

Untersuchungen zur Suberinentwicklung und der
Bedeutung von Cytochrom P-450 Monooxygenasen bei
der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*.

DISSERTATION

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

vorgelegt von
René Höfer
aus Koblenz

Bonn 2008

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für zelluläre und molekulare Botanik der Universität Bonn angefertigt.

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

Tag der Abgabe der Dissertation: 03.09.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2008

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

Bonn, 2008

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Anforderungen an pflanzliche Grenzflächen.....	2
1.2. Kutin und Wachs.....	3
1.3. Suberin.....	4
1.4. Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	9
1.5. Zielsetzung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Chemikalien.....	14
2.2. Pflanzenmaterial und Anzuchtsbedingungen	14
2.2.1. Verwendete Pflanzen	14
2.2.2. Allgemeine Anzuchtsbedingungen	14
2.2.3. Anzucht von <i>Arabidopsis</i> unter NaCl-Einfluss	15
2.2.4. Anzucht von Keimlingen zur Untersuchung des Wurzelwachstums	15
2.2.5. Behandlung von Keimlingen zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Genen unter Stressbedingungen	15
2.3. Molekularbiologische Arbeiten.....	16
2.3.1. Methode zur Extraktion von RNA mit TriReagent.....	16
2.3.2. Methode zur Extraktion von RNA mit LiCl.....	16
2.3.3. Methode zur Extraktion von genomischer DNA.....	17
2.3.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	17
2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.3.6. Reverse Transkription–Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	19
2.3.7. Gelelektrophorese.....	20
2.3.8. Isolation, Überprüfung und Sequenzierung von Plasmiden.....	20
2.4. Isolation von T-DNA Insertionsmutanten	21
2.5. Mikrobiologische Arbeiten	23
2.5.1. Herstellung kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	23
2.5.2. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	23
2.5.3. Herstellung kompetenter Zellen von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>).....	23
2.5.4. Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mittels Hitzeschock.....	24

2.5.5. Langzeitlagerung von Mikroorganismen	24
2.6. Herstellung transgener Pflanzen	25
2.6.1. Herstellung von Pflanzen Transformations-Vektoren	25
2.6.1.1. Erzeugung eines <i>entry-clone</i>	25
2.6.1.2. Erzeugung eines <i>expression-clone</i>	26
2.6.2. Transformation von <i>Arabidopsis</i> mittels <i>Floral-Dip</i> Methode.....	27
2.6.2.1. Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> für <i>Floral-Dip</i>	27
2.6.2.2. Durchführung des <i>Floral-Dip</i>	27
2.7. Transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	
 (<i>N. benthamiana</i>).....	28
2.8. Mikroskopische Untersuchungen.....	29
2.8.1. β -Glucuronidase (GUS) Aktivitätstest.....	29
2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	29
2.8.3. Histochemische Färbung	30
2.9. Analytische Untersuchungen	30
2.9.1. Herstellung der Proben	30
2.9.1.1. Extraktion von Blattwachsen.....	30
2.9.1.2. Anreicherung suberinisierter Wurzelzellwände von 35 d alten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	30
2.9.1.3. Alternative Aufbereitung von <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln verschiedenen Alters	31
2.9.1.4. Präparation totalextrahierter Blätter	31
2.9.1.5. Anreicherung totalextrahierter Samenschalen.....	32
2.9.1.6. Umesterungsreaktion.....	32
2.9.1.7. Derivatisierung	32
2.9.2. Gaschromatographie und Massenspektrometrie	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1. Änderung der Suberinzusammensetzung im Verlauf des Wurzelwachstums von <i>Arabidopsis</i> ..	
 	36
3.2. Einfluss von NaCl auf die Suberinisierung in <i>Arabidopsis</i>	42
3.3. Auswahl von Kandidatengenem	45
3.4. Organspezifische Expressionsanalyse der Kandidatengene	48
3.5. Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene unter abiotischen Stressbedingungen	50
3.5.1. NaCl-Behandlung.....	50
3.5.2. Mannitolbehandlung	53

3.6. Bestätigung des transkriptionellen Knockout von T-DNA Insertionsmutanten der Kandidatengene.....	55
3.7. Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins in Knockout-Pflanzen der Kandidatengene.....	58
3.8. Weiterführende Untersuchungen zu CYP86A1	64
3.8.1. Komplementation der Knockout Mutanten <i>cyp86a1-1</i>	64
3.8.2. Überexpression von <i>CYP86A1</i> in Wildtyp und Mutante.....	66
3.8.3. Zusammensetzung anderer Biopolyester und des Wachses von <i>cyp86a1</i> und dem Wildtyp .	68
3.8.4. Untersuchung des Wurzelwachstums von <i>cyp86a1</i>	70
3.8.5. Gewebespezifische Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i> anhand der Promotor _{<i>CYP86A1</i>} :GUS Aktivität	71
3.8.6. Subzelluläre Lokalisation von <i>CYP86A1</i> mit einem CYP86A1-GFP-Fusionsprotein	73
4. DISKUSSION	75
4.1. Im Verlauf der Wurzelentwicklung dominieren ω-Hydroxysäuren im Wurzelsuberin von <i>Arabidopsis</i>.....	76
4.2. Die Wurzel von <i>Arabidopsis</i> wird bei NaCl-Behandlung verstärkt suberinisiert.....	78
4.3. CYP81F4, CYP705A1 und CYP705A13 sind wahrscheinlich nicht an der Biosynthese aliphatischer Suberinmonomere in <i>Arabidopsis</i> beteiligt.....	79
4.4. CYP86A1 ist ein Schlüsselenzym der aliphatischen Suberinbiosynthese in <i>Arabidopsis</i>	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	90
6. SUMMARY	92
7. LITERATUR	94
8. ANHANG	106
8.1. Verwendete Chemikalien	107
8.2. Verwendete Lösungen und Medien	107
8.3. Verwendete Primer und Berechnung der <i>Annealing</i>temperatur	113
8.4. Verwendete und erzeugte Vektoren	115
8.5. Ergänzende Ergebnisse.....	120
8.5.1. Detaillierte Daten der Analyse des Wurzelsuberins von <i>Arabidopsis</i> nach NaCl-Behandlung	120

8.5.2. Organ- und entwicklungsspezifische Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i>	121
8.5.3. Vergleich der Wurzeloberfläche von <i>cyp705a1</i> und dem Wildtyp	122
8.5.4. Expressionslevel von <i>CYP86A1</i> in Pflanzen, die mit einem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt transformiert wurden.....	123
8.5.5. Detaillierte Daten der Analyse des Blattkutins der <i>cyp86a1</i> Mutanten und des <i>Arabidopsis</i> - Wildtyp	125
8.5.6. Detaillierte Daten der Analyse des Samenschalenpolyesters der <i>cyp86a1-1</i> Mutante und des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp	126
8.5.7. Detaillierte Daten der Analyse des Blattwachses der <i>cyp86a1-1</i> Mutante und des <i>Arabidopsis</i> - Wildtyp	127
8.6. Abbildungsverzeichnis.....	128
8.7. Tabellenverzeichnis.....	131
<u>PUBLIKATIONSLISTE</u>	133
<u>LEBENS LAUF</u>	134
<u>DANKSAGUNG</u>	135

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure (engl. <i>abscisic acid</i>)
ACC	A minocyclopropan c arbonsäure
Bp	B asen p aare
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluo a cetamid
cDNA	komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i>)
CDS	kodierende Sequenz (engl. <i>coding sequence</i>)
d	Tag (engl. <i>day</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	engl. <i>deoxyribonucleoside triphosphates</i>
DsRed	<i>Discosoma sp. red fluorescing protein</i>
FAE	Fettsäureelongation (engl. <i>Fatty acid elongation</i>)
FID	F lammenionisations d etektor
GC	G aschromatograph
GFP	g rün fluo r eszierendes P rotein
GNS	g enomische S equenz
GOI	engl. <i>gen of interest</i>
GUS	β - G lucuronidase
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
KCS	β - K etoacyl- C oA- S ynthase
M / mM	m olar / m illimolar
mA	m illi A mpere
MeOH/HCl	methanolische Salzsäure
mgdw	Milligramm Trockengewicht (engl. <i>milligramme dryweight</i>)
mRNA	Boten- R NA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MS	M assens p ektrometer
OD	o ptische D ichte
P450	Cytochrom P- 450 Monooxygenase
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	R ibonukleinsäure
RT-PCR	R everse T ranskriptions- P CR

TEM	T ransmissionselektronen m ikroskop
Temp.	T emperatur
UV	U ltraviolett
VLCFA	sehr langkettige Fettsäuren (engl. <i>very long chain fatty acids</i>)
Vol	V olumen
v/v	V olumen zu V olumen
x-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β - g lucoronid

Kapitel 1

Einleitung

Fundamental für die Evolution des Lebens war die Entwicklung von Grenzflächen, die den Organismus gegen die Umwelt abgrenzen. In der kleinsten Einheit der belebten Welt, der Zelle, wird diese Aufgabe durch eine Plasmamembran erfüllt. Sie ermöglicht einen selektiven Stoff- und Informationsaustausch mit der Umgebung. Im Laufe der Evolution von mehrzelligen, immer komplexeren Lebewesen, entwickelten sich schließlich ganze Gewebe, die ausschließlich als Grenzfläche zur Umwelt fungieren. Bei modernen mehrzelligen Lebewesen bildet eine Epidermis das Abschlussgewebe zwischen Corpus und Umwelt.

1.1. Anforderungen an pflanzliche Grenzflächen

Die wichtigste Anforderung an oberirdische pflanzliche Grenzflächen ist die Abdichtung des Pflanzenkörpers, um Wasserverlust an die Atmosphäre zu verhindern. Zudem müssen Pathogene davon abgehalten werden in den Pflanzenkörper einzudringen (Müller, 2006; Leveau, 2006). Auch die Auswaschung von Stoffen aus dem Pflanzenkörper durch Regen und Nebel soll unterbunden werden. Modifikationen der oberirdischen Grenzfläche tragen außerdem dazu bei, die Oberfläche von Schmutz und Pathogenen zu reinigen (Barthlott und Neinhuis, 1997), oder durch Teilreflektion von Strahlung den Photosyntheseapparat zu schützen (Pfündel *et al.*, 2006). Übereinstimmend mit der oberirdischen, muss auch die unterirdische pflanzliche Grenzfläche Wasserverlust an das umgebende Substrat und das Eindringen von Pathogenen verhindern. Ein entscheidender Unterschied zur oberirdischen Grenzfläche ist, dass die selektive Aufnahme von Wasser und gelösten Nährstoffen weiterhin ermöglicht werden muss. Die Aufnahme von toxischen Substanzen aus dem Substrat muss jedoch verhindert werden.

Um diesen verschiedenartigen Anforderungen an ober- und unterirdische pflanzliche Grenzflächen gerecht zu werden, unterscheidet sich auch die chemische und morphologische Anpassung in ober- und unterirdischen pflanzlichen Abschlussgeweben. Alle oberirdischen Grenzflächen von Pflanzenorganen im primären Entwicklungszustand sind mit einer Kutikula bedeckt, die sich aus dem Biopolymer Kutin und darin auf- und eingelagerten Wachsen zusammensetzt (Abbildung 1A). Das unterirdische Abschlussgewebe bildet im primären Entwicklungszustand die sogenannte Endodermis, die sich im Pflanzenkörper befindet und durch die Einlagerung des Biopolymers Suberin abgedichtet wird (Abbildung 1B).

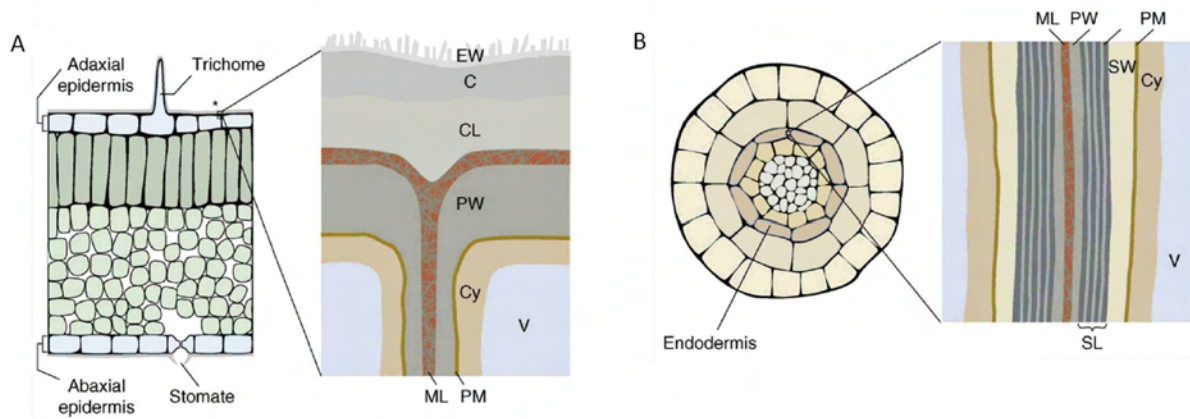


Abbildung 1: Schematisches Modell von Kutin- und Suberinablagerungen (nach Pollard *et al.*, 2008).

(A) Schematischer Querschnitt durch ein Blatt mit Kutin- und Wachsablagerungen auf der Oberfläche. Epikutikuläre Wachse (EW) bedecken das Kutikel (C), welches sich aus Kutin und eingelagerten Wachsen zusammensetzt. Eine darunterliegende Kutinschicht (CL) stellt die Verbindung zur Zellwand der Epidermiszellen her. (B) Schematischer Querschnitt durch eine Wurzel im primären Entwicklungszustand mit Suberineinlagerung in der Endodermis. Gezeigt sind zwei benachbarte Endodermiszellen deren Zwischenraum mit einer Suberinlamelle (SL) abgedichtet ist. Mit Cy= Zytoplasma; ML= Mittellamelle; PM= Plasmamembran; PW= primäre Zellwand; SW= sekundäre Zellwand; V= Vakuole.

1.2. Kutin und Wachs

Die Kutikula wird nur in oberirdischen Abschlussgeweben gebildet. Neben dem Spross im primären Entwicklungszustand, den Blättern und der Blüte, werden auch Früchte von ihr bedeckt. Die Kutikula ist eine der Epidermis aufgelagerte 0,1-10 μm dicke Membran, die oft sogar weniger durchlässig für Wasser ist, als moderne artifizielle Polymere gleicher Dicke (Riederer und Schreiber, 2001). Sie ist über eine pektinreiche Schicht fest mit der Zellwand der Epidermis verbunden. Die Kutikula setzt sich aus einer Polymermatrix, dem Kutin, und löslichen Lipiden, den kutikulären Wachsen zusammen. Das Kutin besteht hauptsächlich aus C_{16} und C_{18} Hydroxysäuren, die ein dreidimensionales Polyesternetzwerk bilden. In geringeren Anteilen können je nach Pflanzenart noch Fettsäuren, Alkohole, Aldehyde, Ketone und Disäuren eingebunden sein (Nawrath, 2002). Bei der Quervernetzung der Aliphaten spielt Glycerin eine wichtige Rolle (Graca *et al.*, 2002). In das Kutin sind intrakutikuläre Wachse eingelagert und die Oberfläche mit epikutikulären Wachsen überzogen. Die Wachse setzen sich aus einer artspezifischen Mischung aus langkettigen Aliphaten, wie zum Beispiel Alkanen, Alkoholen, Aldehyden, Ketone und Fettsäuren zusammen (Walton, 1990, Jenks *et al.*, 2002). Nur durch das Zusammenspiel von Kutin und Wachs kommen die herausragenden Barriereigenschaften der Kutikula zustande. Entfernt man die Wachse, wird die

Kutikula für Wasser um einige Größenordnungen durchlässiger (Schönherr und Riederer, 1989). Durch die Skulpturierung der Kutikula und die Ausbildung von hochgeordneten, epikutikulären Wachsstrukturen, kann zudem die Anheftung von Pathogenen erschwert und die Oberfläche durch Wasser effektiv gereinigt werden (Furstner *et al.*, 2000).

1.3. Suberin

Die Depositionsorte von Suberin sind höchst divers. In oberirdischen Pflanzenteilen kommt Suberin im Periderm des Sprosses im sekundären Entwicklungszustand, Bündelscheidenzellen der C₄-Pflanzen, Nadeln der Koniferen, und der Samenschale vor (Kolattukudy, 1981, 2001; Bernards, 2002). In unterirdischen Pflanzenteilen wird Suberin in den Zellwänden der Endodermis und des Periderms der Wurzel aller Angiospermen inklusive *Arabidopsis* (Ma und Peterson, 2003; Franke *et al.*, 2005) und in rhizodermalen und hypodermalen Geweben der primären Wurzel eingelagert (Perumalla *et al.*, 1990). Entsprechend der Anforderung an pflanzliche Grenzflächen konnte für das Periderm vieler Spezies gezeigt werden, dass apoplastische Suberineinlagerungen den Fluss von Wasser, gelösten Nährstoffen und Ionen im Apoplasten weitgehend unterbinden (Schönherr und Ziegler, 1980; Vogt *et al.*, 1983; Groh *et al.*, 2002). In gleicher Weise behindern suberinisierte Zellwände der Wurzel die Bewegung von Wasser und Ionen. Ein gutes Beispiel ist der suberinisierte Casparische-Streifen der Wurzelendodermis (Schreiber *et al.*, 1994), der es diesem inneren Pflanzengewebe ermöglicht die Aufnahme von Wasser und Ionen in die Stele zu kontrollieren (Sattelmacher *et al.*, 1998; Ma und Peterson, 2003). Bei der Einlagerung von Suberin in ein äußeres Abschlussgewebe, wie dem Periderm der Wurzel, wirkt es zudem als antimikrobielle Barriere gegen Pathogene (Lulai und Corsini, 1998). Außerdem kann es zu zusätzlichen Suberineinlagerungen als Reaktion auf Verwundung und Pathogenbefall kommen (Agrios, 1997) und unter ungünstigen Umweltbedingungen wie Trockenheit oder Salzstress (North und Nobel, 1994; Reinhardt und Rost, 1995; Steudle und Peterson, 1998). Diese vermehrte Suberineinlagerung, und in gleicher Weise auch die Induktion einer suberinisierten Exodermis in Mais durch eine aeroponische Anzucht, führt zu einem verstärkten Widerstand gegen Wasserverlust in der Wurzel (Zimmermann *et al.*, 2000). Zusammengefasst zeigen die bisherigen Erkenntnisse, dass die

Wasserleitfähigkeit, beziehungsweise die Dichtigkeit der Wurzel, durch die Einlagerung des aliphatischen Polymers Suberin auf vielerlei äußere Einflüsse abgestimmt werden kann.

Die Eigenschaft von Suberin als multifunktionelle Barriere zu wirken beruht auf dem molekularen Aufbau des Suberins. Das Makromolekül Suberin besteht aus einer polyaromatischen- und polyaliphatischen Domäne (Kolattukudy, 2001; Bernards, 2002). Die polyaromatische Domäne, besteht aus Phenylpropanoiden, die an der primären Zellwand angelagert und mit Kohlenhydraten der primären Zellwand kovalent verbunden sind (Abbildung 2A). Im Gegensatz dazu, ist die polyaliphatische Domäne ein dreidimensionales Polyesternetzwerk. Sie besteht aus langkettigen Fettsäuren und Fettsäurederivaten, die teilweise mit Glycerin quervernetzt sind, aromatische Verbindungen einbinden und an der polyaromatischen Domäne verankert sind. Der hochgeordnete Aufbau des Polyesternetzwerks, ist vermutlich auch für die im TEM erkennbare Lamellierung des Suberins verantwortlich (Abbildung 2B), bei der sich elektronendichte Bereiche, mit einem hohen Anteil an aromatischen Verbindungen, und relativ elektronendurchlässige Bereiche, die vornehmlich aliphatische Verbindungen enthalten, abwechseln (Bernards 2002). Es wird vermutet, dass die aliphatische Domäne des Suberin, die Basis für seine abdichtenden Eigenschaften bildet (Hose *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2000). Daher liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Aufklärung der Biosynthese von Verbindungen der aliphatischen Suberindomäne.

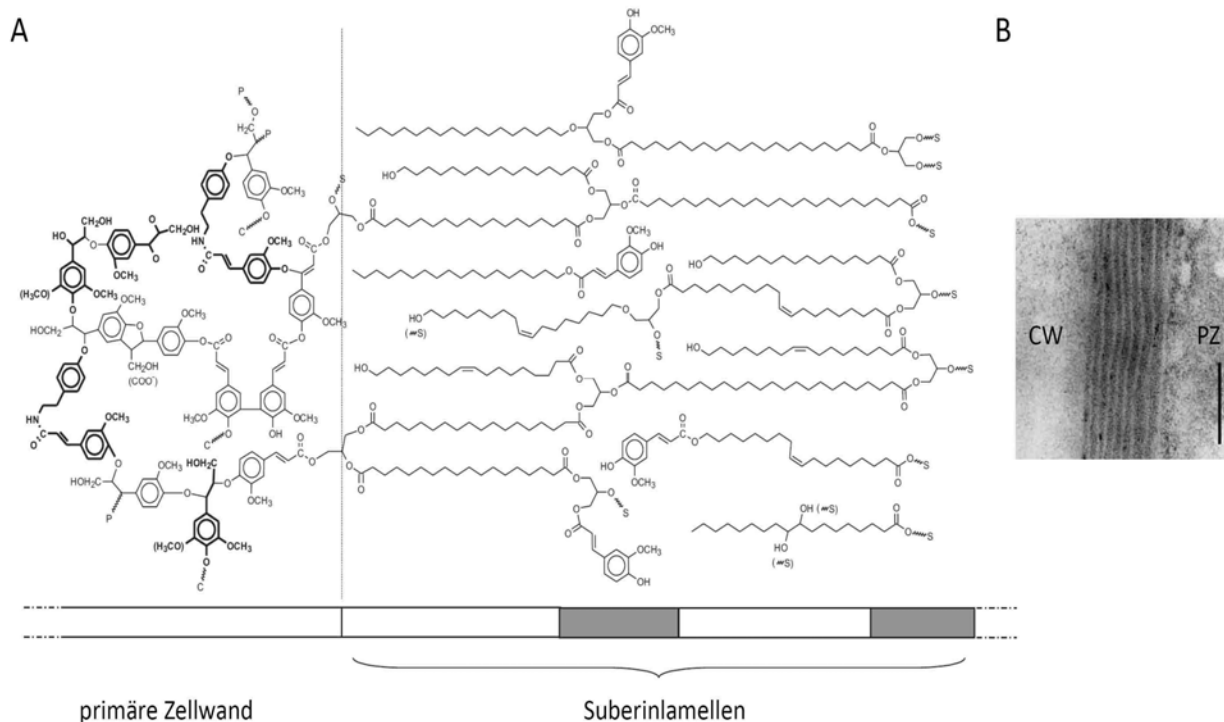


Abbildung 2: Aktuelles zweidimensionales Modell der Suberinstruktur und TEM-Aufnahme der Suberinlamellen (nach Bernards, 2002; Nawrath, 2002).

(A) Das Modell zeigt die Verankerung des Suberinpolymers über die polyaromatische Domäne in der primären Zellwand (links) und einen kleinen Teil einer polyaliphatischen Domäne (Suberinlamellen). Der Balken unter dem Modell steht für elektronenarme (weiß) und elektronenreiche (grau) Bereiche, die auch in TEM-Aufnahmen der Suberinlamelle von *Arabidopsis* erkennbar sind (B). Mit C= Kohlenhydrate; P= Aromaten; S= Suberin (aromatisch oder aliphatisch); CW= Zellwand; PZ= peridermale Zelle; Maßstab in (B)= 100 nm.

Die aliphatischen Bestandteile des Suberins von *Arabidopsis* sind vor allem ω -Hydroxysäuren (C_{16} - C_{24}) und α,ω -Disäuren (C_{16} - C_{24}), mit geringeren Mengen an sehr langkettigen Fettsäuren (*very long-chain fatty acids*, VLCFA) (C_{16} - C_{24}), primären Alkoholen (C_{16} - C_{20}) und 2-Hydroxysäuren (C_{20} - C_{24}) (Franke *et al.*, 2005; Beisson *et al.*, 2007; Höfer *et al.*, 2008). Eine vergleichbare Suberinzusammensetzung konnte auch bei anderen Spezies nachgewiesen werden (Holloway, 1983; Matzke und Riederer, 1991; Schreiber *et al.*, 1999). Basierend auf Kohlenstofffluss-Studien im sich entwickelnden Wundperiderm von Kartoffelknollen (Yang und Bernards, 2006), und der chemischen Zusammensetzung des Suberins von *Arabidopsis* und anderen Spezies (Franke und Schreiber, 2007), werden zwei Stoffwechselwege als charakteristisch für die Biosynthese des aliphatischen Suberins angesehen. Der eine Stoffwechselweg ist die Verlängerung von C_{16} und C_{18} Fettsäuren zu VLCFA, der andere Stoffwechselweg beinhaltet Reaktionen zur ω -Oxygenierung von Fettsäuren zur Synthese von Fettsäurederivaten, wie ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Einen vereinfachten Überblick der Suberinbiosynthese zeigt Abbildung 3. Die

Fettsäureelongation (*fatty acid elongation*, FAE) ist ein mehrstufiger Prozess, der durch einen Multienzymkomplex am Endoplasmatischen Retikulum (ER) durchgeführt wird. Der β -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) kommt in diesem Multienzymkomplex eine besondere Rolle zu, da sie das geschwindigkeits- und produktbestimmende Enzym ist (Millar und Kunst, 1997). Über KCS wurden schon ausgiebige Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde auch eine KCS von *Arabidopsis* identifiziert, die in der Suberinbiosynthese involviert ist (Briesen, 2008; Franke *et al.*, 2008 im Druck). Bei der ω -Oxygenierung von Fettsäuren, und somit bei der Synthese eines Großteils der aliphatischen Suberinmonomere, spielen jedoch andere Enzyme eine zentrale Rolle, die Cytochrom P450 Monooxygenasen (P450).

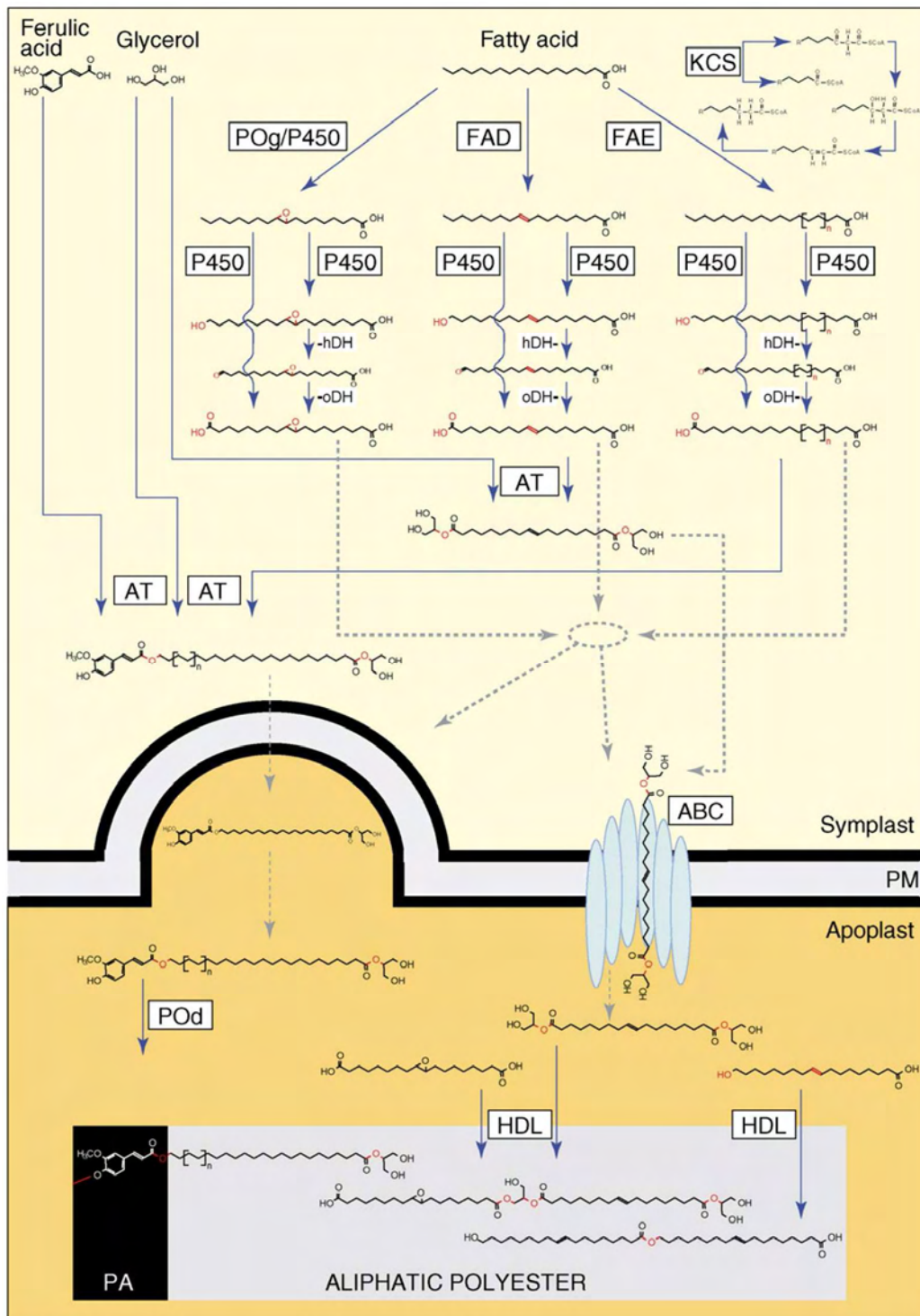


Abbildung 3: Vereinfachtes Modell der Suberinbiosynthese (nach Franke und Schreiber, 2007).

Aliphatische Suberinmonomere werden ausgehend von C_{16} und C_{18} Fettsäuren (*Fatty acid*) synthetisiert. Die Fettsäuren können zunächst bis zu C_{30} verlängert, und danach je nach Bedarf funktionalisiert werden. Ob noch in der Zelle kleinere Suberinstücke zusammengesetzt oder die Monomere erst im Apoplasten verestert werden, ist noch unklar. Wichtige Enzyme sind: ABC= ATP-Bindekassette Transporter; AT= Acyltransferasen; FAD= Fettsäure Desaturasen; FAE= Fettsäure Elongation Enzymkomplex; KCS= β -Ketoacyl-CoA-Synthasen; hDH= ω -Hydroxysäure Dehydrogenasen; HDL= α,β -Hydrolasen; oDH= ω -Oxosäure Dehydrogenase; P450= Cytochrom P450-Monooxygenasen; POd= Peroxydase; POg= Peroxygenase. Mit PA= polyaromatische Domäne; PM= Plasmamembran.

1.4. Cytochrom P450 Monooxygenasen

Bei Analysen des komplett sequenzierten *Arabidopsis*-Genoms wurden 272 P450 Gene (inklusive 27 Pseudogenen) identifiziert (Schuler *et al.*, 2006). Sie sind somit eine der größten Supergenfamilien, die für Enzyme kodieren. In *Arabidopsis* haben sie teilweise weniger als 20 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene, zeigen aber einen hohen Grad in der Erhaltung der generellen Topographie und strukturellen Faltung. Besonders das Zentrum der Proteine, welches die für alle P450 charakteristische prosthetische Häme Gruppe bindet, ist hochkonserviert. Andere Proteinbereiche, die zum Beispiel die Substratspezifität bestimmen, zeigen jedoch eine hohe Variabilität. Die prosthetische Gruppe der P450 ist auch für die Namensgebung verantwortlich. Wenn das Häme Kohlenmonoxid gebunden hat, zeigen P450 im Photometer ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm (*pigment absorbing at 450 nm*) (Omura und Sato, 1964). Alle *Arabidopsis* P450 sind membrangebundene Proteine.

Die hohe Zahl an P450 hat mit der Vielzahl der von ihnen katalysierten Reaktionen zu tun. Im Allgemeinen benutzen P450 Elektronen von NAD(P)H, um die Aktivierung von molekularem Sauerstoff zu katalysieren, und regiospezifische und stereospezifische Oxygenierungen bei einer Fülle von Substraten durchzuführen. Der gut charakterisierte vierstufige Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Reaktionsfolge umfasst die Bindung des Substrates, Reduktion von Eisen(III) des Häme zu Eisen(II), Bindung von molekularem Sauerstoff und eine weitere Reduktion, die zu einer "aktivierten Sauerstoffspezies" führt (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Diese sehr reaktive "aktivierte Sauerstoffspezies" kann neben der Oxygenierung auch eine Vielzahl von anderen Reaktionen, wie zum Beispiel Dehydratationen, Dimerisierungen oder Reduktionen, katalysieren (Mansuy, 1998). Danach wird das Produkt freigesetzt und ein neuer Zyklus kann beginnen.

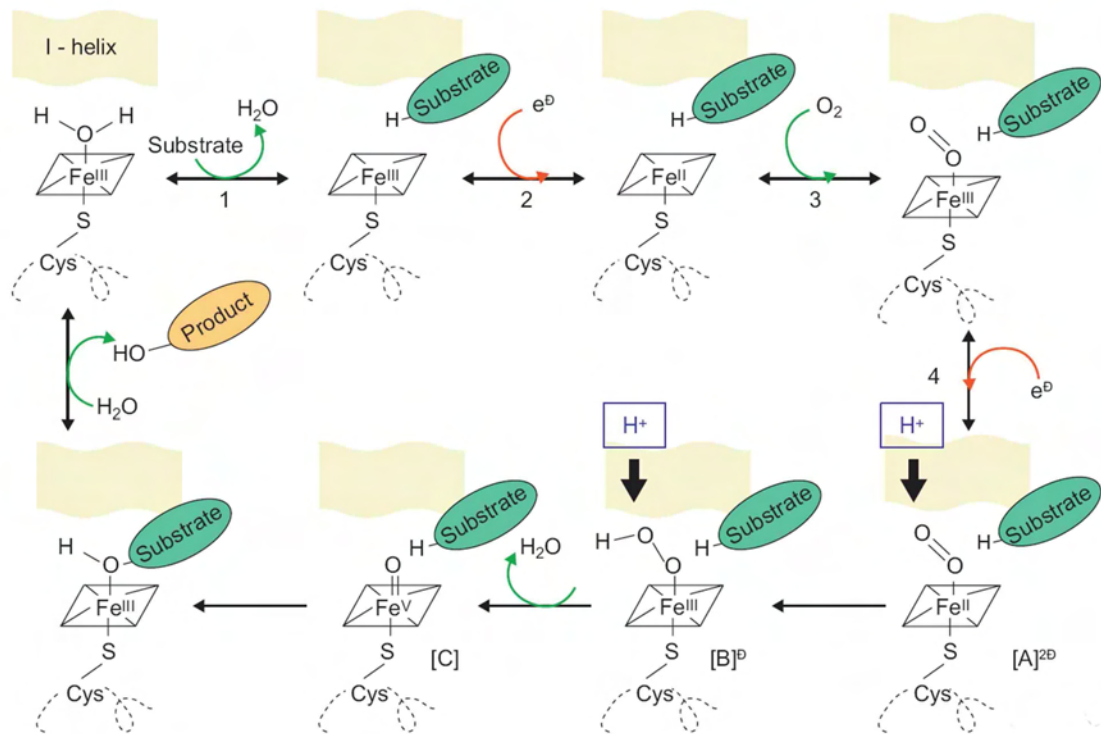


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus von P450 (nach Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Exemplarisch ist die am häufigsten von P450 katalysierte Reaktion, die Hydroxylation, die von den Enzymspezies [C] und [B] durchgeführt werden kann, dargestellt. [A] und [B] Formen können nukleophile Attacken katalysieren. Das sauerstofffreie Enzym kann zum Beispiel Reduktionen und Dehydratationen katalysieren.

Wie gesagt, können P450 verschiedenste Reaktionen katalysieren, und sind aufgrund dessen auch an unterschiedlichsten Stoffwechselwegen involviert. Sie sind zum Beispiel an der Biosynthese von Pigmenten, Hormonen und Signalmolekülen beteiligt, machen Giftstoffe wie Pestizide unschädlich oder wirken bei der Pathogenabwehr mit (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). P450 sind aber auch Schlüsselenzyme in der Synthese von Monomeren der Biopolymere Kutin und Suberin. Aliphatische Hauptbestandteile des Kutins und Suberins sind zum Beispiel ω -Hydroxysäuren. Die Fähigkeit von P450 enthaltenden Mikrosomen von *Vicia sativa* und *Pisum sativum* die Synthese von ω -Hydroxysäuren zu katalysieren, wurde schon früh in biochemischen Studien gezeigt (Soliday und Kolattukudy, 1977; Benveniste *et al.*, 1982; Pinot *et al.*, 1992, 1993). Anschließende molekularbiologische Studien führten zur Isolation von CYP94A1 aus *Vicia sativa*, der ersten charakterisierten pflanzlichen ω -Hydroxylase (Tijet *et al.*, 1998). Zur selben Zeit wurde auch CYP86A1 als erste ω -Hydroxylase aus *Arabidopsis* isoliert (Benveniste *et al.*, 1998). Die ersten

isolierten ω -Hydroxylasen aus *Arabidopsis*, denen eine *in vivo* Funktion zugeordnet werden konnte, waren CYP86A2 und CYP86A8 (Wellesen *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). Die korrespondierenden Mutanten wiesen beide Defekte bei der Kutikelentwicklung auf. Für CYP86A8 wurde biochemisch eine ω -Hydroxylase Aktivität nachgewiesen. Auf die Beteiligung von CYP86A2 bei der ω -Hydroxylierung, wies die starke Reduktion an ω -oxygenierten Fettsäuren im Kutin des Stängels der Mutanten hin. Obwohl viele ω -Hydroxylasen biochemisch charakterisiert werden konnten, ist nur von wenigen bekannt in welchem Stoffwechselweg sie involviert sind. Bisher konnte auch noch keiner ω -Hydroxylase eine Beteiligung in der Suberinbiosynthese zugewiesen werden.

1.5. Zielsetzung

Im Gegensatz zur chemischen Struktur und physiologischen Funktion des Suberins ist bis heute kaum etwas über die Suberinbiosynthese bekannt. Zur Untersuchung der Suberinbiosynthese wird hier die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* verwendet. Da das Genom komplett sequenziert ist, eignet sich *Arabidopsis* besonders gut für molekularbiologische Arbeiten und das Studium von Stoffwechselwegen. Bisherige Untersuchungen postulieren, dass P450 Schlüsselenzyme in der Biosynthese von aliphatischen, oxygenierten Suberinmonomeren sind. Über Datenbankanalysen sollen P450 ausgewählt werden, die als Kandidaten für eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese in Frage kommen. Anhand von detaillierten Expressionsstudien sollen die Datenbankrecherchen überprüft und die Kandidatengene näher charakterisiert werden. *Arabidopsis* Knockout-Linien der Kandidatengene sind eine Möglichkeit die Funktion der Gene zu untersuchen. Hat das Ausschalten der Gene eine Auswirkung auf die Suberinzusammensetzung der Knockout-Linien, kann darüber auf die Rolle der Gene bei der Suberinbiosynthese geschlossen werden. Identifizierte Suberinmutanten sollen dann weitergehend molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert werden.

Anhand der gewonnenen Daten könnten weitere Gene der aliphatischen Suberinbiosynthese identifiziert werden und das Netzwerk von Genen, die in der Suberinbiosynthese beteiligt sind, besser verstanden werden. Der postulierte Biosyntheseweg für Suberin soll überprüft, und die Bedeutung von oxygenierten Fettsäuren für die Barriereigenschaften des Suberinpolymers näher untersucht werden. Ein verbessertes Verständnis der Suberinbiosynthese könnte in Zukunft dazu beitragen, die Stresstoleranz von Nutzpflanzen gegenüber abiotischen und biotischen Umweltstressfaktoren zu optimieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Macherey-Nagel (Düren) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Eine detaillierte Tabelle ist im Anhang 8.1 zu finden.

2.2. Pflanzenmaterial und Anzuchsbedingungen

2.2.1. Verwendete Pflanzen

Den genetischen Hintergrund aller verwendeten Versuchspflanzen bildet *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Ökotyp Columbia. Die Samen verschiedener T-DNA Insertionsmutantenlinien (Alonso *et al.*, 2003) als auch die korrespondierenden Wildtypen wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, Nottingham, England) bezogen (siehe auch Tabelle 7), beziehungsweise aus diesen Samen propagiert.

2.2.2. Allgemeine Anzuchsbedingungen

Die Anzucht erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf Anzuchterde (Floradur Typ 1, Floragard, Oldenburg) in einer Klimakammer bei 22 °C, $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h. Vor der Aussaat wurde die Erde mit Dünger (Flory 3 verde; Planta, Regenstauf) und einem systemischen Insektizid (Confidor Wg70; Bayer Crop Science, Langenfeld) gewässert. Zur Unterstützung der Keimung durch eine höhere Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanztöpfe für 5 d mit einer transparenten Plastikhaube abgedeckt.

Für einige Experimente war eine sterile Anzucht von Pflanzen in Petrischalen auf MS-Agar (8.2.1) (Murashige und Skoog, 1962) notwendig. Vor der Aussaat mussten die Samen hierzu oberflächensterilisiert werden. Samenmengen bis zu 100 mg wurden dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und mit 1 ml frisch zubereiteter Sterilisationslösung (8.2.2) versehen. Größere Samenmengen (bis zu 500 mg) wurden in 25 ml Reaktionsgefäßen mit 20 ml Sterilisationslösung gegeben. Nach 15-20 min schütteln, wurden die Samen 3-mal mit 96 % Ethanol gewaschen (1 ml bzw. 20 ml, je nach Samenmenge), der verbleibende Alkohol entfernt und zum Schluss im Luftstrom in der Sterilbank getrocknet. Die wie beschrieben vorbereiteten

Samen konnten dann in Petrischalen mit MS-Agar ausgestreut werden, und eventuelle Restmengen im Kühlraum für weitere Versuche aufbewahrt werden. Die Petrischalen wurden nach der Pflanzenaussaat mit Parafilm[®] verschlossen.

2.2.3. Anzucht von *Arabidopsis* unter NaCl-Einfluss

Die Pflanzen wurden zunächst wie in 2.2.2 beschrieben angezogen. Nachdem die Keimlinge 4-Blätter ausgebildet hatten, wurde bei der weiteren Anzucht bei jedem Gießen dem Wasser 100 mM NaCl zugegeben. Alle anderen Anzuchtsparemeter blieben unverändert.

2.2.4. Anzucht von Keimlingen zur Untersuchung des Wurzelwachstums

Die Samen wurden wie in 2.2.2 beschrieben vorbehandelt, und in einer Reihe auf Petrischalen mit MS-Agar (8.2.1) ausgebracht. Bei einem Teil der Petrischalen wurde der MS-Agar mit 50 mM, beziehungsweise 100 mM NaCl versetzt. Die Platten wurden vertikal aufgestellt und in der Klimakammer angezogen. Nach der Keimung der Versuchspflanzen wurden die Platten täglich fotografiert und die Position der Wurzelspitze jedes Keimlings markiert. Die Auswertung des Wurzelwachstums erfolgte anhand der Fotos mit dem Programm Image J 1.4 (freie Software).

2.2.5. Behandlung von Keimlingen zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Genen unter Stressbedingungen

Die Samen wurden wie in 2.2.2 beschrieben vorbehandelt und auf Petrischalen mit MS-Agar (8.2.1) ausgestreut. Die Platten mit 10 d alten Keimlingen wurden entweder mit 50 ml 150 mM NaCl oder 50 ml 500 mM Mannitol bedeckt und für die Dauer der Behandlung weiterhin in der Klimakammer aufbewahrt (Duan und Schuler, 2005). Zur Kontrolle wurden Keimlinge direkt geerntet und in flüssigem N₂ eingefroren. Proben der behandelten Pflanzen wurden nach 1 h, 3 h und 6 h geerntet und in flüssigem N₂ eingefroren.

2.3. Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1. Methode zur Extraktion von RNA mit TriReagent

Für die Extraktion von Gesamt-RNA mit TriReagent (8.2.3) (Chomczynski und Sacchi, 1987) wurden ca. 100 mg *Arabidopsis*-Keimlinge geerntet und direkt im 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem N₂ eingefroren. Mit einem vorgekühlten Metall-Pistill wurden die Proben für 10 s im 1,5 ml Reaktionsgefäß gemörsert und 500 µl TriReagent zugegeben. Nach 10 s Homogenisation und nochmaliger Zugabe von 500 µl TriReagent, wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Brom-Chloro-Propan zugesetzt, gemischt und die Proben weitere 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss an eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12000 xg wurde die entstandene obere Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol eiskaltem Isopropanol versetzt und die RNA für mindestens 1 h bei Raumtemperatur gefällt. Zur Pelletierung der RNA folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12000 xg. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % eiskaltem Ethanol versehen, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 7500 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet im Vakuum getrocknet und in 40 µl DEPC-H₂O (8.2.4) resuspendiert.

2.3.2. Methode zur Extraktion von RNA mit LiCl

Bei der Extraktion von Gesamt-RNA mit LiCl haltigem RNA-Extraktionspuffer (8.2.5) (De Vries *et al.*, 1988) wurden bis zu 500 mg Pflanzenmaterial in flüssigem N₂ eingefroren und im Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Nach der Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde zunächst 500 µl 80 °C warmer RNA-Extraktionspuffer hinzugefügt und für 30 s gemischt, und danach 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugegeben und nochmals für 30 s gemischt. Im Anschluss an eine Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 12000 xg wurde die entstandene obere Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol 4 M LiCl versetzt, für 30 s gemischt und die RNA über Nacht bei 4 °C gefällt. Zur Pelletierung der RNA wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und 12000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl

DEPC-H₂O vollständig resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 2 Vol 100 % Ethanol für 2 h auf Eis gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 120 000 xg wurde das entstandene Pellet zunächst mit 70 % und danach mit 100 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

2.3.3. Methode zur Extraktion von genomischer DNA

Blätter von 2-4 Wochen alten Pflanzen wurden im 1,5 ml Reaktionsgefäß direkt in flüssigem N₂ eingefroren und mit einem vorgekühlten Metall-Pistill 10 s gemörsert. Nach Zugabe von 100 µl 60 °C warmen CTAB-Isolationspuffer (8.2.6), wurden die Proben für 30 min bei 60 °C inkubiert und dabei alle 5 min mit einem Pistill gemischt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur und 24000 xg zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 100 µl eiskaltem Isopropanol gemischt und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA für 5 min bei Raumtemperatur und 24000 xg pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun 3-mal mit 100 µl CTAB-Waschpuffer (8.2.7) gemischt, 5 min inkubiert und 5 min bei Raumtemperatur und 24000 xg zentrifugiert und der jeweilige Überstand verworfen. Nach der Trocknung im Vakuum wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer (8.2.8) resuspendiert.

2.3.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Bei den aus 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3 erhaltenen Nukleinsäurelösungen wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Extraktion eine Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrophotometer (UV-Mini 1240; Shimadzu, Duisburg) durchgeführt. Dazu wurden die Proben in geeigneter Weise verdünnt, in eine Halbmikroküvette gefüllt und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Quantität der Nukleinsäuren in der Lösung kann nach $c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = \text{OD}_{260} * V * F$ (mit c = Konzentration; V = Verdünnungsfaktor; F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA; 40 für RNA)) errechnet werden. Die Reinheit der Präparation kann außerdem über das Verhältnis der OD₂₆₀ zu der OD₂₈₀ überprüft werden. Eine

proteinfreie Nukleinsäurelösung weist hier ein Verhältnis zwischen 1,5-2,0 auf (Wilfinger *et al.* 1997).

Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösungen wurden diese auf 100 ng/μl verdünnt um bei einer anschließender RT-PCR vergleichbare Aussagen über die Einzelproben treffen zu können. Die Konzentration der eingestellten RNA-Lösungen wurde anschließend nochmals mit einem 1,3 % Agarosegel überprüft.

2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genomische DNA für die PCR wurde nach 2.3.3 hergestellt, Plasmide nach 2.3.8 isoliert. Alle in dieser Arbeit gezeigten Standard PCR's wurden mit *Tfi*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) angesetzt und nach Tabelle 1 hergestellt. Die PCR's wurden in einem Primus 25 (MWG-Biotech, Ebersberg) oder Primus 96 advanced (PEQLAB-Biotechnologie, Erlangen) Thermocycler mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 3 durchgeführt. Für PCR's deren Produkt für Klonierungen weiterverwendet werden sollten, wurde Platinum®-Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet und die Zusammensetzung und das Temperaturprogramm entsprechend Tabelle 2 bzw. Tabelle 3 abgewandelt. Eine genaue Tabelle der verwendeten Primer ist im Anhang 8.3.2 zu finden. Alle Primer wurden von Invitrogen bezogen. Nach beendeter PCR wurden die Proben wie in 2.3.7 beschrieben weiterbehandelt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes mit *Tfi*-DNA-Polymerase.

Reagenz	Volumen [μl]
5 X PCR-Reaktionspuffer (Invitrogen)	5
50 mM MgCl ₂	0,75
10 mM dNTP's (Fermentas, St. Leon-Rot)	0,5
50 pmol/μl Primer	je 0,25
5 U/μl <i>Tfi</i> -DNA-Polymerase	0,25
Reinstwasser	auf 24
<i>template</i> DNA	1

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes mit *Pfx*-DNA-Polymerase.

Reagenz	Volumen [μ l]
10 X PCR-Reaktionspuffer (Invitrogen)	2,5
25 mM MgSO ₄	1,5
10 mM dNTP's (Fermentas)	0,5
50 pmol/ μ l Primer	je 0,25
2,5 U/ μ l Platinum [®] <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	0,25
Reinstwasser	auf 24
<i>template</i> DNA	1

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die PCR.

Zur Berechnung der primerabhängigen Temperatur siehe 8.3.1. Bei der Verwendung von *Tfi*-DNA-Polymerase wurde die Elongation bei 70 °C durchgeführt. Bei der Verwendung von *Pfx*-DNA-Polymerase wurde die Elongation bei 68 °C durchgeführt.

	Temp. [°C]	Zeit
initiale Denaturierung	94	3 min
30-35 Zyklen		
{ Denaturierung	94	30 sec
{ <i>Annealing</i>	Primerabhängige Temp.	30 sec
{ Elongation	Polymeraseabhängige Temp.	1 min/1 Kbp
finale Elongation	Polymeraseabhängige Temp.	5 min

2.3.6. Reverse Transkription–Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA für organspezifische Expressionsstudien wurde von 5 Wochen alten, auf Erde angezogenen Pflanzen nach 2.3.2 gewonnen. Für andere Expressionsstudien wurde RNA nach 2.3.1 von 10 d alten, auf MS-Agar gewachsenen Pflanzen extrahiert.

Die RT-PCR wurde mit dem SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System mit Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in einem Primus 25 Thermocycler (MWG-Biotech) oder Primus 96 advanced (PEQLAB-Biotechnologie, Erlangen) angesetzt. Zu jedem Reaktionsansatz nach Tabelle 4 wurden 100 ng RNA gegeben und die RT-PCR nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 5 durchgeführt. Das konstitutiv exprimierte *Aktin* Gen diente bei jeder RT-PCR als Kontrolle. Die verwendeten Primer wurden von Invitrogen bezogen und sind im Anhang (8.3.2) aufgeführt. Nach beendeter RT-PCR wurden die Proben nach 2.3.7 weiterbehandelt und ausgewertet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermixes.

Reagenz	Volumen [μ l]
2 X Reaktionsmix (Invitrogen)	2,5
50 pmol/ μ l Primer	je 0,25
SuperScript™ III RT / Platinum®-Taq Mix	0,25
Reinstwasser	auf 24
100 ng/ μ l <i>template</i> RNA	1

Tabelle 5: Temperaturprogramm für die RT-PCR.

	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
cDNA Synthese	55	30 min
initiale Denaturierung	94	3 min
25-40 Zyklen		
{ Denaturierung	94	30 sec
{ <i>Annealing</i>	Primerabhängige Temp.	30 sec
{ Elongation	68	1 min/1 Kbp
finale Elongation	68	5 min

2.3.7. Gelelektrophorese

Die Proben für die Gelelektrophorese wurden mit einer geeigneten Menge 6 X Gelladepuffer (8.2.9) versehen und in 1 % Agarosegele, welche mit 0,05 % Ethidiumbromid hergestellt wurden, gefüllt. Zur Kontrolle, wurde für Fragmentlängen bis zu 5 Kbp parallel eine 100 bp-DNA-Leiter *extended* (Carl Roth) zugegeben und für Fragmentlängen über 5 Kbp eine 1 Kbp-DNA-Leiter (Carl Roth) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 150 mA. Nach hinreichender Auftrennung wurden die Agarosegele unter UV-Licht fotografiert. Zur quantitativen Auswertung bei der RT-PCR wurden die Agarosegele mit einem Typhoon Imager (General Electric Company, München) eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Programm ImageQuant Version 5 (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt.

2.3.8. Isolation, Überprüfung und Sequenzierung von Plasmiden

Zur Isolation von Plasmiden aus Mikroorganismen wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers benutzt.

Zur Überprüfung der hergestellten Plasmiden wurden sie mit Restriktionsenzymen behandelt. Jedes Plasmid wurde mit mindestens zwei verschiedenen Enzymen nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen) verdaut. Der Reaktionsansatz setzte sich nach Tabelle 6 zusammen. Die Inkubation erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1-2 h. Die Proben wurden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.7).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Restriktionsverdaus.

Reagenz	Volumen [μ l]
Plasmid	1-5
10 X Puffer	1
Restriktionsenzym (BSA; je nach Enzym)	0,5 (0,2)
Reinstwasser	auf 10

Die Sequenzierung von gewünschten Abschnitten von Plasmiden führte die Firma 4base-lab (Reutlingen) aus. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Lasergene[®] v7.2 (GATC Biotech, Konstanz) kontrolliert und gegebenenfalls bearbeitet.

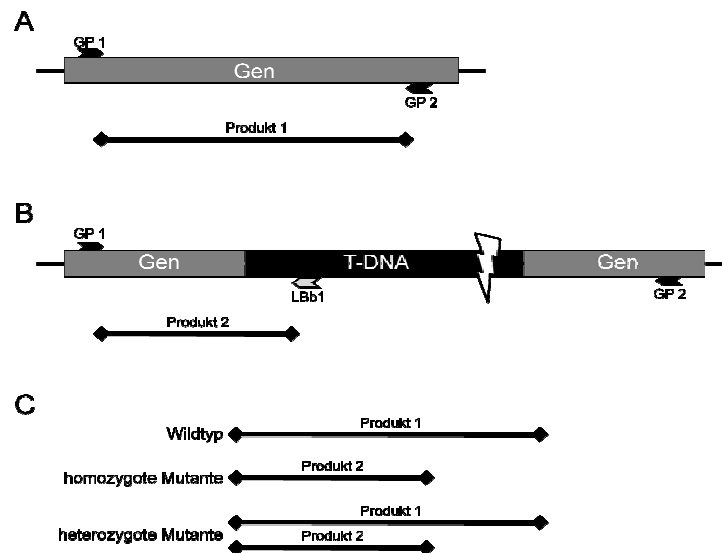
2.4. Isolation von T-DNA Insertionsmutanten

Es wurden die in Tabelle 7 angegebenen T-DNA Insertionsmutantenlinien (SALK-Linien) benutzt. Um homozygote Insertionsmutantenlinien aus der vom NASC erhaltenen Samenmischung zu isolieren, wurde der T-DNA-spezifische *left border* Primer LBb1 (8.3) zusammen mit genspezifischen Primern (Tabelle 7 und 8.3) in einer kompetitiven PCR auf die genomischen DNA der Pflanzenlinien eingesetzt. Das Prinzip dieser PCR ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Bei den als homozygot genotypisierten Mutanten, wurden 10 d alte auf MS-Agar angezogene Keimlingen, mittels RT-PCR Analyse auf das Vorhandensein oder das Fehlen eines Gentranskripts untersucht. Homozygote Mutanten mit verifiziertem transkriptionellen Knockout des entsprechenden Gens, wurden dann für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Tabelle 7: Verwendete SALK-Linien und Genotypisierungsprimer.

Die untersuchten Gene mit ihrem AGI-Code und den jeweils bezogenen SALK-Linien sind aufgeführt. Die AP-Nummer steht für eine abteilungsinterne Nummerierung der genotypisierten Pflanzenlinien. Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind aufgeführt. Nähere Details zu den Primern finden sich in Tabelle 10 im Anhang.

Gen (AGI-Code)	SALK Linie	AP Nummer	Verwendete Primer
CYP81F4 (At4g37410)	SALK_024438	AP1516	LS224/ LS225
CYP86A1 (At5g58860)	SALK_107454	AP1293	LS138/ LS139
	SALK_104083	AP1545	LS230/ LS231
CYP705A1 (At4g15330)	SALK_043195	AP1556	LS226/ LS227
CYP705A13 (At2g14100)	SALK_053188	AP1549	LS228/ LS229

**Abbildung 5: Prinzip einer kompetitiven PCR zur Genotypisierung.**

(A) Schematischer Wildtyp-Genlocus mit Genotypisierungsprimern und entstehendem PCR-Produkt. (B) Schematischer Mutanten-Genlocus mit T-DNA Insertion, Genotypisierungsprimern und entstehendem PCR-Produkt. (C) Bei der PCR entstehende Produkte verschiedener Längen von genomischer DNA vom Wildtyp, heterozygoter Mutante und homozygoter Mutante. Mit GP1= *forward* Genotypisierungsprimer; GP2= *reverse* Genotypisierungsprimer; LbB1= T-DNA-Spezifischer *left border* Primer.

2.5. Mikrobiologische Arbeiten

2.5.1. Herstellung kompetenter Zellen von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Nach Anfertigung eines Verdünnungsausstrichs von *E. coli* (Stamm DH5 α) und Anzucht über Nacht bei 37 °C, wurden 250 ml SOB-Medium (8.2.12) in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 10-12 große Kolonien (2-3 mm Durchmesser) angeimpft und bei 18 °C und 170 rpm inkubiert. War eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht (ca. 42 h) wurde die Flüssigkultur zunächst 10 min in Eiswasser gekühlt, auf zwei 250 ml Zentrifugationsgefäße verteilt und für 10 min bei 4 °C und 2500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets je in 40 ml eiskaltem TB-Puffer (8.2.11) resuspendiert und für weitere 10 min in Eiswasser aufbewahrt. Im Anschluss wurde erneut für 10 min bei 4 °C und 2500 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets je in 10 ml TB-DMSO-Puffer (8.2.11) resuspendiert. Nach einer 10 min Inkubation in Eiswasser, wurden Aliquots zu 200 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2. Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Ein Aliquot der in 2.5.1 hergestellten, chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und zusammen mit 10 ng Plasmid (siehe 2.6.1) in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und in Eiswasser für 30 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 s bei 42 °C im Wasserbad, wurden die Zellen für 5 min wieder in Eiswasser gelagert. Danach wurden 800 μ l SOC-Medium (8.2.12) zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden Aliquots (10 μ l, 100 μ l und der Rest) auf LB-Agar (8.2.10) ausgestrichen, welcher zur Selektionierung von positiv transformierten Zellen ein entsprechendes Antibiotikum (siehe auch 2.6.1) enthielt, und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.3. Herstellung kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101, welcher eine Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin besitzt, benutzt. Von einem bei 28 °C für 48 h angezogenem Verdünnungsausstrich von *A. tumefaciens*

auf LB-Agar (8.2.10) mit Rifampicin (10 µg/ml) wurde eine Vorkultur von 20 ml LB-Medium (8.2.10) mit Rifampicin (10 µg/ml) im 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, und über Nacht bei 28 °C und 230 rpm geschüttelt. Für die Hauptkultur, wurde die Vorkultur in 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum (10 µg/ml Rifampicin) im 2 l Erlenmeyerkolben gegeben und für weitere 4 h bei 28 °C und 170 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Hauptkultur in 250 ml Zentrifugationsgefäße gegeben, für 20 min bei 4 °C und 3200 xg pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension in 10 ml eiskaltem TE-Puffer (8.2.8) und Überführung in ein 25 ml Reaktionsgefäß, wurde erneut für 20 min bei 4 °C und 3200 xg pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zu Aliquots von je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.4. Transformation von *A. tumefaciens* mittels Hitzeschock

Ein Aliquot der in 2.5.3 hergestellten, chemisch kompetenten *A. tumefaciens* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und zusammen mit 1 µg Plasmid (siehe 2.6.1.2) vermischt. Nach einer Inkubation für je 5 min in Eiswasser und in flüssigem N₂, folgte ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Danach wurde sofort 1 ml LB-Medium (8.2.10) zu den Zellen gegeben und bei 28 °C für 3 h inkubiert. Zum Abschluss wurden Aliquots von 20 µl und 200 µl auf LB-Agar mit 10 µg/ml Rifampicin ausgestrichen, welcher zur Selektionierung von positiv transformierten Zellen ein weiteres Antibiotikum (siehe auch 2.6.1.2) enthielt, und die Platten bei 28 °C für 48 h inkubiert.

2.5.5. Langzeitlagerung von Mikroorganismen

Die in 2.6.1 erzeugten transgenen *E. coli* und *A. tumefaciens* Klone wurden zur Langzeitlagerung in Glycerin eingefroren. Dazu wurden 5 ml LB-Medium (8.2.10) mit entsprechendem Antibiotikum versehen, mit dem ausgewählten Klon beimpft und bei 37 °C über Nacht (*E. coli*) beziehungsweise bei 28 °C für 48 h (*A. tumefaciens*) inkubiert. Von dieser Flüssigkultur wurden 700 µl abgenommen und mit 300 µl 50 % Glycerin gemischt. Nach dem Einfrieren in flüssigem N₂ können die Mikroorganismen bei -80 °C gelagert werden.

2.6. Herstellung transgener Pflanzen

2.6.1. Herstellung von Pflanzen Transformations-Vektoren

Zur Herstellung der benötigten Transformations-Vektoren, wurde die Gateway[®] Technologie von Invitrogen (Hartley *et al.*, 2000) benutzt. Sie basiert auf dem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen *Lambda* (λ -Phage), dass die Integration der *Lambda*-DNA in das Genom seines Wirtes *E. coli* ermöglicht. Die DNA-Rekombination wird dabei von mehreren Enzymen katalysiert, welche an spezifische Sequenzen (*attachment sites* (*att*)) binden, die DNA-Stränge dort schneiden und in neuer Form verbinden. Für die Gateway[®] Technologie wurden die Komponenten des *Lambda* Rekombinationssystem modifiziert, um die Spezifität und Effizienz des Systems zu verbessern und es für die Gentechnologie nutzbar zu machen. Dies ermöglicht den Transfer von beliebigen DNA-Fragmenten mit *att*-Sequenzen in Vektoren und zwischen verschiedenen Vektoren.

2.6.1.1. Erzeugung eines *entry-clone*

Um ein beliebiges DNA-Fragment, zum Beispiel ein Gen (*gene of interest* (*GOI*)), in einem Transformations-Vektor einzubringen, musste zunächst ein sogenannter *entry-clone* hergestellt werden. Dazu wurde das *GOI* mittels PCR amplifiziert und an den Enden mit *attB*-Schnittstellen versehen. In einer BP-Reaktion konnte dann das *attB*-flankierte *GOI* in einen *attP*-Schnittstellen enthaltenden Donorvektor (pDONR/Zeo, siehe auch 8.4.1) transferiert werden (Abbildung 6). Dabei kam ein BP-Klonase Enzymmix zum Einsatz, welcher die Rekombination zwischen *attB*- und *attP*-Schnittstellen katalysiert. Um das als *entry-clone* bezeichnete Produkt dieser Rekombination zu vermehren, wurde es mittels Hitzeschock in *E. coli* eingebracht (2.5.2). Positiv transformierte *E. coli* konnten über eine mit dem *entry-clone* vermittelte Zeocinresistenz selektioniert werden. Das im *donor vector* und im Nebenprodukt enthaltene *ccdB*-Gen, erlaubte eine negativ Selektionierung von Zellen die diese Produkte bei der Transformation aufnehmen. Das *ccdB*-Gen kodiert für ein Protein welches mit der DNA-Gyrase von *E. coli* interferiert und somit das Wachstum unterbindet. Positiv selektionierte *E. coli* Kolonien wurden zur Sicherung erneut auf LB-Agar (mit Antibiotika) ausgestrichen und 5 ml LB-Medium (mit Antibiotika) als Flüssigkultur angeimpft. Von der Flüssigkultur wurde ein Teil

eingefroren (2.5.5) und von der restlichen Kultur Plasmide isoliert (2.3.8). Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau überprüft und zusätzlich sequenziert (2.3.8). Die hergestellten Vektoren sind in 8.4.2 aufgeführt.

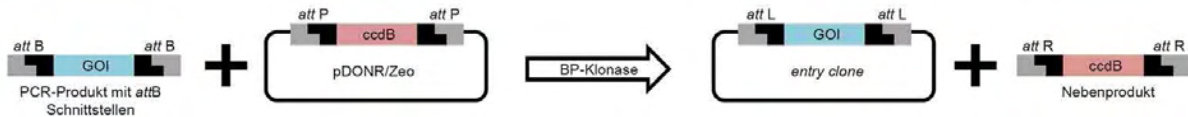


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer BP-Reaktion.

Bei der BP-Reaktion wird ein *attB* flankiertes DNA-Fragment (blau) mit Hilfe der BP-Klonase in den Donorvektor (pDONR/Zeo) inseriert. Dabei entstehen der *entry-clone* und ein Nebenprodukt. Mit *ccdB*= DNA-Gyrasegen aus *E. coli*; *attB*, *attP*, *attL*, *attR*= Rekombinationschnittstellen.

2.6.1.2. Erzeugung eines *expression-clone*

Mit dem in 2.6.1.1 hergestellten und überprüften *entry-clone* wurde in einer Rekombination mit einem Zielvektor, der eigentliche Pflanzen Transformations-Vektor, auch *expression-clone* genannt, hergestellt. Bei dieser LR-Reaktion wurde das *GOI* vom *attL*-Schnittstellen enthaltenden *entry-clone* in einen *attR*-Schnittstellen enthaltenden Zielvektor (pMDC-Vektoren, siehe auch 8.4.1; Curtis und Grossniklaus, 2003) transferiert (Abbildung 7). Dabei kam ein LR-Klonase Enzymmix zum Einsatz, welcher die Rekombination zwischen *attL*- und *attR*-Schnittstellen katalysiert. Zur Vermehrung des Produktes wurde es mittels Hitzeschock in *E. coli* eingebracht (2.5.2). Zur Selektionierung von positiv transformierten *E. coli* diente eine über den Zielvektor vermittelte Kanamycinresistenz und das *ccdB*-Gen. Die positiv selektionierten *E. coli* Kolonien, wurden wie in 2.6.1.1 behandelt und überprüft, jedoch nicht sequenziert. Die hergestellten Vektoren sind in 8.4.2 aufgeführt.

Da die Transformation von *Arabidopsis* mit der *Floral-Dip* Methode erfolgte (2.6.2) (Clough und Bent, 1998), musste abschließend noch ein überprüftes Plasmid des *expression-clone* mittels Hitzeschock in *A. tumefaciens* eingebracht werden (2.5.4). Positiv transformierte *A. tumefaciens* wurden über die vermittelte Kanamycinresistenz selektioniert und wie in 2.6.1.1 behandelt und überprüft. Die überprüften transgenen *A. tumefaciens* wurden dann in 2.6.2 eingesetzt.



Abbildung 7: Schematische Darstellung einer LR-Reaktion.

Bei der LR-Reaktion wird ein *attL* flankiertes DNA-Fragment aus dem *entry-clone* in einen Zielvektor inseriert. Dabei entstehen der *expression-clone* und ein Nebenprodukt. Mit *ccdB*= DNA-Gyrasegen aus *E. coli*; *attB*, *attP*, *attL*, *attR*= Rekombinationschnittstellen.

2.6.2. Transformation von *Arabidopsis* mittels *Floral-Dip* Methode

2.6.2.1. Anzucht von *A. tumefaciens* für *Floral-Dip*

Von einem überprüften *A. tumefaciens* Klon wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika angefertigt und für 48 h bei 28 °C bebrütet. Aufgrund des verwendeten *A. tumefaciens* Stamms GV3101 und der verwendeten binären Vektoren, wurden als Antibiotika 10 µg/ml Rifampicin und 50 µg/ml Kanamycin eingesetzt. Für eine Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium (mit Antibiotika) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie des Verdünnungsausstriches inokuliert und über Nacht bei 28 °C und 170 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur, bestehend aus 300 ml LB-Medium (mit Antibiotika), wurde dann mit der Vorkultur beimpft, in zwei 500 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt und über Nacht bei 28 °C und 170 rpm angezogen.

2.6.2.2. Durchführung des *Floral-Dip*

Die vorbereitete Hauptkultur von *A. tumefaciens* wurde in Zentrifugationsgefäße überführt, für 15 min bei 3200 xg pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden dann in insgesamt 200 ml Inokulationsmedium (8.2.13) aufgenommen und in ein geeignetes Gefäß für die Behandlung der Pflanzen gegeben.

Zur Transformation wurden 4-6 Pflanztöpfe mit 3-4 Wochen alten gesunden Pflanzen mit ausgebildeten bis zu 15 cm langen Infloreszenzen ausgewählt. Diese wurden dann kopfüber 2-mal für 10 s in die Inokulationssuspension getaucht, in eine mit Plastikfolie ausgelegte Anzuchtsbox gelegt und mit einer transparenten Plastikhaube abgedeckt. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen dann wieder aufgestellt, gewässert und bis zur Samenreife angezogen.

Die getrockneten Samen wurden wie in 2.2 beschrieben, steril auf MS-Agar mit 50 µg/ml Hygromycin ausgesät. Positiv transformierte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden über eine mit dem Vektor vermittelte Hygromycin-Resistenz selektioniert.

2.7. Transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)

N. benthamiana wurde unter den in 2.2 beschriebenen Bedingungen in einer Klimakammer für 6-8 Wochen angezogen. Mit einer Kolonie des *A. tumefaciens* Stamm GV3101, welcher ein GOI:GFP Konstrukt unter der Kontrolle des CaMV35S-Promoter (35S) enthielt (8.4), wurden 2 ml LB-Medium (mit Antibiotika) angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm geschüttelt. Ein Aliquot von 500 µl Kultur wurde entnommen, pelletiert, in 2 ml Infiltrationsmedium (8.2.14) (Wydro *et al.*, 2006) resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 0,1 eingestellt. Nach 3 h Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Bakteriensuspension mit einer Spritze ohne Nadel in junge, voll expandierte Blätter von 6-8 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Als positiv Kontrolle für Co-Lokalisationsstudien, wurde das 35S-Promotor gesteuerte Konstrukt HDEL:DsRed (8.4), bestehend aus dem Retentionssignal für ER residente Proteine, HDEL (Haseloff *et al.*, 1997), und dem *Discosoma sp. red fluorescing* Protein (DsRed) (Jach *et al.*, 2001), in dieselben *N. benthamiana* Blätter infiltriert. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen für 24-48 h in die Klimakammer gestellt. Transfizierte *N. benthamiana* Blätter, wurden mit einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Olympus FV 1000; Olympus, Hamburg) untersucht. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Argon/Krypton Laser und einem 530 nm Bandpass Filter dargestellt. Es wurden Serien von konfokalen optischen Schnitten angefertigt und mit der Software Olympus FV100 (Olympus) untersucht und projiziert.

2.8. Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) im Hellfeld oder unter UV-Licht durchgeführt und mit einer Nikon DXM1200 (Nikon, Düsseldorf) Digitalkamera dokumentiert.

2.8.1. β -Glucuronidase (GUS) Aktivitätstest

Transgene Pflanzen der T1 und T2 Generation, welche ein Promotor:Reportergen Konstrukt enthielten (8.4), wurden über die vermittelte Hygromycinresistenz selektioniert (2.6.2.2). Hygromycin resistente Keimlinge wurden entweder auf Erde (siehe auch 2.2) transferiert und weiter angezogen oder direkt auf eine GUS-Aktivität untersucht. Durch die Inkubation mit 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) in X-Gluc-Puffer (8.2.15) (De Block und Debrouwer, 1992) bei 37 °C für 0,5-12 h wurden die Proben auf GUS-Aktivität überprüft. Eine GUS-Aktivität wird durch Blaufärbung der betreffenden Zelle angezeigt. Die GUS hydroxyliert hier das Substrat x-Gluc zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, welches in der Zelle zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Durch den Transfer der Proben in 70 % Ethanol wurde die Färbung beendet. Das 70 % Ethanol wurde 2 bis 3-mal gewechselt, um in oberirdischen Pflanzenteilen Chlorophyll zu entfernen, welches die Wahrnehmung einer Färbung erschwert. Die Proben wurden danach unter einem Binokular (Olympus SZ61; Olympus, Hamburg) oder Mikroskop untersucht, oder nach 2.8.2 und 2.8.3 weiterbearbeitet.

2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Es wurden ganze Wurzeln oder Wurzelstücke in Fixierlösung (8.2.16) für mindestens 24 h eingelegt. Die Proben wurden dann in Einbettmedium (Neg-50; Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) bei -25 °C eingefroren. Mithilfe eines Mikrotom-Kryostat (Microm HM 500 M; Microm International, Walldorf) wurden 20 μ m dicke Querschnitte angefertigt und auf einen Objektträger überführt. Nach Einbettung in H₂O/Glycerin (1:1; v/v) wurden die Proben mikroskopisch untersucht.

2.8.3. Histochemische Färbung

Die in 2.8.2 angefertigten Querschnitte von *Arabidopsis*-Wurzeln wurden teilweise mit Sudan Rot 7B angefärbt. Mithilfe dieses lipophilen Farbstoffes können aliphatische Substanzen angefärbt werden, und somit auch Suberineinlagerungen in den Zellwänden sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Querschnitte mit einer Färbelösung (8.2.17) (Brundrett *et al.*, 1991) bedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurde zunächst mit 1 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) und danach mit H₂O-Dest. gespült. Nach dem Bedecken mit H₂O/Glycerin (1:1; v/v) und Auflegen eines Deckglases, wurden die Schnitte mikroskopisch untersucht.

2.9. Analytische Untersuchungen

2.9.1. Herstellung der Proben

2.9.1.1. Extraktion von Blattwachsen

Pro Probe wurden 10 Blätter von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen geerntet. Zur Extraktion der kutikulären Wachse wurden die Blätter jeweils für 10 s mit der gesamten Blattfläche in Chloroform getaucht. Die entwachsenen Blätter wurden danach eingescannt und die Blattflächen mittels Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH, München) über die Pixelanzahl ermittelt. Der Chloroformextrakt wurde mit 2 µg Tetracosan (C₂₄-Alkan) als interner Standard versehen, im N₂-Strom auf ca. 100 µl eingeeengt und derivatisiert (2.9.1.7).

2.9.1.2. Anreicherung suberinisierter Wurzelzellwände von 35 d alten

Arabidopsis-Pflanzen

Wurzeln von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden vorsichtig ausgegraben und mit Leitungswasser ausgiebig gewaschen. Bei einigen Versuchen, wurde vor der Weiterbehandlung noch die Wurzeloberfläche bestimmt. Dazu wurden die Wurzeln auf einem Flachbettscanner ausgebreitet und aufgenommen. Die Wurzeloberfläche wurde anhand der aufgenommenen Fotos mit Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH) über die Pixelanzahl bestimmt. Danach wurden die Wurzeln zum Abbau von

kohlenhydratreichen Zellwandbestandteilen in Polysaccharid-Hydroxylase-Lösung (8.2.18) gegeben. Nach 2 Wochen Verdau und einem Wechsel der Polysaccharid-Hydroxylase-Lösung, wurden die Wurzeln in Boraxpuffer (8.2.19) überführt und 1 Woche inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch H₂O-Dest. ersetzt und die Wurzeln erneut für 1 Woche stehen gelassen. Zum Abschluss wurden, durch waschen mit Chloroform/Methanol (1:1; v/v) für 1 Woche, alle löslichen Lipide entfernt. Das verbleibende Wurzelmaterial wurde dann getrocknet, gewogen und in einer Umesterungsreaktion (2.9.1.6) eingesetzt.

2.9.1.3. Alternative Aufbereitung von *Arabidopsis*-Wurzeln verschiedenen Alters

Ganze 10 d alte *Arabidopsis*-Keimlinge wurden von MS-Agarplatten geerntet, die Wurzeln abgetrennt, und zur Entfernung löslichen Lipide in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gegeben. Wurzeln von 21 d und 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden vorsichtig ausgegraben und mit Leitungswasser ausgiebig gewaschen. Nach der Aufteilung der Wurzeln in verschiedene Wurzelteile wurden diese ebenfalls in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gegeben. Nach 2 Wochen Chloroform/Methanol Extraktion und zweimaligem Wechsel der Lösungsmittel, wurden die Wurzeln getrocknet und das Trockengewicht ermittelt. Die Wurzelteile der 35 d alten Wurzeln wurden im Anschluss noch, wie in 2.9.1.2 beschrieben, enzymatisch verdaut und nach dem Trocknen nochmals das Gewicht bestimmt. Alle Wurzelteile konnten im Anschluss in eine Umesterungsreaktion eingesetzt werden (2.9.1.6).

2.9.1.4. Präparation totalextrahierter Blätter

Nach dem Ernten und Einscannen von 20 Blätter von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen, wurden die Blätter in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gegeben. Alle löslichen Lipide wurden durch 5-maligen Austausch des Lösemittels in einem Zeitraum von 2 Wochen entfernt. Die totalextrahierten Blätter konnten nach dem Trocknen direkt in einer Umesterungsreaktion (2.9.1.6) verwendet werden. Die Blattflächen wurden mit Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH) ermittelt.

2.9.1.5. Anreicherung totalextrahierter Samenschalen

Basierend auf dem Protokoll von Molina *et al.* (2006) wurden pro Parallele mindestens 15 mg Samen eingewogen und in flüssigem N₂ gemörsert. Das erhaltene Pulver wurde für 2 Wochen in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) extrahiert und das Lösemittel 5-mal gewechselt. Nach dem Trocknen wurde das totalextrahierte Samenpulver in einer Umesterungsreaktion (2.9.1.6) eingesetzt.

2.9.1.6. Umesterungsreaktion

Um Biopolymere zu untersuchen, müssen sie in ihre monomeren Bestandteile zerlegt werden. Die Aufspaltung der Esterbindungen kann unter anderem mit einer säurekatalysierten Umesterung mit methanolischer-Salzsäure (MeOH/HCl) erreicht werden (Abbildung 8) (Holloway, 1982). Dazu wurden die Proben aus 2.9.1.2, 2.9.1.4 und 2.9.1.5 in Reaktionsgefäße mit 2 ml 1 M MeOH/HCl gegeben und für 2 h bei 80 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml gesättigter NaCl-Lösung gestoppt. Zu den Proben aus 2.9.1.2 und 2.9.1.4 wurde 10 µg Dotriacontan (C₃₂-Alkan) als interner Standard gegeben, zu den Proben aus 2.9.1.5 4 µg Dotriacontan. Die bei der Umesterung freigesetzten Substanzen wurden durch die Zugabe von 1 ml Hexan, anschließendem Vortexen und Überführung des Lösemittels in ein neues Reaktionsgefäß extrahiert. Die Extraktion wurde 2-mal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden danach im N₂-Strom eingeeengt und derivatisiert (2.9.1.7).

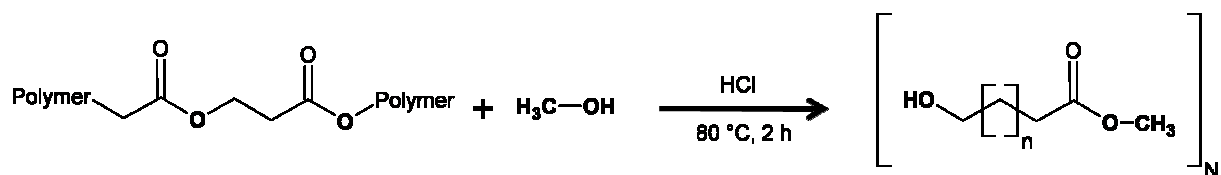


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer säurekatalysierten Umesterung eines Polyesters

Die Monomere des Polymers werden durch die Umesterung an Methanol sukzessive freigesetzt.

2.9.1.7. Derivatisierung

Bevor die in 2.9.1.1 bis 2.9.1.6 hergestellten Proben für die Gaschromatographie und Massenspektrometrie verwendet werden konnten, mussten zunächst noch hydrophile funktionelle Gruppen maskiert werden. Dieser Schritt erhöht die Flüchtigkeit und

Trennbarkeit der in den Proben enthaltenen Substanzen für die Gaschromatographie und verringert unerwünschte Reaktionen mit der Säulenbeschichtung. Jeder Probe wurden 20 µl wasserfreies Pyridin als Katalysator und 20 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), zur Überführung freier Hydroxy- und Carboxygruppen in ihre korrespondierenden Trimethylsilylether beziehungsweise –ester, zugegeben. Die Bildung dieser Derivate erfolgte durch eine Inkubation bei 70 °C für 40 min (Abbildung 9). Im Anschluss wurden die Proben gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht (2.9.2).

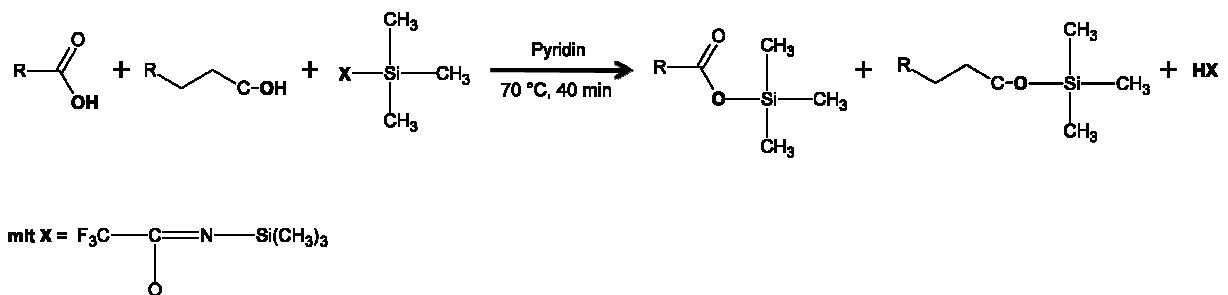


Abbildung 9: Beispiel einer Derivatisierung von Suberinmonomeren mit BSTFA.

Die Maskierung von funktionellen Gruppen (hier zum Beispiel eine Carboxy- und Hydroxygruppe) geschieht über die Synthese von Trimethylsilylethern und -estern. Die dabei entstehenden Derivate der Ausgangsstoffe haben für die GC verbesserte Eigenschaften. Bei der Reaktion dient Pyridin als Katalysator.

2.9.2. Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die in den Proben enthaltenen Substanzen wurden anhand ihrer *electron-impact* MS-Spektren (70 eV, m/z 50-700), nach Auftrennung in einem Agilent 6890N Gaschromatographen (GC) (Agilent Technologies, Böblingen) welcher mit einem Agilent 5973N Massenspektrometer (MS) (Agilent Technologies) gekoppelt war, identifiziert. Je 1 µl der Proben wurde *on-column* in die Kapillarsäule (DB-1, 30 m x 0,32 mm, 0,1 µm; Agilent J&W, Böblingen) injiziert und der GC mit den Temperaturprogrammen aus Tabelle 8 gefahren (Abbildung 10), dabei diente Helium mit einer Flussrate von 2 ml/min als Trägergas. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm HP-Chemstation (Hewlett-Packard Corporation, USA) unter Zuhilfenahme von publizierten MS-Spektren (Holloway, 1982) und einer internen MS-Spektren Bibliothek.

Die Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Stoffe, erfolgte mit einem identischen GC-System, das mit einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) gekoppelt war, über den Vergleich mit dem internen Standard. Es wurden identische

Temperaturprogramme benutzt, jedoch Wasserstoff mit einer Flussrate von 2 ml/min als Trägergas.

Tabelle 8: Temperaturprogramme für GC-FID und GC-MS

Suberin / Kutin / Samenschale	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

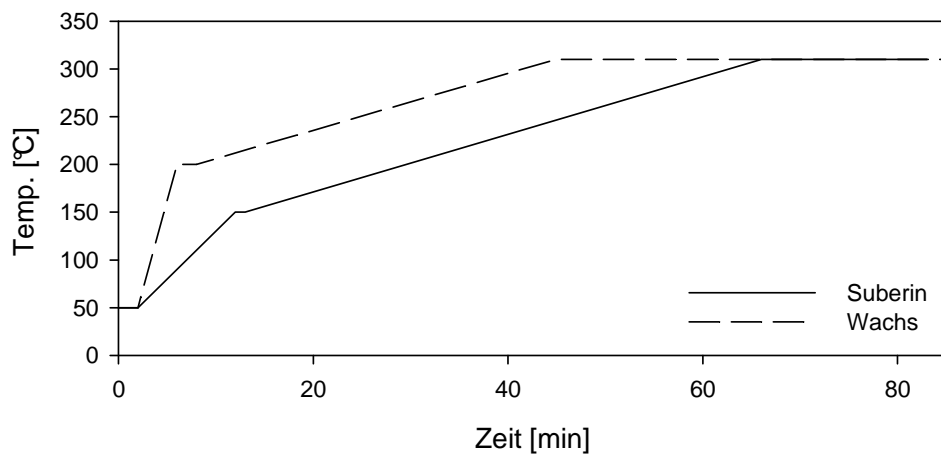


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Temperaturprogramme für Suberin und Wachs.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1. Änderung der Suberinzusammensetzung im Verlauf des Wurzelwachstums von *Arabidopsis*

Um eine Vorstellung von den biochemischen Reaktionen zu bekommen, welche an der Formation und Entwicklung des aliphatischen Wurzelsuberins beteiligt sind, wurde die Suberinzusammensetzung im Laufe der Wurzelentwicklung genauer untersucht. Es wurden Wurzeln von 10 d, 21 d und 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen histochemisch und chemisch analysiert. Die 10 d alten Keimlinge waren steril auf MS-Agar angezogen, die beiden anderen Altersstufen auf Erde (2.2). Von den 10 d alten Keimlingen wurde die gesamte Wurzel für diese Analyse verwendet (Abbildung 11A). Die Wurzeln der 21 d alten Pflanzen wurden entlang der Wurzelachse zusätzlich in 2 Zonen unterteilt (Abbildung 11C). Der basale Teil reichte von der Wurzelbasis 20 mm Richtung Wurzelspitze, der apikale Teil umfasste den distalen Rest der Wurzel inklusive Wurzelspitze. Bei den 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Wurzeln in 3 Zonen entlang der Wurzelachse aufgeteilt (Abbildung 11F). Der basale Teil beinhaltete ausgehend von der Wurzelbasis die ersten 15 mm der Wurzel. Dem mittleren Teil wurden die darauf folgenden 25 mm der Wurzel zugeordnet. Der apikale Teil umfasste den distalen Rest der Wurzel inklusive Wurzelspitze.

Von allen Altersstufen und Wurzelteilen wurden Querschnitte angefertigt, mit dem lipophilen Farbstoff Sudan Rot 7B angefärbt, und mikroskopisch untersucht (2.8). Die Färbung mit Sudan Rot 7B wird häufig verwendet, um Suberineinlagerungen anzufärben. Repräsentative Querschnitte der basalen Teile der 21 d und 35 d alten Pflanzen zeigen Wurzeln in einem sekundären Entwicklungszustand, der durch die Einlagerung von Suberin in den Zellwänden der äußersten peridermalen Zellen gekennzeichnet ist (Abbildung 11D, G). Die Querschnitte des mittleren Teils der 35 d alten Wurzel zeigen ebenfalls ein suberinisiertes Periderm (Abbildung 11H). Die Querschnitte der 10 d alten Wurzeln und der apikalen Teile der 21 d und 35 d alten Wurzeln zeigen Wurzeln in einem primären Entwicklungszustand. Der primäre Entwicklungszustand ist charakterisiert durch das Vorhandensein einer Endodermis mit apoplastischen Suberineinlagerungen (Abbildung 11B, E, I).

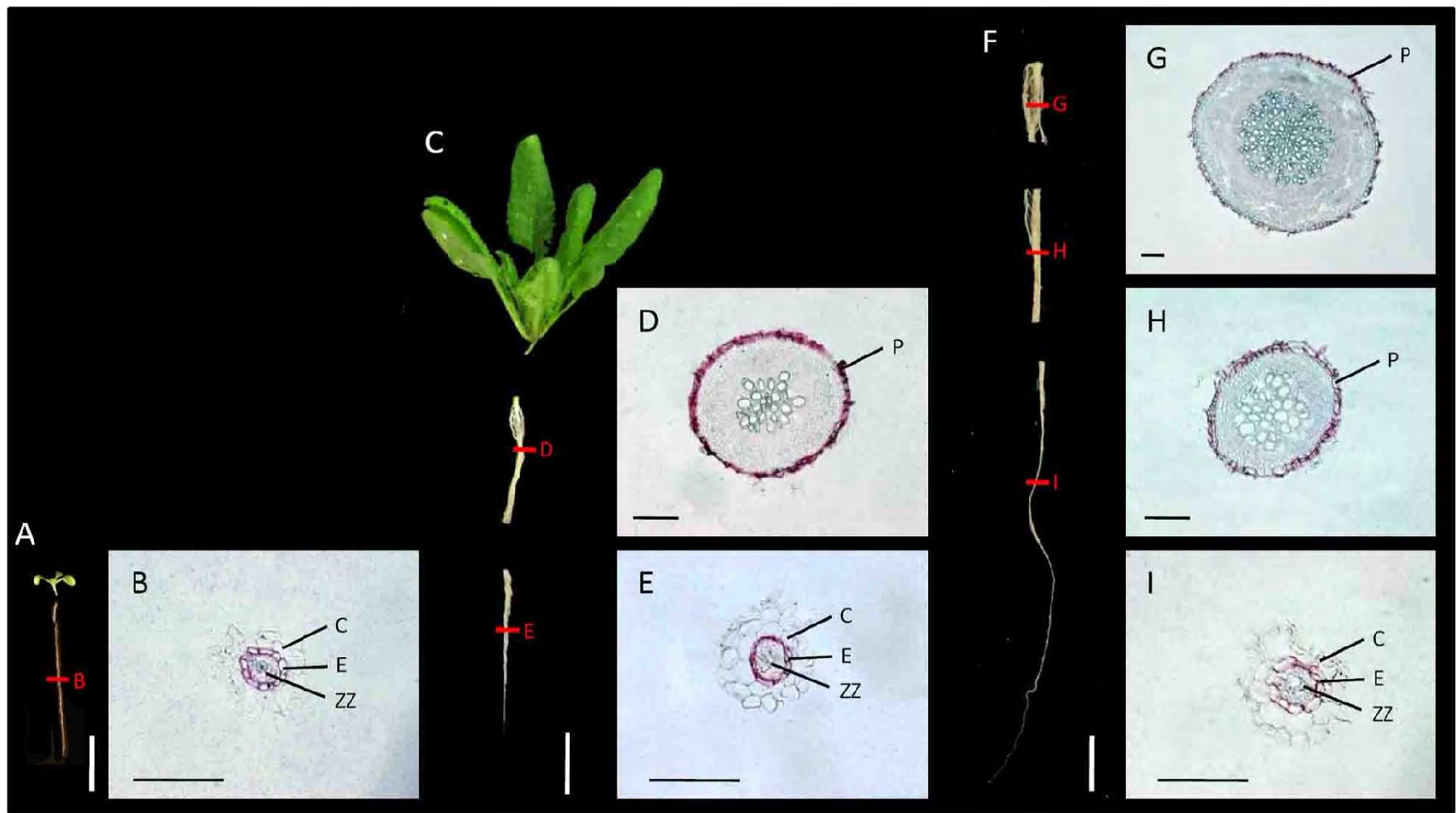


Abbildung 11: Untersuchte Altersstadien und Wurzelzonen von *Arabidopsis* und Verteilung von Suberin in den Wurzeln.

Zum Größenvergleich ist jeweils eine 10 d (A), 21 d (C), und 35 d (F) alte *Arabidopsis*wurzel gezeigt, die in die untersuchten Zonen aufgeteilt wurde. Von jeder Wurzel beziehungsweise Wurzelzone wurden Querschnitte angefertigt, die Position der Querschnitte ist durch rote Linien und Buchstaben markiert. (B, D, E, G-I) Hellfeldaufnahmen der mit Sudan 7B angefärbten repräsentativen Querschnitte der *Arabidopsis*wurzel. Das rot gefärbte Suberin ist in der Endodermis von Wurzeln im primären Entwicklungszustand (B, E, I) oder im Periderm von Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand (D, G, H) eingelagert. Mit C= Kortex; E= Endodermis; P= Periderm; ZZ= Zentralzylinder. Maßstab in A, C, F= 1 cm; in B, D, E, G-I= 100 µm.

Zur Analyse der Suberinmenge und –zusammensetzung wurden aus dem Wurzelgewebe der unterschiedlichen Wurzelzonen alle löslichen Lipide mit Chloroform/Methanol extrahiert (2.9.1.3). Die Wurzeln der 10 d und 21 d alten Pflanzen waren sehr klein und wurden aufgrund dessen im Anschluss an die Chloroform/Methanol-Extraktion nicht enzymatisch verdaut. Es wäre nicht möglich gewesen das übrig gebliebene Pflanzenmaterial nach der Enzymbehandlung aufzufangen. Die Wurzeln der 35 d alten Pflanzen konnten im Anschluss an die Chloroform/Methanol-Extraktion enzymatisch verdaut und das Pflanzenmaterial wieder eingesammelt werden. Im Anschluss wurde das verbleibende Gewebe mittels GC-FID und GC-MS analysiert (2.9.2). Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, ausschließlich auf das Trockengewicht der Wurzeln nach Chloroform/Methanol Extraktion. In allen Altersstadien und Wurzelzonen konnten die gleichen Suberinmonomere nachgewiesen werden. Dazu gehörten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₁₈ bis C₂₄, primäre Alkohole (C₁₈-C₂₂), ω-Hydroxysäuren (C₁₆-C₂₄), α,ω-Disäuren (C₁₆-C₂₄) und 2-Hydroxysäuren (C₂₀-C₂₆) (Abbildung 12A). Hauptmonomere waren in allen Proben die einfach ungesättigte C₁₈ ω-Hydroxysäure (C₁₈(1)) (12-32 %) und C₁₈(1) α,ω-Disäure (11-19 %). Bei den 21 d alten Wurzeln waren die Mengen aller Monomere außer den 2-Hydroxysäuren im apikalen Teil der Wurzel geringer als im basalen Teil. In den 35 d alten Wurzeln konnten die höchsten Gehalte aller Monomere im mittleren Teil der Wurzel nachgewiesen werden. Hauptsubstanzklassen waren in allen Proben ω-Hydroxysäure (27-52 %) und α,ω-Disäuren (20-31 %) (Abbildung 12B). Innerhalb einer Altersstufe konnte in den Wurzelteilen im sekundären Entwicklungszustand (21 d, 35 d basaler Teil und 35 d mittlerer Teil) im Vergleich zu den Wurzelteilen im primären Entwicklungszustand (21 d, 35 d apikaler Teil) jeweils ein höherer relativer Anteil der Substanzklasse der ω-Hydroxysäuren, und ein geringerer relativer Anteil der Substanzklassen der Fettsäuren und 2-Hydroxysäuren nachgewiesen werden. In den 10 d und 21 d alten Wurzeln war keine signifikante Veränderung am relativen Anteil der Substanzklasse der α,ω-Disäuren zu erkennen. Die 35 d alten Wurzeln enthielten im Vergleich zu den jüngeren Wurzeln einen höheren relativen Anteil der Substanzklasse der α,ω-Disäuren (ca. 22 % 10 d, 21 d zu ca. 30 % 35 d). Keine Veränderung zeigte die Substanzklasse der Alkohole.

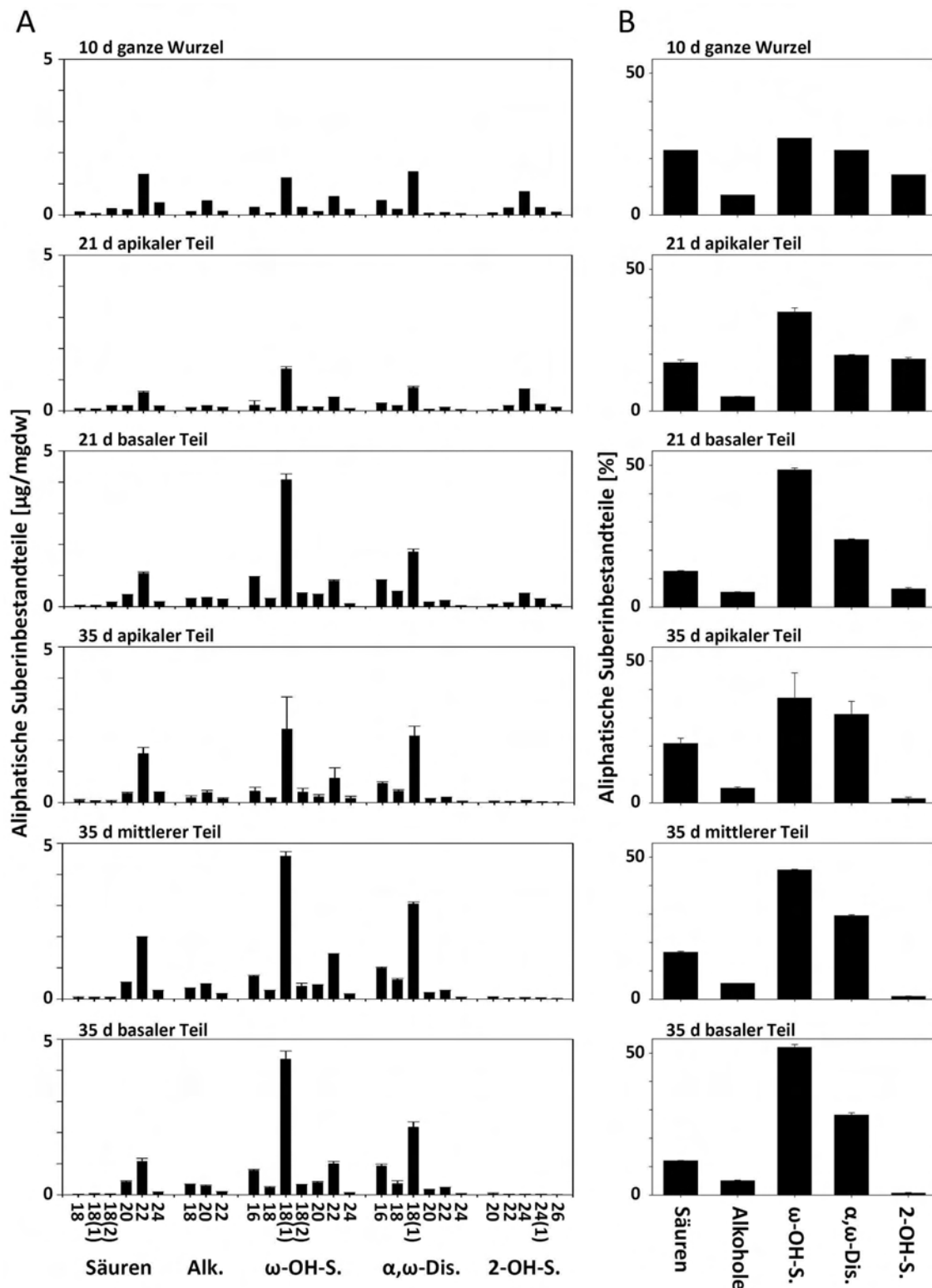


Abbildung 12: Zusammensetzung des aliphatischen Suberins in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von *Arabidopsis*.

(A) Monomere Zusammensetzung und Menge des Wurzelsuberins von *Arabidopsis* in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht nach $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Extraktion. (B) Relativer Anteil der einzelnen Substanzklassen des aliphatischen Suberins in den jeweiligen Wurzelzonen. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung (ausgenommen 10 d alte Wurzel mit einer Analyse). Mit Alk= primärer Alkohol; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäure; α,ω -Dis.= α,ω -Disäure; 2OH-S.= 2-Hydroxysäure. Jede Parallele enthielt 1,5-25 mg $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ extrahierte Wurzelteile.

Es dominierten in allen Proben Monomere mit einer Kettenlänge von C₁₈ (36-57 %) (Abbildung 13). Mit zunehmenden Alter und geringerer Distanz zur Wurzelbasis stieg der relative Anteil am Gesamtsuberin von C₁₈ Monomere von 36 % auf 57 % und der relative Anteil am Gesamtsuberin von C₂₄ Monomeren fiel von 17 % auf 2 %. Bei den 21 d beziehungsweise 35 d alten Wurzelteilen stieg vom apikalen- zum basalen Teil der relative Anteil am Gesamtsuberin von C₁₆ Monomeren leicht an (6-12 % bei 21 d bzw. 9-12 % bei 35 d), und der relative Anteil am Gesamtsuberin von C₂₂ und C₂₆ Monomeren fiel leicht ab (C₂₂: 21-17 % bei 21 d bzw. 24-18 % bei 35 d; C₂₆: 1,73 %-0,53% bei 21 d bzw. 0,14 %-0,03 % bei 35 d). Monomere mit einer Kettenlänge von C₂₀ zeigten im Laufe der Entwicklung keine signifikanten Veränderungen.

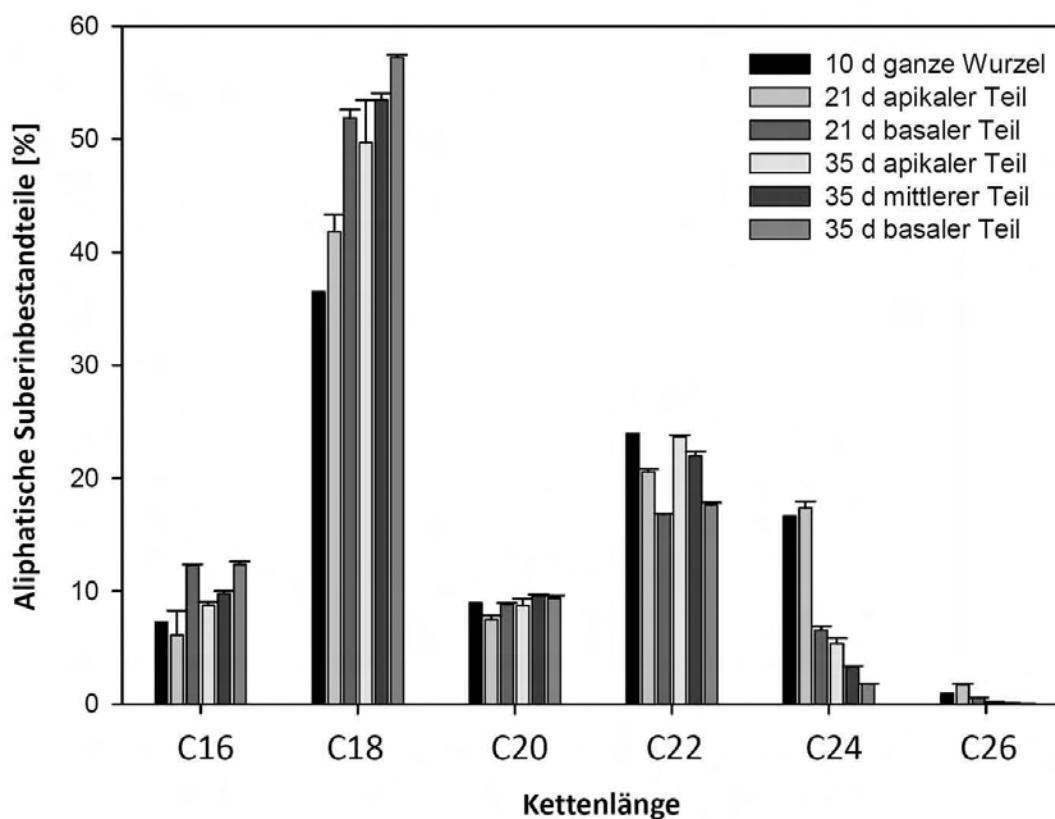


Abbildung 13: Kettenlängenverteilung der aliphatischen Suberinmonomere in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von *Arabidopsis*.

Relativer Anteil der nach Kettenlänge sortierten aliphatischen Suberinmonomere an der Gesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung (ausgenommen 10 d alte Wurzel mit einer Analyse). Jede Parallele enthielt 1,5-25 mg CHCl₃/MeOH extrahierte Wurzelteile.

Die gesamte aliphatische Suberinmenge in den Wurzeln im primären Entwicklungszustand variierte zwischen $6,67 \pm 0,39 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ und $11,25 \pm 2,42 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ (Abbildung 14). Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand enthielten eine aliphatische Gesamtsuberinmenge zwischen $13,71 \pm 0,92 \mu\text{g}/\text{mgdw}$

und $17,62 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mgdw}$. In den 21 d alten Wurzeln enthält der basale Teil mehr als die doppelte Suberinmenge als der apikale Teil ($6,67 \pm 0,39 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ apikaler Teil; $14,46 \pm 0,43 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ basaler Teil). Bei den 35 d alten Wurzeln wurde im mittleren Teil die höchste aliphatische Gesamtsuberinmenge nachgewiesen ($17,62 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mgdw}$). Der basale Wurzelteil enthielt wiederum eine höhere Suberinmenge als der apikale Wurzelteil ($11,25 \pm 2,42 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ apikaler Teil; $13,71 \pm 0,92 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ basaler Teil). Bezieht man die Berechnung der gesamten Suberinmenge der 35 d alten Wurzeln auf das Trockengewicht nach Enzymbehandlung, so steigt die Suberinmenge von der Wurzelspitze Richtung Wurzelbasis um 132 % an ($18,9 \pm 4,58 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ apikaler Teil; $33,3 \pm 0,96 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ mittlerer Teil; $43,94 \pm 2,06 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ basaler Teil) (Abbildung 14).

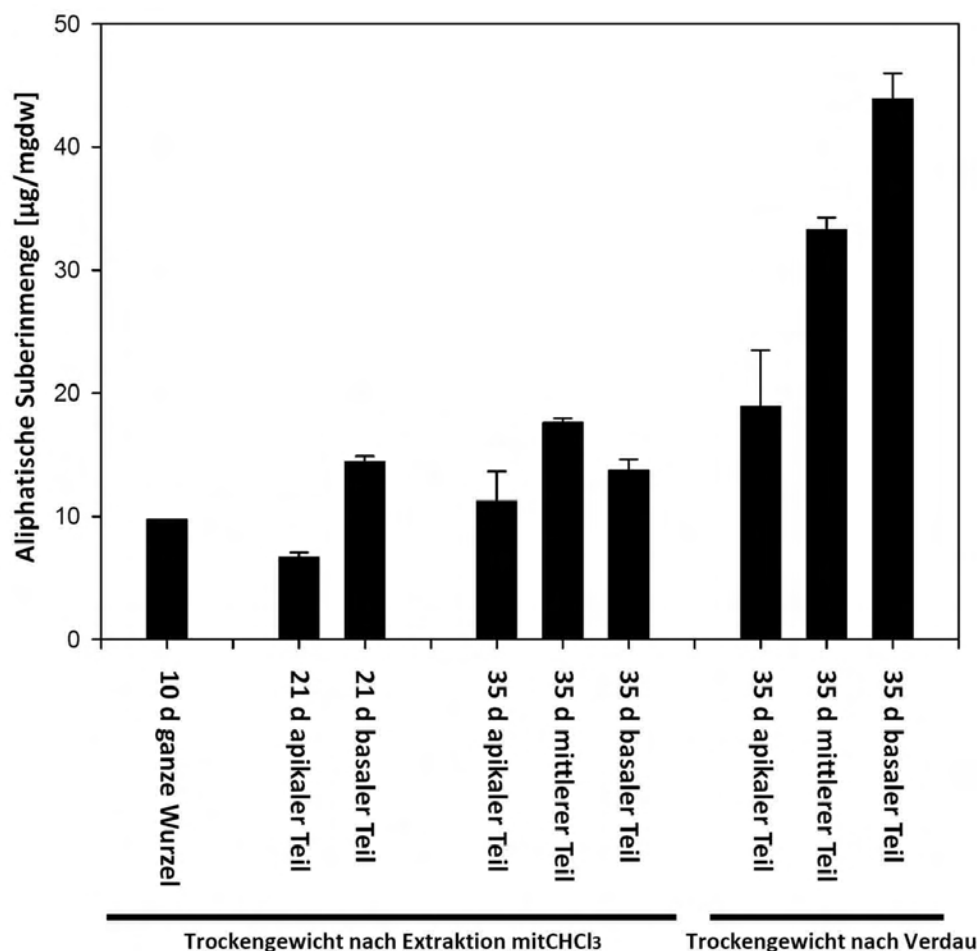


Abbildung 14: Gesamtmenge des aliphatischen Suberins in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von *Arabidopsis* und Vergleich der Gesamtmenge des aliphatischen Suberins in den 35 d alten Wurzelzonen bei unterschiedlichen Bezugsgrößen.

Die Gesamtmenge des aliphatischen Suberins in den drei Zonen der 35 d alten Wurzel ist auf das Trockengewicht nach $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Extraktion und auf das Trockengewicht nach Enzymbehandlung bezogen. Gezeigt ist bei allen Altersstadien und Wurzelzonen jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung (ausgenommen 10 d alte Wurzel mit einer Analyse). Jede Parallele enthielt 1,5-25 mg $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ extrahierte Wurzelteile.

3.2. Einfluss von NaCl auf die Suberinisierung in *Arabidopsis*

Ergänzend zu den Untersuchungen der Suberinzusammensetzung im Verlauf des Wurzelwachstums von *Arabidopsis*, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen unter dem Einfluss von 100 mM NaCl angezogen (2.2.3). Die Wurzeln von 35 d alten Pflanzen wurden geerntet, und mittels GC-FID und GC-MS analysiert (2.9). In der Kontrolle und in den mit NaCl behandelten Pflanzen konnten dieselben Suberinmonomere nachgewiesen werden (Abbildung 44). Quantitativ erhöhte sich im Vergleich zwischen behandelten Pflanzen und Kontrolle die Gesamtmenge der Säuren um 65 %, der Alkohole um 76 %, der ω -Hydroxysäuren um 77 % und der α,ω -Disäuren sogar um 148 % (Abbildung 15). Die Gesamtmenge des aliphatischen Suberin stieg von $26,6 \pm 2,86 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ in der Kontrolle auf $47,48 \pm 6,18 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ in den behandelten Pflanzen.

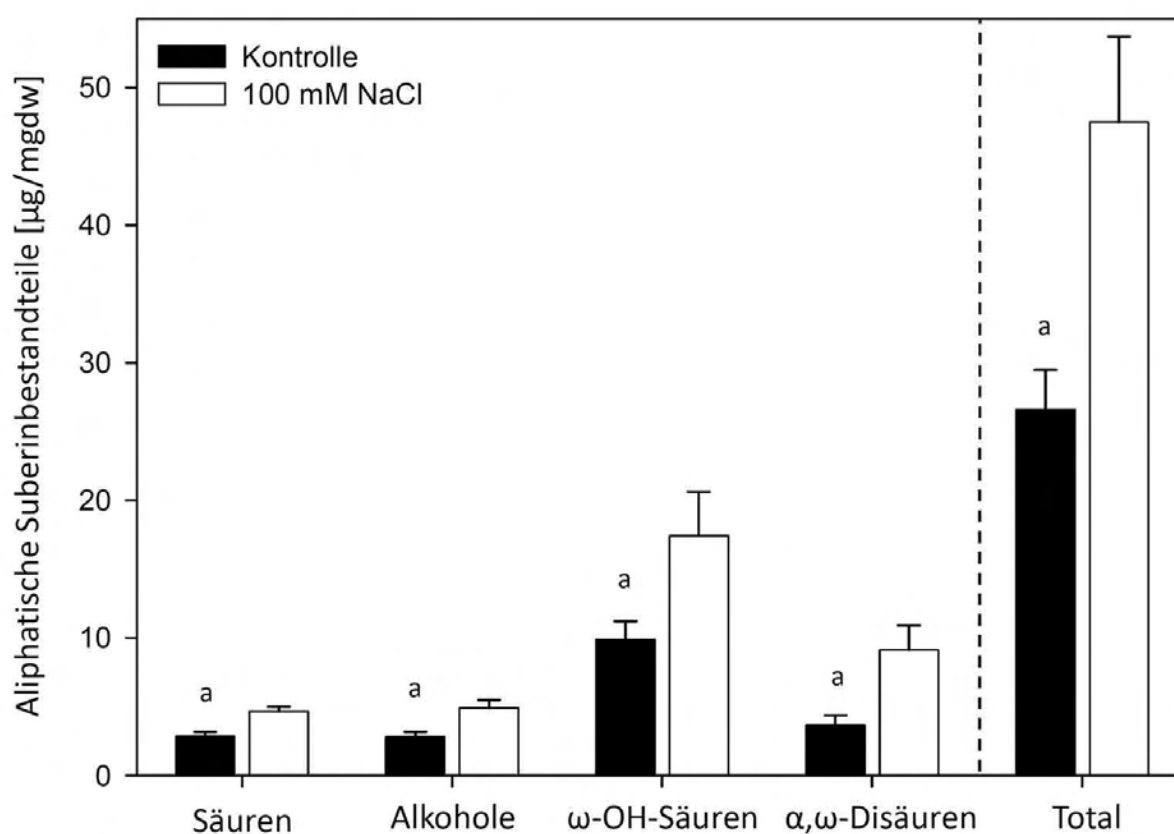


Abbildung 15: Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von *Arabidopsis* bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.

Bei der Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen wurde dem Gießwasser 100 mM NaCl zugegeben. Nach 35 d wurden die Pflanzen geerntet und die aliphatische Suberinzusammensetzung analysiert. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt 3-12 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände. a= Unterschied zu über 98 % signifikant. Mit ω -OH-Säuren= ω -Hydroxysäuren.

Im Gegensatz zum deutlichen quantitativen Unterschied der Suberinzusammensetzung in der *Arabidopsis*-Wurzel bei Anzucht unter NaCl-Einfluss, zeigten sich beim qualitativen Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Pflanzen keine großen Unterschiede. Die Säuren, Alkohole und ω -Hydroxysäuren zeigten keine Veränderung ihres relativen Anteils am Gesamtsuberin (Abbildung 16A). Nur bei den α,ω -Disäuren konnte ein höherer relativer Anteil an der aliphatischen Gesamtsuberinmenge nachgewiesen werden. Die relative Verteilung der Kettenlängen zeigte eine leichte Erhöhung des relativen Anteils der Substanzen mit einer Kettenlänge von C₁₆ und C₂₀ (Abbildung 16B). Die übrigen Kettenlängen zeigten keine Veränderung.

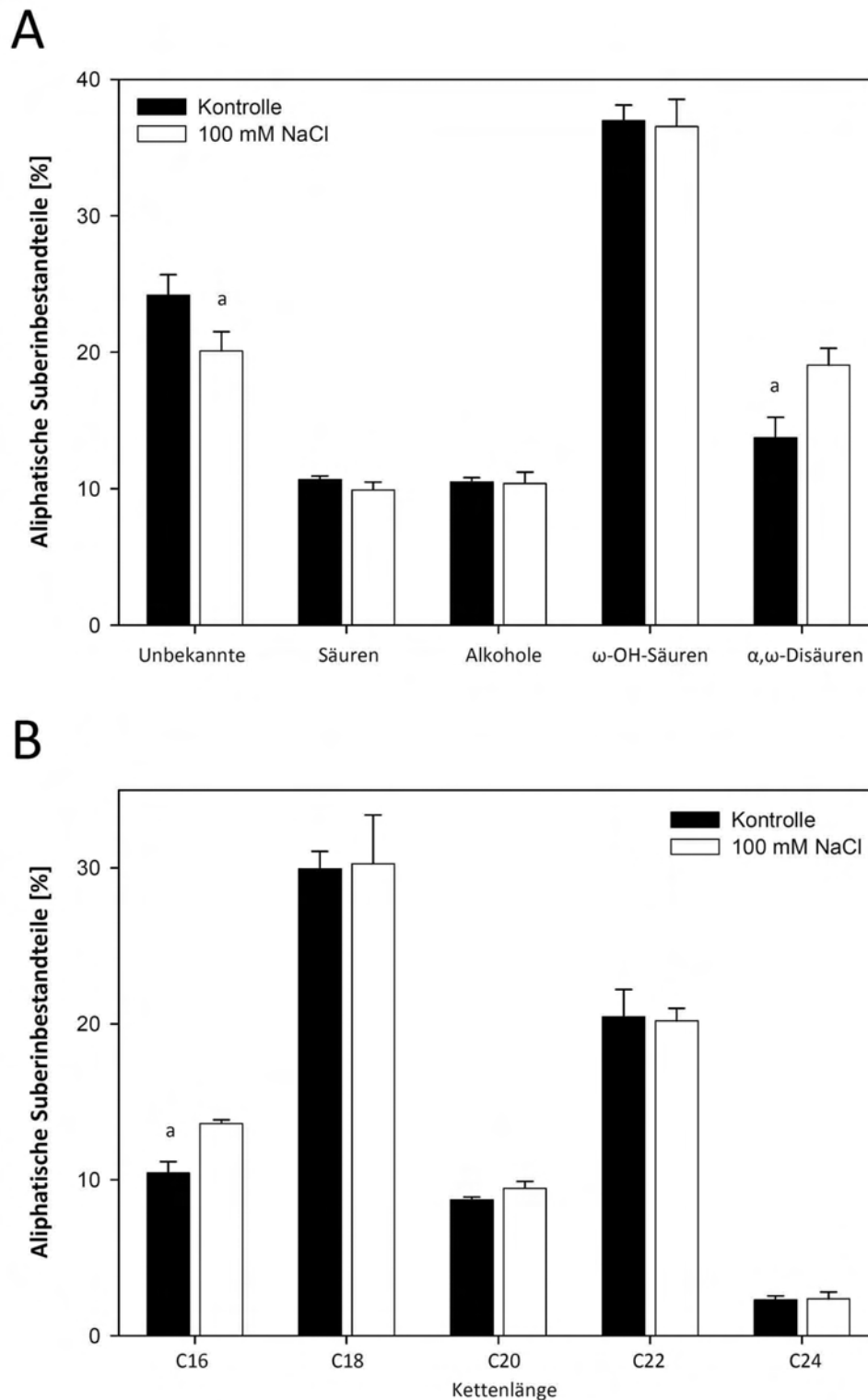


Abbildung 16: Relative Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von *Arabidopsis* bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.

Bei der Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen wurde dem Gießwasser 100 mM NaCl zugegeben. Nach 35 d wurden die Pflanzen geerntet und die aliphatische Suberinzusammensetzung analysiert. (A) Relativer Anteil der einzelnen Stoffklassen an der Gesamtmenge des aliphatischen Wurzelsuberins. (B) Relativer Anteil der nach Kettenlänge sortierten Suberinmonomere an der Gesamtmenge des aliphatischen Wurzelsuberins. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung in % von der Gesamtsuberinmenge. Jede Parallele enthielt 3-12 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände. a= Unterschied zu über 99 % signifikant. Mit ω -OH-Säuren= ω -Hydroxysäuren.

3.3. Auswahl von Kandidatengen

Um aus den 246 putativen *P450* im *Arabidopsis*-Genom Gene auszuwählen, die mit der Suberinbiosynthese assoziiert sein könnten, wurden öffentlich zugängliche Datenbanken zu Hilfe genommen. Zunächst wurden anhand einer *Microarray*-Analyse des *Arabidopsis* 2010 Projektes (National Science Foundation; *Arabidopsis* 2010: Functional Genomics of *Arabidopsis* P450s; <http://arabidopsis-p450.biotech.uiuc.edu>) wurzelexprimierte *P450* gesucht, da Suberineinlagerungen bei *Arabidopsis* fast ausschließlich in diesem Organ zu finden sind. Insgesamt zeigten in dieser Analyse 169 *P450* eine Expression in der Wurzel, 70 davon hatten im Vergleich mit den anderen untersuchten Organen ihre höchste oder ausschließliche Expression in der Wurzel. In Tabelle 9 sind die 20 am stärksten in der Wurzel exprimierten *P450* aufgeführt.

Tabelle 9: Expression in verschiedenen Pflanzenorganen der 20 am stärksten in der Wurzel exprimierten *P450* von *Arabidopsis* (nach *Arabidopsis* 2010: Functional Genomics of *Arabidopsis* P450s).

Die Daten wurden aus *Microarray*-Analysen des *Arabidopsis* 2010 Projektes (National Science Foundation; *Arabidopsis* 2010: Functional Genomics of *Arabidopsis* P450s; <http://arabidopsis-p450.biotech.uiuc.edu>) extrahiert. Gezeigt ist die zur Kontrolle normalisierte relative Expression der *P450* in verschiedenen Pflanzenorganen.

P450	AGI-Code	Relative Expression (normalisiert zur universellen Kontrolle)			
		Wurzel	Blatt	Stängel	Blüte
CYP704A1	At2g44890	8,02	--	3,43	2,84
CYP72A14	At3g14680	8,05	--	--	0,74
CYP712A1	At2g42250	8,15	--	--	1,89
CYP71A16	At5g42590	8,16	--	6,75	--
CYP81F4	At4g37410	8,53	0,21	1,01	0,05
CYP82C4	At4g31940	8,61	--	--	--
CYP71A19	At4g13290	9,22	--	3,54	0,54
CYP718	At2g42850	9,40	--	--	0,94
CYP705A13	At2g14100	9,48	--	--	--
CYP705A9	At2g27010	9,62	--	--	--
CYP86A1	At5g58860	11,26	--	1,92	0,12
CYP71A27	At4g20240a	11,59	--	--	--
CYP87A2	At1g12740	11,98	--	--	--
CYP82F1	At2g25160	12,14	--	--	--
CYP705A8	At2g27000	12,72	--	0,66	--
CYP708A2	At5g48000	12,79	--	0,64	--
CYP702A5	At4g15393	13,40	--	4,34	--
CYP705A5	At5g47990	15,85	--	0,66	--
CYP705A12	At5g42580	18,04	--	--	--
CYP705A1	At4g15330	22,23	--	--	--

Desweiteren wurden Daten einer wurzelspezifischen *Microarray*-Analyse von Birnbaum *et al.* (2003) ausgewertet. Insgesamt wurde bei dieser Analyse eine Expression von 114 putative *P450* in der Wurzel detektiert. In Abbildung 17A sind die 20 Gene mit der höchsten Signalstärke über die gesamte Wurzel gezeigt. Außerdem untersuchte diese *Microarray*-Analyse die Expression der Gene in den verschiedenen Wurzelgeweben. Da angenommen wurde, dass Gene die an der Suberinbiosynthese beteiligt sind, in der Endodermis exprimiert sind, wurden die *P450* mit der höchsten Signalstärke in der Endodermis aus den Daten extrahiert (Abbildung 17B).

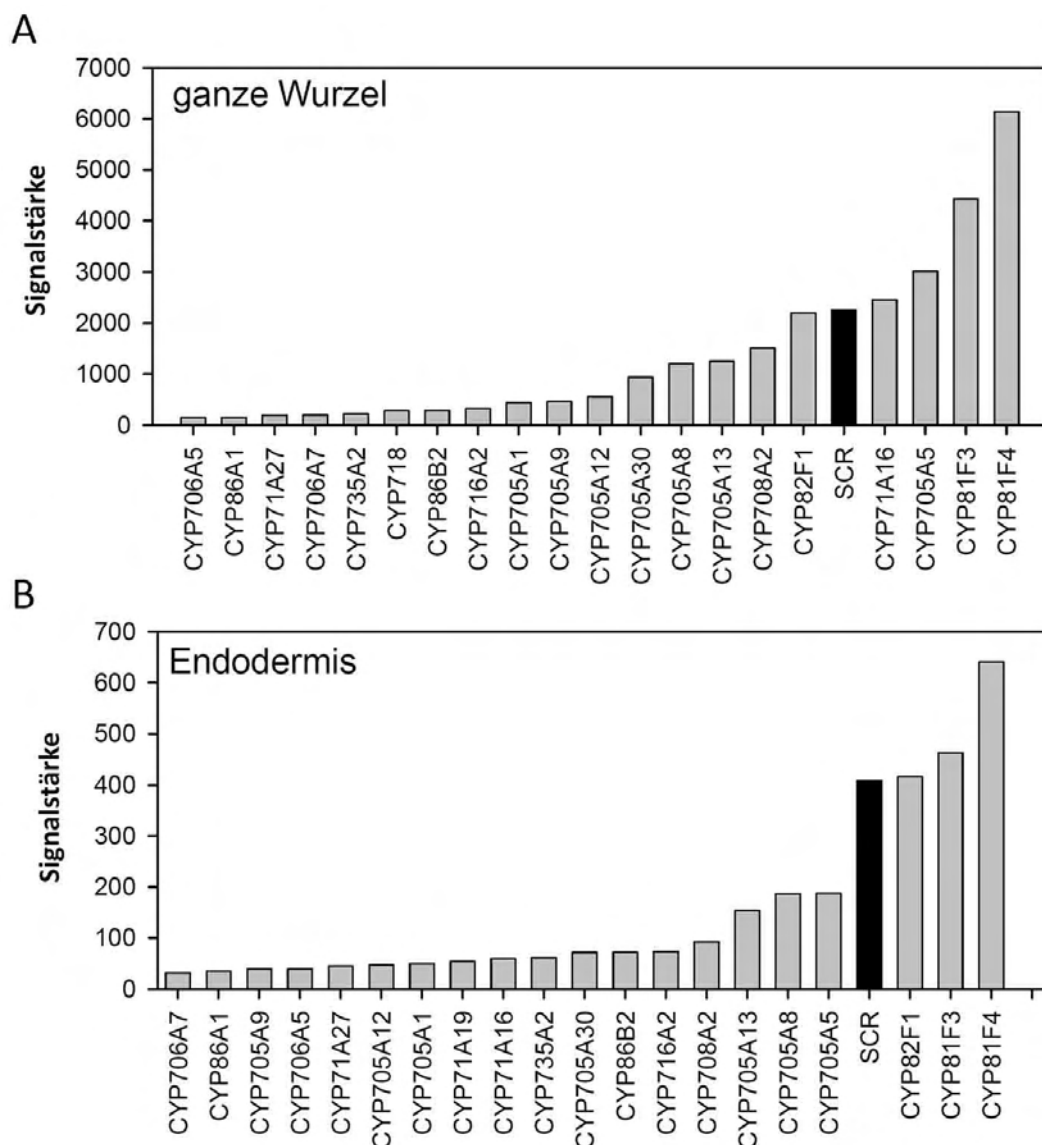


Abbildung 17: Die 20 *P450* mit der höchsten Summe aller Signale über die ganze Wurzel, beziehungsweise der Endodermis von *Arabidopsis* (nach Birnbaum *et al.*, 2003).

Die Daten wurden aus *Micoarray*-Analysen von Birnbaum *et al.* (2003) extrahiert. (A) Die 20 *P450* mit der höchsten Summe aller Signale über die ganze Wurzel (B) Die 20 *P450* mit der höchsten Summe aller Signale in der Endodermis der Wurzel. *SCR*= endodermispezifisches Referenzgen (Wysocka-Diller *et al.*, 1999).

Die beiden *Microarray*-Analysen zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Es sind 13 *P450* in beiden Analysen unter den 20 am stärksten in der Wurzel exprimierten Genen vertreten, jedoch belegen sie andere Positionen. Unter den in Abbildung 17A gezeigten 20 Genen mit der höchsten Signalstärke über die gesamte Wurzel sind auch 19, welche die höchste Signalstärke in der Endodermis haben. Für die weiteren Untersuchungen wurde *CYP705A1* ausgewählt, da es nur in der Wurzel detektiert werden konnte und eine hohe Signalstärke in der gesamten Wurzel und Endodermis hatte. Des Weiteren wurde *CYP81F4* gewählt, da es sowohl die höchste Signalstärke über die gesamte Wurzel, als auch in der Endodermis zeigte, und auch im Vergleich der Pflanzenorgane am stärksten in der Wurzel exprimiert war. *CYP705A13* wurde als ein Gen mit mittleren Expressionsraten in beiden *Microarray*-Analysen ausgewählt. Trotz der geringen Signalstärken in Wurzel und Endodermis wurde noch *CYP86A1* für die folgenden Untersuchungen ausgewählt. Zum einen wurde bei Transkriptom Analysen vom sich entwickelnden Phelloderm von *Quercus suber* eine zu *CYP86A1* Homologe *P450* identifiziert von der angenommen wird, dass sie an der Suberinbiosynthese beteiligt ist (Soler *et al.*, 2007). Zum anderen wurde die Fähigkeit von *CYP86A1* zur ω -Hydroxylierung von Fettsäuren *in vitro* bereits nachgewiesen (Benveniste *et al.* 1998).

3.4. Organspezifische Expressionsanalyse der Kandidatengene

Zur Überprüfung der *Microarray*-Daten wurde für jedes Kandidatengene eine organspezifische semiquantitative RT-PCR durchgeführt (2.3.6). Dafür wurden Wurzeln, Blätter, Stängel, Blüten und Schoten von auf Erde aufgezogenen 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen geerntet und die Gesamt-RNA extrahiert (2.3.2). Die Wurzeln der Versuchspflanzen wurden zusätzlich noch in drei Zonen unterteilt (siehe 3.1), um die Expressionstärke in Wurzeln im primären- beziehungsweise sekundären Entwicklungszustand vergleichen zu können. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden organspezifischen Expressionsdaten von *Microarray*-Analysen, die aus der Genevestigator-Datenbank (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004) extrahiert wurden, gegenübergestellt.

Die RT-PCR zeigte, dass alle Kandidatengene bis auf *CYP705A1* ausschließlich in der Wurzel exprimiert sind (Abbildung 18A). Bei *CYP705A1* konnte noch eine schwache Expression in Blüten und Schoten nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke von *CYP86A1*, *CYP705A1* und *CYP705A13* fiel vom apikalen- zum basalen Teil der Wurzel ab. Die höchste Expression für *CYP81F4* zeigte sich im mittleren Teil der Wurzel. Apikaler- und basaler Teil zeigten bei der RT-PCR eine geringere relative Expression. Die geringste Expressionsstärke in den Wurzeln hatten *CYP86A1* und *CYP705A13*, die höchste *CYP81F4* und *CYP705A1*. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR, zeigten die Daten von Genevestigator für alle Kandidatengene auch eine geringe Expression in den oberirdischen Pflanzenorganen (Abbildung 18B). Alle Kandidatengene zeigten jedoch auch bei Genevestigator die stärkste Expression in der Wurzel.

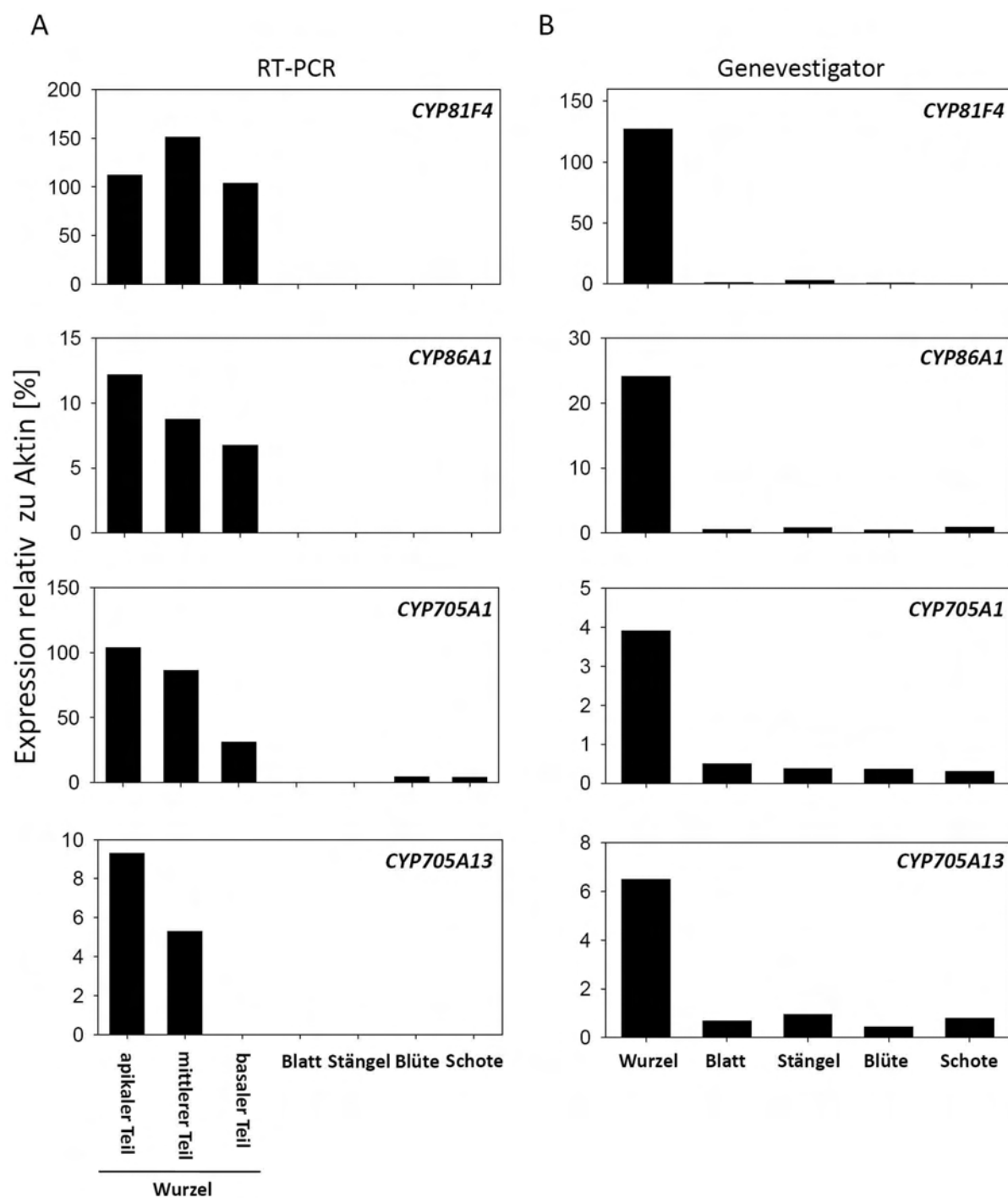


Abbildung 18: Organspezifische Expressionsanalyse der Kandidatengene.

(A) Die Gesamt-RNA von Organen und Wurzelteilen von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde extrahiert und in einer semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Die Bandenstärke der Kandidatengene wurde densitometrisch ermittelt und relativ zur Bandenstärke von *Aktin* aufgetragen. (B) Die Daten wurden aus *Micoarray*-Analysen von Zimmerman *et al.* (2004) extrahiert und die Expression der Kandidatengene relativ zur Expression von *Aktin* aufgetragen.

3.5. Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene unter abiotischen Stressbedingungen

3.5.1. NaCl-Behandlung

Wie bereits gezeigt, wird durch NaCl eine verstärkte Suberinbildung in *Arabidopsis* induziert. Es ist anzunehmen, dass die Expression von Genen die eine Rolle in der Suberinbiosynthese spielen, ebenfalls durch NaCl induziert wird. Zur Überprüfung der transkriptionellen Regulation der Kandidatengene, wurden 10 d alte Keimlinge des Wildtyp mit NaCl behandelt (2.2.5), die Gesamt-RNA extrahiert (2.3.1) und eine semiquantitative RT-PCR auf die Kandidatengene durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit *Microarray*-Daten des AtGenExpress-Projektes (<http://www.uni-tuebingen.de/plantphys/AFGN/atgenex.htm>) verglichen.

Zunächst wurde die Expressionsrate des durch NaCl induzierten Markergens *RD29A* (*RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29A* (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993)) untersucht. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen im Vergleich zur Kontrolle nach 3 h NaCl-Behandlung einen deutlichen Anstieg der Expressionsrate von *RD29A*, die nach 6 h wieder leicht zurückgeht (Abbildung 19).

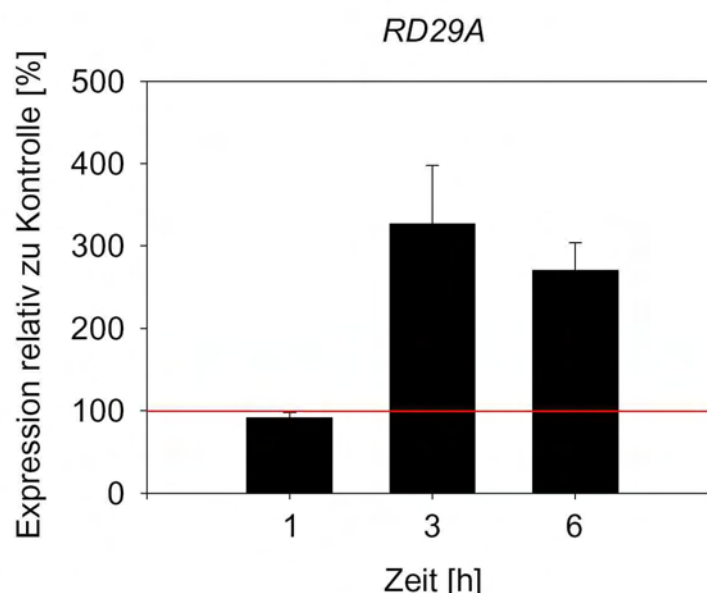


Abbildung 19: Expression von *RD29A* in mit NaCl behandelten *Arabidopsis*-Keimlingen.

Die Gesamt-RNA aus mit 150 mM NaCl behandelten 10 d alten *Arabidopsis*-Keimlingen wurde extrahiert und in einer semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Es ist die Expression relativ zur Kontrolle (unbehandelte Keimlinge) \pm Standardabweichung von drei RT-PCR's auf dieselbe RNA dargestellt. *RD29A* ist ein durch NaCl induziertes Referenzgen (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993).

Die RT-PCR zeigte für *CYP81F4* eine deutliche Repression der Expressionsrate nach 6 h unter NaCl-Einfluss auf $32,81 \pm 14,74$ % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20A). Auch die Expressionsrate von *CYP86A1* geht nach einem leichten Anstieg nach 1 h NaCl-Behandlung, nach 6 h auf $56,31 \pm 18,5$ % im Vergleich zur Kontrolle zurück (Abbildung 20B). Die Expressionsrate von *CYP705A1* stieg nach 1 h auf $256,3 \pm 105,56$ % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20C). Die Expressionsrate ging dann sukzessive unter den Kontrollwert zurück. Für *CYP705A13* zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein leichter Anstieg der Expressionsrate nach 1 h unter NaCl-Einfluss, und eine Repression der Expressionsrate auf $36,41 \pm 14,53$ % nach 6 h (Abbildung 20D).

Die *Microarray*-Daten zeigten für die Expressionsrate von *CYP81F4* in der Wurzel nahezu keine Veränderung über 24 h unter NaCl-Einwirkung (Abbildung 20E). Wie in der RT-PCR war jedoch auch hier der Trend zu einer reprimierten Expressionsrate nach 6 h zu erkennen. Für *CYP86A1* zeigten die *Microarray*-Daten eine Induktion der Expressionsrate in der Wurzel zwischen 0,5 h und 3 h NaCl-Behandlung, nach 6 h ging die Expressionsrate dann deutlich unter den Kontrollwert zurück (Abbildung 20F). Nach 12 h bis 24 h NaCl-Einwirkung war *CYP86A1* in der Wurzel wieder stärker exprimiert als in der Kontrolle. Die Expressionsrate von *CYP705A1* in der Wurzel war nach 1 h NaCl-Einwirkung deutlich induziert, fiel dann aber sukzessive bis nach 24 h NaCl-Einwirkung unter den Kontrollwert ab (Abbildung 20G). Bei *CYP705A13* fiel die Expressionsrate in der Wurzel zwischen 0,5 h und 3 h NaCl-Einfluss deutlich unter den Kontrollwert ab, stieg dann aber bis nach 24 h unter NaCl-Einfluss wieder an (Abbildung 20H).

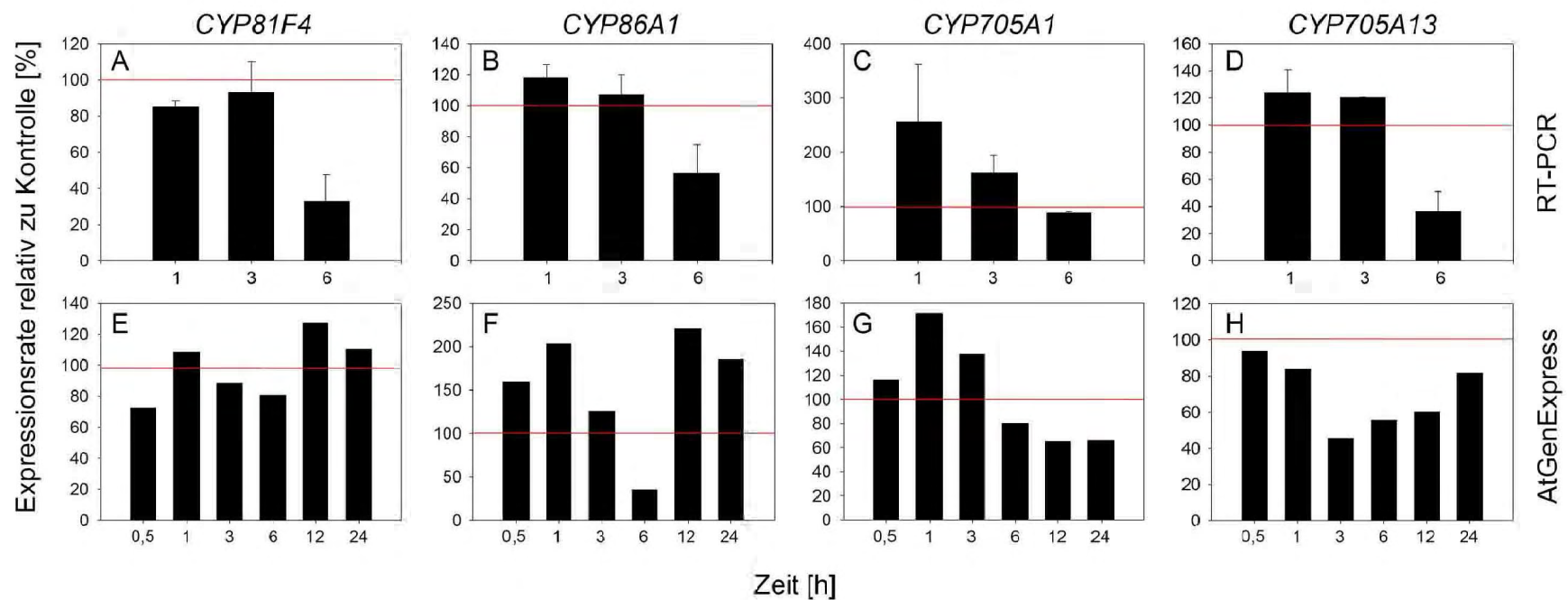


Abbildung 20: Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene bei NaCl-Behandlung.

(A-D) Ergebnisse der RT-PCR Analyse von mit 150 mM NaCl-behandelten ganzen Keimlingen. Gezeigt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrolle \pm Standardabweichung von drei RT-PCR's. (E-H) Ergebnisse der *Microarray*-Analyse von mit 150 mM NaCl-behandelten Wurzeln von Keimlingen (AtGenExpress). Gezeigt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrolle.

3.5.2. Mannitolbehandlung

Zusätzlich zu der NaCl-Behandlung, wurden 10 d alte *Arabidopsis*-Keimlinge einem durch 500 mM Mannitol ausgelösten, osmotischen Stress ausgesetzt (2.2.5). Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine semiquantitative RT-PCR auf die Kandidatengene durchgeführt. Die Ergebnisse wurden wiederum mit *Microarray*-Daten des AtGenExpress-Projektes verglichen.

Bei der RT-PCR zeigte sich für *CYP81F4* ein leichter Rückgang der Expressionsrate durch die Mannitolbehandlung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21A). Für *CYP86A1* und *CYP705A13* konnten keine signifikanten Änderungen der Expressionsrate durch Mannitoleinfluss beobachtet werden (Abbildung 21B, D). Die Expressionsrate von *CYP705A1* ging nach einer leichten Induktion nach 1 h Mannitoleinwirkung, nach 3 h leicht unter den Kontrollwert zurück, und nach 6 h wieder auf den Ausgangswert hoch (Abbildung 21C).

Die *Microarray*-Daten zeigten bezogen auf die Kontrolle nach einer leichten Reduktion der Expressionsrate von *CYP81F4* in der Wurzel zwischen 0,5 h und 1 h, eine sukzessive Induktion zwischen 3 h und 24 h Mannitolbehandlung (Abbildung 21E). Für *CYP86A1* zeigten die *Microarray*-Daten der Wurzel einen allmählichen Anstieg der Transkripthäufigkeit bis zu 12 h Mannitoleinwirkung, danach fiel sie wieder ab (Abbildung 21F). Bei *CYP705A1* reduzierte die Mannitolbehandlung nach 3 h die Expression in der Wurzel. Zwischen 3 h und 24 h stieg die Expressionsrate in der Wurzel kontinuierlich an, und lag nach 24 h leicht über dem Ausgangswert (Abbildung 21G). Die Expressionsrate von *CYP705A13* scheint durch die Mannitolbehandlung reprimiert zu werden (Abbildung 21H).

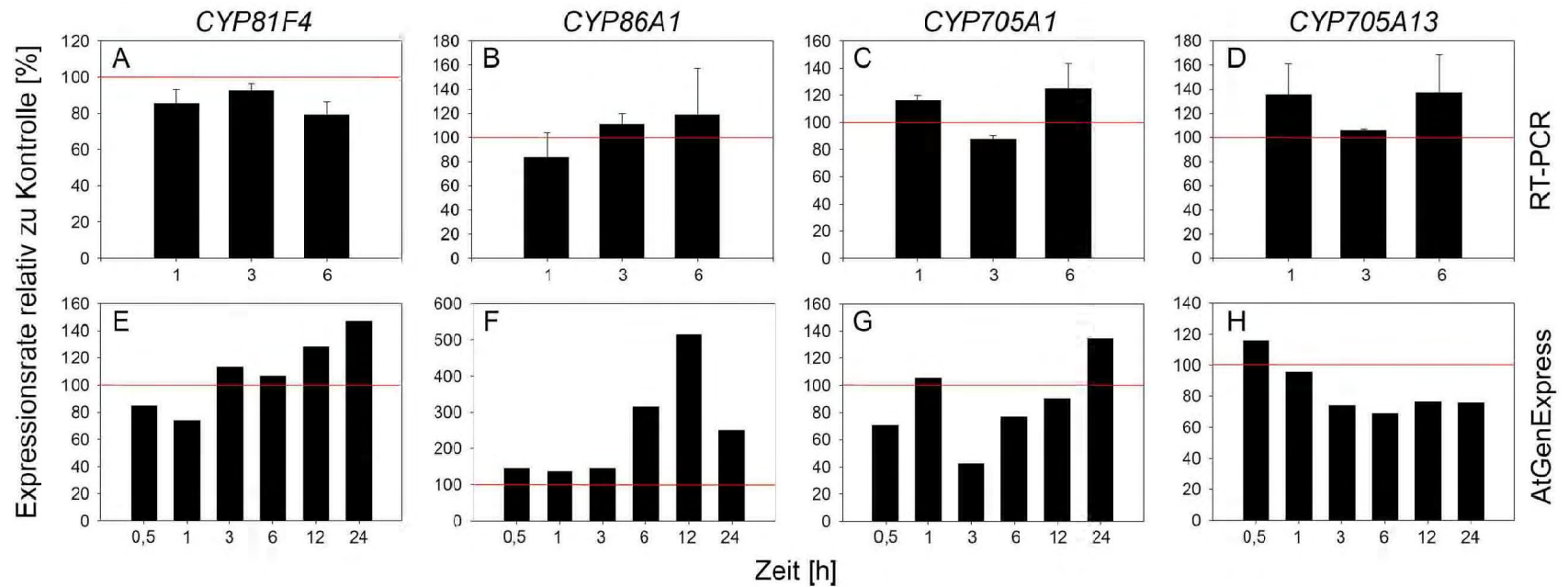


Abbildung 21: Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene bei Mannitolbehandlung.

(A-D) Ergebnisse der RT-PCR Analyse von mit 500 mM Mannitol behandelten ganzen Keimlingen. Gezeigt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrolle \pm Standardabweichung von drei RT-PCR's. (E-H) Ergebnisse der *Microarray*-Analyse von mit 300 mM Mannitol behandelten Wurzeln von Keimlingen (AtGenExpress). Gezeigt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrolle.

3.6. Bestätigung des transkriptionellen Knockout von T-DNA Insertionsmutanten der Kandidatengene

Um eine eventuelle Beteiligung der Kandidatengene an der Suberinbiosynthese zu untersuchen, wurden *Arabidopsis*-Samen mit T-DNA Insertionen in den Kandidatengenen vom NASC bezogen (Tabelle 7). Die T-DNA Insertion in den Kandidatengenen kann einen transkriptionellen Knockout der entsprechenden Gene bewirken. Durch eine Analyse des Wurzelsuberins der Knockout-Mutanten und eventuelle Veränderungen der Suberinzusammensetzung kann dann auf die Funktion des ausgeschalteten Gens rückgeschlossen werden. Um homozygote Insertionsmutantenlinien aus der vom NASC erhaltenen Samenmischung zu isolieren, wurden mindestens 10 Pflanzen angezogen, und eine kompetitive PCR (2.4) auf die isolierte, genomische DNA (2.3.3) der Pflanzen durchgeführt. Für *CYP86A1* wurden zwei Insertionsmutanten vom NASC bezogen, bei denen die T-DNA Insertion im ersten- beziehungsweise zweiten Exon liegt. Für die anderen Kandidatengene wurde jeweils eine Pflanzenlinie mit einer T-DNA Insertion im entsprechenden Gen vom NASC bezogen. Die T-DNA Insertion liegt bei *CYP81F4* im Intron, bei *CYP705A1* im zweiten Exon und bei *CYP705A13* am Ende der 3' *untranslated-region*. Der genomische Aufbau der Kandidatengene und die Position der T-DNA Insertionen ist in Abbildung 22 schematisch dargestellt.

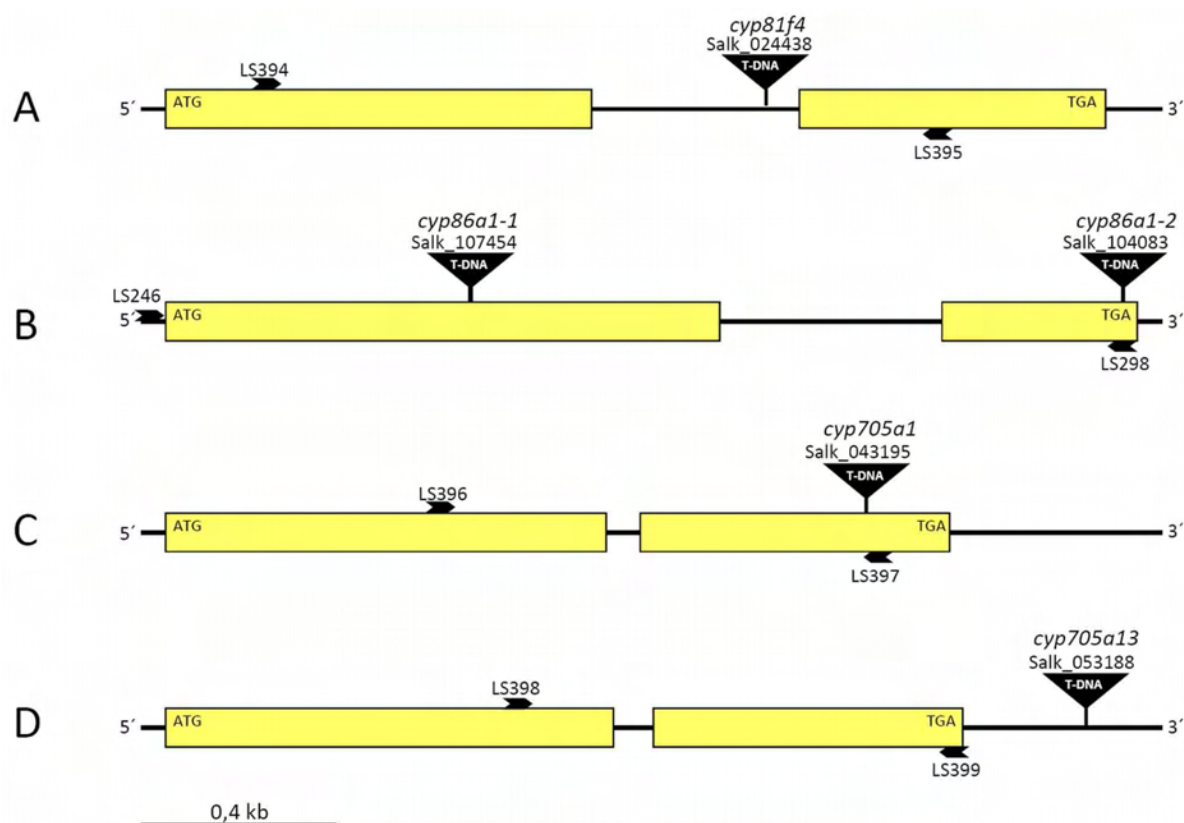


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Genloki der Kandidatengene mit Position der T-DNA Insertion und der Primer die zur Bestätigung des transkriptionellen Knockout verwendet wurden.

Schematischer Genlokus von (A) *CYP81F4*, (B) *CYP86A1*, (C) *CYP705A1* und (D) *CYP705A13*. Es wird Größe und Position der Exons (gelb) der Kandidatengene gezeigt (nach Swarbreck *et al.*, 2008). Die wahrscheinliche Lage der T-DNA Insertionen (Dreiecke) in den SALK-Linien ist angegeben (nach <http://signal.salk.edu>) und die Position der Primer die zur Bestätigung des transkriptionellen Knockout verwendet wurden (Pfeile).

Die isolierten, homozygoten Linien wurden zusammen mit dem Wildtyp steril angezogen und die Gesamt-RNA von 10 d alten Keimlingen isoliert. Mittels RT-PCR sollte der transkriptionelle Knockout der Kandidatengenen durch die T-DNA Insertion bestätigt werden. Bei den T-DNA Insertionsmutanten *cyp81f4*, *cyp86a1* und *cyp705a1* konnte im Gegensatz zum Wildtyp kein Transkript der entsprechenden Gene detektiert werden (Abbildung 23A, B, C). In der Mutanten *cyp705a13* konnte ein Transkript von *CYP705A13* detektiert, und somit kein transkriptioneller Knockout gezeigt werden (Abbildung 23D). Sie konnte somit für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet werden.

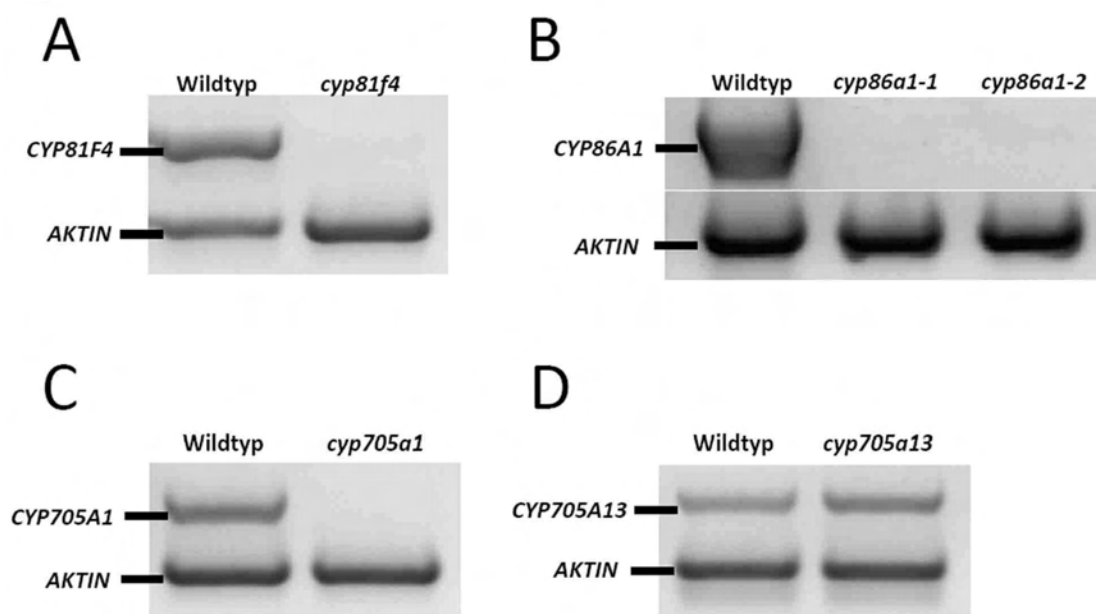


Abbildung 23: RT-PCR zur Bestätigung des transkriptionellen Knockout der Kandidatengene in den korrespondierenden T-DNA Insertionsmutanten.

Agarosegelelektrophorese der RT-PCR Produkte. Die Gesamt-RNA von 10 d alten *Arabidopsis*-Keimlingen wurde extrahiert und 100 ng in einer RT-PCR eingesetzt. Die Position der verwendeten Primer ist in Abbildung 22 dargestellt. Gezeigt ist jeweils die Expression von (A) *CYP81F4*, (B) *CYP86A1*, (C) *CYP705A1* und *CYP705A13* im Wildtyp und den korrespondierenden homozygoten T-DNA Insertionsmutanten. Zur Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte *Aktin*-Gen amplifiziert.

3.7. Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins in Knockout-Pflanzen der Kandidatengene

Zur Untersuchung der Auswirkung des transkriptionellen Knockout der Kandidatengene auf die Suberinbiosynthese, wurden Wurzeln von 35 d alten auf Erde angezogenen Insertionsmutanten und des korrespondierenden Wildtyp geerntet, und analytisch untersucht.

Beim Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin zwischen Wildtyp und *cyp81f4*, beziehungsweise Wildtyp und *cyp705a1* konnten bezogen auf das Trockengewicht der Wurzeln keine signifikanten Unterschiede in der Suberinzusammensetzung festgestellt werden (Abbildung 24, Abbildung 26). Beide *cyp86a1* Mutantenlinien zeigten im Vergleich zum Wildtyp bei allen Substanzklassen außer den Alkoholen eine signifikante Reduktion im Gehalt bestimmter aliphatischer Suberinmonomere (Abbildung 25). Die markanteste Reduktion wurde bei C₁₆ und C₁₈ ω-Hydroxysäuren und bei C₁₆ bis C₂₀ α,ω-Disäuren festgestellt. Außerdem zeigten die C₂₂ und C₂₄ Fettsäuren sowie C₂₀, C₂₂ und C₂₄(1) 2-Hydroxysäuren einen reduzierten Gehalt in der *cyp86a1* Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp. Die Gesamtmenge an ω-Hydroxysäuren und α,ω-Disäuren war in *cyp86a1-1* um 61 % beziehungsweise 78 % in *cyp86a1-2* um 62 % beziehungsweise 79 % reduziert. Im Vergleich zum Wildtyp war die aliphatische Wurzelsuberinmenge bei *cyp86a1-1* um 60 % und bei *cyp86a1-2* um 62 % reduziert (31,62 ± 4,63 µg/mgdw im Wildtyp; 12,69 ± 2,03 µg/mgdw in *cyp86a1-1*; 11,86 ± 3,28 µg/mgdw in *cyp86a1-2*).

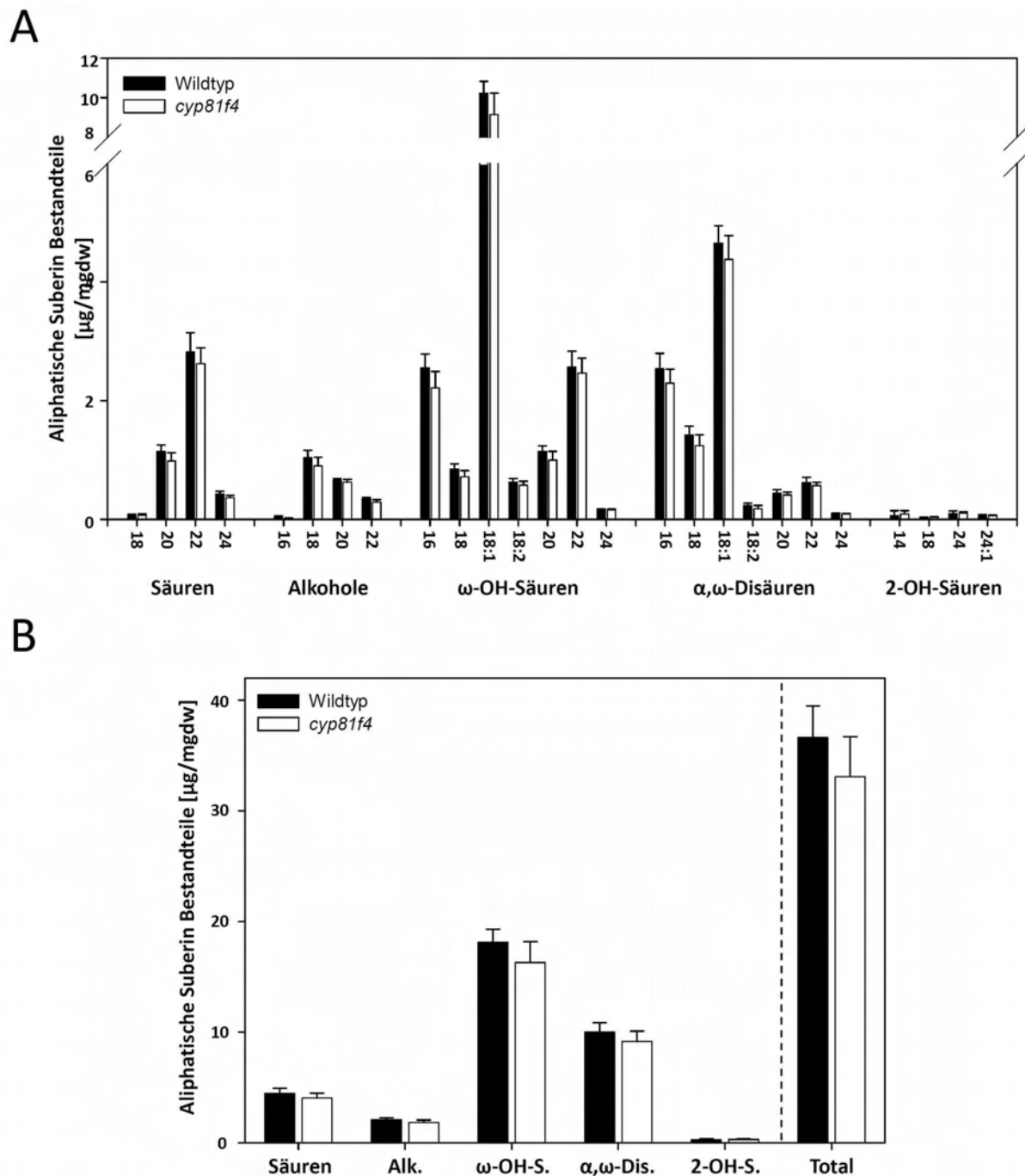


Abbildung 24: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp81f4* Mutante und des Wildtyp.

(A) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp81f4* und dem Wildtyp (B) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit Alk.= Alkohole; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren; α,ω -Dis.= α,ω -Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

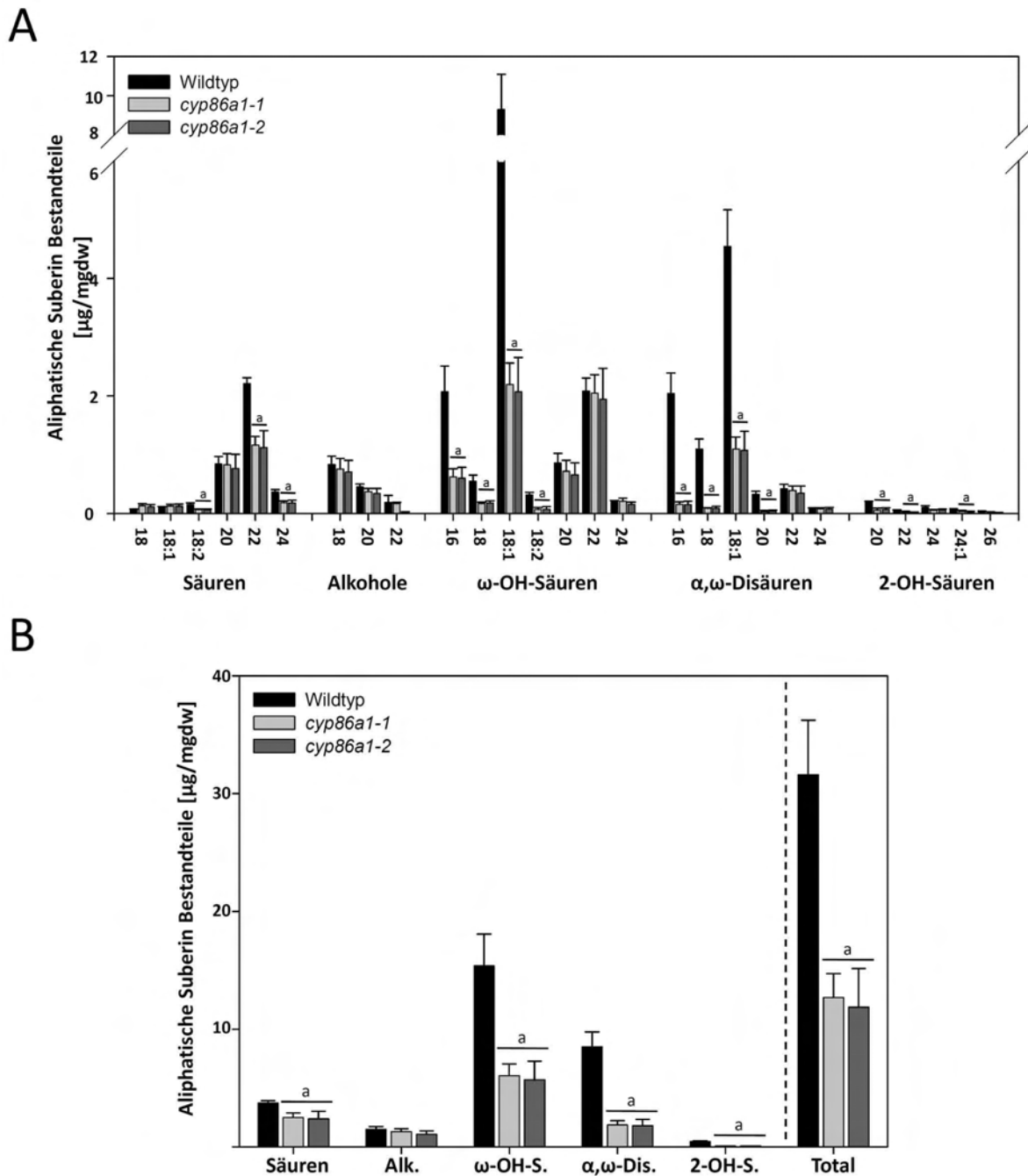


Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von *cyp86a1* Mutanten und des Wildtyp.

(A) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp86a1-1*, *cyp86a1-2* und dem Wildtyp
 (B) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. a= Unterschied zu über 99 % signifikant. Mit Alk.= Alkohole; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren; α,ω -Dis.= α,ω -Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

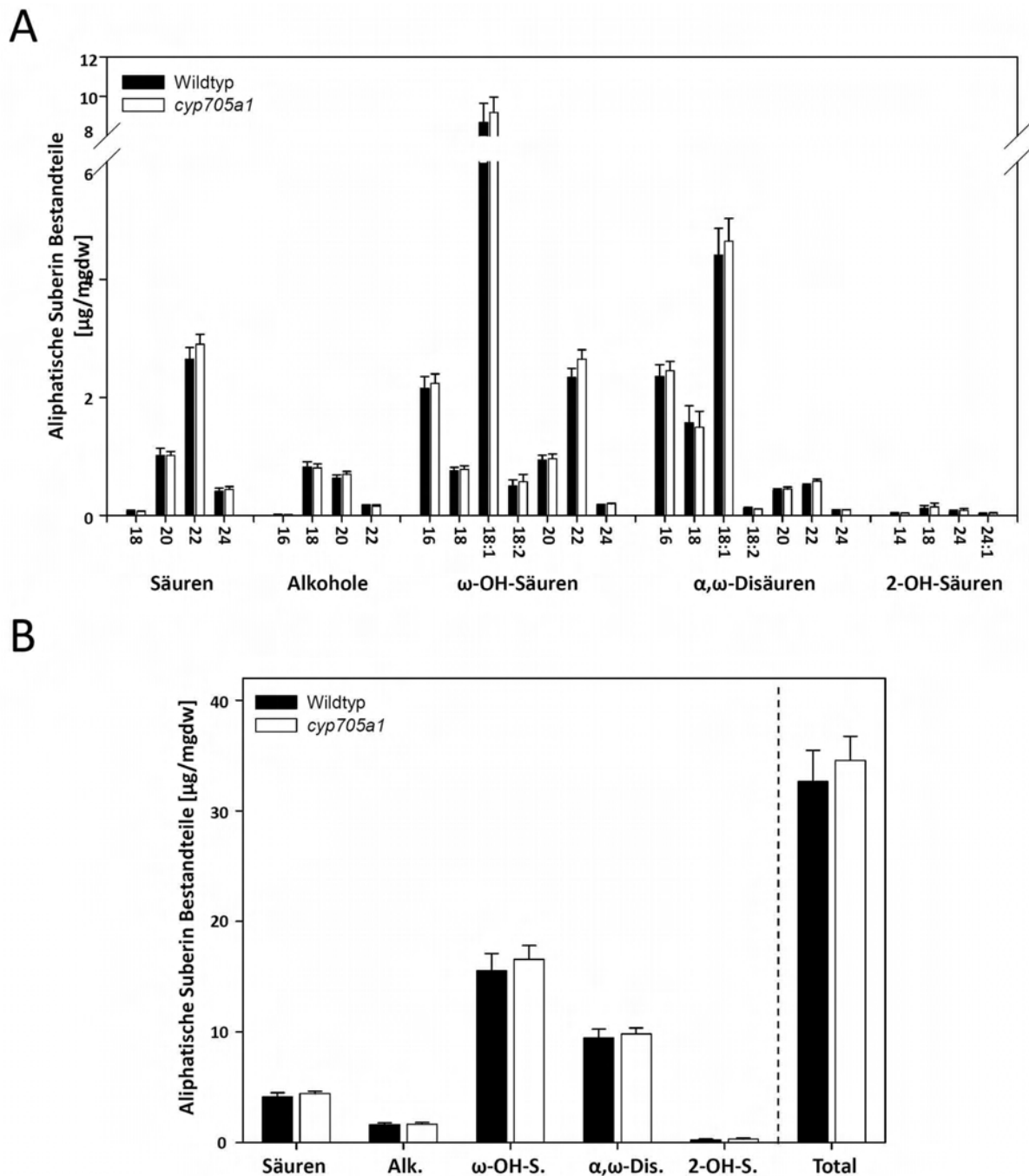


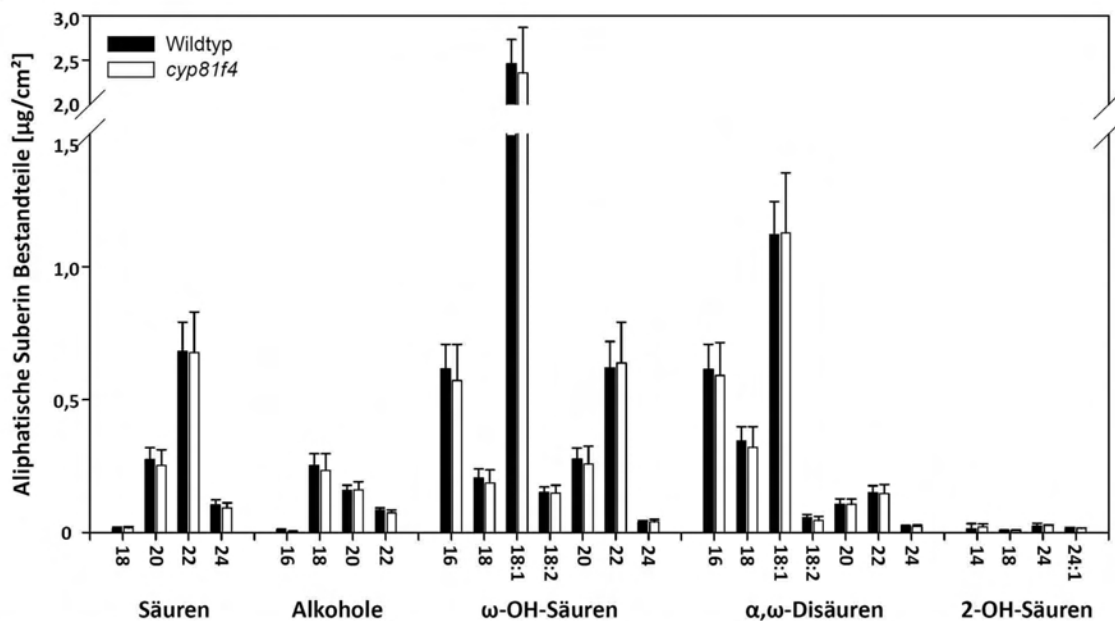
Abbildung 26: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp705a1* Mutante und des Wildtyp.

(A) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp705a1* und dem Wildtyp (B) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit Alk.= Alkohole; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren; α,ω -Dis.= α,ω -Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

Für *cyp81f4*, *cyp705a1* und den Wildtyp wurde zusätzlich zum Trockengewicht auch die Oberfläche der für die Analyse verwendeten Wurzeln als Bezugsgröße ermittelt. Beim Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins zwischen Wildtyp und *cyp81f4* Mutanten, konnte auch im Bezug auf die Wurzeloberfläche kein Unterschied

festgestellt werden (Abbildung 27). Die *cyp705a1* Mutanten zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine im Schnitt um 13,5 % signifikant erhöhte Menge aller Suberinmonomere (Abbildung 28). Die Wurzeloberfläche der *cyp705a1* Mutanten war im Schnitt 14 % kleiner als die des Wildtyps, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 46).

A



B

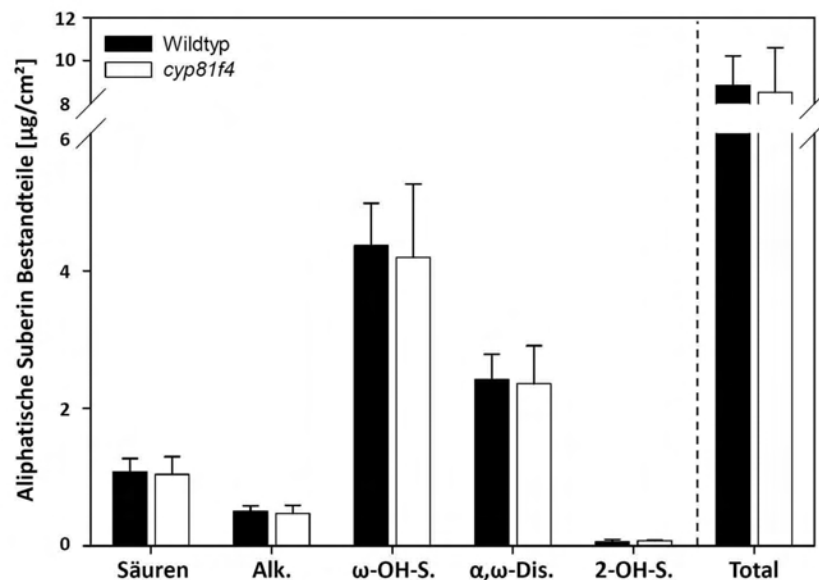


Abbildung 27: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp81f4* Mutante und des Wildtyp im Bezug auf die Wurzeloberfläche.

(A) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp81f4* und dem Wildtyp (B) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g}/\text{mg}^2$. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit Alk.= Alkohole; ω-OH-S.= ω-Hydroxysäuren; α,ω-Dis.= α,ω-Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

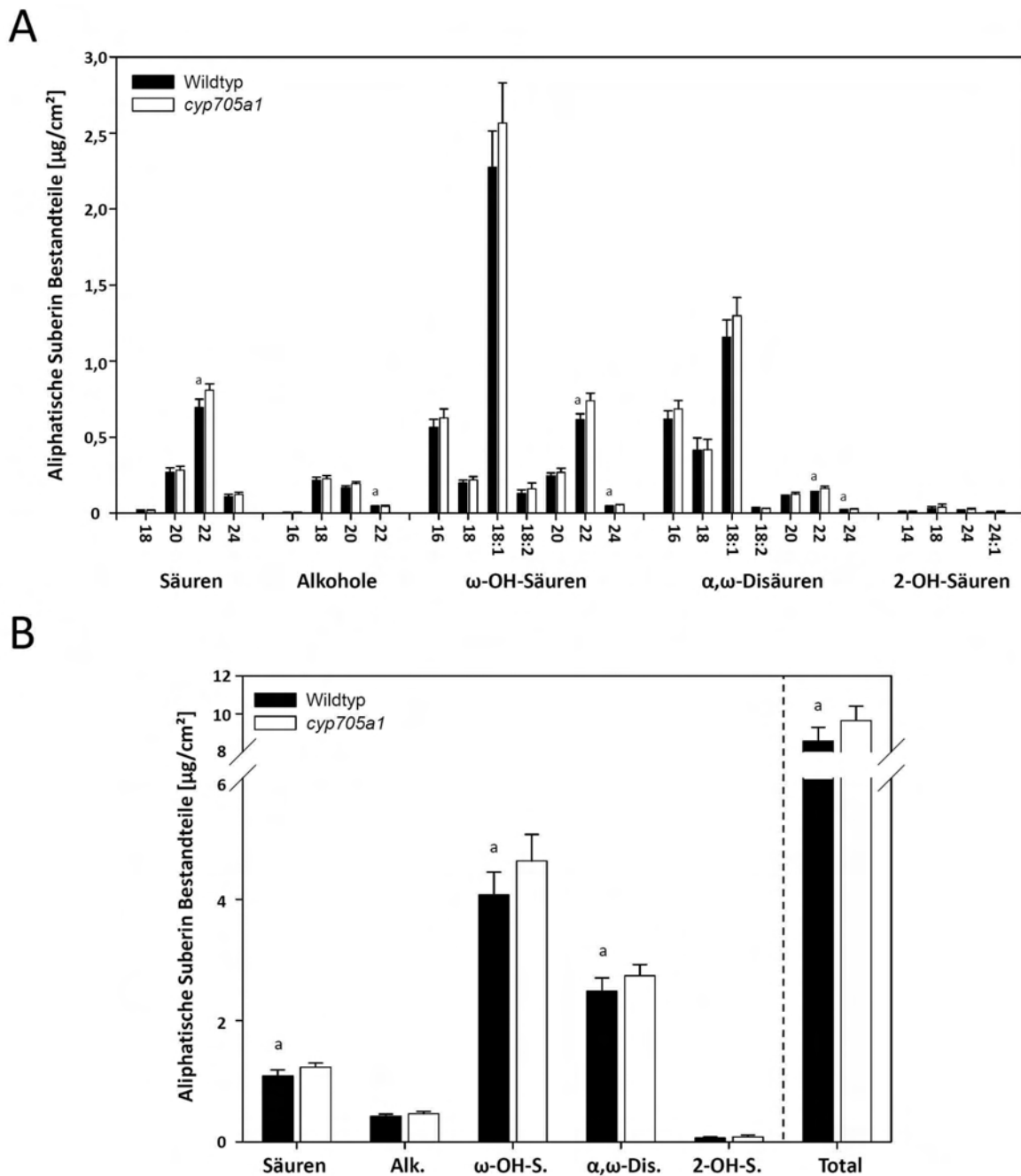


Abbildung 28: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp705a1* Mutante und des Wildtyp im Bezug auf die Wurzeloberfläche.

(A) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp705a1* und dem Wildtyp (B) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g}/\text{mg}^2$. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit Alk.= Alkohole; ω-OH-S.= ω-Hydroxysäuren; α,ω-Dis.= α,ω-Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

3.8. Weiterführende Untersuchungen zu CYP86A1

3.8.1. Komplementation der Knockout Mutanten *cyp86a1-1*

Um sicherzustellen, dass der Knockout von CYP86A1 für den Suberinphänotyp in den Insertionsmutanten verantwortlich ist, wurde ein DNA-Fragment aus der genomischen DNA des Wildtyps, welches die 1,4 Kb 5' Region vor dem prognostizierten *CYP86A1* Startcodon und die genomische Sequenz von *CYP86A1* enthielt, wieder in die *cyp86a1-1* Mutante eingebracht (2.6). Aus 10 d alten Keimlingen von erfolgreich Transformierten *cyp86a1-1* Mutanten (*cyp86a1-1-CYP86A1*), den *cyp86a1-1* Mutanten und dem Wildtyp, wurde die Gesamt-RNA extrahiert, und mit einer RT-PCR auf das Vorhandensein eines *CYP86A1* Transkriptes untersucht. Bei der Agarosegelelektrophorese der RT-PCR konnte für *cyp86a1-1-CYP86A1* und den Wildtyp ein *CYP86A1* Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 29A). Die Analyse des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp86a1-1-CYP86A1* Linie, zeigte eine dem Wildtyp quantitativ und qualitativ identische Suberinzusammensetzung (Abbildung 29B, C).

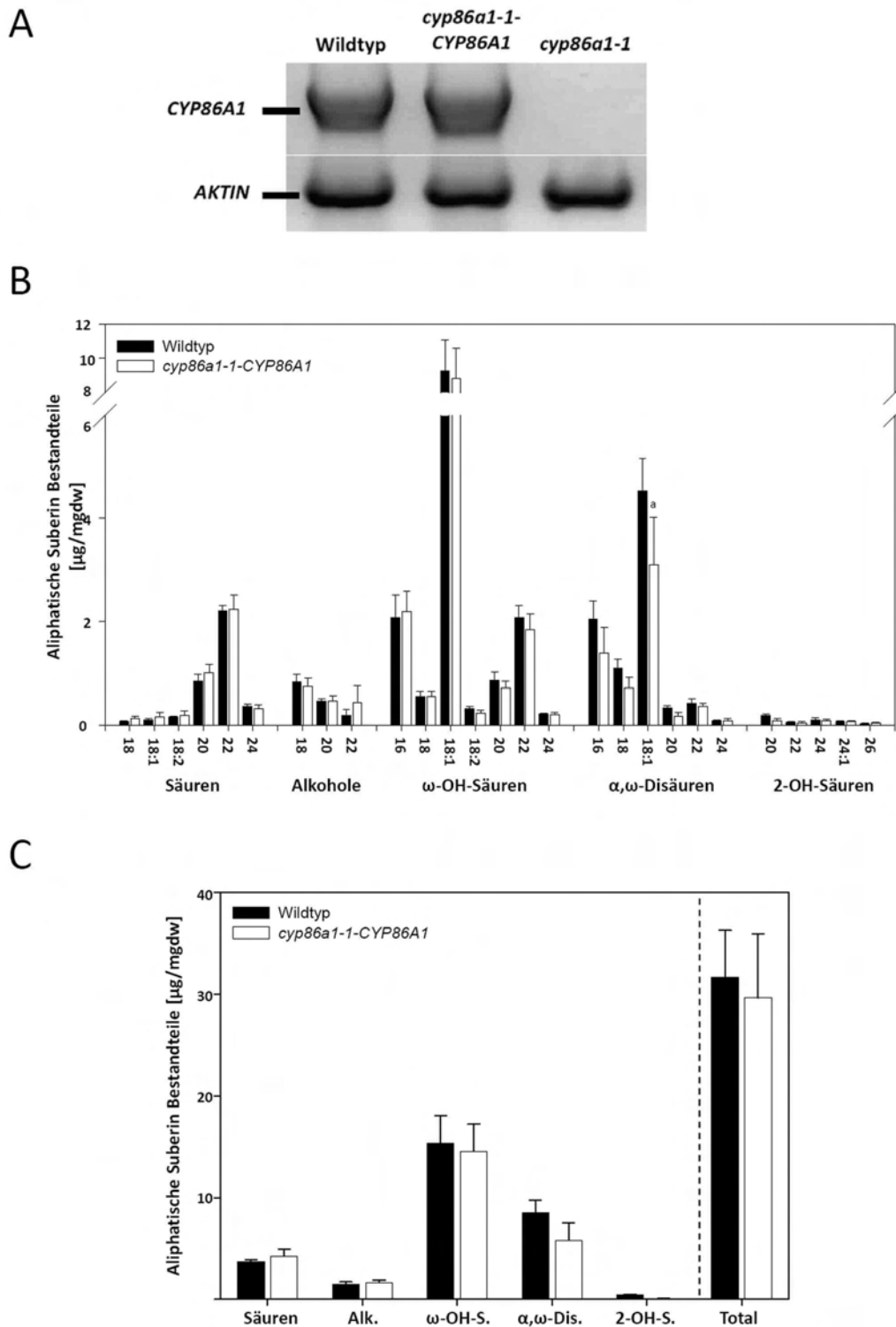


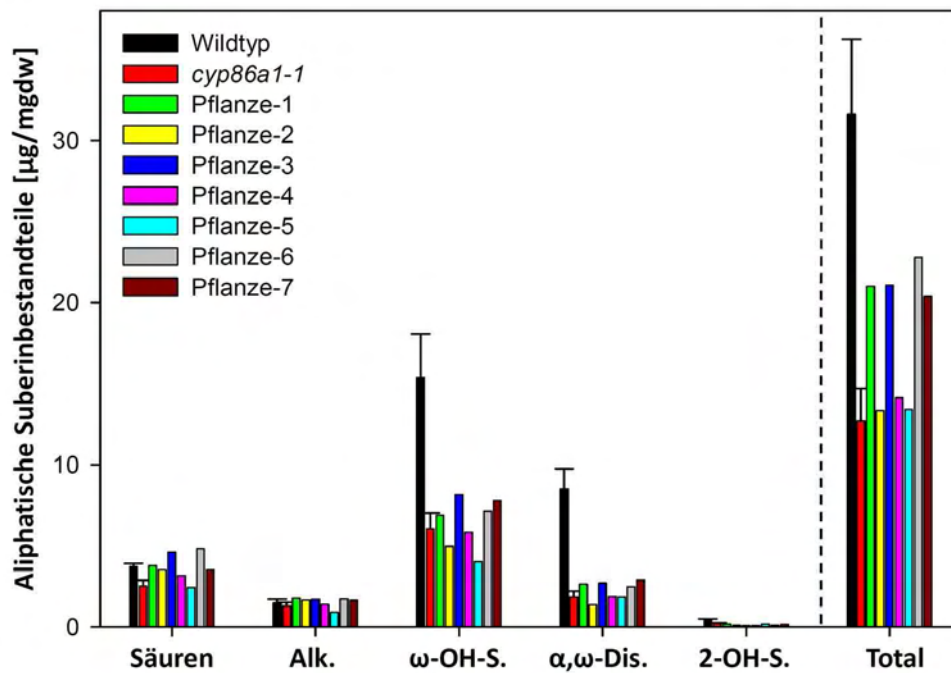
Abbildung 29: Expressionsanalyse von *CYP86A1* und Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins in der komplementierten *cyp86a1-1* Mutanten und dem Wildtyp.

(A) Agarosegelelektrophorese der RT-PCR zur Bestätigung der Transkription von *CYP86A1* in *cyp86a1-1-CYP86A1*. Die Gesamt-RNA von 10 d alten *Arabidopsis*-Keimlingen wurde extrahiert und 100 ng in einer RT-PCR eingesetzt. (B) Monomere Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *cyp86a1-1-CYP86A1* und dem Wildtyp (C) Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt mindestens 3 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände von 2-3 Wurzeln von 35 d alten, auf Erde angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen. a= Unterschied zu über 99 % signifikant. Mit Alk.= Alkohole; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren; α,ω -Dis.= α,ω -Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

3.8.2. Überexpression von *CYP86A1* in Wildtyp und Mutante

Ergänzend zu den vorangegangenen Untersuchungen, wurde die CDS von *CYP86A1* unter der Kontrolle von zwei hintereinander geschalteten 35S-Promotoren (2X35S:CYP86A1) in den Wildtyp und *cyp86a1-1* eingebracht. Der 35S-Promotor stammt aus dem Blumenkohlmosaikvirus und ist ein starker konstitutiver Promotor. Ähnlich der Komplementation, sollte mit dem Einbringen des 2X35S:CYP86A1 Konstrukts in die *cyp86a1-1* Mutante, wieder eine dem Wildtyp vergleichbare Suberinzusammensetzung erreicht werden. Durch die Transformation des Wildtyps mit dem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt, sollte eine Überexpression von *CYP86A1*, und ein erhöhter Gehalt der in den *cyp86a1* Mutanten reduzierten Stoffe erreicht werden. Samen der T1-Generation der transformierten Linien, wurden auf Hygromycin enthaltendem MS-Agar selektioniert, und hygromycinresistente Keimlinge im Alter von 10 d auf Erde transferiert. Die erfolgreiche Überexpression von *CYP86A1* wurde in Schwesterpflanzen der untersuchten Linien bestätigt (8.5.4). Die Analyse des aliphatischen Wurzelsuberin von 35 d alten Pflanzen, zeigte bei den sieben untersuchten, mit dem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt transformierten *cyp86a1-1* Mutanten, nur leichte Veränderungen der Suberinzusammensetzung im Vergleich zur *cyp86a1-1* Mutante (Abbildung 30A). In keinem Fall konnte eine dem Wildtyp vergleichbare Zusammensetzung und Gesamtmenge des aliphatischen Wurzelsuberins nachgewiesen werden. Die Transformation des Wildtyp mit dem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt, führte bei einigen der fünf untersuchten Pflanzen, zu einer Reduktion der Suberinzusammensetzung und -menge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 30B). Bei keiner Pflanze konnte ein erhöhter Anteil an ω -Hydroxysäuren oder α,ω -Disäuren im Suberin oder eine höhere Gesamtsuberinmenge festgestellt werden.

A



B

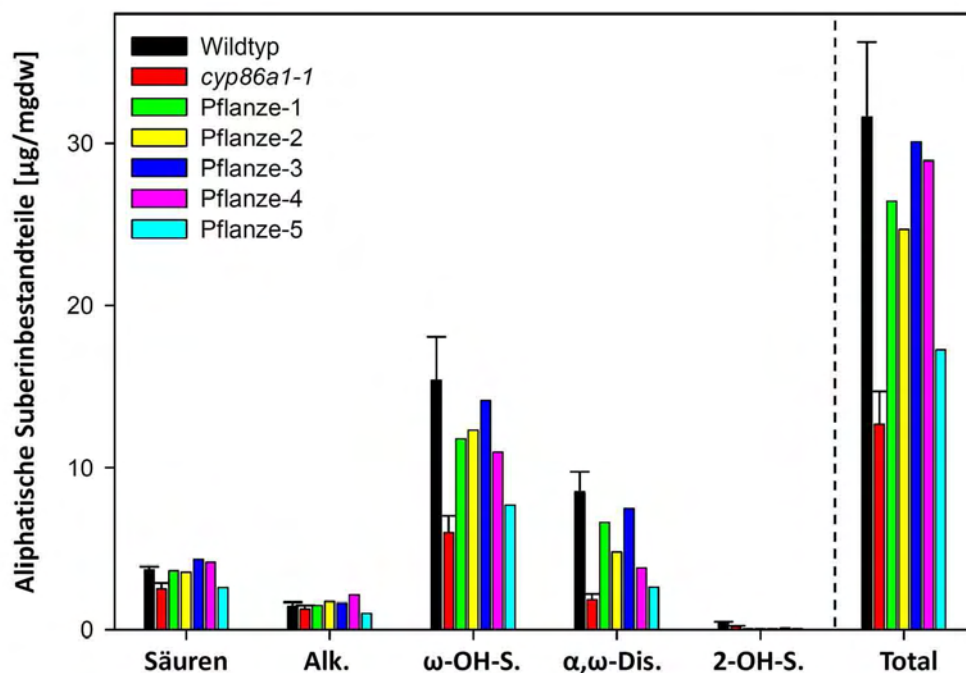


Abbildung 30: Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von mit 2X35S:CYP86A1 transformierten *cyp86a1-1* und Wildtyp-Pflanzen.

Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge von (A) 2X35S:CY86A1:*cyp86a1-1* Pflanzen und (B) 2X35S:CYP86A1:Wildtyp Pflanzen. Bei den zum Vergleich gezeigten *cyp86a1-1* und dem Wildtyp ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf parallelen Analysen \pm Standardabweichung gezeigt. Die Analysen der 2X35S:CY86A1:*cyp86a1-1* und 2X35S:CYP86A1:Wildtyp Pflanzen stehen jeweils für Einzelwurzeln. Alle Analysen wurden mit isolierten, suberinisierten Wurzelzellwänden von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt und sind in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht dargestellt. Mit Alk.= Alkohole; ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren; α,ω -Dis.= α,ω -Disäuren; 2-OH-S.= 2-Hydroxysäuren.

3.8.3. Zusammensetzung anderer Biopolyester und des Wachses von *cyp86a1* und dem Wildtyp

In den *CYP86A1* Insertionsmutanten sind ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren des aliphatischen Wurzelsuberins reduziert. Da diese Stoffe auch im Biopolyester der Blätter und der Samen zu finden sind, wurde das Kutin und die Samenschale der *cyp86a1-1* Mutante und des Wildtyp mittels GC-FID und GC-MS auf Unterschiede in ihrer Zusammensetzung untersucht.

Bei der Analyse von totalextrahierten Blättern (2.9.1.4) von 35 d alten *cyp86a1* Mutanten und Wildtypen konnten dieselben Kutinmonomere identifiziert werden. Es konnten Fettsäuren (C_{16} - C_{24}), Alkohole (C_{16} - C_{18}), ω -Hydroxysäuren (C_{16} - C_{18}), α,ω -Disäuren (C_{16} - C_{18}) und 2-Hydroxysäuren (C_{16} - C_{28}) nachgewiesen werden (Abbildung 49). Beim Vergleich der Kutinanalyse von Wildtyp und Mutante konnten weder in der monomeren Zusammensetzung, noch bei der Substanzklassenverteilung signifikante Veränderungen festgestellt werden (Abbildung 31A).

Auch bei der Analyse von totalextrahierten Samenschalen (2.9.1.5) konnten bei Samen der *cyp86a1-1* Mutante und dem Wildtyp die gleichen Monomere identifiziert werden. Die Analyse der Samenschalen ergab eine Zusammensetzung aus Fettsäuren (C_{16} - C_{24}), Alkoholen (C_{16} - C_{22}), ω -Hydroxysäuren (C_{16} - C_{24}), α,ω -Disäuren (C_{16} - C_{24}) und 2-Hydroxysäuren (C_{16} - C_{26}) (Abbildung 50). Beim Vergleich der Analyse der Samenschalen von Wildtyp und Mutante konnte bei der Substanzklassenverteilung und der Gesamtmenge kein Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 31B). In der monomeren Zusammensetzung des Polyesters der Samenschale wurde bei der Mutanten ein reduzierter Gehalt der in geringen Mengen vorkommenden C_{16} ω -Hydroxysäure und C_{16} α,ω -Disäure festgestellt (Abbildung 50).

Ein weiterer reduzierter Bestandteil im aliphatischen Wurzelsuberin von *cyp86a1* war die Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C_{24} , welche auch im Blattwachs von *Arabidopsis* vorkommen. Bei der Analyse der von 35 d alten Blättern extrahierten Blattwachse (2.9.1.1), konnten im Wildtyp und in der *cyp86a1-1* Mutante Fettsäuren (C_{24} - C_{34}), Alkohole (C_{26} - C_{34}), Alkane (C_{29} - C_{33}) und Aldehyde (C_{28} - C_{34}) identifiziert werden (Abbildung 51). Im Gehalt der C_{24} Fettsäure und bei der Substanzklassenverteilung konnten zwischen Wildtyp und Mutante keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Abbildung 31C).

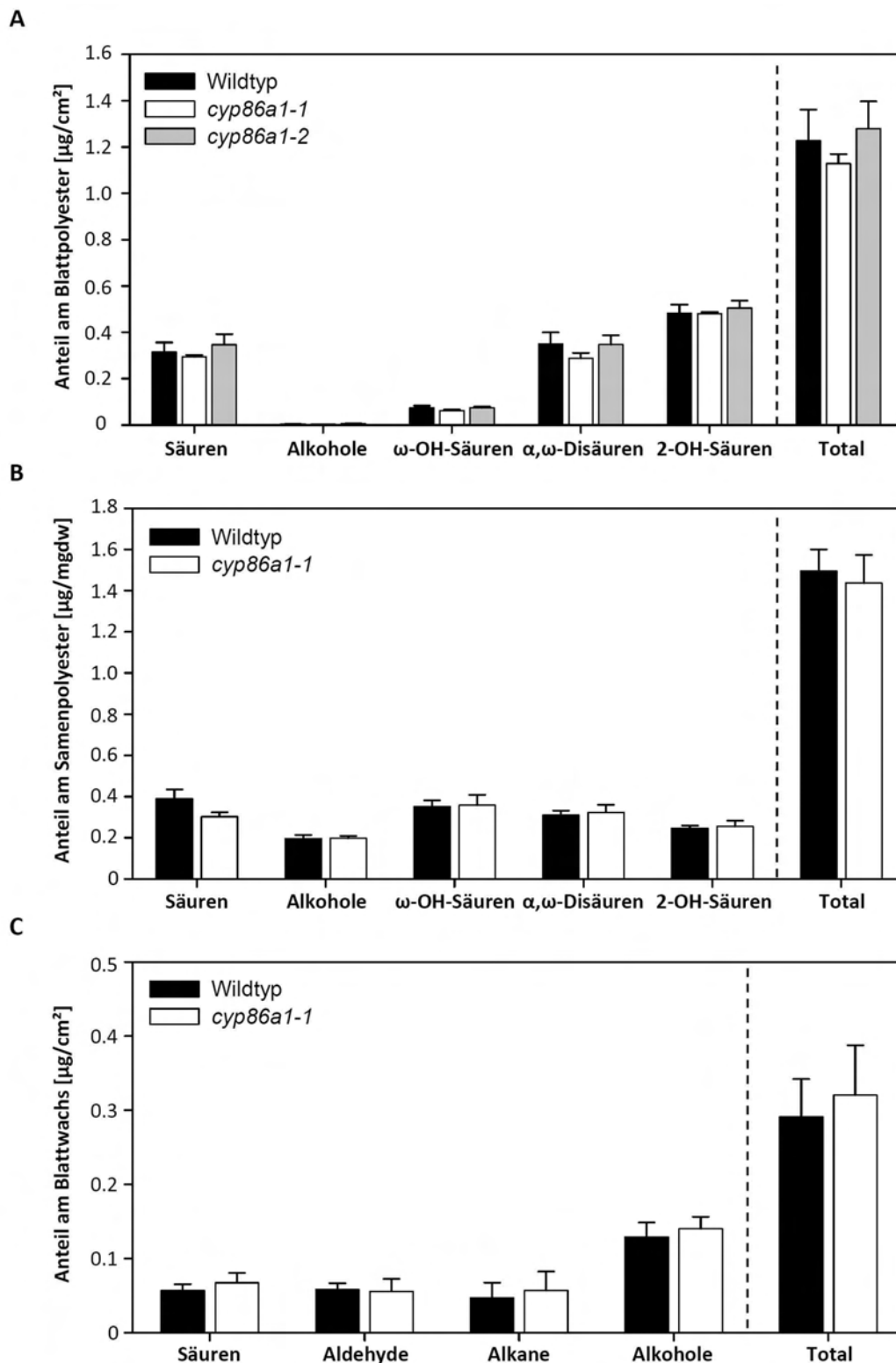


Abbildung 31: Kutin-, Samenschalen- und Wachsanalyse vom *Arabidopsis*-Wildtyp und *cyp86a1* Mutanten.

(A) Stoffklassenverteilung und Gesamtmenge des Blattkutin der *cyp86a1* Mutanten und des Wildtyp in $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit je 15-20 Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen. (B) Stoffklassenverteilung und Gesamtmenge des Polyesters der Samenschale von *cyp86a1-1* und Wildtyp Samen in $\mu\text{g mg}^{-1} \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit mindestens 16 mg Samen. (C) Stoffklassenverteilung und Gesamtmenge der extrahierten Blattwache von *cyp86a1-1* und dem Wildtyp in $\mu\text{g cm}^{-2} \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit je 7 Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit ω -OH-Säuren= ω -Hydroxysäuren; 2-OH-Säuren= 2-Hydroxysäuren.

3.8.4. Untersuchung des Wurzelwachstums von *cyp86a1*

Im Vergleich zum Wildtyp ist das Wurzeluberins der *cyp86a1* Mutanten drastisch reduziert und verändert. Bei Anzucht auf Erde zeigten die Mutanten jedoch im Vergleich zum Wildtyp keinen veränderten Phänotyp der oberirdischen Pflanzenorgane. Um eventuelle Unterschiede im Wurzelwachstum zu untersuchen, wurden Keimlinge der *cyp86a1* Mutanten und des Wildtyp auf vertikal orientierten MS-Agarplatten angezogen und das Wurzelwachstum verfolgt (2.2.4). Bei vorangegangenen Versuchen konnte durch NaCl ein Unterschied im Wachstum des Wildtyp und einer Mutanten induziert werden (Höfer, 2005). Daher wurde das Wurzelwachstum des Wildtyp und der *cyp86a1* Mutanten auch auf MS-Agarplatten untersucht, die mit 50 mM NaCl, beziehungsweise 100 mM NaCl versehen waren. Es zeigten sich jedoch unter keinen Anzuchtsbedingungen signifikante Unterschiede im Wurzelwachstum zwischen dem Wildtyp und den *cyp86a1* Mutanten (Abbildung 32).

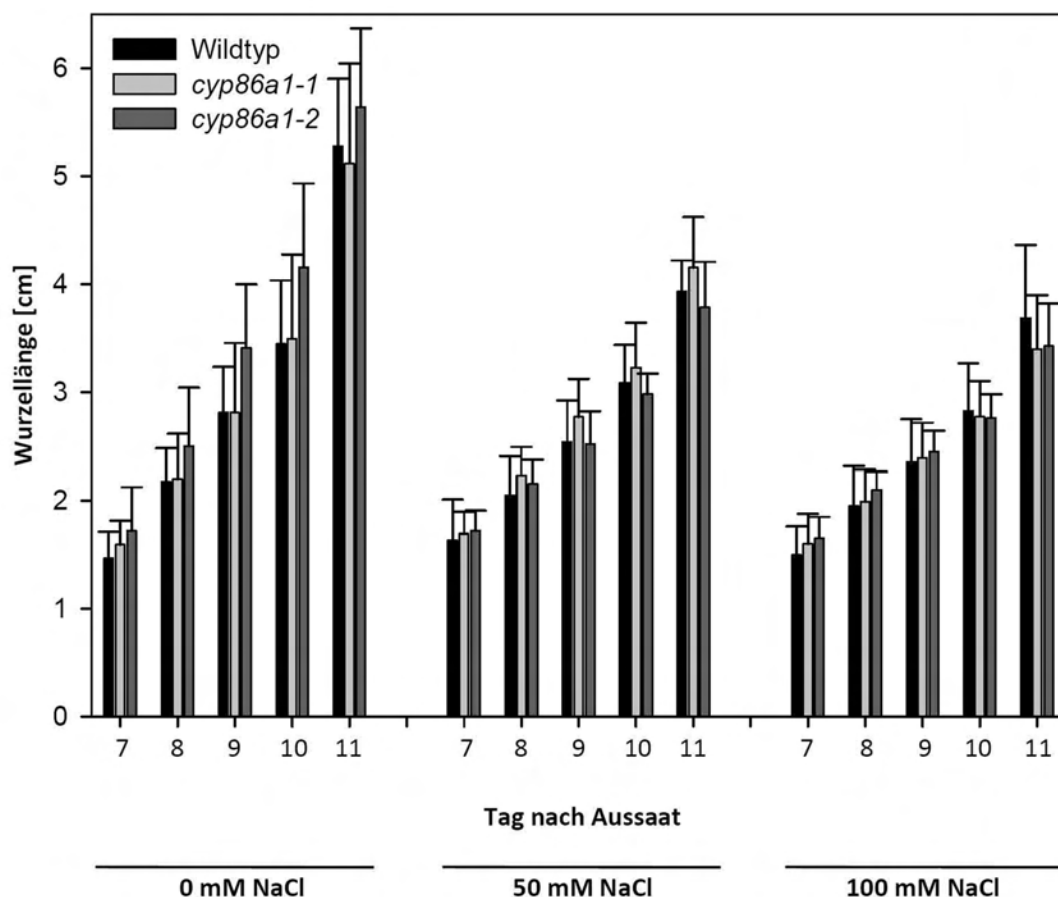


Abbildung 32: Wurzelwachstum von *Arabidopsis*-Wildtyp und *cyp86a1* Mutanten auf MS-Agarplatten unter normalen Bedingungen und bei NaCl-Behandlung.

Zur Messung des Wurzelwachstums, wurden Keimlinge der *cyp86a1* Mutanten und des Wildtyp auf vertikal orientierten MS-Agarplatten angezogen. Die Anzucht erfolgte auf normalen MS-Agarplatten und auf MS-Agarplatten die mit 50 mM NaCl, beziehungsweise 100 mM NaCl versehen waren. Gezeigt ist die Gesamtlänge der Wurzeln vom 7 d bis 11 d in cm \pm Standardabweichung von 6-15 Keimlingen.

3.8.5. Gewebespezifische Expressionsanalyse von *CYP86A1* anhand der Promotor_{*CYP86A1*}:GUS Aktivität

Um Informationen über die gewebespezifische Expression von *CYP86A1* zu erhalten, wurde die 1,4 Kb lange 5' Region vor dem prognostizierten *CYP86A1* Startcodon vor das *GUS*-Reporter gen geklont (Promotor_{*CYP86A1*}:*GUS*) und in den *Arabidopsis*-Wildtyp eingebracht. Samen der T1- und T2-Generation wurden auf Hygromycin enthaltendem MS-Agar selektioniert und hygromycinresistente Keimlinge entweder direkt untersucht, oder im Alter von 10 d auf Erde transferiert und weiter angezogen. Alle untersuchten 7 d alten Promotor_{*CYP86A1*}:*GUS* Keimlinge der T1- und T2-Generation zeigten eine *GUS* Aktivität ausschließlich in der Wurzel und nicht im Hypokotyl oder in den Kotyledonen (Abbildung 33A). Bei mikroskopischen Untersuchungen der 7 d alten Keimlinge, konnte eine *GUS* Aktivität nur in den inneren Geweben der Wurzel beobachtet werden (Abbildung 33B). In angefertigten Querschnitten der 7 d alten Wurzeln im primären Entwicklungszustand, zeigte sich eine auf die Endodermis beschränkte *GUS* Aktivität (Abbildung 33C). Bei Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand von 35 d alten, Promotor_{*CYP86A1*}:*GUS* Pflanzen der T1- und T2-Generation, konnte an der Oberfläche nur eine sporadische *GUS* Aktivität beobachtet werden (Abbildung 33D). In gefärbten Bereichen zeigten die Querschnitte der Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand teilweise eine durchgängige (Abbildung 33F), oder auf einen dünnen Bereich unterhalb des Periderms beschränkte, *GUS* Aktivität (Abbildung 33E). Außerdem zeigten die 35 d alten Promotor_{*CYP86A1*}:*GUS* Pflanzen der T1- und T2-Generation, auch eine *GUS* Aktivität in den Petalen, in der Basis der Schoten im Übergang zum Stängel und in der Chalaza/Mikropyl-Region des Samens (Abbildung 33G-I).

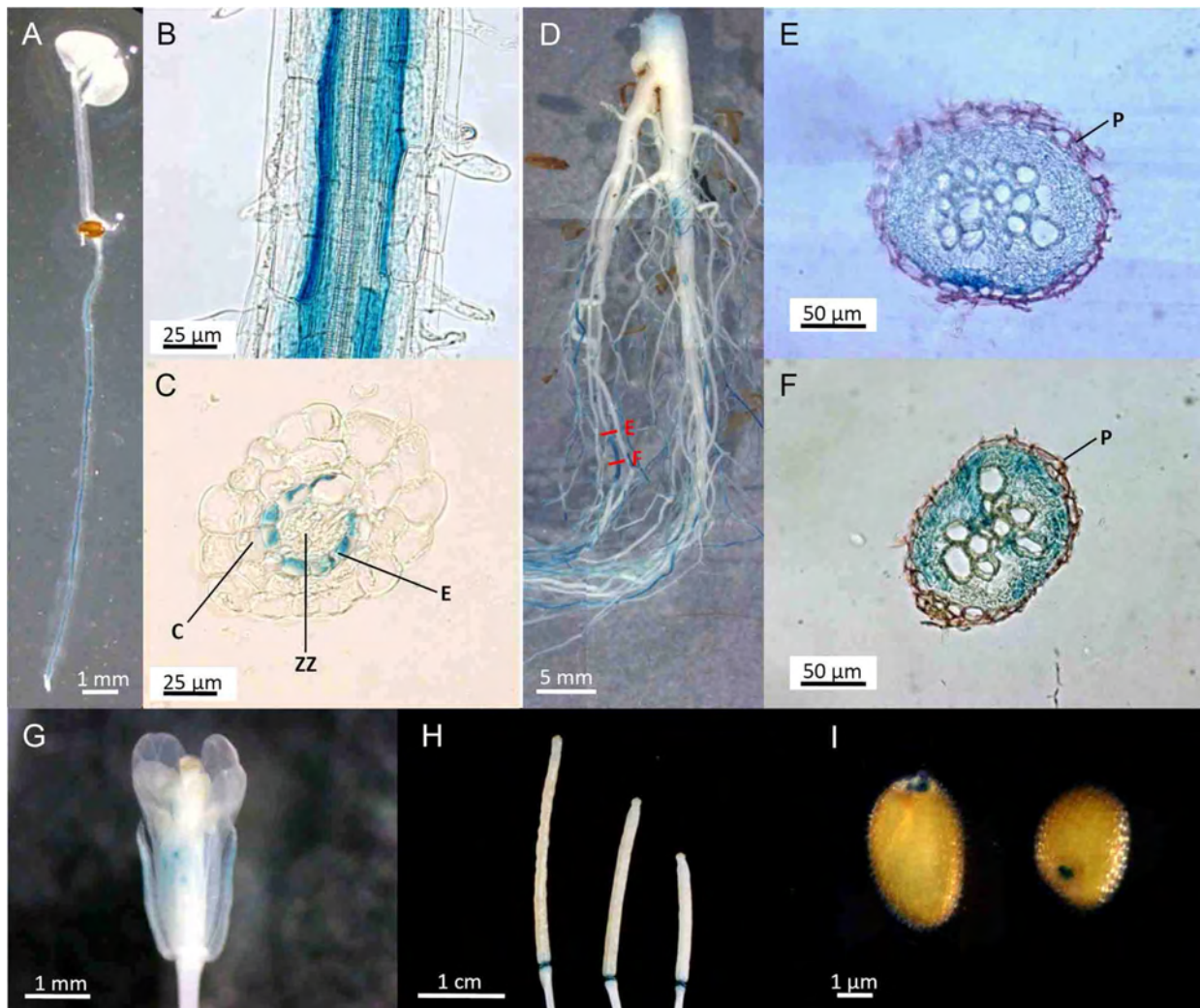


Abbildung 33: GUS Aktivität in Promotor_{CYP86A1}:GUS Konstrukt transformierten Arabidopsis-Pflanzen

(A) 7 d alter Promotor_{CYP86A1}:GUS Keimling; (B) Detailansicht der Wurzel eines Keimlings; (C) Querschnitt einer 7 d alten Wurzel im Hellfeld; (D) Ganze Wurzel einer 35 d alten Promotor_{CYP86A1}:GUS Pflanze, rote Linien markieren die Position der Querschnitte (E, F) im Hellfeld mit Sudan Rot 7B angefärbt; (G) Blüte einer 35 d alten Promotor_{CYP86A1}:GUS Pflanze; (H) Schoten in verschiedenen Entwicklungsstadien von 35 d alten Promotor_{CYP86A1}:GUS Pflanzen; (I) Samen aus Schoten von 35 d alten Promotor_{CYP86A1}:GUS Pflanzen. Mit C= Kortex; E= Endodermis; P= Periderm; ZZ= Zentralzylinder.

3.8.6. Subzelluläre Lokalisation von *CYP86A1* mit einem *CYP86A1*-GFP-Fusionsprotein

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von *CYP86A1*, wurde an das 3' Ende der CDS von *CYP86A1* die CDS des grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) fusioniert und unter die Kontrolle eines 35S-Promotors gestellt. Dieses *CYP86A1*:GFP Konstrukt wurde in *A. tumefaciens* eingebracht, positiv transformierte *A. tumefaciens* auf Kanamycin enthaltendem LB-Agar selektioniert und danach überprüft (2.6.1). Durch die Infiltration von *N. benthamiana* Blättern mit *CYP86A1*:GFP Konstrukt enthaltenden *A. tumefaciens*, wurde *CYP86A1*:GFP transient in Epidermiszellen von *N. benthamiana* Blättern exprimiert (2.7). Bei der anschließenden Untersuchung mit einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (2.7) konnte eine intensive GFP-Fluoreszenz in netzartigen Strukturen der Epidermiszellen beobachtet werden, die charakteristisch für das Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind (Abbildung 34A). Die Beobachtung der Zellen, zeigte die für ein vitales ER typische dynamische Veränderung der Netzstruktur (Abbildung 34B). Die Koexpression eines HDEL:DsRed ER-Markerproteins (2.7) und dem *CYP86A1*:GFP Protein in derselben Zelle, ließ die Kolokalisation der beiden Proteine im ER erkennen (Abbildung 34C-E).

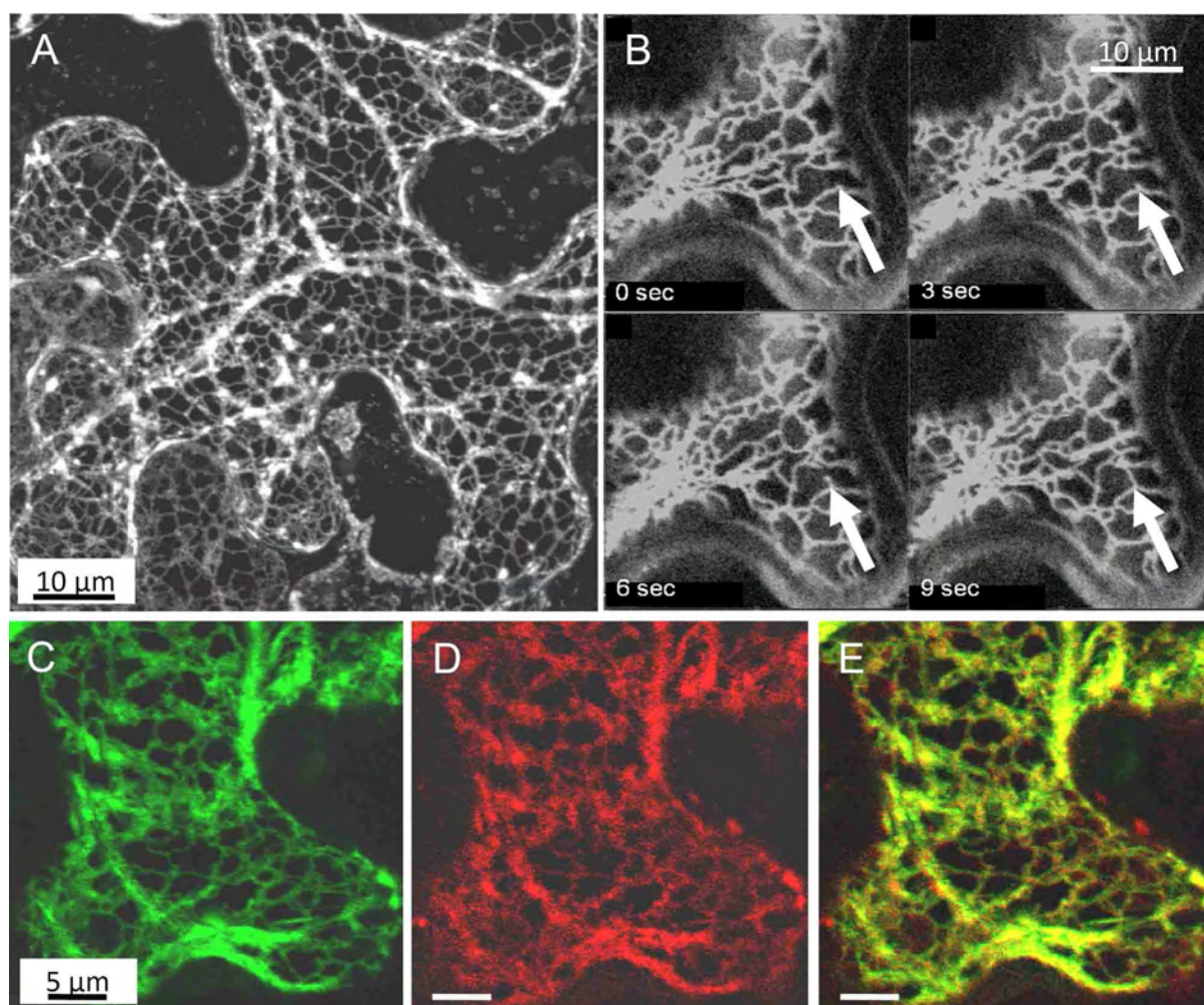


Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation eines CYP86A1-GFP-Fusionsproteins in der Epidermis von *N. benthamiana* Blättern.

Konfokale Laser-Scanning Mikroskop Bilder von transient exprimierten GFP und DsRed markierten Proteinen in der Epidermis von *N. benthamiana* Blättern. (A) Projektion einer Serie von optischen Schnitten durch eine CYP86A1:GFP Protein exprimierende Epidermiszelle; (B) Detailansicht welche die Vitalität der Zelle aufgrund der Bildung von neuen ER Strukturen zeigt (Pfeil); (C-E) Die Kolokalisation von CYP86A1:GFP (grün, C) und HDEL:DsRed (rot, D) im ER-Netzwerk derselben Zelle zeigt sich beim Übereinanderlegen der beiden Kanäle (gelb, E). Maßstab in C, D und E ist gleich. Mit sec = Sekunden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1. Im Verlauf der Wurzelentwicklung dominieren ω -Hydroxysäuren im Wurzeluberin von *Arabidopsis*

Von vielen Spezies wurden Analysen des Wurzeluberin mit enzymatisch isolierten endodermalen und hypodermalen/peridermalen Zellwänden durchgeführt (Schreiber *et al.*, 1999, 2007). Bei der graziilen Wurzel von *Arabidopsis* ist jedoch die Auftrennung und Isolation der suberinisierten Gewebe nur schwer durchführbar. Daher wurden für bisherige Analysen des Wurzeluberins von *Arabidopsis* ganze Wurzelsysteme verwendet (Franke *et al.*, 2005; Beisson *et al.*, 2007). Diese Analysen repräsentieren eine Mischung suberinisierter Gewebe von Wurzelteilen in einem primären und sekundären Entwicklungszustand. Die Verwendung von Wurzeln unterschiedlichen Alters und die Aufteilung älterer Wurzeln entlang der Wurzelachse in 2 beziehungsweise 3 Zonen (Abbildung 11A, C, F), ermöglichte einen Vergleich der Suberinkomposition von Wurzeln, beziehungsweise Wurzelzonen, in verschiedenen Entwicklungsstadien. Wie in der histochemischen Untersuchung von repräsentativen Querschnitten gezeigt, stehen die Analysen des basalen Teils der 21 d und 35 d alten Wurzel für Suberin aus peridermalen Zellwänden von Wurzeln in einem sekundären Entwicklungszustand (Abbildung 11D, G), wohingegen die Analysen der 7 d alten Wurzel und des apikalen Teils der 21 d und 35 d alten Wurzeln das Suberin der Endodermis von Wurzeln in einem primären Entwicklungszustand zeigen (Abbildung 11B, E, I). Der mittlere Teil der 35 d alten Wurzel enthält vornehmlich Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand (Abbildung 11H) und somit Suberin aus einem sich vermutlich noch weiterentwickelndem Periderm. Die beobachteten Entwicklungsstadien stimmen mit früheren mikroskopischen Studien von *Arabidopsis*-Wurzeln verschiedenen Alters überein (Baum *et al.*, 2002). In weiteren Untersuchungen wäre es interessant die Übergangszone zu finden, in der das sekundäre Dickenwachstum und somit die Bildung des Periderms beginnt.

Die Analysen der chemischen Zusammensetzung des aliphatischen Suberins der verschiedenen Wurzelteile sind vergleichbar mit früheren Untersuchungen von *Arabidopsis* (Franke *et al.*, 2005; Beisson *et al.*, 2007). Unabhängig vom Alter und Entwicklungszustand der Wurzeln, konnten in allen Proben die gleichen aliphatischen Suberinmonomere identifiziert werden (Abbildung 12A, B). Zwischen den einzelnen Altersstufen und Wurzelzonen wurden ausgeprägte qualitative und quantitative Unterschiede festgestellt. Die gesamte aliphatische Suberinmenge

variierte bezogen auf das Trockengewicht nach Chloroform/Methanol Extraktion zwischen 6,7 µg/mgdw (21 d apikaler Teil) und 17,6 µg/mgdw (35 d mittlerer Teil) (Abbildung 14). Dabei fällt auf, dass unabhängig vom Alter, Wurzeln im primären Entwicklungszustand weniger Suberin enthalten als Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand. Bei den 35 d alten Wurzeln liegen die Suberinmengen bezogen auf das Trockengewicht nach Enzymbehandlung sogar zwischen 18,9 µg/mgdw (apikaler Teil) und 43,9 µg/mgdw (basaler Teil), und somit in der Größenordnung die auch bei Analysen von enzymatisch verdauten, ganzen Wurzeln ermittelt wurde (Abbildung 24-26). Der basale Teil enthält somit mehr als die doppelte Suberinmenge als der apikale Teil. Dies ist das Ergebnis einer erheblichen Zunahme des Wurzeldurchmessers von der Spitze zur Basis, und hängt auch vom Gewebe mit Suberineinlagerung ab. Der Anteil des suberinisierten Gewebes nimmt während der Wurzelentwicklung zu, da im primären Entwicklungszustand nur eine Suberindeposition in einer inneren Zellschicht, der Endodermis, stattfindet, und im sekundären Entwicklungszustand die äußerste Zellschicht der Wurzel, das Periderm, suberinisiert ist. Verglichen mit der äußeren Wurzeloberfläche die vom Periderm bedeckt wird, ist die Fläche die von der Endodermis umschlossen wird, viel geringer.

Mit zunehmenden Alter und abnehmender Distanz zur Wurzelbasis nimmt der relative Anteil an kurzkettigen Suberinmonomeren (C_{16} und besonders C_{18}) zu, analog dazu nimmt der relative Anteil an langkettigen Monomeren (besonders C_{24}) ab (Abbildung 13). Ein gegenteiliges Bild zeigte sich bei der Analyse von suberinisierten, endodermalen Zellwänden aus Maiswurzeln (*Zea mays*), bei denen mit zunehmender Distanz zur Wurzelspitze der relative Anteil von langkettigen Suberinmonomeren (C_{24} - C_{28}) zunahm (Zeier *et al.*, 1999). Welche Bedeutung diese unterschiedliche Entwicklung der Kettenlängenverteilung für die Barriereigenschaften des Suberins hat, muss noch näher untersucht werden. Ein Ansatz zur Aufklärung des Einflusses der Kettenlängenverteilung auf die Barriereigenschaften des Suberins wäre die Untersuchung von *Arabidopsis*-Mutanten mit einer, im Vergleich zum Wildtyp, veränderten Kettenlängenverteilung im Wurzelsuberin.

Die auffälligste, qualitative Veränderung der Suberinkomposition der verschiedenen Alters- und Entwicklungsstadien der Wurzel ist bei den ω -Hydroxysäuren, 2-Hydroxysäuren und Fettsäuren zu erkennen (Abbildung 12B). Mit zunehmenden Alter und abnehmender Distanz zur Wurzelbasis, nimmt der

relative Anteil an ω -Hydroxysäuren zu und der relative Anteil an 2-Hydroxysäuren und Fettsäuren ab. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Arabidopsis*, nimmt der Gehalt an Fettsäuren und 2-Hydroxysäuren in endodermalen und rhizodermalen/hypodermalen Zellwänden von Maiswurzeln von der Spitze zur Basis ab, wohingegen der Gehalt an ω -Hydroxysäuren zunimmt (Zeier *et al.*, 1999). Wie in *Arabidopsis* zeigten sich im Mais die deutlichsten Unterschiede zwischen der apikalen Wurzelzone und der basalen Wurzelzone. Die Änderung der Suberinzusammensetzung entlang der Wurzelachse in Mais und *Arabidopsis* hebt die große Bedeutung von ω -Hydroxysäuren für die Suberinisierung von Zellwänden hervor. Aufgrund der zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen, sind ω -Hydroxysäuren ideale Monomere zur Bildung von Polyestern. Ob die Zunahme an ω -Hydroxysäuren auch die physiologischen und funktionellen Eigenschaften von suberinisierten Barrieren in der Endodermis und dem Periderm beeinflusst ist unklar.

4.2. Die Wurzel von *Arabidopsis* wird bei NaCl-Behandlung verstärkt suberinisiert

Die Auswirkungen von Salz auf Wachstum, Morphologie und Stoffwechsel wurde bei vielen Spezies umfassend untersucht (Shannon *et al.*, 1994; Munns und Tester, 2008). Auch über den Einfluss von Salz auf die Suberinisierung von Wurzelgeweben gibt es zahlreiche Studien (Hose *et al.*, 2001; Franke und Schreiber, 2007). Bei der Aufzucht von *Arabidopsis* unter NaCl-Einfluss und anschließender Analyse des Suberins von ganzen Wurzelsystemen, war die Gesamtmenge an aliphatischem Suberin in den behandelten Pflanzen beinahe doppelt so hoch wie in den unbehandelten Pflanzen (Abbildung 15). Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen in Mais (*Zea mays*) und Rizinus (*Ricinus communis*) überein, bei denen der Gehalt an aliphatischem Suberin bei Anzucht unter NaCl-Einfluss um den Faktor 1,5-3 zunahm (Zeier, 1998; Schreiber *et al.*, 2005). Bei *Arabidopsis* konnten bis auf eine leichte Erhöhung des relativen Anteils an α,ω -Disäuren, keine qualitativen Unterschiede in der Zusammensetzung des Wurzelsuberins zwischen mit NaCl behandelten Pflanzen und der Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 16A, B). Auch bei Mais konnte keine qualitative Veränderung der Suberinzusammensetzung bei der Aufzucht unter NaCl-Einwirkung gezeigt werden (Zeier, 1998). Das könnte bedeuten, dass bei NaCl-Einwirkung lediglich die Suberinmenge weiterhin ein gutes Wachstum

gewährleistet, jedoch keine Modifikation der Suberinzusammensetzung erforderlich ist. Die verstärkte Suberinisierung der Wurzeln bei NaCl-Behandlung könnte zu einem erhöhten Widerstand gegen den Eintritt von Ionen und den Verlust von Wasser führen.

4.3. CYP81F4, CYP705A1 und CYP705A13 sind wahrscheinlich nicht an der Biosynthese aliphatischer Suberinmonomere in *Arabidopsis* beteiligt

Aufgrund der starken und teilweise ausschließlichen Expression in der Wurzel (Tabelle 9; Abbildung 17A) und der hohen Expression in der Endodermis (Abbildung 17B), die als Syntheseort für Suberinmonomere vermutet wird, wurden *CYP81F4*, *CYP705A1* und *CYP705A13* als Kandidatengene für eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese ausgewählt. Bei einer organspezifischen, semiquantitativen RT-PCR konnte lediglich für *CYP705A1* eine geringe Expression in oberirdischen Pflanzenteilen gezeigt werden (Abbildung 18). *CYP81F4* und *CYP705A1* konnten ausschließlich in der Wurzel detektiert werden. *Microarray*-Analysen zeigten für alle Kandidatengene eine geringe Expression in oberirdischen Pflanzenteilen, jedoch war in jedem Fall die Wurzel das Organ der stärksten Genexpression (Zimmermann *et al.*, 2004; Schuler und Werck-Reichhart, 2003).

Von allen Kandidatengenen wurden T-DNA Insertionsmutanten untersucht um Hinweise auf die *in vivo* Funktion zu erhalten. Nach dem Genotypisieren wurden homozygote Linien auf einen transkriptionellen Knockout der jeweiligen Gene untersucht. Dabei zeigte sich, dass *cyp705a13* zwar eine homozygote T-DNA-Insertionslinie ist, jedoch noch ein Transkript von *CYP705A13* gebildet wird (Abbildung 23D), und somit nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte. Vermutlich lag die T-DNA Insertion bei der untersuchten Linie zu weit außerhalb der CDS um einen Einfluss auf die Transkription zu haben. Bei *cyp81f4* und *cyp705a1* konnte ein transkriptioneller Knockout der Gene mit T-DNA Insertion bestätigt werden (Abbildung 23A, C). Bei der Analyse des Wurzelsuberin konnte, im Bezug auf das Trockengewicht nach Enzymverdau, kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und *cyp81f4* beziehungsweise *cyp705a1* festgestellt werden (Abbildung 24; Abbildung 26). Die *cyp705a1* Mutante enthielt im Bezug auf die Wurzeloberfläche etwas mehr Suberin (Abbildung 28). Dieser Unterschied ist vermutlich darauf

zurückzuführen, dass *cyp705a1* kleinere Wurzeln hat. Es konnten keine Rückschlüsse auf die Ursache für die kleineren Wurzeln gemacht werden.

Die Ergebnisse der Analytik deuten nicht auf eine Beteiligung von CYP81F4 und CYP705A1 an der Suberinbiosynthese hin. Jedoch kann eine Beteiligung auch nicht ausgeschlossen werden, da der Knockout von *CYP81F4* und *CYP705A1* durch orthologe Gene kompensiert werden könnte, und somit kein Suberinphänotyp zu beobachten wäre. Dagegen spricht, dass die transkriptionelle Regulation der beiden Gene sich von der Expression des in der Suberinbiosynthese beteiligten *CYP86A1* unterscheidet (Abbildung 20; Abbildung 21). In welchen Stoffwechselwegen die Gene *CYP81F4*, *CYP705A1* und *CYP705A13* involviert sind, muss noch weitergehend untersucht werden. Von keinem Mitglied der CYP705 Familien in *Arabidopsis* ist bisher eine Funktion bekannt (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Für eine P450 aus der Familie CYP81 konnte eine Aktivität als *in chain* Hydroxylase gezeigt werden (Cabello-Hurtado *et al.*, 1998). CYP81F4 könnte eine ähnliche Reaktion katalysieren und zum Beispiel an der Synthese von 2-Hydroxysäuren beteiligt sein. Nelson *et al.* (2004) vermuten für Mitglieder des CYP71 Clans, zu dem die CYP81 und CYP705 Familien gehören, aufgrund der bekannten Funktion von anderen P450 des CYP71 Clans, eine Beteiligung an der Produktion von sekundären Metaboliten.

4.4. CYP86A1 ist ein Schlüsselenzym der aliphatischen Suberinbiosynthese in *Arabidopsis*

Ebenso wie die anderen Kandidatengene wurde *CYP86A1* wegen der starken Expression in der Wurzel als Kandidatengene für eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese ausgewählt. Sowohl bei den Daten des NSF 2010-Projektes (<http://arabidopsis-p450.biotec.uiuc.edu>) als auch bei Birnbaum *et al.* (2003) ist *CYP86A1* unter den 20 am stärksten in der Wurzel (Tabelle 9; Abbildung 17A), beziehungsweise in der Endodermis der Wurzel (Abbildung 17B), exprimierten P450 zu finden. Zudem konnte *CYP86A1* bei einer organspezifischen, semiquantitativen RT-PCR ausschließlich in der Wurzel detektiert werden (Abbildung 18). Eine Expression in oberirdischen Pflanzenteilen war mit dieser Methode nicht nachzuweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten von Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004) und früheren organspezifischen Expressionsstudien (Duan und Schuler, 2005) überein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine

Expression von *CYP86A1* während der gesamten Wurzelentwicklung stattfindet (Abbildung 18; Abbildung 45). Es ist interessant, dass die Expression von *CYP86A1* in den 10 d alten Wurzeln und im basalen Teil der 21 d alten Wurzel am höchsten ist. Das könnte darauf hindeuten, dass in der 10 d alten Wurzel ein erhöhter Bedarf für ω -Hydroxysäuren besteht, da die Wurzel schnell wächst und die neu gebildete Endodermis noch suberinisiert werden muss. Ähnlich könnte man die hohe Expressionsrate von *CYP86A1* im basalen Teil der 21 d alten Wurzel interpretieren. Auch dieser Wurzelteil kennzeichnet sich durch ein schnelles Wachsrum und durch den Übergang vom primären- zum sekundären Entwicklungsstadium setzt die Peridermbildung ein. Das neu gebildete Periderm muss wiederum noch suberinisiert werden, was einen hohen Bedarf an ω -Hydroxysäuren erklären könnte. Die Expression von *CYP86A1* in den 35 d alten Wurzeln ist geringer als in der 21 d alten Wurzel, und nimmt vom apikalen zum basalen Teil ab. Vermutlich ist der Bedarf an ω -Hydroxysäuren in der 35 d alten Wurzel viel geringer, da die Wurzel nur noch langsam wächst, und während der Entwicklung bereits Suberin in die Endodermis und das Periderm eingelagert wurde.

Um die *in vivo* Funktion von *CYP86A1* aufzuklären, wurden zwei unabhängige *Arabidopsis* T-DNA Insertionsmutanten im Gen *At5g58860* (*CYP86A1*) verwendet, *cyp86a1-1* und *cyp86a1-2*. Der transkriptionelle Knockout von *CYP86A1* in den beiden Mutanten (Abbildung 23B) resultierte in einer signifikanten Reduktion im Gehalt bestimmter aliphatischer Suberinmonomere und einer >60 % Reduktion der Gesamtmenge des aliphatischen Wurzelsuberins im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 25). Da besonders der Gehalt an ω -Hydroxysäuren reduziert war, wird die Mutante auch als *horst* (*hydroxylase of root suberized tissue*) bezeichnet (Höfer *et al.*, 2008). Durch die funktionelle Komplementation der *cyp86a1-1* Mutanten mit einem genomischen DNA Fragment, welches den *CYP86A1* Lokus inklusive der Promotor-Region enthielt, konnte wieder eine dem Wildtyp quantitativ und qualitativ vergleichbare Suberinkomposition erreicht werden (Abbildung 29B, C). Die Analyse der Suberinkomposition in den beiden *cyp86a1* Mutanten und der komplementierten *cyp86a1-1-CYP86A1* Linie, liefern den genetischen Nachweis für eine Beteiligung von *CYP86A1* in der Suberinbiosynthese. Dies wird zudem durch die Analyse zweier weiterer Insertionsmutanten in *CYP86A1* von Li *et al.* (2007) bestätigt, die eine vergleichbare Suberinzusammensetzung und -menge aufweisen.

Übereinstimmend mit der katalytischen *in vitro* Aktivität von CYP86A1 (Benveniste *et al.*, 1998) zeigt das aliphatische Suberin von *cyp86a1* im Vergleich zum Wildtyp eine starke Reduktion von ω -Hydroxysäuren $<C_{20}$. Mikrosomen, welche aus CYP86A1 exprimierenden Hefen hergestellt wurden, metabolisieren $C_{16}>C_{18:1}>C_{18:2}>C_{14}>C_{12}$ Fettsäuren in die korrespondierenden ω -Hydroxysäuren, mit der höchsten Aktivität bei C_{16} und $C_{18:1}$ Fettsäuren. Zusätzlich konnte auch für CYP86A1 aus *Baculovirus*-infizierten Insektenzellen gezeigt werden, dass es einige dieser Substrate bindet (Rupasinghe *et al.*, 2007). Die Suberinanalyse der *cyp86a1* Mutanten bestätigen diese Ergebnisse und liefern außerdem neue Informationen, da in den *in vitro* Studien keine Substrate länger C_{18} getestet wurden. Die Tatsache, dass in den *cyp86a1* Mutanten der Gehalt an ω -Hydroxysäuren $\geq C_{20}$ im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war, deutet auf eine starke Spezifität bezüglich der Kettenlängen der von CYP86A1 für die ω -Hydroxylierung akzeptierten Substrate hin. Höchstwahrscheinlich dienen Fettsäuren, die länger als C_{20} sind, *in vivo* nicht als Substrat für CYP86A1. Im Widerspruch zu *in vitro* Studien, bei denen heterolog exprimiertes CYP86A1 nicht in der Lage war Stearinsäure ($C_{18:0}$) als Substrat zu benutzen (Benveniste *et al.*, 1998; Rupasinghe *et al.*, 2007), zeigte das Suberin der *cyp86a1* Mutanten auch eine signifikante Reduktion der Stearinsäure im Vergleich zum Wildtyp. Auch wenn gewisse Probleme im heterologen *in vitro* System nicht ausgeschlossen werden können (z.B. endogene Reaktionen der Hefe konkurrieren um die Stearinsäure), könnte dies darauf hindeuten, dass *in situ* zusätzliche Faktoren die Substratspezifität von CYP86A1 beeinflussen und dazu befähigen auch Stearinsäure als Substrat zu benutzen. Eine alternative Erklärung wäre, dass im Wildtyp die Elongation von ω -Hydroxysäuren von C_{16} zu C_{18} stattfindet, jedoch konnte bisher nur die zur FAE notwendige CoA-Aktivierung und keine Elongation von C_{16} ω -Hydroxysäure nachgewiesen werden (Schnurr *et al.*, 2004).

Da im Suberin der *cyp86a1* Mutanten noch geringe Mengen C_{16} und C_{18} ω -Hydroxysäuren vorkommen, muss es im Genom von *Arabidopsis* noch andere zu CYP86A1 funktionell redundante ω -Hydroxylasen geben, welche zumindest teilweise den Knockout von CYP86A1 kompensieren. Bisher konnte in Pflanzen eine ω -hydroxylase Aktivität für einige P450 aus den Familien CYP78, CYP92, CYP96 und mehrere P450 der CYP86 und CYP94 Familien gezeigt werden (Kandel *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* wurde durch heterologe Expression in Hefe für vier CYP94 (CYP94B1, CYP94B2, CYP94B3 und CYP94C1) und CYP86A8 die Fähigkeit zur

ω -Hydroxylierung von C12:0, C14:0 C16:0 und C18:1 Fettsäuren demonstriert (Benveniste *et al.*, 2006; Wellesen *et al.*, 2001). Desweiteren wurde die ω -Hydroxylierung von C18:1 Fettsäuren für CYP86A2, CYP86A4 und CYP86A7, alle aus der biochemisch wenig charakterisierten CYP86 Familie in *Arabidopsis*, nachgewiesen (Rupasinghe *et al.*, 2007). Von diesen P450 mit ω -Hydroxylase Aktivität, wurden CYP94B1, CYP84B3, CYP86A2, CYP86A4 und CYP86A8 als Gene mit einer auch in der Wurzel nachweisbaren Expression beschrieben (Wellesen *et al.*, 2001; Duan und Schuler, 2005; Schuler *et al.*, 2006). Auch wenn diese Gene nicht vorzugsweise in suberinisierten Geweben exprimiert sind, kann auch eine geringe Expression von einer oder mehrerer dieser ω -Hydroxylasen in der Wurzel zu einer ω -Hydroxylase Aktivität führen, die den Knockout von CYP86A1 teilweise kompensiert.

Außer der starken Reduktion an ω -Hydroxysäuren $<C_{20}$ in den *cyp86a1* Mutanten, sind auch andere Suberinmonomere aus den Stoffklassen der α,ω -Disäuren, Fettsäuren und 2-Hydroxysäuren signifikant reduziert (Abbildung 25). Die Synthese von α,ω -Disäuren kann, basierend auf den für die ω -Oxidation vorgeschlagenen Stoffwechselwegen in der Biosynthese von apoplastischen Polyestern, auf zwei verschiedene Arten erfolgen (Franke *et al.*, 2005; Kurdyukov *et al.*, 2006). Zum einen können α,ω -Disäuren, ausgehend von ω -Hydroxysäuren als Substrat, durch zwei sequentielle Dehydrogenase-Reaktionen hergestellt werden. Diese Reaktion wurde erstmals im Periderm von Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) gezeigt (Agrawal und Kolattukudy, 1978). Es wird angenommen, dass diese Reaktion von *HOTHEAD* (*HTH*) (Kurdyukov *et al.*, 2006) ähnlichen Oxydoreduktasen katalysiert wird. Eine Mutation in *HTH* führt im Kutin der Mutante zu einem erhöhten Gehalt an ω -Hydroxysäuren. Deshalb ist anzunehmen, dass die starke Reduktion von C₁₆ und C₁₈ α,ω -Disäuren in *cyp86a1*, durch das verminderte Angebot an ω -Hydroxysäuren entsteht, welche das Substrat für *HTH* ähnliche Oxydoreduktasen sind. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass *HTH* auch in der Wurzel exprimiert ist. Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von α,ω -Disäuren ist die enzymkatalysierte stufenweise Oxidation von Fettsäuren zu ihren korrespondierenden ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. In diesem Fall könnte CYP86A1 ähnlich wie CYP94A5 und CYP94C1 als multifunktionelle ω -Hydroxylase arbeiten (Le Bouquin *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2007). Jedoch konnte für CYP86A1

in vitro, unter Bedingungen die für andere multifunktionelle ω -Hydroxylasen erfolgreich angewendet wurden, diese Reaktion nicht nachgewiesen werden.

Bemerkenswerterweise akkumulieren die vermutlich von CYP86A1 zu ω -Hydroxysäuren umgesetzten Substrate, C₁₆ und C₁₈ Fettsäuren, nicht im Suberin der Mutanten. Stattdessen wird der Gehalt an langkettigen Fettsäuren und 2-Hydroxysäuren von der Mutation in *CYP86A1* beeinträchtigt (Abbildung 25). Dies deutet auf eine starke Verknüpfung und Wechselwirkung zwischen den einzelnen Stoffwechselwegen der aliphatischen Suberinbiosynthese und vielleicht auch mit anderen Pfaden der Lipidbiosynthese hin. Bisher nicht entdeckte komplexe regulatorische Mechanismen bei der Suberinbiosynthese, könnten zur Repression von der ω -Hydroxylation vorgeschalteten Reaktionen, und somit zu mehr oder minder spezifischen sekundären Effekten auf die Suberinzusammensetzung führen. Einer dieser Effekte betrifft die Kettenlängenverteilung der Fettsäuren in *cyp86a1*. Fettsäuren >C₂₀ sind im Suberin der *cyp86a1* Mutanten signifikant reduziert, was auf einen Einfluss des Knockout von *CYP86A1* auf die Expression oder Aktivität von Enzymen die an der Elongation von C₂₀ Fettsäuren beteiligt sind hinweist. Die FAE wird als einer der zentralen Schritte bei der Suberinbiosynthese in der Kartoffel und bei *Arabidopsis* gesehen (Franke *et al.*, 2005; Yang und Bernards, 2006). Von den 21 in *Arabidopsis* vorkommenden putativen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (FAE-KCS), welche bei der FAE den geschwindigkeits- und produkt-bestimmenden Schritt katalysieren (Millar und Kunst, 1997), konnte für 6 FAE-KCS die Fähigkeit zur Synthese von C₂₂ oder C₂₄ Fettsäuren gezeigt werden (Trenkamp *et al.*, 2004; Blacklock und Jaworski., 2006; Paul *et al.*, 2006). Die Untersuchung dieser FAE-KCS in den *cyp86a1* Mutanten könnte erste Einblicke in die Regulation zwischen der FAE und der Fettsäurehydroxylierung liefern. In ähnlicher Weise wie die Fettsäuresynthese könnten andere Stoffwechselwege, wie zum Beispiel die Synthese der 2-Hydroxysäure, durch unbekannte Wechselwirkungen in der Suberinbiosynthese sekundär beeinflusst werden. So scheint auch die Reduktion der C₂₀ α,ω -Disäure ein sekundärer Effekt des *CYP86A1* Knockout zu sein, da der Gehalt des für die Herstellung vermutlich verwendeten Substrats, die C₂₀ ω -Hydroxysäure, in der *cyp86a1* Mutanten nicht beeinflusst ist. Vielleicht werden HTH ähnliche Enzyme, die spezifisch C₂₀ ω -Hydroxysäuren binden, in *cyp86a1* inhibiert oder gestört.

Trotz des im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduzierten und veränderten Wurzeluberins der *cyp86a1* Mutanten, zeigte sich bei Anzucht auf Erde kein veränderter Phänotyp der oberirdischen Pflanzenorgane. Auch beim Vergleich des Wurzelwachstums auf normalen Agar-Platten, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 32). Dies könnte an den im Labor optimalen Anzuchtbedingungen liegen, bei denen die Pflanzen zu keiner Zeit unter Wasser- oder Nährstoffmangel leiden. Es wurde vermutet, dass durch Trocken- oder Salzstress ein Phänotyp von *cyp86a1* induziert werden könnte. Beim Vergleich des Wurzelwachstums auf mit NaCl versetzten Agar-Platten, konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 32). Gegebenenfalls war bei dieser Untersuchung der beobachtete Zeitraum zu kurz um Differenzen im Wachstum festzustellen. Bei Wachstumsversuchen von auf Erde angezogenen und mit NaCl gewässerten Wildtyp- und *DAISY*-Mutanten konnten deutliche Unterschiede im Wachstum erst nach 16 Tagen ermittelt werden (Höfer 2005). Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Auswirkung des *CYP86A1* Knockout, wären Austrocknungsversuche mit adulten Pflanzen. Weiterführende Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der starken Reduktion der Gesamtsuberinmenge in der Wurzel sind noch erforderlich. Besonders die deutlich verminderte Menge der ω -Hydroxysäuren könnte einen Einfluss auf die Eigenschaften des Suberinpolymers in *cyp86a1* haben. Da es in der Kartoffel ein zu *CYP86A1* orthologes Gen gibt, stellt die Verwendung von gentechnisch veränderten und enzymatisch isolierten Kartoffelperidermen, ein gutes System zur Untersuchung der Eigenschaften eines quantitativ und qualitativ veränderten Suberins dar. Mit diesen isolierten Kartoffelperidermen können zum Beispiel genaue und quantifizierbare Transpirationsversuche durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Wurzeldruckmessung bei *cyp86a1* und Wildtyp Pflanzen. Mit dieser Technik können Unterschiede in der Wasserleitfähigkeit von lebenden Wurzelsystemen gemessen werden (Steudle, 1993).

Ergänzend zu den Knockout-Linien von *CYP86A1* und der komplementierten *cyp86a1-1-CYP86A1* Linie wurden Wildtyp und *cyp86a1-1* Pflanzen hergestellt, bei denen *CYP86A1* unter der Kontrolle eines doppelten 35S-Promotors steht. Die Erwartung war, dass die Reintegration von *CYP86A1* in *cyp86a1*, ähnlich der Komplementation, zu einer Wiederherstellung des Wildtyp Suberins und im Wildtyp zu einem höheren Gehalt an ω -Hydroxysäure und α,ω -Disäuren führt. Die erfolgreich

veränderten Wildtyp-Pflanzen könnten wiederum für Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung eines veränderten ω -Hydroxysäure- und α,ω -Disäure-Gehaltes im Wurzelsuberin benutzt werden. Die mit dem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt transformierten Wildtypen zeigen jedoch, entgegen der Erwartung, einen reduzierten Gehalt an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren im Wurzelsuberin (Abbildung 30B). Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich in Pflanze-5 und könnte auf eine Cosuppression (Jorgensen *et al.*, 1998) von *CYP86A1* durch das Einbringen des 2X35S:CYP86A1 Konstrukts zurückzuführen sein, jedoch müsste die Expressionsrate von *CYP86A1* in dieser Linie noch überprüft werden. Die spezifische Reduktion der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren in Pflanze-5, unterstützt die Ergebnisse der Analysen der *cyp86a1* Mutanten und der *cyp86a1-1-CYP86A* Linie. Wenn die Expressionsrate von *CYP86A1* in Pflanze-5 reduziert ist, sollten auch weniger ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren gebildet werden können. Die mit dem 2X35S:CYP86A1 Konstrukt transformierten *cyp86a1-1* Pflanzen zeigten keine Veränderung der Suberinkomposition im Vergleich zu den *cyp86a1* Mutanten (Abbildung 30A). Eine mögliche Erklärung wäre, dass das eingebrachte *CYP86A1*-Gen, trotz der vorangegangenen Überprüfung des 2X35S:CYP86A1 Konstrukts, in den Pflanzen kein korrekt gefaltetes Protein ergibt.

Übereinstimmend mit der bei der RT-PCR nicht nachweisbaren Expression von *CYP86A1* in Blättern (Abbildung 18) konnten bei den *cyp86a1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung im Blattwachs oder im Kutin nachgewiesen werden (Abbildung 31A, C).

Im Vergleich zum Wildtyp konnte in der chemischen Zusammensetzung der Samenschale, in der *cyp86a1-1* Mutante eine Reduktion im Gehalt der C_{16} ω -Hydroxysäure und C_{16} α,ω -Disäure gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass *CYP86A1* auch bei der Biosynthese der Samenschale involviert ist. Jedoch stimmen die gezeigten Unterschiede zwischen Wildtyp und *cyp86a1-1* Mutante in der Zusammensetzung der Samenschale nicht mit den gezeigten Veränderungen des aliphatischen Wurzelsuberins in der Mutante überein, da keine ω -Hydroxysäuren oder α,ω -Disäuren mit einer Kettenlänge $>C_{16}$ betroffen sind. Zudem konnte eine Expression von *CYP86A1* lediglich in der Chalaza/Mikropyl-Region des Samens gezeigt werden (Abbildung 33). Durch eine Analyse der Samenschale der *cyp86a1-1-CYP86A1* Linie könnte die Beteiligung von *CYP86A1* bei der Biosynthese der Samenschale bestätigt werden.

Wie auch schon für die FAE-KCS *DAISY* gezeigt, wird die Expression von Genen, die in der Suberinbiosynthese involviert sind, durch Salz und Osmotika induziert (Franke *et al.*, 2008 im Druck). Die erhöhte Expression des Markergens RD29A (Abbildung 19) zeigt an, dass die für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation verwendeten Pflanzen unter NaCl-Einwirkung standen. Bei der RT-PCR konnte wie auch bei Daten von Zimmermann *et al.* (2004) eine im Durchschnitt erhöhte Expressionsrate von *CYP86A1* in der Wurzel unter diesem Stressesstimuli festgestellt werden, die Expressionsmuster unterscheiden sich jedoch voneinander (Abbildung 20B, F; Abbildung 21B, F). Expressionsstudien von Duan und Schuler (2005) bestätigen die erhöhte Expressionsrate von *CYP86A1* unter Mannitoleinwirkung und zeigten zudem eine Induktion durch ABA, ACC, Clofibrat und Kälte. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von *CYP86A1* bei der Reaktion auf NaCl, verschiedene Osmotika und Pflanzenhormone hin. Die exakte Funktion von *CYP86A1* bei der Antwort auf diese Stressesstimuli müsste jedoch noch weiter untersucht werden.

Die Analyse des aliphatischen Wurzelsuberins der *cyp86a1* Mutanten und der komplementierten Linie *cyp86a1-1-CYP86A1* beweist das *CYP86A1* für die Suberinbiosynthese benötigt wird. Entsprechend der apoplastischen Suberineinlagerungen in der Endodermis von Wurzeln im primären Entwicklungszustand (Abbildung 11B, E, I), konnte eine GUS Aktivität in 7 d alten Wurzeln von Pflanzen, die mit einem Prom_{CYP86A1}:GUS Konstrukt transformiert wurden, in der Endodermis beobachtet werden (Abbildung 33C). Dies unterstützen auch die Daten von Birnbaum *et al.* (2003) (Abbildung 17B), die eine Expression von *CYP86A1* in der Endodermis zeigen, und spricht für eine Beteiligung von *CYP86A1* im frühen Stadium der Suberindeposition. Im peridermalen Gewebe von 35 d alten Wurzeln im sekundären Entwicklungszustand, konnte unter den angewandten Bedingungen keine durchgängige GUS Aktivität nachgewiesen werden. Vermutlich findet in diesem Alters- und Entwicklungsstadium der *Arabidopsis*-Wurzel kaum noch eine Suberindeposition statt. Auch bei der RT-PCR konnte im basalen Teil der 35d alten Wurzel nur eine schwache Expression von *CYP86A1* gezeigt werden (Abbildung 18). Durch die Untersuchung der GUS Aktivität in jüngeren Wurzeln könnte ein noch genaueres Expressionsmuster von *CYP86A1* erstellt werden. Da Suberin auch als Reaktion auf Verwundung gebildet wird (Bernards und Lewis 1998; Kolattukudy, 2001), könnte die sporadisch auftretende GUS Aktivität in adulten

Wurzeln (Abbildung 33D), und die in Querschnitten erkennbare unregelmäßige Verteilung (Abbildung 33E, F), auf eine Induktion der *CYP86A1*-Promotor gesteuerten *GUS* Expression durch Verwundung der Wurzel bei der Probenherstellung zurückzuführen sein. Dies ist auch an der Schnittstelle, an der die Wurzel vom oberirdischen Pflanzenteil getrennt wurde, zu beobachten (Abbildung 33D).

Im oberirdischen Teil der adulten Pflanzen war noch eine räumlich stark beschränkte *GUS* Aktivität in der Abszissionszone zwischen Schote und Stängel zu sehen (Abbildung 33H). Die gleiche *GUS* Aktivität konnte auch für die an der Suberinbiosynthese beteiligte FAE-KCS *DAISY* (Franke *et al.*, 2008 im Druck) gezeigt werden. Bisher liegen noch keine analytischen Daten vor, die das Vorhandensein von einem suberinähnlichen Polymer in diesem Bereich bestätigen. Jedoch konnten Franke *et al.* (2008 im Druck) die Abszissionszone zwischen Schote und Stängel mit dem lipophilen Farbstoff Sudan Rot 7B anfärben, was auf Zellwandmodifikationen in diesem Bereich hindeutet. Eine für die Abszissionszone spezifische Chitinase und das *Arabidopsis* *INFUORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* Gen zeigen ein übereinstimmendes *GUS* Expressionsmuster (Butenko *et al.*, 2003; Patterson und Bleecker 2004). Zusammengenommen lässt dies eine Beteiligung von *CYP86A1* an der Synthese eines sekundären Abschlussgewebes in der Abszissionszone der Schote vermuten.

Übereinstimmend mit der leicht veränderten chemischen Zusammensetzung der Samenschale, konnte in der Chalaza/Mikropyl-Region des Samens eine *GUS* Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 33I). Ähnlich wie in der Abszissionszone der Schote wird auch hier ein sekundäres Abschlussgewebe gebildet. In der Grapefruit (*Citrus paradisi*) konnten Espelie *et al.* (1980) zeigen, dass die Chalaza-Region der Samenschale von einigen Lagen suberinisierter Zellen abgedichtet wird. Auch eine von Franke *et al.* (2008 im Druck) durchgeführte Sudan Rot 7B Färbung des *Arabidopsis*-Samens deutet auf die Einlagerung von lipophilem Material in diesem Bereich hin. Zudem zeigen zwei weitere an der Suberinbiosynthese beteiligte Gene, *GPAT5* und *DAISY*, ebenfalls eine *GUS* Aktivität in der Chalaza/Mikropyl-Region des sich entwickelnden Samens (Beisson *et al.*, 2007; Franke *et al.*, 2008 im Druck). Die chemische Analyse der isolierten Chalaza/Mikropyl-Region des Samens von *Arabidopsis* würde die durchgeführten histochemischen Suberinnachweise bestätigen.

Auf subzellulärer Ebene deutet die Visualisierung eines CYP86A1-GFP Fusionsproteins in *N. benthamiana* Blattepidermis Zellen deutlich auf eine ER-Lokalisation von CYP86A1 hin (Abbildung 34A, B). Auch wenn die Überexpression im heterologen System zu einer artifiziellen ER Retention führen kann, wird die ER-Lokalisation von CYP86A1 durch die Co-Lokalisation mit einem parallel exprimierten ER-Reportergen (HDEL:DsRed Protein) belegt (Abbildung 34C-E). Die ER-Lokalisation der ω -Hydroxylase CYP86A1 stimmt zudem mit Untersuchungen überein, in denen für P450 enthaltende Pflanzenmikrosomen die Fähigkeit zur Synthese von ω -Hydroxysäuren aus Fettsäuren gezeigt wurde (Benveniste *et al.*, 1982; Pinot *et al.*, 1992; 1993). Derzeitige Analysen der Genstruktur von *CYP86A1* prognostizieren für das Protein eine N-terminale hydrophobe Transmembrandomäne und eine Aktivität im Endomembransystem (Schwacke *et al.*, 2003). Darüber hinaus erweitert die ER-Lokalisation des GFP-markierten CYP86A1 biochemische Untersuchungen, in denen Mikrosomen von *CYP86A1* exprimierenden Hefen erfolgreich angewendet wurden, um die katalytischen Eigenschaften von CYP86A1 zu untersuchen und CYP86A1 eine Aktivität in Kompartimenten des Endomembransystems zugewiesen wurde (Benveniste *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang die FAE, eine weitere Schlüsselreaktion bei der Suberinbiosynthese, in Mikrosomen aus suberinisierten Geweben der Maiswurzel gezeigt werden (Schreiber *et al.*, 2005). Die Aktivität der FAE in verschiedenen Wurzelzonen korrelierte dabei mit dem Bedarf an Suberinbestandteilen. Andere Versuche mit GFP-markierten FAE-KCS, zeigten zudem die ER-Lokalisation von Reaktionsschritten in der FAE (Kunst und Samuels, 2003; Zheng *et al.*, 2005). Zusammengenommen legen diese Ergebnisse es nahe, dass Schlüsselreaktionen der Suberinbiosynthese, wie die FAE und die ω -Hydroxylation von Fettsäuren, am ER stattfinden. Es wird sich jedoch noch zeigen, ob die am ER synthetisierten Suberinbestandteile, als Monomere oder vorgeformte Ester in den Apoplasten exportiert werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Der lipophile Biopolyester Suberin bildet wichtige Barrieren um die Pflanze vor der Umgebung zu schützen oder verschiedene Gewebe innerhalb der Pflanze zu trennen. In der Wurzel wird Suberin in die Zellwände der Endodermis und Hypodermis und in das Periderm eingelagert. Aus Suberin bestehende apoplastische Barrieren erfüllen die Herausforderung den Wasser- und Nährstoffverlust zu begrenzen und das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. Trotz der großen physiologischen Bedeutung des Suberins und der Kenntnis der Suberinzusammensetzung von vielen Pflanzenspecies, ist wenig über die Biosynthese und die dabei beteiligten Gene bekannt. In dieser Arbeit wird eine detaillierte Analyse der aliphatischen Suberinzusammensetzung der *Arabidopsis*-Wurzel in verschiedenen Alters- und Entwicklungsstadien gezeigt. Diese Untersuchung zeigt große Veränderungen der Suberinzusammensetzung und -menge während der Wurzelentwicklung von *Arabidopsis* und verdeutlicht den großen Stellenwert der ω -Hydroxylierung für die Suberinbiosynthese. Eine Studie der Suberinisierung der *Arabidopsis*-Wurzel bei NaCl-Behandlung demonstriert die große physiologische Bedeutung der Suberineinlagerung für das Pflanzenwachstum unter ungünstigen Umweltbedingungen. Anhand von Datenbankrecherchen und Expressionsstudien wurden CYP81F4, CYP86A1, CYP705A1 und CYP705A13 als Kandidatengene für eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese ausgewählt. Über einen revers genetischen Ansatz konnte CYP86A1 als Cytochrom P450 Fettsäure ω -Hydroxylase und als Schlüsselenzym für die Biosynthese von aliphatischem Wurzelsuberin in *Arabidopsis* identifiziert werden. Die korrespondierenden *cyp86a1* Mutanten zeigten eine beträchtliche Reduktion an ω -Hydroxysäure mit einer Kettenlänge $<C_{20}$, was die Funktion von CYP86A1 als Hydroxylase der suberinierten Wurzelgewebe demonstriert. Detaillierte Expressionsstudien offenbarten eine starke Wurzelspezifität und eine endodermispezifische Expression. Die transgene Expression eines CYP86A1:GFP Fusionsproteins zeigte eine Lokalisation am Endoplasmatischen Retikulum. Dies deutet darauf hin, dass die Biosynthese von Suberinmonomeren am Endoplasmatischen Retikulum stattfindet.

Kapitel 6

Summary

The lipophilic biopolyester suberin forms important boundaries to protect the plant from its surrounding environment or to separate different tissues within the plant. In roots, suberin can be found in the cell walls of the endodermis and the hypodermis or periderm. Apoplastic barriers composed of suberin accomplish the challenge to restrict water and nutrient loss and prevent the invasion of pathogens. Despite the physiological importance of suberin and the knowledge of the suberin composition of many plants, very little is known about its biosynthesis and the genes involved. Here, a detailed analysis of the *Arabidopsis* aliphatic suberin in roots at different ages and developmental stages is presented. This study demonstrates some variability in suberin amount and composition during root development and indicates the importance of ω -hydroxylation for suberin biosynthesis. An analysis of NaCl treated *Arabidopsis* roots revealed an increased suberin amount and points out the physiological importance of suberin deposition for plant growth under unfavorable environmental conditions. By the investigation of databases and performed expression studies *CYP81F4*, *CYP86A1*, *CYP705A1* and *CYP705A13* have been chosen as candidate genes for an involvement in suberin biosynthesis. Using reverse genetics, only *CYP86A1* could be identified as cytochrome P450 fatty acid ω -hydroxylase and as a key enzyme for aliphatic root suberin biosynthesis in *Arabidopsis*. The corresponding *cyp86a1* mutants show a substantial reduction in ω -hydroxyacids with a chain length $<C_{20}$, demonstrating that *CYP86A1* functions as a hydroxylase of root suberized tissue. Detailed expression studies revealed a strong root specificity and a localized expression in the root endodermis. Transgenic expression of *CYP86A1* fused to GFP distributed *CYP86A1* to the endoplasmic reticulum, indicating that suberin monomer biosynthesis takes place in this sub-cellular compartment before intermediates are exported in the apoplast.

Kapitel 7

Literatur

- Agrawal VP, Kolattukudy PE.** 1978. Purification and characterization of a wound-induced ω -hydroxyfatty acid:NADP oxidoreductase from potato tuber discs (*Solanum tuberosum* L). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **191**, 452–465.
- Agrios GN.** 1997. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.** 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653–657.
- Barthlott W, Neinhuis C.** 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**, 1-8.
- Baum SF, Dubrovsky JG, Rost TL.** 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American Journal of Botany* **89**, 908–920.
- 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*. *The Plant Cell* **19**, 351–368.
- Benveniste I, Salaün JP, Simon A, Reichhart D, Durst F.** 1982. Cytochrome P-450-dependent ω -hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea seedlings. *Plant Physiology* **70**, 122–126.
- Benveniste I, Tijet N, Adas F, Philipps G, Salaün JP, Durst F.** 1998. CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**, 688–693.
- Bernards MA, Lewis NG.** 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm. *Phytochemistry* **47**, 915-933.

- 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 Communications* **346**, 583–590.
- Briesen I.** 2008. Charakterisierung von β -Ketoacyl-CoA-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*.
- 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.
- Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik GE, Amundsen SS, Mandal A, Aalen RB.** 2003. *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell* **15**, 2296-2307.
- Cabello-Hurtado F, Batard Y, Salaün JP, Durst F, Pinot F, Werck-Reichhart D.** 1998. Cloning, expression in Yeast, and functional characterisation of CYP81B1, a plant cytochrome P450 that catalyzes in-chain hydroxylation of fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 7260-7267.
- Chomczynski P, Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735–743.
- Curtis MD, Grossniklaus U.** 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plants. *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. *The Plant Journal* **2**, 261–266.
- De Vries S, Hoge H, Bisseling T.** 1988. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoot RA, eds. *Plant molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1–5.
- Duan H, Schuler MA.** 2005. Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily. *Plant Physiology* **137**, 1067–1081.
- Espelie KE, Davis RW, Kolattukudy PE.** 1980. Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice sac and inner seed coat of Grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed.).
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L.** 2005. Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues: a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66**, 2643–2658.
- Franke R, Höfer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L.** 2008. The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza microphyle region of seeds. *The Plant Journal*, im Druck.
- Franke R, Schreiber L.** 2007. Suberin – a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 252–259.
- Furstner R, Neinhuis C, Barthlott W.** 2000. The lotus effect: Self-purification of microstructured surfaces. *Nachrichten aus der Chemie* **48**, 24-28.
- Graça J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H.** 2002. Glycerol and glyceryl esters of ω -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**, 205-215.
- Groh B, Hubner C, Lenzian KJ.** 2002. Water and oxygen permeance of phellems isolated from trees: the role of waxes and lenticels. *Planta* **215**, 794–801.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA.** 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788–1795.

- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S.** 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 2122–2127.
- Höfer R.** 2005. Charakterisierung einer Insertionsmutanten im Elongasegen *At1g04220*. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*.
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R.** 2008. The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2347-2360
- Holloway PJ.** 1982. The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds. *The Plant Cuticle*. London: Academic Press, 45-85.
- Holloway PJ.** 1983. Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* **22**, 495–502.
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W.** 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2245-2264.
- Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K, Schell J.** 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma sp.* (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal* **28**, 483–491.
- Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B.** 2002 Cuticular waxes of *Arabidopsis*. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0016.
- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS, Lucas WJ.** 1998. An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**, 1486-1487-
- Kandel S, Sauveplane V, Compagnon V, Franke R, Millet Y, Schreiber L, Werck-Reichhart D, Pinot F.** 2007. Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro. *FEBS Journal* **274**, 5116–5127.

- Kandel S, Sauveplane V, Olry A, Diss L, Benveniste I, Pinot F.** 2006. Cytochrome P450-dependent fatty acids hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews* **5**, 359–372.
- Kolattukudy PE.** 1981. Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **32**, 539–567.
- Kolattukudy PE.** 2001. Suberin from plants. In: Doi Y, Steinbuechel A, eds. *Biopolymers I: Biological systems and biotechnological production* 3. Münster: Wiley–VCH, 41–68.
- Kunst L, Samuels AL.** 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**, 51–80.
- Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Baˆr S, Franke R, Efremova N, Tiedjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A.** 2006. Genetic and biochemical evidence for involvement of *HOTHEAD* in the biosynthesis of long-chain α -, ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**, 315–329.
- Le Bouquin R, Skrabs M, Kahn R, Benveniste I, Salaün JP, Schreiber L, Durst F, Pinot F.** 2001. CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the ω -alcohol and to the corresponding diacid. *European Journal of Biochemistry* **268**, 3083–3090.
- Leveau JHJ.** 2006. Microbial communities in the phyllosphere. *Annual Plant Reviews* **23**, 334–367.
- Li Y, Beisson F, Koo AJK, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J.** 2007. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 18339–18344.
- Lulai EC, Corsini DL.** 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 209–222.

- Ma FS, Peterson CA.** 2003. Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* **81**, 405–421.
- Mansui D.** 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **121**, 5-14.
- Matzke K, Riederer M.** 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* **185**, 233–245.
- Millar AA, Kunst L.** 1997. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal* **12**, 121–131.
- Molina I, Bonaventure G, Ohlrogge J, Pollard M.** 2006. The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* **67**, 2597–2610.
- Müller C.** 2006. Plant-insect interaction on cuticular surfaces. *Annual Plant Reviews* **23**, 398-422.
- Munns R, Tester M.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Nawrath C.** 2002. The biopolymers cutin and suberin. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0021.
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S.** 2004. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*: analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology* **135**, 756–772.

- North GB, Nobel PS.** 1994. Changes in root hydraulic conductivity for two tropical epiphytic cacti as soil-moisture varies. *American Journal of Botany* **81**, 46–53.
- Omura T, Sato R.** 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal Of Biological Chemistry* **239**, 2370-2378.
- Patterson SE, Bleecker AB.** 2004. Ethylene-dependent and –independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 194-203.
- 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.
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE.** 1990. A survey of angiosperm species to detect hypodermal casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**, 93–112.
- 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, Salaün JP.** 1993. ω -Hydroxylation of oleic acid in *Vicia sativa* microsomes. *Plant Physiology* **102**, 1313–1318.
- Pinot F, Salaün JP, Bosch H, Lesot A, Mioskowsky C, Durst F.** 1992. ω -Hydroxylation of Z9-octadecenoic, Z9,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P450 systems from *Vicia sativa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**, 183–193.
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB.** 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**, 236-246.
- 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.
- Rupasinghe SG, Duan H, Schuler MA.** 2007. Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **68**, 279–293.
- Sattelmacher B, Muhling KH, Pennewiss K.** 1998. The apoplast – its significance for the nutrition of higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **161**, 485–498.
- Schnurr J, Shockey J, Browse J.** 2004. The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 629–642.
- Schönherr J, Riederer M.** 1989. Foliar penetration and accumulation of organic-chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **108**, 1-70.
- Schönherr J, Ziegler H.** 1980. Water permeability of *Betula periderm*. *Planta* **147**, 345–354.
- Schreiber L, Breiner HW, Riederer M, Duggelin 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, Franke R, Hartmann K.** 2007. Chemical composition of apoplastic transport barriers in roots: quantification of suberin depositions in endodermal and hypodermal root cell walls. In: Sattelmacher B, Horst WJ, eds. *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions*. Heidelberg: Springer, 109–118.
- Schreiber L, Franke R, Lessire R.** 2005. Biochemical characterization of elongase activity in corn (*Zea mays* L.) roots. *Phytochemistry* **66**, 131–138.
- 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.

- Schuler MA, Duan H, Bilgin M, Ali S.** 2006. *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* **5**, 205–237.
- Schuler MA, Werck-Reichhart D.** 2003 Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 629-667.
- Schwacke R, Schneider A, Van Der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, Kunze R.** 2003. ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**, 16–26.
- Shannon MC, Grieve CM, Francois LE.** 1994. Whole-plant response to salinity. In: Wilkinson RE, ed. *Plant-Environment Interactions*. New York: Marcel Dekker Inc, 199-244.
- Soler M, Serra O, Molinas M, Huguet G, Fluch S, Figueras M.** 2007. A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation. *Plant Physiology* **144**, 419–431.
- Soliday CL, Kolattukudy PE.** 1977. Biosynthesis of cutin: ω -hydroxylation of fatty acids by a microsomal preparation from germinating *Vicia faba*. *Plant Physiology* **59**, 1116–1121.
- Steudle E.** 1993. Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue, and organ level. In: Smith JAC, Griffith H, eds. *Water deficits: plant response from cell to community*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 5-36.
- Steudle E, Peterson CA.** 1998. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* **49**, 775–788.
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang P, Huala E.** 2008. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acid Research* **36**, Database issue D1009-D1014, doi: 10.1093/nar/gkm965.

- Tijet N, Helvig C, Pinot F, Le Bouquin R, Lesot A, Durst F, Salaün JP, Benveniste I.** 1998. Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *The Biochemical Journal* **332**, 583–589.
- 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, USA* **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.
- 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 ω -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 9694–9699.
- Werck-Reichhart D, Bak S, Paquette S.** 2002. Cytochromes P450. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R.** 2000. Cytochrome P450: a success story. *Genome Biology* **1**, reviews3003.1-3003.9.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P.** 1997. Effect of pH and ion strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474-481.
- Wydro M, Kozubek E, Lehman P.** 2006. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* **53**, 289–298.

- Xiao FM, Goodwin SM, Xiao YM, Sun ZY, Baker D, Tang XY, Jenks MA, Zhou JM.** 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO Journal* **23**, 2903–2913.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1993. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiology* **101**, 1119-1120.
- Yang W-L, Bernards MA.** 2006. Wound induced metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) tubers: biosynthesis of aliphatic domain monomers. *Plant Signaling and Behavior* **1**, 59–66.
- Zeier J.** 1998. Pflanzliche Abschlussgewebe der Wurzel: Chemische Zusammensetzung und Feinstruktur der Endodermis in Abhängigkeit von Entwicklung und äußeren Einflüssen. *Dissertation Julius-Maximilians-Universität, Würzburg*.
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L.** 1999. Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* **209**, 1–12.
- Zheng HQ, Rowland O, Kunst L.** 2005. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *The Plant Cell* **17**, 1467–1481.
- 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.

Kapitel 8

Anhang

8.1. Verwendete Chemikalien

Brom-Chloro-Propan	Molecular Biology Grade (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA)
BSTFA	(Macherey-Nagel)
Chloroform	Rotisolv HPLC Gradient Grade (Carl Roth)
Ethanol	Technical Grade $\geq 99,8$ % (Carl Roth)
Hexan	Rotisolv ≥ 99 % Pestilyse (Carl Roth)
Isoamylalkohol	≥ 98 % zur Synthese (Carl Roth)
Isopropanol	$\geq 99,9$ % zur Synthese (Carl Roth)
MeOH/HCl	Methanolic HCl, 3 N (Supelco, Bellefonte, USA)
Methanol	Rotisolv HPLC Gradient Grade (Carl Roth)
Pyridin	Puriss, absolut, $\leq 0,005$ % H ₂ O (Fluka)

8.2. Verwendete Lösungen und Medien

8.2.1. Saccharose-MS-Agar

- NH₄NO₃ 1,65 g/l
- KNO₃ 1,9 g/l
- CaCl * 2 H₂O 440 mg/l
- MgSO₄ * 7 H₂O 370 mg/l
- KH₂PO₄ 170 mg/l
- MNSO₄ * H₂O 22,28 mg/l
- ZnSO₄ * 7 H₂O 8,6 mg/l
- H₃BO₃ 6,2 mg/l
- KJ 0,83 mg/l
- Na₂MoO₄ * 2 H₂O 0,25 mg/l
- CuSO₄ * 5 H₂O 0,026 mg/l
- CaCl * 6 H₂O 0,026 mg/l
- Na₂EDTA 37,28 mg/
- FeSO₄ * 7 H₂O 27,8 mg/l
- Myoinosit 100 mg/l
- Glycine 2 mg/l

- Nicotinamid 0,5 mg/l
 - Vitamin B6 0,5 mg/l
 - Thiamin 0,05 mg/l
 - K₂SO₄ 989,6 mg/l
 - AgarAgar 7 g/l
 - Saccharose 15 g/l
- pH-Wert auf pH 5,7 einstellen und Autoklavieren

8.2.2. Lösung zur Oberflächensterilisation von Samen

- 97 % Ethanol 25 ml
- 12 % NaHClO 4 ml
- H₂O-Dest. 21 ml

8.2.3. TriReagent

- Ammonium-thiocyanat 0,4 M
 - Guanidin-thiocyanat 0,8 M
 - Natriumacetat 0,1 M
 - Glycerin 5 % (v/v)
- in H₂O-Dest. lösen
mit Essigsäure pH auf 5,0 einstellen
- Phenol 38 % (v/v)

8.2.4. DEPC-H₂O

Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,1 % (v/v)
in Reinstwasser
für mindestens 120 min. auf der Rollbank inkubieren
Autoklavieren

8.2.5. RNA-Extraktionspuffer

- 10 M LiCl 1 ml

- 1 M Tris-HCl (pH=8) 10 ml
- 0,5 M EDTA (pH=8) 2 ml
- 10 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 ml
mit H₂O-Dest. auf 100 ml auffüllen
- Phenol 100 ml

8.2.6. CTAB-Isolationspuffer

- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 2 % (w/v)
- 2-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v)
- NaCl 1,4 M
- Tris-Cl (pH=8) 100 mM
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 20 mM

8.2.7. CTAB-Waschpuffer

- 97 % Ethanol 76 % (v/v)
- Ammoniumacetat 10 mM

8.2.8. TE-Puffer

- Tris-Cl (pH=7,4) 10 mM
- EDTA 1 mM

8.2.9. 6xGelladepuffer

- Bromphenolblau 0,1 % (w/v)
- Saccharose 40 % (w/v)

8.2.10. LB-Medium und LB-Agar

LB-Medium

- Trypton 10 g/l
- Hefeextrakt 5 g/l

- NaCl 5 g/l
pH-Wert auf pH 7,2 einstellen

LB-Agar

- LB-Medium
- AgarAgar 1 % (w/v)

8.2.11. TB-Puffer und TB-DMSO-Puffer

TB-Puffer

- Pipes 10 mM
- CaCl 15 mM
- KCl 250 mM
In H₂O-Dest. lösen
pH-Wert auf pH 6,7 einstellen
- MnCl₂ 55 mM
steril Filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Für TB-DMSO-Puffer Zugabe von 7 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

8.2.12. SOB-Medium und SOC-Medium

SOB-Medium

- Trypton 20 g/l
- Hefeextrakt 5 g/l
- NaCl 0,5 g/l
- KCl 2,5 mM

pH-Wert auf pH 7 einstellen und Autoklavieren

Vor Benutzung werden noch 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung hinzugegeben

SOC-Medium

Dem fertigen SOB-Medium werden noch 20 ml einer sterilen 1 M Glucoselösung zugegeben.

8.2.13. Inokulationsmedium

- Saccharose 5 % (w/v)
 - Silwet L-77 0,05 % (v/v)
- in Leitungswasser lösen

8.2.14. Infiltrationsmedium

- Zitronensäuremonohydrat 20 mM
 - Saccharose 2 % (w/v)
 - Acetosyringon 200 μ M
- pH-Wert auf pH 5,2 einstellen

8.2.15. X-Gluc-Puffer

- 1 M NaH_2PO_4 8,5 ml
 - 1 M Na_2HPO_4 11,5 ml
 - 0,5 M EDTA (pH=8) 4 ml
 - Kaliumhexacyanoferrat(III) 235 mg
- mit H_2O -Dest auf 188 ml auffüllen
pH-Wert auf pH 8 einstellen
- 10 % Triton X-100 2 ml
 - X-Gluc 104 mg

8.2.16. Fixierlösung

- Na_3PO_4 10 mM
 - NaCl 137 mM
 - KCl 2,7 mM
- pH-Wert auf pH 7,4 einstellen
- Formaldehyd 3,7 % (v/v)

8.2.17. Sudan Rot 7B Färbelösung

- 50 ml PEG-400 werden
- Sudan Rot 7B 0,1 % (w/v)
bei 90 °C lösen
- 50 ml 90 % Glycerin

8.2.18. Polysacharid-Hydroxylase-Lösung

- 2 % Cellulase (Celluclast; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) 2 % (v/v)
- 2 % Pektinase (Begerow, Langenlonsheim) 2 % (v/v)
- Zitronensäuremonohydrat 0,1 M
- 0,1 % Natriumazid 0,1 % (v/v)
pH-Wert auf pH 3 einstellen

8.2.19. Boraxpuffer

- Natriumtetraborat 0,1 M
pH-Wert auf pH 9 einstellen

8.3. Verwendete Primer und Berechnung der *Annealing*temperatur

8.3.1. Berechnung der *Annealing*temperatur

Zunächst wird die Schmelztemperatur der Primer berechnet:

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69,3 + 41 (nG + nC) / s - 650 / s$$

Mit T_M = Schmelztemperatur
 nG = Anzahl der G in der Nukleotidsequenz des Primers
 nC = Anzahl der C in der Nukleotidsequenz des Primers
 s = Gesamtanzahl der Basen des Primers

Die *Annealing*temperatur der Primer errechnet sich dann nach:

$$T_A [^\circ\text{C}] = T_M - 2$$

Mit T_A = *Annealing*temperatur
 T_M = Schmelztemperatur

8.3.2. Verwendete Primer

Tabelle 10: Verwendete Primer mit Verwendung, Nummer und Sequenz.

Zielgen	Primer	Verwendung	Sequenz
CYP81F4	LS224	<i>forward</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_024438; zu benutzen mit LS225, Produktgröße WT=1034 Bp, MT=480-780 Bp	5'-TGGGTCGAGTCTTACACAAGG-3'
	LS225	<i>reverse</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_024438; zu benutzen mit LS224, Produktgröße WT=1034 Bp, MT=480-780 Bp	5'-GGCTTAATGCTGGTAACGAATC-3'
	LS394	<i>forward</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 1 Exon von At4g37410; zu benutzen mit LS395, Produktgröße 1398/971 Bp (DNA/cDNA)	5'-TCCATGGCCCAATCTTCTAC-3'
	LS395	<i>reverse</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 2 Exon von At4g37410; zu benutzen mit LS394, Produktgröße 1398/971 Bp (DNA/cDNA)	5'-GTCACGTGGCACATCGTATC-3'
CYP86A1	LS136	<i>forward</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_107454; zu benutzen mit LS137, Produktgröße WT=946 Bp, MT=458-758 Bp	5'-AGCAACATCTGCTTCCCCTTG-3'
	LS137	<i>reverse</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_107454; zu benutzen mit LS136, Produktgröße WT=946 Bp, MT=458-758 Bp	5'-GGACTTTCGTGCCAAGAGGCT-3'
	LS230	<i>forward</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_104083; zu benutzen mit LS231, Produktgröße WT=1078 Bp, MT=492-792 Bp	5'-AACGAGTTTCTTGAGCTCAAG-3'
	LS231	<i>reverse</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_104083; zu benutzen mit LS230, Produktgröße WT=1078 Bp, MT=492-792 Bp	5'-ACCAGGATTCAAATACGTCG-3'
	LS246	<i>forward</i> Primer mit Gateway attB1-Adapter zur Amplifikation der GNS/CDS von At5g58860; für das Klonen in Gateway-Kompatible Vektoren; für die RT-PCR , bindet im 1 Exon; zu benutzen mit LS298, Produktgröße 2087/1630 Bp (DNA/cDNA)	5'-ggggacaagtgttgcacaaaaagcaggct ACAGAACAAAAGCAAAAAGCCTAAACC-3'
	LS248	<i>forward</i> Primer mit Gateway attB1-Adapter zur Amplifikation des Promotors (mit LS249) oder des Promotors und der GNS (mit LS298) von At5g58860; für das Klonen in Gateway-Kompatible Vektoren; zu benutzen mit LS249, Produktgröße 1478 Bp; zu benutzen mit LS298, Produktgröße 3480 Bp	5'-ggggacaagtgttgcacaaaaagcaggct ACGTGTTGATTATGTTGATGATGCTGAG-3'
	LS249	<i>reverse</i> Primer mit Gateway attB2-Adapter zur Amplifikation des Promotors von At5g58860; für das Klonen in Gateway-Kompatible Vektoren; zu benutzen mit LS248, Produktgröße 1478 Bp	5'-ggggaccactttgtacaagaagctgggt GGTTTAGGCTTTTGTCTTTGTCTGT-3'
	LS298	<i>reverse</i> Primer mit Gateway attB2-Adapter zur Amplifikation der GNS/CDS (mit LS246) oder des Promotors mit GNS (mit LS248) von At5g58860; für das Klonen in Gateway-Kompatible Vektoren; für die RT-PCR , bindet im 2 Exon; zu benutzen mit LS246, Produktgröße 2087/1630 Bp (DNA/cDNA); zu benutzen mit LS248, Produktgröße 3480 Bp	5'-ggggaccactttgtacaagaagctgggt TGCAAGCACCTCACACGAG-3'
CYP705A1	LS226	<i>forward</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_043195; zu benutzen mit LS227, Produktgröße WT=983 Bp, MT=461-761 Bp	5'-AGGCACACAGTTTATGGATGC-3'
	LS227	<i>reverse</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_043195; zu benutzen mit LS226, Produktgröße WT=983 Bp, MT=461-761 Bp	5'-TTCCAGTTTAATGCTCGCAC-3'
	LS396	<i>forward</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 1 Exon von At4g15330; zu benutzen mit LS397, Produktgröße 918/848 Bp (DNA/cDNA)	5'-GGAAGCGTCCAGATTCGTTA-3'
	LS397	<i>reverse</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 2 Exon von At4g15330; zu benutzen mit LS396, Produktgröße 918/848 Bp (DNA/cDNA)	5'-CAATCGCGGTTCTACAAAT-3'
CYP705A13	LS228	<i>forward</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_053188; zu benutzen mit LS229, Produktgröße WT=1056 Bp, MT=491-791 Bp	5'-TGGGAAGGAAAGTCACAGATG-3'
	LS229	<i>reverse</i> Primer zur Genotypisierung von SALK_053188; zu benutzen mit LS228, Produktgröße WT=1056 Bp, MT=491-791 Bp	5'-AAATTGGAAATATTGTTTCTTCC-3'
	LS398	<i>forward</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 1 Exon von At2g14100; zu benutzen mit LS399, Produktgröße 917/835 Bp (DNA/cDNA)	5'-TGTTACGCAGGCTGTTGAG-3'
	LS399	<i>reverse</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 2 Exon von At2g14100; zu benutzen mit LS398, Produktgröße 917/835 Bp (DNA/cDNA)	5'-TGCAAGTTGCATTCGAGAAAC-3'
T-DNA	LBb1 (LS015)	<i>Left boarder</i> Primer der pROK2-Vektors, der für die Erzeugung der T-DNA Insertionsmutanten von SALK benutzt wird; zu benutzen mit allen Primern zur Genotypisierung	5'-GCGTGGACCGTCTGCTGCAACT-3'
Aktin2	LS096	<i>forward</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 1 Exon von At5g09810; zu benutzen mit LS100, Produktgröße 566/480 Bp (DNA/cDNA)	5'-GTGATGATGCCCCGAGAGC-3'
	LS100	<i>reverse</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 2 Exon von At5g09810; zu benutzen mit LS096, Produktgröße 566/480 Bp (DNA/cDNA)	5'-GACCCGAAGATCAAGACGA-3'
RD29A	LS232	<i>forward</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 1 Exon von At5g52310; zu benutzen mit LS233, Produktgröße 969/885 Bp (DNA/cDNA)	5'-GGAAGAGTCGGCTGTTTCAG-3'
	LS233	<i>reverse</i> Primer für die RT-PCR ; bindet im 2 Exon von At5g52310; zu benutzen mit LS232, Produktgröße 969/885 Bp (DNA/cDNA)	5'-GTGCTCTGTTTGGCTCCTC-3'
Vektor	M13 (-20) forw	Standard Sequenzierungsprimer für die verwendeten Vektoren	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
	M13 rev	Standard Sequenzierungsprimer für die verwendeten Vektoren	5'-CAGGAACAGCTATGAC-3'

8.4. Verwendete und erzeugte Vektoren

8.4.1. Verwendete Ausgangsvektoren

pDONR/Zeo (Invitrogen)

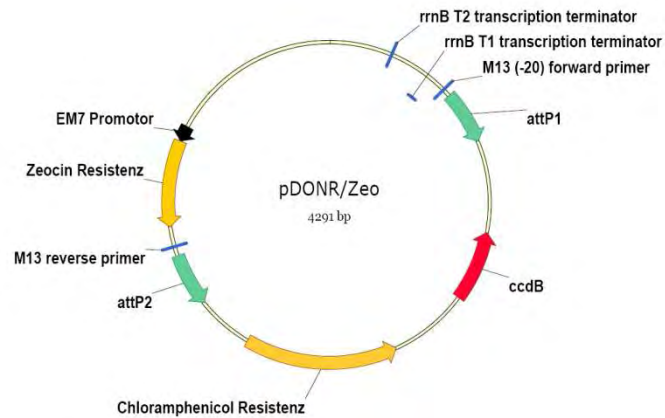


Abbildung 35: Vektorkarte des Donorvektors pDONR/Zeo.

pMDC-Vektoren (Curtis und Grossniklaus, 2003)

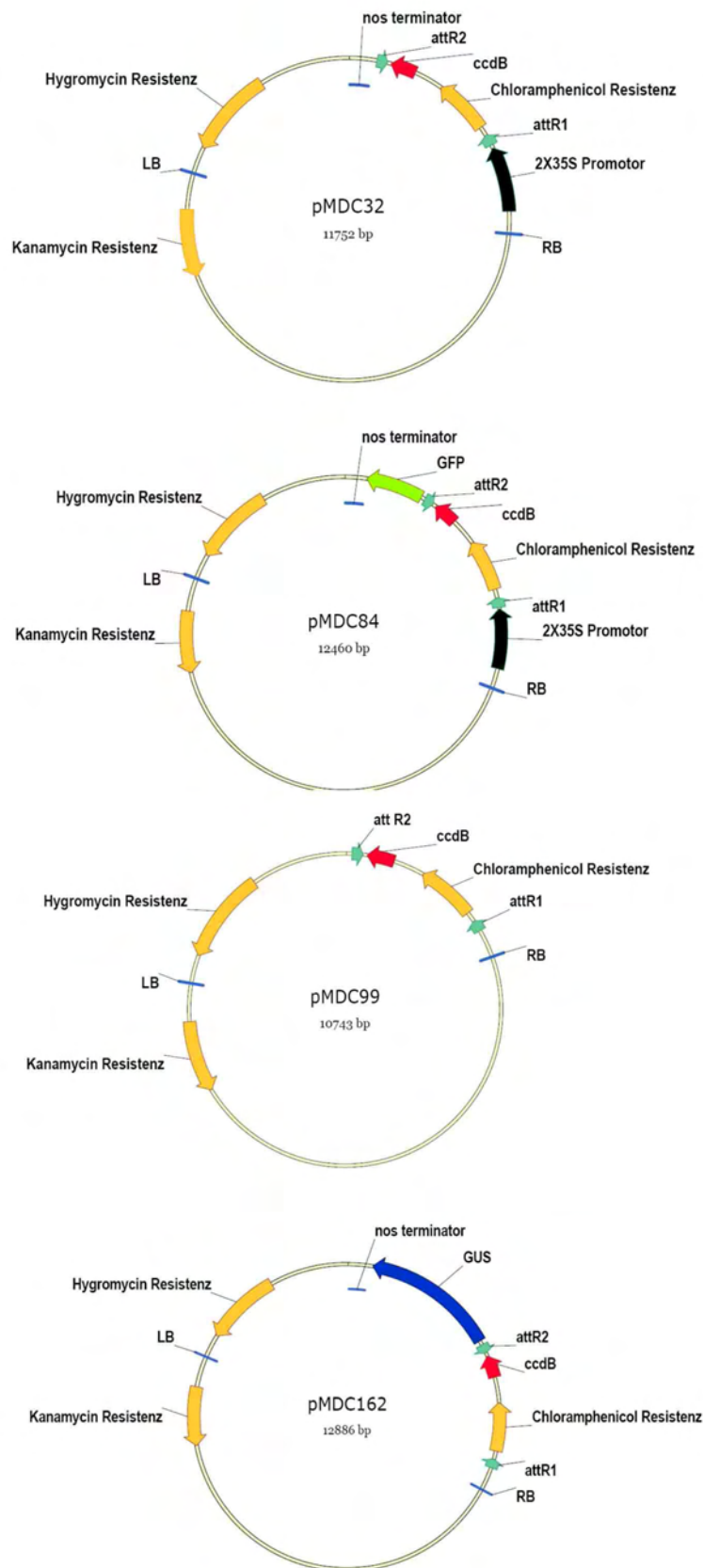


Abbildung 36: Vektorkarten der Ausgangsvektoren (pMDC-Vektoren).

Die pMDC-Vektoren wurden von Mark D. Curtis vom Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich bezogen (Curtis und Grossniklaus, 2003).

8.4.2. Erzeugte Vektoren

Durch BP-Reaktionen erzeugte Vektoren

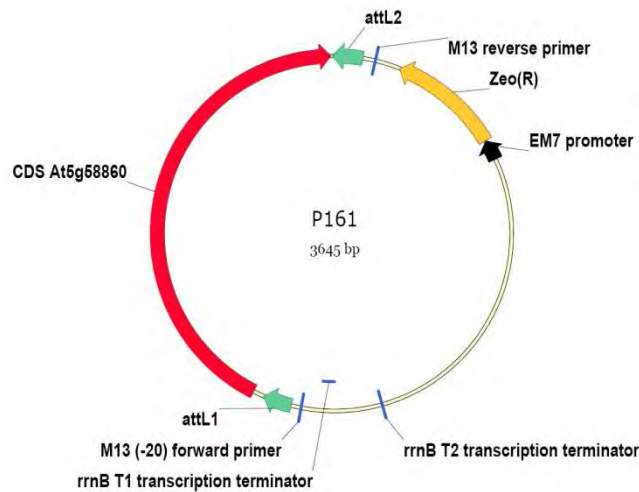


Abbildung 37: Vektorkarte von P161 mit der CDS von *CYP86A1* (At5g58860).

Der Vektor wurde durch die Rekombination des Donorvektors pDONR/Zeo mit der *attB*-Schnittstellen flankierten CDS von *CYP86A1* (At5g58860) erzeugt.

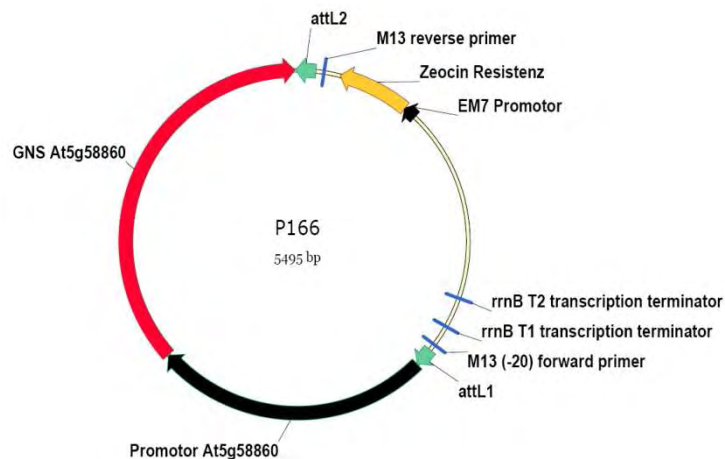


Abbildung 38: Vektorkarte von P166 mit dem Promotor und der GNS von *CYP86A1* (At5g58860).

Der Vektor wurde durch die Rekombination des Donorvektors pDONR/Zeo mit der *attB*-Schnittstellen flankierten Promotor/GNS von *CYP86A1* (At5g58860) erzeugt.

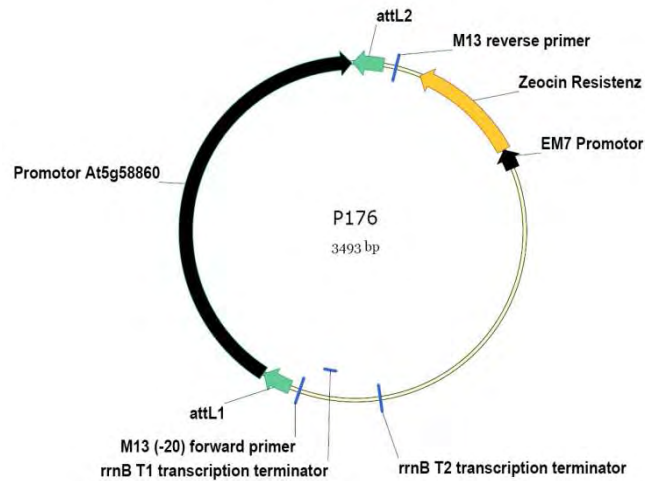


Abbildung 39: Vektorkarte von P176 mit dem Promotor von *CYP86A1* (At5g58860).

Der Vektor wurde durch die Rekombination des Donorvektors pDONR/Zeo mit dem *attB*-Schnittstellen flankierten Promotor von *CYP86A1* (At5g58860) erzeugt.

Durch LR-Reaktionen erzeugte Vektoren

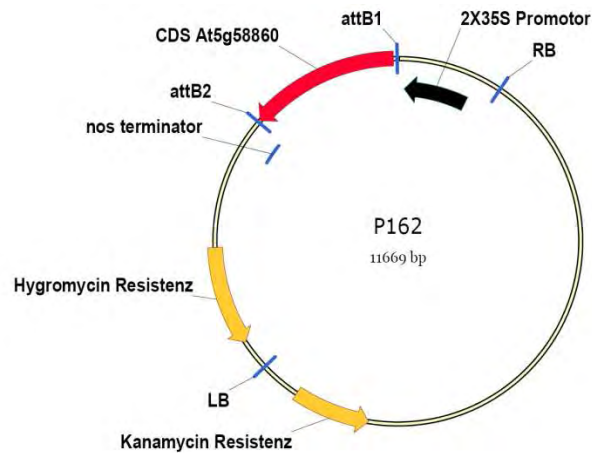


Abbildung 40: Vektorkarte von P162 mit einem 2X35S Promotor und der CDS von *CYP86A1* (At5g58860).

Der Vektor wurde durch die Rekombination von P161 und pMDC32 erzeugt.

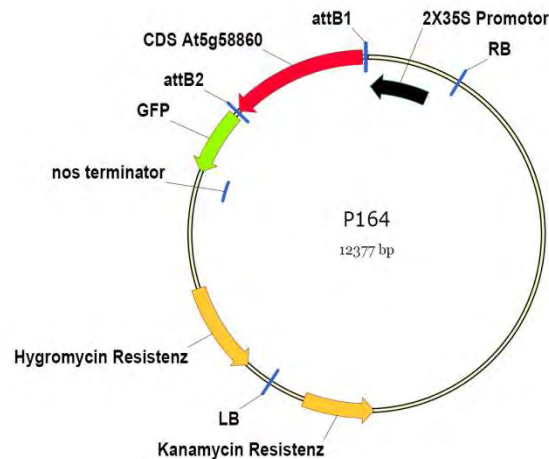


Abbildung 41: Vektorkarte von P164 mit einem 2X35S Promotor, der CDS von *CYP86A1* (At5g58860) und der CDS des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).

Der Vektor wurde durch die Rekombination von P161 und pMDC84 erzeugt.

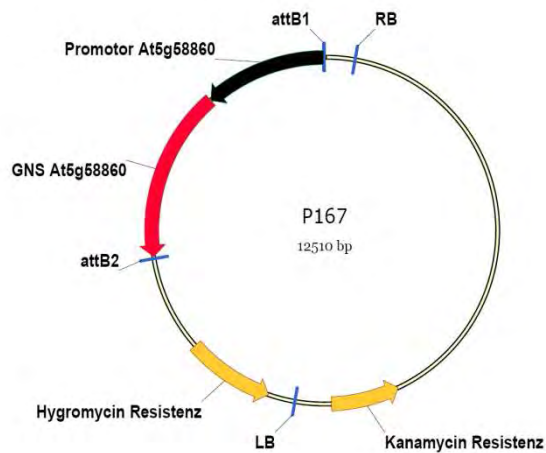


Abbildung 42: Vektorkarte von P167 mit dem Promotor und der GNS von *CYP86A1* (At5g58860).

Der Vektor wurde durch die Rekombination von P166 und pMDC99 erzeugt.

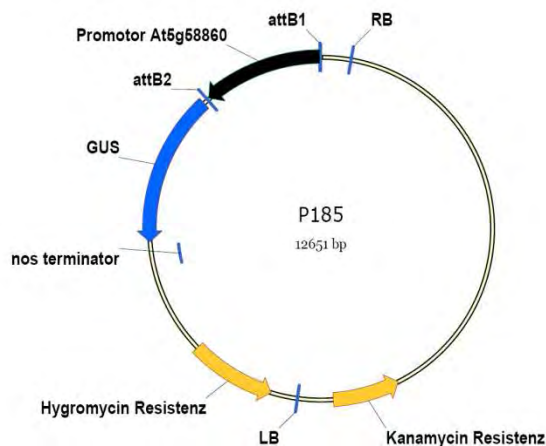


Abbildung 43: Vektorkarten von P185 mit dem Promotor von *CYP86A1* (At5g58860) und der CDS des *GUS*-Gens.

Der Vektor wurde durch die Rekombination von P176 und pMDC162 erzeugt.

8.5. Ergänzende Ergebnisse

8.5.1. Detaillierte Daten der Analyse des Wurzelsuberins von *Arabidopsis* nach NaCl-Behandlung

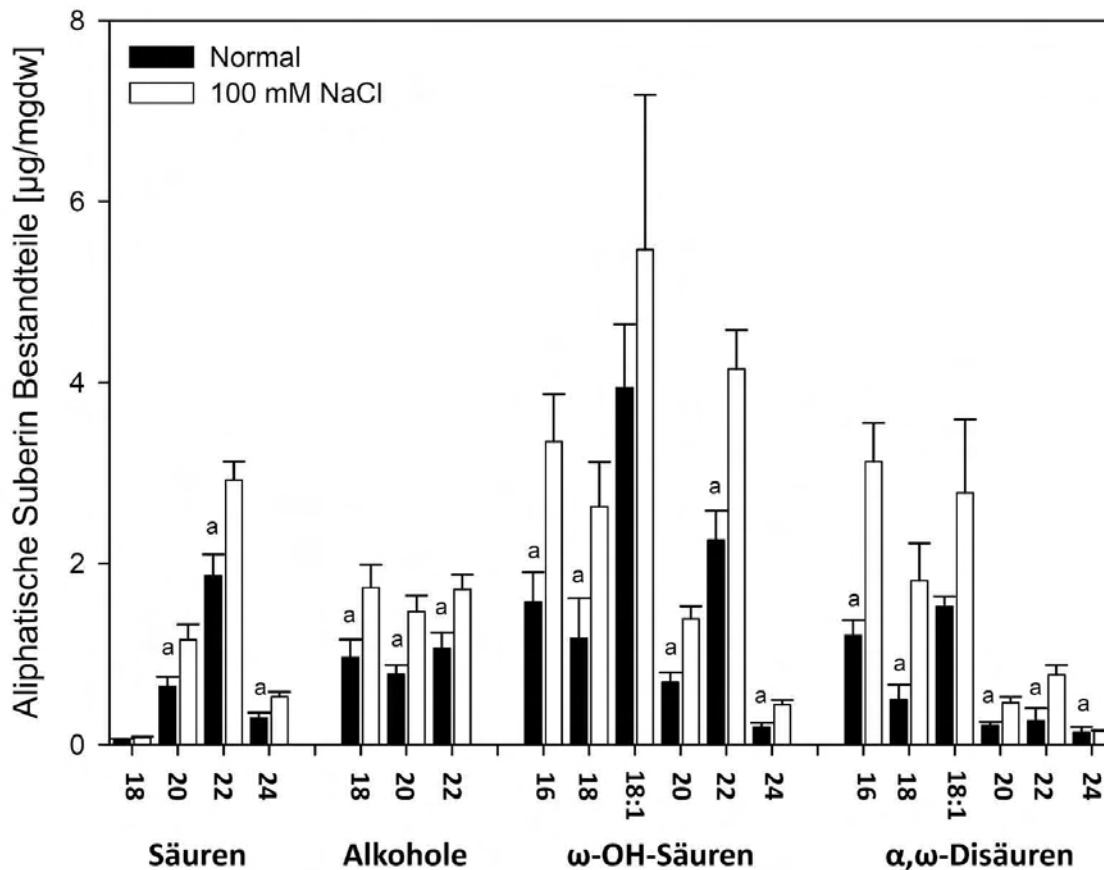


Abbildung 44: Monomere Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von *Arabidopsis* bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.

Bei der Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen wurde dem Gießwasser 100 mM NaCl zugegeben. Nach 35 d wurden die Pflanzen geerntet und die aliphatische Suberinzusammensetzung analysiert. Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei parallelen Analysen \pm Standardabweichung in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht. Jede Parallele enthielt 3-12 mg isolierte, suberinisierte Wurzelzellwände. a= Unterschied zu über 99 % signifikant. Mit ω -OH-Säuren= ω -Hydroxysäuren.

8.5.2. Organ- und entwicklungsspezifische Expressionsanalyse von *CYP86A1*

Die in 3.1 durchgeführte Analyse der Zusammensetzung des aliphatischen Suberins im Verlauf der Wurzelentwicklung von *Arabidopsis* zeigt, dass ω -Hydroxysäuren eine der prominentesten Stoffklassen sind. Zum besseren Verständnis der Suberinbiosynthese sollte die Expression der Fettsäure ω -Hydroxylase *CYP86A1* mit diesen Daten korreliert werden.

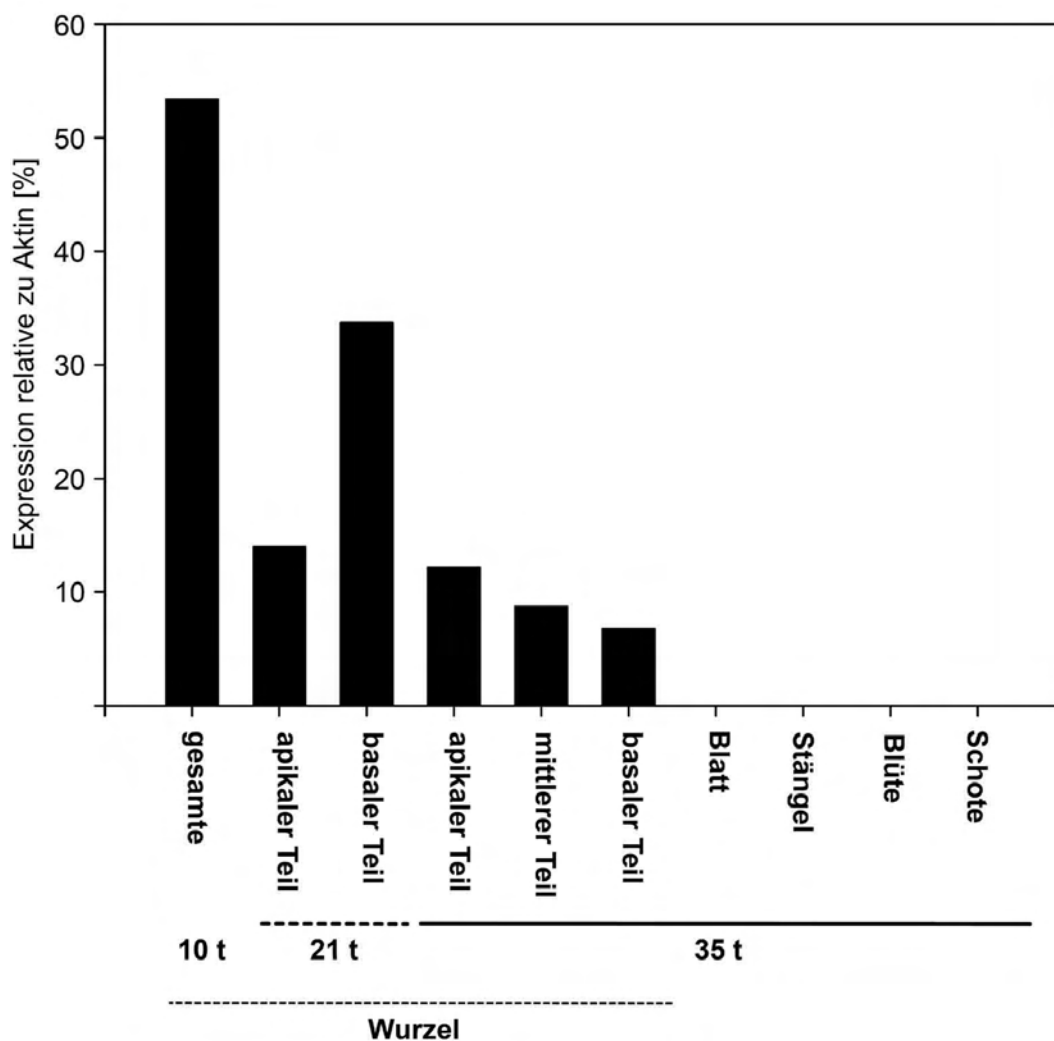


Abbildung 45: Organ- und entwicklungsspezifische Expressionsanalyse von *CYP86A1*.

Die Gesamt-RNA von Organen und Wurzelteilen von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde extrahiert und in einer semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Die Wurzeln wurden wie in Abbildung 11 dargestellten unterteilt. Die Bandenstärke von *CYP86A1* wurde densitometrisch ermittelt und relativ zur Bandenstärke von *Aktin* aufgetragen.

8.5.3. Vergleich der Wurzeloberfläche von *cyp705a1* und dem Wildtyp

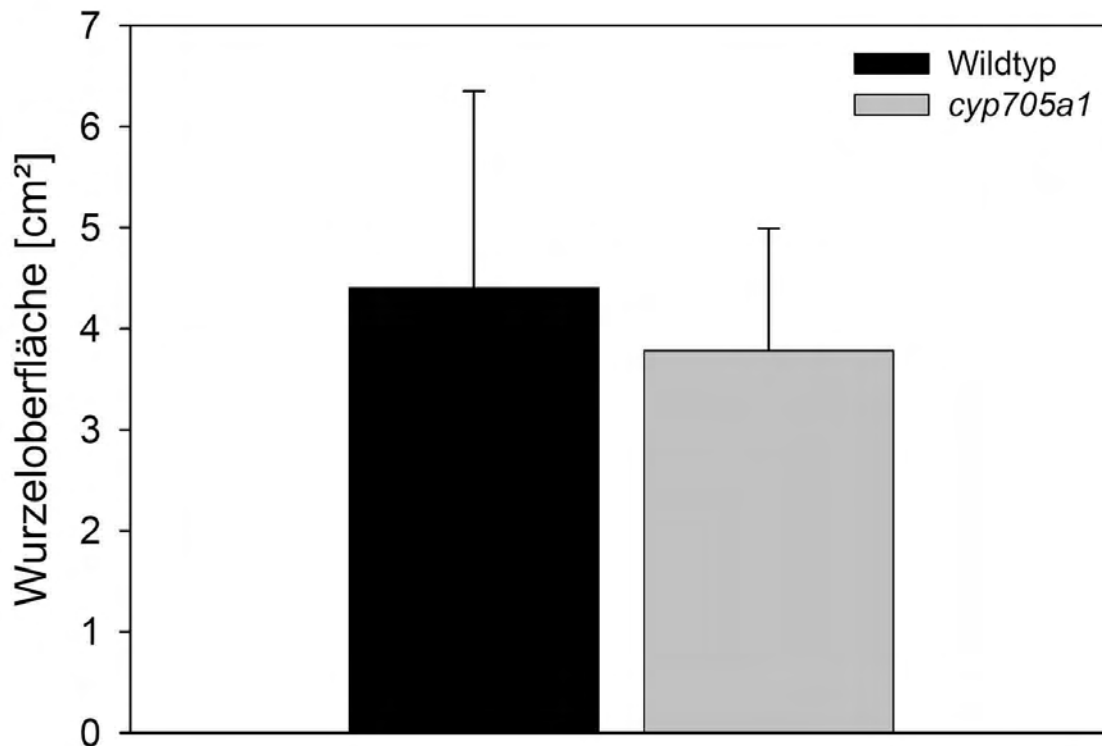


Abbildung 46: Vergleich der Wurzeloberfläche von *cyp705a1* und dem Wildtyp.

Gezeigt ist die durchschnittliche Wurzeloberfläche von *cyp705a1* und dem Wildtyp in $\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung von mindestens 20 Einzelwurzeln. Die Wurzeln wurden eingescannt und die Wurzeloberfläche anhand der Pixelanzahl errechnet.

8.5.4. Expressionslevel von *CYP86A1* in Pflanzen, die mit einem 2X35S:*CYP86A1* Konstrukt transformiert wurden

Die erfolgreiche Expression von *CYP86A1* in Schwesterpflanzen, der in 3.8.2 untersuchten Pflanzen, sollte überprüft werden. Da die untersuchten Pflanzen weiter angezogen wurden um Samen zu erhalten, konnte die Expression von *CYP86A1* nur in den Blättern überprüft werden. Es ist jedoch aufgrund des konstitutiven 35S-Promotors davon auszugehen, dass das Expressionslevel von *CYP86A1* in den Blättern mit dem Expressionslevel in der Wurzel vergleichbar ist.

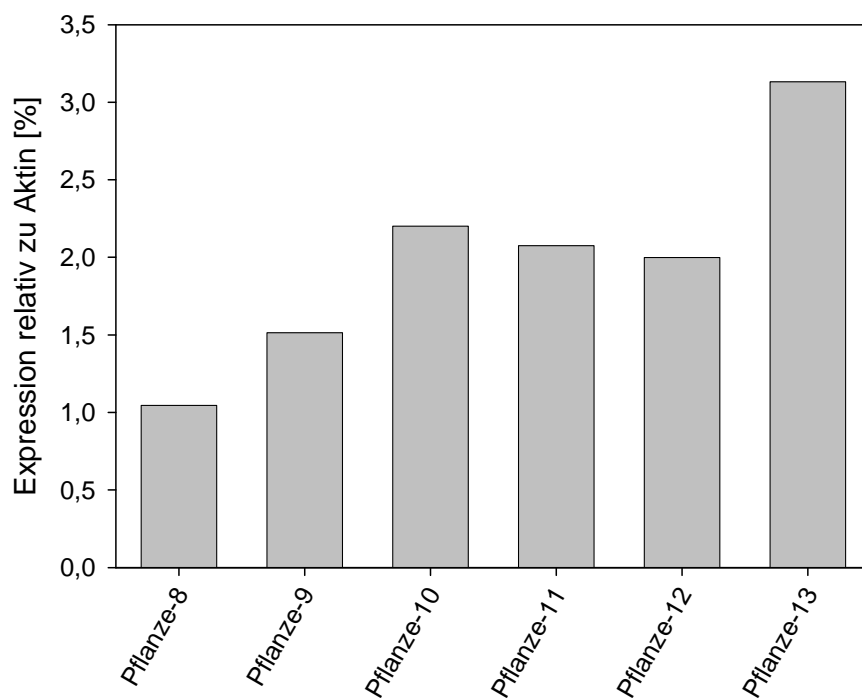


Abbildung 47: : Expressionsanalyse von *CYP86A1* in 2X35S:*CYP86A1*:*cyp86a1-1* Pflanzen

Die Gesamt-RNA von Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde extrahiert und 100 ng RNA in einer semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Die Bandenstärke von *CYP86A1* wurde densitometrisch ermittelt und relativ zur Bandenstärke von *Aktin* aufgetragen. Im Wildtyp ist keine Expression von *CYP86A1* in den Blättern nachweisbar (nicht gezeigt).

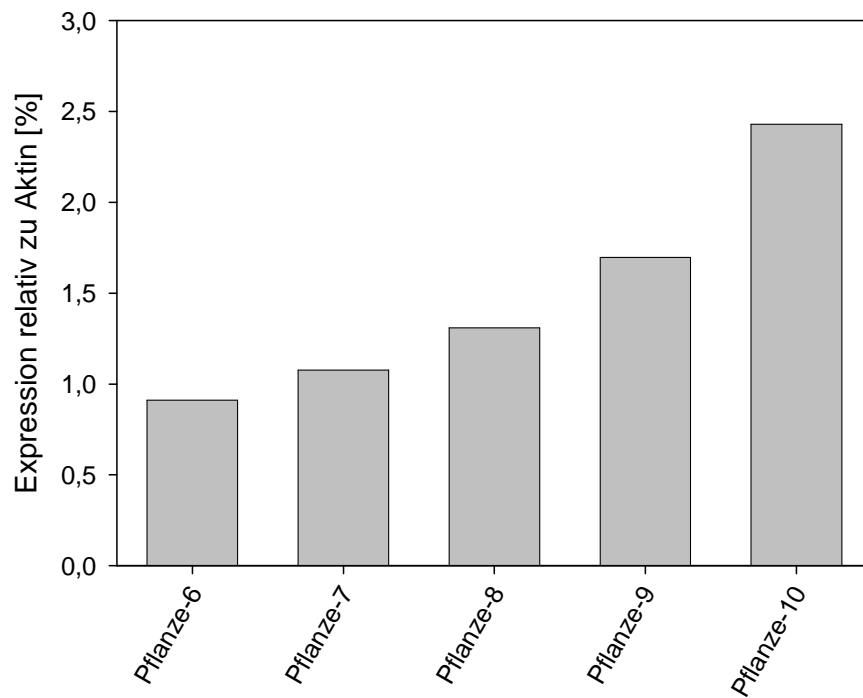


Abbildung 48: Expressionsanalyse von *CYP86A1* in 2X35S:*CYP86A1*:Wildtyp Pflanzen

Die Gesamt-RNA von Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde extrahiert und 100 ng RNA in einer semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Die Bandenstärke von *CYP86A1* wurde densitometrisch ermittelt und relativ zur Bandenstärke von *Aktin* aufgetragen. Im Wildtyp ist keine Expression von *CYP86A1* in den Blättern nachweisbar (nicht gezeigt).

8.5.5. Detaillierte Daten der Analyse des Blattkutins der *cyp86a1* Mutanten und des *Arabidopsis*-Wildtyp

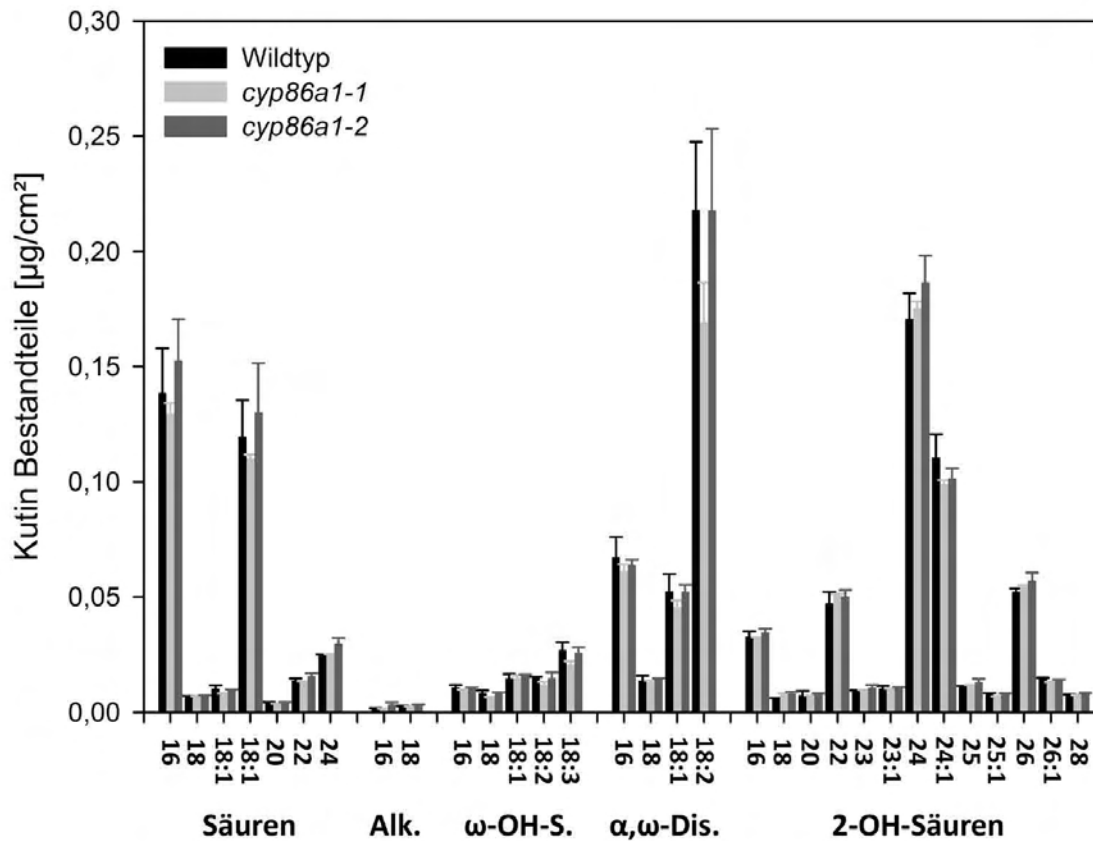


Abbildung 49: Monomere Zusammensetzung des Blattkutins der *cyp86a1* Mutanten und des *Arabidopsis*-Wildtyp.

Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel in $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit je 15-20 Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen. Mit Alk.= Alkohole; ω-OH-S.= ω-Hydroxysäuren; 2-OH-Säuren= „-Hydroxysäuren.

8.5.6. Detaillierte Daten der Analyse des Samenschalenpolyesters der *cyp86a1-1* Mutante und des *Arabidopsis*-Wildtyp

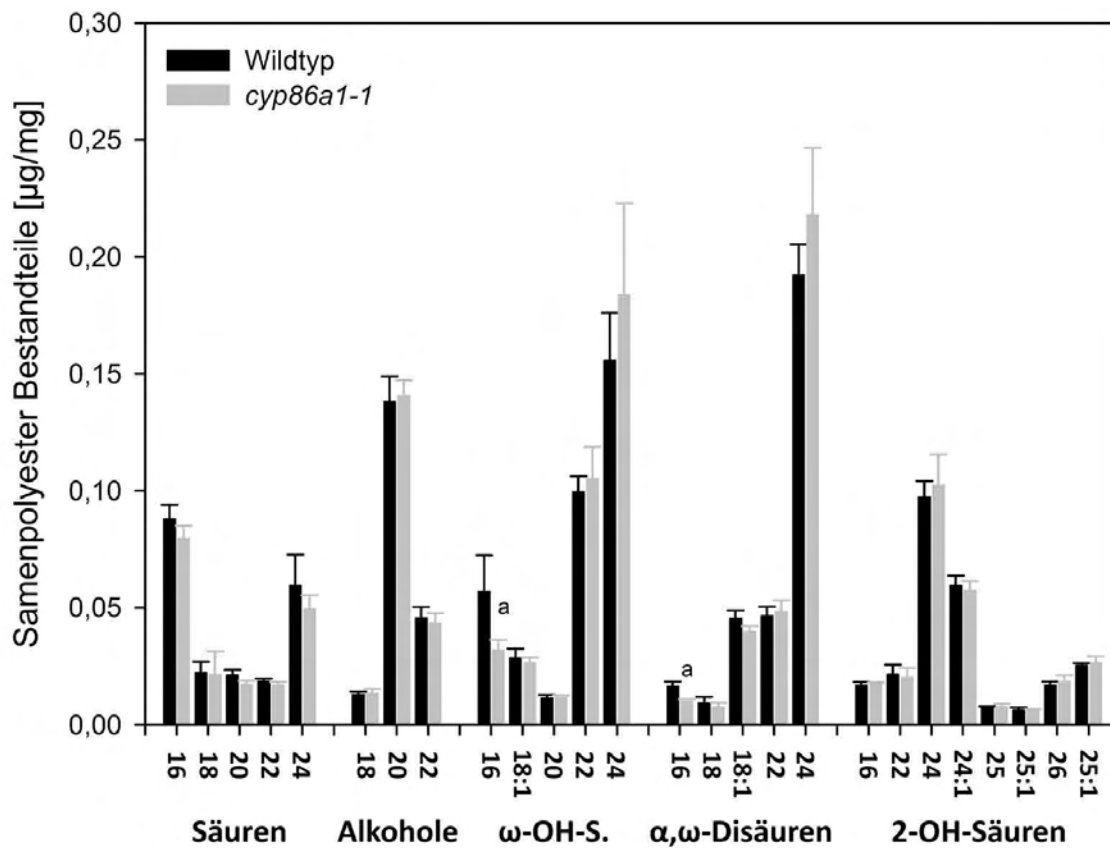


Abbildung 50: Monomere Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der *cyp86a1-1* Mutante und des *Arabidopsis*-Wildtyp.

Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel in $\mu\text{g mg}^{-1} \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit mindestens 16 mg Samen. a=Unterschied zu über 99 % signifikant. Mit ω -OH-S.= ω -Hydroxysäuren, 2-OH-Säuren= 2-Hydroxysäuren.

8.5.7. Detaillierte Daten der Analyse des Blattwachses der *cyp86a1-1* Mutante und des *Arabidopsis*-Wildtyp

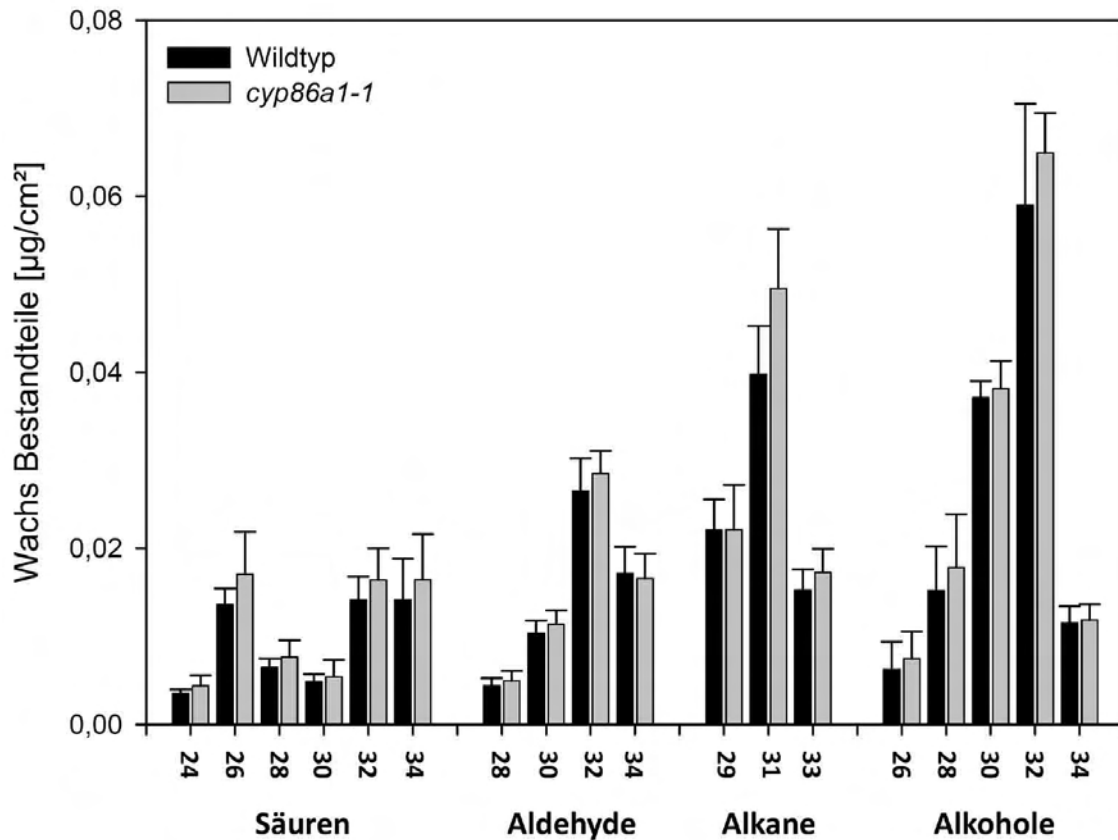


Abbildung 51: Monomere Zusammensetzung des Blattwachses der *cyp86a1-1* Mutante und des *Arabidopsis*-Wildtyp.

Gezeigt ist jeweils das arithmetische Mittel in $\mu\text{g cm}^{-2} \pm$ Standardabweichung von fünf parallelen Analysen mit je 7 Blättern von 35 d alten *Arabidopsis*-Pflanzen.

8.6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Modell von Kutin- und Suberinablagerungen.....	3
Abbildung 2: Aktuelles zweidimensionales Modell der Suberinstruktur und TEM-Aufnahme der Suberinlamellen.....	6
Abbildung 3: Vereinfachtes Modell der Suberinbiosynthese.....	8
Abbildung 4: Reaktionsmechanismus von P450.....	10
Abbildung 5: Prinzip einer kompetitiven PCR zur Genotypisierung.	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer BP-Reaktion.	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer LR-Reaktion.	27
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer säurekatalysierten Umesterung eines Polyesters.....	32
Abbildung 9: Beispiel einer Derivatisierung von Suberinmonomeren mit BSTFA.	33
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Temperaturprogramme für Suberin und Wachs.....	34
Abbildung 11: Untersuchte Altersstadien und Wurzelzonen von <i>Arabidopsis</i> und Verteilung von Suberin in den Wurzeln.	37
Abbildung 12: Zusammensetzung des aliphatischen Suberins in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von <i>Arabidopsis</i>	39
Abbildung 13: Kettenlängenverteilung der aliphatischen Suberinmonomere in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von <i>Arabidopsis</i>	40
Abbildung 14: Gesamtmenge des aliphatischen Suberins in den untersuchten Altersstadien und Wurzelzonen von <i>Arabidopsis</i> und Vergleich der Gesamtmenge des aliphatischen Suberins in den 35 d alten Wurzelzonen bei unterschiedlichen Bezugsgrößen.	41
Abbildung 15: Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von <i>Arabidopsis</i> bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.	42
Abbildung 16: Relative Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von <i>Arabidopsis</i> bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.	44
Abbildung 17: Die 20 <i>P450</i> mit der höchsten Summe aller Signale über die ganze Wurzel, beziehungsweise der Endodermis von <i>Arabidopsis</i>	46
Abbildung 18: Organspezifische Expressionsanalyse der Kandidatengene.	49
Abbildung 19: Expression von <i>RD29A</i> in mit NaCl behandelten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	50

Abbildung 20: Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene bei NaCl-Behandlung.	52
Abbildung 21: Transkriptionelle Regulation der Kandidatengene bei Mannitolbehandlung.	54
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Genloki der Kandidatengene mit Position der T-DNA Insertion und der Primer die zur Bestätigung des transkriptionellen Knockout verwendet wurden.	56
Abbildung 23: RT-PCR zur Bestätigung des transkriptionellen Knockout der Kandidatengene in den korrespondierenden T-DNA Insertionsmutanten.....	57
Abbildung 24: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>cyp81f4</i> Mutante und des Wildtyp.	59
Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von <i>cyp86a1</i> Mutanten und des Wildtyp.....	60
Abbildung 26: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>cyp705a1</i> Mutante und des Wildtyp.....	61
Abbildung 27: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>cyp81f4</i> Mutante und des Wildtyp im Bezug auf die Wurzeloberfläche.	62
Abbildung 28: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>cyp705a1</i> Mutante und des Wildtyp im Bezug auf die Wurzeloberfläche.	63
Abbildung 29: Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i> und Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins in der komplementierten <i>cyp86a1-1</i> Mutanten und dem Wildtyp.....	65
Abbildung 30: Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von mit 2X35S:CYP86A1 transformierten <i>cyp86a1-1</i> und Wildtyp-Pflanzen.....	67
Abbildung 31: Kutin-, Samenschalen- und Wachsanalyse vom <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp und <i>cyp86a1</i> Mutanten.	69
Abbildung 32: Wurzelwachstum von <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp und <i>cyp86a1</i> Mutanten auf MS-Agarplatten unter normalen Bedingungen und bei NaCl-Behandlung.....	70
Abbildung 33: GUS Aktivität in Promotor _{CYP86A1} :GUS Konstrukt transformierten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	72
Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation eines CYP86A1-GFP-Fusionsproteins in der Epidermis von <i>N. benthamiana</i> Blättern.	74
Abbildung 35: Vektorkarte des Donorvektors pDONR/Zeo.....	115
Abbildung 36: Vektorkarten der Ausgangsvektoren (pMDC-Vektoren).....	116

Abbildung 37: Vektorkarte von P161 mit der CDS von <i>CYP86A1</i> (At5g58860).....	117
Abbildung 38: Vektorkarte von P166 mit dem Promotor und der GNS von <i>CYP86A1</i> (At5g58860).....	117
Abbildung 39: Vektorkarten von P176 mit dem Promotor von <i>CYP86A1</i> (At5g58860).	118
Abbildung 40: Vektorkarte von P162 mit einem 2X35S Promotor und der CDS von <i>CYP86A1</i> (At5g58860).	118
Abbildung 41: Vektorkarte von P164 mit einem 2X35S Promotor, der CDS von <i>CYP86A1</i> (At5g58860) und der CDS des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). .	119
Abbildung 42: Vektorkarte von P167 mit dem Promotor und der GNS von <i>CYP86A1</i> (At5g58860).....	119
Abbildung 43: Vektorkarten von P185 mit dem Promotor von <i>CYP86A1</i> (At5g58860) und der CDS des <i>GUS</i> -Gens.....	119
Abbildung 44: Monomere Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins von <i>Arabidopsis</i> bei Anzucht unter NaCl-Einfluss.	120
Abbildung 45: Organ- und entwicklungspezifische Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i>	121
Abbildung 46: Vergleich der Wurzeloberfläche von <i>cyp705a1</i> und dem Wildtyp.	122
Abbildung 47: : Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i> in 2X35S: <i>CYP86A1</i> : <i>cyp86a1-1</i> Pflanzen.....	123
Abbildung 48: Expressionsanalyse von <i>CYP86A1</i> in 2X35S: <i>CYP86A1</i> :Wildtyp Pflanzen.....	124
Abbildung 49: Monomere Zusammensetzung des Blattkutins der <i>cyp86a1</i> Mutanten und des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp.	125
Abbildung 50: Monomere Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der <i>cyp86a1-1</i> Mutante und des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp.....	126
Abbildung 51: Monomere Zusammensetzung des Blattwachses der <i>cyp86a1-1</i> Mutante und des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp.	127

8.7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes mit <i>Tfi</i> -DNA-Polymerase.	18
Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes mit <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase.	19
Tabelle 3: Temperaturprogramm für die PCR.....	19
Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermixes.....	20
Tabelle 5: Temperaturprogramm für die RT-PCR.....	20
Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Restriktionsverdau.	21
Tabelle 7: Verwendete SALK-Linien und Genotypisierungsprimer.	22
Tabelle 8: Temperaturprogramme für GC-FID und GC-MS.....	34
Tabelle 9: Expression in verschiedenen Pflanzenorganen der 20 am stärksten in der Wurzel exprimierten <i>P450</i> von <i>Arabidopsis</i>	45
Tabelle 10: Verwendete Primer mit Verwendung, Nummer und Sequenz.....	114

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, 03.09.2008

Publikationsliste

- Franke R, Höfer R Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L.** 2008. The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza microphyle region of seeds. *The Plant Journal*, im Druck.
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R.** 2008. The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2347-2360
- Panikashvili D., Savaldi-Goldstein S., Mandel T., Yifhar T., Franke R.B., Höfer R., Schreiber L., Chory J., Aharoni A.** 2007. The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 Transporter Is Required for Cutin and Wax Secretion. *Plant Physiology* **145**, 1345-1360.

Danksagung

Vielen Dank an,

- Herr Prof. Dr. Lukas Schreiber für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe zu promovieren und interessante und lehrreiche Gespräche und Diskussionen.
- Herr PD Dr. Rochus Franke für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit, all die Diskussionen und Beratungen und die Erfrischungsgetränke im Garten.
- Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Diedrik Menzel besonders PD Dr. Jozef Šamaj für die Möglichkeit zur Benutzung des Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop und die Betreuung bei der Auswertung der Bilder.
- Meinen besonderen Dank den derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe "Ökophysiologie Pflanzlicher Grenzflächen" für die nette Zusammenarbeit, eine freundliche Arbeitsatmosphäre und den Pausen zwischendurch. Neben Lukas und Bennie sind noch Tina Ballmann, Beatrix Bartolomey, Anja Bodenheim, Isabel Briesen, Sheron De Oliveira, Patrick Diehl, Mitja Emserman, Andrea Faust, Carolin Hohn, Mathias Krampitz, Marlene Kühne, Stephanie Ludwig und Kosala Ranathunge zu nennen.
- Meinen Freunden für die Ablenkung von der Arbeit und für fachfremde Gespräche.....
- Martina für ihre Unterstützung in guten und schlechten Zeiten.
- Meinen Eltern und meinem Bruder für Alles!