

Technische Universität München

Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

# Rolle und Regulation der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktor-Familie aus *Arabidopsis thaliana*

Quirin Ludwig Ranftl

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer  
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 20.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.10.2016 angenommen.

„Alles Wissen und alle Vermehrung unsres Wissens  
endet nicht mit einem Schlußpunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.“

(Hermann Hesse)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis . . . . .	V
Tabellenverzeichnis . . . . .	VII
Abkürzungen . . . . .	VIII
Zusammenfassung . . . . .	1
Summary . . . . .	3

## 1. Einleitung

1.1. GATA-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen . . . . .	5
1.1.1. GATA-Transkriptionsfaktoren werden basierend auf ihrem Typ IV Zn <sup>2+</sup> -Finger differenziert . . . . .	5
1.2. LLM-Domänen B-GATAs gehören zu den B-GATAs bei Pflanzen . . . . .	8
1.2.1. B-GATAs teilen sich in LLM- und HAN-Domänen GATAs auf. . . . .	8
1.3. Funktion der B-GATAs . . . . .	10
1.3.1. LLM-Domänen B-GATAs steuern wichtige Prozesse der Pflanzenentwicklung . . . . .	10
1.3.2. Die LLM-Domäne ist wichtig für die Funktion der LLM-GATAs . . . . .	11
1.3.3. LLM- und HAN-Domänen B-GATAs weisen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in ihrer Funktion auf . . . . .	12
1.4. <i>GNC</i> und <i>GNL</i> sind Zielgene verschiedener Signalwege . . . . .	13
1.4.1. <i>GNC</i> und <i>GNL</i> agieren unterhalb von Gibberellin . . . . .	13
1.4.2. Die <i>GATAs GNC</i> und <i>GNL</i> sind lichtreguliert . . . . .	15
1.4.3. <i>GNC</i> und <i>GNL</i> sind Zielgene im Auxin Signalweg . . . . .	16
1.4.4. Cytokinin nimmt Einfluss auf <i>GNC</i> und <i>GNL</i> . . . . .	17
1.5. Zielsetzung der Arbeit . . . . .	19

## 2. Ergebnisse

2.1. LLM-Domänen B-GATAs in Pflanzen . . . . .	20
2.1.1. Die LLM-Domänen B-GATAs sind innerhalb der <i>Brassicaceae</i> hoch konserviert . . . . .	20
2.1.2. In der Entwicklung der Landpflanzen wurden die LLM- und die HAN-Domänen voneinander getrennt . . . . .	22
2.2. Biochemische Untersuchungen an <i>GNC</i> und <i>GNL</i> . . . . .	24
2.2.1. <i>GNC</i> und <i>GNL</i> interagieren mit TCP-Transkriptionsfaktoren und TPL . . . . .	24
2.3. Genregulation der LLM-Domänen B-GATAs . . . . .	27
2.3.1. Regulation der LLM-Domänen B-GATAs durch Licht . . . . .	27
2.3.2. Regulation der LLM-Domänen B-GATAs durch die Hormone Gibberellin, Auxin und Cytokinin . . . . .	30
2.3.3. Expressionsanalyse mittels eFP-Browser. . . . .	32

2.4.	Die LLM-Domänen B-GATAs sind elementare Regulatoren der Pflanzenentwicklung . . . . .	35
2.4.1.	Charakterisierung von Insertionsmutanten der sechs LLM-Domänen B-GATA Gene . . . . .	35
2.4.2.	Herstellung der komplexen Mutanten . . . . .	37
2.4.3.	LLM-GATAs kontrollieren redundant die Chlorophyllakkumulation bei Pflanzen . . . . .	38
2.4.4.	LLM-GATAs steuern Entwicklungsprozesse unterhalb von Gibberellin .	40
2.4.4.1.	LLM-GATAs verzögern die Keimung . . . . .	41
2.4.4.2.	LLM-Domänen B-GATAs steuern den Blühzeitpunkt . . . . .	42
2.4.4.3.	LLM-GATAs reprimieren die Gibberellin-Antwort in <i>ga1</i> . . . . .	46
2.4.4.4.	Die Zahl der Petalen und Sepalen wird von LLM-GATAs gesteuert . . . . .	47
2.4.5.	LLM-GATAs steuern die Hypokotylelongation lichtabhängig . . . . .	49
2.5.	LLM-GATAs sind wichtige Akteure in Cytokinin-regulierten Prozessen . . . . .	51
2.5.1.	Genmutanten der <i>LLM-GATAs</i> zeigen Defekte in der Genexpression .	51
2.5.1.1.	Die <i>quintupel</i> -Mutante zeigt die stärksten Abweichungen in der basalen Genexpression. . . . .	52
2.5.1.2.	<i>gata</i> -Genmutanten sind defekt in Cytokinin-induzierter Genregulation . . . . .	53
2.5.2.	<i>gata</i> -Genmutanten sind defekt in Cytokinin-regulierten Entwicklungsprozessen . . . . .	54
2.5.2.1.	Die <i>gata</i> -Genmutanten zeigen im Callus-Induktionsassay und im Wurzelassay keine Abweichungen der Cytokinin-Antwort .	55
2.5.2.2.	Die <i>gata</i> -Mutanten sind in der Phyllotaxis beeinträchtigt . . . . .	57
2.5.2.3.	GATAs steuern mehrere Aspekte der Sprossverzweigung . . . . .	58
2.5.2.4.	Die <i>gata</i> -Mutanten und Überexpressoren von <i>GNL</i> bewirken antagonistische Effekte auf die Seneszenz . . . . .	60
2.5.2.5.	<i>gata</i> -Mutanten bilden längere Schoten aus und produzieren mehr Samen . . . . .	62

### 3. Diskussion

3.1.	Die LLM-GATA Proteine . . . . .	64
3.1.1.	Konservierung der LLM-Domänen B-GATA Proteine . . . . .	64
3.1.2.	Bedeutung der biochemischen Funktion von GNC und GNL . . . . .	65
3.2.	Die Analysen der neuen Insertionsmutanten bekräftigen die Bedeutung der LLM-Domänen B-GATAs . . . . .	67
3.3.	LLM-B-GATAs sind vielseitige Regulatoren, die unterhalb verschiedener Signale agieren . . . . .	70
3.3.1.	Hypokotylelongation. . . . .	71
3.3.2.	LLM-Domänen B-GATAs sind Blühzeitregulatoren in Arabidopsis . . . . .	71
3.3.3.	LLM-GATAs steuern redundant die Bildung der Blütenorgane . . . . .	73
3.3.4.	Defekte in <i>gata</i> -Genmutanten betreffen viele Prozesse, die durch Cytokinin gesteuert werden . . . . .	74
3.4.	Schlussfolgerung . . . . .	76

## 4. Material und Methoden

4.1. Material . . . . .	78
4.1.1. Bakterienstämme . . . . .	78
4.1.2. Pflanzenlinien und Mutanten . . . . .	78
4.1.3. Proteinnachweis. . . . .	78
4.1.4. Primer . . . . .	79
4.1.5. Vektoren. . . . .	81
4.1.6. Kits . . . . .	81
4.1.7. Software für spezielle Anwendungen . . . . .	81
4.2. Methoden . . . . .	82
4.2.1. Pflanzenarbeiten . . . . .	82
4.2.1.1. Sterilisation der Samen . . . . .	82
4.2.1.2. Wachstumsbedingungen . . . . .	82
4.2.2. Physiologische Experimente . . . . .	82
4.2.2.1. Keimungsassay . . . . .	82
4.2.2.2. Chlorophyllbestimmung . . . . .	82
4.2.2.3. Hypokotylmessung . . . . .	83
4.2.2.4. Blühzeitpunktbestimmung. . . . .	83
4.2.2.5. Schotenlänge und Samenzahl . . . . .	83
4.2.2.6. Quantifizierung der Blütenorgane . . . . .	83
4.2.2.7. Behandlung mit Licht und Hormonen . . . . .	83
4.2.2.8. Bestimmung der Quantenausbeute und des Trockengewichts . . . . .	84
4.2.2.9. Wurzelassay. . . . .	84
4.2.2.10. Callus-Induktionsassay . . . . .	84
4.2.2.11. Bestimmung der Phyllotaxis . . . . .	84
4.2.2.12. Seneszenzassay . . . . .	85
4.2.2.13. Untersuchung der Verzweigung . . . . .	85
4.2.3. Molekularbiologische Methoden . . . . .	85
4.2.3.1. Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien. . . . .	85
4.2.3.2. Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen . . . . .	85
4.2.3.3. RNA-Extraktion aus Pflanzen . . . . .	86
4.2.3.4. cDNA Synthese . . . . .	86
4.2.3.5. Semiquantitative (RT) und quantitative (qRT)-PCRs . . . . .	86
4.2.3.6. Standard-PCR Reaktion . . . . .	87
4.2.3.7. Klonierungen . . . . .	87
4.2.3.8. Microarray Experimente. . . . .	87
4.2.4. Biochemische Methoden . . . . .	88
4.2.4.1. Proteinextraktion aus Hefe . . . . .	88
4.2.4.2. SDS-PAGE . . . . .	88
4.2.4.3. Coomassie-Färbung . . . . .	88
4.2.4.4. Western-Blot . . . . .	89
4.2.4.5. Hefe-Zwei-Hybrid System. . . . .	89
4.2.5. Zellbiologische Methoden. . . . .	90
4.2.5.1. Konfokalmikroskopie . . . . .	90
4.2.5.2. Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	90

4.2.6. In silico Analysen . . . . .	90
4.2.6.1. Phylogenetische Analysen . . . . .	90
4.2.6.2. eFP Browser Analysen . . . . .	91

**5. Literaturverzeichnis**

Danksagung . . . . .	101
Appendix . . . . .	102

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Darstellung der NMR-aufgelösten Ultrastruktur des Zn<sup>2+</sup>-Finger Transkriptionsfaktors cGATA1 aus dem Huhn.
- Abbildung 2:** Phylogenetischer Stammbaum der GATA-Transkriptionsfaktoren aus Reis und Arabidopsis.
- Abbildung 3:** Phylogenetischer Stammbaum der B-GATA Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 4:** Darstellung der Proteinstruktur der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 5:** Effekte der veränderten Expression von GATAs auf das Pflanzenwachstum.
- Abbildung 6:** Evolutionäre Konservierung der LLM-Domänen B-GATAs in *Brassicaceae*.
- Abbildung 7:** Evolutionäre Konservierung der LLM- und HAN-Domänen.
- Abbildung 8:** Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zur Homo- und Heterodimerisierung von GNC und GNL.
- Abbildung 9:** Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zur Interaktion von GNC und GNL mit TCP9, TCP15 und TPL.
- Abbildung 10:** Expression der LLM-Domänen B-GATA Gene in rotem, dunkelrotem und blauem Licht.
- Abbildung 11:** Expression der LLM-Domänen B-GATA Gene in rotem Licht im Wildtyp und der *pifQ* Mutante.
- Abbildung 12:** Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach GA-Behandlung.
- Abbildung 13:** Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach Auxin-Behandlung.
- Abbildung 14:** Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach CK-Behandlung.
- Abbildung 15:** Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach eFP-Browser (entwicklungsbiologisch).
- Abbildung 16:** Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach eFP-Browser (Hormonbehandlungen).
- Abbildung 17:** Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien von GATA-Genen.
- Abbildung 18:** Lokalisation der LLM-Domänen B-GATA Loci im Genom von *Arabidopsis thaliana*.
- Abbildung 19:** Die LLM-Domänen B-GATAs regulieren redundant die Chlorophyllakkumulation in Arabidopsis.
- Abbildung 20:** Ausprägung des Chlorophylldefekts der *gata*-Mutanten in adulten Pflanzen.
- Abbildung 21:** Keimungsverhalten von Mutanten der LLM-Domänen B-GATAs.
- Abbildung 22:** Blühzeitpunktdefekte der *gata*-Mutanten (Langtag).
- Abbildung 23:** Blühzeitpunktdefekte der *gata*-Mutanten (Kurztag).
- Abbildung 24:** Defekte der *gata*-Mutanten in Quantenausbeute und Trockengewicht.
- Abbildung 25:** Die LLM-Domänen B-GATAs agieren als Repressoren der GA-Antwort in *ga1*.
- Abbildung 26:** Defekte der *gata*-Mutanten in der Zahl der Blütenorgane.
- Abbildung 27:** Hypokotylelongation der *gata*-Genmutanten in unterschiedlichen Lichtbedingungen.
- Abbildung 28:** Vergleichbarkeit der beiden Microarray-Datensätze.
- Abbildung 29:** Analyse der basalen Expressionslevel in den *gata*-Mutanten.
- Abbildung 30:** Analyse der CK-induzierten Genexpression der *gata*-Mutanten.
- Abbildung 31:** Callus-Induktionsassay der *gnc gnl* und *quintupel*-Mutante sowie des *GNL* Überexpressors.
- Abbildung 32:** CK-Wurzelassay mit den *gata*-Mutanten.
- Abbildung 33:** Analyse der Phyllotaxis der *gata*-Mutanten.
- Abbildung 34:** Analyse der Verzweigungsmuster in den *gata*-Genmutanten.

- Abbildung 35:** Winkel der lateralen Infloreszenzen in *gata*-Genmutanten.
- Abbildung 36:** Analyse der Seneszenz in den *gata*-Mutanten.
- Abbildung 37:** Analyse der Wirkung von CK auf die Seneszenz.
- Abbildung 38:** Quantifizierung der Schotenlänge und Samenproduktion.
- Abbildung 39:** Überblick über die Phänotypen, an denen die LLM-Domänen B-GATAs beteiligt sind.

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Genotypisierungsprimer für die *GATA*-Insertionslinien.  
**Tabelle 2:** Primer für die semiquantitativen RT-PCR Analysen.  
**Tabelle 3:** Primer für die quantitativen RT-PCR Analysen.  
**Tabelle 4:** Primer für die qPCR Analysen.

## Appendixverzeichnis

- Appendix 1:** Sequenzalignierung der Proteinsequenzen der LLM- und HAN-Domänen B-GATAs.  
**Appendix 2:** Sequenzalignierung von B-GATAs verschiedener Brassica-Spezies.  
**Appendix 3:** Sequenzalignierung der Zn<sup>2+</sup>-Finger der LLM- und HAN-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana* und GATAs von *Physcomitrella patens*.  
**Appendix 4:** Bilder von Pflanzen der *gata*-Genmutanten unter Langtag- und Kurztag-Bedingungen.  
**Appendix 5:** Bilder von Kreuzungen der *gata*-Genmutanten und *gal* unter Langtag-Bedingungen.  
**Appendix 6:** Veröffentlichung Ranftl et al. 2016, Plant Physiology.  
**Appendix 7:** Lebenslauf.

## Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
3-AT	3-Aminotriazol
6-BA	6-Benzylaminopurin
AHK2	ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2
AHK3	ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3
AHK4/CRE1	ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE/CYTOKININ RESPONSE1
AHP	ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN
<i>Al</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>
AP1	APETALA 1
AP2	APETALA 2
AP3	APETALA 3
ARF2	AUXIN RESPONSE FACTOR2
ARF7	AUXIN RESPONSE FACTOR7
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
<i>Bd</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BOP2	BLADE-ON-PETIOLE2
<i>Br</i>	<i>Brassica rapa</i>
cDNA	complementary DNA
CGA1/GNL	CYTOKININ-INDUCED GATA1/GNC-LIKE
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CKX3	CYTOKININ OXIDASE3
CKX4	CYTOKININ OXIDASE4
CO	CONSTANS
Col-0	Columbia-0
<i>Cr</i>	<i>Capsella rubella</i>
CRY1	CRYPTOCHROME
CRY2	CRYPTOCHROME
DNA	DESOXYRIBONUKLEINSÄURE
<i>Es</i>	<i>Eutrema salsugineum</i>
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
GA	GIBBERELIC ACID (GIBBERELLIN)
GA1	GA REQUIRING1
GA <sub>3</sub>	GIBBERELLIN
GA3OX1	GIBBERELLIN 3-OXIDASE1
GID1	GA INSENSITIVE DWARF1
GLUTR/HEMA1	GLUTAMYL-tRNA REDUCTASE/HEMA1
GNC	GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM INVOLVED
GUN4	GENOMES UNCOUPLED4
HA	Hämagglutinin
HAN	HANABA TARANU
HANL2	HAN-LIKE2
ICS1	ISOCHORISMATE SYNTHASE1
JAG	JAGGED
<i>Ler-0</i>	Landsberg <i>erecta</i>
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
MUTE	MUTE

---

NAA	1-Naphtylelessigsäure
NIT2	NITRATE NONUTILIZER2
NMR	NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE
NTL1	NIT2-LIKE1
PAC	PACLOBUTRAZOL
PDV1	PLASTID DIVISION1
PDV2	PLASTID DIVISION2
PHYA	PHYTOCHROME A
PI	PISTILLATA
PIF	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
<i>pifQ</i>	<i>pif1 pif3 pif4 pif5</i>
PLT1	PLETHORA1
PNH	PINHEAD
POR	PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE
<i>Pp</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SCF	SKP1-CULLIN-F-BOX
SCR	SCARECROW
SCRM2	SCREAM/SCREAM2
SDD1	STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1
SEP3	SEPALLATA3
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SLR1	SOLITARY ROOT1
SLY1	SLEEPY1
SNE	SNEEZY
SNL1	SIN3-LIKE1
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1
SPCH	SPEECHLESS
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
TCP9	TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR9
TCP15	TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR15
TMM	TOO MANY MOUTHS
TPL	TOPLESS
TYP-A ARR	TYP-A ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
TYP-B ARR	TYP-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
WUS	WUSCHEL
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid System ( <i>yeast two-hybrid system</i> )
Zn <sup>2+</sup> -Finger	Zink-Finger

## Zusammenfassung

In allen Lebewesen regeln Transkriptionsfaktoren die Aktivität der Gene. In Abhängigkeit von inneren und äußeren Signalen steuern sie das koordinierte Ablesen der Erbinformation. Für ein grundlegendes Verständnis der Entwicklung von Organismen ist die Aufklärung des Zusammenspiels der Transkriptionsfaktoren mit den dazugehörigen Signalen unerlässlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkriptionsfaktor-Familie der LLM-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana* charakterisiert. Diese Genfamilie gehört zu einer in Pflanzen konservierten Untergruppe der GATA-Transkriptionsfaktoren und wurde basierend auf Untersuchungen der beiden Mitglieder *GNC* (*GATA*, *NITRATE-INDUCIBLE*, *CARBON-METABOLISM INVOLVED*) und *CGA1/GNL* (*CYTOKININ-INDUCED GATA1/GNC-LIKE*) bereits mit verschiedenen Prozessen der Pflanzenentwicklung in Verbindung gebracht. Mit dieser Arbeit wurden die Analysen auf alle sechs Mitglieder der LLM-Domänen B-GATAs ausgeweitet und somit auch *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* (*GATA17-LIKE*) untersucht. Alle diese Gene wurden systematisch auf die Regulation durch die vorgeschalteten Signale Auxin, Cytokinin, Gibberellin und Licht hin getestet und Einzel- und komplexe Mutantenkombinationen der GATAs wurden einer Phänotypenanalyse unterzogen.

Durch die Analysen der *gnc gnl* Mutante und verschiedener Kombinationen anderer Insertionslinien führte die Arbeit zu einem Überblick darüber, wie sehr der Verlust weiterer GATAs zusätzlich zu *GNC* und *GNL* die Entwicklung der Pflanzen beeinträchtigt. So zeigten die Untersuchungen eine redundante Wirkung der LLM-Domänen B-GATAs in Phänotypen wie der Chlorophyllakkumulation, des Blühzeitpunktes, der Bildung der Blütenorgane, der Seneszenz, der Schotenlänge und Samenproduktion, und damit Prozessen, die bereits in *gnc gnl* beeinträchtigt waren. Weiterhin konnten in den komplexen Insertionsmutanten durch die Beschreibung von Defekten in der Hypokotylelongation, der Phyllotaxis, der Verzweigung und Knospenaktivierung Prozesse aufgezeigt werden, mit denen Insertionslinien der LLM-Domänen B-GATA Gene bisher noch nicht in Verbindung gebracht wurden. Die Beschreibung einiger Mutanten weist zudem auf eine besondere Rolle der neu untersuchten GATAs in manchen Phänotypen hin. Insgesamt wurde dadurch deutlich, dass die neu untersuchten LLM-Domänen B-GATAs nicht nur redundant mit *GNC* und *GNL* agieren, sondern selbst für die Kontrolle wichtiger Prozesse entscheidend sind.

Während diese Arbeit zeigt, dass die Kontrolle der GATAs auf den Blühzeitpunkt und die Blütenentwicklung sehr wahrscheinlich durch Gibberellin gesteuert wird, könnten einige andere Prozesse durch Cytokinin reguliert sein. In Übereinstimmung damit wurden alle untersuchten Gene durch eine Cytokinin-Behandlung aktiviert und die Cytokinin-induzierte Genexpression schien in Mutanten der B-GATAs stark

beeinträchtigt zu sein. Im Falle der Seneszenz konnte zudem gezeigt werden, dass eine Cytokinin-Behandlung weniger effektiv war.

Nicht zuletzt wurden durch die Untersuchungen auf Proteinebene neue Interaktionspartner für GNC und GNL beschrieben und phylogenetische Analysen offenbarten, dass die LLM-Domänen B-GATAs nicht nur innerhalb der *Brassicaceae* stark konserviert sind, sondern auch in Vertretern ursprünglicher Landpflanzen vorhanden sind. So sind die GATA-Faktoren mit ihrer spezifischen und für die Funktion der Proteine wichtigen LLM-Domäne bis in das Laubmoos *Physcomitrella patens* nachweisbar.

## Summary

In all living organisms, transcription factors regulate the activity of genes. Dependent on internal as well as external signals, they control the coordinated reading of the genetic information. For a fundamental understanding of the development of organisms, it is indispensable to elucidate the interplay of transcription factors with the associated signals.

In this work, the transcription factor family of the LLM-domain B-GATAs from *Arabidopsis thaliana* was characterized. This gene family belongs to a subgroup of GATA transcription factors conserved in plants and was, based on investigations of the two members *GNC* (*GATA*, *NITRATE-INDUCIBLE*, *CARBON-METABOLISM INVOLVED*) and *CGA1/GNL* (*CYTOKININ-INDUCED GATA1/GNC-LIKE*), already implicated in different processes of plant development. With this work, the analysis was extended to all six members of the LLM-domain B-GATAs, and hence *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* and *GATA17L* (*GATA17-LIKE*) were also investigated. All these genes were tested systematically for their regulation by the upstream signals auxin, cytokinin, gibberellin and light and single and complex mutant combinations of the GATAs were subjected to a phenotypic analysis.

Through the analysis of the *gnc gnl* mutant and different combinations of other insertion lines, this work lead to an overview of how much the loss of other GATAs in addition to *GNC* and *GNL* impairs the development of plants. Thereby, the investigations showed the redundant action of the LLM-domain B-GATAs in phenotypes like chlorophyll accumulation, flowering time, development of floral organs, senescence, silique length and seed production and thus processes that where already affected in *gnc gnl*. Furthermore, with the description of defects in hypocotyl elongation, phylotaxy, branching and bud activation in the complex insertion mutants, it was possible to link insertion lines of the LLM-domain B-GATAs with processes they have never before been associated with. The description of some mutants, moreover, indicates a special role of the newly investigated GATAs in some phenotypes. Overall, it became clear that the newly investigated LLM-domain B-GATAs not only act redundantly with *GNC* and *GNL* but are crucial on their own for the control of some processes.

While this work shows that control of flowering time and development of floral organs by the GATAs is likely regulated by gibberellins, some of the other processes might be controlled by cytokinin. In line with this, all investigated genes were activated by cytokinin treatment and the cytokinin-induced gene expression seemed to be affected in mutants of B-GATAs. Moreover, in the case of senescence, it could be shown that cytokinin treatment was less effective.

Not least with investigations on the protein level, new interaction partners for *GNC* and *GNL* could be found and phylogenetic analyses revealed that the LLM-domain B-GATAs

are not only conserved within the *Brassicaceae* but are present in evolutionary old land plants. GATA factors with their specific as well as functionally important LLM-domain were detectable down to the moss *Physcomitrella patens*.

# 1. Einleitung

Alle Aspekte der Entwicklung der Pflanzen werden durch Hormone gesteuert. Sie etablieren Entwicklungsmuster, koordinieren das Wachstum und regulieren letztendlich den gesamten Lebenszyklus der Pflanzen. Eine besondere Rolle kommt dabei den Transkriptionsfaktoren zu, die als molekulare Schalter die Aktivität der Gene steuern. Sie tun das unter dem Einfluss der Hormone und anderer innerer und äußerer Signale.

In pflanzlichen Lebewesen muss das Ablaufen der internen Programme mit externen Signalen abgestimmt werden, da ihr Leben – von der Keimung über die vegetative bis zur reproduktiven Phase – einer sehr genauen Abstimmung mit ihrer Umwelt bedarf. Äußere Signale werden mit inneren Programmen abgeglichen und führen so zu einer plastischen, offenen Entwicklung. Das ermöglicht den Pflanzen als sessile Lebewesen zum einen eine gewisse Anpassungsfähigkeit gegenüber ihrer Umgebung und zum anderen stellt es eine genaue Abstimmung ihrer saisonalen Lebensphasen mit der Umwelt sicher. Ein ausgewogenes Zusammenwirken von Hormonen und den Transkriptionsfaktoren ist deshalb entscheidend für die Entwicklung von Pflanzen. In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere auf das Zusammenspiel von GATA-Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Pflanzenhormonen eingegangen.

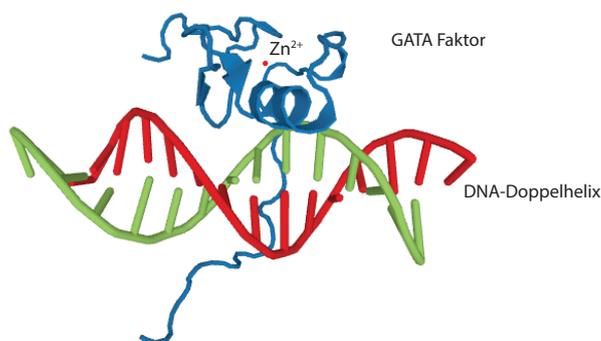
## 1.1. GATA-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen

### 1.1.1. GATA-Transkriptionsfaktoren werden basierend auf ihrem Typ IV Zn<sup>2+</sup>-Finger differenziert

Die Gruppe der GATA-Transkriptionsfaktoren ist in vielen ein- und vielzelligen Lebewesen zu finden, wobei die Proteine von Tieren, Pilzen und Pflanzen einige Gemeinsamkeiten aufweisen. Für alle charakteristisch ist ein Typ IV Zink-Finger (Zn<sup>2+</sup>-Finger) mit der namensgebenden DNA-Bindesequenz (W-**G-A-T-A**-R, W = A/T, R = G/A). In dieser Bindedomäne umspannen zwei Cysteine, die von zwei Aminosäuren getrennt werden, eine mittlere Schleife von 17 bis 20 Resten (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17-20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C) (Reyes, 2004).

GATAs tierischer Organismen besitzen oft zwei solcher Zn<sup>2+</sup>-Finger mit jeweils 17 Resten in der mittleren Schleife (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17</sub>-C-X<sub>2</sub>-C), wobei nur der C-terminale Zn<sup>2+</sup>-Finger DNA binden kann und dem zweiten eine regulatorische Funktion zukommt (Lowry und Atchley, 2000; Trainor et al., 2000). In Pilzen ist wiederum meist nur eine DNA-bindende Sequenz mit entweder 17 oder 18 Resten in der mittleren Schleife zu finden (Reyes, 2004). Aufgrund ihrer wichtigen Funktion in der Regulation der Zelldifferenzierung in vielen Geweben sowie der hämatopoetischen Entwicklung wurden die tierischen GATA-Transkriptionsfaktoren schon intensiv untersucht (Gao et al., 2015; Lowry und Atchley, 2000). Das große Interesse an GATA-Faktoren

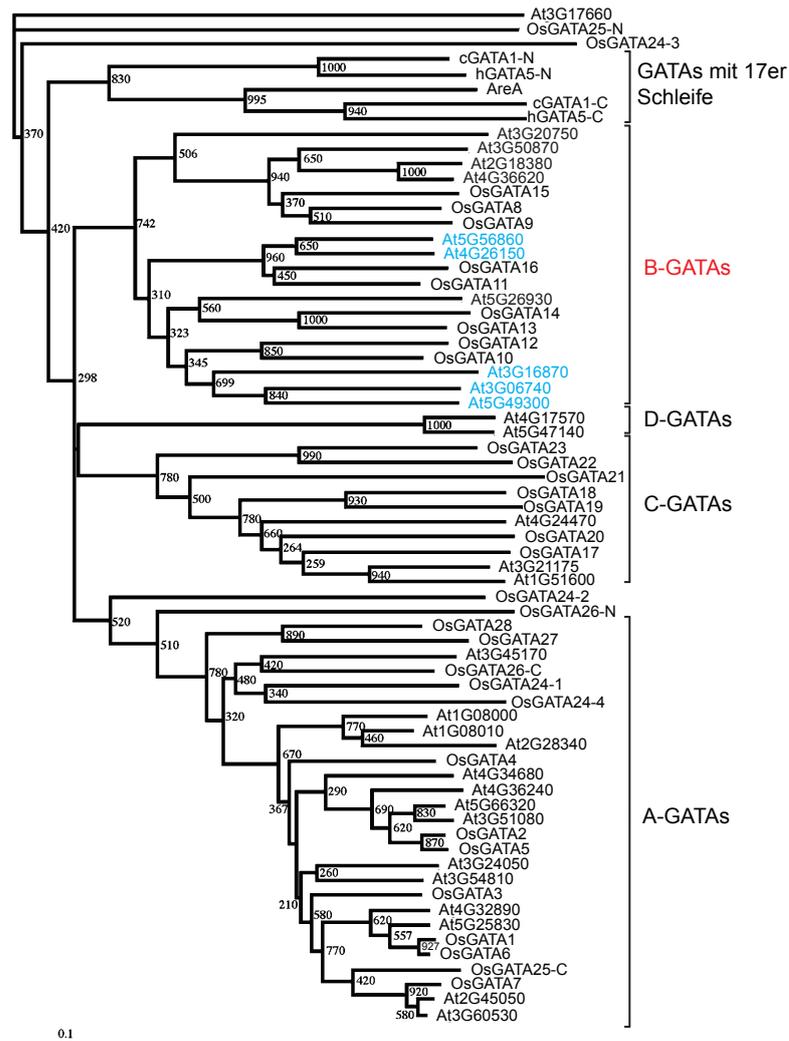
in tierischen Systemen entstammt, neben ihrer Aufgabe in der Entwicklung der Blutzellen, vor allem der Tatsache, dass ihnen eine Rolle in der Entstehung und im Verhalten von endokrinen Tumoren zugeschrieben wird. In Maus und Mensch konnte in Übereinstimmung damit gezeigt werden, dass die GATAs an der Entwicklung, Homöostase und Funktion vieler endokriner Organe beteiligt sind (Pihlajoki et al., 2016). In eingehenden Analysen wurde daher die Feinstruktur einiger GATA-Proteine verschiedener Wirbeltiere bereits geklärt. Die NMR (*nuclear magnetic resonance*) Strukturen des cGATA1 aus *Gallus gallus* (Huhn) legen einen Bindemechanismus nahe, in dem der  $Zn^{2+}$ -Finger hydrophobe Interaktionen mit der großen Furche der DNA eingeht und der C-terminale Teil des Proteins mit dem Phosphatrückgrat in der kleinen Furche interagiert (Omichinski et al., 1993; Tjandra et al., 1997; Abbildung 1).



**Abbildung 1: Darstellung der NMR-aufgelösten Ultrastruktur des  $Zn^{2+}$ -Finger Transkriptionsfaktors cGATA1 aus dem Huhn.** Die DNA-Doppelhelix ist in rot/grün dargestellt, das Protein in blau und das  $Zn^{2+}$ -Atom wurde als roter Punkt eingezeichnet. Die Darstellung wurde der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Base (RCSB PDB) entnommen (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2GAT>).

Die Struktur eines pflanzlichen GATA-Faktors ist bisher noch nicht geklärt. In der Regel besitzen diese einen  $Zn^{2+}$ -Finger mit 18 oder 20 Resten in der mittleren Schleife (Reyes, 2004). Ein Reis GATA-Faktor (OsGATA24) besitzt sogar drei DNA-Bindedomänen. Dieser Fall ist jedoch sowohl für die bisher analysierten Pflanzen als auch für andere Eukaryoten einzigartig (Reyes, 2004). Verglichen mit anderen Reichen besitzen die Pflanzen mit Abstand die größte Gruppe der GATA-Transkriptionsfaktoren. In Arabidopsis und Reis wurden bislang Sequenzen von etwa 30 und in *Glycine max* (Soja) sogar 64 GATA-Faktoren gefunden (Behringer et al., 2014; Zhang et al., 2015). Im Vergleich dazu sind im menschlichen Genom nur sechs GATAs zu finden. Des Weiteren sind acht aus *Drosophila melanogaster*, zehn aus *Caenorhabditis elegans*, elf aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie vier aus *Schizosaccharomyces pombe* bekannt (Reyes, 2004).

Aufgrund struktureller Merkmale ist es gelungen, die Vielzahl an Pflanzen GATAs zu charakterisieren und zu unterteilen, wobei der hoch konservierten DNA-Bindedomäne als funktioneller Einheit, neben anderen Merkmalen, eine entscheidende Rolle zukommt. Diese Einteilung wurde in Pflanzen zunächst mit Vergleichen von GATAs aus Reis und Arabidopsis etabliert. Neben der Zahl und dem Grad der Konservierung der Aminosäuren innerhalb der DNA-Bindedomäne sind in untergeordneter Weise auch Unterschiede außerhalb des  $Zn^{2+}$ -Fingers wichtig. So tragen die Anzahl und



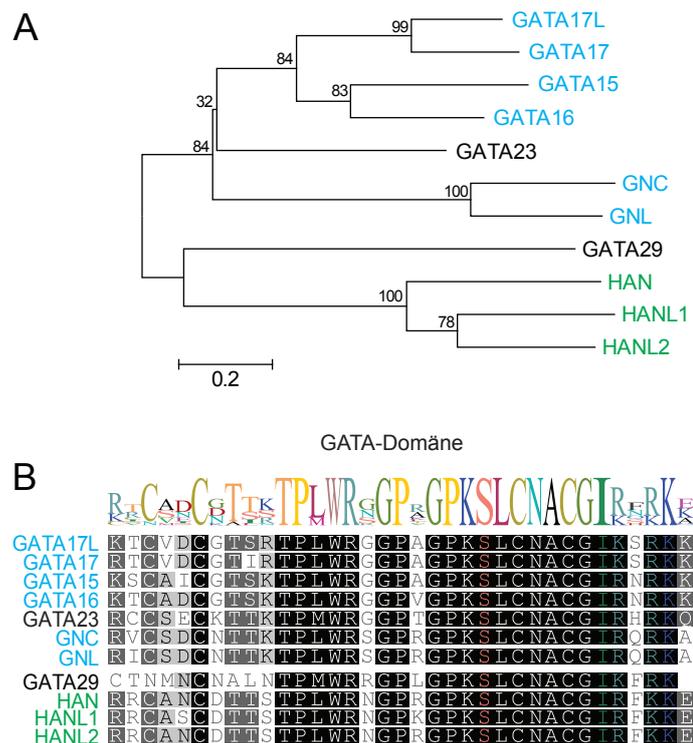
**Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der GATA-Transkriptionsfaktoren aus Reis und Arabidopsis.** Phylogenetische Darstellung basierend auf Zn<sup>2+</sup>-Finger Domänen von GATA-Transkriptionsfaktoren aus Arabidopsis und Reis nach Reyes et al. (2004). N und C bezeichnen die N- und C-terminalen Zn<sup>2+</sup>-Finger der Proteine, die zur Analyse herangezogen wurden.

Verteilung der Exons ebenfalls zur Einteilung bei. Basierend auf diesen Vergleichen werden vier Gruppen unterschieden (Gruppe A bis D) (Reyes, 2004; Abbildung 2). Die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren gehören aufgrund ihrer strukturellen Merkmale zu den B-GATAs. Soweit die Proteine aus Arabidopsis zum Zeitpunkt der Analysen von Reyes et al. (2004) annotiert waren, wurden sie in der Abbildung entsprechend farblich hervorgehoben.

## 1.2. LLM-Domänen B-GATAs gehören zu den B-GATAs bei Pflanzen

### 1.2.1. B-GATAs teilen sich in LLM- und HAN-Domänen GATAs auf

B-GATA-Transkriptionsfaktoren zeichnet, neben anderen Merkmalen, charakteristischerweise ein Zn<sup>2+</sup>-Finger mit 18 Resten in der mittleren Schleife aus (Reyes, 2004). Außerdem trägt die DNA-Bindedomäne in der Mitte ein konserviertes Serin sowie einen charakteristischen Bereich C-terminal vom Zn<sup>2+</sup>-Finger (IRX [R/K] K) (Abbildung 3B).

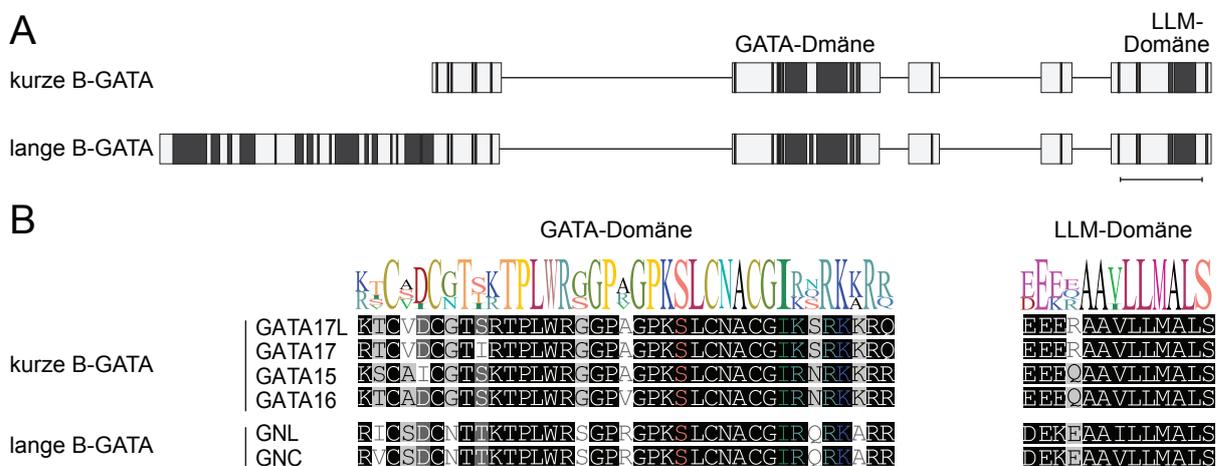


**Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der B-GATA Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*.** (A) Phylogenetischer Stammbaum basierend auf einer *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) Sequenzalignierung der elf B-GATAs in voller Proteinelänge (siehe Appendix 1). LLM-Domänen B-GATAs sind blau und HAN-Domänen B-GATAs grün eingezeichnet. Die beiden GATA23 und GATA29 besitzen degenerierte LLM- und HAN-Domänen. (B) Sequenzalignierung der DNA-Bindedomäne der im Stammbaum dargestellten B-GATAs.

Insgesamt werden in *Arabidopsis* bis jetzt elf Proteine zu den B-GATA-Transkriptionsfaktoren gezählt (Behringer et al., 2014; Abbildung 3A). Durch Untersuchungen der B-GATAs wurden in den letzten Jahren weitere Merkmale identifiziert, die diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren strukturell und funktionell unterteilen. Demnach unterscheiden sie sich hauptsächlich in der Länge ihres N-Terminus sowie in der Anwesenheit zweier Domänen außerhalb des Zn<sup>2+</sup>-Fingers (Behringer und Schwechheimer, 2015). B-GATAs tragen in der Regel entweder eine LLM-Domäne im C-Terminus oder eine HAN-Domäne im N-Terminus. In vergleichenden Analysen von B-GATAs aus *Arabidopsis*, Tomate, Gerste und *Brachypodium* ist

es unserer Arbeitsgruppe gelungen zu zeigen, dass diese Domänen bei Pflanzen evolutionär konserviert sind (Behringer et al., 2014). Obwohl die Funktion dieser Domänen noch nicht bekannt ist, kommt ihre Wichtigkeit dadurch zum Ausdruck, dass alle untersuchten Spezies B-GATA Proteine mit diesen Domänen aufweisen. Lediglich eine Gruppe von Proteinen entzieht sich dieser Einteilung: Homologe der Arabidopsis Proteine GATA23 und GATA29, die degenerierte LLM- und HAN-Domänen besitzen, kommen nur in Vertretern des Genus Brassica vor und sind, nach bisheriger Einschätzung, Ausdruck einer funktionellen Expansion, die nur in Brassica stattfand, um dort spezielle Prozesse zu steuern (De Rybel et al., 2010; Behringer et al., 2014). Analysen an GATA23 in Arabidopsis bestätigen eine funktionelle Verschiedenheit zu den anderen GATAs (Behringer et al., 2014).

Die HAN-Domäne, die in den drei B-GATA-Faktoren HAN, HANL1 und HANL2 zu finden ist, wurde zuerst in HAN (HANABA TARANU) beschrieben (Nawy et al., 2010; Zhao, 2004). Die LLM-Domäne geht auf Untersuchungen an GNC (GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON-METABOLISM INVOLVED, AtGATA21) und CGA1/GNL (CYTIKININ-INDUCED GATA1/GNC-LIKE, AtGATA22) zurück und weist neben anderen konservierten Aminosäuren die namensgebenden Reste Leucin-Leucin-Methionin (LLM) auf (Richter et al., 2010; Abbildung 4B).



**Abbildung 4: Darstellung der Proteinstruktur der LLM-Domänen B-GATA-Transkriptionsfaktoren aus Arabidopsis thaliana.** (A) Schematische Darstellung einer Sequenzalignierung kurzer und langer LLM-Domänen B-GATA Proteine aus Arabidopsis thaliana. Regionen mit geringer Übereinstimmung und Lücken in der Alignierung sind als Linien dargestellt, Regionen mit einer Übereinstimmung von  $\leq 50\%$  sind als graue Boxen und Regionen mit einer Übereinstimmung von  $\geq 80\%$  als schwarze Boxen dargestellt. Größenstandard = 30 Aminosäuren in konservierten Bereichen der Alignierung. (B) Sequenzalignierung und Sequenzlogo der GATA- und LLM-Domäne der sechs LLM-Domänen B-GATAs aus Arabidopsis thaliana.

Mittlerweile wurden sechs LLM-Domänen B-GATAs beschrieben, zu denen neben GNC und GNL auch AtGATA15 (GATA15), AtGATA16 (GATA16) sowie AtGATA17 (GATA17) und AtGATA17-LIKE (GATA17L) gehören (Behringer et al., 2014).

Charakteristisch für die beiden zuletzt genannten homologen Paare ist ein, im Vergleich zu GNC und GNL, kürzerer N-Terminus (Abbildung 4A).

B-GATAs haben aufgrund ihrer Wichtigkeit für viele entwicklungsbiologische Prozesse große Aufmerksamkeit erlangt. Vor allem die Rolle der LLM-Domänen B-GATAs konnte in letzter Zeit auf viele Gebiete der Pflanzenentwicklung ausgedehnt werden und diese sollen in der Folge zusammengefasst werden.

### 1.3. Funktion der B-GATAs

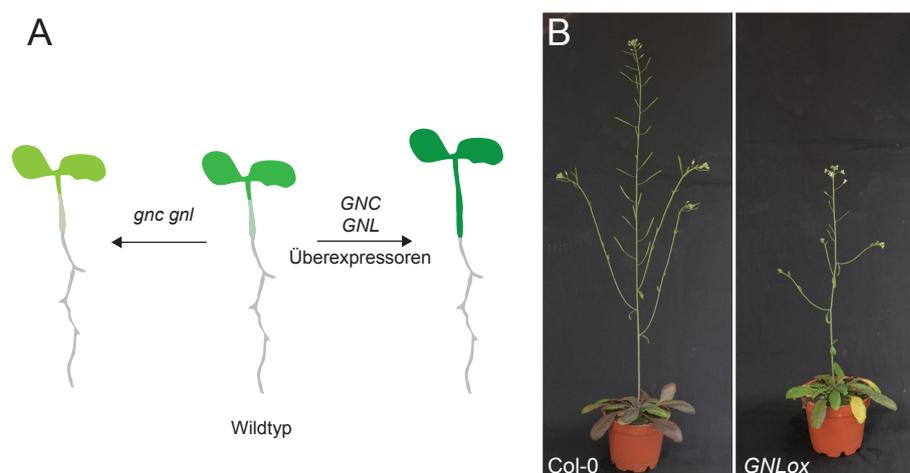
Erste Hinweise über GATAs in Pflanzen stammen von der Entdeckung von G-A-T-A Motiven in Promotoren lichtregulierter Gene und Loci circadianer Rhythmik (Argüello et al., 1992; Terzaghi und Cashmore, 1995). Die Rolle von GATAs in der Genregulation durch Licht wurde durch *footprinting* Experimente bekräftigt, in denen dauerhafte und lichtabhängige Bindeereignisse durch GATAs identifiziert werden konnten (Borello et al., 1993; Lam und Chua, 1989; Schindler und Cashmore, 1990; Teakle et al., 2002). Früh wurden die GATAs auch mit der Metabolisierung von Stickstoff (N) in Verbindung gebracht. Erste konkrete Hinweise dazu ergaben sich durch die Fähigkeit des GATAs NIT2 (NITRATE NONUTILIZER2) an G-A-T-A Motive in pflanzlichen Promotorelementen zu binden. NIT2 ist ein GATA-Faktor aus *Neurospora crassa*, der wichtige Gene des N-Metabolismus unter Stickstoffmangel steuert. In der Folge wurde das homologe Protein NTL1 (NIT2-LIKE1) als eines der ersten pflanzlichen GATAs in *Nicotiana tabacum* identifiziert und isoliert (Daniel-Vedele und Caboche, 1993). Trotz dieser deutlichen Anzeichen für die Funktion der GATAs in so entscheidenden Prozessen wie der Lichtregulation und des N-Metabolismus, ist dann jedoch weder die genaue Funktion von NTL1 noch die der meisten anderen GATAs eingehender untersucht worden. Die ersten Mitglieder der pflanzlichen GATAs, die systematisch auf ihre Funktion hin untersucht wurden, waren die LLM-Domänen B-GATAs GNC und GNL beziehungsweise der HAN-GATA HAN. Bisherige Analysen der beiden Gruppen von LLM- sowie der HAN-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktoren lassen sowohl auf Gemeinsamkeiten als auch auf Unterschiede in ihrer biochemischen Funktion schließen (Behringer und Schwechheimer, 2015).

#### 1.3.1. LLM-Domänen B-GATAs steuern wichtige Prozesse der Pflanzenentwicklung

Von den sechs LLM-Domänen B-GATAs wurden vor allem die beiden Mitglieder GNC und GNL bezüglich ihrer biologischen Funktion intensiv untersucht. GNC wurde als nitratinduziertes Gen identifiziert und gemäß seiner vermeintlichen Rolle in der Genregulation im Kohlenstoffmetabolismus als GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM INVOLVED annotiert (Bi et al., 2005; Hudson et al., 2011; Price, 2004; Scheible et al., 2004; Wang et al., 2004). Zudem wurde es als wichtiger Regulator der Chlorophyllakkumulation beschrieben (Bi et al., 2005). GNL wurde hingegen

aufgrund seiner starken Induktion durch Licht und Cytokinin entdeckt und folglich mit dem Synonymen *CGA1/GNL* (*CYTOKININ-INDUCED GATA1/GNC-LIKE*) bezeichnet (Kiba et al., 2005; Manfield et al., 2006; Naito et al., 2007). In der Folge konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren redundant wichtige Prozesse der Pflanzenentwicklung kontrollieren.

*GNC* und *GNL* sind Paraloge und basierend auf Untersuchungen der *gnc gnl* Doppelmutante konnte den Genen vor allem eine Rolle in der Chlorophyllakkumulation zugeschrieben werden. Außerdem keimen und blühen diese Mutanten geringfügig früher als der Wildtyp, bilden längere Schoten aus und haben eine beschleunigte Seneszenz (Richter et al., 2010, 2013a, 2013b). Die Überexpressoren von *GNC* und *GNL* haben überwiegend den Mutanten entgegengesetzte Phänotypen. Es sind dunkelgrüne, langsam seneszierende Pflanzen, die ein verspätetes Keimungs- und Blühverhalten zeigen. Zudem weisen sie als lichtgewachsene Keimlinge ein elongiertes Hypokotyl, eine veränderte Blattform und einen vergrößerten Winkel zwischen primärer und sekundärer Infloreszenz auf (Behringer et al., 2014; Hudson et al., 2011, 2013; Köllmer et al., 2011; Richter et al., 2010, 2013a, 2013b).



**Abbildung 5: Effekte der veränderten Expression von GATAs auf das Pflanzenwachstum. (A)** Schematische Darstellung der Effekte veränderter *GNC* und *GNL* Expression auf Keimlinge. **(B)** Adulte Pflanzen von Col-0 und eines *GNL* Überexpressors.

In Abbildung 5 sind die Effekte veränderter *GNC* und *GNL* Expression auf das Wachstum von Keimlingen und adulten Pflanzen dargestellt. In wieweit die restlichen LLM-Domänen B-GATAs an der Kontrolle dieser Prozesse beteiligt sind und möglicherweise redundant wirken, ist basierend auf Insertionsmutanten nicht bekannt.

### 1.3.2. Die LLM-Domäne ist wichtig für die Funktion der LLM-GATAs

Neben *GNC* und *GNL* wurden die anderen Mitglieder der LLM-Domänen B-GATAs vor allem im Hinblick auf ihre Proteinstruktur untersucht. In einer Studie wurde dabei die Rolle des N-Terminus sowie der LLM-Domäne genauer beleuchtet (Behringer et al., 2014). Dadurch wurde die Wichtigkeit der LLM-Domäne für die GATAs deutlich

erkennbar. Überexprimiertes *GNC* mit mutierter oder deletierter LLM-Domäne führt zu Pflanzen mit einem anderen Erscheinungsbild als mit wildtypischen Überexpressoren. Vor allem die Rosettenblätter sind kleiner und mit einem kurzen Stiel versehen und das Hypokotyl ist nicht mehr elongiert. Interessanterweise ist ein unter dem Eigenpromotor exprimiertes mutiertes *GNC* auch nicht in der Lage die Chlorophylldefekte der *gnc gnl* Mutante auszugleichen. Der LLM-Domäne kommt also eine entscheidende Rolle in der Funktion der GATAs zu (Behringer et al., 2014).

Aufgrund der teilweise sehr milden Phänotypen der *gnc gnl* Doppelmutante und der möglichen Redundanz der GATA-Faktoren wurden die Untersuchungen an den verbleibenden GATAs ausschließlich im Kontext der Überexpressoren analysiert. Die kurzen Mitglieder *GATA15* und *GATA17* zeigen dabei als Überexpressoren sehr ähnliche Phänotypen wie *GNC* und *GNL*. Vor allem die starke Induktion des Chlorophylls, die Elongation des Hypokotyls, eine verzögerte Seneszenz und Blühzeitpunkte sind dabei von Bedeutung. Da *GATA17* unter der Kontrolle des *GNC* Promotors ebenfalls in der Lage ist die Chlorophylldefekte einer *gnc gnl* Mutante auszugleichen, scheint die Länge des N-Terminus für die redundante Wirkungsweise in der Kontrolle der Chlorophyllakkumulation nicht entscheidend zu sein (Behringer et al., 2014). Allerdings ist abgesehen von den Analysen der Überexpressoren nicht bekannt, welche Funktion die kurzen GATAs einnehmen.

### **1.3.3. LLM- und HAN-Domänen B-GATAs weisen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in ihrer Funktion auf**

Die HAN-Domäne wurde zuerst in Arabidopsis anhand des Transkriptionsfaktors *HAN* beschrieben, der in der Blüten- und Embryoentwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Nawy et al., 2010; Zhao, 2004). In der frühen Entwicklung wird *HAN* für die Abgrenzung von Proembryo und Suspensorzellen benötigt (Ding et al., 2015). *HAN* trägt dabei zur domänenspezifischen Expression von Genen in den unteren Zellschichten des Proembryos bei, die letztendlich zur Abgrenzung des Proembryos vom Suspensor führen. Dementsprechend kommt es in *han-2* Mutanten zu Veränderungen in der Etablierung der für diese Domänen bekannten Markergene wie *PLT1* (*PLETHORA1*) und *SCR* (*SCARECROW*) beziehungsweise von Genen der Auxinantworten, die für die Ausbildung der Abgrenzung des Proembryos vom Suspensor wichtig wären. Die Zellen des Proembryos gleichen im Erscheinungsbild folglich denen des Suspensors, die koordinierte Wurzelbildung ist verändert und die Kolyledonidentität ist gestört (Nawy et al., 2010).

Auch in späteren Entwicklungsschritten ist *HAN* an der Etablierung der Grenzen zwischen entstehenden Geweben beteiligt. *HAN* ist dabei zwischen Meristemen und neu angelegten Primordien im Apikalmeristem exprimiert sowie im Blütenmeristem an der Grenze zwischen den Wirteln (Zhao, 2004). Dementsprechend weisen *han-2* Mutanten zum Beispiel verschmolzene Sepalen auf. Außerdem besitzen sie

verkleinerte, flache Sprossmeristeme. Ein wichtiger molekularer Grund für diese Phänotypen ist, nach jetzigem Kenntnisstand, die Kontrolle der *WUS* (*WUSCHEL*) Expression durch *HAN*. *HAN* begrenzt die Ausdehnung der *WUS* Expression auf die zentralen Regionen des Meristems und steuert so die Ausdehnung der Zellen. Diese Beobachtungen werden durch die Phänotypen der *HAN* Überexpressoren bestätigt, in denen das Wachstum verzögert und die Zellteilung gestört ist und in denen es zum Verlust des Meristems kommt (Zhao, 2004). Kürzlich wurde in einer ausführlichen Studie nachgewiesen, dass *HAN* auch mit einigen wichtigen Meristemregulatoren genetisch und biochemisch interagiert (Ding et al., 2015). *HAN* interagiert direkt mit *PNH* (*PINHEAD*) und *JAG* (*JAGGED*), Regulatoren des Infloreszenzmeristems, beziehungsweise der Primordien der Blüten. In seiner Funktion die Grenze zwischen Infloreszenzmeristem und den Primordien zu steuern, kontrolliert *HAN* zusätzlich die Transkription der primordienspezifischen *JAG* und *BOP2* (*BLADE-ON-PETIOLE*) sowie der *CKX3* (*CYTOKININ OXIDASE 3*) (Ding et al., 2015).

Interessanterweise gibt es Hinweise auf Gemeinsamkeiten in der Funktion von *HAN*- und LLM-GATAs. So sind die Phänotypen der *han-2* und *hanl2* Mutanten, bezüglich der Embryoentwicklung sowie der Blütenbildung in Mutantenkombinationen mit *gnc* und *gnl* teilweise verstärkt. Sogar eine Dimerisierung zwischen *HAN*, *GNC* und *GNL* konnte in einem Hefe-Zwei-Hybrid System sowie in BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) gezeigt werden (Zhang et al., 2013). Andererseits konnten auch deutliche Unterschiede in der biologischen Funktionen ausgemacht werden. Die Überexpression von *HAN* beeinflusst das Wachstum in anderer Art und Weise als die Überexpressoren der LLM-Domänen B-GATAs. So können *HAN* und *HANL2* als Überexpressoren im Gegensatz zu *GNC* und *GNL* weder Chlorophyll induzieren noch ist das Hypokotyl in lichtgewachsenen Keimlingen elongiert. Tatsächlich zeigen sie sogar geringere Chlorophyllgehalte als der Wildtyp (Behringer et al., 2014). *HAN*- und LLM-Domänen B-GATAs scheinen zwar in manchen Bereichen zusammen zu agieren, es gibt jedoch auch Hinweise auf unterschiedliche Funktionen.

## 1.4. *GNC* und *GNL* sind Zielgene verschiedener Signalwege

In detaillierten Studien ist es gelungen, die biologischen Funktionen von *GNC* und *GNL* in einen mechanistischen Zusammenhang zu bringen. Basierend auf den Phänotypen der Mutanten und Überexpressoren und ihrer Regulation konnten die beiden GATA-Faktoren mit vielen Signalwegen in Verbindung gebracht werden. Dabei wurde klar, dass diese Transkriptionsfaktoren ein breites Spektrum an Entwicklungsantworten unterhalb der Signale Auxin, Cytokinin, Gibberellin und Licht steuern.

### 1.4.1. *GNC* und *GNL* agieren unterhalb von Gibberellin

Gibberellin (GA) ist eines der am längsten untersuchten Pflanzenhormone und steuert unter anderem die Keimung, den Blühzeitpunkt und die Blütenbildung (Akai, 1974;

Richards et al., 2001; Ueguchi-Tanaka et al., 2007). Die GA Signaltransduktion beginnt mit der Bindung von GA an den Rezeptor *GID1* (*GA INSENSITIVE DWARF1*) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Diese Bindung führt zur Heterodimerisierung zwischen *GID1* und einem DELLA Protein mit nachfolgendem Abbau des DELLAs über *SCF<sup>SLY1/SNE</sup>* (SKP1-CULLIN-F-BOX Komplex mit den F-Box Proteinen *SLEEPY1* beziehungsweise *SNEEZY*) und dem 26S Proteasom (McGinnis et al., 2003; Strader et al., 2004; Willige et al., 2007). Die repressorische Wirkung der DELLAs im GA Signalweg beruht vor allem auf der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und der damit einhergehenden Funktionsstörung dieser Faktoren. Mittlerweile sind viele Interaktionspartner der DELLAs bekannt und die Mechanismen beschrieben, wie sich diese Interaktionen auf die Funktion der jeweiligen Transkriptionsfaktoren auswirken (Davière et al., 2014; Feng et al., 2008; Feurtado et al., 2011; Hou et al., 2010; de Lucas et al., 2008; Marín-de la Rosa et al., 2015; Schwechheimer und Willige, 2009; Zhang et al., 2011). Die Einordnung von *GNC* und *GNL* in den GA Signalweg entstammt der Beobachtung, dass die Gene durch GA reprimiert werden. Dieser Mechanismus kommt dadurch zustande, dass die über GA abgebauten DELLAs ihre repressorische Wirkung auf die PIFs (PHYTOCHROME-INTERACTING FAKTORS) verlieren (Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008) und diese an die DNA binden können, um *GNC* und *GNL* zu reprimieren (Richter et al., 2010). Bis jetzt konnte insbesondere die Bindung von PIF3 an die Promotoren von *GNC* und *GNL* gezeigt werden (Richter et al., 2010). Zusätzlich zur Regulation durch GA zeigen die Mutanten und Überexpressoren von *GNC* und *GNL* auch klassische GA-Phänotypen, welche die Keimung, den Chlorophyllgehalt und das Blühverhalten betreffen. Der wichtigste Hinweis darauf, dass *GNC* und *GNL* als repressorische Transkriptionsfaktoren unterhalb von GA arbeiten zeigt sich in der genetischen Interaktion von *gnc gnl* und *ga1* (*ga requiring1*). Einige der drastischen Phänotypen der GA-Biosynthesemutante, wie zum Beispiel die extreme Verzögerung der Blühinduktion, werden in der *ga1 gnc gnl* teilweise supprimiert. Dies bedeutet, dass *GNC* und *GNL* essentiell für die Repression der GA-Antworten in *ga1* sind (Richter et al., 2010).

Nach der Klarstellung der Wichtigkeit von *GNC* und *GNL* für die GA-Antwort wurde in detaillierten Studien die Rolle der beiden Gene in der Blühzeitkontrolle und in der Blütenentwicklung im Kontext von GA untersucht (Richter et al., 2013; Daten des Lehrstuhls Schwechheimer). Der Blühzeitpunkt ist streng geregelt und viele Signalwege, die das Blühen steuern, wurden bereits identifiziert. Der MADS-Box Transkriptionsfaktor *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*) agiert unter anderem im Apikalmeristem und ist einer der bedeutendsten Integratoren der Blühinduktion. Unter Langtag-Bedingungen ist er einer der wichtigsten Signale in der Bestimmung des Blühzeitpunktes (Samach et al., 2000; Yoo et al., 2005). Die Expression von *SOC1* steht unter dem Einfluss von Faktoren aus

verschiedenen Signalwegen wie CO (CONSTANS), FT (FLOWERING LOCUS T), FLC (FLOWERING LOCUS C), SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE), SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE) (Samach et al., 2000; Yoo et al., 2005). Zudem ist *SOC1* unter Kurztag-Bedingungen der wichtigste Faktor für die Blühinduktion durch GA (Moon et al., 2003). In Analysen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch *GNC* und *GNL* ihre Wirkung auf die Blühinduktion zum Teil dadurch ausüben, indem sie auf die Expression von *SOC1* wirken. Beispielsweise ist die Expression von *SOC1* in spätblühenden Überexpressoren von *GNC* und *GNL* stark unterdrückt. Dem entsprechend blühen *SOC1* Überexpressoren früher, da die Regulation von *GNC* und *GNL* entkoppelt ist. Die repressorische Wirkung von *GNC* und *GNL* auf *SOC1* wurde letztlich auch in ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) Experimenten bestätigt (Richter et al., 2013a).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der im Kontext mit GA untersucht wurde, war die genetische Interaktion von *GNC* und *GNL* mit dem homeotischen MADS-Box Transkriptionsfaktor *AP1* (*APETALA1*). *AP1* ist zusammen mit anderen Faktoren für die Identität von Geweben und letztendlich für die Ausbildung von Sepalen und Petalen wichtig (Bowman et al., 1993; Irish und Sussex, 1990; Kaufmann et al., 2010; Pajoro et al., 2014). In der Zusammenarbeit in einem Komplex tragen die Komponenten *AP1*, *AP3* (*APETALA3*), *PI* (*PISTILLATA*) und *SEP3* (*SEPALLATA3*) zur Steuerung der Identität der Blütenorgane bei (Honma und Goto, 2001). Einer der markantesten Merkmalsausprägungen von Mutanten in *AP1* ist das Fehlen der Petalen. In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nun die Rolle von GA in diesem Prozess erkannt werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die GA-Regulation von *GNC* und *GNL* in Blüten *AP1* abhängig ist und *AP1* direkt an die Promotoren von *GNC* und *GNL* binden kann und diese dadurch reprimiert. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass GA auf *AP1* wirkt, indem dieses von den DELLAs auf Proteinebene direkt reprimiert wird. Das Zusammenspiel der *GATA*-Faktoren und *AP1* zeigt sich deutlich in der teilweisen genetischen Suppression des *ap1-15* Phänotyps in der *ap1-15 gnc gnl* Tripelmutante. Die Expression von *GNC* und *GNL* wird zudem von den Blütenentwicklungsregulatoren *AP3* (*APETALA3*) und (*PI*) *PISTILLATA* gesteuert (Mara und Irish, 2008). Die genaue Bedeutung davon ist allerdings noch unklar. Neben allen Details, die über die Funktion von *GNC* und *GNL* unterhalb von GA schon bekannt sind, ist nicht klar, in wieweit die anderen Mitglieder der LLM-Domänen B-GATAs in diesen Bereichen wirken.

#### **1.4.2. Die GATAs *GNC* und *GNL* sind lichtreguliert**

Licht ist das wohl am besten verstandene externe Signal für Pflanzen. Bis jetzt wurden 13 Photorezeptoren identifiziert, die ein breites Spektrum von dunkelrotem Licht bis hin zur UV Strahlung wahrnehmen können, um das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen zu steuern und an ihren jeweiligen Standort anzupassen (Kami et al., 2010). Vor allem Rot-, Dunkelrot- und Blaulicht sind für die Pflanzen von Beginn an

von großer Bedeutung. Licht ist das Signal für die Keimlinge, welches das Wachstum von Skotomorphogenese auf die Photomorphogenese umstellt. Der im Dunklen aufrecht erhaltene Apikalhaken wird geöffnet, die ergrünenden Keimblätter entfalten sich und das Wachstum der Hypokotyle wird eingestellt (Kami et al., 2010; Willige et al., 2012). Rotes und dunkelrotes Licht wird durch die fünf Phytochrome *PHYA* (PHYTOCHROME A) bis *PHYE* (PHYTOCHROME E) detektiert. In *phyA phyB* Mutanten bleibt unter rotem und dunkelrotem Licht die Aktivierung lichtregulierter Gene aus und die Keimlinge besitzen dementsprechend ein etioliertes Wachstum mit langen Hypokotylen, geschlossener Keimblätter und einer verminderten Chlorophyllproduktion (Reed et al., 1994). Die Phytochrome werden durch die Anregung des entsprechenden Lichtes in eine aktive Form (Pfr) überführt und dadurch in den Kern transloziert. Dort interagieren sie mit den PIFs, welche daraufhin abgebaut werden. Die PIFs sind die zentralen Regulatoren der Photomorphogenese. Es kommt nach ihrem Abbau zu Änderung in der Transkription und der Aktivierung lichtregulierter Gene (Leivar und Monte, 2014). In der *pif1 pif3 pif4 pif5 (pifQ)* Mutante werden die Merkmale des skotomorphen Wachstums zugunsten der Photomorphogenese umgestellt und die Keimlinge entwickeln sich auch im Dunklen zu deetiolierten Keimlingen mit kurzen Hypokotylen, offenen Kotyledonen und höherem Chlorophyllgehalt. Die Signalübertragung des blauen Lichtes beginnt vor allem mit der Anregung der im Kern befindlichen Cryptochrome (*CRY1* und *CRY2*). In einer nachfolgenden Phosphorylierung nehmen sie eine offene Konformation an und interagieren mit Signalpartnern um die Genexpression auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene zu verändern (Chory, 2010; Ohgishi et al., 2004). Den Cryptochromen unterliegen vor allem die langsamen und permanenten Änderungen der Blaulichtentwicklung (Ahmad et al., 1998; Cashmore et al., 1999; Ohgishi et al., 2004). Der molekulare Hintergrund der starken Lichtinduktion von *GNL* ist noch nicht bekannt (Naito et al., 2007). Da die PIFs das GA Signal auf *GNC* und *GNL* übertragen und sie entscheidende Faktoren für das Wachstum und die Lichtrezeption sind, stellen diese interessanten Kandidaten dafür dar. Abgesehen von den elongierten Hypokotylen in Überexpressoren der LLM-Domänen B-GATAs sind keine Lichtabhängigen Phänotypen beschrieben.

#### **1.4.3. *GNC* und *GNL* sind Zielgene im Auxin Signalweg**

Als weiteres vorgeschaltetes Signal für die Regulation von *GNC* und *GNL* wurde Auxin identifiziert. Auxin trägt durch seine Verteilung und seinen gerichteten Transport zur Steuerung fast aller Entwicklungsprozesse bei (Barbosa und Schwechheimer, 2014; Teale et al., 2006). Auf transkriptioneller Ebene reguliert Auxin Gene vor allem über die *Aux/IAA* (*AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID*) Gene und die *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) Transkriptionsfaktoren. Auxin leitet den proteasomalen Abbau der *Aux/IAAs* ein, welche an die ARFs binden, um diese zu inhibieren. Der Abbau der *Aux/IAAs* ermöglicht den dadurch freien ARFs die Transkription entsprechend

zu steuern (Teale et al., 2006). Basierend auf Überschneidungen von Phänotypen in *GNC* und *GNL* Überexpressoren und Mutanten der *ARF* Transkriptionsfaktoren wurden die beiden LLM-GATAs auch mit diesem Signalweg in Zusammenhang gebracht. Tatsächlich sind die Überexpressoren von *GNC* und *GNL* den *arf2* Mutanten in manchen Phänotypen ähnlich. Alle zeigen zum Beispiel einen im Vergleich mit dem Wildtyp erhöhten Chlorophyllgehalt, vergrößerte Samen sowie verzögerte Seneszenz und Blühzeitpunkte. Auch sind Ähnlichkeiten mit *arf7* Mutanten beziehungsweise der Funktionsgewinnmutanten des dazugehörigen *AUX/IAA SLR1 (SOLITARY ROOT1)* vorhanden (Richter et al., 2013b). In umfassenden Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren ARF2 und ARF7 direkt an Elemente in den Promotoren von *GNC* und *GNL* binden und reprimieren (Richter et al., 2013b). Dementsprechend ist das Expressionsniveau von *GNC* und *GNL* in *arf2* Mutanten erhöht. Zudem konnte gezeigt werden, dass einige der bekannten *arf2* Phänotypen, wie der erhöhte Chlorophyllgehalt und die vergrößerten Samen in der *arf2 gnc gnl* Tripelmutante supprimiert sind. Interessanterweise ist es sogar möglich, das Blühen der *arf2* durch das Behandeln mit GA zu beschleunigen. Dies verdeutlicht, dass *GNC* und *GNL* für diese Mechanismen in der *arf* Mutante verantwortlich sind und auch in diesem Signalweg weit unten als Transkriptionsfaktoren arbeiten, um bestimmte Prozesse zu kontrollieren (Richter et al., 2013b).

#### 1.4.4. Cytokinin nimmt Einfluss auf *GNC* und *GNL*

Einige der Phänotypen, die mit einer Missexpression von *GNC* und *GNL* einhergehen, sei es in der *gnc gnl* Mutante oder den Überexpressoren, betreffen Mechanismen, die durch Cytokinin (CK) kontrolliert werden. Zum Beispiel die Kontrolle des Chlorophyllgehaltes, einer der ersten Prozesse mit denen *GNC* und *GNL* in Verbindung gebracht wurden (Bi et al., 2005). Die Fähigkeit von *GNC* und *GNL* sowie deren Orthologie aus verschiedenen Spezies, wie Tomate, Gerste, Reis und Pappel, den Chlorophyllgehalt zu induzieren, wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen (An et al., 2014; Bi et al., 2005; Chiang et al., 2012; Hudson et al., 2013; Richter et al., 2010). In *Arabidopsis* steuern *GNC* und *GNL* redundant das Ergrünen der Pflanzen (Behringer et al., 2014). Neben der Anregung von Genen der Chlorophyllbiosynthese wie *GLUTR/HEMA1 (GLUTAMYL-TRNA REDUCTASE/HEMA1)*, *GUN4 (GENOMES UNCOUPLED 4)* und *PORs (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE)* bewirken die LLM-B-GATAs das verstärkte Ergrünen auch durch die Steuerung der Zahl und der Größe der Chloroplasten in ähnlicher Weise wie CK (Chiang et al., 2012; Hudson et al., 2011). In den Überexpressoren von *GNC* und *GNL* sind die Chloroplasten zwar nicht zwingend größer, aber vor allem in größerer Zahl vorhanden, wohingegen sie in *gnc gnl* in der Regel kleiner sind (Chiang et al., 2012). CK steuert die Teilung der Chloroplasten über die Aktivierung von *PDV1* und *PDV2 (PLASTID DIVISION)*, welche auch in Überexpressoren von *GNC* und *GNL* hochreguliert sind (Richter et al.,

2010; Hudson et al., 2011). Außerdem wird in Überexpressoren der beiden B-GATAs die Differenzierung der Etioplasten in Chloroplasten verstärkt und es bilden sich Chloroplasten in Geweben, in denen im Wildtyp normalerweise keine zu finden sind. Auch dieser Effekt kann durch die Behandlung von CK induziert werden (Kobayashi et al., 2012). Der Zusammenhang zwischen der Induzierbarkeit von *GNC* und *GNL* durch CK und der Tatsache, dass in *gnc gnl* die CK-Sensitivität bezüglich der Bildung der Chloroplasten durch CK vermindert ist (Chiang et al., 2012), legt nahe, dass der Grund für diese Defekte in der *gnc gnl* in einer geringeren CK-Antwort zu suchen ist. Neben der Kontrolle der Chloroplastenentwicklung ist CK in der Regulierung vielerlei Prozesse beteiligt. Zur Steuerung dieser Prozesse wird das Signal nach der Rezeption durch die drei funktionalen CK-Rezeptoren, der Arabidopsis Histidinkinasen (AHK2, AHK3 und AHK4) über das sogenannte Zwei-Komponenten-System sehr schnell weitergeleitet (Higuchi et al., 2004; Inoue et al., 2001; Mähönen et al., 2000). Die AHPs (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN) transportieren das Signal nach erfolgter Phosphorylierung durch die AHKs weiter in den Kern und aktivieren dort, wiederum über eine Phosphorylierung die Typ-B ARRs (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR), die daraufhin die Expression der *Typ-A* ARRs regulieren, die somit die ersten Zielgene des CK darstellen (Hwang et al., 2012; Werner und Schmülling, 2009). Dies erlaubt eine sehr schnelle Antwort hauptsächlich über eine transkriptionelle Änderung der Zielgene (Brenner et al., 2005). Seit der Entdeckung von Cytokinen, vor allem durch seine Wirkung in der *de novo* Organogenese aus Geweben, wurden diese mittlerweile in viele Prozesse der Pflanzenentwicklung integriert (Miller et al., 1955), welche sich über den gesamten Entwicklungszyklus der Pflanzen erstrecken. Von der Anregung der Keimung und der Expansion der Blätter (Riefler, 2006; Wang et al., 2011), der Kontrolle der Apikaldominanz in Spross und Wurzel (Dello Ioio et al., 2007; Leibfried et al., 2005; Moubayidin et al., 2010), bis hin zur Verzögerung der Seneszenz (Gan und Amasino, 1995) und des Stickstoffmetabolismus (Sakakibara et al., 2006) wurde die Wichtigkeit der Cytokine erkannt. In letzter Zeit wurden, neben bekannteren Prozessen wie dem Wurzelwachstum und der Meristemaktivität, vor allem Faktoren beleuchtet, die für Nutzpflanzen von Bedeutung sind: der Einfluss auf den Bauplan der Pflanzen wie die Sprossverzweigung (Müller und Leyser, 2011) und die Phyllotaxis (Besnard et al., 2013) sowie die Schoten und Samenproduktion (Bartrina et al., 2011). Ob neben *GNC* und *GNL* weitere LLM-Domänen B-GATAs an der Kontrolle CK-kontrollierter Prozesse beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Gene aus der Familie der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* zu charakterisieren. Zum einen sollten durch phylogenetische Untersuchungen und Analysen von GNC und GNL auf Proteinebene im Hefe-Zwei-Hybrid System bereits bestehende Kenntnisse weiter vertieft werden und zum anderen sollte die Genfamilie mittels Insertionsmutanten hinsichtlich ihrer biologischen Rolle untersucht werden.

Vorangegangene Untersuchungen an *GNC* und *GNL* wiesen auf eine redundante Beteiligung dieser LLM-Domänen B-GATAs an wichtigen physiologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen hin. Durch die weiteren Mitglieder der Genfamilie bestand der Verdacht, dass zwischen diesen LLM-domänen B-GATAs ebenfalls eine redundante Wirkung bestehen könnte, die die Analyse weiterer Phänotypen in der *gnc gnl* Mutante erschweren. Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Mutantenallele von *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* beschrieben und deren biologische Rolle war weitgehend unbekannt. Ziel war deshalb, Insertionsmutanten der LLM-Domänen B-GATAs in Einzel- und Mehrfachkombinationen zu untersuchen, um Aufschluss über deren Beteiligung an Prozessen zu bekommen, die bekannterweise bereits von *GNC* und *GNL* kontrolliert werden sowie Hinweise auf noch unbekannte Aufgaben der LLM-Domänen B-GATAs zu erhalten.

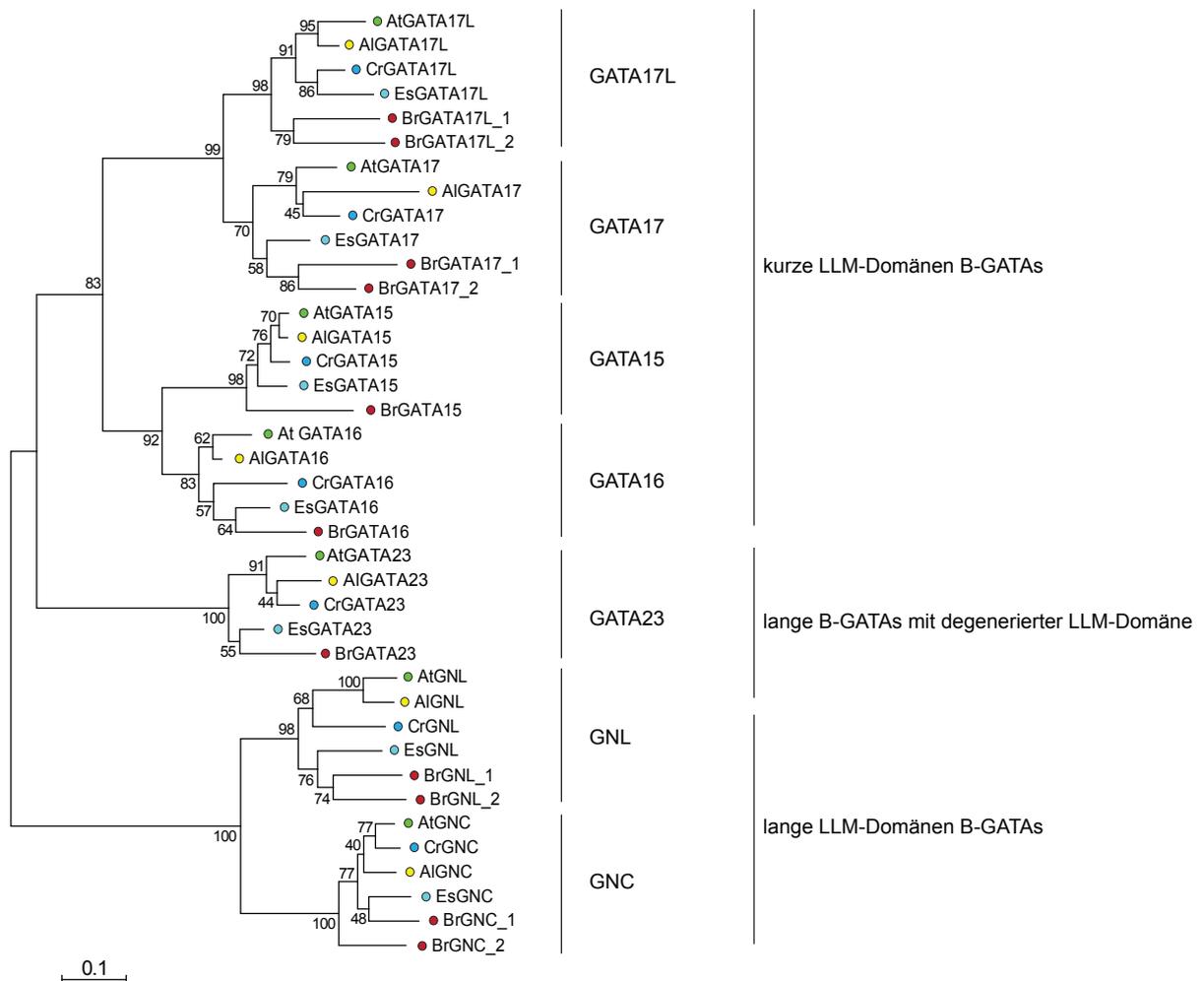
## 2. Ergebnisse

### 2.1. LLM-Domänen B-GATAs in Pflanzen

Zentrales Element dieser Arbeit war die Charakterisierung von Genen aus der Familie der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*. In Anknüpfung an zwei bereits charakterisierte Allele von *GNC* und *GNL* sollten Insertionslinien weiterer Gene beschrieben werden, um Hinweise über die möglichen biologischen Prozesse zu sammeln, die die Transkriptionsfaktoren dieser Familie kontrollieren. Vor allem eine breit angelegte Untersuchung und Beschreibung von Phänotypen in verschiedenen Kombinationen der Insertionsmutanten stand im Fokus dieser Arbeit. Die Bedeutung der LLM-Domänen B-GATAs wurde aber nicht nur in der nachfolgenden Untersuchung von Insertionsmutanten deutlich, sondern drückte sich auch durch die hohe Konservierung der Proteine aus.

#### 2.1.1. Die LLM-Domänen B-GATAs sind innerhalb der *Brassicaceae* hoch konserviert

GATA-Transkriptionsfaktoren finden sich in einer Vielzahl von Organismen und auch in Pflanzen sind sie weit verbreitet. In *Arabidopsis* wurden sie bereits mit vielen wichtigen Prozessen der Pflanzenentwicklung in Verbindung gebracht. Die LLM-Domänen B-GATAs bilden aufgrund struktureller Merkmale eine Untergruppe der GATA-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen. Diese zeichnen sich, neben einem Zink Finger vom Typ IV (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>18/20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C), durch eine hoch konservierte C-terminale LLM-Domäne aus, die die namensgebenden Aminosäuren Leucin-Leucin-Methionin trägt (Abbildung 4B) (Behringer und Schwechheimer, 2015; Richter et al., 2010). In *Arabidopsis* wurden bis jetzt die sechs LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktoren *GNC*, *GNL*, *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* identifiziert (Behringer et al., 2014; Richter et al., 2010). Basierend auf der Proteinsequenz können diese Transkriptionsfaktoren in die beiden langen homologen Mitglieder *GNC* und *GNL* und die kurzen homologen Paare *GATA15* und *GATA16* sowie *GATA17* und *GATA17L* unterschieden werden, welche einen kürzeren N-Terminus besitzen (Abbildung 4A). Diese Art der Unterteilung der GATA-Transkriptionsfaktoren anhand von strukturellen Merkmalen basiert auf dem Vergleichen von Proteinen verschiedener dikotyler und monokotyler Pflanzen. Alle untersuchten Spezies, wie zum Beispiel *Arabidopsis*, Tomate, Reis, *Brachypodium* und Gerste, weisen Proteine dieser Form auf (Behringer et al., 2014). Diese Untersuchungen der LLM-Domänen B-GATAs legen nahe, dass diese Transkriptionsfaktoren in ihrer Grundform sehr konserviert sind. Eingehende Analysen führten dennoch zum Schluss, dass es im Laufe der Evolution zu einer Diversifizierung und Spezialisierung dieser Proteinfamilie in den untersuchten Spezies gekommen sein muss (Behringer et al., 2014). So fiel auf, dass Mitglieder



**Abbildung 6: Evolutionäre Konservierung der LLM-Domänen B-GATAs in Brassicaceae.** Phylogenetischer Stammbaum basierend auf einer Sequenzalignierung von LLM-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Eutrema salsugineum* und *Brassica rapa*. Die zur Berechnung verwendete Sequenzalignierung befindet sich in Appendix 2. Zur Berechnung wurde die *Neighborjoining* Methode und die *Bootstrap* Methode mit 1000 *Bootstrap* Wiederholungen sowie das *Jones-Taylor-Thornton* Modell verwendet. Die *Bootstrap* Werte sind an den Knotenpunkten angegeben. Der Baum wurde maßstabsgetreu gezeichnet, wobei die Länge der Äste die evolutionäre Beziehung zwischen den Proteinen widerspiegelt. Die Proteine wurden gemäß ihrer Spezieszugehörigkeit farblich markiert.

des Brassica Genus Proteine (GATA23) mit einer speziellen Form der LLM-Domäne aufweisen (Behringer et al., 2014). Um einen umfassenden Überblick über den Grad der Konservierung von *Arabidopsis* nahestehenden LLM-Domänen B-GATAs innerhalb der Familie der *Brassicaceae* zu bekommen, wurden die Proteine der Spezies *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella* und *Eutrema salsugineum* verglichen (Abbildung 6).

Der Vergleich zeigte, dass für alle GATA-Faktoren entsprechende Orthologe in den jeweiligen Spezies vorhanden sind. In *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella* und *Eutrema salsugineum* konnte eine Kopie der jeweiligen GATAs und in *Brassica rapa* konnten, mit Ausnahme der kurzen GATA15 und GATA16, zwei Kopien aller GATAs gefunden werden (Abbildung 6). Diese Beobachtung spiegelt die Tatsache wider, dass *Brassica rapa* zunächst eine Hexaploidisierung durchlief, also demnach drei Kopien

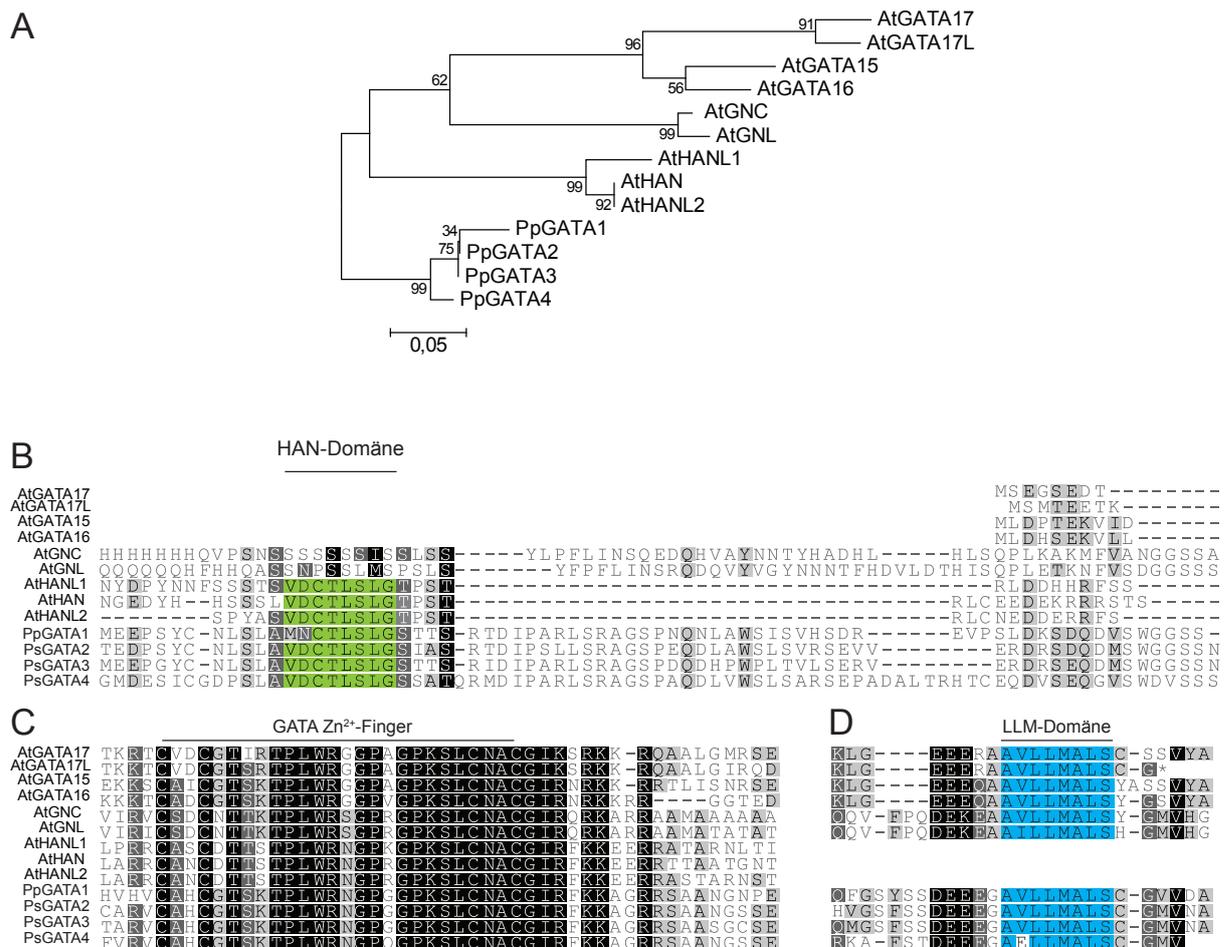
aller Gene besaß und durch nachfolgende Genverluste wieder viele der überzähligen Proteinkopien verlor (Tang et al., 2012; Wang et al., 2011). Sehr deutlich trat bei dieser Analyse hervor, dass sich die orthologen GATAs zwischen den hier ausgewählten Spezies phylogenetisch sehr nahe stehen, also alle GNC-, GNL-, GATA15-, GATA16-, GATA17-, und GATA17L-Proteine jeweils eine Gruppe bilden. Ebenfalls bilden die für *Brassicaceae* spezifischen Proteine mit einer veränderten LLM-Domäne eine Einheit und gehen demnach, ebenso wie die anderen, auf einen gemeinsamen Ursprung zurück. Diese Analyse spiegelt ebenfalls die bekannte Stellung der ausgewählten Spezies zueinander wider. Proteine näher verwandter Arten weisen auch in dieser Analyse ähnlichere Proteine auf. *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* Proteine zum Beispiel stehen basierend auf der Proteinsequenz näher zueinander als zu den anderen Spezies.

Zusammenfassend kann daraus gefolgert werden, dass alle sechs LLM-Domänen B-GATAs in den hier betrachteten *Brassicaceae* konserviert sind. Auch die für Brassica spezifische Gruppe (GATA23) mit degenerierter LLM-Domäne ist konserviert. Die nahestehenden Gruppen zeugen von gemeinsamen Vorfahren aller Proteine. In *Brassica rapa* weisen überzählige Kopien auf ein Hexaploidisierungsereignis hin, aber auch nach den Genverlusten sind Vertreter der sechs GATAs vorhanden. All dies weist auf einem hohen Grad der Konservierung der LLM-Domänen B-GATAs innerhalb der hier gezeigten Spezies der *Brassicaceae* hin.

### **2.1.2. In der Entwicklung der Landpflanzen wurden die LLM- und die HAN-Domänen voneinander getrennt**

Neben der LLM-Domäne bildet die HAN-Domäne ein weiteres strukturelles Unterscheidungsmerkmal für B-GATA-Faktoren in *Arabidopsis* (Nawy et al., 2010; Zhao, 2004). Proteine dieser Transkriptionsfaktoren tragen dementsprechend entweder eine LLM- oder eine HAN-Domäne. In einer Studie unseres Labors konnte gezeigt werden, dass die LLM-Domäne eine funktionell notwendige Einheit darstellt und somit LLM- von HAN-Domänen B-GATAs, zumindest in machen Prozessen, nicht nur strukturell, sondern auch funktionell getrennt werden können (Behringer et al., 2014).

Hier stellte sich die Frage, wie stark die LLM-Domäne als potentiell biochemisch funktionelle Einheit im Allgemeinen evolutionär konserviert ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in Vertretern von basalen Mitgliedern der Landpflanzen nach GATA-Faktoren mit einer konservierten LLM-Domäne gesucht. Dabei konnten in den Moosen *Anthoceros angustus*, *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* GATA-Faktoren identifiziert werden, jedoch nur in *Physcomitrella patens* wurden Vertreter der B-GATAs mit einer eindeutigen LLM-Domäne identifiziert (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Evolutionäre Konservierung der LLM- und HAN-Domänen.** (A) Phylogenetischer Stammbaum der LLM- und HAN-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana* sowie GATA-Faktoren aus *Physcomitrella pathens* basierend auf einer Sequenzalignierung der Zn<sup>2+</sup>-Finger (Appendix 3). Zur Berechnung wurde die *Neighborjoining* Methode und die *Bootstrap* Methode mit 1000 *Bootstrap* Wiederholungen sowie das *Jones-Taylor-Thornton* Model verwendet. Die *Bootstrap* Werte sind an den Knotenpunkten angegeben. Der Baum wurde maßstabsgetreu gezeichnet, wobei die Länge der Äste die evolutionäre Beziehung zwischen den Proteinen widerspiegelt. (B) *MUSCLE* Sequenzalignierung des N-terminalen Bereichs der Proteine, des Zn<sup>2+</sup>-Fingers (C) und des C-terminalen Bereichs (D) der Proteine. HAN-Domänen sind grün und LLM-Domänen blau hervorgehoben.

Interessanterweise gehören die *Physcomitrella* LLM-GATAs, nach der zuvor beschriebenen Kategorisierung, zu den Vertretern der langen GATA-Proteine, was darauf hindeutet, dass die Proteine mit einem ausgedehnteren N-Terminus die ursprüngliche Form der LLM-Domänen B-GATAs darstellen (vgl. Abbildung 4A). Weiterhin ist von Bedeutung, dass die Proteine in *Physcomitrella* nicht nur eine LLM- sondern auch eine HAN-Domäne aufweisen (Abbildung 7). Die Vereinigung der Domänen auf einem Protein könnte aus gen-ökonomischen Gründen der Fall sein (Bartlett et al., 2003; Shahzad et al., 2015; Vogel et al., 2004). Bisher stellen die GATA-Faktoren in *Physcomitrella*, in denen beide Domänen auf einem Protein vereint sind, jedoch die Ausnahme dar. Daher ist eine Trennung der Domänen im Laufe der Evolution zum Beispiel für flexiblere Regulationsmöglichkeiten eher wahrscheinlich.

Letztendlich kann also festgestellt werden, dass LLM- und HAN-Domänen evolutionär hoch konserviert sind und in Samenpflanzen und Laubmoosen, nicht aber in den

Vertretern *Anthoceros angustus* und *Marchantia polymorpha* der Horn- und Lebermoose zu finden sind. Außerdem weist die Präsenz der beiden Domänen auf einem Protein in *Physcomitrella* darauf hin, dass diese beiden funktionell verschiedenen Einheiten im Laufe der Evolution voneinander getrennt wurden, um auf verschiedenen Proteinen zu agieren.

## 2.2. Biochemische Untersuchungen an GNC und GNL

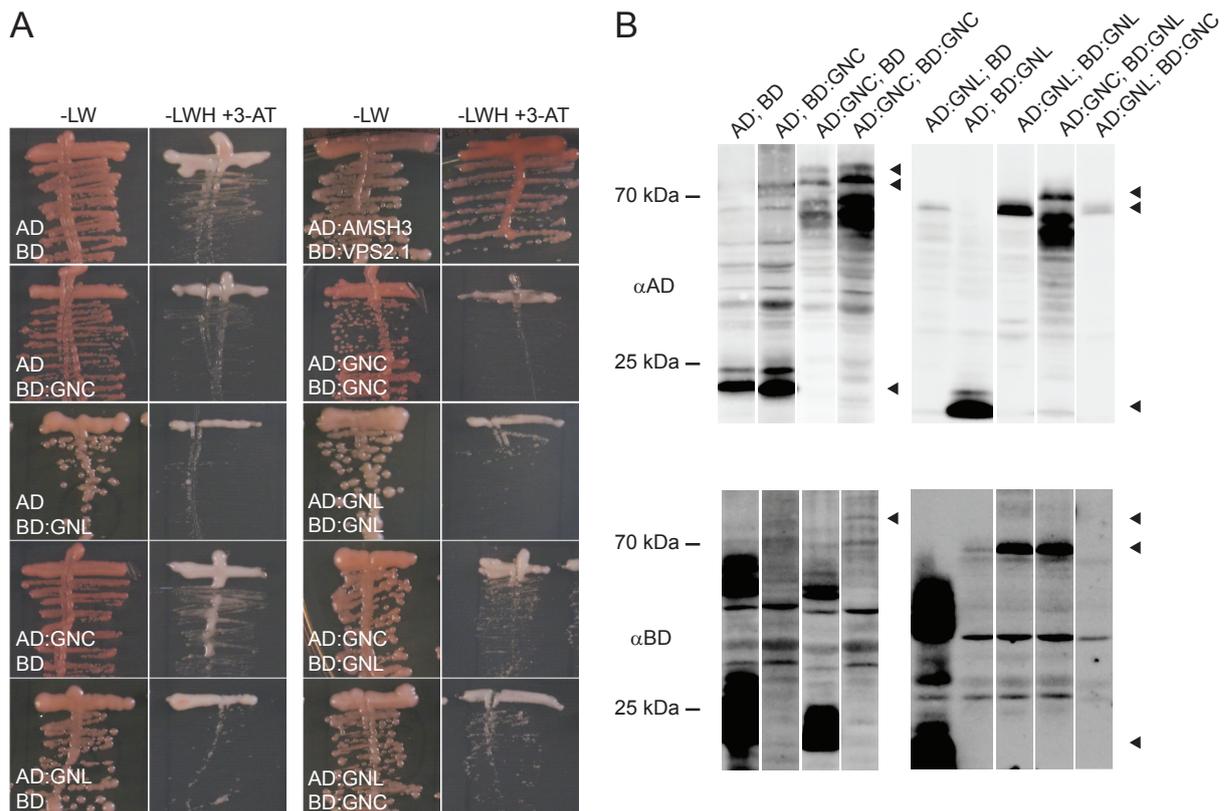
Die Konservierung der LLM-Domänen B-GATAs mit ihrer charakteristischen Domäne wurde im vorigen Abschnitt deutlich. Auch wenn die Wichtigkeit der LLM-Domäne für die Funktion der GATAs bereits beleuchtet werden konnte, sind die genaue Wirkungsweise und biochemische Funktionen der GATAs, vor allem im Zusammenspiel mit anderen Proteinen, zur Steuerung und Regulation der Transkription der Zielgene, noch weitestgehend unbekannt (Behringer et al., 2014). Da GATA Faktoren zum Beispiel in tierischen Systemen vielfältige Interaktionen eingehen und Transkriptionsfaktoren normalerweise im Kontext komplexer Interaktionen mit anderen Proteinen agieren (Fox et al., 1998; Tsang et al., 1997), wurden die beiden Mitglieder GNC und GNL der LLM-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis* hier einer Interaktionsstudie unterzogen.

### 2.2.1. GNC und GNL interagieren mit TCP-Transkriptionsfaktoren und TPL

In bisherigen Untersuchungen konnten Hinweise auf eine Interaktion von GNC und GNL mit HAN (GATA18) gefunden werden (Zhang et al., 2013). Diese Interaktion mit einem nahe verwandten Transkriptionsfaktor warf die Frage nach der Interaktion der LLM-Domänen B-GATAs untereinander auf. Zudem lieferten die Untersuchungen mit EMSAs (*electro mobility shift assays*) an GATAs Hinweise auf deren Dimerisierung (Jeong und Shih, 2003). Um die Fähigkeiten von GNC und GNL zur Homo- und Heterodimerisierung zu testen, wurden die Interaktionen dieser Proteine mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid (*yeast two-hybrid*, Y2H) Systems untersucht.

Unter Verwendung des Stammes Y190 konnte in diesem System weder eine Homo- noch eine Heterodimerisierung für GNC und GNL nachgewiesen werden, obwohl die Proteine in allen verwendeten Hefekolonien exprimiert wurden (Abbildung 8).

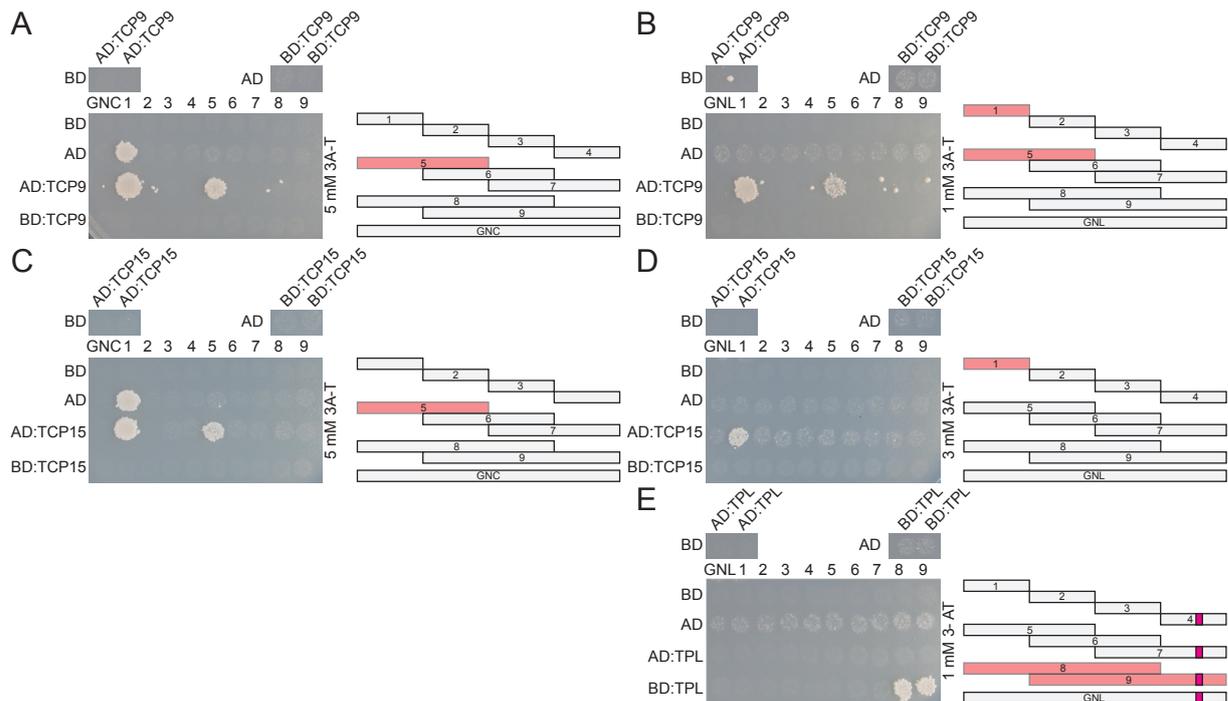
Um zu sehen, ob GNC und GNL mit anderen Proteinen interagieren, wurden die beiden Transkriptionsfaktoren anschließend in einem Y2H-System getestet, das es erlaubte, die Bindung von bis zu 12.500 definierten Interaktionspartnern zu prüfen (Dreze et al., 2011). In diesem System wurden GNC und GNL als Fusionsproteine sowohl mit der Bindedomäne (BD, *engl. bait*, Köderprotein) als auch mit der Aktivierungsdomäne (AD *engl. prey*, Beuteprotein) des Y2H-Systems in voller Länge und in Fragmenten gegen die gesamte Datenbank getestet, um möglichst viele potentielle Interaktionspartner zu finden (Dreze et al., 2010). Aus diesen groß angelegten Testläufen wurden viele Kandidaten als mögliche Interaktionspartner identifiziert, jedoch nur drei Proteine konnten in nachfolgenden Tests tatsächlich verifiziert werden.



**Abbildung 8: Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zur Homo- und Heterodimerisierung von GNC und GNL.** (A) Wachstumsassay des Hefestamms Y190 transformiert mit AD- und BD-Konstrukten auf Auxotrophiemedien ohne Leucin (L) und Tryptophan (W), beziehungsweise ohne L,W und Histidine (H) mit 2,5 mM 3-aminotriazol (3-AT). Rote Kolonien weisen auf eine positive Interaktion hin. (B) Immunoblots zum Nachweis der AD- und BD-Fusionsproteine. αHA (anti AD), αBD (anti GAL4DB). Pfeile weisen auf die Banden der Fusionsproteine beziehungsweise die einzelnen Binde- und Aktivierungsdomänen.

Darunter der Ko-Repressor TPL (TOPLESS) und zwei Mitglieder der TCP Transkriptionsfaktorfamilie: TCP9 (TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR 9) und TCP15. TCP9, welches zusammen mit TCP8 für die Expression von *ICS1* (ISOCHORISMATE SYNTHASE1), einem Schlüsselgen der Salizylsäure-Biosynthese in der pflanzlichen Immunantwort, verantwortlich ist (Wang et al., 2015), interagiert mit GNC und GNL im N-terminalen Bereich. Im Falle von GNL wurde das sehr gut an den positiven Ergebnissen für die Fragmente 1 und 5 ersichtlich (Abbildung 9B). Im Falle von GNC konnte eine positive Interaktion nur mit dem Fragment 5 bestätigt werden, da das Fragment 1 wegen seiner Autoaktivierung in diesem System keine Aussage zuließ (Abbildung 9A). Die Vollängenkonstrukte und die Fragmente 8, welche ebenfalls den Bereich des Fragments 5 beinhalten, führten in diesem Test nicht zu einem positiven Ergebnis.

Ebenfalls N-terminal lag die mögliche Interaktionsdomäne zwischen den GATA-Hybridproteinen und TCP15. Die beiden Homologen TCP14 und TCP15 sind in der Kontrolle verschiedenster licht- und hormonabhängiger Prozesse involviert, so scheinen sie die Hypokotyllänge, die Keimung, die Blattform und viele andere Entwicklungsschritte zu beeinflussen und wurden in Tomate auch mit einer Rolle der



**Abbildung 9: Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zur Interaktion von GNC und GNL mit TCP9, TCP15 und TPL.** Wachstumsassays der getesteten Interaktionspartner TCP9 (**A, B**), TCP15 (**C, D**) und TPL (**E**) mit Fragmenten von GNC beziehungsweise GNL. Zu sehen sind jeweils die Wachstumsassays auf -LWH Auxotrophiemedien mit 1-5 mM 3-AT nach der Replizierung von Platten, auf denen AD- und BD- Konstrukte in den Hefestämmen Y8800 beziehungsweise Y8930 zuvor gepaart wurden. Die Interaktionstests befinden sich in den unteren beiden Reihen, darüber die Negativkontrollen. Neben den Wachstumsassays ist ein Schema dargestellt, in dem positive Interaktionen der Fragmente in rot markiert sind. In (E) ist im Schema der Fragmente von GNL zusätzlich die Position des EAR-Motivs eingezeichnet.

Meristemaktivität und der Verzweigung in Verbindung gebracht (Davière et al., 2014; Resentini et al., 2014; Steiner et al., 2012). Die Interaktion mit GNC war auch hier nur mit Fragment 5 nachweisbar und für GNL nur mit Fragment 1 (Abbildung 9C, 9D). Dies deutet darauf hin, dass längere Fragmente einer gewissen Störung unterliegen. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass manche Interaktionen im Y2H-System, auch wenn es sich um wirkliche Interaktoren handelt, nur mit Fragmenten der eigentlichen Proteine nachgewiesen werden können (Boxem et al., 2008).

Zusätzlich zu den TCPs konnte für GNL eine Interaktion der Fragmente 8 und 9 mit dem Ko-Repressor TPL verifiziert werden. Die meisten Interaktionen mit TPL werden über ein EAR-Motiv vermittelt. So ist die Anwesenheit eines Motivs der Form LxLxL ausreichend, um eine Interaktion mit TPL zu erklären (Kagale und Rozwadowski, 2011). Interessanterweise ist in GNL ein EAR-Motiv im C-terminalen Bereich vorhanden, durch welches die Interaktion des Fragments 9 erklärt werden könnte. Allerdings kann hier nicht abschließend geklärt werden, warum das Vollängenkonstrukt und die Fragmente 4 und 7, die dieses Motiv ebenfalls tragen, kein positives Ergebnis zeigten. Dementsprechend ist nicht erklärbar, warum das Fragment 8, welches kein offensichtliches EAR-Motiv trägt, zu einer positiven Interaktion führte. Letzterem ist entgegenzuhalten, dass auch GATA16 in einer Studie, in der Interaktionspartner für

TPL mittels des Y2H-System gesucht wurden, als Interaktionspartner gefunden wurde, obwohl es kein EAR-Motiv trägt und demnach noch weitere Motive eine Interaktion mit TPL vermitteln könnten (Causier et al., 2012).

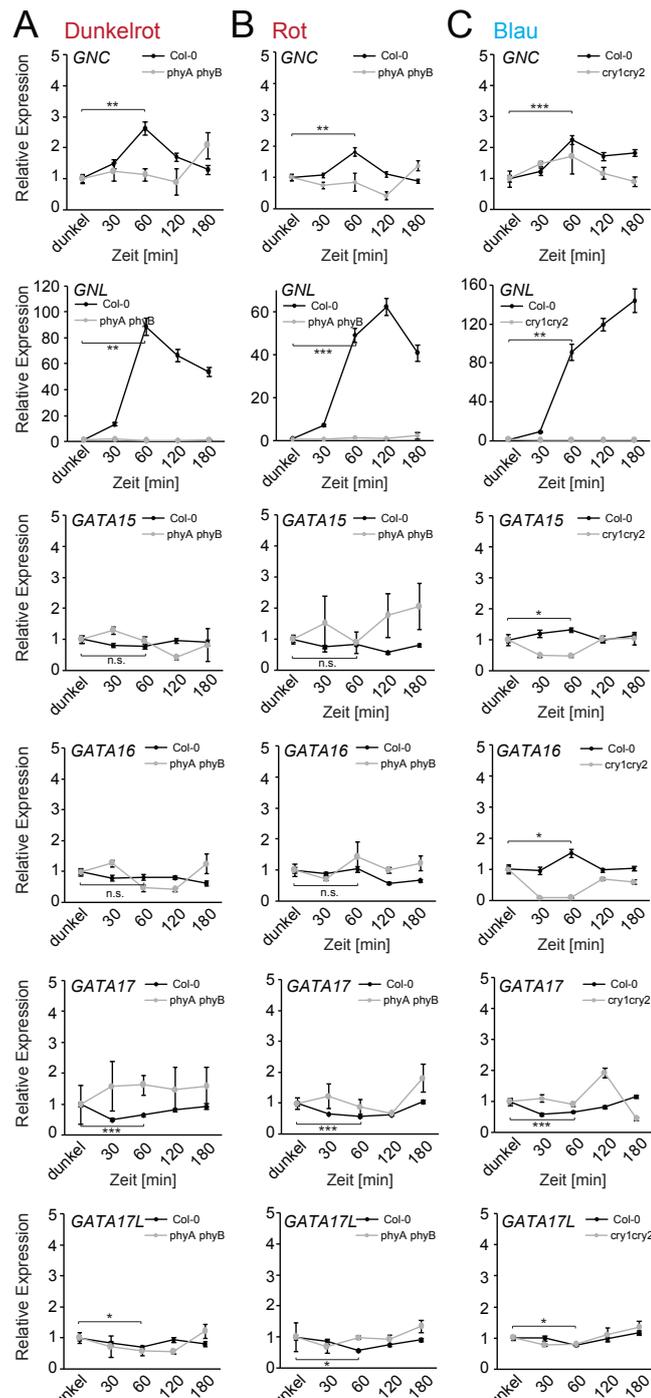
Zusammenfassend kann hier gefolgert werden, dass GNC und GNL Interaktionen mit TCP-Transkriptionsfaktoren (TCP9, TCP15) eingehen und GNL mit dem Ko-Repressor TPL im Y2H-System interagieren kann. Im Hinblick auf den Umfang der durchgeführten Analysen konnten jedoch nur wenige überzeugende Interaktionspartner für GNC und GNL gefunden werden, was andeutet, dass den Proteinen in Hefe zur vollständigen Funktion ihrer Interaktionsfähigkeit möglicherweise eine posttranslationale Modifikation oder die Anwesenheit bestimmter anderer Faktoren, wie Chaperone, zur korrekten Faltung fehlen, was die Identifikation von Interaktionspartnern in diesem System erschweren könnte (Brückner et al., 2009). Die biologischen Funktionen der Interaktionspartner sind mit den bisher bekannten Funktionen von GNC und GNL in Einklang zu bringen. Die Bestätigung der Signifikanz dieser Interaktionen durch funktionale Analysen steht jedoch noch aus. Unter anderem stellt sich die Einordnung der Interaktionen von TCP15 schwer dar, weil für diesen Transkriptionsfaktor im Y2H-System bis jetzt über 40 Interaktionspartner beschrieben wurden (Dreze et al., 2011).

### **2.3. Genregulation der LLM-Domänen B-GATAs**

Das Wissen über die redundante Funktion der LLM-Domänen B-GATAs, welches vor allem aus Untersuchungen von überexprimierten *GATA*-Genen verschiedener Spezies und Promotor-Austausch-Experimenten in *Arabidopsis* stammt, zog nicht nur die Frage nach sich, ob alle sechs *GATAs* an der Kontrolle der selben Prozesse beteiligt sind, sondern auch, inwieweit die Expression der sechs LLM-GATAs durch die selben vorgeschalteten Signale gesteuert wird. *GNC* und *GNL* waren zuvor bereits als Zielgene der Signale Auxin, CK, GA und Licht identifiziert worden (Kiba, 2005; Manfield et al., 2006; Naito et al., 2007; Richter et al., 2010, 2013b). Aufbauend darauf wurden alle sechs LLM-Domänen B-GATAs auf eine Regulation durch diese vier Stimuli hin untersucht. Es sollte geprüft werden, welche Signale für die Expression der *GATA*-Faktoren wichtig sind und wie einheitlich die Antwort auf das jeweilige Signal ausfällt.

#### **2.3.1. Regulation der LLM-Domänen B-GATAs durch Licht**

Licht war eines der ersten Signale, mit denen *GNL* in Verbindung gebracht wurde (Kiba, 2005; Naito et al., 2007). Um die Reaktion der anderen *GATAs* auf Licht zu untersuchen, wurden vier Tage alte, dunkel gewachsene Keimlinge rotem, dunkelrotem, und blauem Licht ausgesetzt und die Änderung der Expression nach 30, 60, 120 und 180 Minuten mittels qRT-PCR bestimmt (Abbildung 10).

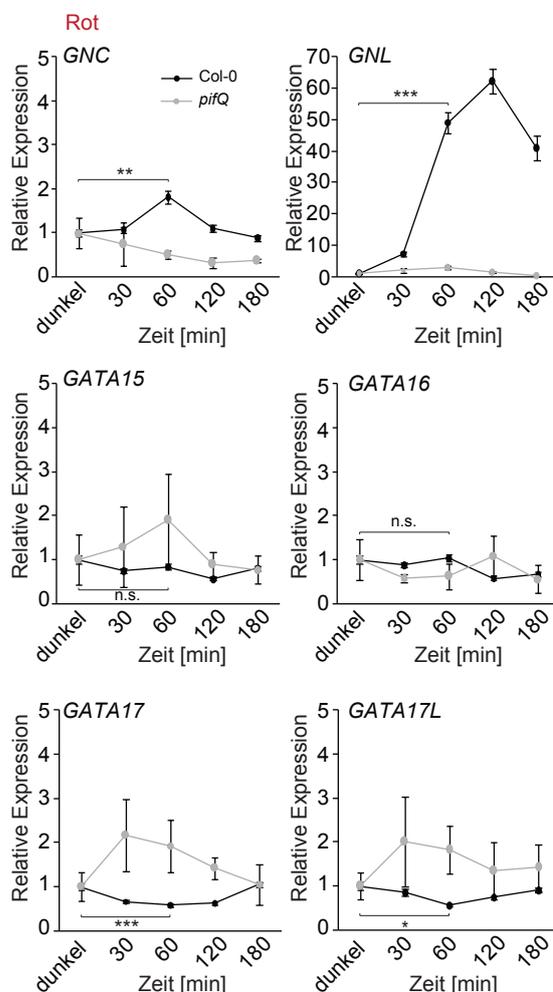


**Abbildung 10: Expression der LLM-Domänen B-GATA Gene in rotem, dunkelrotem und blauem Licht.** Durchschnittliche Expression mit Standardfehler in vier Tage alten, dunkel gewachsenen Keimlingen sowie nach 30, 60, 120 und 180 Minuten in  $0,35 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  dunkelrotem Licht (A),  $7,2 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  rotem Licht (B) und  $4,25 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  blauem Licht (C). Die Expressionswerte zu den angegebenen Zeitpunkten wurden zu der basalen Expression im Dunklen normalisiert. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

Die starke Induktion von *GNL* durch rotes, dunkelrotes und blaues Licht ließ sich sehr gut verfolgen. Bereits nach 60 min war die Expression unter allen Lichtbedingungen mindestens 40-fach induziert. Dieser Anstieg der Expression war jedoch in den *phyA phyB* Rotlichtrezeptormutanten beziehungsweise in den *cry1 cry2* Blaulichtrezeptormutanten nicht zu verzeichnen, was die jeweilige Spezifität dieser Antworten belegt. Auch *GNC* wurde unter den ausgewählten Lichtbedingungen

induziert, wobei der stärkste Anstieg des Transkripts unter dunkelrotem Licht nach 60 Minuten zu verzeichnen war. Was die verbleibenden LLM-B-GATAs betrifft so fiel die Antwort sehr viel inhomogener aus. Die Expression von *GATA15* und *GATA16* schien nur unter Blaulicht verändert zu sein. Dabei zeigte sich nach 60 Minuten eine geringfügige Induktion der beiden Gene. Im Falle des homologen Paares *GATA17* und *GATA17L* war die Expression unter den untersuchten Lichtbedingungen ebenfalls nur geringfügig beeinflusst und wies im Gegensatz zu den anderen Genen nach 60 Minuten jeweils eine verminderte Expression auf.

Im Zuge der bereits beschriebenen transkriptionellen Regulierung von *GNC* und *GNL* durch die PIF-Proteine (Richter et al., 2010) ergab sich die Frage, ob die lichtabhängige Induktion der hier betrachteten Gene PIF-abhängig ist. Um das zu prüfen, wurde die Expression der LLM-Domänen B-GATAs im Folgenden unter Rotlicht auch in der *pif1345* (*pifQ*) Mutante untersucht.



**Abbildung 11: Expression der LLM-Domänen B-GATA Gene in rotem Licht im Wildtyp und der *pifQ*-Mutante.** Durchschnittliche Expression mit Standardfehler in vier Tage alten, dunkel gewachsenen Keimlingen sowie nach 30, 60, 120 und 180 Minuten in  $7,2 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  rotem Licht. Schwarze und graue Linien zeigen die Expressionswerte in Col-0 beziehungsweise der *pifQ*-Mutante. Die Expressionswerte zu den angegebenen Zeitpunkten wurden zu der basalen Expression im Dunklen normalisiert. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

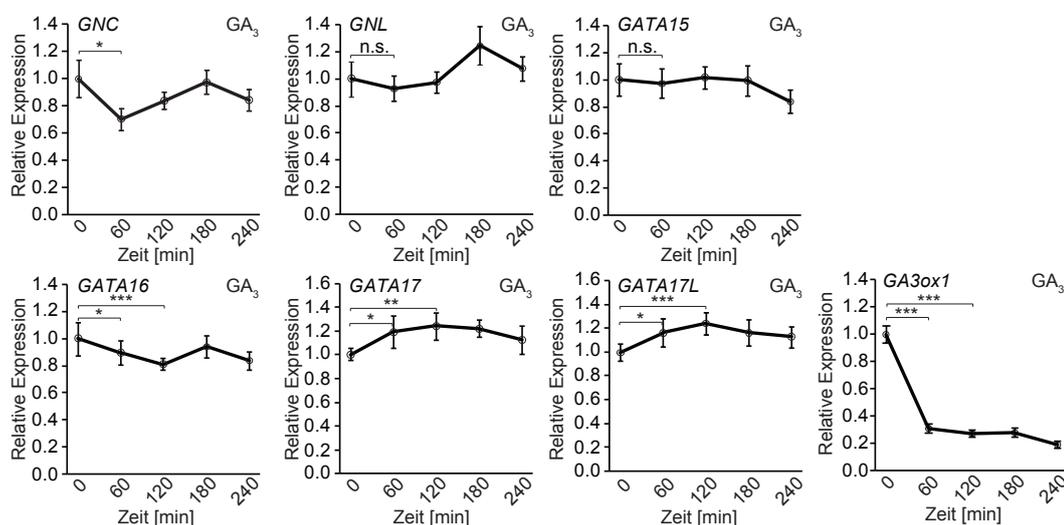
Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, verminderte die Abwesenheit der PIFs die Induktion der LLM-GATAs durch Rotlicht in der *pifQ*-Mutante sehr deutlich. Dieser Effekt trat am markantesten bei den deutlich Rotlicht-regulierten *GNC* und *GNL* hervor.

Interessanterweise waren in der getesteten *pif1345*-Mutante, in der nur vier der sieben PIFs mutiert sind, die Effekte gänzlich unterdrückt. Deswegen wird *GNL* im Rotlicht wohl von einem oder mehreren der PIFs aus der *pifQ* Mutante gesteuert. Abschließend kann hier also bestätigt werden, dass die transkriptionelle Antwort im Rotlicht von *GNC* und *GNL* PIF-abhängig zu sein scheint.

### 2.3.2. Regulation der LLM-Domänen B-GATAs durch die Hormone Gibberellin, Auxin und Cytokinin

Nachdem *GNL* als licht- und CK-reguliertes Gen beschrieben worden war, wurde von unserer Arbeitsgruppe für die beiden Transkriptionsfaktoren *GNC* und *GNL* zusätzlich die Regulation durch GA und Auxin aufgedeckt. Auf molekularer Ebene spiegelt sich das durch die direkte Bindung der DELLA reprimierten PIFs sowie der ARFs an die Promotoren von *GNC* und *GNL* wider (Richter et al., 2010, 2013b). Somit beeinflussen neben CK auch GA und Auxin die Regulation von *GNC* und *GNL*.

Um der Frage nachzugehen, ob diese Signale auch die anderen LLM-Domänen B-GATAs steuern, wurde die transkriptionelle Antwort aller sechs LLM-Domänen B-GATAs nach Behandlungen mit dem Gibberellin  $GA_3$ , dem Auxin 2,4-D und dem Cytokinin 6-BA in zehn Tage alten Col-0 Keimlingen nach 60, 120, 180 und 240 Minuten untersucht. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der GA-, Auxin- und CK-Behandlungen wurden als Positivkontrollen die Expression von *GA3ox1*, *Aux/IAA19* sowie *CKX4* in den jeweiligen Proben analysiert.

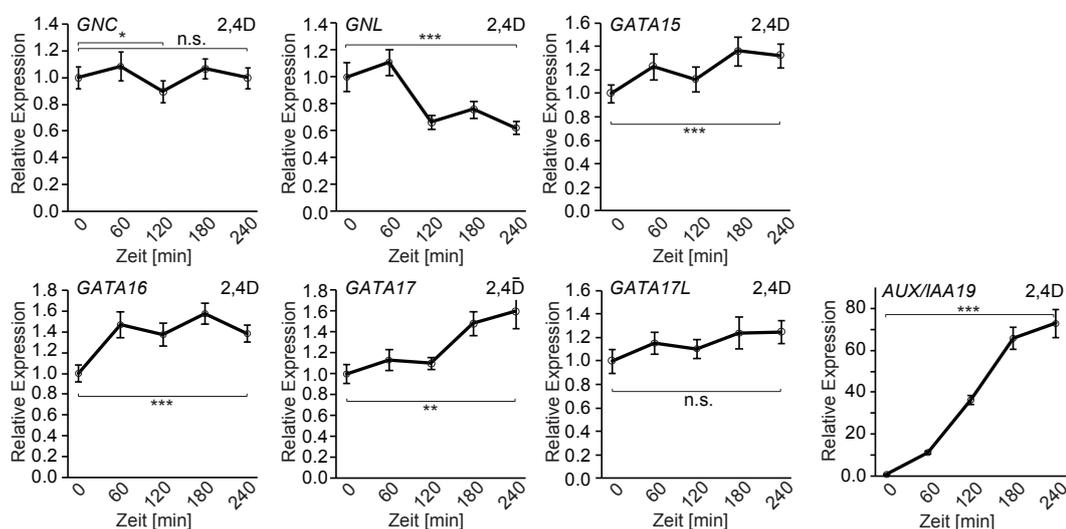


**Abbildung 12: Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach GA-Behandlung.** Durchschnittliche Expression mit Standardfehler der LLM-Domänen B-GATAs in zehn Tage alten Col-0 Keimlingen, die bestimmte Zeit mit 100  $\mu M$   $GA_3$  behandelt wurden. Zur Kontrolle wurde das *GA3ox1* Transkript in den Keimlingen die gesamte Behandlungsdauer über verfolgt. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, konnte die bereits beschriebene Regulation von *GNC* und *GNL* durch GA gut nachvollzogen werden. Die Regulation durch GA ist geprägt von einer starken Reduktion der Expression, die im weiteren Verlauf durch

eine positiven Rückkopplung wieder ansteigt (Richter et al., 2010). Bei *GNC* war dieser Transkriptionsverlauf gut erkennbar, wobei die Expression ihr Minimum bei 60 Minuten erreichte, und auch *GATA16* schien diesem Muster zu folgen (Abbildung 12). *GNL* zeigte hingegen einen geringeren Rückgang der Expression durch die GA-Behandlung, jedoch war der durch die Rückkopplung verursachte Anstieg der Transkription zu erkennen. Bei den beiden Genen *GATA17* und *GATA17L* war nach 30 beziehungsweise 60 Minuten ein leichter Anstieg der Expression zu verzeichnen. Sie reagierten somit entgegengesetzt zu *GNC*, *GNL* und *GATA16*. Die geringsten Effekte waren bei *GATA15* zu verzeichnen (Abbildung 12).

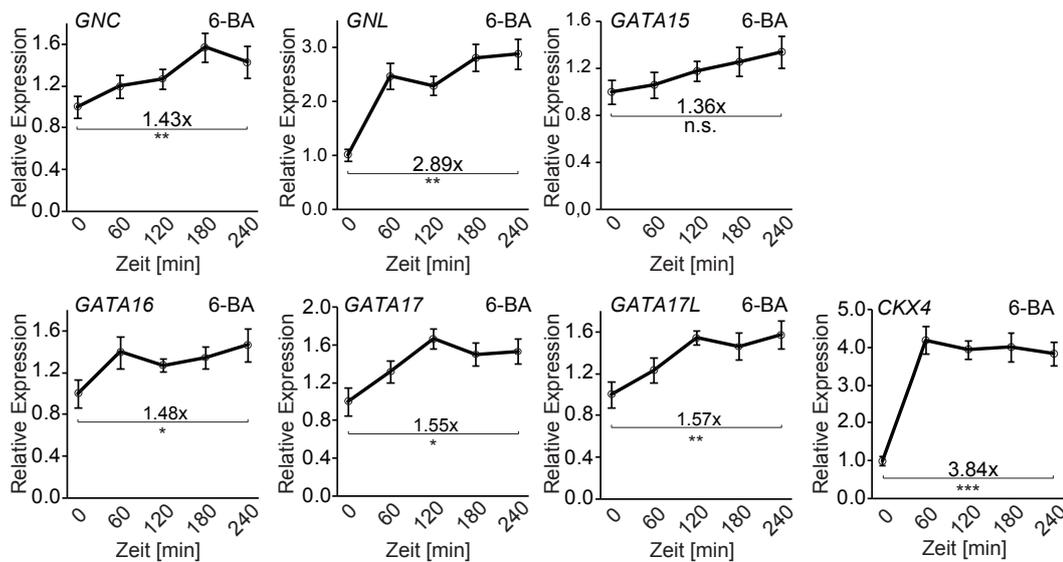
Auch Auxin übte eine negative Wirkung auf die Expression von *GNC* und *GNL* aus, wobei dieser Effekt bei *GNL* mit einer Reduktion von ca. 40% nach 120 Minuten am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach Auxin-Behandlung.** Durchschnittliche Expression mit Standardfehler der LLM-Domänen B-GATAs in zehn Tage alten Col-0 Keimlingen, die bestimmte Zeit mit 5 µM 2,4D behandelt wurden. Zur Kontrolle wurde das *AUX/IAA19* Transkript verfolgt. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

Die Expression von *GNC* blieb in diesem Experiment weitestgehend unverändert und nur nach 120 Minuten war eine geringe Reduktion in der Expression zu erkennen. Die kurzen LLM-GATAs *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* hingegen schienen eine von *GNC* und *GNL* entgegengesetzte Antwort zu besitzen und wurden nach der Auxin-Behandlung hochreguliert. So waren diese kurzen GATAs am Ende der Behandlung im Schnitt 1,5-fach induziert (Abbildung 13).

Im Falle des Hormons CK war festzustellen, dass alle LLM-Domänen B-GATAs durch die Behandlung mit 6-BA aktiviert wurden. Hier zeigte sich also eine transkriptionelle Regulation, die im Gegensatz zu GA und Auxin sehr homogen ausfiel (Abbildung 14).



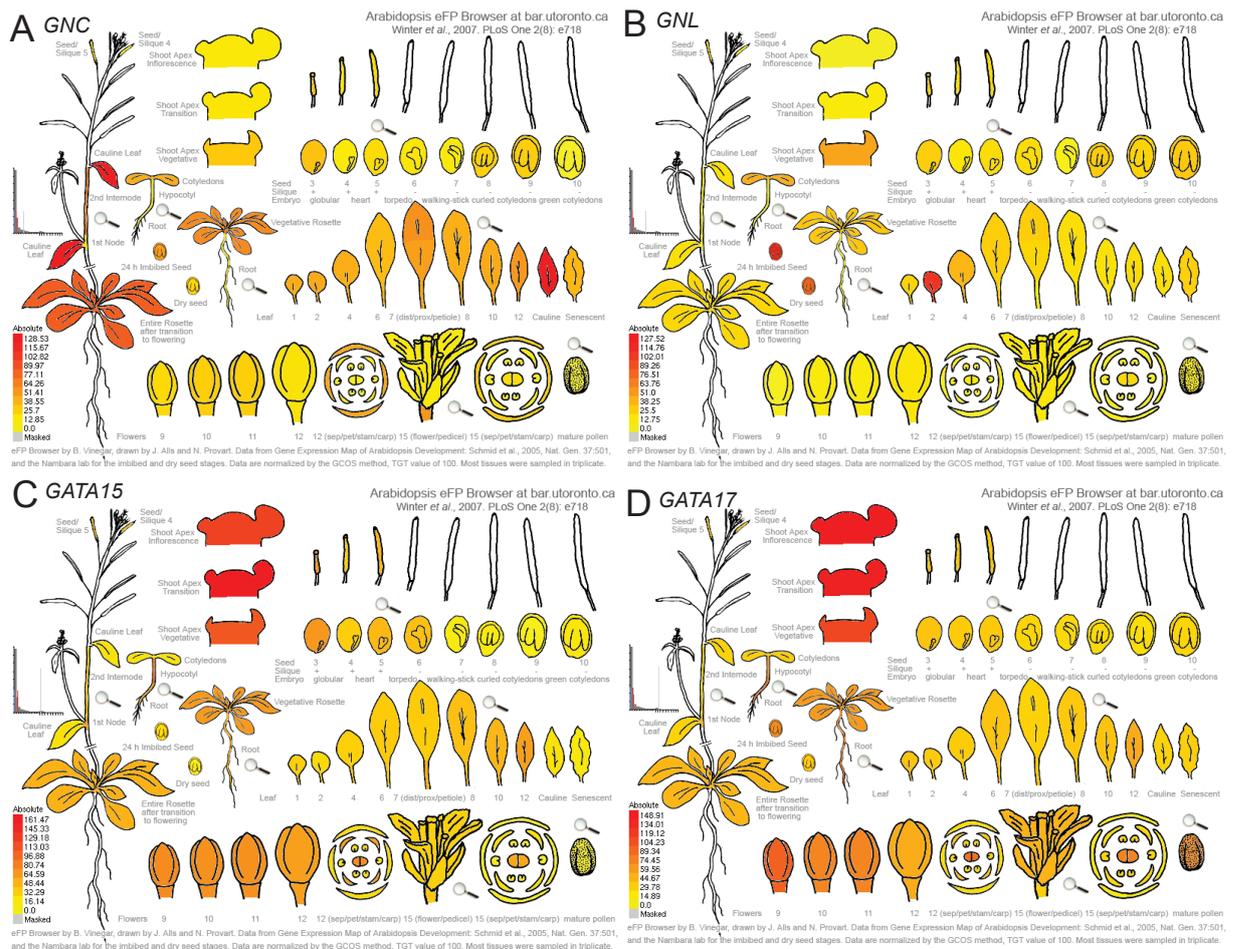
**Abbildung 14: Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach CK-Behandlung.** Durchschnittliche Expression mit Standardfehler der LLM-Domänen B-GATAs in 10 Tage alten Col-0 Keimlingen, die bestimmte Zeit mit 10  $\mu\text{M}$  6-BA behandelt wurden. Zur Kontrolle wurde das CKX4 Transkript verfolgt. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

Der stärkste Effekt war hier bei *GNL* mit einer dreifachen Induktion nach 240 Minuten zu beobachten. Alle anderen Gene wurden bis zum Ende der Behandlung mindestens eineinhalbfach aktiviert (Abbildung 14).

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass die transkriptionelle Antwort auf die hier getesteten Hormone für *GNC* und *GNL* im Wesentlichen bestätigt werden konnte. Die Reaktionen der kurzen homologen Paare *GATA15*, *GATA16* und *GATA17*, *GATA17L* fallen jedoch insgesamt geringer und inhomogener aus. *GATA17* und *GATA17L* weisen im Falle von GA und Auxin sogar eine zu *GNC* und *GNL* entgegengesetzte Regulation auf. Nur durch CK werden alle LLM-Domänen B-GATAs induziert. Diese homogene Wirkung der 6-BA-Behandlung könnte ein Hinweis darauf sein, dass alle LLM-Domänen B-GATAs in die Kontrolle CK-regulierter Prozesse involviert sind.

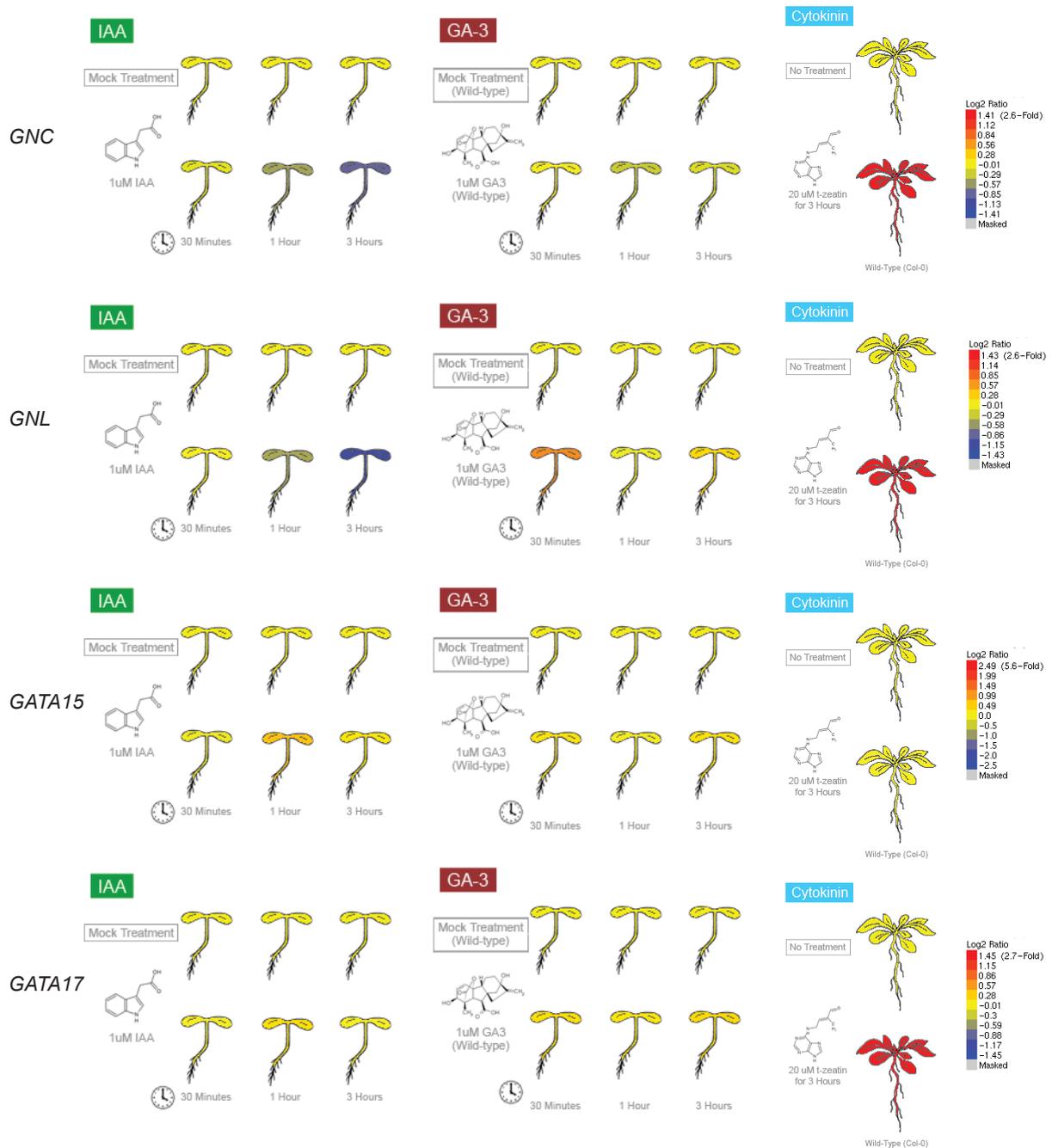
### 2.3.3. Expressionsanalyse mittels eFP-Browser

Für die Funktion von Transkriptionsfaktoren ist nicht nur die Steuerung durch vorgeschaltete Signale wichtig, die ihre Aktivierung oder Repression zum richtigen Zeitpunkt sicherstellen, sondern auch der Ort ist entscheidend, an dem sie exprimiert werden und ihre Wirkung entfalten. Bei redundant wirkenden Genen ist die Expression an ähnlichen Orten sehr wahrscheinlich. Es wurde bereits gezeigt, dass *GNC* und *GNL* in grünen Geweben exprimiert sind (Hudson et al., 2011; Richter et al., 2010, 2013a, 2013b) und es gibt Hinweise darauf, dass *GATA15* und *GATA17* auch in Blüten exprimiert sind (Manfield et al., 2006). Um zu sehen, ob sich diese Befunde über die Expressionsdomänen der LLM-Domänen B-GATAs bestätigen lassen, wurde mit Hilfe des eFP-Browsers die Expression der *GATAs* analysiert.



**Abbildung 15: Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach eFP-Browser (entwicklungsbiologisch).** (A) Entwicklungsbiologisch relevante Expressionsprofile von *GNC* (A), *GNL* (B), *GATA15* (C) und *GATA17* (D) basierend auf den absoluten Werten des eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Für *GATA16* und *GATA17L* liegen im eFP-Browser keine Daten vor.

Dazu wurden die entwicklungsbiologischen Muster der Expression der im eFP-Browser verfügbaren *GATAs* *GNC*, *GNL*, *GATA15* und *GATA17*, verglichen (Abbildung 15). Zusätzlich wurde ebenfalls auf die Expressionsänderungen durch Hormonbehandlungen mit Auxin, GA und CK eingegangen (Abbildung 16). Für *GATA16* und *GATA17L* liegen keine Daten vor, da die Quelle des eFP Browsers auf Arraydatensätzen basieren, auf denen diese Gene nicht vertreten sind. Gemäß bereits bekannter Analysen ist *GNC* auch in der Darstellung der absoluten Werte des eFP-Browsers relativ gleichmäßig in grünem Gewebe exprimiert. Dabei zeigt sich vor allem ein deutliches Signal in den Rosettenblättern und den sprossständigen Blättern. Auch in imbibierten Samen und in Blütenorganen sowie dem Apex scheint *GNC* exprimiert zu sein (Abbildung 15A). Für *GNL* ergibt sich ein ähnliches Bild, wobei die Expression in den Blättern weniger stark und dafür mehr in die Samen und den Apex verlagert zu sein scheint (Abbildung 15B). *GATA15* ist ebenfalls in den chlorophyllhaltigen Geweben exprimiert und besonders deutlich in Blütenknospen sowie den Spross- und Blütenmeristemen und Blütenknospen vorhanden (Abbildung 15C). Die besonders starke Expression in den Meristemen zeigt



**Abbildung 16: Expression der LLM-Domänen B-GATAs nach eFP-Browser (Hormonbehandlungen).** Expressionsänderungen der LLM-Domänen B-GATAs *GNC*, *GNL*, *GATA15* und *GATA17* in Reaktion auf Horminbehandlungen basierend auf den Werten des eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Dargestellt sind Auxin, GA- und CK-Behandlungen. Für *GATA16* und *GATA17L* liegen im eFP-Browser keine Daten vor.

sich auch für *GATA17*, das zudem noch stärker in Blütenknospen und auch in Samen vermehrt vorliegt (Abbildung 15D).

Interessanterweise spiegeln die Darstellungen des eFP-Browsers die Ergebnisse dieser Arbeit, bezüglich der Regulation durch die Hormone, größtenteils wider (Abbildung 16).

*GNC* und *GNL* werden, gemäß eFP-Browser, durch Auxin leicht reprimiert, und durch CK sehr stark induziert. *GATA15* und *GATA17* werden durch Auxin leicht angeregt und reagieren auf GA nicht sehr stark. Auch *GATA17* wird durch CK deutlich angeregt. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Expression der untersuchten LLM-Domänen B-GATAs vor allem auf die chlorophyllhaltigen Gewebe konzentriert und dabei besonders in Blättern und Meristemen zu finden ist.

## **2.4. Die LLM-Domänen B-GATAs sind elementare Regulatoren der Pflanzenentwicklung**

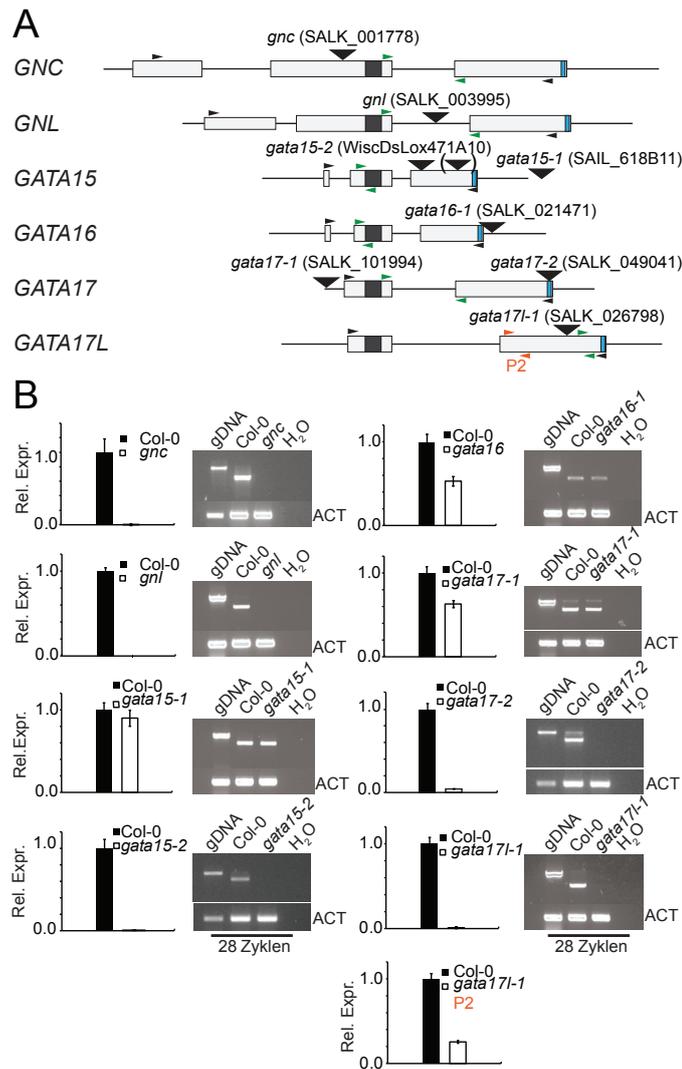
Neben der Frage durch welche Signale die LLM-Domänen B-GATAs gesteuert werden, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Beschreibung von Phänotypen in komplexen Kombinationen von T-DNA-Insertionslinien dieser Gene. Ausgehend von bereits beschriebenen Phänotypen von *gnc* und *gnl* wurden Hinweise dafür gesammelt, welche biologischen Prozesse die Transkriptionsfaktoren dieser Familie kontrollieren.

### **2.4.1. Charakterisierung von Insertionsmutanten der sechs LLM-Domänen B-GATA Gene**

Das Wissen über die LLM-Domänen B-GATA Familie basiert vor allem auf Analysen von Insertionsmutanten und Überexpressoren von *GNC* und *GNL*. Eingehende Untersuchungen an diesen Genen in Arabidopsis, aber auch in Reis, trugen maßgeblich zum Verständnis dieser redundant wirkenden Transkriptionsfaktoren bei (Behringer et al., 2014; Hudson et al., 2013; Richter et al., 2010, 2013a). Doch weder in Arabidopsis noch einer anderen Spezies waren zu Beginn dieser Arbeit Mutanten der kurzen Vertreter der LLM-Domänen B-GATAs *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* beschrieben. Eine systematische Arbeit zur Rolle dieser Gene und deren Beitrag zur Kontrolle biologischer Funktionen, basierend auf Mutanten, fehlte gänzlich. Demzufolge sollten hier T-DNA-Insertionslinien aller sechs Gene identifiziert und untersucht werden.

Für die beiden langen LLM-GATAs wurden dazu die bereits publizierten Allele *gnc* (SALK\_001778) und *gnl* (SALK\_003995) zur Analyse herangezogen. Für *GATA15* wurden die Linien SAIL\_618\_B11 (*gata15-1*) und WiscDsLox471A10 (*gata15-2*) ausgewählt, für *GATA16* die SALK-Linie SALK\_021471 (*gata16-1*). Zur Analyse von *GATA17* fanden die beiden Linien SALK\_101994 (*gata17-1*) und SALK-049041 (*gata17-2*) Verwendung und schließlich für *GATA17L* die Linie SALK\_026798C (*gata17l-1*). Homozygote Linien dieser Insertionsmutanten wurden mittels semi-quantitativer und quantitativer PCR untersucht (Abbildung 17).

Diese Analyse bestätigte die Befunde aus früheren Studien, dass in der *gnc* Mutante, in der die T-DNA im zweiten Exon lokalisiert ist, weder das Volllängenkonstrukt, analysiert über RT-PCR, noch Regionen, die hinter der Insertionsstelle liegen in einer qRT-PCR nachweisbar sind. In ähnlicher Weise war auch bei *gnl* mittels RT-PCR kein



**Abbildung 17: Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien von GATA-Genen. (A).** Überblick der GATA Genloci. Exons sind dabei durch Rechtecke und Introns durch Linien dargestellt. Die für die Gene charakteristischen GATA-Zinkfinger sowie LLM-Domänen jeweils durch schwarze und blaue Rechtecke. Primer der semi-quantitativen und quantitativen PCR Analysen sind durch schwarze beziehungsweise farblich abgesetzte Pfeile verdeutlicht. Die Positionen der T-DNA Insertionen sind durch schwarze Dreiecke dargestellt, wobei die im Zuge dieser Analysen als falsch annotierte Insertion in *GATA15* zusätzlich in Klammern dargestellt wurde. **(B).** Semi-quantitative (rechts) und quantitative (links) PCR Analysen der Expression der LLM-Domänen B-GATAs in sieben Tage alten Keimlingen der untersuchten Insertionslinien. Zur Kontrolle der RT-PCR wurden immer Reaktionen mit genomischer DNA, cDNA und einer Wasserkontrolle gegenübergestellt. Die qRT-PCRs wurden jeweils auf die Col-0 Probe normalisiert.

Vollängenkonstrukt nachweisbar und auch in einer qRT-PCR Reaktion mit Primern, die das insertionstragende Intron umspannen, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Die Expressionsanalysen in der neuen Insertionslinie von *GATA15* (SAIL\_618\_B11), für die die Lage der Insertion für das dritte Exon annotiert war, ergaben keine Hinweise auf ein vermindertes *GATA15* Transkript. Eine anschließende Sequenzierung des Locus klärte die exakte Position der T-DNA. Die Insertion liegt ca. 60 Nukleotide hinter der 3'-UTR des Gens. Dies erklärt die unveränderte Expression von *GATA15* und demnach kann SAIL\_618\_B11 nicht als Verlustmutante von *GATA15* bezeichnet werden. Für das zweite Allel, *gata15-2* (WiscDsLox471A10), konnte die

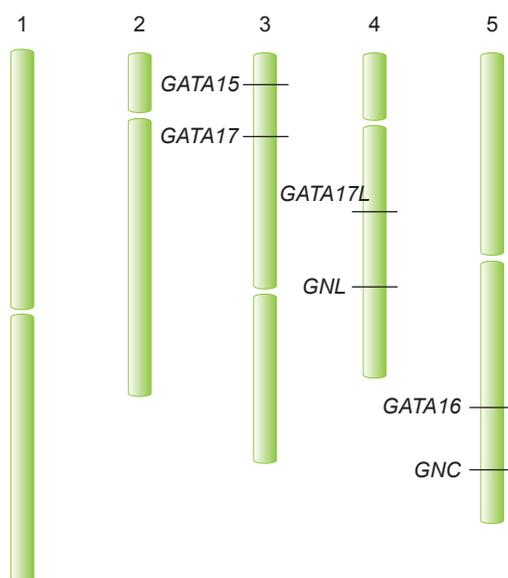
Insertion im dritten Exon bestätigt werden und weder in der RT-PCR noch in der qRT-PCR mit Primern, die vor der Insertion lagen, konnte ein Transkript nachgewiesen werden. Weiterhin ergaben die Analysen, dass die T-DNA-Insertionen in SALK\_021471 (*gata16-1*) und in SALK\_101994 (*gata17-1*) im 3'-UTR beziehungsweise in der 5'-UTR der jeweiligen Gene lagen. Durch beide Insertionen wurden die entsprechenden Transkripte jedoch um mindestens 50% vermindert (Abbildung 17B). Mit dem Allel *gata17-2* (SALK-049041) wurde eine weitere Insertionslinie für *GATA17* untersucht, in der die mRNA nur in der quantitativen PCR noch leicht detektierbar war. Für *GATA16* konnten im T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) keine weiteren Insertionslinien gefunden werden. Schließlich wurde durch Sequenzierung des *GATA17L* Locus die Lage der T-DNA-Insertion im zweiten Exon bestimmt. Ein Vollängentranskript war weder mittels RT-PCR noch einer qRT-PCR Reaktion nachweisbar, wenn sich das Amplikon nach der Insertion befand (Abbildung 17B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transkripte in den T-DNA-Insertionslinien, so wie sie hier untersucht wurden, für *gnc*, *gnl*, *gata15-2* und *gata17l-1* abwesend sind, für *gata16-1* und *gata17-1* stark reduziert und für *gata15-1* nicht verändert sind. Da die Allele *gata15-2* und *gata17-2* erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung standen und für *GATA16* keine alternativen Mutanten zur Verfügung standen, konnten diese in der Folge nicht in die Herstellung der komplexen Mutanten mit einbezogen werden und es wurde mit der Analyse der schwächeren Mutanten fortgefahren. Klar ist jedoch, dass die folgenden Analysen keine Rückschlüsse auf die Rolle und Funktion von *GATA15* zulassen. Im weiteren Verlauf wird diesem Umstand Rechnung getragen, indem in entsprechenden Mutantenkombinationen dieses Allel als *GATA15* bezeichnet wird.

#### 2.4.2. Herstellung der komplexen Mutanten

Wegen der redundanten Wirkung der Gene, welche aus bisherigen Analysen an der *gnc gnl* Doppelmutante sowie Überexpressoren von einiger LLM-GATAs ersichtlich war, wurde von Beginn an das Ziel verfolgt, mehrfache oder komplexe Mutantenkombinationen zu generieren und zu untersuchen. In Abbildung 18 ist die Lage aller LLM-Domänen B-GATAs im Arabidopsis-Genom eingezeichnet. Die T-DNA Insertionen wurden derart kombiniert, um Mutanten zu erhalten, die es erlaubten, die Rolle der LLM-GATAs in komplexen Kombinationen im Kontext von *gnc* und *gnl* zu untersuchen.

Dafür wurden zuerst die Insertionen der nahverwandten Genpaare von *GATA15* und *GATA16* sowie *GATA17* und *GATA17L* gekreuzt, um die Kombinationen *GATA15 gata16* und *gata17 gata17l* zu erhalten. Anschließend wurden diese Mutanten weiter verwendet, um die *GATA15 gata16 gata17 gata17l* Tripelmutante zu erzeugen, die im Folgenden als (komplementäre) *tripel*-Mutante bezeichnet wird und ausschließlich



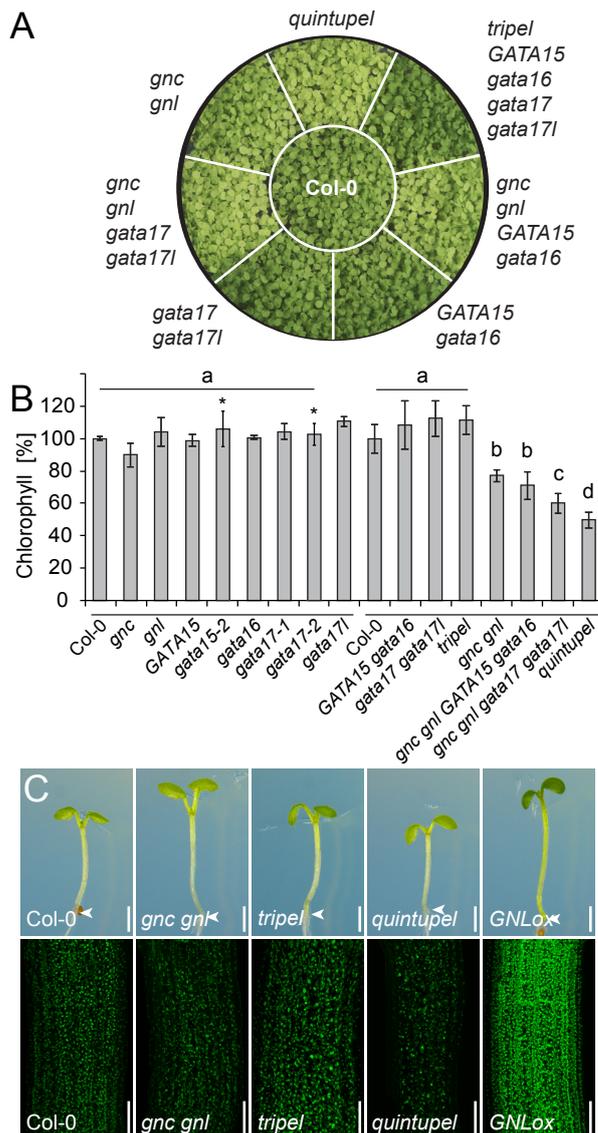
**Abbildung 18: Lokalisation der LLM-Domänen B-GATA Loci im Genom von *Arabidopsis thaliana*.** Relative Lage aller LLM-Domänen B-GATAs beziehungsweise der verwendeten T-DNA Insertionen auf den Chromosomen des Genoms von *Arabidopsis thaliana*. *GNC* (SALK\_001778), *GNL* (SALK\_003995), *GATA15* (SAIL\_618\_B11), *GATA16* (SALK\_021471), *GATA17* (SALK\_101994) und *GATA17L* (SALK\_026798C).

die kurzen LLM-GATAs vereint. Mit den Allelen *gnc* und *gnl* wurden die Tripel- und Quadrupelmutanten *gnc gnl GATA15 gata16* und *gnc gnl gata17 gata17l* und schließlich die Quintupelmutante *gnc gnl GATA15 gata16 gata17 gat17l* erzeugt, die die höchste Komplexität aufweist und im weiteren Verlauf *quintupel*-Mutante genannt wird (Abbildung 18).

### 2.4.3. LLM-GATAs kontrollieren redundant die Chlorophyllakkumulation bei Pflanzen

Beim Herstellen der Mutanten hatte sich bereits abgezeichnet, dass in komplexeren Mutantenkombinationen ein deutlicher Defekt der Chlorophyllakkumulation vorlag. Um die Rolle der LLM-Domänen B-GATAs in der Chlorophyllproduktion systematisch zu untersuchen, wurde in Einzel- und Mehrfachkombinationen von 14 Tage alten *gata*-Mutanten die Chlorophyllkonzentration quantifiziert (Abbildung 19).

Der Chlorophyllgehalt in den Keimlingen der Einzelmutanten wich nicht signifikant von Col-0 ab. Mit Ausnahme der bereits beschriebenen Chlorophylldefekte von *gnc gnl* waren auch in den Doppelmутanten keine Unterschiede auszumachen (Abbildung 19B). Dabei wiesen auch die starken Allele *gata15-2*, *gata17-2* und *gata17l-1*, der neuen Insertionslinien, verglichen mit dem Wildtyp, keine Verminderung des Chlorophylls auf. Dies verdeutlicht zum einen die hoch redundante Wirkung der GATAs in der Kontrolle der Chlorophyllbildung und unterstreicht zum anderen die Tatsache, dass ein Phänotyp, zum Beispiel in *gata17-1*, nicht zwingend aufgrund der Schwäche des Allels abwesend ist. Interessanterweise war jedoch zu beobachten, dass - obwohl die Mutationen in der *tripel*-Mutante noch keinen Defekt zeigten - die Insertionen in *GATA16* und die beiden Allele von *GATA17* und *GATA17L* die Defekte der *gnc gnl* Mutante verstärkten und die *gnc gnl GATA15 gata16* sowie die *gnc gnl gata17 gata17l* in der Quantifizierung den Chlorophyllgehalt von *gnc gnl* sogar deutlich unterschritten. Die hohe Redundanz in der Kontrolle des Ergrüens wurde nicht zuletzt dadurch



**Abbildung 19: Die LLM-Domänen B-GATAs regulieren redundant die Chlorophyllakkumulation in Arabidopsis.**

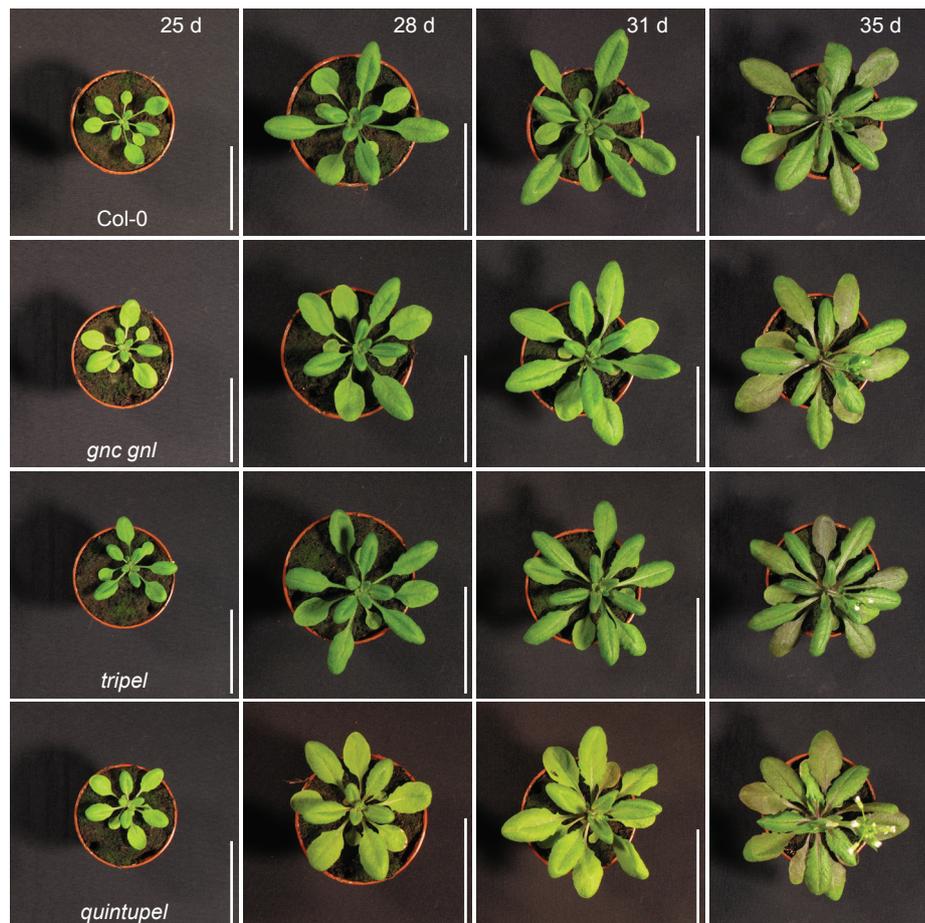
**(A)** Foto von 14 Tage alten Keimlingen, um den Chlorophylldefekt der Mutanten gegenüber Col-0 zu verdeutlichen. Die Quantifizierung des Chlorophylls in **(B)** wurde mit diesen Pflanzen durchgeführt. **(B)** Quantifizierung des Chlorophylls A und B aus 14 Tage alten Pflanzen unterschiedlicher Genotypen. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Durchgängen durchgeführt, wie die Balken über der Beschriftung andeuten, und die Ergebnisse sind im Verhältnis der jeweiligen Col-0 Probe angegeben. Der Student's t-Test wurde zwischen allen Genotypen durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterscheiden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert. Die Quantifizierungen des Chlorophylls der *gata15-2* und *gata17-2* Allele (mit einem \* markiert) wiesen keinen statistischen Unterschied zu Col-0 auf und wurden nachträglich eingefügt. **(C)** Repräsentative Bilder von sieben Tage alten Keimlingen, die unter schwachem Licht ein langes Hypokotyl ausbildeten und zur Visualisierung der Chloroplastenfluoreszenz verwendet wurden (obere Reihe) sowie Konfokalmikroskopiebilder von fluoreszierenden Chloroplasten in Hypokotylen von Keimlingen verschiedener Genotypen (untere Reihe).

unterstrichen, dass die deutlichsten Chlorophylldefekte in der *quintupel* Mutante hervortraten (Abbildung 19B).

Zusammenfassend kann hier gefolgert werden, dass alle LLM-Domänen B-GATA Faktoren redundant die Chlorophyllakkumulation steuern, wobei der Ausfall von einzelnen Genen durch die andern Mitglieder der Familie scheinbar kompensiert werden kann. Natürlich kann hier keine Aussage über den Beitrag von *GATA15* zur Chlorophyllakkumulation gemacht werden, da das verwendete Allel in den komplexen Mutanten keine Verlustmutante darstellt.

Um die Defekte bezüglich des Ergrüens in den Mutanten weiter zu verdeutlichen, wurde der Chlorophyllgehalt anhand der Fluoreszenz unter dem Konfokalmikroskop untersucht. Die Hypokotyle von sieben Tage alten Keimlingen der *gnc gnl* Doppelmutante, der *tripel*- sowie der *quintupel*-Mutante wurden unter dem Mikroskop untersucht (Abbildung 19C).

Erwartungsgemäß spiegelte diese Untersuchung die Ergebnisse der Chlorophyllbestimmung in Abbildung 19B wider. So wiesen die Chloroplasten



**Abbildung 20: Ausprägung des Chlorophylldefekts der *gata*-Mutanten in adulten Pflanzen.** Bilder von Col-0, *gnc gnl*, *tripel*- und der *quintupel*-Mutanten, die jeweils nach 25, 28, 31 und 35 Tagen fotografiert wurden. Standardbalken = 5 cm

der *quintupel*-Mutante die geringste Fluoreszenz auf und auch in der *gnc gnl* Doppelmutante war die Fluoreszenz, verglichen mit Col-0, offensichtlich geringer. Die *tripel*-Mutante zeigte eine ähnliche Fluoreszenz wie der Wildtyp.

Im Laufe der gesamten Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass sich der Chlorophylldefekt nicht nur in Keimlingen und jungen Pflanzen nachweisen ließ, sondern vor allem im Falle der *quintupel*-Mutante, auch in adulten Pflanzen noch sehr auffällig zu sehen war (Abbildung 20).

Abschließend kann also gefolgert werden, dass der Defekt in der Chlorophyllakkumulation, den Mutationen in den LLM-Domänen B-GATAs verursachen, in verschiedenen Analysemethoden nachweisbar ist und zumindest in den komplexen Mutanten über die gesamte Lebensspanne hervortritt.

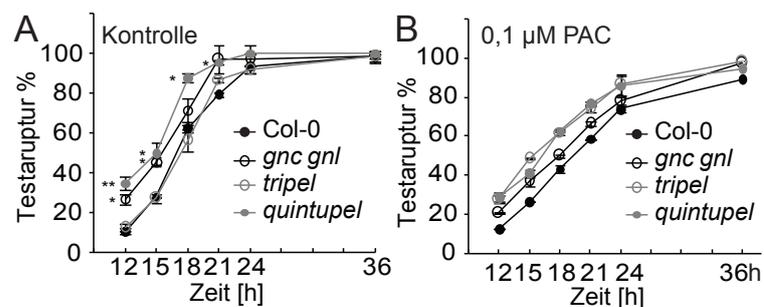
#### 2.4.4. LLM-GATAs steuern Entwicklungsprozesse unterhalb von Gibberellin

Neben dem sehr offensichtlichen Phänotyp des Chlorophylldefekts, der für *gnc* schon früh beschrieben wurde (Bi et al., 2005), sind *GNC* und *GNL* zuerst als GA regulierte Transkriptionsfaktoren in den Fokus unserer Arbeitsgruppe geraten (Richter et al., 2010). In eingehenden Analysen konnte bestätigt werden, dass einige der bekannten

GA Phänotypen, wie die erwähnte Chlorophyllakkumulation, die Keimung und der Blühzeitpunkt zum Teil durch *GNC* und *GNL* gesteuert werden. Im Folgenden wurden GA-Phänotypen auch in den neu generierten Mutantenkombinationen betrachtet, um die Rolle der paralogen *GATAs* für diese Prozesse genauer zu beleuchten.

#### 2.4.4.1. LLM-GATAs verzögern die Keimung

Eines der bekanntesten Merkmale, welches der Kontrolle des Hormons GA unterliegt, ist die Keimung (Schwechheimer, 2014). Für die *gnc gnl* Doppelmutante wurde eine verfrühte Keimung festgestellt (Richter et al., 2010). Um zu sehen, ob dieser Effekt in den Samen der komplexen *gata*-Mutanten verstärkt ist, wurde synchronisiertes Samenmaterial einem Keimungstest unterzogen. Dafür wurden die Samen von Col-0, *gnc gnl*, der *tripel*-Mutante sowie der *quintupel*-Mutante auf Kontrollmedium und auf Medium mit 0,1  $\mu\text{M}$  Paclobutrazol (PAC) nach 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden auf eine Ruptur der Testa hin untersucht (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Keimungsverhalten von Mutanten der LLM-Domänen B-GATAs.** Keimungsassay von Col-0 und verschiedenen *gata*-Mutanten in Kontrollmedium (A) und in Medium mit 0,1  $\mu\text{M}$  Paclobutrazol (B). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden alle Samen mit einer Ruptur der Testa gezählt und prozentual zur Gesamtzahl dargestellt ( $n \geq 62$ ). Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Die sigmoiden Kurven des Keimungsverlaufs unter Kontrollbedingungen von *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante liegen über der Kurve von Col-0, was eine verfrühte Keimung andeutet. Speziell nach 12 und 15 Stunden keimten *gnc gnl* und die *quintupel*-Mutante signifikant früher als Col-0. Die Samen der *tripel*-Mutante hingegen verhielten sich wildtypisch (Abbildung 21A). Durch die Behandlung mit PAC wurde die Keimung insgesamt deutlich verlangsamt. Dies kommt durch eine Abflachung der Kurven zum Ausdruck und verdeutlicht die GA-Abhängigkeit dieses Prozesses. Selbst nach 24 Stunden keimten hier noch nicht alle Samen, wobei die *tripel*-Mutante und die *quintupel*-Mutante gegenüber der PAC-Behandlung insensitiver zu sein schienen als der Wildtyp (Abbildung 21B).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Wirkung der paralogen *GATAs* auf die Keimung deutlich sichtbar ist. Sie kommt vor allem dadurch zum Ausdruck, dass die *quintupel*-Mutante unter Kontrollbedingungen am frühesten keimt. Die Unterschiede zwischen der *quintupel*-Mutante und *gnc gnl* fallen jedoch nicht groß aus, was bedeutet,

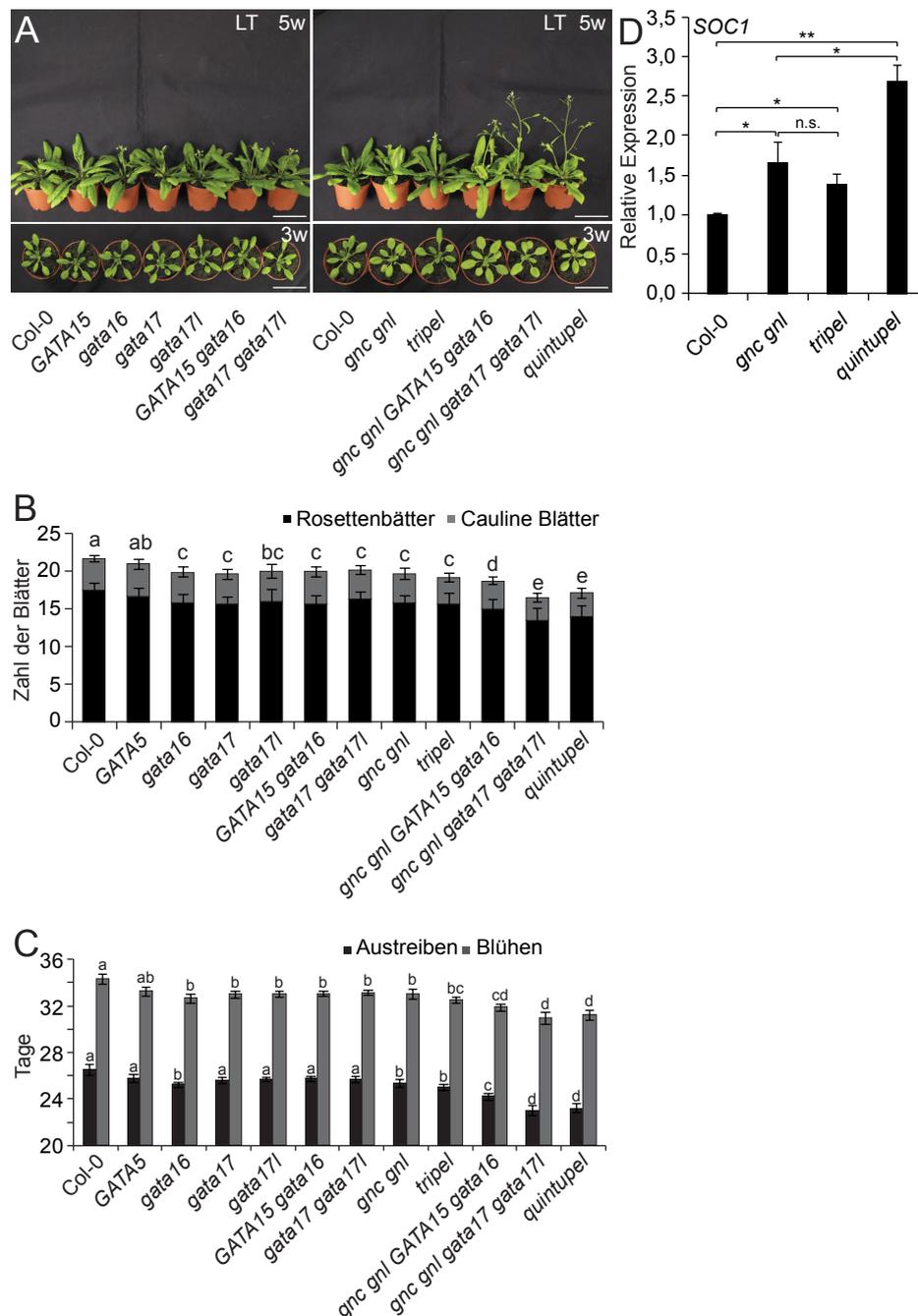
dass die paralogen *LLM-GATAs* für die Kontrolle der Keimung eher eine untergeordnete Rolle spielen.

#### 2.4.4.2. LLM-Domänen B-GATAs steuern den Blühzeitpunkt

Eines der wichtigsten Merkmale der *gnc gnl* Mutante, im Kontext von GA, ist zweifellos der Blühzeitpunkt. Verglichen mit dem Wildtyp blüht die *gnc gnl* Mutante geringfügig früher und die Überexpression der LLM-Domänen B-GATAs verursacht dementsprechend eine starke Verzögerung des Blühzeitpunktes (Richter et al., 2010, 2013a). Um den Einfluss der paralogen LLM-Domänen B-GATAs auf den Blühzeitpunkt zu untersuchen, wurden die *gata*-Verlustmutantenserie in Langtag- und Kurztag-Bedingungen mit einem 16 beziehungsweise 8 Stunden langen Lichtzyklus angezogen und der Blühzeitpunkt anhand der Dauer bis zum Austreiben, dem Erscheinen der Blütenorgane und der Anzahl der Rosettenblätter bestimmt (Abbildung 22).

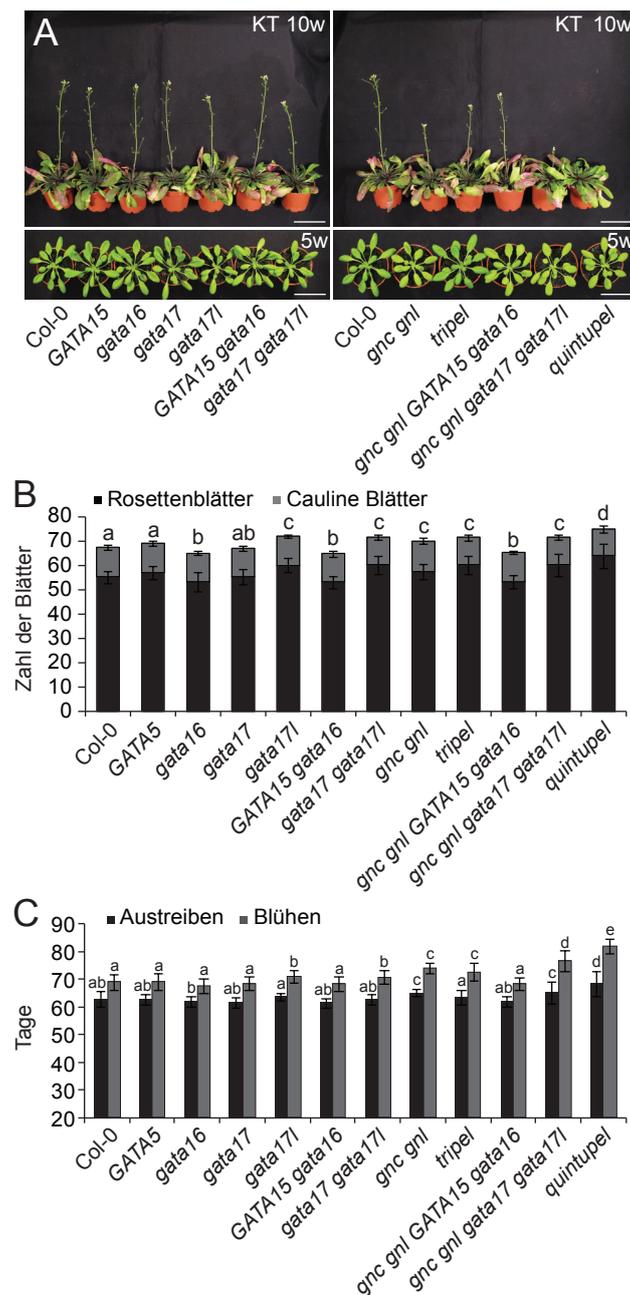
Unter Langtag-Bedingungen war bei den Einzelmutanten nur ein geringer Effekt zu erkennen, so konnte jedoch mit steigender Komplexität der Mutanten ein gradueller Anstieg der Beschleunigung des Blühzeitpunktes bei den Mutanten-Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 22). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, neben dem bekannten Phänotyp der Blühzeitverkürzung von *gnc gnl*, bei den Einzelmutanten *gata16* und *gata17* und *gata17l* ein leicht verfrühter Blühzeitpunkt, der bei der Tripelmutante *gnc gnl GATA15 gata16* noch etwas verstärkt war und am stärksten in *gnc gnl gata17 gata17l* und der *quintupel*-Mutante ausgeprägt war. Diese Erkenntnisse zeigten sich im Wesentlichen sowohl basierend auf der Anzahl der Rosettenblätter, der Tage bis zum Austreiben als auch anhand der Tage bis zum Erscheinen der ersten Blütenorgane (Abbildung 22B, 22C). Die *quintupel*-Mutante trieb demnach nicht nur über drei Tage früher aus, sondern die Pflanzen besaßen beim Eintritt in die reproduktive Phase mindestens drei Rosettenblätter weniger. Zur Veranschaulichung, dass die Reaktion der Pflanzen innerhalb der Genotypen homogen war, sind im Appendix 4 jeweils fünf Pflanzen eines Genotyps dargestellt.

Weiterführende Untersuchungen konnten die molekularen Zusammenhänge klären und *SOC1*, einer der zentralen Blühzeitpunktregulatoren in Verbindung mit GA, als Zielgen von GNC und GNL identifizieren (Richter et al., 2013a). Der Effekt von GNC und GNL auf den Blühzeitpunkt wird durch die repressive Wirkung auf *SOC1* erzielt. Auf molekularer Ebene wird die unterdrückende Aktion von GNC und GNL auf den *SOC1* Promotor durch eine erhöhte Expression des Blühzeitregulators in der *gnc gnl* Doppelmutante deutlich (Richter et al., 2013a). Um einen Hinweis zu bekommen, ob auch die anderen LLM-Domänen B-GATAs möglicherweise eine Wirkung auf den Blühzeitpunkt über *SOC1* ausüben, wurde die Expression von *SOC1* in Blüten adulter Pflanzen im Wildtyp sowie in *gnc gnl*, der komplementären *tripel*-Mutante und der *quintupel*-Mutanten untersucht (Abbildung 22D).



**Abbildung 22: Blühzeitpunktdefekte der *gata*-Mutanten (Langtag).** (A) Repräsentative Fotos von drei (Ansicht von oben) beziehungsweise fünf (Seitenansicht) Wochen alten Pflanzen, die unter Langtag-Bedingungen (16h Licht/8h Dunkelheit) wuchsen. Quantifizierung des Blühzeitpunktes basierend auf der Zahl der Blätter (B) beziehungsweise der Tage zum Austreiben und zum Erscheinen der ersten Blütenorgane (C). Der Student's t-Test wurde zwischen allen Genotypen durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterschieden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert. (D) Expression von *SOC1* in Blüten der *gata*-Mutanten verglichen mit Col-0. Student's t-Test für ausgewählte Zeitpunkte: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s. nicht signifikant.

Interessanterweise ließ sich der Anstieg des *SOC1* Transkriptes in den Blüten aller Mutanten gut nachweisen. Ein signifikanter Anstieg war bereits in *gnc gnl* und der *tripel*-Mutante zu detektieren, wobei der stärkste Anstieg in der *quintupel*-Mutante zu verzeichnen war. Diese molekularen Daten spiegeln somit die Ausprägung des Phänotyps der ausgewählten Genotypen wider.



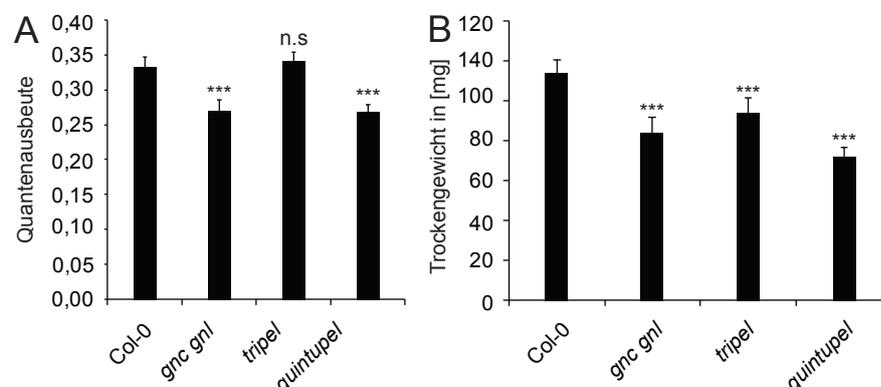
**Abbildung 23: Blühzeitpunktdefekte der *gata*-Mutanten (Kurztag).** (A) Repräsentative Fotos von fünf (Ansicht von oben) beziehungsweise zehn (Seitenansicht) Wochen alten Pflanzen, die unter Langtag-Bedingungen (8h Licht/16h Dunkelheit) wuchsen. Quantifizierung des Blühzeitpunktes basierend auf der Zahl der Blätter (B) beziehungsweise der Tage zum Austreiben und zum Erscheinen der ersten Blütenorgane (C). Der Student's t-Test wurde zwischen allen Genotypen durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterschieden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert.

Daraus kann geschlossen werden, dass mehrere LLM-Domänen B-GATAs zur Unterdrückung des Blühzeitpunktes unter Langtag-Bedingungen in Pflanzen beitragen und sich ein Effekt der *SOC1* Dereprimierung in den frühblühenden Mutanten nachweisen lässt.

Die Pflanzen, die unter Kurztag-Bedingungen angezogen wurden, verhielten sich jedoch anders. Die Effekte der *GATA*-Genverluste auf den Blühzeitpunkt unter Kurztag waren denen unter Langtag entgegengesetzt (Abbildung 23). Das heißt,

die komplexeren Mutantenkombinationen blühten viel später als der Wildtyp und die weniger komplexen Mutantenkombinationen. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da in Arabidopsis, bezogen auf den Blühzeitpunkt, die Ergebnisse unter Kurztag gewöhnlich die Ergebnisse von Langtag-Experimenten widerspiegeln. Die *quintupel*-Mutante trieb über fünf Tage nach dem Wildtyp aus und brachte bis zur Bildung einer Infloreszenz acht Rosettenblätter mehr hervor (Abbildung 23). Auch hier dient zur Veranschaulichung der Homogenität des Phänotyps eine Abbildung im Appendix, in der jeweils fünf Pflanzen eines Genotyps abgebildet wurden (Appendix 4).

Eine Erklärungsmöglichkeit für diese deutliche Beeinträchtigung in der Entwicklung in den höher komplexen Mutantenkombinationen könnte in den physiologischen Parametern liegen, die für die Blühinduktion in den *gata*-Mutanten unter dem Wachstum in Kurztag mit eingeschränkten Beleuchtungsperioden limitierend sein könnten (Sulpice et al., 2014). Eine Einschränkung, die nicht besteht wenn die Pflanzen in Langtag-Bedingungen wachsen. Um einen Hinweis auf eine mögliche Limitierung des Wachstums unter Kurztag-Bedingungen zu bekommen, wurde mittels Chlorophyllfluoreszenz die Effizienz, in Form der Quantenausbeute des Photosystems II, der Pflanzen gemessen, mit der sie das einfallende Licht verwenden können sowie das Trockengewicht bestimmt (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Defekte der *gata*-Mutanten in Quantenausbeute und Trockengewicht.** (A) Quantifizierung der Quantenausbeute des Photosystems II in *gata*-Mutanten und Wildtyp. (B) Quantifizierung des Trockengewichtes in *gata*-Mutanten und Wildtyp. Student's t-Test im Vergleich zum Wildtyp: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

Hier wurde deutlich, dass *gnc gnl* und die *quintupel*-Mutante einen Rückgang der Quantenausbeute um 20% aufwiesen. Demnach könnte die verminderte Effizienz der Photosynthese und damit der Photosyntheseleistung unter den erschwerten Bedingungen unter Kurztag zu einer Verzögerung in der Entwicklung in den komplexen Mutanten geführt haben. Ein weiteres Zeichen dahingehend, dass vor allem die Mutanten mit einem starken Chlorophylldefekt unter den physiologisch restriktiven Bedingungen unter Kurztag litten, stellt das Trockengewicht dar, welches in den Mutanten deutlich unter dem Wert des Wildtyps lag. Alles in allem stellen

diese Parameter jedoch nur Hinweise auf eine Limitierung durch die physiologischen Parameter dar. Aber klar ist, dass sich die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten nicht abschließend erklären lassen. Die tatsächlichen Ursachen sind demnach sehr viel komplexer.

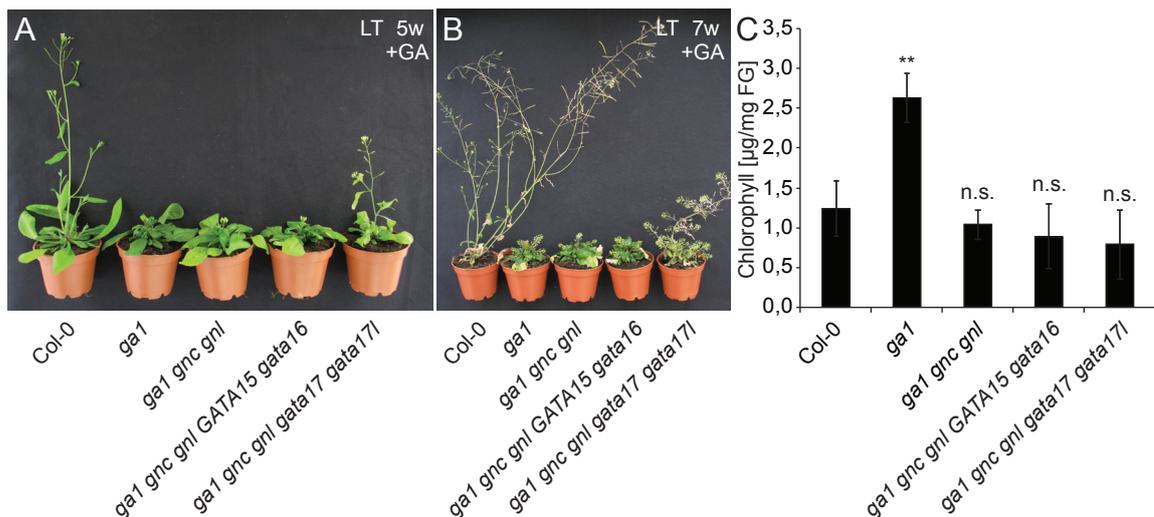
Zusammenfassend kann, bezogen auf das Blühverhalten, geschlossen werden, dass alle LLM-Domänen B-GATAs, mit Ausnahme von *GATA15*, den Blühzeitpunkt unter Langtag-Bedingungen unterhalb von GA steuern. Auch ein Einfluss unter Kurztagbedingungen ist vorhanden, aber der Beitrag zur Steuerung scheint wegen der antagonistischen Art und Weise und vieler möglicher Effekte der Regulation sehr komplex zu sein.

#### 2.4.4.3. LLM-GATAs reprimieren die Gibberellin-Antwort in *ga1*

Die Wichtigkeit von GA als Blühzeitpunktregler unter Langtag-Bedingungen ist schon lange akzeptiert (Blázquez et al., 1998; Willige et al., 2007). Einer der wichtigsten Hinweise darauf, dass *GNC* und *GNL* den Blühzeitpunkt unterhalb dieses Hormons reprimieren, ist die teilweise Supprimierung des Blühzeitpunktes der extrem zwergwüchsigen und sehr spät blühenden GA-Biosynthese Mutante *ga1* durch *gnc gnl*. Die *ga1 gnc gnl* Tripelmutante ist zwar in der Entwicklung noch sehr beeinträchtigt, aber im Vergleich zur *ga1* Mutante weist sie ein verbessertes vegetatives Wachstum auf und bildet kleine Blütenknospen aus (Richter et al., 2010). Dieser genetische Zusammenhang zeigt, dass *GNC* und *GNL* als Repressoren des Blühzeitpunktes direkt im GA-Signalweg fungieren. Das bedeutet, dass die Präsenz von *GNC* und *GNL*, und möglicherweise anderer LLM-Domänen B-GATAs, einer der Gründe für den extrem verzögerten Blühzeitpunkt der *ga1* Mutante darstellen.

Um zu sehen, ob auch die paralogen LLM-Domänen B-GATAs, ähnlich wie *GNC* und *GNL*, den Blühzeitpunkt der *ga1* Mutante beeinflussen und somit unterhalb von GA kontrollieren können, wurden in *ga1 gnc gnl* zusätzliche *gata*-Mutantenaliele eingekreuzt und auf den Blühzeitpunkt hin untersucht. Dabei wurden Pflanzen des Wildtyps Col-0, *ga1*, *ga1 gnc gnl*, *ga1 gnc gnl GATA15 gata16* und *ga1 gnc gnl gata17 gata17l* angezogen und zur Verbesserung der Keimung und des allgemeinen Wachstums am Anfang des Experiments gleichmäßig, wiederholt mit 10 µM GA behandelt (Abbildung 25).

Die Supprimierung einiger *ga1*-Phänotypen durch die eingekreuzten Allele war deutlich erkennbar. Nach fünf Wochen war in den Genotypen *ga1 gnc gnl*, *ga1 gnc gnl GATA15 gata16* und *ga1 gnc gnl gata17 gata17l* eine deutliche Reduktion des Chlorophyllgehaltes zu erkennen und in der *ga1 gnc gnl gata17 gata17l* war ein deutlich früherer Blühzeitpunkt zu verzeichnen. Die Effekte waren durch die vorangegangene GA-Behandlung jedoch offensichtlich verstärkt, sodass auch die *ga1* Mutante zur Ausbildung von Blütenknospen befähigt war. Die Unterschiede



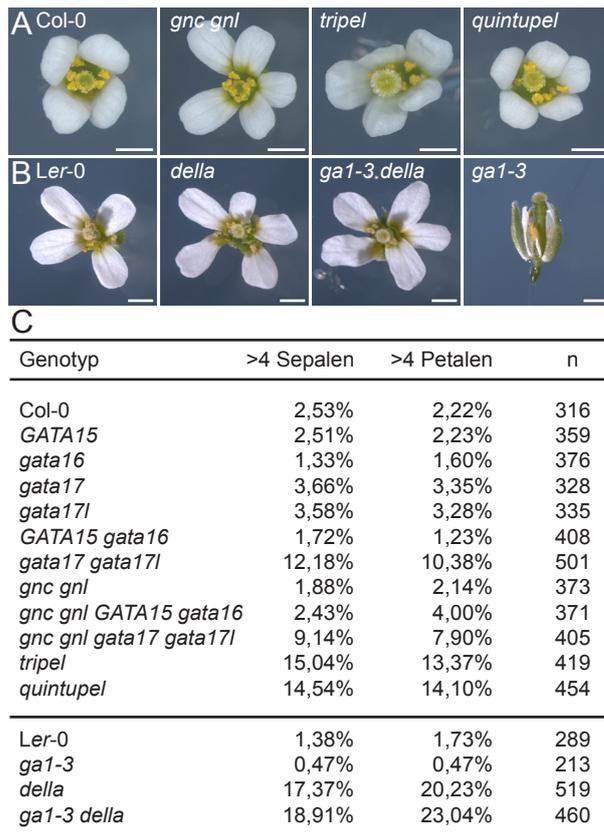
**Abbildung 25: Die LLM-Domänen B-GATAs agieren als Repressoren der GA-Antwort in *ga1*.** Repräsentative Fotos von fünf (A) beziehungsweise sieben (B) Wochen alten Pflanzen, die unter Langtag-Bedingungen wuchsen (16h Licht/8h Dunkelheit). Die Pflanzen wurden wiederholt mit 10 µM GA<sub>3</sub> behandelt. Eine Abbildung von Gruppen der jeweiligen Genotypen ist im Appendix 5 zu finden. (C) Quantifizierung des Chlorophylls A und B der Kreuzungen von *ga1* mit *gata*-Mutanten. Student's t-Test im Vergleich zum Wildtyp: \*\* p ≤ 0,01; n.s. nicht signifikant.

zu Col-0 beziehungsweise zu der *ga1 gnc gnl gata17 gata17l* Mutante waren jedoch deutlich zu erkennen (Abbildung 25A, 25B).

Zusammenfassend kann hier gefolgert werden, dass neben *gnc* und *gnl* weitere LLM-Domänen B-GATAs an der Reprimierung des Blühzeitpunktes und der GA-Antwort in *ga1* beteiligt sind.

#### 2.4.4.4. Die Zahl der Petalen und Sepalen wird von LLM-GATAs gesteuert

Neben der Koordinierung des Blühzeitpunktes ist GA auch für die Blütenentwicklung wichtig (Cheng, 2004; Yamaguchi et al., 2014; Yu et al., 2004). Die Blütenentwicklung wird in Arabidopsis durch MADS-Box Transkriptionsfaktoren gesteuert. Dabei ist, neben einer Reihe spezifischer Faktoren, *AP1* für die Differenzierung des Blütenmeristems und später für die Ausbildung von Petalen und Sepalen entscheidend beteiligt (Bowman et al., 1993; Honma und Goto, 2001; Irish und Sussex, 1990; Kaufmann et al., 2010). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe über das Zusammenspiel bei der Blütenentwicklung wurde erkannt, dass die GA-Regulation von *GNC* und *GNL* in Blüten *AP1* abhängig ist und *AP1* direkt an die Promotoren von *GNC* und *GNL* binden kann und diese dadurch reprimiert (Daten des Lehrstuhls Schwechheimer). Das *AP1* Protein selbst ist jedoch nicht über GA reguliert. Vielmehr wird die Regulation von GA auf Proteinebene über eine direkte Interaktion zwischen DELLA-Proteinen und *AP1* vermittelt. *ap1-15* Mutanten bilden keine Petalen und Sepalen, und interessanterweise ist dieser Phänotyp in einer *ap1-15 gnc gnl* Mutante teilweise unterdrückt. *GNC* und *GNL* sind demzufolge daran beteiligt die Bildung von Sepalen und Petalen GA abhängig zu unterdrücken (Daten des Lehrstuhls Schwechheimer).



**Abbildung 26: Defekte der *gata*-Mutanten in der Zahl der Blütenorgane.** Fotografien von Blüten des Wildtyps, der *gata*-Mutanten (A) sowie der *della*-Mutanten (B). (C) Quantifizierung der Defekte in der Bildung der Blütenorgane durch wiederholte Zählungen an vollständig geöffneten Blüten (Anthese, Stadium 13).

Da neben *GNC* und *GNL* auch *GATA16* in einer genomweiten Studie für AP1-Zielgene gefunden wurden (Pajoro et al., 2014), ergab sich die Frage, ob die LLM-Domänen B-GATA Faktoren auch zu diesem Prozess beitragen und gegebenenfalls redundant agieren. Um zu testen, ob auch andere *GATAs* in die Kontrolle der Blütenorganentwicklung involviert sind, wurden Blüten von *gata*-Mutanten auf Fehlentwicklungen hin untersucht (Abbildung 26).

Blüten von Arabidopsis Wildtypblüten weisen normalerweise je vier Petalen und Sepalen, sechs Staubblätter und zwei Fruchtblätter auf (Alvarez-Buylla et al., 2010; Coen und Meyerowitz, 1991). Im Bezug auf Petalen und Sepalen wichen nur etwa zwei Prozent der betrachteten Col-0 Blüten davon ab. In den *gata*-Mutanten war jedoch ein deutlicher Anstieg an Blüten mit fünf und in seltenen Fällen sogar sechs Petalen und Sepalen zu verzeichnen. So wiesen bereits in der Doppelmutante *gata17 gata17l* 12% aller Blüten mehr als vier Blüten- und Kelchblättern auf und in der *tripel*- und der *quintupel*-Mutante sogar 13% bzw. 14% (Abbildung 26C). Bedeutenderweise lag *gnc gnl* mit 1,88% im Bereich des Wildtyps.

Daraus kann hier gefolgert werden, dass der Effekt der paralogen *GATAs* auf die Bildung der Blütenorgane direkt sichtbar ist, wohingegen die Auswirkungen der *gnc gnl* Allele nur im speziellen *ap1-15* Hintergrund ersichtlich werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der paralogen *GATAs* in diesem Prozess. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen, dass AP1 die Entwicklung der beiden äußeren Wirtel steuert, sind im Fall der *gata*-Mutanten in der Regel auch Petalen und Sepalen betroffen.

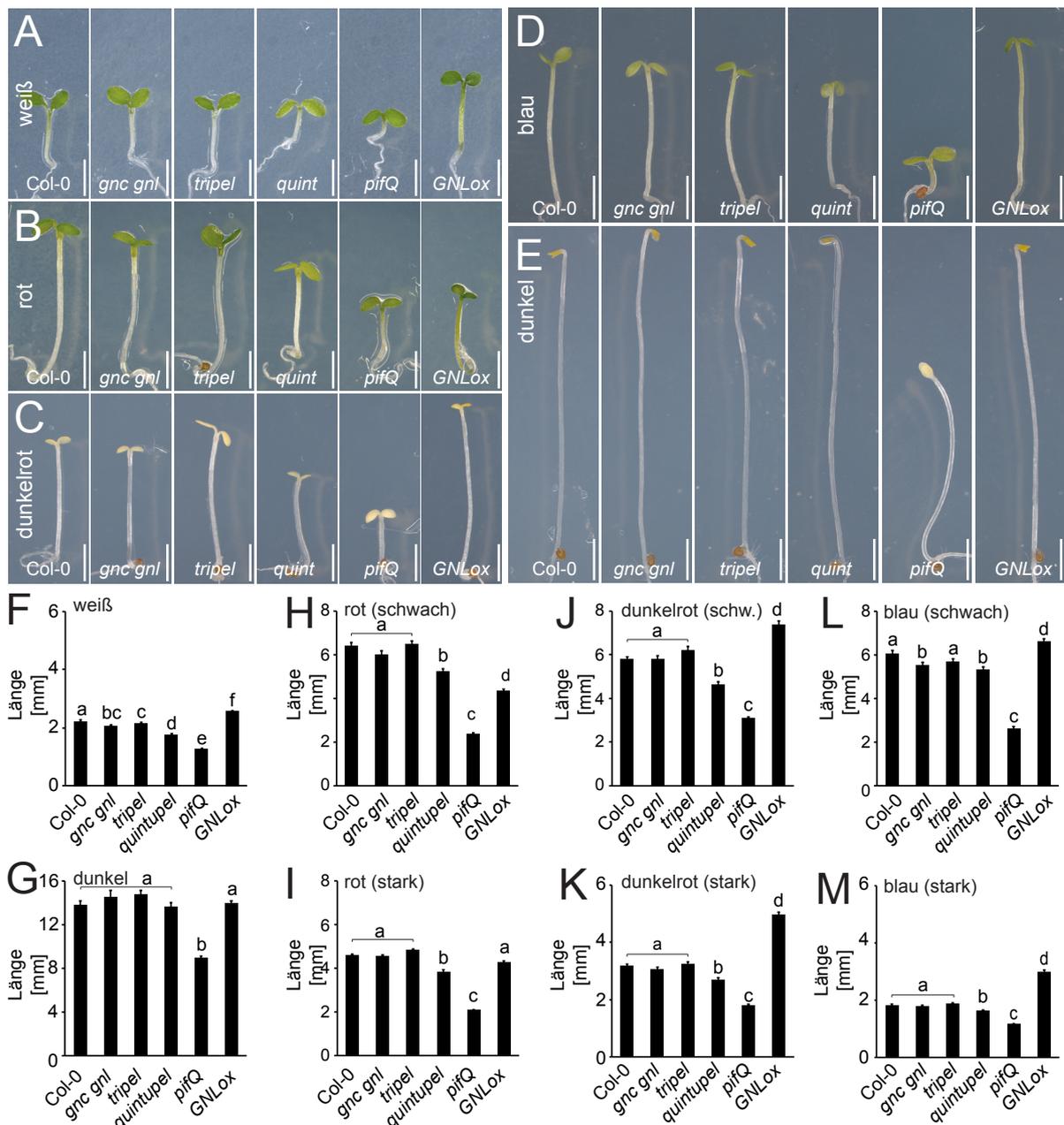
Da das GA Signal über die DELLAs direkt an AP1 weitergegeben wird, war zu vermuten, dass auch die bekannten *della*-Mutanten einen Phänotyp zeigen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Blüten des Wildtyps *Ler-0*, der *della*-Mutante (*rga-24 gai-t6 rgl1 rgl2 rgl3*), *ga1-3 della* (*ga1-3 rga-24 gai-t6 rgl1 rgl2 rgl3*) und der *ga1-3* Mutante auf Anomalien in der Blütenbildung hin untersucht. Interessanterweise zeigten die Blüten der globalen *della*-Mutante, in der alle DELLA-Proteine ausgeschaltet sind, in 20,23% aller Blüten mehr als vier Petalen (Abbildung 26B, 26C). Daraus geht deutlich hervor, dass unter anderem auch GA in diesem Prozess wichtig ist.

Abschließend kann hier festgestellt werden, dass die LLM-Domänen B-GATAs in vielen GA-gesteuerten Bereichen wie der Keimung, des Blühzeitpunktes und der Blütenbildung wichtig sind, wobei die paralogen Mitglieder vor allem bei der Kontrolle des Blühzeitpunktes und der Blütenbildung eine entscheidende Rolle spielen.

#### 2.4.5. LLM-GATAs steuern die Hypokotylelongation lichtabhängig

Aufgrund der starken Regulation von *GNL* in rotem, dunkelrotem und blauem Licht, die zum Teil auch bei *GNC* zu beobachten war, stellte sich die Frage ob die LLM-Domänen B-GATAs in der Regulation eines lichtabhängigen Prozesses eine Rolle spielen. Nachdem schon beschrieben war, dass die Überexpressoren einiger *GATA*-Faktoren im Weißlicht ein elongiertes Hypokotyl aufweisen (Behringer et al., 2014; Richter et al., 2010), wurden Pflanzen der *gata*-Verlustmutanten in unterschiedlichen Lichtbedingungen in jeweils starker und schwacher Intensität fünf Tage lang angezogen und anschließend auf die Länge des Hypokotyls hin untersucht (Abbildung 27). Alle Keimlinge entwickelten sich gemäß den gewählten Lichtbedingungen. So waren sie etwa in rotem Licht trotz der Bildung von Chlorophyll in der Deetiolierung beeinträchtigt. In dunkelrotem Licht waren sie zwar ebenfalls in der Deetiolierung beeinträchtigt, jedoch ohne dabei signifikant zu ergrünen. Und in blauem Licht zeigten sie eine teilweise Deetiolierung und eine sichtbar erhöhte Chlorophyllbildung. In Dunkelheit entwickelten sich alle Keimlinge hingegen vollkommen skotomorphogenetisch. Dementsprechend war, wie zu erwarten, in allen Genotypen bis auf *pifQ* noch ein Apikalhaken vorhanden. In weißem Licht waren alle Keimlinge deetioliert und normal ergrünt (Abbildung 27A-E).

Auffällig war, dass neben der *pifQ* Mutante, die in allen Bedingungen ein für sie charakteristisches kurzes Hypokotyl aufwies, auch die *quintupel*-Mutante ein kurzes Hypokotyl zeigte. Interessanterweise war nur in der *quintupel*-Mutante in allen Bedingungen durchgehend ein kürzeres Hypokotyl als im Wildtyp zu beobachten (Abbildung 27). Die beiden anderen Mutantenkombinationen *gnc gnl* und die *tripel*-Mutante wiesen diesen Phänotyp nicht konsequent auf. Lediglich im weißem und blauem Licht waren zwischen *gnc gnl* und *Col-0* signifikante Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 27F, 27L). Dies deutet darauf hin, dass die jeweils anderen



*GATAs* in diesen Mutanten die korrekte Ausbildung des Hypokotyls steuern. Im Falle der *quintupel*-Mutante kann dieser Mechanismus nicht mehr greifen. Weiterhin wiesen die Hypokotyle der *gata*-Mutanten im Dunklen eine ähnliche Länge wie der Wildtyp auf, was darauf hindeutet, dass es sich um einen lichtabhängigen Prozess handelt (Abbildung 27G). Schließlich ist bemerkenswert, dass der Phänotyp der *quintupel*-Mutante dem des Übererxpressors von *GNL* entgegengesetzt war, welcher in weißem, dunkelrotem und blauem Licht ein längeres Hypokotyl aufwies als Col-0.

Nur im Rotlicht nicht, wo das Hypokotyl unter schwacher Intensität in diesem Experiment sogar kürzer war (Abbildung 27H).

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass die LLM-Domänen B-GATAs die Hypokotyllänge lichtabhängig kontrollieren und in diesem Prozess hoch redundant agieren.

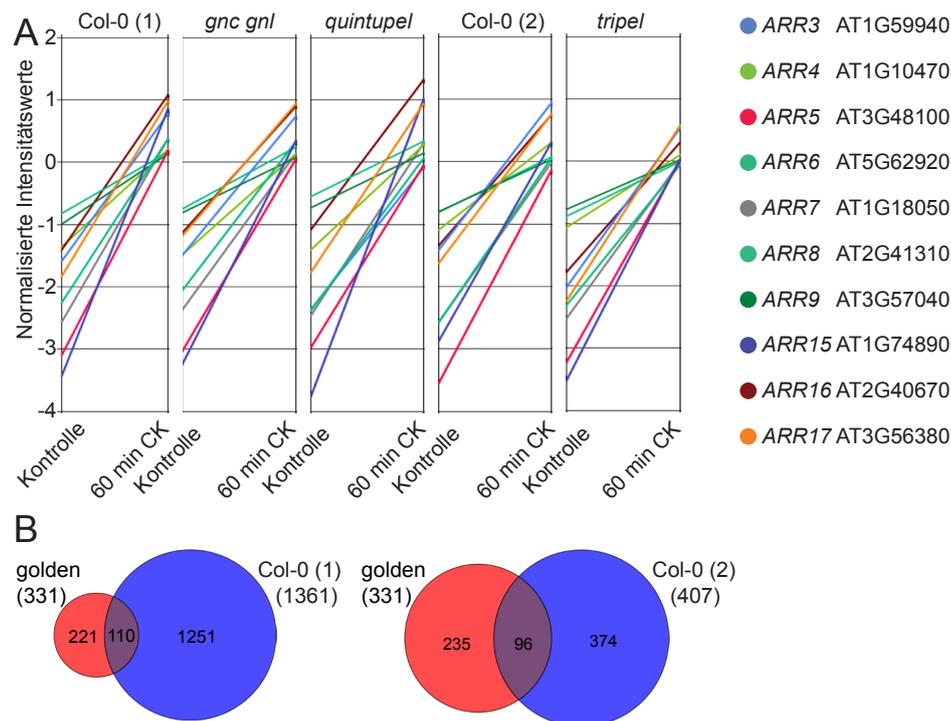
## 2.5. LLM-GATAs sind wichtige Akteure in Cytokinin-regulierten Prozessen

Aufgrund der starken und einheitlichen Induktion aller LLM-Domänen B-GATAs durch CK lag die Untersuchung CK-regulierter Prozesse nahe. Im Zuge dieser Bestrebung wurde die Rolle der GATAs im Kontext von CK von Grund auf untersucht. Um die Rolle der GATAs im Kontext von CK genauer verstehen zu können, wurde in einem Microarray Experiment die Genexpression nach CK-Gabe analysiert und eine systematische Betrachtung von bekannten CK-regulierten Prozessen durchgeführt.

### 2.5.1. Genmutanten der LLM-GATAs zeigen Defekte in der Genexpression

Die ersten Nennungen von *GNL* in der Literatur fielen im Zusammenhang mit seiner CK-Induzierbarkeit, welche bis jetzt in vielen Studien bestätigt wurde (Brenner et al., 2005; Che et al., 2006; Kiba, 2005; Lee et al., 2007; Naito et al., 2007). Dies spiegelt sich auch in dem ursprünglichen Synonym von *GNL* wider: *CGA1 (CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1)*. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die anderen LLM-Domänen B-GATAs durch CK induziert werden. Um nun die Rolle der GATA-Gene in der CK-abhängigen Genexpression zu untersuchen, wurden Microarray-Experimente mit 14 Tage alten Pflanzen mit und ohne CK-Behandlung durchgeführt. Dazu wurde Material des Wildtyps Col-0, *gnc gnl*, der *tripel*- und *quintupel*-Mutante vor und nach einer 60-minütigen CK-Behandlung mit 20  $\mu$ M 6-Benzylaminopurin (6-BA) analysiert. Aus technischen Gründen wurde das Experiment in zwei unabhängigen Durchgängen durchgeführt. Als erstes Col-0 (1) zusammen mit *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante und anschließend Col-0 (2) mit der *tripel*-Mutante.

Bevor die Daten auf Unterschiede in der basalen Expression und auf Unterschiede nach der CK-Behandlung hin untersucht wurden, konnte die Homogenität der CK-Behandlungen der beiden Datensätze anhand der Expression der *Typ-A ARR*s (*A-TYPE RESPONSE REGULATORS*) validiert werden. So wurden alle *Typ-A ARR*s, die bekanntermaßen sehr sensitiv auf CK reagieren, in den verwendeten Genotypen auf vergleichbare Weise induziert (Abbildung 28A). Innerhalb der *Typ-A ARR*s waren auch die Unterschiede zwischen dem stark regulierten *ARR15* und dem schwächer regulierten *ARR9* in allen Datensätzen vergleichbar. Auch im Vergleich mit einer bereits publizierten Liste, der sogenannten „Goldenen Liste“ (Bhargava et al., 2013) CK-regulierter Gene, konnte die Effektivität der CK-Behandlungen in den beiden



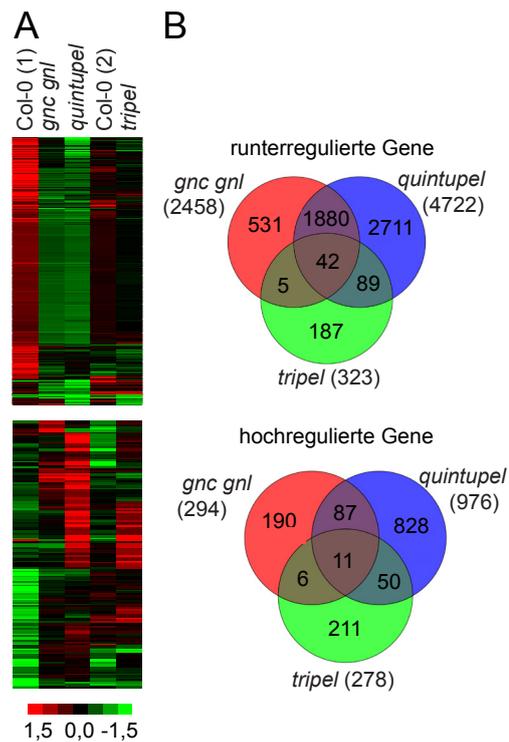
**Abbildung 28: Vergleichbarkeit der beiden Microarray-Datensätze.** (A) Darstellung der Induktion von *ARR*-Genen in den beiden hier verwendeten Microarray-Datensätzen. (B) Venn-Diagramme der CK-regulierten Gene der Wildtypkontrollen Col-0 (1) und Col-0 (2) der beiden Datensätze und deren Überschneidung mit den Genen der bekannten „Goldenen Liste“ CK-regulierter Gene (Bhargava et al., 2013).

Experimenten bestätigt werden. Über 70% der Entitäten aus dieser Liste waren in beiden Experimenten signifikant CK-reguliert (Abbildung 28B). Von diesen 331 Entitäten waren nach CK-Gabe immerhin noch 71 hochreguliert (Col-0 (1) und Col-0 (2)) und 39 (Col-0 (1)) beziehungsweise 25 (Col-0 (2)) runterreguliert, wenn eine zweifache Induktion als zusätzliches Filterkriterium angelegt wurde.

Daraus kann geschlossen werden, dass die CK-Behandlung in beiden Experimenten entsprechend war und sie somit in einer vergleichenden Analyse gegenübergestellt werden können.

### 2.5.1.1. Die *quintupel*-Mutante zeigt die stärksten Abweichungen in der basalen Genexpression.

In einer Betrachtung der Expression im Gundzustand, also dem Vergleich der fehlexprimierten Gene in den *gata*-Mutanten verglichen zum Wildtyp ohne CK-Behandlung, konnte der größte Effekt in der *quintupel*-Mutante mit 4722 runter- und 976 hochregulierten Entitäten, verglichen mit Col 0 (1), beobachtet werden (Abbildung 29). *gnc gnl* wies 2458 runter- und 294 hochregulierte Entitäten auf und in der *tripel*-Mutante waren mit 323 runter- und 278 hochregulierten Entitäten die geringsten Auswirkungen auf die Genexpression zu verzeichnen (Abbildung 29). Die *quintupel*-Mutante und *gnc gnl*, die auf genetischer Ebene beide die *gnc gnl* Allele teilen, zeigten, verglichen zum Wildtyp, nicht nur die stärksten Abweichungen in der basalen Expression, sondern teilten auch die meisten fehlregulierten



**Abbildung 29: Analyse der basalen Expressionslevel in den *gata*-Mutanten.** (A) Heat maps der differentiell regulierten Gene von zehn Tage alten Col-0 Pflanzen sowie der *gnc gnl*, *tripel*- und *quintupel*-Mutanten. Das Experiment basiert auf zwei unabhängigen Datensätzen, die hier mit der jeweiligen Wildtypkontrolle Col-0 (1) und Col-0 (2) dargestellt sind. Die runterregulierten Gene sind im oberen Teil dargestellt und die hochregulierten im unteren Teil der Abbildung. (B) Venn-Diagramme, die den Vergleich der differentiell regulierten Gene in den *gata*-Mutanten darstellen. Gene, die im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp runter- beziehungsweise hochreguliert waren, wurden ausgewählt und anschließend zwischen den Mutanten verglichen.

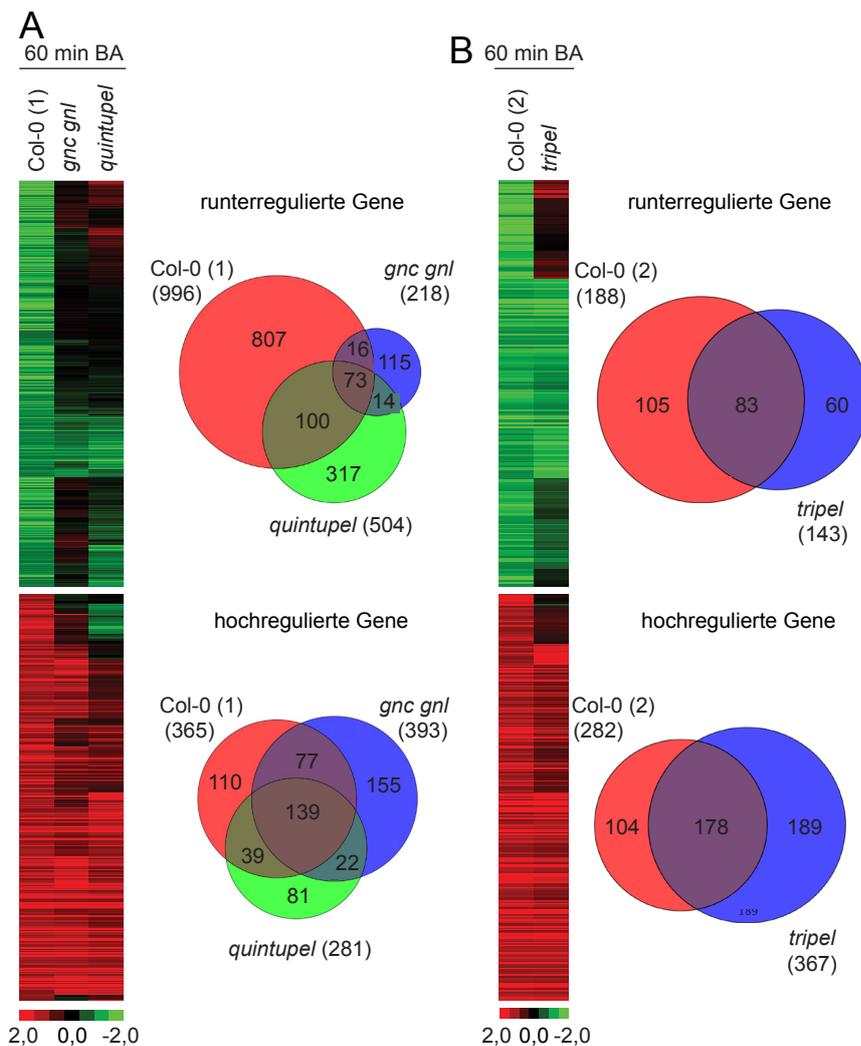
Gene: 1922 der 2458 in *gnc gnl* runterregulierten Entitäten waren auch in der *quintupel*-Mutante vermindert und 98 der 294 hochregulierten Entitäten waren ebenfalls in der *quintupel*-Mutante erhöht exprimiert. Entsprechend dem genetischen Hintergrund war die Überschneidung von fehlregulierten Genen zwischen der *tripel*- und *quintupel*-Mutante auch größer, als zwischen der *tripel*-Mutante und *gnc gnl* (Abbildung 29B).

Daraus wird geschlossen, dass die Genexpressionsdefekte der *quintupel*-Mutante weitaus gravierender sind, als die der *gnc gnl* und der *tripel*-Mutante, und sich die Annahme, dass die GATAs redundant wirken, auch in diesen Daten bestätigt.

### 2.5.1.2. *gata*-Genmutanten sind defekt in Cytokinin-induzierter Genregulation

Um die Veränderungen in der CK-abhängigen Genregulation zu untersuchen, wurden die Expressionsunterschiede zwischen der basalen und der Expression der Gene nach einer 60-minütigen CK-Behandlung (6-BA) der *gata*-Mutanten mit der des Wildtyps verglichen.

Interessanterweise waren von den 996 Entitäten, die in Col-0 (1) nach der CK-Behandlung reduziert waren, nur noch 173 (18%) und 89 (9%) in der *quintupel*-Mutante beziehungsweise in *gnc gnl* reduziert. In der *tripel*-Mutante waren von den 188 in Col-0 (2) runterregulierten Entitäten immerhin noch 83 (44%) vermindert (Abbildung 30). Das Fehlen der GATA-Gene in den Mutanten hatte auf die CK-induzierten Gene einen geringeren Effekt. So waren in der *quintupel*-Mutante noch 49% der in Wildtyp durch CK regulierten Gene induziert und in der *gnc gnl* und der *tripel*-Mutante noch 59% beziehungsweise 63%.



**Abbildung 30: Analyse der CK-induzierten Genexpression der *gata*-Mutanten.** (A, B) *Heat maps* und Venn-Diagramme der differenziell regulierten Gene von Wildtyp und den entsprechenden *gata*-Mutanten nach 60 Minuten Behandlung mit 20 µM 6-BA von 14 Tage alten Pflanzen. Das Experiment basiert auf zwei unabhängigen Datensätzen, die hier mit der jeweiligen Wildtypkontrolle Col-0 (1) und Col-0 (2) dargestellt sind. Die Venn-Diagramme zeigen die Überschneidungen und Unterschiede in den durch die Behandlung differenziell regulierten Genen im Wildtyp und den Mutanten.

Zusammenfassend kann hier geschlossen werden, dass die CK-abhängige Genexpression in den *gata*-Mutanten enorm beeinträchtigt zu sein scheint.

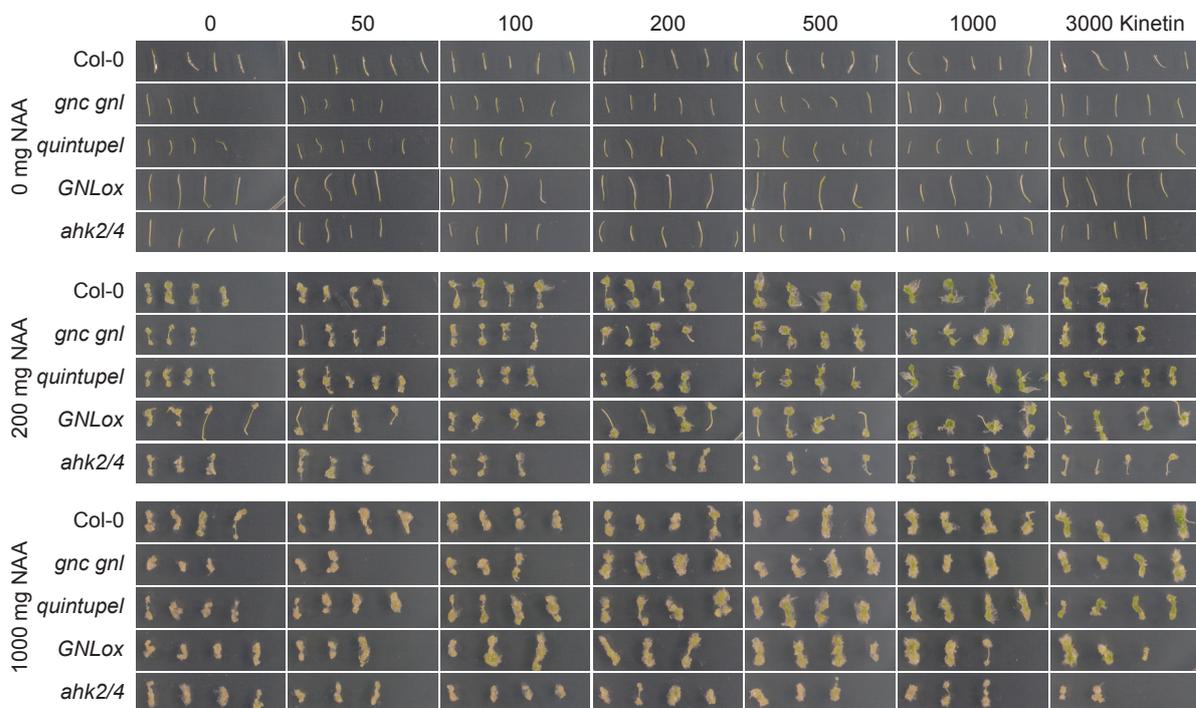
### 2.5.2. *gata*-Genmutanten sind defekt in Cytokinin-regulierten Entwicklungsprozessen

Aufgrund der positiven Regulation, die in allen LLM-Domänen B-GATAs nachweisbar war, und der starken Defekte der CK-Antwort in den *gata*-Mutanten, welche die Microarrays offenlegten, wurde nach Phänotypen in diesen Mutanten gesucht, die auf einen Defekt der CK-Antwort hinweisen könnten. Dabei wurde sowohl auf etablierte Tests zurückgegriffen, die standardmäßig zur Untersuchung von CK-Mutanten herangezogen werden, als auch Analysen von Prozessen unternommen, für die es Hinweise auf eine Rolle der GATAs gab, sodass ein breites

Spektrum von Phänotypen von Keimlingen bis hin zu adulten Pflanzen abgebildet werden konnte.

### 2.5.2.1. Die *gata*-Genmutanten zeigen im Callus-Induktionsassay und im Wurzelassay keine Abweichungen der Cytokinin-Antwort

Zu den bekanntesten Effekten von CK auf Pflanzen gehören die Inhibierung des Wurzelwachstums sowie die Fähigkeit von einigen Cytokinin, Calli aus Pflanzengewebe zu induzieren (Hwang et al., 2012). Untersuchungen zu diesen Phänotypen gehören zu den Standardtests im Zusammenhang mit CK. Um zu sehen, wie die *gata*-Genmutanten auf CK reagieren, wurden sie in diesen Assays entsprechend untersucht. Als erstes wurden dazu Hypokotyle von elf Tage alten Keimlingen von Wurzel und Keimblättern getrennt und zur Callus-Induktion auf Medium ohne oder mit 200 und 1000 ng/ml NAA (1-Naphtylelessigsäure) und ansteigenden Konzentrationen des Cytokinins Kinetin unter Dauerlicht 25 Tage lang inkubiert (Abbildung 31).

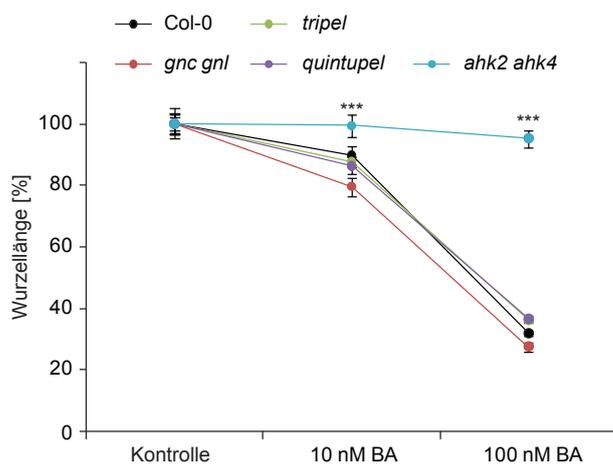


**Abbildung 31: Callus-Induktionsassay der *gnc gnl* und *quintupel*-Mutante sowie des *GNL* Überexpressors.** Bilder von Hypokotylen des Wildtyps, *gnc gnl*, *quintupel*-Mutante und des *GNL* Überexpressors, die in einem Callus-Induktionsassay ansteigenden Konzentrationen von NAA und Kinetin 25 Tage im Dauerlicht ausgesetzt waren. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurde die Mutante *ahk2 ahk4* miteinbezogen, bei der zwei der drei CK-Rezeptoren defekt sind. Es sind alle verwendeten Hypokotyle abgebildet.

Das Zusammenspiel von Auxin und CK in der Ausbildung eines Callus ließ sich in diesem Versuch deutlich erkennen. Nur in Anwesenheit beider Hormone kam es zur Induktion der Zellteilung der Gewebe (Abbildung 31). Der Überschuss von Auxin führte dabei zur Ausbildung eines farblosen Wurzelcallus, und wenn das CK überwog, wurde ein ergrünender Zellhaufen aus Sprossgewebe gebildet. Wie zu erwarten, verhielt sich die *ahk2 ahk4* (*ahk2-5 cre1-2*) CK-Rezeptormutante, bei der zwei der drei

bekannten funktionalen Rezeptoren defekt sind, gegenüber Kinetin insensitiver und bildete auch unter höheren Kinetin-Konzentrationen nur einen farblosen Wurzelcallus aus. Alle anderen Genotypen bildeten hingegen in den Ansätzen ab ca. 100 ng/ml Kinetin einen ergrünenden Callus. Allerdings waren zwischen Col-0, *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten der Callusbildung zu erkennen. Auch der Überexpressor von *GNL* schien in der Callus-Induktion nicht beeinträchtigt. Dies bedeutet entweder, dass die *GATA*-Gene im Prozess der Callusbildung eine untergeordnete Rolle spielen oder feine Unterschiede in diesem Assay nicht abgebildet werden können. Letzteres wird durch nur geringe offensichtliche Unterschiede zwischen Col-0 und *ahk2 ahk4* unterstrichen, obwohl diese in ihrer Sensibilität der CK-Rezeption sehr beeinträchtigt ist.

In einem nächsten Schritt wurden Pflanzen auf  $\frac{1}{2}$  MS ohne, beziehungsweise mit, 10 nM oder 100 nM 6-BA angezogen, um anschließend das Wurzelwachstum zu quantifizieren (Abbildung 32).



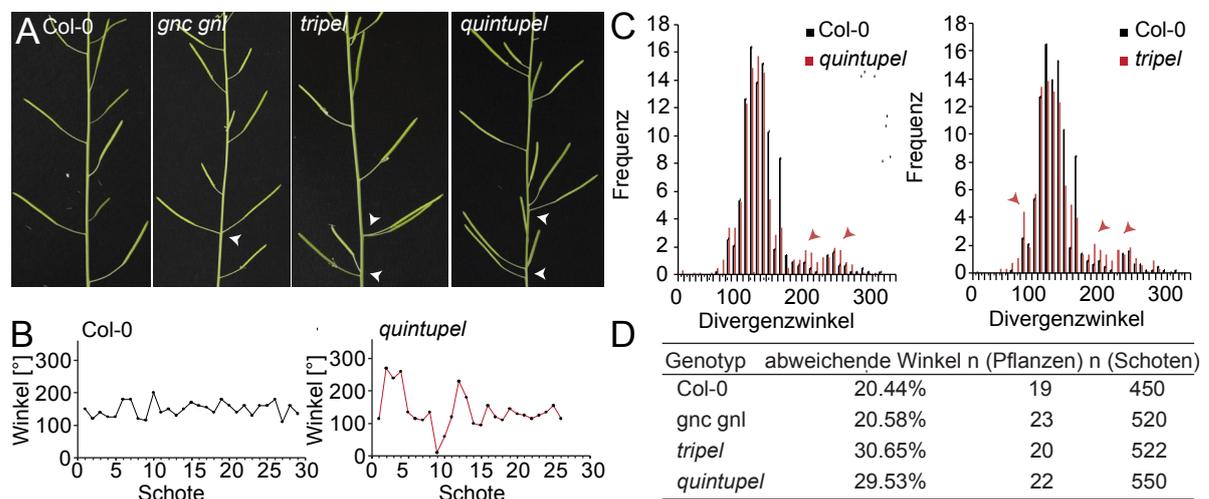
**Abbildung 32: CK-Wurzelassay mit den *gata*-Mutanten.** Quantifizierung des Wurzelwachstums vom 4. bis zum 6. Tag von Col-0 *gnc gnl*, *tripel*- und *quintupel*-Mutante ohne und mit 10 und 100 mM 6-BA. Student's t-Test im Vergleich zum Wildtyp: \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Auch hier ließ sich die unmittelbare Wirkung des Cytokinins auf die Wurzeln nachweisen. Mit Ausnahme der Rezeptormutante *ahk2 ahk4* waren die Wurzeln der Pflanzen mit ansteigender Konzentration zunehmend im Wachstum beeinträchtigt. Jedoch zeigten weder *gnc gnl* noch die *tripel*- oder *quintupel*-Mutante einen signifikanten Unterschied im Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 32). Es kann hier zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die schwachen Allele in der *quintupel*-Mutante mögliche Effekte der Behandlung verhindern, allerdings sind die LLM-Domänen B-GATAs in der Wurzel nur sehr schwach abundant und eine ähnliche Reaktion von Col-0 und den *gata*-Mutanten damit sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass weder im Callus-Induktionsassay noch im Wurzelassay ein Unterschied im Verhalten zwischen den *gata*-Mutanten und dem Wildtyp auf eine Behandlung mit CK nachweisbar ist und die *GATAs*, den hier gezeigten Experimenten zufolge, für diese Prozesse eine untergeordnete Rolle spielen.

### 2.5.2.2. Die *gata*-Mutanten sind in der Phyllotaxis beeinträchtigt

Cytokinin ist im Zusammenspiel mit anderen Hormonen für die Stabilität des Apikalmeristems verantwortlich (Shani et al., 2006; Su et al., 2011). In diesem Zusammenhang wurde das Hormon kürzlich als Regulator der Phyllotaxis beschrieben, indem es durch seine inhibitorische Wirkung für eine gleichmäßige Initiation der Blüten sorgt (Besnard et al., 2013). So zeigt die bekannte CK-Mutante *ahp6* eine auffällig starke Störung in der Anordnung der Schoten entlang des Hauptsprosses. Wildtyp Pflanzen weisen eine spiralförmige Phyllotaxis auf, bei der die aufeinanderfolgenden Blütenmeristeme idealerweise in einem Winkel von  $137,5^\circ$  angelegt werden. Um zu sehen, ob die LLM-Domänen B-GATAs in diesem Prozess eine Rolle spielen, wurden die Winkel der aufeinanderfolgenden Schoten in den *gata*-Mutanten gemessen, um die Abweichungen von dem idealen Winkel zu quantifizieren (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Analyse der Phyllotaxis der *gata*-Mutanten.** (A) Bilder von Infloreszenzen des Wildtyps sowie der *gnc gnl*, *triplel*- und *quintupel*-Mutanten mit reifen Schoten. Pfeile weisen auf Fehler in der Positionierung der Schoten hin. (B) Darstellung aufeinanderfolgender Winkel der Schoten entlang des Sprosses des Wildtyps und der *quintupel*-Mutante. (C) Darstellung der Frequenz mit der Schoten in der *triplel*- und *quintupel*-Mutante in einem bestimmten Winkel entlang des Sprosses auftreten. Pfeile deuten jeweils auf Bereiche in denen die Mutanten stark von den Mustern des Wildtyps abweichen. (D) Häufigkeit der abweichenden Winkel im Wildtyp und den *gata*-Mutanten.

In der *triplel*- und *quintupel*-Mutante konnten im Vergleich zu Col-0 deutliche Abweichungen der phyllotaktischen Muster in der Anordnung der Schoten beobachtet werden, jedoch nicht in der *gnc gnl* Doppelmутante. Die Quantifizierung ergab im Falle der *triplel*- und *quintupel*-Mutante in ungefähr 30% der Fälle einen Winkel zwischen den aufeinanderfolgenden Schoten, der von dem idealen Winkel abwich. Col-0 und *gnc gnl* wiesen jedoch nur in 20% der Fälle eine solche Abweichung auf. Bei genauer Betrachtung der Häufigkeit der Abweichungen in den *gata*-Mutanten fiel auf, dass vor allem Winkel über  $200^\circ$  in den beiden Mutanten häufiger gezählt werden konnten (Abbildung 33).

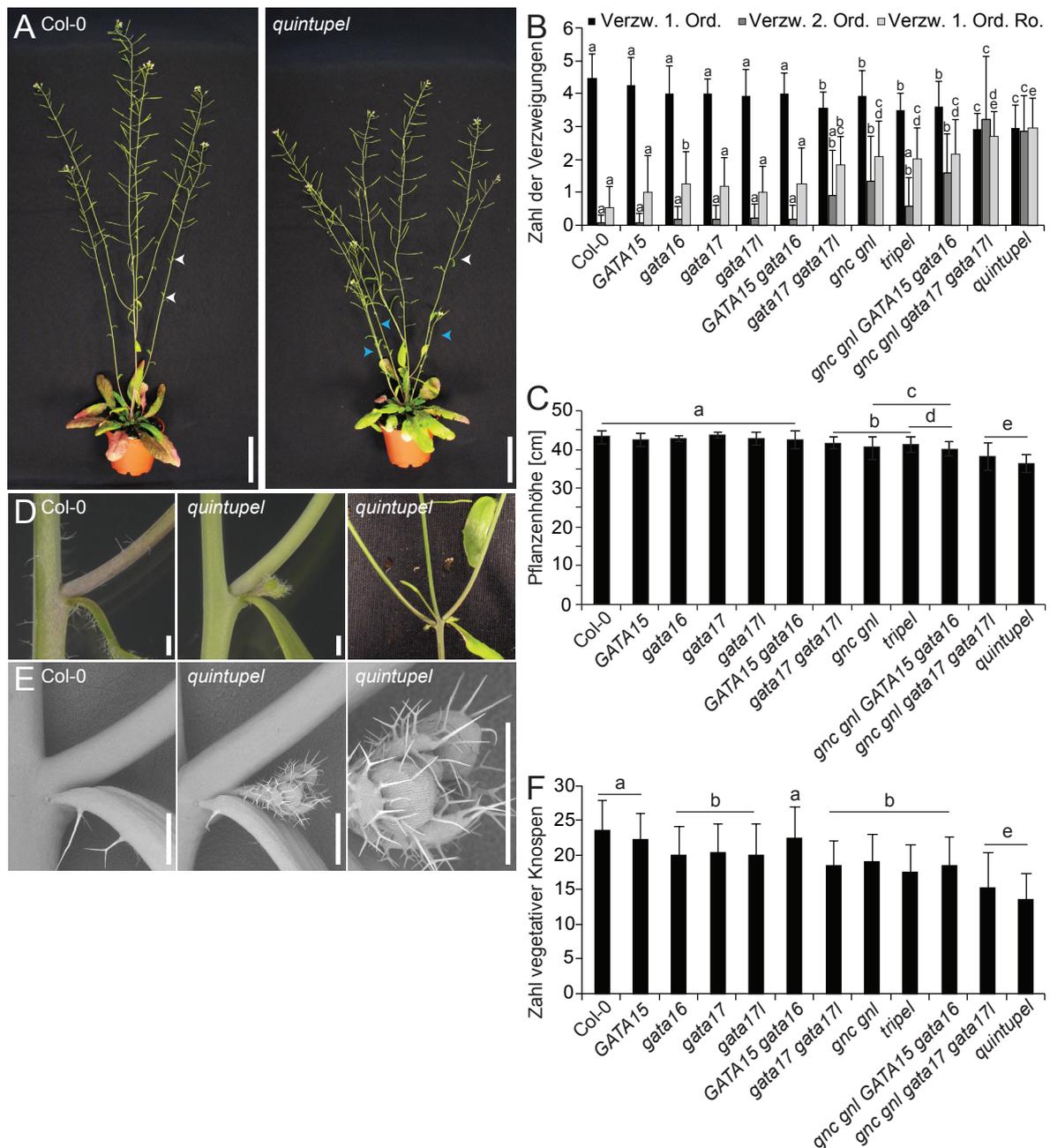
Zusammenfassend kann hier gefolgert werden, dass die komplexen *gata*-Mutanten in der Phyllotaxis Defekte aufweisen. Da in der *tripel*- und *quintupel*-Mutante ähnliche Ergebnisse vorliegen, tragen die paraloge *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* verstärkt zu diesem Prozess bei.

### 2.5.2.3. GATAs steuern mehrere Aspekte der Sprossverzweigung

Neben der Rolle in der Etablierung der Phyllotaxis der Blüten ist CK auch für die generelle Sprossverzweigung beziehungsweise die Aktivierung der Knospen ein entscheidender Faktor (Müller und Leyser, 2011). Abweichungen in den Verzweigungsmustern können oft auf Unregelmäßigkeiten in der CK-Synthese oder -antwort zurückgeführt werden (Turnbull et al., 1997). Da Unterschiede in der Verzweigung in einigen *gata*-Mutanten auffällig waren, wurden alle verfügbaren Mutanten auf veränderte Verzweigung hin untersucht (Abbildung 34).

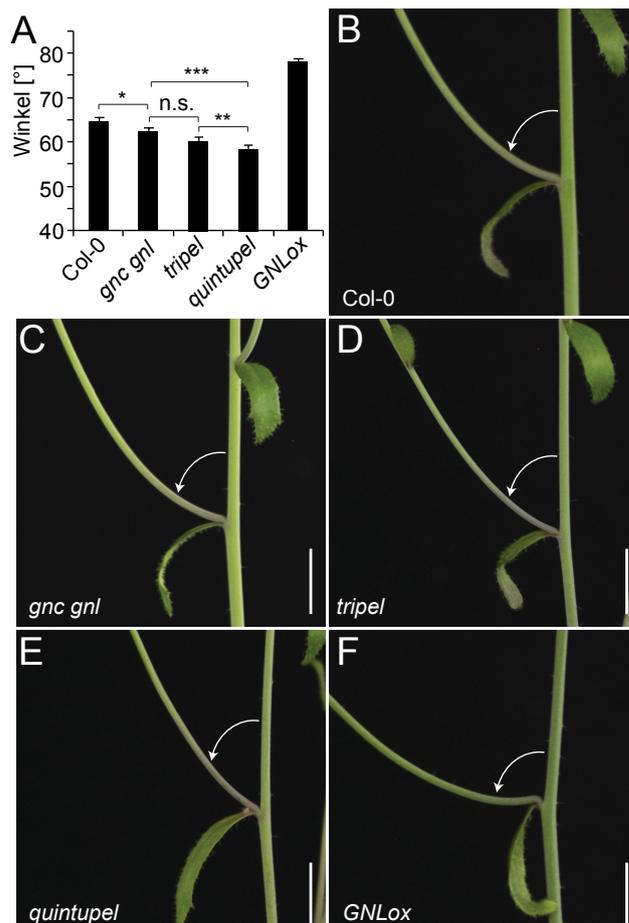
Die genaue Vermessung der Pflanzen ergab, dass die *quintupel*-Mutante und einige andere Mutanten eine erhöhte Zahl an sekundären Verzweigungen aufwiesen und kleiner waren. Im Besonderen waren die Verzweigungen erster und zweiter Ordnung in *gata17 gata17l*, *gnc gnl* sowie aller Mutanten höherer Komplexität erhöht, wobei die größten Effekte in der *gnc gnl gata17 gata17l* und der *quintupel*-Mutante zu verzeichnen waren. Genau diese Pflanzen waren auch mit ähnlicher Verteilung messbar kleiner als der Wildtyp (Abbildung 34B, 34C). Da bereits in *gata17 gata17l* und *gnc gnl* Effekte zu erkennen waren, die in der *gnc gnl gata17 gata17l* und der *quintupel*-Mutante ihre stärkste Ausprägung fanden, tragen wohl vor allem *gnc* und *gnl* sowie *gata17* und *gata17l* zu diesem Phänotyp bei. Eine indirekte Auswirkung der Höhe auf die Verzweigung ist unwahrscheinlich, da die Höhe zwar signifikant verringert war, aber nur in geringem Ausmaß und damit nicht den Hauptgrund darstellt.

Interessanterweise initiierten Mutanten höherer Ordnung, gemessen an allen Zweigen, weniger vegetative Knospen (Abbildung 34F). Damit scheint nicht die Initiation der Knospen, sondern das Auswachsen dieser in den *gata*-Mutanten dereprimiert zu sein. Dementsprechend konnte in der *quintupel*-Mutante auch gelegentlich das Auswachsen einzelner Blüten zwischen den seitlichen Infloreszenzen und deren Tragblättern beobachtet werden (Abbildung 34D, 34E).



**Abbildung 34: Analyse der Verzweigungsmuster in den *gata*-Genmutanten.** (A) Bilder von sieben Wochen alten Wildtyp und *quintupel*-Mutanten Pflanzen. Pfeile weisen auf Verzweigungen zweiter Ordnung (weiß) und auf Verzweigungen erster Ordnung in Rosetten (blau) hin. Standardbalken = 5 cm. (B) Quantitative Erfassung der Verzweigungen erster und zweiter Ordnung des Sprosses (Verz. 1. Ord., Verz. 2. Ord.) sowie der rosettenständigen Verzweigung erster Ordnung (Verz. 1. Ord. Ro.). (C) Pflanzenhöhe des Wildtyps und aller Mutantenkombinationen. (D, E) Fotos (D) und Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (E) von der Bildung von Blütenknospen zwischen Seitensprossen und Tragblättern in der *tripel*- und *quintupel*-Mutante. Standardbalken = 1 mm. (F) Zahl der vegetativen Knospen entlang des Sprosses in Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen in n = 15 Pflanzen. Der Student's t-Test wurde zwischen allen Genotypen durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterschieden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert.

Bei der Vermessung der Pflanzen zur Verzweigung fiel auf, dass die seitlichen Infloreszenzen einen veränderten Winkel aufwiesen. Bei der Quantifizierung dieses Phänotyps waren die Mutanten durch einen spitzeren Winkel der seitlichen Triebe, gemessen zum Hauptspross, gekennzeichnet (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Winkel der lateralen Infloreszenzen in *gata*-Genmutanten.** (A) Messungen der Winkel der lateralen Infloreszenzen an fünf Wochen alten Pflanzen ( $n = 19$ ). Student's t-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (B-F) Repräsentative Bilder von lateralen Infloreszenzen der angegebenen Genotypen. Pfeile zeigen an, wie die Winkel für die Analysen in (A) gemessen wurden. Standardbalken = 1 cm.

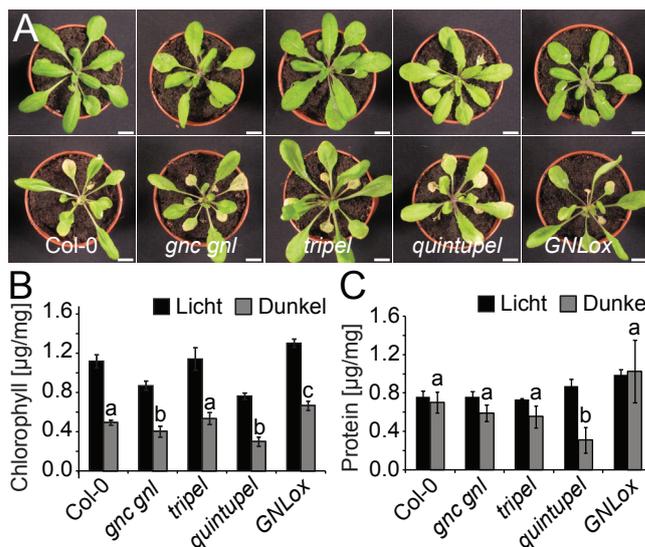
Auch hier trat der Effekt am deutlichsten in der *quintupel*-Mutante hervor. In der Tat wurde in einer vorangegangenen Arbeit bereits ein entgegengesetzter Phänotyp, also ein größerer Winkel zwischen Spross und Seitenzweigen, in den *GATA*-Überexpressionslinien beschrieben (Behringer et al., 2014).

Daraus kann geschlossen werden, dass *gata*-Genverlustmutanten und deren Überexpressoren die Winkel von Seitenzweigen antagonistisch regulieren.

#### 2.5.2.4. Die *gata*-Mutanten und Überexpressoren von *GNL* bewirken antagonistische Effekte auf die Seneszenz

Die Seneszenz ist ein weiterer Prozess, der unter dem Einfluss von CK steht. Künstliche Erhöhung des Hormons, sei es durch die Expression von CK-Synthesegenen oder eine externe Applikation, verzögert die Alterungsprozesse der betroffenen Gewebe deutlich (Gan und Amasino, 1995; Riefler, 2006). Da bereits eine verzögerte Seneszenz in den Überexpressoren beziehungsweise eine beschleunigte Seneszenz in der *gnc gnl* Doppelmutante nachgewiesen werden konnte, schien dieser Phänotyp ein guter Ansatzpunkt, um die Rolle der LLM-Domänen B-GATAs im Kontext von CK zu untersuchen.

Um im ersten Schritt die generellen Seneszenzdefekte der *gata*-Mutanten zu betrachten, wurden adulte 33 Tage alte Pflanzen für vier Tage ins Dunkle transferiert, um die Seneszenz zu induzieren und anschließend, anhand des



**Abbildung 36: Analyse der Seneszenz in den *gata*-Mutanten.** (A) Bilder von 33 Tage alten Pflanzen, die zur Induktion der Seneszenz vier Tage lang in Dunkelheit transferiert wurden (obere Reihe vor und untere Reihe nach dem Transfer). Standardbalken = 1 cm. Quantifizierung des Chlorophylls (B) sowie des Gesamtproteingehaltes (C) der Pflanzen aus (A) ( $n = 3$ ). Der Student's t-Test wurde zwischen den Proben in Dunkelheit durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterscheiden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert.

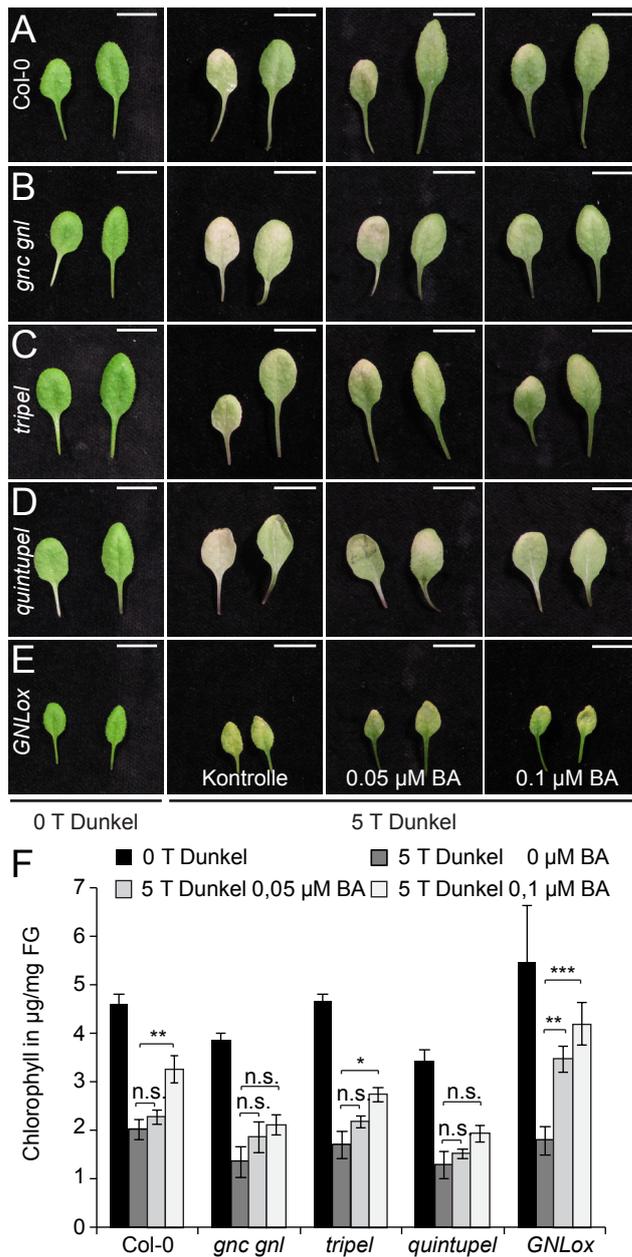
Chlorophyll- und des Proteingehaltes der Blätter, die Alterung zu quantifizieren (Abbildung 36).

Wie anhand der Reduktion des Chlorophylls und des Proteingehaltes in den Blättern der adulten Pflanzen verfolgt werden kann, war die Seneszenz in der *quintupel*-Mutante deutlich beschleunigt. Auch die *gnc gnl* Doppelmutante zeigte eine verfrühte Seneszenz, die im Falle der Chlorophyllmessungen auch signifikant ausfiel. Die *tripel*-Mutante verhielt sich ähnlich zum Wildtyp. Das bedeutet, dass *gnc gnl* und die *quintupel*-Mutante einen Defekt in der kontrollierten Alterung besitzen, der zu einer beschleunigten Seneszenz führt.

Nachdem diese Abweichungen im Seneszenzverhalten deutlich wurden, ergab sich die Frage ob, die Wirkung von CK auf die Seneszenz in den Verlustmutanten gestört war. Zur Klärung dieser Frage wurden Blätter von 21 Tage alten Pflanzen der gleichen *gata*-Mutanten wie im vorigen Versuch, inklusive des Überexpressors von *GNL*, vier Tage in Kontrollmedium und in Medium mit 0,05  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  CK inkubiert (Abbildung 37).

Wie zu erwarten, verzögerte CK die Seneszenz in den Blättern, wobei diese Verzögerung, gemessen am Chlorophyllgehalt, in der *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante weniger deutlich ausgeprägt war als in Col-0 und der *tripel*-Mutante. Die CK-Behandlung war in dieser Mutante also weniger effizient. Hingegen löste das CK in der *GNL* Überexpressorlinie, welche eine verzögerte Seneszenz aufweist, einen stärkeren Effekt auf die Verzögerung der Alterung aus.

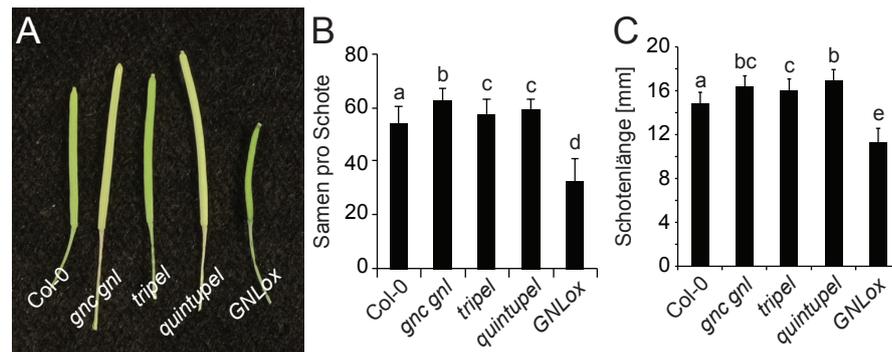
Zusammenfassend kann hier konstatiert werden, dass von den *GATA*-Genen vor allem der Verlust von *GNC* und *GNL* zu einer beschleunigten Seneszenz führt und die Effektivität von CK die Alterung zu verlangsamen in den Mutanten, die die *gnc* und *gnl* Allele enthielten, reduziert ist. Dementsprechend verhalten sich alle diese Beobachtungen in den *GNL* Überexpressoren entgegengesetzt.



**Abbildung 37: Analyse der Wirkung von CK auf die Seneszenz.** (A-E) Fotos von 21 Tage alten Pflanzen der angegebenen Genotypen. Die Blätter drei und fünf wurden von den Pflanzen getrennt und für vier Tage in Flüssigmedium mit und ohne CK (6-BA) in Dunkelheit inkubiert. Das linke Bild zeigt frische Blätter und die folgenden die in Dunkelheit inkubierten Blätter. Standardbalken = 1 cm. (F) Quantifizierung des Chlorophylls A und B der Blätter aus (A-E) (n = 3). Student's t-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant.

### 2.5.2.5. *gata*-Mutanten bilden längere Schoten aus und produzieren mehr Samen

Ein weiterer Phänotyp, der im Zusammenhang mit verschiedenen Hormonen und unter anderem auch mit CK untersucht wurde, ist die Samenproduktion (Bartrina et al., 2011). Um zu sehen, ob die Mutanten eine veränderte Samenproduktin aufweisen, wurde die Länge der Schoten sowie die Samenzahl der Schoten quantifiziert (Abbildung 38). In der Tat waren vor allem die Schoten von *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante länger als die des Wildtyps. Ebenso war die Samenzahl pro Schote in diesen Mutanten erhöht. Diese Beobachtungen verhielten sich antagonistisch zu denen in den Überexpressoren.



**Abbildung 38: Quantifizierung der Schotenlänge und Samenproduktion.** (A) Repräsentative Schoten von Wildtyp, *gnc gnl*, *tripel*-, *quintupel*- und *GNL* Überexpressor Pflanzen. Zu beachten ist auch der Chlorophylldefekt, der in den Schoten der Mutanten zu erkennen ist. (B) Quantifizierung der Samenanzahl pro Schote. (C) Messungen der Schotenlänge. Der Student's t-Test wurde zwischen allen Genotypen durchgeführt. Datensätze, die sich nicht statistisch unterschieden, fallen in eine Gruppe und wurden entsprechend markiert.

Samenproduktivität und Schotenlänge sind demnach ebenfalls Prozesse, die unter dem Einfluss der LLM-Domänen B-GATAs stehen.

### 3. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung von Mitgliedern der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktor-Familie aus *Arabidopsis thaliana*. Mit *GNC* und *GNL* wurden in vorangegangenen Studien bereits zwei Mitglieder dieser Transkriptionsfaktoren intensiv untersucht und in wichtige Prozesse der Pflanzenentwicklung unterhalb der Signale Auxin, Cytokinin, Gibberellin und Licht integriert. Diese Genfamilie besitzt allerdings mit *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* vier weitere Mitglieder, über die weder Erkenntnisse zur Regulation durch vorgeschaltete Signale noch zur biologischen Funktion, basierend auf Mutantanalysen, vorlagen.

In den durchgeführten Analysen von Insertionslinien dieser LLM-Domänen B-GATAs zeigte sich in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen eine redundante Wirkung der *GATAs* als Repressoren in der Blühzeit- und Blütenkontrolle unterhalb von GA.

Weiterhin wurden durch die neuen komplexen Insertionsmutanten Defekte in der Hypokotylelongation, der Phyllotaxis, der Verzweigung und Knospenaktivierung beschrieben, die zeigen, dass die neu untersuchten LLM-Domänen B-GATAs nicht nur redundant mit *GNC* und *GNL* agieren, sondern selbst entscheidend an der Kontrolle wichtiger Prozesse beteiligt sind.

Viele der Defekte in den Mutanten betreffen Prozesse, die mit Cytokinin in Verbindung gebracht werden. Durch die systematischen Untersuchungen auf vorgeschaltete Signale aller LLM-Domänen B-GATAs, ging bezeichnenderweise Cytokinin dabei als das einzige Signal hervor, welches alle *GATAs* induziert. Außerdem weisen die *gata*-Mutanten in einer Genexpressionsanalyse Defekte in der CK-Antwort auf.

Des Weiteren wurde in phylogenetischen Analysen die Konservierung der LLM-GATAs weiter verdeutlicht und neue Interaktionspartner für *GNC* und *GNL* im Y2H-System untersucht.

#### 3.1. Die LLM-GATA Proteine

##### 3.1.1. Konservierung der LLM-Domänen B-GATA Proteine

Unsere Arbeitsgruppe hat durch ihre Studien die GATA-Faktoren mit einer LLM-Domäne als festen Bestandteil der B-GATAs identifiziert. Die Arbeiten zeigen anhand der Homologen von *GATA23*, dass es innerhalb dieser Transkriptionsfaktorengruppe zu einer Diversifizierung und Spezialisierung gekommen ist (Behringer et al., 2014). In den phylogenetischen Analysen dieser Arbeit wurde jedoch deutlich, dass die homologen Paare der LLM-Domänen B-GATAs *GNC* und *GNL*, *GATA15* und *GATA16* sowie *GATA17* und *GATA17L* in Brassica stark konserviert sind (Abbildung 6). Die Erhaltung der *GATAs* in *Brassicaceae* spricht für die funktionelle Wichtigkeit dieser

Proteine. In Übereinstimmung damit konnte hier gezeigt werden, dass neben *GNC* und *GNL* auch die anderen Mitglieder der Genfamilie wichtige Funktionen in der Pflanzenentwicklung übernehmen.

Vorangegangene Untersuchungen legten nahe, dass LLM-Domänen B-GATAs schon vor der Aufspaltung von monokotylen und dikotylen Pflanzen existierten, da B-GATA-Faktoren mit LLM-Domänen in Spezies beider Gruppen vorkommen (Behringer und Schwechheimer, 2015; Behringer et al., 2014). An diese Erkenntnisse anknüpfend, konnte hier gezeigt werden, dass LLM-GATAs in Landpflanzen bis in das Laubmoos *Physcomitrella patens* nachweisbar sind (Abbildung 7). Die Existenz dieser Proteine in ursprünglichen Vertretern der Landpflanzen verdeutlicht sowohl die starke Konservierung der GATAs, als auch der LLM-Domäne als funktionelle Einheit. Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil viele Signalwege, wie der GA Signalweg mit seinen Komponenten *GID1* und den *DELLA* Proteinen, in *Physcomitrella* nicht komplett konserviert sind (Schwechheimer und Willige, 2009). Dies könnte bedeuten, dass die LLM-Domänen B-GATAs erst im Laufe der Evolution dazu verwendet wurden, um im GA und in anderen Signalwegen zu agieren.

Im Zuge dieser phylogenetischen Analysen fiel auf, dass die untersuchten Proteine in *Physcomitrella* zwei für die B-GATAs charakteristische Domänen tragen: die LLM- und die HAN-Domäne (Abbildung 7). Da bis jetzt kein B-GATA in anderen Spezies identifiziert wurde, in dem diese N- beziehungsweise C-terminal konservierten Bereiche auf einem Protein vereint vorliegen, ist eine Trennung der Domänen während der Entwicklung der Landpflanzen wahrscheinlich. Die Funktion aller Proteine wird durch ihre Domänen bestimmt und der Gewinn oder Verlust dieser funktionellen Einheiten ist zentraler Bestandteil der Evolution der Proteine (Vogel et al., 2004). Der Verlust oder die Trennung von Domänen kann möglicherweise die Regulation oder ihre Funktion in einem bestimmten Kontext ermöglichen (Scaiewicz und Levitt, 2015). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *GNC*, *GNL* und *HAN* direkt miteinander interagieren können (Zhang et al., 2013), wodurch ein Mechanismus vorhanden wäre, durch den die Domänen der Proteine zusammen aber auch getrennt agieren könnten. Außerdem gibt es Hinweise auf gemeinsame und getrennte Funktionen in LLM- und HAN-Domänen B-GATAs (Behringer et al., 2014). Genauere Analysen müssen zeigen wie die biochemische Funktion und der Beitrag der Domänen zur jeweiligen Funktion der Proteine sind.

### **3.1.2. Bedeutung der biochemischen Funktion von *GNC* und *GNL***

Wie die LLM-Domänen B-GATAs auf biochemischer Ebene ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren nachkommen, ist nur wenig bekannt. In einem Versuch Neues über das Verhalten der Proteine zu erfahren, wurden hier breit angelegte Y2H-Analysen mit *GNC* und *GNL* durchgeführt. Die Analysen dieser Arbeit zeigten zunächst, dass keine Homo- oder Heterodimerisierung zwischen *GNC* und *GNL*

stattfindet (Abbildung 8). Ein weiterführender Y2H-Interaktionstest, gegen tausende von möglichen Interaktionspartnern mit Vollängen- und Fragmentproteinen von GNC und GNL, deckte jedoch neue mögliche Interaktoren auf. So konnten N-terminale Fragmente von GNC und GNL positiv mit TCP9 und TCP15 getestet werden und C-terminale Fragmente von GNL lieferten in einem Test mit TPL positive Ergebnisse (Abbildung 9). Es ist bekannt, dass selbst Interaktionen zwischen Proteinen, für die in Y2H-Analysen ein positiver Test nur mit Fragmenten möglich ist, sinnvolle Partner darstellen können (Boxem et al., 2008). Auch wenn die hier beschriebenen Kandidaten für GNC und GNL in weiteren Experimenten noch bestätigt werden müssen, stellen sie im Hinblick auf ihre Funktion interessante Kandidaten dar. Nur einige der möglichen Verbindungen seien hier aufgezeigt.

TCP9 und TCP15 gehören beide zu den Klasse I TCPs. Sie sind Transkriptionsfaktoren, die Promotoren von Zellzyklusgenen binden können und die Zellteilung regulieren (Davière et al., 2014; Martín-Trillo und Cubas, 2010). Sie wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass TCP15 und sein homologes TCP14 die Keimung (Resentini et al., 2014), Internodien-Länge und Blattform in Arabidopsis (Kieffer et al., 2011) sowie die Verzweigung und Meristemaktivität in Tomate steuern (Steiner et al., 2012a). Interessanterweise wurden dabei Zusammenhänge mit dem GA und dem CK Signalweg aufgedeckt. Zum einen reprimieren die DELLAs die TCPs durch direkte Interaktion, um die Sprosslänge zu kontrollieren (Davière et al., 2014). Und zum anderen wird SPY (SPYNDLY) für die Funktion von TCP14 benötigt, welches CK-abhängige Prozesse steuert (Steiner et al., 2012b). TCP14 und TCP15 haben unter anderem auch Einfluss auf die Blütenentwicklung und fusioniert mit einer Repressionsdomäne führen sie zur Reduktion der Zahl der Petalen (Kieffer et al., 2011). Damit sind Prozesse betroffen, in die auch LLM-Domänen B-GATAs involviert sind. Bezogen auf die antagonistischen Phänotypen, die aus den bisherigen Untersuchungen von Ausfällen der TCPs und GATAs hervorgingen, könnte es sich bei ihnen um Gegenspieler handeln, die sich durch eine direkte Interaktion auf Proteinebene gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen. Genauere Untersuchungen müssen zeigen, wie die Interaktionen in Zusammenhang mit ihrer Funktion gebracht werden können und wie sich die genauen Beziehungen der Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene darstellen.

Auch im Falle von TPL interagierten nur zwei Fragmente von GNL und nicht das Vollängenkonstrukt, aber eine Interaktion scheint unter gewissen Gesichtspunkten dennoch logisch. Wie die Micorarrayanalysen verdeutlichen, besitzen die LLM-Domänen B-GATAs vor allem repressorische Wirkung. So waren nach CK-Behandlung die runterregulierten Gene in den Mutanten am stärksten beeinträchtigt (Abbildung 30). In Übereinstimmung damit ist bekannt, dass GNC und GNL zum Beispiel am Promotor von *SOC1* als Repressoren agieren (Richter et al., 2013a). Diese

repressorische Wirkung könnte durch einen Ko-Repressor wie TPL vermittelt werden, welcher bekanntlich Transkriptionsfaktoren bindet und die Genregulation mithilfe von Histonacetylrasen verändert (Wang et al., 2012). In einem groß angelegten Y2H-Test mit TPL und verwandten Proteinen, wurden außerdem mit GATA18 (HAN) und GATA16 zwei weitere B-GATAs als TPL Interaktoren dokumentiert (Causier et al., 2012). Beide tragen kein EAR-Motiv, welches für eine TPL-Interaktion bis jetzt als entscheidend angesehen wurde (Kagale und Rozwadowski, 2011).

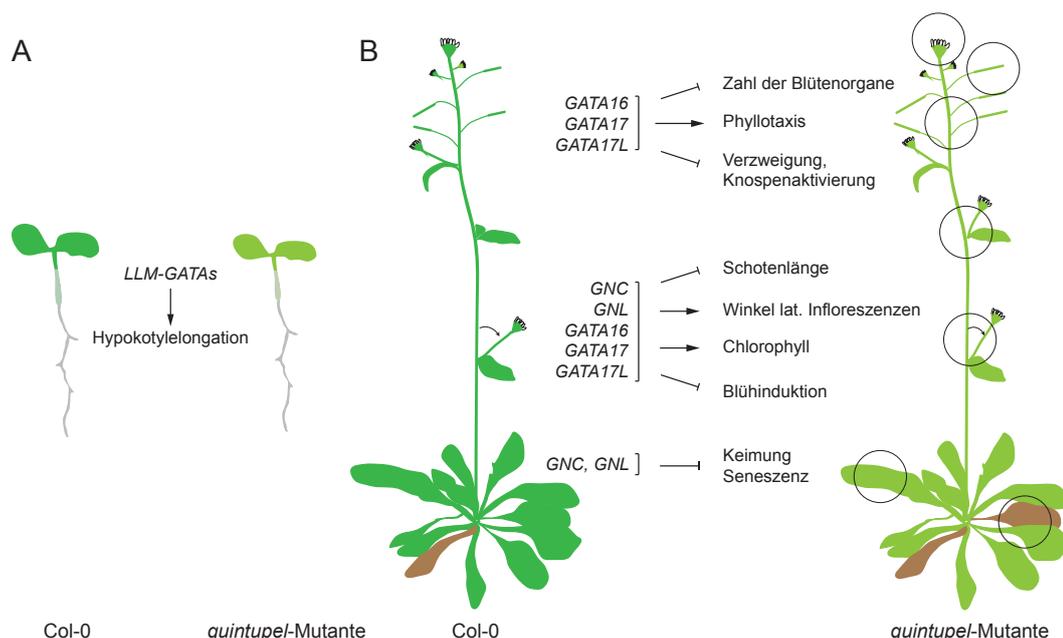
Weiterhin ist von Bedeutung, dass für GNC bereits eine Interaktion mit SNL1 (SIN3-LIKE1) in einem Y2H nachgewiesen wurde (Bowen et al., 2010). SNL1 ist eine Komponente eines Multiproteinkomplexes, welcher mit einer Histondeacetylase assoziiert ist. SINL1 bindet Transkriptionsfaktoren, um Gene zu reprimieren (Bowen et al., 2010). Weitere Analysen müssen zeigen wie die repressorische Wirkung der LLM-GATAs auf molekularer Ebene erreicht wird und welche Rolle dabei TPL und SNL1 spielen.

### **3.2. Die Analysen der neuen Insertionsmutanten bekräftigen die Bedeutung der LLM-Domänen B-GATAs**

In einer vergleichenden Analyse der LLM-Domänen B-GATAs aus Arabidopsis, Brachypodium und Tomate konnte eine spezieübergreifende redundante Funktion nachgewiesen werden. Überexpressoren von *AtGATA15*, *AtGATA17* oder zum Beispiel auch *BdGATA4* oder *SIGATA4* und *SIGATA5* produzieren als Transgene in Arabidopsis, bezüglich Chlorophyllakkumulation und Keimungsverhalten, ähnliche Phänotypen wie *GNC* und *GNL* Überexpressoren (Behringer et al., 2014). Auch die zum Teil schwachen Ausprägungen der Phänotypen in *gnc gnl* lassen auf eine redundante Funktion der anderen GATAs der Familie schließen. Tatsächlich traten viele der hier untersuchten Phänotypen, die zum Teil in *gnc gnl* schon vorhanden waren, wie Chlorophyllakkumulation, Hypokotylelongation, Schotenlänge, Samenanzahl, Blühzeitpunkt sowie Seneszenz, Pflanzenhöhe und Verzweigung, in der *quintupel*-Mutante verstärkt auf. Sie waren schwächer oder gar nicht in weniger komplexen Mutanten zu erkennen. Daraus kann, in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien, geschlossen werden, dass die LLM-Domänen B-GATA Gene aus Arabidopsis gemeinsame biologische Funktion besitzen und viele unterschiedliche Prozesse steuern. Diese Aussage wird durch die Genexpressionsdaten der Micoarrayexperimente unterstützt, die deutlich machen, dass die GATAs überlappende Funktion in der Regulation von Genen besitzen. Sowohl in der basalen Expression als auch nach der CK-Induktion war die Genexpression in komplexeren Mutanten deutlicher beeinträchtigt, als in weniger komplexen Mutanten (Abbildung 30).

Eine Untersuchung der Phänotypen in allen Mutantenkombinationen war wegen der hohen Zahl möglicher Kombination nicht durchführbar. Dennoch bestand der Anspruch, auch die Rolle der kurzen GATAs zu beleuchten. Daher wurden viele

der phänotypischen Analysen mit der *gnc gnl* Doppelmutante, der komplementären *tripel*-Mutante und der *quintupel*-Mutante durchgeführt, um die Phänotypen im Kontext von *GNC* und *GNL* zu untersuchen. In einigen Fällen ist es sogar gelungen den Beitrag zu Phänotypen auf einzelne LLM-Domänen B-GATA oder ein Gen-Paar zurückzuführen. Während zum Beispiel die Keimung oder die Seneszenz in Blättern vor allem durch *GNC* und *GNL* kontrolliert wurde (Abbildungen 21 und 37), trugen zu den Phänotypen wie der Hypokotylelongation und der Schotenlänge alle Insertionen bei und die deutlichsten Effekte waren folglich in der *quintupel*-Mutante zu erkennen (Abbildungen 27 und 38). Die Defekte in der Bildung der Blütenorgane und der Verzweigung waren allerdings schon in der *gata17 gata17l* Doppelmutante zu sehen und auch die Phänotypen der Phyllotaxis und der Knospenaktivierung legten eine besondere Funktion der kurzen *GATAs* nahe, da hier schon die *tripel*-Mutante betroffen war, nicht jedoch die *gnc gnl* Mutante (Abbildungen 26, 33, und 34). Mit der Phyllotaxis und der Steuerung der Knospenaktivität wurden zudem neue Phänotypen beschrieben, die zuvor noch nicht im Zusammenhang mit LLM-Domänen B-GATAs gefunden wurden.



**Abbildung 39: Überblick über die Phänotypen, an denen die LLM-Domänen B-GATAs beteiligt sind.** Darstellung des Einflusses der LLM-Domänen B-GATAs auf die Entwicklung von Keimlingen (A) sowie auf adulte Pflanzen (B) anhand von schematischen Abbildungen des Wildtyps und der *quintupel*-Mutante. In (B) sind die *LLM-GATAs* aufgelistet und entsprechend ihres Beitrags zu den jeweiligen Phänotypen gruppiert. Zusätzlich wurden, soweit möglich, die Phänotypen an der Mutantepflanze mit Kreisen markiert.

In Abbildung 39 ist eine Übersicht dargestellt an welchen Entwicklungsprozessen die LLM-Domänen B-GATAs beteiligt sind. Auffällig ist, dass viele der Phänotypen in den untersuchten Insertionslinien wie Phyllotaxis, Sprossverzweigung, Knospenaktivierung und Bildung der Blütenorgane einen Bezug zur Meristemfunktion aufweisen.

Manche dieser Phänotypen waren zudem in Mutantenkombinationen der kurzen *GATAs* zu sehen, die vermehrt in Meristemen exprimiert werden. Dementsprechend scheint im Falle der Phyllotaxis und der Entwicklung der Blütenorgane auch das in Meristemen exprimierte *GATA17* eine wichtige Funktion zu besitzen. Eine genaue Aufschlüsselung, welche *GATAs* zu den jeweiligen Prozessen beitragen, wäre jedoch nur mit Komplementationsexperimenten zu erreichen.

Im Hinblick auf die Aufgaben einzelner *GATAs* muss natürlich auch gesehen werden, dass es sich bei *gata16* (SALK\_021471) und *gata17* (SALK\_101994) um schwache Mutanten-Allele handelt. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es unter der Verwendung von stärkeren Allelen in manchen Fällen zu einer Verstärkung der beobachteten Phänotypen gekommen wäre. Entscheidend ist jedoch, dass sich die verwendeten Allele im Laufe der Analysen aus mehreren Gründen sehr bewährt haben. Wie bereits beschrieben, kam es neben der erwähnten Verstärkung der Phänotypen der *gnc gnl* Mutante, auch zur Entdeckung neuer noch unbekannter Phänotypen in den Mutanten. In manchen Phänotypen konnte der Effekt, wie bereits erwähnt, auch auf einzelne *GATAs* oder Genpaare zurückgeführt werden. Nicht zuletzt konnte in vielen Fällen, wie zum Beispiel bei der Blühzeitkontrolle, eine graduelle Verstärkung der Phänotypen festgestellt werden, die sich mit höherer Komplexität der Mutanten verstärkte. Dies ist nicht nur ein Hinweis darauf, dass die Gene additiv und redundant agieren, sondern wirkt wie eine inhärente Kontrolle dafür, dass die Effekte auf die *GATA*-Gene zurückzuführen sind und nicht auf andere Faktoren. Alles deutet darauf hin, dass die beobachteten Effekte in den Mutanten von den jeweils defekten *GATAs* stammen. Abgesehen davon könnten stärkere Allele einen Nachteil darstellen, falls die Effekte sehr stark sind und eine Gefahr der Letalität besteht. Das erscheint bei so elementaren Phänotypen, die Keimung, Blüten- und Samenentwicklung betreffen, auch nicht ausgeschlossen. Des Weiteren konnten auch in starken Allelen für *GATA15* WiscDsLox471A10 (*gata15-2*) und *GATA17* SALK-049041 (*gata17-2*), zumindest für den Chlorophyllgehalt und den generellen Habitus der Pflanzen, keine Defekte festgestellt werden. Dies zeigt erneut, dass diese Gene redundant wirken und es kann als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, dass einer der untersuchten Prozesse gänzlich von *GATA15* oder *GATA17* kontrolliert wird. Für *GATA16* wurde keine Alternative Insertionsmutante gefunden.

Zuletzt kann darauf verwiesen werden, dass die Allele *gata17-1* und *gat17l-1* bereits für weitere Studien zum Einsatz kamen und gute Ergebnisse erzielt wurden. Auch in höchst komplexen genetischen Interaktionen war es möglich zu zeigen, dass diese *GATAs* die Stomatabildung oberhalb von *SPCH* (*SPEECHLESS*), *MUTE* und *SCRM2* (*SCREAM/SCREAM2*) und unterhalb oder unabhängig von *TMM* (*TOO MANY MOUTHS*) und *SDD1* (*STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1*) steuern (Klermund et al., 2016).

Allein die Tatsache, dass die Transkription von *GATA15* in dem ausgewählten Allel *SAIL\_618\_B11* nicht beeinflusst ist, lässt keine direkten Rückschlüsse auf die biologische Funktion dieses Gens zu. In diesem Zusammenhang wäre im nächsten Schritt ein Ansatz mit dem genomeditierenden CRISPR/Cas-System lohnend, um schneller gewünschte Kombinationen starker Mutanten zu erreichen. In diesem Fall sind die hier gezeigten Untersuchungen hilfreich, um zu sehen welche Kombinationen dafür wertvoll wären.

Die redundante Arbeitsweise der *GATAs* in vielen Phänotypen verlangt nach einer Erklärung wie ein solches gegenseitiges Ersetzen der Gene möglich ist. Durch Expressionstests von *GATA15*, *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* in *gnc gnl* und *GNL* Überexpressoren konnten Hinweise auf eine gegenseitige repressorische Wirkung der *GATAs* gesammelt werden (Ranftl et al., 2016). Die Transkriptmengen von *GATA16*, *GATA17* und *GATA17L* sind demnach in *gnc gnl* erhöht und die von *GATA15*, *GATA16* und *GATA17L* in *GNL* Überexpressoren signifikant reduziert. Die Möglichkeit einer solchen Kreuzregulation wird durch ChIP-seq und ChIP-qRT Analysen, die von Emmanouil Bastakis durchgeführt wurden, gestützt. Diese Daten zeigen, dass *GNL* an Promotorregionen von mindestens drei der sechs LLM-*GATAs* bindet (Ranftl et al., 2016). Der Ausfall eines Mitgliedes der LLM-Domänen B-*GATAs* könnte also durch die Hochregulierung der anderen Gene ausgeglichen werden und würde erklären, warum manche Phänotypen nur in der *quintupel*-Mutante und nicht in weniger komplexen Mutantenkombinationen zu sehen waren.

### **3.3. LLM-B-*GATAs* sind vielseitige Regulatoren, die unterhalb verschiedener Signale agieren**

Transkriptionsfaktoren kontrollieren als molekulare Schalter wichtige Prozesse und können nur im Kontext der Signale verstanden werden, die sie aktivieren. Da die Annahme bestand, dass die LLM-Domänen B-*GATAs* als redundante Faktoren auch durch ähnliche Signale gesteuert werden, wurden sie auf die Signale getestet, die auch für *GNC* und *GNL* wichtig sind. Durch diese Analysen wurde deutlich, dass die *GATAs* auf die vorgeschalteten Signal nicht alle gleichermaßen reagieren. Außer CK, welches alle LLM-Domänen B-*GATAs* anregte, fielen die Resultate bei GA und Auxin sehr inhomogen aus und durch Licht schienen nur *GNC* und *GNL* angeregt zu sein. Dieses Verhalten liefert auch eine mögliche Erklärung dafür warum *GNC* und *GNL* als Ziele von Signalen aus vielen Studien zur Genregulation hervorgingen, nicht aber ihre kurzen Paralogen.

Im Folgenden soll hier auf einige Phänotypen eingegangen werden, die an bestimmte Signale gekoppelt sind: die lichtabhängige Hypokotylelongation, die Funktion als Blühzeitregulatoren unterhalb von GA und, im Hintergrunde der homogenen Regulation der *GATAs* durch CK und der Microarray-Daten, einige CK-abhängige Prozesse.

### 3.3.1. Hypokotylelongation

Für *GNC* und *GNL* wurde die Induktion durch Licht bereits in einigen Studien nachgewiesen und auch hier konnte diese Regulation bestätigt werden (Manfield et al., 2006; Naito et al., 2007). Vor allem *GNL* wurde durch alle getesteten Lichtbedingungen von dunkelrotem, roten und blauem Licht stark angeregt (Abbildung 10). Dass die Anregung unter Rotlicht PIF-abhängig war, ist nicht überraschend, da *GNC* und *GNL* durch PIFs transkriptionell kontrolliert werden (Richter et al., 2010). Die anderen getesteten LLM-Domänen B-GATAs wurden durch Licht nur schwach beeinflusst. Trotz der deutlichen Lichtregulation war, abgesehen von der Chlorophyllbildung, bisher in *gnc gnl* kein lichtabhängiger Phänotyp zu beobachten. Lediglich in den Überexpressoren ist das Hypokotyl in lichtgewachsenen Keimlingen elongiert. Durch die Verstärkung der Phänotypen war jedoch in der *quintupel*-Mutante im Bereich der lichtabhängigen Hypokotylelongation ein Phänotyp zu erkennen, der in der *gnc gnl* Doppelmutante noch nicht ausgeprägt war (Abbildung 27). Das bedeutet, dass trotz fehlender Lichtinduktion auch die restlichen GATAs an diesem Prozess beteiligt sind und redundant agieren.

Aufgrund der Tatsache, dass zum einen die Phänotypen der *gata*-Mutanten sehr komplex sind, und dass zum anderen auch die Regulation des Hypokotyls unter dem Einfluss vieler Signale, wie Auxin, CK, Ethylen, GA und Licht stehen, ist nicht davon auszugehen, dass der Defekt in der Hypokotylelongation das Resultat eines Photomorphogenesedefekts mit klarem physiologischem Kontext ist. Unverkennbar ist jedoch, dass dieser Effekt lichtabhängig ist. Eine direkte Verbindung zu lichtabhängigen Prozessen ist möglicherweise im Zusammenhang mit den PIFs zu sehen. Es wurde bereits erkannt, dass *pifQ* und *GNC* und *GNL* Überexpressoren transkriptionell viele Defekte in der Genexpression teilen, die genauen Mechanismen müssen aber noch gezeigt werden (Richter et al., 2010). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass kürzlich gezeigt wurde, dass Cryptochrome mit PIF4 und PIF5 interagieren (Pedmale et al., 2016). Dadurch kann, nach jetzigem Kenntnisstand, das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen an unterschiedliche Lichtbedingungen angepasst werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Signale des Lichtes über die PIFs auf *GNC* und *GNL* übertragen werden, um dadurch das Wachstum zu verändern.

### 3.3.2. LLM-Domänen B-GATAs sind Blühzeitregulatoren in Arabidopsis

Durch die Analysen der Insertionsmutanten ist es durch diese Arbeit gelungen, die gemeinsame Kontrolle des Blühzeitpunktes sowie der Blütenentwicklung durch die LLM-Domänen B-GATAs unterhalb von GA zu verdeutlichen. Die Fähigkeit von *GNC* und *GNL* das Blühen zu unterdrücken wurde bereits ausführlich untersucht. So führen Verlustmutanten und Überexpressoren zu früheren beziehungsweise

späteren Blühzeitpunkten, wenn die Pflanzen unter Langtag-Bedingungen wachsen (Richter et al., 2010, 2013a). Diesen Befunden entsprechend blühten die komplexen *gata*-Mutanten früher der diesbezügliche Phänotyp von *gnc gnl* wurde noch deutlich verstärkt (Abbildung 22). Vor allem die graduelle Verstärkung des Phänotyps, die durch das Fehlen weiterer *GATAs* ausgelöst wurde, zeigt sehr eindrucksvoll die Beteiligung der untersuchten *GATAs* an diesem Prozess. Auch die Suppression der extrem spät blühenden *ga1* Mutante durch *gnc gnl* konnte durch das Hinzufügen weiterer *GATA* Allele verstärkt werden. Vor allem die Allele *gata17* und *gata17l* scheinen diesbezüglich eine wichtige Rolle zu spielen (Abbildung 25).

Als eines der bekannten Regulationspunkte der GA-abhängigen Blühzeitkontrolle wurde *SOC1* als Zielgen von GNC und GNL nachgewiesen. Die Kontrolle des Blühzeitpunktes durch GNC und GNL wird demnach durch den Regulator *SOC1* vermittelt, indem sie direkt an den Promotor binden, um diesen zu reprimieren (Richter et al., 2013). Auch in diesem Punkt konnte hier gezeigt werden, dass in der *quintupel*-Mutante die Transkription von *SOC1* dereprimiert war, wobei dieser Effekt im Vergleich zur *gnc gnl* noch verstärkt wurde (Abbildung 22). Folglich sind die LLM-Domänen B-*GATAs* redundante Blühzeitregulatoren unterhalb von GA und üben ihre Kontrolle auf den Blühzeitpunkt teilweise über *SOC1* aus. Dieser Zusammenhang ist auch deshalb interessant, weil dadurch die Funktion von GA und *SOC1* in der Kontrolle des Blühzeitpunktes unter Langtag-Bedingungen gestärkt wird.

Überraschenderweise blühten die komplexen *gata*-Mutanten unter Kurztag-Bedingungen später als der Wildtyp. Da auch dieser Effekt mit zunehmender Komplexität der Mutanten verstärkt wurde, verhielten sich die Pflanzen entgegengesetzt zu den unter Langtag gewachsenen (Abbildung 23). Auch wenn dieses Verhalten nicht zu erwarten war, waren *gnc* und *gnl* schon bei den ersten Untersuchungen des Blühzeitpunktes nicht in der Lage gewesen den *ga1* Phänotyp unter Kurztag-Bedingungen zu supprimieren, obwohl sie das unter Langtag-Bedingungen vermochten (Richter et al., 2010). Dies legt nahe, dass neben der Wirkung auf *SOC1* andere Effekte für die Bestimmung des Blühzeitpunktes in den *gata*-Mutanten eine Rolle spielen. Der Blühzeitpunkt ist insgesamt sehr komplex reguliert und viele externe und interne Signal stellen die zeitliche Abstimmung des Blühens sicher (Blümel et al., 2015). Eine Erklärung für das antagonistische Verhalten der komplexen *gata*-Mutanten in den unterschiedlichen Lichtbedingungen ist wahrscheinlich auch in physiologischen Parametern zu suchen. Der drastisch reduzierte Chlorophyllgehalt könnte unter Kurztag zu Limitierungen führen, die unter Langtag nicht bestehen. Hinweise dafür konnten zum Beispiel in der verringerten Trockenmasse und der reduzierten Quantenausbeute gefunden werden. Wenngleich diese Punkte nur Anhaltspunkte darstellen das Verhalten der Mutanten zu erklären, ist bekannt, dass GNC Einfluss auf den Zuckermetabolismus hat. Dabei konnte ebenfalls bestätigt werden, dass es

sich wegen des reduzierten Chlorophyllgehaltes zum Teil um indirekte Effekte handelt (Hudson et al., 2011). Klar ist jedoch, dass das Wachstum unter verlängerten Kurztag-Bedingungen eine Herausforderung für die Pflanzen darstellt. Um etwaige Effekte zu testen, könnte man die komplexen Mutanten im ersten Schritt unter Kurztag in sehr starken Licht-Bedingungen anziehen, um zu sehen, ob eine physiologische Limitierung gelöst werden kann.

### 3.3.3. LLM-GATAs steuern redundant die Bildung der Blütenorgane

Die Kontrolle der Blütenorgane ist ein weiterer Prozess für den es Hinweise gibt, dass er durch LLM-Domänen B-GATAs GATAs unterhalb von GA gesteuert wird. Einer der wichtigsten Faktoren der Blütenentwicklung AP1 steuert dabei die GA-anhängige Repression von *GNC* und *GNL* in Blüten (Daten des Lehrstuhls Schweichheimer). Bedeutenderweise wird der apetale Phänotyp der *ap1-15* Mutante durch die Abwesenheit von *GNC* und *GNL* in der *ap1-15 gnc gnl* Mutante aufgehoben, was nahelegt, dass die GATAs die Bildung von Blütenorganen unterdrücken. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass komplexe *gata*-Mutanten, im Gegensatz zu *gnc gnl*, auch außerhalb des *ap1-15* Hintergrunds überzählige Petalen und Sepalen aufweisen. Interessant ist, dass dieser Phänotyp sowohl in den komplexen *tripel*- und *quintupel*-Mutanten als auch in der *gata17 gata17l* zu sehen war (Abbildung 26). Da zumindest für *GATA17* die vermehrte Expression im Apikalmeristem schon gezeigt wurde (Manfield et al., 2006), erscheint der Beitrag dieses Mitglieds zusammen mit seinem homologen *GATA17L* zu diesem Phänotyp auch nachvollziehbar. Die Rolle dieser kurzen LLM-GATAs für die Blütenentwicklung wird auch dadurch bekräftigt, dass *GATA17L* in ChIP-seq Analysen als Ziel von AP1/SEP3 gefunden wurde (Pajoro et al., 2014). Im Einklang mit der Sichtweise, dass dieser Prozess unter der Kontrolle von GA steht, konnte hier zudem gezeigt werden, dass die globale *della*-Mutante *rga-24 gai-t6 rgl1 rgl2 rgl3* von Defekten in der Blütenbildung betroffen ist. Auch diese Mutante wies überzählige Petalen und Sepalen auf (Abbildung 26). Damit konnte hier, in Verbindung mit den anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, gezeigt werden, dass Gibberellin die Zahl der Blütenorgane durch die Regulation der LLM-Domänen B-GATAs steuert.

Aufgrund der momentanen Datenlage ist anzunehmen, dass die Zusammenhänge in der Kontrolle der Blütenentwicklung mit der Involvierung von B-GATAs jedoch noch sehr viel komplexer sind. Die Beobachtung, dass in Überexpressoren von *GNC* oder *GNL* keine Defekte zu sehen sind legt nahe, dass es noch anderer Faktoren bedarf, um die Zahl der Blütenorgane zu regulieren. Außerdem weisen neben den LLM-Domänen B-GATAs, wie bereits erwähnt, auch die *han-2* und *hanl2* Mutanten Defekte in der Petalenzahl auf. Der Grund darin wurde bisher in der Tatsache gesehen, dass HAN das Etablieren und Einhalten der Grenzen zwischen Meristemen und Primordia sowie die Meristemgröße reguliert (Nawy et al., 2010; Zhao, 2004). Die Verstärkung der *han*

Phänotypen durch *gnc* und *gnl* sowie deren Interaktion im Y2H-System legen nahe, dass sie in diesem Prozess zusammen arbeiten. Des Weiteren wurde erkannt, dass für die Wirkung der B-GATAs auf die Blütenentwicklung auch CK wichtig ist. So konnte im Hintergrund der Tatsache, dass sich CK auf die Zahl der Blütenorgane auswirkt (Han et al., 2014) auch gezeigt werden, dass sowohl HAN als auch AP1 in der Lage sind auf die CK-Menge in den Blüten zu wirken (Ding et al., 2015; Han et al., 2014). Insgesamt ist somit der Rahmen einer sehr komplexen Interaktion verschiedener Faktoren und Hormone vorstellbar, in dem die GATAs eine entscheidende Rolle einnehmen.

Die Expression von *GNC* und *GNL* wird zudem von den Blütenentwicklungsregulatoren AP3 (APETALA3) und (PI) PISTILLATA gesteuert (Mara und Irish, 2008). Die genaue Bedeutung dieser Bindung und Regulation ist allerdings noch unklar.

### 3.3.4. Defekte in *gata*-Genmutanten betreffen viele Prozesse, die durch Cytokinin gesteuert werden

Durch die in dieser Arbeit getesteten Hormone Auxin, CK und GA, war die Antwort der LLM-Domänen B-GATAs nur im Falle von CK homogen. Die Transkripte aller Gene wurden durch die Behandlung erhöht (Abbildung 14). In der Literatur finden sich bereits zahlreiche Hinweise darauf, dass *GNC* und vor allem *GNL* durch CK induziert werden und in Prozessen eine Rolle spielen, die durch das Hormon reguliert werden (Brenner et al., 2005; Che et al., 2006; Kiba, 2005; Lee et al., 2007; Naito et al., 2007). Mit den hier präsentierten Ergebnissen zur CK-Induzierbarkeit aller LLM-GATAs, kommt der Hinweis auf eine Rolle der gesamten Genfamilie in CK-regulierten Prozessen hinzu. Auch konnten bereits durch den Nachweis, dass die Induktion von *GNC* und *GNL* durch CK in den *arr1-3 arr12-1* Mutanten (*Typ-B ARR*s) unterdrückt ist, erste Indizien dafür gesammelt werden, wie *GNC* und *GNL* durch Komponenten des CK Signalwegs gesteuert werden (Chiang et al., 2012). Dies lässt eine Funktion der beiden Transkriptionsfaktoren und weiterer LLM-GATAs im CK-Signalweg sehr wahrscheinlich erscheinen. Diese Annahme wurde letztendlich vor allem durch die Analyse der CK-Induzierbarkeit der Gene in den *gata*-Mutanten mittels Microarray durch diese Arbeit gestärkt. Insgesamt war hier ein Defekt der Regulation der Gene durch CK zu sehen, wobei die deutlichsten Effekte in der *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante zu verzeichnen waren (Abbildung 30).

Die Beschreibung der GATAs als Akteure unterhalb von CK beschränkte sich bis jetzt jedoch im Wesentlichen auf *GNC* und *GNL* im Kontext der Chloroplastenentwicklung (Chiang et al., 2012). Dies ist wahrscheinlich mit der Redundanz der LLM-Domänen B-GATAs zu begründen. Anhand der komplexen Insertionsmutante der LLM-Domänen B-GATAs ist es in dieser Arbeit gelungen, viele Phänotypen zu beschreiben, die in Verbindung mit CK stehen. Insgesamt stehen folgende Prozesse, die auch in den Mutanten beschrieben wurden, unter dem Einfluss von CK: die Seneszenz, die Verzweigung und Knospenaktivierung, die Phyllotaxis, die Samenproduktion, die

Bildung der Blütenorgane und der Chlorophyllgehalt (El-Showk et al., 2013; Hill et al., 2013). Neben den für *gata*-Mutanten bekannten Phänotypen, die die Seneszenz und die Chlorophyllakkumulation betreffen, konnten mit der Phyllotaxis, der Verzweigung und der Knospenaktivierung Phänotypen beschrieben werden, die bisher nicht mit den *GATAs* in Verbindung standen und vor allem in Mutantenkombinationen der kurzen *GATAs* zu finden waren. Auch wenn eine direkte mechanistische Verbindung zwischen den LLM-Domänen B-*GATAs* und CK für die meisten neu beschriebenen Phänotypen noch zu zeigen ist, konnte in *gnc gnl* und der *quintupel*-Mutante ein Defekt der seneszenzverzögernden Wirkung von CK gesehen werden, was daraufhin deutet, dass die *GATAs* diesen Prozess tatsächlich unterhalb und in Abhängigkeit von CK steuern (Abbildung 37).

Die Phyllotaxis ist eines der Beispiele bei dem die kurzen *GATAs* eine große Rolle spielen. Ein Phänotyp war in *gnc gnl* noch nicht zu sehen, trat aber in der *quintupel*- und *tripel*-Mutante sowie der *gata17 gata17l* hervor (Abbildung 33). Auch in diesem Prozess wurde bereits gezeigt, dass das Zusammenspiel von Hormonen wichtig ist und CK eine entscheidende Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass die räumliche Organisation und Anlage der Primordien durch Auxin im Apikalmeristem zusätzlich durch CK-Signale räumlich eingeschränkt wird und so zu einer zeitlich gleichmäßig gesteuerten Anordnung der Organe führt (Besnard et al., 2013). Wenn diese Mechanismen nicht greifen, ist die Phyllotaxis gestört. Phänotypen sind vor allem in *ahp6* zu erkennen, der Mutante eines CK-Phosphotransferproteins, welches in diesen Geweben exprimiert ist. Im Zusammenhang mit Defekten von Mutanten des CK-Signalwegs in diesem Prozess ist interessant, dass die CK-Antwort von *GNC* und *GNL* in *arr1 arr10 arr12* beeinträchtigt ist (Chiang et al., 2012) und sich bezeichnenderweise ähnliche Defekte in der Anordnung der Schoten entlang des Sprosses in der *arr1 arr10* Mutante finden (Argyros et al., 2008). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die *GATAs* tatsächlich unterhalb von *AHP6*, *ARR10* und *ARR12* an der Steuerung der Phyllotaxis beteiligt sind.

Die Sprossverzweigung beziehungsweise die Aktivierung der Knospen sind komplex gesteuerte Prozesse auf die viele Faktoren wirken, die wiederum bereits mit *GNC* und *GNL* in Verbindung gebracht wurden. So wirken unter anderem Hormone wie Auxin und CK auf die Verzweigung und die N-Verfügbarkeit sowie der N-Metabolismus nehmen ebenfalls darauf Einfluss (Su et al., 2011). *CGA1/GNL* aus Hirse wurde zudem kürzlich in der phyB-abhängigen Knospenaktivierung entdeckt (Kebrom und Mullet, 2016). Die Analysen zur Sprossverzweigung dieser Arbeit legen nahe, dass *GNC* und *GNL* und eventuell weitere *GATAs* im Kontext von CK und anderen Signalen an der Koordinierung der Verzweigung beteiligt sein könnten. Weitere Untersuchungen stehen aus, um die mechanistischen und komplexen Zusammenhänge aufzuklären.

### 3.4. Schlussfolgerung

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit die Rolle der LLM-Domänen B-GATAs als Regulatoren wichtiger Prozesse der Pflanzenentwicklung bekräftigt und auf weitere Mitglieder der Genfamilie ausgeweitet werden. In der Kontrolle der Pflanzenentwicklung wirken die neu untersuchten Gene teilweise mit *GNC* und *GNL* redundant, aber in einigen Prozessen auch getrennt davon. Die LLM-GATAs wurden hier mit neuen Prozessen in Verbindung gebracht und die Kenntnis über ihre biologische Funktion dadurch weiter vertieft.

Zusammen mit den Erkenntnissen, die über die HAN-GATAs in den letzten Jahren gesammelt wurden, ergibt sich ein Bild, das die B-GATAs als entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Pflanzenentwicklung etabliert. Die Beschreibung von Phänotypen in Mutanten der Gene, die die Architektur der Pflanzen und die Blüten und Samenproduktion betreffen, sind nicht zuletzt deshalb sehr interessant, weil damit Prozesse betroffen sind, die in der Nutzpflanzenentwicklung von großem Interesse sind.

Im Zuge weiterer Überlegungen wie das Zusammenspiel der unterschiedlichen LLM-GATAs in der Kontrolle des Pflanzenwachstums funktioniert und ein tieferes Verständnis der biochemischen und biologischen Funktion zu erlangen ist, sind folgende Überlegungen wichtig.

Im Gegensatz zu den HAN-GATAs, die im Wesentlichen aus Mutageneseexperimenten hervorgegangen sind und vor allem in Studien mit Interaktionspartnern und Experimenten zur Identifizierung ihrer Zielgene untersucht wurden, erfolgte der Zugang zu den LLM-GATAs über die Signale, die ihre Transkription steuern. Basierend auf der Regulation wurden *GNC* und *GNL* in Anhängigkeit der vorgeschalteten Signale untersucht, wohingegen auf Proteinebene und im Bezug auf die Zielgene noch nicht viel bekannt ist.

Einige Hinweise deuten darauf hin, dass die *LLM-GATAs* ihre Aufgaben weit unterhalb der Signale und vieler anderer Faktoren verrichten. Sie stellen damit in den Bereichen der Pflanzenentwicklung, an denen sie beteiligt sind, wichtige Exekutoren dar. Über ihre Funktion kann aufgedeckt werden, welche Gene durch die Hormone tatsächlich gesteuert werden, um einen bestimmten Prozess zu regulieren und wie die Spezifität dabei garantiert wird.

Um die Zielgene der LLM-GATAs zu ermitteln, würden ChIP-seq in Kombination mit RNA-seq Analysen in verschiedenen Geweben darüber Aufschluss geben, welche Gene die GATAs steuern, und ob alle GATAs die selben oder verschiedene Zielgene haben. Dies würde zeigen, ob sich die Redundanz auch über die Zielgene widerspiegelt.

Außerdem ist von Bedeutung, ob der Grund der unterschiedlichen Funktionen der GATAs in manchen Prozessen nur in der Expression in bestimmten Domänen und

der Regulation von Genen zu suchen ist, oder ob die LLM-GATAs auch biochemisch verschiedene Funktionen besitzen. So wäre interessant, ob der N-Terminus von GNC und GNL, den kurze GATAs nicht besitzen, bei der Kontrolle der Phänotypen, die vor allem von GNC und GNL gesteuert werden, eine Rolle spielt. Bezogen auf die biochemische Funktion wäre weiterhin zu klären, wie die genaue biochemische Funktion der LLM-Domäne ist und ob sie zusammen mit der HAN-Domäne, im Falle der Interaktion mit HAN-GATAs, eine funktionelle Einheit bildet. Und wenn ja, welche Aufgabe ihr dabei zukommt.

Im Zusammenhang mit der starken Konservierung der LLM-Domänen B-GATAs bis in das Moos *Physcomitrella* ist auch interessant zu erörtern wie stark ihre Funktion tatsächlich konserviert ist, und ob ein *Physcomitrella*protein Aufgaben in *Arabidopsis* erfüllen und Defekte in *gata*- oder *han*-Mutanten ausgleichen kann. Diesbezüglich wäre ebenfalls aufschlussreich zu erfahren, ob Fusionsproteine von HAN- und LLM-GATAs Aufgaben beider Proteine übernehmen können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Bakterienstämme

Zur Nachzucht der Standard-Plasmide wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm XL1-Blue (*recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F', *proAB*, *lacIqZΔM15*, Tn10 Tet<sup>R</sup>]; Agilent Technologies/Stratagene, Santa Clara, USA) verwendet. Zur Gewinnung der Gateway-Vektoren wurde der *E. coli* Stamm *ccdB* Survival<sup>TM</sup>2 (F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araΔ139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG fhuA::IS2*, Lifetechnologies/Invitrogen, Carlsbad, USA) herangezogen.

#### 4.1.2. Pflanzenlinien und Mutanten

Alle für diese Arbeit generierten Mutantenkombinationen wurden in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotypen Columbia-0 (Col-0) etabliert. Die Insertionslinien *gnc* (SALK\_003995), *gnl* (SALK\_003995) und deren Doppelmutante *gnc gnl* sowie *ga1* (SALK\_109115) wurden zuvor bereits im Labor verwendet und beschrieben (Richter et al., 2010). Alle anderen Insertionslinien der LLM-Domänen B-GATAs wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NAS) bezogen: *GATA15* (SAIL\_618B11 und WiscDsLox471A10), *GATA16* (SALK\_021471), *GATA17* (SALK\_101994 und SALK\_049041) sowie *GATA17L* (SALK\_026798). Aus diesen Linien wurden folgende Mutantenkombinationen neu hergestellt: *GATA15 gata16*, *gata17 gata17l*, *gnc gnl GATA15 gata16* (tripel-Mutante), *gnc gnl GATA15 gata16 gata17 gata17l* (quintupel-Mutante), *ga1 gnc gnl*, *ga1 gnc gnl GATA15 gata16*, *ga1 gnc gnl gata17 gata17l*. Eine Liste der zur Genotypisierung und Analyse der Mutanten verwendeten Primer ist im Abschnitt 4.1.4. aufgelistet. Weiter fanden die Mutanten *phyA phyB* (*phyA-211 phyB-9*) (Reed et al., 1994), *cry1 cry2* (Mockler et al., 1999) und *pifQ* (*pif1 pif3 pif4 pif5*) (Leivar et al., 2008) Einzug in die Untersuchungen. Vergleichende Analysen der Blütenorgane fand außerdem im Hintergrund des Ökotypen Landsberg *erecta* (*Ler-0*) statt: *Ler-0* sowie der *della*-Mutante (*rga-24 gai-t6 rgl1 rgl2 rgl3*), *ga1 della* (*ga1-3 rga-24 gai-t6 rgl1 rgl2 rgl3*) (Koini et al., 2009) und der *ga1-3*. Auch wurde die *ahk2 ahk4* (*ahk2-5 cre1-2*) Mutante hinzugezogen. Letztlich wurden Linien der Überexpressoren von *GNL* aus früheren Studien verwendet (Behringer et al., 2014; Richter et al., 2010).

#### 4.1.3. Proteinnachweis

Zur Detektion der Proteine im Y2H-System wurden die beiden Antikörper α-HA-HRP (Sigma-Aldrich, München) und α-GAL4-BD (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet. Beide Antikörper wurden aus Mäusen gewonnen und dienten zum Nachweis der

Fusionsproteine mit Bindedomäne (BD) beziehungsweise mit der HA-markierten Aktivierungsdomänenproteins (AD). Die Antikörper wurden in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt.

#### 4.1.4. Primer

**Tabelle 1:** Genotypisierungsprimer für die *GATA* Insertionslinien.

Gen (Allel)	Primername	Sequenz (5' - 3')
At3g06740 (SAIL_618B11)	GATA15 LP	ACAAAAATGGCATCAATGAGC
	GATA15 RP	ATGCTAGATCCCACCGAGAA
At5g49300 (SALK_021471)	GATA16 LP	GATAAACATTTTTTCATGCGGG
	GATA16 RP	ACTTGTGCTGATTGTGGAACC
At3g16870 (SALK_101994)	GATA17 LP	TCAAACCTTTGTGGTTGAGGC
	GATA17 RP	TCGCGATCCATTGATTAGATC
At4g16141 (SALK_026798C)	GATA17L LP	CAGCTGGACTTTATTTTGGAGC
	GATA17L RP	TTGTGTGCTTAGCTCTGTTGC
At5g56860 (SALK_001778)	GNC LP	TCTCTGAATCTCCGGCAACC
	GNC RP	CTGATCATCTCCATCTTTCTC
At4g26150 (SALK_003995)	GNL LP	ATGCTAGATCATCGAAATAGATATTG
	GNL RP	TATCTGATGGTGGTTCATCATCAAG
Border Primer SALK	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC
Border Primer SAIL	LB3 (modifiziert)	AATTCATAACCAATCTCGATACAC

**Tabelle 2:** Primer für die semiquantitativen RT-PCR Analysen.

Gen	Primername	Sequenz (5' - 3')
<i>GATA15</i> (At3g06740)	<i>GATA15</i> KO-test ATG	ATGCTAGATCCCACCGAGAA
	<i>GATA15</i> KO-test STOP	TTAAGCATAAACCGGAAGAAGCATAAG
<i>GATA16</i> (At5g49300)	<i>GATA16</i> KO-test ATG	ATGCTAGATCACAGTGAAAAG
	<i>GATA16</i> KO-test STOP	CTAAGCGTAAACAGAGCCATAA
<i>GATA17</i> (At3g16870)	<i>GATA17</i> KO-test ATG	ATGTCTGAGGGATCAGAAGATACG
	<i>GATA17</i> KO-test STOP	TTAGGCGTAAACAGAGCTACAAG
<i>GATA17L</i> (At4g16141)	<i>GATA17L</i> KO-test ATG	ATGTCAATGACGGAAGAAACCAAG
	<i>GATA17L</i> KO-test STOP	TCAACCACAAGAAAGAGCCATGAG
<i>GNC</i> (At5g56860)	<i>GNC</i> LP	TCTCTGAATCTCCGGCAACC
	<i>GNC</i> RP	CTGATCATCTCCATCTTTCTC
<i>GNL</i> (At4g26150)	<i>GNL</i> LP	ATGCTAGATCATCGAAATAGATATTG
	<i>GNL</i> RP	TATCTGATGGTGGTTCATCATCAAG
<i>ACT2</i> (AT3G18780)	RT- <i>ACT2</i> LP	ATTCAGATGCCCGAAGTCTTGTTTC
	RT- <i>ACT2</i> RP	GCAAGTGCTGTGATTTCTTTGCTCA

**Tabelle 3:** Primer für die quantitativen RT-PCR Analysen.

Gen	Primername	Sequenz (5' - 3')
GATA15 (At3g06740)	GATA15 2step KO LP	ATCGAAGAACACAGCAGCAG
	GATA15 2step KO RP	TGGTACCACAAATGGCACA
GATA16 (At5g49300)	GATA16 2step KO LP	GAAGATATGATCGAACAGAACAACA
	GATA16 2step KO RP	TGGTTCCACAATCAGCACA
GATA17 (At3g16870)	GATA17 2step LP	CTCTTTGGCGTGGTGGTC
	GATA17 2step RP	GCAATTGCTTTTTCTGTTCTTCT
GATA17L (At4g16141)	GATA17L 2step KO LP	GTTTAAGGTACCGGCGATGA
	GATA17L 2step KO RP	CTTCCCCAAGTTTCCTCCAT
	GATA17L 2step RP (P2)	GCAATGCGTGTGGTATCAAG
	GATA17L 2step LP (P2)	TCGGCTCTCAAGACCAAGAT
GNC (At5g56860)	GNC 2step LP	GCGTGATTAGGGTTTGTTCG
	GNC 2step RP	CTTTGCCGTATACCACATGC
GNL (At4g26150)	GNL 2step KO-test LP	CCAAGACTCCTCTTTGGAGAA
	GNL 2step KO-test RP	GGCCTTCCTTTGCCTTATTC

**Tabelle 4:** Primer für die qPCR Analysen.

Gen	Primername	Sequenz (5' - 3')
GATA15 (At3g06740)	GATA15 2step LP	GGTACCAGCAAAAACCCCTCT
	GATA15 2step RP	CTGCTTCAACGAGTCACCAA
GATA16 (At5g49300)	GATA16 2step LP	AAACTCCTCTTTGGCGTGGT
	GATA16 2step RP	TCTGTTTCTGATCCCACACG
GATA17 (At3g16870)	GATA17 2step LP	CTCTTTGGCGTGGTGGTC
	GATA17 2step RP	GCAATTGCTTTTTCTGTTCTTCT
GATA17L (At4g16141)	GATA17L 2step LP	GTTTAAGGTACCGGCGATGA
	GATA17L 2step RP	CTTCCCCAAGTTTCCTCCAT
GNC (At5g56860)	GNC 2step LP	GCGTGATTAGGGTTTGTTCG
	GNC 2step RP	CTTTGCCGTATACCACATGC
GNL (At4g26150)	GNL 2step LP	CCATATCTCCCAACCTCTCG
	GNL 2step RP	TGGGCACCATTTGATCACT
GA3OX1 (AT1G15550)	GA3ox1 2step LP	TGCCTTCCAAATCTCAAACC
	GA3ox1 2step RP	ACCGGTGAGAACTCAATGTC
AuxIAA19 (AT3G15540)	AuxIAA19 2step LP	CTATGATGATCTAGCCTTTGC
	AuxIAA19 2step RP	AGAAACATCCCCCAAGGTACA
CKX4 (AT4G29740)	CKX4 2step LP	CACCCACAAGGGTGAATGGTCTC
	CKX4 2step RP	TGCGACTCTTGTGTTGATCGGAGAG
ACT8 (AT1G49240)	ACT8 2step LP	GCAGCATGAAGATTAAGGTCGTG
	ACT8 2step RP	TGTGGACAATGCCTGGACCTGCT
PP2A (AT1G13320)	PP2A 2step LP	GCAGCATGAAGATTAAGGTCGTG
	PP2A 2step RP	TGTGGACAATGCCTGGACCTGCT
ACT2 (AT3G18780)	ACT2 2step LP	TATCGGATGACGATTCTTCGTGCAG
	ACT2 2step RP	GCTTGGTCGACTATCGGAATGAGAG

#### 4.1.5. Vektoren

Zur Klonierung der Konstrukte für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden die Plasmide pGADT7 (GAL4-AD Fusionsvektor, ADH1 Promotor, Amp<sup>R</sup>, Leu<sup>R</sup>) und pGBKT7 (GAL4-BD Fusionsvektor, ADH1 Promotor, Kan<sup>R</sup>, Trp<sup>R</sup>) (Clontech Laboratories/Takara Bio Group, Japan) sowie die GATEWAY-kompatiblen Plasmide p-DEST-DB (Amp<sup>R</sup>) und pDEST-AD (Amp<sup>R</sup>) verwendet (Dreze et al., 2010). Als Donorvektor diente pDONR201 (Gateway DONR, Kan<sup>R</sup>, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sowie die Vektoren pENTRY Sfi (Spec<sup>R</sup>) der Arabidopsis Interactome Mapping Platform/Consortiums (Dreze et al., 2011).

#### 4.1.6. Kits

Zur standardmäßigen Extraktion der RNA wurde das NucleoSpin RNA Plant Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Die Extraktion erfolgte wie im Herstellerprotokoll angegeben, inklusive des DNA-Verdau. Für die Extraktion der RNA der Experimente der Lichtinduktion wurde das RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Mit letzterem wurde zusätzlich das RNase-Free DNase Set von Qiagen für den DNA-Verdau eingesetzt. Die Klonierungen der GATEWAY-Konstrukte erfolgte mit den Enzymen und gemäß den Protokollen der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### 4.1.7. Software für spezielle Anwendungen

Die Phylogenetischen Analysen beruhen auf Sequenzalignierungen des *ClustalW2 alignment tools* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) und *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) des *European Bioinformatics Institute*. Die Berechnung der Stammbäume erfolgte mit MEGA6 (<http://www.megasoftware.net>) und weitere DNA und Protein-Alignierungen wurden mit Hilfe des Programms *Geneious* (Biomatters, Auckland, Neuseeland) erstellt. Des Weiteren wurden *ImageJ* (NIH, Bethesda, USA) und *Adobe CS6* (Adobe Systems, München, Deutschland) verwendet.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Pflanzenarbeiten

#### 4.2.1.1. Sterilisation der Samen

Zur Sterilisation wurden die Samen von *Arabidopsis thaliana* erst 12 Minuten in gesättigter Calciumhydroxidlösung auf einem Drehrad und anschließend eine Minute in 70% Ethanol inkubiert. Danach wurde das Material einige Male mit sterilem Wasser gewaschen. Nach einer Stratifizierungszeit von zwei bis drei Tagen wurden die Samen auf GM (4,3 g/l Murashige & Skoog Medium; 10 g/l Saccharose; 0,5 g/l MES-Monohydrat; 5,5 g/l Agar; pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) oder ½ MS Wachstumsmedium (2,15 g Murashige & Skoog Medium; 0,5 g/l MES-Monohydrat; 6,5 oder 8 g/l Agar; pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) ausplattiert. Zur Kultivierung der Pflanzen auf Erde wurden die Samen nicht sterilisiert, sondern nur in Wasser stratifiziert und anschließend auf Erde ausgebracht.

#### 4.2.1.2. Wachstumsbedingungen

Falls nicht anders angegeben, wurden die Pflanzen bei Langtag-Bedingungen (16h Licht/8h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 100-120  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  Weißlicht angezogen.

### 4.2.2. Physiologische Experimente

#### 4.2.2.1. Keimungsassay

Für die Keimungsassays wurden synchronisierte und für zwei Tage stratifizierte Samen auf ½ MS Medium ohne, beziehungsweise mit 0,1  $\mu\text{M}$  Paclobutrazol (PAC) ausgelegt. Nach dem Transfer der Platten in Dauerlicht (100  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$ ) wurden alle Samen nach 12, 15, 18, 21, 24 und 36 Stunden unter dem Binokular auf die Ruptur der Testa hin untersucht und ausgewertet. Das Ergebnis der jeweiligen Assays spiegelt den Anteil der gekeimten Samen im Verhältnis zur Gesamtanzahl aller Samen wider.

#### 4.2.2.2. Chlorophyllbestimmung

Die Quantifizierung des Chlorophylls wurde mit 14 Tage alten Pflanzen durchgeführt und die Analyse orientierte sich dabei an der bereits beschriebenen Methode von Inskip und Bloom (1985). Alle Pflanzen wuchsen in denselben Bedingungen und der Chlorophyllgehalt wurde relativ zu dem des Wildtyps dargestellt. Die Extraktionen und Quantifizierungen fanden in unabhängigen Durchgängen statt und sind jeweils entsprechend markiert.

#### 4.2.2.3. Hypokotylmessung

Für die Vermessung der Hypokotyle wurden die Keimlinge fünf Tage in verschiedenen Lichtregimen angezogen, die Platten gescannt und mit Hilfe von *ImageJ* vermessen. Die Intensität des Weißlichtes betrug  $80 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$ , die des dunkelroten Lichtes  $0,35 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (schwach) beziehungsweise  $0,6 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (stark), die des roten Lichtes  $7,2 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (schwach) beziehungsweise  $11 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (stark) und die des blauen Lichtes  $4,25 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (schwach) beziehungsweise  $10 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (stark).

Bei den Analysen zur Wirkung von CK auf die Hypokotyle wurden die Keimlinge fünf Tage im Dunklen auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten mit 0,05 bzw. 0,1 mM 6-BA oder Lösungsmittelkontrollmedium ohne CK angezogen und danach wie oben vermessen.

#### 4.2.2.4. Blühzeitpunktbestimmung

Für die Blühzeitpunktanalysen wurden nach einer dreitägigen Stratifikation ca. fünf Samen pro Topf mit einer Pipette direkt auf Erde ausgebracht und überzählige Keimlinge nach fünf Tagen entfernt. Die Pflanzen wuchsen in Langtag-Bedingungen unter  $100 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) oder in Kurztag-Bedingungen unter  $130 \mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  (8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit). Die Pflanzen wurden täglich gesichtet und auf das Erscheinen der Blütenstandknospe (Zeit bis zum Austreiben) und der Bildung der ersten Petalen (Erscheinen der Blütenorgane) untersucht. Nach dem Austreiben wurden zusätzlich für jede Pflanze die Rosettenblätter quantifiziert. Pflanzen mit dem Allel *gal* wurden zu Beginn der Assays wiederholt mit  $10 \mu\text{M GA}_3$  behandelt.

#### 4.2.2.5. Schotenlänge und Samenzahl

Die Schotenlänge sowie die Anzahl der Samen pro Schote wurde von solchen Schoten ermittelt, die in vergleichbaren Regionen der Hauptinfloreszenz von verschiedenen Pflanzen entnommen wurden. Länge und Zahl der Samen wurde nach dem Aufnehmen eines Scannerbildes mit Hilfe von *ImageJ* für jede Schote einzeln bestimmt.

#### 4.2.2.6. Quantifizierung der Blütenorgane

Bei der Quantifizierung der Blütenorgane wurde die Anzahl der Sepalen und Petalen von allen Blüten einer Pflanze erfasst, die vollständig geöffnet waren (Anthese, Stadium 13). Diese Zählungen wurden mehrmals wiederholt, sobald sich an den Pflanzen neue Blüten öffneten. Die Abweichungen in der Anzahl der Blütenorgane wurde für Sepalen  $\neq 4$  sowie Petalen  $\neq 4$  in Prozent der Gesamtblütenanzahl ausgedrückt (n Blüten mit Fehlern/n Gesamtzahl der Blüten).

#### 4.2.2.7. Behandlung mit Licht und Hormonen

Die 10 Tage alten Keimlinge für die Expressionsanalysen wurden vor der Hormonbehandlung vier Stunden in flüssigem Medium inkubiert, bevor zum Start der Behandlung in Medium gelöstes Hormon zugegeben wurde, um die richtigen

Endkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  6-BA (Cytokinin), 100  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> (Gibberellin) und 5  $\mu\text{M}$  2,4-D (Auxin) zu erreichen.

Im Falle der Lichtbehandlung wurden vier Tage alte, dunkel gewachsene Keimlinge den verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt und nach 30, 60, 120 und 180 Minuten je drei biologische Replikate entnommen. Die Normalisierung (Zeitpunkt: 0) erfolgte anhand einer Probe von Keimlingen, die ausschließlich in Dunkelheit gewachsen waren. Die Intensität des dunkelroten Lichtes betrug 0,35  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$ , die des roten Lichtes 7,2  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  und die des blauen Lichtes 4,25  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$ .

#### **4.2.2.8. Bestimmung der Quantenausbeute und des Trockengewichts**

Die Messungen der Quantenausbeute des Photosystems II und des Trockengewichts adulter Pflanzen wurden von Ulrich Lutz im Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem Fluorometer 3500 von Photon System Instruments und die Bilder wurden mit Fluorocam 7.0 analysiert.

#### **4.2.2.9. Wurzelassay**

Für die Wurzelassays zur Analyse der Wirkung von CK auf das Wurzelwachstum, wurden die Pflanzen auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium mit 0,8% Agar angezogen. Zu den Medien wurde das gleiche Volumen DMSO mit unterschiedlichen 6-BA Konzentrationen gegeben, um die Endkonzentrationen von 0, 10, und 100 nM 6-BA zu erhalten. Die Pflanzen wuchsen unter 80  $\mu\text{mol s}^{-2} \text{m}^{-2}$  weißem Dauerlicht. Der Zuwachs der Wurzel vom 4. bis zum 6. Tag wurde anhand gescannter Platten quantifiziert.

#### **4.2.2.10. Callus-Induktionsassay**

Für die Callus-Induktionsassays wurden 11 Tage alte, unter gedimmtem Weißlicht gewachsene Keimlinge von Wurzeln und Keimblättern getrennt und das Hypokotyl zur Callus-Induktion auf Medium ohne oder mit 200 bzw. 1000 ng/ml NAA (1-Naphtylelessigsäure) und 0, 50, 100, 200, 500 oder 1000 ng/ml des Cytokinins Kinetin unter Dauerlicht 25 Tage lang inkubiert. Für die Bilder wurden die Hypokotyle auf neuen Platten angeordnet.

#### **4.2.2.11. Bestimmung der Phyllotaxis**

Die Bestimmung der Winkel aufeinanderfolgender Schoten entlang des Sprosses erfolgte in Anlehnung an eine bereits beschriebene Methode (Besnard et al., 2013; Peaucelle et al., 2007). Dazu wurde eine runde Schablone entwickelt, die entlang der Infloreszenz nach oben bewegt werden konnte und die es erlaubte, die Winkel aufeinanderfolgender Schoten entlang der Wachstumsachse zu messen. Messungen an Pflanzen von zwei unabhängigen Experimenten wurden vereint.

#### **4.2.2.12. Seneszenzassay**

Der Seneszenzassay verlief im Wesentlichen nach bekannten Vorlagen (Richter et al., 2013). Die Blätter 3 und 5 wurden von 21 Tage alten Pflanzen abgelöst und auf die Oberfläche von flüssigem  $\frac{1}{2}$  MS Medium gegeben. Auf diese Weise wurden die Blätter neben Kontrollmedium in Medium mit 0,05 oder 0,1  $\mu\text{M}$  6-BA vier Tage in absoluter Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde Chlorophyll, wie oben beschrieben, extrahiert und quantifiziert. Auch adulte (33 Tage alte) ganze Pflanzen wurden in Dunkelheit überführt, um nach vier Tagen das Chlorophyll A und B beziehungsweise den Proteingehalt mittels Bradford-Analyse zu bestimmen.

#### **4.2.2.13. Untersuchung der Verzweigung**

Zur Analyse des Verzweigungsverhaltens der *gata*-Genmutanten wurden neben der Pflanzenhöhe auch die Zahl der Verzweigungen 1. und 2. Ordnung quantifiziert. Dazu wurden zunächst alle vegetativen Knospen (zum Auswachsen fähigen Knospen) entlang des Sprosses quantifiziert und anschließend alle Verzweigungen am Spross und an der Rosette gezählt, die mindestens 0,5 cm ausgewachsen waren.

### **4.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.3.1. Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Gewinnung von Plasmid DNA wurde eine *E. coli* Kultur in 2 ml Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend pelletiert und in 100  $\mu\text{l}$  Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8) und 10 mM EDTA) aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurden dann 100  $\mu\text{l}$  0,2 N NaOH + 1% SDS gegeben und kurz invertiert. Nun wurden 100  $\mu\text{l}$  eines weiteren Puffers (3 M Natriumacetat pH 4,8) gegeben, gut gemischt und abzentrifugiert. Der Überstand der wässrigen Lösung wurde mit Isopropanol gefällt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in Wasser aufgenommen. Abschließend wurde die DNA-Lösung bei Bedarf mit RNase behandelt.

#### **4.2.3.2. Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen**

Bei der Extraktion der genomischen DNA der Pflanzen wurde frisches Gewebe in einer Kugelmühle zerkleinert und in 300  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer (250 mM NaCl; 200 mM Tris/HCl pH 7,5; 25 mM EDTA (pH 8) und 0,5% SDS) aufgenommen. Nach kurzem Vortexen wurde diese Suspension ca. 25 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 300  $\mu\text{l}$  Phenol-Chloroform (1:1) hinzugegeben und gründlich gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt 13.000 *g* für 10 Minuten wurde die wässrige Phase abgenommen und die darin enthaltene DNA mit gleichen Teilen Isopropanol gefällt. Abschließend wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst.

#### 4.2.3.3. RNA-Extraktion aus Pflanzen

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller. Das Material wurde nach der Homogenisierung und der Zugabe des ersten Puffers optional ein weiteres Mal zentrifugiert, um große Mengen an Debris zu entfernen. Die Zeit des DNA-Verdaus wurde im Falle beider Kits um ca. 5 Minuten verlängert.

#### 4.2.3.4. cDNA Synthese

Für die Übersetzung der RNA in cDNA wurden 2 oder 3 µg RNA in einem Volumen von 10 µl Wasser gelöst und in PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl eines Puffers zugegeben, der die restlichen Komponenten für die Reaktion beinhaltet: 1 µl Wasser; 1 µl oligo-dT-Primer (50 µM Sequenz: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN); 2 µl dNTPs (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 4 µl 5x Reaktionspuffer sowie 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas/Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Diese Lösung wurde in den PCR-Reaktionsgefäßen vorsichtig gemischt und die reverse Transkription in der PCR Maschine bei 37 °C gestartet. Nach 70 Minuten wurde die Reaktion dann für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

#### 4.2.3.5. Semiquantitative (RT) und quantitative (qRT)-PCRs

Um die Transkripte zu bestimmen, wurde die cDNA verdünnt (1:5) und für die semiquantitative (RT) und quantitative (qRT) PCR verwendet. Für die RT-PCRs wurde ein 10 µl PCR-Ansatz mit folgenden Bedingungen gewählt: 0,2 µl Taq-Polymerase (diese Polymerase wurde in unserem Labor hergestellt und besitzt keine Aktivitätsangaben), 2,5 µl PCR Puffer (20 mM Tris-HCl pH8,4; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µl dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 µl Primer (20 µM), 13,8 µl H<sub>2</sub>O und als Template 1 µl cDNA. Für die qRT-PCR diente iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München, Deutschland), wobei 1 µl cDNA (20 ng/µl) in einem 9,4 µl Ansatz verwendet wurde. Von den zwei-Schritt Primern kamen 4,5 pmol zum Einsatz. Die Reaktionen liefen in drei technischen Replikaten in einem CFX96 Real-Time System Cyler von Bio-Rad und wurden mit der Herstellersoftware (CFX Manager 3.1) analysiert und ausgewertet. Das verwendete zwei-Schritt Programm lief wie folgt ab: 3 Minuten 95 °C, dann 40 Zyklen von 95 °C (10 s) - 60 °C (20 s). Jeder Lauf wurde mit einer Schmelzkurve abgeschlossen. Dafür wurden die Proben in 0,5 °C Schritten von 65 °C bis 95 °C vermessen. Jedem Messpunkt in der finalen Abbildung liegen drei biologische Replikate zugrunde. Als Normalisierung dienten *PHOSPHATASE SUBUNIT2A* (*PP2A*; AT1G13320) in dunkelrotem und rotem Licht sowie *ACTIN2* (*ACT2*; AT3G18780) in Blaulicht. Für alle anderen Analysen wurde zur Normalisierung *ACTIN8* (*ACT8*; AT1G49240) verwendet. Alle Primer für die beschriebenen PCR-Läufe sind in Abschnitt 4.1.4 aufgelistet.

#### 4.2.3.6. Standard-PCR Reaktion

Die Zusammensetzung einer Genotypisierungs-PCR bestand aus 0,2 µl Taq-Polymerase (diese Polymerase wurde in unserem Labor hergestellt und besitzt keine Aktivitätsangaben), 2,5 µl PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µl dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 µl Primer (20 µM), 13,8 µl H<sub>2</sub>O und als Template 5 µl der genomischen DNA. Das Programm lief wie folgt ab: 3 Minuten 90 °C, dann 34 Zyklen von 94 °C (60 s) - 60 °C (30 s) - 72 °C (75 s) und abschließend 72 °C (5 min).

#### 4.2.3.7. Klonierungen

Für die Klonierung der Y2H-Konstrukte wurden die Gene *GNC* und *GNL* aus cDNA mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Ein Ansatz enthielt 1 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas/Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA), 10 µl Phusion HF Buffer, 1 µl dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), jeweils 1,25 µl Primer (20 µM), ad 50 µl H<sub>2</sub>O und 1 - 5 µl cDNA. Das Fragment wurde dann in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 inseriert. Dabei kamen jeweils am C-terminalen Ende *EcoRI* und am N-terminalen Ende *Sall* zum Einsatz.

Zur Klonierung der Fragmente von *GNC* und *GNL* diente das bereits vorhandene Vollängenkonstrukt der oben beschriebenen Vektoren. Für diese Konstrukte wurde das GATEWAY-System von Invitrogen (Carlsbad, Californien, USA) verwendet und gemäß den Herstellerangaben verwendet. In Anlehnung an bereits beschriebene Experimente zur Analyse von Proteinfragmenten (Boxem et al., 2008) wurde die Sequenz der Gene in Oligonukleotide von ca. 250 Basenpaaren eingeteilt und unter Berücksichtigung des Leserasters Primer entworfen, die es erlaubten, verschiedene zusammenhängende DNA-Fragmente zu erstellen.

#### 4.2.3.8. Microarray Experimente

Für die Microarray-Analysen kamen 14 Tage alte Keimlinge zum Einsatz. Wie zuvor beschrieben, wurden diese auf ½ MS Platten ausgelegt, welches mit Filterpapier belegt war (To et al., 2004). Nach den 14 Tagen Wachstumszeit unter 100 µmol s<sup>-2</sup> m<sup>-2</sup> konstantem Weißlicht wurde das Filterpapier mit den Pflanzen in flüssiges ½ MS Medium für die Behandlungen überführt.

Insgesamt wurden für jeden Genotyp drei biologische Replikate für 60 Minuten mit Cytokinin (20 µM 6-BA) oder entsprechender Kontrolllösung behandelt, die nur das Lösungsmittel DMSO enthielt. Nach der Extraktion der RNA mit dem NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurden 150 ng der RNA mit Cy3 mittels *Low Input Quick Amp Labeling Protocols* (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) markiert. Die Arrays (V4, design ID 21169, Agilent Technologies) wurden bei 65 °C für 17 Stunden in einer Kammer (Agilent Technologies) hybridisiert. Danach

wurden die Arrays gewaschen und in einem Agilent Micoarrayscanner analysiert. Von allen Proben wurden drei biologische Replikate, wie beschrieben, verarbeitet und in den nachfolgenden Auswertungen vereinigt. Die Kontrolle der RNA erfolgte mit Hilfe des Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Die Rohdaten wurden mit der *Extraction Software* (Version 10.7.3.1; Agilent Technologies) extrahiert und in *GeneSpring GX 12* importiert. Zur Normalisierung wurden die *scale-to-median* und *baseline-to-median* Algorithmen ausgewählt. Die Markierung der RNA, die Hybridisierung und die Extraktion der Rohdaten wurde von Frau Dr. Carina Klermund durchgeführt. Die anschließenden Analysen wurden von ihr angeleitet und von mir ausgeführt.

Nach einer Cluster Analyse wurde eines der Kontroll-Replikate ohne CK-Behandlung der *quintupel*-Mutante von der Analyse ausgeschlossen. Alle anderen Daten wurden dann einer ANOVA-Analyse (P: 0,05) mit einem S-N-K *post hoc* Test unterzogen. Anschließend wurde nach Genen mit einer im Vergleich zum Wildtyp veränderten Expression gefiltert. Die Daten der gesamten Analyse wurde in der GEO (*Gene Expression Omnibus*) hinterlegt und besitzen die Identifikationsnummer: GSE71828 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)).

#### **4.2.4. Biochemische Methoden**

##### **4.2.4.1. Proteinextraktion aus Hefe**

Die Extraktion von Proteinen aus Hefen erfolgte gemäß Kushnirov (2000). Dazu wurde eine frische Hefekolonie gesammelt und in 200 µl 0,2 N NaOH resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension pelletiert und in SDS-Probenpuffer (60 mM Tris HCl (pH 6,8); 5 % Glycerin; 2 % SDS; 4 % β-Mercaptoethanol; 0.0025 % Bromophenol Blau) aufgenommen und im Heizblock drei Minuten bei 98 °C denaturiert und erneut pelletiert. Vom Überstand wurden anschließend 5 - 10 µl auf das SDS-Gel aufgetragen. Um eine Aussage über die Proteinmenge treffen zu können, wurden Übernachtskulturen in der OD (optische Dichte) angeglichen, um vergleichbare Mengen von Hefe einzusetzen.

##### **4.2.4.2. SDS-PAGE**

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Zur besseren Trennung wurden 5 %-ige Sammelgele und 12 %-ige Trenngele kombiniert. Diese wurden aus 30 %-igem Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 hergestellt. Die Läufe fanden in Mini Protean II Zellen (Bio-Rad, München, Deutschland) statt.

##### **4.2.4.3. Coomassie-Färbung**

Zur Überprüfung der geladenen Proteinmenge wurde ein SDS-Gel nach der Elektrophorese mit Coomassie-Lösung (0,25 % Coomassie R-250; 50 % Ethanol; 10 % Essigsäure) gefärbt und mit Entfärber-Lösung (43 % Ethanol; 7 % Essigsäure)

wieder so stark entfärbt, dass die Proteinbanden der verschiedenen Proben verglichen werden konnten.

#### 4.2.4.4. Western-Blot

Zur Proteindetektion im Western-Blot wurden die Proteine von SDS-Gel in einem Semidryblotter (SD) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Übertragung wurde ein SD-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 1,3 mM SDS, pH 8,3 [mittels NaOH eingestellt]) verwendet. Um die Bindung der Antikörper an die Membran zu verringern, wurde diese nach dem Blotten in einem Blockierpuffer (3 % Magermilchpulver in PBS-T [PBS mit 0,5 % Tween-20] auf dem Schüttler inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in PBS-T Puffer gelöst und die Membran darin mindestens eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (ca. 10 Minuten) wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls in PBS-T Puffer gelöst, mindestens 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Detektion erfolgte nach erneuten drei Waschschritten über eine Peroxidasereaktion mittels *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in dem *Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini series* (Fujifilm, Japan).

#### 4.2.4.5. Hefe-Zwei-Hybrid System

Insgesamt wurden in dieser Arbeit verschiedene Kombinationen aus Hefe-2-Hybridstämmen und Vektoren verwendet. Zum einen wurde ein System verwendet, welches auf dem *Matchmaker GAL4 two-hybrid system* von Clontech (Clontech Laboratories/Takara Bio Group, Japan) basiert. Dieses wurde vor allem im Rahmen von gerichteten Interaktionsstudien gebraucht, indem der Hefestamm Y190 (*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-80.1*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *cyh<sup>R2</sup>*, *LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3*, *URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-LacZ*) in einer Doppeltransformation sowohl mit dem *Bait*- als auch mit dem *Prey*-Konstrukt transformiert wurde. Dazu wurde die Hefe in YPD-Medium über Nacht angezogen, geerntet und in 100 µl Lithiumacetat (100 mM) aufgenommen und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 10 µl der zu transformierenden Plasmide zugegeben und zusammen mit 250 µl 40 % PEG (Polyethylenglycol) vorsichtig gemischt und anschließend für ca. 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 35 µl DMSO zugegeben, gemischt und 10 Minuten bei 42 °C im Wasserbad transformiert. Alle Zellen wurden pelletiert, mit sterilem Wasser gewaschen und auf SD-LW Platten (Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan) ausplattiert und bei 30 °C gelagert. Für die Interaktionstests wurde die Hefe mit allen Kontrollen auf entsprechende Auxotrophie-Medien ausgestrichen. Zum Sammeln der Hefezellen wurde maximal bei 1000 g zentrifugiert.

Das zweite System, das in dieser Arbeit zur Anwendung kam, wurde ausführlich beschrieben (Dreze et al., 2010). Im Wesentlichen wurden die AD- und DB-Vektoren

dabei in die Hefestämme Y8800 (MAT a) beziehungsweise Y8900 (MAT a) transformiert und anschließend auf YPD Medium gepaart. Der Genotyp der Hefen lautet: *leu2-3, 112, trp1-901, his3-200, ura3-52, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3 MET2::GAL7-lacZ, cyh2<sup>R</sup>*. Für einen Interaktionstest wurden die Hefen auf YPD-Medium gespottet und über Nacht gepaart. Anschließend wurde die YPD Platten auf Samtstempel abgedrückt und auf die verschiedenen Auxotrophiemedien repliziert. Die Kombination aus diesen Hefestämmen und Plasmiden erlaubt eine zusätzliche Kontrolle und Vermeidung von spontaner Autoaktivierung mutierter BD-Konstrukte. Das Wachstum auf Platten mit Cycloheximid selektiert für Hefen, die nur das BD-Konstrukt tragen und Interaktionstest, in denen diese Hefen zu einem positiven Ergebnis führen, können von der Analyse ausgeschlossen werden.

#### **4.2.5. Zellbiologische Methoden**

##### **4.2.5.1. Konfokalmikroskopie**

Um die Chloroplastenautofluoreszenz zu detektieren, wurden Bilder von Hypokotylen sieben Tage alter Keimlinge unter einem Konfokalmikroskop (FV1000, Olympus, Hamburg, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm gemacht. Die Detektion des Signals erfolgte bei 631-729 nm. In vergleichbaren Bereichen des Hypokotyls wurden von der Epidermis ausgehend nach unten 25 Stapel-Aufnahmen im Abstand von 6 µm gemacht und die Einzelaufnahmen anschließend mit Hilfe des Imaris Bildbearbeitungsprogramms zu einem Bild addiert. Eine Propidium-Iodid Färbung diente zur besseren Unterscheidbarkeit der Zellen und um sicherzustellen, dass lebendes Gewebe mikroskopiert wurde. Letztere ist jedoch in den Abbildungen nicht dargestellt. Das Experiment wurde mehrmals wiederholt und repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

##### **4.2.5.2. Rasterelektronenmikroskopie**

Die Blütenknospen wurden für die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop auf einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Träger eingefroren. Anschließend wurden Bilder mit einem TM-3000 Rasterelektronenmikroskop (Hitachi, Krefeld, Deutschland) aufgenommen.

#### **4.2.6. In silico Analysen**

##### **4.2.6.1. Phylogenetische Analysen**

Die Sequenzen der LLM-Domänen B-GATAs für die phylogenetischen Analysen entstammen der Funktion BioMart der ENSEMBL Datenbank (<http://plants.ensembl.org/index.html>). Die Sequenzen der Transkriptionsfaktoren der verschiedenen Spezies wurden nach GATA Faktoren mit einer LLM-Domäne gefiltert und mit Hilfe des *ClustalW2 tools* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) des *European*

*Bioinformatics Institute* aligniert. Für weitere Analysen wurde auf *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) zurückgegriffen. Zwei der *Brassica rapa* Proteine wurden von der Analyse ausgeschlossen, da für die entsprechenden Gene (Bra037421 und Bra035633) keine ESTs zu finden waren (<http://www.plantgdb.org/BrGDB/>). Die Berechnung der Stammbäume basiert auf einer verkürzten Version der Sequenzalignierung, die den Zink-Finger sowie den C-terminalen Bereich beinhalteten und im Appendix 2 vollständig gezeigt sind. Die Darstellung der Bäume erfolgte mit MEGA6 (<http://www.megasoftware.net>), wobei zur Berechnung die *Neighborjoining* Methode und die *Bootstrap* Methode mit 1000 *Bootstrap* Wiederholungen sowie das *Jones-Taylor-Thornton Model* mit *gaps/missing data treatment* zu paarweiser Deletion gewählt wurde. Die DNA Alignierungen der GATA-DNA-Bindedomäne in Abbildung 3 wurden mit Hilfe des *MUSCLE alignments* des Programms Geneious erstellt.

#### **4.2.6.2. eFP Browser Analysen**

Die Darstellungen der Expressionsmuster der LLM-Domänen B-GATAs basieren auf Abbildungen, die mit dem eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) erstellt wurden. Dazu wurde für die absolute Expression der entsprechenden Gene die Darstellung der *Developmental Map* ausgewählt. Auch wurden die Daten zu Expressionsänderungen nach Auxin-, GA- und CK-Behandlung verwendet. Da der eFP-Browser auf Arraydatensätzen basiert, in denen die Gene *GATA16* und *GATA17L* nicht vorhanden sind, konnte diese Analyse nur für *GNC*, *GNL*, *GATA15* und *GATA17* durchgeführt werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahmad, M., Jarillo, J.A., und Cashmore, A.R.** (1998). Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10, 197–207.
- Akai, S.** (1974). History of plant pathology in Japan. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12, 13–26.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, Á., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R.V., et al.** (2010). Flower development. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 8.
- An, Y., Han, X., Tang, S., Xia, X., und Yin, W.** (2014). Poplar GATA transcription factor PdGNC is capable of regulating chloroplast ultrastructure, photosynthesis, and vegetative growth in Arabidopsis under varying nitrogen levels. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 119, 313–327.
- Argüello, G., García-Hernández, E., Sánchez, M., Gariglio, P., Herrera-Estrella, L., und Simpson, J.** (1992). Characterization of DNA sequences that mediate nuclear protein binding to the regulatory region of the *Pisum sativum* (pea) chlorophyll a/b binding protein gene AB80: identification of a repeated heptamer motif. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2, 301–309.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.-H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J., und Schaller, G.E.** (2008). Type-B Response Regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* 20, 2102–2116.
- Barbosa, I.C., und Schwechheimer, C.** (2014). Dynamic control of auxin transport-dependent growth by AGCVIII protein kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 108–115.
- Bartlett, G.J., Borkakoti, N., und Thornton, J.M.** (2003). Catalysing new reactions during evolution: economy of residues and mechanism. *J. Mol. Biol.* 331, 829–860.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., und Schmulling, T.** (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 69–80.
- Behringer, C., und Schwechheimer, C.** (2015). B-GATA transcription factors - insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Front. Plant Sci.* 6.
- Behringer, C., Bastakis, E., Ranftl, Q.L., Mayer, K.F.X., und Schwechheimer, C.** (2014). Functional Diversification within the family of B-GATA transcription factors through the Leucine-Leucine-Methionine domain. *Plant Physiol.* 166, 293–305.
- Besnard, F., Refahi, Y., Morin, V., Marteaux, B., Brunoud, G., Chambrier, P., Rozier, F., Mirabet, V., Legrand, J., Lainé, S., et al.** (2013). Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* 505, 417–421
- Bhargava, A., Clabaugh, I., To, J.P., Maxwell, B.B., Chiang, Y.-H., Schaller, G.E., Loraine, A., und Kieber, J.J.** (2013). Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in Arabidopsis *Plant Physiol.* 162, 272–294.
- Bi, Y.-M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T., und Rothstein, S.** (2005). Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity: A GATA gene for chlorophyll and glucose sensitivity. *Plant J.* 44, 680–692.
- Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., und Weigel, D.** (1998). Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* 10, 791–800.

- Blümel, M., Dally, N., und Jung, C.** (2015). Flowering time regulation in crops—what did we learn from *Arabidopsis*? *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 121–129.
- Borello, U., Ceccarelli, E., und Giuliano, G.** (1993). Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different I box elements in plant light-regulated promoters. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 4, 611–619.
- Bowen, A.J., Gonzalez, D., Mullins, J.G.L., Bhatt, A.M., Martinez, A., und Conlan, R.S.** (2010). PAH-domain-specific interactions of the *Arabidopsis* transcription coregulator SIN3-LIKE1 (SNL1) with telomere-binding protein 1 and ALWAYS EARLY2 myb-DNA binding factors. *J. Mol. Biol.* 395, 937–949.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., und Smyth, D.R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development* 119, 721–743.
- Boxem, M., Maliga, Z., Klitgord, N., Li, N., Lemmens, I., Mana, M., de Lichtervelde, L., Mul, J.D., van de Peut, D., Devos, M., et al.** (2008). A protein domain-based interactome network for *C. elegans* early embryogenesis. *Cell* 134, 534–545.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L., und Schmülling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* 44, 314–333.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., und Schlattner, U.** (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2763–2788.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.-J., und Liu, D.** (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760–765.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., und Davies, B.** (2012). The TOPLESS Interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158, 423–438.
- Che, P., Lall, S., Nettleton, D., und Howell, S.H.** (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol.* 141, 620–637.
- Cheng, H.** (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055–1064.
- Chiang, Y.-H., Zubo, Y.O., Tapken, W., Kim, H.J., Lavanway, A.M., Howard, L., Pilon, M., Kieber, J.J., und Schaller, G.E.** (2012). Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 332–348.
- Chory, J.** (2010). Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant J.* 61, 982–991.
- Coen, E.S., und Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31–37.
- Daniel-Vedele, F., und Caboche, M.** (1993). A tobacco cDNA clone encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi. *M. Molec. Gen. Genet.* 240, 365–373.
- Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., und Achard, P.** (2014). Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr. Biol.* 24, 1923–1928.
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., et al.** (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20, 1697–1706.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., und Sabatini, S.** (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17, 678–682.

- Ding, L., Yan, S., Jiang, L., Zhao, W., Ning, K., Zhao, J., Liu, X., Zhang, J., Wang, Q., und Zhang, X.** (2015). HANABA TARANU (HAN) bridges meristem and organ primordia boundaries through PINHEAD, JAGGED, BLADE-ON-PETIOLE2 and CYTOKININ OXIDASE 3 during flower development in *Arabidopsis*. *PLOS Genet* 11(9), e1005479.
- Donald E Richards, Kathryn E King, Tahar Ait-ali, and Harberd, und N.P.** (2001). HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 67–88.
- Dreze, M., Monachello, D., Lurin, C., Cusick, M.E., Hill, D.E., Vidal, M., und Braun, P.** (2010). Chapter 12 - High-Quality Binary Interactome Mapping. B.-M. in *Enzymology*, ed. (Academic Press), pp. 281–315.
- Dreze, M., Carvunis, A.-R., Charlotiaux, B., Galli, M., Pevzner, S.J., Tasan, M., Ahn, Y.-Y., Balumuri, P., Barabási, A.-L., Bautista, V., et al.** (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* Interactome Map. *Science* 333, 601–607.
- El-Showk, S., Ruonala, R., und Helariutta, Y.** (2013). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140, 1373–1383.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475–479.
- Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W.T., und Cutler, A.J.** (2011). The *Arabidopsis* C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* 23, 1772–1794.
- Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P., und Crossley, M.** (1998). Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J. Biol. Chem.* 273, 33595–33603.
- Gan, S., und Amasino, R.M.** (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986–1988.
- Gao, J., Chen, Y.-H., und Peterson, L.C.** (2015). GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders. *Exp. Hematol. Oncol.* 4, 28.
- Han, Y., Zhang, C., Yang, H., und Jiao, Y.** (2014). Cytokinin pathway mediates APETALA1 function in the establishment of determinate floral meristems in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6840–6845.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., et al.** (2004). In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 8821–8826.
- Hill, K., Mathews, D.E., Kim, H.J., Street, I.H., Wildes, S.L., Chiang, Y.-H., Mason, M.G., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J., et al.** (2013). Functional characterization of Type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. *Plant Physiol.* 162, 212–224.
- Honma, T., und Goto, K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525–529.
- Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., und Yu, H.** (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* 19, 884–894.
- Hudson, D., Guevara, D., Yaish, M.W., Hannam, C., Long, N., Clarke, J.D., Bi, Y.-M., und Rothstein, S.J.** (2011). GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 6(11), e26765.
- Hudson, D., Guevara, D.R., Hand, A.J., Xu, Z., Hao, L., Chen, X., Zhu, T., Bi, Y.-M., und Rothstein, S.J.** (2013). Rice cytokinin GATA transcription factor1 regulates chloroplast development and plant architecture. *Plant Physiol.* 162, 132–144.

- Hwang, I., Sheen, J., und Müller, B.** (2012). Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 353–380.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., und Kakimoto, T.** (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409, 1060–1063.
- Inskip, W.P. und Bloom, P.R.** (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77, 483–485
- Irish, V.F., und Sussex, I.M.** (1990). Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 2, 741–753.
- Jeong, M.-J., und Shih, M.-C.** (2003). Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 555–562.
- Kagale, S., und Rozwadowski, K.** (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* 6, 141–146.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., und Fankhauser, C.** (2010). Chapter two - light-regulated plant growth and development. In *Current Topics in Developmental Biology*, M.C.P. Timmermans, ed. (Academic Press), pp. 29–66.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., et al.** (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science* 328, 85–89.
- Kebrom, T.H., und Mullet, J.E.** (2016). Transcriptome profiling of tiller buds provides new insights into PhyB regulation of tillering and indeterminate growth in *Sorghum*. *Plant Physiol.* 170, 2232–2250.
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., und Mizuno, T.** (2005). Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His→Asp phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiol.* 46, 339–355.
- Kieffer, M., Master, V., Waites, R., und Davies, B.** (2011). TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. *Plant J.* 68, 147–158.
- Klarmund, C., Ranftl, Q.L., Diener, J., Bastakis, E., Richter, R., und Schwechheimer, C.** (2016). LLM-Domain B-GATA transcription factors promote stomatal development downstream of light signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant Cell* 28, 646–660.
- Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keranen, M., Aro, E.-M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K., et al.** (2012). Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1081–1095.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., und Franklin, K.A.** (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* 19, 408–413.
- Köllmer, I., Werner, T., und Schmölling, T.** (2011). Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and development. *J. Plant Physiol.* 168, 1320–1327.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lam, E., und Chua, N.H.** (1989). ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell* 1, 1147–1156.
- Lee, D.J., Park, J.-Y., Ku, S.-J., Ha, Y.-M., Kim, S., Kim, M.D., Oh, M.-H., und Kim, J.** (2007). Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Mol. Genet. Genomics* 277, 115–137.

- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., und Lohmann, J.U.** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438, 1172–1175.
- Leivar, P., und Monte, E.** (2014). PIFs: systems integrators in plant development. *Plant Cell* 26, 56–78.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., und Quail, P.H.** (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr. Biol.* 18, 1815–1823.
- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K., und Wang, J.** (2008). SOAP: short oligonucleotide program. *Bioinformatics* 24, 713–714.
- Lowry, J.A., und Atchley, W.R.** (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J. Mol. Evol.* 50, 103–115.
- de Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., und Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480–484.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., und Helariutta, Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* 14, 2938–2943.
- Manfield, I.W., Devlin, P.F., Jen, C.-H., Westhead, D.R., und Gilmartin, P.M.** (2006). Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family. *Plant Physiol.* 143, 941–958.
- Mara, C.D., und Irish, V.F.** (2008). Two GATA transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147, 707–718.
- Marín-de la Rosa, N., Pfeiffer, A., Hill, K., Locascio, A., Bhalerao, R.P., Miskolczi, P., Grønlund, A.L., Wanchoo-Kohli, A., Thomas, S.G., Bennett, M.J., et al.** (2015). Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins. *PLOS Genet.* 11, e1005337.
- Martín-Trillo, M., und Cubas, P.** (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15, 31–39.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T., und Steber, C.M.** (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15, 1120–1130.
- Miller, C.O., Skoog, F., Von Saltza, M.H., und Strong, F.M.** (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1392–1392.
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., und Lin, C.** (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126, 2073–2082.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C.B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., und Lee, I.** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35, 613–623.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., und Sabatini, S.** (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Curr. Biol.* 20, 1138–1143.
- Muiño, J.M., Kaufmann, K., van Ham, R.C., Angenent, G.C., und Krajewski, P.** (2011). ChIP-seq analysis in R (CSAR): an R package for the statistical detection of protein-bound genomic regions. *Plant Methods* 7, 11.
- Müller, D., und Leyser, O.** (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.* 107, 1203–1212.

- Naito, T., Kiba, T., Koizumi, N., Yamashino, T., und Mizuno, T.** (2007). Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1557–1560.
- Nawy, T., Bayer, M., Mravec, J., Friml, J., Birnbaum, K.D., und Lukowitz, W.** (2010). The GATA factor HANABA TARANU is required to position the proembryo boundary in the early *Arabidopsis* embryo. *Dev. Cell* 19, 103–113.
- Ohgishi, M., Saji, K., Okada, K., und Sakai, T.** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2223–2228.
- Omichinski, J.G., Clore, G.M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S.J., und Gronenborn, A.M.** (1993). NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261, 438–446.
- Pajoro, A., Madrigal, P., Muiño, J.M., Matus, J.T., Jin, J., Mecchia, M.A., Debernardi, J.M., Palatnik, J.F., Balazadeh, S., Arif, M., et al.** (2014). Dynamics of chromatin accessibility and gene regulation by MADS-domain transcription factors in flower development. *Genome Biol.* 15, R41.
- Peaucelle, A., Morin, H., Traas, J., und Laufs, P.** (2007). Plants expressing a miR164-resistant CUC2 gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in *Arabidopsis*. *Development* 134, 1045–1050.
- Pedmale, U.V., Huang, S.C., Zander, M., Cole, B.J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P.A.B., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J.R., et al.** (2016). Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell* 164, 233–245.
- Pihlajoki, M., Färkkilä, A., Soini, T., Heikinheimo, M., und Wilson, D.B.** (2016). GATA factors in endocrine neoplasia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 421, 2–17.
- Price, J.** (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2128–2150.
- Ranftl, Q.L., Bastakis, E., Klermund, C., und Schwechheimer, C.** (2016). LLM-domain containing B-GATA factors control different aspects of cytokinin-regulated development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 170, 2295–2311.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., und Kieber, J.J.** (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11081–11085.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., und Chory, J.** (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 104, 1139–1149.
- Resentini, F., Felipo-Benavent, A., Colombo, L., Blázquez, M.A., Alabadí, D., und Masiero, S.** (2014). TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 8, 482–485.
- Reyes, J.C.** (2004). The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol.* 134, 1718–1732.
- Richter, R., Behringer, C., Muller, I.K., und Schwechheimer, C.** (2010). The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev.* 24, 2093–2104.
- Richter, R., Bastakis, E., und Schwechheimer, C.** (2013a). Cross-repressive interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162, 1992–2004.
- Richter, R., Behringer, C., Zourelidou, M., und Schwechheimer, C.** (2013b). Convergence of auxin and gibberellin signaling on the regulation of the GATA transcription factors GNC and GNL in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13192–13197.

- Riefler, M.** (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18, 40–54.
- Sakakibara, H., Takei, K., und Hirose, N.** (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.* 11, 440–448.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., und Coupland, G.** (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288, 1613–1616.
- Scaiewicz, A., und Levitt, M.** (2015). The language of the protein universe. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 50–56.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., und Stitt, M.** (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499.
- Schindler, U., und Cashmore, A.R.** (1990). Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins. *EMBO J.* 9, 3415–3427.
- Schwechheimer, C.** (2014). Gibberellin - Mechanism of Action. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0023921]
- Schwechheimer, C., und Willige, B.C.** (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 57–62.
- Shahzad, K., Mittenthal, J.E., und Caetano-Anollés, G.** (2015). The organization of domains in proteins obeys Menzerath-Altmann’s law of language. *BMC Syst. Biol.* 9.
- Shani, E., Yanai, O., und Ori, N.** (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 484–489.
- Steiner, E., Yanai, O., Efroni, I., Ori, N., Eshed, Y., und Weiss, D.S.** (2012a). Class I TCPs modulate cytokinin-induced branching and meristematic activity in tomato. *Plant Signal. Behav.* 7, 807–810.
- Steiner, E., Efroni, I., Gopalraj, M., Saathoff, K., Tseng, T.-S., Kieffer, M., Eshed, Y., Olszewski, N., und Weiss, D.** (2012b). The Arabidopsis O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with Class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell* 24, 96–108.
- Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, K.M., und Steber, C.M.** (2004). Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12771–12776.
- Su, Y.-H., Liu, Y.-B., und Zhang, X.-S.** (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant* 4, 616–625.
- Sulpice, R., Flis, A., Ivakov, A.A., Apelt, F., Krohn, N., Encke, B., Abel, C., Feil, R., Lunn, J.E., und Stitt, M.** (2014). Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. *Mol. Plant* 7, 137–155.
- Tang, H., Woodhouse, M.R., Cheng, F., Schnable, J.C., Pedersen, B.S., Conant, G., Wang, X., Freeling, M., und Pires, J.C.** (2012). Altered patterns of fractionation and exon deletions in *Brassica rapa* support a two-step model of paleohexaploidy. *Genetics* 190, 1563–1574.
- Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F., und Gilmartin, P.M.** (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol. Biol.* 50, 43–56.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., und Palme, K.** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 847–859.

- Terzaghi, W.B., und Cashmore, A.R.** (1995). Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Biol.* 46, 445–474.
- Tjandra, N., Omichinski, J.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., und Bax, A.** (1997). Use of dipolar  $1\text{H}-15\text{N}$  and  $1\text{H}-13\text{C}$  couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 732–738.
- To, J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., und Kieber, J.J.** (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 16, 658–671.
- Trainor, C.D., Ghirlando, R., und Simpson, M.A.** (2000). GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation. *J. Biol. Chem.* 275, 28157–28166.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., und Orkin, S.H.** (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109–119.
- Turnbull, C.G.N., Raymond, M.A.A., Dodd, I.C., und Morris, S.E.** (1997). Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. *Planta* 202, 271–276.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T., Hsing, Y.C., Kitano, H., Yamaguchi, I., et al.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693–698.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., und Matsuoka, M.** (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 183–198.
- Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N.D., Chothia, C., und Teichmann, S.A.** (2004). Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 208–216.
- Wang, L., Kim, J., und Somers, D.E.** (2012). Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 761–766.
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., und Crawford, N.M.** (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136, 2512–2522.
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J.-H., Bancroft, I., Cheng, F., et al.** (2011a). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat. Genet.* 43, 1035–1039.
- Wang, X., Gao, J., Zhu, Z., Dong, X., Wang, X., Ren, G., Zhou, X., und Kuai, B.** (2015). TCP transcription factors are critical for the coordinated regulation of ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 expression in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 82, 151–162.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y.-Q., und Wu, Y.** (2011b). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by downregulating ABI5 expression: The interplay of ABA and cytokinin in Arabidopsis. *Plant J.* 68, 249–261.
- Werner, T., und Schmülling, T.** (2009). Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 527–538.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A., und Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1209–1220.
- Willige, B.C., Ogiso-Tanaka, E., Zourelidou, M., und Schwechheimer, C.** (2012). WAG2 represses apical hook opening downstream from gibberellin and

- PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5. *Development* 139, 4020–4028.
- Yamaguchi, N., Winter, C.M., Wu, M.-F., Kanno, Y., Yamaguchi, A., Seo, M., and Wagner, D.** (2014). Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*. *Science* 344, 638–641.
- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S., and Ahn, J.H.** (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 770–778.
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7827–7832.
- Zhang, C., Hou, Y., Hao, Q., Chen, H., Chen, L., Yuan, S., Shan, Z., Zhang, X., Yang, Z., Qiu, D., et al.** (2015). Genome-wide survey of the soybean GATA transcription factor gene family and expression analysis under low nitrogen stress. *PLoS ONE* 10, e0125174.
- Zhang, X., Zhou, Y., Ding, L., Wu, Z., Liu, R., and Meyerowitz, E.M.** (2013). Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 Family genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 83–101.
- Zhang, Z.-L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.-O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sun, T.** (2011). SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2160–2165.
- Zhao, Y.** (2004). HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2586–2600.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Schwechheimer für die Chance bedanken, an seinem Lehrstuhl eine Doktorarbeit anzufertigen. Die Zusammenarbeit mit ihm war in vielen Bereichen sehr lehrreich.

Bei Herrn Prof. Dr. Hückelhoven möchte ich mich bedanken, dass er sich bereit erklärte meine Arbeit zu evaluieren und Herrn Prof. Dr. Liebl gilt mein Dank dafür, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Von den Leuten aus dem Labor danke ich Manolis nicht nur, weil die Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten super funktionierte und er mit seinen Daten mein Paper bereicherte, sondern auch, weil er durch seine bedingungslos zuversichtliche Art immer eine Motivation war.

Als Teil des GNÜLLER-Teams gilt auch Carina Dank für die gute Zusammenarbeit und die Einführung in die Microarray-Analysen.

Weiterhin möchte ich Inês für die wertvollen Diskussionen und die wichtigen *train talks* von ganzem Herzen danken.

Auch Uli sei gedankt, der immer wichtige Kniffe für viele Analysen parat hatte und ebenso gut für Faxen zu haben war.

Benny möchte ich für eine super Atmosphäre an der *bench* danken, die immer konzentriert, aber dennoch entspannt war. Außerdem war er immer für angeregte Diskussionen über die wichtigen Fragen des Lebens motiviert.

Bei Melina Z. bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre angenehme und ausgeglichene Art im Labor.

Jutta danke ich für die Unterstützung bei vielen, vielen pikierten Keimlingen und PCRs und bei Petra und Rita bedanke ich mich für ihre fröhliche Stimmung und Hilfe in organisatorischen Dingen.

Nina, Lana, Mayra, Hiro, Thomas und allen weiteren Teilnehmern des „*freaky friday*“ danke ich herzlich für die tolle Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt und auf die ich mich uneingeschränkt verlassen kann. Vor allem mein Schwesterchen Stephanie ist immer da, wenn ich sie brauche.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank Judith für viel Verständnis, Geduld und die Versorgung mit Leckereien während der Schreibphase. Gestartet als Kletterpartnerin, ist sie jetzt fester Teil meines Lebens. Auf dass wir in Seilschaft immer sicher verbunden bleiben und die wichtigen Gipfel zusammen erklimmen.

# Appendix

**Appendix 1: Sequenzalignierung der Proteinsequenzen der LLM- und HAN-Domänen B-GATAs.** *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) Alignierung der elf B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana* in voller Proteinlänge, auf dem die Berechnung des Satmmbaums in Abbildung 3 basiert.

```

GATA29  MPELDL LKLSLPNSVTE-----THLTLS PPTTTT
HANL1                                     MMGYQ---TNSNLSMFFSSENDDQNHNYDPYNNFS-----
HANL2                                     MGLSMFFSFP-----ENDVSHHSS-----
HAN      MMQTPYTTSTQQG----YCHSCG-MFHHHSQS CCYNNNNNS---NAGSM-SMVFMQNGGVFEQNGEDYHH-----
GNC      MDSNFHYSLIDNEDQNHHEQPFYPLGSSSS LHHHH----HHHHHVPSN SSSSSS ISS LSSMLPFLIN SQEDQH-VAYNNYHA--DH LHL SQPLKAK
GNL      M:SNFHYSLIDNEDQNH--QPFASLGSS LHHHLQQQQQQQHFFHQA---SSNPSLSMS PSLSMFPFLIN SRQDQVYVGNNTFFHDLVLDTHISQPLETK
GATA23
GATA17
GATA17L
GATA15
GATA16
GATA29  DQGTNVV DGGEV INHRRGLGDDEV LHNELN NNV EFNIRIYN YV FQQ FVGAPN TLFN FAPYMP PPSIPAPAPET PVPVDEYVVIDV--PARRARRNNS TVMT
-----SSTS-----VDQTLSTGTPSFRID-----DH---HRFSSA---NSNN---ISGDY-----LH
HANL2   -----PYAS-----VDQTLSTGTPSFRID-----NEDDERRFSSH---TSD---LIGWDF-----LN
HAN      -----SSSL-----VDQTLSTGTPSFRID-----EEDKRRRSTSS---SGASSCSNFDL-----LH
GNC     --MFVANGGS-----SACDHMVPKKEFRKLL--TIRKKD-----HEDQPHPLHQNPT-KPD--SDSKWMS PKMRLIKK TITNNKQLID
GNL     --NFVSDGGS-----SSSDQMVPKKEFRKLL--TIRKKD-----NHQDQTDLPQSPKI-KDMTGTNSLKWSS-KVRLMKKKK---AIT
GATA23
GATA17
GATA17L
GATA15
GATA16
-----NSWKENATPKRIRGCGG----FCGGRIEGMKKCTNMNCNALNLPWNR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA29  G--GNAKT-----SSYKKGVAHSLPGRGASCDHMSPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
HANL1   -----GSKKGGGGGHNLLAR:GANCDHMSPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
HANL2   -----TKNNSKT----APYNNVPS-----FSANKPSRGCSSGGGGGGGGGDSLLAR:GANCDHMSPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
HAN      QT-NNNNHKS DHYPLN HKTNFDEDDHEDLN FKNV LTRKTTAATENRYNTI--NENGYSNNGVIR:GSDCNMUKPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GNC     TS-DSSKQ-----HTNNDQSSNLSNSE--RQNGY-NNDCVIR:GSDCNMUKPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GNL     -----KLLSCSSY--VSVRMKEEKGTI:GSDC:GSKPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA23  EG-SEDTK-----TKLDS---AGELS DV DNEC SSSG---SGGSSSGDTK:GVDG:GIRPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA17  MT-EETKT-----TKLES---AGDSS DV DNGN C SSSG---SGG---DTK:GVDG:GIRPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA17L ES-MESKL-----TSVDA---IE-----EHSS---SSNEAISNEK:GAT:GSKPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA15  DS-ETMKT-----RAEDM---I-----EQNNTSVN DKK:GADG:GSKPLPWR:GP:SPKSLGNACGTR:RKA
GATA16
GATA29  EERKAKRNVVIVLDD
HANL1   ERATARNLTISGGGSSAAE---VPVENS YNGGNYSHHHYASSS ESWAHQNTQRVPYFSVPPEMEYYPVDNV-----TA
HANL2   ERAS TARNSTSGGSS TAAG---VPTLD-HQASANYNNNQYASSS EWHHQHTQRVPYSPANNE-YSYVDVDR-----V---VDH DVTT
HAN      ERRTAATGN TVVGAAPVQT--DQYGHNSG YNNYHAATNNNNNGTEWAAHHS TQRVPCNYPANEI--RFMDYDGSVANNVE-----SDGAHGG
GNC     RRAAMAAAAAGDQEVAVAPRVQLPLKLLQNKKRSNGGKYNHS PDMVAKAKK---CKIKEEEKEM---EAE TVAGDSEISKSTTSSNSSISSNK
GNL     RRAAMATATATAVSGV---SPPVMKKMQNKNKISNGVYKI--LSLPLKVN T---CKRMITLEETA---L---AEDLE---TQSNSTMLSSDN
GATA23  RES ELLGHIIRSHKSL-----A-----S---KKIN
GATA17  RRAALGMRSEEEKKNRK-----S-----N CNDLNL DHRNAK KYK-----IN I-----VDDGKIDI-----DDDPKICNKRSSSSSNKGV
GATA17L RRAALGIRQDDIKIKSK-----S-----N N L G L E S R N V K T G K E E V N V K I A K-----C E P G I V K I A K G E P G N V K N I K R D P E N S S - S N N N K N V K R V
GATA15  RRLT LISNRSEDKKKSH-----N-----R-----NF-----KFGDSLK
GATA16  RRGTE DNKKLKKSSSG-----G-----G-----NR-----KFGESLK
GATA29  SSFMSWN
HANL1   DPFISWR LNV--ADRT-----GLHDFTM
HANL2   VPFISWR LNV--ADRA-----SLHDFTR
HAN      FCEDDL T--LMSKSSAYQO---VFPQDEKFAAVLLMALS YGMVHG*
GNC     IYEDDLA--LLSKSSAYQO---VFPQDEKFAA L L L M A L S H G M V H G
GNL     --LSSS---SHGGVAV---KRRSLK EEEQAALCLLLLS C S S M L A
GATA23  SKFDDLGFKVPVMKRS AVEKRLWRKLG EEBRAAVLLMALS C S S M - Y A *
GATA17  GRFDDFGFKVPAMKRS AVEKRLWRKLG EEBRAAVLLMALS C G *
GATA17L QRLMELGREVMMQRS TAENQR--RNKLG EEEQAAVLLMALS YASSVYA*
GATA15  QSLMELGIRK---RSTVEKQ--RQKLG EEEQAAVLLMALS YGS M - Y A *
GATA16

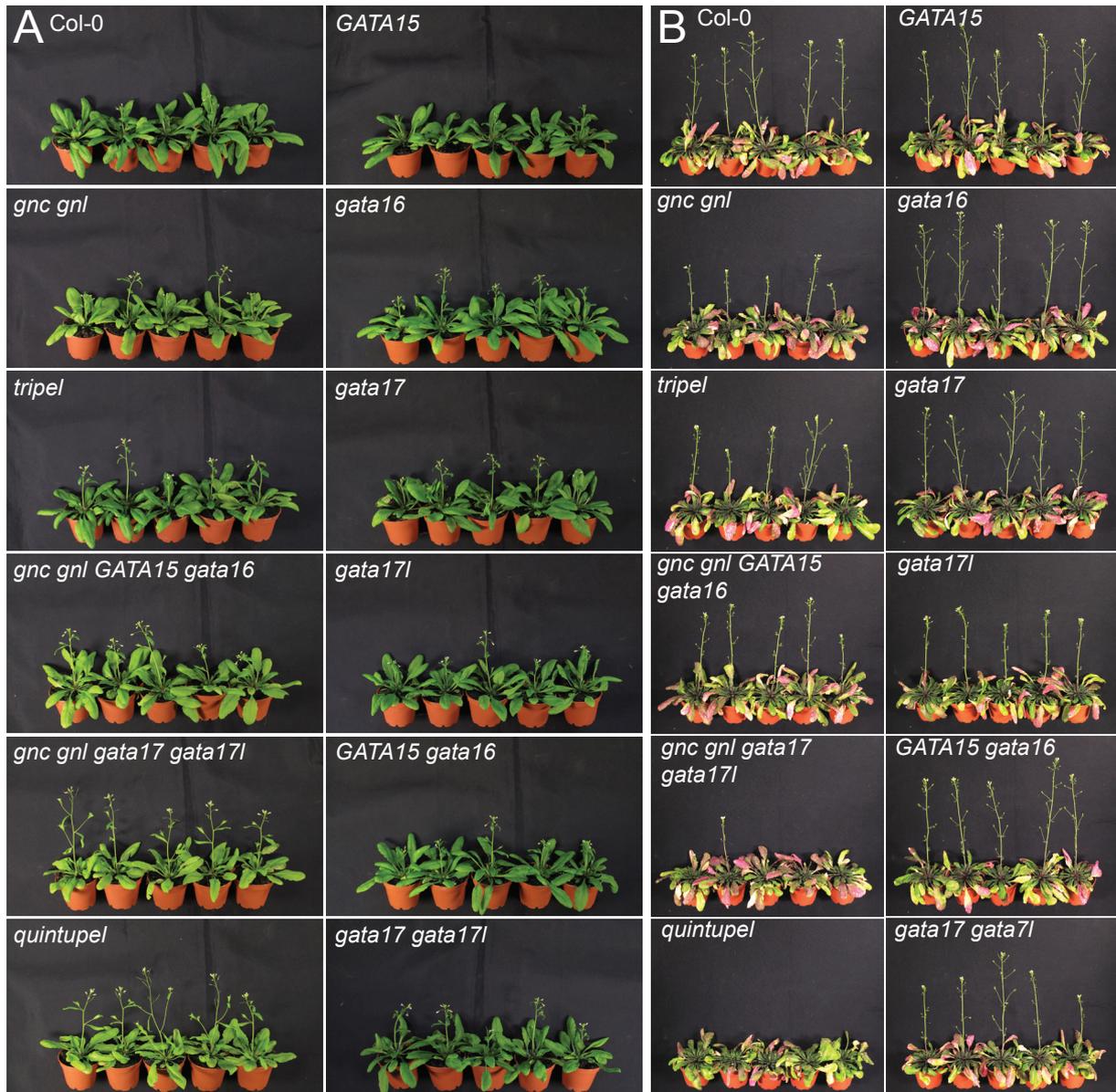
```



**Appendix 3: Sequenzalignierung der Zn<sup>2+</sup>-Finger der LLM- und HAN-Domänen B-GATAs aus *Arabidopsis thaliana* und GATAs von *Physcomitrella patens*.** *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) Alignierung der Zn<sup>2+</sup>-Finger mit Sequenzlogo. Die Berechnung des Stammbaums in Abbildung 7 basiert auf dieser Sequenzalignierung.

AtGATA17 R T C V D C G T I R T P L W R G P A G P K S L C N A C G T R S R R K  
 AtGATA17L K T C V D C G T S R T P L W R G P A G P K S L C N A C G T R S R R K  
 AtGATA15 K S C A I C G T S K T P L W R G P A G P K S L C N A C G T R N R R K  
 AtGATA16 K T C A D C G T S K T P L W R G P V G P K S L C N A C G T R N R R K  
 AtHAN R R C A N C D T T S T P L W R N G P R G P K S L C N A C G T R F K K E  
 AtHANL1 R R C A S C D T T S T P L W R N G P K G P K S L C N A C G T R F K K E  
 AtHANL2 R R C A N C D T T S T P L W R N G P R G P K S L C N A C G T R F K K E  
 AtGNC R V C S D C N T T K T P L W R S G P R G P K S L C N A C G T R Q R R A  
 AtGNL R I C S D C N T T K T P L W R S G P R G P K S L C N A C G T R Q R R A  
 PsGATA4 R V C A H C G T S K T P L W R N G P Q G P K S L C N A C G T R F K K A  
 PpGATA1 H V C A H C G T S K T P L W R N G P G G P K S L C N A C G T R F K K A  
 PsGATA3 R V C A H C G T S K T P L W R N G P G G P K S L C N A C G T R F K K A  
 PsGATA2 R V C A H C G T S K T P L W R N G P G G P K S L C N A C G T R F K K A

**Appendix 4: Bilder von Pflanzen der *gata*-Genmutanten unter Langtag- und Kurztag-Bedingungen.** Zur Verdeutlichung der homogenen Entwicklung sind jeweils fünf Pflanzen der angegebenen Genotypen abgebildet, die entweder **(A)** fünf Wochen unter Langtag-Bedingungen (16h Licht/8h Dunkelheit) oder **(B)** zehn Wochen unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht/16h Dunkelheit) wuchsen.



**Appendix 5: Bilder von Kreuzungen der *gata*-Genmutanten mit *ga1* unter Langtag-Bedingungen.** Zur Verdeutlichung der homogenen Entwicklung sind jeweils fünf Wochen alte Pflanzen dargestellt, die unter Langtag-Bedingungen wuchsen (16h Licht/8h Dunkelheit). Die Pflanzen wurden wiederholt mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  behandelt.



**Appendix 6: Veröffentlichung Ranftl et al. 2016, Plant Physiology.** Abbildungen aus der Veröffentlichung wurden ganz oder teilweise für diese Arbeit verwendet.

## LLM-Domain Containing B-GATA Factors Control Different Aspects of Cytokinin-Regulated Development in *Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup>[OPEN]

Quirin L. Ranftl, Emmanouil Bastakis, Carina Klermund, and Claus Schwechheimer\*

Plant Systems Biology, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Emil-Ramann-Strasse 8, 85354 Freising, Germany (Q.L.R., E.B., C.K., C.S.)

ORCID ID: 0000-0003-0269-2330 (C.S.).

Leu-Leu-Met (LLM)-domain B-GATAs are a subfamily of the 30-membered GATA transcription factor family from *Arabidopsis*. Only two of the six *Arabidopsis* LLM-domain B-GATAs, i.e. GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM-INVOLVED (GNC) and its paralog *GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1* (GNL), have already been analyzed with regard to their biological function. Together, GNC and GNL control germination, greening, flowering time, and senescence downstream from auxin, cytokinin (CK), gibberellin (GA), and light signaling. Whereas overexpression and complementation analyses suggest a redundant biochemical function between GNC and GNL, nothing is known about the biological role of the four other LLM-domain B-GATAs, *GATA15*, *GATA16*, *GATA17*, and *GATA17L* (*GATA17-LIKE*), based on loss-of-function mutant phenotypes. Here, we examine insertion mutants of the six *Arabidopsis* B-GATA genes and reveal the role of these genes in the control of greening, hypocotyl elongation, phyllotaxy, floral organ initiation, accessory meristem formation, flowering time, and senescence. Several of these phenotypes had previously not been described for the *gnc* and *gnl* mutants or were enhanced in the more complex mutants when compared to *gnc gnl* mutants. Some of the respective responses may be mediated by CK signaling, which activates the expression of all six GATA genes. CK-induced gene expression is partially compromised in LLM-domain B-GATA mutants, suggesting that B-GATA genes play a role in CK responses. We furthermore provide evidence for a transcriptional cross regulation between these GATAs that may, in at least some cases, be at the basis of their apparent functional redundancy.

Transcription factors of the GATA family contain a type IV zinc-finger DNA-binding domain (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17-20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C), which is predicted to bind the consensus DNA sequence WGATAR (where W is T, or A and R is G or A) (Reyes et al., 2004). The genomes of higher plants encode approximately 30 GATA transcription factors, which are classified as A-, B-, C-, and D-GATAs according to their primary amino-acid sequence, the conservation of their GATA DNA-binding domains, the conservation of protein domains outside

of the GATA DNA-binding domain, and their exon-intron structures (Reyes et al., 2004). We recently showed that the *Arabidopsis* B-GATAs can be further subdivided into two structural subfamilies with either a HANABA TARANU (HAN)- or a Leu-Leu-Met (LLM)-domain located N- or C-terminally of the GATA DNA-binding domain (Behringer et al., 2014; Behringer and Schwechheimer, 2015). The HAN-domain was initially identified as a conserved domain in the floral morphology regulator HAN (Zhao et al., 2004; Nawy et al., 2010; Zhang et al., 2013); the LLM-domain was named after the invariant LLM motif in the conserved C terminus of the respective B-GATAs (Richter et al., 2010; Behringer et al., 2014).

A recent comparative analysis of B-GATAs from *Arabidopsis*, *Solanum lycopersicon* (tomato), *Hordeum vulgare* (barley), and *Brachipodium distachyon* (*Brachipodium*) revealed that HAN-domain and LLM-domain B-GATAs have different biological and biochemical activities: the expression of HAN-domain B-GATAs under the control of an LLM-domain B-GATA promoter could not complement LLM-domain B-GATA loss-of-function mutants and the overexpression of HAN- and LLM-domain B-GATAs in *Arabidopsis* differentially affected plant growth (Behringer et al., 2014; Behringer and Schwechheimer, 2015). The existence of the *Brassicaceae*-specific *GATA23*, which has a degenerate LLM-domain, as well as the existence of monocot-specific HAN-domain

<sup>1</sup> This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to C.S. (nos. SCHW751/9-1 and SCHW751/10-1 in the SPP1530). C.S. thanks the Nirit and Michael Shaoul Fund for Visiting Scholars and Fellows for financial support during manuscript preparation.

\* Corresponding author: claus.schwechheimer@wzw.tum.de.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Claus Schwechheimer ([claus.schwechheimer@wzw.tum.de](mailto:claus.schwechheimer@wzw.tum.de)).

Q.L.R. and C.S. designed all experiments and wrote the paper; Q.L.R. performed all experiments and data analysis apart from the microarray and the ChIP-seq analyses; Q.L.R. and C.K. performed and analyzed the microarray experiment; E.B. and C.S. designed the ChIP-seq experiment; and E.B. performed and analyzed the ChIP-seq experiment.

<sup>[OPEN]</sup>Articles can be viewed without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01556](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01556)

*Plant Physiology*<sup>®</sup>, April 2016, Vol. 170, pp. 2295–2311, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org) © 2016 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved. 2295

Downloaded from [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org) on March 30, 2016 - Published by [www.plant.org](http://www.plant.org)  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Ranftl et al.

B-GATAs, reveal that expansions of the B-GATA family have been used during plant evolution to control specific aspects of plant development (De Rybel et al., 2010; Whipple et al., 2010; Behringer and Schwechheimer, 2015).

The Arabidopsis LLM-domain B-GATA family is comprised of GATA15, GATA16, GATA17, and GATA17L (GATA17-LIKE) as well as GNC (GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM-INVOLVED; GATA21; hitherto GNC) and GNL (GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1; hitherto GNL) (Behringer et al., 2014; Behringer and Schwechheimer, 2015). Among these, the paralogous GNC and GNL are already well characterized with regard to their biological function and their upstream regulation: *gnc* and *gnc gnl* mutants are defective in greening and chloroplast biogenesis, and they germinate and flower slightly earlier than the wild type (Bi et al., 2005; Richter et al., 2010; 2013a,b; Chiang et al., 2012). Conversely, overexpression of the two GATAs results in a strong increase in chlorophyll accumulation and delayed germination and flowering (Richter et al., 2010; 2013a,b; Behringer et al., 2014). In addition, GNC and GNL overexpression promotes hypocotyl elongation in light-grown seedlings, alterations in leaf shape, and an increased angle between the primary and lateral inflorescences (Behringer et al., 2014). Importantly, deletion or mutation of the LLM-domain of GNC or GNL compromises some but not all phenotypes when these deletion or mutant variants are overexpressed in Arabidopsis and the effects of the overexpression transgenes are compared to the effects of the overexpression of the wild-type proteins (Behringer et al., 2014). The fact that the overexpression of every LLM-domain B-GATA factor tested to date results in highly comparable phenotypes, suggested that LLM-domain B-GATAs have conserved biochemical functions (Behringer et al., 2014).

A range of studies have already addressed the upstream signaling pathways controlling GNC and GNL expression: GNC was initially identified as a nitrate-inducible gene with an apparent role in the control of greening (Bi et al., 2005). GNL was originally identified based on its strong CK- (cytokinin)-regulated gene expression and therefore designated CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1 (Naito et al., 2007). The expression of GNC and GNL is also controlled by the DELLA regulators of the GA signaling pathway as well as by the light-labile PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) of the phytochrome signaling pathway, which are themselves negatively regulated by DELLAs (Richter et al., 2010; Leivar and Monte, 2014). Furthermore, the auxin signaling regulators AUXIN RESPONSE FACTOR2 and AUXIN RESPONSE FACTOR7, the flowering regulator SUPPRESSOR-OF-OVEREXPRESSION-OF-CONSTANS1, and the floral development regulators APETALA3 and PISTILLATA have been implicated in GNC and GNL transcription control (Mara and Irish, 2008; Richter et al., 2010; 2013a,b). Thus, multiple signaling pathways converge on GNC and GNL expression and the two genes control a broad range of developmental responses in plants.

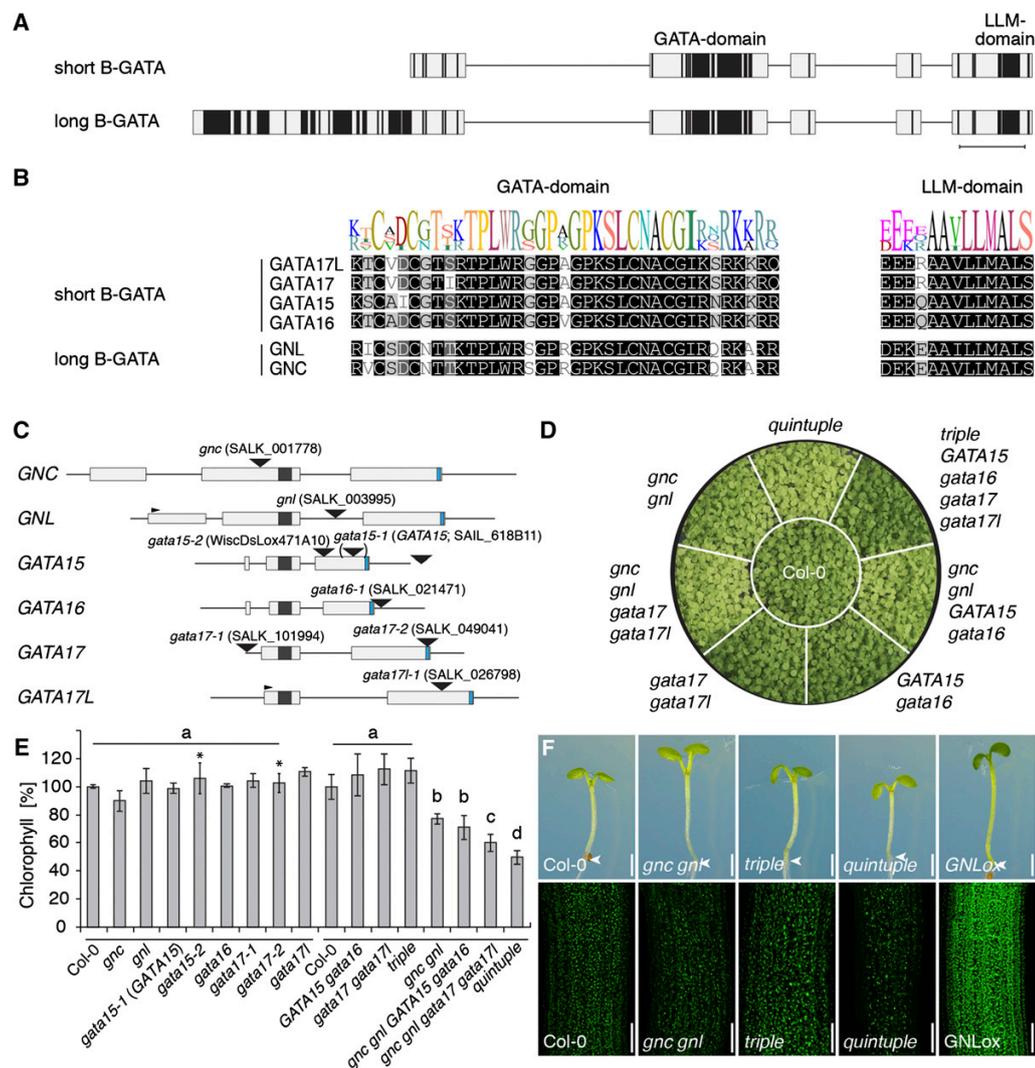
To date, nothing is known about the regulation and biological function of the four Arabidopsis LLM-domain B-GATAs, e.g. GATA15, GATA16, GATA17, and GATA17L. Here, we examine the entire LLM-domain B-GATA gene family through the analysis of single gene insertion mutants and a range of mutant combinations. These analyses reveal mainly overlapping roles for these B-GATAs in the control of previously known B-GATA-regulated processes such as greening, hypocotyl elongation, flowering time, and senescence, but they also reveal previously unknown functions of LLM-domain B-GATAs in phyllotactic patterning, floral organ initiation, and accessory meristem formation. Several of these responses may be mediated by CK signaling and CK treatments induce the expression of all six GATA genes. CK-induced gene expression is partially compromised in LLM-domain B-GATA mutants, suggesting that B-GATA genes play a role in CK responses. Furthermore, we provide evidence for a cross regulation of the different LLM-domain B-GATA genes at the transcriptional level.

## RESULTS

### Evolutionary Conservation of the LLM-Domain B-GATAs within the Brassicaceae

The Arabidopsis genome encodes six LLM-domain GATA transcription factors, namely GNC (AtGATA21), GNL (AtGATA22), GATA15 (AtGATA15), GATA16 (AtGATA16), GATA17 (AtGATA17), and GATA17L (AtGATA17-LIKE) (Behringer et al., 2014; Behringer and Schwechheimer, 2015). Phylogenetic analyses showed that these proteins can be grouped into three pairs of highly homologous proteins comprised of the, with regard to the length of their N termini, long B-GATAs GNC and GNL and the short B-GATAs GATA15 and GATA16 as well as GATA17 and GATA17L, respectively (Fig. 1, A and B; Supplemental Fig. S1; Behringer et al., 2014; Behringer and Schwechheimer, 2015). It had previously become apparent that the respective subfamilies of long and short B-GATAs were conserved in different plant species but that gene duplications in individual subfamilies may have led to a differential expansion of these subfamilies in different species (Behringer et al., 2014). To gain an insight into the conservation of these GATAs within the family of Brassicaceae, we searched for LLM-domain B-GATAs in the fully sequenced genomes of *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Eutrema salsugineum*, and *Brassica rapa*. We retrieved orthologs for each of the six Arabidopsis B-GATAs within each Brassicaceae species (Supplemental Figs. S1 and S2). Whereas the *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, and *Eutrema salsugineum* genomes contained exactly one apparent ortholog for each of the six Arabidopsis genes, the *Brassica rapa* genome, known to have undergone hexaploidization followed by genome fractionation, retained at least two orthologs each for GNC, GNL, GATA17, and GATA17L and one ortholog of GATA15

## LLM-Domain B-GATAs



**Figure 1.** LLM-domain B-GATAs redundantly control greening in Arabidopsis. **A**, Domain architecture of short and long LLM-domain B-GATAs based on the alignment of family members from *Arabidopsis*. Protein regions with restricted sequence conservation or gaps in the alignment are depicted as lines; regions with low ( $\leq 50\%$ ) sequence similarity, gray boxes; regions with high ( $\geq 80\%$ ) sequence similarity, black boxes. Scale bar = 30 amino acids in a conserved part of the protein. **B**, MUSCLE alignment with sequence logo of the B-GATA domain and the LLM-domain of the Arabidopsis LLM-domain B-GATAs. **C**, Schematic representation of the gene models of the six Arabidopsis LLM-domain B-GATA genes with exons (boxes) and introns (lines). The 5'-UTR (untranslated region) of GNL and the 3'-UTR of *GATA16* were previously unknown and derived from RNA sequencing data available in the laboratory. The sequences coding for the GATA DNA-binding domain and the LLM-domain are represented as black and blue boxes, respectively. The T-DNA insertion positions are shown. The position in brackets of the *GATA15* insertion refers to the original misannotation of this insertion ([www.signal.salk.edu](http://www.signal.salk.edu)). **D**, Photograph of 14-d-old plants with the genotypes as specified in comparison to the Columbia-0 (Col-0) wild-type control. **E**, Result of the quantification of chlorophyll A and B from different *gata* single and complex mutants. The experiment was performed in two rounds, as indicated by the lines above the genotypes, to reduce the complexity of the experiment; the Col-0 wild-type reference was included in both rounds. **F**, Representative photographs of 7-d-old seedlings (top panel) and confocal images (bottom panel) of these seedlings to visualize differential chloroplast accumulation in these mutants.

and *GATA16* (Supplemental Figs. S1 and S2; Wang et al., 2011; Tang et al., 2012). In summary, we concluded that the six LLM-domain B-GATAs are conserved

in the different *Brassicaceae* examined here, and that four members of the gene family were present in multiple copies in *Brassica rapa*.

Ranftl et al.

### Characterization of Insertion Mutants of the Six LLM-Domain B-GATA Genes

All previously published genetic analyses of the LLM-domain B-GATAs genes from Arabidopsis focused on *GNC* and *GNL* (Behringer and Schwechheimer, 2015). As yet, no mutants have been described for the remaining four LLM-domain B-GATAs and their biological function remains elusive. We therefore identified homozygous lines of T-DNA insertion mutants for each of the six genes (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3) and subsequently analyzed these lines with regard to the effects of the respective mutations on gene expression using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and semi-qRT-PCR (Supplemental Fig. S3B): The analysis of the *gnc* allele (Salk\_001778), which had already been used in several publications, suggested that neither the full-length transcript nor regions downstream from the insertion site were transcribed (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B) (Richter et al., 2010; Bi et al., 2005). Similarly, analyses of the *gnl* insertion mutant (Salk\_003995) using primers spanning the entire transcript or flanking the T-DNA harbored in the intron suggested that the *GNL* full-length transcript was absent (Fig. 1C; Supplemental Figure S3B) (Bi et al., 2005; Richter et al., 2010). Although one of the selected *GATA15* insertion alleles (*gata15-1*, SAIL\_618\_B11) was annotated as an in-gene insertion (www.signal.salk.edu), we found no evidence for a change of *GATA15* gene expression in the homozygous insertion line (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). Sequencing of the insertion site then revealed that the insertion was downstream from the gene's 3'-UTR (untranslated region), indicating that the *GATA15* gene was intact in SAIL\_618\_B11 (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). The analysis of a second allele (*gata15-2*, WiscDsLox471A10) with an exon-insertion revealed a strong down-regulation of *GATA15* expression in both RT-PCR analyses (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). In a *GATA16* allele with a T-DNA insertion in the gene's 3'-UTR (*gata16-1*, Salk\_021471), transcript abundance was partially reduced (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). The abundance of *GATA17* was also partially reduced in Salk\_101994 (*gata17-1*), which harbored a T-DNA insertion in the gene's 5'-UTR and was strongly reduced in SALK\_049041 (*gata17-2*), which carried an insertion in the LLM-domain-encoding gene region (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). Finally, we detected no transcript in our analyses of a *GATA17L* exon insertion allele (*gata17l-1*, Salk\_026798) when using primer pairs spanning the insertion or located downstream from the insertion site (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). When analyzing this allele with a primer combination upstream of the insertion, we were able to detect residual transcript in *gata17l-1* but judged that this may not give rise to a fully functional protein since the insertion was upstream of the LLM-domain (Fig. 1C; Supplemental Fig. S3B). We concluded that the expression of the respective *GATA* genes was absent or at least strongly reduced in alleles for *GNC* (*gnc*), *GNL* (*gnl*), *GATA15* (*gata15-2*), *GATA17* (*gata17-2*), and *GATA17L* (*gata17l-1*) alleles. The *gata16-1* and *gata17-1* alleles were only partially impaired in the

expression of the respective genes whereas the *gata15-1* allele was not affected in *GATA15* expression. The *gata15-2* and *gata17-2* alleles became available to us only later in this study and, for strategic reasons, could not be included in the generation of the complex mutant combinations described below. Any of the phenotypes described in the following sections for the more complex mutant combinations were not apparent in the *gata15-2* and *gata17-2* single mutants. We, therefore, exclude the possibility that these genes are by themselves responsible for any of the phenotypes described here for the higher-order mutants.

### LLM-Domain B-GATAs Redundantly Control Greening

We did not observe any obvious defects in the *gata* single mutants apart from the already well-documented defects in greening of the *gnc* mutants (Bi et al., 2005; Richter et al., 2010; Chiang et al., 2012). To generate higher-order mutants in the closely related B-GATA genes, we combined the alleles *gnc*, *gnl*, *gata15-1*, *gata16-1*, *gata17-1*, and *gata17l-1*. For simplicity, we will subsequently omit the respective allele numbers. Since the presence of the misannotated *gata15-1* mutation does not provide information about the loss of *GATA15*, we refer to this allele as *GATA15*.

Through genetic crosses, we obtained *gata17 gata17l* double mutants, *GATA15 gata16 gata17 gata17l*, *gnc gnl GATA15 gata16*, and *gnc gnl gata17 gata17l* triple and quadruple mutants as well as a *gnc gnl GATA15 gata16 gata17 gata17l* quintuple mutant. In the following, we will refer to the *gata* quintuple mutant as the *quintuple* mutant and to the *GATA15 gata16 gata17 gata17l* triple mutant that does not include the *gnc* and *gnl* alleles as the (complementary) *triple* mutant. In all other cases, we will specify the allele combinations.

To examine a possible redundant function among the B-GATAs in the control of greening, we analyzed greening and chlorophyll content in 14-d-old light-grown *gata* mutant plants (Fig. 1, D and E). Although there was no indication for a defect in greening in *gata17 gata17l* or in the *triple* mutant, we found that the greening defect of *gnc gnl* was further enhanced in the *gnc gnl gata17 gata17l* quadruple mutant and even more in the *quintuple* mutant (Fig. 1, D and E). At the same time, greening defects were not obvious in any of the *gata* single mutants (Fig. 1E). In the case of the *gata15* and *gata17* alleles, this was not due to the fact that weak alleles had been chosen for the complex mutants because also the severe alleles *gata15-2* and *gata17-2* showed no reduction in chlorophyll levels when compared to the wild type (Fig. 1E).

The further reduction in chlorophyll accumulation in the *quintuple* mutant was also apparent when we analyzed chlorophyll abundance by fluorescence microscopy; here, we found reduced chloroplast fluorescence when comparing the *quintuple* mutant to *gnc gnl* (Fig. 1F). Furthermore, we noted that the greening defect gradually disappeared in *gnc gnl* mutants after the

2298

Plant Physiol. Vol. 170, 2016

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 30, 2016 - Published by www.plant.org  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

seedling stage; however, it remained apparent in the *quintuple* mutants in adult plants (Supplemental Fig. S4). Taken together, this suggested that all mutated *GATA* genes participate in the control of greening and chlorophyll accumulation and that the defects of mutants defective in only a single gene may be suppressed by the presence of the other family members.

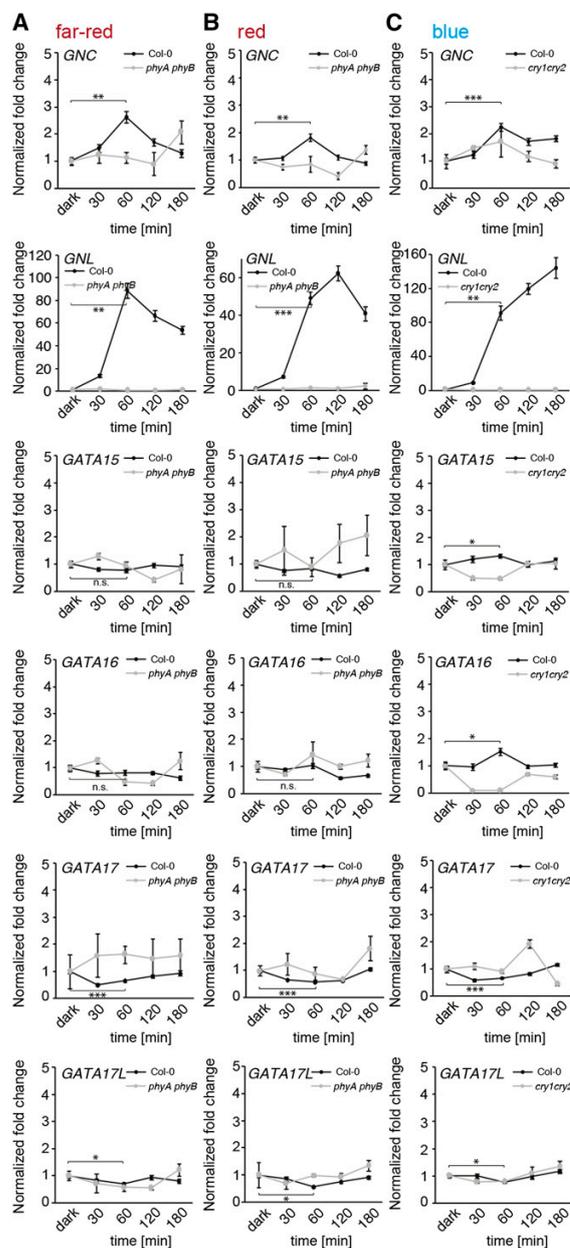
### Gene Expression Regulation of the LLM-Domain B-GATAs

*GNC* and *GNL* had been in the focus of several studies based on the strong regulation of their gene expression by light and CK (Bi et al., 2005; Naito et al., 2007; Richter et al., 2010, 2013a,b). We were therefore interested in evaluating to what extent light and CK regulate the expression of the other *GATA* genes. In the case of light regulation, we found that far-red, red, and blue light strongly induced the expression of *GNL*, and to some extent the expression of *GNC* (Fig. 2). In blue light, we noted a subtle but significant induction of *GATA15* and *GATA16* (Fig. 2C). Importantly, this regulation was not observed in the red and far-red light receptor mutant *phyA phyB* or in the blue light receptor mutant *cry1 cry2* (Fig. 2). Furthermore, light-induced gene expression changes in red light were impaired in the quadruple mutant for the *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR* (PIF) genes *PIF1*, *PIF3*, *PIF4*, and *PIF5* (*pifq*), indicating that the light-dependent regulation in red light was mediated by the phytochrome and PIF signaling pathways (Supplemental Fig. S5; Leivar et al., 2008).

The CK experiments indicated that CK induces the expression of all six *GATA* genes (Fig. 3). With an approximately 3-fold increase in transcript abundance, this induction was strongest for *GNL* but could be observed for each of the other *GATA* genes after a one-to-four h CK treatment (Fig. 3). Thus, CK promotes the expression of all six LLM-domain B-GATAs.

### Mutants of LLM-Domain B-GATAs Are Impaired in Hypocotyl Elongation

Due to the strong regulation particularly of *GNL* but also of *GNC* in far-red, red, and blue light conditions, we examined the contribution of the *GATA* genes to hypocotyl elongation by analyzing mutant seedlings in the different light conditions in two different light intensities (Fig. 4). Here, we found that *quintuple* mutant seedlings had a shorter hypocotyl than wild-type seedlings in white light as well as in red, far-red, and blue light (Fig. 4). Notably these phenotypes were not apparent, or at least not significant, in the *gnc gnl* double mutant or the *triple* mutant, suggesting that the respective other *GATA* genes may contribute to the hypocotyl elongation phenotype in these backgrounds (Fig. 4). At the same time, hypocotyl length of dark-grown mutant seedlings was indistinguishable in all



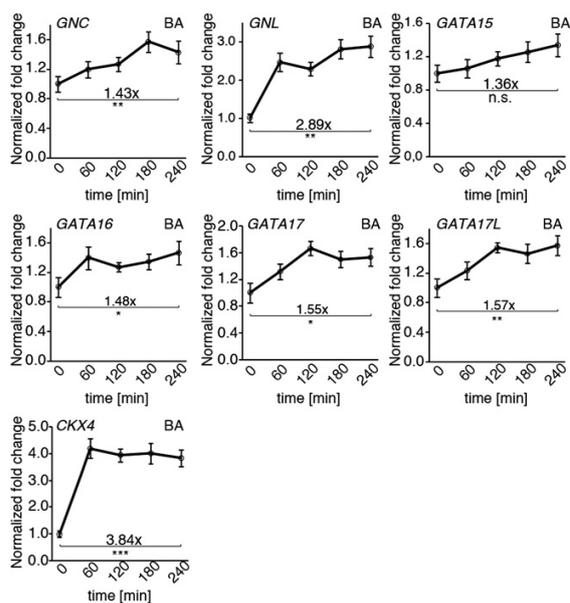
**Figure 2.** *GATA* gene expression in far-red, red, and blue light conditions. A, B, C, Averages and ses of three replicate qRT-PCR analyses of 4-d-old dark-grown seedlings after transfer to (A) far-red ( $0.35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), (B) red ( $7.2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), and (C) blue light ( $4.25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). The *phyA phyB* and *cry1 cry2* light receptor mutants were used to control the specificity of the respective treatment, and to control for background gene expression. Gene expression data were normalized to the transcript abundance detected in the dark sample of the respective genotype. Student's *t* test for selected time points: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s. = not significant.

Ranftl et al.

genotypes from that observed in the wild type (Fig. 4, E and G). The short hypocotyl phenotype of the *GATA* gene mutants was also interesting because we previously observed that the LLM-domain B-GATA overexpressors had a longer hypocotyl than the wild type when grown in white light (Behringer et al., 2014). When analyzed in the different light conditions, we found the long hypocotyl phenotype of the *GNL* overexpression line (*GNLox*) was also present in far-red and blue light but interestingly not in red light, where hypocotyls were even shorter than in the wild type or the mutants when grown in weak red light conditions (Fig. 4).

### GATA Gene Mutants Have Differential Gene Expression Defects

The strong induction of *GNL* gene expression by CK was already repeatedly described and is the reason for the gene's original designation GNC-LIKE/CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR1 (Naito et al., 2007; Köllmer et al., 2011). In order to examine the role of the *GATA* genes in CK-responsive gene expression, we performed microarray experiments with 14-d-old wild-type plants, *gnc gnl* and *triple* mutants as well as *quintuple* mutants treated for 60 min with the CK 6-benzylaminopurine



**Figure 3.** *GATA* gene expression is induced by cytokinin. Averages and ses of three replicate qRT-PCR analyses of 10-d-old seedlings that had been treated for the times indicated with 10  $\mu$ M 6-BA. Expression changes for *CKX4* are shown to verify the effectiveness of the hormone treatment. The expression values for each time point were normalized to those of an untreated mock sample. The fold change is shown relative to time point 0, which was set to 1. Student's *t* test for selected time points: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s. = not significant.

(6-BA) or a corresponding mock solvent control (Figs. 5 and 6; Supplemental Tables S1 and S2). We then analyzed the resulting data with regard to differences in basal gene expression (Fig. 5) and with regard to gene expression differences after the CK treatment in comparison to the mock control (Fig. 6). For technical reasons, the experiment was conducted in two rounds. The first experiment included the Col-0 (1) wild-type control, the *gnc gnl* double mutant, and the *quintuple* mutant; the second experiment included an independent Col-0 (2) wild-type control and the *triple* mutant. When we examined the expression of the CK-induced *A-TYPE RESPONSE REGULATORS* of the CK signaling pathway, we could confirm that the respective CK induction experiments were comparably efficient between the two experiments and in all genotypes tested (Supplemental Fig. S6A). We also examined the microarray dataset with regard to the expression of a previously defined so-called "golden list" of CK-regulated genes (Bhargava et al., 2013). Greater than 70% of the 331 entities derived from this list were significantly CK-regulated in our experiments (Supplemental Table S3). When applying a 2-fold expression change as additional filter criterion, 71 of these 331 entities were identified as up-regulated (Col-0 1 and Col-0 2), and 39 (Col-0 1) and 25 entities (Col-0 2) as down-regulated after CK treatment (Supplemental Fig. S6B; Supplemental Table S3). We thus concluded that the CK treatments in both experiments were similarly efficient and that the data sets could be used for comparative analyses.

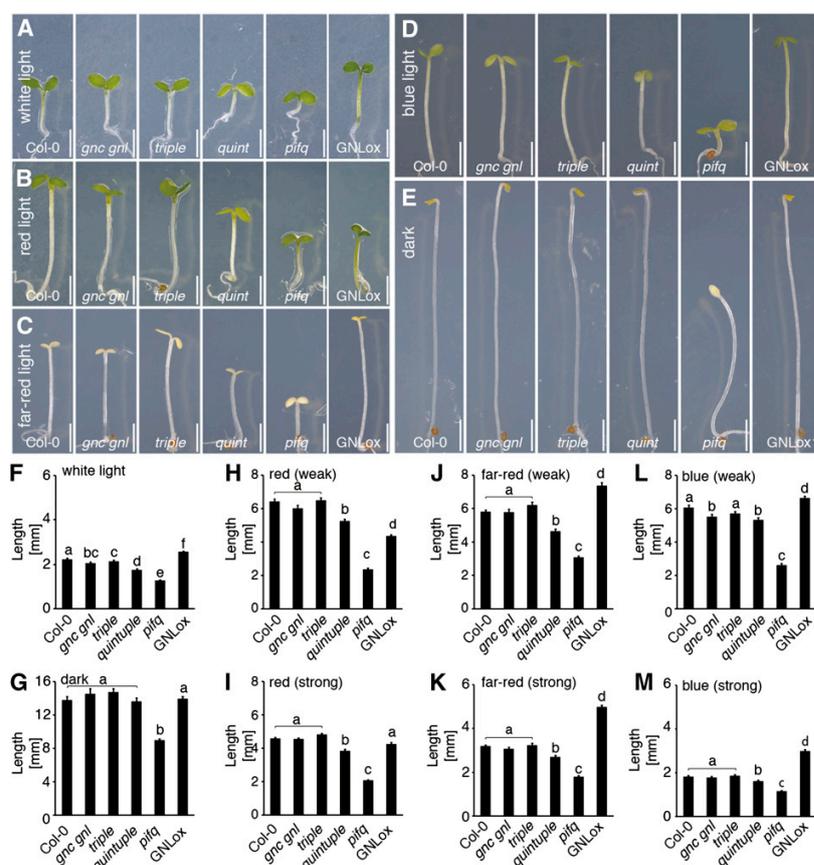
The comparison of the basal gene expression profiles of the wild-type samples and the mutants indicated that the (untreated) *quintuple* mutant seedlings had by far the largest number of differentially regulated genes with 4722 down-regulated and 976 up-regulated entities when compared to the Col-0 (1) wild type (Fig. 5; Supplemental Table S1). Furthermore, the *gnc gnl* double mutant contained 2458 down- and 294 up-regulated entities, respectively (Fig. 5; Supplemental Table S1). In comparison, the number of differentially expressed genes was comparatively minor in the *triple* mutant, which had only 323 down- and 278 up-regulated entities in this particular experiment and selected physiological growth conditions (Fig. 5).

The comparatively strong gene expression differences in the *gnc gnl* double and the *quintuple* mutants, and the fact that both mutants shared the *gnc gnl* loss-of-function at the genetic level, was reflected by the large overlap between the differentially expressed gene sets of the two genotypes. Specifically, 1922 of the 2458 down-regulated entities from *gnc gnl* were also down-regulated in the *quintuple* mutant (Fig. 5B), and 98 of the 294 entities up-regulated in *gnc gnl* were also up-regulated in the *quintuple* mutant (Fig. 5B). Conversely, the overlap in gene expression defects between the *triple* mutant and the *quintuple* mutant was higher than that between the *triple* mutant and *gnc gnl* (Fig. 5B). We therefore concluded that the gene expression differences between the different *GATA* gene mutants was strongest in the *quintuple* mutant and that the strong increase in the number of differentially

2300

Plant Physiol. Vol. 170, 2016

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 30, 2016 - Published by www.plant.org  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.



**Figure 4.** GATA factors contribute to hypocotyl elongation. A, B, C, D, E, Representative photographs; and F, G, H, I, J, K, L, M, averages and SEs from hypocotyl measurements of 5-d-old seedlings ( $n \geq 50$ ) grown in white light (A and F), weak and strong red light (B, H, I), weak and strong far-red light (C, J, K), weak and strong blue light (D, L, and M), and in the dark (E and G). Scale bar = 2 mm. Student's *t* test: datasets with no statistical difference fall in one group and were labeled accordingly.

regulated genes exceeded by far the differences seen in the *gnc gnl* double mutant and the *triple* mutant. This supported our conclusion from the phenotypic analyses that the GATA genes act in a functionally redundant manner.

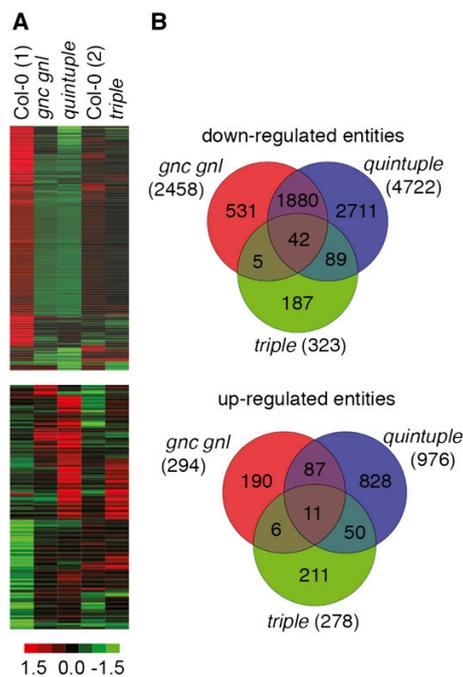
Since we had observed increased gene expression of all six GATA genes after CK-treatment, we expected that CK-induced gene expression may be compromised in the *gata* mutants (Fig. 6). Indeed, of the 996 entities that were down-regulated after CK-treatment in the wild type (Col-0 1), only 173 (18%) and 89 (9%) remained CK-regulated in the *quintuple* and *gnc gnl* mutants, respectively (Fig. 6A; Supplemental Table S2). At the same time, of the 188 entities that were down-regulated after CK treatment in the wild-type sample of the second experiment (Col-0 2), 83 (44%) remained CK-regulated in the *gata* triple mutant (Fig. 6B). The differential effect on gene expression between the different mutants was less pronounced when examining the CK-induced genes. Here, 49% (*quintuple* mutant), 59% (*gnc gnl*), and 63% (*triple* mutant) of the CK-induced entities from the respective wild types remained CK-regulated in the mutants (Fig. 6, A and B). In summary, we concluded that CK-regulated gene expression is impaired in the GATA gene mutants.

#### GATA Gene Mutants Are Defective in CK-Regulated Developmental Processes

Based on the strong defects of *gata* mutants in CK-regulated gene expression, we searched for phenotypes that could be explained by defects in CK response. CK signaling was described as a regulator of phyllotactic patterning in the shoot apical meristem of *Arabidopsis* (Besnard et al., 2014). In line with a role of the LLM-domain B-GATA genes in this process, we observed frequent aberrations from normal phyllotactic patterning in flower positioning in *triple* and *quintuple* mutant inflorescences (Fig. 7). Quantitative analyses revealed aberrations from the canonical angle of approximately  $137.5^\circ$  in approximately 30% of the petioles in *triple* and *quintuple* inflorescences (Fig. 7D). At the same time, this patterning defect was not apparent in the *gnc gnl* double mutant. Since we also did not observe a quantitative increase in the severity of this phenotype between the *triple* and the *quintuple* mutant, we concluded that *GATA16*, *GATA17*, and *GATA17L* may be responsible for this phenotype (Fig. 7D).

Leaf senescence is another CK-regulated process (Hwang et al., 2012). In the wild type, CK levels are reduced during senescence, and positive or negative

Ranftl et al.



**Figure 5.** Differential basal gene expression in *gata* mutants. A, Heat maps of differentially expressed genes from 10-d-old light-grown Col-0 seedlings and the *gnc gnl*, *quintuple*, and *triple* mutants. The experiment was performed in two rounds with two independent wild-type controls referred to as Col-0 (1) and Col-0 (2). Down-regulated and up-regulated genes are shown in the top and bottom panels, respectively. B, Venn diagrams showing the overlap in differential gene expression for down- and up-regulated genes between the three different *gata* mutant backgrounds using the respective Col-0 wild-type control as a reference. Gene expression identities and data are shown in Supplemental Table S1.

interference with the decrease in CK levels can promote and delay senescence, respectively (Hwang et al., 2012). Senescence can be induced by shifting light-grown plants to the dark; we had previously already shown that leaf senescence is delayed in overexpression lines of LLM-domain B-GATAs (Behringer et al., 2014). To examine possible senescence defects in the *gata* mutants, we floated leaves of wild-type and mutant plants in the dark on a mock solution or on a solution containing 0.05  $\mu\text{M}$  or 0.1  $\mu\text{M}$  6-BA (Fig. 8, A–F) (Weaver and Amasino, 2001). In line with the expectation that the presence of CK in the medium would suppress the senescence process, we observed decreased senescence in CK-treated wild-type leaves, which we quantitatively assessed by measuring chlorophyll levels in the mock- and CK-treated leaves (Fig. 8F). Here, we found that the effects of the senescence treatment were less efficiently suppressed by CK treatments in the *gnc gnl* double and in the *quintuple* mutant than in the wild type or the *triple* mutant (Fig. 8, A–F). Similarly, we observed a stronger effect on the decreases in chlorophyll and

total protein levels in the *gnc gnl* as well as the *quintuple* mutant when we transferred light-grown plants for 4 d to the dark (Fig. 8, G–I). As previously reported, *GNL* overexpressing plants (*GNLox*) had senescence phenotypes that were antagonistic to the ones observed with the mutants (Fig. 8) (Behringer et al., 2014). In the case of the leaf floating assay, CK-treatment had a stronger effect on greening and chlorophyll abundance in *GNLox* than in the wild type (Fig. 8, A–F). When we transferred plants from the light to the dark, *GNLox* seedlings remained visibly green and did not display the strong decrease in total protein abundance that we observed in the wild type or the *GATA* gene mutants (Fig. 8, G–I). We thus concluded that *GATA* gene mutants and overexpressors have antagonistic effects with regard to the regulation of senescence, and that *GNC* and *GNL* contribute particularly strongly to this phenotype.

CK induces greening in light-grown seedlings (Kobayashi et al., 2012). To examine to what extent CK can induce chlorophyll accumulation in the *gata* mutants, we grew plants for 2 weeks in constant light on medium containing CK (5 nM BA) or a corresponding CK-free medium. As expected, chlorophyll content was increased in wild-type plants but this increase was neither significant in the *gnc gnl* nor the *triple* or the *quintuple* mutants (Supplemental Fig. S7). We thus concluded that the *GATA* factors are required for CK-induced greening in Arabidopsis seedlings.

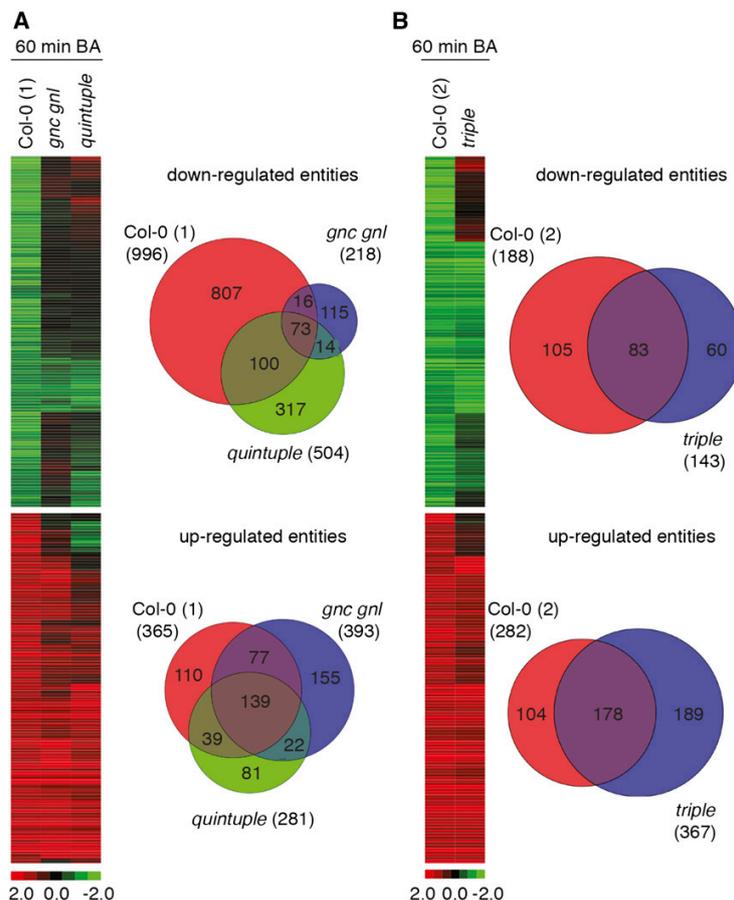
It was previously reported that hypocotyl elongation could be repressed by incubating dark-grown seedlings in the presence of CK (Su and Howell, 1995). Since the *GATA* gene mutants had displayed a hypocotyl elongation defect in light-grown seedlings (Fig. 4), we also explored the link between hypocotyl elongation and CK. However, when we tested the effects of CK on hypocotyl elongation in dark-grown seedlings, we did not detect any significant differences in the response between the different genotypes tested (Supplemental Fig. S8). It is thus unlikely that the *GATA* genes participate in this elongation response.

Branching is another phenotype that has been attributed to defects in CK biosynthesis and response (El-Showk et al., 2013). When we analyzed the general habitus of the *quintuple* mutants, we noted that they had an increased number of secondary branches combined with a reduced plant height (Fig. 9, A–C). Occasionally, we also observed the outgrowth of inflorescences in the axils of lateral inflorescences in the mutants whereas we had not noted this phenotype in the wild type (Fig. 9, D and E). A quantitative analysis of these phenotypes over all *gata* mutant phenotypes revealed that the number of first- and second-order lateral branches increased with increasing mutant complexity (Fig. 9B). Here, we observed strong effects already in the *gata17 gata17l* mutant as well as the *gnc gnl* double mutant but strongest defects in the *triple* and the *quintuple* mutant; thus, all five *GATA* genes may contribute to this phenotype (Fig. 9B). At the same time, plant height was reduced to a significant but still minor level in these

2302

Plant Physiol. Vol. 170, 2016

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 30, 2016 - Published by www.plant.org  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.



**Figure 6.** Cytokinin-responsive gene expression is impaired in *gata* mutants. A, B, Heat maps and Venn diagrams of differentially expressed genes from Col-0 and the *gata* mutants after 60-min CK treatment. The experiment was performed in two rounds with two independent wild-type controls referred to as Col-0 (1) and Col-0 (2). Down- and up-regulated genes are shown in the top and bottom panels, respectively. Venn diagrams showing the overlap in differential gene expression for genes that were down- and up-regulated following CK treatment in the respective Col-0 wild type and their expression in the respective *gata* mutants. Gene expression identities and data are shown in Supplemental Table S2.

mutants, suggesting that decreases in plant height, which may have indirect consequences on the general plant habitus and branching, are not the primary cause for altered branching patterns in the *gata* mutants (Fig. 9C). It is further important to note that the higher-order *GATA* gene mutants initiated fewer vegetative buds but had a higher number of growing buds as reflected by the increased branch numbers (Fig. 9F). Thus, axillary bud formation is promoted and bud outgrowth is repressed by the GATAs in the wild type.

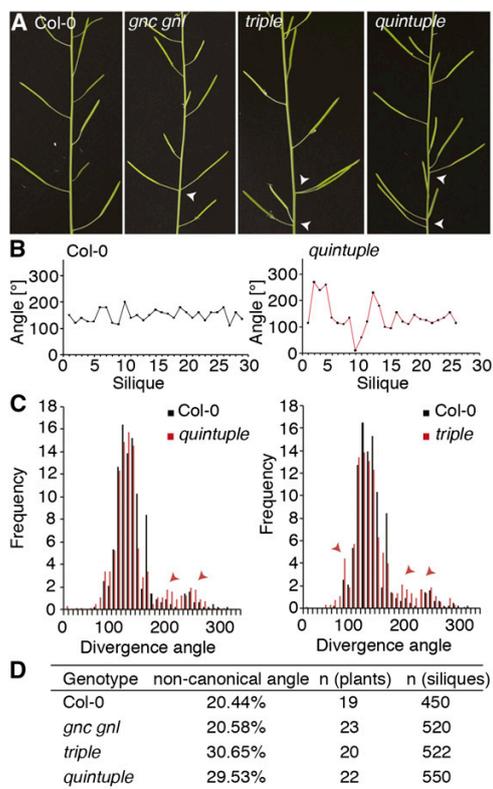
Another phenotype that became apparent during our analysis of the *gata* mutant plant habitus was an increase in the angle formed between the primary inflorescence and the lateral inflorescences (Fig. 9, G and H; Supplemental Fig. S9). The *gata* mutants had a decreased angle formed between the primary inflorescence and lateral inflorescences and this phenotype was strongest in the *quintuple* mutant and intermediate in the *gnc gnl* and *triple* mutants (Fig. 9, G and H; Supplemental Fig. S9). Interestingly, we had previously observed increased branch angles in *GATA* overexpression lines such as *GNLox* (Supplemental Fig. S9) (Behringer et al., 2014).

We thus concluded that *GATA* gene mutants and over-expressors antagonistically regulate branch angles in Arabidopsis.

#### *GATA* Genes Regulate Petal and Sepal Numbers as well as Silique Length

CK signaling has recently been implicated in the control of floral development (Han et al., 2014). When we analyzed *gata* mutant flowers in more detail, we noted with interest aberrations in floral organ numbers in comparison to the wild type (Fig. 10A). Whereas wild-type flowers have generally four sepals and four petals and only rarely deviate from this pattern (in our study in around 2% of the cases), a strong increase in flowers with more than four (generally five, in rare cases six) petals and sepals became apparent in the higher-order *gata* mutants (Fig. 10A and Supplemental Fig. S10A). In the *gata17 gata17l* mutants, we observed flowers with more than four sepals and petals in 12% of all flowers, and this number was slightly enhanced in

Ranftl et al.



**Figure 7.** Phyllotaxis patterns are impaired in *GATA* gene mutants. **A**, Representative photographs of mature inflorescences. Arrowheads point at events of aberrant silique positioning. **B**, Measurement of silique angles along the primary inflorescence of representative wild-type and *quintuple* mutant plants. Note the particularly strong deviation from the ideal silique angle of  $137.5^\circ$  at the base of the inflorescence. **C**, Frequency distribution of silique divergence angles in wild-type and *gata triple* as well as *quintuple* mutant plants. Arrowheads mark examples for instances where mutant angles strongly deviate from wild-type angles. **D**, Overview over the number of siliques with a non-canonical angle as observed in the wild type and *GATA* gene mutants.

the *triple* mutant (13% petals) and the *quintuple* mutant (14% petals) (Fig. 10A and Supplemental Fig. S10A). Importantly, the single mutants with the clearest apparent effect were the *gata17* and *gata17l* mutants and, inversely, mutations in *GNC* and *GNL* contributed only to a minor extent to this phenotype (Supplemental Fig. S10A). In summary, this analysis revealed that *GATA17* and *GATA17L* make a particularly strong contribution to the floral morphology phenotype of the *gata* mutants.

Since we had previously noted that overexpression lines of LLM-domain B-GATAs have short siliques and a reduced number of seeds per silique, we also analyzed silique length and seed set in the *gata* mutants (Supplemental Fig. S10, B–D). In line with an antagonistic regulation of these traits in the *gata* mutants, we measured significant increases in seed set in the siliques

of the *gnc gnl*, the *triple* as well as the *quintuple* mutants, and we detected significant increases in silique length in all mutant backgrounds (Supplemental Fig. S10, B–D). We thus concluded that the *GATA* genes repress silique elongation and seed set in the wild type, at least to a minor extent. A differential contribution of individual *GATAs* to these phenotypes could, however, not be resolved here.

#### *GATA* Gene Mutants Have Antagonistic Effects on Flowering Time in Long and Short Days

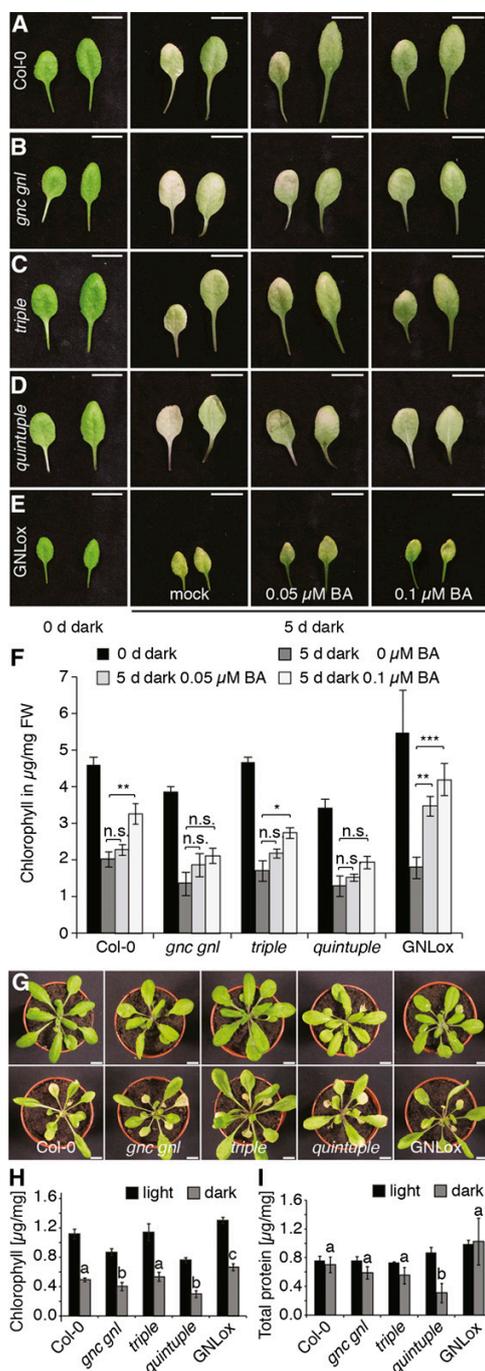
Accelerated flowering in plants grown under long-day conditions was another phenotype previously described for *gnc gnl* mutants (Richter et al., 2010, 2013a,b). Conversely, overexpression of the LLM-domain B-GATAs causes a strong delay in flowering (Richter et al., 2010, 2013a,b; Behringer et al., 2014). To examine the contribution of the other *GATA* factors to the flowering time phenotype, we grew the *gata* mutant series in long- and short-day conditions with a 16 h and 8 h light period, respectively (Fig. 10, B and C; Supplemental Fig. S11). Interestingly, we observed a gradual acceleration of flowering in long-day-grown plants that was weakest in the single mutants, more pronounced in the double, *triple*, and quadruple mutants, and strongest in the *quintuple* mutants (Fig. 10, B and C; Supplemental Figs. S11 and S12). We thus concluded that all LLM-domain B-*GATA* genes examined here may contribute to the repression of flowering in long-day-grown plants.

Interestingly, the effects of the reduced *GATA* gene function on flowering time in short-day conditions were antagonistic to those observed in long day-grown plants in that the complex *GATA* gene mutants flowered much later than the wild type or the less complex mutant combinations when flowering was counted in days (Fig. 10, B and C; Supplemental Figs. S11 and S12). We thus concluded that the LLM-domain B-*GATAs* factors regulate flowering time in long- and short-day conditions but, in view of the antagonistic nature of this regulation, their contribution to flowering time control may be complex.

#### Cross Regulation of *GATA* Gene Expression

Since several of our genetic analyses had suggested a functional redundancy between the *GATA* genes, we looked for evidences of a cross regulation of *GATA* gene expression in the *gnc gnl* double mutant background. There, we detected indeed an increased transcript abundance of *GATA16*, *GATA17*, and *GATA17L* in the *gnc gnl* mutant, which could be compensatory for the loss of *GNC* and *GNL* (Fig. 11A). At the same time, *GATA15*, *GATA16*, and *GATA17L* gene expression levels were significantly reduced in *GNL* overexpression lines (*GNLox*) suggesting that *GNL* may regulate the expression of these genes.

Since these observations indicated that molecular mechanisms may exist that compensate for the loss of



**Figure 8.** Cytokinin-effects on senescence are impaired in *gata* mutants. A–E, Representative photographs of leaves from 21-d-old plants. Leaf nos. 3 and 5 were detached and kept in the dark for 4 d in liquid medium to monitor senescence in the presence and absence of the cytokinin 6-benzylaminopurin (BA). Scale bar = 1 cm. F, Averages and s.d. after quantification of chlorophyll abundance of the leaves shown in

individual LLM-domain B-GATA genes, e.g. in the *gnc gnl* mutants, we examined the binding of GNL to the LLM-domain GATA gene promoters after ChIP-seq analysis (chromatin immunoprecipitation followed by DNA sequencing). Here, we found that at least three of the six LLM-domain B-GATA genes were bound by GNL after immunoprecipitation of HA-tagged GNL from transgenic plants expressing a functional GNL:HA transgene from a GNL promoter fragment in the *gnc gnl* background (pGNL::GNL:HA *gnc gnl*; Fig. 11B). Through subsequent ChIP-PCR studies targeting selected regions upstream from *GNC*, *GNL*, and *GATA17*, we could confirm this binding through independent analyses (Fig. 11C). Thus, LLM-domain B-GATA factors may directly regulate their own expression as well as that of other family members.

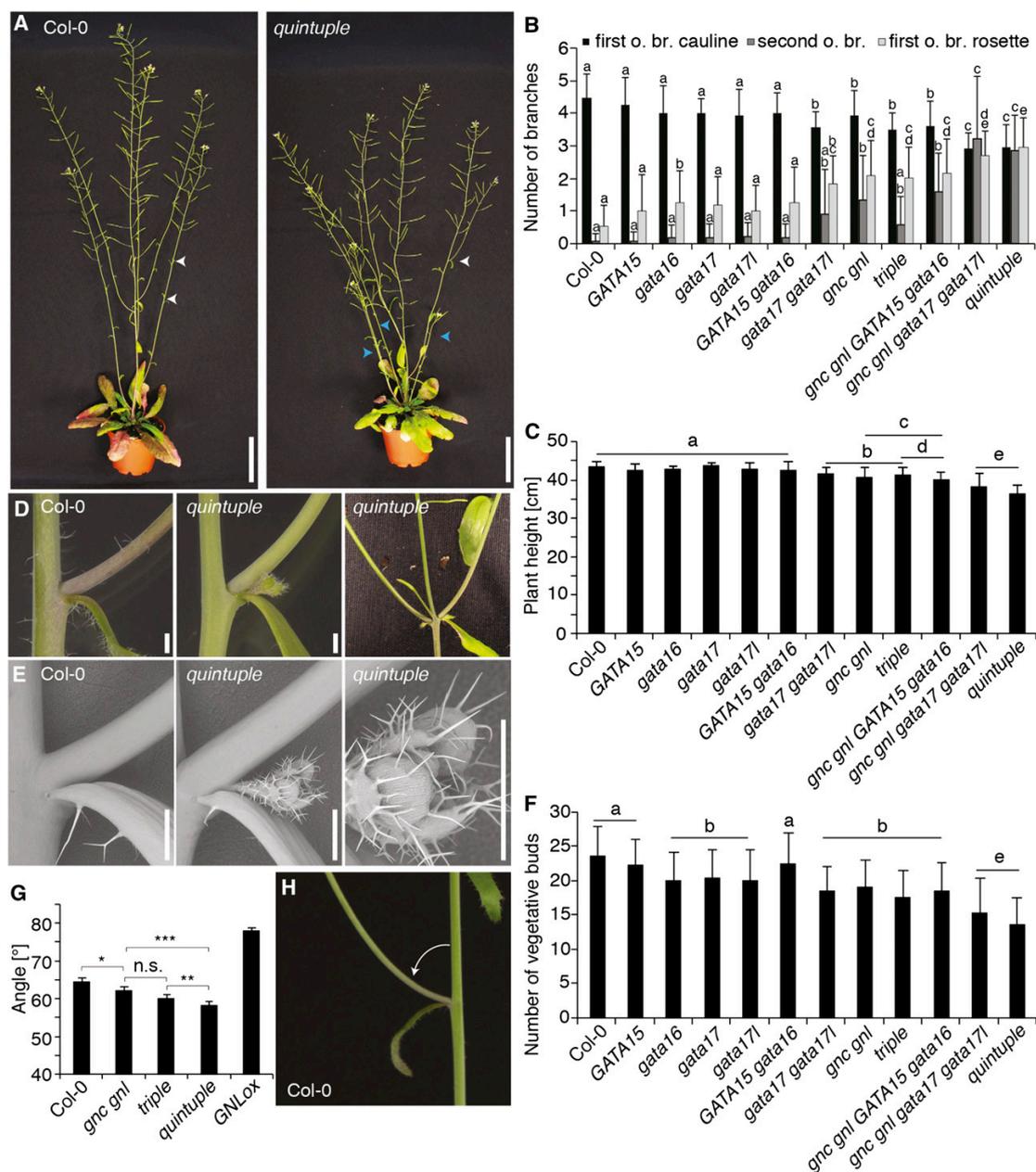
## DISCUSSION

In this study, we have characterized the six-membered family of LLM-domain B-GATAs from Arabidopsis. Whereas the family has diverged when compared among Arabidopsis, tomato, barley, and Brachypodium, a clear conservation of this protein family can be observed within the *Brassicaceae* family (Supplemental Fig. S1; Behringer et al., 2014). Within the *Brassicaceae*, *GNC* and *GNL*, *GATA15* and *GATA16* as well as *GATA17* and *GATA17L* form closely related LLM-domain B-GATA pairs. In a previous study, we had comparatively analyzed transgenic Arabidopsis lines expressing different members of the LLM-domain B-GATA gene family from Arabidopsis, barley, and tomato, and concluded that these genes are functionally redundant at the biochemical level since their overexpression resulted in highly similar phenotypes (Behringer et al., 2014). Several of the phenotypes analyzed here, namely greening (Fig. 1, D–F), hypocotyl elongation (Fig. 4), plant height, branching patterns (Fig. 9), branch angles (Fig. 9 and Supplemental Fig. S9), silique length, seed set (Supplemental Fig. S10), flowering time (Fig. 10), and senescence (Fig. 8) are strongest in the *gata* quintuple mutant and weaker, or in some cases not even apparent, in the less complex *gata* mutant combinations. Thus, in line with this previous study, our present analysis shows that the LLM-domain B-GATA genes from Arabidopsis have a shared biological function in the control of multiple developmental pathways.

Due to the high complexity of the available range of single, double, triple, quadruple, and quintuple mutants, we restricted many of our phenotypic analyses to the *gnc gnl* double, the complementary *triple*, and the

(A–E) ( $n = 3$ ). Student's *t* test: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s. = not significant. G, Representative photographs of 33-d-old plants that had transferred from the light to the dark for 4 d. Scale bar = 1 cm. H, I, Averages and s.d.s after quantification of chlorophyll measurements (H) and total protein determination (I) of plants shown in (G).  $n \geq 3$ . Student's *t* test was performed for dark samples: datasets with no statistical difference fall in one group and were labeled accordingly.

Ranftl et al.

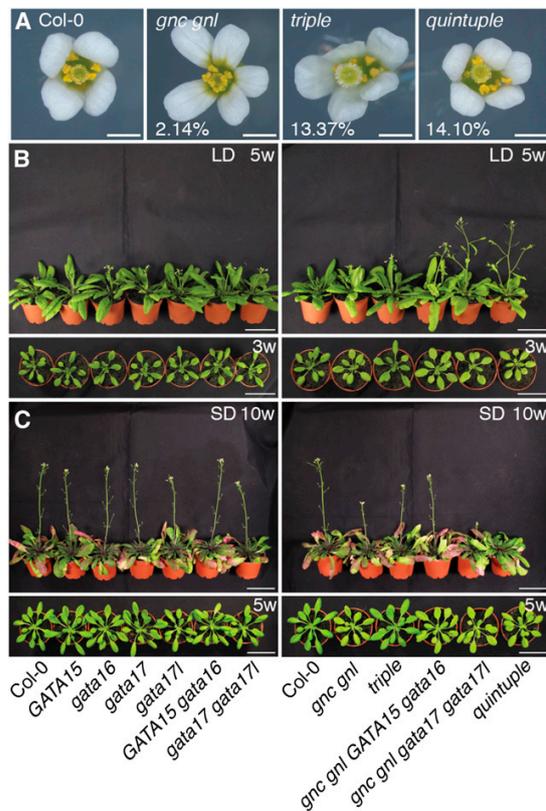


**Figure 9.** *GATA* gene mutants have altered branching patterns and branch angles. **A**, Representative photographs of 7-week-old Col-0 and *quintuple* mutant plants. Arrowheads indicate positions of second-order lateral branch formation (white) and first-order branches from nodes in the rosette (blue). Scale bar = 5 cm. **B**, **C**, and **F**, Quantitative analysis of branch numbers (first-order branch from cauline leaves, first o. br. cauline; second-order branches, second o. br.; and first-order branches from the rosette, first o. br. rosette). **B**, Plant height and **C**, vegetative bud formation along the shoot (**F**) in the wild-type and *gata* mutant backgrounds.  $n = 15$ . Student's *t* test: datasets with no statistical difference fall in one group and were labeled accordingly. **D**, **E**, Photographs (**D**) and scanning electron micrographs (**E**) of floral meristems and siliques formed in the axils of second-order lateral branches of *quintuple* mutants, which are typically not found in the wild type. Scale bar = 1 mm. **F**, Quantitative analysis of branch angles measured on 5-week-old Arabidopsis plants.  $n = 19$ . Student's *t* test: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s. not significant. **G**, Representative photographs of lateral inflorescences branching from the primary inflorescence in the wild type. **H**, The arrows indicate the angles measured for the analysis shown in (**G**). Scale bar = 1 cm.

2306

Plant Physiol. Vol. 170, 2016

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 30, 2016 - Published by www.plant.org  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.



**Figure 10.** *gata* mutants have impaired floral morphology and flowering time. A, Phenotypic analysis of sepal and petal numbers in the wild-type and the *gata* gene mutant backgrounds. Percentages indicate the penetrance of the displayed floral phenotype. The wild-type flower phenotype represents about 98% of all flowers analyzed; the frequency of aberrant flowers is similar to that of the *gnc gnl* mutant. B, C, Representative photographs (side and top views) of wild-type and *gata* gene mutants grown for 5 weeks in long-day (16 h light/8 h dark) (B) or for 10 weeks in short-day (8 h light/16 h dark) conditions (C). Scale bar = 5 cm.

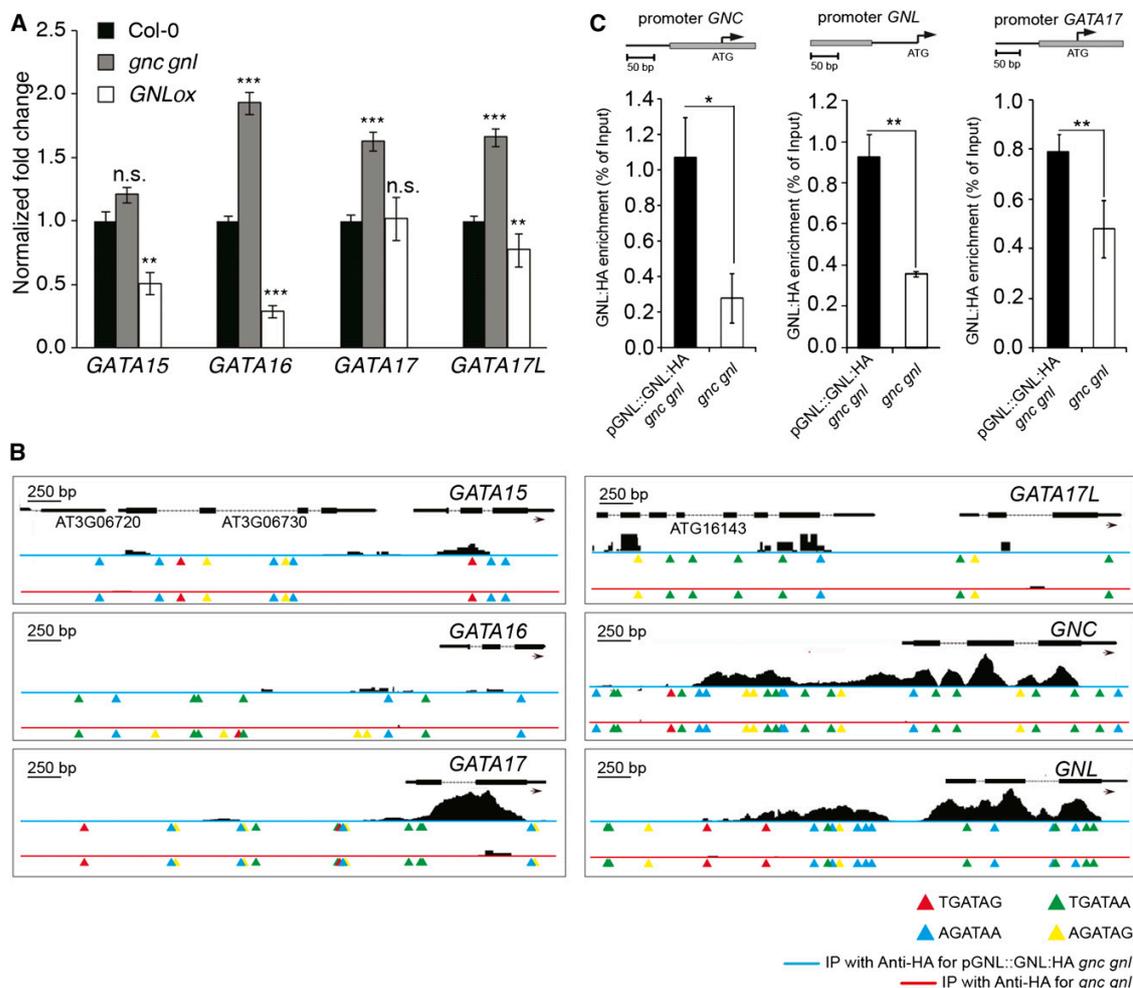
*quintuple* mutants. It can nevertheless be suggested, based on the presently available data, that some phenotypes are predominantly controlled by a single LLM-domain B-GATA or rather an LLM-domain B-GATA gene pair. Phyllotactic patterning as assessed here in the inflorescence is impaired in the *gata triple* but not in the *gnc gnl* double mutant (Fig. 7). Similarly, the increases in floral organ numbers are already very prominent in the *gata17 gata17l* double mutants and not much more enhanced in the *gata triple* or *quintuple* mutant that includes the *gata17 gata17l* mutations (Fig. 10A; Supplemental Fig. S10A). Thus, the LLM-domain B-GATA genes have shared overlapping but distinct roles in the control of plant development. The fact that *GATA15* gene function is not impaired in the selected *GATA15* gene insertion allele does not allow us to draw any direct conclusions on the biological function of this

gene based on the data presented here. Furthermore, the fact that the mutant alleles of *GATA16* and *GATA17* used in the complex mutants are only partially defective in *GATA* gene expression could suggest that even stronger phenotypes may be observed if loss-of-function alleles were used. The two strong alleles for *GATA15* (*gata15-2*) and *GATA17* (*gata17-2*) isolated here but analyzed only as single mutants may help in the future to understand the biological function of these *GATA* genes at further depth.

It is interesting that the overexpression lines and the mutants of these *GATA* genes frequently have antagonistic phenotypes. This study in combination with a previous study identifies such antagonistically regulated phenotypes in the control of greening, hypocotyl elongation, branch angle formation, flowering time, and senescence (Richter et al., 2010; Behringer et al., 2014). Particularly, in the case of transcription factors where the loss-of-function or overexpression may affect the expression of many downstream targets genes and developmental responses triggered by these target genes, one may not expect such a clear antagonistic relationship between mutants with reduced gene functions and the overexpressors. In view of the fact that overexpressors likely control the expression of genes that are normally not targeted by this transcription factor when expressed from their native promoter (off-targets), this observation is even more striking. It may suggest that the GATAs examined here control developmental responses in a dosage-dependent manner together with other critical factors. In this context, the presence and abundance of the GATAs would just modulate the response but would by itself not be sufficient to trigger it. Further analyses will be required to gain a more detailed understanding of the mode of action of the LLM-domain B-GATA factors in the control of gene expression.

We had previously shown that the LLM-domain B-GATAs *GNC* and *GNL* repress flowering since their loss-of-function mutants and overexpressors displayed an early and late flowering phenotype, respectively, when plants were grown in long-day conditions (Richter et al., 2010; 2013a,b). We furthermore showed that the control of flowering is partially mediated by the flowering time regulator *SUPPRESSOR-OF-OVEREXPRESSION-OF-CONSTANS1*, which acts downstream from *GNC* and *GNL* and whose promoter can be directly bound by *GNC* and *GNL* (Richter et al., 2013a,b). In line with these previous observations, we show here that the complex *GATA* gene mutants flower even earlier than the *gnc gnl* mutant, further substantiating our conclusion that LLM-domain B-GATAs are flowering time regulators in Arabidopsis (Fig. 10B; Supplemental Fig. S11). Surprisingly, the complex *gata* mutants flowered late when grown in short-day conditions and their phenotype was thereby antagonistic to the phenotype observed in long days (Fig. 10C; Supplemental Fig. S9). The reason for this antagonistic flowering time behavior remains to be resolved but a complex scenario may be envisioned. We also do not want to rule out that physiological parameters become limiting in the induction of

Ranftl et al.



**Figure 11.** *GATA* gene expression is cross regulated in *gnc gnl* mutants and *GNLox* transgenic lines. A, Result from qRT-PCR analyses of the *GATA* genes *GATA15*, *GATA16*, *GATA17*, and *GATA17L* in the *gnc gnl* mutant and *GNLox* background. Gene expression data were normalized to the transcript abundance detected in the Col-0 wild type. B, Read coverage over the six LLM-domain B-*GATA* genes and 30-kb upstream region after chromatin immunoprecipitation of *GNL:HA* from a *pGNL::GNL:HA gnc gnl* transgenic line (blue line) and the *gnc gnl* mutant (red line) followed by next-generation sequencing. *GATA* gene models and, where applicable, the gene models of the neighboring genes are indicated in the figure, different *GATA*-sequence-containing motifs are indicated below the gene models. C, Result from qRT-PCR analyses for selected amplicons (gray boxes) upstream from the *GNC*, *GNL*, and *GATA17* gene promoters after chromatin immunoprecipitation of *GNL:HA* from a *pGNL::GNL:HA gnc gnl* transgenic line and the *gnc gnl* mutant. Student's *t* tests: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s. = not significant.

flowering in the *gata* mutants. Long-term defects as a result of their reduced greening may play a limiting role during the extended growth in short days with short illumination periods that are not limiting when plants are grown in long days.

Several of our phenotypic analyses suggested that the LLM-domain B-*GATAs* act in concert to control specific phenotypes. The fact that at least some of the phenotypes were most pronounced in the *quintuple* mutant and not apparent or only weak in the less complex mutants suggests that the LLM-domain B-*GATAs* may

cross regulate their expression, and that presence and absence of one *GATA* could interfere with the abundance of other *GATA* family members. We have analyzed this hypothesis here by examining the expression of the LLM-domain B-*GATAs* *GATA15*, *GATA16*, *GATA17*, and *GATA17L* in the *gnc gnl* mutant and in the *GNL* overexpression line (Fig. 11A). In both cases, we found the expression of three of the four analyzed genes to be differentially regulated in the two genetic backgrounds suggesting that the *GATAs* can cross regulate their gene expression and supporting again the

hypothesis that the GATAs have a repressive activity on the transcription of the other *GATA* genes. Further support for such a hypothetical cross regulation came from a ChIP-seq analysis with GNL where we observed a strong binding of GNL, when expressed from its own promoter, to the three *GATA* gene loci, *GNC*, *GNL*, and *GATA17* (Fig. 11B). Additional studies are needed to disentangle the interplay of the different LLM-domain B-GATAs in the control of plant growth and the mutual transcriptional control of the different *GATA* gene family members, and to get a full understanding of their biochemical and biological function during plant growth and development.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological Material

All experiments were performed in Arabidopsis ecotype Columbia. Insertion mutants for *GNC* (SALK\_001778) and *GNL* (SALK\_003995) and their double mutant were previously described (Richter et al., 2010). Insertion mutants for *GATA15* (SAIL\_618B11 and WiscDsLox471A10), *GATA16* (SALK\_021471), *GATA17* (SALK\_101994 and SALK\_049041), and *GATA17L* (SALK\_026798) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center. Homozygous single- and higher-order mutant combinations were isolated from segregating populations by PCR-based genotyping. In the context of this analysis, it became apparent that the insertion position for one *GATA15* allele (SAIL\_618B11) was misannotated and that the correct position of this insertion was downstream of the gene's 3'-untranslated region. A list of genotyping primers is provided in Supplemental Table S4. In addition, the previously described mutants *phyA-211 phyB-9* (Reed et al., 1994), *cry1 cry2* (Mockler et al., 1999), and *pif1 pif3 pif4 pif5* were used (Leivar et al., 2008).

### Protein Alignment and Phylogeny

LLM-domain B-GATA protein sequences of different *Brassicaceae* genomes were identified in the ENSEMBL database (<http://plants.ensembl.org/index.html>). Sequences were filtered for proteins containing the LLM-domain and alignments were performed using the ClustalW2 alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Two *Brassica rapa* genes, Bra037421 and Bra035633, were not included in the analysis because no expressed sequence tags could be detected for these annotations and they may represent pseudogenes (<http://www.plantgdb.org/BrGDB/>). The phylogenetic tree was generated with MEGA6.06 (<http://www.megasoftware.net>) using the Neighbor-joining method and the bootstrap method with 1000 bootstrap replications, as well as the Jones-Taylor-Thornton model with gaps/missing data treatment set to pairwise deletion, based on an alignment of trimmed B-GATAs using the entire B-GATA DNA-binding domain and the C termini with the LLM-domain (Supplemental Fig. S2).

### Physiological Assays

Unless otherwise stated, all plants were cultivated on sterile 1/2 MS medium without sugar under continuous white light ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). For hypocotyl length measurements, seedlings were grown for 5 d in white light ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), far-red light (weak:  $0.35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ; strong:  $0.6 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), red light (weak:  $7.2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ; strong:  $11 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), and blue light (weak:  $4.25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ; strong:  $10 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Hypocotyl length was measured from scanned seedlings using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Chlorophyll measurements were performed with 14-d-old plants and chlorophyll content was determined as previously described and normalized to the chlorophyll content of the wild-type seedlings grown in the same conditions (Inskeep and Bloom, 1985). To visualize chloroplast accumulation and auto-fluorescence, pictures of 7-d-old seedlings were taken with a model no. FV1000 confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germany) with an excitation of 405 nm and a detection from 631 to 729 nm. The experiments were repeated three times with comparable outcomes; the result of one representative experiment is shown. For flowering time analyses, plants were grown

on soil in  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in 16 h light/8 h dark long-day conditions or in  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  8 h light/16 h short-day conditions. For CK treatments, 10-d-old seedlings were preincubated for 4 h in liquid 1/2 MS medium and treatments were started by adding hormone-containing medium to reach a final concentration of  $10 \mu\text{M}$  6-benzylaminopurin (6-BA). To examine the effects of CK on hypocotyl elongation growth, seedlings were grown in the dark for 5 d on medium containing 0.05 or  $0.1 \mu\text{M}$  6-BA or a corresponding mock solution. Silique angles were determined as previously described (Besnard et al., 2014). To this end, a round gauge was built in such a way that it could be moved up the main inflorescence to measure the angles of consecutive siliques. The experiment was repeated in two rounds and both datasets were combined. Senescence assays were performed as previously described (Weaver and Amasino, 2001). In brief, detached leaves nos. 3 and 5 of 21-d-old light-grown plants were floated on liquid 1/2 MS in absolute darkness, containing either  $0.05$  or  $0.1 \mu\text{M}$  BA or a mock solution. After 4 d, chlorophyll was extracted as described above. Alternatively, whole plants were transferred into darkness for 4 d, chlorophyll was determined as described above, and total protein concentration was determined using a Bradford assay. To assess the branching phenotype of *gata* mutants, the numbers of branches of at least 0.5 cm length were determined from nodes in the rosette and from cauline nodes as well as those of vegetative buds (leaf-bearing nodes) along the shoot. For scanning electron microscopy of floral buds, samples were mounted on pre-frozen platforms and pictures were taken with a TM-3000 table top scanning electron microscope (Hitachi, Krefeld, Germany). Numbers of floral organs were counted at the time of anthesis (stage 13). This measurement was repeatedly performed with all plants after new flowers had formed. Siliques were harvested from different plants from a comparable section of the main inflorescence. Length and seed number was determined for each silique separately. To determine flowering, plants were monitored on a daily basis for the presence of a visible inflorescence bud (time to bolting) or petals (flowering time). The numbers of rosette and cauline leaves after bolting were counted.

### Microarray Analyses

For microarray analyses, 14-d-old plants grown in continuous white light ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) were treated for 60 min with CK ( $20 \mu\text{M}$  6-BA) or a corresponding mock solvent control treatment. Total RNA was extracted with the NucleoSpin RNA Plant Kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) and  $150 \text{ ng}$  total RNA was labeled with Cy3 using the Low Input Quick Amp Labeling Protocol (Agilent Technologies, Böblingen, Germany). Three biological replicate samples were prepared for each genotype and Arabidopsis arrays (V4, design ID 21169; Agilent Technologies) were hybridized at  $65^\circ\text{C}$  for 17 h in rotating hybridization chambers (Agilent Technologies). Subsequently, the arrays were washed and scanned using a Microarray Scanner (Agilent Technologies). Total RNA and probe quality were controlled with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Raw data were extracted using the Feature Extraction software v. 10.7.3.1 (Agilent Technologies). Raw data files were imported into GeneSpring GX (v. 12) and normalized choosing the scale-to-median and baseline-to-median algorithms. Data were then subjected to an ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ) with an S-N-K post hoc test and filtered for genes with fold expression differences to the respective wild-type controls as specified (Supplemental Table S2). Microarray data were deposited as GSE71828 into the Gene Expression Omnibus database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)).

### Quantitative Real Time-PCR

To measure transcript abundance, total RNA was extracted with an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A quantity of  $2 \mu\text{g}$  total RNA was reverse-transcribed with an oligo(dT) primer and M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). The transcript levels were detected using a CFX96 Real-Time System Cycler with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Freiburg, Germany). The results were normalized to *PROTEIN PHOSPHATASE SUBUNIT2A*; AT1G13320 in red and far-red light and to *ACTIN2* (AT3G18780) in blue light. Expression in the dark samples was set to one. Normalization for the hormone treatments was performed with *ACTIN8* (AT1G49240). Primers for qRT-PCRs are listed in Supplemental Table S4.

### ChIP-seq

For ChIP, three biological replicate samples (2 g tissue) of 10-d-old pGNL::GNL:HA *gnc gnl* or *gnc gnl* control plants grown on GM medium under constant white light were fixed for 20 min in 1% formaldehyde. The samples were

Ranftl et al.

subsequently processed as previously described using anti-HA antibodies (Abcam, Cambridge, UK; Kaufmann et al., 2010) and prepared for DNA sequencing with a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA). The data from this analysis are accessible under PRJNA288918 at NCBI-SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>). Sequencing reads were then mapped to the Arabidopsis genome (TAIR10) using SOAPv1 (Li et al., 2008) and the following settings: three mismatches, mapping to unique positions only, no gaps allowed, iteratively trimming set to 41–50. Subsequent analysis for peak identification was performed with CSAR, retaining only peaks with an FDR < 0.05 as statistically significant peaks (Muiño et al., 2011). ChIP-seq results for *GATA* genes were independently verified using ChIP-PCR. The primers for ChIP-PCRs are listed in Supplemental Table S4.

### Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers AT5G56860 (*GNC*, *GATA21*); AT4G26150 (*GNL/CGA1*, *GATA22*); AT3G06740 (*GATA15*); AT5G49300 (*GATA16*); AT3G16870 (*GATA17*); AT4G16141 (*GATA17L*).

### Supplemental Materials

The following supplemental materials are available.

**Supplemental Figure S1:** Evolutionary conservation of LLM-domain B-GATAs within the *Brassicaceae*.

**Supplemental Figure S2:** Sequence alignment of the *GATA*-domain and the LLM-domain.

**Supplemental Figure S3:** *GATA* insertion mutant analysis.

**Supplemental Figure S4:** Mature plant phenotypes of *gata* gene mutants.

**Supplemental Figure S5:** *GATA* gene expression in red light conditions is PIF-dependent.

**Supplemental Figure S6:** The effects of CK-induction in the two microarray data sets are comparable.

**Supplemental Figure S7:** CK cannot efficiently induce greening in *GATA* gene mutants.

**Supplemental Figure S8:** The effect of CK on hypocotyl elongation is not impaired in *GATA* gene mutants.

**Supplemental Figure S9:** *GATA* gene dosage affects lateral inflorescence angles.

**Supplemental Figure S10:** Floral morphology and silique parameters are influenced in *GATA* gene mutations.

**Supplemental Figure S11:** Quantitative analysis of flowering time in long- and short-day conditions.

**Supplemental Figure S12:** *GATA* gene mutations alter flowering time in long- and short-day conditions.

**Supplemental Table S1:** Differentially expressed genes in *GATA* gene mutants.

**Supplemental Table S2:** Differentially expressed genes in *GATA* gene mutants after CK-treatment.

**Supplemental Table S3:** Abundance of CK-regulated genes after CK-treatment in the wild type and *GATA* gene mutants.

**Supplemental Table S4:** Primers used in this study.

### ACKNOWLEDGMENTS

C.S. thanks Eilon Shani and Daniel Chamovitz, Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, for hosting C.S. at Tel Aviv University during manuscript preparation. Q.L.R., E.B., and C.S. thank Jutta Elgner for her excellent technical support.

Received October 5, 2015; accepted January 29, 2016; published February 1, 2016.

### LITERATURE CITED

- Behringer C, Bastakis E, Ranftl QL, Mayer KF, Schwecheimer C (2014) Functional diversification within the family of B-GATA transcription factors through the leucine-leucine-methionine domain. *Plant Physiol* **166**: 293–305
- Behringer C, Schwecheimer C (2015) B-GATA transcription factors—insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Front Plant Sci* **6**: 90
- Besnard F, Refahi Y, Morin V, Marteaux B, Brunoud G, Chambrier P, Rozier F, Mirabet V, Legrand J, Lainé S, Thévenon E, Farcot E, et al (2014) Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* **505**: 417–421
- Bhargava A, Clabaugh I, To JP, Maxwell BB, Chiang YH, Schaller GE, Loraine A, Kieber JJ (2013) Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**: 272–294
- Bi YM, Zhang Y, Signorelli T, Zhao R, Zhu T, Rothstein S (2005) Genetic analysis of Arabidopsis *GATA* transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *Plant J* **44**: 680–692
- Chiang YH, Zubo YO, Tapken W, Kim HJ, Lavanway AM, Howard L, Pilon M, Kieber JJ, Schaller GE (2012) Functional characterization of the *GATA* transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in Arabidopsis. *Plant Physiol* **160**: 332–348
- De Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, Möller B, Wilson M, et al (2010) A novel aux/IAA28 signaling cascade activates *GATA23*-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr Biol* **20**: 1697–1706
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**: 1373–1383
- Han Y, Zhang C, Yang H, Jiao Y (2014) Cytokinin pathway mediates *APETALA1* function in the establishment of determinate floral meristems in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 6840–6845
- Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 353–380
- Inskeep WP, Bloom PR (1985) Extinction coefficients of chlorophyll a and B in *n,n*-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol* **77**: 483–485
- Kaufmann K, Wellmer F, Muiño JM, Ferrier T, Wuest SE, Kumar V, Serrano-Mislata A, Madueño F, Krajewski P, Meyerowitz EM, Angenent GC, Riechmann JL (2010) Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* **328**: 85–89
- Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro EM, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, Masuda T (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 1081–1095
- Köllmer J, Werner T, Schmülling T (2011) Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and development. *J Plant Physiol* **168**: 1320–1327
- Leivar P, Monte E (2014) PIFs: systems integrators in plant development. *Plant Cell* **26**: 56–78
- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E, Quail PH (2008) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* **18**: 1815–1823
- Li R, Li Y, Kristiansen K, Wang J (2008) SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* **24**: 713–714
- Mara CD, Irish VF (2008) Two *GATA* transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**: 707–718
- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H, Lin C (1999) Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* **126**: 2073–2082
- Muiño JM, Kaufmann K, van Ham RC, Angenent GC, Krajewski P (2011) ChIP-seq analysis in R (CSAR): an R package for the statistical detection of protein-bound genomic regions. *Plant Methods* **7**: 11
- Naito T, Kiba T, Koizumi N, Yamashino T, Mizuno T (2007) Characterization of a unique *GATA* family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1557–1560
- Nawy T, Bayer M, Mravec J, Friml J, Birnbaum KD, Lukowitz W (2010) The *GATA* factor HANABA TARANU is required to position the proembryo boundary in the early Arabidopsis embryo. *Dev Cell* **19**: 103–113

2310

Plant Physiol. Vol. 170, 2016

Downloaded from www.plantphysiol.org on March 30, 2016 - Published by www.plant.org  
Copyright © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. *Plant Physiol* **104**: 1139–1149
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (2004) The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **134**: 1718–1732
- Richter R, Bastakis E, Schwechheimer C (2013a) Cross-repressive interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**: 1992–2004
- Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwechheimer C (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* **24**: 2093–2104
- Richter R, Behringer C, Zourelidou M, Schwechheimer C (2013b) Convergence of auxin and gibberellin signaling on the regulation of the GATA transcription factors GNC and GNL in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 13192–13197
- Su W, Howell SH (1995) The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in Arabidopsis seedlings are independent and additive. *Plant Physiol* **108**: 1423–1430
- Tang H, Woodhouse MR, Cheng F, Schnable JC, Pedersen BS, Conant G, Wang X, Freeling M, Pires JC (2012) Altered patterns of fractionation and exon deletions in *Brassica rapa* support a two-step model of paleohexaploidy. *Genetics* **190**: 1563–1574
- Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, Bai Y, Mun JH, Bancroft I, Cheng F, Huang S, Li X, et al (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* **43**: 1035–1039
- Weaver LM, Amasino RM (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiol* **127**: 876–886
- Whipple CJ, Hall DH, DeBlasio S, Taguchi-Shiobara F, Schmidt RJ, Jackson DP (2010) A conserved mechanism of bract suppression in the grass family. *Plant Cell* **22**: 565–578
- Zhang X, Zhou Y, Ding L, Wu Z, Liu R, Meyerowitz EM (2013) Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 family genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 83–101
- Zhao Y, Medrano L, Ohashi K, Fletcher JC, Yu H, Sakai H, Meyerowitz EM (2004) HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2586–2600

## Appendix 7: Lebenslauf.

## Lebenslauf

## Persönliche Daten

Quirin Ludwig Ranftl  
 Geburtsdatum: 03. März 1982  
 Geburtsort: München  
 Nationalität: deutsch

Blutenburgstr. 15  
 80636 MÜNCHEN  
 Telefon: +49 (0) 89 45207590  
 Mobil: +49 (0) 176 21239808



Quirin Ludwig Ranftl  
 Diplom-Biologe

## Ausbildung

09/2010 -12/2015

- Doktorarbeit an der Technischen Universität München  
 Titel: "Rolle und Regulation der LLM-Domänen B-GATA Transkriptionsfaktor-Familie in *Arabidopsis thaliana*"  
 Betreuer: Prof. Dr. Claus Schwechheimer

10/2007 – 03/2008

- ERASMUS-Austausch an die University of York, England  
 Belegte Kurse:  
 Entwicklungsgenetik, Eukaryotische Genexpression, Biotechnologie der Pflanzen

08/2006 – 09/2006

- Praktikum, Estación Científica San Francisco - ECSF, Ecuador

10/2003 – 08/2009

- Grund-, und Hauptstudium Biologie, Universität Bayreuth  
 Diplomarbeit: Untersuchungen zur Säuretoleranz und Wurzelexsudation im Modellsystem *Arabidopsis thaliana*  
 Abschluss: Diplom-Biologe (Univ.), Note: 1,5

09/1993-07/2002

- Besuch des Johann-Sebastian-Bach-Gymnasiums Windsbach, Bayern  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,0

## Sprachen

- Deutsch: Muttersprache  
 Englisch: Verhandlungssicher  
 Französisch: Grundkenntnisse  
 Spanisch: Grundkenntnisse

## Konferenzen

12/2015

- Mini Symposium on DELLA-and Gibberellin-Dependent Plant Growth Regulation

03/2015

WZW Meeting "Next Generation Sequencing"

09/2013

Plant Biology of the Next Generation, conference of the SFB 924

09/2012

8th Tri-National Arabidopsis Meeting, Lausanne

## Publikationen

- [Ranftl QL](#), Bastakis E, Klermund C, Schwechheimer C (2016) LLM-domain containing B-GATA factors control different aspects of cytokinin-regulated development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 170: 2295-3211
- Klermund C, [Ranftl QL](#), Diener J, Bastakis E, Richter R, Schwechheimer C (2016) LLM-domain B-GATA transcription factors promote stomata development downstream from light signaling in *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. Plant Cell 28: 646-660
- Behringer C, Bastakis E, [Ranftl QL](#), Mayer KF, Schwechheimer C (2014) Functional diversification within the family of B-GATA transcription factors through the leucine-leucine-methionine domain. Plant Physiol. 166: 293-305
- Hakenjos JP, Bejai S, [Ranftl QL](#), Behringer C, Vlot AC, Absmanner B, Hammes U, Heinzlmeir S, Küster B, Schwechheimer C (2013) ML3 Is a NEDD8- and Ubiquitin-Modified Protein. Plant Physiol. 163: 135-149

## Engagement

2011 - 2014

- Mitglied der Studenteninitiative des Sonderforschungsbereichs SFB924

2006 - 2008

- Gewählter stellvertretender Fachschaftssprecher der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth

München, 18. August, 2016