

**Untersuchungen zur Regulation und  
Biosynthese apoplastischer Polyester in  
höheren Pflanzen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Marc Stefan Frenger  
aus Leverkusen

Bonn 2014



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

1. Gutachter: PD Dr. Rochus Benni Franke
2. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 2015

Erscheinungsjahr: 2015



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Grenzflächen höherer Pflanzen	2
1.2	Kutin und Wachse als Bestandteile oberirdischer Grenzflächen	2
1.3	Suberin als Bestandteil pflanzlicher Grenzflächen	4
1.3.1	Biosynthese des Suberinpolyesters	7
1.4	GDSL-Lipasen	10
1.5	MYB-Transkriptionsfaktoren	11
1.6	NAC-Transkriptionsfaktoren	11
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien	16
2.2	Pflanzenmaterial	16
2.3	Pflanzenanzucht	16
2.3.1	Erdkultur	16
2.3.2	Hydrokultur	17
2.3.3	Sterile Anzucht auf MS-Agar	17
2.4	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.5	Identifikation potentieller Kandidatengene in der Suberinbiosynthese	18
2.6	Molekularbiologische Arbeiten	19
2.6.1	Präparation genomischer DNA	19
2.6.2	Präparation pflanzlicher RNA	19
2.6.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.6.5	Gelelektrophorese	22
2.6.6	Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten	22
2.6.7	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	23
2.6.8	cDNA Synthese	25
2.6.9	Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)	25
2.7	Mikrobiologische Arbeiten	26
2.7.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	26
2.7.2	Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	27
2.7.3	Präparation, Restriktionsverdau und Sequenzierung bakterieller Plasmid-DNA	27
2.7.4	Langzeit-Lagerung transformierter Bakterien	28

<b>2.8</b>	<b>Generierung transgener <i>A. thaliana</i> Pflanzen</b> .....	<b>28</b>
2.8.1	BP-Reaktion zur Herstellung des <i>entry clone</i> .....	28
2.8.2	LR-Reaktion zur Erstellung des <i>expression clone</i> .....	30
2.8.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
2.8.3.1	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> für „Floral Dip“ .....	33
2.8.3.2	Durchführung der „Floral dip“-Methode.....	33
<b>2.9</b>	<b>Histologische und anatomische Studien</b> .....	<b>34</b>
2.9.1	Histochemische Färbung mit Sudan Rot 7B.....	34
2.9.2	Anfertigung von Wurzelquerschnitten mit dem Gefriermikrotom.....	34
2.9.3	Untersuchung der Genexpression mittels Reporter-genfusion.....	35
<b>2.10</b>	<b>Analytische Untersuchungen</b> .....	<b>36</b>
2.10.1	Präparation suberinisierter Wurzelzellwände von <i>A. thaliana</i> .....	36
2.10.2	Präparation suberinisierter Periderme von <i>A. thaliana</i> .....	36
2.10.3	Präparation suberinisierter Samenschalen von <i>A. thaliana</i> .....	37
2.10.4	Analyse der Kutin- und Suberin-Polyester und Blattwachse.....	37
2.10.4.1	Umesterung mit methanolischem Borontrifluorid.....	38
2.10.4.2	Umesterung mit methanolischer Salzsäure.....	39
2.10.4.3	Extraktion von Blattwachsen .....	39
2.10.4.4	Derivatisierung mit BSTFA.....	40
2.10.4.5	Gaschromatographie und Massenspektrometrie.....	40
2.10.4.6	Statistische Auswertung.....	42
<b>2.11</b>	<b>Physiologische Untersuchungen</b> .....	<b>43</b>
2.11.1	Trockenstress.....	43
2.11.2	Salzstress und osmotischer Stress .....	43
2.11.3	Verwundung.....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung von Kandidatengen der Suberinbiosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Genotypisierung und Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins in der <i>silip-2</i> Mutante</b> .....	<b>53</b>
3.3.1	Auswirkungen des <i>SiLip-2</i> Knockouts auf die Toleranz gegenüber Trockenstress...55	
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins in der <i>myb93</i> Mutante</b> .....	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung des Transkriptionsfaktors NAC058 in <i>Arabidopsis thaliana</i></b> <b>58</b>	
3.5.1	Untersuchungen der Suberinzusammensetzung der <i>anac058</i> Mutante.....	58
3.5.1.1	Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins .....	58
3.5.1.2	Untersuchung des peridermalen Suberins .....	61

3.5.1.3	Untersuchung des Samenschalensuberins .....	62
3.5.2	Auswirkungen des Knockouts auf die Expression charakterisierter Suberingene ...	65
3.5.3	Untersuchung der Genexpression unter Stressbedingungen .....	66
3.5.3.1	Salzstress.....	66
3.5.3.2	Verwundung .....	68
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierung des Transkriptionsfaktors <i>NAC038</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b>	<b>70</b>
3.6.1	Gewebespezifische Expressionsanalyse von <i>ANAC038</i> .....	70
3.6.2	Färbung suberinisierter Gewebe mit Sudan Rot 7B .....	72
3.6.3	Gaschromatographische Untersuchungen apoplastischer Polyester und Wachse in den <i>anac038</i> Mutanten.....	74
3.6.3.1	Untersuchung des Wurzelsuberins in der T-DNA Insertionsmutante <i>anac038-1</i> .....	74
3.6.3.2	Untersuchung des Wurzelsuberins in der T-DNA Insertionsmutante <i>anac038-2</i> .....	77
3.6.3.3	Untersuchung des Samenschalensuberins in der T-DNA Insertionsmutante <i>anac038-179</i>	
3.6.3.4	Untersuchung der Zusammensetzung der Blattwache in der T-DNA Insertionsmutante <i>anac038-1</i> .....	79
3.6.4	Anatomie primärer Wurzelbereiche von <i>anac038-1</i> Mutanten.....	80
3.6.5	Auswirkungen des Knockouts auf den Samenertrag .....	81
3.6.6	Auswirkungen des Knockouts auf die Expression charakterisierter Suberingene ...	82
3.6.7	Komplementation der Knockout Mutante <i>anac038-1</i> .....	83
3.6.8	Untersuchung der Genexpression unter Stressbedingungen .....	86
3.6.8.1	Salzstress.....	86
3.6.8.2	Verwundung .....	87
3.6.9	Auswirkungen des <i>ANAC038</i> Knockouts auf die Stresstoleranz .....	89
3.6.9.1	Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber Salzstress .....	89
3.6.9.2	Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber osmotischem Stress	91
3.6.9.3	Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber Trockenstress.	92
<b>3.7</b>	<b>Weiterführende Untersuchungen zu <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i></b> .....	<b>94</b>
3.7.1	Generierung und Untersuchung der Doppelmutante <i>anac058/anac038-1</i> .....	94
3.7.2	Überexpression von <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> in Wildtyp Pflanzen .....	97
3.7.2.1	Generierung von Überexpressionslinien und Messung der Genexpression .....	97
3.7.2.2	Auswirkungen der Überexpression von <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> auf die Expression charakterisierter Suberingene in Blättern.....	99
3.7.2.3	Untersuchung des Wurzelsuberins in den Überexpressionslinien .....	103
3.7.2.4	Auswirkungen der Überexpression von <i>ANAC038</i> auf die Expression charakterisierter Suberingene in Wurzeln.....	105
3.7.2.5	Untersuchungen der Zusammensetzung der aliphatischen Blattpolyester in den 35S:: <i>ANAC038</i> Linien .....	106
3.7.2.6	Untersuchungen der Blattwachs zusammensetzung in den 35S:: <i>ANAC038</i> Linien .....	109

3.7.3	Überexpression des <i>ANAC058</i> -Orthologs <i>NAC34</i> in Reis ( <i>Oryza sativa</i> ) .....	112
3.7.4	Identifizierung möglicher redundanter Gene für <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> .....	114
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>118</b>
4.1	Kandidatengene der Suberinbiosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	119
4.2	Die Bedeutung von SiLip-2 für die Suberinbiosynthese.....	121
4.3	Die Bedeutung von MYB93 für die Suberinbiosynthese.....	124
4.4	Die Bedeutung von <i>ANAC058</i> für die Suberinbiosynthese .....	125
4.4.1	<i>anac058</i> Mutanten weisen gewebeabhängig Unterschiede in der Suberinzusammensetzung auf.....	125
4.4.2	Veränderungen in der Expression von <i>ANAC058</i> haben Auswirkungen auf die Expression charakterisierter Suberingene.....	127
4.4.3	Identifizierung möglicher weiterer Zielgene und Hypothese der möglichen Funktion von <i>ANAC058</i> .....	129
4.4.4	Die Überexpression von <i>ANAC058</i> führt zu keiner messbaren Veränderung des Wurzelsuberins.....	132
4.4.5	Identifizierung möglicher redundanter Gene und Dimerisierungspartner .....	133
4.4.6	Die Rolle von <i>ANAC058</i> unter Stressbedingungen .....	134
4.5	Die Bedeutung von <i>ANAC038</i> für die Suberinbiosynthese .....	138
4.5.1	Gewebespezifische Lokalisation der Expression von <i>ANAC038</i> .....	138
4.5.2	<i>anac038</i> Mutanten weisen Gewebe abhängig Unterschiede in der Zusammensetzung apoplastischer Polyester auf.....	140
4.5.3	Wechselwirkungen von <i>ANAC038</i> mit charakterisierten Suberingenen.....	142
4.5.4	Die Rolle von <i>ANAC038</i> unter Stressbedingungen .....	144
4.5.5	Hat der <i>ANAC038</i> Knockout Auswirkungen auf die Stresstoleranz? .....	145
4.5.6	<i>35S::ANAC038</i> Pflanzen weisen Veränderungen des Kutin- und Wachsgehalts in Blättern auf .....	148
4.5.7	Hypothese der möglichen Funktion von <i>ANAC038</i> .....	149
4.5.8	Die Zusammensetzung des Wurzelsuberins der <i>anac058/anac038-1</i> Pflanzen erinnert an die <i>anac038-1</i> Mutante .....	153
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>158</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>172</b>
7.1	Verwendete Lösungen und Medien.....	173
7.2	Verwendete Chemikalien.....	174



<b>7.3</b>	<b>Berechnung der Hybridisierungstemperatur verwendeter Primer und Primertabelle .....</b>	<b>175</b>
<b>7.4</b>	<b>RTQ-Expressionsmessungen durch Daniela Nosbüsch.....</b>	<b>179</b>
<b>7.5</b>	<b>Analyse der Samenschalenpolyester von <i>anac038-1</i> Pflanzen (Sebastian Theobald, 2012) .....</b>	<b>180</b>
<b>7.6</b>	<b>Querschnitte von <i>anac038-1</i> und WT-Wurzeln .....</b>	<b>180</b>
<b>7.7</b>	<b>Trockenstressexperiment mit <i>anac038-1</i> und <i>anac038-2</i>.....</b>	<b>181</b>
<b>7.8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>182</b>
<b>7.9</b>	<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>185</b>
<b>7.10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>185</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
bp	Basenpaare
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
GDSL	Glycin, Aspartat (D), Serin und Leucin
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Mol
m	Meter
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometer
MYB	<i>Myeloblastosis</i>
NAC	<i>No apical meristem (NAM), Arabidopsis transcription activation factor (ATAF), Cup-shaped cotyledon (CUC)</i>
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
OH	Hydroxy
VI	

Osmol	Osmolarität
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PER	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RTQ-PCR	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SiLip	Suberin involvierte Lipase
TAE-Puffer	Tris-acetat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
U	Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
Üex	Überexpression
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen ( <i>weight per volume</i> )
w/w	Gewicht zu Gewicht ( <i>weight per weight</i> )
WT	Wildtyp



# **1 Einleitung**

## **1.1 Grenzflächen höherer Pflanzen**

Die Erschließung neuer Lebensräume birgt vielfältige Herausforderungen. Beim Übergang von der aquatischen zur terrestrischen Lebensweise bestand eine wichtige Herausforderung in der Etablierung eines funktionierenden Wasserhaushalts, da Wasser und Nährstoffe nicht mehr über die gesamte Pflanze sondern nur noch über hoch spezialisierte Organe aufgenommen werden können. Diese müssen von der Umwelt und umgebenden Geweben zum Schutz vor Wasserverlust und Diffusion abgegrenzt werden, um entgegen des vorherrschenden Wasserpotentialgradienten Wasser und Nährstoffe aufnehmen zu können. Durch Auf- und Einlagerung von hydrophoben Substanzen auf die Polysaccharide der Zellwände werden verschiedene Arten von Diffusionsbarrieren ausgebildet (Franke & Schreiber, 2007).

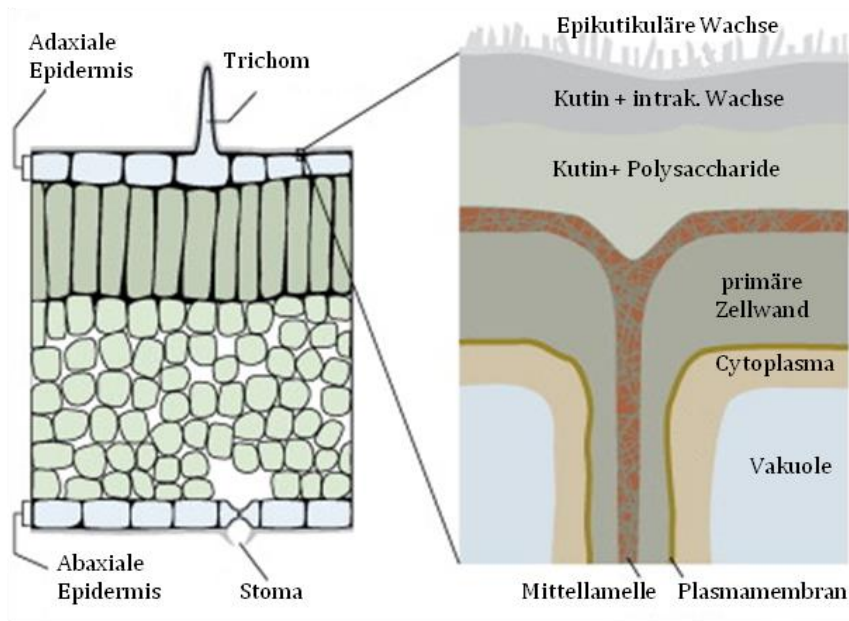
Extrazelluläre Diffusionsbarrieren können sowohl in unterirdischen als auch oberirdischen Organen der Pflanze gefunden werden und übernehmen zusätzlich weitere Aufgaben als Schutz vor biotischem und abiotischem Stress, dem Pflanzen auf Grund ihrer sessilen Lebensweise nicht durch Standortwechsel entgehen können.

## **1.2 Kutin und Wachse als Bestandteile oberirdischer Grenzflächen**

In höheren Pflanzen ist das äußere Abschlussgewebe aller oberirdischen Organe wie Blätter, Früchte und Sprossachse im primären Entwicklungszustand von der Kutikula bedeckt (PE Kolattukudy & Center, 1996). Wie in Abbildung 1 gezeigt, ist die Kutikula auf die Zellwand aufgelagert und vermutlich durch kovalente Bindungen an diese gebunden (Jeffree, 2006; Tian et al., 2008).

Sie besitzt eine Dicke von 0,1-10  $\mu\text{m}$  und ist stark wasserundurchlässig (Riederer & Schreiber, 2001). Den Hauptbestandteil der Kutikula bildet das Kutin, ein lipophiler Polyester, der überwiegend aus Glycerin und oxygenierten Aliphaten der Kettenlänge  $\text{C}_{16}$  oder  $\text{C}_{18}$  besteht, die über Esterbrücken verknüpft sind (Deas & Holloway, 1977; Kolattukudy, 1981; Kolattukudy, 2001). Zwischen verschiedenen Spezies kann die Zusammensetzung durchaus ebenso variieren wie zwischen verschiedenen Pflanzenorganen (Beisson, et al., 2007; Matzke & Riederer, 1991). Kutin formt das strukturelle Rückgrat der Kutikula. Dabei sorgen die kovalenten Bindungen zwischen den Monomeren für Stabilität und Widerstand gegen mechanische Schädigung (Samuels et al., 2008). Wäh-

rend die Bestandteile des Kutins mit Hilfe von hydrolytischer Depolymerisierung aus dem Polyester gelöst und anschließend analysiert werden konnten, besteht weiterhin eine nicht hydrolysierbare Fraktion der Kutikularmembran, die als Kutan bezeichnet wird. Deren Struktur und chemische Komposition ist bislang aber nicht ausreichend verstanden (Heredia, 2003; Villena et al., 1999).



**Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch ein Blatt mit aufliegender Kutikula**

Die Kutikula ist auf die äußere Zellwand der abaxialen und adaxialen Epidermis aufgelagert. Wie in der Vergrößerung dargestellt können epikutikuläre Wachse als äußerer Bestandteil der Kutikula identifiziert werden. Die darunter liegende Schicht (grau) bildet der Kutinpolyester mit intrakutikulären Wachsen, als Komponenten der darunter liegenden Schicht (oliv) werden der Kutinpolyester und Polysaccharide der Zellwand angenommen, wobei die Einlagerung epikutikulärer Wachse nicht ausgeschlossen wird; verändert nach Pollard et al. (2008).

Die zweite Komponente der Kutikula sind Wachsmomere, die durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können. Sie machen 20 – 60 % der Kutikula aus (Heredia, 2003) und stellen eine komplexe Mischung von Aliphaten der Kettenlänge  $C_{20}$  bis  $C_{60}$  dar und umfassen Alkane, Alkohole, Aldehyde, Fettsäuren und Ester, weiterhin wurden auch Triterpene und Hydroxyzimtsäurederivate identifiziert (Jetter et al., 2006; Kolattukudy et al., 1976; Tulloch, 1976). Weitergehende Untersuchungen konnten dabei zwischen intrakutikulären Wachsen, die das Kutinpolymer durchsetzen, und epikutikulären Wachsen, die auf das Polymer aufgelagert sind, differenzieren, die sich dabei auch in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden (Jetter & Schäffer, 2001). Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung tragen auch in Bezug auf die Funktionsweise der Kutikula als wasserabweisende Barriere Rechnung: Für einige Ar-

ten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das selektive Abheben der epikutikulären Wachse zu keinem Anstieg der kutikulären Transpiration führt. Die Transpirationsbarriere scheint demnach in tieferen Schichten lokalisiert zu sein und von den intrakutikulären Wachsen etabliert zu werden (Zeisler, 2013).

### **1.3 Suberin als Bestandteil pflanzlicher Grenzflächen**

Im Gegensatz zu Kutin kann Suberin sowohl in unterirdischen als auch in oberirdischen Organen wie Samen, Blättern und Stamm gefunden werden (Kolattukudy, 1980). Als prominentes Beispiel von Suberinablagerungen gilt das Sprossperiderm der Korkeiche (*Quercus suber*), in dem Suberin über 50 % der Trockenmasse ausmacht (Graça & Pereira, 1997). Dabei ist seine Ablagerung nicht auf äußere Gewebe beschränkt sondern kann in der Wurzel ebenfalls in der Hypodermis und in der Endodermis identifiziert werden (Schreiber et al., 1999). Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, mit der die überwiegende Anzahl der Experimente in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, bildet in Wurzeln keine Hypodermis aus.

In mikroskopischen Querschnitten von *A. thaliana* Wurzeln konnten Franke et al. (2005) Suberinablagerungen histochemisch untersuchen. Durch Anfärbung junger Wurzeln im primären Entwicklungsstadium mit dem Farbstoff Sudan III wurden Suberinablagerungen in den Zellwänden der Endodermis nachgewiesen, wie schematisch in Abbildung 2 dargestellt ist. Weitergehende Untersuchungen unter UV-Licht zeigten eine starke Autofluoreszenz in radialen endodermalen Zellwänden, was für aromatische Bestandteile spricht. Allerdings wird die postulierte Beteiligung von Suberin am Aufbau des Caspary-Streifens derzeit kontrovers diskutiert (Franke et al., 2012; Naseer et al., 2012).

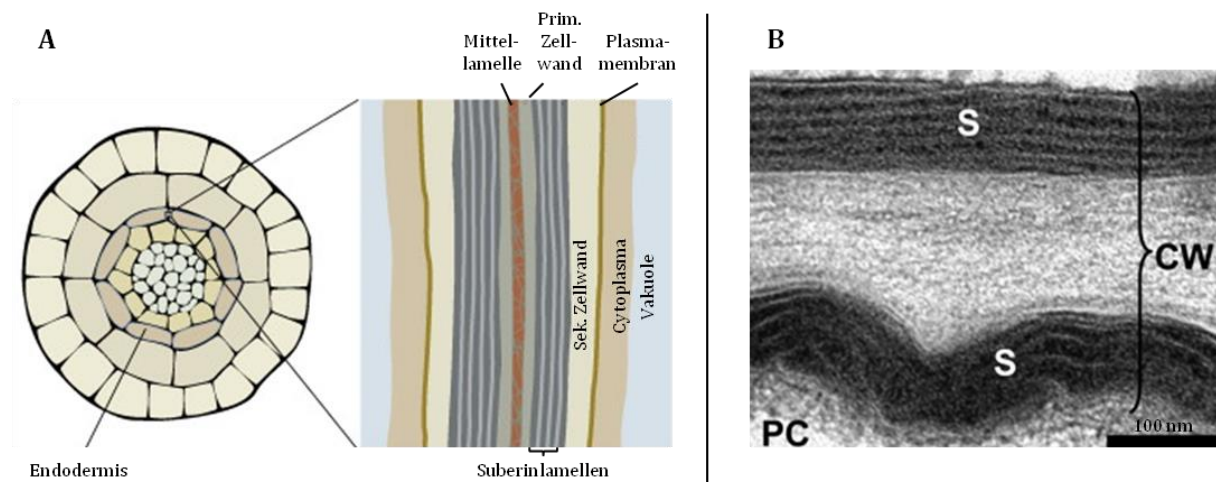
In Wurzeln des sekundären Entwicklungsstadiums resultierte die Sudan III Inkubation in einer intensiven Färbung des Periderms, weshalb auch von einer Suberinisierung dieses äußeren Gewebes ausgegangen wird.

Die Synthese und Auflagerung von Suberin scheint nicht auf Entwicklungsprozesse beschränkt zu sein, sondern kann gezielt durch abiotischen Stress, Pathogenbefall und Verwundung induziert werden (Enstone et al., 2003; Lulai & Corsini, 1998; Schreiber et al., 2005). Zusammengefasst kommen Suberin daher mehrere Funktionen zu: Zum einen wird eine Beteiligung als Diffusionsbarriere angenommen, die der Kontrolle des Verlustes bzw. der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen dient. Des Weiteren besteht seine



Funktion darin, die Pflanze vor dem Eindringen von Pathogenen und der Aufnahme schädlicher Solute zu schützen (Franke et al., 2005; Ranathunge et al., 2011).

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen von Suberinauflagerungen zeigten eine charakteristische lamellenartige Struktur alternierender elektrodichtere und -durchlässiger Schichten, wie sie in Abbildung 2 dargestellt ist (Bernards, 2002; Thomson et al., 1995).

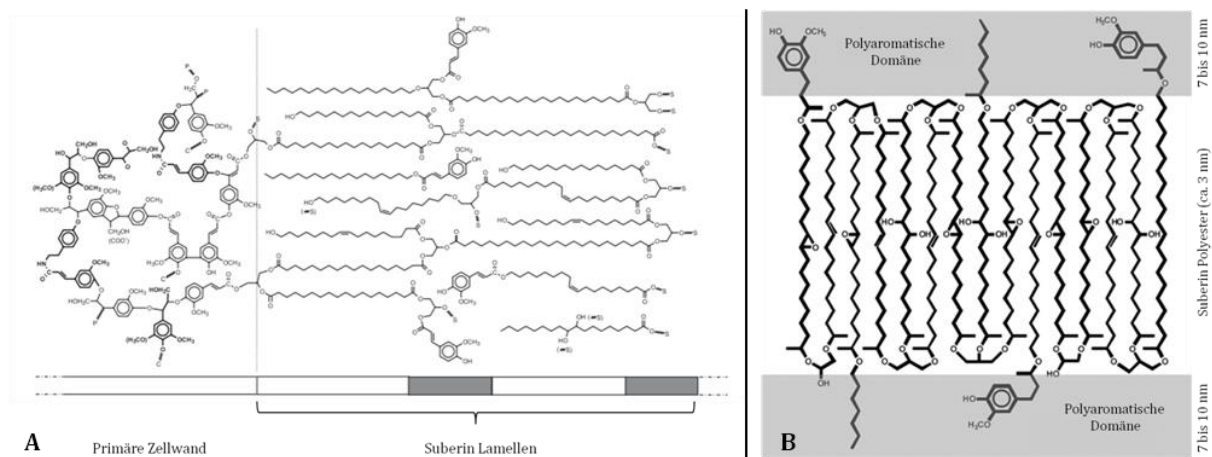


**Abbildung 2: Schematischer Querschnitt einer jungen Wurzel mit Suberinauflagerung in der Endodermis und TEM-Aufnahme des Querschnitts einer Wurzel von *A. thaliana***

**A:** Dargestellt sind zwei angrenzende Zellen mit einer Mittellamelle zwischen den primären Zellwänden. Suberinauflagerungen sind in einer lamellenartigen Struktur auf den primären Zellwänden jeder Zelle zu finden. Lignin und Cellulose reiche Auflagerungen bilden die sekundäre Zellwand zwischen den Suberinlamellen und der Plasmamembran aus; verändert nach Pollard et al. (2008). **B:** TEM Aufnahme einer *A. thaliana* Wurzel im späten Stadium des sekundären Dickenwachstums, die lamellare Struktur des Suberins ist deutlich erkennbar; S: Suberin, PC: Peridermale Zelle, CW: Zellwand; verändert nach Molina et al. (2009).

Suberin wird gemäß der gängigen Lehrmeinung als heterogenes Polymer beschrieben, das aus einer aromatischen und einer aliphatischen Domäne zusammengesetzt ist (Bernards, 2002; Kolattukudy, 2001; Mattinen et al., 2009). Gemäß des aktuellen Kenntnisstandes besteht die aliphatische Domäne chemisch im Wesentlichen aus  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren, geringeren Mengen an Fettsäuren und Alkoholen mit Kettenlängen von  $C_{16}$  bis  $C_{32}$ , wobei die maximale Kettenlänge in *A. thaliana* auf  $C_{24}$  beschränkt ist. Als weitere wichtige Bestandteile wurde Glycerin identifiziert (Moire et al., 1999). Die aromatische Domäne wird im Wesentlichen aus Hydroxyzimtsäurederivaten wie Ferula- und Coumarsäure gebildet (Franke & Schreiber, 2007; Franke et al., 2005; Graça & Santos, 2007; Nawrath et al., 2013). Die physiologisch wichtigen Barriereigenschaften werden der aliphatischen Domäne zugeschrieben (Hose et al., 2001; Zimmermann et al., 2000), auf der in den Untersuchungen dieser Arbeit der Fokus liegt.

In Bezug auf die zuvor erwähnte im TEM sichtbare Lamellenstruktur werden derzeit zwei Modelle vorgeschlagen, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind. Das erste Modell beruht auf Untersuchungen der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und sieht vor, dass Suberin als aliphatischer Polyester auf der Basis von Glycerin-Verknüpfungen mit vereinzelt phenolischen Bestandteilen verknüpft ist, wobei die aromatische Domäne kovalent an die primäre Zellwand gebunden ist (Bernards, 2002). Das zweite Modell basiert auf Untersuchungen der Korkeiche (*Quercus suber*). Es sieht alternierend aromatische und aliphatische Domänen vor, wobei die aliphatischen Monomere zweidimensional über Glycerin miteinander verknüpft sind (Graça & Santos, 2007). Beide Modellvorstellungen verbindet die Annahme, dass aromatische und aliphatische Domänen zu einer Lamellierung führen, wie sie im TEM sichtbar wird. Dabei könnten die aromatischen Domänen die Elektronen undurchlässigen Bereiche und die aliphatischen Domänen die Elektronen durchlässigen Bereiche bilden.



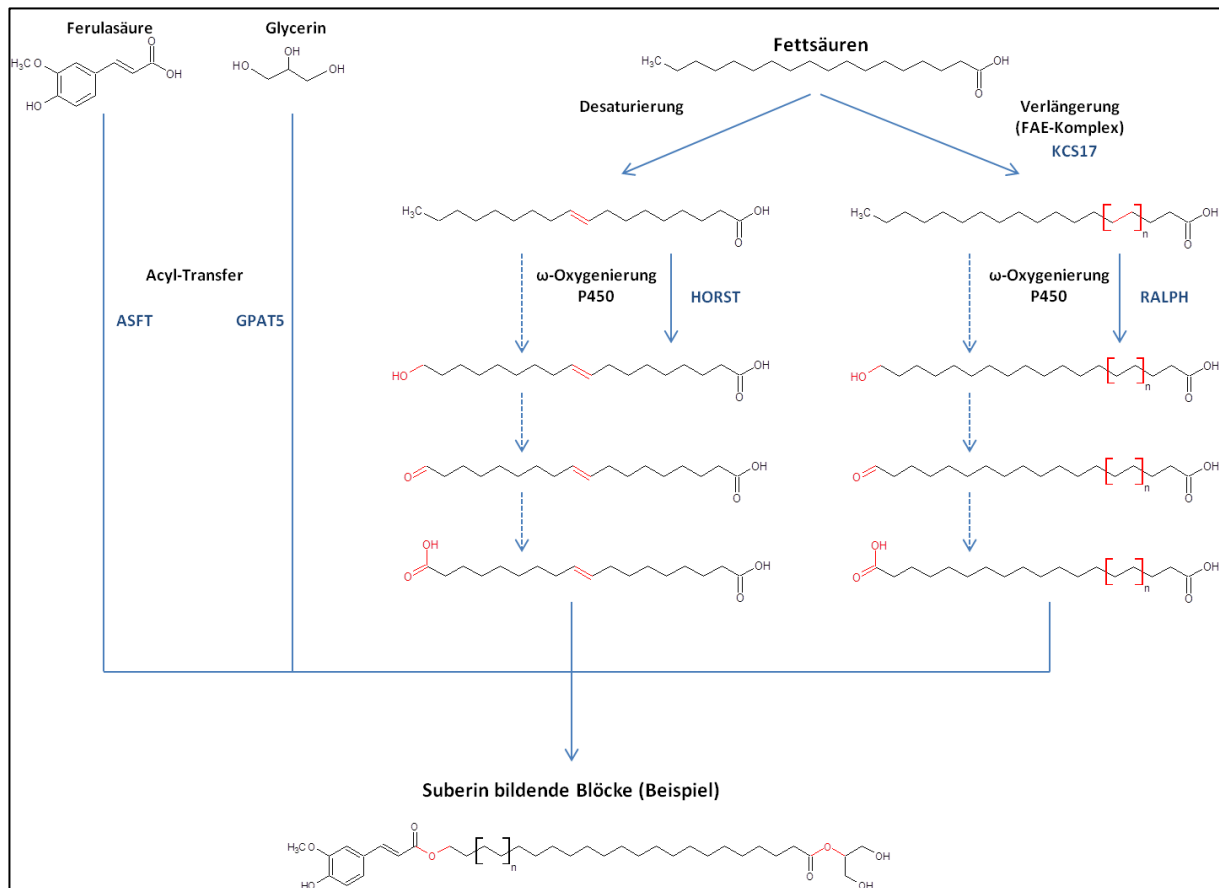
### Abbildung 3: Gängige Modellvorstellungen des Aufbaus des Suberinpolymers

**A:** Modellvorstellung auf Basis der Untersuchungen in Kartoffel (*Solanum tuberosum*): Die aliphatische Domäne besteht aus Monomeren, die über Glycerinverbindungen verknüpft und mit einzelnen phenolischen Bestandteilen verestert sind. Über eine polyaromatische Domäne ist Suberin kovalent an die Polysaccharide der Zellwand gebunden, die eingelagerten elektronendichten aromatischen Bestandteile könnten gemäß Modellvorstellung für die im TEM sichtbare Lamellierung verantwortlich sein (verändert nach Bernards (2002)); **B:** Modellvorstellung auf Basis der Untersuchungen in Korkeiche (*Quercus suber*): Die über Glycerin verknüpfte aliphatische und die aromatische Domäne sind alternierend kovalent miteinander verbunden, die abwechselnde Anordnung von elektronendichter aromatischer und elektronendurchlässiger aliphatischer Domäne führen zur Lamellenbildung, die auch mit theoretischen Berechnungen der Moleküllängen begründet werden können (verändert nach Graça & Santos (2007)).

### 1.3.1 Biosynthese des Suberinpolyesters

Das derzeitige Modell der Suberinbiosynthese basiert auf Erkenntnissen über die Zusammensetzung der Polyester-bildenden Monomere, Studien in entwickelnden Wundpidermen von Kartoffeln und revers-genetische Untersuchungen in *A. thaliana*. Es beschreibt für die Suberinbiosynthese die folgenden wesentlichen Schlüsselprozesse: Die Elongation von Fettsäuren, deren  $\omega$ -Hydroxylierung und die weitere Oxidierung zu  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren (Nawrath et al., 2013).

Die Suberinzusammensetzung von *A. thaliana* ist vergleichbar mit der anderer untersuchter Spezies, insbesondere der Kartoffel (Franke et al., 2005). Durch die komplette Sequenzierung des Genoms und die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Mutanten stellt dieser Modellorganismus daher ein ideales Werkzeug dar, um Kandidatengene der Suberinbiosynthese zu identifizieren und zu untersuchen. Zusätzlich konnten durch Expressionsstudien im Suberin bildenden Rindengewebe der Korkeiche (*Quercus suber*) Kandidatengene identifiziert und vergleichend herangezogen werden (Soler et al., 2007). Nachfolgend ist das Syntheschema gemäß des aktuellen Kenntnisstandes in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Zusätzlich werden ausgewählte Enzyme aufgeführt, die in der Vergangenheit charakterisiert werden konnten und auf die im Verlauf dieser Arbeit Bezug genommen wird.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese der Suberinmonomere**

Fettsäuren der Kettenlängen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> werden als plastidär synthetisierte Ausgangsstoffe entweder durch den Fettsäure-Elongations-Komplex (FAE) verlängert und / oder durch ω-Oxygenierung funktionalisiert. Dabei werden sie erst zu ω-Hydroxyäuren oxidiert und können anschließend zu α,ω-Dicarbonsäuren weiter oxidiert werden. Im weiteren Verlauf kann eine Verknüpfung mit Glycerin und Ferulasäure erfolgen. Zu den jeweiligen Reaktionen sind ausgewählte bereits charakterisierte Enzyme als Beispiele in blau aufgeführt; verändert nach Franke & Schreiber (2007).

Ausgangsstoffe der aliphatischen Suberinmonomere sind Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>, die in den Plastiden synthetisiert werden. Die ω-Hydroxylierung der Fettsäuren wird durch Mitglieder der Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen (P450) katalysiert (Pinot & Beisson, 2011). In Pflanzen konnte diese Funktion für die beiden Unterfamilien CYP86 und CYP94 dieser Superfamilie nachgewiesen werden (Kandel et al., 2006).

In Bezug auf die Suberinsynthese konnten in unserer Gruppe mit CYP86A1/HORST und CYP86B1/RALPH bereits zwei ω-Hydroxylasen charakterisiert werden (Compagnon et al., 2009; Höfer et al., 2008). Sie unterscheiden sich in ihrer Spezifität für die Kettenlängen ihrer Substrate: So weist CYP86A1/HORST eine Spezifität für Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>, CYP86B1/RALPH eine Spezifität für die Kettenlängen C<sub>22</sub> und C<sub>24</sub> auf. Die Analyse des Wurzelsuberins von korrespondierenden Knockout Mutanten ergab

charakteristische Reduzierungen in den  $\omega$ -Hydroxysäuren der jeweiligen Kettenlängen (Compagnon et al., 2009; Höfer et al., 2008).

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von Suberin und Kutin ist das Vorkommen von Monomeren mit sehr langen Kohlenstoffketten. Diese Kettenverlängerung wird durch einen membrangebundenen Elongationskomplex am Endoplasmatischen Reticulum vermittelt, dem so genannten Fettsäure-Elongations-Komplex (FAE, *Fatty-Acid-Elongation Complex*). Die Kettenverlängerung erfolgt analog zur Fettsäurebiosynthese in den Plastiden in einem mehrstufigen Prozess bei dem die beteiligten Enzyme der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) Familie den Geschwindigkeit bestimmenden Schritt ausmachen (Joubès et al., 2008). In unserer Arbeitsgruppe konnten mit KCS2/DAISY und KCS17 zwei Enzyme dieser Familie identifiziert und der Suberinbiosynthese zugeordnet werden (Franke et al., 2008; Nosbüsch, 2009).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Suberinpolymers ist Glycerin. Beisson et al. (2007) konnten die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase GPAT5 identifizieren, die die Verknüpfung von Glycerin mit  $C_{22}$  und  $C_{24}$   $\omega$ -Hydroxysäuren und -Dicarbonsäuren an der sn2-Position vermittelt (Yang et al., 2010). Mit ASFT (*Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase*) konnte des Weiteren ein Enzym identifiziert werden, das als mögliche Verbindung der aliphatischen und aromatischen Domäne diskutiert wird, da es die Bindung von Ferulasäure an primäre Alkoholgruppen der aliphatischen Suberinmonomere vermittelt (Molina et al., 2009).

Wie Suberinbestandteile aus der Zelle heraustransportiert werden ist bislang unbekannt. Spekuliert wird die Beteiligung von Golgi-Vesikeln oder ABC-Transportern (*ATP Binding Cassette Transporter*). Diese sind von berechtigtem Interesse da in Expressionsstudien in der Rinde von Korkeichen der Anstieg der Transkripte von ABC-Transportern beobachtet werden konnte (Soler et al., 2007) und Knockout Mutanten des Transporters ABCG11 Veränderungen der Zusammensetzung des Wurzelsuberins aufwiesen (Panikashvili et al., 2010). In Kartoffeln konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation des ABC-Transporters *ABCG1* zu Veränderungen der Suberinzusammensetzung in Wurzeln und Knollen führte (Landgraf et al., 2014). Des Weiteren wurden durch Yadav et al. (2014) in *A. thaliana* für die ABC-Transporter ABCG2, ABCG6 und ABCG20 eine Beteiligung an der Suberinsynthese in Wurzeln und Samenschalen gezeigt. In Bezug auf die Polymerisierung und Quervernetzung der aliphatischen Domäne wird die Beteiligung von  $\alpha,\beta$ -Hydrolasen und ihrer Untergruppe GDSL-Lipasen diskutiert (Kurdyukov et al., 2006). Ebenfalls spekulativ bleibt bislang die Frage der Regulation. Zwar werden als

mögliche Regulatoren auf Basis von Coexpressionsstudien Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilien MYB und NAC vorgeschlagen, doch konnte bislang für keinen Transkriptionsfaktor eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese nachgewiesen werden (Nawrath et al., 2013; Ranathunge et al., 2011; Soler et al., 2007).

## 1.4 GDSL-Lipasen

Die Familie der GDSL-Lipasen bildet eine Untergruppe der Superfamilie der  $\alpha,\beta$ -Hydrolasen und nimmt Funktionen in der Hydrolyse und Synthese von Estern ein. Die namensgebende GDSL-Domäne (Glycin, Aspartat (D), Serin und Leucin) ist hoch konserviert und ist nahe des N-Terminus lokalisiert (Upton & Buckley, 1995). Für GDSL-Lipasen wurde in *A. thaliana* mehrfach eine Beteiligung in der Antwort auf abiotischen und biotischen Stress beschrieben (Hong et al., 2008; Naranjo et al., 2006; Oh et al., 2005). Da die Bildung eines Polyesters *in vitro* mit Hilfe einer Lipase und Monomeren des Suberins und des aliphatischen Modells als Substraten gezeigt werden konnte, wird ein enzymatisch katalysierter Mechanismus für die Bildung des Suberin- und Kutinpolyesters angenommen (Olson & Sheares, 2006; Olsson et al., 2007).

Für die Synthese des Kutinpolyesters gelang es Kurdyukov et al. (2006) mit BODYGUARD (BDG) einen Vertreter der Superfamilie der  $\alpha,\beta$ -Hydrolasen mit einer postulierten Funktion im Aufbau des Kutinpolyesters in Zusammenhang zu bringen. Ein weiteres Beispiel stellt die GDSL-Lipase CDEF1 (Cuticle Destructing Factor 1) dar (Takahashi et al., 2010). Die Überexpression des Gens führte zu schwerwiegenden kutikulären Defekten in Pollen, weshalb eine mögliche Funktion als pflanzliche Kutinase angenommen wird. Ein ähnlicher Effekt konnte in der Fruchtkutikula der Tomate (*Solanum lycopersicum*) beobachtet werden: Der transkriptionelle Knock-Down des GDSL-Lipase Gens *GDSL1* führte zu Veränderungen des Kutingehalts und deren Struktur (Girard et al., 2012). Als weiterer Vertreter wurde in der Tomate *CD1* (Cutin Deficient 1) identifiziert, Knockout Mutanten wiesen nur noch 5-10 % des Kutingehalts des Wildtyps auf (Yeats et al., 2012). Bislang konnte keine Beteiligung von GDSL-Lipasen an der Synthese des Suberinpolyesters nachgewiesen werden, allerdings stellen sie auf Grund der geschilderten Beobachtungen im Kutinpolyester vielversprechende Kandidaten dar.

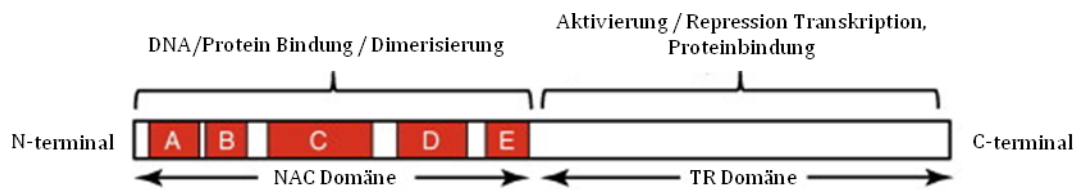
## 1.5 MYB-Transkriptionsfaktoren

Die Transkription eines Gens ist die erste Möglichkeit, an der seine Aktivität durch das Binden eines spezifischen Transkriptionsfaktors (TF) an seine regulatorische Region im Promoter reguliert werden kann. Die MYB (*Myeloblastosis*) Transkriptionsfaktoren stellen dabei eine der größten Familien und repräsentieren etwa 9 % aller TF in *A. thaliana* (Riechmann et al., 2000). Sie zeichnen sich durch ihre hoch konservierte DNA-bindende MYB-Domäne aus, die typischerweise aus einer bis vier Einheiten von 52 Aminosäureresten mit jeweils drei konservierten Tryptophanresten bestehen und Helix-Turn-Helix Strukturen ausbilden, die in die große Rinne der DNA binden (Jia et al., 2004; Ogata et al., 1996). Für MYB TF wurde mehrfach eine Rolle in der Antwort auf Trockenstress und Salzstress beschrieben (Li et al., 2014). Des Weiteren konnten Funktionen in der Synthese des Kutin-Polyesters und von Wachsen beobachtet werden. Beispielsweise konnte für MYB41 durch Cominelli et al. (2008) eine Rolle als negativer Regulator der Kutinbiosynthese belegt werden. Unter Trockenstressbedingungen induziert MYB96 die Akkumulation von kutikulären Wachsen als Schutzmechanismus (Seo et al., 2011) und für MYB30 konnte die Aktivierung von Genen der Wachsbiosynthese als Antwort auf Pathogenbefall demonstriert werden (Raffaele et al., 2008).

## 1.6 NAC-Transkriptionsfaktoren

Das Genom von *A. thaliana* kodiert für etwa 2.500 TF, von denen die meisten großen Genfamilien zugeordnet werden konnten (Zhang et al., 2011). Speziesübergreifend bildet die NAC Superfamilie (*No apical meristem* (NAM), *Arabidopsis transcription activation factor* (ATAF), *Cup-shaped cotyledon* (CUC)) dabei eine der größten Familien in Pflanzen, wobei in *A. thaliana* 117 NAC Gene (ANAC) beschrieben worden sind (Riechmann et al., 2000).

Alle Mitgliedern der NAC-Familie zeichnen sich durch die hoch konservierte N-terminal gelegene NAC-Domäne mit einer Länge von etwa 150 Aminosäuren und die C-terminal gelegene hoch variable Transkriptions-regulatorische (TR) Domäne aus (Ernst et al., 2004; Olsen et al., 2005). Eine schematische Übersicht der typischen Struktur eines NAC Gens gibt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines typischen NAC Proteins**

Dargestellt ist die konservierte N-terminal gelegene NAC-Domäne und die hoch variable C-terminal gelegene Transkriptions-regulatorische Domäne (TR Domäne). Die NAC Domäne ist für die Bindung an DNA oder Proteine und die Dimerisierung verantwortlich, der TR Domäne kommen Aufgaben bei Aktivierung oder Repression der Transkription sowie möglicherweise bei der Proteinbindung zu; verändert nach Puranik et al. (2012).

Die NAC-Domäne kann dabei in die fünf Subdomänen A – E aufgeteilt werden. Die hoch konservierten und positiv geladenen Subdomänen C und D binden an die DNA, während A für die Bildung von Homo- und Hetero-Dimeren mit anderen NAC-Proteinen zuständig ist, die Subdomänen B und D scheinen dagegen für die funktionelle Diversität der NAC Gene verantwortlich zu sein (Chen et al., 2011; Ernst et al., 2004; Jensen et al., 2010; Ooka et al., 2003). Die individuellen Funktionen von NAC-Proteinen werden durch die hoch variable TR Domäne bestimmt: So konnte für NACs sowohl die Funktion als Aktivator (He et al., 2005; Lu et al., 2007; Puranik et al., 2011; Tran & Nakashima, 2004) aber auch als Repressor der Transkription beobachtet werden (Delessert et al., 2005; Kim et al., 2007; Yamaguchi et al., 2010). Innerhalb der TR Domäne wurden verschiedene gruppenspezifische Motive identifiziert, die reich an Abfolgen von Serin-Threonin, Prolin-Glutamin oder sauren Resten und innerhalb einer Gruppe konserviert waren (Puranik et al., 2012).

Die Expression von NAC TF ist reguliert und in NAC Promotoren können Erkennungssequenzen für weitere Regulatoren identifiziert werden. So kann ihre Expression sowohl von NAC- als auch von anderen Transkriptionsfaktoren induziert werden. Da viele NACs in die Stressantwort der Pflanze involviert sind, können sie Ziel von ABA responsiven Elementen, Jasmonsäure responsiven Elementen und Salicylsäure responsiven Elementen sein (Nakashima et al., 2012). Auf post-transkriptioneller Ebene (Khraiwesh et al., 2012) konnte eine Regulation ebenso nachgewiesen werden wie auf post-translationaler Ebene, die im Ubiquitin-vermittelten Abbau, Dimerisierung und Interaktion mit anderen Nicht-NAC Proteinen erfolgen kann (Greve et al., 2003; Hegedus et al., 2003; Jeong et al., 2009).

Für NAC TF wurde mehrfach eine Funktion in der Antwort auf abiotischen und biotischen Stress gezeigt. So konnte zum Beispiel in Reis (*Oryza sativa*) für mehrere NAC Gene (OsNAC) eine Induzierbarkeit durch Trockenheit und Salzstress nachgewiesen wer-



den, deren Expression in Folge zur Aktivierung weiterer Gene der Stressantwort führte. Die Überexpression der Gene *OsNAC6*, *OsNAC5* und *OsNAC1* führte jeweils zu einer deutlichen Verbesserung der Toleranz der Pflanzen gegenüber Salz- und Trockenstress (Hu et al., 2006; Hu et al., 2008; Takasaki et al., 2010). Das Gen *OsNAC4* konnte mit dem Auslösen des hypersensitiven Zelltods als Antwort auf Pathogenbefall in Verbindung gebracht werden (Kaneda et al., 2009). Untersuchungen in *A. thaliana* führten ebenfalls zur Identifizierung mehrerer NAC TF. Stellvertretend seien *ANAC019*, *ANAC055* und *ANAC072* genannt, die in der Antwort auf Trockenstress eine Rolle spielen (Tran et al., 2004). Bislang konnten nach aktuellem Stand der Forschung keine Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit der Suberinsynthese identifiziert werden.

Die zuvor beschriebenen Stressoren, die eine NAC TF vermittelte Antwort der Pflanze auslösen, können auch die Synthese von Suberin induzieren. Da des Weiteren gezeigt werden konnte, dass NAC TF auch im Rahmen der Suberinsynthese hochreguliert werden (Soler et al., 2007), stellen sie mögliche interessante Kandidaten dar, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollen.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse über die der Biosynthese von Suberin zu Grunde liegenden Prozesse gewonnen werden konnten, bleibt unser bestehendes Bild unvollständig. Insbesondere über die Regulation und ihre Mechanismen kann bisher nur spekuliert werden.

Die vorliegende Arbeit soll dabei helfen, Regulationsfaktoren zu identifizieren, um damit das existierende Syntheschema und unser Wissen zu vervollständigen. Der Fokus soll dabei auf Mitgliedern der Familien der NAC- und MYB-Transkriptionsfaktoren liegen. Auf Grund der einfachen experimentellen Handhabung, der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Knockout Mutanten und etablierter Analysemethoden in unserer Arbeitsgruppe werden diese Arbeiten mit dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Dabei werden Kandidatengene auf der Basis unserer Kenntnisse über charakterisierte Suberingene durch Coexpressionsstudien und Vorhersagen der Lokalisation ausgewählt und Knockout Mutanten analytisch untersucht, um mögliche Auswirkungen auf die Zusammensetzung und den Gehalt des Wurzelsuberins zu analysieren.

Anhand der Ergebnisse sind Rückschlüsse auf die Funktion der Kandidatengene zu erwarten, die durch weitergehende molekulare und physiologische Studien charakterisiert werden sollen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Studien soll auf der Untersuchung von Mitgliedern der GDSL-Lipase Familie liegen, für die bereits spezifische Funktionen in der Synthese des verwandten Kutinpolyesters nachgewiesen werden konnten.

Die gewonnenen Daten könnten im Anschluss auf Nutzpflanzen übertragen werden und in Hinblick auf die Regulation der Suberinbiosynthese und die beschriebene Schutzfunktion von Suberin einen Beitrag zu den Bemühungen leisten, die Stresstoleranz von Pflanzen zu verbessern.

## **2 Material und Methoden**

## 2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Chemikalien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Molekularbiologische Kits wurden von den Firmen Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), PEQLAB (Erlangen, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) und Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Eine detaillierte Chemikalienliste ist im Anhang unter 7.2 aufgeführt.

## 2.2 Pflanzenmaterial

Die beschriebenen Experimente wurden mit Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Ökotyp Columbia, durchgeführt. Sollten andere Ökotypen verwendet worden sein, wird dies explizit erwähnt. Die Samen der verwendeten T-DNA Insertionsmutanten (Alonso et al., 2003 und Krysan J.P et al., 2007) und deren korrespondierende Wildtypen wurden durch das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, England) bezogen bzw. aus diesen Samen propagiert. Die Transposon Insertionsmutante ET 11247 (Sundaresan et al., 1995) wurde ebenfalls über das NASC bezogen.

Die untersuchten Reislinien (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) wurden freundlicherweise durch Shunsaku Nishiuchi (Universität Nagoya, Japan) kultiviert und zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Pflanzenanzucht

### 2.3.1 Erdkultur

Die Anzucht der *A. thaliana* Pflanzen erfolgte auf Pflanzenerde (Floradur Anzuchtsubstrat, 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 Stunden. Vor der Aussaat wurde die Erde mit Dünger (*Flory 3 verde*, Planta, Regenstauf), einem systemischen Insektizid (*Confidor WG70*, Bayer Crop Science, Langenfeld) und einem Fungizid (*Proplant*, Dr. Stähler, Stade) gewässert. Zur Stratifikation wurden die Samen vor der Aussaat für zwei Tage in Dunkelheit bei 4 °C gelagert. Um eine gleichbleibend hohe Luftfeuchtigkeit und damit

gute Keimungsrate zu gewährleisten, wurden die Anzuchtsschalen nach der Aussaat für fünf Tage mit transparenten Plastikhauben abgedeckt. Die Pflanzen wurden zweimal pro Woche mit Leitungswasser gewässert.

### **2.3.2 Hydrokultur**

Die Anzucht von *A. thaliana* unter hydroponischen Bedingungen erfolgte in Anzuchtcontainern der Firma Araponics (Liège, Belgien) unter den oben beschriebenen Anzuchtbedingungen in der Klimakammer. Die Abdeckungen der Container enthielten 18 Bohrungen für mitgelieferte Samenhälter. Mit Ethanol und Wasser gewaschene Zigarettenfilter wurden mit einem Holzstab durchbohrt und in die Samenhälter eingesetzt, auf jedem Filter wurden zwei Samen positioniert (Lenz et al., 2013). Die Anzuchtkammer wurde mit 2 l Nährlösung befüllt, so dass Samenhälter und Zigarettenfilter in die Lösung hineinragten. Die Nährlösung wurde aus kommerziell erhältlichen Konzentraten der *Flora Serie* der Firma General Hydroponics (Fleurance, Frankreich) gemäß Anleitung hergestellt. Für eine gleichbleibend hohe Luftfeuchtigkeit und zur Förderung der Keimungsrate wurden die Anzuchtkammern für fünf Tage mit transparenten Hauben abgedeckt, die Nährlösung wurde wöchentlich gewechselt.

### **2.3.3 Sterile Anzucht auf MS-Agar**

Als Vorbereitung für die Anzucht auf MS-Agar wurden die Samen sterilisiert. Bis zu 100 mg Samen wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit frisch vorbereiteter Sterilisationslösung (vgl. 7.1 im Anhang) versetzt und für 10 min in einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Samen unter der Sterilbank drei mal mit 96 % Ethanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die Lagerung erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß bei 4 °C.

Die sterilisierten Samen wurden auf MS-Agar in Petrischalen ausgestreut und der Deckel nach der Aussaat mit Parafilm fixiert.

## **2.4 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana***

*A. thaliana* gehört zu den selbstbestäubenden Pflanzen und erlaubt die Kreuzung verschiedener Genotypen mit relativ geringem Aufwand. Die Bestäubung erfolgt vor Öff-

nung der Blüte: Das weibliche Blütenorgan reift heran, wenn Frucht- und Staubblätter noch von Kron- und Kelchblättern umschlossen sind. Die Antheren wachsen am Stempel vorbei und setzen die gereiften Pollen frei, die mit der Narbe in Kontakt geraten und diese bestäuben.

Zur Kreuzung wurden genetisch unterschiedliche Pflanzenlinien unter identischen Wachstumsbedingungen angezogen und junge Blüten im geschlossenen Zustand ausgewählt, die restlichen und zu jungen Blüten wurden mit einer Schere entfernt. Für die Pollenempfangnis wurden einer Knospe unter dem Binokular nacheinander mit Präzisionspinzetten die vier Kelchblätter, die vier Blütenblätter und die sechs Antheren schräg nach unten abgezogen, ohne die Fruchtanlage zu verletzen. Zur Pollenernte wurden Blüten des zweiten Genotyps sorgfältig präpariert, die abgeschlossene Reifung der Pollen zeigt sich durch eine gelbliche Schicht auf den Antheren. Diese wurden vorsichtig abgetrennt und am Stempel der präparierten Blüte abgestreift. Ließen sich anschließend unter dem Binokular gelbe Ablagerungen auf dem Stempel der Empfängerpflanze erkennen, war die Bestäubung erfolgreich.

Die künstlich bestäubten Blüten wurden mit Frischhaltefolie umwickelt, um eine weitere unerwünschte Bestäubung zu vermeiden. Bei erfolgreicher Befruchtung wuchsen die Fruchtblätter zu einer Schote heran, die nach etwa 2 Wochen geerntet werden konnte. Gemäß der Mendel'schen Gesetze sollte die Tochtergeneration (F1-Generation) in Bezug auf die zu untersuchenden genetischen Merkmale heterozygot sein, in der nachfolgenden Generation (F2-Generation) sollten erwartungsgemäß homozygote Doppelmutanten zu identifizieren sein (Mendel, 1866).

## **2.5 Identifikation potentieller Kandidatengene in der Suberinbiosynthese**

Die Identifikation potentieller Kandidatengene, die in die Suberinbiosynthese involviert sind, erfolgte unter Zuhilfenahme frei verfügbarer Datenbanken. Diese ermöglichen auf der Grundlage von Transkriptom- und Translatom-Analysen (Birnbaum et al., 2003; Mustrup et al., 2009) Vorhersagen über die gewebespezifische Expression von Zielgenen. Kriterien für die Auswahl von Kandidatengenen waren sowohl die Endodermis spezifische Expression sowie eine mögliche Funktion in der Suberinbiosynthese, die mit dem in der Einleitung beschriebenen Synthesemodell und bekannten Enzymfamilien konsistent ist. Soler et al. (2007) konnten durch Expressionsstudien Enzymfamilien

identifizieren, für die sie eine mögliche Rolle in der Suberinbiosynthese in Korkeichen (*Quercus suber*) postulieren.

Mit Hilfe der Datenbank ATTED-II (<http://atted.jp>; Obayashi et al., 2007) wurden ausgewählte Kandidatengene auf ihre Coexpression mit den bereits charakterisierten Genen *CYP86A1/HORST* (Höfer et al., 2008) und *CYP86B1/RALPH* (Compagnon et al., 2009) überprüft, die in der Einleitung beschrieben wurden. Weiterhin wurden die öffentlichen Datenbanken *Arabidopsis eFP-Browser* (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter et al., 2007) und *GeneAtlas Tool* von *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann & Hirsch-Hoffmann, 2004) in Hinblick auf die organ-, gewebe- und entwicklungspezifische Expression der Gene untersucht.

## **2.6 Molekularbiologische Arbeiten**

### **2.6.1 Präparation genomischer DNA**

Die Präparation genomischer DNA erfolgte aus frischem Pflanzenmaterial mit Hilfe des *peqGOLD Plant DNA Mini Kits* (PEQLAB, Erlangen) gemäß Anleitung des Herstellers. Das zugrunde liegende Prinzip besteht in der chemischen Lyse der Proben und der anschließenden Isolation und Aufreinigung der genomischen DNA über eine Silikamembran. Zellbestandteile, Proteine und sekundäre Metabolite werden durch ein spezielles Puffersystem entfernt und die DNA anschließend eluiert.

### **2.6.2 Präparation pflanzlicher RNA**

Die Präparation pflanzlicher RNA erfolgte aus frischem Pflanzenmaterial mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA Plant Kits* (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Anleitung des Herstellers, das zugrunde liegende Prinzip ist in 2.6.1 beschrieben.

### **2.6.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Anschluss an die Präparation erfolgte mit Hilfe eines *Nanodrop™2000c* Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Das Prinzip beruht auf der spezifischen

Absorption der DNA bzw. RNA bei 260 nm. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung erfolgt gemäß nachstehender Formel:

**Formel 1: Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung**

c: Konzentration der Nukleinsäuren, OD<sub>260</sub>: optische Dichte bei 260 nm, V: Verdünnungsfaktor, F: Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA)

$$c \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, aus der Kombination der beiden OD-Werte lässt sich eine Aussage über mögliche Proteinkontaminationen der Probe ableiten. Liegen die Werte des Verhältnisses OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,8 und 2,0 lässt dies auf einen hohen Reinheitsgrad der Probe schließen.

### 2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) zur Amplifikation genomischer DNA-Bereiche wurde mit Hilfe des *KAPA2G® Fast 2x ReadyMix with Dye* (PEQLAB, Erlangen) gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Amplifikation von DNA-Bereichen für eine nachfolgende Klonierung erfolgte mit Hilfe der *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in einem *Primus 96 advanced* Thermocycler (PEQLAB, Erlangen). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Temperatureinstellungen des Cyclers sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes einer PCR mit *KAPA2G® Fast Polymerase*

Reagenz	Volumen	Konzentration (final)
2 x KAPA2G® Fast ReadyMix with Dye	12,5 µl	1 x
Forward Primer (50 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Reverse Primer (50 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Template DNA	≤ 250 ng	wie benötigt
Reinstwasser	bis 25 µl	-



**Tabelle 2:** Temperaturprogramm des Thermocyclers einer PCR mit *KAPA2G Fast Polymerase*

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung		95	2 min
PCR-Amplifikation (35 Zyklen)	Denaturierung	95	15 s
	Hybridisierung	Primer-spezifisch	30 s
	Elongation	72	5s /kbp
Finale Elongation		72	5 min

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes einer PCR mit *Phusion® High-Fidelity Polymerase*

Reagenz	Volumen	Konzentration (final)
5x Phusion® HF Buffer	4 µl	1 x
10 mM dNTPs	1 µl	jeweils 200 µM
Forward Primer (50 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Reverse Primer (50 µM)	1,25 µl	0,5 µM
Template DNA	wie benötigt	≤ 250 ng
Phusion® DNA Polymerase	0,2 µl	0,02 U/µl
Reinstwasser	bis 20 µl	-

**Tabelle 4:** Temperaturprogramm des Thermocyclers einer PCR mit *Phusion® High-Fidelity Polymerase*

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung		98	30 s
PCR-Amplifikation (35 Zyklen)	Denaturierung	98	10 s
	Hybridisierung	Primer-spezifisch	30 s
	Elongation	72	15s /kbp
Finale Elongation		72	5 min

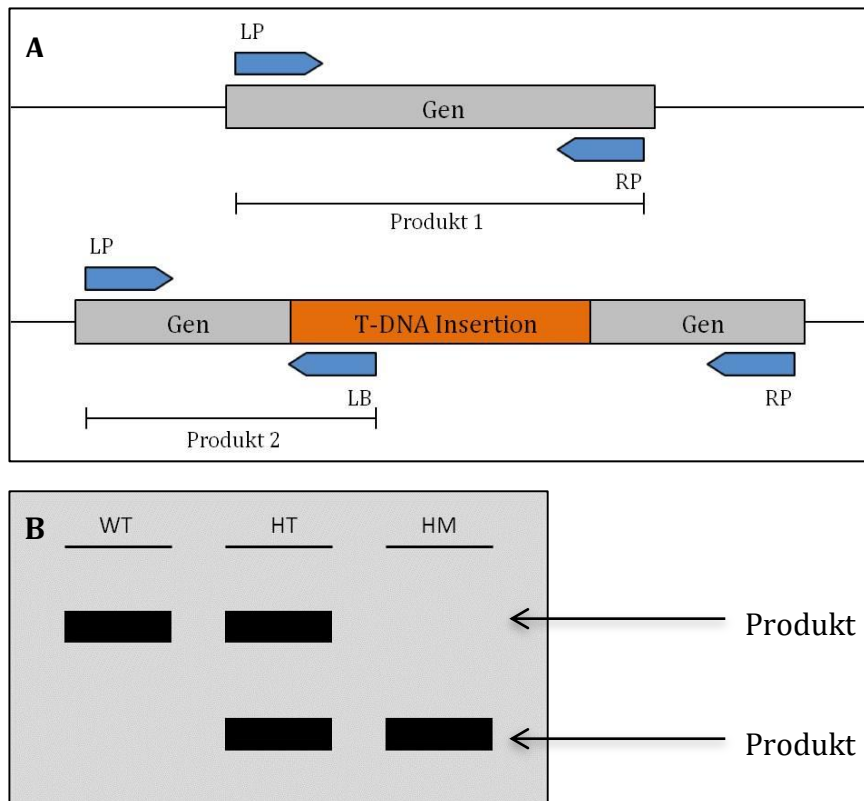
### 2.6.5 Gelelektrophorese

Um Gemische unterschiedlich großer DNA-Fragmente aufzutrennen wurde eine Gelelektrophorese in einem 0,8 % Agarosegel durchgeführt. Kleine DNA-Fragmente durchwandern das Gel in einem angelegten elektrischen Feld schneller als große DNA-Fragmente, was eine spezifische Auftrennung nach der Größe der Fragmente erlaubt. Dieser Effekt ist auf die Siebeigenschaften des Agarosegels zurückzuführen, das kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand entgegengesetzt als größeren. Durch das gleichzeitige Auftragen eines DNA-Größenstandards (*100 bp DNA-ladder extended*, Carl Roth, Karlsruhe) mit definierten Bandengrößen ließen sich die jeweiligen Längen der Fragmente abschätzen. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 150 mA. Dem Agarosegel zugesetztes Ethidiumbromid interkalierte in der doppelsträngigen DNA und ermöglichte die Sichtbarmachung der Banden unter UV-Licht und deren Dokumentation.

### 2.6.6 Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten

Um die Position der T-DNA Insertion innerhalb des Genoms zu bestimmen wurde eine PCR mit zwei gen- und einem T-DNA spezifischen Primer durchgeführt (Ríos et al., 2002).

Die beiden genspezifischen Primer werden dabei so gewählt, dass sie die vermutete Insertionsposition flankieren, der T-DNA spezifische Primer bindet im Außenbereich der T-DNA, zum Beispiel in der Left-Boarder. Im Falle einer T-DNA Insertion wird das PCR-Produkt aus T-DNA spezifischem und einem genspezifischen Primer ein Amplikon definierter Größe ergeben, das allerdings von einem Amplikon, das ausschließlich durch die genspezifischen Primer ohne T-DNA Insertion gebildet wird, aufgrund der Größe zu unterscheiden sein muss. In einem PCR-Ansatz, der alle drei Primer enthält, lassen sich folgende mögliche Kombinationen von zwei Allelen nachweisen: WILDTYP/WILDTYP, WILDTYP/mutante und mutante/mutante.



**Abbildung 6: Funktionsprinzip der Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten**

**A:** Schematische Darstellung des WT Locus (oben) und des Locus mit der T-DNA Insertion (unten) sowie der Lage der Primer und der gebildeten Amplikons. LP: Linker genomischer Primer; RP: Rechter genomischer Primer; LB: T-DNA spezifischer Primer im Bereich der Left Boarder. **B:** Schematische Darstellung der in einem Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte in den drei möglichen Allel-Kombinationen: Wildtyp (WT), Heterozygot (HT) und Homozygot (HM).

Verändert nach <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

## 2.6.7 Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion wurde mit Hilfe des *SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kits* (Life Technologies, Darmstadt) gemäß Anweisung des Herstellers durchgeführt. Während der RT-PCR wird mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und Oligo(dT)<sub>18</sub> Primern in cDNA umgeschrieben, um mit einer nachfolgenden PCR anhand der Intensität der im Gel aufgetragenen Fragmentbanden semiquantitative Aussagen über die Genexpression zu treffen.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer RT-PCR mit *SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum Taq*

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Konzentration (final)</b>
2 x Reaction Mix	25 µl	1 x
Forward Primer (50 µM)	1 µl	0,2 µM
Reverse Primer (50 µM)	1 µl	0,2 µM
Template RNA	x µl	10 pg – 1 µg
RT / Platinum Taq Mix	1 µl	-
Reinstwasser	bis 50 µl	-

**Tabelle 6:** Temperaturprogramm des Thermocyclers einer RT-PCR mit *SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum Taq*

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer</b>
cDNA Synthese und Denaturierung	55	30 min
	94	2 min
PCR-Amplifikation (30 Zyklen)	Denaturierung	94
	Hybridisierung	Primer-spezifisch
	Elongation	72
Finale Elongation	72	1 min /kbp
		5 min

## 2.6.8 cDNA Synthese

Als Vorbereitung einer Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde cDNA mit Hilfe des *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kits* (Life Technologies, Darmstadt) gemäß Anweisung des Herstellers aus RNA synthetisiert.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei der cDNA Synthese mit dem *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit*

Reagenz	Volumen	Konzentration (final)
5 x VILO Reaction Mix	25 µl	1 x
Template RNA	x µl	bis zu 2,5 µg
10x SuperScript Enzyme Mix	2 µl	-
Reinstwasser	bis 20 µl	-

**Tabelle 8:** Temperaturprogramm des Thermocyclers bei der cDNA Synthese mit *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit*

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
Ribonuklease-Inhibition	25	10 min
cDNA Synthese	42	60 min
Enzym-Inaktivierung	85	5 min

## 2.6.9 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)

Die Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion stellt eine technische Verfeinerung der RT-PCR Methode dar. Dabei wird die Menge der amplifizierten DNA durch Fluoreszenzmessung direkt quantitativ erfasst. Ein dem Reaktionsansatz zugegebener Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngiger DNA, wobei ein Anstieg des Fluoreszenzsignals, jeweils zum Ende eines Elongationszyklus, mit der Zunahme an amplifizierter DNA korreliert.

Die RTQ-PCR wurde mit Hilfe des *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies, Darmstadt) gemäß Anweisung des Herstellers in einem *StepOne Real-Time PCR System* (Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer RTQ-PCR mit dem *Power SYBR® Green PCR Master Mix*

Reagenz	Volumen	Konzentration (final)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl	1 x
Forward Primer (50 µM)	0,1 µl	0,025 µM
Reverse Primer (50 µM)	0,1 µl	0,025 µM
cDNA Template	x µl	mind. 10 ng
Reinstwasser	bis 20 µl	-

**Tabelle 10:** Temperaturprogramm des Thermocyclers einer RTQ-PCR mit dem *Power SYBR® Green PCR Master Mix*

Reaktionsschritt		Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung		95	10 min
PCR-Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95	15 s
	Elongation	60	1 min
Schmelzkurve	Denaturierung	95	15 s
	Elongation	60	1 min
	Temperaturgradient	60 - 95	0,3 °C/min
Finale Denaturierung		95	15 s

## 2.7 Mikrobiologische Arbeiten

### 2.7.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Für das Einbringen von Plasmiden in *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen wurden chemisch kompetente *Subcloning Efficiency DH5 α® Competent Cells* (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Diese wurden nach Anweisung des Herstellers inkubiert und mit 10 ng genetischen Materials durch Hitzeschock transformiert. Nach abschließender Inkubation wurden 10 µl, 100 µl und ca. 890 µl Aliquots auf LB-Agar ausgestrichen, das zur anschließenden Selektion der positiven Transformanden mit spezifischen Antibiotika (z. B.

Zeocin (50 µg/ml; Life Technologies, Darmstadt) für *entry clone* Plasmide oder Kanamycin (50 µg/ml) für *expression clone* Plasmide) versetzt wurde.

### **2.7.2 Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen**

200 µg kompetente *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) Zellen des Stammes GV3101pMP90 wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid versetzt und für weitere 5 min in Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min in flüssigen Stickstoff überführt und für 5 min einem Hitzeschock in einem 37 °C warmen Wasserbad ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 3 h in einem Schüttler bei 300 rpm und 28 °C inkubiert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 20 µl, 200 µl und ca. 980 µl Zellen auf LB-Agar (versetzt mit Kanamycin (50 µg/ml) und Rifampicin (10 µg/ml)) ausgestrichen und für 48 h bei 28 °C inkubiert.

### **2.7.3 Präparation, Restriktionsverdau und Sequenzierung bakterieller Plasmid-DNA**

Die Präparation bakterieller Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid* Miniprep Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Anweisung des Herstellers mit 5 ml *E. coli* Kultur.

Zur Überprüfung wurden die aufgereinigten Plasmide im ersten Schritt einem Verdau mit Restriktionsenzymen unterzogen. Dafür wurde jedes Plasmid mit verschiedenen Restriktionsenzymen für 1 Stunde bei den angegebenen Bedingungen verdaut und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Anhand des spezifischen Fragmentmusters waren Rückschlüsse auf die Identität des Plasmids möglich. Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen und gemäß Anweisung der Hersteller verwendet. Positiv identifizierte Plasmide wurden zur abschließenden Überprüfung sequenziert.

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit Plasmid-abhängigen Sequenzier-Primern.

### 2.7.4 Langzeit-Lagerung transformierter Bakterien

Von allen erzeugten Bakterienstämmen, die durch Sequenzierung überprüft worden waren, wurden zur Langzeit-Lagerung Glycerinstocks angefertigt. 700 µl Bakteriensuspension wurden mit 300 µl sterilem, wässrigem Glycerin (50 % v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, die Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## 2.8 Generierung transgener *A. thaliana* Pflanzen

Für die Generierung transgener *A. thaliana* Pflanzen und die vorbereitenden Klonierungen wurde das *Gateway® Technology System* (Life Technologies, Darmstadt) eingesetzt. Dieses zweistufige System verläuft über die Klonierung eines *entry clone* mit einem zuvor amplifizierten DNA-Bereich, der zur Erstellung eines transformierbaren *expression clone* genutzt wird.

### 2.8.1 BP-Reaktion zur Herstellung des *entry clone*

Das Prinzip der *in vitro* Klonierungstechnologie des *Gateway® Technology Systems* beruht auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda ( $\lambda$ -Phage). Dieser erkennt spezifische *att*-Sequenzen (*attachment sites*) innerhalb von DNA-Sequenzen und vermittelt zwischen diesen die zielgerichtete Rekombination. Diesen Effekt nutzt dieses System, das die gezielte Rekombination amplifizierter DNA-Abschnitte mit einem Donor-Vektor (*donor-vector*) vermittelt.

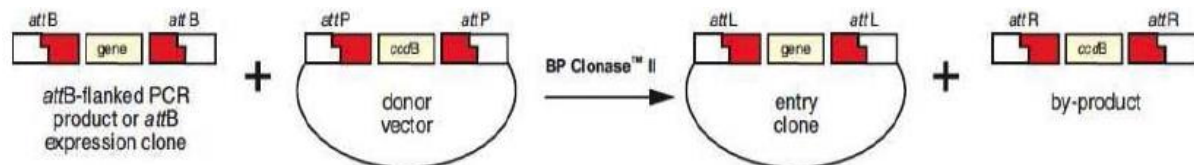
Zu diesem Zweck wird die Amplifikation des zu inserierenden Genabschnitts mit *attB*-flankierenden Primern durchgeführt, die zusätzlich um *attB*-Sequenzen verlängert sind. Katalysiert durch ein Set an Enzymen kann dieses *attB*-flankierte Amplikon in der BP-Reaktion gegen einen *attP*-flankierten Bereich innerhalb eines Donor-Vektors ausgetauscht werden, es entstehen der fertige *entry clone* und das ausgetauschte Gen als Nebenprodukt. Das im Donor-Vektor lokalisierte *att*-flankierte Gen *ccdB* kodiert für ein Produkt, das die bakterielle DNA-Gyrase (Topoisomerase II) inhibiert und dadurch für die im Labor verwendeten Bakterienstämme toxisch ist.

Im Anschluss an die erfolgte Rekombination wird der *entry clone* in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht (vgl. 2.7.1); Vektoren, an denen keine BP-Reaktion stattgefunden hat, führen auf Grund des enthaltenen *ccdB* Gens in *E. coli* zum Absterben der Wirtszellen und ermöglichen eine Selektion der rekombinierten Vektoren. Ein weiterer Selektions-



schritt besteht durch ein im Donor-Vektor kodiertes Antibiotikaresistenzgen. Dieser Vorgang ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Die Verwendung dieser *ccdB*-basierenden Selektion führt zu einer Effizienz von typischerweise > 95 %. Sobald eine DNA-Sequenz in einen Donor-Vektor rekombiniert wurde, kann sie ausgehend von diesem in der nachfolgenden LR-Reaktion in eine Vielzahl anderer Zielvektoren integriert werden.



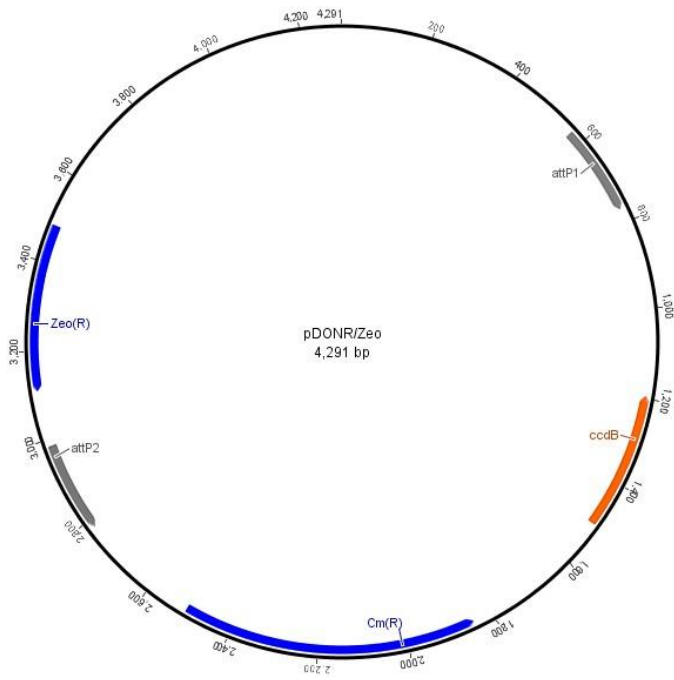
#### Abbildung 7: Schematische Darstellung der BP-Reaktion

Ein *attB*-flankiertes PCR-Produkt wird vermittelt durch die im Kit enthaltenen Enzyme gegen die *attP*-flankierte Gensequenz des Donor-Vektors ausgetauscht. Es entstehen ein *entry clone* und ein Nebenprodukt. *attB* und *attP*: Rekombinationsschnittstellen, *ccdB*: Gyrasehemmer Gen, *donor vector*: pDONR®/Zeo; verändert nach: Gateway® Technology Userguide.

Die Amplifikation des PCR-Produkts erfolgte mit Hilfe der *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), die über eine zusätzliche Korrekturlesefunktion verfügt. Die Einbringung der flankierenden *attB*-Rekombinationsschnittstellen erfolgte durch eine PCR mit spezifischen Primern, die an 5'- bzw. 3'-Position zusätzlich über die erforderlichen *attB*-Schnittstellen verfügen.

Zur abschließenden Kontrolle wurde das Amplikon auf einem Agarosegel aufgetragen, mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Darmstadt) nach Anweisung des Herstellers aus dem Gel aufgereinigt und sequenziert (vgl. 2.7.3).

Die BP-Reaktion erfolgte mit Hilfe des *Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix* (Life Technologies, Darmstadt) nach Anweisung des Herstellers mit dem vorgesehenen Donor-Vektor *pDONR®/Zeo* (vgl. Abbildung 8).



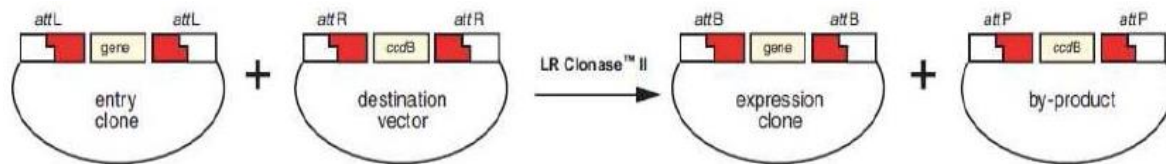
**Abbildung 8: Vektorkarte des Donor-Vektors pDONR®/Zeo**

attP1 und attP2: Rekombinationsschnittstellen, Zeo: Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin, Cm: Resistenzgen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol, ccdB: Gen, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert.

Nach erfolgter Rekombination wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht (vgl. 2.7.1) und auf Zeocin-haltigem LB-Agar (50 µg/ml) ausgestrichen. Die Plasmide ausgewählter Kolonien wurden wie in 2.7.3 beschrieben extrahiert, sequenziert und nach der positiven Prüfung Glycerinstocks angelegt (vgl. 2.7.4).

## 2.8.2 LR-Reaktion zur Erstellung des *expression clone*

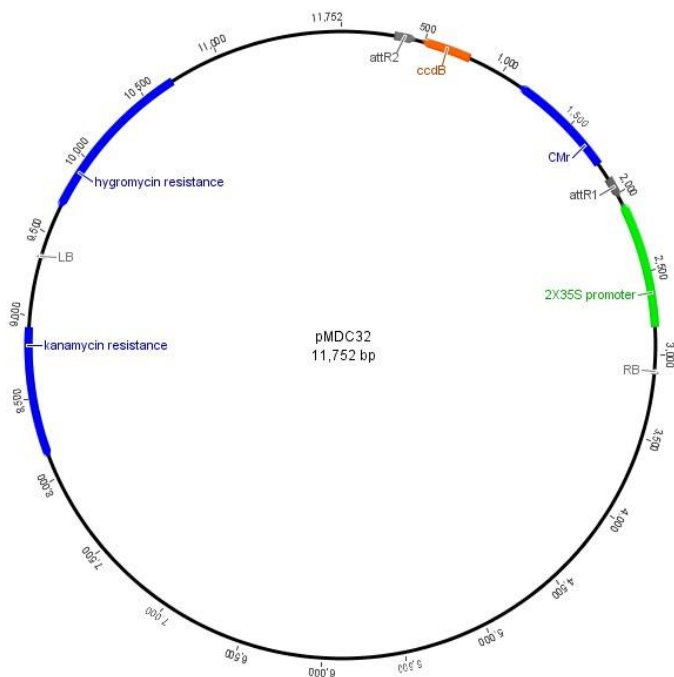
Nach erfolgreicher Erstellung des *entry clone* kann das enthaltene Gen in einem weiteren Rekombinationsschritt in eine Vielzahl von Ziel-Vektoren (*destination vector*) eingebracht werden mit dem Ziel, einen transformierbaren *expression clone* zu erhalten. Dieser Reaktionsschritt erfolgt ebenfalls durch eine  $\lambda$ -Phagen vermittelte Rekombination nach dem zuvor beschriebenen Prinzip. Die im *entry clone* und Ziel-Vektor enthaltenen *att*-Sites werden durch ein Set an Enzymen erkannt, die den Austausch der flankierten Gene durch Rekombination vermitteln. Dieses Prinzip ist nachfolgend schematisch in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der LR-Reaktion**

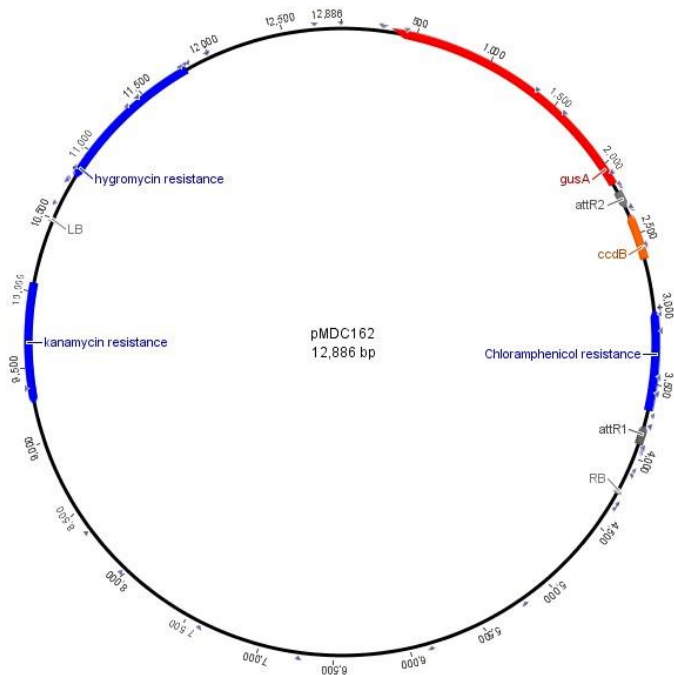
Das *attL* flankierte PCR-Produkt des *entry clones* wird vermittelt durch die im Kit enthaltenen Enzyme gegen die *attR*-flankierte *ccdB*-Sequenz des *destination vector* ausgetauscht. Es entstehen der transformierbare *expression clone* und ein Nebenprodukt. *attL* und *attR*: Rekombinationschnittstellen, *ccdB*: Gyrasehemmer Gen; verändert nach Gateway® Technology Userguide.

Die LR-Reaktion erfolgte mit Hilfe des *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix* (Life Technologies, Darmstadt) nach Anweisung des Herstellers. Als Zielvektoren dienten pMDC32 und pMDC162 (Curtis und Grossniklaus, 2003), sowie Prom\_CYP86B1\_pMD (Nosbüsch, 2013). Das Plasmid Prom\_CYP86B1\_pMD wurde freundlicherweise von Daniela Nosbüsch (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Diese Plasmide sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.



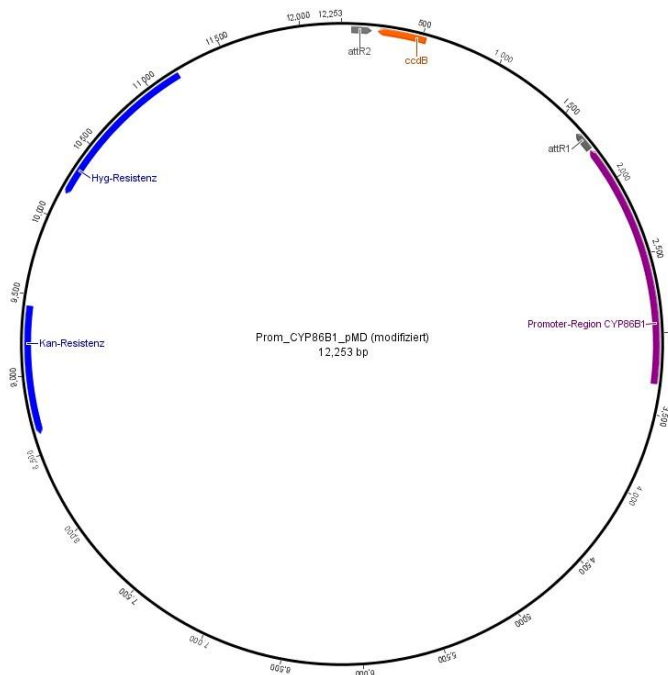
**Abbildung 10: Vektorkarte des Zielvektors pMDC32**

*attR1* und *attR2*: Rekombinationschnittstellen, LB und RB: *Left-* bzw. *Right-Boarder*, *CMr*: Resistenzgen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol, *ccdB*: Gen für ein Enzym, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert.



**Abbildung 11: Vektorkarte des Zielvektors pMDC162**

attR1 und attR2: Rekombinationsschnittstellen, LB und RB: *Left-* bzw. *Right-Boarder*, *ccdB*: Gen für ein Enzym, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert, *gusA*: Gen für  $\beta$ -Glucuronidase.



**Abbildung 12: Vektorkarte des Zielvektors Prom\_CYP86B1\_pMD**

attR1 und attR2: Rekombinationsschnittstellen, *ccdB*: Gen, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert, *Kan-Resistenz*: Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin, *Hyg-Resistenz*: Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin.

Im Anschluss an die erfolgte Rekombination wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht und auf LB-Agar ausgestrichen, dem das jeweilige Antibiotikum zur

Selektion zugesetzt worden war. Durch Präparation der Plasmid-DNA und anschließende Sequenzierung wurden positive Klone identifiziert und Glycerin-Stocks angelegt.

### **2.8.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens***

Die abschließende Transformation von *A. thaliana* erfolgt unter Zuhilfenahme des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), das in diesem Falle als „Genfahre“ für den vorbereiteten *expression clone* fungiert. Die Transformation der Pflanzen erfolgte mit Hilfe der von Clough und Bent (1998) beschriebenen „*Floral Dip*“-Methode bei der die Blütenorgane der Pflanze in eine vorbereitete Bakteriensuspension getaucht werden.

#### **2.8.3.1 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* für „*Floral Dip*“**

Nach der in 2.7.2 beschriebenen Transformation wurde eine *A. tumefaciens* Kultur für die anschließende „*Floral Dip*“-Methode vorbereitet.

In einem 500 ml Schikanekolben wurden 10 ml LB-Medium, dem zuvor Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt worden war, mit der transformierten *A. tumefaciens* Kultur angeimpft und bei 28 °C auf einem Schüttler bei 170 rpm über Nacht inkubiert.

Diese Vorkultur wurde am Folgetag mit 300 ml LB-Medium (mit Rifampicin und Kanamycin) versetzt und auf zwei Schikanekolben aufgeteilt, diese Hauptkultur wurde wieder über Nacht auf einem Schüttler bei 170 rpm bei 28 °C inkubiert.

#### **2.8.3.2 Durchführung der „*Floral dip*“-Methode**

Die über Nacht inkubierten Hauptkulturen wurden auf sechs 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 15 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die gebildeten Pellets wurden in 200 ml Inokulations-Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert.

Für das anschließende „*Floral dip*“ wurden 4 Wochen alte Pflanzen gewählt, deren Blütenstände nach 3 Wochen entfernt worden waren, um durch Brechen der Apikaldominanz ein vermehrtes Wachstum der Sprossachsen zu induzieren. Jeweils 15 Pflanzen

wurden zwei mal kopfüber mit den Blütenständen für jeweils 10 s in die Inokulationslösung getaucht und anschließend waagrecht auf eine mit Folie ausgekleidete Anzuchtschale gelegt. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurden die Pflanzen mit Leitungswasser besprüht und die Schale mit einem transparenten Beutel umschlossen. Die Pflanzen wurden für 2 Tage in der Klimakammer inkubiert bevor sie aufgerichtet und der Beutel entfernt wurde. Die weitere Anzucht bis zur Reifung der Samen erfolgte unter den in 2.3.1 beschriebenen Standardbedingungen.

## **2.9 Histologische und anatomische Studien**

Alle beschriebenen mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) im Hellfeld oder zur Detektion der Autofluoreszenz von aromatischen Zellwandbestandteilen im UV-Licht (Filterset: Anregungsfilter BP 450-490 nm, Strahlteiler FT510 nm, Sperrfilter LP 520 nm) durchgeführt und mit einer Nikon DXM-1200 Digitalkamera (Nikon, Düsseldorf) dokumentiert.

### **2.9.1 Histochemische Färbung mit Sudan Rot 7B**

Zur Sichtbarmachung suberinisierter Gewebe während der mikroskopischen Untersuchung wurden Wurzeln von unter hydroponischen Bedingungen angezogenen Pflanzen mit dem Farbstoff Sudan Rot 7B gefärbt. Mit Hilfe dieses lipophilen Farbstoffs können Suberinlamellen und Ablagerungen aliphatischer Substanzen sichtbar gemacht werden (Brundrett et al., 1991). Dazu wurden die Wurzeln mit Sudan Rot 7B Färbelösung (vgl. 7.1 im Anhang) überschichtet und für 1 h bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mehrfach mit Wasser gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Wurzeln wurden anschließend entweder mit Wasser/Glycerin (1:1) überschichtet und mit Hilfe des Mikroskops untersucht oder wie in 2.9.2 beschrieben zur Anfertigung von Wurzelquerschnitten genutzt.

### **2.9.2 Anfertigung von Wurzelquerschnitten mit dem Gefriermikrotom**

Für die Anfertigung von Wurzelquerschnitten wurden Wurzeln von unter hydroponischen Bedingungen angezogenen Pflanzen für mindestens 7 Tage in Ethanol bei 4 °C

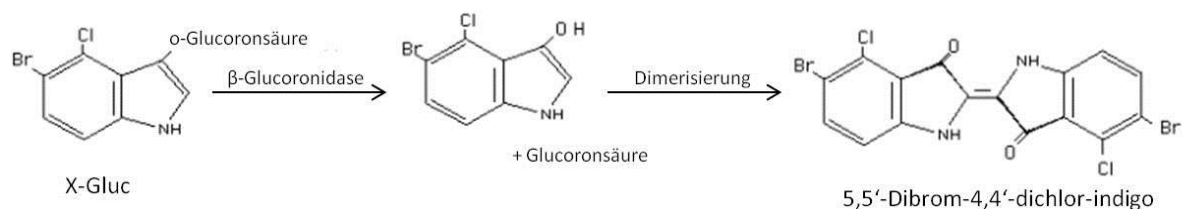
inkubiert und wie in 2.9.1 erläutert gefärbt. Im Anschluss wurden die Wurzeln in *Neg-50®* Einbettmedium (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) eingebettet und bei -30 °C im Mikrotom gefroren. Mit Hilfe eines Mikrotom-Krystoats (*Microm HM 500 M*, Microm International, Waldorf) wurden 40 µm dicke Querschnitte angefertigt und mit einer Pinzette auf einem Objektträger platziert. Nach Überschichtung mit Wasser/Glycerin (1:1) wurden die Proben mit Hilfe des Mikroskops untersucht.

### 2.9.3 Untersuchung der Genexpression mittels Reportergenfusion

Mit dem Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS Konstrukt transformierte Pflanzen wurden auf Hygromycin haltigem MS-Medium selektioniert und für weitere Untersuchungen entweder nach 10 Tagen geerntet oder zur weiteren Anzucht auf Erde umgesetzt.

Zur Untersuchung der Lokalisation der Genexpression mit Hilfe der GUS-Aktivität wurden 10 Tage alte Keimlinge oder Wurzeln 4 Wochen alter Pflanzen in X-Gluc Lösung (De Block & Debrouwer, 1992, vgl. Anhang) über Nacht im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Das durch das *GUS* Gen kodierte Enzym  $\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert X-Gluc zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlorindoxyl, das in der Zelle zu dem unlöslichen blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo dimerisiert (vgl. Abbildung 13). Mit Hilfe der Blaufärbung lässt sich die Promoteraktivität des untersuchten Gens lokalisieren.

Die Reaktion wurde durch Inkubation der Proben in Ethanol abgestoppt und das in den Pflanzen enthaltene Chlorophyll durch mehrmaliges Wechseln des Ethanols ausgewaschen. Die Proben wurden anschließend unter dem Binokular (Olympus SZ61, Olympus, Hamburg) betrachtet oder nach der Anfertigung von Querschnitten mit dem Gefriermikrotom im Mikroskop betrachtet.



#### Abbildung 13: Farbreaktion der $\beta$ -Glucuronidase

Das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase spaltet X-Gluc zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlorindoxyl, das in der Zelle zum unlöslichen blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo dimerisiert.

Verändert nach <https://www.bio.purdue.edu/people/faculty/karcher/blue2000/fig1.gif>.

## **2.10 Analytische Untersuchungen**

### **2.10.1 Präparation suberinisierter Wurzelzellwände von *A. thaliana***

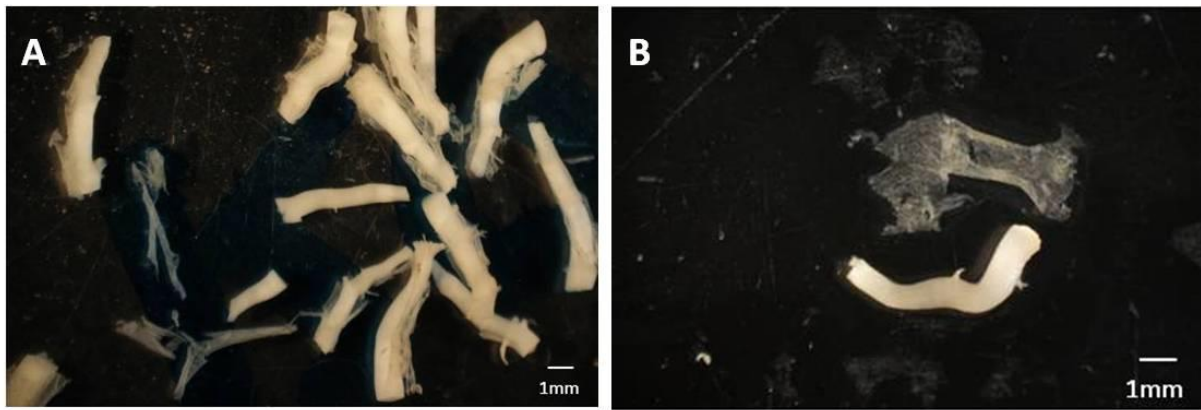
Die Wurzeln sechs Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen wurden entweder vorsichtig aus der Erde ausgegraben oder aus den hydroponischen Containern entnommen und am Übergang zum Hypokotyl abgetrennt. Sie wurden in Leitungswasser gewaschen und falls notwendig mit einem Pinsel vorsichtig von Erdresten befreit. Um die kohlenhydratreichen Zellwandbestandteile abzubauen, wurden die Wurzeln für zehn Tage in Erlenmyerkolben in Enzymlösung (vgl. 7.1 im Anhang) geschwenkt, wobei die Lösung zweimal ausgetauscht und verworfen wurde.

Beim Verdau freigesetzte Membranlipide und sonstige freie Lösemittel-lösliche Bestandteile wurden anschließend in einem Extraktionsschritt in 48 h entfernt. Die verdauten Wurzeln wurden zu diesem Zweck in Zellulose-Filtertaschen (ANKOM Technology, Macedon NY, USA) verpackt in einem Soxhlet-Aufsatz für jeweils 24 h mit Chloroform und Methanol komplett extrahiert. Bis zur Analyse wurden die Proben für mindestens 48 h in einem Exsikkator auf Silicagel und Phosphorpentoxid als Trocknungsmittel gelagert.

### **2.10.2 Präparation suberinisierter Periderme von *A. thaliana***

Die Wurzeln 8 Wochen alter Pflanzen wurden vorsichtig aus der Erde ausgegraben und in Leitungswasser gewaschen und von Erdresten befreit. Mit einer Rasierklinge wurde nur der oberste basale Teil der Wurzel separiert, der je nach Größe der Wurzel eine Länge von 4 – 6 mm aufwies. Die so erhaltenen Wurzelproben wurden für sieben Tage anverdaut, um das Periderm von der Stele lösen zu können. Periderm und Stele sind im Gegensatz zu den zwischen ihnen liegenden nicht modifizierten Zellwänden nicht verdaubar. Unter dem Binokular konnte das Periderm mit Feinpinzetten von der lignifizierten Stele abgezogen werden, wie in Abbildung 14 gezeigt.





**Abbildung 14: Separierung von Periderm und verholzter Stele**

**A:** Nach 7-tägigem Verdau war das zwischen Periderm und verholzter Stele befindliche nicht modifizierte Gewebe verdaut. **B:** Mit Hilfe von Feinpinzetten wurde das Periderm (oben) von der Stele (unten) separiert.

Die anschließende Extraktion erfolgte mit Chloroform/Methanol-Lösung (1:1) in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde drei mal gewechselt. Anschließend wurden die präparierten Periderme wie zuvor beschrieben getrocknet.

### 2.10.3 Präparation suberinisierter Samenschalen von *A. thaliana*

Für die Präparation suberinisierter Samenschalen wurden jeweils alle Samen einer Pflanze komplett geerntet und als 1 Parallele definiert. Jeweils ca. 50 mg getrocknete Samen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators (B. Braun, Melsungen) gemahlen. Die gemahlene Samen wurden in ein 5 ml Glasgefäß überführt, mit 2 ml Chloroform/Methanol (1:1) versetzt und für zwei Wochen auf der Rollbank zur Extraktion von Lösemittel-löslichen Bestandteilen wie Speicherlipiden inkubiert, die Extraktionslösung wurde alle zwei Tage gewechselt und verworfen. Anschließend wurden die extrahierten Samen wie zuvor beschrieben getrocknet.

### 2.10.4 Analyse der Kutin- und Suberin-Polyester und Blattwachs

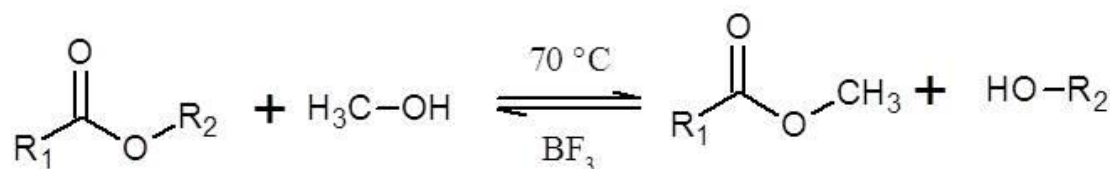
Nach der vollständigen Extraktion und Trocknung der zu untersuchenden Gewebe wurden die Monomere durch Umesterung mit methanolischem Boron-Trifluorid (vgl. 2.10.4.1) oder methanolischer Salzsäure (vgl. 2.10.4.2) herausgelöst und als Vorbereitung für die anschließende gaschromatographische Auftrennung mit N,O-

Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) derivatisiert (vgl. 2.10.4.4). Anschließend erfolgte die Analyse mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (vgl. 2.10.4.5).

#### 2.10.4.1 Umesterung mit methanolischem Borontrifluorid

Da Suberin als komplexer Polyester vorliegt, muss dieser für die nachfolgende Analyse durch eine Umesterungsreaktion mit methanolischem Borontrifluorid in seine Monomere gespalten werden, wie schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

Das Trockengewicht der wie zuvor beschrieben verdauten und extrahierten Proben wurde mit einer Analysenwaage (Sartorius MC21S, Göttingen) gewogen und die Proben in einem 5 ml Glasgefäß mit 2 ml  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt, die Proben wurden für 16 h bei 70 °C in einem Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden für die spätere Quantifizierung 10 µg  $\text{C}_{32}$ -Alkan als Interner Standard zugegeben und die Umesterungsreaktion durch Zugabe von 2 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gründliches Mischen abgestoppt.



**Abbildung 15: Umesterungsreaktion eines Polyesters mit  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$**

Borontrifluorid polarisiert die Esterbindung und ermöglicht damit die nukleophile Substitution durch Methanol. Die Reaktion ist reversibel, auf Grund des  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ -Überschusses wird aber die Seite der Produkte gemäß des Prinzips von Le Chatelier bevorzugt.

Zur Extraktion der aliphatischen Monomere wurde das Methanolsat mit 1 ml Chloroform versetzt, gründlich durch Vortexen gemischt und die Chloroformphase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde zwei mal wiederholt und die Extrakte vereinigt. Um nicht aliphatische, hydrophile Bestandteile aus der Lösung zu entfernen, wurde das Chloroformextrakt mit 1 ml HPLC-Wasser versetzt, durch Vortexen gründlich gemischt und die Wasserphase anschließend verworfen, dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat wurden die Proben getrocknet. Das Chloroformextrakt wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Stickstoffstrom bei 60 °C auf ein Volumen von 100-200 µl eingeengt und derivatisiert (vgl. 2.10.4.4).

#### **2.10.4.2 Umesterung mit methanolischer Salzsäure**

Die Umesterung mit methanolischer Salzsäure stellt eine Alternative zu der zuvor beschriebenen Methode dar. Die Proben werden hier zur Umesterung mit 1 N methanolischer Salzsäure (1 N MeOH/HCl) versetzt und für 2 h bei 80 °C im Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden für die spätere Quantifizierung 10 µg C<sub>32</sub>-Alkan als Interner Standard zugegeben und die Umesterungsreaktion durch Zugabe von 2 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung und gründliches Mischen abgestoppt. Zur Extraktion aliphatischer Monomere wurde das Gemisch mit 1 ml Hexan versetzt, durch Vortexen gemischt und die Hexanphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dieser Schritt wurde zwei mal wiederholt. Das vereinigte Extrakt wurde im Stickstoffstrom bei 60 °C auf 100-200 µl eingeengt und derivatisiert (vgl. 2.10.4.4).

#### **2.10.4.3 Extraktion von Blattwachsen**

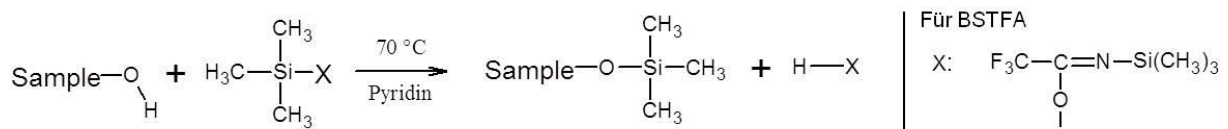
Für die Extraktion von epi- und intrakutikulären Wachsen von *Arabidopsis thaliana* Blättern wurden bis zu zehn Blätter pro Pflanze vorsichtig abgeschnitten und für 10 s in 10 ml Chloroform eingetaucht. Das Extrakt wurde im Stickstoffstrom bei 60 °C auf 100 - 200 µl eingeengt und derivatisiert (vgl. 2.10.4.4).

Zur anschließenden Bestimmung der Blattoberflächen wurden die Blätter nach dem Eintauchen zwischen zwei Folien gelegt und eingescannt. Die Ermittlung der Blattoberfläche erfolgte anhand der Pixelzahl, die mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, USA) bestimmt wurde. Durch Vergleich mit der Pixelzahl einer Fläche bekannter Größe konnte die Blattoberfläche errechnet werden.

#### 2.10.4.4 *Derivatisierung mit BSTFA*

Um die Suberinbestandteile über eine Säule im Gaschromatographen auftrennen zu können ist eine vorherige Derivatisierung notwendig. Diese erfolgt mit BSTFA nach dem nachfolgend in Abbildung 16 dargestellten Reaktionsschema und ermöglicht die chemische Maskierung polarer Gruppen. Dies sorgt zum einen für eine verbesserte Flüchtigkeit der Substanzen und reduziert des Weiteren die irreversible Anlagerung polarer Gruppen an das Säulenmaterial und damit verbundene Verschlechterungen der Auftrennungsleistung.

Das Chloroformextrakt wurde hierzu in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20 µl Pyridin und 20 µl BSTFA versetzt und für 40 min bei 70 °C in einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss konnte das Probengemisch mit Hilfe der Gaschromatographie analysiert werden.



**Abbildung 16: Derivatisierung einer Substanz mit BSTFA**

BSTFA führt zu einer elektrophilen Substitution am Sauerstoffatom polarer Gruppen und der Bildung eines Trialkylsilylderivats; verändert nach Knapp (1979).

#### 2.10.4.5 *Gaschromatographie und Massenspektrometrie*

Die Grundlage der gaschromatographischen Auftrennung bilden charakteristische physikalische und chemische Eigenschaften der zu trennenden Stoffe. Die unterschiedlichen Siedepunkte der Bestandteile eines Stoffgemisches in der mobilen Phase und die molekülspezifischen Wechselwirkungen der Bestandteile mit der stationären Phase sorgen für unterschiedlich lange Retentionszeiten, die die Bestandteile zum Passieren der Säule benötigen.

Für die gaschromatographische Auftrennung wurde ein Agilent 6890N Gaschromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einer DB1 Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm; 0,1 µm Beschichtung, J&W Scientific, USA) als stationärer Phase verwendet. Diese war mit einer Polydimethylsiloxan-Schicht ausgekleidet, die auf Grund ihres unpolaren Charakters für die Auftrennung langkettiger aliphatischer Stoffgemische besonders geeignet ist.

Das zu analysierende Stoffgemisch wurde per *On-Column-Injektion* direkt auf die Säule injiziert. Die zur Analyse von Suberin- und Wachsmonomeren verwendeten Temperaturprogramme sind nachfolgend dargestellt.

**Tabelle 11: Temperaturprogramm „Suberin“ zur gaschromatographischen Auftrennung von Suberinmonomeren**

$\Delta T$ : Temperaturerhöhung,  $T_{\max}$ : Maximaltemperatur des Programmschritts

$\Delta T$ [°C/min]	Nächste $T_{\max}$ [°C]	T halten [min]
	50	4
10	120	2
2	150	1
3	315	20

**Tabelle 12: Temperaturprogramm „Wachse“ zur gaschromatographischen Auftrennung von Wachsbestandteilen**

$\Delta T$ : Temperaturerhöhung,  $T_{\max}$ : Maximaltemperatur des Programmschritts

$\Delta T$ [°C/min]	Nächste $T_{\max}$ [°C]	T halten [min]
	50	2
40	200	2
3	310	30

Zur qualitativen Analyse der aufgetrennten Komponenten war der Gaschromatograph an ein Massenspektrometer (*MS 5973 Network Selective Detector*, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gekoppelt, das als mobile Phase verwendete Trägergas war Helium. Aufgetrennte Substanzen, die nach unterschiedlichen Retentionszeiten die Säule passieren, werden im Massenspektrometer durch Beschuss mit Elektronen ionisiert. Dabei zerfallen Substanzen in charakteristische Fragmente, die in einem angeschlossenen Quadrupol durch ein elektromagnetisches Feld beschleunigt werden, das durch vier quadratisch angeordnete Stabelektroden erzeugt wird. Durch die angelegte Wechselspannung erfolgt in festgelegten Zeitintervallen eine Selektion der Fragmente nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis, so dass nur bestimmte Fragmente zum Detektor gelangen. Das am Detektor aufgenommene Massenspektrum weist für jede Substanz charakteristische Fragmentierungsmuster aus, die mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden können.

Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden die gaschromatographisch aufgetrennten Substanzen mit Hilfe eines nachgelagerten Flammen-Ionisations-Detektors (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert, das als mobile Phase verwendete Trägergas war Wasserstoff. Die aufgetrennten Substanzen werden in einer Knallgasflamme ionisiert, wobei die entstehenden Elektronen einen Stromfluss induzieren, der durch den Detektor als digitales Signal abgeleitet wird. Die Stärke des erzeugten Stromflusses ist proportional zum Kohlenstoffgehalt der analysierten Substanzen.

Trotz vorheriger Derivatisierung kann es zu starken Interaktionen von Bestandteilen des Analyse-Gemischs mit der Säule und damit zu Ablagerungen und Verschmutzungen kommen, die die Qualität der Auftrennung beeinträchtigen. Um eine Aussage über die Auftrennungsqualität der Säule zu erhalten, wurde zuvor und im Anschluss an die Analyse ein Säurestandard aufgetragen, der aus einem derivatisierten Gemisch der langkettigen Carbonsäuren Nonacosansäure (C<sub>29</sub> Säure), Triacontansäure (C<sub>30</sub> Säure) und Hentriacontansäure (C<sub>31</sub> Säure) und dem Alkan Tetracosan (C<sub>24</sub> Alkan) bestand. Das Verhältnis der Signalstärke zwischen Alkan und der längsten Säure gilt als guter Indikator, um die Säulenqualität zu beurteilen. Liegt das Verhältnis bei einem Wert von  $\leq 1,3$  gilt die Qualität der Säule als gut, ein weiteres Indiz ist die Beschaffenheit und Form der Peaks. Liegt das Verhältnis über diesem Wert müssen entsprechende Reinigungsmaßnahmen durchgeführt werden. Das für den Säurestandard verwendete Temperaturprogramm ist nachfolgend in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13: Temperaturprogramm „Säurestandard“ zur Überprüfung der Säulenqualität**

$\Delta T$ : Temperaturerhöhung,  $T_{\max}$ : Maximaltemperatur des Programmschritts

$\Delta T$ [°C/min]	Nächste $T_{\max}$ [°C]	T halten [min]
	50	1
40	200	2
3	310	15

#### 2.10.4.6 *Statistische Auswertung*

Um die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen statistisch abzusichern, wurde die Signifikanz der Messungen mit Hilfe des Student's t-Test überprüft. Der Zweistichproben t-Test beurteilt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unterschiedliche Stich-

proben die gleichen Grundgesamtheiten mit denselben Mittelwerten zu Grunde liegen. Bezogen auf die analytischen Messungen wurde der t-Test angewandt, um mit einer definierten Mindestwahrscheinlichkeit eine Aussage darüber treffen zu können, ob gemessene unterschiedliche Mittelwerte zwischen zwei vergleichend untersuchten Genotypen einen signifikanten Effekt darstellen. Damit lassen sich Aussagen bezüglich der beobachteten Auswirkungen verschiedener Genotypen auf die Suberinzusammensetzung statistisch absichern. Beträgt die Wahrscheinlichkeit für die Aussage, dass die beiden verschiedenen Stichproben (hier also die gemessenen Werte der unterschiedlichen Genotypen) nicht auf die selbe Grundgesamtheit zurückzuführen sind (deutliche Unterschiede in den gemessenen Mengen der Suberinmonomere) mindestens 95 %, gilt die Aussage als wahr und damit statistisch signifikant. In diesem Falle wird der Unterschied zwischen analytischen Messungen in den Ergebnissen als signifikant bezeichnet ( $t \leq 0,05$ ). Beträgt die Wahrscheinlichkeit für die Aussage, dass die beiden verschiedenen Stichproben nicht auf die selbe Grundgesamtheit zurückzuführen sind mindestens 99 %, wird der Unterschied in den Ergebnissen als hoch signifikant bezeichnet ( $t \leq 0,01$ ).

## **2.11 Physiologische Untersuchungen**

### **2.11.1 Trockenstress**

Für Trockenstressexperimente wurden Pflanzen unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen angezogen und regelmäßig bewässert. Nach 21 Tagen wurden die Pflanzen in Anzuchtsschalen überführt, deren Boden mit Sand bedeckt war, um überschüssiges Wasser zu entfernen, die übrigen Bedingungen wurden nicht verändert. Die Pflanzen wurden für insgesamt 9 Tage nicht gewässert.

### **2.11.2 Salzstress und osmotischer Stress**

Für Experimente mit osmotischem oder Salzstress wurden Pflanzen unter den in 2.3.2 beschriebenen Bedingungen in hydroponischen Containern angezogen. Nach 21 Tagen wurden der Nährlösung 300 mM Mannitol oder 150 mM NaCl zugegeben, die anderen Anzuchtsbedingungen wurden nicht verändert. Für die Expressionsmessungen nach Salzstress wurden Blätter vor und 1, 3 und 6 h nach Beginn der Stressapplikation geerntet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 2.11.3 Verwundung

Für die Verwundungsstressexperimente wurden WT-Pflanzen unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen angezogen. Nach 21 Tagen wurden die Blätter mit einer Hundebürste vorsichtig großflächig perforiert. Für die Expressionsmessungen wurden Blätter vor bzw. 1, 3, 6, 24, 48 und 72 h nach Beginn der Verwundung geerntet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zusätzlich wurden Pflanzen verwundet, die mit dem Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS Konstrukt transformiert wurden, um die mögliche Induktion der Expression des Gens *ANAC038* durch Verwundung nachweisen zu können.



### **3 Ergebnisse**

### 3.1 Identifizierung von Kandidatengenegen der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

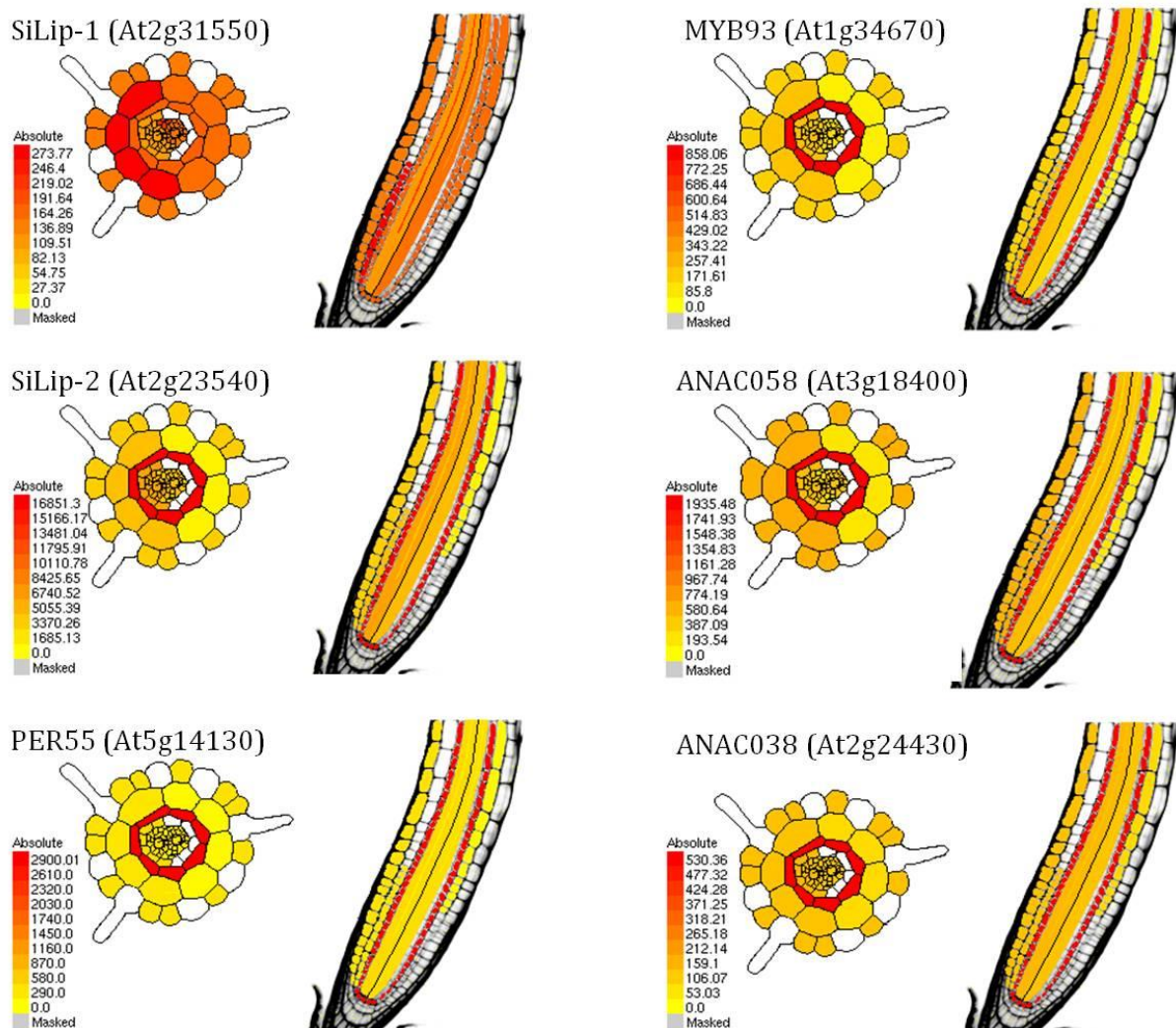
Durch die Datenbank-gestützte *in silico* Expressionsanalyse und Koregulationsuntersuchung mit bekannten Suberingenen konnten Kandidatengene mit einer potentiellen Funktion in der Suberinbiosynthese identifiziert werden. Die als putative Lipasen annotierten Gene At2g31550 und At2g23540, das als Peroxidase annotierte Gen At5g14130 (*PER55*) und die Transkriptionsfaktoren At1g34670 (*MYB93*), At3g18400 (*ANAC058*) und At2g24430 (*ANAC038*) wurden aufgrund Ihrer vorhergesagten Funktion ausgewählt und sollten in der vorliegenden Arbeit eingehender auf ihre mögliche Rolle in der Suberinbiosynthese untersucht werden. Zur besseren Übersicht erhielten die putativen Lipasen At2g31550 und At2g23540 die Arbeitsnamen *SiLip-1* und *-2* (*Suberin involved Lipase*).

Die zuvor *in silico* vorausgesagte organspezifische Expression der Gene At2g31550 (*SiLip-1*), At2g23540 (*SiLip-2*), At1g34670 (*MYB93*), At2g24430 (*ANAC038*) und At5g14130 (*PER55*) wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Daniela Nosbüsch mit Hilfe der Real-time quantativen Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) in Schote, Blüte, Stengel, apikalem und basalem Wurzelgewebe hydroponisch sowie auf Erde angezogener Pflanzen untersucht, die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang unter 7.4 aufgeführt.

Relativ bezogen auf die Expression in Blättern konnte für *SiLip-1* die höchste Expression in Blüten und dem apikalen Wurzelgewebe hydroponisch gewachsener Pflanzen gemessen werden, für *SiLip-2* wurde die höchste Expression im basalen Wurzelgewebe hydroponisch gewachsener Pflanzen gemessen. Die höchste Expression im basalen Wurzelgewebe hydroponisch gewachsener Pflanzen wurde ebenfalls für *PER55* beobachtet. Bei den Transkriptionsfaktoren *MYB93* und *ANAC038* wurde die höchste Expression im Wurzelgewebe gemessen, wobei die höchste Expression für *MYB93* in erdgewachsenen Wurzeln im apikalen Bereich gemessen wurde, für *ANAC038* hingegen im basalen Bereich. Mit Ausnahme von *SiLip-2* wurde in Blüten nur eine vergleichsweise geringe oder gar keine Expression beobachtet, geringe Expression in Schoten wurde für alle Gene mit Ausnahme der drei Transkriptionsfaktoren beobachtet.

Charakteristische suberinisierte Bereiche der Wurzel sind Endodermis und Exodermis. Nachdem mit Ausnahme für *SiLip-1* für alle Gene das höchste Expressionslevel in der Wurzel bestimmt werden konnte, wurden mit Hilfe des Microarray-basierten *Arabidop-*

sis *eFP*-Browsers Informationen über die gewebespezifische Expression in Wurzeln ausgewertet, die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.



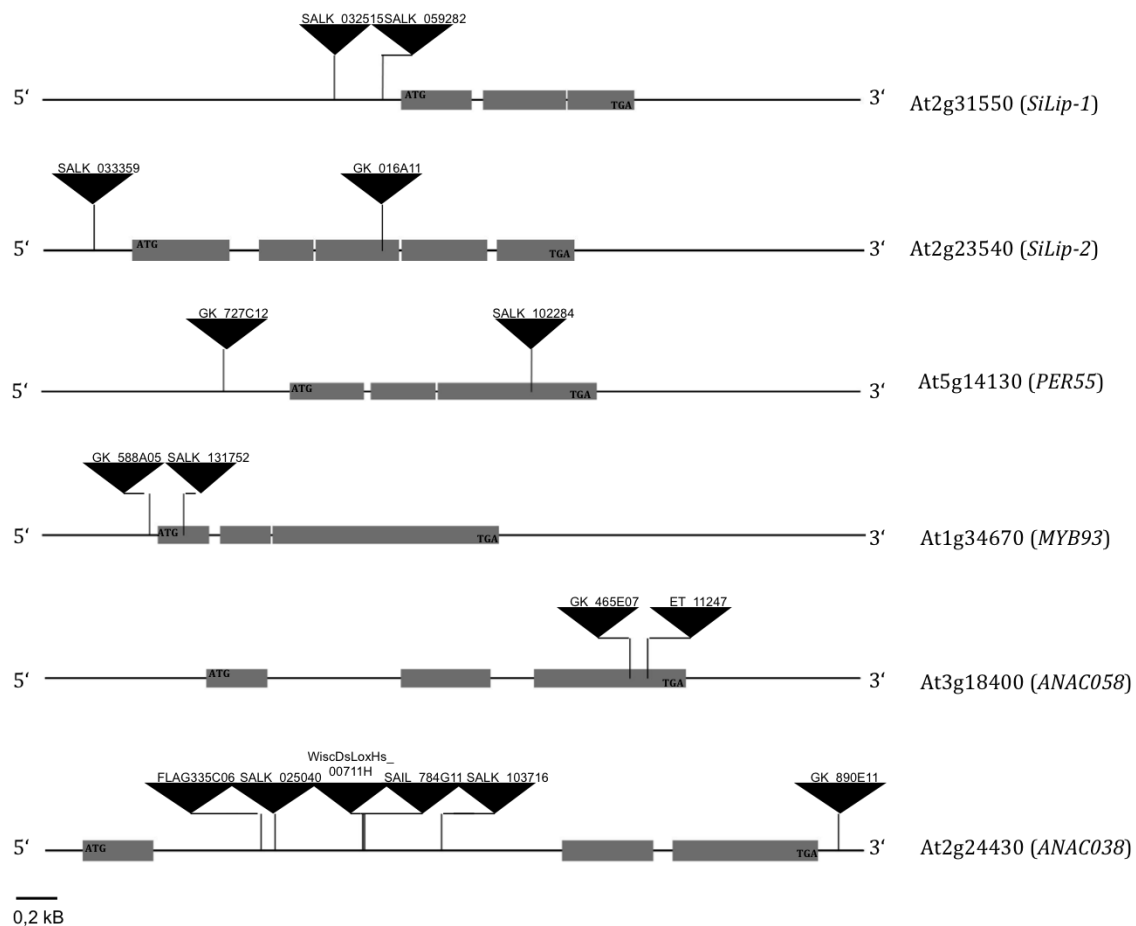
**Abbildung 17: Lokalisation der Genexpression in der Wurzel mit Hilfe des *Arabidopsis eFP*-Browser**

Den Graphiken liegen Expressionsdaten des Microarray-basierten *Arabidopsis eFP*-Browsers zu Grunde. Dargestellt ist die Genexpression in Wurzellängs- und -querschnitten, je intensiver die Färbung desto stärker die Genexpression in dem jeweiligen Gewebe. Absolute Werte können den nebenstehenden Skalen entnommen werden. Mit Ausnahme des Gens *SiLip-1* konnte die stärkste Expression jeweils im endodermalen Gewebe beobachtet werden. Daten: <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.

Die Abbildungen zeigen Wurzelquerschnitte in denen die Intensität der Expression farblich dargestellt wird, je intensiver der Farbton desto höher ist das Expressionslevel des untersuchten Gens. Auf Grundlage dieser Daten ließ sich für alle Gene mit Ausnahme von *SiLip-1* eine Endodermis-spezifische Expression bestimmen.

### 3.2 Genotypisierung und Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien

Um eine mögliche Rolle der Kandidatengene in der Suberinbiosynthese qualitativ und quantitativ untersuchen und mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion ziehen zu können, wurden für jedes Kandidatengen mindestens zwei Mutantenlinien bestellt. Die nachfolgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die Genstruktur aller sechs Kandidatengene und der zugehörigen Mutanten-Linien.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Genloci der sechs Kandidatengene und der Position der Insertionen**

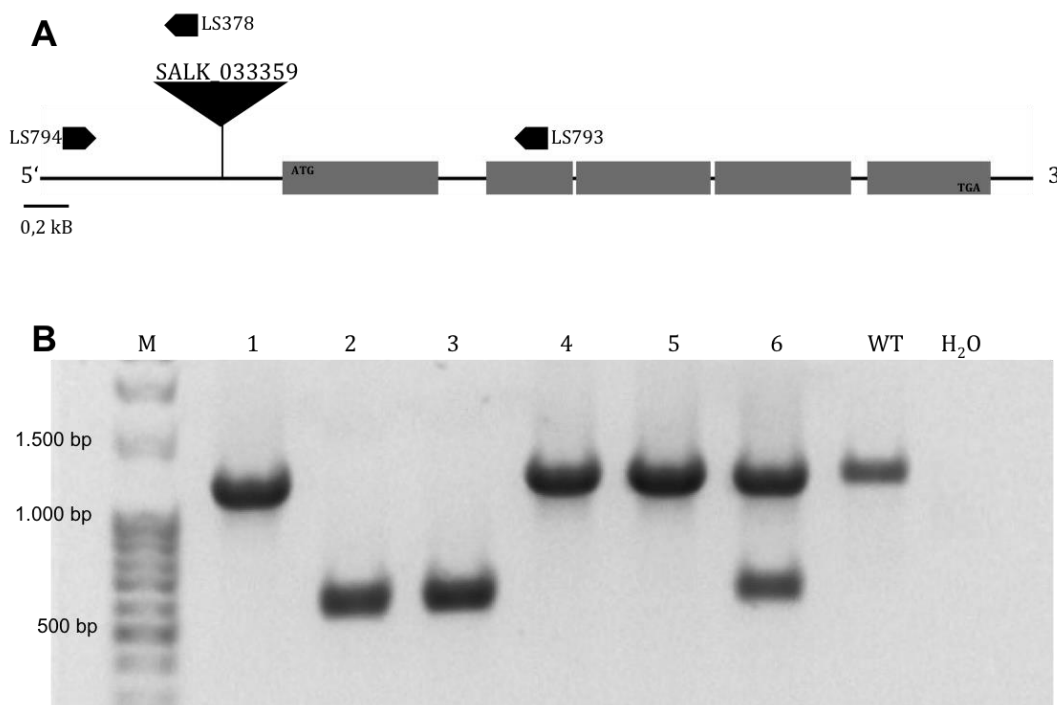
Schematische Darstellung der Genloci der sechs Kandidatengene in der Orientierung von 5' nach 3', dunkelgraue Boxen kennzeichnen Exons, schwarze Dreiecke kennzeichnen die angegebenen Positionen der T-DNA Insertionen der Mutanten.

Die Genotypisierung aller Mutantenlinien erfolgte mit Hilfe der kompetitiven PCR. Die Verwendung von zwei Gen spezifischen und einem T-DNA spezifischen Primer erlaubte sowohl die Bestimmung der Position als auch der Ausrichtung der T-DNA Insertion innerhalb des Gens. Stellvertretend für alle Genotypisierungsexperimente ist in Abbildung

19 das Ergebnis dieser PCR für die Mutantenlinie SALK\_033359 des Gens *SiLip-2* detailliert dargestellt.

Um Mutanten des *SiLip-2* Gens untersuchen zu können wurden Samen der Mutantenlinie SALK\_033359 über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) bezogen und wie in 2.3.1 beschrieben angezogen. Nach zwei Wochen wurden zwei Rosettenblätter geerntet und zur Extraktion genomischer DNA verwendet (vgl. 2.6.1). In der anschließenden PCR wurden die Primer LS793 und LS794 als genspezifische Primer verwendet, als T-DNA spezifischer Primer diente LS378. In Abhängigkeit von der Insertion wurde für Wildtyp-Pflanzen ein durch die Primer LS793 und LS794 gebildetes Amplikon der Größe 1.366 bp erwartet, für homozygote Insertionsmutanten wurde ein durch die Primer LS 794 und LS378 gebildetes Amplikon der Größe 595 bp erwartet, für heterozygote Insertionsmutanten wurden beide Amplikons erwartet.

Auf Grundlage dieser Erwartungen konnten die Pflanzen Nr. 2 und 3 als homozygote Insertionsmutanten für das Gen *SiLip-2* identifiziert und ihre Nachkommen für die weiteren Untersuchungen verwendet werden. Pflanze Nr. 6 stellt eine heterozygote Insertionsmutante dar, die übrigen Pflanzen tragen keine Insertion an dieser Position.



**Abbildung 19: Genotypisierung der Mutantenlinie SALK\_033359 des Genlocus *SiLip-2***

**A:** Schematische Darstellung des Genlocus *SiLip-2* von 5' nach 3'. Dunkelgraue Boxen kennzeichnen Exons, das schwarze Dreieck kennzeichnet die Position der T-DNA Insertion der Linie SALK\_033359, schwarze Pfeile kennzeichnen die Position der Genotypisierungsprimer. **B:** Agarosegel nach der Genotypisierungs-PCR. M: Marker, 1-6: zu genotypisierende Pflanzen, WT: Positivkontrolle mit Wildtyp-DNA, H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle mit Reinstwasser. Erwartete Fragmentgrößen: *SiLip-2*: 1.366 bp, *silip-2*: 595 bp.

Falls ausschließlich heterozygote Insertionsmutanten identifiziert werden konnten, wurden einzelne Pflanzen unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen propagiert um Pflanzen der Folgegeneration erneut auf homozygote Insertionsmutanten zu überprüfen.

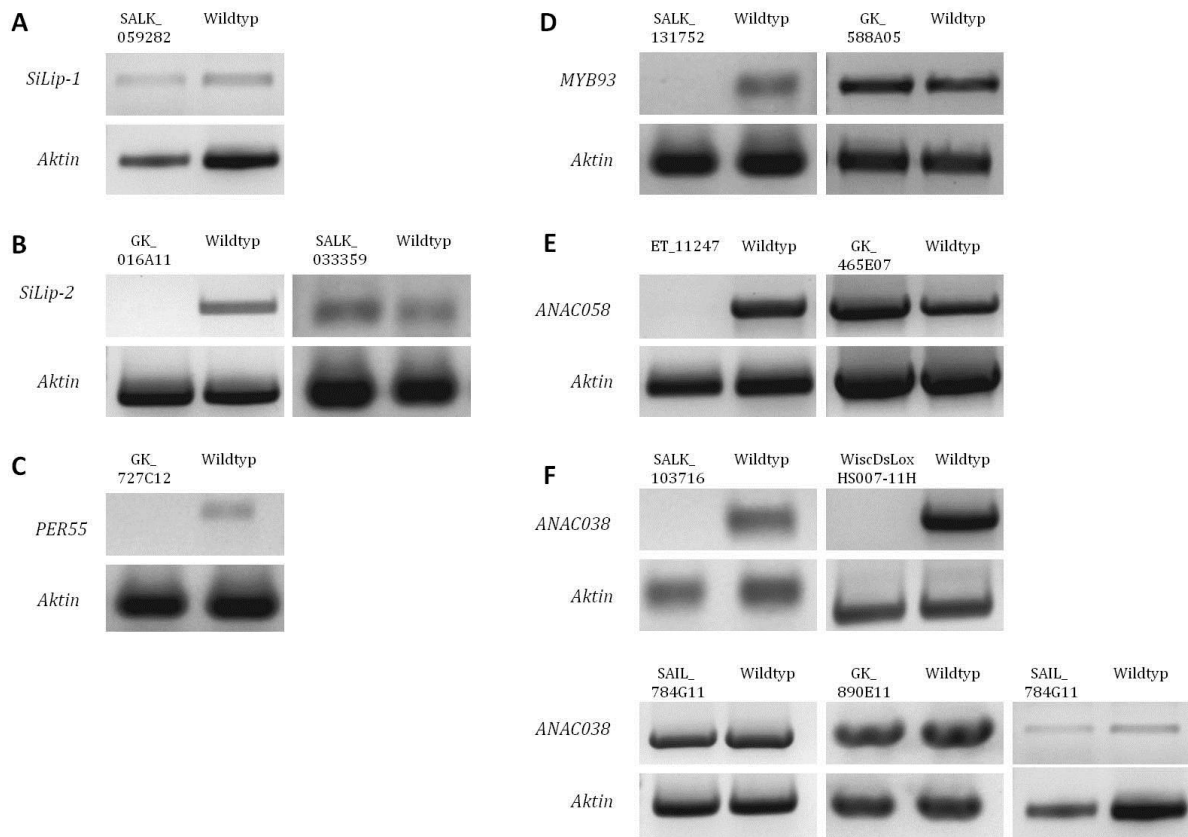
Mit Ausnahme von *SiLip-1* und *PER55* konnten für alle Genloci mindestens zwei homozygote Insertionsmutanten identifiziert werden, deren Expressionslevel im nächsten Schritt mit Hilfe der Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt wurden. Die Ergebnisse der Genotypisierung aller Insertionsmutanten sind nachfolgend in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genotypisierung aller Insertionsmutanten**

<b>Genlocus</b>	<b>Insertionsmutante</b>	<b>Homozygot</b>	<b>Wildtyp</b>
<i>SiLip-1</i> (At2g31550)	SALK_032515		X
	SALK_059282	X	
<i>SiLip-2</i> (At2g23540)	SALK_033359	X	
	GK_016A11	X	
<i>PER55</i> (At5g14130)	GK_727C12	X	
	SALK_102284		X
<i>MYB93</i> (At1g34670)	GK_588A05	X	
	SALK_131752	X	
<i>ANAC058</i> (At3g18400)	GK_465E07	X	
	ET_11247	X	
	FLAG355C06	X	
	SALK_025040		<i>Samen nicht gekeimt</i>
<i>ANAC038</i> (At2g24430)	WiscDsLoxHs_00711H	X	
	SAIL_784G11	X	
	SALK_103716	X	
	GK_890E11	X	

Wurzeln vier Wochen alter als homozygot charakterisierter Insertionsmutanten wurden vorsichtig ausgegraben, gewaschen und die Gesamt-RNA wie in 2.6.2 beschrieben extrahiert. Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Expressionslevel in den Mutanten semiquantitativ

untersucht, als interne Kontrolle diente das konstitutiv exprimierte Gen *Aktin*. Mit Ausnahme von *SiLip-1* konnten für alle Gene Insertionsmutanten identifiziert werden, deren Genexpressionslevel nicht nachweisbar war, für den Genlocus *ANAC038* konnte der transkriptionelle Knockout für zwei Allele bestätigt werden. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien**

Expression der jeweils angegebenen Gene in den korrespondierenden Insertions-Mutanten, als Kontrolle dient das konstitutiv exprimierte Gen *Aktin*. Das Fehlen einer Bande bedeutet den transkriptionellen Knockout der Genexpression als Folge der T-DNA Insertion, dieser konnte für die Mutantenlinien GK\_016A11 (B), GK\_727C12 (C), SALK\_131752 (D), ET\_11247 (E), SALK\_103716 und SAIL\_784G11 (beide F) nachgewiesen werden.

Von 16 ausgesäten putativen Mutantenlinien konnten abschließend sechs Insertionslinien mit homozygotem Gen-Knockout identifiziert werden. Diese wurden in den nachfolgenden Experimenten dieser Arbeit verwendet.

Die Ergebnisse der Genotypisierung und Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien sind nachfolgend in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genotypisierung und der Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien**

Homozygote Insertionsmutanten, in denen ein transkriptioneller Gen-Knockout nachgewiesen werden konnte, sind hervorgehoben.

Genlocus	Insertionsmutante	Homozygot	Transkriptioneller Knockout
<i>SiLip-1</i>	SALK_032515	nein	
(At2g31550)	SALK_059282	ja	nein
<i>SiLip-2</i>	SALK_033359	ja	nein
(At2g23540)	<b>GK_016A11</b>	ja	ja
<i>PER55</i>	<b>GK_727C12</b>	ja	ja
(At5g14130)	SALK_102284	nein	
<i>MYB93</i>	GK_588A05	ja	nein
(At1g34670)	<b>SALK_131752</b>	ja	ja
<i>ANAC058</i>	GK_465E07	ja	nein
(At3g18400)	<b>ET_11247</b>	ja	ja
	FLAG355C06	ja	nein
	SALK_025040	nein	
<i>ANAC038</i>	<b>WiscDsLoxHs_00711H</b>	ja	ja
(At2g24430)	SAIL_784G11	ja	nein
	<b>SALK_103716</b>	ja	ja
	GK_890E11	ja	nein

Da für das Gen *SiLip-1* keine Knockout Mutanten identifiziert werden konnten, wurden die Arbeiten mit diesem Genlocus nicht weiterverfolgt.

Die Insertionsmutante GK\_727C12 für die Peroxidase PER55 wurde von Sebastian Theobald (2012) im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit untersucht. Die Analyse des Wurzelsuberin hydroponisch angezogener Pflanzen zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen. Allerdings konnten in der Analyse erdgewachsener Wurzeln Unterschiede in der Suberinzusammensetzung zwischen *per55* Pflanzen und deren korrespondierendem Wildtyp beobachtet werden: In *per55* Pflanzen war der Gehalt an trans-Ferulasäure um 35 % reduziert, die Gesamtmenge an  $\omega$ -Hydroxysäuren war um 23 % erhöht, was aus einer Erhöhung der Mengen an C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>-, C<sub>18:1</sub> und C<sub>20</sub>- $\omega$ -Hydroxysäuren resultierte. Des Weiteren konnte eine Steigerung der C<sub>20</sub>-Säure Konzent-



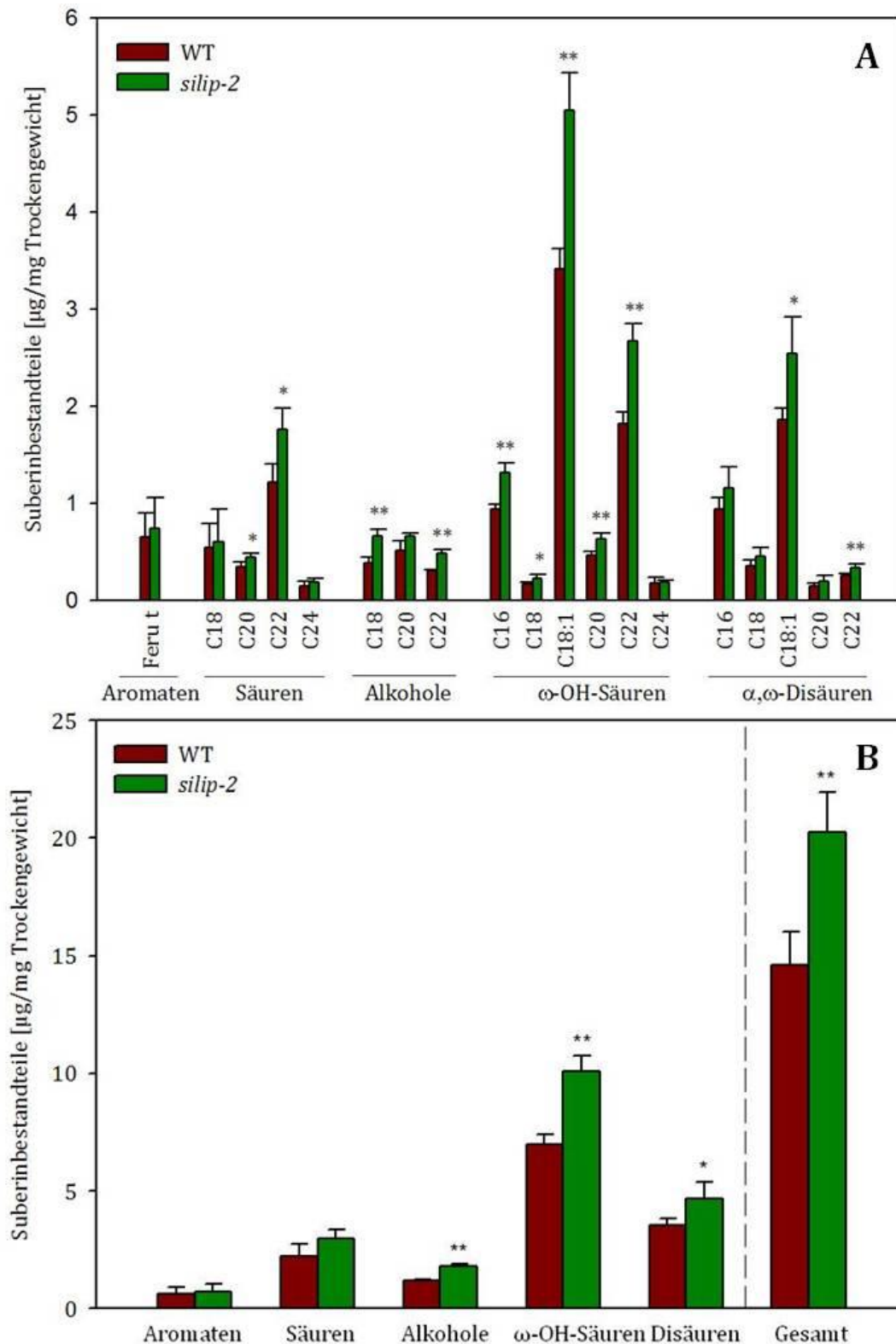
ration um 33 % sowie eine erhöhte Menge an C<sub>18</sub>- und C<sub>20</sub>-Dicarbonsäuren gemessen werden.

### 3.3 Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins in der *silip-2* Mutante

Zur Untersuchung des Wurzelsuberins wurden *silip-2* und WT-Pflanzen in hydroponischen Kammern angezogen und die Wurzeln nach 30 Tagen geerntet. Für die *silip-2* Mutante wurden vier Wurzeln analysiert, für den Wildtyp wurden drei Wurzeln analysiert. Insgesamt konnten 18 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Aromaten (trans-Ferulasäure), Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>),  $\omega$ -Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten.

Der Vergleich der Mengen der analysierten Suberinbestandteile wurde in Bezug auf das Trockengewicht ermittelt und wird in der vorliegenden Arbeit mit der Einheit  $\mu\text{g}/\text{mgdw}$  (mg *dry weight*) angegeben. Die Messung ergab signifikante Unterschiede zwischen Mutanten- und WT-Pflanzen: Der Gesamtsuberingehalt der Mutante ist mit  $20,3 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  im Vergleich zur WT-Pflanze mit  $14,6 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  um 39 % erhöht und der Unterschied hoch signifikant (Student's t-Test:  $t \leq 0,01$ ), die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 21 dargestellt.

Dieses Ergebnis resultiert aus einer Akkumulation der  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren und primären Alkohole. Die prominenteste Substanzklasse der  $\omega$ -Hydroxysäuren ist in der Mutante mit einer Suberinmenge von  $10,1 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  im Vergleich zum WT mit  $7,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  um 44 % erhöht, die Menge der primären Alkohole ist um 50 % ( $1,8 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  in der Mutante und  $1,2 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  im WT), die Menge der  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren um 34 % ( $4,7 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  in der Mutante und  $3,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mgdw}$  im WT) erhöht. In den Alkoholen und  $\omega$ -Hydroxysäuren konnte diese Veränderung für alle Substanzen der Kettenlängen C<sub>16</sub> bis C<sub>22</sub> mit Ausnahme des C<sub>20</sub> Alkohols beobachtet werden, in den  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren wurde dieser Effekt nur für die Kettenlängen C<sub>18:1</sub> und C<sub>22</sub> beobachtet. Weitere signifikante (Student's t-Test:  $t \leq 0,05$ ) Akkumulationen von Suberinmonomeren konnten in den C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Monocarbonsäuren mit einer Erhöhung um 33 % bzw. 42 % beobachtet werden, diese führten zwar zu einem leichten Anstieg des Gehalts an Monocarbonsäuren, der jedoch nicht statistisch signifikant war (Student's t-Test:  $t > 0,05$ ).



**Abbildung 21: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante *silip-2* und des korrespondierenden Wildtyps**

**A:** Zusammensetzung der Monomere des aliphatischen Wurzelsuberins der Mutante *silip-2* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei (Wildtyp) bzw. vier Parallelen (Mutante)  $\pm$  Standardabweichung. Ferul t: trans-Ferulasäure, Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; \*: Student's t-Test,  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$ .

### 3.3.1 Auswirkungen des *SiLip-2* Knockouts auf die Toleranz gegenüber Trockenstress

Um mögliche Effekte des *SiLip-2* Knockouts auf die Toleranz gegenüber Trockenstress zu untersuchen, wurden 21 Tage alte erdgewachsene *silip2* und WT-Pflanzen für einen Zeitraum von zehn Tagen nicht gegossen. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich Pflanzen der Linie *esb1* angezogen und derselben Behandlung unterzogen. Diese zeichnen sich durch einen signifikant höheren Suberingehalt der Wurzeln aus und zeigten in früheren Studien eine verbesserte Toleranz gegenüber Trockenstress (Baxter et al., 2009). Parallel wurden Pflanzen jedes Genotyps als Kontrolle weiterhin wie zuvor regelmäßig gewässert. Das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 22 dargestellt.



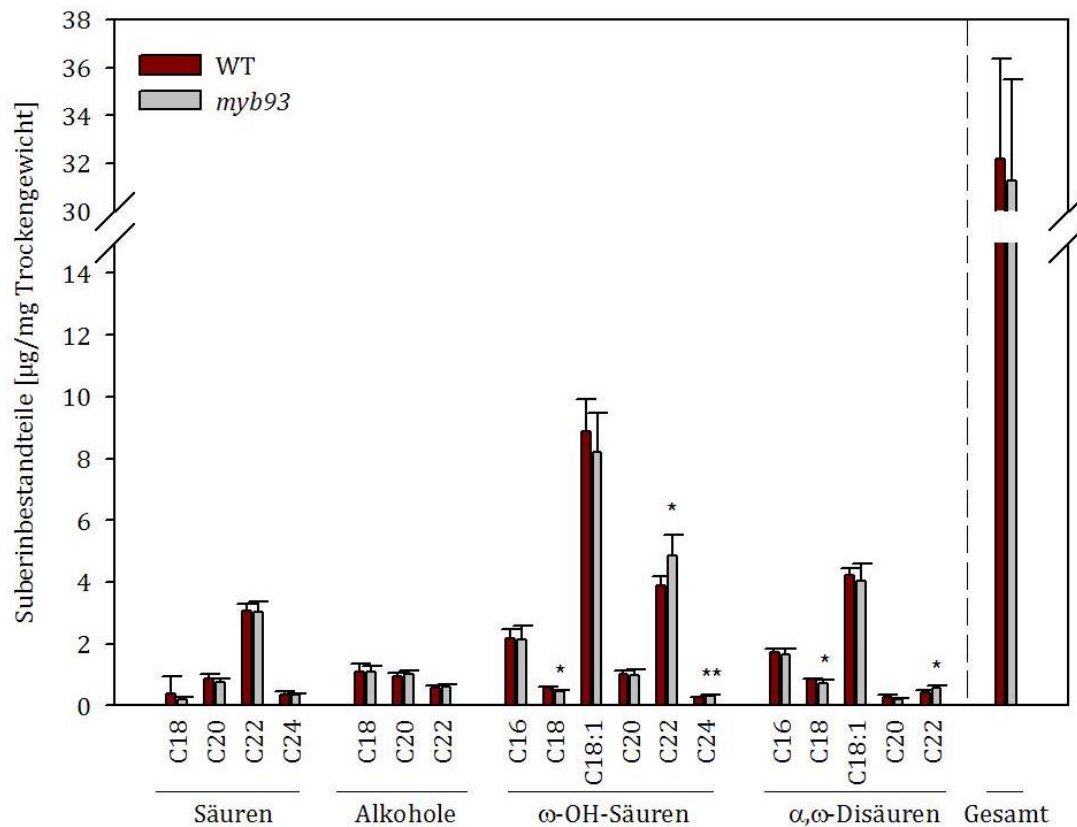
**Abbildung 22: *silip-2* und WT-Pflanzen nach 10-tägigem Trockenstress**

*silip-2* und WT-Pflanzen wurden zehn Tage lang nicht gegossen, als Positivkontrolle fungierte die trockenstresstolerante und Suberin reichere *esb1* Mutante. Kontrolle: *silip-2* Pflanzen wurden weiterhin unverändert gewässert, andere Kontrollpflanzen nicht gezeigt.

Wie dargestellt wirken die Blätter der nicht gegossenen WT-Pflanzen ausgetrocknet, bräunlich verfärbt und nekrotisch. Die Blätter der Linien *silip-2* und *esb1* hingegen sind gleichmäßig grün gefärbt, zeigen wenig Anzeichen von Erschlaffung und kaum Nekrosen. Dabei ist zwischen Pflanzen der Linie *silip-2* und *esb1* kein Unterschied zu erkennen. Diese Pflanzen zeigen damit eine deutlich bessere Toleranz gegenüber Trockenstress als WT-Pflanzen.

### **3.4 Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins in der *myb93* Mutante**

Zur Untersuchung des Wurzelsuberins wurden auf Erde angezogene *myb93* und WT-Pflanzen nach 36 Tagen geerntet, die Wurzeln gewaschen und wie in 2.10.1 beschrieben für die Analyse vorbereitet, vier Wurzeln des Wildtyps und sechs Wurzeln der Mutante wurden analysiert. Insgesamt konnten 18 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante *myb93* und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des aliphatischen Wurzelsuberins der Mutante *silip-2* und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus vier (Wildtyp) bzw. sechs (Mutante) Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; \*:  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$

Der Vergleich der Gesamtsuberinmenge in Wurzeln zwischen *myb93* und WT-Pflanzen ergab keinen signifikanten Unterschied. Bei der Betrachtung der Menge der aliphatischen Monomere konnten jedoch für Vertreter der  $\omega$ -Hydroxysäuren und der  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden, die allerdings in Anbetracht der Größenordnung der gemessenen Werte nur geringfügig waren und sich nicht signifikant auf die Gesamtmenge dieser Substanzklassen auswirkten.

So war die Menge der C<sub>18</sub>  $\omega$ -Hydroxysäure in der Mutante um 19 % reduziert (WT:  $0,56 \pm 0,1 \mu\text{g/mgdw}$ , *myb93*:  $0,45 \pm 0,1 \mu\text{g/mgdw}$ ). Die Menge an C<sub>22</sub>  $\omega$ -Hydroxysäure war in der Mutante jedoch um 20 % erhöht (WT:  $3,88 \pm 0,3 \mu\text{g/mgdw}$ , *myb93*:  $4,84 \pm 0,7 \mu\text{g/mgdw}$ ), die Menge an C<sub>24</sub>  $\omega$ -Hydroxysäure um 21 % (WT:  $0,26 \pm 0,02 \mu\text{g/mgdw}$ , *myb93*:  $0,33 \pm 0,04 \mu\text{g/mgdw}$ ).

In der Mutante waren die  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren der Kettenlänge C<sub>18</sub> um 16 % reduziert (WT:  $0,86 \pm 0,03 \mu\text{g/mgdw}$ , *myb93*:  $0,72 \pm 0,1 \mu\text{g/mgdw}$ ), die der Kettenlänge C<sub>22</sub> waren um 26 % erhöht (WT:  $0,41 \pm 0,9 \mu\text{g/mgdw}$ , *myb93*:  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mgdw}$ ).

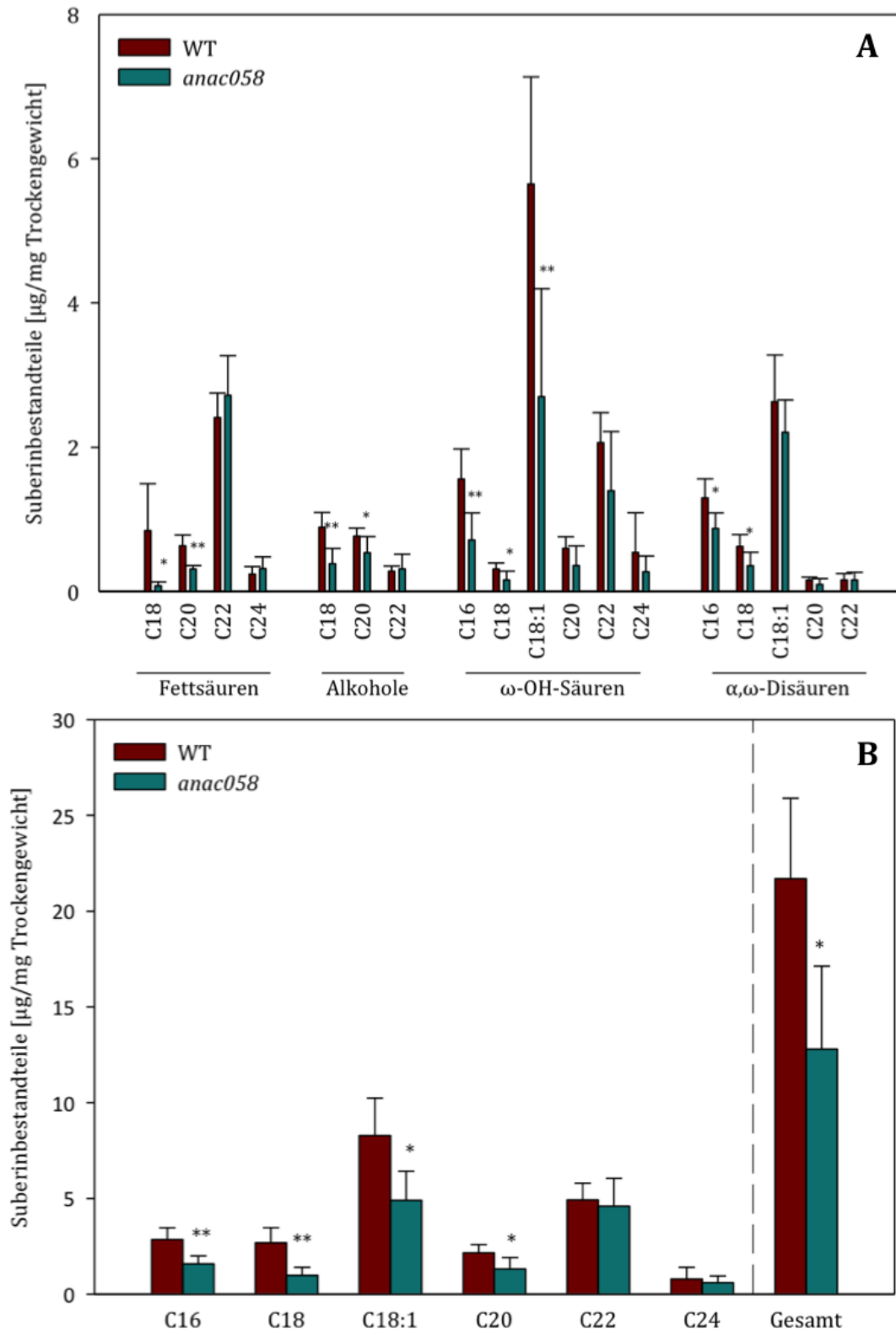
## **3.5 Charakterisierung des Transkriptionsfaktors NAC058 in *Arabidopsis thaliana***

### **3.5.1 Untersuchungen der Suberinzusammensetzung der *anac058* Mutante**

Die Zusammensetzung des Suberins wurde in Wurzeln, im Periderm und in Samen der *anac058* Mutante untersucht.

#### **3.5.1.1 *Untersuchung des Gesamtwurzelsuberins***

Zur Untersuchung des Wurzelsuberins wurden jeweils fünf auf Erde angezogene *anac058* und WT-Pflanzen nach 37 Tagen geerntet, die Wurzeln gewaschen und wie in 2.10.1 beschrieben für die Analyse vorbereitet. Durch die gaschromatographische Analyse konnten insgesamt 18 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 24 dargestellt.



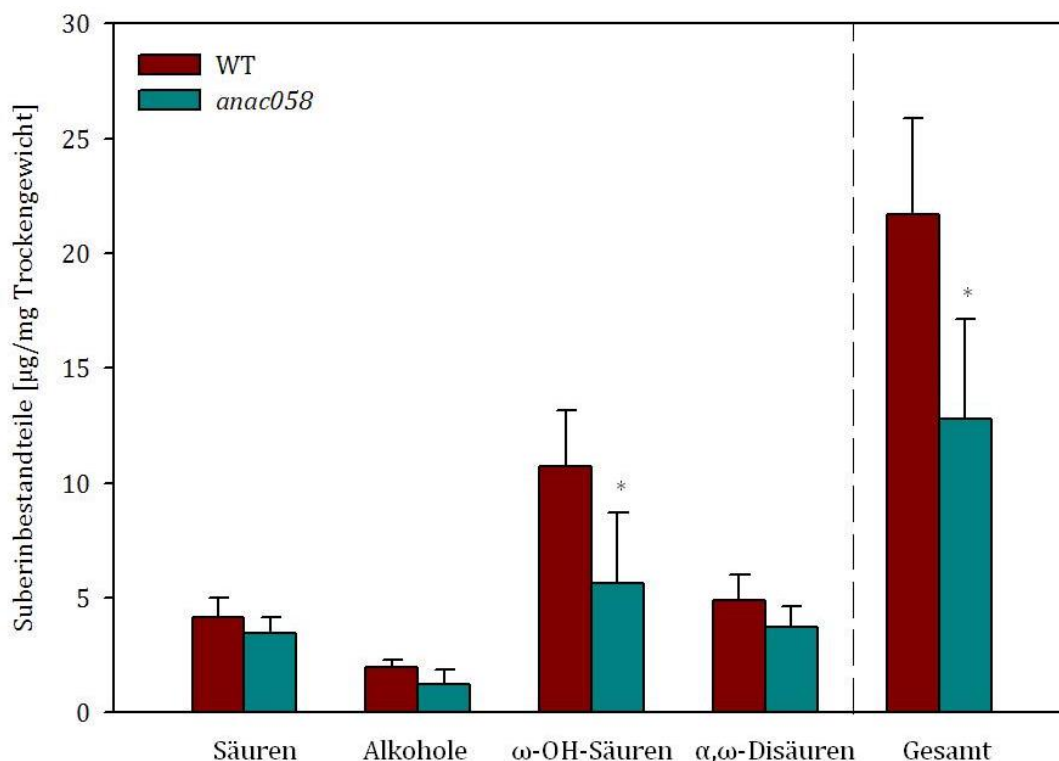
**Abbildung 24: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps**

**A:** Zusammensetzung der Monomere des aliphatischen Wurzelsuberins der Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Kettenlängenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; \*:  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$



Im Vergleich zwischen den Wurzeln der *anac058* und WT-Pflanzen ist der Gesamtsuberinhalt der Mutanten um 41 % reduziert (WT:  $21,7 \pm 4,2 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ , *anac058*:  $12,8 \pm 4,3 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ ). Dieser Unterschied resultiert primär aus einer Verringerung aller Monomere der Kettenlängen  $C_{16}$  (Reduktion um 45 %, WT:  $2,9 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ , *anac058*:  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ ) und  $C_{18}$  (Reduktion um 63 %, WT:  $2,7 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ , *anac058*:  $1,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ ). Des Weiteren ist der Gehalt an Monomeren der Kettenlänge  $C_{20}$  in den Monocarbonsäuren (Reduktion um 20 %) und den Alkoholen (Reduktion um 38 %) sowie die  $C_{18:1}$   $\omega$ -Hydroxysäure (Reduktion um 53 %) im Wurzelsuberin der *anac058* Pflanzen signifikant reduziert. Für die übrigen Monomere konnten keine Veränderungen beobachtet werden.

Bezogen auf die unterschiedlichen Substanzklassen wirkten sich diese Veränderungen signifikant ausschließlich auf die  $\omega$ -Hydroxysäuren aus, deren Gehalt um 48 % (WT:  $10,7 \pm 2,4 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ , *anac058*:  $5,6 \pm 3,1 \mu\text{g}/\text{mgdw}$ ) reduziert vorlag, wie nachfolgend in Abbildung 25 gezeigt. Bezogen auf die Verteilung der restlichen Substanzklassen konnten zwar Reduktionen aber keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden.



**Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung der Substanzklassen des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps**

Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; \*:  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$



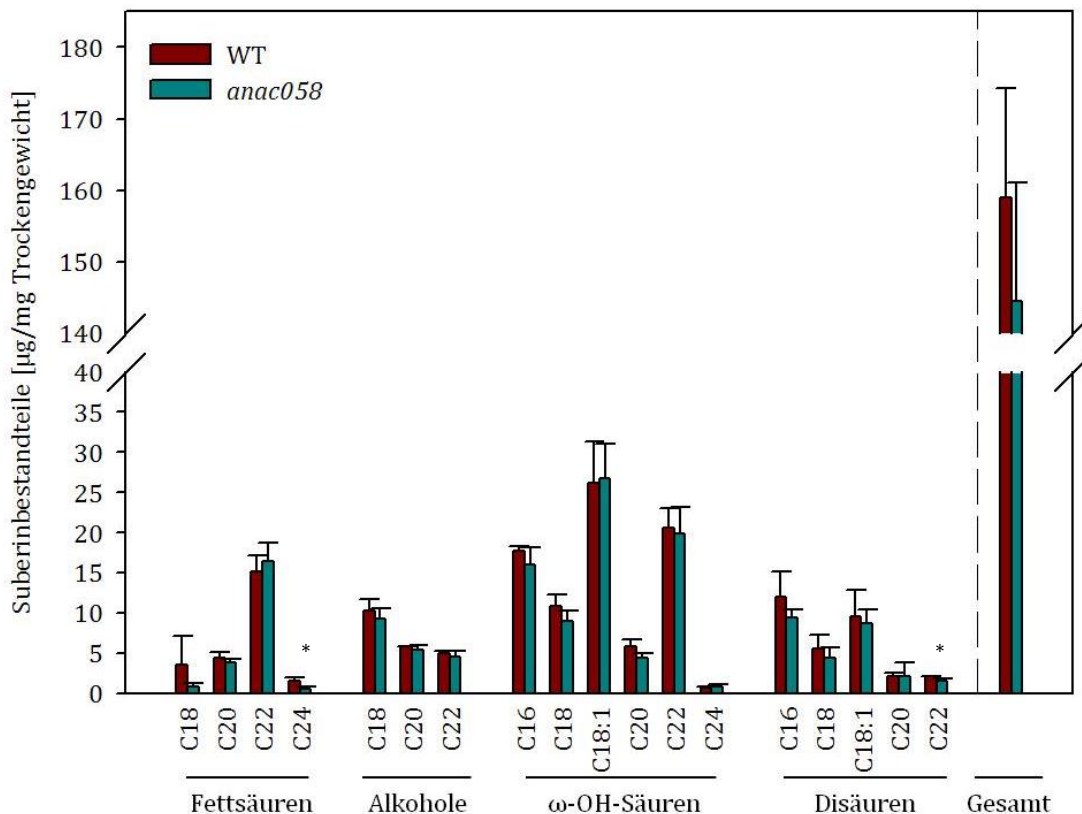
### 3.5.1.2 *Untersuchung des peridermalen Suberins*

Zur Untersuchung des peridermalen Suberins wurden jeweils 48 *anac058* und WT-Pflanzen auf Erde angezogen und der zu untersuchende Wurzelabschnitt wie in 2.10.2 beschrieben präpariert, um anschließend das peridermale Suberin durch Verdau und mechanische Behandlung zu separieren. Für die anschließende Analyse wurden die isolierten Periderme gepoolt und in jeweils drei Parallelen zusammengefasst.

Durch die gaschromatographische Analyse konnten insgesamt 18 Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 26 dargestellt. Die Substanzklasse der ω-Hydroxysäuren bildete die prominenteste Stoffklasse (WT: 81,9 ± 10,1 µg/mgdw, *anac058*: 77,0 ± 10,9 µg/mgdw), gefolgt von α,ω-Dicarbonsäuren (WT: 31,3 ± 7,7 µg/mgdw, *anac058*: 26,2 ± 1,9 µg/mgdw), Fettsäuren (WT: 24,7 ± 2,8 µg/mgdw, *anac058*: 21,9 ± 2,2 µg/mgdw) und primären Alkoholen (WT: 21,2 ± 1,3 µg/mgdw, *anac058*: 19,3 ± 2,5 µg/mgdw).

Der Vergleich des peridermalen Suberins zwischen *anac058* und WT-Pflanzen zeigte keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme der C<sub>24</sub> Monocarbonsäure (WT: 1,9 ± 0,4 µg/mgdw, *anac058*: 0,6 ± 0,2 µg/mgdw) und der C<sub>22</sub> α,ω-Dicarbonsäuren (WT: 2,1 ± 0,1 µg/mgdw, *anac058*: 1,6 ± 0,3 µg/mgdw).

Diese hatten jedoch keine Auswirkungen auf die Suberingesamtmenge oder die Substanzklassenverteilung. Im direkten Vergleich der Suberinzusammensetzung zwischen Mutante und Wildtyp konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 26: Vergleich der Zusammensetzung des peridermalen Suberins der Knockout Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des aliphatischen Wurzelsuberins der Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus drei Parallelen (entspricht 16 Pflanzen)  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren. \*:  $t \leq 0,05$

### 3.5.1.3 Untersuchung des Samenschalenuberins

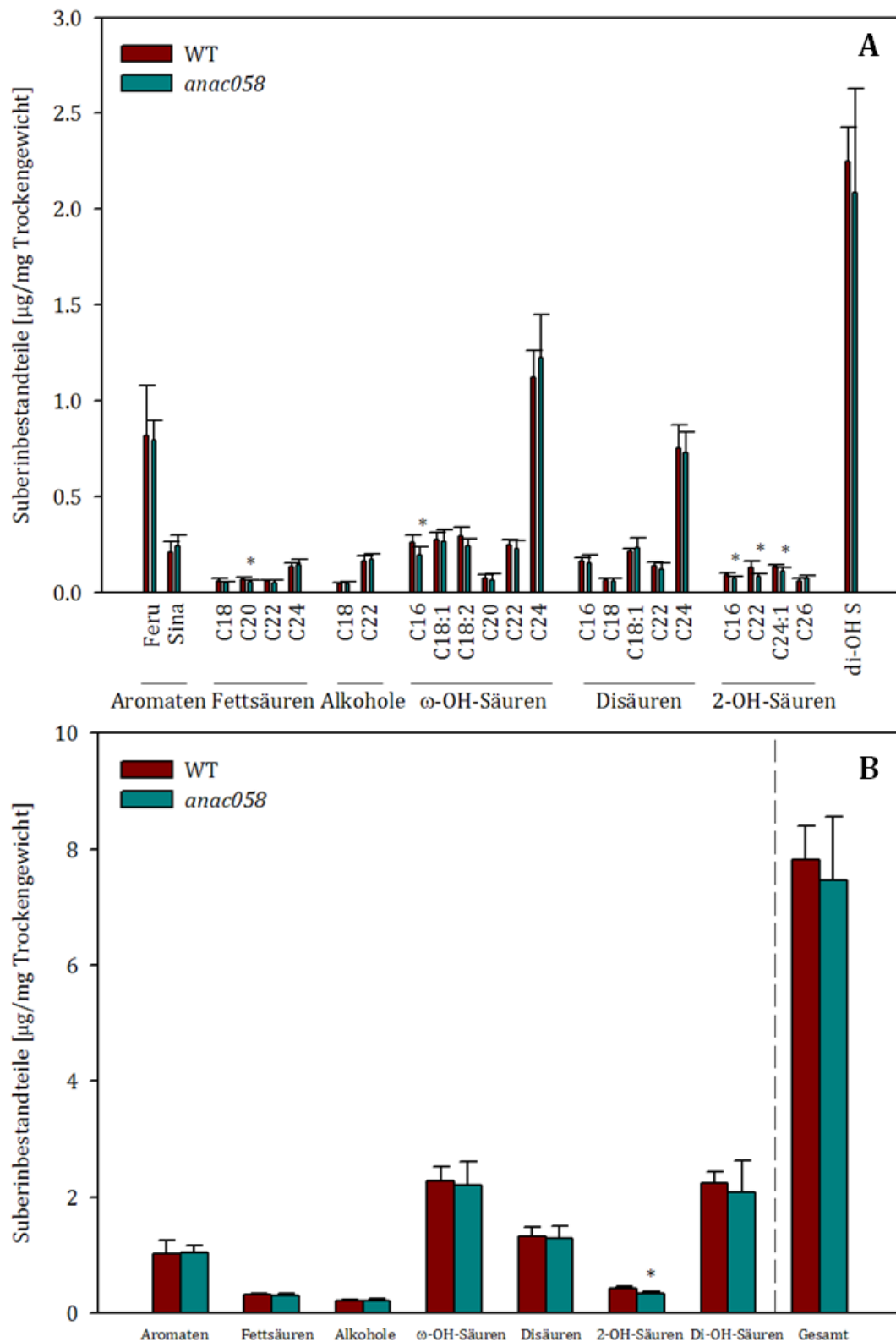
Die Aufbereitung isolierten Samenschalenmaterials aus jeweils fünf *anac058* und WT-Pflanzen erfolgte gemäß der in 2.10.3 beschriebenen Vorgehensweise, jeder Parallele liegen alle geernteten Samen einer Pflanze zugrunde.

In allen untersuchten Linien konnten 24 Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>),  $\omega$ -Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>),  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>), 2-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>26</sub>), Di-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>) und Aromaten (Ferulasäure und Sinapinsäure) zugeordnet werden konnten, wie in Abbildung 27 dargestellt.

Der Vergleich der Suberinzusammensetzung und der Gesamtmenge in Samenschalen von *anac058* und WT-Pflanzen zeigte äußerst geringfügige aber signifikante Unterschiede für die C<sub>20</sub> Monocarbonsäure (WT:  $0,1 \pm 0,01$  µg/mgdw, *anac058*:  $0,1 \pm 0,01$  µg/mgdw), C<sub>16</sub>  $\omega$ -Hydroxysäure (WT:  $0,3 \pm 0,04$  µg/mgdw, *anac058*:  $0,2 \pm 0,04$

µg/mgdw) und alle 2-Hydroxysäuren mit Ausnahme der Kettenlänge C<sub>26</sub> (C<sub>16</sub>: WT: 0,1 ± 0,01 µg/mgdw, *anac058*: 0,1 ± 0,01 µg/mgdw; C<sub>22</sub>: WT: 0,1 ± 0,03 µg/mgdw, *anac058*: 0,1 ± 0,5 µg/mgdw; C<sub>24:1</sub>: WT: 0,1 ± 0,01 µg/mgdw, *anac058*: 0,1 ± 0,01 µg/mgdw). Die Veränderungen des Gehalts an 2-Hydroxysäuren resultierten in einer Reduktion um 19 %.

Mit Ausnahme dieser geringfügigen Reduktionen der Monomermenge in der Mutante konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede der Zusammensetzung und der detektierten Gesamtmenge des Samenschalensuberin von *anac058* und WT-Pflanzen festgestellt werden.



**Abbildung 27: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalensuberins der Knockout Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps**

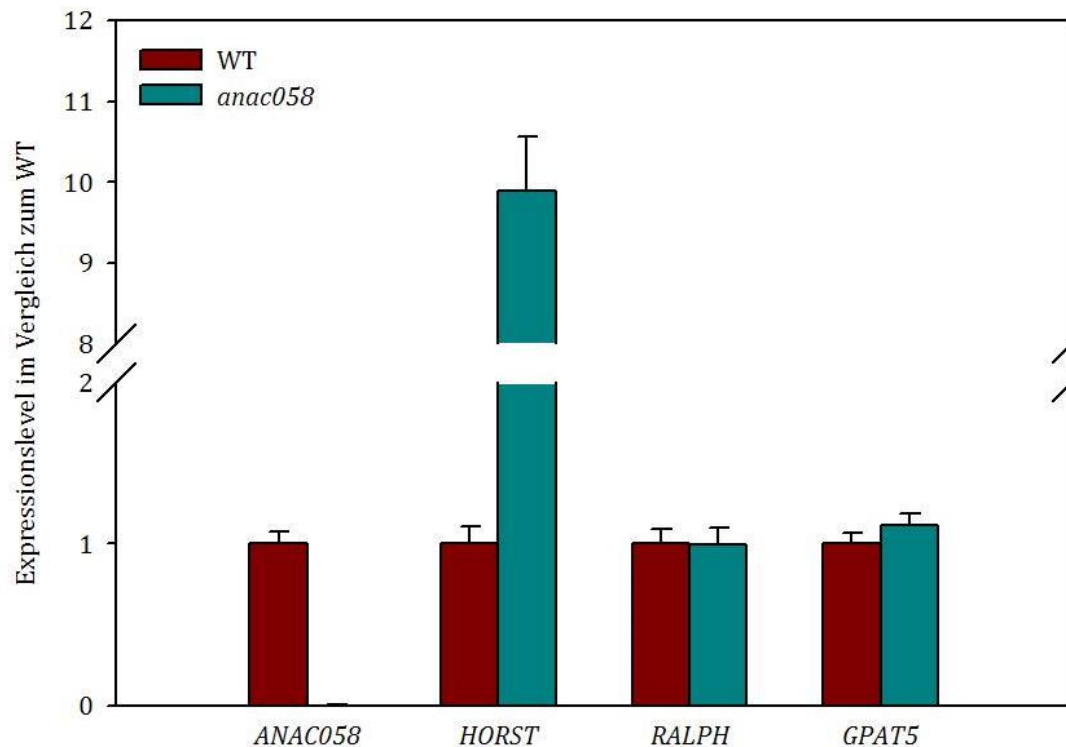
**A:** Zusammensetzung der Monomere des Samenschalensuberins der Mutante *anac058* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Fettsäuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren, 2-OH-Säuren: 2-Hydroxysäuren, di-OH-S/Di-OH-Säuren: Di-Hydroxysäuren, Feru: Ferulasäure, Sina: Sinapinsäure; \*:  $t \leq 0,05$ .

### 3.5.2 Auswirkungen des Knockouts auf die Expression charakterisierter Suberingene

Da es sich bei ANAC058 um einen Transkriptionsfaktor handelt, stellte die Untersuchung möglicher Auswirkungen des Gen-Knockouts auf die Genexpression bereits charakterisierter Suberingene eine sinnvolle experimentelle Fortführung dar. Zum einen sollten damit Hinweise auf mögliche Interaktionen von ANAC058 und den untersuchten Suberingenen zu entnehmen sein, zum anderen ließen sich mögliche Rückschlüsse ziehen, wie es zu der veränderten Zusammensetzung des Wurzelsuberins in *anac058* Pflanzen kommen konnte.

Für die Messungen der Genexpression wurde Gesamt-RNA aus erdgewachsenen 21 Tage alten Wurzeln von *anac058* und WT-Pflanzen wie in 2.6.2 beschrieben extrahiert, anschließend wurde die extrahierte mRNA in cDNA umgeschrieben (vgl. 2.6.8) und für die RTQ-PCR bereitgestellt. In dieser wurde das Expressionslevel der Gene *ANAC058*, *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* vergleichend zwischen *anac058* und WT Pflanzen mit *GAPDH* als endogener Kontrolle gemessen. Die Berechnung der amplifizierten Menge des Zielgens und damit des Expressionslevels in den Mutanten erfolgte durch Normalisierung auf das endogene Kontrollgen *GAPDH* und in Relation zum Wildtyp gemäß der komparativen  $C_T$  Methode ( $\Delta\Delta C_T$  Methode). Konkret wurde für das Ergebnis das Expressionslevel der Gene in den Mutanten relativ in Bezug auf den Wildtyp als Referenz quantifiziert indem das Expressionslevel in den WT-Pflanzen willkürlich auf den Wert 1 gesetzt wurde. Generell gilt für die Beurteilung der Ergebnisse der RTQ-PCR, dass ein gemessener Unterschied im Expressionslevel als signifikant gewertet wird, wenn der Wert mindestens  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  annimmt (Bustin et al., 2009). Das Ergebnis der Expressionsmessungen ist nachfolgend in Abbildung 28 dargestellt.

In der Wurzel der untersuchten *anac058* Mutante konnte im direkten Vergleich zu der untersuchten WT-Pflanze eine Abnahme der Genexpression von *ANAC058* auf das 0,001-fache ( $\pm 0,0$ ) gemessen werden und damit der transkriptionelle Knockout bestätigt werden. Während für die Gene *RALPH* und *GPAT5* keine signifikante Veränderung der Genexpression in der Mutante detektiert werden konnte, wurde für das Gen *HORST* ein Anstieg der Expression auf das fast 10-fache gemessen (9,9-fach  $\pm 0,7$ ).



**Abbildung 28: Messung der Genexpression in der Wurzel von *anac058* und WT-Pflanzen**  
 Expression der Gene *ANAC058*, *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* in *anac058* und WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in *anac058* Pflanzen ist in Relation zum Wildtyp angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

### 3.5.3 Untersuchung der Genexpression unter Stressbedingungen

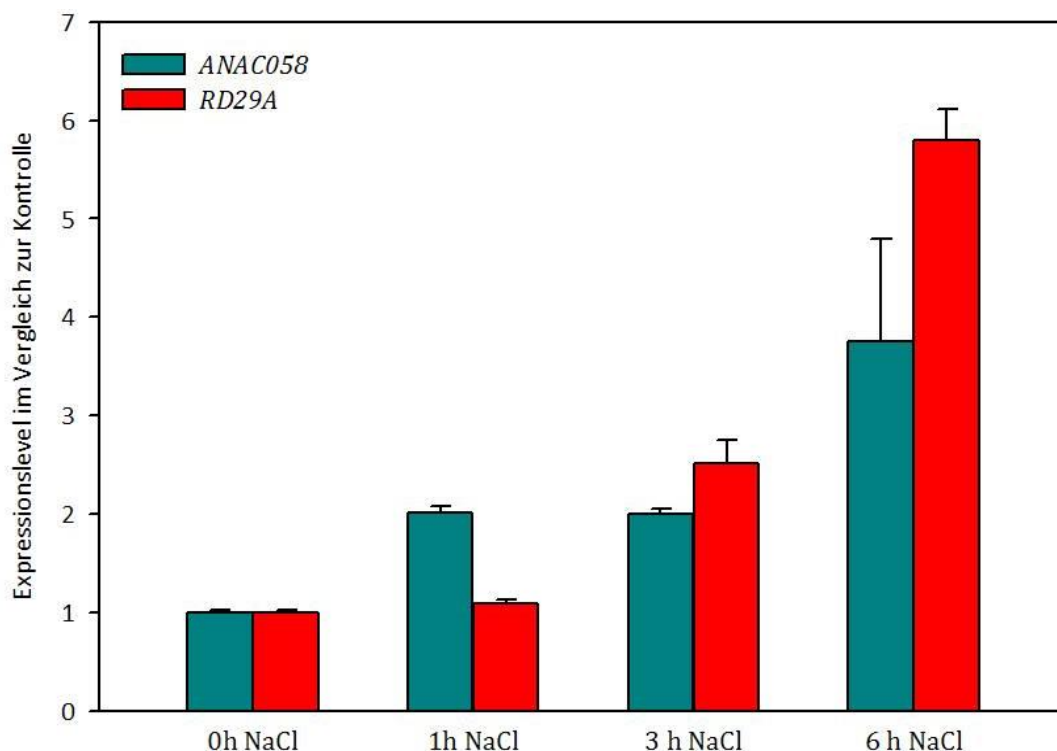
Um eine Beteiligung von *ANAC058* an der Stressantwort und eine mögliche Induktion durch Stress zu untersuchen, sollte die Genexpression unter Stressbedingungen, die typischerweise die Biosynthese von Suberin induzieren, mit Hilfe der RTQ-PCR gemessen werden.

#### 3.5.3.1 *Salzstress*

Um Genexpression unter Salzstress zu messen, wurden WT-Pflanzen für 10 Tage in hydroponischen Kammern unter den in 2.3.2 beschriebenen Bedingungen angezogen und in neue Kammern umgesetzt, deren Nährmedium 150 mM NaCl zugesetzt wurde, Kontrollpflanzen wurden unter den vorher genannten Bedingungen weiter inkubiert. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten wurden Wurzelproben entnommen: 0 h, 1 h, 3 h und 6 h nach der NaCl-Applikation. Diese Proben wurden für die Extraktion von Gesamt-RNA

verwendet (vgl. 2.6.2) und die daraus synthetisierte cDNA (vgl. 2.6.8) für die Expressionsmessungen unter Verwendung der RTQ-PCR eingesetzt.

Als endogene Kontrolle wurde das Gen *GAPDH* verwendet, als Referenz für die NaCl behandelten Pflanzen dienten die „ungestressten“ Pflanzen zum Zeitpunkt 0 h. Als zusätzliche Kontrolle, dass die Pflanzen Stress ausgesetzt waren und mögliche Veränderungen der Genexpression auf diesen zurückgeführt werden können, wurde die Expression des während Stress induzierten Gens *RD29A* untersucht, das oft als Referenz in Stress-responsiven Experimenten genutzt wird (Hooker et al., 2002; Sunkar et al., 2003; Wu et al., 2009; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993). Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen sind nachfolgend in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Messung der Genexpression von *ANAC058* und *RD29A* nach NaCl-Applikation**

Expression von *ANAC058* und des Stress-Kontrollgens *RD29A* in Wurzeln NaCl behandelte Pflanzen zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 3 h und 6 h nach der NaCl-Applikation, das Expressionslevel der unbehandelten Kontroll-Pflanzen zum Zeitpunkt 0 h wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Pflanzen zu den übrigen Zeitpunkten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

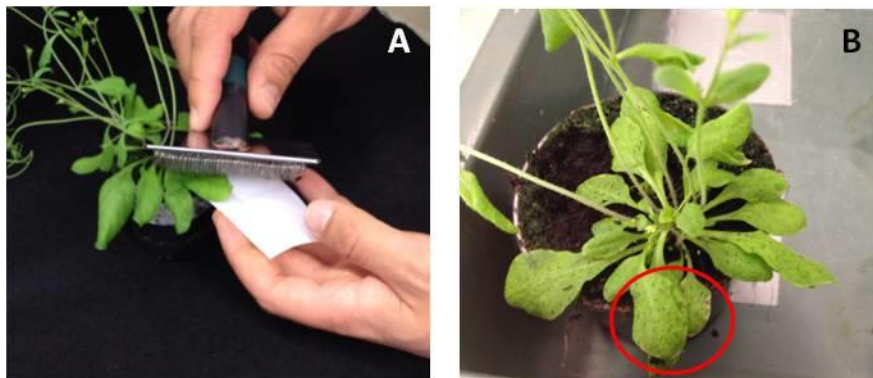
Die Überprüfung der Genexpression des Stressgens *RD29A* zeigte 1 h nach NaCl-Applikation keine signifikante Veränderung. Nach 3 h konnte allerdings ein Anstieg des Expressionslevel um 150 % gemessen werden (2,5-fach  $\pm$  0,23) und 6 h nach NaCl-Applikation wurde ein um das 6-fache erhöhtes Expressionslevel im Vergleich zur un-

behandelten Kontrolle gemessen ( $5,8\text{-fach} \pm 0,32$ ) und die Induktion des Stressgens *RD29A* somit eindeutig nachgewiesen.

Das Genexpressionslevel von *ANAC058* war 1 h nach NaCl-Applikation um 100 % erhöht ( $2,0\text{-fach} \pm 0,06$ ) und blieb auch nach 3 h auf diesem Level ( $2,0\text{-fach} \pm 0,05$ ), 6 h nach NaCl-Applikation erhöhte sich das Expressionslevel im Vergleich zur „ungestressten“ Kontrolle etwa auf das 4-fache ( $3,8\text{-fach} \pm 1,1$ ).

### 3.5.3.2 *Verwundung*

Um die Genexpression während einer Verwundungssituation messen zu können, wurden die Blätter 35 Tage alter auf Erde angezogener WT-Pflanzen mit einer Hundehaarbürste vorsichtig perforiert (vgl. Abbildung 30) und anschließend weiterhin unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

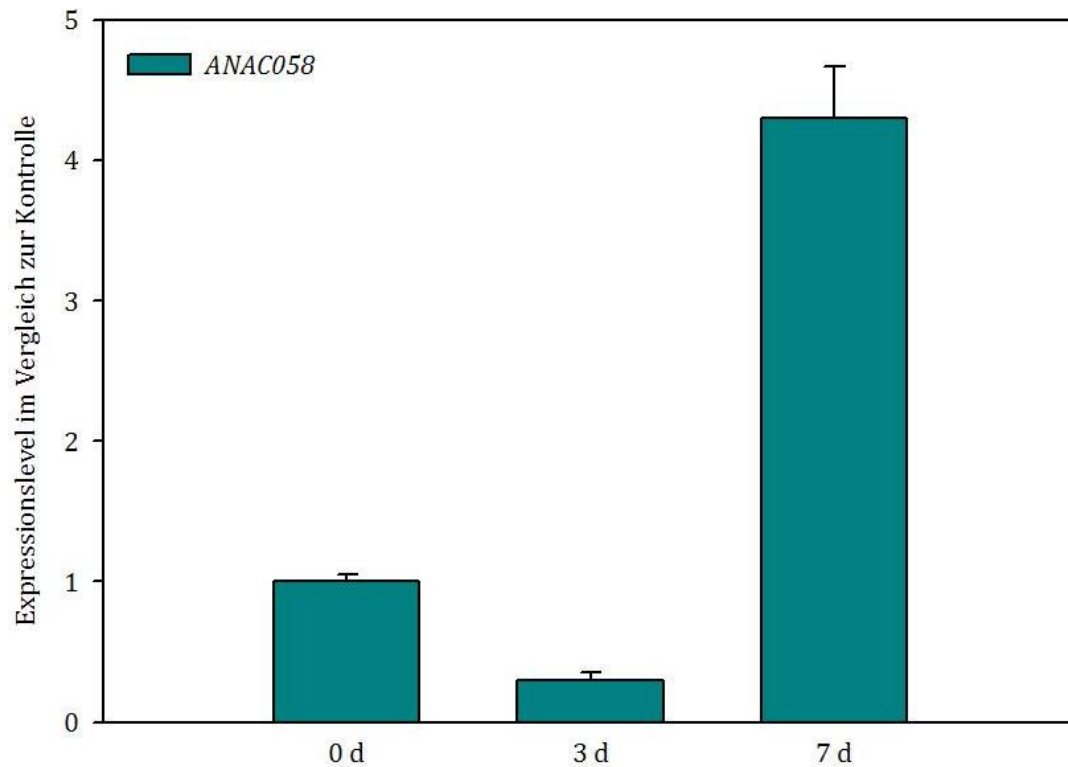


**Abbildung 30: Verwundung der Blätter**

A: Verwundung der Blätter durch Perforation mit einer Hundebürste, B: Verwundete Blätter zeigten großflächig Perforationen (roter Kreis).

Zur Extraktion von Gesamt-RNA und Messung der Expressionsraten wurden Blätter vor Beginn der Verwundung und nach 3 und 7 Tagen geerntet und wie in 2.6.2 beschrieben zur Extraktion der Gesamt-RNA und Synthese der cDNA genutzt. Als endogene Kontrolle wurde das Gen *GAPDH* verwendet, als Referenz dienten die unverwundeten Pflanzen zum Zeitpunkt 0 Tage. Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen sind nachfolgend in Abbildung 31 gezeigt.





**Abbildung 31: Messung der Genexpression von *ANAC058* nach Verwundung der Blätter**

Expression von *ANAC058* in Blättern verwundeter Pflanzen zu den Zeitpunkten 0 Tage (0 d), 3 Tage und 7 Tage nach der Blatt-Perforation, das Expressionslevel der unverwundeten Kontroll-Pflanzen zum Zeitpunkt 0 Tage wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Pflanzen zu den übrigen Zeitpunkten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

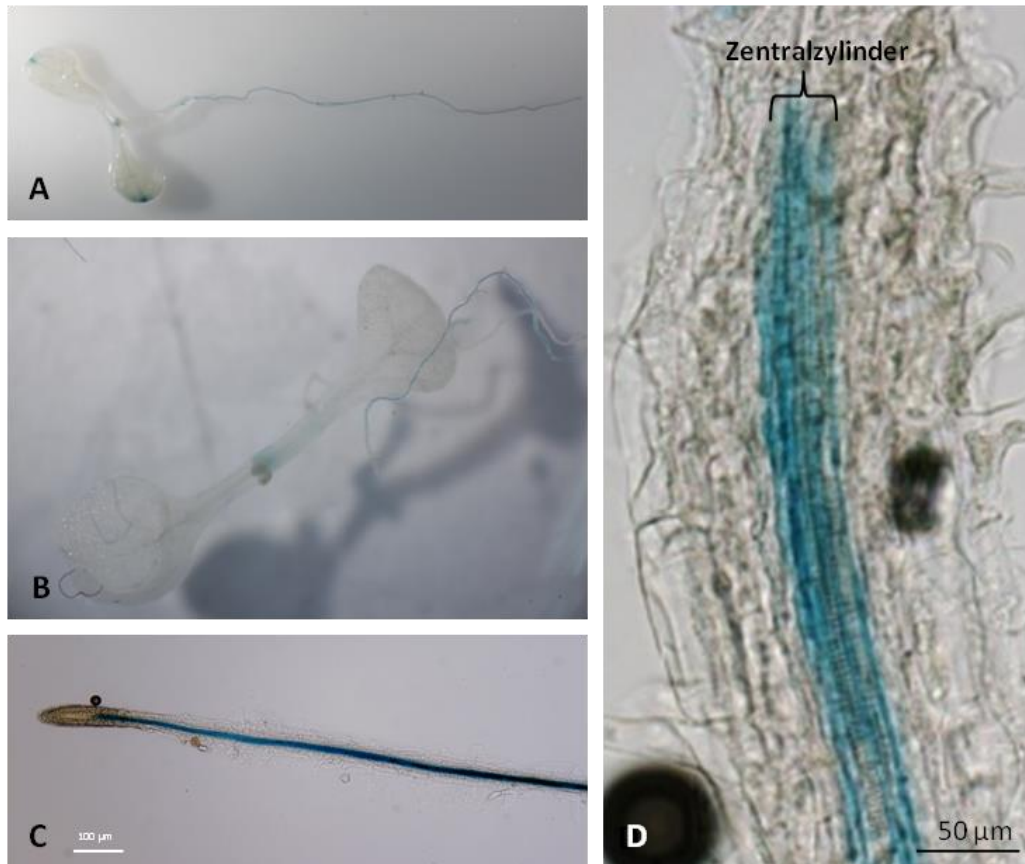
Die Ergebnisse der Genexpressionsmessung von *ANAC058* nach 3 Tagen zeigten eine Verminderung auf das 0,3-fache ( $\pm 0,06$ ) im Vergleich zur ungestressten Kontrolle, nach 7 Tagen konnte eine Steigerung der Expression auf das 4-fache gemessen werden ( $4,3 \pm 0,4$ ).

### **3.6 Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *NAC038* in *Arabidopsis thaliana***

Für das Gen *ANAC038* konnten wie in Abschnitt 3.2 beschrieben zwei unabhängige Knockout Mutanten Linien identifiziert werden: SALK\_103716 und WiscDsLoxHs-007\_11H, zur Vereinfachung wurden für diese die Bezeichnungen *anac038-1* (SALK\_103716) und *anac038-2* (WiscDsLoxHs-007\_11H) eingeführt.

#### **3.6.1 Gewebespezifische Expressionsanalyse von *ANAC038***

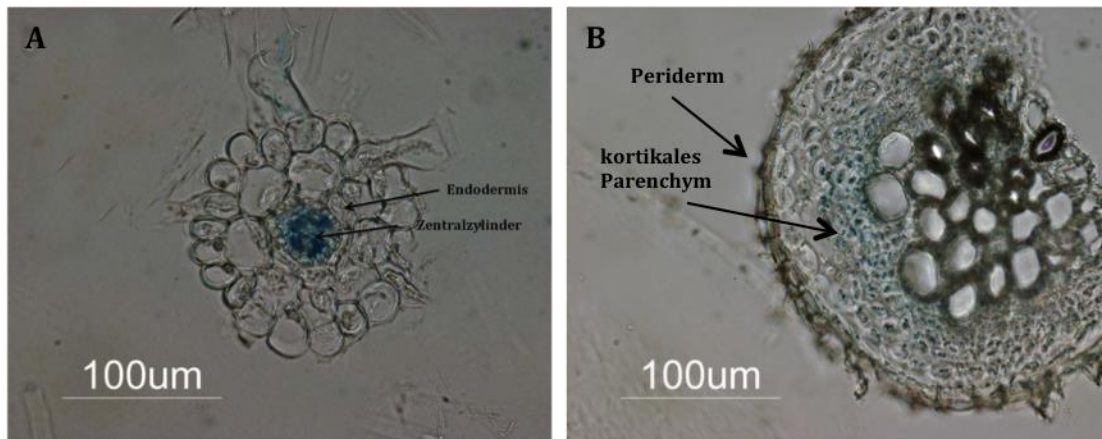
Um die Expression von *ANAC038* lokalisieren zu können, wurde der putative Promoter des *ANAC038* Gens mit dem  $\beta$ -*Glucuronidase* Gen fusioniert und WT-Pflanzen mit diesem Konstrukt transformiert. Für die Lokalisation der Expression wurden zehn Tage alte Keimlinge entweder mit X-Gluc Lösung inkubiert oder auf Erde umgesetzt und nach 4 Wochen geerntet. Die Betrachtung zehn Tage alter Keimlinge zeigte nach Inkubation in X-Gluc Lösung unter dem Binokular eine spezifische Färbung der Wurzeln, in Blättern hingegen konnte keine Färbung beobachtet werden, wie in Abbildung 32 dargestellt. Durch Betrachtung kompletter Wurzeln und longitudinaler Schnitte unter dem Mikroskop konnte die Färbung der Wurzel auf den Bereich des Zentralzylinders präzisiert werden. Diese spezifische Färbung wurde in zehn unabhängigen primären Transformatanten beobachtet.



**Abbildung 32: Aufsicht und Longitudinalschnitt von Wurzeln zehn Tage alter *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* Pflanzen**

Zehn Tage alte Keimlinge, die mit dem Konstrukt *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* transformiert worden waren, wurden in X-Gluc Lösung inkubiert und anschließend unter dem Binokular (A und B) betrachtet. Die Blaufärbung blieb spezifisch auf die Wurzeln beschränkt, die Blätter waren nicht gefärbt. Die Betrachtung intakter Wurzeln (C) und longitudinaler Schnitte (D) unter dem Mikroskop bestätigte eine spezifische Färbung im Bereich des Zentralzylinders.

Zur genaueren Untersuchung der Lokalisation der Expression wurden 40 µm dicke Querschnitte von zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Wurzeln wie in 2.9.2 beschrieben angefertigt und unter dem Mikroskop betrachtet.



**Abbildung 33: Querschnitte von 25 Tage alten *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* Pflanzen**

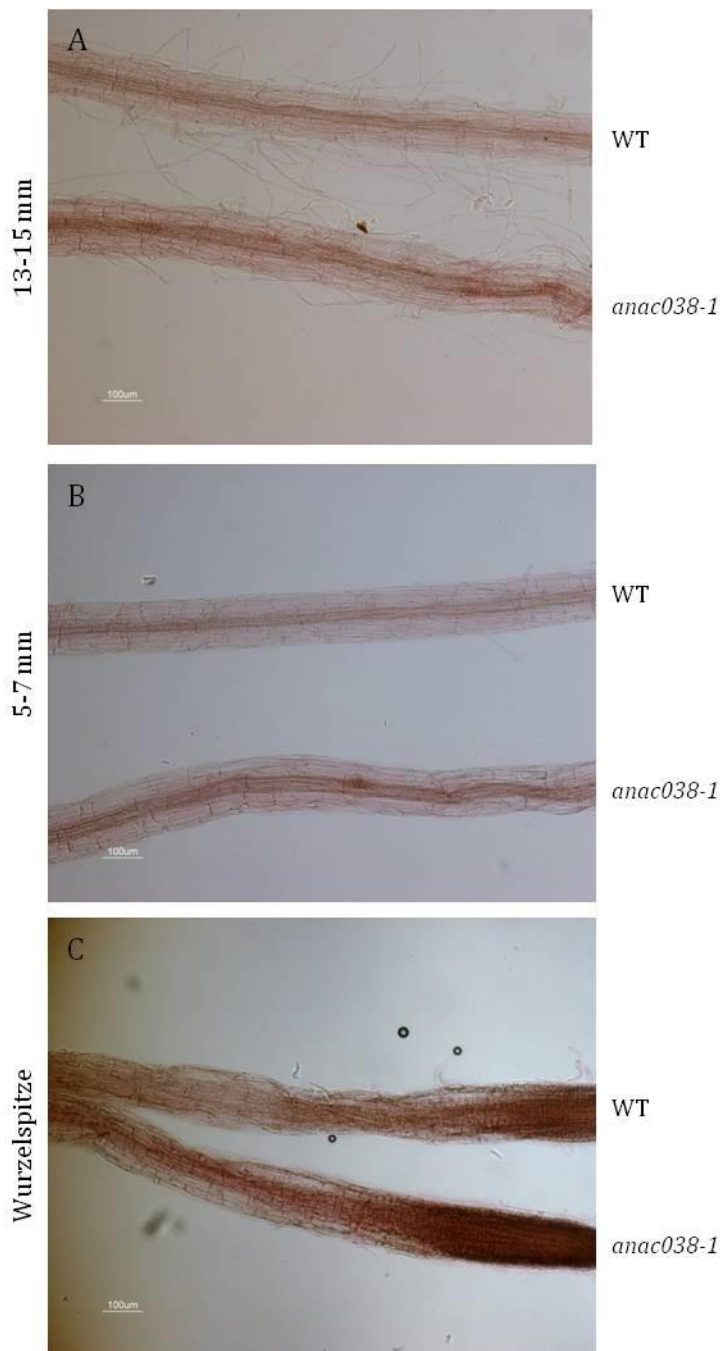
25 Tage alte Pflanzen, die mit dem Konstrukt *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* transformiert worden waren, wurden in X-Gluc Lösung inkubiert und anschließend zur Herstellung von Querschnitten mit dem Mikrotom verwendet. **A:** Querschnitte im apikalen Bereich der Wurzel zeigen eine spezifische Färbung im Bereich des Zentralzylinders, aber nicht der Endodermis; **B:** Querschnitte im basalen Bereich der Wurzel zeigen eine diffuse Färbung im gesamten Bereich des corticalen Parenchymgewebes.

Wie in Abbildung 33 dargestellt konnte in apikalem Wurzelgewebe, das mit einer voll ausgebildeten Endodermis ein früheres Entwicklungsstadium repräsentiert, eine intensive Blaufärbung im Bereich des Zentralzylinders beobachtet werden. Zellen der Endodermis oder des Cortex waren nicht gefärbt. Wurzelgewebe im basalen Bereich repräsentiert das fortgeschrittene Entwicklungsstadium der Wurzel. Hier wurde die Aktivität des *ANAC038*-Promoters als von der Glucuronidase-Aktivität verursachte Blaufärbung im gesamten Bereich des corticalen Parenchymgewebes beobachtet, Zellen des Zentralzylinders sowie des Periderms zeigten jedoch keine Färbung. Dieses Ergebnis wurde in acht unabhängigen Transformanten beobachtet.

### 3.6.2 Färbung suberinisierter Gewebe mit Sudan Rot 7B

Sudan Rot 7B hat sich in der Mikroskopie als Farbstoff bewährt, um Suberinlamellen und andere Lipidablagerungen in Pflanzengeweben anzufärben. Um mögliche Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Suberinablagerung beobachten zu können, wurden hydroponisch gewachsene Wurzeln von 28 Tage alten *anac038-1* und WT-Pflanzen in Ethanol fixiert und anschließend mit Sudan Rot 7B gefärbt und unter dem Mikroskop im Hellfeld betrachtet. Wie in Abbildung 34 gezeigt, wurden repräsentativ Bereiche der Wurzel 13-15 mm, 5-7 mm und unmittelbar hinter der Wurzelspitze betrachtet. In allen Bildern ist die Endodermis als den Zentralzylinder umschließendes Gewebe deutlich rot angefärbt. Die Rotfärbung beschränkt sich sowohl in den Wurzeln

des Wildtyps als auch der Mutante auf den Bereich der Endodermis, eine mögliche ekto-  
pische Verteilung der Färbung konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 34: Mikroskopische Betrachtung von Sudan Rot 7B gefärbten Wurzeln der Pflanzen *anac038-1* und WT in unterschiedlichen Abständen von der Wurzelspitze.** 28 Tage alte unter hydroponischen Bedingungen angezogene Wurzeln wurden mit Sudan Rot 7B gefärbt und im Abstand von 13-15 mm (A), 5-7 mm (B) und unmittelbar auf Höhe der Wurzelspitze (C) im Hellfeld betrachtet.

In Bezug auf die Anatomie konnten im Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp keine Unterschiede beobachtet werden. Die Intensität der Färbung wies jedoch deutliche Unterschiede auf: So erschien die Endodermis der Mutanten deutlich intensiver gefärbt als

die des Wildtyps. Dieser Effekt wurde in allen untersuchten Bereichen der Wurzel beobachtet und war nicht auf einen bestimmten Bereich beschränkt.

Da die Färbung mit Sudan Rot 7B sehr sensitiv ist, kann diese Beobachtung als Hinweis auf eine möglicherweise erhöhte Suberinmenge in der Mutante gedeutet werden und soll im Folgenden quantitativ mit Hilfe der Gaschromatographie überprüft werden.

Für dieses Experiment wurden verschiedene Wurzeln von jeweils fünf Pflanzen untersucht, die übereinstimmend den gleichen Phänotyp zeigten.

### **3.6.3 Gaschromatographische Untersuchungen apoplastischer Polyester und Wachse in den *anac038* Mutanten**

Die Zusammensetzung des Suberins wurde in Wurzeln der *anac038-1* und *anac038-2* Mutanten untersucht. Weiterhin wurde die Zusammensetzung des Samenschalensuberins und der Blattwachse analysiert.

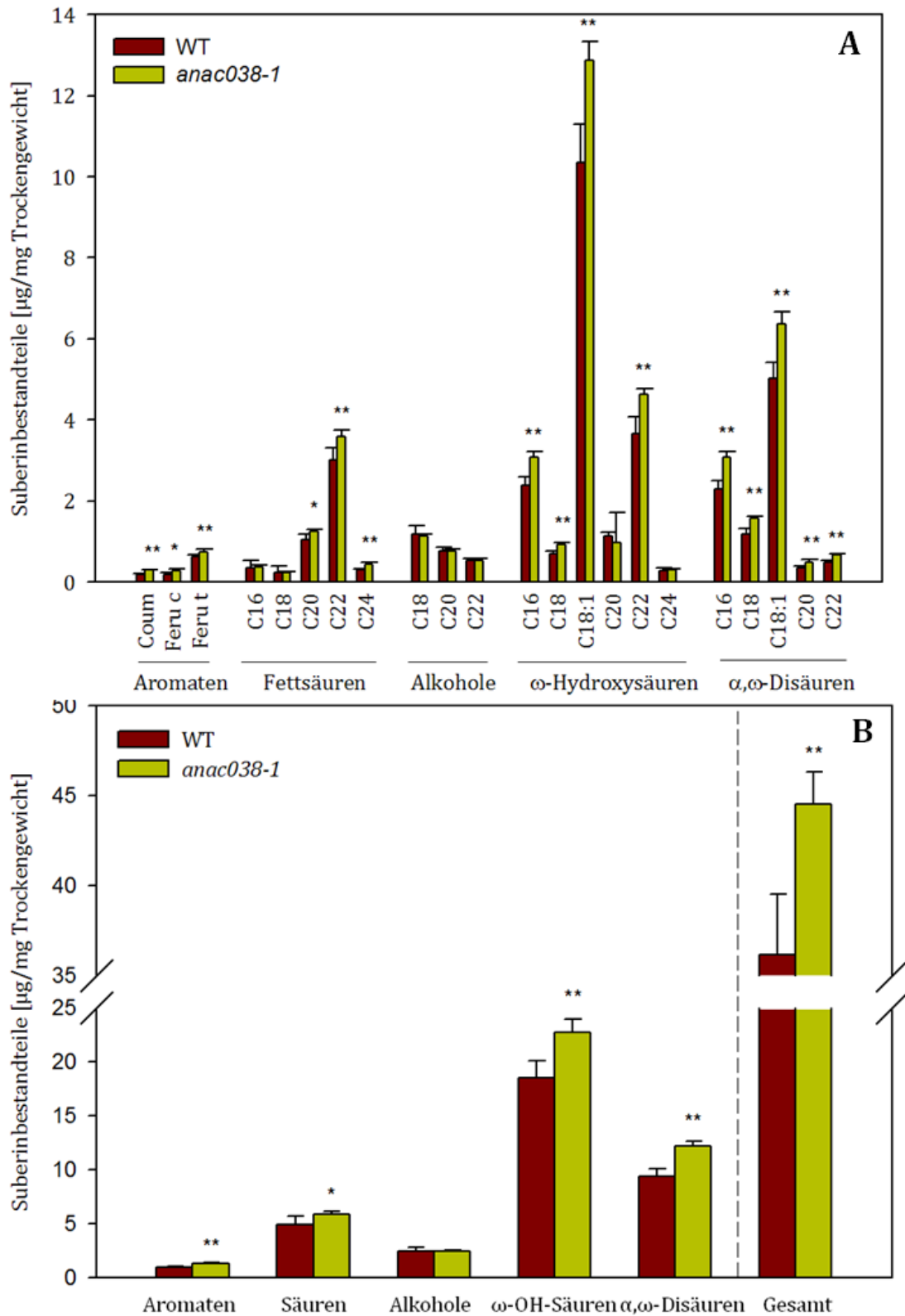
#### **3.6.3.1 Untersuchung des Wurzelsuberins in der T-DNA Insertionsmutante *anac038-1***

Zur Untersuchung des Wurzelsuberins wurden jeweils fünf auf Erde angezogene *anac038-1* und WT-Pflanzen nach 40 Tagen geerntet, die Wurzeln gewaschen und wie in 2.10.1 beschrieben für die Analyse vorbereitet. Durch die gaschromatographische Analyse konnten 22 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Aromaten (trans-Coumarsäure, cis- und trans-Ferulasäure), Monocarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 35 dargestellt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt deutlich die Akkumulation des Gesamtsuberins in den Wurzeln der *anac038-1* Pflanzen und damit die Erhöhung der Suberinmenge um 23 % auf (WT: 36,2 ± 3,3 µg/mgdw, *anac038-1*: 44,6 ± 1,8 µg/mgdw). Dieser Unterschied resultiert aus einer signifikanten Akkumulation der Aromaten (WT: 0,9 ± 0,07 µg/mgdw, *anac038-1*: 1,3 ± 0,05 µg/mgdw), primären Fettsäuren (WT: 4,9 ± 0,8 µg/mgdw, *anac038-1*: 5,9 ± 0,2 µg/mgdw), ω-Hydroxysäuren (WT: 18,5 ± 1,6 µg/mgdw, *anac038-1*: 22,7 ± 1,2 µg/mgdw) und α,ω-Dicarbonsäuren (WT: 9,4 ± 0,7 µg/mgdw, *anac038-1*: 12,2 ± 0,5 µg/mgdw). Dabei konnten signifikante Erhöhungen

der analysierten Menge aller Mitglieder der zuvor genannten Stoffklassen beobachtet werden mit Ausnahme der primären C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> Fettsäure und der C<sub>20</sub> und C<sub>24</sub> ω-Hydroxysäure.

Bezogen auf die primären Alkohole konnten keine Unterschiede zwischen *anac038-1* und WT-Pflanzen identifiziert werden (WT: 2,5 ± 0,3 µg/mgdw, *anac038-1*: 2,4 ± 0,1 µg/mgdw).



**Abbildung 35: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Knockout Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps**

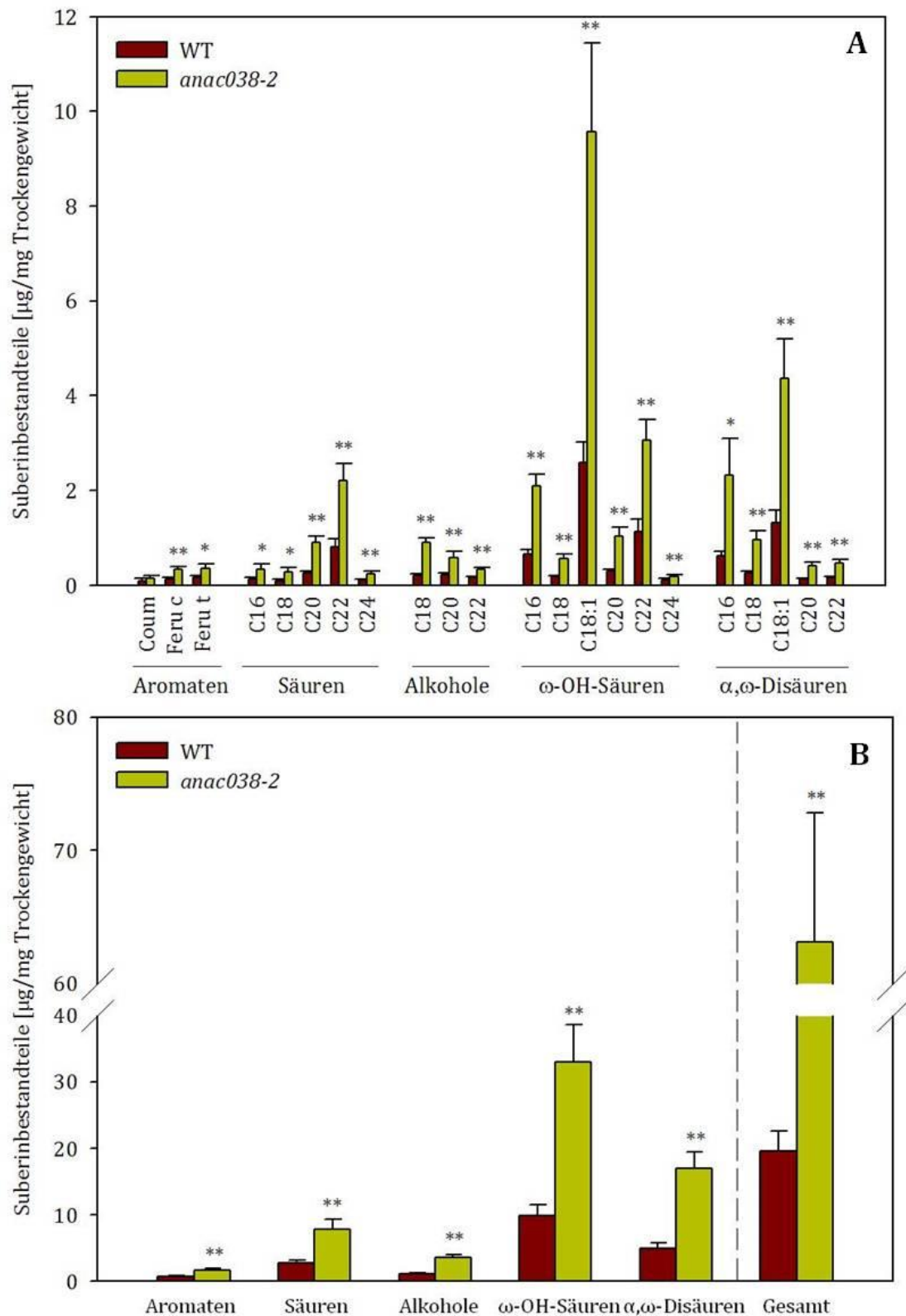
**A:** Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; Coum: Coumar-säure, Feru c bzw. Feru t: cis- bzw. trans-Ferulasäure; \*:  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$ .



### 3.6.3.2 *Untersuchung des Wurzelsuberins in der T-DNA Insertionsmutante anac038-2*

Zur Untersuchung des Wurzelsuberins wurden vier auf Erde angezogene *anac038-2* und fünf WT-Pflanzen nach 38 Tagen geerntet, die Wurzeln gewaschen und wie in 2.10.1 beschrieben für die Analyse vorbereitet. Durch die gaschromatographische Analyse konnten 22 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Aromaten (trans-Coumarsäure, cis- und trans-Ferulasäure), Monocarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 36 dargestellt.

Im Wurzelsuberin der *anac038-2* Mutanten wurde eine Steigerung der mittleren Gesamtsuberinmenge um 220 % beobachtet (WT: 19,6 ± 3,0 µg/mgdw, *anac038-2*: 63,1 ± 9,6 µg/mgdw). Diese resultierte aus einer Akkumulation aller Monomere mit Ausnahme der trans-Coumarsäure, was sich in einer hoch signifikanten Veränderung aller Substanzklassen widerspiegelte: In den Wurzeln der *anac038-2* Pflanzen konnte für die Aromaten eine Akkumulation um 100 % (WT: 0,8 ± 0,1 µg/mgdw, *anac038-2*: 1,6 ± 0,3 µg/mgdw), für die Monocarbonsäuren um 180 % (WT: 2,8 ± 0,4 µg/mgdw, *anac038-2*: 7,9 ± 1,4 µg/mgdw), für die primären Alkohole um 200 % (WT: 1,2 ± 0,1 µg/mgdw, *anac038-2*: 3,6 ± 0,5 µg/mgdw), für die ω-Hydroxysäuren um 230 % (WT: 9,9 ± 1,6 µg/mgdw, *anac038-2*: 33,0 ± 5,7 µg/mgdw) und für die α,ω-Dicarbonsäuren um 250 % (WT: 4,9 ± 0,8 µg/mgdw, *anac038-2*: 17,1 ± 2,3 µg/mgdw) gemessen werden. Bei der Betrachtung der Einzelsubstanzen zeigten sich die markantesten Unterschiede bei den Monomeren, die bezogen auf die Gesamtmenge ohnehin den größten Anteil haben: C<sub>22</sub> Monocarbonsäure (175 % Unterschied), C<sub>16</sub> (223 % Unterschied), C<sub>18:1</sub> (267 % Unterschied) und C<sub>22</sub> ω-Hydroxysäure (165 % Unterschied), C<sub>16</sub> (291 % Unterschied) und C<sub>18:1</sub> α, ω-Dicarbonsäure (235 % Unterschied).



**Abbildung 36: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Knockout Mutante *anac038-2* und des korrespondierenden Wildtyps**

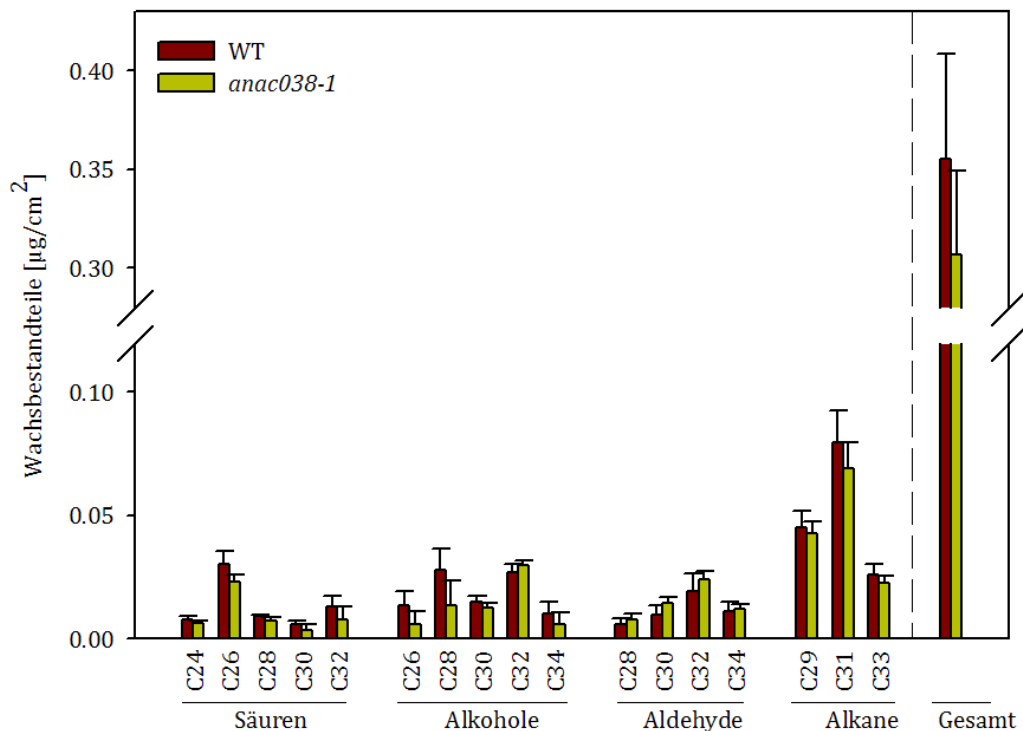
**A:** Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Mutante *anac038-2* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus vier *anac038-2* und fünf WT-Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren; Coum: Coumarsäure, Feru c bzw. Feru t: cis- bzw. trans-Ferulasäure; \*:  $t \leq 0,05$ ; \*\*:  $t \leq 0,01$ .

### **3.6.3.3      *Untersuchung des Samenschalensuberins in der T-DNA Insertionsmutante *anac038-1****

Die gaschromatographische Analyse der Samenschalenpolyester der T-DNA Insertionsmutante *anac038-1* wurde durch Sebastian Theobald im Rahmen seiner Bachelorarbeit (2012) durchgeführt. Er konnte im direkten Vergleich zwischen *anac038-1* und WT-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede in der Suberinzusammensetzung der Samenschalen identifizieren, das Ergebnis kann dem Anhang unter 7.5 entnommen werden.

### **3.6.3.4      *Untersuchung der Zusammensetzung der Blattwachse in der T-DNA Insertionsmutante *anac038-1****

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Blattwachse wurden Blätter von 28 Tage alten Pflanzen geerntet und die aufgelagerten Wachse wie in 2.10.4.3 beschrieben mit Chloroform extrahiert. Durch die gaschromatographische Analyse konnten 17 verschiedene Wachsbestandteile identifiziert werden, die den Stoffklassen der Monocarbonsäuren (C<sub>24</sub>-C<sub>32</sub>), primären Alkohole (C<sub>26</sub>-C<sub>34</sub>), Aldehyde (C<sub>28</sub>-C<sub>34</sub>) und Alkane (C<sub>29</sub>-C<sub>33</sub>) zugeordnet werden konnten, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 37 dargestellt. Im Vergleich zwischen WT- und *anac038-1* Pflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.



**Abbildung 37: Zusammensetzung der Blattwachse der Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps.**

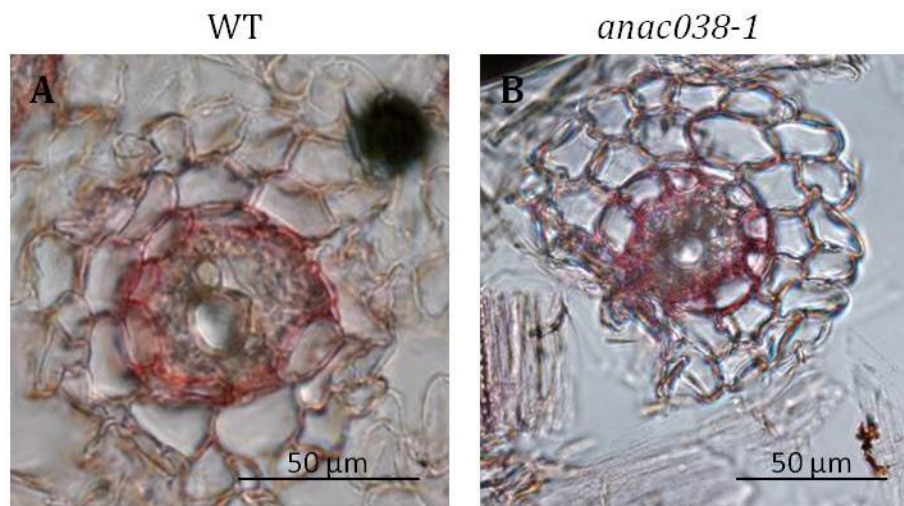
Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus vier *anac038-1* und vier WT-Parallelen  $\pm$  Standardabweichung, wobei eine Probe alle Blätter einer Pflanze umfasst.

### 3.6.4 Anatomie primärer Wurzelbereiche von *anac038-1* Mutanten

In Wurzeln von *anac038-1* Pflanzen konnte eine Erhöhung des Gesamtsuberins nachgewiesen werden. Um mögliche Auswirkungen der Veränderung der Suberinkomposition auf die Anatomie und Morphologie der Wurzeln untersuchen zu können oder eine mögliche ektopische Suberinisierung zu identifizieren, wurden 28 Tage alte in hydroponischen Containern gewachsene Wurzeln mit Sudan Rot 7B gefärbt (vgl. Abschnitt 3.6.2). Mit Hilfe des Gefriermikrotoms wurden im apikalen Bereich 40  $\mu\text{m}$  dicke Querschnitte angefertigt und unter dem Mikroskop im Hellfeld beobachtet.

Auf den in Abbildung 38 dargestellten Hellfeldaufnahmen ist im direkten Vergleich erkennbar, dass die rot eingefärbten Endodermiszellen einen geschlossenen Ring um den Zentralzylinder bilden. Die Rotfärbung ist spezifisch auf die endodermalen Zellen beschränkt. Eine mögliche ektopische Suberinisierung anderer Zellen konnte nicht gefunden werden. Die umgebenden Zellen sind klar voneinander abgegrenzt und intakt, auch in der Form oder Größe der Zellen sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *anac038-1* Mutante erkennbar. Um auszuschließen, dass auf Grund des Färbeprozesses und der dabei notwendigen Inkubation bei 70 °C keine Unterschiede zwischen Wildtyp

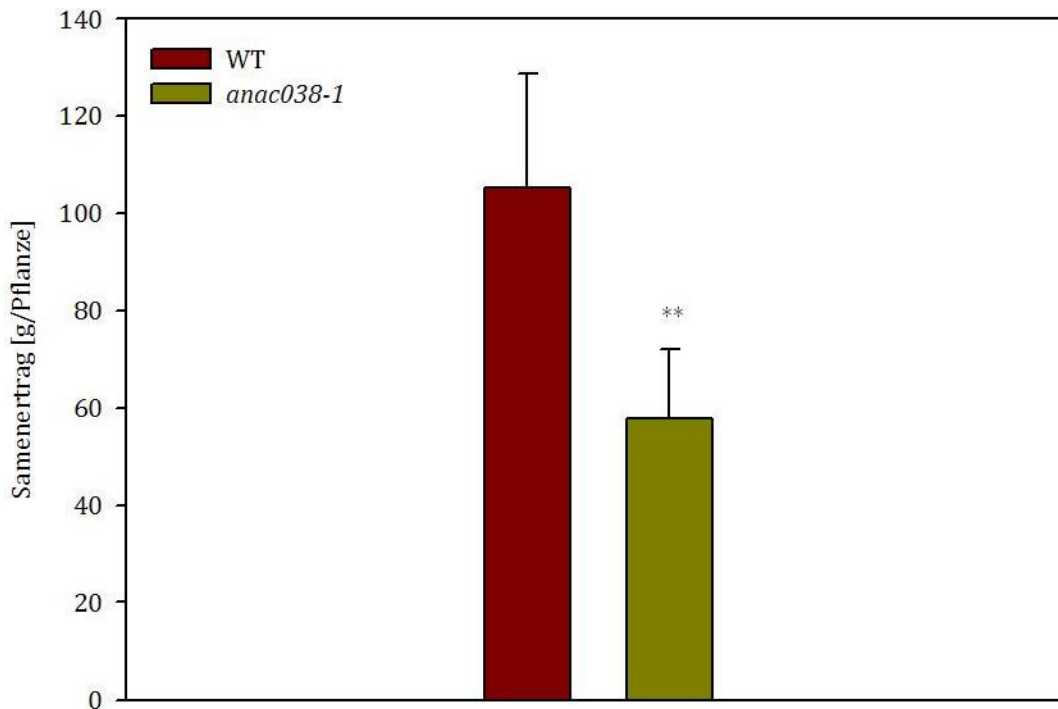
und Mutante sichtbar waren, wurden ebenfalls Querschnitte von ungefärbten Wurzeln angefertigt und diese im Hellfeld und zusätzlich zur Detektion der Autofluoreszenz aromatischer Zellwandbestandteile im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In diesen Querschnitten konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden, diese Abbildungen sind dem Anhang zu entnehmen (vgl. 7.6).



**Abbildung 38: Anatomie und Histologie der primären Wurzel der Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps.** Repräsentative Querschnitte von apikalen Bereichen 28 Tage alter in hydroponischen Bedingungen gewachsenen und mit Sudan Rot 7B gefärbten Wurzeln. Mikroskopische Aufnahme des Wildtyps (A) und der *anac038-1* Mutante (B). Die Suberinlamellen der Endodermis sind rot angefärbt.

### 3.6.5 Auswirkungen des Knockouts auf den Samenertrag

Um mögliche Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf den Samenertrag zu beobachten, wurden jeweils acht *anac038-1* und WT-Pflanzen parallel unter Standardkulturbedingungen angezogen (vgl. 2.3.1) und die Samen geerntet und gewogen. Wie nachfolgend in Abbildung 39 dargestellt, unterschied sich der durchschnittliche Samenertrag der *anac038-1* Pflanzen von WT-Pflanzen signifikant um 45 % (WT:  $105,3 \pm 23,5$  g/Pflanze, *anac038-1*:  $57,8 \pm 14,2$  g/Pflanze).



**Abbildung 39: Auswirkung des *ANAC038* Knockouts auf den Samenertrag**

Dargestellt ist das arithmetische Mittel der gemessenen Samengewichte von jeweils acht WT- und *anac038-1* Pflanzen  $\pm$  Standardabweichung; \*\*:  $t \leq 0,01$ .

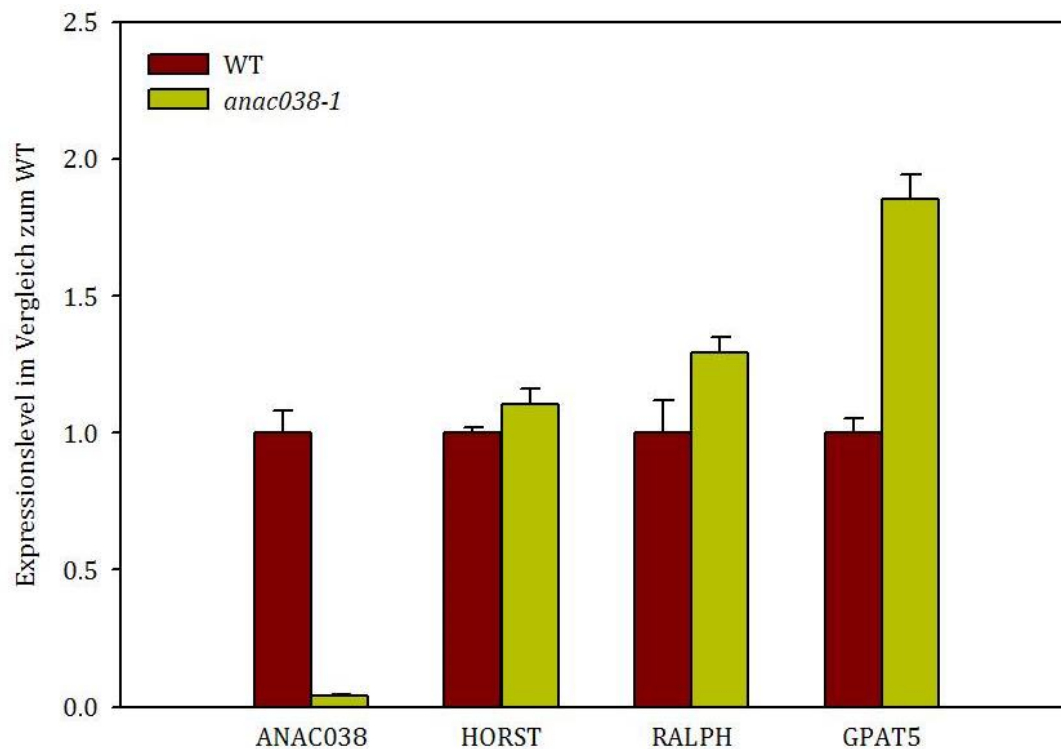
### 3.6.6 Auswirkungen des Knockouts auf die Expression charakterisierter Suberingene

Um mögliche Auswirkungen des Knockouts des Transkriptionsfaktors *ANAC038* auf die Expression bereits charakterisierter Suberingene beobachten zu können und auf Basis dieser Ergebnisse mögliche Rückschlüsse auf die Funktion und Interaktion von *ANAC038* ziehen zu können, wurden Expressionsmessungen in den Wurzeln erdgewachsener *anac038-1* Pflanzen durchgeführt.

Für die Messungen der Genexpression wurde Gesamt-RNA aus erdgewachsenen 28 Tage alten Wurzeln von *anac058* und WT-Pflanzen wie in 2.6.2 beschrieben extrahiert, anschließend wurde die extrahierte mRNA in cDNA umgeschrieben (vgl. 2.6.8) und für die RTQ-PCR bereitgestellt. In dieser wurde das Expressionslevel der Gene *ANAC038*, *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* vergleichend zwischen *anac038-1* und WT Pflanzen mit *GAPDH* als endogener Kontrolle gemessen. Die Berechnung der Expressionsmenge erfolgte gemäß der in 3.5.2 beschriebenen Vorgehensweise, die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 40 dargestellt.

In der Wurzel der untersuchten *anac038-1* Pflanze konnte eine Abnahme der *ANAC038*-Expression auf das 0,04-fache ( $\pm 0,01$ ) im Vergleich zum WT gemessen und damit der

transkriptionelle Knockout quantitativ bestätigt werden. Während für die Gene *HORST* und *RALPH* gemäß der in 3.5.2 eingeführten Kriterien keine signifikante Veränderung der Expressionsrate beobachtet werden konnte, war das Expressionslevel von *GPAT5* in der Mutante um 86 % erhöht (1,86-fach  $\pm$  0,09).



**Abbildung 40: Messung der Genexpression in der Wurzel von *anac038-1* und WT-Pflanzen**  
 Expression der Gene *ANAC038*, *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* in *anac038-1* und WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in *anac038-1* Pflanzen ist in Relation zum Wildtyp angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

### 3.6.7 Komplementation der Knockout Mutante *anac038-1*

In der in Abbildung 35 dargestellten gaschromatographischen Analyse des Wurzelsubersins der *anac038-1* Pflanzen konnten signifikante Veränderungen beobachtet werden. Um sicher zu stellen, dass diese Veränderungen als direkte Konsequenz auf den transkriptionellen Knockout des *ANAC038* Gens und nicht auf andere Faktoren zurückzuführen sind, wurden *anac038-1* Pflanzen mit der *ANAC038* CDS (Coding DNA Sequence) komplementiert, um das Wurzelsuberin in der Filialgeneration gaschromatographisch zu analysieren.

Die *ANAC038* CDS wurde zu diesem Zweck in einen Vektor kloniert, der neben der zur Selektion positiver Transformanden notwendigen Hygromycin-Resistenz über die

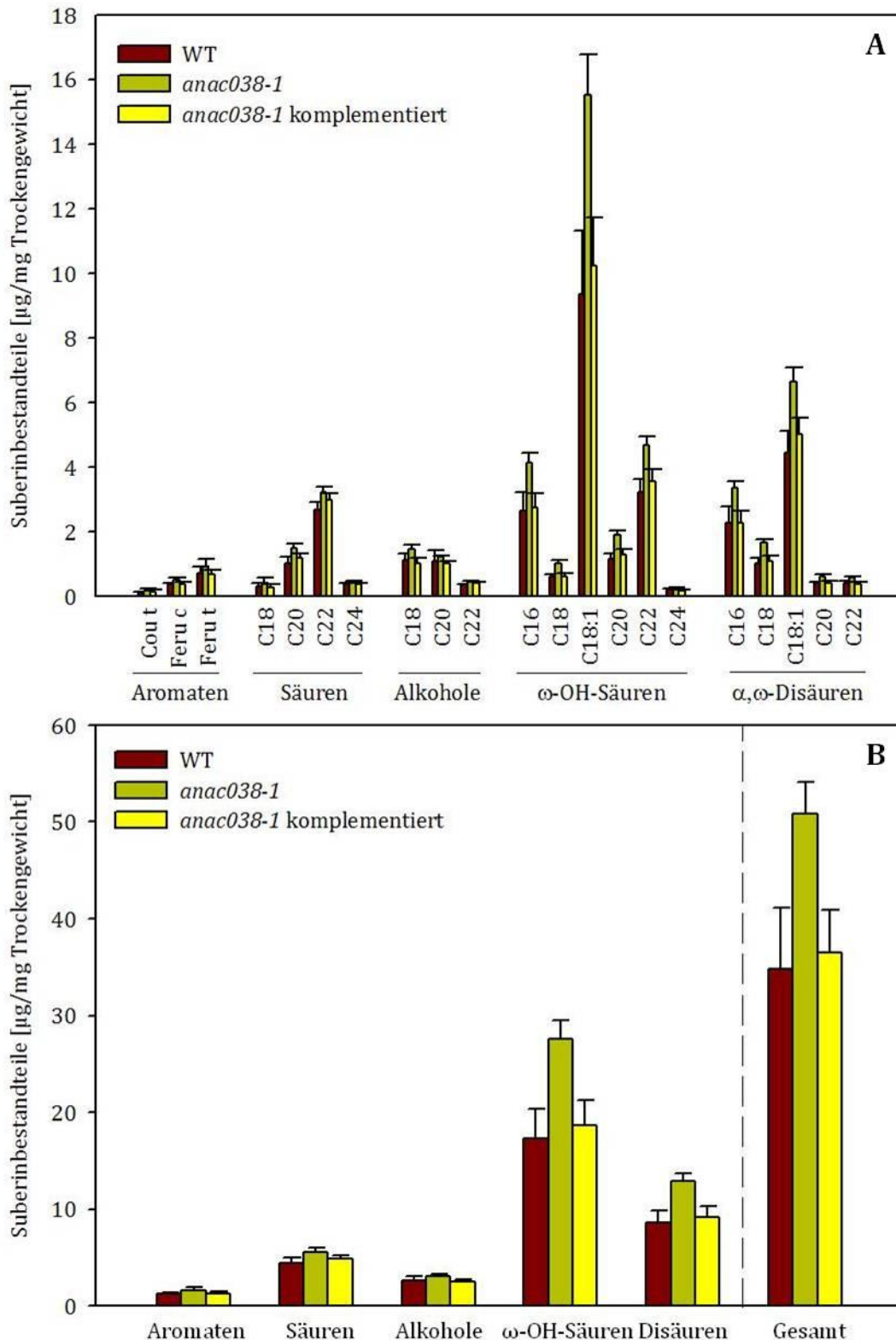
*CYP86B1* Promoterregion verfügte. Da die Expression der *ANAC038* CDS unter der Kontrolle des *CYP86B1* Promoters stand, war die Endodermis spezifische Expression sichergestellt.

Samen der transformierten Pflanzen wurden zur Selektion auf Hygromycin haltigem MS-Medium ausgesät, Samen der nicht transformierten Pflanzen wurden auf MS-Medium ohne Hygromycin ausgesät und nach erfolgreicher Keimung auf Erde umgesetzt. Zusätzlich wurden die selektierten Pflanzen vor der Analyse erneut genotypisiert, um die Präsenz des Hygromycin Resistenzgens und der inserierenden T-DNA nachzuweisen; das Hygromycin Resistenzgen befand sich auf dem zur Komplementation genutzten Plasmid (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse fanden jeweils sechs Wurzeln 34 Tage alter Pflanzen Verwendung, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 41 dargestellt.

Die Auswertung der gaschromatographischen Analyse offenbarte im direkten Vergleich des Wurzelsuberins zwischen *anac038-1* und WT-Pflanzen eine signifikante Akkumulation in allen Substanzklassen mit Ausnahme der trans-Ferulasäure, der C<sub>18</sub> Monocarbonsäure und des C<sub>20</sub> Alkohols, auch die Suberingesamtmenge war in Wurzeln der *anac038-1* Pflanzen signifikant erhöht.

Diese Beobachtung wurde durch die Komplementierung aufgehoben, die Analyse der komplementierten *anac038-1* Pflanzen zeigte eine mit dem Wildtyp in Quantität und Qualität übereinstimmende Zusammensetzung des Wurzelsuberins. Die einzige Ausnahme bildet der C<sub>22</sub> Alkohol, der in der komplementierten Mutante minimal aber signifikant erhöht vorlag.





**Abbildung 41: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Knockout Mutante *anac038-1*, des korrespondierenden Wildtyps und der komplementierten *anac038-1* Pflanzen**

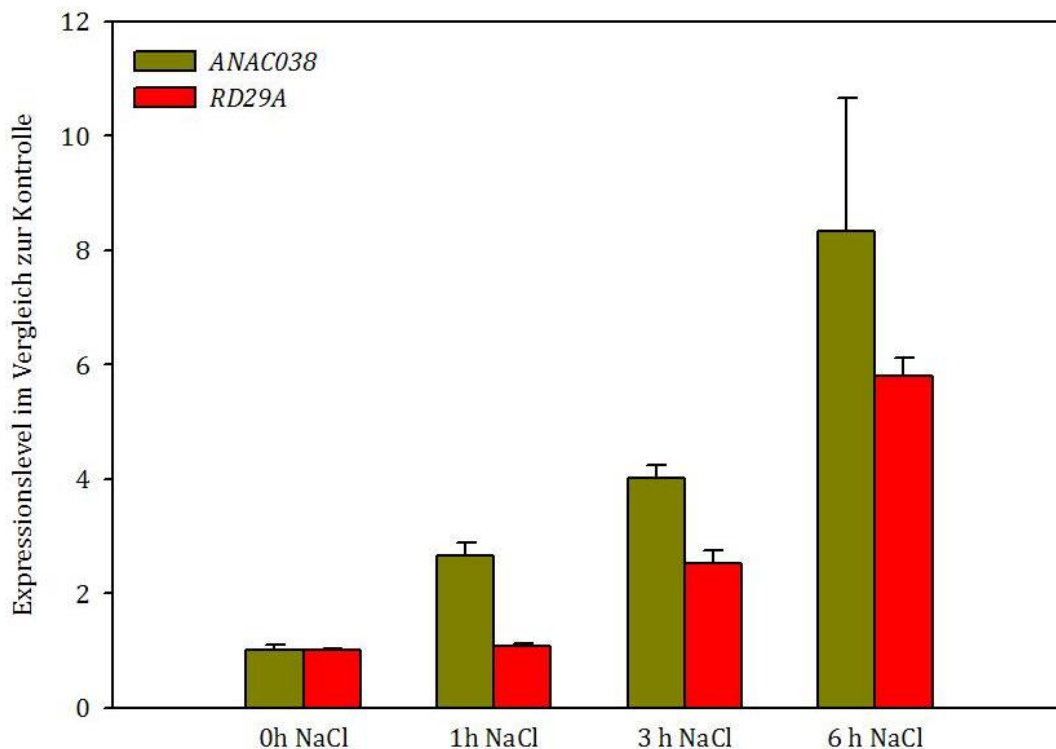
**A:** Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Mutante *anac038-1*, des korrespondierenden Wildtyps und der mit der *ANAC038* CDS komplementierten Mutante *anac038-1*. **B:** Substanzklassenverteilung und Suberingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus sechs Parallelen ± Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole, ω-OH-Säuren: ω-Hydroxysäuren, (α,ω)-Disäuren: α,ω-Dicarbonsäuren; Cou t: trans-Coumarsäure, Feru c bzw. Feru t: cis- bzw. trans-Ferulasäure.

### 3.6.8 Untersuchung der Genexpression unter Stressbedingungen

Ebenso wie zuvor bereits für *ANAC058* soll auch die mögliche Induktion von *ANAC038* durch Stress mit Hilfe der RTQ-PCR quantitativ untersucht werden, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von *ANAC038* an der Stressantwort zu erhalten.

#### 3.6.8.1 Salzstress

Die Messungen der Genexpression wurden mit den selben Pflanzenproben und im selben Versuchsansatz durchgeführt wie die zuvor beschriebenen Messungen der Expression von *ANAC058* (vgl. 3.5.3.1). Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 42 dargestellt.



**Abbildung 42: Messung der Genexpression von *ANAC038* und *RD29A* nach NaCl-Applikation**

Expression von *ANAC038* und des Stress-Kontrollgens *RD29A* in Wurzeln NaCl behandelte Pflanzen zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 3 h und 6 h nach der NaCl-Applikation, das Expressionslevel der unbehandelten Kontroll-Pflanzen zum Zeitpunkt 0 h wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Pflanzen zu den übrigen Zeitpunkten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

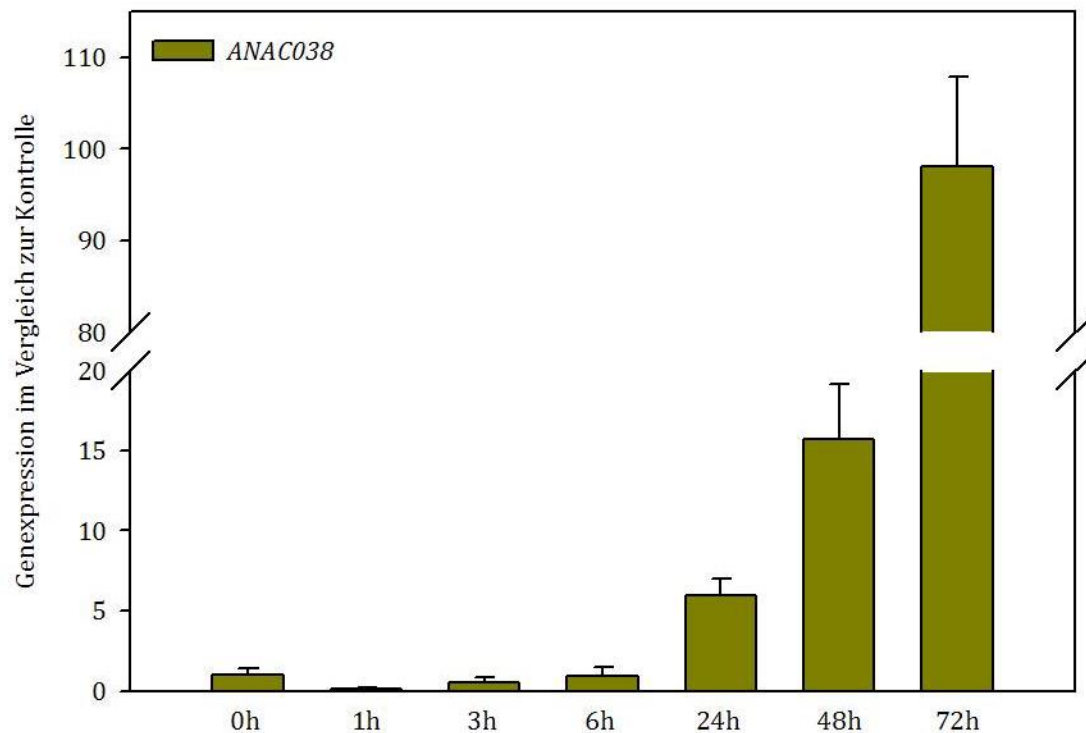
Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte nach 1 h Behandlung mit 150 mM NaCl eine Steigerung der Genexpression von *ANAC038* um 170 % beobachtet werden (2,7-fach  $\pm$  0,23). Das Genexpressionslevel steigerte sich anschließend kontinuierlich weiter auf das 4-fache ( $\pm$  0,24) nach 3 h, um schließlich das 8,3-fache ( $\pm$  2,3) 6 h nach Beginn der NaCl Applikation zu erreichen.

### **3.6.8.2      *Verwundung***

Um die mögliche Induktion der *ANAC038* Expression durch Verwundung zu untersuchen, wurden Blätter von WT-Pflanzen mit Hilfe einer Hundebürste großflächig perforiert und zu den folgenden Zeitpunkten nach der Verwundung Blattmaterial geerntet: 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte einen signifikanten Anstieg der Genexpression im Vergleich zur unverwundeten Kontrolle erst nach 24 h. Vielmehr konnte nach 1 h eine Reduktion der Expression auf das 0,09-fache ( $\pm$  0,1) beobachtet werden, die nach 3 h auf das 0,5-fache ( $\pm$  0,3) und nach 6 h auf das 0,9-fache ( $\pm$  0,5) und damit fast wieder auf das Ursprungsniveau stieg.

Nach 24 h stieg die Genexpression signifikant um fast 500 % an (6,0-fach  $\pm$  1,0), steigerte sich nach 48 h auf das fast 16-fache (15,7-fach  $\pm$  3,4) und erreichte ihren Höhepunkt dieser Messreihe nach 72 h bei der 98-fachen ( $\pm$  9,8) Genexpression im Vergleich zur nicht verwundeten Kontrolle.



**Abbildung 43: Messung der Genexpression von ANAC038 nach Verwundung der Blätter**

Expression von ANAC038 in Blättern verwundeter Pflanzen zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Blatt-Perforation, das Expressionslevel der nicht verwundeten Kontroll-Pflanzen zum Zeitpunkt 0 h wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Pflanzen zu den übrigen Zeitpunkten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

Dieses Experiment wurde zusätzlich mit Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS Pflanzen durchgeführt. Hierfür wurden Blätter mit einer Hundehaarbürste verwundet und nach 3 h abgeschnitten und in GUS-Lösung inkubiert. Wie Abbildung 44 zu entnehmen zeigte sich rund um die Verwundungsstellen sowie an der Schnittstelle von der Sprossachse eine intensive Blaufärbung. Parallel wurden unverwundete Blätter in GUS-Lösung inkubiert, die lediglich an der Schnittstelle von der Sprossachse blau verfärbt waren (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt konnte in zehn unabhängigen Transformanten beobachtet werden.



**Abbildung 44: Verwundetes Blatt einer Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS Pflanze**

Blätter von Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS Pflanzen wurden mit einer Hundebürste verletzt und nach 3 h in GUS-Lösung inkubiert. Die Ränder der verwundeten Blattbereiche weisen eine intensive Blaufärbung auf.

### 3.6.9 Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Stresstoleranz

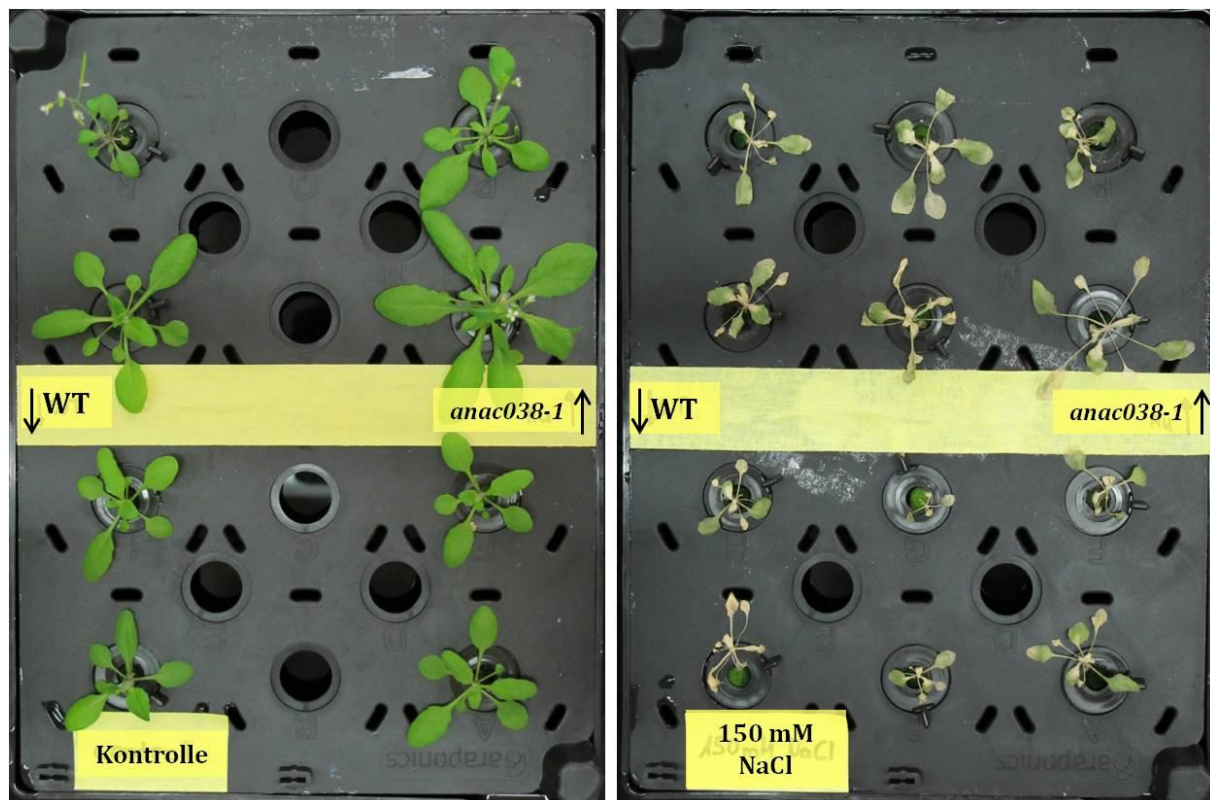
Die zuvor dargestellten Beobachtungen, dass die Gesamtmenge des Wurzelsuberins in *anac038* Pflanzen signifikant erhöht ist, führt zu der Frage, ob sich daraus Auswirkungen auf die Toleranz dieser Pflanzen gegenüber abiotischen Stressfaktoren wie Salz- oder Trockenstress ergeben. Diese Fragestellung sollte mit Pflanzen der Linie *anac038-1* untersucht werden, die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

#### 3.6.9.1 Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber Salzstress

Um die möglichen Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Toleranz gegenüber Salzstress untersuchen zu können, wurden *anac038-1* und WT-Pflanzen für 21 Tage in hydroponischen Kammern angezogen. Jeweils vier Pflanzen beider Genotypen wurden anschließend in hydroponische Kammern umgesetzt, deren Medium 150 mM NaCl zugesetzt worden war. Weitere acht Pflanzen wurden als Kontrolle auf hydroponische Kammern mit zusatzfreiem Nährmedium umgesetzt.

Sowohl für dieses als auch für die Untersuchungen mit Mannitol wurden hydroponisch gewachsene Pflanzen gewählt, weil diese im Gegensatz zu erdgewachsenen Pflanzen den Vorteil haben, dass ein „zonaler Effekt“ der NaCl Applikation wie in Erde vermieden

wird und die Experimente besser reproduzierbar sind. Vor Beginn des Stressexperiments wurde das Wasserpotential des Nährmediums mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) gemessen: Das Wasserpotential des zusatzfreien Nährmediums (Kontrolle) betrug 0,007 Osmol/kg, das Wasserpotential des mit 150 mM NaCl versetzten Nährmediums betrug 0,277 Osmol/kg.



**Abbildung 45: *anac038-1* und WT-Pflanzen nach 6-tägiger Behandlung mit 150 mM NaCl**

21 Tage alte *anac038-1* (oben) und WT-Pflanzen (unten) wurden für sechs Tage in Medium mit 150 mM NaCl (rechts) bzw. in unbehandeltem Medium als Kontrolle (links) inkubiert. Nach der Inkubation zeigen beide Genotypen deutliche Stresssymptome, eine Unterscheidung der Stressanfälligkeit ist nicht möglich.

Als Folge der Behandlung mit 150 mM NaCl konnten nach 3 Tagen erste gelblich/weiße Verfärbungen der Blätter aller Pflanzen beobachtet werden, auch wurden erste Stresssymptome wie leichtes Welken und Runzeln der Blätter sichtbar, ein Unterschied zwischen *anac038-1* und WT-Pflanzen war jedoch nicht auszumachen. Nach vier Tagen sichtbar werdende Nekrosen zeigten deutlich den ausgelösten Salzstress an, der nach sechs Tagen zu welken, nekrotischen und ausgebleichten Blättern führte, wie Abbildung 45 zu entnehmen ist. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein phänotypischer Unterschied zwischen *anac038-1* und WT-Pflanzen in Bezug auf die Stressanfälligkeit identifiziert werden, beide Genotypen schienen von den Stresssymptomen gleichermaßen betroffen zu sein.

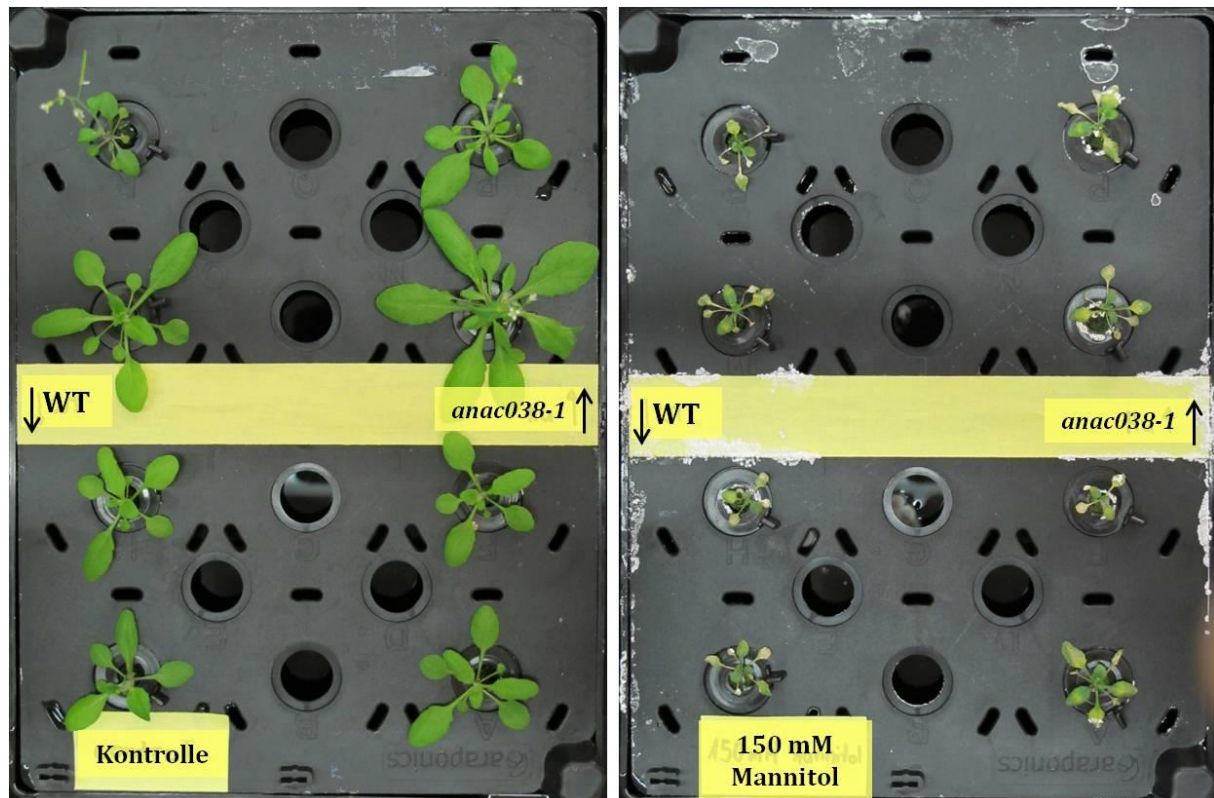
Dieses Experiment wurde ebenfalls mit Pflanzen des Allels *anac038-2* wiederholt, auch für diese Pflanzen konnten nach Stressapplikation keine phänotypischen Unterschiede im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.6.9.2      *Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber osmotischem Stress***

Um die möglichen Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Toleranz gegenüber osmotischem Stress untersuchen zu können, wurden *anac038-1* und WT-Pflanzen für 21 Tage in hydroponischen Kammern angezogen. Anschließend wurden sie teilweise in Kammern transferiert, deren Medium 150 mM Mannitol zugesetzt worden war. Vor Beginn des Stressexperiments wurde das Wasserpotential des Nährmediums mit Hilfe eines Osmometers gemessen: Das Wasserpotential des zusatzfreien Nährmediums (Kontrolle) betrug 0,007 Osmol/kg, das Wasserpotential des mit 150 mM Mannitol versetzten Nährmediums betrug 0,157 Osmol/kg.

Nach drei Tagen wurden erste Effekte der Mannitolapplikation sichtbar: Blätter einzelner Pflanzen begannen zu welken und nach vier Tagen wurden erste Gelbfärbungen sichtbar. Sechs Tage nach Beginn der Applikation konnten zusätzlich leichte Nekrosen und starke Gelbfärbungen der Blätter identifiziert werden. Im direkten Vergleich mit dem Stressexperiment mit 150 mM NaCl wirkten die Symptome jedoch milder. Sowohl *anac038-1* als auch WT-Pflanzen zeigten nach sechs Tagen deutliche Stresssymptome, mögliche Unterschiede in der Stressanfälligkeit konnten allerdings nicht festgestellt werden, die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 46 dargestellt.





**Abbildung 46: *anac038-1* und WT-Pflanzen nach 6-tägiger Behandlung mit 150 mM Mannitol**

21 Tage alte *anac038-1* und WT-Pflanzen wurden für sechs Tage in Medium mit 150 mM Mannitol (rechts) bzw. in unbehandeltem Medium als Kontrolle (links) inkubiert. Nach der Inkubation zeigen beide Genotypen deutliche Stresssymptome, eine Unterscheidung der Stressanfälligkeit ist nicht möglich.

Zur Betrachtung der Abbildung ist anzumerken, dass die verwendeten Pflanzen in der Kontrollreihe deutlich größer sind als die mit Mannitol behandelten Pflanzen, dies liegt nicht in einer möglichen Wachstumsverzögerung durch Mannitol begründet, sondern vielmehr wiesen die Pflanzen durch Komplikationen während der Anzucht bereits vor Beginn der Applikation eine geringere Größe auf.

### **3.6.9.3 Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Toleranz gegenüber Trockenstress**

Um mögliche Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Toleranz gegenüber Trockenstress untersuchen zu können, wurden 21 Tage alte erdgewachsene *anac038-1* und WT-Pflanzen für neun Tage nicht mehr gegossen, *anac038-1* Kontrollpflanzen wurden parallel gegossen. Als zusätzliche Positivkontrolle wurden Pflanzen des Genotyps *esb1* angezogen. Diese Pflanzen zeigten eine deutlich verbesserte Toleranz, die auf eine signifikante Erhöhung des Gesamtsuberingehalts zurückgeführt wurde (Baxter et al., 2009).





**Abbildung 47: *anac038* und WT-Pflanzen nach 9-tätigem Trockenstress**

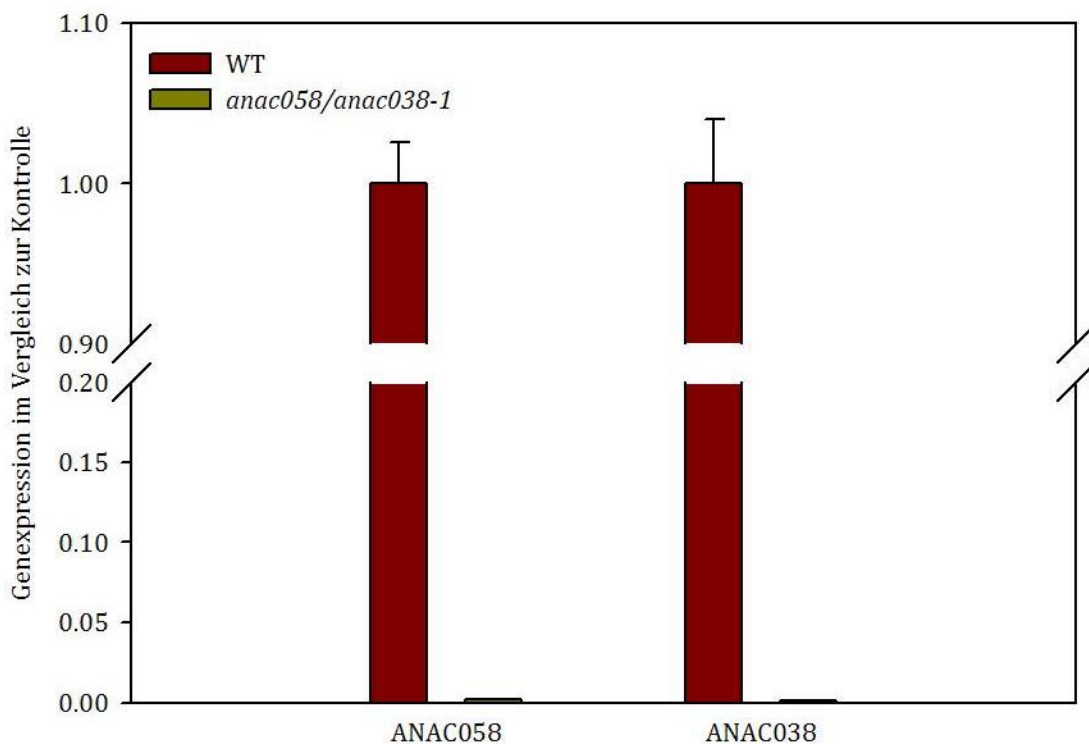
*anac038-1* und WT-Pflanzen wurden neun Tage lang nicht gegossen, als Positivkontrolle fungierte die trockenstresstolerante und Suberin reichere *esb1* Mutante. Kontrolle: *anac038-1* Pflanzen wurden weiterhin wie zuvor gewässert, weitere Kontrollpflanzen nicht dargestellt.

Wie in Abbildung 47 dargestellt wirkten die nicht gewässerten WT-Pflanzen nach neun Tagen ausgetrocknet, erschlafft und nekrotisch und die meisten Blätter wiesen eine gelbe bis bräunliche Verfärbung auf. Die *esb1* Pflanzen wirkten im Gegensatz dazu fest, vital und wiesen eine dunkle grüne Färbung und keine Nekrosen auf. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich für die *anac038-1* Pflanzen, deren vitales Aussehen und dunkelgrüne Blätter keine typischen Symptome von Trockenstress erkennen ließen. Zwar war die Blattfärbung der *anac038-1* und *esb1* Pflanzen deutlich dunkler und die Ausbildung der Blütenstände im Vergleich zu den gewässerten Kontrollpflanzen etwas verzögert, doch zeigten sie eine deutlich bessere Stresstoleranz als die ausgetrockneten WT-Pflanzen. *anac038-1* und *esb1* zeigen dabei eine vergleichbare sehr geringe Anfälligkeit gegenüber Trockenstress und ließen sich optisch nicht unterscheiden. Dieser Effekt wurde nicht nur in Pflanzen der Linie *anac038-1* sondern in einem unabhängigen Experiment zusätzlich in der Linie *anac038-2* beobachtet (Abbildung im Anhang in 7.7).

## 3.7 Weiterführende Untersuchungen zu *ANAC058* und *ANAC038*

### 3.7.1 Generierung und Untersuchung der Doppelmutante *anac058/anac038-1*

Für weiterführende Untersuchungen wurden Nachkommen einer zuvor von Sebastian Theobald generierte Kreuzung aus *anac038-1* und *anac058* verwendet. Gemäß der Mendel'schen Vererbungslehre konnten in der F2-Generation durch Genotypisierung Pflanzen identifiziert werden, die für beide Allele homozygot waren und die für die nachfolgenden Suberinanalysen propagiert wurden. Der transkriptionelle Knockout in Wurzeln der Pflanzen der F3-Generation wurde mit Hilfe der RTQ-PCR nachgewiesen, das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48: Messung der Genexpression von *ANAC058* und *ANAC038* in den Wurzeln von *anac058/anac038-1* und WT-Pflanzen**

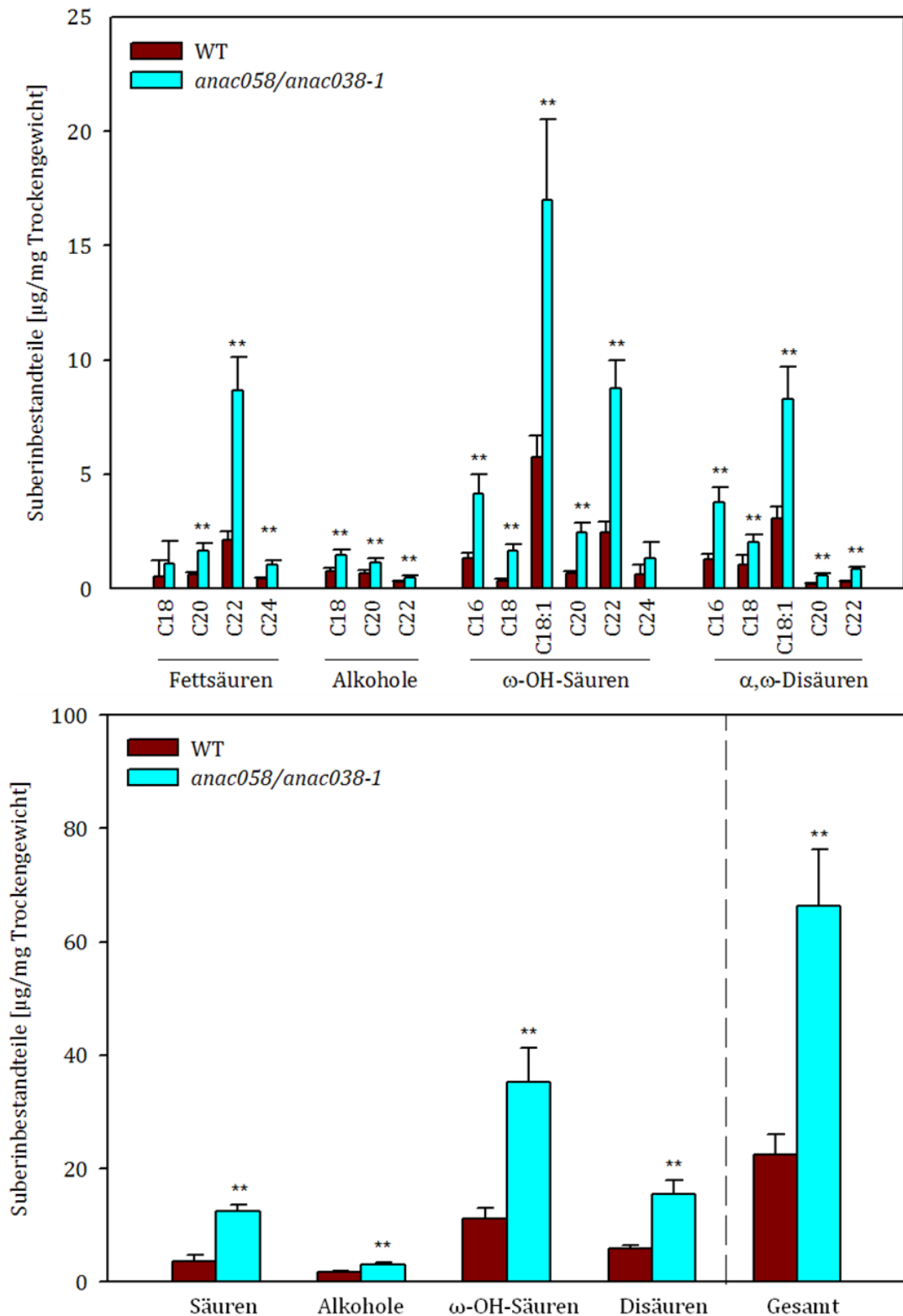
Expression von *ANAC058* und *ANAC038* in Wurzeln der Pflanzen *anac058/anac038-1* und WT, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

Für die gaschromatographische Untersuchung des Wurzelsuberins wurden *anac058/anac038-1* und WT-Pflanzen für 37 Tage auf Erde angezogen. Da die beiden Knockout Mutanten, die hier gekreuzt wurden, ursprünglich in unterschiedlichen Ökotypen generiert wurden (*anac038-1*: Columbia, *anac058*: Landsberg), stellte sich die Frage nach dem richtigen Ökotypen als Referenz für den Vergleich des Suberingehalts. Die angezogenen *anac058/anac038-1* Pflanzen entsprachen phänotypisch dem Columbia-Ökotyp, der durch seine Blattmorphologie deutlich vom Landsberg-Ökotyp zu unterscheiden ist, daher fand er für die vergleichende Analyse Verwendung.

Durch die gaschromatographische Analyse konnten 18 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkohole (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten, wie in Abbildung 49 gezeigt.

Im Wurzelsuberin der *anac058/anac038-1* Mutanten wurde eine hoch signifikante Steigerung der mittleren Gesamtsuberinmenge um 140 % (WT: 22,4 ± 3,6 µg/mgdw, *anac058/anac038-1*: 66,3 ± 9,9 µg/mgdw) beobachtet. Diese resultierte aus einer Akkumulation aller Monomere mit Ausnahme der C<sub>18</sub> Monocarbonsäure und der C<sub>24</sub> ω-Hydroxysäure. Diese Veränderung des Gesamtsuberins spiegelte sich auch im Vergleich der Substanzklassen wieder: So waren in den Wurzeln der *anac058/anac038-1* Mutanten die Monocarbonsäuren um 235 % (WT: 3,7 ± 1,0 µg/mgdw, *anac058/anac038-1*: 12,4 ± 1,2 µg/mgdw), die primären Alkohole um 82 % (WT: 1,7 ± 0,3 µg/mgdw, *anac058/anac038-1*: 3,1 ± 0,5 µg/mgdw), die ω-Hydroxysäuren um 215 % (WT: 11,2 ± 1,8 µg/mgdw, *anac058/anac038-1*: 35,3 ± 5,9 µg/mgdw) und die α,ω-Dicarbonsäuren um 163 % erhöht (WT: 5,9 ± 0,6 µg/mgdw, *anac058/anac038-1*: 15,5 ± 2,5 µg/mgdw).

Bei der Betrachtung der Einzelsubstanzen zeigten sich die markantesten Erhöhungen für die C<sub>22</sub> Monocarbonsäure (Erhöhung um 314 %), C<sub>16</sub> (Erhöhung um 215 %), C<sub>18:1</sub> (Erhöhung um 193 %) und C<sub>22</sub> ω-Hydroxysäure (Erhöhung um 252 %) sowie die C<sub>16</sub> (Erhöhung um 192 %) und C<sub>18:1</sub> α,ω-Dicarbonsäure (Erhöhung um 168 %).



**Abbildung 49: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppel-Knockout Mutante *anac058/038-1* und des korrespondierenden Wildtyps**

**A:** Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Mutante *anac058/038-1* und des korrespondierenden Wildtyps. **B:** Substanzklassenverteilung und Gesamtsuberinmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus jeweils fünf *anac058/038-1* und WT-Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole, ω-OH-Säuren: ω-Hydroxysäuren, (α,ω)-Disäuren: α,ω-Dicarbonsäuren; \*\*:  $t \leq 0,01$ .

### **3.7.2 Überexpression von *ANAC058* und *ANAC038* in Wildtyp Pflanzen**

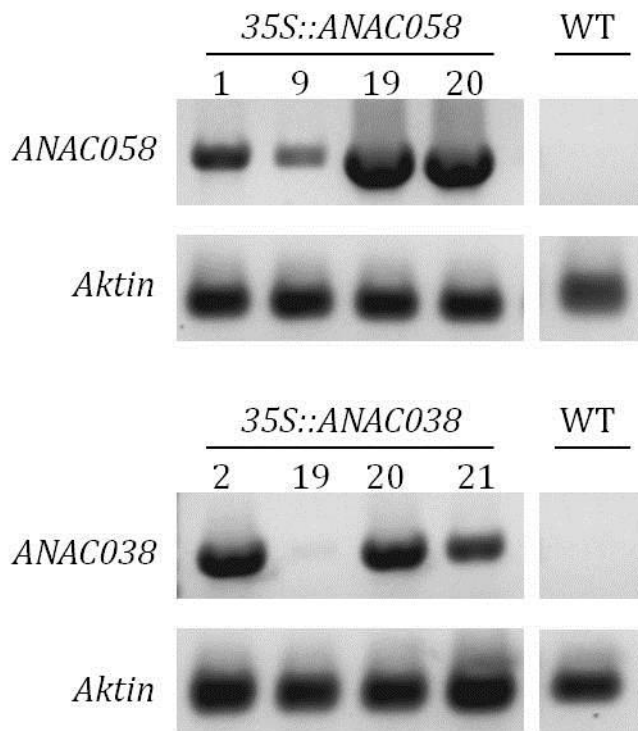
Um mögliche Auswirkungen einer Überexpression der Transkriptionsfaktoren *ANAC058* und *ANAC038* auf die Suberinzusammensetzung und die Expression anderer Suberingene untersuchen zu können, wurden beide Gene unter der Kontrolle des 35S-Promoters in WT-Pflanzen überexprimiert.

#### **3.7.2.1 Generierung von Überexpressionslinien und Messung der Genexpression**

Zur Generierung von Überexpressionslinien wurde die CDS von *ANAC058* bzw. *ANAC038* mit Hilfe der Gateway-Technik in den kommerziell erhältlichen pMDC32-Vektor unmittelbar hinter zwei 35S-Promotoren kloniert, wie in 2.8 beschrieben in WT-Pflanzen transformiert und die Samen der Nachfolgeneration selektiert.

Mit Hilfe der PCR wurde jeweils in 21 zufällig ausgewählten Keimlingen beider Überexpressionslinien die Präsenz des 35S-Promoters nachgewiesen und diese weiter propagiert, um Samen der T2-Generation zu erhalten.

Von diesen unabhängigen Linien der T2-Generation wurden Blätter geerntet und Gesamt-RNA extrahiert, um die Expression der Gene *ANAC058* bzw. *ANAC038* mit Hilfe der RT-PCR jeweils repräsentativ in 4 unabhängigen Pflanzen semiquantitativ zu messen (Abbildung 50). Die Messung der Expression in Blättern bot den Vorteil, dass ein endogenes Expressionslevel, wie es in Wurzeln zu erwarten wäre, vermieden werden konnte.



**Abbildung 50: Messung der Genexpression von *ANAC058* bzw. *ANAC038* in den jeweiligen Überexpressionslinien mit Hilfe der RT-PCR**

Semiquantitative Messung der Expressionslevel von *ANAC058* bzw. *ANAC038* in den Blättern von jeweils vier unabhängiger Überexpressionslinien mit Hilfe der RT-PCR. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen *Aktin*, als weitere Kontrolle wurde die Expression in den Blättern von nicht transformierten WT-Pflanzen gemessen.

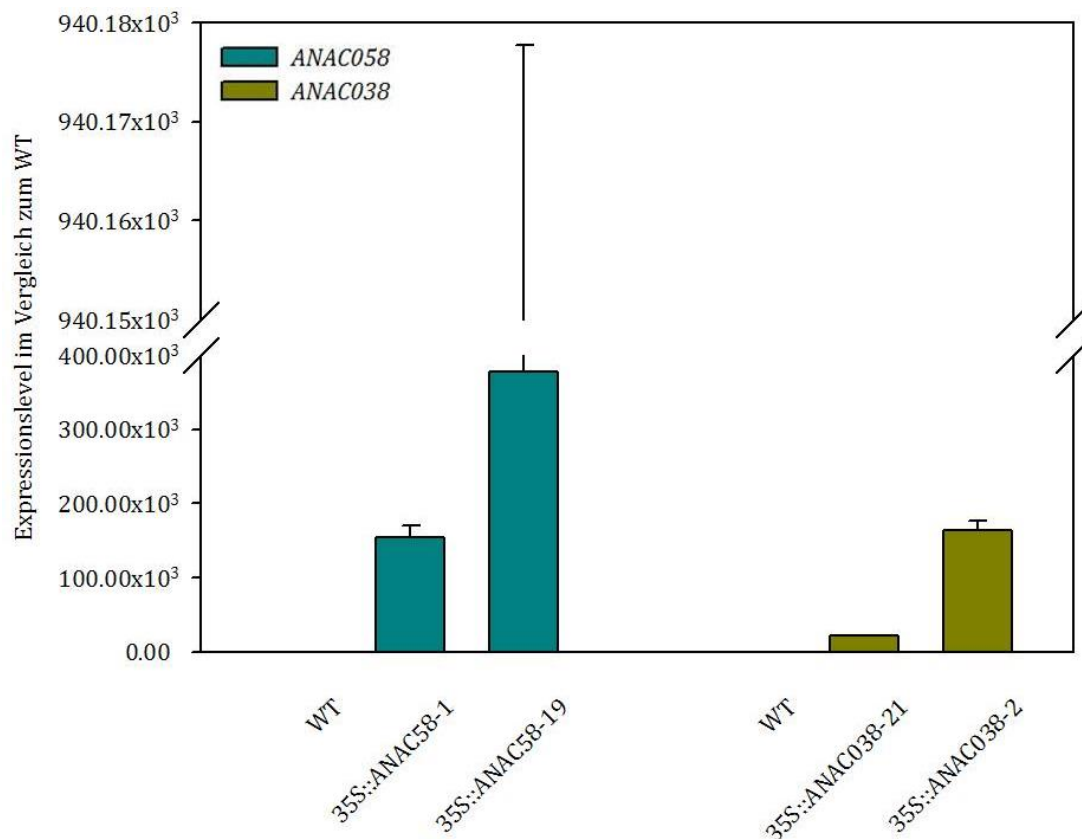
Sowohl die unabhängigen *35S::ANAC058* Linien als auch die unabhängigen *35S::ANAC038* Linien wiesen unterschiedlich hohe Expressionslevel auf, was sich in unterschiedlichen Intensitäten der Banden ausdrückte. Erwartungsgemäß konnte in den Blättern der nicht transformierten WT-Pflanzen keine Expression gemessen werden, da sowohl *ANAC058* als auch *ANAC038* Wurzel spezifisch exprimiert werden (vgl. 3.1).

Für die weiteren Expressionsmessungen wurden jeweils zwei Linien repräsentativ ausgewählt, die unterschiedlich hohe Expressionslevel zeigten, um mögliche Abhängigkeiten von der Intensität der Genexpression nachzuweisen. Für *35S::ANAC058* wurden die Linien Nr. 1 als schwach und Nr. 19 als stark exprimierende Vertreter ausgewählt. Für *35S::ANAC038* wurden die Linien Nr. 21 als schwach und Nr. 2 als stark exprimierende Vertreter ausgewählt. Die entsprechenden Pflanzen wurden propagiert und alle weiteren Experimente mit Pflanzen der T3-Generation durchgeführt.

Zusätzlich wurden die Unterschiede der Genexpression mit Hilfe der RTQ-PCR quantitativ bestimmt (vgl. Abbildung 51).

Das Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen der semiquantitativen RT-PCR da deutliche Unterschiede in der Intensität der Expressionslevel zwischen den beiden

Überexpressionslinien jedes Gens gemessen werden konnten. Für die Linie *35S::ANAC038-21* wurde im Vergleich zum WT das fast 22.000-fache ( $21.792\text{-fach} \pm 540$ ), für *35S::ANAC038-2* das fast 164.000-fache ( $164.480\text{-fach} \pm 12.599$ ) Expressionslevel gemessen. Für die Linie *35S::ANAC058-1* wurde eine Erhöhung auf das 154.000-fache ( $154.017 \pm 15.801$ ) und für *35S::ANAC058-19* auf das 380.00-fache ( $378.396 \pm 561.782$ ) gemessen.



**Abbildung 51: Messung der Genexpression von ANAC058 und ANAC038 in den Blättern der vier Überexpressionslinien**

Expression von ANAC058 und ANAC038 in den Blättern der Überexpressionslinien *35S::ANAC058-1* und *-19* und *35S::ANAC038-21* und *-2* sowie WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

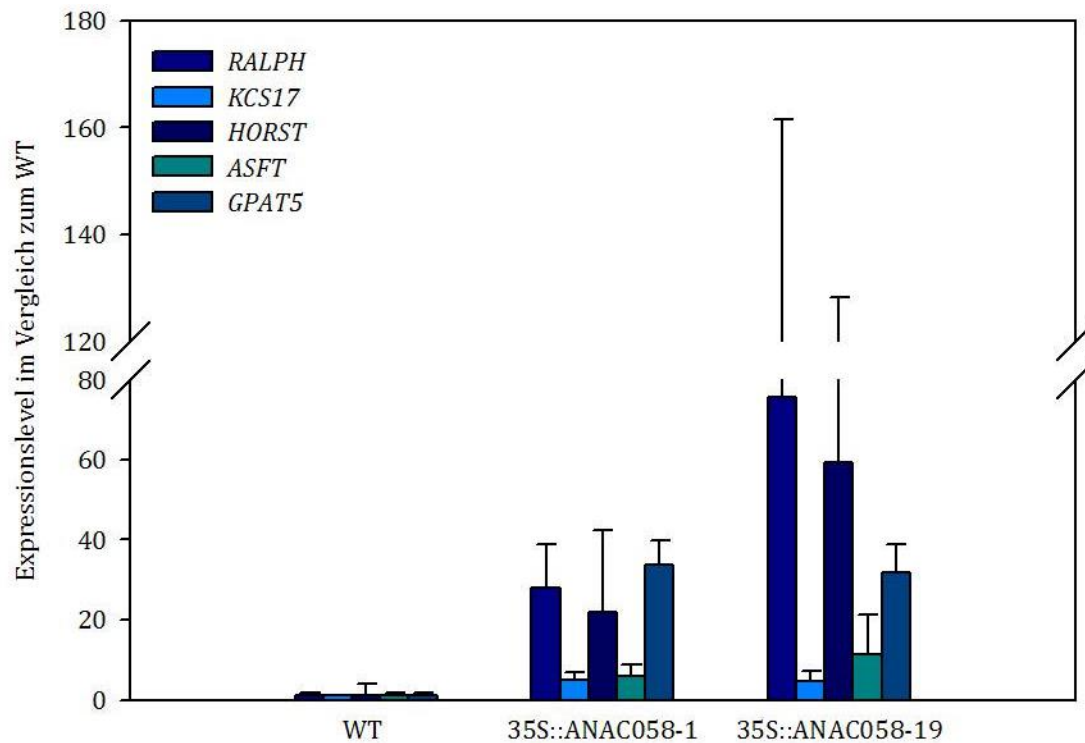
### 3.7.2.2 Auswirkungen der Überexpression von ANAC058 und ANAC038 auf die Expression charakterisierter Suberingene in Blättern

Um mögliche regulative Effekte bekannter Suberingene der Transkriptionsfaktoren ANAC058 und ANAC038 auf bekannte Suberingene zu untersuchen, wurde die Expression der bereits charakterisierten Suberingene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* in Blättern der Überexpressionskonstrukte gemessen.

Sollte es nun möglich sein, eine erhöhte Expression in den Blättern der Überexpressions-Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen zu messen, so könnte dies in unmittelbarem Zusammenhang mit der Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren stehen, die normalerweise ebenfalls nicht in Blattgeweben exprimiert werden. Des Weiteren sollte sich in diesem Fall die unterschiedliche Intensität der Expression von *ANAC058* bzw. *ANAC038* in den ausgewählten Linien auch auf die Expression der untersuchten Subergene auswirken. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 52 für *35S::ANAC058* und in Abbildung 53 für *35S::ANAC038* dargestellt.

Die Betrachtung der Ergebnisse der *ANAC058*-Überexpression zeigt deutliche Erhöhungen der Genexpression mindestens auf das 20-fache für die Gene *RALPH*, *HORST* und *GPAT5* in beiden Überexpressionslinien. Die gemessenen Mittelwerte für *RALPH* (Nr. 1: 27,9-fach  $\pm$  11, Nr. 19: 75,5-fach  $\pm$  85,9) und *HORST* (Nr. 1: 22-fach  $\pm$  20,4, Nr. 19: 59  $\pm$  69) steigen zwischen den Linien *35S::ANAC058-1* und *-19* um etwa 170 %. Die Expressionslevel der Gene *KCS17* und *GPAT5* sind in beiden Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp signifikant angestiegen (*KCS17*: etwa 5-fach, *GPAT5*: etwa 33-fach). Ähnlich verhält es sich für die Expressionslevel des Gens *ASFT*, zwischen der Expression in *35S::ANAC058-1* (6,0-fach  $\pm$  2,6) und der in *-19* (11,5-fach  $\pm$  9,7) besteht ein Unterschied von 110 %, aufgrund der hohen Standardabweichung ist eine Beurteilung jedoch schwierig.

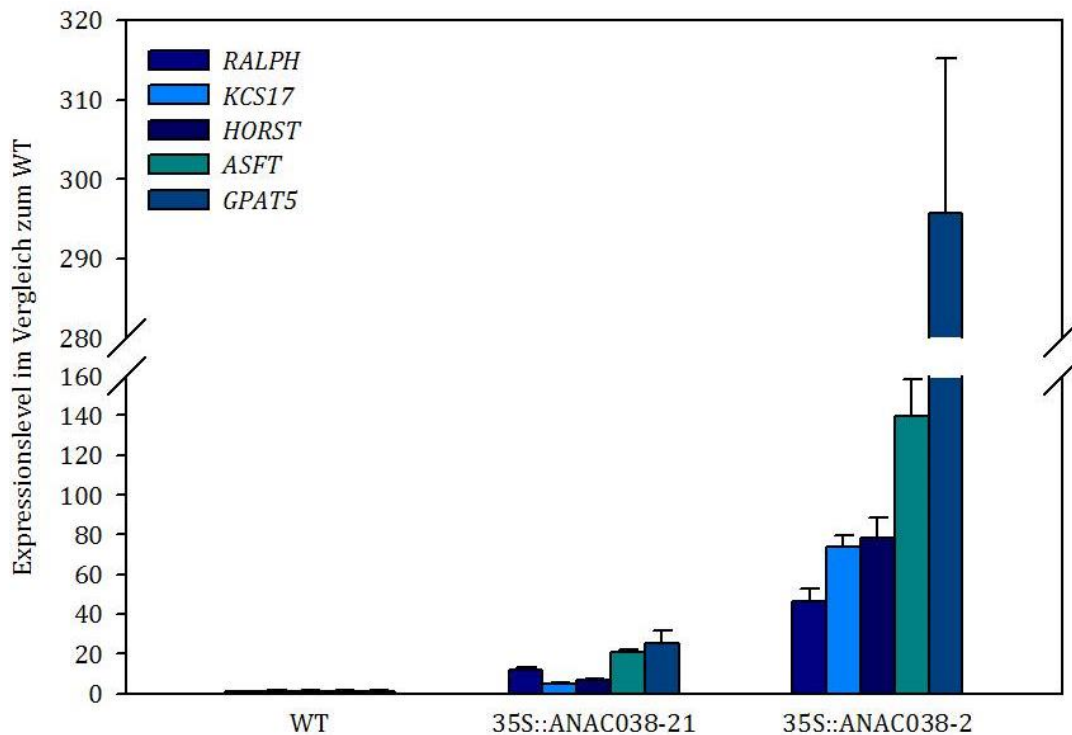




**Abbildung 52: Messung der Genexpression von Suberingenen in den Blättern von Pflanzen der beiden Überexpressionslinien 35S::ANAC058-1 und -19**

Expression der Suberingene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* in den Blättern der Überexpressionslinien 35S::ANAC058-1 und -19 sowie WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

In In der Überexpressionslinie 35S::ANAC038-21 wurde für alle Suberingene eine Erhöhung der Expression auf das mindestens 4,6-fache (*KCS17*;  $\pm 0,7$ ) gemessen. Die maximale Expression wurde in dieser Linie für das Gen *GPAT5* mit einer Erhöhung auf das 25-fache ( $\pm 7,0$ ) gemessen. Die Expressionsraten von *RALPH* (12,0-fach  $\pm 1,2$ ), *HORST* (6,5-fach  $\pm 1,1$ ) und *ASFT* (20,5-fach  $\pm 1,5$ ) lagen zwischen diesen Werten. Ein Vergleich dieser Werte mit der Überexpressionslinie 35S::ANAC038-2 ergab eine weitere Steigerung der Expression der untersuchten Gene: Die höchste Expression konnte erneut für das Gen *GPAT5* (295,8-fach  $\pm 24,4$ ) gemessen werden, die geringste Expression wurde für das Gen *RALPH* (46,3  $\pm 6,4$ ) beobachtet. Die Expression der Gene *KCS17* (73,4-fach  $\pm 6,0$ ), *HORST* (78,3  $\pm 10,0$ ) und *ASFT* (140,0-fach  $\pm 18,1$ ) lag zwischen diesen Werten.

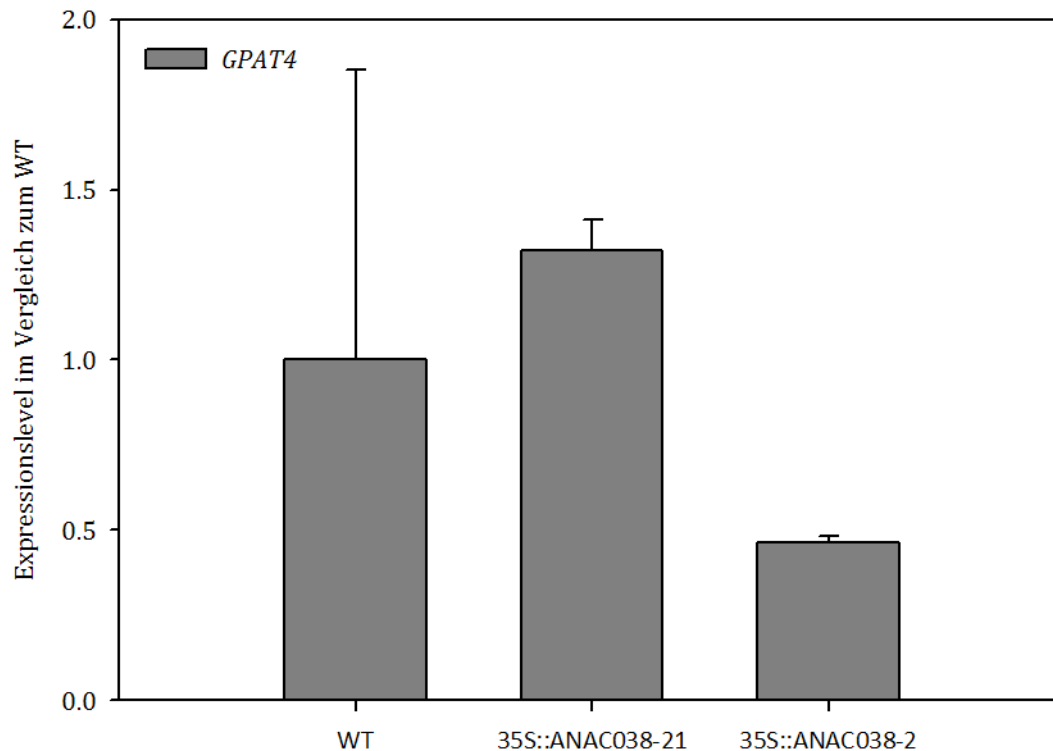


**Abbildung 53: Messung der Genexpression von Suberingenen in den Blättern von Pflanzen der beiden Überexpressionslinien 35S::ANAC038-21 und -2**

Expression der Suberingene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* in den Blättern der Überexpressionslinien 35S::ANAC038-21 und -2 sowie WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

Nachdem die Auswirkungen auf die Genexpression im Zusammenhang mit der Überexpression von *ANAC038* ausschließlich für Suberin spezifische Gene untersucht wurden, wurde ein weiteres Gen ausgewählt, das in die Biosynthese von Kutin involviert ist. Ziel der Untersuchung waren Erkenntnisse, ob der Transkriptionsfaktor *ANAC038* Funktionen ausschließlich in der Regulation der Biosynthese von Suberin übernimmt oder in die Regulation der Biosynthese unterschiedlicher Polyester involviert sein könnte. Repräsentativ für die Kutin-Synthese wurde das Gen *GPAT4* ausgewählt (Yang et al., 2010).

Für das Gen *GPAT4* konnte in den Blättern der Überexpressionsmutanten 35S::ANAC038-21 (1,3-fach  $\pm$  0,1) und 35S::ANAC038-2 (0,5-fach  $\pm$  0,0) keine signifikante Veränderung der Genexpression beobachtet werden (vgl. Abbildung 54).



**Abbildung 54: Messung der Expression des Kutin Gens *GPAT4* in den Blättern der beiden Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2***

Expression des Gens *GPAT4* (beteiligt in der Kutin-Synthese) in den Blättern der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* sowie der WT-Pflanze, das Expressionslevel der WT-Pflanze wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

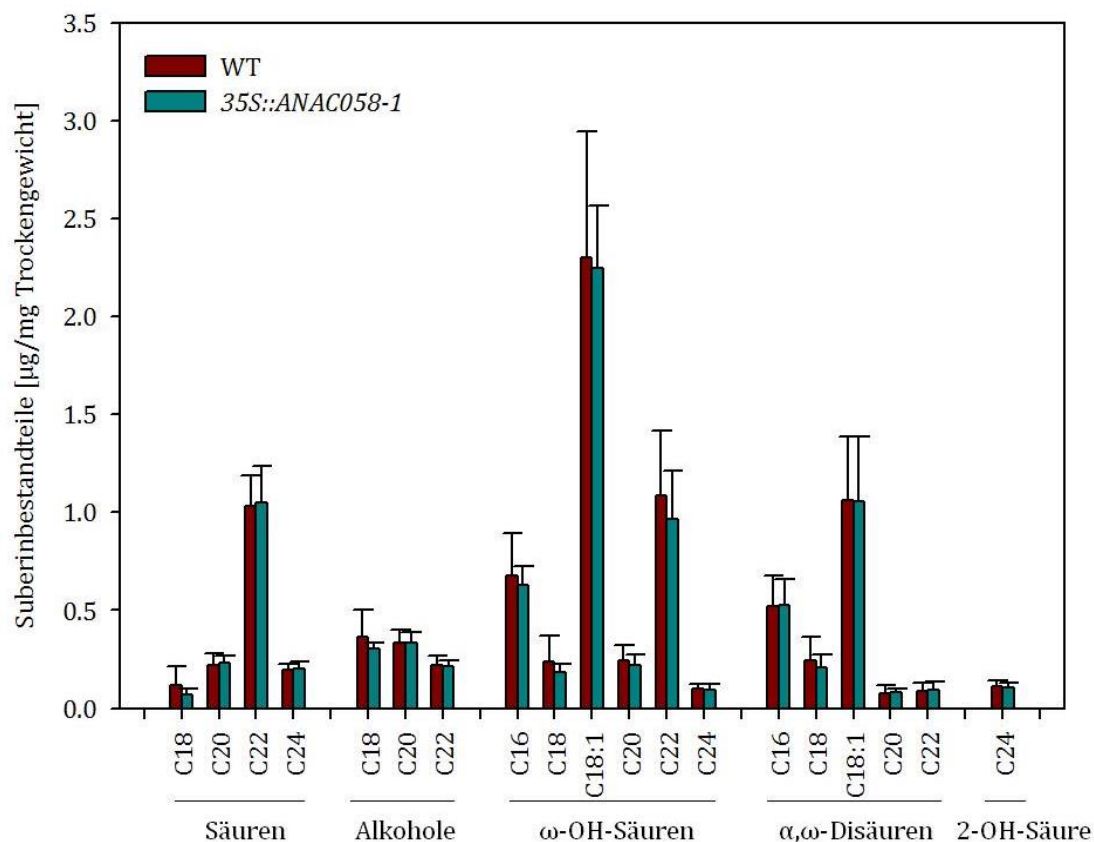
### 3.7.2.3 *Untersuchung des Wurzeluberins in den Überexpressionslinien*

Nachdem in den zuvor durchgeführten Experimenten eine Veränderung des Expressionslevels für Gene der Suberinbiosynthese in den Blättern beobachtet worden war, sollte die Zusammensetzung des Wurzeluberins in den ausgewählten Überexpressionslinien analysiert werden. Damit könnten mögliche Auswirkungen der Überexpression der Transkriptionsfaktoren *ANAC058* und *ANAC038* und der zuvor gemessenen Suberin-spezifischen Gene auf das Wurzeluberin nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Analysen sind nachfolgend in den Abbildungen 55 und 56 dargestellt.

In der gaschromatographischen Analyse der Wurzeln der *35S::ANAC058-1* Linie und des korrespondierenden Wildtyps konnten 19 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Monocarbonsäuren ( $C_{18}$ - $C_{24}$ ), primären Alkoholen ( $C_{18}$ - $C_{22}$ ),  $\omega$ -Hydroxysäuren ( $C_{16}$ - $C_{24}$ ),  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren ( $C_{16}$ - $C_{22}$ ) und 2-Hydroxysäuren ( $C_{24}$ ) zu-

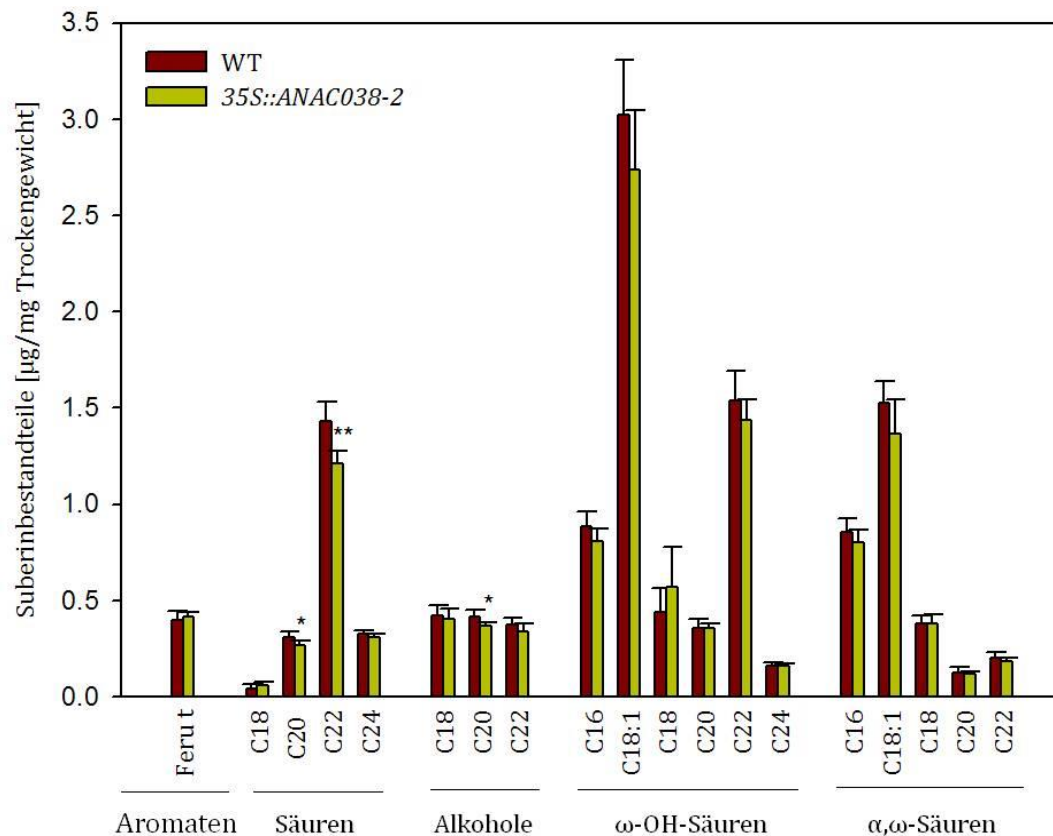
geordnet werden konnten. Zwischen Wildtyp und Überexpressionspflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.



**Abbildung 55: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie 35S::ANAC058-1 und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie 35S::ANAC058-1 und des korrespondierenden Wildtyps. Die untersuchten Pflanzen wurden auf Hygromycin-haltigem MS-Medium angezogen und anschließend in hydroponische Kammern überführt. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus jeweils fünf 35S::ANAC058-1 und WT-Parallelen ± Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole, ω-OH-Säuren: ω-Hydroxysäuren, α,ω-Disäuren: α,ω-Dicarbonsäuren.

Ein ähnliches Bild ergibt sich durch die Analyse der Wurzeln der 35S::ANAC038-2 Pflanzen: In der gaschromatographischen Analyse konnten 19 verschiedene Suberinbestandteile identifiziert werden, die den Aromaten (trans-Ferulasäure), Monocarbonsäuren (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>), primären Alkoholen (C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>), ω-Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) und α,ω-Dicarbonsäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>) zugeordnet werden konnten. Mit Ausnahme marginaler aber signifikanter Unterschiede der C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> Säure sowie dem primären C<sub>20</sub> Alkohol konnten zwischen Überexpressionslinien und WT-Pflanzen keine deutlichen Unterschiede identifiziert werden. Diese Analyse wurde zusammen mit Sebastian Theobald im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit (2012) durchgeführt.

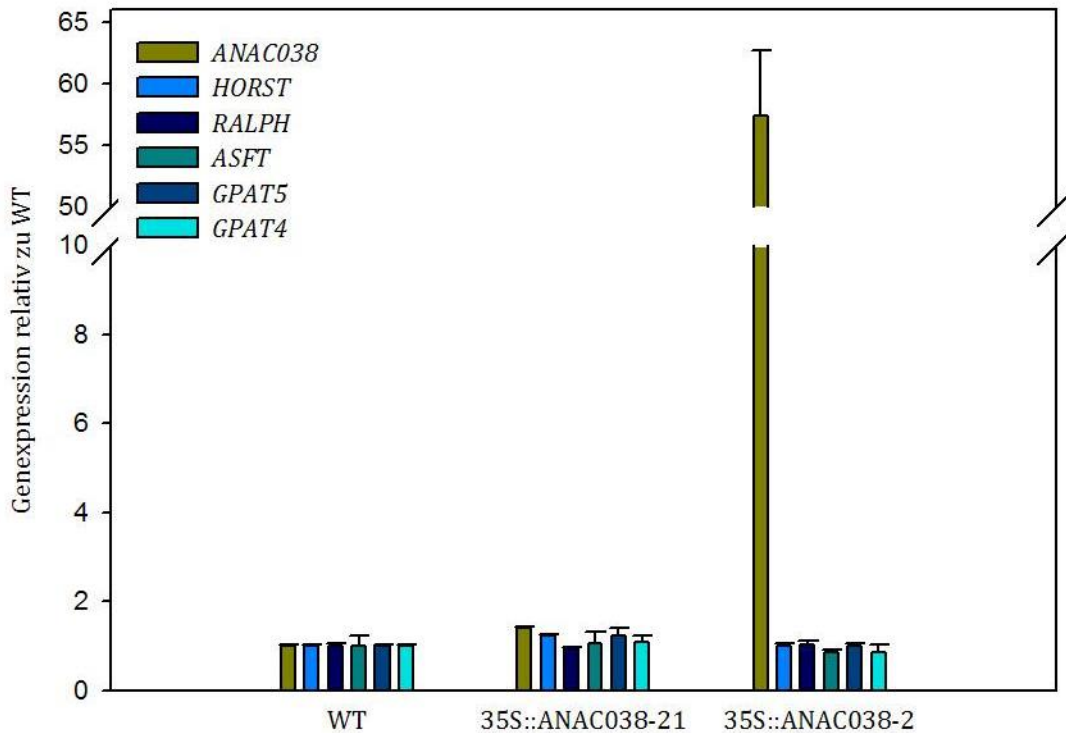


**Abbildung 56: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie 35S::ANAC038-2 und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie 35S::ANAC038-2 und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus jeweils fünf 35S::ANAC038-2 und WT-Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Säuren: Monocarbonsäuren, Alkohole: primäre Alkohole,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -Disäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren, Feru t: trans-Ferulasäure.

#### 3.7.2.4 Auswirkungen der Überexpression von ANAC038 auf die Expression charakterisierter Suberingene in Wurzeln

Da in 35S::ANAC038 Pflanzen keine Veränderungen des Wurzelsuberins gemessen werden konnten stellte sich die Frage, ob die Expression der zuvor in Blättern analysierten Gene auch in Wurzeln verändert war. Wie in Abbildung 57 gezeigt, war die Genexpression aller untersuchten Gene in Wurzeln der 35S::ANAC038-21 Pflanzen nicht signifikant verändert. In Wurzeln der 35S::ANAC038-2 Pflanzen war lediglich die Expression des Gens ANAC038 auf das 57-fache ( $\pm$  5,3) im Vergleich zum WT erhöht. Für alle anderen Suberingene konnte jedoch keine signifikante Veränderung des Expressionslevels beobachtet werden.



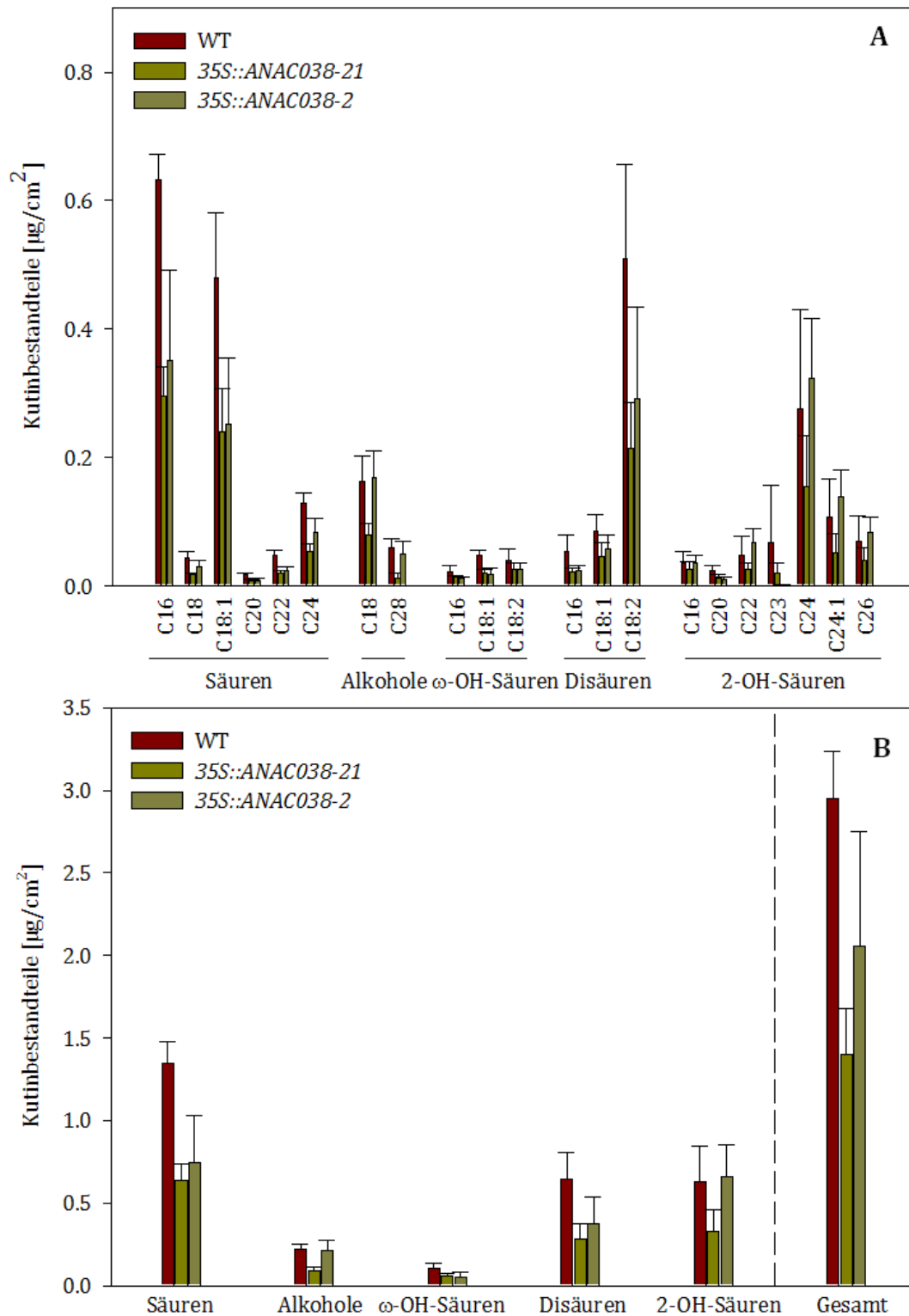
**Abbildung 57: Messung der Genexpression von *ANAC038* und charakterisierten Suberinenen in Wurzeln der Pflanzen *35S::ANAC038-21* und *-2*.**

Expression der Gene *ANAC038*, *HORST*, *RALPH*, *ASFT*, *GPAT5* und *GPAT4* in den Blättern der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* sowie WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.

### 3.7.2.5 Untersuchungen der Zusammensetzung der aliphatischen Blattpolyester in den *35S::ANAC038* Linien

Nachdem Expressionsmessungen Unterschiede in Blättern der beiden *ANAC038* überexpressierenden Mutantenlinien zeigten (vgl. Abbildung 54), sollte ein möglicher Effekt dieser Veränderungen auf die Zusammensetzung aliphatischer Polyester in Blättern untersucht werden. Diese, wie zum Beispiel Kutin, sind aus Monomeren aufgebaut, die auch in Suberin vorkommen. Hierfür wurden alle Blätter von jeweils fünf 28 Tage alten Pflanzen geerntet und wie in 2.10.4.3 beschrieben extrahiert und für die Analyse vorbereitet. In der gaschromatographischen Analyse konnten 21 verschiedene Kutinbestandteile identifiziert werden, die den 2-Hydroxysäuren ( $C_{16}$ - $C_{26}$ ), Alkoholen ( $C_{18}$  und  $C_{28}$ ), Dicarbonsäuren ( $C_{16}$ - $C_{18:2}$ ), Säuren ( $C_{16}$ - $C_{24}$ ) und  $\omega$ -Hydroxysäuren ( $C_{16}$ - $C_{18:2}$ ) zugeordnet werden konnten, wie in Abbildung 58 gezeigt.

Für die Auswertung wurde, wie in der Literatur üblich, die Fläche als Bezugsgröße gewählt. Zusätzlich wurde die Auswertung mit dem Trockengewicht als Bezugsgröße durchgeführt, zeigte die gleichen Veränderungen und wird daher nicht aufgeführt.



**Abbildung 58: Vergleich der Zusammensetzung des Blattkutins der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* und des korrespondierenden Wildtyps**

**A:** Zusammensetzung der Monomere des Blattkutins der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* und des korrespondierenden Wildtyps, **B:** Substanzklassenverteilung und Kutingesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf (WT und *35S::ANAC038-2*) bzw. vier Parallelen (*35S::ANAC038-21*)  $\pm$  Standardabweichung. 2-OH-Säuren: 2-Hydroxysäuren, Alkohole: primäre Alkohole, Dicarbonsäuren:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren, Säuren: Monocarbonsäuren,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren.

Der Vergleich der Gesamtmengen der analysierten Kutinbestandteile in Blättern des Wildtyps ergab in Relation zur Linie *35S::ANAC038-21* eine hoch signifikante Reduktion um 53 % (WT:  $3,0 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $1,4 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und in Relation zur Linie *35S::ANAC038-2* eine signifikante Reduktion um 30 % (*35S::ANAC038-2*:  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Ein direkter Vergleich der beiden Mutantenlinien miteinander zeigte dabei in Bezug auf den Gesamtgehalt an Blattkutin keinen signifikanten Unterschied.

Diese Unterschiede zwischen Wildtyp und den beiden Überexpressionslinien beruhen auf signifikanten Reduktionen der Dicarbonsäuren, Säuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren in den Mutanten. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Dicarbonsäuren in *35S::ANAC038-21* um etwa 50 %, in *35S::ANAC038-21* um etwa 35 % reduziert (WT:  $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Die Säuren zeigten eine Reduktion um etwa 60 % in *35S::ANAC038-21* und etwa 50 % in *35S::ANAC038-2* (WT:  $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,7 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und die  $\omega$ -Hydroxysäuren in beiden Mutantenlinien um 45 % (WT:  $0,11 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Diese Veränderungen waren in allen Monomeren der beschriebenen Substanzklassen zu beobachten. Ein direkter Vergleich der gemessenen Mengen an Dicarbonsäuren, Säuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren zwischen den beiden Linien mit unterschiedlichem Expressionsmuster zeigte, dass die Unterschiede nicht signifikant waren.

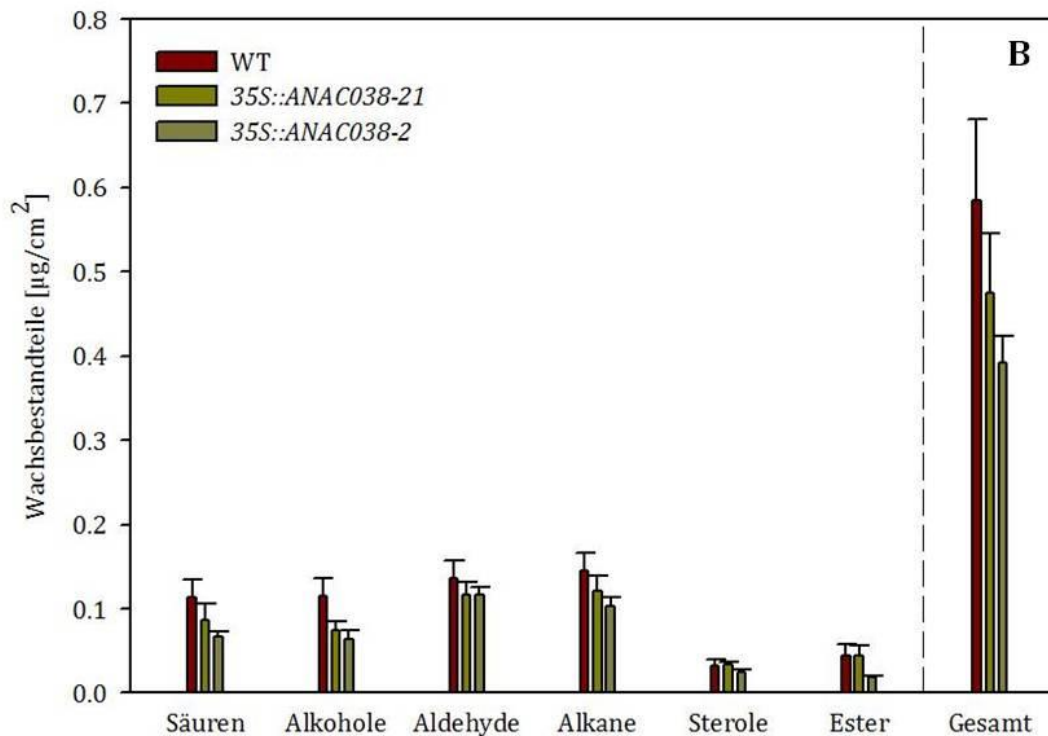
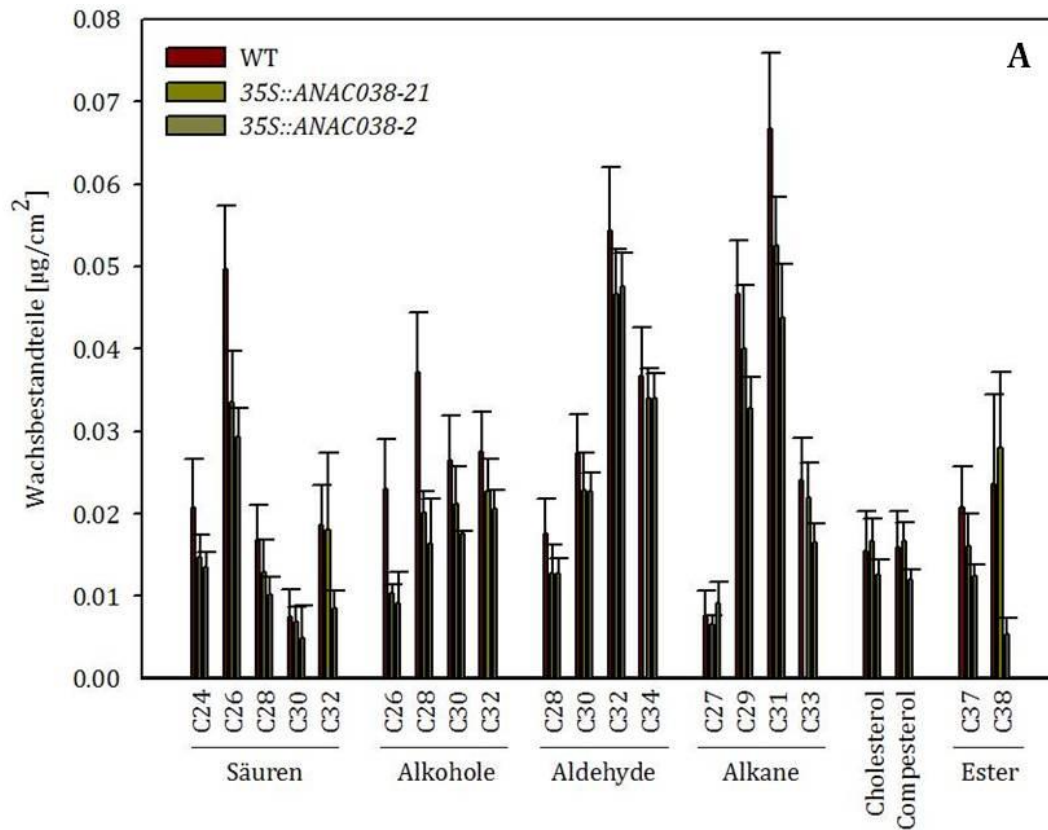
Für 2-Hydroxysäuren und Alkohole konnten signifikante Unterschiede ausschließlich zwischen WT- und *35S::ANAC038-21* Pflanzen um etwa 50 % beobachtet werden. Zwischen WT- und *35S::ANAC038-2* Pflanzen hingegen unterschieden sich die gemessenen Mengen an Monomeren nicht signifikant von einander (2-Hydroxysäuren: WT:  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,5 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; Alkohole: WT:  $0,2 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,1 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,2 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Da Li et al. (2007) im Stengelkutin von *CYP86A1* und *GPAT5* coüberexpressierenden Pflanzen typische Suberinbestandteile wie  $\text{C}_{20}$ - und  $\text{C}_{22}$ -Dicarbonsäuren sowie  $\text{C}_{20}$ - und  $\text{C}_{22}$ - $\omega$ -Hydroxysäuren nachweisen konnten, die normalerweise im Kutin nicht zu finden sind, wurden die massenspektrometrischen Analysen der beiden Überexpressionslinien gezielt auf diese Monomere untersucht. Diese Monomere konnten nicht identifiziert werden.



### **3.7.2.6 Untersuchungen der Blattwachs­zusammensetzung in den 35S::ANAC038 Linien**

Abschließend wurde nach der Untersuchung des Blattkutins die Wachs­zusammensetzung in Blättern der 35S::ANAC038 Linien untersucht. Hierfür wurden alle Blätter von jeweils fünf 28 Tage alten Pflanzen geerntet und die Blattwachse wie in 2.10.4.3 beschrieben extrahiert. In der gaschromatographischen Analyse konnten 21 verschiedene Wachsbestandteile identifiziert werden, die den Säuren (C<sub>24</sub>-C<sub>32</sub>), Alkoholen (C<sub>26</sub>-C<sub>32</sub>), Aldehyden (C<sub>28</sub>-C<sub>34</sub>), Alkanen (C<sub>27</sub>-C<sub>33</sub>), Sterolen (Cholesterol und Campesterol) und Estern (C<sub>37</sub> und C<sub>38</sub>) zugeordnet werden konnten, wie in Abbildung 59 gezeigt.



**Abbildung 59: Vergleich der Zusammensetzung der Blattwache der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* und des korrespondierenden Wildtyps**

**A:** Zusammensetzung der Monomere der Blattwache der Überexpressionslinien *35S::ANAC038-21* und *-2* und des korrespondierenden Wildtyps, **B:** Substanzklassenverteilung und Gesamtmenge. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf (WT und *35S::ANAC038-21*) bzw. vier Parallelen (*35S::ANAC038-2*) ± Standardabweichung.

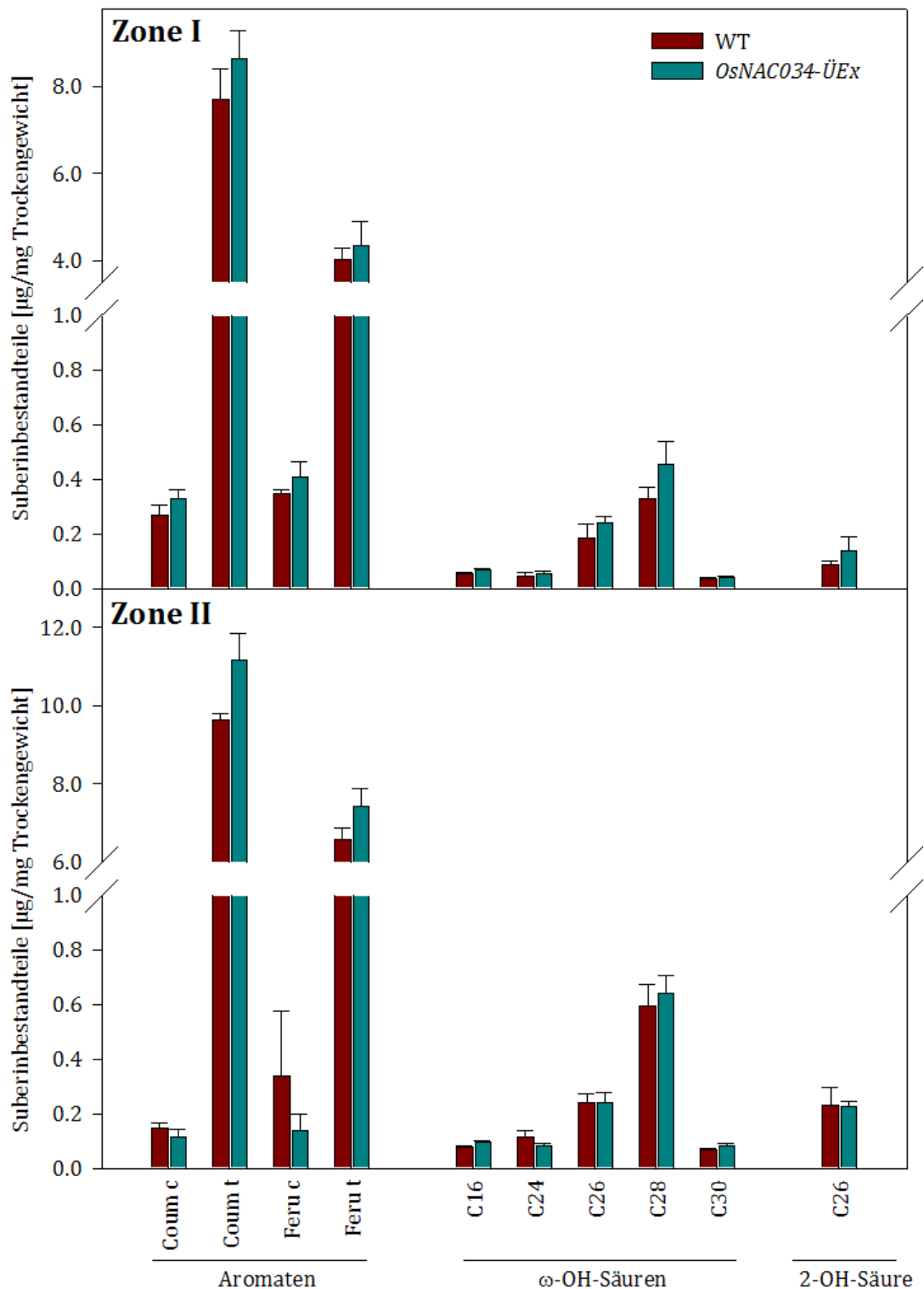
Ein Vergleich der gemessenen Gesamtwachsmengen zwischen Wildtyp und den beiden Überexpressionsmutanten ergab für die *35S::ANAC038-2* Mutante eine signifikante Reduktion um über 30 %, für *35S::ANAC038-21* konnte kein signifikanter Unterschied in der Gesamtwachsmenge gemessen werden (WT:  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,4 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Signifikante Reduktionen konnten in fast allen Substanzklassen der Blattwachse der Linie *35S::ANAC038-2* im Vergleich mit den Werten des Wildtyps gemessen werden: Die Säuren waren um etwa 40 %, die Alkohole um 45 %, die Alkane um 33 % und die Ester um etwa 50 % reduziert (Säuren: WT:  $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Alkohole: WT:  $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Alkane: WT:  $0,15 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Ester: WT:  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-2*:  $0,02 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Diese Veränderungen zeigten sich bei allen Vertretern der beschriebenen Substanzklassen mit Ausnahme der C<sub>30</sub>-Säure und des C<sub>27</sub>-Alkans, deren Veränderungen nicht als signifikant bestimmt werden konnten. Gemessene Unterschiede der Aldehyde und Sterole waren nicht signifikant.

Ein Vergleich der Wachszusammensetzung zwischen Wildtyp und *35S::ANAC038-21* Mutante zeigte mit Ausnahme der Sterole und Ester eine tendentielle Reduktion der Substanzmenge, die jedoch lediglich für die Aldehyde als statistisch signifikant bestimmt werden konnte (WT:  $0,15 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Bezogen auf die Monomermengen blieben Veränderungen auf die C<sub>26</sub>-Säure (WT:  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), die Alkohole der Kettenlänge C<sub>26</sub> (WT:  $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,01 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und C<sub>28</sub> (WT:  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,02 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und das C<sub>31</sub> Alkan (WT:  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *35S::ANAC038-21*:  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschränkt. Für alle weiteren Wachsmomere konnten keine signifikanten Veränderungen gemessen werden.

Da durch Li et al. (2007) in *GPAT5* überexprimierenden Pflanzen zusätzlich Monoacylglycerole (MAG) in kutikularen Wachsen nachgewiesen werden konnten, wurden die massenspektrometrischen Analysen auf diese überprüft. Es konnten keine Monoacylglycerole identifiziert werden.

### **3.7.3 Überexpression des *ANAC058*-Orthologs *NAC34* in Reis (*Oryza sativa*)**

Um die Analyse der Suberinzusammensetzung in *35S::ANAC058* Pflanzen speziesübergreifend zu untersuchen, wurde mit Reis (*Oryza sativa*) ein weiterer Organismus ausgewählt, dessen Suberinzusammensetzung beschrieben wurde (Schreiber et al., 2005). Pflanzen, die das *ANAC058*-Ortholog *OsNAC034* überexprimieren, wurden durch Shunsaku Nishiuchi (Universität Nagoya, Japan) unter aeroben Bedingungen angezogen, geerntet, enzymatisch verdaut und freundlicherweise für die anschließenden Analysen zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Wurzelproben wurden gemäß ihrer Anatomie wie folgt klassifiziert: Zone I bezeichnet den Bereich 5 – 50 mm hinter der Wurzelspitze, Zone II den Bereich 60 mm bis zur Basis der Wurzel. Die Ergebnisse der Analyse sind nachfolgend in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie *OsNAC034-ÜEx* und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie *OsNAC034-ÜEx* und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus jeweils fünf *OsNAC034-ÜEx* und WT-Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. Coum c bzw. t: cis- bzw. trans-Coumarsäure, Feru c bzw. t: cis- bzw. trans-Ferulasäure,  $\omega$ -OH-Säuren:  $\omega$ -Hydroxysäuren, 2-OH-Säure: 2-Hydroxysäure; Zone I: 5 – 50 mm hinter der Wurzelspitze, Zone II: 60 mm – Basis.

In der gaschromatographischen Analyse der Wurzeln der *OsNAC34-ÜEx* Linie und des korrespondierenden Wildtyps konnten zehn verschiedene Suberinbestandteile in Zone I und zehn verschiedene in Zone II identifiziert werden, die den  $\omega$ -Hydroxysäuren (C<sub>16</sub>-C<sub>30</sub>), 2-Hydroxysäuren (C<sub>26</sub>), primären Alkoholen (C<sub>18</sub>, nur Zone I) und Aromaten (cis- und trans-Coumarsäure, cis- und trans-Ferulasäure) zugeordnet werden konnten. Zwischen Wildtyp und Überexpressionspflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

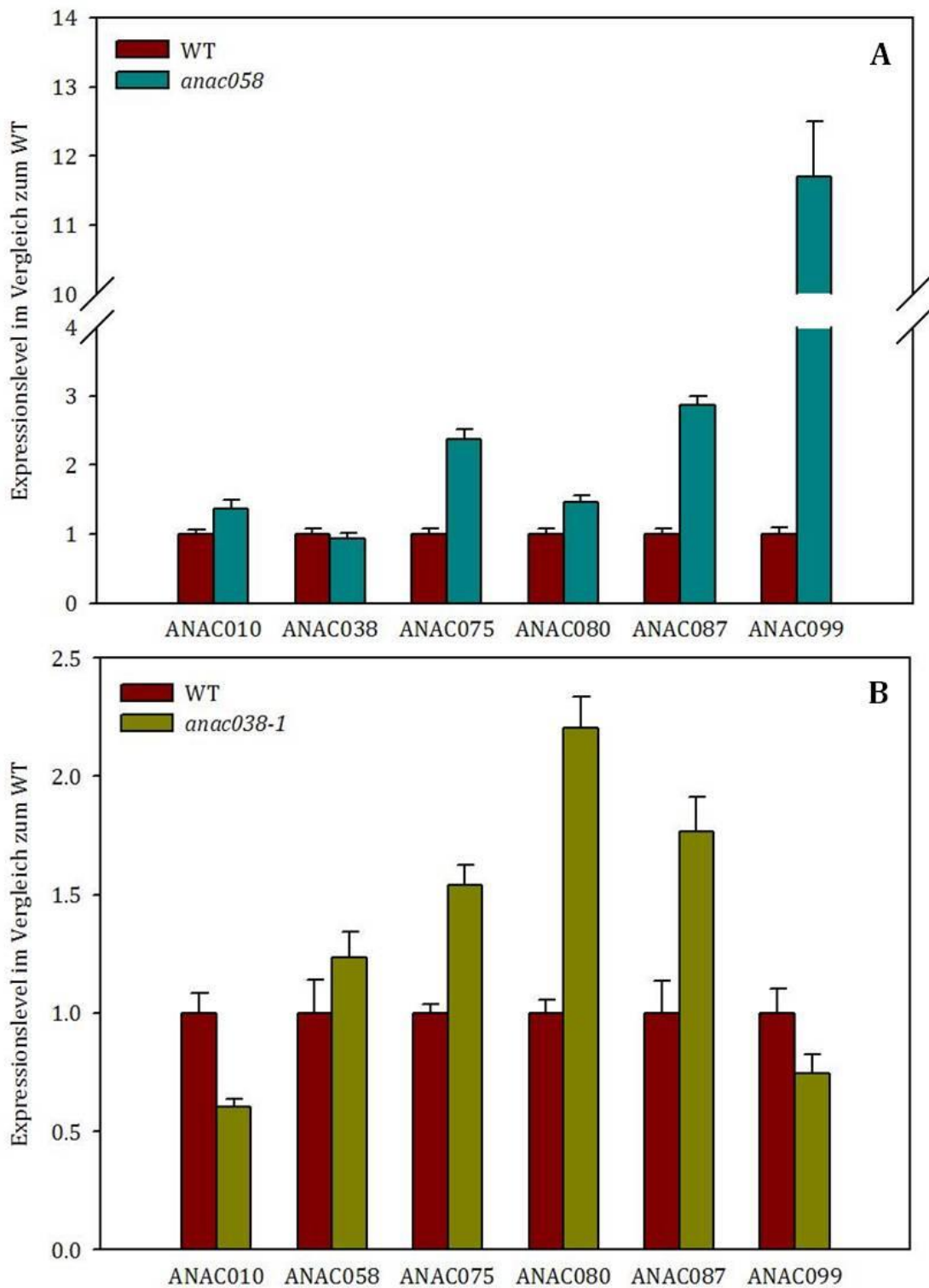
#### **3.7.4 Identifizierung möglicher redundanter Gene für *ANAC058* und *ANAC038***

Die Präsenz mehrerer redundanter Gene, die dieselbe Funktion übernehmen, ist ein möglicher Mechanismus, um einen durch Mutation oder andere Faktoren verursachten Funktionsausfall von Genen zu kompensieren. Um für *ANAC058* und *ANAC038* mögliche redundante Gene zu identifizieren, wurden mit Hilfe des „CoExSearch“-Tools der ATTED-II Datenbank (<http://atted.jp>, Obayashi et al., 2007) mit *ANAC058* und *ANAC038* coexprimierte Genloci identifiziert. Gene, die eine NAC-Domäne enthielten, wurden aus den ersten 300 Coexpressions-Genen dieser Liste ausgewählt. Durch dieses Verfahren ergaben sich sechs potentielle Kandidatengene, deren vorhergesagte Expression mit Hilfe des Microarray-basierten *Arabidopsis eFP*-Browsers untersucht wurde. Eine entsprechende Liste ist zur Übersicht nachfolgend in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Übersicht der mit ATTED-II identifizierten potentiellen Coexpressionsgene für ANAC058 und ANAC038.** Dargestellt ist die Position innerhalb der von ATTED-II extrahierten Top 300 Kandidatenliste möglicher für ANAC058 und ANAC038 redundanter Gene oder Dimerisierungspartner sowie der Genlocus, der vorgeschlagene Name und die durch den *Arabidopsis eFP*-Browser vorhergesagte Lokalisation der Genexpression in der Wurzel.

<b>Position</b>	<b>Genlocus</b>	<b>Name</b>	<b>Expression in der Wurzel</b>
35	At4g29230	<i>ANAC075</i>	Endodermis
60	At1g28470	<i>ANAC010</i>	Endodermis
86	At5g18270	<i>ANAC087</i>	Ubiquitär
113	At5g07680	<i>ANAC080</i>	Nicht dargestellt im <i>eFP</i> -Browser
138	At5g56620	<i>ANAC099</i>	Endodermis

Die Expression dieser Gene wurde mit Hilfe der RTQ-PCR in den Wurzeln der Linien *anac058* und *anac038-1* gemessen (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Messung der Genexpression von potentiell redundanten Kandidatengen für *ANAC058* und *ANAC038* in Wurzeln der Pflanzen *anac058* (A) und *anac038-1* (B)**

Expression der potentiell redundanten Kandidatengene *ANAC010*, *ANAC058*, *ANAC075*, *ANAC080*, *ANAC087* und *ANAC099* in den Wurzeln der Linien *anac058* (A) und *anac038-1* (B) sowie WT-Pflanzen, das Expressionslevel der WT-Pflanzen wurde auf den Wert 1 gesetzt, das Expressionslevel in den Mutanten ist in Relation zu diesem Wert angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen und die Standardabweichung.



Die Messung der Genexpression der potentiell redundanten Kandidatengene in den Wurzeln der *anac058* Linien zeigte im Vergleich zu WT-Pflanzen signifikante Veränderungen in der Expression der Gene *ANAC075* (2,4-fach  $\pm$  0,1), *ANAC087* (2,9-fach  $\pm$  0,1) und *ANAC099* (11,7  $\pm$  0,8). Die Expression der Gene *ANAC010*, *ANAC038* und *ANAC080* war nicht signifikant verändert.

In den Wurzeln der Linie *anac038-1* konnten signifikante Veränderungen der Genexpression für die Gene *ANAC075* (1,5-fach  $\pm$  0,1), *ANAC080* (2,2-fach  $\pm$  0,1), *ANAC087* (1,8-fach  $\pm$  0,1) beobachtet werden, die Expression der Gene *ANAC010*, *ANAC058* und *ANAC099* wiesen keine signifikante Veränderung auf.

## **4 Diskussion**

## 4.1 Kandidatengene der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

Durch Datenbank gestützte Expressionsstudien konnten sechs verschiedene potentielle Kandidatengene identifiziert werden (vgl. 3.1), für die eine Coexpression mit den beiden Cytochrom P450 Monooxygenasen *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH* vorhergesagt wurde. Die Rolle dieser beiden Enzyme in der Suberinbiosynthese wurde zuvor beschrieben (Compagnon et al., 2009; Höfer et al., 2008).

Durch diese Studien konnten die zwei putativen GDSL-Lipasen *SiLip-1* (At2g31550) und *SiLip-2* (At2g23540) als Kandidatengene für die Suberinbiosynthese identifiziert werden. Durch Auswertung veröffentlichter Transkriptomanalysen (Birnbaum et al., 2003; Brady et al., 2007) konnte die höchste Expression des Gens *SiLip-2* „spezifisch“ im Bereich der Endodermis lokalisiert werden. Diese Beobachtung macht die Gene zu guten Kandidaten da Suberinablagerungen spezifisch im endodermalen Gewebe beobachtet werden.

Für das Gen *SiLip-1* konnte die Expression in der Wurzel nicht auf ein Gewebe eingegrenzt werden, vielmehr scheint sie ubiquitär in allen Wurzelgeweben vertreten zu sein wobei die höchsten Werte im kortikalen Gewebe gemessen wurden. Auch die quantitative Expressionsmessung in verschiedenen Pflanzenorganen (vgl. 7.4 im Anhang) zeigte die höchste Expression in der Blüte. Dieses Gen scheint daher als Kandidatengene für die Suberinbiosynthese wenig geeignet. Da im Anschluss keine Knockout Linien identifiziert werden konnten (vgl. 3.2), wurde die Arbeit mit diesem Gen nicht weiter verfolgt. Der Ansatz, GDSL- Lipasen als mögliche Kandidaten der Suberinbiosynthese zu untersuchen ist aber durchaus berechtigt. Zwar konnte bisher für keine GDSL-Lipase eine Rolle in der Suberinbiosynthese belegt werden, doch konnte ihre Beteiligung an der Synthese des verwandten Biopolyesters Kutin sowohl in *Arabidopsis thaliana* (Takahashi et al., 2010) als auch in *Oryza sativa* (Park et al., 2010) und *Solanum lycopersicum* (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012) gezeigt werden.

Als weiteres Kandidatengene wurde die Peroxidase *PER55* ausgewählt. Sie war ebenfalls mit *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH* coexprimiert und in der Wurzel im endodermalen Gewebe exprimiert. Für Peroxidasen konnte mehrfach eine Funktion in der Suberinbiosynthese nachgewiesen werden (Arrieta-Baez & Stark, 2006; Bernards et al., 1999; Johnson-Flanagan & Owens, 1985; Quiroga et al., 2000).

Als weiterer Bestandteil der Untersuchungen konnten die Transkriptionsfaktoren *MYB93* (At1g34670), *ANAC058* (At3g18400) und *ANAC038* (At2g24430) ausgewählt

werden. Sie waren ebenfalls mit *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH* coexprimiert und zeigten übereinstimmend ihre höchste Expression in der Wurzel im endodermalen Gewebe. Es war bisher nicht möglich, in die Suberinbiosynthese involvierte Transkriptionsfaktoren zweifelsfrei zu identifizieren. Lediglich zwei Kandidatengene konnten bisher auf der Basis von Transkriptomanalysen identifiziert werden: *AtERF38* in *Arabidopsis thaliana* (Lasserre et al., 2008) und *MYB1* in *Quercus suber* (Almeida et al., 2013) werden in suberinisierten Geweben exprimiert. Weitergehende Untersuchungen wie Auswirkungen von Überexpression oder transkriptionellem Gen-Knockout dieser Gene auf den Suberingehalt fehlen jedoch.

Mitglieder der MYB-Transkriptionsfamilie wurden bereits auf Grund von Expressionsstudien mit einer möglichen Funktion in der Suberinbiosynthese in *Quercus suber* in Verbindung gebracht (Soler et al., 2007), für das Gen *MYB41* konnte eine Rolle in der negativen Regulation der Kutin-Biosynthese beobachtet werden (Cominelli et al., 2008). Diese Untersuchungen und die Beobachtung, dass ein bedeutender Anteil der charakterisierten MYB-Proteine Funktionen in der Kontrolle des Phenylpropanoidstoffwechsels übernimmt (Dubos et al., 2010) machen das Gen *MYB93* zu einem vielversprechenden Kandidaten.

Bisher ist kein NAC-Transkriptionsfaktor bekannt, der in die Synthese von Suberin oder Kutin involviert ist. Die quantitative Messung der Genexpression der vorgestellten NAC-Transkriptionsfaktoren in isolierten RNA-Proben von Wildtyp-Pflanzen zeigte im Gegensatz zu den anderen Genen eine ausschließlich Wurzel spezifische Expression (vgl. 7.4 im Anhang), zusätzlich wies die Auswertung der Transkriptomanalysen auf eine Endodermis spezifische Expression hin. Dies kann als möglicher Hinweis auf ausschließlich am Wurzel-Suberin beteiligte Transkriptionsfaktoren gewertet werden.

## 4.2 Die Bedeutung von SiLip-2 für die Suberinbiosynthese

Die Analyse der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *silip-2* Mutanten ergab eine fast 40 % Erhöhung der Gesamtsuberinmenge im Vergleich zum Wildtyp. Die Erhöhung der Gesamtmenge war dabei nicht auf einzelne Substanzklassen oder Monomere spezifischer Kettenlängen zurückzuführen sondern konnte in fast allen Suberinbestandteilen beobachtet werden (vgl. 3.3).

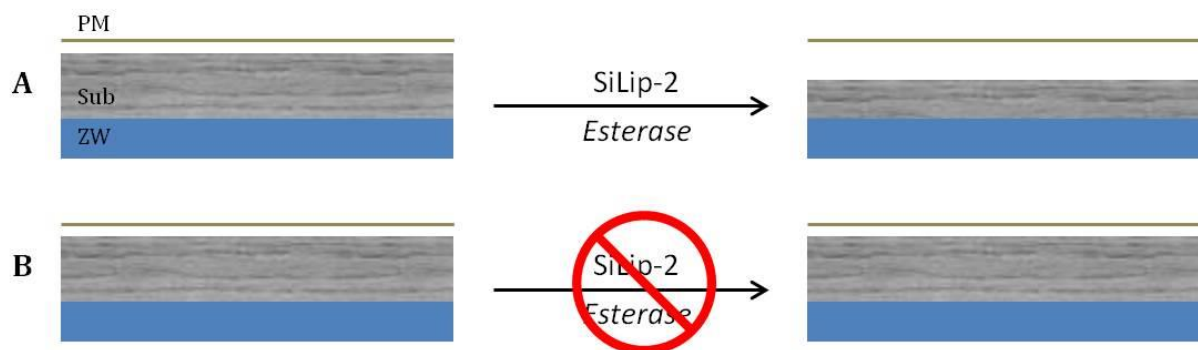
SiLip-2 ist eine GDSL-Lipase, die als Bestandteil der Enzymgruppe der Esterasen der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen zugeordnet wird (Akoh et al., 2004; Ling, 2008; Volokita et al., 2011). Für mehrere GDSL-Lipasen konnte eine Funktion im Zusammenhang mit der Kutinsynthese nachgewiesen werden: In *Solanum lycopersicum* wurde für die GDSL-Lipase CD1 eine Funktion als Acyl-Transferase gezeigt, die am Aufbau des Kutin-Polyesters beteiligt ist. Mutanten mit einem Gendefekt weisen nur 5-10 % des Fruchtkutins des Wildtyps auf (Girard et al., 2012; Yeats et al., 2012). In *Oryza sativa* konnte das Gen *WDL1* (*Wilted Dwarf and Lethal 1*) identifiziert werden, das ebenfalls für ein Mitglied der GDSL-Lipase Familie kodiert. Der Gen-Knockout führte zu Veränderungen in der Struktur der Kutikula und der Zellwände, weshalb eine Funktion während der Organisation des Kutins postuliert wird (Park et al., 2010).

Die Überexpression der natürlicherweise nur in Pollen vorkommenden GDSL-Lipase/Esterase CDEF1 in *A. thaliana* führte zu massiven Defekten der Kutikula, weshalb eine Funktion als Cutinase angenommen wird (Takahashi et al., 2010). In weiteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass *CDEF1* auch Suberin abbauen kann. So ließ sich in Wurzeln nach Expression von *CDEF1* unter der Kontrolle eines Endodermis-spezifischen Promoters durch Färbung keine Suberinisierung nachweisen (Naseer et al., 2012).

Auf Grund ihrer Sequenz können Eigenschaften von Proteinen mit Hilfe der öffentlichen bioinformatischen Datenbank *UniProt* (UniProt Consortium, 2013) vorhergesagt werden. Für SiLip-2 wurde eine Hydrolase-Aktivität für Ester-Bindungen bestimmt. Des Weiteren wurde die subzelluläre Lokalisation des Proteins außerhalb der Zelle angegeben. Auf Basis dieser Vorhersagen lässt sich über die Funktion von SiLip-2 in der Suberinbiosynthese spekulieren:

Die Beobachtung, dass die Suberinzusammensetzung in Wurzeln der *silip-2* Mutante verändert ist, unterstützt die postulierte Beteiligung von SiLip-2 an der Synthese und Auflagerung von Suberin. Auf Grund der zuvor genannten Vorhersagen ist eine Beteili-

gung als Esterase denkbar, deren mögliches Substrat auf der Zellwand aufgelagertes Suberin ist. Dafür sprechen die vorhergesagte extrazelluläre Lokalisation und die zuvor beschriebene Funktion der verwandten GDSL-Lipase/Esterase CDEF1, deren Lokalisation ebenfalls im extrazellulären Bereich identifiziert wurde. SiLip-2 könnte die Funktion übernehmen, einzelne Monomere oder Teile des Polyesters durch Hydrolyse der Esterbindung abzuspalten. Im Falle eines Gen-Knockouts würde diese Abspaltung von Monomeren nicht stattfinden, was in einer Erhöhung der Menge des gemessenen Gesamtsuberins resultieren würde, wie in dem vorgestellten Ergebnis gemessen. Diese hypothetische Funktion ist nachfolgend in Abbildung 62 veranschaulicht.



**Abbildung 62: Modell der Funktion von SiLip-2**

Die Esterase SiLip-2 spaltet Monomere oder Teile des Polyesters durch Hydrolyse der Esterbindung ab und reduziert damit die Gesamtsuberinmenge (A). Im Falle eines Gen-Knockouts wird diese Funktion nicht mehr erfüllt, weshalb im Vergleich das gemessene Gesamtsuberin erhöht ist (B). PM: Plasmamembran, Sub: Suberinauflagerung, ZW: Zellwand

Um die hier diskutierte Funktion überprüfen zu können, sind weitere Experimente notwendig. Die vorgeschlagene Esterase-Aktivität ließe sich mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren spektrophotometrischen Esterase-Assays mit *p*-Nitrophenyl-Butyrat (Quinn et al., 1982) oder *p*-Nitrophenyl-Palmitat (Gupta et al., 2002) als Substrat nachweisen. Die Lokalisation des Proteins ließe sich durch Fusion mit GFP und anschließende Beobachtung der Fluoreszenzsignale überprüfen, wie auch für CDEF1 durchgeführt. Die Hypothese, dass SiLip-2 eine potentielle Suberin abbauende Funktion besitzt, könnte durch Generierung transgener *SiLip-2* überexprimierender Pflanzen gezeigt werden. Mögliche Unterschiede in der Menge des Gesamtsuberins könnten durch histochemische und gaschromatographische Analyse nachgewiesen werden. Eine mögliche Auswirkung auf Kutin könnte ebenfalls untersucht werden, da für CDEF1 sowohl Suberin als auch Kutin als mögliche Substrate gezeigt wurden. Auf Grund der Expressionsdaten, die auf eine Wurzel spezifische Expression hindeuten, scheint dies aber eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren wäre eine Betrachtung der suberinisierten Gewebe von *silip-2* Mutanten und *SiLip-2* überexprimierenden Pflanzen im Transmissionselektronenmikroskop denkbar, um mögliche Auswirkungen auf die Struktur suberinisierter Gewebe oder die Zellwandintegrität beobachten zu können.

Es bleibt abschließend zu diskutieren, warum der Knockout des *SiLip-2* Gens zu verbesserter Trockentoleranz führt. Nach zehn Tagen Austrocknung wirken Pflanzen des Genotyps *silip-2* im direkten Vergleich zu WT-Pflanzen deutlich vitaler und weniger stressanfällig (vgl. 3.3.1). Diese Beobachtung wird zusätzlich dadurch gestützt, dass sie in ihrem Phänotyp Pflanzen des Genotyps *esb1-2* gleichen, die sich durch eine verbesserte Toleranz gegenüber Trockenstress auszeichnen (Baxter et al., 2009). Die Autoren führten diese verbesserte Toleranz auf die Erhöhung des Gesamtgehalts an Wurzelsuberin in der Mutante zurück. In Anbetracht der Tatsache, dass in *silip2*-Mutanten ebenfalls eine signifikant höhere Menge an Wurzelsuberin gemessen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete verbesserte Toleranz gegenüber Trockenstress auf die gemessene erhöhte Suberinmenge zurückzuführen ist. Gemäß der Modellvorstellung sollte Suberin als Barriere den Wasserfluss durch den Wurzelappoplasten einschränken. Durch die erhöhte Suberinmenge wird sowohl der Wasserfluss zur Sprossachse als auch zurück in den Boden eingeschränkt.

Kritisch kann allerdings bemerkt werden, dass die verbesserte Trockentoleranz möglicherweise durchaus auch mit einer Verminderung der stomatalen Transpirationsraten in Verbindung stehen könnte. Um diesen Effekt ausschließen zu können, sollten entsprechende Messungen durchgeführt werden, wie sie zum Beispiel von Baxter et al (2009) beschrieben wurden.

Da Veränderungen der *silip-2* Suberinmonomere nicht in allen Substanzklassen beobachtet wurden, wie es in der *esb1* Mutante der Fall ist, lassen sich des Weiteren aber auch mögliche strukturelle Veränderungen des Suberins und daraus resultierende Auswirkungen auf die Barriereigenschaften spekulieren. Besonders betroffen von den Veränderungen des *silip2* Suberins sind  $\omega$ -Hydroxysäuren und Dicarbonsäuren, denen eine besondere Bedeutung bei der Quervernetzung des Suberinpolymers zukommt. Es wäre daher möglich zu spekulieren, dass es zu einer dichteren Verknüpfung des Suberinpolymers kommen könnte, die zu einer Einschränkung der Wasserdurchlässigkeit führt.

Zusammenfassend ist es verlockend zu formulieren, dass die vorgestellte These, dass es durch den Knockout der putativen Esterase SiLip2 zu einer Erhöhung der messbaren Suberinmenge kommt, die zu einer verbesserten Trockentoleranz führt, durchaus in das

beschriebene Suberinmodell passt, weitere Untersuchungen jedoch notwendig sind. So bleibt die Identifizierung eines weiteren Mutantenallels oder die Komplementierung der *silip2* Mutante und die chemische Analyse des Wurzelsuberins für eine tiefergehende Betrachtung neben den bereits zuvor beschriebenen Experimenten unerlässlich, um die Funktionsweise des Gens *SiLip2* aufzuklären.

### 4.3 Die Bedeutung von MYB93 für die Suberinbiosynthese

Durch die gaschromatographische Analyse des Wurzelsuberins von *myb93* Pflanzen konnten in Bezug auf die Gesamtmenge sowie auf die Menge der unterschiedlichen Substanzklassen keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden (vgl. 3.4). Lediglich für die C<sub>18</sub> ω-Hydroxysäure und die C<sub>18</sub> α,ω-Dicarbonsäure wurde eine geringfügige Reduzierung beobachtet, für die C<sub>22</sub>- und C<sub>24</sub> ω-Hydroxysäuren sowie die C<sub>22</sub> α,ω-Dicarbonsäuren wurde eine geringfügige Erhöhung beobachtet, die mit Hilfe des t-Tests als signifikant bestimmt werden konnten. Diese Beobachtung könnte auf eine mögliche Funktion des Transkriptionsfaktors MYB93 in der ω-Hydroxylierung oder in der Kettenverlängerung hindeuten. Auf Basis der vorliegenden Datenlage bleiben solche Aussagen aber rein spekulativ, da unklar ist, ob es sich um einen Effekt des Gen-Knockouts auf die Suberinzusammensetzung oder um eine zufällige Abweichung handelt. Um Thesen nachhaltig überprüfen zu können, wird die Untersuchung eines weiteren Mutanten-Allels notwendig.

Für MYB Transkriptionsfaktoren wurde in *A. thaliana* mehrfach eine Rolle in der Kontrolle von Prozessen des Phenylpropanoidstoffwechsels beschrieben (Dubos et al., 2010; Zhong & Ye, 2009). Da sich die aromatischen Monomere des Suberins ebenfalls aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel ableiten, wäre auch die gezielte Untersuchung der aromatischen Suberinbestandteile möglicherweise von Interesse. Diese Überlegung wird durch Coexpressionsanalysen von *MYB93* mit Hilfe der Datenbank ATTED-II unterstützt: Gemäß Vorhersage der Datenbank ist *MYB93* mit mehreren Peroxidasen coexprimiert. Peroxidasen werden mit einer Rolle in der Vernetzung der aromatischen Suberinbestandteile in Verbindung gebracht werden (Razem & Bernards, 2002; Razem & Bernards, 2003). Eine weiterer möglicher Untersuchungsansatz auf Grundlage dieser Überlegungen wäre eine Beteiligung von MYB93 in der Biosynthese des ebenfalls aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel abgeleiteten aromatischen Polymers Lignin, in des-



sen Synthese ebenfalls die Beteiligung mehrerer MYB-Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (Zhao & Dixon, 2011).

Auf Grund der vorliegenden Datenlage ist abschließend eine über diese Hypothese hinausgehende Beurteilung einer möglichen Bedeutung von MYB93 für die Suberinbiosynthese nicht möglich.

## 4.4 Die Bedeutung von ANAC058 für die Suberinbiosynthese

### 4.4.1 *anac058* Mutanten weisen gewebeabhängig Unterschiede in der Suberinzusammensetzung auf

Die Suberinanalyse verschiedener Gewebe in *anac058* Pflanzen führte zu keinem einheitlichen Ergebnis. So ergab die Analyse des peridermalen Wurzelsuberins keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante mit Ausnahme der C<sub>24</sub>-Fettsäure und der C<sub>22</sub>-Dicarbonsäure, die jeweils geringe aber signifikante Unterschiede aufwiesen (vgl. 3.5.1.2). In Anbetracht der sehr geringen gemessenen Konzentration wird dieser Unterschied aber nicht als Folge des Gen-Knockouts bewertet.

Die Untersuchung der Samenschalenpolyester ergab bezogen auf die Gesamtsuberinmenge ebenfalls keine Unterschiede (vgl. 3.5.1.3). Lediglich die Substanzklasse der 2-Hydroxysäuren lag in der Mutante um 19 % reduziert vor, in Anbetracht der geringen Gesamtmenge an 2-Hydroxysäuren ist jedoch ebenfalls fraglich, ob dieser Unterschied als Suberineffekt gewertet werden kann oder ob es sich um natürliche Variabilität handelt. Um diese Frage zufriedenstellend beantworten zu können, bietet sich eine erneute Untersuchung der Samenschalenpolyester oder die Analyse eines weiteren Mutantenallels an.

Im Gegensatz zu diesen beiden Geweben ergab die Suberinanalyse der Gesamtwurzeln signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante, die in einer Reduktion des gemessenen Gesamtsuberins in den Wurzeln der *anac058* Pflanzen um 41 % resultierten (vgl. 3.5.1.1). Eine genauere Betrachtung der betroffenen Suberinmonomere zeigte Auswirkungen auf Vertreter aller Substanzklassen, wobei der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante mit Hilfe des t-Tests nur für die Substanzklasse der  $\omega$ -Hydroxysäuren als statistisch signifikant bestimmt werden konnte. Bezogen auf die Kettenlänge konnten signifikante Veränderungen in allen Vertretern mit Ausnahme der Kettenlängen C<sub>22</sub> und C<sub>24</sub> beobachtet werden.

Zusammengefasst können diese Messungen als Hinweis darauf gedeutet werden, dass ANAC058 möglicherweise eine spezifische Rolle in der Suberinbiosynthese im endodermalen Gewebe der Wurzel zukommt, seine Bedeutung für die Suberinbiosynthese in Samenschalen und im peridermalen Wurzelgewebe jedoch von nachrangiger Bedeutung ist, weshalb in diesen Geweben keine bzw. nur geringfügige Veränderungen des Suberingehalts beobachtet werden konnten. Diese mögliche Gewebespezifität wird durch die in 3.2 dargestellte Vorhersage der Lokalisation der Expression innerhalb der Pflanze dahingehend gestützt, dass die Genexpression spezifisch im endodermalen Wurzelgewebe jedoch nicht in Samenschalen oder peridermalem Gewebe gemessen wurde. Die Untersuchung der organ-spezifischen Expression mit Hilfe eines Reporter-Konstrukts oder Detektion des Proteins mit spezifischen Antikörpern könnten Aufschluss geben.

Eine kritische Überprüfung der Messergebnisse ergab, dass die Trockengewichte der *anac058* Wurzeln höher waren als die der WT Wurzeln. Da die Suberinmenge [ $\mu\text{g}$ ] einer Pflanze im Anschluss an die Auswertung relativ auf das Trockengewicht [ $\text{mg}$ ] einer Pflanze bezogen wird, lässt dies die kritische Anmerkung zu, Unterschiede in der Suberinmenge der *anac058* Pflanzen [ $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht] stellen einen rein rechnerischen Effekt dar. Es ließe sich spekulieren, die Gewichtszunahme sei auf eine gesteigerte Zellwandsynthese zurückzuführen und ANAC058 interagiert mit Enzymen der Zellwandsynthese. Dem lässt sich entgegenhalten, dass das gemessene höhere Trockengewicht auch mit einer höheren Suberinmenge korreliert und das vorliegende Ergebnis in einer unabhängigen Messung anderer Pflanzen zu einem anderen Zeitpunkt bestätigt werden konnte. Dies spricht dafür, dass der ANAC058 Knockout tatsächlich zu einer verringerten Suberinmenge führt. Eine alternative Methode könnte im Bezug der Suberinmenge auf die Wurzelfläche bestehen.

Unterschiede im Trockengewicht können grundsätzlich verschiedenen Wachstums- und Anzuchsfaktoren geschuldet sein. Weitere Aussagekraft könnte die histochemische Untersuchung haben. In *anac038* Pflanzen führte die erhöhte Suberin-Menge zu einer intensiveren Färbung, so wäre hier von einer Abschwächung der Intensität der Färbung auszugehen. Auch die Betrachtung der Wurzelstruktur in Querschnitten könnte diese These bekräftigen. Mögliche Veränderungen der Zellwand wären hier sichtbar.

#### 4.4.2 Veränderungen in der Expression von *ANAC058* haben Auswirkungen auf die Expression charakterisierter Suberingene

Dass Veränderungen der Suberinzusammensetzung in *anac058* Pflanzen unabhängig von der Kettenlänge und Substanzklassen beobachtet werden konnten, kann als Hinweis auf eine universelle Rolle von ANAC058 in der Kontrolle der Suberinbiosynthese aufgefasst werden. Um die Funktion von ANAC058 und den zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismus untersuchen zu können, wurde die Genexpression bekannter Suberingene in Mutanten mit veränderter *ANAC058* Expression untersucht.

Da *ANAC058* als potentielles Kandidatengen der Suberinbiosynthese in dieser Arbeit ausgehend von seiner Coexpression mit den Suberingenen *HORST* und *RALPH* ausgewählt wurde, wurde die Expression dieser beiden und des Suberingens *GPAT5* in Wurzeln von *anac058* Pflanzen untersucht. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass die Expression von *RALPH* und *GPAT5* in *anac058* Pflanzen nicht verändert war, die Expression von *HORST* jedoch auf das fast 10-fache gesteigert war (vgl. 3.5.2). Dies könnte bedeuten, dass ANAC058 ein negativer Regulator von HORST ist.

Um die mögliche Interaktion von *ANAC058* mit anderen beschriebenen Suberingenen untersuchen zu können, wurden Überexpressionspflanzen generiert, in denen die Expression von *ANAC058* unter der Kontrolle des 35S-Promoters stand (vgl. 3.7.2.1). Die extrem hohe Standardabweichung für die Messung der Linie *35S::ANAC058-19* ist auffällig und liegt zum einen in den Anfangsschwierigkeiten begründet, die RTQ-PCR als Methode mit einem neuen Gerät zu etablieren und ist zum anderen möglicherweise auf eine nicht einwandfreie Charge des verwendeten SYBR-Green Farbstoffs zurückzuführen. Es geht aber deutlich aus den Daten hervor, dass das Expressionslevel von *ANAC058* in der Überexpressionslinie *35S::ANAC058-1* um das mindestens 150.000-fache erhöht ist, des Weiteren zeigte auch das Ergebnis der vorherigen RT-PCR klare Unterschiede in der Intensität zwischen den Linien Nr. 1 und Nr. 19, daher wurden diese Linien für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

In Blättern dieser zwei repräsentativ ausgewählten Linien wurde die Expression der charakterisierten Suberingene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* gemessen. Das Ergebnis der Expressionsmessung zeigte, dass die Gene *RALPH*, *HORST* und *GPAT5* in Abhängigkeit vom Grad der *ANAC058* Überexpression ebenfalls unterschiedlich stark überexprimiert wurden, für die Gene *KCS17* und *ASFT* war dieser Effekt deutlich geringer (vgl. 3.7.2.2). Dies kann mit einer möglichen Induktion der Expression der Gene

*RALPH*, *HORST* und *GPAT5* durch *ANAC058* in Zusammenhang gebracht werden. Dass NAC Transkriptionsfaktoren Funktionen in der prä- und posttranskriptionellen sowie posttranslationalen Regulation als Bestandteile komplexer Netzwerke einnehmen können, wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Puranik et al. , 2012). Daher darf mit einer gewissen Berechtigung spekuliert werden, dass *ANAC058* die Genexpression der untersuchten Suberingene direkt oder indirekt regulieren könnte.

Dieses Ergebnis scheint allerdings im Widerspruch zu der vorher beschriebenen Messung in Wurzeln von *anac058* Pflanzen zu stehen, in denen die Genexpression der untersuchten Suberingene mit Ausnahme von *HORST* nicht verändert war. Es sollte allerdings beachtet werden, dass *ANAC058* in Blättern im Vergleich zur Wurzel gemäß Vorhersagen nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Weitere in der Wurzel exprimierte Gene, die Bestandteil eines regulatorischen Netzwerkes sein können, werden möglicherweise nicht exprimiert, so dass Messungen aus diesen zwei verschiedenen Organen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Zum Beispiel wäre es denkbar, dass Enzyme eines Wurzel spezifischen Regulationsnetzwerks in Blättern nicht exprimiert werden. Aufschluss würde die Expressionsmessung der vorgestellten Suberingene und von *ANAC058* in den Wurzeln der *35S::ANAC058* geben.

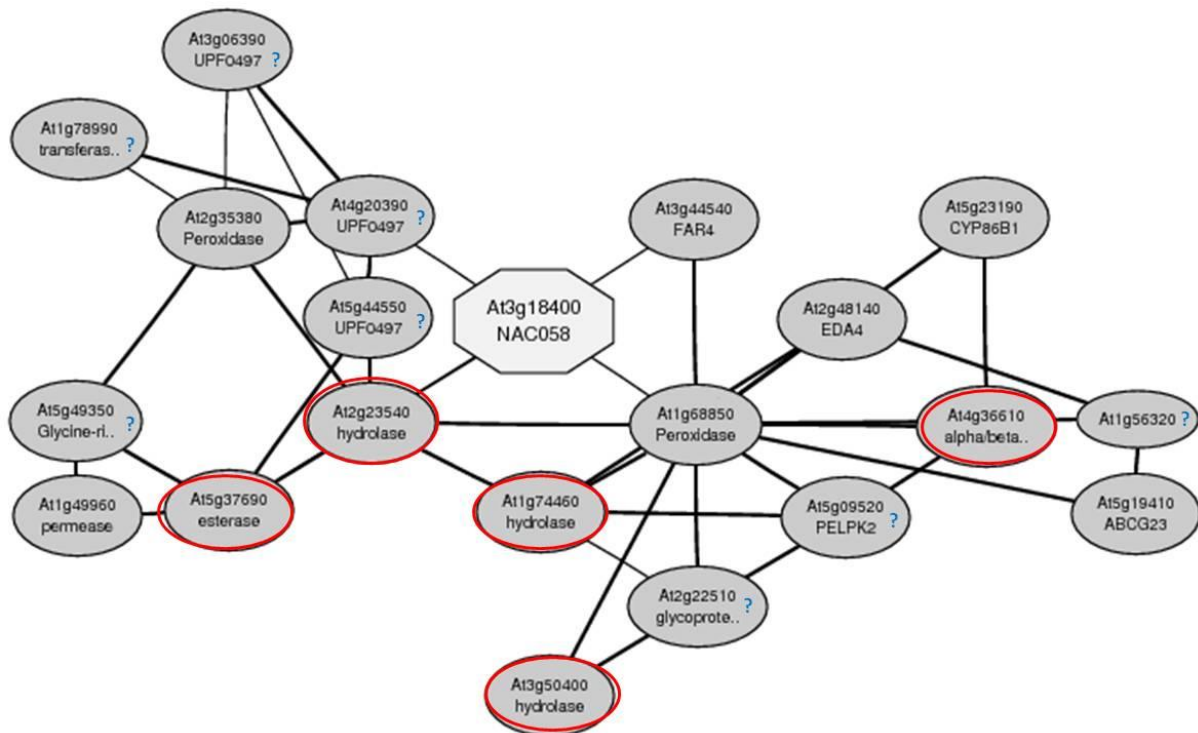
Des Weiteren lässt die Beobachtung, dass als Folge der Überexpression von *ANAC058* die Expression der untersuchten Suberingene ebenfalls gesteigert ist, keine Rückschlüsse auf den zu Grunde liegenden Mechanismus der Interaktion zu. Ob eine mögliche Induktion direkt oder als Teil eines regulatorischen Netzwerkes stattfindet bleibt offen.

Damit können die Ergebnisse der Überexpressionsmessungen zwar auf einen möglichen Zusammenhang zwischen *ANAC058* und den Suberingenen *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* als möglichem „Ziel“ hindeuten, eindeutig belegen lässt sich diese Theorie auf Basis dieser Daten aber nicht. Experimentelle Ansätze zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen wie der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) könnten zur Klärung dieser Überlegungen beitragen. Auch lässt sich das Ergebnis der Suberinanalyse mit Hilfe der Expressionsmessungen in Wurzeln der *anac058* Pflanzen nur unzureichend erklären. Die erhöhte Expression von *HORST* spiegelt sich nicht in der Suberinanalyse wieder. Mögliche Erklärungen sind weitere bislang nicht bekannte posttranskriptionelle oder posttranslationelle Regulierungsmechanismen in einem komplexen Netzwerk oder die Hochregulation von *HORST* stellt eine Reaktion auf die reduzierte Suberinmenge dar.

Bezogen auf die Expression der anderen untersuchten Suberingene lässt sich die Reduktion der Suberinbausteine und der Suberingesamtmenge mit diesen Messungen nicht erklären. Möglicherweise sind weitere bislang unbekannte Interaktionspartner von ANAC058 von Bedeutung, die bisher noch nicht mit der Suberinbiosynthese in Zusammenhang gebracht worden sind.

#### **4.4.3 Identifizierung möglicher weiterer Zielgene und Hypothese der möglichen Funktion von ANAC058**

Weiterführend wurde mit Hilfe der ATTED-II Datenbank eine Coexpressionsanalyse durchgeführt, um weitere potentielle Zielgene zu identifizieren. Von den Top 20 coexprimierten Genen von ANAC058 wurde mit Hilfe der UniProt Datenbank (UniProt Consortium, 2013) für vier Gene eine Hydrolase-Aktivität für Ester-Bindungen bestimmt (At2g23540 (*SiLip-2*), At5g37690, At1g74460 und At3g50400), für ein weiteres Gen (At4g36610) wurde allgemein eine Hydrolase-Aktivität vorausgesagt und für acht Gene konnte keine Funktion bestimmt werden. Bemerkenswerterweise wurden auch zwei Gene der Suberinbiosynthese identifiziert: Neben *RALPH* (CYP86B1; Compagnon et al., 2009) wurde mit *FAR4* (At3g44540; Domergue et al., 2010) ein Gen identifiziert, das für eine Fettsäurereduktase kodiert. Das von der Datenbank erstellte Netzwerk der Top 20 coexprimierten Gene ist nachfolgend in Abbildung 63 dargestellt.



**Abbildung 63: Coexpressionsnetzwerk von ANAC058**

Coexpressionsnetzwerk von ANAC058, wie es von der Coexpressionsdatenbank ATTED-II (<http://atted.jp>) ausgegeben wird. ?: Funktion nicht charakterisiert, roter Kreis: Gene mit Hydrolase-Aktivität, für die Gene At2g23540 (*SiLip-2*), At5g37690, At1g74460 und At3g50400 wurde mit Hilfe der UniProt Datenbank eine Esterase-Aktivität spezifiziert.

Die Identifizierung von mindestens vier mit ANAC058 coexprimierten Genen, die für Enzyme mit Esterase-Aktivität codieren, könnte als Hinweis auf Esterasen als mögliches Ziel von ANAC058 interpretiert werden. Vor dem Hintergrund der vorgestellten Ergebnisse der Suberinanalyse lässt sich zusammen mit diesen Beobachtungen folgende Hypothese bezüglich der Funktion von ANAC058 entwickeln:

Die Funktion von ANAC058 könnte in der negativen Regulation von Esterasen bestehen. Der Knockout von ANAC058 würde zum Ausfall der negativen Regulation und damit in Folge zu einer Akkumulation an Esterasen führen, was in einer Reduktion der Suberinmenge resultieren würde.

Als Beispiel für eine bereits charakterisierte Suberin abbauende Esterase kann das Enzym CDEF1 (Naseer et al., 2012) herangezogen werden, das in 4.2 bereits diskutiert wurde.

Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu überprüfen, besteht in der Expressionsmessung der in der ATTEDII-Analyse identifizierten Esterase Gene mit Hilfe der RTQ-PCR. Sollte die Hypothese zutreffen, wäre ein Anstieg der Expression in Wurzeln der *anac058* Pflanz-

zen zu erwarten. In Wurzeln der Überexpressionspflanzen wäre entsprechend mit einer Reduktion der Expression zu rechnen.

Die Identifizierung der in die Suberinbiosynthese involvierten Fettsäurereduktase *FAR4* als coexprimiertem Gen lässt eine weitere These bezüglich der Funktion von *ANAC058* zu: *FAR4* wird durch *ANAC058* inhibiert, durch den Gen-Knockout von *ANAC058* kommt es zu einem Ausfall der negativen Regulation und einem Anstieg der durch *FAR4* vermittelten Reduktion von Fettsäuren zu Alkoholen. In der Suberinzusammensetzung der *far4* Knockout Mutanten wurde eine Reduktion der C20-Alkohole beobachtet (Domergue et al., 2010). In *anac058* Mutanten könnte der Ausfall der Inhibierung zu einem Anstieg von C20-Alkohol führen. Da einfache Alkohole mangels weiterer funktioneller Gruppen nicht zur Quervernetzung des Suberinpolyesters beitragen, könnte ihnen eine Funktion als „Begrenzer“ des Polymers zukommen. Eine entsprechende Veränderung des Gehalts an C20-Alkohol konnte jedoch in Analysen des Gesamtwurzelsuberins in *anac058* Mutanten nicht beobachtet werden (vgl. 3.5.1.1). Die signifikante Reduktion der C20-Säuren kann allerdings als möglicher Hinweis auf diese Theorie gewertet werden.

Neben diesen Überlegungen, die sich primär auf enzymatische Prozesse der Biosynthese beziehen, könnten auch andere Effekte für das vorliegende Ergebnis verantwortlich sein. Die beobachtete Reduktion von Suberin könnte auch mit der Hemmung oder nicht erfolgten Aktivierung von Transportern im Zusammenhang stehen. Wie in der Einleitung beschrieben, konnten mehrere in die Suberinbiosynthese involvierte ABC-Transporter identifiziert werden (Landgraf et al., 2014; Yadav et al., 2014). Es wäre denkbar, dass synthetisierte Suberinbausteine innerhalb der Zelle akkumulieren und nicht heraustransportiert werden. Die Akkumulation von Monomeren innerhalb der Zelle wurde in *Arabidopsis* für Wachsmomere beobachtet (Pighin et al., 2004). Diese Hypothese ließe sich zum einen durch mikroskopische Betrachtung von Querschnitten belegen, die mit dem Farbstoff Nile Red gefärbt wurden, der beim Anfärben intrazellulärer Lipidakkumulationen Verwendung findet (Greenspan et al., 1985). Zum anderen wäre eine Totalextraktion der Wurzel mit Methanol/Chloroform und anschließende gaschromatographische Analyse denkbar, die Aufschluss über möglicherweise akkumulierte Suberinmonomere geben kann. Diese Überlegung könnte erklären, warum die gemessene Erhöhung der Expression von *HORST* (vgl. 3.5.2) zu keinem messbaren Anstieg der  $\omega$ -Hydroxysäuren der Kettenlänge C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> bzw. deren  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren

führt: Möglicherweise werden diese tatsächlich vermehrt synthetisiert, akkumulieren jedoch in der Zelle, da sie nicht in den Apoplasten transportiert werden.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von ANAC058 bleibt die Identifizierung weiterer möglicher Zielgene unerlässlich. Hierfür empfiehlt sich die Analyse der differentiellen Genexpression in Wurzeln von *anac058* und *35S::ANAC058-1* mit Hilfe eines Microarrays. Die Auswertung dieser Daten kann einen Überblick über das gesamte Expressionsspektrum der Zelle geben und helfen, putative Interaktionspartner durch Veränderungen ihrer Genexpression zu identifizieren.

#### **4.4.4 Die Überexpression von ANAC058 führt zu keiner messbaren Veränderung des Wurzeluberins**

Die Tatsache, dass der ANAC058 Knockout zu weniger messbarem Suberin führt (vgl. 3.5.1.1), die Überexpression von ANAC058 aber nicht (vgl. 3.7.2.3) lässt sich mit der vorherigen Hypothese nicht in Einklang bringen.

Wie bereits zuvor diskutiert, stützt sich die Charakterisierung der „Überexpressionsmutante“ ausschließlich auf Expressionsmessungen der Blätter, ob *ANAC058* in der Wurzel ebenfalls überexprimiert wird, ist bislang nicht bekannt. Die Bewertung des Ergebnisses bleibt somit schwierig und macht die Messung der *ANAC058* Expression in der Wurzel erforderlich. Einen Hinweis können Untersuchungen des eng verwandten Gens *ANAC038* liefern: Die Analyse der Wurzeln von *ANAC038* überexprimierenden Pflanzen ergab, dass *ANAC038* scheinbar nur in der stärker überexprimierenden Mutante *35S::ANAC038-2* hochreguliert wurde, in der anderen jedoch nicht (vgl. 3.7.2.4). Dem entsprechend wäre auch ein Effekt auf mögliche Zielgene nicht zu erwarten.

Speziesübergreifend wurden die Wurzeln von Reispflanzen analysiert, in denen das *ANAC058* Ortholog *OsNAC34* überexprimiert wurde. In diesen konnte ebenfalls keine Veränderung der Suberinzusammensetzung im Vergleich zu WT-Pflanzen festgestellt werden (vgl. 3.7.3). Dieses Ergebnis festigt die Beobachtung aus *A. thaliana*, dass die Überexpression von *ANAC058* unter der Kontrolle des 35S-Promoters zu keiner Veränderung der Suberinzusammensetzung in Wurzeln führt.

Ein Erklärungsansatz wären mögliche posttranslationale Regulationsmechanismen als Reaktion auf die Überexpression von *ANAC058*, die bislang nicht bekannt sind. Die Überexpression könnte aber auch zu einer Cosuppression führen (Jorgensen et al., 1998). Des



Weiteren wäre denkbar, dass die Gesamtsuberinmenge möglicherweise enzymatisch über bislang unbekannt Mechanismen reguliert wird.

Unter der Voraussetzung, dass es auch in der Wurzel zu einer Überexpression Suberin spezifischer Gene kommt, wäre aber auch denkbar, dass die Transporter der limitierende Faktor sind: Die Überexpression Suberin spezifischer Gene führt zu einer Erhöhung der Syntheserate von Suberinbausteinen. Die in der Zellmembran befindlichen benötigten Transporter haben allerdings ihr Kapazitätsmaximum erreicht, die synthetisierten Bausteine verbleiben daher in der Zelle und als Effekt wird keine Veränderung der messbaren Suberinmenge beobachtet, wie in 3.7.2.3 beschrieben. In diesem Falle sollten sich in der Zelle akkumulierende Suberinbausteine wie zuvor angemerkt in Querschnitten anfärben und unter dem Mikroskop nachweisen lassen.

Eine abschließende Theorie bezieht sich auf die Verknüpfung von Suberin mit der Zellwand. Wie in der Einleitung erläutert (vgl. 1.3.1) ist die Frage der Verknüpfung bislang nicht eindeutig geklärt. Es wäre daher verlockend zu spekulieren, dass der Knockout von ANAC058 zu einer veränderten Verknüpfung von Suberin mit der Zellwand führt, die nicht durch Umesterung aufgetrennt werden kann. Möglicherweise ließe sich das vorliegende Ergebnis in Hinblick auf diese Theorie dahingehend interpretieren, dass die Gesamtsuberinmenge der Mutante nicht reduziert sondern unverändert ist. Allerdings können durch veränderte Bedingungen der Verankerung des Suberinpolymers an der Zellwand weniger Suberinbestandteile aus dem Polymer herausgelöst und gaschromatographisch analysiert werden.

#### **4.4.5 Identifizierung möglicher redundanter Gene und Dimerisierungspartner**

Durch Coexpressionsanalysen konnten mit Hilfe der Datenbank ATTED-II sechs NAC-Gene identifiziert werden, die mit ANAC058 coexprimiert sind (vgl. 3.7.4). Expressionsmessungen in Wurzeln von *anac058* Pflanzen zeigten für die Gene ANAC075, ANAC087 und ANAC099 Veränderungen des Expressionslevels, wobei die Expression von ANAC075 und ANAC087 auf das zwei- bzw. 3-fache erhöht war, die Expression von ANAC099 etwa auf das 12-fache.

Dieses Ergebnis kann als Indiz für eine mögliche redundante Funktion dieser Gene gewertet werden. Weiterhin ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass Transkriptionsfaktoren der NAC-Familie oftmals miteinander Homo- oder Heterodimere ausbilden

(Welner et al., 2012; vgl. 1.6). Daher liegt es nahe, für die identifizierten coexprimierten NAC-Transkriptionsfaktoren eine Funktion als mögliche Dimerisierungspartner zu spekulieren. Da *ANAC087* im Gegensatz zu *ANAC075* und *ANAC099* nicht Endodermis-spezifisch sondern ubiquitär exprimiert wird, scheint eine mögliche Rolle in der Suberinbiosynthese eher unwahrscheinlich. *ANAC075* wird zwar Endodermis spezifisch exprimiert, doch scheint das Ausmaß des Expressionsanstiegs im Vergleich zu *ANAC099* eher gering. Der Anstieg des Expressionslevels auf das fast 13-fache lässt *ANAC099* als viel versprechenden Kandidaten für eine mögliche Funktion im Zusammenhang mit *ANAC058* und der Suberinbiosynthese erscheinen. Die Bewertung, ob *ANAC099* eine mögliche redundante Funktion zukommt, bleibt auf Basis der vorliegenden Daten spekulativ. Auch hier könnten Expressionsmessungen in Wurzeln der *35S::ANAC058* Pflanzen nützlich sein, um weitere Indizien für eine mögliche Interaktion zu sammeln. Ein weiterer Ansatz könnte in der Generierung einer *anac058 / anac099* Doppel-Knockout Mutante bestehen.

Das veränderte Expressionsmuster der drei hier vorgestellten NAC-Transkriptionsfaktoren kann auch als möglicher Hinweis auf eine Funktion in der Bildung eines Heterodimers mit *ANAC058* gedeutet werden. Zur abschließenden Identifizierung möglicher Dimer bildender Bindungspartner sind aber Verfahren wie Immunpräzipitation und Techniken zur Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen notwendig.

#### **4.4.6 Die Rolle von ANAC058 unter Stressbedingungen**

Die Synthese von Suberin ist ein Bestandteil der Antwort auf verschiedene abiotische und biotische Stressoren (vgl. 1.3). So konnte die vermehrte Suberinablagerung durch Salzstress in endodermalen und hypodermalen Wurzelzellwänden der Castorbohne (*Ricinus communis* L.) (Schreiber et al., 2005) und in Wurzeln von *Arabidopsis* beschrieben werden (Franke et al., 2008). Suberinisierung als Antwort auf Pathogen- oder mechanisch induzierte Verwundung konnte zum Beispiel in Kartoffelknollen beobachtet werden (Bernards & Lewis, 1998). Auch nach Verwundung von *Arabidopsis* Blättern ließ sich Suberinisierung der Wundränder mit Hilfe von Sudan 7b Färbung nachweisen (Franke et al., 2008).

Für NAC Transkriptionsfaktoren wurde vielfach eine Beteiligung in der Stressantwort von Pflanzen beschrieben, von denen nachfolgend repräsentativ einige Beispiele ge-

nannt werden sollen: Der Transkriptionsfaktor *ANAC092* in *A. thaliana* wird als Antwort auf Salzstress hochreguliert und beeinflusst die Entwicklung lateraler Wurzeln (Balazadeh et al., 2010; He et al., 2005). *NAC011* und *NAC020* aus Sojabohnen (*Glycine max*) sind ebenfalls in die Antwort auf Salzstress involviert und führen bei Überexpression in *A. thaliana* zu erhöhter Resistenz (Hao et al., 2011). Der in Reis identifizierte Transkriptionsfaktor *NAC06* wurde durch Stressarten wie Salz- und Verwundungsstress induziert und vermittelte nach Überexpression ebenfalls erhöhte Resistenz (Nakashima et al., 2007).

Die Untersuchung des ansteigenden Expressionslevels von *RD29A* im Anschluss an die Salzapplikation identifizierte Stress (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993) und ermöglicht damit, einen Zusammenhang zwischen der gemessenen veränderten *ANAC058* Expression und Stress als auslösendem Faktor zu schlussfolgern (3.5.3.1). Dabei bleibt jedoch offen, ob die Expression auf den durch NaCl ausgelösten ionentoxischen Stress oder osmotischen Stress zurückzuführen ist. Das Expressionslevel von *ANAC058* war nach einer Stunde auf das Doppelte gesteigert, veränderte sich nach drei Stunden nicht und war nach sechs Stunden auf das fast 6-fache gesteigert. Globale Untersuchungen der Genexpression von NAC Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* konnten zeigen, dass die meisten NAC Gene eine Antwort auf Salzstress zeigen (Jensen et al., 2010; Zeller et al., 2009), was im Einklang mit dem vorgestellten Ergebnis steht.

Die unterschiedlichen Level der Expression könnten als Zwei Phasen-Prozess betrachtet werden, wie er zum Beispiel auch für die Induktion von *RD29* durch osmotischen Stress beobachtet wurde (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992). Die Autoren konnten für die Induktion der zweiten Phase einen Zusammenhang mit dem Hormon Abscisinsäure (ABA) herstellen, für die erste unmittelbare Reaktion konnte dieser jedoch nicht gezeigt werden und diese wurde als unabhängig betrachtet. Dass auch für NAC Transkriptionsfaktoren ABA abhängige- und unabhängige Regulationswege gezeigt werden konnten (Puranik et al., 2012) ermöglicht - bezogen auf die gemessenen Expressionslevel von *ANAC058* - die Spekulation, dass die Induktion in einem zweistufigen Schritt geschieht.

Eine Hormon-induzierte Expression von *ANAC058* in der Antwort auf Salzstress in Betracht zu ziehen liegt nahe. Für den Transkriptionsfaktor *ANAC02/ANAC092* konnte zum Beispiel im Rahmen der Antwort auf Salzstress eine Induktion durch Ethylen und Auxin vermittelte Signalwege belegt werden (He et al., 2005). Die Expression von *ANAC019*, *ANAC055* und *ANAC072* wird ebenfalls im Rahmen der Antwort auf Salzstress hochreguliert und kann durch ABA induziert werden (Tran et al., 2004). Entsprechende Messun-

gen des Hormongehalts, die diese Überlegungen unterstützen könnten, wurden bisher nicht durchgeführt. Ebenfalls wären längerfristige Zeiträume von 24 oder 48 Stunden aber auch kürzere wie 30 Minuten nach Beginn der Applikation von Relevanz, um zum einen die Induktion der *ANAC058* Expression zeitlich besser erfassen zu können aber auch Informationen über mögliche Veränderungen des Expressionslevels im weiteren Zeitverlauf zu erhalten.

Des Weiteren wurde eine mögliche Beteiligung von *ANAC058* in der Antwort auf Verwundungsstress untersucht (vgl. 3.5.3.2). Die Messung der *ANAC058* Expression im Anschluss an Verwundung von Blättern ergab ein Absinken der Expression auf das 0,3-fache nach drei Tagen und einen Anstieg nach sieben Tagen auf das 4-fache. Eine Beteiligung von NAC-Transkriptionsfaktoren in der Antwort auf Verwundungsstress wurde bereits mehrfach beschrieben. So konnte die Induktion von NAC Genen durch Verwundung außer in *A. thaliana* (Wu et al., 2009) auch in anderen Organismen wie Weizen (Xia et al., 2010), Kartoffeln (Collinge & Boller, 2001), Raps (Hegedus et al., 2003) und Reis (Nakashima et al., 2007) gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es hier zuerst zu einer Herabregulation und anschließend zu einer Heraufregulation als Antwort auf die Verwundung kommt. Möglicherweise ist dies ein Indiz für einen zweistufigen Regulationsprozess.

Nicht konstante Veränderungen der Expression im Rahmen der Stressantwort wurden auch in anderen Organismen beobachtet: Untersuchungen in Kartoffeln ergaben, dass ein NAC-Transkriptionsfaktor als Folge von Verwundung innerhalb von 24 h sehr schnell hochreguliert, anschließend aber wieder herunterreguliert wurde. Nach 48 h konnte jedoch ein erneuter Anstieg der Expression beobachtet werden (Collinge & Boller, 2001). Wie bereits für die Antwort auf Salzstress diskutiert, könnte eine mögliche Ursache in verschiedenen Signalwegen liegen, die unabhängig voneinander die Expression von *ANAC058* beeinflussen.

Die ABA- und Jasmonsäure vermittelte transkriptionelle Aktivierung von Genen ist Teil der generellen Reaktion auf Verwundungsstress (Fujita et al., 2006; Hildmann et al., 1992). In Bezug auf NAC-Transkriptionsfaktoren konnte in diesem Zusammenhang mehrfach eine Interaktion nachgewiesen werden, die sich in ihrer Funktionsweise aber durchaus unterscheidet: So wird der NAC-Transkriptionsfaktor *ATAF2* (*Arabidopsis Transcription Activation Factor*) als Antwort auf Verwundung durch Jasmonsäure induziert, ist aber unabhängig von einem ABA-kontrollierten Signalweg (Delessert et al.,

2005). Der eng verwandte Faktor ATAF1 hingegen agiert als negativer Regulator des ABA-Signalwegs, induziert aber Jasmonsäure regulierte Kaskaden (Jensen et al., 2008). ANAC019 und ANAC055 hingegen werden sowohl durch ABA- als auch den Jasmonsäure abhängige Signalwege reguliert (Tran et al., 2004).

Zusammenfassend kann für ANAC058 eine Rolle in der Antwort auf Salz- und auch Verwundungsstress angenommen werden. Ein Vergleich der beiden Antworten ist schwierig, da die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Intervallen erfolgten. Denkbar wäre eine Messreihe mit mehreren Messzeiten innerhalb der ersten 48 Stunden und anschließend weitere Messungen in 24 h Intervallen. Damit wären einerseits Aussagen über einen möglichen langfristigen Effekt möglich aber es ließen sich auch eventuelle Schwankungen oder Veränderungen beobachten, die auf eine oben diskutierte Interaktion mit anderen Signalwegen hindeuten könnten. Aussagen über eine spekulierte Interaktion von ANAC058 mit anderen Signalkaskaden oder möglicherweise Hormonen sind auf Grundlage dieser Daten nicht möglich. Auch kann *ANAC058* bisher keine konkrete Funktion in der Stressantwort zugeordnet werden.

Um die Untersuchungen abzurunden könnte auch eine mögliche Induktion unter weiteren Stressbedingungen wie Trocken- oder Kältestress untersucht werden, für die ebenfalls eine Induzierbarkeit für NAC Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* oder Reis gezeigt werden konnte (Jeong et al., 2010; Song et al., 2011; Tran & Nakashima, 2004).

Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, wie sich die Überexpression von *ANAC058* auf die Stresstoleranz auswirken würde. Zwar konnte die Suberinanalyse der Wurzeln der *35S::ANAC058-1* Mutanten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp offenbaren, jedoch wäre es denkbar, dass ANAC058 noch unbekannte Funktionen innerhalb der Stressreaktion übernimmt, die durch eine Überexpression beeinflusst würden. Eine Verbesserung der Stresstoleranz durch Überexpression wurde für mehrere in die Stressantwort involvierte NAC Faktoren beschrieben (Hu et al., 2006; Liu et al., 2011; Tran & Nakashima, 2004).

## 4.5 Die Bedeutung von ANAC038 für die Suberinbiosynthese

### 4.5.1 Gewebespezifische Lokalisation der Expression von ANAC038

Wie in den Ergebnissen erläutert, wurde das Gen *ANAC038* als möglicher Kandidat der Suberinbiosynthese neben seiner Coexpression mit Suberin-spezifischen Genen auf Grund der Lokalisation seiner Expression ausgewählt. Diese wurde sowohl durch Daniela Nosbüsch mit Hilfe der RTQ-PCR auf die Wurzel spezifiziert (vgl. 7.4 im Anhang) als auch durch Auswertung des Microarray-basierten *Arabidopsis eFP*-Browsers für das endodermale Wurzelgewebe vorhergesagt (vgl. 3.1).

Die Auswertung zehn Tage alter Pflanzen, die zuvor mit dem *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* Konstrukt transformiert worden waren, bestätigte diese Beobachtungen und Vorhersagen dahingehend, dass eine Blaufärbung ausschließlich im Bereich der Wurzel beobachtet werden konnte, andere Gewebe wie Blatt und Sprossachse jedoch keine Blaufärbung zeigten (vgl. 3.6.1).

Mit Hilfe der mikroskopischen Betrachtung von Wurzelquerschnitten konnte diese Blaufärbung im apikalen Bereich der Wurzel auf den Zentralzylinder eingegrenzt werden, das endodermale Gewebe war jedoch wider Erwarten nicht eingefärbt. Im basalen Bereich der Wurzel, der ein späteres Entwicklungsstadium repräsentiert, konnte eine diffuse Färbung beobachtet werden, die sich unspezifisch über den gesamten Bereich des kortikalen Parenchyms erstreckte.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Vorhersagen des *Arabidopsis eFP*-Browsers da eine spezifische Färbung der Endodermis aber nicht des Zentralzylinders erwartet wurde. Allerdings entstammen diese Vorhersagen großen Datenmengen aus einer Microarray-Analyse und sollten entsprechend kritisch betrachtet werden. Eine entsprechende eigene Analyse können sie nicht ersetzen. Daher ist in Betracht zu ziehen, dass die Vorhersagen des *Arabidopsis eFP*-Browsers für *ANAC038* nicht die tatsächlichen Verhältnisse abbilden. Es wäre aber auch möglich, dass der Promoter nicht komplett war.

Eine Expression eines Gens im Zentralzylinder und nicht in der Endodermis scheint konträr zu einer vermuteten Funktion in der Suberinsynthese zu stehen. Bisher wurde für die Suberingene *GPAT5*, *CYP86A1*, *CYP86B1*, *ASFT*, *FAR1*, *FAR4*, *FAR5* und *KCS20* eine bevorzugte Expression in der Endodermis beobachtet (Ranathunge et al., 2011).

Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht zwingend eine Beteiligung von *ANAC038* an der Suberinbiosynthese in der Endodermis aus. So wurde die Expression des Suberin-Gens *DAISY* mit Hilfe eines Promoter:GUS Fusionsprodukts ebenfalls im Bereich der Leitbündel aber nicht in der Endodermis beobachtet (Franke et al., 2008). Die Bedeutung dieses Ergebnisses für die Suberinsynthese wurde durch die Autoren mit einer möglichen Beteiligung von Zellen des Leitbündel Parenchyms und Perizykels in der Biosynthese und Auflagerung von Suberin in der Endodermis diskutiert. Aus der Lignin-Synthese sind Enzyme bekannt, die an einem anderen Ort exprimiert werden als schließlich ihre Wirkung beobachtet werden kann: Die höchste Promoter getriebene GUS-Aktivität der Gene *CAD* und *C4H* wurde in Zellen der Leitbündel gemessen, an ihrem eigentlichen Wirkungsort, dem lignifizierten Tracheengewebe bzw. lignifizierten Phloem- und Sklerenchym Fasern jedoch kaum (Feuillet et al., 1995; Franke et al., 2000). Eine mögliche Erklärung sehen die Autoren in der Bereitstellung und Sekretion von Vorläufern des apoplastischen Ligninpolymers durch die Zellen, die das lignifizierte Gewebe umgeben. Ein solcher Mechanismus wäre auch für *ANAC038* denkbar: In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor könnte die Synthese von Vorläufern des apoplastischen Suberinpolymers in Zellen des Zentralzylinders kontrolliert werden, die an die Zellen der Endodermis angrenzen. Im Anschluss an die Synthese würden diese in die angrenzenden Zellen der Endodermis transportiert.

Alternativ wäre es möglich, dass der Transkriptionsfaktor *ANAC038* in den Leitbündeln exprimiert und durch sie zu seinem endgültigen Wirkungsort transportiert wird, denkbar wäre ein direkter Transport in die Endodermis aber möglicherweise auch in andere Organe. Der interzelluläre Transport von wurzel-spezifischen Transkriptionsfaktoren ist keine Ausnahmeerscheinung und wurde mehrfach beobachtet (Lee et al., 2006). Diese These ließe sich durch Immunolokalisation oder ein Fusionskonstrukt von *ANAC038* und GFP überprüfen. Für den Transkriptionsfaktor *SHR* wurde auf diese Weise ein Transport aus den Leitbündeln in die angrenzende Endodermis nachgewiesen (Kurata et al., 2005).

Die vorgestellten Hypothesen lassen sich nur unzureichend auf die diffuse Färbung des corticalen Parenchymgewebes übertragen (vgl. 3.6.1). Diese Beobachtung könnte vielmehr als Hinweis verstanden werden, dass *ANAC038* noch weitere Funktionen als in der angenommenen Suberinbiosynthese zukommen, denkbar wäre auf Basis dieser Beobachtung eine Beteiligung an der asymmetrischen Zellteilung des Kortex.

#### 4.5.2 *anac038* Mutanten weisen Gewebe abhängig Unterschiede in der Zusammensetzung apoplastischer Polyester auf

Die Analyse apoplastischer Polyester und Wachse verschiedener Gewebe der *anac038* Mutanten ergab kein einheitliches Bild. Vergleichende Analysen der Samenschalenpolyester und der Blattwache von WT- und *anac038-1* Pflanzen ergaben keine signifikanten Unterschiede (vgl. 3.6.3.3 und 3.6.3.4). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den zuvor beschriebenen Untersuchungen zur gewebespezifischen Lokalisation der Genexpression von *ANAC038*. Diese deuteten auf eine wurzelspezifische Expression hin (vgl. 7.4 im Anhang), so dass vorerst auf Basis dieser Daten als erste Hypothese formuliert werden könnte, dass *ANAC038* keine Rolle in der Synthese von Blattwachsen oder Samenschalenpolyestern zukommt.

Es ist allerdings nicht grundsätzlich auszuschließen, dass *ANAC038* durchaus eine bedeutende Rolle in der Synthese von Blattwachsen und Samenschalenpolyestern zukommen könnte. Mögliche bislang nicht identifizierte redundante *ANAC* Transkriptionsfaktoren könnten den Gen-Knockout in der Mutante kompensieren, so dass es zu keinen messbaren Effekten kommt. Des Weiteren wäre es denkbar, dass *ANAC038* in anderen Geweben als der Wurzel nicht permanent sondern nur unter bestimmten Bedingungen wie zum Beispiel Stress exprimiert wird und der Gen-Knockouts daher keine messbaren Konsequenzen hat. Diese Überlegungen sollen im weiteren Verlauf der Diskussion fortgesetzt werden.

Die Analyse des Wurzeluberins von *anac038-1* Pflanzen ergab eine signifikante Erhöhung des Gesamtuberinergehalts im Vergleich zum Wildtyp (vgl. 3.6.3.1), wobei die absolute und relative Verteilung der identifizierten Monomere vergleichbar mit Literaturwerten war (Compagnon et al., 2009). Um sicherzustellen, dass diese Beobachtung ausschließlich auf den Knockout des *ANAC038* Gens und nicht auf andere Faktoren zurückzuführen ist, wurde mit *anac038-2* ein weiteres Mutanten-Allel untersucht (vgl. 3.6.3.2). Durch gaschromatographische Analyse konnte auch in dieser Mutante eine signifikante Erhöhung des Gesamtuberinergehalts gemessen werden.

Ein Vergleich der Daten der beiden Mutanten-Allele ergibt qualitativ dasselbe Ergebnis, weist allerdings einige quantitative Unterschiede auf. So ist der Gesamtuberinergehalt der *anac038-2* Mutante im Vergleich zur *anac038-1* Mutante um fast 40 % erhöht, der Gesamtuberinergehalt der korrespondierenden Wildtypen unterscheidet sich sogar um fast 50 %. Auch wirken sich die Unterschiede in der *anac038-2* Mutante auf alle Sub-



stanzklassen aus, in der *anac038-1* Mutante hingegen konnten keine Unterschiede in den Alkoholen identifiziert werden, auch die C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- Fettsäuren und C<sub>24</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dies könnte eine Folge der geringeren Gesamtsuberinmenge sein, so dass ein Unterschied auf Grund der geringen Menge schwieriger zu identifizieren ist. Grundsätzlich ist ein direkter Vergleich der Analysen der beiden Mutantenallele schwierig und es muss berücksichtigt werden, dass die Pflanzen nicht zeitgleich unter denselben Wachstumsbedingungen angezogen wurden und die korrespondierenden Wildtypen unterschiedlichen Ökotypen angehören. Die Linie *anac038-1* wurde durch das SALK-Institut mit dem Ökotyp Col-8 erzeugt, die Linie *anac038-2* hingegen wurde an der Universität Wisconsin mit dem Ökotyp Col-0 erzeugt. In diesem Fall erscheint zur besseren quantitativen Vergleichbarkeit der Daten eine Wiederholung des Experiments angebracht in der alle zu untersuchenden Pflanzen gleichzeitig unter identischen Wachstumsbedingungen angezogen werden.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der transkriptionelle Knockout des *ANAC038* Gens zu einer Erhöhung des Suberingehalts in Wurzeln führt. Unterstützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass die Komplementation der *anac038-1* Mutante dazu führte, dass die Menge der gemessenen Suberinmonomere der des Wildtyps entsprach (vgl. 3.6.7).

Eine kritische Überprüfung der Messergebnisse ergab, dass die Wurzelgewichte der *anac038* Mutanten im Mittelwert um etwa 20 % geringer waren als die der WT Pflanzen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei den Pflanzen der *anac058* Mutante beobachtet, deren durchschnittliche Wurzelgewichte etwa 60 % höher lagen. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte ein beobachteter Unterschied in Bezug auf die Suberinmenge zwischen WT und Mutanten damit auf einen rechnerischen Effekt zurückzuführen sein, wie in 4.4.1 erläutert.

Des Weiteren ließe sich kritisch anmerken, dass die Suberinmenge in den Wurzeln der Mutanten möglicherweise nicht erhöht ist sondern der beobachtete Effekt mit noch unbekanntem Veränderungen in den Bindungsverhältnissen des Polyesters zusammenhängt und daher in Wurzeln der Mutante während der Umesterungsreaktion mehr Monomere aus dem Polyester freigesetzt werden.

Diesen kritischen Argumenten ist entgegenzuhalten, dass die Färbung von *anac038-1* und WT Wurzeln mit Sudan 7B sehr eindrucksvoll zeigte, dass die Intensität der Färbung in den Mutanten deutlich stärker ausgeprägt war und damit eine höhere Suberin-

menge bestätigte (vgl. 3.6.2). Bezüglich der zweiten kritischen Anmerkung ließen sich in Wurzelquerschnitten keine morphologischen Veränderungen erkennen (vgl. 3.6.4).

Mögliche Auswirkungen auf die Bindungsverhältnisse innerhalb des Polyesters lassen sich nicht ausschließen, eine Untersuchung wäre mit Hilfe von NMR-Messungen möglich.

Inwiefern ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Knockout von *ANAC038* und Unterschieden in den gemessenen Gewichten der WT und Mutanten Wurzeln besteht bleibt offen (vgl. 3.6.5).

#### **4.5.3 Wechselwirkungen von ANAC038 mit charakterisierten Suberingenen**

Die Beobachtung, dass der Gehalt fast aller Suberinmonomere in Wurzeln der *anac038* Mutanten signifikant erhöht ist, legt die Hypothese nahe, dass ANAC038 verschiedene Funktionen in der Suberinbiosynthese zukommen könnten. Da *ANAC038* unter anderem auf Grund seiner vorhergesagten Coexpression mit den Suberingenen *HORST* und *RALPH* als Kandidatengen ausgewählt wurde, wurde die Expression dieser beiden Gene sowie die von *GPAT5* in Wurzeln der *anac038-1* Mutante gemessen (vgl. 3.6.6).

In diesen Messungen konnte zwar nachgewiesen werden, dass das Expressionslevel von *ANAC038* in den Mutanten erwartungsgemäß auf ein Minimum reduziert war, die untersuchten Suberingene *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* jedoch im Vergleich zum Wildtyp in ihrem Expressionslevel nicht signifikant verändert waren. Die vorliegenden Analyseergebnisse können mit der Expression dieser Gene nicht erklärt werden.

Um eine mögliche Interaktion von ANAC038 mit bekannten Suberingenen besser nachzuvollziehen, wurden *ANAC038* überexprimierende Mutanten generiert, von denen die unabhängigen Linien Nr. 2 und 21 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden (vgl. 3.7.2.1). Die Messung der Genexpression der Suberingene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* ergab im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Anstieg (vgl. 3.7.2.2). Die Beobachtung, dass abhängig vom Grad der *ANAC038*-Überexpression die Expressionslevel der Suberingene unterschiedlich stark erhöht sind belegt einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von *ANAC038* und der veränderten Expression der untersuchten Suberingene. Interessant ist dabei auch, dass die Gene in Relation zur Expression im Wildtyp nicht gleichmäßig stark überexprimiert werden. So lässt sich aus der besonders starken Veränderung der *GPAT5* Expression möglicherweise eine

besondere Rolle ableiten, allerdings bleiben diese Überlegungen spekulativ. Es wäre auch denkbar, dass die Expression im Wildtyp besonders niedrig ist. Wie bereits zuvor für die Überexpressionslinien des Gens *ANAC058* erläutert können diese Daten als Hinweis auf eine mögliche Induktion der untersuchten Suberingene durch *ANAC038* verstanden werden. Ob diese allerdings direkt oder als Teil eines komplizierten Netzwerkes stattfindet ist aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich und muss noch aufgeklärt werden.

Da diese Messungen allerdings in Blättern durchgeführt wurden, in denen *ANAC038* unter Standardbedingungen nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird, können die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in Wurzeln übertragen werden.

Genexpressionsmessungen in Wurzeln der Überexpressionspflanzen bestätigen diese Überlegungen. In beiden Überexpressionsmutanten konnten keine Veränderungen der überprüften Suberingene in Wurzeln gemessen werden (vgl. 3.7.2.4). Eine veränderte Expression von *ANAC038* konnte ausschließlich in der Überexpressionsmutante Nr. 2 gemessen werden. Bezogen auf die zuvor aufgestellte Hypothese, dass *ANAC038* die Expression der untersuchten Suberingene induzieren könnte, ergeben sich mehrere vorstellbare Erklärungsansätze: Zum einen ist es denkbar, dass durch bisher nicht identifizierte Faktoren das maximale Expressionslevel von *ANAC038* in Wurzeln beschränkt wird oder es sich bei dem gemessenen Level bereits um das Maximum handelt. Als Konsequenz wäre eine Induktion der untersuchten Suberingene nicht möglich. Dieser These widerspricht, dass in Wurzeln der Linie *35S::ANAC038-2* das Expressionslevel von *ANAC038* auf das fast 60-fache erhöht war, eine Steigerung der *ANAC038* Expression in Wurzeln also offensichtlich möglich ist aber trotzdem keine Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Suberingene zur Folge hat oder deren Expressionslevel bereits das Maximum erreicht hat. Dass diese Steigerung in der Linie *35S::ANAC038-21* nicht zu beobachten war könnte auf das unterschiedliche Expressionslevel in den Mutantenlinien zurückzuführen sein. In Hinblick auf die Möglichkeit, dass die maximale Expressionsrate durch nicht näher bekannte Mechanismen reguliert wird wäre denkbar, dass diese Mechanismen nur bis zu einem gewissen Maximum greifen.

Eine alternative Erklärung könnte darin bestehen, dass das Expressionslevel der untersuchten Suberingene durch bislang unbekannte Faktoren beschränkt wird und daher keine Veränderungen beobachtet werden können. Allgemein ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Expression von *ANAC038* primär in den Wurzeln und nicht in den Blättern stattfindet. Eine künstlich mit Hilfe des 35S-Promoters erzeugte Induktion der *ANAC038*

Expression in Blättern zeigt entsprechend im Vergleich zum WT einen deutlicheren Effekt als möglicherweise in Wurzeln. Da in Wurzeln von einem grundsätzlich eher hohen Expressionslevel der untersuchten Gene auszugehen ist, werden die Effekte der Überexpression zum einen keine starken Auswirkungen wie in den Blättern haben und zum anderen möglicherweise schwieriger zu detektieren sein.

Da allerdings wie bereits zuvor angemerkt nicht klar ist, ob die in Blättern postulierte Induktion von Suberinenen durch *ANAC038* direkt oder indirekt geschieht ist nicht auszuschließen, dass in die vermutete Interaktion von Transkriptionsfaktor und Suberinenen verschiedene nicht identifizierte Faktoren involviert sind. Solange diese nicht bekannt sind ist es schwierig zu spekulieren, wie sich die Überexpression von *ANAC038* auf die Expression anderer Gene in der Wurzel auswirkt. Zur Aufklärung würde die Analyse der differentiellen Genexpression in Wurzeln von *35S::ANAC038* Linien im Vergleich zum Wildtyp beitragen.

Um zu klären, ob es zu einer direkten Interaktion von *ANAC038* und den untersuchten Suberinenen kommt, können Bindungsstudien hilfreich sein. So würde beispielsweise ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) helfen, diese nachzuweisen und qualitativ und quantitativ zu untersuchen (Hellman & Fried, 2007).

#### **4.5.4 Die Rolle von ANAC038 unter Stressbedingungen**

Wie bereits zuvor in der Diskussion des Gens *ANAC058* in 4.4.6 ausführlich beschrieben, ist Suberinisierung ein Bestandteil der Antwort der Pflanze auf osmotischen, Salz- und Trockenstress sowie Verwundung. In diesem Zusammenhang wurde auch für mehrere NAC-Transkriptionsfaktoren eine Beteiligung an der Reaktion der Pflanze nachgewiesen.

In der in 3.6.8.1 dargestellten Messung der Genexpression nach Applikation von 150 mM NaCl belegt der Anstieg der *RD29A* Expression eine Stresssituation. Der beinahe linear verlaufende Anstieg der *ANAC038* Expression weist auf die Induzierbarkeit durch NaCl Applikation und eine Rolle in der Antwort auf Salzstress hin. Es ist jedoch auf Basis der vorliegenden Daten nicht möglich einzugrenzen, ob diese Induktion durch ionentoxische oder osmotische Effekte verursacht wird oder eine Reaktion auf beides darstellt. Wie bereits für *ANAC058* diskutiert, ist eine spezifische Induzierbarkeit von NAC-Transkriptionsfaktoren durch Salzstress mehrfach beschrieben worden. Im Gegensatz zu der für *ANAC058* postulierten zweistufigen Reaktion wirkt die Antwort von *ANAC038*

kontinuierlicher (vgl. 3.5.3.1 und 3.6.8.1), weitere Messungen der Expression nach größeren Zeitabständen könnten dieses Bild aber vervollständigen.

Des Weiteren wurde die mögliche Beteiligung von *ANAC038* in der Antwort auf Verwundung untersucht. Wie in 3.6.8.2 dargestellt konnte nach einem anfänglichen Absinken der Expression in der ersten Stunde nach Verwundung ein Anstieg der Expression auf das 6-fache nach 24 Stunden gemessen werden, die ihr gemessenes Maximum nach 72 Stunden bei dem 98-fach ihres Ursprungswerts erreichte. Dieser fast exponentielle Verlauf steht im Gegensatz zu den Messungen für die *ANAC058*-Expression. Die Expression von *ANAC038* wurde zusätzlich durch die Verwundung von *Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS* Blättern bestätigt, die rund um die Verwundungszonen herum eine deutliche Blaufärbung aufwiesen (vgl. 3.6.8.2). Diese lokal sehr begrenzte Färbung bestätigt die Induktion der *ANAC038* Expression durch Verwundung, so dass zusammenfassend für *ANAC038* nicht nur eine Rolle in der Antwort auf Salz- und Trockenstress sondern auch auf Verwundung angenommen werden kann.

Für das Gen *ANAC058* wurde zuvor ausgiebig die mögliche Rolle von Hormonen wie Jasmonsäure oder ABA in der Stressantwort diskutiert. Diese bezog sich in den vorherigen Messungen insbesondere auf den beschriebenen zweistufigen Induktionsprozess. Auch wenn in den vorliegenden Messungen keine akuten Anhaltspunkte für diese Hypothese zu erkennen sind, lassen sich diese Überlegungen auch auf *ANAC038* anwenden. Eine mögliche Interaktion mit den genannten Hormonen kann in Hinblick auf die zuvor zitierte Literatur nicht ausgeschlossen werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Denkbar wäre, dass der gemessene Anstieg der *ANAC038* Transkriptmenge nach 24 Stunden auf Hormoninduktion zurückzuführen ist. Auch könnten die Experimente auf weitere Stressmethoden ausgeweitet werden, die in der Literatur im Zusammenhang mit NAC-Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden, denkbar wären Kälte- und Trockenstress.

#### **4.5.5 Hat der *ANAC038* Knockout Auswirkungen auf die Stresstoleranz?**

Mögliche Auswirkungen des *ANAC038* Knockouts auf die Stresstoleranz wurden in der vorliegenden Arbeit für drei Stressoren überprüft: Salz, Mannitol und Austrocknung. Sowohl während der Applikation mit Salz als auch mit Mannitol wurden Symptome wie Nekrosen, Verfärbungen und Welken der Blätter beobachtet, die für eine Stresssituation

typisch sind (vgl. 3.6.9.1 und 3.6.9.2). Unterschiede in der Intensität oder im Zeitverlauf der Stressantwort, die einen Hinweis auf mögliche Auswirkungen auf die Stresstoleranz zwischen Mutante und Wildtyp geben könnten, waren aber nicht erkennbar.

Suberin stellt eine Barriere dar, die den Zufluss von Ionen wie  $\text{Na}^+$  in die Wurzel kontrolliert (Ranathunge et al., 2011). Eine negative Korrelation zwischen der  $\text{Na}^+$  Aufnahme und der Menge an Suberin in den Wurzeln konnte in einer Studie mit Reissorten mit unterschiedlichem Suberinisierungsgrad gezeigt werden (Krishnamurthy et al., 2009). Auch konnte wie bereits beschrieben in *Arabidopsis* und *Ricinus* Wurzeln die vermehrte Ablagerung von Suberin als Reaktion auf Salzstress beobachtet werden (Franke et al., 2008; Schreiber et al., 2005).

In unserer Arbeitsgruppe konnte für die suberinreichere *esb1* Mutante (Baxter et al., 2009) eine verbesserte Toleranz gegenüber Salzstress nachgewiesen werden (Daten unveröffentlicht), was die Vermutung nahelegte, dass die höhere gemessene Suberinmenge in *anac038-1* Wurzeln ebenfalls zu verbesserter Salzstresstoleranz führen könnte. Eine mögliche Erklärung, warum dieser Effekt in den hier vorgestellten Ergebnissen nicht beobachtet werden konnte bezieht sich auf die Anzuchtbedingungen und die Salzapplikation. Die Anzucht und Applikation in hydroponischen Kammern bietet gegenüber dem Gießen erdgewachsener Pflanzen mit NaCl Lösung den Vorteil, dass die Applikation frei von einem zonalen Effekt der Erde erfolgen kann und das osmotische Potential der umgebenden Lösung sehr genau eingestellt werden kann. Andererseits erfolgt die Stressapplikation der Pflanzen sehr viel schneller und kann nicht abgepuffert werden, wie es in einem erdgewachsenen System der Fall ist. Dies könnte dazu führen, dass die Suberinisierung der Wurzeln als Stressreaktion zu langsam vonstatten geht um den erhöhten Ioneneinfluss zu kompensieren. Hinzu kam, dass die NaCl Konzentration mit 150 mM vergleichsweise zu hoch gewählt war, da die Pflanzen bereits nach 6 Tagen so starke Stresssymptome aufwiesen, dass eine langfristige Beobachtung nicht möglich war. Die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten *esb1* Pflanzen wurden auf Erde angezogen und nach 3 Wochen mit einer 200 mM NaCl Lösung gewässert, nach zehn Tagen konnten spezifische Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden.

Auch für osmotischen Stress wurde Suberinisierung als Teil der Stressantwort in Wurzeln von Mais beobachtet (Schreiber et al., 1999). Zwar wurden bisher keine entsprechenden Experimente mit der Mutante *esb1* durchgeführt, doch gelten die zuvor angemerktten Zweifel in Bezug auf die Versuchsanordnung auch für dieses Experiment.

Daher kann die Auswertung dieser Experimente zusammenfassend keine eindeutige Antwort auf die Frage geben, ob der *ANAC038* Knockout Auswirkungen auf die Stresstoleranz gegenüber Salz- und osmotischem Stress hat. Diese Experimente sollten unter veränderten Bedingungen wiederholt werden: Auf Basis der zuvor dargelegten Überlegungen sollten *anac038-1* und *-2* Pflanzen auf Erde angezogen und nach 21 Tagen mit 200 mM NaCl bzw. 150 mM Mannitol Lösung gewässert werden. Ein alternatives Experiment könnte in der Anzucht auf mit NaCl versetzten Agar-Platten bestehen. Dieses System wäre auch geeignet, mögliche Auswirkungen auf das Wurzelwachstum unter Salzstress zu identifizieren.

Das Austrocknungsexperiment ergab im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Stressexperimenten ein eindeutiges Ergebnis: Pflanzen der Linie *anac038-1* zeigen weniger Stresssymptome und sind nach 10 Tagen Austrocknung dem Phänotyp der als Positivkontrolle untersuchten *esb1* Pflanzen sehr ähnlich (vgl. 3.6.9.3). Dass sowohl in den Wurzeln der *esb1* Mutante als auch der *anac038-1* Mutante ein erhöhter Suberingehalt gemessen wurde, legt die Vermutung nahe, den beobachteten Effekt auf die gemessene Erhöhung der Suberinmenge zurückzuführen. In verschiedenen Spezies konnte nachgewiesen werden, dass der höhere Suberinanteil reiferer Regionen der Wurzeln mit einem verminderten Wasserverlust korreliert (Taleisnik et al., 1999).

Baxter et al. (2009) konnten für die *esb1* Mutante nicht nur verminderte Stresssymptome der Blätter wie Welken oder Verfärbungen beobachten sondern zusätzlich auch eine verminderte Transpiration messen. Gemäß der Modellvorstellung wirkt endodermales Suberin als apoplastische Barriere dem unkontrollierten Wasserstrom in die Stele und peridermales Suberin dem Wassertransport aus der Wurzel heraus entgegen. Die Autoren argumentierten, dass die gemessene Erhöhung des Gesamtsuberins in der Wurzel der *esb1* Mutante diese Barrieren verstärkte und damit zu der beobachteten verbesserten Trockentoleranz führte.

Die vorgestellte Hypothese ließe sich durch Pfropfungsexperimente untermauern um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt auf die Wurzel zurückzuführen ist. Des Weiteren wäre eine Messung der Transpiration von Interesse, wie auch für die *esb1* Mutante beschrieben.

#### 4.5.6 35S::ANAC038 Pflanzen weisen Veränderungen des Kutin- und Wachsgehalts in Blättern auf

Die Untersuchung der Bestandteile des Blattkutins in den beiden *ANAC038* überexprimierenden Pflanzenlinien Nr. 21 und 2 ergab eine signifikante Verringerung des Gesamtkutingehalts im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen (vgl. 3.7.2.5). Bei einer genaueren Betrachtung fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den beiden Mutantenlinien mit Ausnahme der Alkohole und 2-Hydroxysäuren nicht signifikant sind. Bezogen auf die beiden zuletzt genannten Substanzklassen konnten Unterschiede nur zwischen Wildtyp und *35S::ANAC038-21* Pflanzen gemessen werden. Da in der Mutantenlinie Nr. 2 jedoch im Vergleich zu Linie Nr. 21 ein deutlich höheres *ANAC038* Expressionslevel gemessen worden war (vgl. 3.7.2.1) wäre ein deutlicherer Effekt in dieser Linie erwartet worden. Im Vergleich zu anderen Messungen fallen in dieser Untersuchung aber die hohen Standardabweichungen auf. Möglicherweise führen diese zu den scheinbar nicht signifikanten Unterschieden, so dass eine Wiederholung des Experiments aufschlussreich sein könnte.

Des Weiteren konnte in den Blättern der Überexpressionsmutanten keine Veränderung des Expressionslevels des Gens *GPAT4* gemessen werden (vgl. 3.7.2.2). Dies verwundert insofern als dass *GPAT4* ein prominentes Enzym der Kutinsynthese ist (Li et al., 2007; Yang et al., 2010) und daher der Verdacht nahe lag, dass bei einer messbaren Veränderung des Kutingehalts auch eine Veränderung der *GPAT4* Expression beobachtet werden könnte.

Weiterhin konnte durch Li et al. (2007) gezeigt werden, dass durch Coüberexpression von *GPAT5* und *CYP86A1* im Stengelkutin typische Suberinmonomere wie C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Dicarbonsäuren sowie C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>- $\omega$ -Hydroxysäuren identifiziert werden konnten, diese konnten jedoch in den vorliegenden Mutantenlinien nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass in den von den Autoren beschriebenen Pflanzen ausschließlich *GPAT5* und *CYP86A1* überexprimiert wurden. In Anbetracht der Tatsache, dass in den hier untersuchten Mutantenlinien zusätzlich die Expression einer großen Anzahl weiterer Gene verändert ist, lassen sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragen.

In Bezug auf die Zusammensetzung der Blattwachse wurden in den Überexpressionsmutanten ebenfalls Unterschiede identifiziert (vgl. 3.7.2.6). Die Ergebnisse reflektieren dabei den unterschiedlichen Grad der *ANAC038* Expression in den beiden Überexpressi-



onslinien: Die stärker überexprimierende Mutantenlinie Nr. 2 weist auch eine stärkere Reduktion der Blattwachse auf als die andere Mutantenlinie. Diese Beobachtung spricht für einen Zusammenhang zwischen der *ANAC038* Überexpression und der Reduktion der Blattwachse. Ob diese mit einer möglichen Veränderung der Expressionslevel von in die Wachssynthese involvierten Genen zusammenhängt, ist unklar, da solche nicht untersucht wurden.

Auch könnten Veränderungen bei Transportvorgängen eine mögliche Ursache darstellen, wie sie zuvor bereits für das Gen *ANAC058* diskutiert wurden (vgl. 4.4.3). Vorstellbar wäre eine Funktion von *ANAC038* als negativer Regulator wachsspezifischer Transporter. Als Folge der Überexpression käme es gemäß dieser These zu verstärkter Hemmung der Transporteraktivität und damit zur Reduktion der Wachse. Die Identifizierung möglicher Einschlüsse von Wachsmomeren, wie sie in Zellen der Transportermutante *cer5* gefunden wurden (Pighin et al., 2004), könnten diese These bestätigen. Auch sind Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion notwendig.

#### **4.5.7 Hypothese der möglichen Funktion von ANAC038**

Die vorgestellten Ergebnisse und Diskussionen machen es schwierig, die Funktion von *ANAC038* eindeutig in das bestehende Modell der Suberinbiosynthese einzuordnen. Daher werden nachfolgend mehrere Hypothesen präsentiert, um die beschriebenen Beobachtungen bestmöglich mit dem in der Einleitung präsentierten Synthesemodell in Einklang zu bringen. Da sich die Ergebnisse der Expressions- und Suberinmessungen in den unterschiedlichen Organen scheinbar widersprechen, wird die Situation in Blättern und Wurzeln zunächst getrennt betrachtet.

Mit Hilfe der RTQ-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit in Blättern die Hochregulation der Expression von Genen der Suberinbiosynthese als Folge der Überexpression von *ANAC038* gezeigt werden. Ein natürlicher Vorgang, der zur Induktion der *ANAC038* Expression in Blättern führt, ist wie in 1.3 beschrieben die Verwundung von Blättern, in deren Stressantwort Suberinisierung eine wichtige Rolle spielt. Vorausgesetzt, dass die Ergebnisse der Expressionsmessungen in Überexpressionspflanzen auf die Situation in verwundeten Pflanzen übertragen werden können, lässt sich eine Hypothese für die Rolle von *ANAC038* in der Antwort auf Verwundungsstress entwickeln.

In dieser Hypothese kommt *ANAC038* eine Schlüsselrolle in der Induktion der Suberinisierung als Bestandteil der Antwort der Pflanze auf Verwundungsstress in Blättern zu.

Die Verwundung von Blättern führt zur Induktion der *ANAC038* Expression in Blättern. Die Hochregulation der *ANAC038* Expression induziert die Expression von Suberingenen, um die Suberinsynthese, die als Bestandteil der Antwort auf Verwundungsstress beschrieben wurde, zu initiieren. Dabei könnte *ANAC038* eine Rolle als allgemeiner Schlüsselaktivator der Suberinsynthese zuzukommen, da in den zuvor beschriebenen Ergebnissen die Expression aller untersuchten Suberingene durch die Überexpression von *ANAC038* beeinflusst wurde und nicht nur die einzelner Gene. Auch ist hervorzuheben, dass die untersuchten Gene *RALPH*, *KCS17*, *HORST*, *ASFT* und *GPAT5* an verschiedenen Schritten der Synthese aliphatischer Suberinbestandteile beteiligt sind (vgl. Abbildung 4), was ebenfalls für eine Funktion als allgemeiner Aktivator spricht.

Durch die verstärkte Bildung von Enzymen der Suberinsynthese wäre in den Blättern eine Konkurrenz mit Enzymen der Kutinsynthese und Wachssynthese um  $C_{16}$  und  $C_{18}$  Fettsäuren vorstellbar. Diese Fettsäuren bilden die Ausgangsstoffe sowohl für die Monomere von Suberin als auch Kutin und Wachsen (Franke et al., 2012; Samuels et al., 2008).

Durch die einseitig gesteigerte Expression von Suberingenen würde es bei gleich bleibender Verfügbarkeit dieser Fettsäuren zu Veränderungen kommen:  $C_{16}$  und  $C_{18}$  Säuren würden überwiegend in der Suberinbiosynthese gebunden und wären für die Synthese von Kutin oder Wachsen nur noch eingeschränkt verfügbar. Als Folge käme es zu Reduktionen der Kutin- und Wachsmenge. Die beobachtete Reduktion der Kutin- und Wachsmenge in *ANAC038* Überexpressionspflanzen ist in Einklang mit dieser Hypothese. Auch dass in den Wachsen gemessene Sterole nicht beeinträchtigt waren, die in einem unabhängigen Syntheseweg entstehen, passt zu dieser These. Wie bereits zuvor diskutiert, ließ sich die gemessene Veränderung der Kutinmenge nicht auf Änderungen des Expressionslevels zurückführen da für die Expression des prominenten Kutingens *GPAT4* keine Veränderungen beobachtet wurden.

Dieser These widerspricht scheinbar das Ergebnis der gaschromatographischen Analysen der Blätter von *35S::ANAC038* Pflanzen (vgl. 3.7.2.5). Es konnten keine auffälligen Veränderungen der aliphatischen Blattpolyester gemessen werden, so wäre zum Beispiel eine Akkumulation der  $C_{18:1}$   $\omega$ -Hydroxysäure zu erwarten gewesen, dem prominentesten Suberinmonomer. Möglicherweise ist die Überexpression von *ANAC038* alleine nicht ausreichend, um Suberinauflagerungen in Blättern zu induzieren. Es ist vorstellbar, dass in diesem komplexen Vorgang weitere bislang unbekannte Faktoren wie zum Beispiel Transporter eine Rolle spielen. Möglicherweise werden Suberinmonomere

synthetisiert, akkumulieren aber in der Zelle. Ein ähnliches Phänomen wurde für eine Transportermutante der Wachssynthese beschrieben (Pighin et al., 2004): Wachsmomere bildeten Einschlüsse in der Zelle, die durch TEM Studien nachgewiesen wurden. Zur Überprüfung dieser These könnten zum einen Totalextrakte von Blättern der Überexpressionspflanzen analysiert werden, des Weiteren könnten Färbungen der Blätter mit Sudan Rot 7B und TEM Studien Aufschluss geben.

Bislang beruht die These, dass die untersuchten Suberingene in verwundeten Blättern durch *ANAC038* in ihrer Expression verändert werden auf Spekulationen und sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Denn auch wenn die Ergebnisse der Expressionsmessungen für eine Induktion der untersuchten Suberingene durch *ANAC038* sprechen, bleibt unklar, ob diese direkt oder indirekt geschieht. Die Aufklärung dieser Frage zum Beispiel mit Hilfe des bereits zuvor angeführten Electrophoretic Mobility Shift Assays könnte die hier vorgestellte Hypothese unterstützen (vgl. 4.5.3).

Nachdem bisher die mögliche Funktion von *ANAC038* in Blättern diskutiert wurde, soll der Fokus nachfolgend auf der Funktion in Wurzeln liegen. Im Gegensatz zu Blättern führte die Überexpression von *ANAC038* in Wurzeln zu keiner Veränderung der Expression der untersuchten Suberingene und keiner messbaren Veränderung der Zusammensetzung des Wurzelsuberins. Wie bereits zuvor diskutiert, lässt dies darauf schließen, dass die *ANAC038* Expression anders als in den Blättern durch bislang nicht bekannte Faktoren sehr genau reguliert ist. Dafür spricht auch, dass eine Veränderung der Expression von *ANAC038* ausschließlich in den Wurzeln der stärker exprimierenden Linie *35S::ANAC038-2* beobachtet wurde (vgl. 3.7.2.4). Als mögliche Erklärung wurde bereits angeführt, dass das Ausmaß der Überexpression durch regulierende Mechanismen nicht mehr kompensiert werden könnte. Das Vorhandensein solcher regulierender Mechanismen ist insofern vorstellbar, als dass *ANAC038* in Wurzeln im Gegensatz zu Blättern als primärer Ort der Expression identifiziert wurde. Anhand der vorliegenden Daten sind Überlegungen bezüglich des Mechanismus dieser Regulation jedoch rein spekulativ. Im Gegensatz zur Überexpression führte der Knockout zu signifikanten Veränderungen: In beiden Mutantenallelen konnte eine Erhöhung der Gesamtmenge des Wurzelsuberins gemessen werden. Eine Untersuchung der Blattwachse ergab keine Veränderungen. Diese Beobachtung passt insofern zu der zuvor aufgestellten Hypothese, als dass *ANAC038* unter Verwundungsstressbedingungen induziert wird, unter Normalbedingungen aller-

dings nicht oder kaum in Blättern exprimiert wird und für einen Gen-Knockout daher keine Auswirkungen zu erwarten sein sollten.

Dass die Expression prominenter Suberingene in der Wurzel sowohl in der Überexpressions- als auch in der Knockout-Mutante nicht verändert ist, steht erst einmal konträr zu der Annahme, dass deren Expression durch *ANAC038* induziert werden kann. Allerdings ist auch hier erneut zu beachten, dass nicht bekannt ist, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt und daher mögliche weitere Interaktionspartner identifiziert werden müssen. Die Beobachtung, dass in *anac038-1* Pflanzen eine Erhöhung des Gesamtsuberins gemessen werden konnte, die Expression der prominenten Suberingene *HORST*, *RALPH* und *GPAT5* jedoch nicht verändert war legt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung des Gesamtsuberins nicht auf Veränderungen der Expression bekannter Suberingene zurückzuführen ist (vgl. 3.6.6).

Eine Hypothese, um diese Beobachtungen zu erklären, bezieht sich auf die Annahme, dass Monomere mit mehreren funktionellen Gruppen wie  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren, Glycerol, Ferula- und Coumarsäure zur Quervernetzung des Suberinpolyesters beitragen. Die Veresterung mit monofunktionellen Monomeren wie Alkoholen und einfachen Säuren führt hingegen zum Abschluss des Polyesters (Molina et al., 2009). Möglicherweise besteht die Funktion von *ANAC038* in der Wurzel darin, bislang noch nicht identifizierte Enzyme zu aktivieren, deren Funktion in der substratspezifischen Veresterung von Alkoholen oder Säuren mit dem Polyester besteht und damit zur Begrenzung beiträgt. Im Falle eines Gen-Knockouts könnte diese Funktion nicht mehr ausreichend erfüllt werden und als Folge kommt es zu einer eingeschränkten Begrenzung des Polyesters und damit zur Erhöhung der Suberinmenge, wie sie im vorliegenden Fall gemessen wurde.

Eine Vorhersage der molekularen Funktion von *ANAC038* mit Hilfe der UniProt Datenbank ergab eine Sequenz-spezifische DNA bindende Aktivität. Um auf dieser Basis bislang unbekannt Interaktionspartner und damit mögliche Enzyme mit der zuvor beschriebenen Estersynthese Funktion identifizieren zu können, stellt eine Microarrayanalyse wie bereits zuvor ausgeführt das sinnvollste Werkzeug dar.

Ein weiterer Ansatz, die Funktion von *ANAC038* besser zu verstehen berücksichtigt die Beobachtung, dass NAC-Transkriptionsfaktoren Homo- und Hetero-Dimere bilden können (Olsen et al., 2005). Notwendige Experimente wie Protein-Protein Interaktionsassays wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, wären aber durchaus von Interesse.

Die Messung der Genexpression von weiteren mit *ANAC038* coexprimierten NAC Genen ergab in *anac038-1* Pflanzen mit Ausnahme des Gens *ANAC080* keine signifikanten Veränderungen der Genexpression (vgl. 3.6.6). Der gemessene signifikante Anstieg der Expression von *ANAC080* kann als möglicher Hinweis auf eine Interaktion mit *ANAC038* aufgefasst werden. Ein hypothetisches Modell könnte sein, dass *ANAC038* und *ANAC080* ein Dimer bilden und die *ANAC080* Expression als Reaktion auf den Knockout hochreguliert wird.

Es wäre allerdings auch genauso denkbar, dass *ANAC080* eine redundante Funktion für *ANAC038* übernimmt und daher ein Anstieg des Expressionslevels gemessen werden konnte. Auf Grund seiner vorhergesagten Coexpression mit *ANAC038* und der gemessenen Expressionsveränderungen in der Knockout Mutante erscheint *ANAC080* aber als ein interessanter Kandidat für weitergehende Untersuchungen, deren Fokus auf dem möglichen Zusammenspiel mit *ANAC038* liegen könnte.

Die vorgeschlagenen Funktionen von *ANAC038* beziehen sich überwiegend auf die Regulation der Genexpression. Dies ist in Anbetracht der vorgeschlagenen Sequenzspezifischen DNA bindenden Aktivität naheliegend. Doch sollen abschließend, wie bereits zuvor in 4.4.3 für *ANAC058* kurz weitere Möglichkeiten der Funktionsweise von *ANAC038* angesprochen werden, die über die Regulation auf Expressionsebene hinausgehen.

So wäre auch für *ANAC038* die Interaktion mit Transportern vorstellbar, deren Aufgabe im Transport von Suberinbausteinen über die Plasmamembran besteht. Denkbar wäre eine direkte Interaktion als negativer Regulator mit einem solchen Transporter. Weiterhin wäre aber auch vorstellbar, dass ein Suberin-Transporter unter der negativen Kontrolle eines oder mehrerer bislang unbekannter Regulatoren steht, die wiederum positiv durch *ANAC038* reguliert werden. In beiden beschriebenen Fällen würde der Knockout der Funktion von *ANAC038* zum Ausfall der negativen Regulation der Suberin-Transporter und damit zu einer erhöhten Suberinmenge führen. Untersuchungen der Protein-Protein Interaktion könnten dazu beitragen, diese These zu untermauern.

#### **4.5.8 Die Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *anac058/anac038-1* Pflanzen erinnert an die *anac038-1* Mutante**

Ein Vergleich der gemessenen Mengen der Suberinbestandteile in Wurzeln der Doppelmutante mit *anac058* und *anac038-1* zeigt eindeutig Parallelen zur letzteren Mutante

auf, da die Gesamtsuberinmenge signifikant erhöht war (vgl. 3.7.1). Dies bestätigt auch die morphologische Struktur der Blätter, die eindeutig dem der *anac038-1* Mutante zu Grunde liegenden Ökotyp zugeordnet werden konnte. Dieses Ergebnis kann ein Hinweis darauf sein, dass *ANAC038* im Vergleich zu *ANAC058* eine dominantere Funktion einnimmt und der Phänotyp der Doppelmutante daher dem der Knockout Mutante dieses Gens gleicht. In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, dass durch die erhöhte Menge an Gesamtsuberin, die als Folge des *ANAC038* Gen-Knockouts beobachtet wurde, die Reduktion des Gesamtsuberins, wie sie in der *anac058* Mutante identifiziert wurde, kompensiert werden kann.

Ob eine mögliche Interaktion zwischen *ANAC058* und *ANAC038* besteht lässt sich auf Basis dieser Daten nicht abschätzen. Auch hier sind weitere Untersuchungen wie zur Protein-Protein-Interaktion notwendig. Auch die Identifizierung möglicher Interaktionspartner könnte mit Hilfe eines Microarrays durch Messungen möglicher Veränderungen im Expressionslevel gelingen.

## **5 Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von an der Suberinbiosynthese beteiligten Genen und der Aufklärung ihrer Funktion, um diese in das bestehende Syntheschema einordnen zu können. Hierzu wurden durch Coexpressionsstudien mit charakterisierten Suberingenen die drei Transkriptionsfaktoren *MYB93*, *ANAC058* und *ANAC038* sowie die GDSL-Lipase *SiLip-2* identifiziert. Zur Aufklärung der Funktion wurden für alle Gene Knockout Mutanten identifiziert und chemisch charakterisiert.

Die Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *silip2*-Pflanzen wies eine signifikante Erhöhung der Gesamtmenge auf und die Mutanten Pflanzen zeigten eine deutlich verbesserte Toleranz gegenüber Trockenstress im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen. Diese verbesserte Toleranz wurde in der Diskussion mit der Erhöhung der Gesamtsuberinmenge in Verbindung gebracht und für *SiLip-2* eine spezifische Funktion als Suberin abbauende Esterase vorgeschlagen, die zu einer Begrenzung der Gesamtsuberinmenge beitragen könnte.

Die Analyse des Wurzelsuberins der *myb93* Pflanzen zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu WT-Pflanzen so dass das Gen nicht eindeutig mit der Suberinbiosynthese in Zusammenhang gebracht werden konnte.

In Wurzeln von *anac058* Knockout Pflanzen wurde eine Reduktion der Gesamtmenge des Wurzelsuberins gemessen, wohingegen die Überexpression zu keinen Veränderungen führte. Messungen der Genexpression zeigten die Induzierbarkeit von *ANAC058* durch Salzstress und Verwundung, weiterhin konnte in Blättern von Überexpressionsmutanten die Induktion diverser Suberingene beobachtet werden. Da Datenbankenanalysen für *ANAC058* eine Coexpression mit mehreren Esterasen vorhersagten, wird eine Rolle als negativer Regulator dieser Esterasen vorgeschlagen. Die Funktion könnte in der Begrenzung der Gesamtmenge des Suberinpolymers bestehen.

Die Analyse von zwei unabhängigen *anac038* Mutantenlinien ergab eine signifikante Steigerung der Gesamtmenge des Wurzelsuberins, durch Komplementation einer Mutantenlinie konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden. Die Expression von *ANAC038* in der Wurzel wurde durch Promoterstudien bestätigt. Die Überexpression von *ANAC038* führte zu keinen Veränderungen des Wurzelsuberins, die Gesamtmengen von Blattkutin und -wachsen waren jedoch reduziert.

Die *ANAC038* Expression wird durch Salz- und Verwundungsstress induziert und während Trockenstress zeigten *anac038* Pflanzen eine deutlich verbesserte Toleranz, die im Zusammenhang mit der gemessenen Erhöhung des Gesamtsuberinergehalts diskutiert wurde.



Da in Blättern von Überexpressionspflanzen eine Induktion verschiedener Suberingene gemessen werden konnte, wird für ANAC038 in Blättern eine Rolle während der Antwort auf Verwundungsstress diskutiert. Diese nimmt an, dass ANAC038 als eine Art Schlüsselaktivator auf transkriptioneller Ebene die Synthese von Suberingenen induziert, die mit Enzymen der Kutin- und Wachssynthese um Ausgangsbausteine konkurrieren, durch das erhöhte Expressionslevel wird der Suberinsynthese der Vorzug gegeben. In der Wurzel wird eine Funktion als Aktivator von bislang nicht identifizierten Enzymen vorgeschlagen, die spezifisch Esterbindungen mit monofunktionellen Suberinmonomeren wie Säuren, Alkoholen vermitteln und damit den Suberinpolyester abschließen und begrenzen könnten. Weiterhin wird eine mögliche Funktion als negativer Regulator von Transportern vorgeschlagen, die Suberinbausteine über die Zellmembran transportieren.

## **6 Literaturverzeichnis**

- Akoh, C. C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., & Shaw, J.-F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 534–52.
- Almeida, T., Menéndez, E., Capote, T., Ribeiro, T., Santos, C., & Gonçalves, S. (2013). Molecular characterization of *Quercus suber* MYB1, a transcription factor up-regulated in cork tissues. *Journal of Plant Physiology*, 170(2), 172–8.
- Arrieta-Baez, D., & Stark, R. E. (2006). Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochemistry*, 67(7), 743–753.
- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A. D., Matallana-Ramirez, L. P., Caldana, C., Mehrnia, M., ... Mueller-Roeber, B. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*, 62(2), 250–64.
- Baxter, I., Hosmani, P. S., Rus, A., Lahner, B., Borevitz, J. O., Muthukumar, B., Mickelbart, M.-V., Schreiber, L., Franke, R., & Salt, D. E. (2009). Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 5(5), 1–12.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(1), 351–368.
- Bernards, M. A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 227–240.
- Bernards, M. A., Fleming, W. D., Llewellyn, D. B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A., & Plourde, G. L. (1999). Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology*, 121(1), 135–145.
- Bernards, M. A., & Lewis, N. G. (1998). The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry*, 47(6), 915–33.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., & Benfey, P. N. (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, 302(5652), 1956–1960.
- Brady, S. M., Orlando, D. a, Lee, J.-Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., Mace, D., Ohler, U., Benfey, P. N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, 318(5851), 801–806.
- Brundrett, M. C., Kendrick, B., & Peterson, C. A. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(3), 111–6.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Müller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.-W., Shipley, G.-L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The

- MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–22.
- Chen, Q., Wang, Q., Xiong, L., & Lou, Z. (2011). A structural view of the conserved domain of rice stress-responsive NAC1. *Protein & Cell*, 2(1), 55–63.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743.
- Collinge, M., & Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology*, 46(5), 521–529.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., & Tonelli, C. (2008). Over-expression of the *Arabidopsis* AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 53(1), 53–64.
- Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., Franke, R., & Pinot, F. (2009). CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha, omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiology*, 150(4), 1831–43.
- Consortium, T. U. (2013). Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D43–D47.
- De Block, M., & Debrouwer, D. (1992). In - situ enzyme histochemistry on plastic - embedded plant material. The development of an artefact - free  $\beta$  - glucuronidase assay. *The Plant Journal*, 2(2), 261–266.
- Deas, A. H. B., & Holloway, P. J. (1977). The intermolecular structure of some plant cutins. In M. Tevini & H. Lichtenthaler (Eds.), *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants SE - 16* (pp. 293–299). Springer Berlin Heidelberg.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I. W., Van Der Straeten, D., Manners, J., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 43(5), 745–57.
- Domergue, F., Vishwanath, S. J., Joubès, J., Ono, J., Lee, J. a, Bourdon, M., Alhattab, R., Lowe, C., Pascal, S., Lessire, R., & Rowland, O. (2010). Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiology*, 153(4), 1539–54.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A., & Ma, F. (2003). Root endodermis and exodermis: structure, function and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335–351.

- Ernst, H. A., Olsen, A. N., Larsen, S., & Lo Leggio, L. (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Reports*, 5(3), 297–303.
- Feuillet, C., Lauvergeat, V., Deswarte, C., Pilate, G., Boudet, A., & Grima-Pettenati, J. (1995). Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Molecular Biology*, 27(4), 651–667.
- Franke, R. B., Dombrink, I., & Schreiber, L. (2012). Suberin goes genomics: Use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. *Frontiers in Plant Science*, 3(4), 1–8.
- 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(22), 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-micropyle region of seeds. *The Plant Journal*, 57(1), 80–95.
- Franke, R., McMichael, C. M., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., & Chapple, C. (2000). Modified lignin in tobacco and poplar plants over - expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5 - hydroxylase. *The Plant Journal*, 22(3), 223–234.
- Franke, R., & Schreiber, L. (2007). Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 252–259.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436–442.
- Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.-L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., & Bakan, B. (2012). Tomato GDGL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *The Plant Cell*, 24(7), 3119–34.
- Graça, J., & Pereira, H. (1997). Cork suberin: a glyceryl based polyester. *Holzforschung*, 51, 225–234.
- Graça, J., & Santos, S. (2007). Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromolecular Bioscience*, 7(2), 128–35.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3), 965–973.
- Greve, K., La Cour, T., Jensen, M. K., Poulsen, F. M., & Skriver, K. (2003). Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins:

- RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochemical Journal*, 371, 97–108.
- Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, 311(1), 98–99.
- Hao, Y.-J., Wei, W., Song, Q.-X., Chen, H.-W., Zhang, Y.-Q., Wang, F., Zou H.-F., Lei, G., Tian, A.-G., Zhang, W.-K., Ma, B., Zhang, J.-S., Chen, S.-Y. (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal*, 2, 1–12.
- He, X.-J., Mu, R.-L., Cao, W.-H., Zhang, Z.-G., Zhang, J.-S., & Chen, S.-Y. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, 44(6), 903–16.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S., Lydiate, D. (2003). Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 53(3), 383–397.
- Hellman, L. M. & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849–1861.
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620(1-3), 1–7.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., & Prat, S. (1992). General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *The Plant Cell*, 4(9), 1157–70.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L. & Franke, R. (2008). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2347–2360.
- Hong, J., Choi, H., Hwang, I., Kim, D., Kim, N., Choi, D., Kim, Y. & Hwang, B. (2008). Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta*, 227(3), 539–558.
- Hooker, T. S., Millar, A. A., & Kunst, L. (2002). Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129, 1568–1580.
- Hose, E., Clarkson, D. T., Steudle, E., Schreiber, L., & Hartung, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2245–64.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., & Xiao, B. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS*, 1(31), 12987–12992.

- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., & Xiong, L. (2008). Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 67(1-2), 169–181.
- Jeffree, C. E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle* (pp. 11–125). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Jensen, M. K., Hagedorn, P. H., de Torres-Zabala, M., Grant, M. R., Rung, J. H., Collinge, D. B., & Lyngkjaer, M. F. (2008). Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 56(6), 867–80.
- Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M. M., Galberg, P., Petersen, K., O’Shea, C., & Skriver, K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *The Biochemical Journal*, 426(2), 183–196.
- Jeong, J., Park, Y., Jung, H., Park, S.-H., & Kim, J.-K. (2009). Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. *Plant Biotechnology Reports*, 3(2), 127–134.
- Jeong, J. S., Kim, Y. S., Baek, K. H., Jung, H., Ha, S.-H., Do Choi, Y., Kim, M., Reuzeau, C. & Kim, J.-K. (2010). Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*, 153(1), 185–197.
- Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, L. (2006). Composition of plant cuticular waxes. In M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle* (pp. 145–181). Oxford, UK: Blackwell.
- Jetter, R., & Schäffer, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 126(4), 1725–37.
- Jia, L., Clegg, M. T., & Jiang, T. (2004). Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies *indica* and *japonica* genomes. *Plant Physiology*, 134, 575–585.
- Johnson-Flanagan, A. M., & Owens, J. N. (1985). Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] voss) seedling roots. *Plant Physiology*, 79, 103–107.
- Jorgensen, R. A., Atkinson, R. G., Forster, R. L. S., & Lucas, W. J. (1998). An RNA-based information superhighway in plants. *Science*, 279(5356), 1486–1487.
- Joubès, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domergue, F., & Lessire, R. (2008). The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 67(5), 547–566.

- Kandel, S., Sauveplane, V., Olry, A., Diss, L., Benveniste, I., & Pinot, F. (2006). Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews*, 5(2-3), 359–372.
- Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A., & Che, F.-S. (2009). The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *The EMBO Journal*, 4(8), 740–2.
- Khraiwesh, B., Zhu, J.-K., & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 137–148.
- Kim, H. S., Park, B. O., Yoo, J. H., Jung, M. S., Lee, S. M., Han, H. J., Kim, K.-E., Kim, S.-H., Lim, C.-O., Yun, D.-J., Lee, S.-Y., & Chung, W. S. (2007). Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36292–302.
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of analytical derivatization reactions*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kolattukudy, P. (2001). Polyesters in higher plants. In W. Babel & A. Steinbüchel (Eds.), *Biopolyesters 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (71st ed., Vol. 71, pp. 1–49). Springer Berlin Heidelberg.
- Kolattukudy, P., & Center, N. (1996). Plant cuticles-an integrated functional approach. *Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford*, 50–61.
- Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, 208(4447), 990–1000.
- Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 539–567.
- Kolattukudy, P. E., Croteau, R., & Buckner, J. (1976). Biochemistry of plant waxes. In P. Kolattukudy (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes* (pp. 289–347). Amsterdam: Elsevier B.V.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H. S., Schreiber, L., & Mathew, M. K. (2009). The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 230(1), 119–34.
- Kurata, T., Okada, K., & Wada, T. (2005). Intercellular movement of transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 600–605.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bär, S., Voisin, D., Efremova, N., Tietjen K., Schreiber S., Saedler, H., & Yephremov, A. (2006). The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(February), 321–339.



- Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., Eschen-Lippold, L., Senning, M., Sonnewald, S., Weigel, B., Frolova, N., Strehmel, N., Hause, G., Scheel D., Böttcher, C., & Rosahl, S. (2014). The ABC transporter ABCG1 is required for suberin formation in potato tuber periderm. *The Plant Cell Online*, 26(8).
- Lasserre, E., Jobet, E., Llauro, C., & Delseny, M. (2008). AtERF38 (At2g35700), an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1051–1061.
- Lee, J.-Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U., & Benfey, P. N. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in *Arabidopsis* roots. *PNAS*, 103(15), 6055–6060.
- Lenz, H., Dombinov, V., Dreistein, J., Reinhard, M. R., Gebert, M., & Knoop, V. (2013). Magnesium deficiency phenotypes upon multiple knockout of *Arabidopsis thaliana* MRS2 clade B genes can be ameliorated by concomitantly reduced calcium supply. *Plant & Cell Physiology*, 54(7), 1118–31.
- Li, A. C., Ng, C. K.-Y., & Fan, L.-M. (2014). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*, im Druck.
- Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J. K., Molina, I., Pollard, M., & Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *PNAS*, 104(46), 18339–18344.
- Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J., & Pollard, M. (2007). Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase. *Plant Physiology*, 144(3), 1267–1277.
- Ling, H. (2008). Sequence analysis of GDSL lipase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(5), 763–767.
- Liu, X., Hong, L., Li, X.-Y., Yao, Y., Hu, B., & Li, L. (2011). Improved drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(3), 443–450.
- Lu, P.-L., Chen, N.-Z., An, R., Su, Z., Qi, B.-S., Ren, F., ... Wang, X.-C. (2007). A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 63(2), 289–305.
- Lulai, E. C., & Corsini, D. L. (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.
- Mattinen, M.-L., Filpponen, I., Järvinen, R., Li, B., Kallio, H., Lehtinen, P., & Argyropoulos, D. (2009). Structure of the polyphenolic component of suberin isolated from potato

- (*Solanum tuberosum* var. Nikola). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9747–53.
- 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.
- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R. E., & Ryser, U. (1999). Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiology*, 119(March), 1137–1146.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2009). Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiology*, 151(3), 1317–28.
- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., Girke, T., & Bailey-Serres, J. (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *PNAS*, 106(44), 18843–18848.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 97–103.
- Nakashima, K., Tran, L.-S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617–630.
- Naranjo, M. A., Forment, J., Roldán, M., Serrano, R., & Vicente, O. (2006). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 29(10), 1890–900.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., & Geldner, N. (2012). Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *PNAS*, 109(25), 10101–6.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R. B., Geldner, N., Reina-Pinto, J. J., & Kunst, L. (2013). Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book* (pp. 1–35). The American Society of Plant Biologists.
- Nosbüsch, D. (2009). *Untersuchung des  $\beta$ -Ketoacyl-CoA Synthase-Gens At4g34510 in Arabidopsis thaliana*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Obayashi, T., Kinoshita, K., Nakai, K., Shibaoka, M., Hayashi, S., Saeki, M., Shibata, D., Saito, K., & Ohta, H. (2007). ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 35, D863–D869.

- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S., & Sarai, A. (1996). The cavity in the hydrophobic core of MYB DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature Structural Biology*, *3*, 178–187.
- Oh, I. S., Park, A. R., Bae, M. S., Kwon, S. J., Kim, Y. S., Lee, J. E., Kang, N., Lee, S., Cheong, H., & Park, O. K. (2005). Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell*, *17*, 2832–2847.
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. Lo, & Skriver, K. (2005). DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science*, *169*(4), 785–797.
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. Lo, & Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, *10*(2), 79–87.
- Olson, D. A., & Sheares, V. V. (2006). Preparation of unsaturated linear aliphatic polyesters using condensation polymerization. *Macromolecules*, *39*, 2808–2814.
- Olsson, A., Lindström, M., & Iversen, T. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of an epoxy-functionalized polyester from the suberin monomer cis-9, 10-epoxy-18-hydroxyoctadecanoic acid. *Biomacromolecules*, *8*, 757–760.
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzui, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., & Kikuchi, S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, *10*(6), 239–47.
- Panikashvili, D., Shi, J. X., Bocobza, S., Franke, R. B., Schreiber, L., & Aharoni, A. (2010). The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Molecular Plant*, *3*(3), 563–575.
- Park, J.-J., Jin, P., Yoon, J., Yang, J.-I., Jeong, H. J., Ranathunge, K., Schreiber, L., Franke R., Lee, I., & An, G. (2010). Mutation in Wilted Dwarf and Lethal 1 (WDL1) causes abnormal cuticle formation and rapid water loss in rice. *Plant Molecular Biology*, *74*(1-2), 91–103.
- Pighin, J. A., Zheng, H., Balakshin, L. J., Goodman, I. P., Western, T. L., Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, A. L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science*, *306*(5696), 702–704.
- Pinot, F., & Beisson, F. (2011). Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *The FEBS Journal*, *278*(2), 195–205.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, *13*(5), 236–46.
- Puranik, S., Bahadur, R., Srivastava, P., & Prasad, M. (2011). Molecular cloning and characterization of a membrane associated NAC family gene, SiNAC from foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Molecular Biotechnology*, *49*(2), 138–150.

- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., & Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, *17*(6), 369–81.
- Quinn, D. M., Shirai, K., Jackson, R. L., & Harmony, J. A. K. (1982). Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. *Biochemistry*, *21*(26), 6872–6879.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F., de Forchetti, S.-M., Tigier, H., & Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, *122*(4), 1119–1127.
- Raffaele, S., Vailleau, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F., Roby, D. (2008). A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *20*(3), 752–67.
- Ranathunge, K., & Schreiber, L. (2011). Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1961–1974.
- Ranathunge, K., Schreiber, L., & Franke, R. (2011). Suberin research in the genomics era—new interest for an old polymer. *Plant Science*, *180*(3), 399–413.
- Razem, F. A., & Bernards, M. A. (2002). Hydrogen peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1009–1015.
- Razem, F. A., & Bernards, M. A. (2003). Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase. *Journal of Experimental Botany*, *54*(384), 935–941.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.-J., Samaha, R.-R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.-Z., Ghandehari, D., Sherman, B.-K., & Yu, G.-L. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, *290*(5499), 2105–2110.
- Riederer, M. & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, *52*(363), 2023–32.
- Ríos, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jásik, J., Winter, J., Ferrando, A., Farrás, R., Panicot, M., Henriques, R., Mariaux, J.-B., Ober-schall, A., Molnár, G., Berendzen, K., Shukla, V., Lafos, M., Loncz, Z., Rédei, G., Schell, J., & Koncz, C. (2002). Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *The Plant Journal*, *32*(2), 243–253.
- Samuels, L., Kunst, L., & Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 683–707.

- Schreiber, L. & Franke, R. B. (2011). Endodermis and exodermis in roots. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–7). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Schreiber, L., Franke, R., & Hartmann, K. (2005). Effects of NO<sub>3</sub> deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizo- and hypodermal (rhcw) and endodermal cell walls (ecw) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. *Plant and Soil*, *269*(1-2), 333–339.
- Schreiber, L., Franke, R., Hartmann, K.-D., Ranathunge, K. & Steudle, E. (2005). The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany*, *56*(415), 1427–36.
- 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*(337), 1267–1280.
- Seo, P. J., Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M.-J., Go, Y. S., & Park, C.-M. (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *23*(3), 1138–1152.
- 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*(1), 419–31.
- Song, S.-Y., Chen, Y., Chen, J., Dai, X.-Y. & Zhang, W.-H. (2011). Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta*, *234*(2), 331–345.
- Sunkar, R., Bartels, D., & Kirch, H.-H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, *35*(4), 452–464.
- Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2010). Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *51*(1), 123–31.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Nakashima, K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, *284*(3), 173–183.
- Taleisnik, E., Peyrano, G., Cordoba, A., & Arias, C. (1999). Water retention capacity in root segments differing in the degree of exodermis development. *Annals of Botany*, *83*, 19–27.
- Theobald, S. (2012). *Characterization of the Arabidopsis thaliana genes At5g14130 and At2g24430 in the suberin biosynthetic pathway*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Thomson, N., Evert, R. F., & Kelman, A. (1995). Wound healing in whole potato tubers: a cytochemical, fluorescence, and ultrastructural analysis of cut and bruise wounds. *Canadian Journal of Botany*, 73(9), 1436–1450.
- Tian, S., Fang, X., Wang, W., Yu, B., Cheng, X., Qiu, F., Mort, A., Stark, R. E. (2008). Isolation and identification of oligomers from partial degradation of lime fruit cutin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10318–25.
- Tran, L.-S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fumita, Y., Maruyama, K., Futjita, M., Seki M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress. *The Plant Cell*, 16, 2481–2498.
- Tulloch, A. P. (1976). Chemistry of waxes of higher plants. In P. Kolattukudy (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes* (pp. 235–287). Amsterdam: Elsevier.
- Upton, C., & Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5), 178–179.
- Villena, J. F., Domínguez, E., Stewart, D., & Heredia, A. (1999). Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta*, 208(2), 181–187.
- Volokita, M., Rosilio-Brami, T., Rivkin, N., & Zik, M. (2011). Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDSL-lipase family in land plants. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 551–565.
- Welner, D. H., Lindemose, S., Grossmann, J. G., Møllegaard, N. E., Olsen, A. N., Helgstrand, C., Skriver, K., & Lo Leggio, L. (2012). DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *The Biochemical Journal*, 444(3), 395–404.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2(8).
- Wu, Y., Deng, Z., Lai, J., Zhang, Y., Yang, C., Yin, B., Zhao, Q., Zhang, L., Li, Q., Yang, C., & Xie, Q. (2009). Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Research*, 19(11), 1279–1290.
- Xia, N., Zhang, G., Liu, X.-Y., Deng, L., Cai, G.-L., Zhang, Y., Wang, X.-J., Zhao, J., Huang, L.-L., & Kang, Z.-S. (2010). Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 37(8), 3703–3712.
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I. Q., Rothstein, S. J., & Reed, J. W. (2014). ABCG Transporters Are Required for Suberin and Pollen Wall Extracellular Barriers in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 26(8).

- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., & Demura, T. (2010). VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *22*(4), 1249–63.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K. (1992). 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, *33*(3), 217–224.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant Physiology*, *101*(3), 1119–20.
- Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., & Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *PNAS*, *107*(26), 12040–12045.
- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A., Buda G., Domozych, D., Clausen, M.-H., Rose, J. K. C. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology*, *8*, 609–611.
- Zeisler, V. V. (2013). *Die pflanzliche Kutikula - Aufbau, Funktion und epiphyller Lebensraum*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Zeller, G., Henz, S. R., Widmer, C. K., Sachsenberg, T., Rättsch, G., Weigel, D., & Laubinger, S. (2009). Stress-induced changes in the Arabidopsis thaliana transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *The Plant Journal*, *58*(6), 1068–1082.
- Zhang, H., Jin, J., Tang, L., Zhao, Y., Gu, X., Gao, G., & Luo, J. (2011). PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, *39*, D1114–1117.
- Zhao, Q., & Dixon, R. A. (2011). Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends in Plant Science*, *16*(4), 227–233.
- Zhong, R., & Ye, Z.-H. (2009). Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(11), 1028–1034.
- Zimmermann, H. M., 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*, 302–211.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology*, *136*, 2621–2632.

## **7 Anhang**



## 7.1 Verwendete Lösungen und Medien

<b>Samensterilisationslösung</b>		<b>Inokulationsmedium</b>	
10,50 ml	Aqua demin.	5,00 %	Saccharose (w/v)
2,00 ml	12 % NaHClO	0,05 %	Silwet L-7 (v/v)
12,50 ml	100 % Ethanol		in Leitungswasser
<b>TE-Puffer</b>		<b>Sudan Rot 7B Färbelösung</b>	
10,00 mM	Tris-HCl (pH = 7,4)	0,10 %	Sudan Rot 7B (w/v)
1,00 mM	EDTA	in 50 ml	PEG-400 (für 1 h bei 90 °C gelöst)
<b>6 x Gelladepuffer</b>		50,00 ml	90 % Glycerin (v/v)
10,50 ml	Aqua demin.	<b>Enzymlösung</b>	
2,00 ml	12 % NaHClO	2 %	Cellulase
<b>SOC-Medium</b>		2 %	Pektinase
20,00 g/l	Trypton	0,10 M	Zitronensäuremonohydrat
5,00 g/l	Hefeextrakt	0,10 %	NaN <sub>3</sub>
0,50 g/l	NaCl		pH = 3
0,50 mM	KCl	<b>MS-Agar</b>	
	pH = 7,0; Autoklavieren	15,0 g/l	Saccharose
5,00 ml	2 M MgCl <sub>2</sub> (steril)	4,4 g/l	MS-Medium (Duchefa)
20,00 ml	1 M Glucose (steril)		pH = 5,7
<b>LB Agar</b>		7 g/l	Agar
LB Medium			Autoklavieren
1 %	Agar (w/v)		
	pH = 7,2; Autoklavieren		

## 7.2 Verwendete Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSTFA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Chloroform	für Analyse $\geq 99$ %, Merck, Darmstadt, Deutschland
Cellulase	0,8 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citronensäure- monhydrat	$\geq 99$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	für Analyse $\geq 99$ %, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	$\geq 99$ %, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	$\geq 99$ %, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	$\geq 99$ %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesium- chlorid	$\geq 99$ %, Acros Organics, Geel, Belgien
Methanol	für Analyse $\geq 99$ %, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Boise, Frankreich
MS-Medium	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Natriumazid	$\geq 99$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	$\geq 99$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypo- chlorit (NaHClO)	12 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pektinase	$> 1$ U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PEG-400	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pyridin	$\geq 99$ %, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saccharose	$\geq 99$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silikonfett	Wacker Chemie GmbH, München, Deutschland
Sudan Rot 7B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TRIS	$\geq 99$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 7.3 Berechnung der Hybridisierungstemperatur verwendeter Primer und Primertabelle

**Formel 1:** Berechnung der Schmelztemperatur der verwendeten Primer

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

$T_M$ : Schmelztemperatur,  $\sum G$ : Gesamtzahl der Guanin-Nukleotide in der Nukleotidsequenz des Primers,  $\sum C$ : Gesamtzahl der Cytosin-Nukleotide in der Nukleotidsequenz des Primers,  $\sum Basen$ : Gesamtzahl der Basen des Primers

**Formel 2:** Berechnung der Hybridisierungstemperatur der verwendeten Primer

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

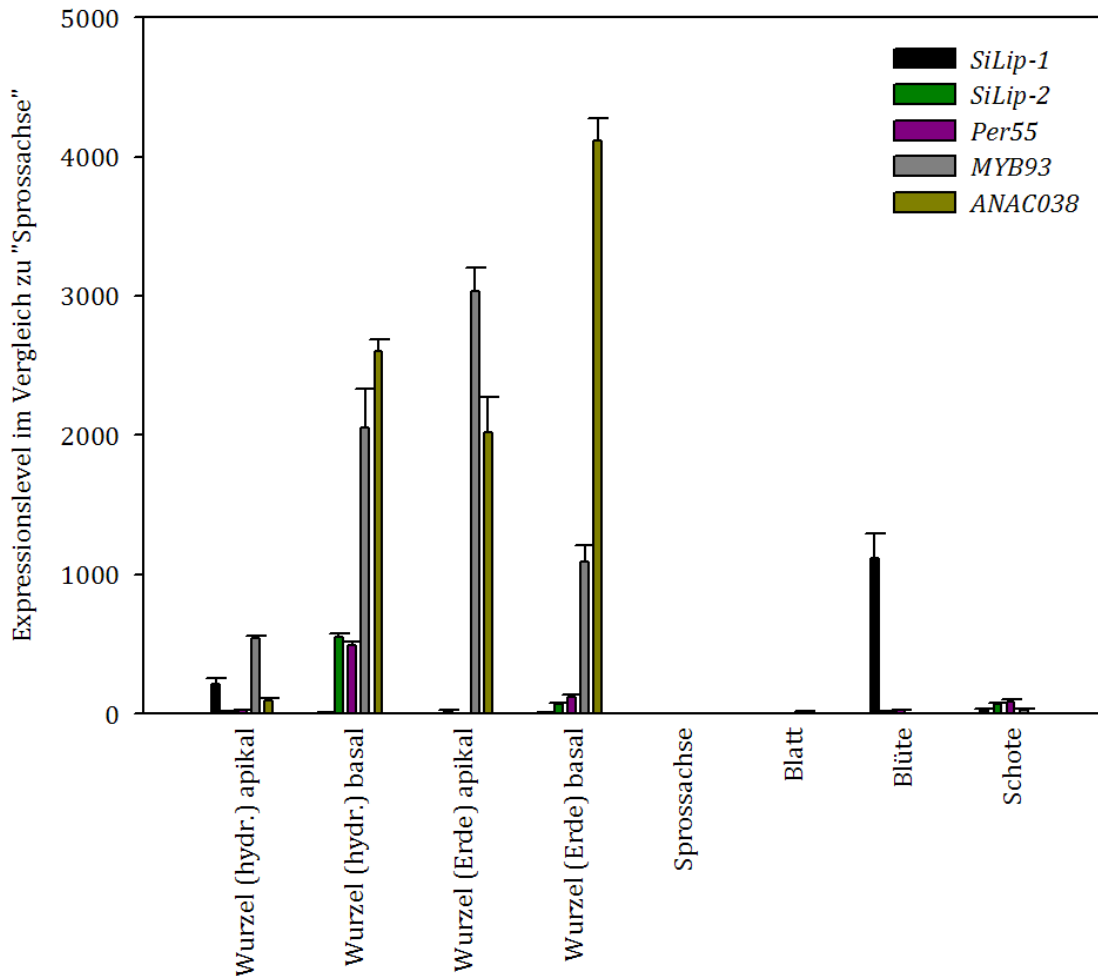
$T_A$ : Hybridisierungstemperatur,  $T_M$ : Schmelztemperatur

<u>Zielgen</u>	<u>Primer</u>	<u>Sequenz (5'-3')</u>	<u>Beschreibung der Primer</u>	<u>Hybridisierungstemperatur [°C]</u>
At2g31550 ( <i>SiLip-1</i> )	<b>LS799</b>	TTGGAGTTCAGTTGGAATCAAG	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_032515. Zu benutzen mit LS800. Produktgröße: 1170 bp	56.53
At2g31550 ( <i>SiLip-1</i> )	<b>LS800</b>	AACCTCCAACCAAAACATTCC	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_032515. Zu benutzen mit LS799. Produktgröße: 1170 bp	55.92
At2g23540 ( <i>SiLip-2</i> )	<b>LS793</b>	TGTTGGGGACTAGAATCACATG	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_033359. Zu benutzen mit LS794. Produktgröße: 1170 bp	58.39
At2g23540 ( <i>SiLip-2</i> )	<b>LS794</b>	TCCGGCTAATAAAGCTTTTCC	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_033359. Zu benutzen mit LS793. Produktgröße: 1170 bp	55.92
At5g14130 ( <i>Peroxi-dase</i> )	<b>LS783</b>	GGCTACAATAGAGGAACCGTTG	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie GK-727C12. Zu benutzen mit LS784. Produktgröße: 1110 bp	60.25
At5g14130 ( <i>Peroxi-dase</i> )	<b>LS784</b>	GAAAGTGGACTTACGAGCACG	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie GK-727C12. Zu benutzen mit LS783. Produktgröße: 1110 bp	59.82
At1g34670 ( <i>MYB93</i> )	<b>LS785</b>	GGCTTCGTCGCTAGCTAGAAG	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_131752. Zu benutzen mit LS786. Produktgröße: 1101 bp	61.78
At1g34670 ( <i>MYB93</i> )	<b>LS786</b>	TTTAAGAGGTTTCATGGCATGG	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_131752. Zu benutzen mit LS785. Produktgröße: 1101 bp	55.92
At3g18400 ( <i>ANAC058</i> )	<b>LS996</b>	ATTGGGCTCATTTGCTCTGCT	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie GABI_465E07. Zu benutzen mit LS997.	57.87
At3g18400 ( <i>ANAC058</i> )	<b>LS997</b>	CGGGCAACAGAAGCTGGTTA	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie GABI_465E07. Zu benutzen mit LS996.	59.35
At2g24430 ( <i>ANAC038</i> )	<b>LS906</b>	AGCTTATCGAACGGAGGCTA	Forward Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_103716. Zu benutzen mit LS907. Produktgröße: 1099 bp	57.30
At2g24430 ( <i>ANAC038</i> )	<b>LS907</b>	TTGGCGATTTAGCTGACTTTT	Reverse Primer zum Genotypisieren der T-DNA Insertionslinie SALK_103716. Zu benutzen mit LS906. Produktgröße: 1099 bp	53.97
T-DNA (SALK)	<b>LS378</b>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Insertions-spezifischer Primer (SALK-Linien)	52.35
T-DNA (GABI-Kat)	<b>LS537</b>	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Insertions-spezifischer Primer (GABI-Kat-Linien)	55.30
T-DNA (SAIL)	<b>LS820</b>	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	Insertions-spezifischer Primer (SAIL-Linien, hergestellt mit dem pDAP01-Vektor)	63.45
T-DNA (Enhancer Trap)	<b>LS569</b>	AAATCGGTTATACGATAACGGTC	Insertions-spezifischer Primer (Enhancer Trap-Linien)	57.08
At3g18400 ( <i>ANAC058</i> )	<b>LS1084</b>	CTTATAGTTTCCCAAAAGAGATGATCC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1085, Produktgröße: 80 bp	60.41
At3g18400 ( <i>ANAC058</i> )	<b>LS1085</b>	CATTTTGGATCATATTGGAGACTCCTT	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1084, Produktgröße: 80 bp	60.41
At4g29230 ( <i>ANAC075</i> )	<b>LS1042</b>	CACAAGCTCGAAGCAAACCAC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1043, Produktgröße: 63 bp	62.12
At4g29230 ( <i>ANAC075</i> )	<b>LS1043</b>	TGGGTCAAATTTCACTCCTGCTG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1042, Produktgröße: 63 bp	60.65

At1g28470 ( <i>ANAC010</i> )	<b>LS1044</b>	ATCACCAAGACGACCAGGTTGG	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1045, Produktgröße: 64 bp	62.12
At1g28470 ( <i>ANAC010</i> )	<b>LS1045</b>	AATTTGACTCCTGCCGGTAAGC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1044, Produktgröße: 64 bp	60.25
At5g18270 ( <i>ANAC087</i> )	<b>LS1046</b>	AGCCTTGGGATTTGCCAAAGAGG	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1047, Produktgröße: 91 bp	62.43
At5g18270 ( <i>ANAC087</i> )	<b>LS1047</b>	CTCATCCAGTCGGATACTTCTCG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1046, Produktgröße: 91 bp	64.43
At5g07680 ( <i>ANAC080</i> )	<b>LS1048</b>	AGCCATGGGAGTTGCCATATAAAG	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1049, Produktgröße: 105 bp	61.01
At5g07680 ( <i>ANAC080</i> )	<b>LS1049</b>	TTGCTCGGTTAGTCCTCAGACC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1048, Produktgröße: 105 bp	62.12
At5g56620 ( <i>ANAC099</i> )	<b>LS1050</b>	TCACCATGGTTCCAAGGACGTG	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1051, Produktgröße: 64 bp	62.12
At5g56620 ( <i>ANAC099</i> )	<b>LS1051</b>	GGCAGCTACGCTGGAATCTCATC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1050, Produktgröße: 64 bp	64.43
At5G52310 ( <i>RD29A</i> )	<b>LS1052</b>	TGGACAAAGCAATGAGCATGAGC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1053, Produktgröße: 109 bp	60.65
At5G52310 ( <i>RD29A</i> )	<b>LS1053</b>	AGGTTTACCTGTTACGCCTGGTG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1052, Produktgröße: 109 bp	62.43
At1g01610 ( <i>GPAT4</i> )	<b>LS1060</b>	TGAAAGAGTTCGGCGATGACTCAC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1061, Produktgröße: 99 bp	62.72
At1g01610 ( <i>GPAT4</i> )	<b>LS1061</b>	CATGCACCATGTAACCTTCTTGC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS1060, Produktgröße: 99 bp	62.72
At4g34510 ( <i>KCS17</i> )	<b>LS600</b>	GGTAGCGGGTTTAAGTGAACAGC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS601, Produktgröße: 65 bp	62.72
At4g34510 ( <i>KCS17</i> )	<b>LS601</b>	TTAACCGAGGGCTCGACATTGC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS600, Produktgröße: 65 bp	62.12
At1g13440 ( <i>GAPDH</i> )	<b>LS602</b>	TTGGTGACAACAG GTCAAGCA	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS603, Produktgröße: 62 bp	57.87
At1g13440 ( <i>GAPDH</i> )	<b>LS603</b>	AAACTGTGCTGCTCAATGCAATC	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS602, Produktgröße: 62 bp	56.53
At5g23190 ( <i>CYP86B1</i> )	<b>LS604</b>	TCCCGTGGATCACAAAGAGGT TC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS605, Produktgröße: 112 bp	62.43
At5g23190 ( <i>CYP86B1</i> )	<b>LS605</b>	AGCTTCCATACGACCCATTGCG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS604, Produktgröße: 112 bp	62.12
At5g58860 ( <i>CYP86A1</i> )	<b>LS606</b>	GTTTACCTCAAGGCTGCTTTGGC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS607, Produktgröße: 64 bp	62.43
At5g58860 ( <i>CYP86A1</i> )	<b>LS607</b>	TGAAAT CCTGAGGCACAGAAGGG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS606, Produktgröße: 64 bp	62.43

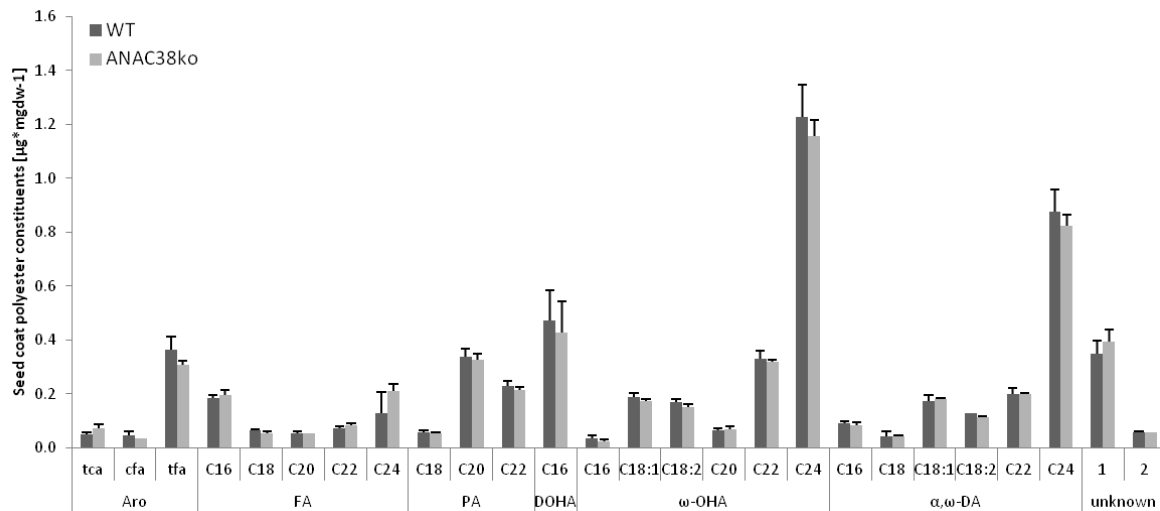
At5g41040 ( <i>ASFT</i> )	<b>LS610</b>	ACGATGTCGTAGACGCCAAGAAC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS611, Produktgröße: 60 bp	62.43
At5g41040 ( <i>ASFT</i> )	<b>LS611</b>	TAGTC ACCTGAGCGGTAACAGG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS610, Produktgröße: 60 bp	62.12
At3g11430 ( <i>GPAT5</i> )	<b>LS638</b>	ACGGATAGGATTGTTCCGGTTGC	Forward Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS639, Produktgröße: 60 bp	62.43
At3g11430 ( <i>GPAT5</i> )	<b>LS639</b>	TGTAGTCGCGTGGAAGAATCCG	Reverse Primer zur Messung der Expression mit Hilfe der qRT-PCR. Zu benutzen mit LS638, Produktgröße: 60 bp	62.12

## 7.4 RTQ-Expressionsmessungen durch Daniela Nosebusch



**Abbildung 64: Expressionsmessungen der Kandidatengene in unterschiedlichen Pflanzenorganen**  
 Expression der Gene *SiLip-1*, *SiLip-2*, *Per55*, *MYB93* und *ANAC038* in apikalen und basalen Bereichen von Wurzeln aus hydroponischen (hydr.) Kammern und Erdanzucht, Sprossachse, Blatt, Blüte und Schote. Die Expression in der Sprossachse wurde als Referenzmessung willkürlich auf den Wert 1 gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 oder 4 Messungen. Für die Expression im apikalen Bereich auf Erde gewachsener Wurzeln waren keine Messwerte verfügbar für die Gene *SiLip-1* und *PER55*, für die Expression im Blatt waren keine Messwerte verfügbar für die Gene *SiLip-1* und *ANAC038*.

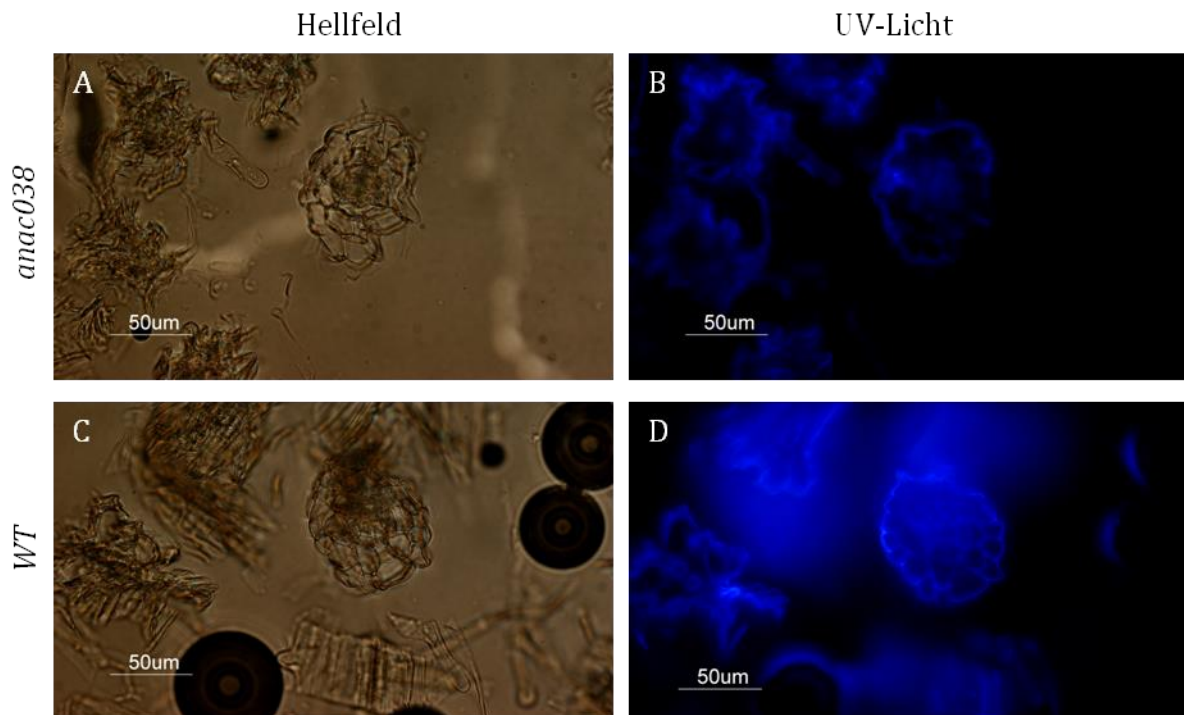
## 7.5 Analyse der Samenschalenpolyester von *anac038-1* Pflanzen (Sebastian Theobald, 2012)



**Abbildung 65: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalensuberins der Knockout Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps**

Zusammensetzung der Monomere des Samenschalensuberins der Mutante *anac038-1* und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Parallelen  $\pm$  Standardabweichung. FA: Monocarbonsäuren, PA: primäre Alkohole, DOHA: Dihydroxysäuren,  $\omega$ -OHA:  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha,\omega$ -DA:  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren, 2-Hydroxysäuren: 2-Hydroxysäuren, tca: trans-Coumarsäure, cfa: cis-Coumarsäure, tfa: trans-Ferulasäure (Theobald, 2012).

## 7.6 Querschnitte von *anac038-1* und WT-Wurzeln

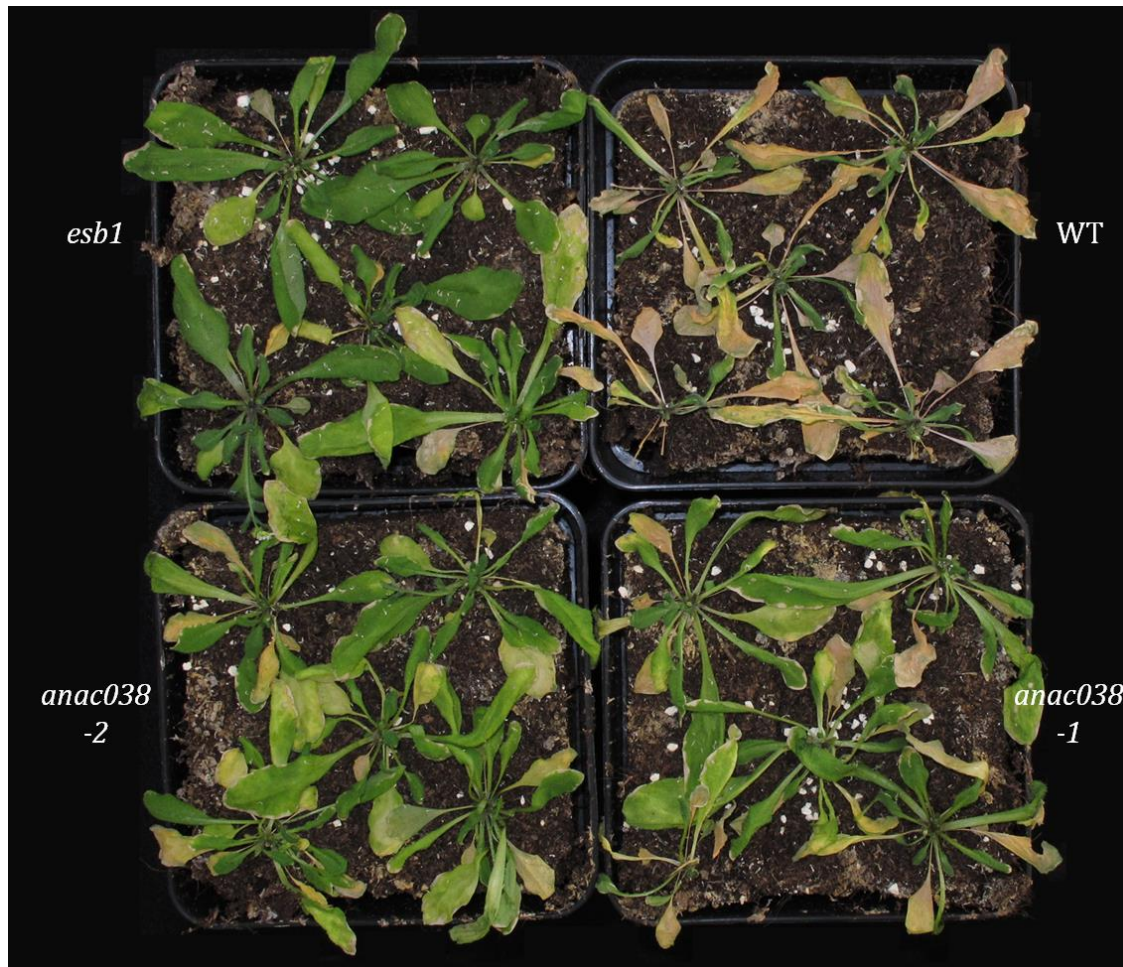


**Abbildung 66: Querschnitte von *anac038-1* und WT-Wurzeln**

Die Querschnitte wurden im Hellfeld (A und C) sowie zur Detektion der Autofluoreszenz im UV-Licht betrachtet (B und D). Der direkte Vergleich zwischen *anac038* (A und B) und WT (C und D) ergab keine strukturellen Unterschiede.



## 7.7 Trockenstressexperiment mit *anac038-1* und *anac038-2*



**Abbildung 67: *anac038* und WT-Pflanzen nach 12-tätigem Trockenstress**

*anac038-1*, *anac038-2* und WT-Pflanzen wurden zwölf Tage lang nicht gegossen, als Positivkontrolle fungierte die trockenstresstolerante und Suberin reichere *esb1* Mutante. Weitere Kontrollpflanzen nicht dargestellt.

## 7.8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch ein Blatt mit aufliegender Kutikula .....	3
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt einer jungen Wurzel mit Suberinauflagerung in der Endodermis und TEM-Aufnahme des Querschnitts einer Wurzel von <i>A. thaliana</i> .....	5
Abbildung 3: Gängige Modellvorstellungen des Aufbaus des Suberinpolymers .....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese der Suberinmonomere.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines typischen NAC Proteins .....	12
Abbildung 6: Funktionsprinzip der Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten ...	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung der BP-Reaktion .....	29
Abbildung 8: Vektorkarte des Donor-Vektors pDONR®/Zeo .....	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung der LR-Reaktion.....	31
Abbildung 10: Vektorkarte des Zielvektors pMDC32 .....	31
Abbildung 11: Vektorkarte des Zielvektors pMDC162.....	32
Abbildung 12: Vektorkarte des Zielvektors Prom_CYP86B1_pMD.....	32
Abbildung 13: Farbreaktion der $\beta$ -Glucuronidase .....	35
Abbildung 14: Separierung von Periderm und verholzter Stele.....	37
Abbildung 15: Umesterungsreaktion eines Polyesters mit $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ .....	38
Abbildung 16: Derivatisierung einer Substanz mit BSTFA .....	40
Abbildung 17: Lokalisation der Genexpression in der Wurzel mit Hilfe des <i>Arabidopsis</i> <i>eFP</i> -Browser.....	47
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Genloci der sechs Kandidatengene und der Position der Insertionen .....	48
Abbildung 20: Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien.....	51
Abbildung 21: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante <i>silip-2</i> und des korrespondierenden Wildtyps .....	54
Abbildung 22: <i>silip-2</i> und WT-Pflanzen nach 10-tägigem Trockenstress .....	55
Abbildung 23: Vergleich der Zusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante <i>myb93</i> und des korrespondierenden Wildtyps .....	57
Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung der Substanzklassen des aliphatischen Wurzelsuberins der Knockout Mutante <i>anac058</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	60

Abbildung 26: Vergleich der Zusammensetzung des peridermalen Suberins der Knockout Mutante <i>anac058</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	62
Abbildung 27: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalensuberins der Knockout Mutante <i>anac058</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	64
Abbildung 28: Messung der Genexpression in der Wurzel von <i>anac058</i> und WT-Pflanzen .....	66
Abbildung 29: Messung der Genexpression von <i>ANAC058</i> und <i>RD29A</i> nach NaCl-Applikation .....	67
Abbildung 30: Verwundung der Blätter .....	68
Abbildung 31: Messung der Genexpression von <i>ANAC058</i> nach Verwundung der Blätter .....	69
Abbildung 32: Aufsicht und Longitudinalschnitt von Wurzeln zehn Tage alter <i>Prom<sub>ANAC038</sub>:GUS</i> Pflanzen .....	71
Abbildung 34: Mikroskopische Betrachtung von Sudan Rot 7B gefärbten Wurzeln der Pflanzen <i>anac038-1</i> und WT in unterschiedlichen Abständen von der Wurzelspitze. 28 Tage alte unter hydroponischen Bedingungen angezogene Wurzeln wurden mit Sudan Rot 7B gefärbt und im Abstand von 13-15 mm (A), 5-7 mm (B) und unmittelbar auf Höhe der Wurzelspitze (C) im Hellfeld betrachtet.....	73
Abbildung 35: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Knockout Mutante <i>anac038-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps .....	76
Abbildung 36: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Knockout Mutante <i>anac038-2</i> und des korrespondierenden Wildtyps .....	78
Abbildung 37: Zusammensetzung der Blattwachse der Mutante <i>anac038-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps. ....	80
Abbildung 38: Anatomie und Histologie der primären Wurzel der Mutante <i>anac038-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps. Repräsentative Querschnitte von apikalen Bereichen 28 Tage alter in hydroponischen Bedingungen gewachsenen und mit Sudan Rot 7B gefärbten Wurzeln. Mikroskopische Aufnahme des Wildtyps (A) und der <i>anac038-1</i> Mutante (B). Die Suberinlamellen der Endodermis sind rot angefärbt. ....	81
Abbildung 39: Auswirkung des <i>ANAC038</i> Knockouts auf den Samenertrag.....	82
Abbildung 40: Messung der Genexpression in der Wurzel von <i>anac038-1</i> und WT-Pflanzen .....	83

Abbildung 41: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin der Knockout Mutante <i>anac038-1</i> , des korrespondierenden Wildtyps und der komplementierten <i>anac038-1</i> Pflanzen .....	85
Abbildung 42: Messung der Genexpression von <i>ANAC038</i> und <i>RD29A</i> nach NaCl-Applikation .....	86
Abbildung 43: Messung der Genexpression von <i>ANAC038</i> nach Verwundung der Blätter .....	88
Abbildung 44: Verwundetes Blatt einer Prom <sub><i>ANAC038</i></sub> :GUS Pflanze .....	89
Abbildung 45: <i>anac038-1</i> und WT-Pflanzen nach 6-tägiger Behandlung mit 150 mM NaCl .....	90
Abbildung 46: <i>anac038-1</i> und WT-Pflanzen nach 6-tägiger Behandlung mit 150 mM Mannitol.....	92
Abbildung 47: <i>anac038</i> und WT-Pflanzen nach 9-tätigem Trockenstress.....	93
Abbildung 48: Messung der Genexpression von <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> in den Wurzeln von <i>anac058/anac038-1</i> und WT-Pflanzen .....	94
Abbildung 49: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin der Doppel-Knockout Mutante <i>anac058/038-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	96
Abbildung 50: Messung der Genexpression von <i>ANAC058</i> bzw. <i>ANAC038</i> in den jeweiligen Überexpressionslinien mit Hilfe der RT-PCR.....	98
Abbildung 51: Messung der Genexpression von <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> in den Blättern der vier Überexpressionslinien .....	99
Abbildung 52: Messung der Genexpression von Suberingenen in den Blättern von Pflanzen der beiden Überexpressionslinien <i>35S::ANAC058-1</i> und <i>-19</i> .....	101
Abbildung 53: Messung der Genexpression von Suberingenen in den Blättern von Pflanzen der beiden Überexpressionslinien <i>35S::ANAC038-21</i> und <i>-2</i> .....	102
Abbildung 54: Messung der Expression des Kutin Gens <i>GPAT4</i> in den Blättern der beiden Überexpressionslinien <i>35S::ANAC038-21</i> und <i>-2</i> .....	103
Abbildung 55: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin der Überexpressionslinie <i>35S::ANAC058-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps ....	104
Abbildung 56: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin der Überexpressionslinie <i>35S::ANAC038-2</i> und des korrespondierenden Wildtyps ....	105
Abbildung 57: Messung der Genexpression von <i>ANAC038</i> und charakterisierten Suberingenen in Wurzeln der Pflanzen <i>35S::ANAC038-21</i> und <i>-2</i> .....	106

Abbildung 58: Vergleich der Zusammensetzung des Blattkutins der Überexpressionslinien <i>35S::ANAC038-21 und -2</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	107
Abbildung 59: Vergleich der Zusammensetzung der Blattwachse der Überexpressionslinien <i>35S::ANAC038-21 und -2</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	110
Abbildung 60: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberin der Überexpressionslinie <i>OsNAC034-ÜEx</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	113
Abbildung 61: Messung der Genexpression von potentiell redundanten Kandidatengen für <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> in Wurzeln der Pflanzen <i>anac058</i> (A) und <i>anac038-1</i> (B).....	116
Abbildung 62: Modell der Funktion von SiLip-2.....	122
Abbildung 63: Coexpressionsnetzwerk von <i>ANAC058</i> .....	130
Abbildung 64: Expressionsmessungen der Kandidatengene in unterschiedlichen Pflanzenorganen.....	179
Abbildung 65: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalensuberins der Knockout Mutante <i>anac038-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	180
Abbildung 66: Querschnitte von <i>anac038-1</i> und WT-Wurzeln.....	180
Abbildung 67: <i>anac038</i> und WT-Pflanzen nach 12-tätigem Trockenstress.....	181

## 7.9 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Schmelztemperatur der verwendeten Primer.....	175
Formel 2: Berechnung der Hybridisierungstemperatur der verwendeten Primer.....	175

## 7.10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes einer PCR mit <i>KAPA2G® Fast Polymerase</i> .....	20
Tabelle 2: Temperaturprogramm des Thermocyclers einer PCR mit <i>KAPA2G Fast Polymerase</i> .....	21

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes einer PCR mit <i>Phusion® High-Fidelity Polymerase</i> .....	21
Tabelle 4: Temperaturprogramm des Thermocyclers einer PCR mit <i>Phusion® High-Fidelity Polymerase</i> .....	21
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer RT-PCR mit <i>SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum Taq</i> .....	24
Tabelle 6: Temperaturprogramm des Thermocyclers einer RT-PCR mit <i>SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum Taq</i> .....	24
Tabelle 7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei der cDNA Synthese mit dem <i>SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit</i> .....	25
Tabelle 8: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei der cDNA Synthese mit <i>SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit</i> .....	25
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer RTQ-PCR mit dem <i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i> .....	26
Tabelle 10: Temperaturprogramm des Thermocyclers einer RTQ-PCR mit dem <i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i> .....	26
Tabelle 11: Temperaturprogramm „Suberin“ zur gaschromatographischen Auftrennung von Suberinmonomeren .....	41
Tabelle 12: Temperaturprogramm „Wachse“ zur gaschromatographischen Auftrennung von Wachsbestandteilen .....	41
Tabelle 13: Temperaturprogramm „Säurestandard“ zur Überprüfung der Säulenqualität .....	42
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genotypisierung aller Insertionsmutanten .....	50
Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genotypisierung und der Bestimmung des Expressionslevels in den Mutanten-Linien.....	52
Tabelle 16: Übersicht der mit ATTED-II identifizierten potentiellen Coexpressionsgene für <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> . Dargestellt ist die Position innerhalb der von ATTED-II extrahierten Top 300 Kandidatenliste möglicher für <i>ANAC058</i> und <i>ANAC038</i> redundanter Gene oder Dimerisierungspartner sowie der Genlocus, der vorgeschlagene Name und die durch den <i>Arabidopsis eFP</i> -Browser vorhergesagte Lokalisation der Genexpression in der Wurzel.....	115