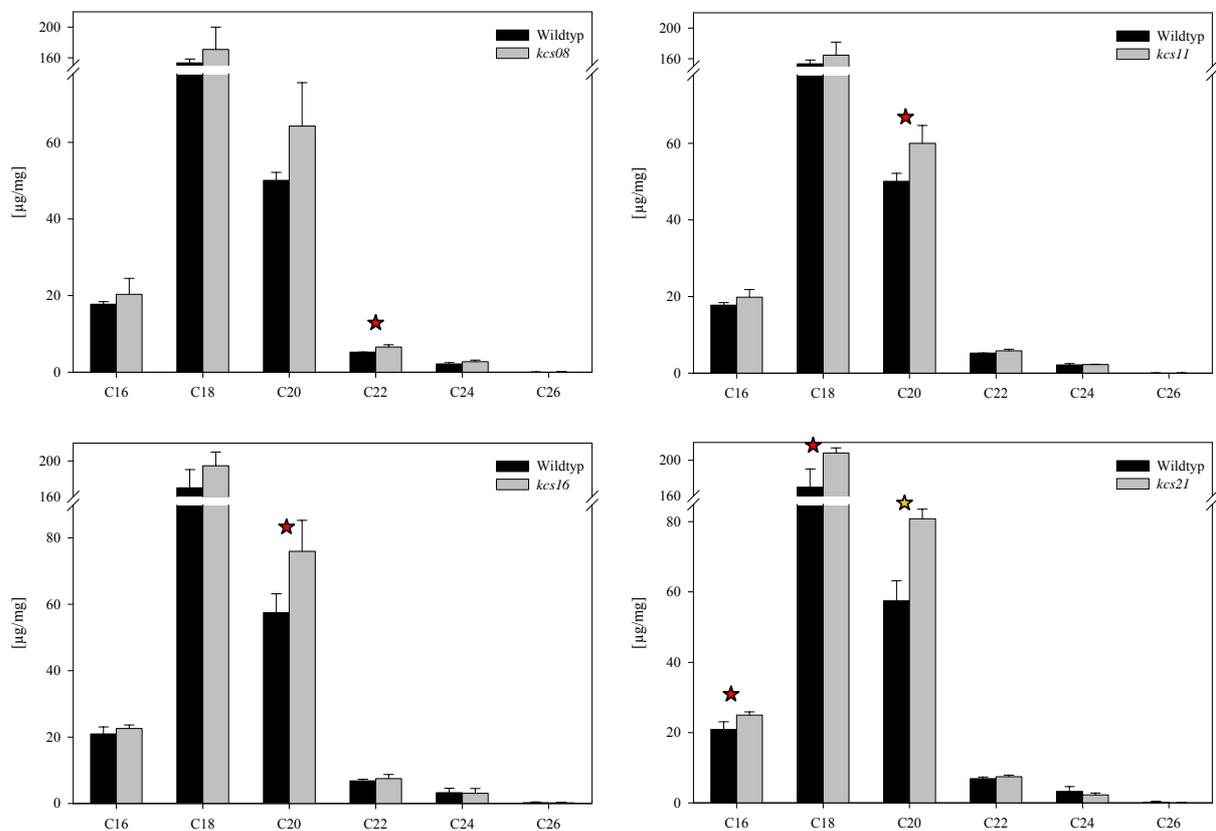


Abbildung 41: Zusammensetzung der Samenlipide in Wildtyp und KCS- Mutanten.

Die getrockneten Samen wurden mit methanolischer Salzsäure umgeestert. Nach Derivatisierung wurden die Bestandteile mittels GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus drei Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg zusammengefasste Samen. Die absolute Kettenlängenzusammensetzung der Gesamtsamenlipide der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt.

Roter Stern: Signifikanzniveau > 95%; gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%.

3.3.3.3 Analyse des Cutins von *Arabidopsis*- Blättern

Die Analyse des Blattcutin wurde wie in 2.9.5 beschrieben durchgeführt und ergab 23

Substanzen, die dem Cutin zugeordnet werden konnten. Eine Auflistung der einzelnen Monomere ist im Anhang sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt (Abbildung 51, Tabelle 31 bis Tabelle 34). Das Cutin von *Arabidopsis* setzt sich aus Monocarbonsäuren (C_{16} bis C_{24}), Alkoholen (C_{26} und C_{28}), α,ω -Dicarbonsäuren (C_{16} und C_{18}) sowie 2-Hydroxycarbonsäuren (C_{16} bis C_{26}) zusammen (Abbildung 51). Neben den gesättigten Formen konnte je eine einfach und zweifach ungesättigte Form der Octadecansäure und der Octadecandisäure gefunden werden. Auch unter den 2-Hydroxycarbonsäuren war ein Vertreter, die 2-Hydroxytetracosansäure, in ungesättigter Form nachweisbar.

In Abbildung 42 sind die Resultate der Analyse des Cutins des jeweiligen Knockouts und des Wildtyps in der Kettenlängenverteilung dargestellt.

Der Knockout von *KCS08*, *KCS16* und *KCS21* führt zu einer, allerdings nicht signifikanten Verminderung der Substanzen aller Kettenlängen. Dies spiegelt sich auch im Gesamtcutin wider. *kcs08* besitzt nur 40%, *kcs16* 46% und *kcs21* 44% des Wildtyp- Cutins (Tabelle 31, Tabelle 33 und Tabelle 34).

Für *kcs11* zeigt sich ein ähnliches Bild, jedoch nur bis zur Kettenlängen $< C_{24}$ (Abbildung 42). Ab dieser Kettenlänge akkumulieren die Substanzen in der Mutante geringfügig. Eine weitere Tendenz zur Akkumulation lässt sich in Abbildung 51 erkennen. Hier lässt sich erkennen, dass sowohl die $C_{18:2}$ Säure (zweifach ungesättigt) als auch die $C_{18:2}$ Disäure, wenn auch nicht auf signifikantem Niveau akkumulieren. Insgesamt hat *kcs11* 66% des Wildtyp- Cutins (Tabelle 32).

Wie sich auf Grund der großen Standardabweichung schon vermuten lies, finden diese Veränderungen jedoch nicht auf signifikantem Niveau statt. Auch in der relative Darstellung (Daten nicht gezeigt) konnte sich kein signifikanter Effekt nachweisen lassen.

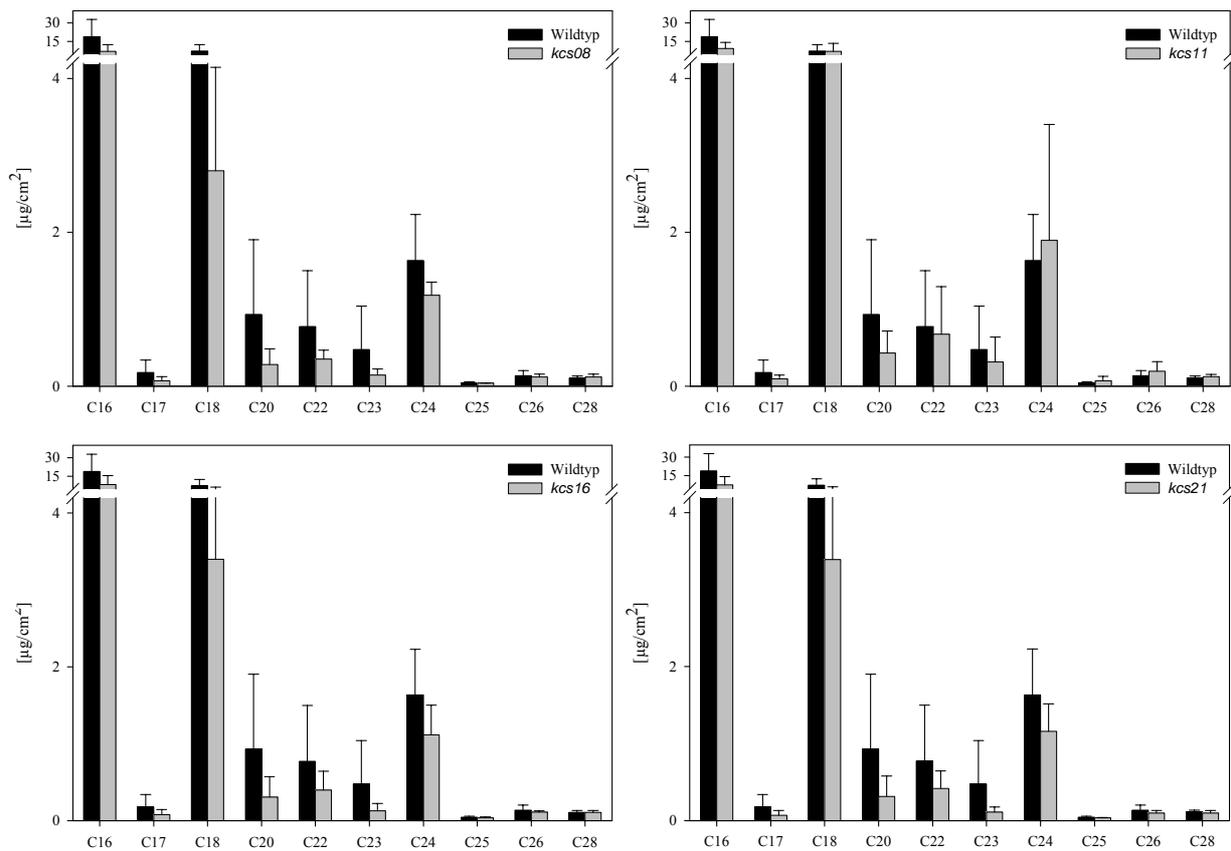


Abbildung 42: Zusammensetzung des *Arabidopsis*- Blattcutins in Wildtyp und *KCS*- Mutanten.

Die totalextrahierten Blätter fünf Wochen alter Pflanzen wurden mit methanolischer Salzsäure umgeestert. Nach Derivatisierung wurden die Bestandteile mittels GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert zwölf Blätter.

Die absolute Kettenlängenverteilung des Cutins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt.

3.3.3.4 Analyse des Wachses von *Arabidopsis*- Blättern

Die Analyse der Blattwachse wurde wie in 2.9.4 beschrieben durchgeführt und ergab 25 Substanzen die dem Wachs zugeschrieben werden konnten. Eine Auflistung der einzelnen Monomeren ist im Anhang sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt (Abbildung 52, Tabelle 35 bis Tabelle 38). Es konnten Monocarbonsäuren (C₂₄ bis C₃₄), Aldehyde (C₂₆ bis C₃₄), Alkane (C₂₈ bis C₃₅) und Alkohole (C₂₆ bis C₃₄) gefunden werden. Die am stärksten vertretene Gruppe waren die der Alkane, welche 37% des Gesamtwachses stellten. Mit ca. 16% des Gesamtwachses war das Alkan mit Kettenlänge C₃₁, gefolgt von dem mit Kettenlänge C₂₉ die Hauptsubstanz.

Der Vergleich der Kettenlängenverteilung des Wachses der vier Knockout Kandidaten zu der des Wildtyps ließ kaum Unterschiede erkennen (Abbildung 43).

Einzig bei *kcs16* konnte ein Unterschied auf signifikantem Niveau festgestellt werden. Wie

Abbildung 52 im Anhang zeigt, liegt das Alkan der Kettenlänge C₃₅ in *kcs16* in verminderter Menge vor. Ebenso vermindert sind die Säuren der Kettenlänge C₃₀ wohingegen der C₂₆ Aldehyd akkumuliert.

Eine Akkumulation des C₂₆ Aldehyds ist auch bei *kcs08* zu erkennen. Der Knockout von *KCS11* führt zu einer tendenziellen Akkumulation der Aldehyde.

Die Gesamtwachsmenge des Wildtyp von 0,41 µg/cm² (± 0,026 µg/cm²) unterschied sich nicht signifikant von der von *kcs08* (0,48 µg/cm² ± 0,026 µg/cm²), *kcs11* (0,51 µg/cm² ± 0,176 µg/cm²), *kcs16* (0,42 µg/cm² ± 0,081 µg/cm²) oder *kcs21* (0,37 µg/cm² ± 0,070 µg/cm²) (Tabelle 35- Tabelle 38). Auch die Auswertung der relativen Wachszusammensetzung ließ keine Unterschiede erkennen (Daten nicht gezeigt).

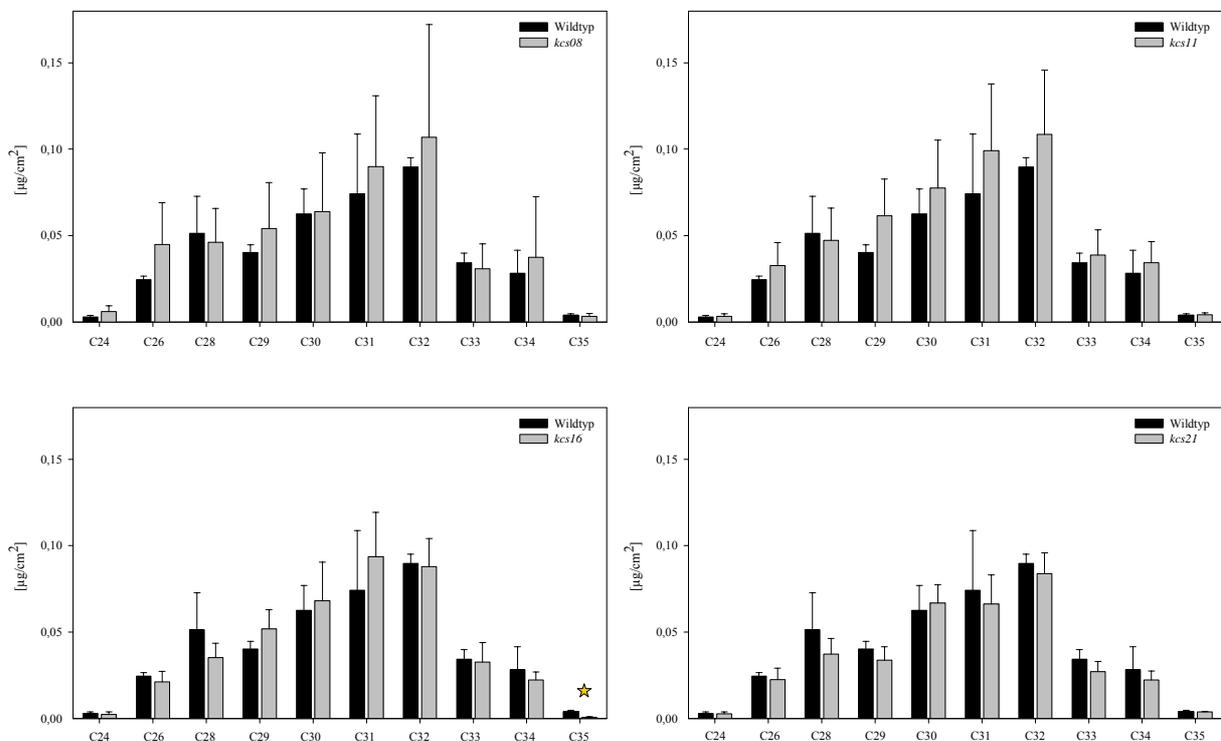


Abbildung 43: Zusammensetzung des Arabidopsis-Blattwachses in Wildtyp und KCS-Mutanten.

Die Wachse der Blätter wurden mittels Chloroform extrahiert und der Überstand mittels GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert zwölf Blätter.

Die absolute Zusammensetzung des Wachses aus den verschiedenen Monomeren der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt.

Gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS04*

Sowohl Expressionsdaten aus öffentlichen Datenbanken (EST, MPSS, Microarray), als auch RT-PCR- Analysen und *Prom_{KCS04}-GUS*- Studien zeigen, dass *KCS04* in der Wurzel exprimiert ist.

Fasst man die Versuche zur transkriptionellen Regulation von *KCS04* nach abiotischem Stress zusammen, so lässt sich der Schluss ziehen, dass *KCS04* durch Salz- oder osmotischen Stress leicht nach 24 bzw. 31 Stunden induziert ist, durch Verwundung konnte keine Induktion gezeigt werden.

Zur näheren Charakterisierung des Gens wurden Überexpressionslinien hergestellt sowie eine weitere T-DNA Knockout Linie (*kcs04-2*) analysiert. Die Analyse des Wurzeluberin fünf Wochen alter Pflanzen zeigte, dass sich das Suberin von *kcs04* nicht von dem des Wildtyps unterschied. Aber es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *KCS04* zu mehr als doppelt soviel Gesamtsuberin führt (Abbildung 36).

In den Wurzeln zehn Tage alter Pflanzen (Abbildung 38) wurde im Knockout von *KCS04* weniger Gesamtsuberin nachgewiesen als im Wildtyp. Die Suberinanalyse in einer weiteren, allelischen *KCS04*- Mutante zeigte keinen veränderten Suberingehalt (Daten nicht gezeigt). Durch das Wiedereinbringen des Gens unter Kontrolle des 2X 35S-Promotors konnte wieder das Suberinlevel des Wildtyps erreicht werden.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der Samenlipide (Abbildung 40). Auch hier führte der Knockout zu einer verminderten Menge nahezu aller Substanzen. Die Samenlipidanalyse der Pflanzen, die *KCS04* überexprimieren, zum einen im Wildtyphintergrund zum anderen im Knockouthintergrund ergab, dass die Überexpression zu einer Akkumulation aller Bestandteile führt. Besonders die Menge der Monocarbonsäuren erhöhte sich in der Überexpression verglichen zu *kcs04* und auch deutlich zum Wildtyp.

3.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS08*

KCS08 wurde ausgewählt, weil es laut EST- und MPSS- Daten eine recht hohe Expression in der Wurzel zeigte. Diese Annahme wurde durch die Microarraydaten von Genevestigator bestätigt. Allerdings konnten höhere Expressionen in allen anderen untersuchten Organen festgestellt werden. Eine differenzierte RT-PCR zeigte eine starke Expression des Gens in den Wurzeln von 20 Tage alten Pflanzen. Die *Prom_{KCS08}-GUS* Studien ergaben, dass das Gen in dem Zentralzylinder der primären Wurzel zehn Tage alter Pflanzen exprimiert wird,

wohingegen nur sehr schwache Färbungen und somit Promotoraktivität in den Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen zu sehen war. Passend zur Expression in jungen Wurzeln, beschränkte sich die Expression in fünf Wochen alten Wurzeln auf die im primären Zustand befindlichen Seitenwurzeln.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCR und der Microarraydaten von Genevestigator und AtGenExpress zeigten, dass *KCS08* durch Salzstress und osmotischen Stress leicht in unterirdischen Organen nach einer Stunde bzw. in Keimlingen nach 24 Stunden bei geringen Salzkonzentrationen induziert wird. Verwundung hat keinen Einfluss auf die Expression von *KCS08*.

Für die Linie Salk_055908 war es möglich bezüglich der Insertion homozygote Pflanzen zu isolieren und den transkriptionellen Knockout nachzuweisen. Die Suberinzusammensetzung der Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen von *kcs08* glich der des Wildtyps (Abbildung 37).

Auch das Suberin der Wurzeln zehn Tage alter *kcs08* Pflanzen (Abbildung 39) unterschied sich nicht signifikant von dem der Wildtypen. Die Analyse der Samenlipide ergab eine signifikante Akkumulation der Substanzen mit Kettenlänge C₂₂. Insgesamt war eine Tendenz zur Akkumulation aller Monomere in der Mutante erkennbar (Abbildung 41). Die Analyse des Blattcutins ergab keine signifikanten Änderungen (Abbildung 42). Der Knockout von *KCS08* hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Wachses der Blättern (Abbildung 43) von *Arabidopsis*.

3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS11*

KCS11 wurde als Kandidat gewählt, weil die EST- und MPSS- Daten Hinweise auf eine Expression in der Wurzel gaben. Die Analyse der Microarraydaten ergab eine recht homogene Expression des Gens in allen untersuchten Organen, aber dennoch konnte die zweithöchste Expression von *KCS11* in den Wurzeln nachgewiesen werden. In der RT-PCR wurde deutlich, dass *KCS11* stark in jungen Wurzeln exprimiert ist und das Expressionslevel mit zunehmendem Alter der Wurzel schwächer wird. Die *Prom_{KCS11}-GUS*- Studien zeigten, dass der Promotor von *KCS11* sehr stark in der Wurzel aktiv ist. In vollständig ausgebildeten, sekundären Wurzeln konnte auch für dieses Gen keine Expression gezeigt werden. Die Ausnahme bildeten Stellen an denen eine entstehende Seitenwurzel von innen durch den Cortex der Wurzel bricht (Abbildung 46).

Weder die RT-PCR noch die Microarraydaten von Genevestigator oder AtGenExpress ließen auf eine Beteiligung an der Antwort auf Salzstress oder osmotischen Stress schließen. Wohingegen verwundete Blätter von *Prom_{KCS11}-GUS*- Pflanzen deutliche Blaufärbungen, daher Promotoraktivität an den entsprechenden Stellen zeigen.

Auch für *KCS11* war es möglich einen transkriptionellen Knockout in Pflanzen, die homozygot für ein T-DNA-Insert (SALK_129099) sind, nachzuweisen. Das Suberin zehn Tage und fünf Wochen alter *kcs11*-Pflanzen unterschied sich nicht signifikant in der Zusammensetzung von dem des Wildtyps (Abbildung 37). Lediglich eine Tendenz zur Akkumulation aller Substanzen im Suberin der Wurzeln zehn Tage alter Keimlinge war zu erkennen (Abbildung 39). Auch bei den Samenlipiden ist eine Tendenz zu erkennen, dass in den Samen von *kcs11* Lipide akkumulieren, vor allem ist die Kettenlänge C₂₀ betroffen (Abbildung 41). Über eine veränderte Zusammensetzung des Blattcutin ist aufgrund der Standardabweichung kaum eine Aussage möglich. Jedoch scheinen auch durch den Knockout von *KCS11* alle Substanzen ab Kettenlänge C₂₄ sowie die ungesättigten C₁₈ Mono- und Dicarbonsäuren zu akkumulieren (Abbildung 42 und Abbildung 51). Weder die Qualität noch die Quantität des Blattwachses (Abbildung 43) war vom Ausfall des Gens betroffen.

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS16*

Für *KCS16* waren zwar keine ESTs aus Wurzelgewebe und keine MPSS-Daten verfügbar, aber die Microarraydaten von Genevestigator zeigten eine hohe Wurzelexpression an. Diese Wurzelspezifität bestätigte sich in der RT-PCR, die die höchste Expression in den untersuchten Organen in zehn Tage alten Wurzeln zeigte. Diese Beobachtung konnte zusätzlich durch *Prom_{KCS16}-GUS*-Studien bestätigt werden. Auch für *KCS16* konnte eine deutliche Blaufärbung des Zentralzylinders über den ganzen Keimling nachgewiesen werden, wohingegen in der Wurzel fünf Wochen alter Pflanzen lediglich eine schwache Blaufärbung in den Seitenwurzeln zu erkennen war.

Die Studien nach Salzstress sowie osmotischen Stress, ergaben dass *KCS16* in unterirdischen Organen nach einer Stunde leicht bzw. in Keimlingen nach vier Stunden bei mittlerer Salzkonzentration sowie nach 31 Stunden bei niedriger und hoher Konzentration induziert wird. Für dieses Gen konnte außerdem eine Induktion durch Verwundung gezeigt werden (Abbildung 30 und Abbildung 46).

Um untersuchen zu können, welche Folgen ein Ausfall dieses Gens für die Pflanze hat, wurden aus der SALK_035139 Linie Pflanzen, die homozygot die T-DNA tragen, isoliert und mittels RT-PCR ein transkriptioneller Knockout nachgewiesen. Die Suberinzusammensetzung in zehn Tage alten *kcs16*-Keimlingen und fünf Wochen alten Pflanzen unterschied sich nicht signifikant von der des Wildtyps (Abbildung 37). Es lies sich, vergleichbar mit *kcs08* und *kcs11*, im Suberin zehn Tage alter Keimlingen eine Tendenz erkennen, dass der Knockout von *KCS16* zu einer Akkumulation aller Kettenlängen führt (Abbildung 39).

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Analyse der Samenlipide, wo die Akkumulation der

Substanzen mit Kettenlänge C₂₀ signifikant war (Abbildung 41).

Die Analyse des Cutins zeigte keine signifikanten Veränderungen an (Abbildung 42). Auch das Wachs der Blätter von *kcs16* unterschied sich kaum von dem des Wildtyps (Abbildung 43). Eine signifikante Verminderung war allerdings bei der Kettenlänge C₃₅ (C₃₅ Alkan) festzustellen.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS17*

Die Knockoutpflanze *kcs17* wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe analytisch charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass *KCS17* an der Suberinbiosynthese beteiligt ist. Das Gen ist in der Wurzel aktiv, was durch öffentlich zugängliche Expressiondaten, differenzierte RT-PCR und *Prom_{KCS17}-GUS* Analysen bestätigt werden konnte.

Es konnte klar gezeigt werden, dass *KCS17* sowohl durch Salzstress als auch durch osmotischen Stress stark nach vier Stunden induziert wird. Auch Verwundung führte eindeutig zu einer schnellen, verstärkten Expression von *KCS17*.

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse für *KCS21*

KCS21 wurde ausgewählt, weil es laut EST Daten nach *kcs04* der beste Kandidat bezüglich der Wurzelexpression zu sein schien. Die RT-PCR sowie die *Prom_{KCS21}-GUS*- Pflanzen zeigten allerdings, dass *KCS21* recht schwach in den Wurzeln exprimiert ist.

Die Expressionsstudien nach abiotischen Stress ergaben, dass *KCS21* sehr deutlich durch Salz- und osmotischen Stress nach 24 Stunden in oberirdischen Organen induziert ist. Mittels RT-PCR konnte in Keimlingen eine erhöhte Expression nach vier Stunden gezeigt werden. Eine Induktion durch Verletzung konnte für dieses Gen nicht gezeigt werden.

Die Analyse von *kcs21*, homozygot bezüglich der T-DNA-Insertion von SALK_030654, was nachweislich zu einem Fehlen des Genprodukts führt, hatte passend zur geringen Expression in Wurzeln keinen Einfluss auf das Suberin der Wurzeln (Abbildung 37 und Abbildung 39).

Allerdings führte der Knockout in den Samenlipiden zu einer signifikanten Akkumulation der Substanzen mit Kettenlängen C₁₆ bis C₂₀ (Abbildung 41).

Weder Cutin (Abbildung 42) noch das Wachs der Blätter (Abbildung 43) wurden von einem Fehlen von *KCS21* beeinflusst.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es Gene zu finden, die einen Einfluss auf die Suberinbiosynthese haben, bzw. die Funktion der gewählten Gene zu klären. Das Fernziel ist mehr über die Suberinbiosynthese zu erfahren und Pflanzen zu erhalten, die eine veränderte qualitative oder quantitative Suberinzusammensetzung haben, um an diesen die physiologische Bedeutung von suberinisierten Barrieren untersuchen zu können. Dadurch ist es eventuell möglich das Suberin in Nutzpflanzen dahingehend zu verändern, so dass diese toleranter gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen, zum Beispiel Trockenheit sind.

Als Vorläufermoleküle stehen der Suberinbiosynthese die Monocarbonsäuren mit Kettenlänge C_{16} und C_{18} des primären Stoffwechsels zur Verfügung. Diese müssen zum einen funktionalisiert und zum anderen zu sehr langkettigen Fettsäuren elongiert werden. Aus diesem Grunde wurde die Familie der KCS oder Elongasen (von Wettstein-Knowles 1982) für weitere Untersuchungen ausgewählt. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits vier der 21 Elongasen aus *Arabidopsis* bearbeitet und für drei dieser Gene (*KCS01* (Krampitz 2006), *KCS04* (Briesen 2004) und *KCS17* (Höfer 2005)) konnte eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese postuliert werden.

4.1 Auswahl der Kandidatengene

Als aussichtsreiche Kandidaten wurden Gene eingestuft, die eine hohe Expression in der Wurzel zeigten. Um aus den 21 Genen die Wurzelexprimierten zu filtern, wurden zunächst öffentlich zugängliche Datenbanken analysiert. Der Vergleich der EST- Daten mit den MPSS- Daten ergab, dass *KCS01*, *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS17*, *KCS19* und *KCS21* starke Expression in Wurzeln aufweisen (Abbildung 9).

Für das Gen *KCS09* konnte kein EST aber MPSS- Signale aus Wurzelgewebe gefunden werden. Die relative Häufigkeit der MPSS- Signale aus der Wurzel glich allerdings nahezu dem aus Blüten. Da Microarraydatenbank- Analysen keinen Hinweis auf eine starke Aktivität des Gens *KCS09* in der Wurzel gaben, wurde dieses Gen nicht als aussichtsreicher Kandidat eingestuft.

Für *KCS16* und *KCS18* waren lediglich EST- Daten verfügbar, die allerdings nicht aus Wurzeln entstammten. Weil aber weitere Microarraydaten für eine Expression von *KCS16* in der Wurzel sprachen, wurde auch dieses Gen weiter untersucht. Für alle anderen Gene zeigten beide Datenbanken eine sehr geringe bis keine Aktivität in der Wurzel.

Um die Relevanz der Daten zu überprüfen wurden auch bereits charakterisierte *KCS*- Gene

untersucht. *KCS05* und *KCS06* (*CER60* und *CER6/CUT1*) sind nach Hooker *et al.* (2002) nicht in der Wurzel exprimiert. Da für diese Gene auch keine oder kaum EST- oder MPSS-Daten aus der Wurzel gefunden werden konnten, wurden die Daten als verlässlich eingestuft. In unserer Arbeitsgruppe wurden *KCS01* und *KCS19* bereits charakterisiert. Daher wurden als Kandidatengene *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16*, *KCS17* und *KCS21* ausgewählt.

4.1.1 Organspezifische Expression mittels öffentlicher Daten und RT-PCR

Die Expression der ausgewählten Gene wurde in unterschiedlichen Organen untersucht. Dazu wurden zum einen Microarraydaten von Genevestigator zum anderen das Expressionslevel mittels RT-PCR untersucht. Die Daten von Genevestigator unterstützten weitgehend die EST- und MPSS-Daten. Es wurde die relative Expression der Gene zum konstitutiv exprimierten *ACTIN* in Wurzel, Stängel, Blatt, Schote und Blüte ermittelt (Abbildung 10).

Von den untersuchten Pflanzenteilen konnte für *KCS04* die stärkste Expression in Wurzeln nachgewiesen werden. *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* hatten immerhin das zweitgrößte Expressionslevel in Wurzeln. Diese Werte passen gut mit den MPSS- und EST-Daten überein. *KCS16* zeigte laut EST keine Expression in Wurzeln und MPSS-Daten waren nicht verfügbar. Jedoch konnten die Microarraydaten von Birnbaum *et al.* (2003) durch Genevestigator bestätigt werden. Auch für *KCS08* konnte eine Expression in Wurzeln gezeigt werden, auch wenn das Gen in den anderen untersuchten Organen stärker exprimiert wurde. Wie auch die MPSS-Daten andeuteten ist *KCS21* nur sehr schwach in Wurzeln exprimiert, obwohl es relativ viele ESTs aus Wurzelgewebe gab.

Mittels RT-PCR wurde die Expression der Gene detailliert analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* stärker in den 10- 20 Tage alten Wurzel exprimiert wurden als in den Wurzeln ausgewachsener Pflanzen (Abbildung 11). In dieser Phase nehmen die Pflanzen schnell an Masse zu und in den wachsenden Wurzeln müssen neue suberinisierte Barrieren gebildet werden. Es macht daher Sinn, dass in jungen Wurzeln eine erhöhte Expression von putativen Suberinbiosynthesegenen zu finden ist, da verstärkt VLCFA, unter anderem zur Bildung von Suberin, benötigt werden. Für GPAT5, eine putative Acyltransferase, konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Knockout des korrespondierenden Gens zu einem veränderten Suberin führt (Beisson *et al.* 2007). Das Gen wird analog zu den untersuchten Kandidatengenem ebenso hauptsächlich in den Primärwurzeln exprimiert. In sekundären Wurzeln von ausgewachsenen Pflanzen ist die Suberinisierung weitgehend abgeschlossen, doch da die Wurzel fünf Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen ständig weiter wächst und zusätzlich Seitenwurzeln ausbildet ist auch in den Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen eine, jedoch geringe, Genaktivität der Kandidaten

nachzuweisen ist (Ausnahme: *KCS08*). Für die Gene *KCS04*, *KCS11*, *KCS17* und *KCS21* stimmen die experimentell ermittelten Daten mit denen der verfügbaren Datenbanken überein. Für *KCS08* und *KCS16* ließen sich mittels RT-PCR sehr geringe Expressionsraten in Schoten nachweisen, wohingegen diese Gene laut Genevestigator stark in Schoten exprimiert sind. Diese Unterschiede könnten auf Unterschiede im Alter bzw. Entwicklungsstadium der Schoten zurückzuführen sein.

4.1.2 Gewebespezifische Expression mittels *Prom_{KCS}-GUS*- Studien

Auch die *Prom_{KCS}-GUS*- Studien zeigten, dass die Expression der Kandidatengene auf primäre Bereiche der Wurzel beschränkt ist. Bei keinem der Kandidaten war in den sekundären Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen eine Blaufärbung zu erkennen, lediglich die sich im primären Zustand befindlichen Seitenwurzeln zeigten eine Blaufärbung (Abbildung 15).

In den Wurzeln zehn Tage alter Keimlinge konnte für alle untersuchten Gene eine Blaufärbung nachgewiesen werden (Abbildung 16). Außer für *KCS11* konnte für keines der Gene eine Färbung in der Endodermis gezeigt werden. Suberin befindet sich in der Endodermis primärer bzw. im Periderm sekundärer Wurzeln. Jedoch war bei allen Kandidaten der Zentralzylinder der Keimlinge blau gefärbt. Daher wurde mittels Kontroll- Konstrukte überprüft, ob es sich bei der Färbung des Zentralzylinders um ein Artefakt handelt (Abbildung 12 bis Abbildung 14). Die Analyse der Pflanzen die mit einem Vektor transformiert wurden, der zwar das *GUS*- Gen allerdings keinen vorgeschalteten Promotor enthält (Krampitz 2006), ergab keine Blaufärbung (Abbildung 12). Zum anderen wurden Promotor-Reporterengenfusionen von *SCARECROW* (*SCR*) und *CYP86A1* untersucht (Abbildung 13 bzw. Abbildung 14). Die Endodermispezifität des Transkriptionsfaktors *SCR* konnte mittels der *Prom_{SCR}-GUS*- Pflanzen bestätigt werden. Zwar war auch bei diesem Konstrukt der Zentralzylinder blau gefärbt, jedoch konnten auch Malamy und Benfey 1997 dieses Expressionsmuster für *SCR*, trotz Nutzung eines anderen Klonierungsverfahrens, zeigen. *CYP86A1* ist eine P450-abhängige Monooxygenase und an der Suberinbiosynthese beteiligt (René Höfer, unveröffentlichte Daten). In den *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Pflanzen war sowohl in der Endodermis wie auch im Zentralzylinder eine Färbung nachweisbar. Interessanterweise konnte mit dem *Prom_{CYP86A1}-GUS*- Konstrukt ein fleckiges (*patchy*) Expressionsmuster, wie es auch für dem an der Suberinbiosynthese beteiligten *GPAT5* gezeigt werden konnte (Beisson *et al.* 2007), nachgewiesen werden. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass in *Prom_{GPAT5}-GUS*- Keimlingen die Blaufärbung der Wurzel erst hinter der Elongationszone beginnt. Ein ähnliches Bild konnte auch für die *Prom_{KCS08}-GUS* und *Prom_{KCS21}-GUS* gezeigt werden.

Aufgrund der Kontrollen kann davon ausgegangen werden, dass von der Blaufärbung des Zentralzylinders auf eine Expression der jeweiligen Gene geschlossen werden kann. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass ebenso für *KCS04* und *KCS17* nur eine Färbung des Zentralzylinders gezeigt werden konnte. Diese beiden Gene wurden bereits analytisch charakterisiert (Briesen 2004, Höfer 2005). Für *KCS17* konnte eine deutliche, für *KCS04* eine mögliche Beteiligung an der Suberinbiosynthese zugesprochen werden. Es ist also nicht auszuschließen, dass Gene trotz Promotoraktivität im Zentralzylinder statt in der Endodermis an der Suberinbiosynthese beteiligt sind. Für *SHORTROOT*, ein Gen das für einen putativen Transkriptionsfaktor der GRAS-Familie codiert, ist beispielsweise bekannt, dass es im Zentralzylinder exprimiert, das Protein aber in der Endodermis nachweisbar ist (Nakajima *et al.* 2001, Sena *et al.* 2004). Es ist also vorstellbar, dass die *KCS*-Gene im Zentralzylinder exprimiert werden, das Enzym dann aber in der Endodermis tätig ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass durch alle Analysen gezeigt werden konnte, dass die gewählten Kandidaten, bis auf *KCS21*, stark in der Wurzel exprimiert sind.

4.2 Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene unter Stressbedingungen

4.2.1 Änderung der Expression unter osmotischem Stress und Salzstress

Da gezeigt werden konnte, dass Pflanzen unter bestimmten Bedingungen vermehrt Suberin bilden (Reinhardt und Rost 1995, Schreiber *et al.* 2005a), wurde die Expression der Kandidatengene nach Behandlung mit 50, 100 und 200 mM sowie nach Anzucht auf 5% PEG untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in *Arabidopsis* bei diesen Konzentrationen durch Salzstress ausgelöste Prozesse induziert werden (Sunkar *et al.* 2003). Um dies auch experimentell zu überprüfen, wurde zunächst die Expression von *RD29A* bestimmt.

RD29A kodiert für einen Transkriptionsfaktor und wird durch Faktoren wie Salz- und osmotischen Stress induziert (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993a, Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993b, Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994, Hooker *et al.* 2002, Sunkar *et al.* 2003, Zhu *et al.* 2005). Es konnte gezeigt werden, dass *RD29A* durch die gewählten Stressbedingungen (NaCl und PEG) stark induziert wird (Abbildung 17 und Abbildung 21).

Diese Proben wurden auch für Untersuchungen des Expressionslevels der Kandidatengene mittels RT-PCR genutzt (Abbildung 18). Ähnlich der Expressionsänderung von *RD29A* verhielt sich die Expression von *KCS17* und *KCS21*. Die Expression beider Gene lag zum Zeitpunkt t 0 unter der Nachweisgrenze. Allein das Umsetzen auf MS-Agar ohne zusätzliches

Salz führte zu einer messbaren Expression, woraus sich schließen lässt, dass die beiden Gene durch den beim Umsetzen entstehenden Stress (Trockenstress und durch Berührung mit der Pinzette) induziert werden. Um diese Faktoren auszuschließen, wurde die jeweilige Expression zu verschiedenen Zeiten und verschiedenen Konzentration nicht auf t 0 sondern auf die Kontrolle (Proben die auf MS-Agar mit 0 mM NaCl umgesetzt wurden) zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen. *KCS17* wird nach vier Stunden induziert, je höher die Salzkonzentration war desto stärker war die Induktion. Es scheint als würde *KCS17* sehr früh in der Anpassung an Salzstress eine Rolle spielen, da 24 Stunden nach dem Umsetzen (t 24) das Expressionslevel wieder deutlich abgesunken war. Analog dazu konnte auch eine Induktion von *KCS17* durch 5% PEG gezeigt werden (Abbildung 22). Bei *KCS21* war die Induktion nicht ganz so stark, dennoch zeigte sich bei diesem Gen auch nach vier Stunden die höchste Expression, die sich nach 24 Stunden wieder der in der Kontrolle anglich. Da für *KCS17* eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese gezeigt werden konnte (Höfer 2005), könnte man daraus schließen, dass auch *KCS21* an der Antwort auf Salinität in Form von Suberinisierung beteiligt ist. Die Beteiligung dieser beiden Gene an der Antwort auf Salzstress wie auch osmotischen Stress wird auch von den Mikroarraydaten von Genevestigator gestützt (Abbildung 19 und Abbildung 23). Die Daten, die über AtGenExpress zur Verfügung stehen deuten eine zeitlich versetzte Induktion von *KCS17* und *KCS21* durch Salz und osmotischen Stress an (Abbildung 20 und Abbildung 24). Es scheint als würde *KCS17* nach sechs Stunden sein Expressionsmaximum erreichen, wohingegen *KCS21* ist nach 24 Stunden induziert wird. Auffällig ist bei den Daten von AtGenExpress außerdem, dass sich die Induktion für *KCS21* nur in oberirdischen Pflanzenteilen feststellen ließ. Bei einer Beteiligung an Salz- bzw. osmotischen Stress ausgelöster Suberinisierung würde man eine Induktion in den Wurzeln erwarten, was zwar die Beteiligung an der Salz- bzw. osmotischen Stress induzierter Suberinisierung für *KCS17* aufgrund der Expressionssteigerung auch in unterirdischen Organen stützt, jedoch die von *KCS21* anzweifeln lässt. Aufgrund der beiden Kontrollgene *ACTIN* (keine Änderung der Expression) und *RD29A* (erhöhte Expression nach Salz und osmotischen Stress) können die Daten von AtGenExpress und Genevestigator als verlässlich eingestuft werden.

Bei *KCS08* und *KCS16* lies sich durch AtGenExpress eine Induktion in unterirdischen Pflanzenteilen nachweisen (Abbildung 20 und Abbildung 24). Die Kinetik deutet an, dass eine sehr schnelle, kurz andauernde Expressionserhöhung von *KCS08* und *KCS16* nach Behandlung mit 150 mM Salz bzw. 300 mM Mannitol stattfindet. Dies könnte erklären, warum keine Induktion für dieses Gen durch Genevestigator gezeigt werden konnte. Die

Daten bei Genevestigator zeigen nur den gemittelten Wert sechs bis 24 Stunden nach Salzbehandlung an. *KCS08* ist nach den RT-PCR- Ergebnissen schwach induziert, das Expressionsmaximum wird nach 24 Stunden unter 50 mM NaCl erreicht. Die Daten von AtGenExpress deuten an, dass eine rasche Induktion durch Salzstress (150 mM NaCl) ausgelöst wird und sich nach drei Stunden bereits kein erhöhtes Expressionslevel mehr nachweisen lässt. Dies lässt sich leider nicht mit den Daten der RT-PCR überprüfen, da die ersten Proben vier Stunden nach dem Umsetzen auf salzhaltiges MS-Medium genommen wurden. Die Ergebnisse der RT-PCR für *KCS16* nach 100 mM NaCl passen sehr gut zu denen von AtGenExpress. Nach vier Stunden erreicht *KCS16* sein Expressionsmaximum, wohingegen nach 24 Stunden keine Erhöhung mehr feststellbar ist. Doch auch nach 31 Stunden konnte eine konzentrationsabhängige Induktion durch 50 und 200 mM gezeigt werden. Diese Zeitspanne ist bei AtGenExpress nicht mehr erfasst. Es wäre vorstellbar, dass abhängig der Salzkonzentration die Antwort in Form von Expressionsänderung zeitlich variiert, allerdings würde man auch einen Expressionsanstieg bei 100 mM nach 31 Stunden erwarten. Ein ähnliches Bild ergibt sich über AtGenExpress nach osmotischem Stress. *KCS08* und *KCS16* erreichen nach einer Stunde ihr Expressionsmaximum. Für *KCS16* konnte allerdings auch nach sechs Stunden noch eine erhöhte Expression gezeigt werden. Die Unterschiede in den Ergebnissen von RT-PCR und Microarraydaten können mehrere Gründe haben. Zum einen wurde für die RT-PCR RNA aus Keimlingen gewonnen und mittels Microarray wurde die Expression in 16 Tage alte Pflanzen analysiert. Die Expression und Antwort auf abiotische Faktoren könnten je nach Entwicklungsstadium der Pflanzen variieren. Zum anderen sind die beiden Gene *KCS08* und *KCS16* auf Aminosäureebene zu 74% homolog (Tabelle 44). Der Verlauf der jeweiligen Kinetik für unterschiedliche abiotische Faktoren gleicht sich ober- und unterirdisch für beide Gene stark. Es wäre möglich, dass die Microarraydaten aufgrund der hohen Homologie der beiden Gene fehlerhaft sind.

Für *KCS04* ließ sich mittels RT-PCR lediglich durch 100 mM NaCl nach 31 Stunden einen leichten Anstieg der Expression feststellen (Abbildung 18), die Anzucht auf 5% PEG haltigen MS-Platten führte zu keiner eindeutigen Expressionserhöhung (Abbildung 22). Auch die gemittelten Werte von Genevestigator lassen keine Änderung der Expression von *KCS04* erkennen (Abbildung 19 und Abbildung 23). Die AtGenExpress- Daten deuten eine späte Reaktion auf Salzstress und osmotischen Stress, wiederum nur in oberirdischen Organen, an (Abbildung 20 und Abbildung 24). Aufgrund der relativ geringen Expressionserhöhung in lediglich oberirdischen Organen lässt sich für *KCS04* eine Beteiligung an der durch Salz- und osmotischen Stress induzierten Suberinisierung ausschließen.

Für *KCS11* konnte durch keine Analyse eine Induktion durch Salz bzw. osmotischen Stress angedeutet werden, viel mehr führte der abiotische Stress zu einer verminderten Expression diesen Gens. Möglicherweise wird *KCS11* aufgrund einer *Feedback*-Hemmung runterreguliert, da andere *KCS* induziert werden. Insgesamt lässt sich schließen, dass *KCS11* nicht an der Anpassung an ungünstige Bedingungen wie Salz- und osmotischen Stress beteiligt ist.

Die erhöhte Expression von *KCS04*, *KCS08*, *KCS16*, *KCS17* und *KCS21* lassen spekulieren, dass diese Gene an physiologischen Prozessen in Zusammenhang mit den Anpassungen an Salinität, beteiligt sind. Azachi *et al.* konnten 2002 zeigen, dass sich in der salztoleranten Alge *Dunaliella salina* durch Salzstress die Expression von *KCS* und auch die Aktivität von *KCS* erhöhen. Die Autoren postulieren, dass in Anpassung an den Salzstress in die Membran verstärkt längerkettige Lipide eingelagert werden. Analog dazu wäre vorstellbar, dass auch in *Arabidopsis* als Antwort auf ungünstige Bedingungen die Zusammensetzung von Membranlipiden verändert werden. Möglich wäre auch dass unter diesen Bedingungen Signallipide gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Oxylipinen nach abiotischen Stress induziert wird (Howe und Schilmiller 2002). Dies wären mögliche Gründe für eine Induktion von *KCS21*, da aufgrund der Expressionserhöhung einzig in oberirdischen Organen eine Beteiligung an Suberinisierung nach Salz- oder osmotischen Stress auszuschließen ist. Da für *KCS08*, *KCS16* und *KCS17* eine erhöhte Expression auch in unterirdischen Pflanzenteilen auftrat ist eine Beteiligung an der salzinduzierten Suberinbiosynthese möglich.

4.2.2 Änderung der Expression nach Verwundung

Es konnte histochemisch nachgewiesen werden, dass analog zur Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (Schreiber *et al.* 2005b, Yang und Bernards 2006) auch *Arabidopsis* Verwundungen durch suberinisiertes Gewebe abschließt (Abbildung 25).

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass wundinduzierte Gene, zum Beispiel *PAL*, durch die gewählte Behandlung induziert werden (Abbildung 26). Es konnte auch gezeigt werden, dass *KCS17* induziert wird. Dies wird auch durch die Ergebnisse von Genevestigator (Abbildung 28) und AtGenExpress bestätigt (Abbildung 29). Auch die Verwundung von *Prom_{KCS17}-GUS*-Pflanzen deutete eine Expression von *KCS17* an verwundeten Stellen an (Abbildung 30). Werden diese Ergebnisse zusammengekommen, so kann man schließen, dass *KCS17* an der wundinduzierten Suberinisierung beteiligt ist.

KCS04, *KCS08* und *KCS21* hingegen werden nicht bzw. nur sehr schwach induziert (Abbildung 27 bis Abbildung 30). Eine Beteiligung dieser Gene an einer Suberinisierung nach Verwundung ist unwahrscheinlich.

Eine Beteiligung von *KCS11* an der Bildung eines Wundperiderms kann postuliert werden. Die Microarraydaten von Genevestigator (Abbildung 28), sowie die Untersuchung der verwundeten *Prom_{KCS11}-GUS*-Pflanzen (Abbildung 30) deuten eine Induktion des Gens an, wohingegen die detaillierten Microarraydaten von AtGenExpress (Abbildung 29) gegen eine Beteiligung sprechen. Für die Microarraystudien wurden Blätter mit zwei Nadeln pro cm² verletzt, so dass pro Blatt ca. drei bis vier Löcher entstanden. In unseren Versuchen wurden pro cm² 15 Nadeln eingesetzt. Eventuell sind die unterschiedlichen Ergebnisse auf den unterschiedlichen Verwundungsgrad zurückzuführen. Im Querschnitt sekundären Wurzeln konnte ebenso eine starke Blaufärbung an Bereichen, an denen eine Seitenwurzel den Cortex durchbricht und somit verletzt, gezeigt werden (Abbildung 46). Des Weiteren sind die Stellen blau gefärbt, an denen die Wurzel von der Pflanze abgetrennt wurde (Abbildung 15). Diese Ergebnisse zusammengenommen ist eine Funktion von *KCS11* in der Bildung eines Wundperiderms anzunehmen.

Die gemittelten Daten von Genevestigator zeigen für *KCS16* keine Induktion (Abbildung 28), betrachtet man sich die detaillierten Daten von AtGenExpress, so zeigt sich eine rasche Induktion in unterirdischen Pflanzenteilen nach einer Stunde (Abbildung 29), wobei bei diesen Pflanzen keine unterirdischen Organe, sondern die Blätter verletzt wurden. Mittels *Prom_{KCS16}-GUS* konnte auch eine Induktion von *KCS16* durch Verwundung festgestellt werden (Abbildung 30). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung bei der Wundantwort ist in Abbildung 46 zusehen. Hier ist eine Blaufärbung in den Wurzeln von *Prom_{KCS16}-GUS*-Pflanzen an den Stellen zu sehen, an denen eine Seitenwurzel von innen den Cortex durchbricht. Daher wird auch für *KCS16* eine Rolle in durch Verwundung induzierte Prozesse postuliert.

Für alle Expressionsstudien, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* in Wurzeln exprimiert werden. Außerdem sind *KCS17* und *KCS21* stark, *KCS08* und *KCS16* etwas schwächer durch Salz- und osmotischen Stress induziert. *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* werden nach Verwundung induziert.

4.3 Gaschromatographische Analysen

4.3.1 Analyse des Suberins fünf Wochen alter Pflanzen

Bei der Analyse des Suberins konnten alle für *Arabidopsis* typischen Bestandteile gefunden werden (Franke *et al.* 2005).

Für *KCS04* wurde bereits eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Elongasegens zu einer Verminderung des Gesamtsuberin

um mehr als 20% führt (Briesen 2004). Es konnte jedoch nie, auch nicht in der relativen Zusammensetzung des Suberins, ein kettenlängenabhängiger Effekt gezeigt werden. Um zu bestärken, dass der Knockout von *KCS04* zu weniger Gesamtsuberin führt, wurde ein weiterer allelischer Knockout untersucht und das Gen mit vorgeschalteten 2X 35S Promotor in die Knockout- Pflanzen stabil integriert (Abbildung 33). Die Analyse der Pflanzen, die *KCS04* überexprimieren ergab, dass in *35S::KCS04-kcs04* nahezu alle Monomere signifikant akkumulieren. Das gleiche Ergebnis wurde in einem unabhängigen Versuch erneut gezeigt (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von *kcs04* (Abbildung 36) sowie der zweiten Linie *kcs04-2* (Daten nicht gezeigt) bestätigte allerdings nicht, dass der Ausfall dieser Elongase zu weniger Suberin führt. Warum vor vier Jahren der Knockout von *KCS04* in drei unabhängigen Versuchen zu einer verminderten Suberinmenge führte und nun nicht mehr, ist unklar. Es wäre vorstellbar, dass sich das Fehlen einer Elongase erst unter bestimmten Bedingungen deutlich macht. Die Pflanzen wurden zwar in Erde des gleichen Herstellers unter gleichen Bedingungen angezogen, jedoch ist bekannt, dass viele Faktoren die Suberinisierung beeinflussen (Schreiber *et al.* 2005a). Es wäre nicht auszuschließen, dass die für diese Versuche genutzte Erde eine andere Qualität aufwies. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Pflanzen vor vier Jahren etwas weniger Wasser bekommen hatten oder das Leitungswasser eine andere Qualität aufwies. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *Arabidopsis* unter ungünstigen Bedingungen (z.B. Salzstress, Trockenheit) mehr Suberin bildet (Daten nicht gezeigt), daher könnten die aufgeführten Faktoren Auswirkungen auf das Suberin haben. Möglicherweise können die restlichen wurzelexprimierten Elongasen das Fehlen von *KCS04* unter „normalen“ Bedingungen kompensieren, kommt es jedoch zu einer Abweichung des „normalen“ Zustandes könnte das Fehlen einer Elongase einen Effekt haben, welcher sich in der Quantität des Suberins widerspiegelt. Die Gesamtmenge an Suberin die damals im Wildtyp detektiert wurde, war ca. um den Faktor zwei höher als bei den jetzigen Suberinanalysen. Eine solche Steigerung lässt sich allerdings nicht auf etwas mehr oder weniger Wasser alleine zurückführen. In der Zwischenzeit wurden Enzymlösungen ausgetauscht, die dazu verwendet werden Zellulose und Pektin abzubauen. Es wäre nicht auszuschließen, dass diese Enzyme mit anderer Effektivität arbeiten. Werden nicht alle unsuberinisierten und unignifizierten Zellwände abgebaut, ist die Bezugsgröße, das Trockengewicht der verdauten Wurzel, größer. Bezieht man nun die analysierte Suberinmenge auf das Gesamtgewicht, so ist im Verhältnis weniger Suberin pro mg Trockengewicht enthalten. Deshalb ist es wichtig, dass die Wurzeln komplett von Erde befreit und im Exsikkator vollständig getrocknet sind. Allerdings wurde dies bei den Analysen beachtet. All

diese Faktoren machen deutlich, dass es sehr wichtig ist, für die Analyse parallel zu den Knockout- Pflanzen auch Wildtyp- Pflanzen exakt gleich zu präparieren. Durch den Vergleich parallel angezogener Pflanzen kann man ausschließen Unterschiede in der Quantität des Suberins als Effekte zu deuten, die jedoch nur auf Unterschiede in der Wassermenge, Qualität der Erde oder Bedingungen in der Klimakammer zurückzuführen sein könnten.

Das Suberin der Wurzeln der Knockout- Pflanzen *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* gleicht dem der Wildtypen (Abbildung 37). Weil für *kcs17* bereits gezeigt wurde, dass das Suberin weniger C₂₂ Monomere aufweist, wohingegen die C₂₀ Monomere akkumulieren (Höfer 2005), wurde diesem Gen eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese zugeschrieben. Zu dieser Erkenntnis passen die ermittelten Expressionsdaten. Zum einen das hohe Expressionslevel in der Wurzel zum anderen die Induzierbarkeit durch verschiedene, zur Suberinisierung führende Stressfaktoren wie Salz-, osmotischer Stress oder Verwundung. Auch für *KCS08*, *KCS11* und *KCS16* ließen sich starke Expressionen in der Wurzel nachweisen (Abbildung 11) und da *KCS11* und *KCS16* durch Verwundung induzierbar sind (Abbildung 30), wurde vermutet, dass der Ausfall dieser Gene zu einem veränderten Suberin führt. *KCS21* hingegen zeigte nur eine schwache Expression in Wurzeln (Abbildung 11) und konnte auch nicht durch Verwundung induziert werden (Abbildung 30). Jedoch führte die Zugabe von Salz oder osmotisch wirksamen Substanzen zu einer stark erhöhten Expression, die vergleichbar zu der von *KCS17* ist (Abbildung 18 und Abbildung 24). Doch auch das Fehlen dieser Elongasen hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und Menge des Suberins.

4.3.2 Analyse des Suberins zehn Tage alter Pflanzen

Die Ergebnisse der Analyse der jungen Wurzeln von *kcs04* entsprachen den Ergebnissen, die 2004 (Briesen) für die fünf Wochen alten Wurzeln erhalten wurden. Fast alle Monomere lagen in verminderter Menge vor (Abbildung 38). Das Wiedereinbringen des Gens mit vorgeschalteten 35S Promotor konnte diese Verminderung weitgehend ausgleichen. Dies und auch das Akkumulieren aller Monomere im Suberin von Überexpressionslinien fünf Wochen alter Pflanzen stützt die These, *KCS04* spiele eine zentrale Rolle in der Suberinbiosynthese. Jedoch konnte das Ergebnis nicht in dem zweiten Knockout- Allel *kcs04-2* nachvollzogen werden, hier zeigten sich keine Einbußen in der Gesamtsuberinmenge. Die Rolle von *KCS04* in der Suberinbiosynthese muss somit in Frage gestellt werden.

Auch das Suberin von zehn Tage alten Keimlingen der neuen Kandidaten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* wurde untersucht (Abbildung 39). Die Vermutung lag nahe, dass das Fehlen einer Elongase im Laufe der Entwicklung von anderen vorhandenen Elongasen kompensiert werden kann. Die Idee war nun, dass der Ausfall einer Elongase in einem sehr frühen Stadium

zu einem Effekt führt, der in späterem Stadium aufgrund von Kompensation durch andere Elongasen nicht mehr erkennbar ist. Jedoch konnte diese Vermutung zumindest für *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS21* nicht bestätigt werden. Das Suberin von zehn Tage alten Wildtyp- und Knockout- Pflanzen unterschied sich kaum. Bei dem Suberin der Knockout- Pflanzen von *KCS08*, *KCS11* und *KCS16*, welche alle stark in jungen Wurzeln exprimiert sind, ist eine leichte Tendenz zur Akkumulation aller Monomere in den jeweiligen Knockout- Linien erkennbar. Dies könnte eventuell so zu deuten sein, dass durch das Fehlen einer Elongase andere stärker induziert werden und es dadurch kurzfristig zu einer Anhäufung der Monomere kommt, die dann allerdings in den alten Wurzeln wieder ausgeglichen wird.

4.3.3 Analyse der Samenlipide

Die Samen von *Arabidopsis* wurden analysiert, da sie zum einen Samenlipide, sehr langkettige Fettsäuren, enthalten und zum anderen die Samenschale suberinisiert ist. Bei den durch die Analyse erhaltenen Substanzen handelte es sich hauptsächlich um die Speicherlipide, die C₁₆ bis C₂₂ Fettsäuren in gesättigter und ungesättigter Form (James *et al.* 1995).

Die Analyse der Samen von *kcs04* sowie zwei unabhängigen *KCS04*- Überexpressionslinien deutete an, dass der Verlust der Elongase zu einer Verminderung der Gesamtmenge führt, wohingegen das Wiedereinbringen und Überexprimieren des Gens diese Verminderung aufhebt und teilweise zu einer Akkumulation führt (Abbildung 40). Dass ein Verlust der Genaktivität von *KCS04* zu einer Verminderung der Gesamtsamenlipide führt, konnte schon gezeigt werden (Briesen 2004) und wurde in diesem Versuch sowie einer unabhängigen Wiederholung bestätigt. Auch dass die Überexpression den Effekt aufheben kann, konnte in einem zweiten Versuch gezeigt werden (Tabelle 26).

Ebenso wurden die Samen von Knockout- Pflanzen der neuen Kandidaten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* analysiert (Abbildung 41). Doch die Zusammensetzung der Samenlipide des Knockouts zeigte im Vergleich zu der des Wildtyps keinen elongasenspezifischen Effekt. Ähnlich wie beim Suberin der zehn Tage alten Pflanzen führt auch hier der Knockout jeder einzelner Elongasen zu einer leichten Akkumulation aller Monomere. Auch hier wäre es vorstellbar, dass durch das Fehlen einer Elongase andere Elongasen hoch reguliert würden bzw. nun mehr Fettsäuren zur Verfügung stehen. Wäre dies der Fall würde man allerdings erwarten, dass alle Lipide der Pflanze in größerer Menge vorliegen, was beispielsweise bei Suberin der fünf Wochen alten Pflanzen nicht der Fall ist.

4.3.4 Analyse des Cutins

Weil das Cutin von *Arabidopsis* sehr langkettige Monocarbonsäuren und deren Derivaten enthält und die Kandidatengene auch eine Expression in oberirdischen Organen zeigten (Abbildung 11), wurde auch das Cutin der jeweiligen Knockout- Pflanzen mit dem des Wildtyps verglichen (Abbildung 42). Bei der Analyse des Cutins konnten alle für *Arabidopsis* typischen Bestandteile gefunden werden (Franke *et al.* 2005).

Die Zusammensetzung des Cutins der Knockout- Pflanzen unterschied sich nicht signifikant von dem des Wildtyps. Für *kcs08*, *kcs16* und *kcs21* könnte der Eindruck entstehen, das Fehlen der jeweiligen Elongase würde zu einer Verminderung aller Substanzen führen. Da diese jedoch nicht signifikant war und bei allen drei untersuchten Kandidaten gleichartig auftrat, ist eine Beteiligung der jeweiligen Elongase an der Cutinbiosynthese nicht klar zu deuten. In *kcs11* akkumulieren tendenziell die Substanzen mit Kettenlängen $\geq C_{24}$, jedoch trifft dies nur für die 2-Hydroxysäuren zu. Bei den Alkoholen und den Monocarbonsäuren ist ein solcher Effekt auf Kettenlängen $\geq C_{24}$ nicht erkennbar. Aufgrund der hohen Standardabweichung müsste die Analyse zunächst wiederholt werden, da jegliche Deutung der vorhandenen Daten sehr spekulativ wäre.

4.3.5 Analyse des Wachses

Das Wachs der Blätter wurde untersucht, weil es langkettige Monocarbonsäuren und deren Derivate enthält. Die Zusammensetzung des Wachses entsprach der in der Literatur beschriebenen Zusammensetzung (Jenks *et al.* 2002). Jedoch war auch hier kein Effekt festzustellen, der auf das Fehlen einer Elongase zurückzuführen wäre (Abbildung 43). Einzig bei *kcs16* lagen die Substanzen mit Kettenlänge C_{35} signifikant vermindert vor. Falls *KCS16* den Schritt von C_{33} zu C_{35} katalysieren würde, könnte man erwarten, dass sich Monomere mit Kettenlängen C_{33} und kleiner anhäufen, weil diese nicht weitergeleitet würden bzw. für diese mehr Acylketten zu Verfügung stünden. Weil allerdings außer der Änderung des C_{35} Alkans keine Änderung signifikant ist, ist eine Deutung recht spekulativ. Zusätzlich wurde auch das Wachs von Blütenständen untersucht (Abbildung 54). Leider war es hier nicht möglich das Alkan mit Kettenlänge C_{35} nachzuweisen. In *kcs08* und *kcs16* waren keine signifikanten Unterschiede im Wachs der Blüten feststellbar. Die Ausnahme bildeten die Ester größer C_{42} , die im Knockout vermindert vorlagen. Auch lagen die Ester in *kcs11* und *kcs21* in verminderter Form vor. Da dieser Effekt bei allen vier Kandidaten auftrat ist es zweifelhaft, dass dieser Effekt auf den Knockout der einzelnen Elongasen zurückzuführen ist.

Die Analyse der Wachse der Blüten zeigte bei *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* noch einen weiteren

Effekt. Die Alkane und Ketone mit Kettenlänge C₂₉ waren, zum Teil signifikant, reduziert. Allerdings waren jeweils die primären Alkohole dieser Kettenlänge nicht verändert. Man könnte hier argumentieren, dass nur der Decarbonylierungspfad beeinträchtigt ist, da die primären Alkohole über den Acyl-Reduktionsweg gebildet werden (Millar *et al.* 1999). Jedoch ist dieser Effekt nur schwach signifikant und die Monomere mit Kettenlänge C₂₉ waren im Wachs des Blattes nicht betroffen. Daher ist eine Deutung schwierig. Um eine Aussage über eine Beteiligung der jeweiligen Elongase an der Synthese von C₂₉- Monomeren zu machen, müsste dieser Versuch mit einer weiteren Knockoutlinie sowie mit Überexpressionslinien wiederholt werden.

4.3.6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Eine Aussage über die Beteiligung der untersuchten KCS- Gene an der Biosynthese von Suberin oder den anderen untersuchten VLCFA Ablagerungen ist nach wie vor schwierig.

Die postulierte Beteiligung von *KCS04* (Briesen 2004) an der Suberinbiosynthese muss revidiert werden. Es konnte zwar gezeigt werden, dass *KCS04* stark in primären Wurzeln exprimiert ist und dass der Knockout und die Überexpression des Gens einen Effekt auf das Suberin haben, jedoch zeigte sich ebenso ein kettenlängenunspezifischer Effekt auf die Samenlipide. Auch die fehlende Induzierbarkeit durch Suberinisierung induzierende abiotische Stressfaktoren spricht gegen eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese. Die Analyse der Wachse und des Cutins lieferten keine weiteren Hinweise auf die Funktion von *KCS04*.

KCS08 zeigte auch eine Expression in der Wurzel, jedoch hatte der Knockout dieser Elongase keinen kettenlängenspezifischen Effekt auf das Suberin. Da auch keine Induktion durch Verwundung feststellbar war ist eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese unwahrscheinlich. Lediglich Salz- und osmotischer Stress führte zu einer leicht erhöhten Transkripthäufigkeit. Dies könnte auf eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese hindeuten, jedoch wäre es auch vorstellbar, das *KCS08* an anderen Prozessen zur Anpassung an Salzstress wie z.B. Modifikation der Membranen oder Bildung von Signallipiden (Xiong 2002) beteiligt ist.

kcs11 hatte keine veränderte Suberinzusammensetzung, auch die Analysen der Samenlipide, des Waches und des Cutins ergaben keine Hinweise auf eine Funktion von *KCS11* an. Salz- und osmotischer Stress hatten keinen Einfluss auf die Expression des Gens. Allerdings konnte gezeigt werden, dass *KCS11* durch Verwundung induziert wird. Dies könnte auf eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese hindeuten. Jedoch werden nach Verwundung auch andere langkettige Fettsäurederivate wie z.B. Oxylipine verstärkt gebildet (Howe und

Schillmiller 2002), so könnte KCS11 auch in diesen Stoffwechselwegen eine Rolle spielen.

Für *KCS16* konnte sowohl eine Induktion nach Salz- und osmotischen Stress als auch nach Verwundung gezeigt werden. Dies ließ auf eine Bedeutung in der Suberinbiosynthese schließen. Jedoch ergaben die Suberinanalysen, dass das Fehlen von *KCS16* keinen Einfluss auf das Suberin hatte. Ebenso konnte für *KCS16* kein Einfluss auf die Biosynthese der Samenlipide, der Wachse oder des Cutins gezeigt werden. Es wäre möglich, dass *KCS16* an der Suberinisierung nach abiotischem Stress beteiligt ist, sich der Knockout des Gens aufgrund von Redundanz der *KCS*- Gene (siehe unten) untereinander nicht auf das Suberin auswirkt. Vorstellbar wäre jedoch auch für dieses Enzym eine Beteiligung an der Bildung von Signallipiden.

KCS17 ist an der Biosynthese des Suberins beteiligt. Analog dazu konnte gezeigt werden, dass *KCS17* durch Verwundung wie auch durch Salz- und osmotischen Stress induziert wird. Durch ein Fehlen von *KCS21* wurde weder die Zusammensetzung des Cutins noch des Wachses beeinflusst. Auch die Suberinanalysen sowie die Samenlipidanalysen ließen nicht auf eine Funktion von *KCS21* in der jeweiligen Biosynthese schließen. Die Microarraydaten zeigten für dieses Gen eine deutliche Induktion durch Salz- und osmotischen Stress. Da die erhöhte Expression allerdings nur in oberirdischen Organen auftrat und das Suberin von *kcs21* nicht verändert war, kann man daraus nicht auf eine Bedeutung in der Suberinbiosynthese schließen. Vielmehr hat es den Anschein als wäre dieses Gen in anderen Prozessen beteiligt, die zur Anpassung an Salz- und osmotischen Stress führen. Vorstellbar wäre das die Produkte von *KCS21* in andere Stoffwechselwege (z.B. Bildung von Signallipide), die zur Anpassung an Salz- und osmotischen Stress führen (Xiong *et al.* 2002), geleitet werden.

Die Analysen des Suberins, des Cutins, der Samenlipide und auch der Wachse ließen für keine der untersuchten Knockoutlinien einen kettenlängenspezifischen Effekt erkennen. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Möglich wäre, dass die 21 Elongasegene untereinander redundant sind. Wie bereits erwähnt, weißt *kcs17* weniger C₂₂ Bausteine auf, jedoch führt der Knockout nicht zu einem gänzlichen Verlust der Substanzen mit Kettenlänge C₂₂. Möglich wäre, dass das Enzym *KCS19*, welches auf Aminosäureebene zu 87% homolog zu *KCS17* ist (siehe Anhang Tabelle 44), den Verlust teilweise kompensiert. Diese These wird durch die Ergebnisse von Trenkamp *et al.* (2004) gestützt. Sie konnten durch heterologe Expression in Hefe zeigen, dass *KCS17* und *KCS19* ein nahezu identisches Substratspektrum haben und sich Substanzen der gleichen Kettenlängen in den jeweiligen Hefen anreichern. Um diese These zu stützen, sollte überprüft werden, ob sich die Expression der anderen Elongasen in

einem Knockout ändert, beispielsweise ob in *kcs17 KCS19* stärker exprimiert wird. Dazu wurde bereits ein Macroblot angefertigt, welcher allerdings aus Zeitgründen noch nicht zu Ende gebracht werden konnte. Allerdings ist fraglich, ob eine Erhöhung der Expression überhaupt aussagekräftig ist, weil das Expressionslevel aufgrund von posttranskriptionalen Modifikationen nicht zwangsweise etwas über die Enzymaktivität aussagt.

Auch *KCS04*, *KCS11*, *KCS16* und *KCS21* wurden heterolog in Hefe exprimiert (Blacklock und Jaworski 2006). Allerdings zeigten *KCS04*, *KCS16* und *KCS21* keine oder nur geringe Aktivität. Möglicherweise waren für diese Enzyme nicht die richtigen Substrate oder sonstige Kofaktoren vorhanden. Für *KCS11* hingegen konnte ein sehr weites Substratspektrum gezeigt werden. Es wurden sowohl gesättigte wie auch ungesättigte Acylketten umgesetzt. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust dieses Genes keinen Einfluss auf die untersuchten VLCFA Ablagerung hat.

Paul *et al.* konnten 2006 die Beteiligung von *KCS17* an der Bildung von VLCFA weiter stützen. In Hefen sind keine *KCS*-Homologe zu finden. Die Verlängerung der Fettsäuren wird durch die ELO Proteine bewerkstelligt. Es konnte gezeigt werden, dass *Elo2p* und *Elo3p* für die Bildung von VLCFA nötig sind. Doppelmutanten, die weder *Elo2p* noch *Elo3p* besitzen, sind nicht überlebensfähig. Paul *et al.* demonstrierten 2006, dass *KCS17* den Verlust der beiden *Elo* Proteine kompensieren kann, dies bedeutet, dass *KCS17* die Verlängerung der vorhandenen C_{16} Substrate, trotz gezeigter Spezifität für C_{20} - Acylketten, katalysiert. Es wurde auch überprüft ob *KCS04* und *KCS11* die Letalität der Doppelmutante aufheben können (Paul *et al.* 2006). Allerdings versagten beide Enzyme, woraus man schließen könnte, dass *KCS04* und *KCS11* nicht in der Lage sind das in der Hefe vorhandene Substrat (C_{16}) zu verlängern. Dem widerspricht allerdings, zumindest für *KCS11*, das Ergebnis von Blacklock und Jaworski (2006). Hier konnte gezeigt werden, dass *KCS11* in der Lage war C_{16} Substrate umzusetzen.

Weil mindestens sieben der 21 Elongasen in der Wurzel exprimiert sind und für einige gezeigt werden konnte, dass sie über ein ähnliches Substratspektrum verfügen, wäre es interessant Doppelmutanten zu analysieren. Es wurden bereits Kreuzungen aller wurzelexprimierten Kandidaten vorgenommen. Leider konnte in der zur Verfügung stehenden Zeit noch kein, bezüglich beider Gene, homozygoter Knockout nachgewiesen werden. Um die Frage nach einer Beteiligung der *KCS* an der Anpassung an Salz- oder osmotischen Stress zu klären, wäre es sinnvoll auch in der RT-PCR kürzere Zeitintervalle (siehe AtGenExpress) zu wählen, sowie die Proben in oberirdisch und unterirdische Organe aufzuteilen. Die Ergebnisse der Microarraydaten deuten an, dass manche Gene sehr schnell stärker exprimiert werden und der

Effekt nach vier Stunden nicht mehr sichtbar ist. Die Unterteilung in verschiedene Organe könnte Aufschluß darüber geben, in welche Prozesse ein induziertes Gen in der Anpassung an den abiotischen Stress involviert ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die Knockout Pflanzen parallel zum Wildtyp auf Salzmedium anzuziehen. Bei Anzucht unter „normalen“ Bedingungen zeigten die Knockout- Pflanzen keine phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp. Jedoch könnte nach Ausfall einer Elongase, welche an der Anpassung an Salzstress beteiligt ist ein phänotypischer Effekt deutlich werden. Interessant wäre es vor allem Doppelmutanten zu analysieren. Da es aufgrund der möglichen Redundanz der *KCS* möglich wäre, dass erst durch Ausschalten von zwei Genen ein phänotypischer Effekt sichtbar wird.

Ein Ansatz der Funktion der *KCS* nach Verwundung näher zu kommen wäre mittels unterschiedlicher Verwundungsgrade zu überprüfen, ob die Knockout- Pflanzen, vor allem *kcs11*, *kcs16* und *kcs17* bzw., Doppelmutanten der korrespondierenden Gene anfälliger gegenüber Verwundungen sind als der Wildtyp. Interessant wäre es außerdem das Wundperiderm der Knockout- Pflanzen bzw. der Doppelmutanten, vor allem der Gene *KCS11*, *KCS16* und *KCS17* zu analysieren, um herauszufinden welchen Einfluss das Fehlen der durch Verwundung induzierten Gene auf das Suberin hat. Bisher ist es jedoch nicht möglich das Suberin der verwundeten Stellen der Blätter zu analysieren. Problematisch ist zum einen, dass sich die Zusammensetzung von Suberin und Cutin sehr ähneln. Als Marker für Suberin können lediglich die ω -Hydroxysäuren genutzt werden, da diese nur gering im Cutin vorkommen (Franke *et al.* 2005). Zum anderen ist verglichen zu der Cutinmenge der Blätter die Suberinmenge rund um die Verwundung verschwindend gering. Die Verwundung wurde mit Nadeln von ca. 0,5 mm Durchmesser durchgeführt. Pro cm² Blatt wurden ca. 15 Nadeln eingesetzt. Das bedeutet, dass pro cm² nur ca. 23,6 mm des Blattes nach Verwundung durch ein Wundperiderm abgedichtet wurden. Es müsste näher untersucht werden, wie viel Prozent des Blattes verwundet werden können, um eine für eine Analyse ausreichende Menge an suberinisiertem Material zu erhalten, ohne das dies für das Blatt letal ist.

Ein weiterer Ansatz um der Funktion der Elongasen näher zu kommen, ist die Analyse von Pflanzen, die das jeweilige Gen überexprimieren. Daher wurden bereits für alle Kandidaten Überexpressionslinien hergestellt allerdings konnte bisher aus Zeitgründen nur die Überexpressionslinien von *KCS04* untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Familie der β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (KCS) katalysieren den entscheidenden Schritt in der Synthese der sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA). Diese stellen die Vorläufermoleküle physiologisch wichtiger Barrieren, wie Cutin und Suberin, dar. Suberin ist in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* zu finden, daher wurden die KCS ausgewählt, die eine Expression in der Wurzel aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnten sechs der 21 KCS- Gene charakterisiert und somit der Grundstein gelegt werden, die Funktion der KCS in der Suberinbiosynthese zu klären.

Die Rolle von KCS17 in der Suberinbiosynthese wurde durch die Tatsache bestätigt, dass KCS17 durch zur Suberinisierung führende Faktoren wie Salzstress oder Verwundung induziert wird. Die postulierte Beteiligung von KCS04 an der Biosynthese des Suberins muss in Frage gestellt werden. KCS04 ist zwar eindeutig in den Wurzeln exprimiert, jedoch sprechen sowohl die Stress- Expressionsstudien als auch die analytischen Daten gegen eine Rolle des Enzyms in der Suberinbiosynthese. Trotz der Wurzelspezifität von KCS08, KCS11 und KCS16 wurde in Knockout- Pflanzen der jeweiligen KCS kein Effekt auf das Suberin der Wurzeln beobachtet. Darüber hinaus wurden auch Cutin, Samenlipide und Wachs untersucht. Jedoch war es, wie auch beim Suberin, nicht möglich einen Effekt zu entdecken, der auf das Fehlen einer KCS zurückzuführen wäre.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die untersuchten Gene an der Suberinbiosynthese beteiligt sind. KCS21 zeigt zwar keine starke Expression in der Wurzel, ist jedoch deutlich durch Salz- und osmotischen Stress induziert. KCS11 und KCS16 werden nach Verwundung induziert. Da gezeigt werden konnte, dass *Arabidopsis* bei Salzstress die Suberinmenge in den Wurzeln verdoppelt, bzw. verletzte Stellen mit einem Wundperiderm abdichtet, spricht dies für eine Beteiligung an der Biosynthese von Suberin. Dass der Verlust einer KCS keinen Einfluss auf das Suberin in der Knockout- Pflanze hat, könnte durch Redundanz der KCS- Gene erklärbar sein. Dies wird von der Tatsache gestützt, dass mindestens sechs KCS- Gene (KCS01, KCS04, KCS08, KCS11, KCS16 und KCS17) in der Wurzel exprimiert sind. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die untersuchten Gene nicht in der Suberinbiosynthese, sondern möglicherweise an anderen Prozessen zur Anpassung an die abiotischen Stressbedingungen, wie die Bildung von Signallipiden, beteiligt sind.

6 Summary

β -ketoacyl-CoA-synthases (KCS) are catalysing the rate limiting step in the synthesis of very long chain fatty acids (VLCFA) which are the precursors for the physiological important barriers cutin and suberin. Suberin can be found in the roots of *Arabidopsis thaliana*, for this reason root expressed KCS were chosen for further investigations.

In this thesis six of the 21 KCS- genes were characterized and by that the foundation was build to clarify the function of the KCS in suberin biosynthesis.

The role of KCS17 in suberin biosynthesis was confirmed, because the expression of *KCS17* could be induced by factors know to induce suberinisation like salt stress and wounding. The postulated role of KCS04 in suberin biosynthesis has to be put in question. Although *KCS04* is expressed in roots the role of KCS04 in suberin biosynthesis is not supported by the stress expression studies and the analytical studies. Despite the shown root specificity for *KCS08*, *KCS11* and *KCS16* no effect on the suberin in each knockout- plant could be shown. Furthermore cutin, seed lipids and waxes were analysed. But the results didn't show an effect based on the lack of one KCS.

Anyhow this doesn't exclude an involvement of the investigated genes in suberin biosynthesis. *KCS21* is not expressed in roots but strongly induced by salt and osmotic stress. *KCS11* and *KCS16* are induced by wounding. It could be shown that *Arabidopsis* doubles the suberin content in roots after salt stress and seals wounded areas with a wound periderm. These two facts and the induction of the KCS- genes argue for an involvement of the chosen genes in suberin biosynthesis. The reason for the lacking effect in knockout- plants could be based on redundancy of the KCS. This is supported by the fact that at least six KCS- genes (*KCS01*, *KCS04*, *KCS08*, *KCS11*, *KCS16* and *KCS17*) are expressed in roots.

However it has to be considered that the investigated genes are not involved in suberin biosynthesis, but in different processes in adaptation to the abiotic conditions, for example the synthesis of signal lipids.

7 Literatur

- Azachi M, Sadka A, Fisher M, Goldschlag P, Gokhman I, Zamir A** (2002) Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 129: 1320-1329
- Becker M, Kerstiens G, Schönherr J** (1986) Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees* 1: 54-60
- Beisson F, Yonghua L, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB** (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 351-368
- Bernards MA, Lewis NG** (1998) The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry* 47: 915-933
- Bernards MA, Razem FA** (2001) The poly (phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cellwall biopolymer. *Phytochemistry* 57: 1115-1122
- Bernards MA** (2002) Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80: 227-240
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 302: 1956-1960
- Blacklock BJ, Jaworski JG** (2006) Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 346: 583-590
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S** (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Biotechnology* 24: 153-171
- Boudet AM** (2000) Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 81-96
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo SJ, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K** (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology* 18: 630-634

- Briesen I** (2004) Chemische Zusammensetzung und Funktion von Suberin in *Arabidopsis* wurzeln: Charakterisierung einer Insertionsmutante im Elongasegen At1g19440. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Broun P, Boddupalli S, Somerville C** (1998) A bifunctional oleate 12-hydroxylase: desaturase from *Lesquerella fendleri*. *Plant Journal* 13: 201-210
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA** (1991) Efficient lipid staining in plant-material with Sudan Red 7B or Fluorol Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* 66: 111-116
- Clough J, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes. *Plant Physiology* 133:462-469
- De Block M, Debrouwer D** (1992) In-situ enzyme histochemistry on plastic embedded plant material. The development of an artefact-free β -glucuronidase assay. *Plant Journal* 2: 261-266
- Di Laurenzio L, Wysockadiller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423–433
- Emsermann M** (2007) Charakterisierung einer Insertionsmutante im Elongasegen At5g43760. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Enstone DE, Peterson CA, Ma FS** (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351
- Espelie KE, Sadek NZ, Kolattukudy PE** (1980) Composition, ultrastructure and function of the cutin- suberin-containing layers in the leaf, fruit, peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradise* Macfed.). *Planta* 149: 498-511
- Espelie KE, Wattendorff J, Kolattukudy PE** (1982) Composition and ultrastructure of the suberized cell wall of isolated idioblasts from *Agave americana* L. leaves. *Planta* 155: 166-175
- Fehling E, Mukherjee KD** (1991) Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochimica et biophysica acta* 1082: 239-246

- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L** (2005) Apoplastic surface tissues – a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66: 2643-2658
- Graça J, Pereira H** (1997) Cork suberin: a glyceryl based polyester. *Holzforschung* 51: 225-234
- Graça J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H** (2002) Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61: 205-215
- Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch F, Hetherington FM** (2000) The *HIC* signaling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408: 713-716
- Höfer R** (2005) Charakterisierung einer Insertionsmutante im Elongasegen At1g04220. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Hooker TS, Millar AA, Kunst L** (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for the cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 1568-1580
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W** (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* 52: 2245-2264
- Howe GA und Schillmiller AL** (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 230-236
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23–28
- James DW, Lim E, Keller J, Plooy I, Dooner HK** (1995) Directed tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation 1 (*FAEI*) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* 7: 309-319
- Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B** (2002) *Cuticular Waxes of Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book, American Society of Plant Biologists
- Kerstiens G** (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47: 1813-1832
- Kolattukudy PE** (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208: 990-1000

- Krampitz M** (2006) Charakterisierung des Ketoacyl-Synthase-Gens *KCSI* in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Kroemer K** (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibliotheca Botanica* 59: 1-148
- Kunst L, Samuels AL** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42: 51-80
- Lewis NG, Yamamoto E** (1990) Lignin - Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 455-496
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Analysis of *SCARECROW* expression using a rapid system for assessing transgene expression in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 12: 957-963
- Millar AA, Kunst L** (1997) Very-long chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant Journal* 12: 121-131
- Millar AA, Clemens S, Zachgo S, Giblin EM, Taylor DC, Kunst L** (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11: 825-838
- Moerschbacher BM, Noll U, Gorrichon L, Reisener H-J** (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiology* 93: 465-470
- Moire L, Schmutz A, Buchala A, Yan B, Stark RE, Ryser U** (1999) Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiology* 119: 1137-1146
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 18: 100-127
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311
- Nawrath C** (2002) The biopolymers cutin and suberin. In: *The Arabidopsis Book, Metabolism*. Editoren Somerville CR und Meyerowitz EM. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA. DOI: 10.1199/tab.0021
- Odell JT, Nagy F, Chua NH** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812

- Ohl S, Hedrick SA, Chory J, Lamb CJ** (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 837-848
- Paul S, Gable K, Beaudoin F, Cahoon E, Jaworski J, Napier JA, Dunn TM** (2006) Members of the *Arabidopsis* FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 9018-9029
- Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG** (2006) Optical properties of plant surfaces. *Annual Plant Reviews* 23: 216-249
- Pinot F, Bosch H, Alayrac C, Mioskowski C, Vendais A, Durst F, Salaun JP** (1993) Omega-Hydroxylation of oleic acid in *Vicia sativa* microsomes: Inhibition by substrate analogs and inactivation by terminal acetylenes. *Plant Physiology* 102: 1313-1318
- Pinot F, Benveniste I, Salaun JP, Loreau O, Noel JP, Schreiber L, Durst F** (1999) Production *in vitro* by the cytochrome P450 CYP94A1 of major C-18 cutin monomers and potential messengers in plant-pathogen interactions: enantioselectivity studies. *Biochemical Journal* 342: 27-32
- Reinhardt DH, Rost TL** (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* 35: 563-574
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52: 2023-2032
- Schönherr J, Eckl K, Gruler H** (1979) Water permeability of plant cuticles: the effect of temperature on diffusion of water. *Planta* 147: 21-26
- Schönherr J, Riederer M** (1989) Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 108: 1-70
- Schreiber L, Breiner HW, Riederer M, Düggelin M, Guggenheim R** (1994) The casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: isolation, fine structure and chemical nature. *Botanica Acta* 107: 353-361
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J** (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* 50: 1267-1280

- Schreiber L, Franke R, Hartmann K** (2005a) Effects of NO₃ deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizo- and hypodermal (RHCW) and endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. *Plant and Soil* 269: 333-339
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K** (2005b) Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* 220: 520-530
- Sena G, Jung JW, Benfey PN** (2004) A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 131: 2817-2826
- Steudle E** (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 51: 1531-1542
- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH** (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal* 35: 452-464
- Todd J, Post-Beitenmiller D, Jaworski JG** (1999) *KCSI* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 17: 119-130
- Trenkamp S, Martin W, Tietjen K** (2004) Specific and differential inhibition of very long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11903-11908
- Vogt E, Schönherr J, Schmidt HW** (1983) Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* 158: 294-301
- Von Wettstein-Knowles PM** (1982) Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiologie Végétale* 20: 797-809
- Walton TJ** (1990) Waxes, cutin and suberin. *Methods in Plant Biochemistry* 4: 106-158
- Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A** (2001) Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega-hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 9694-9699

- Wilson CA, Peterson CA** (1983) Chemical composition of the epidermal, hypodermal, endodermal and intervening cortical cell walls of various plant roots. *Annals of Botany* 22: 759-769
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 165-183
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1993a) *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation responsive *rd29* genes. *Plant Physiology* 101: 1119-1120
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1993b) Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 236: 331-40
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264
- Yang W, Bernards MA** (2006) Wound induced metabolism of fatty acids in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Plant Signaling and Behavior* 1:59-66
- Yephremov A, Wisman E, Huijser P, Huijser C, Wellesen K, Saedler H** (1999) Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* 11: 2187-2202
- Zeier J, Schreiber L** (1997) Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*: identification of the biopolymers lignin and suberin. *Plant Physiology* 113: 1223-1231
- Zhu JH, Verslues PE, Zheng XW, Lee B, Zhan XQ, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu YM, Dong CH, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA** (2005) *HOS10* encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9966-9971
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E** (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302-311
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-2632

8 Anhang

8.1 Tabelle der *KCS* aus *Arabidopsis*

Tabelle 10 Die *KCS*-Familie aus *Arabidopsis*

Aufgelistet ist der in der Arbeit verwendete Name, der dazugehörige AGI- Code und gegebenenfalls der Name unter dem das Gen publiziert wurde.

in dieser Arbeit verwendeter Name	Arabidopsis Gen Index (AGI)	publiziert unter
<i>KCS01</i>	At1g01120	<i>KCS1</i>
<i>KCS02</i>	At4g34510	<i>KCS2</i>
<i>KCS03</i>	At1g07720	
<i>KCS04</i>	At1g19440	<i>SUE</i>
<i>KCS05</i>	At1g25450	<i>CER60</i>
<i>KCS06</i>	At1g68530	<i>CER6/CUT1</i>
<i>KCS07</i>	At1g71160	
<i>KCS08</i>	At2g15090	
<i>KCS09</i>	At2g16280	
<i>KCS10</i>	At2g26250	<i>FDH</i>
<i>KCS11</i>	At2g26640	
<i>KCS12</i>	At2g28630	
<i>KCS13</i>	At2g46720	<i>HIC</i>
<i>KCS14</i>	At3g10280	
<i>KCS15</i>	At3g52160	
<i>KCS16</i>	At4g34250	
<i>KCS17</i>	At1g04220	<i>DAISY</i>
<i>KCS18</i>	At4g34520	<i>FAE1</i>
<i>KCS19</i>	At5g43760	<i>DAISYII</i>
<i>KCS20</i>	At5g49070	
<i>KCS21</i>	At5g04530	

8.2 Verwendete Lösungen und Medien

DEPC-Wasser:

50 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat) in 50 ml H₂O demin.

Inkubation für mindestens 120 Minuten auf der Rollbank, anschließend autoklavieren

Fixerlösung:

10 X PBS-Puffer

Formaldehyd (3,7%; v/v)

Inokulationsmedium

5% Saccharose

0,05% Silwet L-77

Leitungswasser

MS-Agar (verändert nach Murashige und Skoog 1962):

20,63 mM NH₃NO₃

18,8 mM KNO₃

4,0 mM CaCl * 2 H₂O

3,1 mM MgSO₄ * 7 H₂O

1,0 mM KH₂PO₄

0,13 mM MnSO₄ * H₂O

0,03 mM ZnSO₄ * 7 H₂O

0,1 mM H₃BO₃

5 µM KJ

1 µM Na₂MnO₄ * 2 H₂O

0,1 µM CaSO₄ * 5 H₂O

0,2 µM CaCl * 6 H₂O

43,8 mM Saccharose

0,1 mM Na₂EDTA

0,1 mM FeSO₄ * 7 H₂O

0,23 mM Myoinosit

13 µM Glycin

2 µM Nicotinamid

1 µM Vitamin B6

74 nM Thiamin

5,7 µM K₂SO₄

Agar (0,7% w/v)

H₂O

RNA-Extraktionspuffer:

1 ml LiCl (10 M)

10 ml Tris-HCl (1 M; pH 8)

2 ml EDTA (0,5 M; pH8)

10 ml SDS (10% w/v)

77 ml H₂O

100 ml Phenol

Samensterilisationslösung

7,5% v/v NaOCl

0,01% v/v Triton-X

H₂O

SOB-Medium:

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

2,5 mM KCl

SOC-Medium:

SOB-Medium

0,01 mM MgCl₂

0,02 mM Glukose (steril filtriert)

Auffüllen auf einen Liter mit H₂O, pH 7,
autoklavieren**TE-Puffer:**

10 mM Tris HCl

pH 8

1 mM EDTA

TriReagent:

0,4 M Ammonium Thiocyanat

0,8 M Guanidin Thiocyanat

0,1 M Natrium Acetat

5% Glycerin

38% Phenol (v/v)

pH 5

LB-Agar „Luria Broth“-Agar:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

10 g Agar

Auffüllen auf einen Liter mit H₂O, pH 7,2,
autoklavieren**LB-Medium „Luria Broth“:**

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Auffüllen auf einen Liter mit H₂O, pH 7,2,
autoklavieren**PBS-Puffer:**10 mM Na₃PO₄

137 mM NaCl

2,7 mM w/v KCl

pH 7,4

H₂O**X-Gluc-Puffer (Debrouwer und de Block 1992):**8,5 ml 1M NaH₂PO₄11,5 ml 1M Na₂HPO₄

4 ml 0,5 M EDTA, pH 8

235 mg Kaliumferrocyanid

Mit H₂O auf 200 ml auffüllen, auf pH 7
einstellen.

1 mM X-Gluc

1% 10% Triton X-100

6 X Ladepuffer:

0,1% Bromphenolblau

40% Saccharose

10 X PCR- Puffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8.8)

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

8.3 Chemikalienliste

Tabelle 11: Chemikalienliste

Reagenz	Reinheitsgrad	Zulieferer
Isopropanol BSTFA	≥ 99,9% zur Synthese	Roth, Karlsruhe Macherey-Nagel, Düren
Isoamylalkohol Methanol	≥ 98% zur Synthese Rotisolv® HPLC Gradient Grade	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
Pyridin Chloroform	Puriss, absolut, ≥ 0,005 H ₂ O Rotisolv® HPLC Gradient Grade	Fluka, Taufkirchen Roth, Karlsruhe
Hexan Ethanol	Rotisolv® ≥ 99% Pestilyse Technical Grade ≥ 99,8% mit 1% MEK, vergällt	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe

8.4 Primer

Tabelle 12: Verwendete Primer

Aufgeführt sind die verwendeten Primer geordnet nach Einsatzgebiet. Zusätzlich aufgeführt sind das jeweilige Zielgen und die Größe des durch die Primer erhaltenen Amplicons.

forward	reverse	Zielgen	Amplicon [bp]
<u>Nachweis des transkriptionellen Knockouts bzw. der Überexpression</u>			
LS023	LS067	<i>KCS04</i>	610
LS074	LS193	<i>KCS08</i>	1370
LS040	LS041	<i>KCS11</i>	870
LS044	LS045	<i>KCS16</i>	929
LS098	LS195	<i>KCS21</i>	1120
LS096	LS100	<i>ACTIN</i>	480
<u>Stressexperimente (Verwundung, Salz, PEG)</u>			
LS023	LS067	<i>KCS04</i>	610
LS074	LS189	<i>KCS08</i>	758
LS040	LS041	<i>KCS11</i>	870
LS088	LS268	<i>KCS16</i>	832
LS158	LS159	<i>KCS17</i>	655
LS098	LS195	<i>KCS21</i>	1120
LS096	LS100	<i>ACTIN</i>	480
<u>Gateway- Klonierung</u>			
LS140	LS141	<i>KCS04</i>	1618
LS142	LS143	<i>KCS04</i>	1559
LS214	LS215	<i>KCS08</i>	1326
LS212	LS213	<i>KCS11</i>	1306
LS210	LS211	<i>KCS16</i>	1611
LS208	LS209	<i>KCS21</i>	1359
LS317	LS318	<i>SCR</i>	2558

**Tabelle 13: Auflistung aller verwendeter Primer mit der jeweiligen Sequenz
Gatewayadapter sind fett markiert.**

Name	Sequenz (5' nach 3')
LS022	TTGGTGGGTCTTCGTCAAAGC
LS023	GCAAGATCCACAGCGATAACTCC
LS040	TGTCACCGATCTTCGTAGCCTC
LS041	TCACCCGCAACAGCCATAAGT
LS044	TTGTGAGTTTTCTGTGATTATGA
LS045	CTGGGTGCTGGCTTTGAGATG
LS067	GTTTATTCCCTCTCGCCGTTGTTA
LS074	GCAGGATTAGCCATGAAAGGAT
LS088	AGGCGTCTCGTCTTCCACA
LS096	GTGATGATGCCCCGAGAGC
LS098	GGAAACGTACGGCCCAAGAAAT
LS100	GACCCGCAAGATCAAGACGA
LS140	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGTTTTCTCAATGGACGGTG
LS141	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATAACTTAAAGTTACCGGATACTTGTC
LS142	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGAGGCCAAGAATTTG
LS143	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGAGAAAACAAAGTTTG
LS158	TCTCTTCGCCGCTCTTCTTATCTT
LS159	AGCGGTCGGAGGAGCGGTTAG
LS189	AGAACCGCAGCACCACCAAC
LS193	CTATCCATACAGTCTTCCCATG
LS195	GTATCGTCGTTGATCCAATC
LS208	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAAGGGTCATGAGACATTAC
LS209	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGGAAGAAAGAAACAGAG
LS210	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGTTAGGGTAAAGTCATC
LS211	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTTTAGTGATTTAAATTC
LS212	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCTTAAACTAACGCAGCGG
LS213	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATAGCTTCCTTCTTCTCT
LS214	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCTCTAAAATGTTATTGGAGC
LS215	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTGGAGATAACCTAAGAGT
LS268	GCACATTCATAGGATCGGTCATC
LS317	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGAGATTGAAGGGTTGTT
LS318	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATTTGAATCCATTCTC
M13 for	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabelle 14: Auflistung der bearbeiteten Gene mit Salk Notation, *Arabidopsis* Gen Index (AGI) und Name der genutzten Bacs
Die Bacs wurden über TAIR (ABRC) bezogen.

Gen	AGI	Salk	BAC
<i>KCS04</i>	At1G19440	Salk_095739	f18o14
<i>KCS08</i>	At2G15090	Salk_055908	t15j14
<i>KCS11</i>	At2G26640	Salk_129099	f18a8
<i>KCS16</i>	At4G34250	Salk_035139	f10m10
<i>KCS21</i>	At5G04530	Salk_030654	t32m21
<i>ACTIN</i>	At5G09810		
<i>PAL</i>	At2G37040		
<i>RD29A</i>	At5G52310		

8.5 Berechnung der Schmelztemperatur von PCR-Primern

Die Schmelztemperatur (T_M) der Primer wurde wie folgt berechnet:

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69,3 + 41 \left(\frac{\sum G + \sum C}{\sum \text{Basen}} \right) - (650 - \sum \text{Basen})$$

G = Guandin

C = Cytosin

Basen = Alle Nucleotidbasen

8.6 Berechnung der Anlagerungs-Temperatur einer PCR

Um die Temperatur zu ermitteln, bei der die Primer an die Matrize anlagern wurden jeweils von dem Primer mit der niedrigsten Schmelztemperatur zwei Grad Celsius abgezogen.

8.7 Verwendete Vektoren

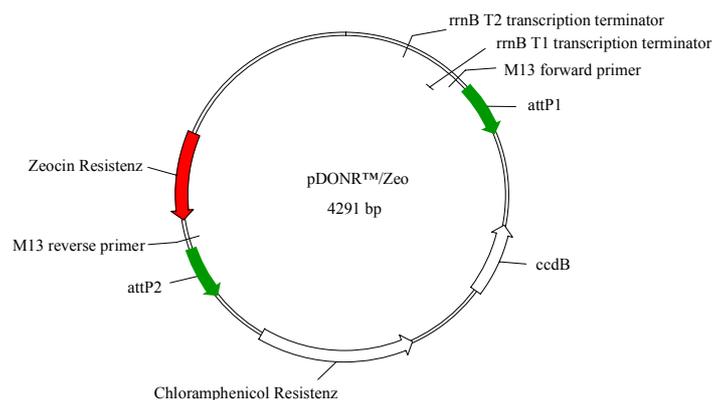


Abbildung 44: Vektorkarte des Donorvektors

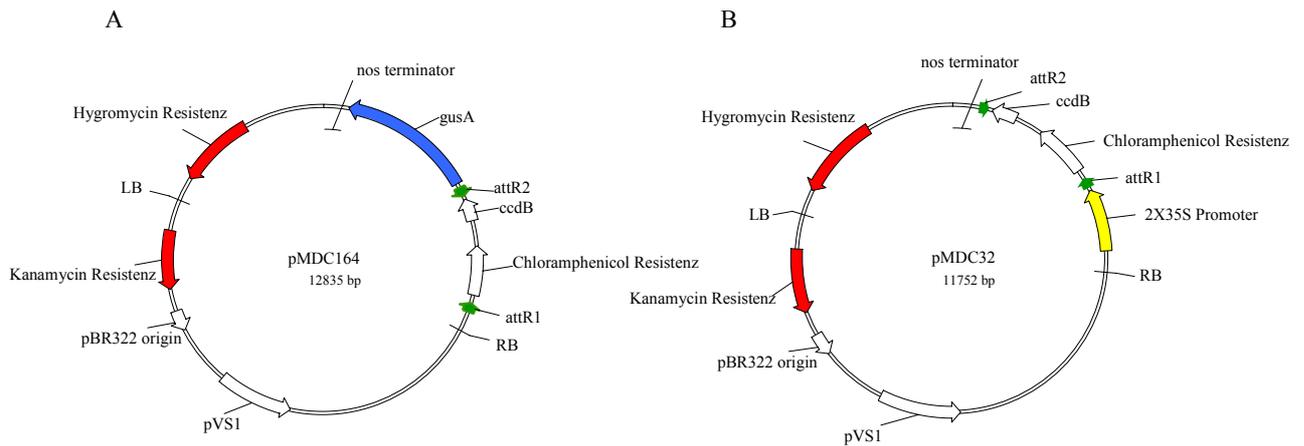


Abbildung 45: Vektorkarten der Zielvektoren

8.8 Promotor-Reportergen- Studien

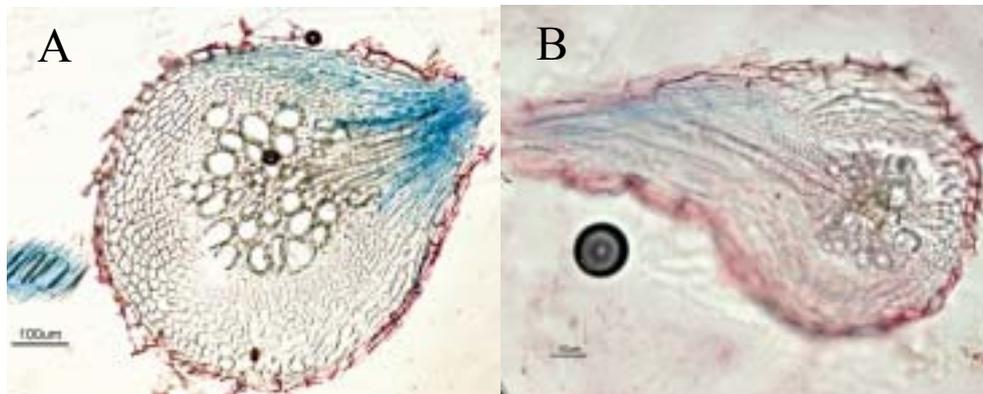


Abbildung 46: Querschnitt einer *Prom_{KCS11}-GUS*- Wurzel (A) und einer *Prom_{KCS16}-GUS*- Wurzel (B). Die Pflanzen wurden in GUS-Lösung inkubiert und die Schnitte mit Sudan 7B gefärbt.

8.9 DNA- Größenmarker

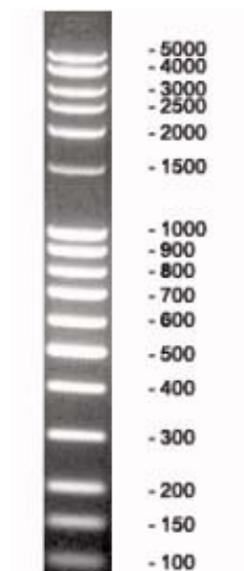


Abbildung 47: 100 bp DNA Größenmarker (Roth, Karlsruhe; www.carlroth.com)

8.10 Analytische Daten

8.10.1 Analyse des Suberins der Wurzeln fünf Wochen alter *Arabidopsis*- Pflanzen

Tabelle 15: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter *kcs04*- und *35S::KCS04-kcs04*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der jeweiligen Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs04</i>		t-Test	<i>35S::KCS04-kcs04</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	a=0,05	MW	STABW	a=0,05
	µg/mg		µg/mg			µg/mg		
Säuren	1,019	0,009	0,799	0,079	0,060	1,997	0,451	0,062
C ₁₆ Säure	0,196	0,118	0,103	0,031	0,392	0,125	0,109	0,537
C ₁₈ Säure	0,010	0,003	0,010	0,002	0,920	0,024	0,006	0,067
C ₂₀ Säure	0,198	0,072	0,163	0,006	0,561	0,398	0,082	0,069
C ₂₂ Säure	0,492	0,059	0,422	0,030	0,272	1,168	0,257	<u>0,040</u>
C ₂₄ Säure	0,123	0,008	0,101	0,014	0,200	0,282	0,055	<u>0,031</u>
Alkohole	0,268	0,065	0,240	0,022	0,621	0,616	0,112	0,031
C ₁₈ Alkohol	0,090	0,030	0,075	0,011	0,570	0,194	0,038	<u>0,049</u>
C ₂₀ Alkohol	0,137	0,031	0,130	0,008	0,768	0,321	0,058	<u>0,028</u>
C ₂₂ Alkohol	0,041	0,005	0,035	0,003	0,275	0,101	0,019	<u>0,024</u>
ω-OH-Säuren	3,631	1,348	3,568	0,451	0,956	7,391	1,205	0,046
C ₁₆ ω-OH-Säure	0,480	0,218	0,481	0,083	0,992	0,959	0,167	0,066
C ₁₈ ω-OH-Säure	0,165	0,057	0,146	0,021	0,690	0,290	0,029	<u>0,043</u>
C _{18:1} ω-OH-Säure	2,341	0,934	2,338	0,310	0,997	4,769	0,845	0,056
C ₂₀ ω-OH-Säure	0,167	0,055	0,164	0,033	0,955	0,354	0,051	<u>0,029</u>
C ₂₂ ω-OH-Säure	0,369	0,073	0,327	0,009	0,502	0,836	0,124	<u>0,019</u>
C ₂₄ ω-OH-Säure	0,065	0,005	0,062	0,002	0,484	0,133	0,021	<u>0,024</u>
C ₂₆ ω-OH-Säure	0,044	0,007	0,050	0,003	0,394	0,051	0,001	0,185
α,ω-Disäuren	1,680	0,498	1,621	0,183	0,888	3,929	0,687	0,030
C ₁₆ Disäure	0,376	0,135	0,379	0,078	0,984	0,890	0,148	<u>0,030</u>
C ₁₈ Disäure	0,217	0,087	0,195	0,023	0,765	0,457	0,083	0,052
C _{18:1} Disäure	0,935	0,229	0,902	0,081	0,862	2,239	0,412	<u>0,029</u>
C ₂₀ Disäure	0,064	0,023	0,057	0,002	0,701	0,135	0,024	<u>0,046</u>
C ₂₂ Disäure	0,087	0,023	0,088	0,000	0,972	0,208	0,035	<u>0,026</u>
2-OH Säuren	0,051	0,004	0,043	0,004	0,251	0,072	0,005	0,015
C _{24:2} 2-OH-Säure	0,051	0,004	0,043	0,004	0,251	0,072	0,005	<u>0,015</u>
Gesamt	6,649	1,925	6,272	0,573	0,815	14,005	2,275	0,034

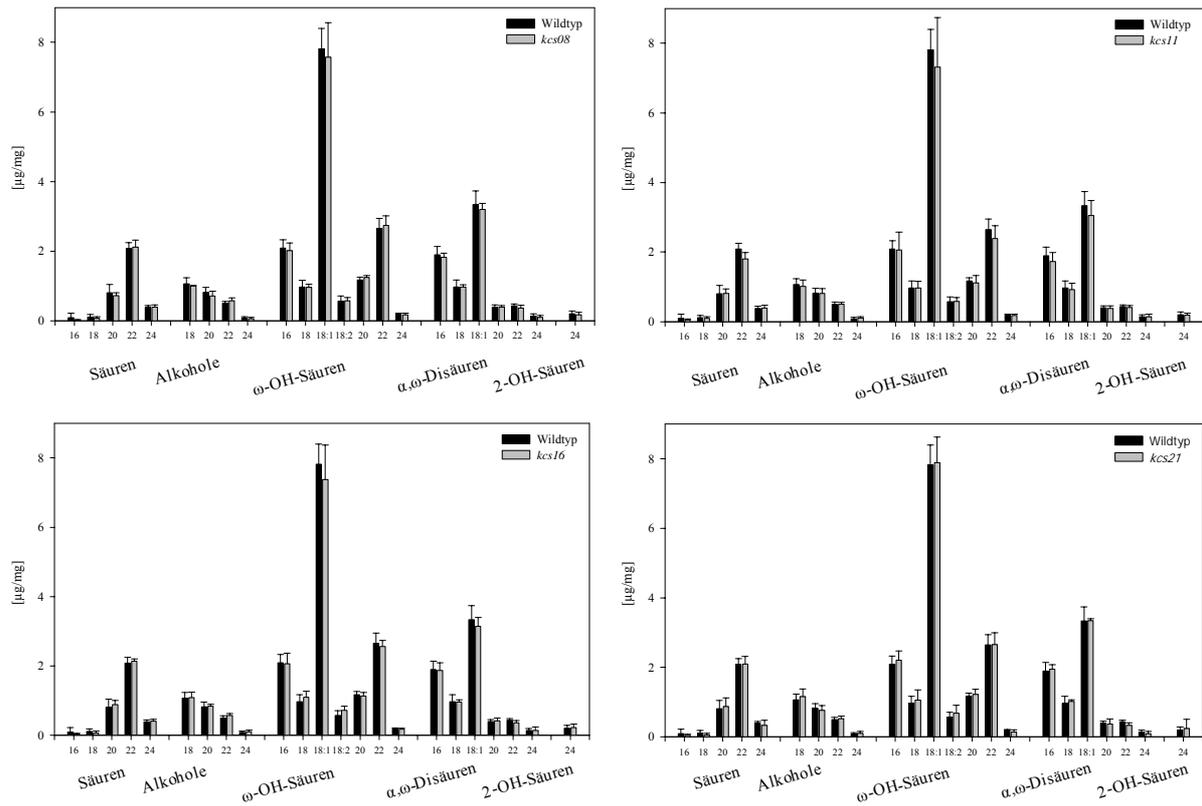


Abbildung 48: Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* im Vergleich zum Wildtyp

Die Wurzeln fünf Wochen alter Pflanzen wurden mittels BF3/MeOH umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Zusammensetzung des Suberins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert das Wurzelmaterial von fünf bis sieben Pflanzen.

Tabelle 16: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter *kcs08*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der jeweiligen Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs08</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	3,481	0,353	3,335	0,271	0,537
C ₁₈ Säure	0,094	0,126	0,026	0,005	0,323
C _{18:1} Säure	0,112	0,070	0,075	0,045	0,408
C ₂₀ Säure	0,805	0,239	0,725	0,078	0,548
C ₂₂ Säure	2,084	0,167	2,120	0,199	0,791
C ₂₄ Säure	0,386	0,056	0,389	0,066	0,944
Alkohole	2,467	0,357	2,354	0,192	0,595
C ₁₈ Alkohol	1,066	0,171	0,998	0,017	0,459
C ₂₀ Alkohol	0,820	0,140	0,716	0,136	0,328
C ₂₂ Alkohol	0,500	0,060	0,573	0,087	0,216
C ₂₄ Alkohol	0,082	0,039	0,067	0,036	0,597
ω-OH Säuren	15,452	1,459	15,294	1,119	0,870
C ₁₆ ω -OH-Säure	2,088	0,239	2,020	0,218	0,689
C ₁₈ ω -OH-Säure	0,970	0,196	0,962	0,096	0,944
C _{18:1} ω -OH-Säure	7,814	0,586	7,576	0,988	0,692
C _{18:2} ω -OH-Säure	0,570	0,140	0,575	0,097	0,953
C ₂₀ ω -OH-Säure	1,172	0,085	1,246	0,055	0,198
C ₂₂ ω -OH-Säure	2,649	0,296	2,742	0,276	0,663
C ₂₄ ω -OH-Säure	0,187	0,027	0,174	0,041	0,590
α,ω-Disäuren	7,170	0,938	6,853	0,370	0,553
C ₁₆ α,ω -Disäure	1,897	0,242	1,825	0,113	0,613
C ₁₈ α,ω -Disäure	0,968	0,204	0,972	0,060	0,973
C _{18:1} α,ω -Disäure	3,335	0,399	3,203	0,168	0,563
C ₂₀ α,ω -Disäure	0,396	0,061	0,391	0,050	0,915
C ₂₂ α,ω -Disäure	0,434	0,049	0,361	0,087	0,199
C ₂₄ α,ω -Disäure	0,140	0,057	0,100	0,051	0,333
2-OH-Säuren	0,201	0,083	0,172	0,072	0,624
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,201	0,083	0,172	0,072	0,624
Gesamt	28,771	3,006	28,009	1,456	0,664

Tabelle 17: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter *kcsII*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der jeweiligen Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcsII</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha = 0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	3,481	0,353	3,160	0,398	0,272
C ₁₈ Säure	0,094	0,126	0,054	0,024	0,559
C _{18:1} Säure	0,112	0,070	0,094	0,049	0,676
C ₂₀ Säure	0,805	0,239	0,811	0,132	0,965
C ₂₂ Säure	2,084	0,167	1,807	0,177	0,063
C ₂₄ Säure	0,386	0,056	0,393	0,082	0,891
Alkohole	2,467	0,357	2,432	0,402	0,901
C ₁₈ Alkohol	1,066	0,171	1,013	0,184	0,688
C ₂₀ Alkohol	0,820	0,140	0,813	0,138	0,943
C ₂₂ Alkohol	0,500	0,060	0,497	0,059	0,956
C ₂₄ Alkohol	0,082	0,039	0,109	0,030	0,308
ω-OH Säuren	15,452	1,459	14,604	2,737	0,604
C ₁₆ ω -OH-Säure	2,088	0,239	2,058	0,515	0,918
C ₁₈ ω -OH-Säure	0,970	0,196	0,967	0,197	0,984
C _{18:1} ω -OH-Säure	7,814	0,586	7,314	1,425	0,540
C _{18:2} ω -OH-Säure	0,570	0,140	0,584	0,109	0,881
C ₂₀ ω -OH-Säure	1,172	0,085	1,114	0,213	0,629
C ₂₂ ω -OH-Säure	2,649	0,296	2,391	0,364	0,313
C ₂₄ ω -OH-Säure	0,187	0,027	0,175	0,045	0,660
α,ω-Disäuren	7,170	0,938	6,645	0,988	0,470
C ₁₆ α,ω -Disäure	1,897	0,242	1,734	0,251	0,387
C ₁₈ α,ω -Disäure	0,968	0,204	0,926	0,179	0,763
C _{18:1} α,ω -Disäure	3,335	0,399	3,056	0,425	0,374
C ₂₀ α,ω -Disäure	0,396	0,061	0,379	0,072	0,733
C ₂₂ α,ω -Disäure	0,434	0,049	0,410	0,056	0,556
C ₂₄ α,ω -Disäure	0,140	0,057	0,141	0,079	0,989
2-OH-Säuren	0,201	0,083	0,188	0,052	0,802
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,201	0,083	0,188	0,052	0,802
Gesamt	28,771	3,006	27,029	4,362	0,535

Tabelle 18: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter *kcs16*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der jeweiligen Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	3,481	0,353	3,526	0,161	0,824
C ₁₈ Säure	0,094	0,126	0,038	0,019	0,413
C _{18:1} Säure	0,112	0,070	0,065	0,056	0,332
C ₂₀ Säure	0,805	0,239	0,884	0,124	0,583
C ₂₂ Säure	2,084	0,167	2,132	0,069	0,608
C ₂₄ Säure	0,386	0,056	0,408	0,051	0,592
Alkohole	2,467	0,357	2,603	0,296	0,580
C ₁₈ Alkohol	1,066	0,171	1,088	0,157	0,860
C ₂₀ Alkohol	0,820	0,140	0,837	0,058	0,831
C ₂₂ Alkohol	0,500	0,060	0,573	0,055	0,120
C ₂₄ Alkohol	0,082	0,039	0,105	0,047	0,468
ω-OH Säuren	15,452	1,459	15,144	1,522	0,780
C ₁₆ ω -OH-Säure	2,088	0,239	2,065	0,297	0,908
C ₁₈ ω -OH-Säure	0,970	0,196	1,099	0,172	0,361
C _{18:1} ω -OH-Säure	7,814	0,586	7,381	0,988	0,479
C _{18:2} ω -OH-Säure	0,570	0,140	0,720	0,120	0,155
C ₂₀ ω -OH-Säure	1,172	0,085	1,137	0,100	0,614
C ₂₂ ω -OH-Säure	2,649	0,296	2,562	0,177	0,631
C ₂₄ ω -OH-Säure	0,187	0,027	0,179	0,026	0,673
α,ω-Disäuren	7,170	0,938	6,877	0,489	0,600
C ₁₆ α,ω -Disäure	1,897	0,242	1,866	0,224	0,860
C ₁₈ α,ω -Disäure	0,968	0,204	0,957	0,066	0,918
C _{18:1} α,ω -Disäure	3,335	0,399	3,140	0,256	0,440
C ₂₀ α,ω -Disäure	0,396	0,061	0,414	0,081	0,734
C ₂₂ α,ω -Disäure	0,434	0,049	0,360	0,065	0,119
C ₂₄ α,ω -Disäure	0,140	0,057	0,141	0,099	0,994
2-OH-Säuren	0,201	0,083	0,222	0,103	0,756
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,201	0,083	0,222	0,103	0,756
Gesamt	28,771	3,006	28,372	2,348	0,841

Tabelle 19: Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln fünf Wochen alter *kcs21*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der jeweiligen Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs21</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	3,481	0,353	3,411	0,492	0,825
C ₁₈ Säure	0,094	0,126	0,051	0,023	0,530
C _{18:1} Säure	0,112	0,070	0,058	0,049	0,247
C ₂₀ Säure	0,805	0,239	0,874	0,251	0,707
C ₂₂ Säure	2,084	0,167	2,099	0,220	0,916
C ₂₄ Säure	0,386	0,056	0,330	0,154	0,518
Alkohole	2,467	0,357	2,541	0,424	0,798
C ₁₈ Alkohol	1,066	0,171	1,160	0,220	0,527
C ₂₀ Alkohol	0,820	0,140	0,760	0,136	0,564
C ₂₂ Alkohol	0,500	0,060	0,522	0,077	0,654
C ₂₄ Alkohol	0,082	0,039	0,099	0,054	0,623
ω-OH Säuren	15,452	1,459	15,862	1,186	0,678
C ₁₆ ω -OH-Säure	2,088	0,239	2,202	0,271	0,550
C ₁₈ ω -OH-Säure	0,970	0,196	1,059	0,290	0,629
C _{18:1} ω -OH-Säure	7,814	0,586	7,894	0,735	0,871
C _{18:2} ω -OH-Säure	0,570	0,140	0,680	0,234	0,449
C ₂₀ ω -OH-Säure	1,172	0,085	1,225	0,148	0,559
C ₂₂ ω -OH-Säure	2,649	0,296	2,657	0,338	0,974
C ₂₄ ω -OH-Säure	0,187	0,027	0,144	0,059	0,230
α,ω-Disäuren	7,170	0,938	7,103	0,257	0,895
C ₁₆ α,ω -Disäure	1,897	0,242	1,949	0,132	0,717
C ₁₈ α,ω -Disäure	0,968	0,204	1,023	0,044	0,619
C _{18:1} α,ω -Disäure	3,335	0,399	3,342	0,055	0,976
C ₂₀ α,ω -Disäure	0,396	0,061	0,372	0,139	0,762
C ₂₂ α,ω -Disäure	0,434	0,049	0,328	0,076	0,058
C ₂₄ α,ω -Disäure	0,140	0,057	0,089	0,072	0,310
2-OH-Säuren	0,201	0,083	0,244	0,260	0,761
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,201	0,083	0,244	0,260	0,761
Gesamt	28,771	3,006	29,161	2,341	0,844

8.10.2 Analyse des Suberins zehn Tage alter *Arabidopsis*- Pflanzen

Tabelle 20 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter *kcs04*- und *35S::KCS04-kcs04*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs04</i>		t-Test	<i>35S::KCS04-kcs04</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	a=0,05	MW	STABW	a=0,05
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	2,267	0,173	1,859	0,228	0,069	2,113	0,168	0,329
C ₁₆ Säure	0,589	0,062	0,485	0,129	0,278	0,592	0,046	0,938
C ₁₈ Säure	0,086	0,004	0,082	0,006	0,363	0,075	0,007	0,086
C _{18:1} Säure	0,052	0,009	0,054	0,009	0,815	0,049	0,015	0,777
C _{18:2} Säure	0,208	0,050	0,209	0,055	0,988	0,198	0,035	0,796
C ₂₀ Säure	0,132	0,016	0,118	0,009	0,247	0,125	0,015	0,626
C ₂₂ Säure	0,873	0,050	0,672	0,032	<u>0,004</u>	0,777	0,069	0,124
C ₂₄ Säure	0,327	0,023	0,240	0,001	<u>0,003</u>	0,295	0,022	0,150
Alkohole	0,475	0,049	0,435	0,047	0,358	0,429	0,047	0,295
C ₁₈ Alkohol	0,082	0,001	0,103	0,022	0,175	0,081	0,013	0,883
C ₂₀ Alkohol	0,328	0,044	0,276	0,016	0,126	0,295	0,040	0,388
C ₂₂ Alkohol	0,066	0,008	0,056	0,011	0,283	0,053	0,007	0,101
ω-OH-Säuren	3,660	0,165	3,013	0,041	0,003	3,306	0,318	0,161
C ₁₆ ω -OH Säure	0,308	0,018	0,260	0,006	<u>0,011</u>	0,272	0,024	0,106
C ₁₈ ω -OH Säure	0,072	0,022	0,073	0,008	0,946	0,056	0,008	0,296
C _{18:1} ω -OH Säure	1,953	0,103	1,581	0,048	<u>0,005</u>	1,767	0,184	0,200
C _{18:2} ω -OH Säure	0,228	0,030	0,197	0,012	0,170	0,200	0,028	0,302
C ₂₀ ω -OH Säure	0,154	0,008	0,139	0,007	0,078	0,150	0,015	0,726
C ₂₂ ω -OH Säure	0,756	0,022	0,614	0,022	<u>0,001</u>	0,696	0,059	0,171
C ₂₄ ω -OH Säure	0,188	0,010	0,149	0,004	<u>0,003</u>	0,166	0,012	0,068
α,ω-Disäuren	2,674	0,244	2,156	0,033	0,022	2,463	0,242	0,347
C ₁₆ Disäure	0,455	0,052	0,393	0,031	0,146	0,443	0,049	0,782
C ₁₈ Disäure	0,175	0,029	0,147	0,008	0,192	0,161	0,030	0,605
C _{18:1} Disäure	1,892	0,153	1,470	0,030	<u>0,009</u>	1,705	0,158	0,215
C ₂₀ Disäure	0,065	0,012	0,055	0,003	0,237	0,064	0,006	0,983
C ₂₂ Disäure	0,041	0,002	0,050	0,007	0,095	0,049	0,005	0,056
C ₂₄ Disäure	0,047	0,004	0,041	0,006	0,278	0,040	0,006	0,197
2-OH-Säuren	1,551	0,064	1,657	0,209	0,447	1,500	0,117	0,547
C ₂₀ 2-OH Säure	0,031	0,012	0,022	0,007	0,340	0,020	0,005	0,237
C ₂₂ 2-OH Säure	0,212	0,007	0,300	0,033	<u>0,011</u>	0,270	0,020	<u>0,009</u>
C ₂₄ 2-OH Säure	0,922	0,034	0,954	0,123	0,681	0,879	0,070	0,391
C _{24:1} 2-OH Säure	0,249	0,007	0,290	0,036	0,124	0,248	0,018	0,935
C ₂₆ 2-OH Säure	0,137	0,006	0,090	0,011	<u>0,003</u>	0,082	0,007	<u>0,000</u>
Gesamt	10,628	0,643	9,120	0,011	0,015	9,810	0,837	0,251

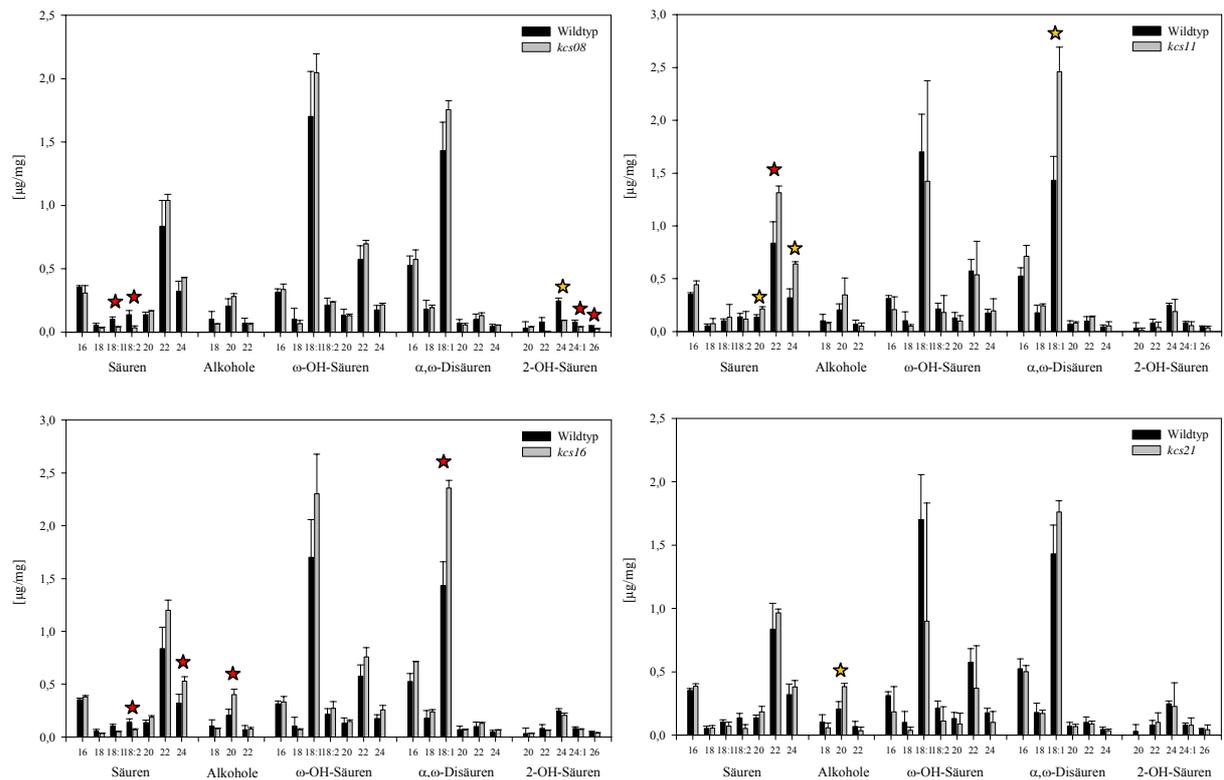


Abbildung 49: Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* im Vergleich zum Wildtyp

Die Wurzeln zehn Tage alter Pflanzen wurden mittels BF3/MeOH umgeestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Zusammensetzung des Suberins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg getrocknetes, vereinigtes Wurzelmaterial.

Gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%; roter Stern: Signifikanzniveau > 95%

Tabelle 21 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter *kcs08*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs08</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	1,941	0,291	2,052	0,043	0,646
C ₁₆ Säure	0,354	0,014	0,309	0,057	0,255
C ₁₈ Säure	0,053	0,017	0,031	0,007	0,201
C _{18:1} Säure	0,103	0,017	0,039	0,006	<u>0,016</u>
C _{18:2} Säure	0,137	0,034	0,036	0,015	<u>0,031</u>
C ₂₀ Säure	0,137	0,022	0,166	0,004	0,172
C ₂₂ Säure	0,836	0,204	1,041	0,048	0,276
C ₂₄ Säure	0,321	0,083	0,430	0,002	0,175
Alkohole	0,379	0,153	0,410	0,027	0,803
C ₁₈ Alkohol	0,104	0,058	0,065	0,002	0,436
C ₂₀ Alkohol	0,206	0,057	0,283	0,022	0,181
C ₂₂ Alkohol	0,069	0,040	0,062	0,007	0,848
ω-OH Säuren	3,210	0,706	3,732	0,182	0,401
C ₁₆ ω -OH Säure	0,313	0,029	0,338	0,043	0,485
C ₁₈ ω -OH Säure	0,102	0,085	0,068	0,025	0,637
C _{18:1} ω -OH Säure	1,701	0,356	2,048	0,147	0,298
C _{18:2} ω -OH Säure	0,213	0,056	0,237	0,004	0,615
C ₂₀ ω -OH Säure	0,131	0,050	0,129	0,013	0,964
C ₂₂ ω -OH Säure	0,575	0,107	0,696	0,028	0,232
C ₂₄ ω -OH Säure	0,175	0,035	0,216	0,014	0,236
Disäuren	2,351	0,463	2,766	0,202	0,334
C ₁₆ Disäure	0,525	0,078	0,575	0,075	0,528
C ₁₈ Disäure	0,179	0,073	0,193	0,020	0,815
C _{18:1} Disäure	1,433	0,225	1,755	0,072	0,158
C ₂₀ Disäure	0,069	0,032	0,058	0,013	0,691
C ₂₂ Disäure	0,100	0,042	0,130	0,024	0,450
C ₂₄ Disäure	0,045	0,018	0,055	0,001	0,505
2-OH-Säuren	0,486	0,131	0,199	0,001	0,060
C ₂₀ 2-OH Säure	0,031	0,052	0,038	0,005	0,872
C ₂₂ 2-OH Säure	0,080	0,037	0,003	0,004	0,067
C ₂₄ 2-OH Säure	0,246	0,023	0,094	0,002	<u>0,003</u>
C _{24:1} 2-OH Säure	0,081	0,015	0,040	0,004	<u>0,039</u>
C ₂₆ 2-OH Säure	0,048	0,005	0,025	0,004	<u>0,011</u>
Gesamt	8,367	1,742	9,159	0,401	0,590

Tabelle 22 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter *kcsII*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcsII</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	1,941	0,291	2,942	0,329	<u>0,017</u>
C ₁₆ Säure	0,354	0,014	0,445	0,035	<u>0,014</u>
C ₁₈ Säure	0,053	0,017	0,074	0,051	0,546
C _{18:1} Säure	0,103	0,017	0,137	0,122	0,659
C _{18:2} Säure	0,137	0,034	0,117	0,072	0,685
C ₂₀ Säure	0,137	0,022	0,215	0,019	<u>0,009</u>
C ₂₂ Säure	0,836	0,204	1,315	0,062	<u>0,018</u>
C ₂₄ Säure	0,321	0,083	0,640	0,022	<u>0,003</u>
Alkohole	0,379	0,153	0,474	0,124	0,447
C ₁₈ Alkohol	0,104	0,058	0,077	0,010	0,472
C ₂₀ Alkohol	0,206	0,057	0,346	0,161	0,229
C ₂₂ Alkohol	0,069	0,040	0,051	0,030	0,581
ω-OH Säuren	3,210	0,706	2,696	1,724	0,658
C ₁₆ ω -OH Säure	0,313	0,029	0,208	0,121	0,219
C ₁₈ ω -OH Säure	0,102	0,085	0,050	0,016	0,360
C _{18:1} ω -OH Säure	1,701	0,356	1,423	0,952	0,661
C _{18:2} ω -OH Säure	0,213	0,056	0,181	0,160	0,759
C ₂₀ ω -OH Säure	0,131	0,050	0,100	0,053	0,491
C ₂₂ ω -OH Säure	0,575	0,107	0,537	0,317	0,856
C ₂₄ ω -OH Säure	0,175	0,035	0,196	0,114	0,777
Disäuren	2,351	0,463	3,690	0,311	<u>0,014</u>
C ₁₆ Disäure	0,525	0,078	0,715	0,100	0,060
C ₁₈ Disäure	0,179	0,073	0,243	0,020	0,212
C _{18:1} Disäure	1,433	0,225	2,459	0,232	<u>0,005</u>
C ₂₀ Disäure	0,069	0,032	0,080	0,015	0,635
C ₂₂ Disäure	0,100	0,042	0,138	0,009	0,211
C ₂₄ Disäure	0,045	0,018	0,055	0,039	0,711
2-OH-Säuren	0,486	0,131	0,333	0,226	0,368
C ₂₀ 2-OH Säure	0,031	0,052	0,013	0,020	0,588
C ₂₂ 2-OH Säure	0,080	0,037	0,040	0,050	0,333
C ₂₄ 2-OH Säure	0,246	0,023	0,189	0,115	0,448
C _{24:1} 2-OH Säure	0,081	0,015	0,057	0,035	0,339
C ₂₆ 2-OH Säure	0,048	0,005	0,035	0,018	0,269
Gesamt	8,367	1,742	10,136	1,642	0,270

Tabelle 23 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter *kcs16*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha = 0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	1,941	0,291	2,454	0,175	0,118
C ₁₆ Säure	0,354	0,014	0,382	0,012	0,104
C ₁₈ Säure	0,053	0,017	0,035	0,001	0,258
C _{18:1} Säure	0,103	0,017	0,052	0,001	<u>0,027</u>
C _{18:2} Säure	0,137	0,034	0,069	0,010	0,077
C ₂₀ Säure	0,137	0,022	0,186	0,016	0,073
C ₂₂ Säure	0,836	0,204	1,201	0,095	0,107
C ₂₄ Säure	0,321	0,083	0,530	0,042	<u>0,050</u>
Alkohole	0,379	0,153	0,554	0,030	0,224
C ₁₈ Alkohol	0,104	0,058	0,077	0,008	0,581
C ₂₀ Alkohol	0,206	0,057	0,401	0,053	<u>0,031</u>
C ₂₂ Alkohol	0,069	0,040	0,076	0,015	0,831
ω-OH Säuren	3,210	0,706	4,138	0,646	0,235
C ₁₆ ω -OH Säure	0,313	0,029	0,331	0,053	0,636
C ₁₈ ω -OH Säure	0,102	0,085	0,069	0,010	0,639
C _{18:1} ω -OH Säure	1,701	0,356	2,303	0,374	0,166
C _{18:2} ω -OH Säure	0,213	0,056	0,272	0,064	0,357
C ₂₀ ω -OH Säure	0,131	0,050	0,147	0,015	0,710
C ₂₂ ω -OH Säure	0,575	0,107	0,759	0,087	0,140
C ₂₄ ω -OH Säure	0,175	0,035	0,257	0,042	0,097
Disäuren	2,351	0,463	3,570	0,117	<u>0,040</u>
C ₁₆ Disäure	0,525	0,078	0,713	0,003	<u>0,048</u>
C ₁₈ Disäure	0,179	0,073	0,238	0,023	0,367
C _{18:1} Disäure	1,433	0,225	2,357	0,071	<u>0,013</u>
C ₂₀ Disäure	0,069	0,032	0,066	0,009	0,900
C ₂₂ Disäure	0,100	0,042	0,131	0,007	0,407
C ₂₄ Disäure	0,045	0,018	0,065	0,005	0,232
2-OH-Säuren	0,486	0,131	0,411	0,036	0,502
C ₂₀ 2-OH Säure	0,031	0,052	0,034	0,001	0,941
C ₂₂ 2-OH Säure	0,080	0,037	0,062	0,003	0,560
C ₂₄ 2-OH Säure	0,246	0,023	0,205	0,021	0,136
C _{24:1} 2-OH Säure	0,081	0,015	0,070	0,007	0,451
C ₂₆ 2-OH Säure	0,048	0,005	0,039	0,004	0,102
Gesamt	8,367	1,742	11,126	0,944	0,141

Tabelle 24 Absolute Verteilung von Suberinmonomeren aus Wurzeln zehn Tage alter *kcs21*- Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs21</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	1,941	0,291	2,097	0,124	0,441
C ₁₆ Säure	0,354	0,014	0,385	0,021	0,095
C ₁₈ Säure	0,053	0,017	0,057	0,019	0,829
C _{18:1} Säure	0,103	0,017	0,071	0,033	0,213
C _{18:2} Säure	0,137	0,034	0,054	0,029	<u>0,031</u>
C ₂₀ Säure	0,137	0,022	0,185	0,041	0,143
C ₂₂ Säure	0,836	0,204	0,966	0,030	0,338
C ₂₄ Säure	0,321	0,083	0,380	0,051	0,352
Alkohole	0,379	0,153	0,477	0,044	0,342
C ₁₈ Alkohol	0,104	0,058	0,058	0,038	0,318
C ₂₀ Alkohol	0,206	0,057	0,384	0,025	<u>0,008</u>
C ₂₂ Alkohol	0,069	0,040	0,036	0,028	0,311
ω-OH Säuren	3,210	0,706	1,792	1,761	0,265
C ₁₆ ω -OH Säure	0,313	0,029	0,185	0,200	0,333
C ₁₈ ω -OH Säure	0,102	0,085	0,038	0,026	0,281
C _{18:1} ω -OH Säure	1,701	0,356	0,899	0,933	0,236
C _{18:2} ω -OH Säure	0,213	0,056	0,111	0,112	0,234
C ₂₀ ω -OH Säure	0,131	0,050	0,090	0,084	0,500
C ₂₂ ω -OH Säure	0,575	0,107	0,369	0,337	0,372
C ₂₄ ω -OH Säure	0,175	0,035	0,101	0,085	0,234
Disäuren	2,351	0,463	2,626	0,096	0,371
C ₁₆ Disäure	0,525	0,078	0,503	0,048	0,698
C ₁₈ Disäure	0,179	0,073	0,171	0,027	0,871
C _{18:1} Disäure	1,433	0,225	1,762	0,089	0,078
C ₂₀ Disäure	0,069	0,032	0,068	0,018	0,938
C ₂₂ Disäure	0,100	0,042	0,087	0,024	0,655
C ₂₄ Disäure	0,045	0,018	0,036	0,013	0,511
2-OH-Säuren	0,486	0,131	0,448	0,359	0,870
C ₂₀ 2-OH Säure	0,031	0,052	0,000	0,000	0,353
C ₂₂ 2-OH Säure	0,080	0,037	0,100	0,077	0,708
C ₂₄ 2-OH Säure	0,246	0,023	0,227	0,186	0,871
C _{24:1} 2-OH Säure	0,081	0,015	0,079	0,058	0,958
C ₂₆ 2-OH Säure	0,048	0,005	0,042	0,038	0,786
Gesamt	8,367	1,742	7,441	2,071	0,585

8.10.3 Analyse von *Arabidopsis*- Samenlipide

Tabelle 25: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcs04*-, *35S::KCS04*- und *35S::KCS04-kcs04*- Samen im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp	STABW	<i>kcs04</i>	STABW	t-Test	<i>35S::KCS04</i>	STABW	t-Test	<i>35S::KCS04-kcs04</i>	STABW	t-Test
	MW		MW		a=0,05	MW		a=0,05	MW		a=0,05
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	178,011	11,288	153,418	7,352	0,077	240,567	13,026	0,003	215,984	6,931	0,008
C ₁₆ Säure	14,196	1,132	10,944	0,309	<u>0,032</u>	19,139	0,984	<u>0,005</u>	16,375	2,047	0,182
C ₁₈ Säure	5,448	0,607	4,414	0,420	0,132	7,491	0,375	<u>0,008</u>	6,873	0,782	0,067
C _{18:1} Säure	29,464	2,029	26,300	2,190	0,195	38,105	2,535	<u>0,010</u>	35,274	1,058	<u>0,012</u>
C _{18:2} Säure	83,523	5,083	71,577	2,288	0,057	115,050	5,419	<u>0,002</u>	101,500	3,692	<u>0,008</u>
C ₂₀ Säure	3,662	0,271	3,438	0,383	0,489	4,750	0,243	<u>0,007</u>	4,640	0,078	<u>0,004</u>
C _{20:1} Säure	32,314	2,552	29,694	1,552	0,295	45,717	3,073	<u>0,004</u>	41,318	0,399	<u>0,004</u>
C _{20:2} Säure	3,722	0,274	3,079	0,159	0,062	4,383	0,387	0,073	4,271	0,063	<u>0,028</u>
C ₂₂ Säure	0,696	0,010	0,262	0,332	0,089	0,800	0,043	<u>0,015</u>	0,807	0,211	0,415
C _{22:1} Säure	2,963	0,165	2,594	0,258	0,138	3,475	0,223	<u>0,033</u>	3,569	0,374	0,062
C _{22:2} Säure	1,103	0,037	0,578	0,403	0,091	0,637	0,033	<u>0,000</u>	0,577	0,037	<u>0,000</u>
C ₂₄ Säure	0,456	0,011	0,314	0,031	<u>0,004</u>	0,509	0,024	<u>0,028</u>	0,386	0,023	<u>0,009</u>
C _{24:1} Säure	0,464	0,101	0,224	0,008	0,050	0,513	0,074	0,539	0,394	0,073	0,385
Alkohole	0,690	0,071	0,469	0,141	0,094	0,772	0,091	0,283	0,772	0,150	0,439
C ₁₈ Alkohol	0,232	0,014	0,164	0,034	<u>0,050</u>	0,242	0,040	0,690	0,244	0,046	0,668
C ₂₀ Alkohol	0,257	0,023	0,222	0,047	0,330	0,331	0,103	0,287	0,335	0,045	0,056
C ₂₂ Alkohol	0,202	0,047	0,083	0,060	0,087	0,199	0,021	0,927	0,193	0,060	0,853
ω-OH-Säuren	0,527	0,108	0,176	0,189	0,071	0,522	0,092	0,951	0,626	0,277	0,592
C ₂₂ ω -OH Säure	0,158	0,065	0,041	0,051	0,127	0,140	0,053	0,729	0,163	0,065	0,929
C ₂₄ ω -OH Säure	0,369	0,042	0,134	0,138	0,060	0,382	0,040	0,727	0,463	0,212	0,491
α,ω-Disäuren	0,356	0,067	0,642	0,351	0,233	0,364	0,035	0,866	0,523	0,010	0,013
C _{18:1} Disäure	0,094	0,019	0,294	0,218	0,182	0,127	0,012	0,062	0,168	0,040	<u>0,045</u>
C ₂₄ Disäure	0,262	0,048	0,347	0,132	0,357	0,237	0,029	0,478	0,355	0,043	0,067
2-OH-Säuren	0,712	0,311	0,310	0,215	0,218	0,596	0,033	0,557	0,677	0,170	0,872
C ₂₄ 2-OH Säure	0,358	0,117	0,157	0,117	0,156	0,331	0,035	0,722	0,342	0,072	0,845
C _{24:2} 2-OH Säure	0,202	0,090	0,091	0,077	0,253	0,169	0,031	0,579	0,187	0,028	0,796
C _{26:2} 2-OH Säure	0,152	0,108	0,061	0,022	0,348	0,096	0,033	0,441	0,148	0,077	0,964
Gesamt	180,296	10,849	155,015	7,546	0,068	242,821	12,945	0,003	218,582	7,378	0,007

Tabelle 26: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcs04*-, *35S::KCS04*- und *35S::KCS04-kcs04*- Samen im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp	STABW	<i>kcs04</i>	STABW	t-Test	<i>35S::KCS04</i> (wt4)	STABW	t-Test	<i>35S::KCS04-kcs04</i> (m6)	STABW	t-Test
	MW		MW		a=0,05	MW		a=0,05	MW		a=0,05
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	238,143	19,149	198,298	64,327	0,362	214,820	64,396	0,580	231,619	22,859	0,724
C ₁₆ Säure	17,949	1,419	14,557	4,755	0,302	16,152	5,228	0,596	17,263	0,396	0,465
C ₁₈ Säure	6,856	0,711	5,182	1,647	0,181	6,176	1,594	0,537	6,036	0,015	0,117
C _{18:1} Säure	28,911	0,926	27,080	7,428	0,693	22,056	5,222	0,089	22,529	11,717	0,400
C _{18:2} Säure	123,060	10,333	99,902	34,390	0,327	110,007	35,169	0,571	121,496	9,207	0,854
C ₂₀ Säure	4,387	0,418	3,831	1,234	0,501	4,391	1,238	0,996	4,555	0,139	0,544
C _{20:1} Säure	46,238	4,088	39,502	12,814	0,435	44,511	13,069	0,838	49,525	1,008	0,248
C _{20:2} Säure	4,647	0,441	3,648	1,027	0,196	5,171	1,198	0,516	4,482	0,368	0,644
C ₂₂ Säure	0,650	0,074	0,458	0,323	0,373	0,656	0,173	0,958	0,646	0,012	0,934
C _{22:1} Säure	2,779	1,571	2,047	1,813	0,625	4,322	1,334	0,265	4,136	0,188	0,212
C _{22:2} Säure	1,699	2,407	1,540	2,191	0,937	0,350	0,068	0,387	0,323	0,041	0,378
C ₂₄ Säure	0,455	0,083	0,277	0,058	<u>0,038</u>	0,520	0,113	0,463	0,306	0,019	<u>0,039</u>
C _{24:1} Säure	0,511	0,094	0,276	0,061	<u>0,022</u>	0,508	0,109	0,969	0,320	0,010	<u>0,025</u>
Alkohole	0,517	0,141	0,439	0,081	0,454	0,560	0,027	0,627	0,457	0,052	0,529
C ₁₈ Alkohol	0,080	0,047	0,056	0,024	0,480	0,080	0,008	0,996	0,064	0,022	0,632
C ₂₀ Alkohol	0,279	0,023	0,272	0,026	0,749	0,319	0,014	0,059	0,279	0,030	0,991
C ₂₂ Alkohol	0,158	0,088	0,111	0,044	0,455	0,161	0,012	0,950	0,113	0,051	0,493
ω-OH-Säuren	0,583	0,358	0,524	0,258	0,827	0,703	0,076	0,599	0,546	0,249	0,891
C _{18:1} ω -OH-Säure	0,082	0,053	0,126	0,110	0,565	0,090	0,004	0,794	0,071	0,045	0,815
C ₂₂ ω -OH-Säure	0,142	0,098	0,095	0,039	0,483	0,158	0,010	0,794	0,137	0,010	0,941
C ₂₄ ω -OH-Säure	0,360	0,209	0,303	0,127	0,710	0,456	0,089	0,506	0,338	0,194	0,899
α,ω-Disäuren	0,663	0,236	0,684	0,246	0,919	0,833	0,217	0,411	0,755	0,281	0,687
C _{18:1} Disäure	0,254	0,189	0,390	0,217	0,460	0,381	0,225	0,495	0,342	0,254	0,658
C ₂₄ Disäure	0,408	0,052	0,294	0,032	<u>0,032</u>	0,451	0,011	0,236	0,413	0,027	0,899
2-OH Säuren	0,814	0,410	0,806	0,034	0,973	1,048	0,030	0,379	0,681	0,340	0,687
C ₁₈ 2-OH-Säure	0,194	0,106	0,238	0,030	0,528	0,226	0,043	0,648	0,180	0,086	0,868
C ₂₀ 2-OH-Säure	0,133	0,071	0,159	0,011	0,569	0,202	0,068	0,294	0,164	0,088	0,662
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,288	0,169	0,245	0,010	0,683	0,383	0,014	0,390	0,201	0,130	0,520
C _{24:2} 2-OH-Säure	0,199	0,081	0,163	0,017	0,502	0,238	0,026	0,476	0,136	0,036	0,288
Gesamt	240,719	20,159	200,750	64,768	0,365	217,965	64,622	0,592	234,057	23,711	0,730

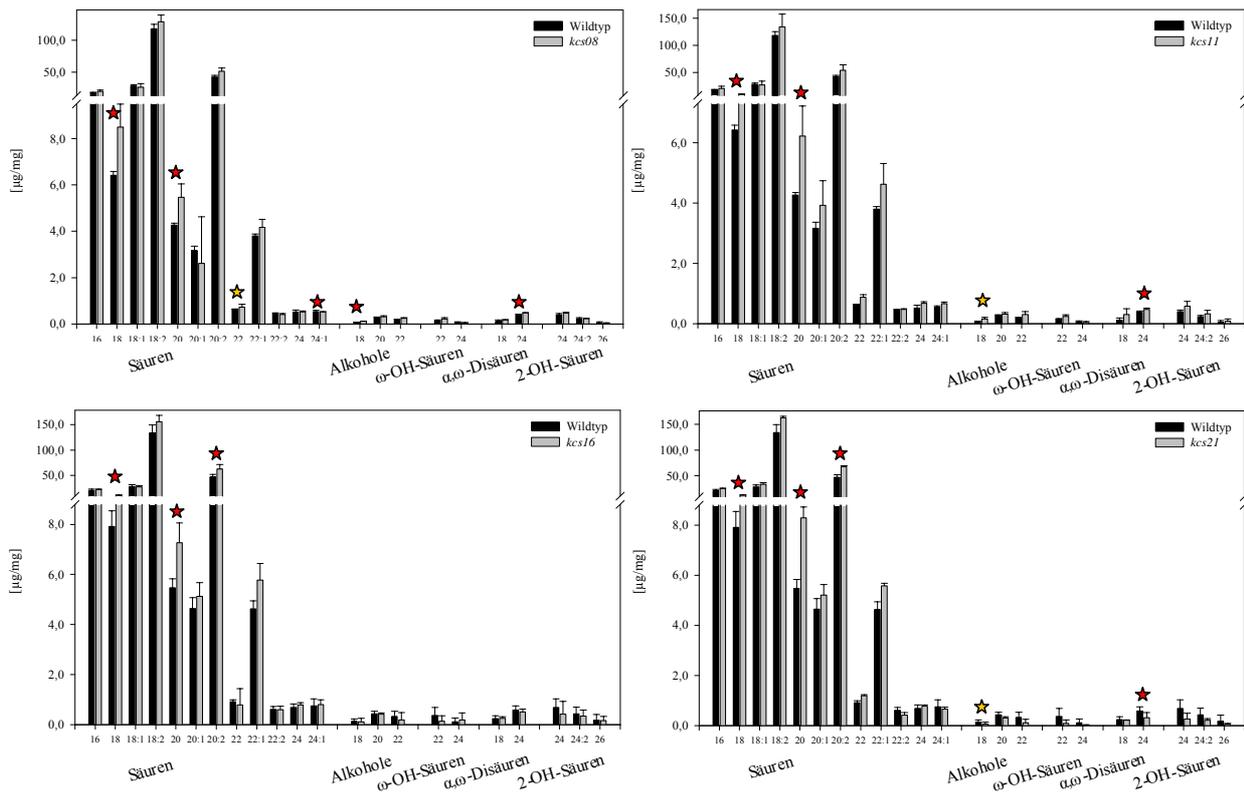


Abbildung 50: Zusammensetzung der Samenlipide aus *kcs08*-, *kcs11*-, *kcs16*- und *kcs21*- Samen im Vergleich zum Wildtyp.

Die getrockneten Samen wurden mit methanolischer Salzsäure umgeestert. Nach Derivatisierung wurden die Bestandteile mittels GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus drei Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 2 mg zusammengefasste Samen.

Die absolute Zusammensetzung der Gesamtsamenlipide der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt.

Roter Stern: Signifikanzniveau > 95%; gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%

Tabelle 27 Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcs08*- Samen im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp	STABW	<i>kcs08</i>	STABW	t-Test
	MW µg/mg		MW µg/mg		$\alpha = 0,05$
Säuren	226,405	12,844	261,712	48,194	2,263
C ₁₆ Säure	17,717	0,682	20,302	4,158	0,348
C ₁₈ Säure	6,422	0,160	8,934	1,535	<u>0,048</u>
C _{18:1} Säure	28,096	2,278	26,987	6,659	0,798
C _{18:2} Säure	118,427	6,982	134,236	23,125	0,320
C ₂₀ Säure	4,268	0,080	6,226	0,999	<u>0,028</u>
C _{20:1} Säure	3,167	0,193	3,925	0,816	0,193
C _{20:2} Säure	42,365	2,205	53,783	10,007	0,126
C ₂₂ Säure	0,640	0,007	0,877	0,084	<u>0,008</u>
C _{22:1} Säure	3,799	0,082	4,624	0,693	0,110
C _{22:2} Säure	0,451	0,025	0,477	0,014	0,181
C ₂₄ Säure	0,517	0,090	0,673	0,055	0,063
C _{24:1} Säure	0,536	0,059	0,668	0,049	<u>0,041</u>
Alkohol	0,549	0,042	0,781	0,195	0,452
C ₁₈ Alkohol	0,080	0,005	0,160	0,044	<u>0,036</u>
C ₂₀ Alkohol	0,282	0,016	0,320	0,052	0,291
C ₂₂ Alkohol	0,187	0,021	0,301	0,099	0,125
ω-OH-Säuren	0,213	0,049	0,277	0,097	0,525
C ₂₂ ω-OH Säure	0,153	0,018	0,240	0,058	0,068
C ₂₄ ω-OH Säure	0,060	0,031	0,037	0,038	0,457
Disäuren	0,494	0,108	0,782	0,227	0,205
C _{18:1} Disäure	0,111	0,073	0,307	0,190	0,169
C ₂₄ Disäure	0,384	0,035	0,475	0,037	<u>0,036</u>
2-OH-Säuren	0,688	0,139	0,977	0,363	1,099
C ₂₄ 2-OH Säure	0,401	0,056	0,577	0,163	0,152
C _{24:2} 2-OH Säure	0,234	0,037	0,323	0,117	0,282
C ₂₆ 2-OH Säure	0,053	0,046	0,078	0,082	0,665
Gesamt	228,349	7,489	264,529	45,053	4,544

Tabelle 28 Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcsII*- Samen im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp	STABW	<i>kcsII</i>	STABW	t-Test
	MW µg/mg		MW µg/mg		$\alpha = 0,05$
Säuren	226,405	12,844	249,972	27,384	4,039
C ₁₆ Säure	17,717	0,682	19,855	1,994	0,154
C ₁₈ Säure	6,422	0,160	8,499	0,991	<u>0,023</u>
C _{18:1} Säure	28,096	2,278	26,531	5,362	0,666
C _{18:2} Säure	118,427	6,982	129,039	11,140	0,235
C ₂₀ Säure	4,268	0,080	5,468	0,579	<u>0,024</u>
C _{20:1} Säure	3,167	0,193	2,609	2,018	0,658
C _{20:2} Säure	42,365	2,205	51,613	4,739	<u>0,037</u>
C ₂₂ Säure	0,640	0,007	0,733	0,113	0,228
C _{22:1} Säure	3,799	0,082	4,168	0,353	0,153
C _{22:2} Säure	0,451	0,025	0,410	0,039	0,207
C ₂₄ Säure	0,517	0,090	0,523	0,039	0,921
C _{24:1} Säure	0,536	0,059	0,523	0,015	0,734
Alkohol	0,549	0,042	0,665	0,083	0,495
C ₁₈ Alkohol	0,080	0,005	0,119	0,003	<u>0,000</u>
C ₂₀ Alkohol	0,282	0,016	0,309	0,051	0,425
C ₂₂ Alkohol	0,187	0,021	0,238	0,028	<u>0,070</u>
ω-OH-Säuren	0,213	0,049	0,254	0,071	0,487
C ₂₂ ω-OH Säure	0,153	0,018	0,216	0,051	0,112
C ₂₄ ω-OH Säure	0,060	0,031	0,038	0,021	0,376
Disäuren	0,494	0,108	0,643	0,028	0,243
C _{18:1} Disäure	0,111	0,073	0,172	0,013	0,227
C ₂₄ Disäure	0,384	0,035	0,471	0,016	<u>0,016</u>
2-OH-Säuren	0,688	0,139	0,731	0,081	1,689
C ₂₄ 2-OH Säure	0,401	0,056	0,463	0,047	0,214
C _{24:2} 2-OH Säure	0,234	0,037	0,227	0,021	0,785
C ₂₆ 2-OH Säure	0,053	0,046	0,041	0,013	0,690
Gesamt	228,349	7,489	252,266	24,009	6,954

Tabelle 29: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcs16*- Samen im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	
Säuren	255,217	29,372	300,991	28,444	4,770
C ₁₆ Säure	20,924	2,168	22,589	1,058	0,298
C ₁₈ Säure	7,917	0,630	10,697	1,201	<u>0,024</u>
C _{18:1} Säure	28,150	3,871	28,044	2,371	0,970
C _{18:2} Säure	133,580	15,869	155,333	12,641	0,137
C ₂₀ Säure	5,474	0,353	7,268	0,793	<u>0,023</u>
C _{20:1} Säure	4,644	0,429	5,118	0,558	0,308
C _{20:2} Säure	46,946	5,119	63,196	8,088	<u>0,042</u>
C ₂₂ Säure	0,916	0,072	0,784	0,651	0,745
C _{22:1} Säure	4,627	0,316	5,774	0,660	0,053
C _{22:2} Säure	0,603	0,118	0,602	0,137	0,992
C ₂₄ Säure	0,687	0,142	0,782	0,093	0,387
C _{24:1} Säure	0,748	0,285	0,804	0,190	0,792
Alkohol	0,887	0,403	0,706	0,499	2,202
C ₁₈ Alkohol	0,139	0,086	0,103	0,152	0,740
C ₂₀ Alkohol	0,423	0,112	0,415	0,059	0,923
C ₂₂ Alkohol	0,325	0,205	0,188	0,288	0,540
ω-OH-Säuren	0,486	0,464	0,329	0,497	1,037
C ₂₂ ω -OH Säure	0,371	0,313	0,136	0,221	0,348
C ₂₄ ω -OH Säure	0,115	0,151	0,193	0,276	0,689
Disäuren	0,824	0,271	0,762	0,170	1,418
C _{18:1} Disäure	0,243	0,108	0,255	0,058	0,869
C ₂₄ Disäure	0,581	0,163	0,507	0,112	0,548
2-OH-Säuren	1,277	0,859	0,922	0,913	2,184
C ₂₄ 2-OH Säure	0,684	0,345	0,419	0,507	0,496
C _{24:2} 2-OH Säure	0,425	0,274	0,340	0,246	0,709
C ₂₆ 2-OH Säure	0,168	0,240	0,164	0,160	0,979
Gesamt	27,261	31,370	181,277	30,523	11,610

Tabelle 30: Absolute Verteilung der Samenlipiden aus *kcs21*- Samen im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs21</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	
Säuren	255,217	29,372	322,183	10,856	1,516
C ₁₆ Säure	20,924	2,168	24,938	0,927	<u>0,042</u>
C ₁₈ Säure	7,917	0,630	12,440	0,318	<u>0,000</u>
C _{18:1} Säure	28,150	3,871	33,321	2,902	0,138
C _{18:2} Säure	133,580	15,869	162,308	3,432	<u>0,037</u>
C ₂₀ Säure	5,474	0,353	8,288	0,431	<u>0,001</u>
C _{20:1} Säure	4,644	0,429	5,207	0,426	0,182
C _{20:2} Säure	46,946	5,119	67,053	2,067	<u>0,003</u>
C ₂₂ Säure	0,916	0,072	1,195	0,042	<u>0,004</u>
C _{22:1} Säure	4,627	0,316	5,579	0,105	<u>0,008</u>
C _{22:2} Säure	0,603	0,118	0,419	0,096	0,104
C ₂₄ Säure	0,687	0,142	0,774	0,042	0,364
C _{24:1} Säure	0,748	0,285	0,661	0,068	0,632
Alkohol	0,887	0,403	0,473	0,261	0,675
C ₁₈ Alkohol	0,139	0,086	0,060	0,079	0,305
C ₂₀ Alkohol	0,423	0,112	0,305	0,043	0,166
C ₂₂ Alkohol	0,325	0,205	0,108	0,139	0,203
ω-OH-Säuren	0,486	0,464	0,106	0,137	0,554
C ₂₂ ω -OH Säure	0,371	0,313	0,086	0,130	0,220
C ₂₄ ω -OH Säure	0,115	0,151	0,019	0,007	0,335
Disäuren	0,824	0,271	0,530	0,212	0,821
C _{18:1} Disäure	0,243	0,108	0,214	0,011	0,670
C ₂₄ Disäure	0,581	0,163	0,316	0,202	0,151
2-OH-Säuren	1,277	0,859	0,531	0,329	0,893
C ₂₄ 2-OH Säure	0,684	0,345	0,259	0,240	0,155
C _{24:2} 2-OH Säure	0,425	0,274	0,214	0,064	0,264
C ₂₆ 2-OH Säure	0,168	0,240	0,059	0,025	0,475
Gesamt	27,261	31,370	166,994	11,795	4,458

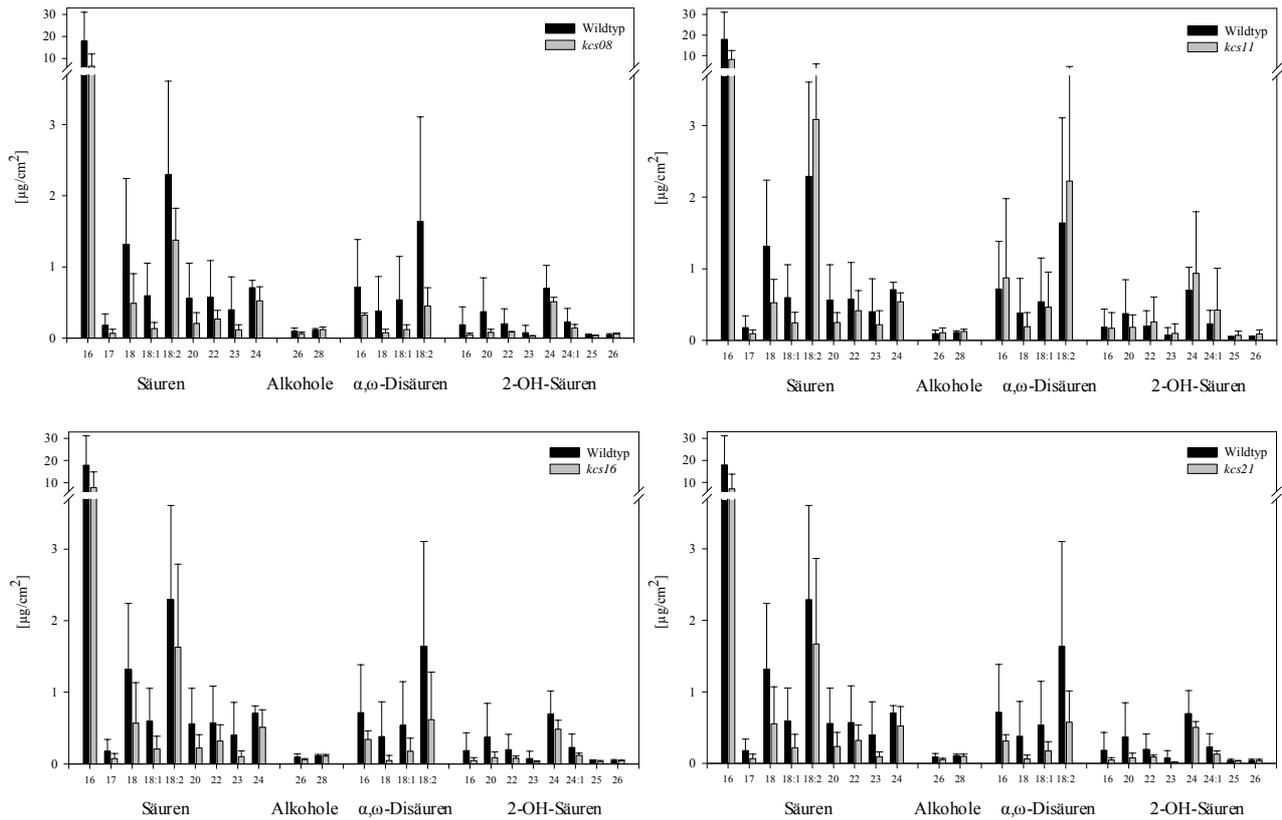
8.10.4 Analyse des Cutins von *Arabidopsis*-Blättern

Abbildung 51: Zusammensetzung des Blattcutins von *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* im Vergleich zum Wildtyp
 Die totalextrahierten Blätter fünf Wochen alter Pflanzen wurden mittels methanolischer Salzsäure umgestert und der Überstand mit GC/FID aufgetrennt. Die absolute Zusammensetzung des Cutins der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt. Dargestellt wird der arithmetische Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus vier Parallelen, jede Parallele repräsentiert 12 Blätter.

Tabelle 31: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus *kcs08*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs08</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	24,580	17,225	9,696	7,024	0,161
C ₁₆ Säure	17,955	13,142	6,517	5,509	0,160
C ₁₇ Säure	0,178	0,161	0,068	0,057	0,243
C ₁₈ Säure	1,317	0,923	0,489	0,414	0,153
C _{18:1} Säure	0,595	0,460	0,133	0,088	0,096
C _{18:2} Säure	2,294	1,317	1,376	0,450	0,235
C ₂₀ Säure	0,559	0,495	0,205	0,155	0,221
C ₂₂ Säure	0,574	0,514	0,268	0,120	0,291
C ₂₃ Säure	0,400	0,461	0,116	0,073	0,269
C ₂₄ Säure	0,708	0,103	0,524	0,199	0,152
Alkohole	0,200	0,033	0,182	0,061	0,622
C ₂₆ Alkohol	0,092	0,051	0,064	0,022	0,357
C ₂₈ Alkohol	0,108	0,024	0,118	0,040	0,695
Disäuren	3,271	3,220	0,966	0,386	0,205
C ₁₆ Disäure	0,715	0,669	0,321	0,031	0,284
C ₁₈ Disäure	0,382	0,485	0,076	0,049	0,255
C _{18:1} Disäure	0,536	0,611	0,118	0,069	0,223
C _{18:2} Disäure	1,639	1,468	0,451	0,257	0,162
2-OH-Säuren	1,845	1,552	0,989	0,100	0,313
C ₁₆ 2-OH-Säure	0,185	0,252	0,046	0,027	0,317
C ₂₀ 2-OH-Säure	0,371	0,477	0,077	0,049	0,267
C ₂₂ 2-OH-Säure	0,200	0,212	0,084	0,010	0,318
C ₂₃ 2-OH-Säure	0,076	0,103	0,030	0,005	0,405
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,698	0,323	0,512	0,062	0,300
C _{24:1} 2-OH Säure	0,228	0,187	0,144	0,047	0,414
C ₂₅ 2-OH-Säure	0,044	0,015	0,039	0,003	0,526
C ₂₆ 2-OH-Säure	0,044	0,016	0,057	0,014	0,260
Gesamt	29,896	21,945	11,833	7,464	0,170

Tabelle 32: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus *kcsII*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcsII</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	24,580	17,225	13,515	7,244	0,281
C ₁₆ Säure	17,955	13,142	8,151	4,376	0,207
C ₁₇ Säure	0,178	0,161	0,093	0,052	0,350
C ₁₈ Säure	1,317	0,923	0,526	0,324	0,157
C _{18:1} Säure	0,595	0,460	0,242	0,150	0,195
C _{18:2} Säure	2,294	1,317	3,084	2,879	0,635
C ₂₀ Säure	0,559	0,495	0,249	0,137	0,273
C ₂₂ Säure	0,574	0,514	0,415	0,281	0,608
C ₂₃ Säure	0,400	0,461	0,218	0,195	0,494
C ₂₄ Säure	0,708	0,103	0,536	0,126	0,079
Alkohole	0,200	0,033	0,228	0,072	0,508
C ₂₆ Alkohol	0,092	0,051	0,104	0,070	0,782
C ₂₈ Alkohol	0,108	0,024	0,124	0,030	0,462
Disäuren	3,271	3,220	3,752	4,261	0,863
C ₁₆ Disäure	0,715	0,669	0,873	1,108	0,815
C ₁₈ Disäure	0,382	0,485	0,192	0,193	0,494
C _{18:1} Disäure	0,536	0,611	0,462	0,492	0,856
C _{18:2} Disäure	1,639	1,468	2,226	2,473	0,697
2-OH-Säuren	1,845	1,552	2,217	2,431	0,805
C ₁₆ 2-OH-Säure	0,185	0,252	0,170	0,217	0,931
C ₂₀ 2-OH-Säure	0,371	0,477	0,182	0,175	0,485
C ₂₂ 2-OH-Säure	0,200	0,212	0,258	0,348	0,784
C ₂₃ 2-OH-Säure	0,076	0,103	0,095	0,134	0,829
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,698	0,323	0,936	0,863	0,624
C _{24:1} 2-OH Säure	0,228	0,187	0,421	0,583	0,553
C ₂₅ 2-OH-Säure	0,044	0,015	0,069	0,059	0,442
C ₂₆ 2-OH-Säure	0,044	0,016	0,087	0,059	0,208
Gesamt	29,896	21,945	19,713	12,986	0,455

Tabelle 33: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus *kcs16*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	24,580	17,225	11,409	9,545	0,230
C ₁₆ Säure	17,955	13,142	7,771	7,093	0,222
C ₁₇ Säure	0,178	0,161	0,076	0,070	0,286
C ₁₈ Säure	1,317	0,923	0,571	0,565	0,217
C _{18:1} Säure	0,595	0,460	0,210	0,179	0,169
C _{18:2} Säure	2,294	1,317	1,631	1,161	0,479
C ₂₀ Säure	0,559	0,495	0,219	0,187	0,246
C ₂₂ Säure	0,574	0,514	0,318	0,230	0,400
C ₂₃ Säure	0,400	0,461	0,103	0,079	0,250
C ₂₄ Säure	0,708	0,103	0,512	0,247	0,193
Alkohole	0,200	0,033	0,170	0,035	0,257
C ₂₆ Alkohol	0,092	0,051	0,061	0,012	0,291
C ₂₈ Alkohol	0,108	0,024	0,109	0,023	0,992
Disäuren	3,271	3,220	1,183	1,012	0,262
C ₁₆ Disäure	0,715	0,669	0,340	0,124	0,312
C ₁₈ Disäure	0,382	0,485	0,048	0,070	0,221
C _{18:1} Disäure	0,536	0,611	0,178	0,180	0,304
C _{18:2} Disäure	1,639	1,468	0,617	0,667	0,252
2-OH-Säuren	1,845	1,552	0,935	0,311	0,294
C ₁₆ 2-OH-Säure	0,185	0,252	0,048	0,037	0,325
C ₂₀ 2-OH-Säure	0,371	0,477	0,089	0,080	0,289
C ₂₂ 2-OH-Säure	0,200	0,212	0,081	0,027	0,308
C ₂₃ 2-OH-Säure	0,076	0,103	0,027	0,015	0,382
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,698	0,323	0,484	0,125	0,263
C _{24:1} 2-OH Säure	0,228	0,187	0,121	0,027	0,300
C ₂₅ 2-OH-Säure	0,044	0,015	0,037	0,010	0,452
C ₂₆ 2-OH-Säure	0,044	0,016	0,048	0,005	0,658
Gesamt	29,896	21,945	13,697	10,754	0,233

Tabelle 34: Absolute Verteilung der Cutinmonomeren aus *kcs21*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs21</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	24,580	17,225	10,819	9,352	0,210
C ₁₆ Säure	17,955	13,142	7,125	6,689	0,192
C ₁₇ Säure	0,178	0,161	0,070	0,062	0,254
C ₁₈ Säure	1,317	0,923	0,553	0,520	0,199
C _{18:1} Säure	0,595	0,460	0,220	0,190	0,182
C _{18:2} Säure	2,294	1,317	1,672	1,196	0,511
C ₂₀ Säure	0,559	0,495	0,239	0,197	0,275
C ₂₂ Säure	0,574	0,514	0,322	0,216	0,402
C ₂₃ Säure	0,400	0,461	0,095	0,067	0,238
C ₂₄ Säure	0,708	0,103	0,523	0,271	0,250
Alkohole	0,200	0,033	0,154	0,050	0,181
C ₂₆ Alkohol	0,092	0,051	0,055	0,018	0,220
C ₂₈ Alkohol	0,108	0,024	0,100	0,032	0,686
Disäuren	3,271	3,220	1,140	0,678	0,243
C ₁₆ Disäure	0,715	0,669	0,317	0,085	0,282
C ₁₈ Disäure	0,382	0,485	0,066	0,050	0,243
C _{18:1} Disäure	0,536	0,611	0,178	0,127	0,295
C _{18:2} Disäure	1,639	1,468	0,579	0,437	0,216
2-OH-Säuren	1,845	1,552	0,948	0,230	0,296
C ₁₆ 2-OH-Säure	0,185	0,252	0,050	0,030	0,330
C ₂₀ 2-OH-Säure	0,371	0,477	0,075	0,068	0,265
C ₂₂ 2-OH-Säure	0,200	0,212	0,093	0,026	0,355
C ₂₃ 2-OH-Säure	0,076	0,103	0,017	0,006	0,297
C ₂₄ 2-OH-Säure	0,698	0,323	0,505	0,082	0,290
C _{24:1} 2-OH Säure	0,228	0,187	0,131	0,043	0,348
C ₂₅ 2-OH-Säure	0,044	0,015	0,035	0,005	0,323
C ₂₆ 2-OH-Säure	0,044	0,016	0,043	0,015	0,947
Gesamt	29,896	21,945	13,061	10,026	0,212

8.10.5 Analyse des Wachses von *Arabidopsis* Blättern

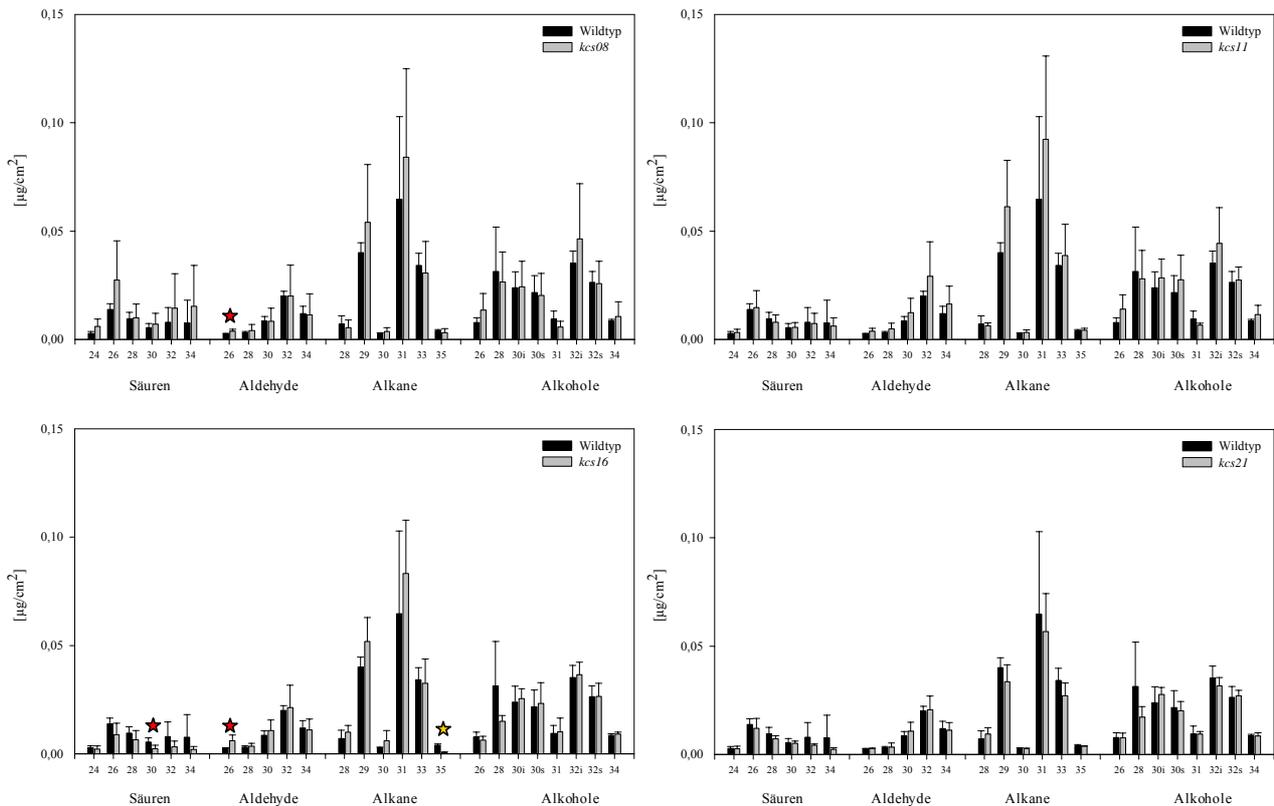


Abbildung 52: Zusammensetzung des Blattwachses von *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* im Vergleich zum Wildtyp
 Die Wachse der Blätter wurden mittels Chloroform extrahiert und GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus 4 Parallelen, jede Parallele repräsentiert im Schnitt 12 Blätter.

Die absolute Zusammensetzung des Wachs aus den verschiedenen Monomeren der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt. Die Alkohole C30 und C32 konnten sowohl in verzweigter (i) als auch unverzweigter (s) Form gefunden werden.
 Gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%, roter Stern: Signifikanzniveau > 95%

Tabelle 35: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs08*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs08</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	
Säuren	0,0475	0,0134	0,0804	0,0676	0,3764
C ₂₄ Säure	0,0029	0,0009	0,0060	0,0034	0,1199
C ₂₆ Säure	0,0139	0,0027	0,0274	0,0181	0,1885
C ₂₈ Säure	0,0096	0,0029	0,0100	0,0064	0,9040
C ₃₀ Säure	0,0056	0,0019	0,0071	0,0051	0,6076
C ₃₂ Säure	0,0080	0,0068	0,0145	0,0159	0,4759
C ₃₄ Säure	0,0076	0,0105	0,0153	0,0189	0,5044
Aldehyde	0,0465	0,0022	0,0479	0,0332	0,9373
C ₂₆ Aldehyd	0,0027	0,0002	0,0039	0,0009	<u>0,0462</u>
C ₂₈ Aldehyd	0,0032	0,0006	0,0042	0,0028	0,5290
C ₃₀ Aldehyd	0,0085	0,0021	0,0084	0,0061	0,9636
C ₃₂ Aldehyd	0,0201	0,0022	0,0201	0,0143	0,9993
C ₃₄ Aldehyd	0,0120	0,0034	0,0114	0,0097	0,9083
Alkane	0,1531	0,0451	0,1814	0,0830	0,5705
C ₂₈ Alkan	0,0072	0,0038	0,0054	0,0036	0,5368
C ₂₉ Alkan	0,0402	0,0045	0,0541	0,0266	0,3418
C ₃₀ Alkan	0,0028	0,0002	0,0038	0,0017	0,3360
C ₃₁ Alkan	0,0648	0,0381	0,0842	0,0407	0,5118
C ₃₃ Alkan	0,0342	0,0055	0,0307	0,0146	0,6689
C ₃₅ Alkan	0,0039	0,0007	0,0032	0,0018	0,4743
Alkohole	0,1644	0,0361	0,1735	0,0815	0,8450
C ₂₆ Alkohol	0,0079	0,0022	0,0136	0,0076	0,2011
C ₂₈ Alkohol	0,0314	0,0205	0,0266	0,0139	0,7104
C ₃₁ Alkohol	0,0094	0,0037	0,0058	0,0026	0,1674
C ₃₄ Alkohol	0,0085	0,0008	0,0106	0,0067	0,5552
C ₃₀ Alkohol i	0,0239	0,0074	0,0244	0,0117	0,9454
C ₃₂ Alkohol i	0,0352	0,0057	0,0464	0,0255	0,4252
C ₃₀ Alkohol s	0,0217	0,0079	0,0203	0,0102	0,8413
C ₃₂ Alkohol s	0,0264	0,0051	0,0258	0,0103	0,9195
Gesamt	0,4116	0,0261	0,4833	0,2576	0,5997

Tabelle 36: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcsII*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcsII</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	
Säuren	0,0475	0,0134	0,0454	0,0209	0,8677
C ₂₄ Säure	0,0029	0,0009	0,0033	0,0015	0,6739
C ₂₆ Säure	0,0139	0,0027	0,0147	0,0079	0,8492
C ₂₈ Säure	0,0096	0,0029	0,0081	0,0034	0,5291
C ₃₀ Säure	0,0056	0,0019	0,0056	0,0022	0,9738
C ₃₂ Säure	0,0080	0,0068	0,0075	0,0047	0,9056
C ₃₄ Säure	0,0076	0,0105	0,0062	0,0038	0,8093
Aldehyde	0,0465	0,0022	0,0669	0,0339	0,2763
C ₂₆ Aldehyd	0,0027	0,0002	0,0039	0,0014	0,1303
C ₂₈ Aldehyd	0,0032	0,0006	0,0049	0,0027	0,2710
C ₃₀ Aldehyd	0,0085	0,0021	0,0125	0,0066	0,2955
C ₃₂ Aldehyd	0,0201	0,0022	0,0292	0,0159	0,2999
C ₃₄ Aldehyd	0,0120	0,0034	0,0164	0,0082	0,3595
Alkane	0,1531	0,0451	0,2065	0,0764	0,2735
C ₂₈ Alkan	0,0072	0,0038	0,0064	0,0014	0,7157
C ₂₉ Alkan	0,0402	0,0045	0,0614	0,0213	0,0993
C ₃₀ Alkan	0,0028	0,0002	0,0033	0,0012	0,5247
C ₃₁ Alkan	0,0648	0,0381	0,0925	0,0384	0,3454
C ₃₃ Alkan	0,0342	0,0055	0,0388	0,0145	0,5788
C ₃₅ Alkan	0,0039	0,0007	0,0042	0,0010	0,6422
Alkohole	0,1644	0,0361	0,1882	0,0585	0,5153
C ₂₆ Alkohol	0,0079	0,0022	0,0140	0,0067	0,1304
C ₂₈ Alkohol	0,0314	0,0205	0,0279	0,0132	0,7852
C ₃₁ Alkohol	0,0094	0,0037	0,0067	0,0009	0,2088
C ₃₄ Alkohol	0,0085	0,0008	0,0116	0,0042	0,2014
C ₃₀ Alkohol i	0,0239	0,0074	0,0284	0,0088	0,4592
C ₃₂ Alkohol i	0,0352	0,0057	0,0443	0,0166	0,3368
C ₃₀ Alkohol s	0,0217	0,0079	0,0277	0,0113	0,4165
C ₃₂ Alkohol s	0,0264	0,0051	0,0275	0,0060	0,7968
Gesamt	0,4116	0,0261	0,5070	0,1762	0,3253

Tabelle 37: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs16*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	
Säuren	0,0475	0,0134	0,0254	0,0159	0,0780
C ₂₄ Säure	0,0029	0,0009	0,0023	0,0015	0,5338
C ₂₆ Säure	0,0139	0,0027	0,0089	0,0053	0,1479
C ₂₈ Säure	0,0096	0,0029	0,0066	0,0041	0,2859
C ₃₀ Säure	0,0056	0,0019	0,0023	0,0016	<u>0,0423</u>
C ₃₂ Säure	0,0080	0,0068	0,0032	0,0027	0,2412
C ₃₄ Säure	0,0076	0,0105	0,0021	0,0014	0,3343
Aldehyde	0,0465	0,0022	0,0529	0,0235	0,6108
C ₂₆ Aldehyd	0,0027	0,0002	0,0060	0,0027	<u>0,0471</u>
C ₂₈ Aldehyd	0,0032	0,0006	0,0035	0,0014	0,6775
C ₃₀ Aldehyd	0,0085	0,0021	0,0107	0,0049	0,4433
C ₃₂ Aldehyd	0,0201	0,0022	0,0214	0,0102	0,8097
C ₃₄ Aldehyd	0,0120	0,0034	0,0111	0,0050	0,7842
Alkane	0,1531	0,0451	0,1847	0,0477	0,3725
C ₂₈ Alkan	0,0072	0,0038	0,0101	0,0031	0,2859
C ₂₉ Alkan	0,0402	0,0045	0,0519	0,0111	0,0984
C ₃₀ Alkan	0,0028	0,0002	0,0061	0,0047	0,2089
C ₃₁ Alkan	0,0648	0,0381	0,0833	0,0245	0,4447
C ₃₃ Alkan	0,0342	0,0055	0,0327	0,0112	0,8084
C ₃₅ Alkan	0,0039	0,0007	0,0007	0,0003	<u>0,0002</u>
Alkohole	0,1644	0,0361	0,1528	0,0295	0,6359
C ₂₆ Alkohol	0,0079	0,0022	0,0063	0,0018	0,3121
C ₂₈ Alkohol	0,0314	0,0205	0,0150	0,0026	0,1649
C ₃₁ Alkohol	0,0094	0,0037	0,0103	0,0064	0,8263
C ₃₄ Alkohol	0,0085	0,0008	0,0091	0,0010	0,3823
C ₃₀ Alkohol i	0,0239	0,0074	0,0255	0,0047	0,7329
C ₃₂ Alkohol i	0,0352	0,0057	0,0366	0,0057	0,7341
C ₃₀ Alkohol s	0,0217	0,0079	0,0234	0,0096	0,7926
C ₃₂ Alkohol s	0,0264	0,0051	0,0266	0,0060	0,9702
Gesamt	0,4116	0,0261	0,4158	0,0807	0,9238

Tabelle 38: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs21*- Blättern im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs21</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	STABW	
Säuren	0,0475	0,0134	0,0341	0,0076	0,1319
C ₂₄ Säure	0,0029	0,0009	0,0027	0,0011	0,8252
C ₂₆ Säure	0,0139	0,0027	0,0121	0,0046	0,5228
C ₂₈ Säure	0,0096	0,0029	0,0072	0,0014	0,2046
C ₃₀ Säure	0,0056	0,0019	0,0053	0,0010	0,7854
C ₃₂ Säure	0,0080	0,0068	0,0044	0,0006	0,3293
C ₃₄ Säure	0,0076	0,0105	0,0024	0,0006	0,3621
Aldehyde	0,0465	0,0022	0,0489	0,0151	0,7644
C ₂₆ Aldehyd	0,0027	0,0002	0,0028	0,0002	0,3219
C ₂₈ Aldehyd	0,0032	0,0006	0,0035	0,0019	0,8186
C ₃₀ Aldehyd	0,0085	0,0021	0,0108	0,0042	0,3825
C ₃₂ Aldehyd	0,0201	0,0022	0,0206	0,0064	0,8832
C ₃₄ Aldehyd	0,0120	0,0034	0,0112	0,0035	0,7718
Alkane	0,1531	0,0451	0,1334	0,0313	0,5004
C ₂₈ Alkan	0,0072	0,0038	0,0094	0,0030	0,3943
C ₂₉ Alkan	0,0402	0,0045	0,0337	0,0078	0,2013
C ₃₀ Alkan	0,0028	0,0002	0,0026	0,0004	0,3931
C ₃₁ Alkan	0,0648	0,0381	0,0567	0,0176	0,7155
C ₃₃ Alkan	0,0342	0,0055	0,0271	0,0060	0,1314
C ₃₅ Alkan	0,0039	0,0007	0,0038	0,0003	0,8237
Alkohole	0,1644	0,0361	0,1498	0,0178	0,4941
C ₂₆ Alkohol	0,0079	0,0022	0,0076	0,0023	0,8664
C ₂₈ Alkohol	0,0314	0,0205	0,0172	0,0049	0,2280
C ₃₁ Alkohol	0,0094	0,0037	0,0094	0,0012	0,9835
C ₃₄ Alkohol	0,0085	0,0008	0,0085	0,0015	0,9986
C ₃₀ Alkohol i	0,0239	0,0074	0,0278	0,0032	0,3725
C ₃₂ Alkohol i	0,0352	0,0057	0,0317	0,0038	0,3427
C ₃₀ Alkohol s	0,0217	0,0079	0,0203	0,0042	0,7683
C ₃₂ Alkohol s	0,0264	0,0051	0,0272	0,0025	0,7887
Gesamt	0,4116	0,0261	0,3662	0,0701	0,2709

8.10.6 Analyses des Wachses von *Arabidopsis*- Blüten

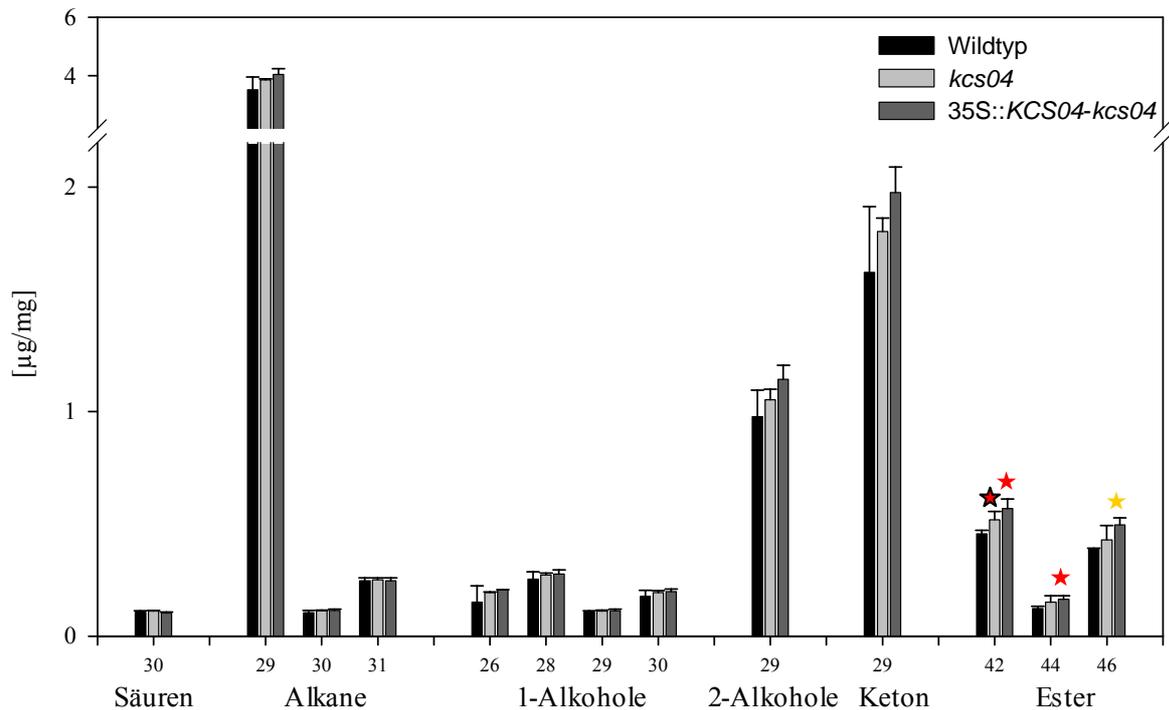


Abbildung 53: Zusammensetzung des Wachses von *kcs04*- und 35S::*KCS04-kcs04*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Wachse der Blüten wurden mittels Chloroform extrahiert und GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus 3 Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 12 mg getrocknetes, vereinigt Blütenmaterial. Die absolute Zusammensetzung von Wachs aus den verschiedenen Monomeren der T-DNA Insertionsmutante *kcs04* ist der des Wildtyps und der Insertionsmutante, die *KCS04* überexprimiert gegenübergestellt.

Gelber Stern: Signifikanzniveau > 99%; roter Stern: Signifikanzniveau > 95%.

Stern mit schwarzem Rahmen: Unterschied zwischen Wildtyp und *kcs04*; ohne Rahmen: Unterschied zwischen Wildtyp und 35S::*KCS04-kcs04*.

Tabelle 39: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs04*- und 35S::*KCS04-kcs04*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs04</i>		t-Test	35S:: <i>KCS04-kcs04</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha=0,05$	MW	STABW	$\alpha=0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	0,107	0,006	0,111	0,004	0,323	0,102	0,006	0,414
C ₃₀ Säure	0,107	0,006	0,111	0,004	0,323	0,102	0,006	0,414
Alkane	3,873	0,423	4,220	0,039	0,231	4,404	0,206	0,123
C ₂₉ Alkan	3,523	0,426	3,856	0,032	0,248	4,043	0,196	0,127
C ₃₀ Alkan	0,104	0,010	0,112	0,003	0,248	0,114	0,005	0,193
C ₃₁ Alkan	0,246	0,013	0,251	0,007	0,586	0,246	0,013	0,999
Alkohole	1,666	0,254	1,824	0,061	0,355	1,938	0,098	0,159
C ₂₆ Alkohol	0,152	0,072	0,195	0,002	0,361	0,206	0,001	0,260
C ₂₈ Alkohol	0,253	0,033	0,272	0,010	0,405	0,277	0,018	0,347
C ₂₉ Alkohol	0,107	0,005	0,111	0,005	0,396	0,113	0,007	0,312
C ₃₀ Alkohol	0,176	0,027	0,194	0,010	0,362	0,198	0,012	0,275
C ₂₉ sek Alkohol	0,978	0,119	1,053	0,047	0,364	1,144	0,063	0,098
Ketone	1,621	0,293	1,803	0,059	0,351	1,977	0,114	0,122
C ₂₉ Keton	1,621	0,293	1,803	0,059	0,351	1,977	0,114	0,122
Ester	0,968	0,026	1,098	0,126	0,155	1,229	0,087	<u>0,008</u>
C ₄₂ Ester	0,455	0,016	0,519	0,036	<u>0,049</u>	0,568	0,043	<u>0,013</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₆ OH)								
C ₄₄ Ester	0,123	0,010	0,151	0,028	0,178	0,165	0,015	<u>0,017</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₈ OH)								
C ₄₆ Ester	0,390	0,001	0,429	0,064	0,355	0,496	0,031	<u>0,004</u>
(C ₁₆ COOH/C ₃₀ OH)								
Gesamt	8,235	0,949	9,056	0,075	0,210	9,649	0,501	0,085

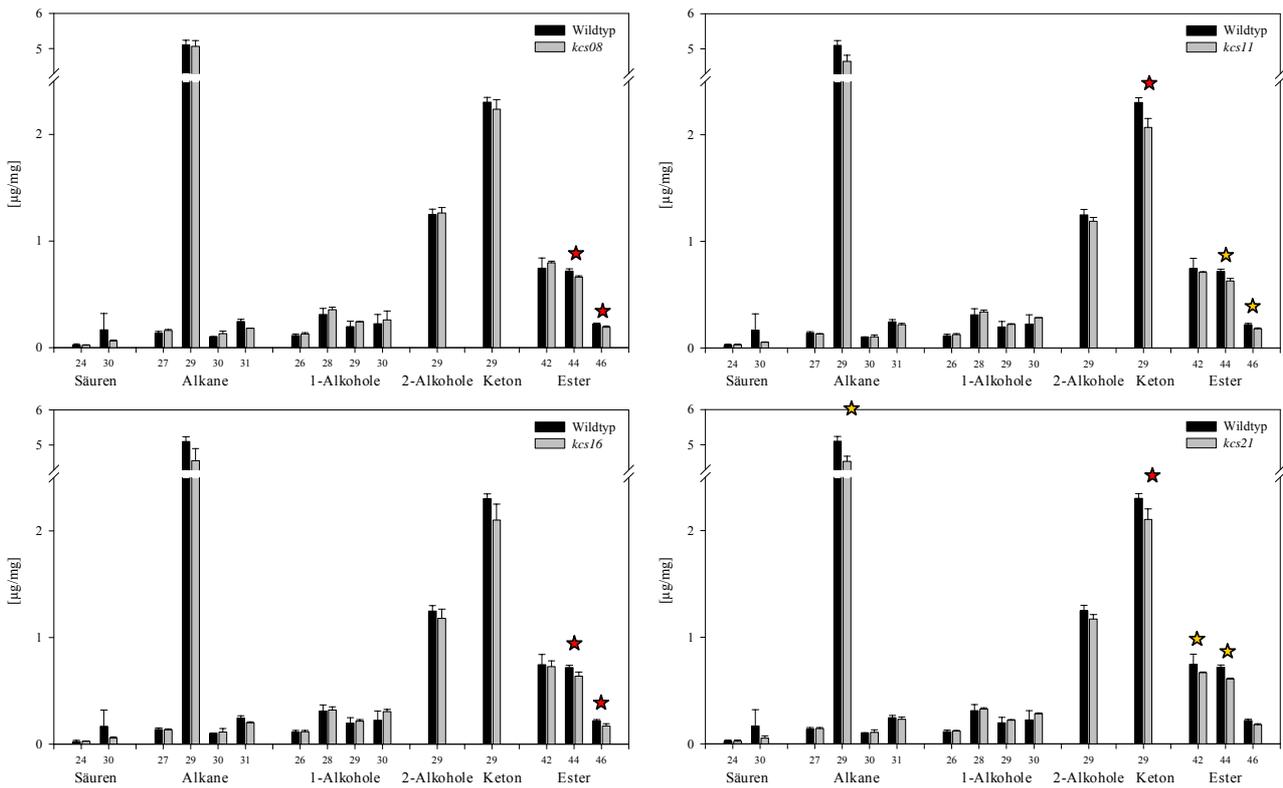


Abbildung 54: Absolute Zusammensetzung des Blütenwaxes von *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* im Vergleich zum Wildtyp

Die Wachse der Blüten wurden mittels Chloroform extrahiert und GC-FID aufgetrennt. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus 3 Parallelen, jede Parallele repräsentiert ca. 12 mg getrocknetes, vereinigtes Blütenmaterial.

Die absolute Zusammensetzung von Wachs aus den verschiedenen Monomeren der T-DNA Insertionsmutanten *kcs08*, *kcs11*, *kcs16* und *kcs21* ist jeweils der des Wildtyps gegenübergestellt.

Gelber Stern: Signifikanzniveau $> 99\%$; roter Stern: Signifikanzniveau $> 95\%$

Tabelle 40: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs08*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs08</i>		t-Test $\alpha = 0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	0,190	0,164	0,085	0,007	0,332
C ₂₄ Säure	0,024	0,012	0,024	0,003	0,949
C ₃₀ Säure	0,165	0,153	0,062	0,009	0,306
Alkane	5,580	0,133	5,543	0,182	0,789
C ₂₇ Alkan	0,138	0,014	0,160	0,010	0,088
C ₂₉ Alkan	5,099	0,141	5,068	0,163	0,816
C ₃₀ Alkan	0,100	0,005	0,133	0,022	0,073
C ₃₁ Alkan	0,243	0,023	0,182	0,001	<u>0,010</u>
Alkohole	2,093	0,215	2,248	0,131	0,346
C ₂₆ Alkohol	0,112	0,016	0,128	0,012	0,248
C ₂₈ Alkohol	0,311	0,057	0,356	0,024	0,277
C ₂₉ Alkohol	0,198	0,051	0,241	0,003	0,218
C ₃₀ Alkohol	0,223	0,087	0,260	0,083	0,621
C ₂₉ sek Alkohol	1,249	0,049	1,263	0,051	0,750
Ketone	2,302	0,044	2,235	0,089	0,309
C ₂₉ Keton	2,302	0,044	2,235	0,089	0,309
Ester	1,681	0,086	1,650	0,025	0,576
C ₄₂ Ester	0,746	0,096	0,797	0,015	0,414
(C ₁₆ COOH/C ₂₆ OH)					
C ₄₄ Ester	0,717	0,021	0,662	0,010	<u>0,014</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₈ OH)					
C ₄₆ Ester	0,218	0,011	0,191	0,011	<u>0,042</u>
(C ₁₆ COOH/C ₃₀ OH)					
Gesamt	13,446	0,511	13,402	0,349	0,909

Tabelle 41: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcsII*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcsII</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha = 0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	0,190	0,164	0,081	0,008	0,317
C ₂₄ Säure	0,024	0,012	0,029	0,007	0,581
C ₃₀ Säure	0,165	0,153	0,052	0,004	0,270
Alkane	5,580	0,133	5,101	0,179	0,020
C ₂₇ Alkan	0,138	0,014	0,131	0,003	0,443
C ₂₉ Alkan	5,099	0,141	4,648	0,172	<u>0,025</u>
C ₃₀ Alkan	0,100	0,005	0,105	0,017	0,690
C ₃₁ Alkan	0,243	0,023	0,218	0,011	0,154
Alkohole	2,093	0,215	2,160	0,061	0,633
C ₂₆ Alkohol	0,112	0,016	0,126	0,008	0,248
C ₂₈ Alkohol	0,311	0,057	0,339	0,017	0,460
C ₂₉ Alkohol	0,198	0,051	0,223	0,006	0,458
C ₃₀ Alkohol	0,223	0,087	0,284	0,001	0,292
C ₂₉ sek Alkohol	1,249	0,049	1,188	0,035	0,153
Ketone	2,302	0,044	2,068	0,083	0,013
C ₂₉ Keton	2,302	0,044	2,068	0,083	<u>0,013</u>
Ester	1,681	0,086	1,517	0,026	0,034
C ₄₂ Ester	0,746	0,096	0,708	0,006	0,533
(C ₁₆ COOH/C ₂₆ OH)					
C ₄₄ Ester	0,717	0,021	0,629	0,023	<u>0,008</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₈ OH)					
C ₄₆ Ester	0,218	0,011	0,180	0,008	<u>0,008</u>
(C ₁₆ COOH/C ₃₀ OH)					
Gesamt	13,446	0,511	12,500	0,332	0,055

Tabelle 42: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs16*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs16</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha = 0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	0,190	0,164	0,083	0,011	0,325
C ₂₄ Säure	0,024	0,012	0,027	0,003	0,739
C ₃₀ Säure	0,165	0,153	0,057	0,013	0,287
Alkane	5,580	0,133	5,005	0,379	0,068
C ₂₇ Alkan	0,138	0,014	0,135	0,008	0,782
C ₂₉ Alkan	5,099	0,141	4,557	0,341	0,064
C ₃₀ Alkan	0,100	0,005	0,112	0,034	0,600
C ₃₁ Alkan	0,243	0,023	0,202	0,007	<u>0,040</u>
Alkohole	2,093	0,215	2,136	0,155	0,794
C ₂₆ Alkohol	0,112	0,016	0,117	0,010	0,719
C ₂₈ Alkohol	0,311	0,057	0,320	0,029	0,806
C ₂₉ Alkohol	0,198	0,051	0,214	0,014	0,632
C ₃₀ Alkohol	0,223	0,087	0,305	0,022	0,190
C ₂₉ sek Alkohol	1,249	0,049	1,180	0,084	0,286
Ketone	2,302	0,044	2,099	0,151	0,090
C ₂₉ Keton	2,302	0,044	2,099	0,151	0,090
Ester	1,681	0,086	1,535	0,110	0,143
C ₄₂ Ester	0,746	0,096	0,728	0,054	0,790
(C ₁₆ COOH/C ₂₆ OH)					
C ₄₄ Ester	0,717	0,021	0,636	0,039	<u>0,033</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₈ OH)					
C ₄₆ Ester	0,218	0,011	0,171	0,021	<u>0,026</u>
(C ₁₆ COOH/C ₃₀ OH)					
Gesamt	13,446	0,511	12,422	0,867	0,153

Tabelle 43: Absolute Verteilung der Wachsmomeren aus *kcs2I*- Blüten im Vergleich zum Wildtyp
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

Monomere	Wildtyp		<i>kcs2I</i>		t-Test
	MW	STABW	MW	STABW	$\alpha = 0,05$
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Säuren	0,190	0,164	0,078	0,026	0,307
C ₂₄ Säure	0,024	0,012	0,024	0,010	0,981
C ₃₀ Säure	0,165	0,153	0,053	0,020	0,277
Alkane	5,580	0,133	5,016	0,162	0,010
C ₂₇ Alkan	0,138	0,014	0,142	0,010	0,679
C ₂₉ Alkan	5,099	0,141	4,537	0,143	<u>0,008</u>
C ₃₀ Alkan	0,100	0,005	0,107	0,023	0,629
C ₃₁ Alkan	0,243	0,023	0,229	0,021	0,460
Alkohole	2,093	0,215	2,117	0,071	0,863
C ₂₆ Alkohol	0,112	0,016	0,119	0,007	0,576
C ₂₈ Alkohol	0,311	0,057	0,325	0,014	0,688
C ₂₉ Alkohol	0,198	0,051	0,222	0,006	0,465
C ₃₀ Alkohol	0,223	0,087	0,281	0,008	0,319
C ₂₉ sek Alkohol	1,249	0,049	1,171	0,040	0,097
Ketone	2,302	0,044	2,105	0,097	0,033
C ₂₉ Keton	2,302	0,044	2,105	0,097	<u>0,033</u>
Ester	1,681	0,086	1,456	0,005	0,011
C ₄₂ Ester	0,746	0,096	0,668	0,006	0,234
(C ₁₆ COOH/C ₂₆ OH)					
C ₄₄ Ester	0,717	0,021	0,608	0,008	<u>0,001</u>
(C ₁₆ COOH/C ₂₈ OH)					
C ₄₆ Ester	0,218	0,011	0,180	0,009	<u>0,009</u>
(C ₁₆ COOH/C ₃₀ OH)					
Gesamt	13,446	0,511	12,385	0,399	0,047

Tabelle 44: Homologievergleich der 21 KCS-Gene

	KCS01	KCS02	KCS03	KCS04	KCS05	KCS06	KCS07	KCS08	KCS09	KCS10	KCS11	KCS12	KCS13	KCS14	KCS15	KCS16	KCS17	KCS18	KCS19	KCS20	KCS21
KCS01	-	52	36	56	53	53	40	50	54	50	58	36	55	54	40	49	57	59	58	41	34
KCS02	52	-	37	68	57	58	44	58	77	51	58	35	51	50	44	60	59	62	59	44	37
KCS03	36	37	-	34	36	35	31	36	36	32	35	79	36	35	30	35	35	37	35	35	50
KCS04	56	68	34	-	60	60	44	59	76	55	64	33	50	49	43	60	60	61	61	42	34
KCS05	53	57	36	60	-	88	47	52	61	50	56	37	48	47	42	50	56	50	57	44	33
KCS06	53	58	35	60	88	-	46	51	61	51	56	35	48	47	42	50	56	50	57	46	34
KCS07	40	44	31	44	47	46	-	44	42	37	40	35	42	41	37	44	43	42	43	46	35
KCS08	50	58	36	59	52	51	44	-	58	42	54	37	52	50	37	74	53	63	53	43	37
KCS09	54	77	36	76	61	61	42	58	-	51	63	35	50	49	43	60	61	64	61	41	35
KCS10	50	51	32	55	50	51	37	42	51	-	52	32	42	41	46	43	50	44	50	37	32
KCS11	58	58	35	64	56	56	40	54	63	52	-	35	53	52	43	54	70	54	69	42	35
KCS12	36	35	79	33	37	35	35	37	35	30	35	-	37	36	32	37	36	34	37	35	50
KCS13	55	51	36	50	48	48	42	52	50	42	53	37	-	98	39	48	52	48	51	43	36
KCS14	54	50	35	49	47	47	41	50	49	41	52	36	98	-	37	47	51	46	51	42	35
KCS15	40	44	30	43	42	42	37	37	43	46	43	32	39	37	-	41	44	39	44	36	27
KCS16	49	60	35	60	50	50	44	74	60	43	54	37	48	47	41	-	53	63	52	43	35
KCS17	57	59	35	60	56	56	43	53	61	50	70	36	52	51	44	53	-	51	87	43	35
KCS18	49	62	37	61	50	50	42	63	64	44	54	34	48	46	39	63	51	-	52	42	33
KCS19	58	59	35	61	57	57	43	53	61	50	69	36	51	51	44	52	87	52	-	43	35
KCS20	41	44	35	42	44	46	46	43	41	37	42	35	43	42	36	43	43	42	43	-	36
KCS21	34	37	50	34	33	34	35	37	35	32	35	50	36	35	27	35	35	33	35	36	-

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, 28.01.08

Danksagungen

Mein Dank geht an

- Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Bereitstellung des interessanten Themas.
- Herrn PD Rochus Franke für die herausragende Betreuung, dafür dass er immer ein offenes Ohr hatte und ich jederzeit mit Problemen zu ihm kommen konnte.
- die gesamte Arbeitsgruppe Schreiber für die freundschaftliche Atmosphäre, die allzeitige Hilfsbereitschaft, die wissenschaftlichen Diskussionen und nicht zuletzt für die gemeinsamen Pauschen.
- alle Korrekturleser: Tina Ballmann, Anja Bodenheim, Patrik Diehl, Mathias Dombrink, Mitja Emsermann, Andrea Faust, Carolin Hohn, Julia Schwarzer.
- die Studenten Frederik Dethloff, Kirsten Knapp, Kati Sell, für die Zusammenarbeit und dass sie mir den Laboralltag etwas erleichterten.
- meine Freunde Anja, Julia und Mathias, dafür dass sie alle Hochs und Tiefs mitmachen.
- meine Eltern und meine Oma für die Unterstützung jeglicher Art!