

**Charakterisierung der VFB F-Box Protein
Familie aus *Arabidopsis thaliana***

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Katja Melanie Schwager

aus Ansbach

vorgelegte

Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung:

31.07.07

Dekan:

Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1.Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Claus Schwechheimer

2.Berichterstatter:

Prof. Dr. Gerd Jürgens

„Erfolg ist die Fähigkeit, von einem Misserfolg zum
anderen zu gehen, ohne seine Begeisterung zu
verlieren.“

Winston Churchill

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen der Universität Tübingen in der Abteilung Entwicklungsgenetik von Prof. Dr. Gerd Jürgens unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. Claus Schwechheimer durchgeführt.

Ich möchte mich bei Priv. Doz. Dr. Claus Schwechheimer bedanken, sowohl für die Möglichkeit an diesem Projekt zu arbeiten, als auch für die Freiheit, selbstständig Experimente durchzuführen, sowie für alle wissenschaftlichen und privaten Gespräche.

Für die meist angenehme Laboratmosphäre möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der FG Schwechheimer (den „Schwechis“) bedanken.

Besonderer Dank gilt dabei Luz Irina A. Calderon Villalobos, die mir den Anfang sehr erleichterte und immer unterstützend zur Seite stand. Außerdem für die praktische Durchführung der Microarrayhybridisierung. Für die Bereitstellung seiner Ergebnisse und von ihm geleistete Vorarbeiten zu diesem Projekt, möchte ich mich bei Stephan Knierer bedanken. Ein dickes Dankeschön auch an Caterina Brancato für die Protoplastentransformationen und ihre spontane Hilfsbereitschaft, wenns schnell gehen musste! Danke auch an Michael Weiss für die Bootstrapanalysen. Björn Willige möchte ich für die Westernblotanalysen danken!

Ein extra Dankeschön geht an dieser Stelle an Tanja Sikler und die "guten Geister" in der Gärtnerei, ohne die die Durchführung der Pflanzenarbeiten nicht möglich gewesen wäre.

Für eine wirklich gute Zusammenarbeit und für das ein oder andere „Schwätzchen“ möchte ich mich bei Carola Nill bedanken. Ich werde Dich vermissen!

Auch bei Esther M.N. Dohmann und Erika Isono möchte ich mich für Ihre offenen Ohren für wissenschaftliche wie auch private Probleme bedanken.

Allen meinen Doktorandenkollegen in der ENTGEN gilt mein Dank für Diskussionen in Seminaren und die stete Hilfsbereitschaft.

Für die gute Zusammenarbeit bei den Lehrerfortbildungen und Life Science Seminaren möchte ich mich bei den Mitgliedern der FG Hochholdinger bedanken. Besonders bei Michaela Sauer, die auch bei meinen anfänglichen 2D Experimenten Ansprechpartnerin war.

Privat gilt mein Dank besonders Tina und Meffi, die mir das Skaten beibrachten und mir so ein Ventil für angestauten Frust geboten haben. Und für Ihre Freundschaft! Außerdem natürlich auch Marc und Kimi! Ihr vier habt mich auf dem Boden der Tatsachen gehalten und mir gezeigt, dass das Leben viele schöne Dinge für einen bereithält!

Auch möchte ich meinen Eltern danken für finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums und während meiner Zeit in Tübingen. Danke auch an meinen Bruder, einfach so!

Obwohl er mich nur das letzte Stück dieses Weges begleitet hat, gilt mein besonderer Dank Danny. Danke für deine Liebe, Kochkünste und Normalität!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Inhaltsverzeichnis	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungen	12

1. Einleitung

1.1	Das Ubiquitin Proteasom System	15
1.2	Die E3 Ubiquitin Ligase	18
1.3	Regulierung der Aktivität des SCF E3 Komplexes	20
1.4	COP1 – Beispiel einer E3 Ligase als wichtiger Regulator in Pflanze und Mensch	23
1.5	F-Box Proteine fungieren als Substratrezeptor im SCF E3 Komplex	26
1.6	TIR1 und die AFB F-Box Proteine – Funktion als Auxinrezeptor	28
1.7	Zielsetzungen dieser Arbeit	31

2. Veröffentlichungen

3.1 Zusammenfassung

3.2 Summary

4. Ergebnisse

4.1	Sequenzanalyse der VFB Familie und Vergleich mit verwandten F-Box Proteinen	39
4.2	Expressionsanalysen der <i>VFB</i> Gene anhand des GUS Reporters und mittels RT-PCR	43
4.2.1	Expression von <i>VFB1</i>	43
4.2.2	Expression von <i>VFB2</i>	43
4.2.3	Expression von <i>VFB3</i>	44

4.2.4	Expression von <i>VFB4</i>	44
4.3	Lokalisierungsexperimente in Protoplasten	45
4.4	Interaktionsanalyse mit Komponenten des SCF Komplexes mittels des Hefe-2-Hybridsystems	47
4.5	Suche nach Interaktoren mittels Hefe-2-Hybridscreen	49
4.6	Tandem-Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag	50
4.7	Untersuchung von Insertionslinien für <i>VFB1</i> , <i>VFB2</i> , <i>VFB3</i> und <i>VFB4</i>	
4.7.1	Identifizierung von „Knock-out“ Mutanten	52
4.7.2	Generierung von Doppel- und Dreifachmutanten	54
4.7.3	Vergleich der Dreifachmutante mit dem Wildtyp unter verschiedenen physiologischen Bedingungen	55
4.7.4	Ergänzender Versuchsansatz zum Ausschalten von <i>VFB4</i> – Aktivierung des <i>Ds</i> Elements in Insertionslinien	57
4.8	Herstellung von <i>vfb4</i> (RNAi) und <i>vfb1 vfb2 vfb3 vfb4</i> (miRNA) bzw. <i>vfb4</i> (miRNA) Konstrukten und Analyse der erzeugten transgenen Pflanzen	59
4.9	Microarray – Erstellung von Expressionsprofilen	
4.9.1	Genexpression in <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp	66
4.9.2	Vergleich des Expressionsprofile der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i> <i>vfb4</i> (RNAi) Mutante mit dem einer COP9 Signalosom Mutante	67
4.10	Expression von GUS/GFP Markerproteinen in der <i>vfb1-1 vfb2-1</i> <i>vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Mutante	
4.10.1	Expressionsanalyse von Markern der Auxinantwort in <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	68
4.10.2	Analyse der Expression weiterer Markerlinien in <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	73
4.11	Analyse zur möglichen Komplementation des <i>tir1-1</i> Phänotyps	76

5. Diskussion

5.1	Die VFB F-Box Protein Familie und Ihre Stellung in der C-Subfamilie der F- Box Proteine	78
5.2	Expression der <i>VFB</i> Gene	79
5.3	Lokalisierung der VFB Proteine und die daraus folgende Auswirkung auf deren Funktion	80
5.4	Rolle der VFB Proteine bei der Auxinantwort	81
5.5	VFB vs. CSN – Übereinstimmungen im Expressionsprofil der Mutanten	84
5.6	Biologische Rolle der VFB Proteine	84
5.7	Ausblick	86

6. Material und Methoden

6.1	Material	
6.1.1	Pflanzenmaterial	88
6.1.2	Bakterienstämme	88
6.1.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	89
6.1.3.1	Antibiotika	90
6.1.3.2	Enzyme	90
6.1.3.3	Kits	90
6.1.3.4	Marker	91
6.1.3.5	Membranen	91
6.2	Methoden	
6.2.1	Pflanzenarbeiten	91
6.2.1.1	Sterilisation von Samen und Wachstumsbedingungen	91
6.2.1.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
6.2.1.3	Selektion transgener Pflanzen	92
6.2.1.4	GUS-Färbung	93
6.2.1.5	Transformation von <i>Arabidopsis</i> Protoplasten	93
6.2.1.6	Physiologische Assays	93

6.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	
6.2.2.1 Bakterienkulturen	95
6.2.2.2 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i> Bakterien	95
6.2.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	95
6.2.2.4 PCR Analyse	96
6.2.2.5 Gateway Klonierung	98
6.2.2.6 Topo TA Klonierung	99
6.2.2.7 Klonierung der artifiziiellen miRNA Konstrukte	100
6.2.2.8 Klonierungen für das Hefe-2-Hybridsystem	101
6.2.2.9 RT-PCR Analysen	101
6.2.2.10 Screen von T-DNA Insertionslinien	102
6.2.2.11 Sequenzierungen	103
6.2.2.12 Microarray	104
6.2.3 Biochemische Arbeiten	
6.2.3.1 Proteinextraktion	104
6.2.3.2 SDS-PAGE und Western-Blotanalyse	104
6.2.3.3 Coomassie Färbung	105
6.2.3.4 Tandem-Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag	106
6.2.4 Analysen im Hefe-2-Hybridsystem	108
6.2.4.1 Anzucht von Hefekulturen	108
6.2.4.2 Transformation von Hefezellen	108
6.2.4.3 Screen nach Interaktoren mit dem Hefe-2-Hybridsystem	109
7. Literaturverzeichnis	111
8. Anhang	126
9. Lebenslauf	182

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Abbau eines Proteins mittels des Ubiquitin Proteasom Systems und der Aufbau des 26S-Proteasoms	17
Abb. 2:	Verschiedene E3 Ubiquitin Ligasen	20
Abb. 3:	Vereinfachte Darstellung der Neddylierung und Deneddylierung, sowie der Funktion von CAND1	22
Abb. 4:	Die COP1 E3 Ubiquitin Ligase – Mutantenphänotyp und Rolle bei Mensch und Pflanze	25
Abb. 5:	Funktion von TIR1 bei der Auxinantwort	31
Abb. 6:	Vergleich der Aminosäuresequenz der VFB Proteine	40
Abb. 7:	Verwandtschaftsverhältnisse der VFB Familie zu anderen F-Box Proteinen	42
Abb. 8:	Expressionsstudien zur VFB F-Box Proteinfamilie	44
Abb. 9:	Konfokalmikroskopie von Protoplasten, transformiert mit den verschiedenen <i>VFB</i> Konstrukten	46
Abb. 10:	Interaktion von VFB2 und ASK2 im Hefe-2-Hybridsystem	48
Abb. 11:	Versuch der TAP-Tag Aufreinigung von VFB2	51
Abb. 12:	Analyse von T-DNA Insertionslinien für die <i>VFB</i> Familie	53
Abb. 13:	Phänotyp der <i>vfb</i> Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten	54
Abb. 14:	Wachstum der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 Mutante</i> im Vergleich mit dem Wildtyp	57
Abb. 15:	Schema der RNAi und miRNA Konstrukte	61
Abb. 16:	Analyse von Pflanzen die <i>vfb4</i> (RNAi) und die miRNA Konstrukte exprimieren	62
Abb. 17:	Seitenwurzelwachstum der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen auf IAA	63
Abb. 18:	Gravitationsexperiment mit Columbia, <i>tir1-1</i> und phänotypischen <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	65
Abb. 19:	Analyse der auf Auxin bezogenen GUS/GFP Markerlinien, gekreuzt mit <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	69
Abb. 20:	Analyse des DR5:GUS Konstrukts in den Seitenwurzeln der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	70
Abb. 21:	GUS-Färbung von HS:AXR3/IAA17NT:GUS	

	<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	72
Abb. 22:	Expressionsanalyse der CYCB1:GUS und ARR5:GUS Konstrukte in den <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen	74
Abb. 23:	Auswertung der GUS Färbungen von CYCB1:GUS <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Pflanzen im Auxinexperiment	75
Abb. 24:	RT-PCR Analyse Dex-induzierter pTA:VFB2 (<i>tir1-1</i>) Linien	77
Abb. 25:	Auxinbehandlung von Dexamethason-induzierten Pflanzenlinien	77
Abb. 26:	Klonierungsstrategie der artifiziiellen miRNA Konstrukte	100

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	F-Box Proteine aus <i>Arabidopsis</i> mit Funktion und Substrat, soweit bekannt	27
Tab. 2:	Putative Interaktoren von VFB2 im Hefescreen	49
Tab. 3:	Übersicht der Oligonukleotidkombinationen der hergestellten Konstrukte	97
Tab. 4:	Oligonukleotidkombinationen für RT-PCR Analysen	101
Tab. 5:	Übersicht der Oligonukleotidkombinationen für die Genotypisierung der Insertionslinien	102
Tab. 6:	Im Rahmen des Projektes verwendete Antiseren	126
Tab. 7:	Liste der erstellten und verwendeten Konstrukte	131
Tab. 8:	Liste der in <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Keimlingen induzierten Gene im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia)	144
Tab. 9:	Liste der in der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Col) herabregulierten Gene	156
Tab. 10:	Liste der Gene, die in der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) und der <i>csn4</i> Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia) induziert sind	171
Tab. 11:	Liste der Gene, die in der <i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4</i> (RNAi) und der <i>csn4</i> Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia) herabreguliert sind	174

Abkürzungen

AFB1, 2, 3	AUXIN REZEPTOR F-BOX PROTEIN 1, 2, 3
AFR	ATTENUATED FAR-RED RESPONSE
APC/C	ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME
ASK1, 2	<i>Arabidopsis</i> SKP1 Homolog 1, 2
ATM	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED
AUX/IAA	AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN / INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCED PROTEIN
AXR1	AUXIN-RESISTANCE PROTEIN 1
BTB/POZ	BRIC-A-BRACK, TRAMTRACK and BROAD COMPLEX/POX VIRUS AND ZINC FINGER
CAND1	CULLIN-ASSOCIATED, NEDDYLATION-DISSOCIATED 1
CDD	COP10, DDB1, DET1
CDF1	CYCLING DOF FACTOR 1
CEG	CEGENDUO
CRL	Cullin-RING Ligasen
COI1	CORONATINE-INSENSITIVE 1
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
COP10	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10
DET1	DE-ETIOLATED 1
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
DDB1	DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1
EB	ELONGIN B
EC	ELONGIN C
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Ligase
EBF1, 2	EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1, 2
EID1	EMPFINDLICHER IM DUNKELROTEN LICHT 1
EIN3	ETHYLEN-INSENSITIVE 1
EST	Expressed Sequence Tag

FKF1	FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT F-BOX 1
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HECT	HOMOLOGOUS TO THE E6-AP CARBOXYL TERMINUS
KEN-Box	Substraterkennungsmotiv des APC/C bestehend aus K (Lysin), E (Glutaminsäure) und N (Asparagin)
LKP2	LOV KELCH PROTEIN 2
LRR	Leucine-rich-repeat, Leucin-reiche Domäne
MATH	MEPRIN AND TRAF HOMOLOGY Domäne
MAX2	MORE AXILLIARY BRANCHES 2
NEDD8/RUB1	NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8/ RELATED TO UBIQUITIN 1
ORE9	ORESARA9; früherer Name von MAX2
PT	Phänotyp
RBX1	RING-BOX 1
RCE1	RUB1 CONJUGATING ENZYME 1
RING	REALLY INTERESTING NEW GENE
RGA	REPRESSOR OF <i>ga1-3</i>
SCF	SKP1-CULLIN1-F-Box
SFR2	SENSITIVE TO FREEZING 2
SKP1	SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1
SLY1	SLEEPY 1
SNE	SNEEZY
SON1	SUPPRESSOR OF NIM1
SPA1	SUPPRESSOR OF PHY A 1
TAP	Tandem-affinity purification; Tandem-Affinitäts Reinigung
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TOC1	TIMING OF CAB EXPRESSION 1
TSR	Template Suppression Reagent
UBP	UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGANS
UTR	Untranslated region; Nichttranslatierte Region
VCB	VON-HIPPEL-LINDAU, ELONGIN C, ELONGIN B
VFB	VIER F-BOX PROTEINE

WT	Wildtyp
YFP	Yellow(Gelb)-fluoreszierendes Protein
ZTL	ZEITLUPE

1. Einleitung

1.1 Das Ubiquitin Proteasom System

Eukaryotische Organismen regulieren viele zelluläre Entwicklungsprozesse über den gezielten Abbau von Proteinen durch das 26S-Proteasom. Zu diesen Proteinen gehören Zellzyklusregulatoren, wie z.B. Cycline oder Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen, und Transkriptionsfaktoren (Hershko und Ciechanover, 1998). Das 26S-Proteasom besteht aus zwei 19S-RP Untereinheiten (**R**egulatory **p**article) und dem 20S-CP Partikel (**C**ore **p**article). Am 19S-RP, bestehend aus dem „Lid“ und der „Base“ (Abb. 1), erfolgt die Substraterkennung sowie die Weiterleitung zum 20S-CP. Hier werden die Proteine schließlich in Peptide und weiter in Aminosäuren zerlegt (Yang et al., 2004). Diesem geregelten Abbau von Substraten wird eine Markierung mit dem kleinen Protein Ubiquitin vorausgeschickt. Ubiquitin hat ein Molekulargewicht von 8 kDa und ist in allen Eukaryoten konserviert. Die 16 in *Arabidopsis thaliana* identifizierten Ubiquitin Gene sind gut untersucht und kodieren meist für Vorformen, die noch prozessiert werden müssen, um funktionell zu sein (Callis et al. 1995; Bachmair et al., 2001). Die Art der Ubiquitinbindung ist wegweisend für die nachfolgenden Prozesse. Während die Bindung eines einzelnen Ubiquitinmoleküls mit Endocytose, Histonregulierung, DNA Reparatur und Export aus dem Nukleus in Verbindung gebracht wird (Woelk et al., 2007; DiFiore et al., 2003), folgt auf die Anhängung einer am Lysin 48 verbundenen Polyubiquitinkette der Abbau des Substratproteins durch das 26S-Proteasom (Woelk et al., 2007). Die Konjugation der Ubiquitinkette an das abzubauen Protein wird durch eine Enzymkaskade, bestehend aus E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und E3 (Ubiquitin Ligase) vermittelt. Das E1 Enzym fungiert als Ubiquitin-aktivierendes Enzym und arbeitet unter Energieverbrauch. Durch Hydrolyse von ATP entsteht ein E1-Ubiquitin Zwischenprodukt, in welchem das C-terminale Glycin des Ubiquitins über eine Thioesterbrücke mit dem E1 verbunden ist. In *Arabidopsis* wurden bislang zwei E1 Enzyme identifiziert, die offenbar dieselbe Spezifität besitzen (Hatfield et al., 1997). In tierischen Zellen konnten E1 Enzyme sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert werden. Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass die Ubiquitinierung in beiden genannten Kompartimenten stattfinden kann (Hatfield et al. 1997; Weissman et al., 2001). Das

aktivierte Ubiquitin wird vom E1 zu einem E2, dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym, mittels einer Transesterifizierung übertragen. In *Arabidopsis* existieren 45 E2 und E2-ähnliche Proteine (Bachmair et al., 2001; Vierstra 2003). Das Zwischenprodukt aus E2 und Ubiquitin liefert der E3 Ubiquitin Ligase das Ubiquitin. Durch das E3 wird die Substratspezifität des Prozesses gewährleistet, da es spezifisch das abzubauen Protein erkennt, welches im Zusammenwirken mit dem E2 polyubiquitiniert werden soll. Das Ubiquitin wird dann mittels einer Isopeptidbindung an einem Lysinrest an das Substrat gebunden (Vierstra, 2003). Schließlich wird das mit einer Ubiquitinkette markierte Substrat vom 26S-Proteasom erkannt und in Peptide oder sogar einzelne Aminosäuren (Abb. 1) zerlegt (Cardozo und Pagano, 2004; Schwechheimer und Calderon Villalobos, 2004). Am 19S-RP findet vorher noch die Abspaltung des Ubiquitins durch DUB Enzyme (Deubiquitinierende Enzyme) statt, so dass das Ubiquitinmolekül dem Kreislauf wieder zugeführt werden kann und in weiteren Abbauprozessen seine Funktion erfüllen kann (Vierstra, 2003). In *Arabidopsis* gibt es 32 *DUB* Gene, die in 16 Familien eingeteilt werden können. Drei Mitgliedern der UBP Unterfamilie (**U**biquitin-spezifische **P**roteasen) konnten Funktionen beim Abbau beschädigter Proteine (UBP1 und UB2) und beim Recycling von Ubiquitinketten (UBP14) zugeordnet werden (Yan et al., 2000; Vierstra 2003).

Insgesamt kodieren im *Arabidopsis thaliana* Genom mehr als 1400 Gene für Proteine, die im Ubiquitin Proteasom System wirken. Prozentual gesehen hat dieser Prozess also einen Anteil am Genom von ungefähr 5%. Dies unterstreicht die große Rolle des Ubiquitin Proteasom Systems bei der Regulation von verschiedenen Mechanismen in Pflanzen (Bachmair et al., 2001; Vierstra, 2003; Smalle und Vierstra, 2004; Schwechheimer und Schwager, 2004).

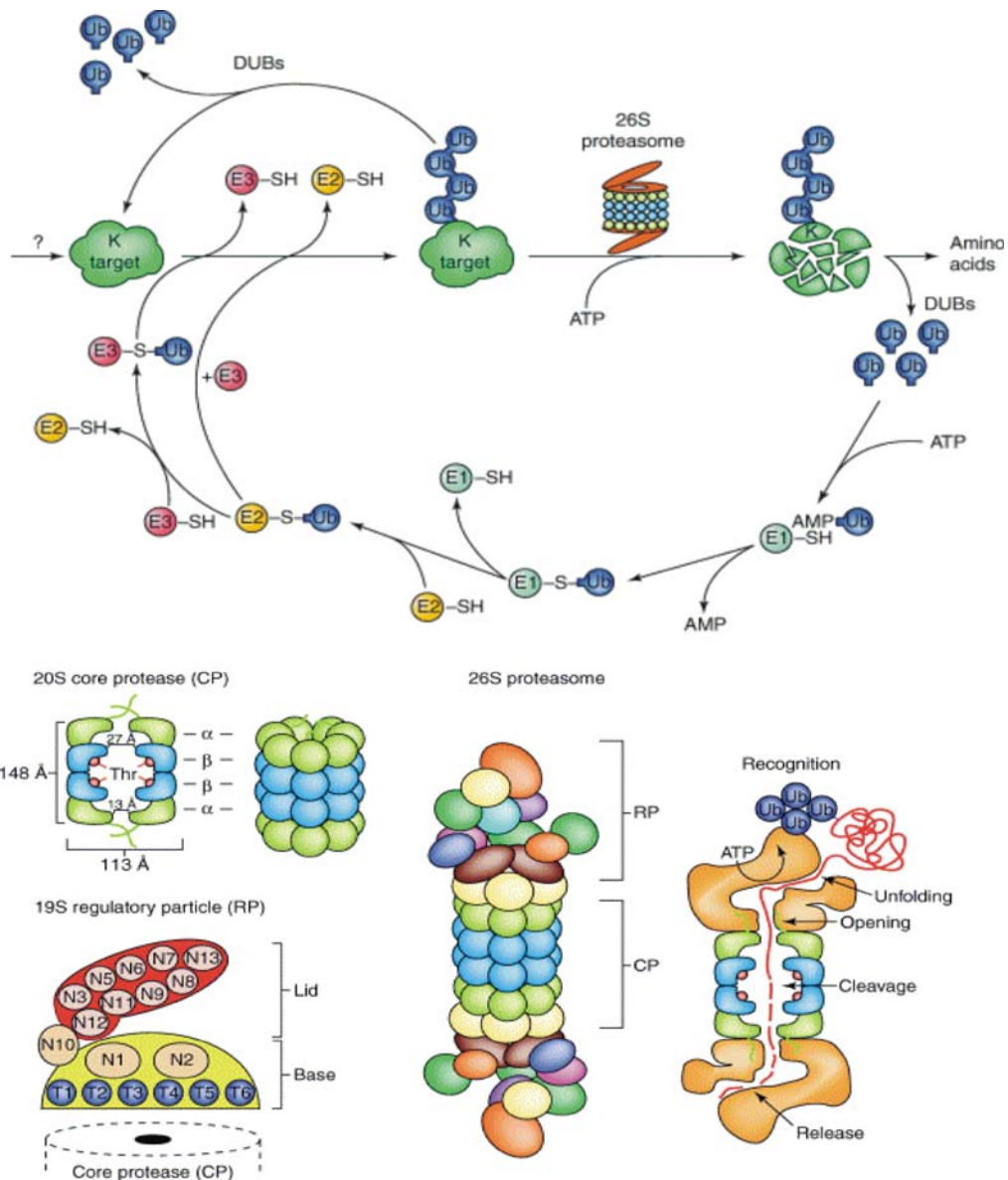


Abb. 1 Abbau eines Proteins mittels des Ubiquitin Proteasom Systems und der Aufbau des 26S-Proteasoms. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bindet unter Energieverbrauch (ATP) das Ubiquitinmolekül. Darauf folgt mittels einer Transesterifizierung die Bindung des Ubiquitins an das E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym). Durch das Zusammenwirken von E2 und dem E3, der Ubiquitin Ligase, wird das Ubiquitin in Form einer Polyubiquitinkette an das abzubauen Substrat vermittelt. So kann das Substrat vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden. Ubiquitin wird mittels der DUB Proteine (Deubiquitinierende Proteine) abgespalten und für neue Abbauprozesse benutzt. Abbildung aus Vierstra, 2003.

1.2 Die E3 Ubiquitin Ligasen

Die Spezifität des Proteinabbaus wird durch die E3 Ubiquitin Ligase gewährleistet. Diese kommen in verschiedenen Formen vor:

Eine große Gruppe von E3 Ligasen enthalten eine Cullin Untereinheit, die sogenannten Cullin-Ring-Ligasen (CRL). Für diese Arbeit am wichtigsten sind die CRLs mit einer Cullin1 Untereinheit, die sogenannten SCF Komplexe (**S**KP1-**C**ullin1-**F**-Box Protein). An das Cullin binden sowohl ein RING-H2 Protein RBX1 (RING-BOX 1) als auch SKP1 (SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1). Letzteres fungiert als Brücke zum Substratrezeptor dieses Komplexes. In *Arabidopsis* gibt es 21 SKP1 ähnliche Proteine, die ASK (*Arabidopsis* SKP1) Proteine (Farras et al., 2001; Gagne et al., 2002; Liu et al., 2004). Der SCF Komplex besitzt als Substratrezeptor ein F-Box Protein (Cardozo und Pagano, 2004; Gagne et al., 2002). Diese stellen mit Ihren 694 Mitgliedern die größte Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana* dar. Damit wird eine Vielzahl verschiedener SCF Komplexe ermöglicht, die eine bislang unbekannte Anzahl von Proteinen zum Abbau rekrutieren könnten. Bislang gut charakterisiert sind der SCF^{TIR1} Komplex, dessen F-Box Protein TIR1 gleichzeitig als Auxinrezeptor fungiert (Dharmasiri et al., 2005a, Kepinski und Leyser 2005), der SCF^{COI1} (Ren et al., 2005), SCF^{SLY1} (Fu et al., 2004) und der SCF^{EBF1/EBF2} (Guo and Ecker, 2003) Komplex.

VCB-Ligasen (**V**on-Hippel Lindau-Elongin **C**, -Elongin **B** Komplex) enthalten Cullin 2 oder 5 als Untereinheit, konnten aber in *Arabidopsis* bislang nicht gezeigt werden.

Eine weitere Gruppe der CRLs bilden die BTB/POZ (**B**RIC-A-**B**RACK, **T**RAMTRACK and **B**ROAD COMPLEX/**P**OX VIRUS AND **Z**INC FINGER) E3s mit Cullin 3 als Untereinheit (van den Heuvel, 2004). Die Funktion, die SKP1 und das F-Box Protein im SCF Komplex erfüllen, nimmt hier ein Protein ein. Die MATH (**M**EPRIN AND **T**RAF **H**OMOLOGY) Domäne dient der Substraterkennung (Abb. 2). In *Arabidopsis* wurde bislang nur dem BTB/POZ Protein ETO1 der Abbau von Enzymen der Ethylenbiosynthese, ACS5 und ACS9, zugeschrieben (Wang et al., 2004).

Eine erste Cullin 4 E3 Ligase konnte letztes Jahr in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Chen et al., 2006). Hier interagiert das Cullin ebenfalls mit RBX1 und zusätzlich mit dem CDD Komplex, bestehend aus COP10 (CONSTITUTIVE

PHOTOMORPHOGENIC 10), DET1 (DE-ETIOLATED 1) und DDB1 (DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1). Zusätzlich interagiert diese Cullin 4 CRL mit COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) und reguliert so den COP1-abhängigen Abbau von Transkriptionsfaktoren der Photomorphogenese (Yanagawa et al., 2004; Chen et al., 2006).

Eine E3 Ligase mit einer Cullin-ähnlichen Untereinheit stellt der APC/C (ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME) Komplex dar. Die zu Cullin homologe Untereinheit ist hier APC2 (Capron et al., 2003a und b). Des Weiteren enthält der aus 11 Untereinheiten bestehende Komplex auch ein RBX1 Homolog, APC11. Als Substratrezeptor fungieren hier Cdc20/FIZZY und Cdh1/FIZZY-related (Harper et al., 2002). Abzubauende Substrate enthalten meist ein D-Box (Destruction Box) Motiv, welches erstmals beim mitotischen Cyclin B1 entdeckt wurde (Glotzer et al., 1991). Manchen Substraten gemeinsam ist auch ein weiteres Motiv, die sogenannte KEN-Box (Pfleger und Kirschner, 2000). Genetisch gut untersucht sind in *Arabidopsis* die APC2 Untereinheit und APC3 (CDC27/HOBBIT) (Capron et al., 2003b; Willemsen et al., 1998; Blilou et al., 2002).

Schließlich gibt es noch HECT (HOMOLOGOUS TO THE E6-AP CARBOXYL TERMINUS) Domänen E3s, denen in *Arabidopsis* bislang nur eine Funktion bei der Trichomentwicklung zugeordnet werden konnte (Bates und Vierstra, 1999; Downes et al., 2003; El Refy et al., 2003). Im *Arabidopsis* Genom sind 7 HECT Domänen Proteine annotiert.

Neben der Familie der F-Box Proteine mit 694 Mitgliedern bilden die RING (REALLY INTERESTING NEW Gene) E3s mit 480 Mitgliedern eine der größten Proteinfamilien in *Arabidopsis* (Smalle und Vierstra, 2004). Die RING Domäne ähnelt dem Zink-Finger Motiv und besteht aus vier Paaren von Liganden, die zwei Zink Ionen binden. Viele Mitglieder dieser Familie könnten eine Rolle beim Abbau von Proteinen spielen (Kosarev et al., 2002). Bislang wurde eine Beteiligung von RING Proteinen unter anderem bei der Photomorphogenese, der Auxinantwort oder auch der Selbstinkompatibilität nachgewiesen (Holm et al., 2002; Osterlund et al., 2000; Xie et al., 2002; Seo et al., 2003 und 2004; Stone et al., 2003).

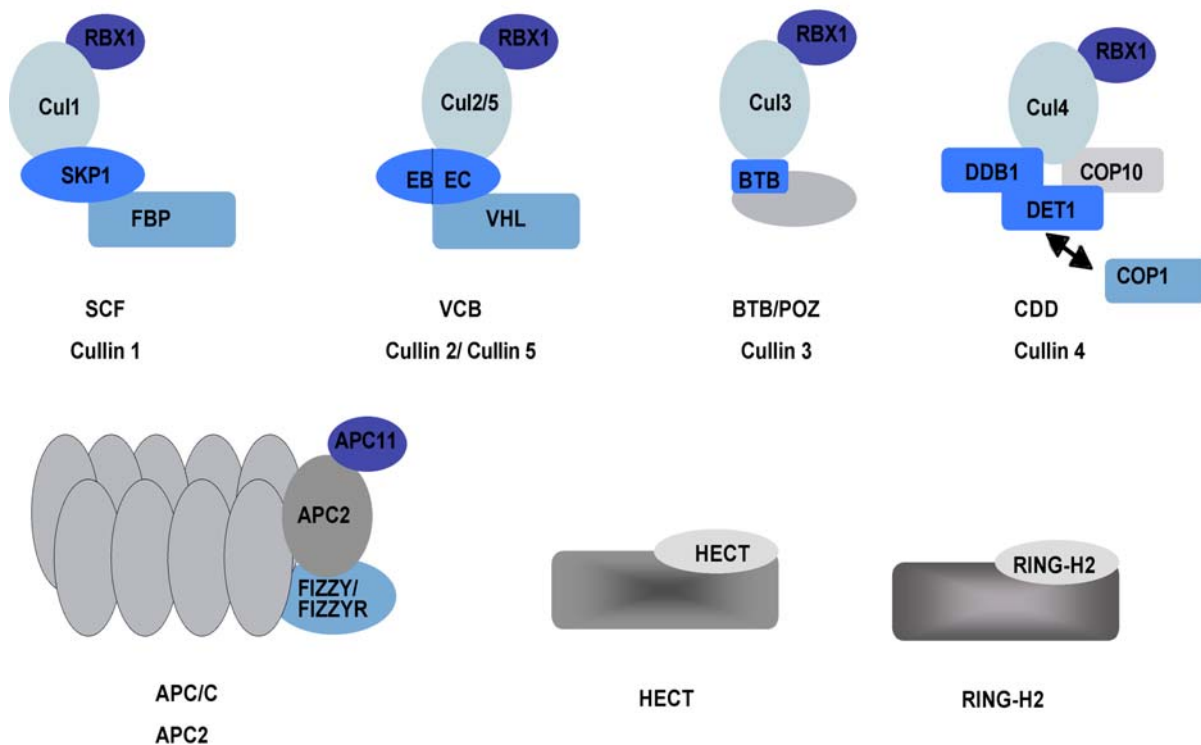


Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedener E3 Ubiquitin Ligasen (SCF Komplex, VCB Komplex, BTB/POZ E3 Ligase, CDD Komplex der mit COP1 interagiert und der APC/C Komplex) mit der jeweiligen Cullin Untereinheit (Cullin1, Cullin2/5, Cullin3 und Cullin4) bzw. Cullin-ähnlichen Untereinheit (APC2), zusätzlich HECT und RING E3 Ligasen.

1.3 Regulierung der Aktivität des SCF E3 Komplexes

Der Abbau von Proteinen mittels der E3 Ubiquitin Ligasen reguliert gezielt verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse. Somit muss auch die Aktivität der SCF E3s einem definierten Regulierungsprozess unterliegen. Dies geschieht mit Hilfe eines kleinen Moleküls, dem Ubiquitin ähnlich, NEDD8/RUB1 (**NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8/RELATED TO UBIQUITIN 1**), das im Zusammenspiel mit dem COP9 Signalosom (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 9; kurz: CSN) und CAND1 (CULLIN-ASSOCIATED, NEDDYLLATION-DISSOCIATED 1) die Aktivität der E3 Ligasen beeinflusst. Das E1-ähnliche Enzym AXR1 fungiert als NEDD8/RUB1-aktivierendes Enzym, RCE1 (RUB1 CONJUGATING ENZYME 1) als NEDD8/RUB1 konjugierendes

Enzym und beide zusammen vermitteln so die Konjugation des Proteins an die Cullin Untereinheiten (Wu et al., 2005; Sulfan und Ohh, 2006; Wimuttisuk und Singer, 2007; Chen et al., 2006). Dieser Prozess wird als Neddylierung/Rubylierung bezeichnet und ermöglicht die Bildung eines aktiven E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (Abb. 3). In *Arabidopsis* konnten bislang einige Mutanten und transgene Pflanzen der an dieser Modifizierung beteiligten Proteine untersucht werden (Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993; del Pozo und Estelle, 1999; del Pozo et al., 1998 und 2002; Tiryaki und Staswick, 2002; Dharmasiri S. et al., 2003;). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Rolle bei der Auxinantwort gelegt.

Neddylierte, aktive SCF Komplexe sind scheinbar instabil und müssen deneddyliert werden, bevor sie selbst abgebaut werden (Wu et al., 2005). Der Multiproteinkomplex CSN erfüllt die Aufgabe, den aktiven, aber instabilen SCF Komplex zu kontrollieren, indem die NEDD8/RUB1 Untereinheit abgespalten und recycelt wird. Dies wird durch die Untereinheit 5 des CSN vermittelt, einer Isopeptidase. Das CSN selbst besteht aus 8 Untereinheiten und weist eine hohe Homologie zum Lid des 19S-RP Teil des 26S-Proteasoms auf (Dohmann et al., 2005; Schwechheimer und Deng, 2001). In *Arabidopsis* konnte eine direkte Interaktion des CSN mit den E3 Ligasen SCF^{TIR1}, SCF^{COI1} und SCF^{UFO} gezeigt werden (Schwechheimer et al., 2001; Feng et al., 2003; Wang et al., 2003). *csn* Mutanten weisen einen starken bis letalen Phänotyp auf, der auf die negative Beeinflussung hunderter E3 Aktivitäten zurückgeführt werden kann (Feng et al., 2004).

Nach der Deneddylierung/Derubylierung durch CSN5, der Abspaltung von NEDD8/RUB1, kann nun der negative Regulator CAND1 an das unmodifizierte Cullin binden und so die Dissoziierung von SKP1 und dem F-Box Protein vom Cullin veranlassen (Bornstein et al., 2006; Feng et al., 2004) (Abb. 3). Dieser Prozess ist notwendig für die normale Funktion von SCF Komplexen. Des Weiteren ist dieser Prozess abhängig von der vorhandenen Menge an F-Box Protein bzw. F-Box Protein und Substrat. Eine *Arabidopsis cand1* Mutante weist Defekte in der vom SCF^{TIR1} vermittelten Auxinantwort auf, zeigt aber nur einen vergleichsweise schwachen Phänotyp, so dass angenommen wird, das CAND1 nicht generell für die Funktion der E3 Ligasen notwendig ist (Cheng et al., 2004).

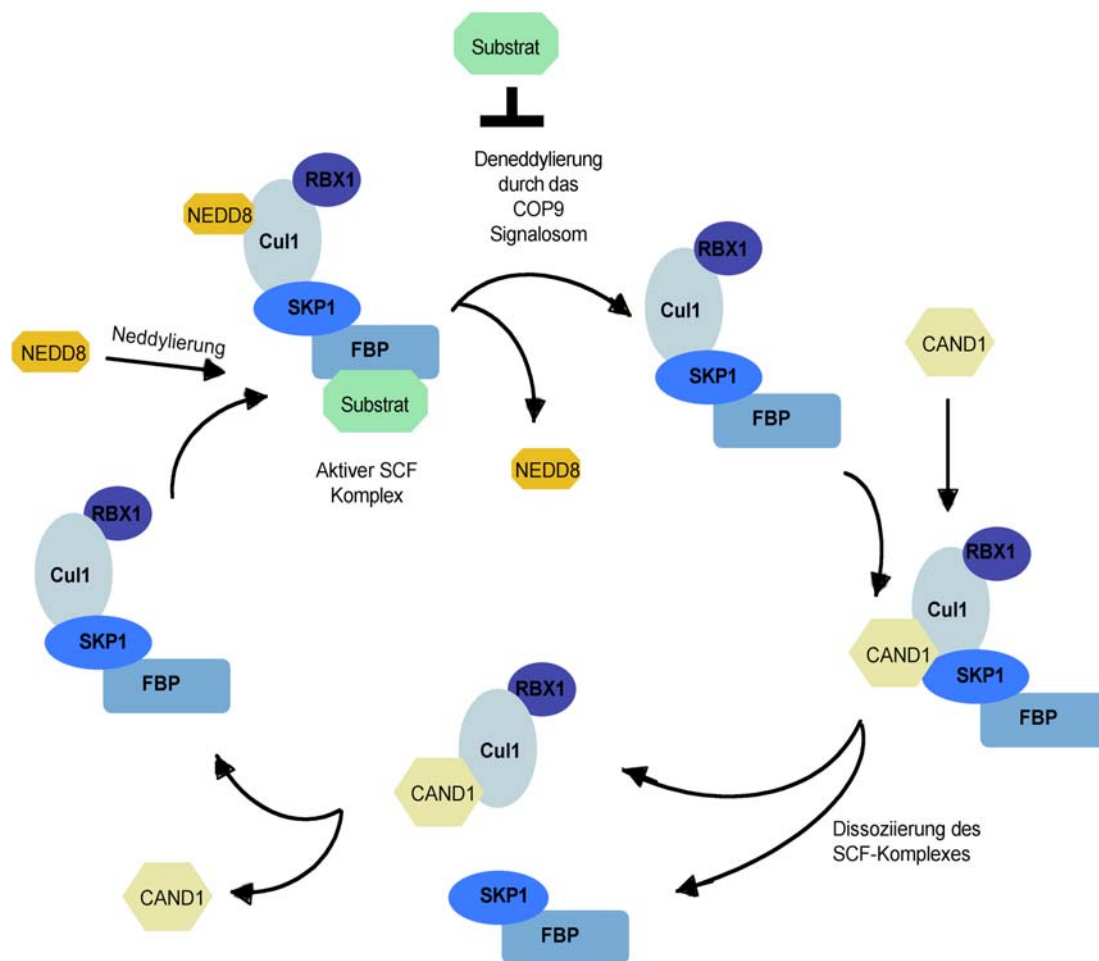


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Neddylierung und Deneddylierung, sowie der Funktion von CAND1 (nach Feng et al., 2004 und Bornstein et al., 2006). Der SCF Komplex wird durch die Modifizierung mit NEDD8 aktiv. Die Deneddylierung erfolgt durch die Untereinheit 5 des CSN, kann aber durch vorhandenes Substrat blockiert werden. An das deneddylierte Cullin kann CAND1 binden und so die Dissoziation des SCF Komplexes veranlassen.

1.4 COP1 – Beispiel einer E3 Ligase als wichtiger Regulator in Pflanze und Mensch

Dass der Abbau von Proteinen über das 26S-Proteasom wichtig ist, impliziert allein schon die Anzahl von Genen, die für Komponenten dieses Abbauweges bei Pflanze, Mensch und anderen Eukaryoten kodieren. Ein Beispiel einer in verschiedenen Organismen konservierten E3 Ubiquitin Ligase ist COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1). Diese E3 Ligase wurde zunächst in *Arabidopsis* Mutanten entdeckt, die bei Anzucht im Dunklen den Phänotyp lichtgewachsener Keimlinge aufweisen (Abb. 4 A) (Deng et al., 1992). Das COP1 Protein weist neben einer RING Domäne eine „coiled-coil“ Domäne und eine WD40 Domäne auf, die beide Protein-Protein Interaktionen ermöglichen können. Während COP1 im Dunklen im Nukleus vorkommt (Deng et al., 1992; von Arnim und Deng, 1994), ist es in lichtgewachsenen Keimlingen im Zytoplasma zu finden und wandert, wenn Dunkelkeimlinge dem Licht ausgesetzt werden, scheinbar vom Nukleus ins Zytoplasma. Der konstitutive Lichtphänotyp der *cop1* Mutanten (Abb. 4 A) und die lichtabhängige Lokalisierung des Proteins deuteten auf eine Rolle bei der Lichtantwort der Pflanze, der Photomorphogenese hin. Tatsächlich ist die Rolle von COP1 sehr komplex, da das Protein in der Lage ist, mit mehreren Schlüsselproteinen der Photomorphogenese zu interagieren. Ein positiver Regulator dieses Prozesses, der bZIP Transkriptionsfaktor HY5 und sein Homolog HYH werden von COP1 im Dunklen abgebaut (Ang et al., 1998; Osterlund et al., 2000; Holm et al., 2002). Des Weiteren ist COP1 in der Lage, mit den Rotlichtrezeptoren phy A und phy B zu interagieren (Seo et al., 2004). Studien der Interaktion von phy A und COP1 zeigten, dass die Proteine in sogenannten „Nuclear speckles“ kolokalisieren und phy A von COP1 ubiquitiniert wird und so dem Abbau durch das Proteasom zugeführt wird (Seo et al., 2004). Auf den ersten Blick erschien dies unwahrscheinlich, da COP1 im Dunklen im Nukleus lokalisiert ist und phy A im Zytoplasma, die beiden Proteine also in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen. Auf ein Lichtsignal hin wandert phy A jedoch in den Nukleus und wird dort von COP1 polyubiquitiniert. COP1 wandert gleichzeitig auf den Lichtreiz hin, aus dem Nukleus ins Zytoplasma und modifiziert dort noch vorhandenes phy A (Abb. 4 B und C) (Seo et al., 2004).

Auch die Blaulichtrezeptoren CRY1 und CRY2 (CRYPTOCHROME 1 und 2) interagieren mit COP1, regulieren dessen Aktivität und ermöglichen so erst die Antwort auf Blaulicht (Wang et al., 2001). Der bHLH Transkriptionsfaktor HFR1

(LONG HYPOKOTYL IN FAR-RED 1) (Kim et al., 2002; Yang et al., 2005) spielt sowohl eine Rolle bei der von PHY A vermittelten Antwort auf dunkelrotes Licht, als auch bei der Blaulichtantwort durch die Cryptochrome eine Rolle und stellt ein weiteres Substrat von COP1 dar. Auch eine Interaktion von COP1 mit SPA1 (SUPPRESSOR OF PHY A 1) über die „coiled-coil“ Domäne konnte gezeigt werden (Hoecker et al., 1998). SPA1 reguliert so die Aktivität der E3 Ligase gegenüber deren Substraten HY5 (Saijo et al., 2003) und LAF1 ((LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1) (Seo et al., 2003). COP1 ist also nachweislich unentbehrlich für die normale Reaktion der Pflanze auf verschiedene Lichtqualitäten.

Bekannt war, dass COP1 *in vivo* in einem ca. 700 kD großem Komplex zu finden ist (Saijo et al., 2003; Yi und Deng, 2005), jedoch wurde in einem Komplex aktives COP1 zuerst am humanen Homolog nachgewiesen (Wertz et al., 2004). Dort baut der DCX^{hDET1hCOP1} Komplex den protoonkogenen Transkriptionsfaktor c-JUN ab und verhindert so die Entstehung von Tumoren. Rund 81% Prozent aller Brustkarzinome weisen eine signifikante Überexpression von COP1, zusammen mit einer drastischen Verminderung des COP1 Substrates p53 auf (Dornan et al., 2004). Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die Regulation von COP1 und von p53 findet durch Phosphorylierung durch ATM (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED) statt. Die ATM Kinase signalisiert der Zelle durch ionisierende Strahlung entstandene Doppelstrangbrüche der DNA und phosphoryliert daraufhin p53, welches dadurch stabilisiert wird. Gleichzeitig phosphoryliert ATM COP1, welches daraufhin vom Nukleus ins Zytoplasma wandert, sich selbst ubiquitiniert und daher abgebaut wird (Shiloh et al., 2004; Dornan et al., 2006). Diese durch Strahlung verursachte Relokation von COP1 ist eine erstaunliche Parallele zur durch Licht angetriebenen Wanderung von COP1 aus dem Nukleus ins Zytoplasma bei Pflanzen (Abb. 4 B). Das Vorhandensein eines Komplexes mit COP1 als Untereinheit wurde in Pflanzen schließlich auch gezeigt. Hier ist COP1 in der Lage mit dem CDD Komplex, einer Cullin 4 Ubiquitin Ligase zu interagieren (Yanagawa et al., 2004; Chen et al., 2006), um so die Photomorphogenese zu regulieren (Chen et al., 2006). Somit ist die COP1 Ubiquitin Ligase in verschiedenen Organismen an lebenswichtigen Prozessen in ähnlicher Weise beteiligt, was die Bedeutung des

konservierten Proteinabbauweges durch das Ubiquitin Proteasom System noch unterstreicht.

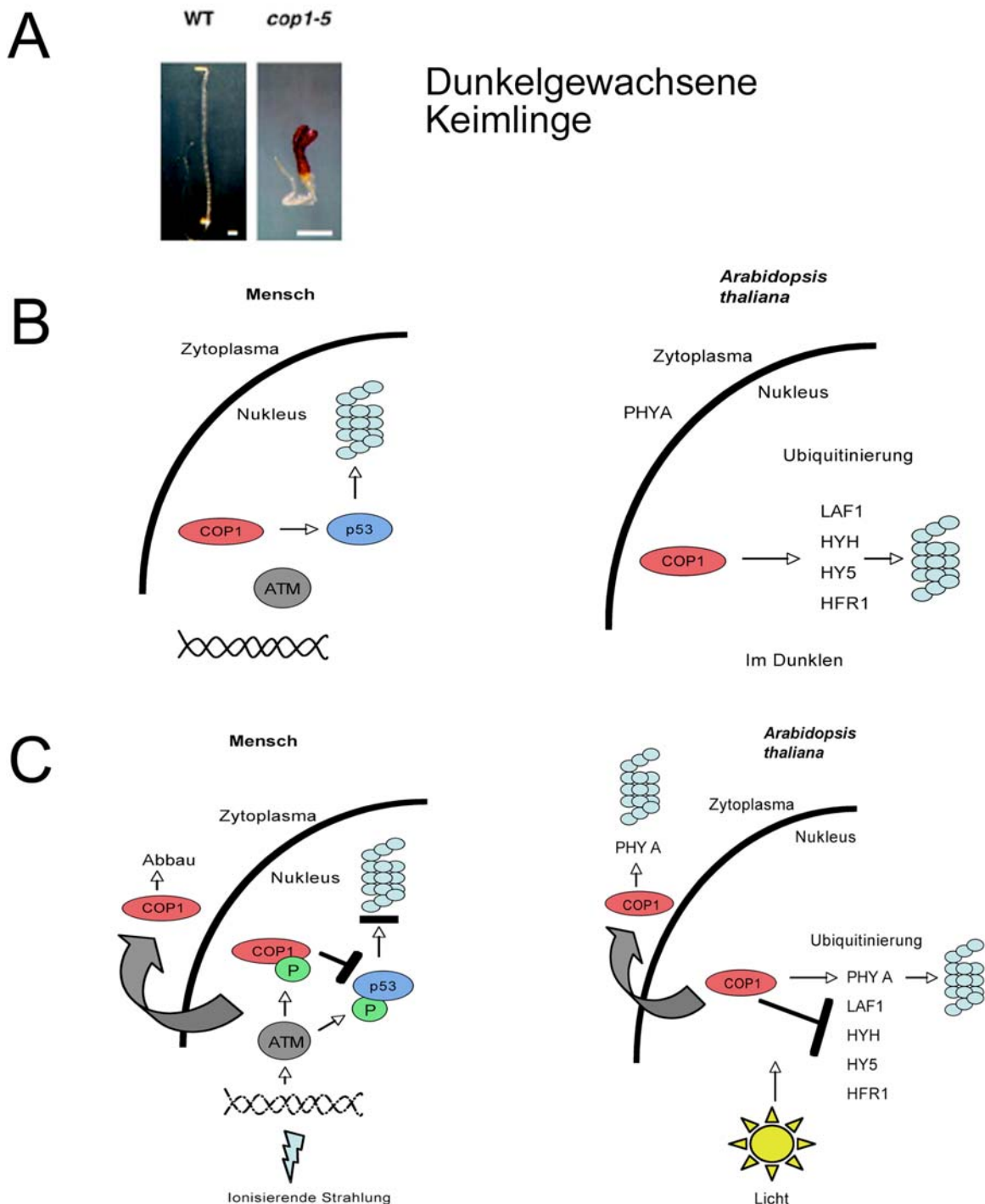


Abb. 4: Die COP1 E3 Ubiquitin Ligase – Mutantenphänotyp und Rolle bei Mensch und Pflanze.

(A) Dunkelgewachsene Keimlinge von Wildtyp und *cop1-5* im Vergleich. Die *cop1-5* Pflanzen weisen einen konstitutiven Lichtphänotyp auf. Abbildung aus Stacey et al., 2000. (B) und (C) COP1 bei Mensch und *Arabidopsis thaliana*. (B). COP1 stellt beim Menschen eine der E3 Ligasen dar, die den Tumorsuppressor p53 ubiquitinieren, welcher so vom 26S-Proteasom abgebaut werden kann. Bei *Arabidopsis* ist COP1 im Dunklen im Nukleus lokalisiert und ubiquitiniert dort verschiedene

Transkriptionsfaktoren, die anschließend vom Proteasom abgebaut werden. (C) In beiden Organismen findet eine Relokalisierung von COP1 aus dem Nukleus ins Zytoplasma in Antwort auf ionisierende Strahlung bzw. ein Lichtsignal hin statt. Beim Mensch wird COP1 auf ionisierende Strahlung hin von ATM phosphoryliert, wandert daraufhin ins Zytoplasma, ubiquitiniert sich selbst und wird abgebaut. Der Tumorsuppressor p53 wird ebenfalls von ATM phosphoryliert und somit stabilisiert. Bei der Pflanze wandert COP1 auf ein Lichtsignal hin aus dem Nukleus. Ein Substrat in beiden Kompartimenten stellt PHY A dar. Andere Substrate werden von dieser E3 Ligase nur bei Dunkelheit im Nukleus ubiquitiniert.

1.5 F-Box Proteine fungieren als Substratrezeptor im SCF E3 Komplex

Beinahe 5% des *Arabidopsis* Genoms kodieren für Proteine, die dem Ubiquitin Proteasom Abbauweg zugeordnet werden können (Bachmair et al., 2001; Vierstra, 2003). Bei Vergleichen mit dem Hefegenom fällt die Erhöhung der Komponenten der SCF-Typ E3 Ligasen auf. Gegenüber SKP1 in Hefe stehen *Arabidopsis thaliana* bereits einundzwanzig verschiedene homologe Gene zur Verfügung (Vierstra, 2003). Besonders auffällig ist jedoch die immense Anzahl an F-Box Proteinen im *Arabidopsis* Genom. Beinahe 2 % der Gene kodieren für rund 694 F-Box Proteine im Gegensatz zu nur elf in *Saccharomyces* (Vierstra, 2003). Dies bietet der Pflanze eine riesige Anzahl an Kombinationen für SCF-Typ E3 Ubiquitin Ligasen und somit zahlreiche mögliche Substrate, die auf diesem Weg abgebaut werden könnten. Von dieser immens hohen Anzahl an F-Box Proteinen sind bis zum heutigen Tag allerdings nur wenige untersucht und konnten einer bestimmten Funktion in *Arabidopsis* zugeordnet werden. Eine Auflistung dieser bekannten F-Box Proteine findet sich in Tab. 1 zusammen mit ihrer Funktion und, falls bekannt, dem zugehörigen abzubauenem Substrat.

Tab. 1: F-Box Proteine aus *Arabidopsis* mit Funktion und Substrat, soweit bekannt.

F-Box Protein	Funktion bei	Substrat	Literaturnachweis
AFB1,2,3	Auxinantwort, Auxinrezeptor	AUX/IAAs	(Dharmasiri et al., 2005b)
AFR	Phytochrom A vermittelte Lichtantwort	Unbekannt	(Harmon und Kay, 2003)
COI1	Jasmonsäuresignalweg	RPD3b	(Devoto et al., 2002) (Devoto et al., 2005)
CEG	Entwicklung von Seitenwurzeln	Unbekannt	(Dong et al., 2006)
EBF1,EBF2	Ethylensignalweg	EIN3	(Guo and Ecker, 2003) (Potuschak et al., 2003) (Gagne et al., 2004) (Binder et al., 2007)
EID1	Photomorphogenese	Unbekannt	(Dieterle et al., 2001) (Marrocco et al., 2006)
FBP7	Translation	Unbekannt	(Calderon et al., 2007)
FKF1/LKP2	Circadiane Rhythmik	CDF1	(Imaizumi et al., 2005a)
ORE9/MAX2	Seneszenz	Unbekannt	(Woo et al., 2001) (Stirnberg et al., 2002)
SKP2;1	Zellzyklusregulation	E2Fc	(del Pozo et al., 2002) (del Pozo et al., 2006)
SLEEPY1, SNEEZY	Gibberellinsäureantwort	RGA	(Dill et al., 2004) (Fu et al., 2004) (Strader et al., 2004)
SON1	Pathogenabwehr	NIM1	(Kim and Delaney, 2002)
TIR1	Auxinrezeptor, Auxinantwort	AUX/IAAs	(Gray et al., 2001) (Dharmasiri et al., 2005a) (Kepinski and Leyser,

UFO	Blütenentwicklung	Unbekannt	2005) (Wang et al., 2003)
ZTL	Zirkadiane Rhythmik	TOC1	(Kevei et al., 2006) (Han et al., 2004) (Kim et al., 2003) (Mas et al., 2003)

Identifiziert wurden die F-Box Proteine anhand ihrer N-terminalen F-Box Domäne, mittels derer die Bindung an SKP1 stattfindet, welche die Einbindung des F-Box Proteins in einen SCF Komplex ermöglicht. Zur Substraterkennung und Bindung dienen verschiedene C-terminale Domänen. Die häufigsten C-Termini enthalten Leucin-reiche Regionen (LRR) oder KELCH-Domänen, bei Pflanzen weniger häufig sind WD-40 Domänen, Armadillo und Tetratricopeptidrepeats (Gagne et al., 2002).

Am besten untersucht ist die sogenannte C-Subfamilie der F-Box Proteine, deren bekannte Mitglieder vor allem in Hormonregulationswegen fungieren. Das bislang am besten verstandene F-Box Protein dieser C Subfamilie ist TIR1 (Transport inhibitor response 1) und seine Homologen, die AFB F-Box Proteine (Auxin Rezeptor F-Box Proteine 1, 2 und 3) (Dharmasiri et al., 2005 a und b; Kepinski und Leyser, 2005). Neben der Funktion von F-Box Proteinen in SCF-Komplexen sind in tierischen Zellen inzwischen auch F-Box Proteine bekannt, die davon unabhängige Aufgaben erfüllen (Hermand et al., 2006).

1.6 TIR1 und die AFB F-Box Proteine – Funktion als Auxinrezeptor

Einzigartig ist bislang die Funktion der F-Box Proteine TIR1 und AFB1 bis 3 als Substratrezeptor einer E3 Ligase und gleichzeitig als Rezeptor für das pflanzliche Hormon Auxin (Kepinski und Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005a). Diese F-box Proteine sind der C-Subfamilie der F-box Proteine zugeordnet und bestehen aus der N-terminalen F-box Domäne und 18 Leucin-reichen Regionen (LRR), welche der Substraterkennung dienen (Gagne et al., 2002; Tan et al., 2007). Drei der LRRs (LRR2, LRR12 und LRR14) bilden die Bindestelle für Auxin und die abzubauenen Substrate, die AUX/IAA Proteine. Im Loop des LRR2 wurde zusätzlich ein

Inositolhexakisphosphat entdeckt, welches bei der Bindung von Auxin als Kofaktor fungieren mag (Tan et al, 2007).

In einem Mutantenscreen für Auxininhibitorresistenz wurde zunächst die *tir1-1* Mutante identifiziert und als defizient in Auxin regulierten Prozessen wie Hypokotylwachstum und Seitenwurzelbildung beschrieben (Ruegger et al., 1998). Die Überexpression von TIR1 in Pflanzen führt zu einer gesteigerten Auxinantwort, inklusive erhöhter Expression Auxin-abhängiger Gene und morphologischen Anpassungen in Keimlingen, ähnlich denen einer Behandlung mit Auxin (Gray et al., 1999). Eine genetische Interaktion mit AXR1, einem E1-verwandtem Enzym, wurde aufgrund der überlappenden Funktionswege postuliert (Ruegger et al., 1998). Zusammen deutete dies auf eine Funktion im Ubiquitin Proteasom System hin und darauf, dass eine gezielte Auxinantwort über TIR1 reguliert werden könnte. Das Gen wurde kloniert und TIR1 aufgrund der Verwandtschaft zum Hefe F-Box Protein Grr1p und dem humanen SKP2 als F-Box Protein identifiziert (Ruegger et al., 1998). Die physische Interaktion zwischen TIR1 und den *Arabidopsis* Homologen zu SKP1, ASK1 und ASK2, wurde gezeigt und so die Existenz des SCF^{TIR1} Komplexes in *Arabidopsis* bewiesen (Gray et al., 1999).

Parallel wurde für Transkriptionsregulatoren der Auxinantwort, die AUX/IAA Proteine, eine Regulierung über den geregelten Proteinabbau nachgewiesen (Worley et al., 2000; Reed, 2001). Die Familie der AUX/IAA Proteine, bestehend aus 29 Mitgliedern, reguliert die Entwicklung der Pflanze und die Auxin-abhängige Genexpression (Overvoorde et al., 2005). Für diese Funktion ist der schnelle Abbau der Proteine mittels des Ubiquitin Proteasom Systems erforderlich. Den AUX/IAA Proteinen gemeinsam sind vier konservierte Domänen mit unterschiedlicher Funktion (Reed, 2001). Während die Domäne I wahrscheinlich Transkriptionsrepression vermittelt (Tiwari et al., 2004), ist die Domäne II für die Stabilität des Proteins verantwortlich. Mittels der Domänen III und IV findet eine Homo- oder Heterodimerisierung mit AUX/IAA Proteinen oder eine Heterodimerisierung mit ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) Proteinen statt. ARF Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die an Auxin-response Elemente (AuxRE) im Promotor Auxininduzierter Gene binden und die Expression dieser fördern. Durch die Heterodimerisierung mit AUX/IAA Proteinen wird die Expression dieser Gene unterdrückt. Bei einem Abbau der AUX/IAA Proteine können die ARFs

homodimerisieren und die Transkription der Auxininduzierten Gene kann stattfinden (Reed, 2001).

SCF^{TIR1} ist in der Lage über die Domäne II mit den AUX/IAA Proteinen zu interagieren, was zum Abbau der AUX/IAs durch das Ubiquitin Proteasom führt (Gray et al., 2001). Mutationen in dieser Domäne haben einen stabilisierenden Einfluß auf AUX/IAA Proteine. Beispiele wären hier das BODENLOS Protein (IAA 12) oder AXR3 (IAA17) (Weijers et al., 2005; Gray et al., 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Auxin die Interaktion zwischen TIR1 und dem AUX/IAA verstärkt und so auch der Abbau der AUX/IAA Proteine durch den SCF^{TIR1} Komplex verstärkt wird (Gray et al., 2001) (Abb. 5).

Trotz der nachweisbar wichtigen Funktion von TIR1 zeigt die *tir1-1* Mutante nur einen milden Phänotyp und kann auf Auxin reagieren (Ruegger et al., 1998). Dies beruht auf der redundanten Funktion von TIR1 und seinen verwandten F-Box Proteinen AFB1, AFB2 und AFB3. Die in der Folge generierte Quadrupelmutante ist Auxin insensitiv und besitzt einen starken Embryophänotyp, der dem von Mutanten wie *bodenlos* und *monopteros* ähnelt (Dharmasiri et al., 2005b). Ob weitere F-Box Proteine eine derartige Stellung bei Hormonantworten einnehmen, bleibt zu klären.

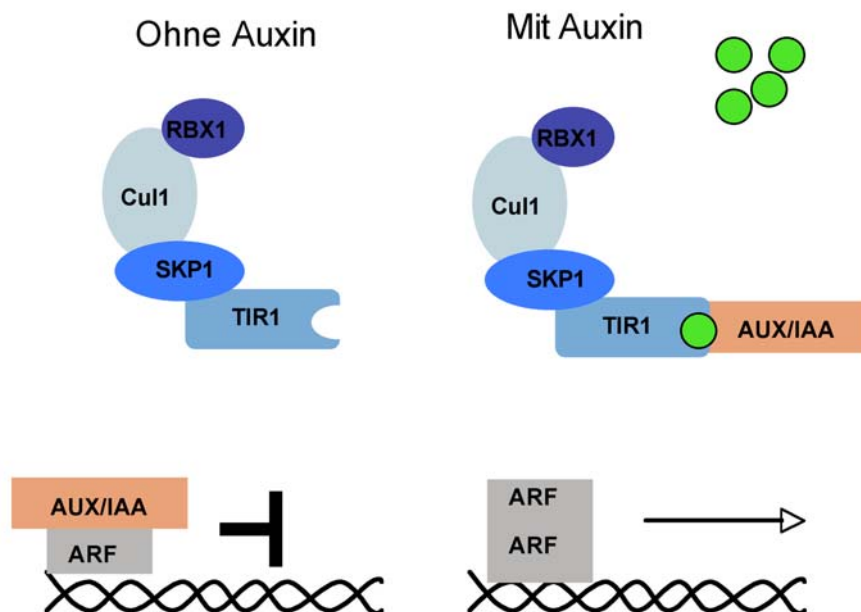


Abb. 5: Funktion von TIR1 bei der Auxinantwort. Ohne ein Auxinsignal heterodimerisieren die AUX/IAA Proteine mit den ARFs und blockieren so die Transkription von Genen der Auxinantwort. Mit Auxin, welches von TIR1 selbst perzeptiert wird, erfolgt die Erkennung und der Abbau der AUX/IAA Proteine. Die ARFs können so homodimerisieren und die Transkription kann stattfinden.

1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Viele Entwicklungsprozesse der Pflanze von der Embryogenese bis zur Seneszenz werden von Hormonen gesteuert. Bislang konnte bei vielen Hormon-abhängigen Prozessen die Beteiligung von F-Box Proteinen nachgewiesen werden (Tab. 1). Die bekanntesten sind Mitglieder der C-Subfamilie. Bei Betrachtung der Verwandtschaftsverhältnisse in dieser Subfamilie liegt verwandtschaftlich gesehen zwischen den F-Box Proteinen, die an der Auxinantwort beteiligt sind, TIR1 und AFB1 bis 3, und den beiden F-Box Proteinen mit Funktion im Ethylensignalweg, EBF1 und EBF2, eine Familie von vier F-Box Proteinen mit den Genbezeichnungen At1g47056, At3g50080, At4g07400 und At5g67250 mit bislang unbekannter Funktion. Die Untersuchung und Charakterisierung dieser F-Box Proteinfamilie mit naher, aber distinkter Verwandtschaft zu TIR1 und den AFB F-Box Proteinen, wurde als Thema dieses Projektes ausgewählt. Im Nachfolgenden werden diese vier Proteine als VFB1 (At1g47056), VFB2 (At3g50080), VFB3 (At4g07400) und VFB4 (At5g67250) bezeichnet. VFB steht für „Vier F-Box Proteine“.

Zunächst sollten die Expressionslevel der vier *VFB* Gene mittels Promotor:GUS Fusionen und RT-PCR untersucht werden. Die Lokalisierung der Proteine sollte mittels GFP/YFP-Fusionsproteinen im Protoplastensystem und in der Pflanze untersucht werden. Ob die F-Box Proteine in einem SCF-Komplex aktiv sind, sollte ein Experiment im Hefe-2-Hybrid System zeigen. Um aktiv Substrate der F-Box Proteine oder interagierende Proteine zu finden, wurde ein Hefe-2-Hybridscreen durchgeführt. Als zweiter experimenteller Ansatz zur Identifizierung von Interaktoren sollte die Tandem-Affinitäts Aufreinigung mit Hilfe des TAP-Tags genutzt werden. Der Ansatz der reversen Genetik sollte eingesetzt werden, um tiefergehende Einblicke in die biologische Funktion der *VFB* Gene *in vivo* zu erlangen. Auch Techniken, wie RNAi und artifizielle miRNA wurden zu diesem Zweck eingesetzt. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu TIR1 und den AFB F-Box Proteinen sollte auch untersucht werden, ob die *VFB* Proteine in der Lage sind, TIR1 funktionell zu ersetzen. Weitergehend sollte ein Microarrayexperiment durchgeführt und verschiedene Markerlinien verwendet werden, um Aufschluss über die Rolle der *VFB* Proteine in bekannten Pflanzenantworten zu bekommen.

2. Veröffentlichungen

2.1 Schwechheimer, C. und Schwager, K. 2004

Regulated proteolysis and plant development

Plant Cell Rep. 23:353-364

Review Artikel in Zusammenarbeit mit C.Schwechheimer

2.2 Schwager, K.M., L. I. A. Calderon-Villalobos, E. M. N. Dohmann, B. Willige, S. Knierer, C. Nill, C. Schwechheimer. 2007.

Characterization of the *VIER F-BOX PROTEINE* genes from Arabidopsis reveals their importance for plant growth and development.

Plant Cell 19:1163-1178

Veröffentlichung der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation erzielt wurden.

Eigener Beitrag zu dieser Veröffentlichung:

Abb. 2:

Die Konstrukte für ASK2, RBX1 und CUL1 wurden bereits veröffentlicht (Schwechheimer et al., 2001; Risseeuw et al., 2003). Das pLEX:VFB2 Konstrukt wurde von S. Knierer im Rahmen einer Diplomarbeit erstellt. Das Ausgangskonstrukt für pLEX:VFB2 Δ F-Box wurde ebenfalls von S. Knierer übernommen und durch mich in den pLEX Vektor umklont. Die Transformationen der Konstrukte in Hefezellen und die Hefe-2-Hybridexperimente wurden von mir selbst durchgeführt (A). Die Westernblotanalysen wurden von Björn Willige durchgeführt (B). Alle GFP/YFP Konstrukte wurden von mir erstellt. Die Transformation in Protoplasten wurde von Caterina Brancato (ZMBP, Universität Tübingen) durchgeführt. Die Analyse der Protoplasten am Konfokalmikroskop wurde von mir mit Unterstützung von Claus Schwechheimer durchgeführt (C).

Abb. 3:

Die Promotor:GUS Fusionskonstrukte wurden von S.Knierer im Rahmen seiner Diplomarbeit erstellt. Auch die GUS Färbung in Embryonen (A) wurden von ihm durchgeführt. Alle weiteren abgebildeten GUS Färbungen wurden von mir an T3

Pflanzen erstellt (B bis G). Die RT-PCR auf cDNA aus Columbia inklusive nötiger Vorarbeiten erfolgte durch mich.

Abb. 4:

Die Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien sowie alle folgenden Arbeiten (RT-PCR, Anzucht und Dokumentation der Pflanzen) wurden von mir selbst durchgeführt.

Abb. 5:

Alle dargestellten Arbeiten (Klonierung von *vfb4* (RNAi), Transformation und Analyse der transgenen Pflanzen) wurden von mir selbst durchgeführt.

Abb. 6:

Die benutzten Reporterlinien waren bereits veröffentlicht (DR5:GUS: Ulmasov et al., 1997 a und b; HS:AXR3/IAA17NT:GUS: Gray et al., 2001). Die Kreuzung mit den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen und anschließende Experimente wurden von mir durchgeführt (A bis F; H und I). Analysen zum Wurzelwachstum (G) und der Ausbildung der Seitenwurzeln (J) in den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen erfolgten durch mich. Die *tir1-1* und *tir1-1:TIR1-Myc* Pflanzen erhielten wir von W. Gray (Universität Minnesota). Die Experimente zum Wurzelwachstum in diesen Pflanzen (K) wurden von mir durchgeführt. Die pTA:VFB2 Konstrukte sowie die transgenen Pflanzen mit diesem Konstrukt wurden von mir erstellt und alle Analysen zum Wurzelwachstum (L) und zur Dexamethason-induzierten Expression der Konstrukte in Pflanzen (M) von mir durchgeführt.

3.1 Zusammenfassung

Der durch Ubiquitin vermittelte Abbau von Proteinen stellt einen wichtigen Regulierungsmechanismus in eukaryotischen Organismen dar. Für den Abbau bestimmte Proteine werden mit einer Polyubiquitinkette markiert. Diese wird durch eine Kaskade aus drei Enzymen bzw. Enzymkomplexen gebildet: dem Ubiquitin aktivierenden Enzym (E1), dem Ubiquitin konjugierenden Enzym (E2) und der Ubiquitin Ligase (E3). Für die Spezifität des Prozesses ist die E3 Ligase zuständig, die als Substratrezeptor fungiert. Eine Form von Ubiquitin Ligasen stellen SCF Komplexe dar, die aus **S**KP1, **C**ULLIN1, RBX1 und einem **F**-Box Protein bestehen. Das F-Box Protein (FBP) kann das abzubauen Substrat erkennen und dem Abbau zuführen. Mehr als 2 % des *Arabidopsis thaliana* Genoms kodiert für FBPs. Obwohl die große Anzahl an FBPs eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Entwicklung impliziert, sind bis heute nur wenige von ihnen auf ihre Funktion hin untersucht worden.

In einer phylogenetischen Analyse konnte eine Familie von FBPs identifiziert werden, deren vier Mitglieder sich innerhalb der C Subfamilie der *Arabidopsis* FBP Superfamilie deutlich abgrenzen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die VFB Familie („**V**ier **F**-Box Proteine“) charakterisiert werden. Die Mitglieder der Familie gehören zu den Proteinen mit Leucin-reichen Domänen (LRR), bestehend aus der N-terminalen F-Box Domäne sowie 14 C-terminalen LRRs. Letztere fungieren vermutlich als Substraterkennungsdomäne.

Mittels Promotor:GUS Fusionskonstrukten und RT-PCR Analyse konnte gezeigt werden, dass *VFB2* und *VFB4* stärker exprimiert sind als die beiden anderen Gene, und dass sie über die gesamte Entwicklung der Pflanze hinweg eine wichtige Funktion in verschiedenen Pflanzenorganen haben könnten. In Protoplasten konnte gezeigt werden, dass die Proteine im Zytosol lokalisiert sind und nicht im Nukleus wie andere bekannte FBPs. Im Hefe-2-Hybridsystem wurde die Interaktion mit der SKP1 Untereinheit des SCF Komplexes gezeigt und so die mögliche Existenz eines SCF^{VFB} aufgezeigt. Mittels reverser Genetik wurden weitere Untersuchungen zur biologischen Rolle der *VFB* Gene durchgeführt. T-DNA Insertionslinien aller vier Gene wurden aus Stammsammlungen bezogen und homozygote Mutanten für *VFB1*, *VFB2* und *VFB3* wurden generiert. Da weder die Einzel-, Doppel- noch Dreifachmutanten einen Phänotyp besaßen, wurden zusätzlich RNAi und miRNA

Konstrukte gegen *VFB4* kloniert und in Pflanzen eingebracht. Die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) bzw. (miRNA) Pflanzen zeigten klare Defekte bei der Ausbildung von Seitenwurzeln und im Wurzelwachstum. Da es sich hierbei um Auxin-vermittelte Phänotypen handelt, wurde durch Einkreuzen der Markerlinien HS:AXR3/IAA17(NT):GUS und DR5:GUS der Phänotyp weiter untersucht. So konnten gezeigt werden, dass die VFBS nicht dieselbe biologische Funktion wie die FBPs TIR1 und AFB 1 bis 3 besitzen. Auch der Test, ob VFB2 das TIR1 F-Box Protein funktionell ersetzen kann, fiel negativ aus. In einem Microarrayexperiment wurden aber mehrere fehlregulierte Gene der Auxinantwort in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen festgestellt. Diese überlappten zusätzlich mit fehlregulierten Genen einer Mutante des COP9 Signalosoms. Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass die VFB Proteine für die normale Entwicklung der Pflanze, das Wachstum und die Entwicklung von Seitenwurzeln wichtig sind, aber keine erkennbare Funktion in der Auxinantwort einnehmen.

3.2 Summary

The ubiquitin-mediated degradation of proteins is an important regulatory mechanism in eukaryotes. Proteins destined for degradation get marked with a polyubiquitin chain. This process is carried out by the successive action of an ubiquitin-activating enzyme (E1), an ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and an ubiquitin ligase (E3). The specificity of the process is conferred by the E3 ligase containing subunits which function as substrate receptors. One type of E3 ligase is represented by SCF complexes which are composed of **S**KP1, **C**ULLIN1, RBX1 and an **F**-Box protein. The F-Box protein (FBP) is the substrate recognition moiety that promotes protein degradation. In *Arabidopsis thaliana* more than 2 % of the genome encode for FBPs. Although their big number suggests an important role for FBPs in plant development only a small number is well investigated with respect to their function.

In a phylogenetic analysis a family of four FBPs was identified in the C subfamily of the *Arabidopsis* FBP superfamily, which is distinct from other members of this family. In this project, this family of FBPs named „**V**ier **F**-**B**ox Proteine“, **VFB**, (German for „Four F-Box Proteins“) was characterized. These FBPs belong to the leucin-rich-repeat FBPs that consist of an N-terminal F-Box domain and in this case 14 C-terminal leucine-rich-repeats (LRR), which are supposed to function as the substrate recognition moiety of the protein.

By using promoter:GUS fusions and RT-PCR analysis it was shown that two proteins, VFB2 and VFB4, are more strongly expressed than the others and that they seem to have a function in many plant organs throughout the plant's life cycle. In protoplasts they were localized to the cytosol and not to the nucleus like many known FBPs. Using the yeast-two-hybrid system, the interaction with the SCF complex component SKP1 was proven and the existence of a SCF^{VFB} complex could be proposed. Using a reverse genetic approach, the role of the *VFB* genes in plant development was investigated. T-DNA insertion lines for all of the genes were obtained and homozygous mutants for *VFB1*, *VFB2* and *VFB3* were generated. Because neither the single, the double nor the triple mutants displayed any obvious phenotype an additional RNAi and miRNA approach was used to knock down *VFB4* function. The *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) and (miRNA) plants were found to have defects in lateral root development and root growth. Because this is an auxin mediated phenotype, the marker lines HS:AXR3/IAA17NT:GUS and DR5:GUS were

crossed to these plants and their expression patterns examined. Here we could show that the VFBs do not have the same function as the related FBPs TIR1 and AFB1 to 3. Additionally a complementation assay was performed and it was shown that VFB2 is not able to functionally replace TIR1. In a microarray experiment auxin related genes were misregulated in the *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) mutants. Those were also overlapping with misregulated genes in a COP9 Signalosome mutant.

In summary, it could be shown that the VFB FBPs are important for regular plant growth and the development of lateral roots but do not act in the known auxin signalling pathway.

4. Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse der VFB Familie und Vergleich mit verwandten F-Box Proteinen

In einer vergleichenden phylogenetischen Studie aller 694 in *Arabidopsis thaliana* identifizierten F-Box Proteine wurden At3g50080, At4g07400 und At5g67250 als Mitglieder der C-Subfamilie der F-Box Proteine identifiziert (Gagne et al., 2002). Zusätzlich konnte in eigenen Analysen später ein viertes Mitglied dieser Unterfamilie, At1g47056, identifiziert werden. Aufgrund des Vorhandenseins von vier Familienmitgliedern wurde diese, bislang nicht charakterisierte Proteinfamilie als VIER F-BOX PROTEINE (VFB) Familie bezeichnet. Die einzelnen Familienmitglieder sind VFB1 (At1g47056), VFB2 (At3g50080), VFB3 (At4g07400) und VFB4 (At5g67250). Die vier Proteine weisen untereinander eine Identität von 56% bis 69% und eine Ähnlichkeit von 63% bis 80% auf. Jeweils ein höherer Homologiegrad lässt sich sowohl zwischen VFB1 und VFB3 als auch zwischen VFB2 und VFB4 feststellen (Abb.5). Die VFB Familie bildet eine eigenständige Unterfamilie der C-Subfamilie der klassifizierten F-Box Proteine. Zu der C-Subfamilie gehören als weitere Mitglieder die gut untersuchten F-Box Proteine TIR1, AFB1 bis 3, COI1, EBF1 und EBF2. Die Gemeinsamkeit mit diesen F-Box Proteinen lässt sich in der Struktur feststellen. Am N-Terminus befindet sich die F-Box Domäne, welche in der Regel eine Interaktion mit der SKP1 Untereinheit einer SCF-Typ E3 Ligase vermittelt. Daran schließt sich bei allen Mitgliedern der VFB-Familie eine Region aus Leucine-Rich-Repeats (LRR) mit jeweils 14 einzelnen LRRs an, welche wahrscheinlich Interaktionen mit putativen Substraten ermöglichen (Abb. 6 und 7 B). Daran schließt sich bei allen vier Proteinen noch ein Bereich an, in dem sie auf Aminosäureebene voneinander abweichen.

Auch auf DNA Sequenzebene weisen die VFB Gene einige Gemeinsamkeiten auf. Keines der Gene enthält Introns und auch die Länge zwischen 1557 bis 1665 bp ist relativ einheitlich. Die Gene kodieren für Proteine mit einer Größe von 56 bis 61 kDa. Für VFB2 und VFB 4 konnten in Datenbanken 7 bzw. 31 ESTs (Expressed sequence tags) gefunden werden, während für VFB1 und VFB 3 keine vorhanden waren. Dies lässt darauf schließen, dass VFB2 und VFB4 stärker exprimiert sind, und dass sie daher unter Umständen wichtigere Mitglieder der VFB Familie darstellen als die beiden anderen Gene.

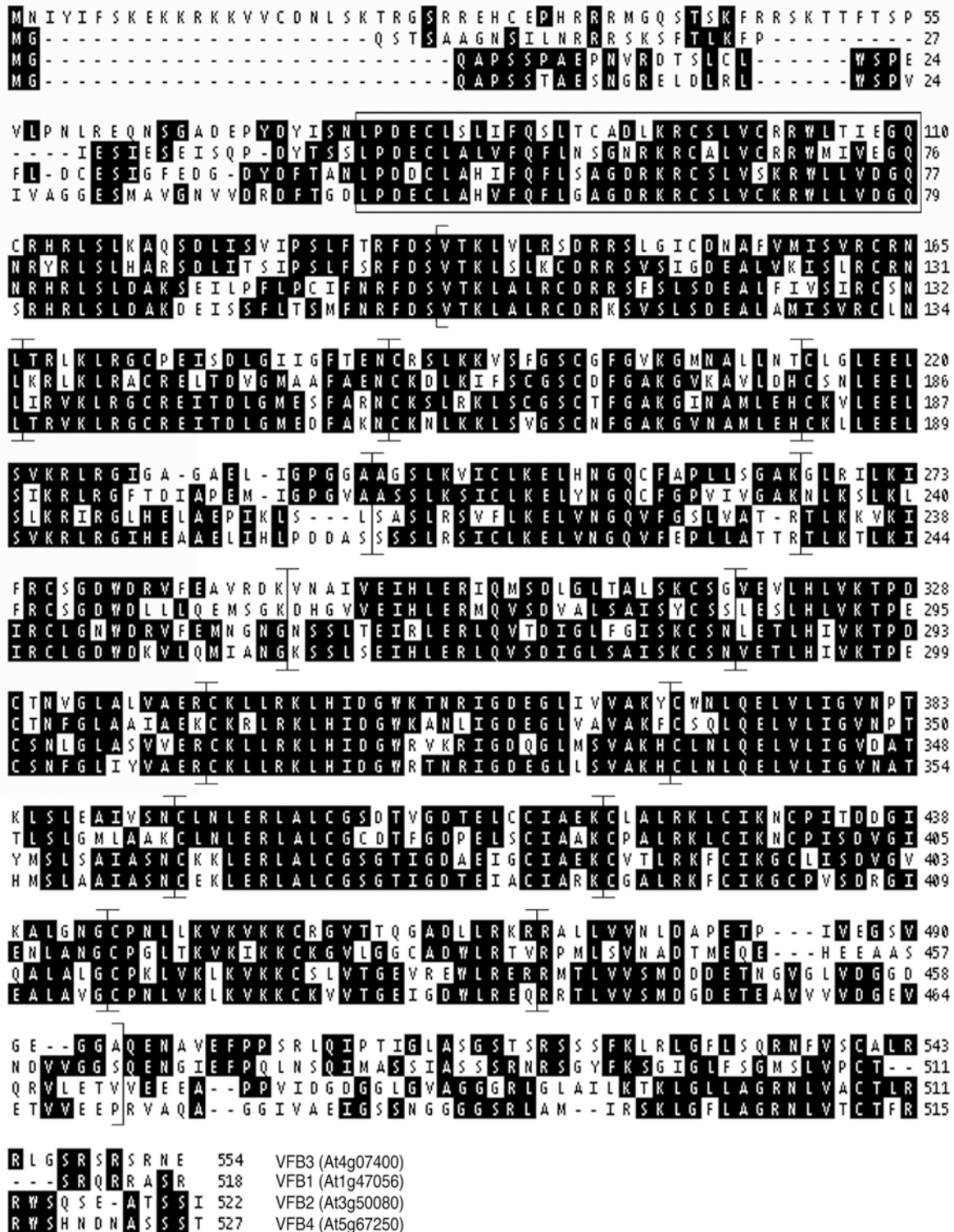


Abb. 6: Vergleich der Aminosäuresequenz der VFB Proteine. Alignment der 4 VFB Proteine; Bereiche mit identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Im Kasten befindet sich die F-Box Domäne. In Klammern befinden sich die 14 LRR Domänen, an die sich der variable C-Terminus anschließt.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien wurde davon ausgegangen, dass sich die vier Familienmitglieder redundant verhalten könnten.

Homologien zu nicht-pflanzlichen Verwandten konnten nicht gefunden werden, während homologe Proteine in Tabak und Reis identifiziert werden konnten. Das Tabakprotein trägt die Bezeichnung AVR9/CF-9 RAPIDLY ELICITED PROTEIN 189 und wird durch Behandlung mit Flagellin induziert (Rowland et al., 2005). Auch VFB4 wurde bereits als Flagellin-induzierbar identifiziert (Navarro et al., 2004). Zwei weitere VFB Homologe konnten in Reis identifiziert werden, namentlich ACRE189 und JNBb0002J11.1. Da keines der Proteine nur einem Mitglied der VFB Familie als Homolog zugeordnet werden konnte, wurde angenommen, dass die VFB Proteine und die genannten Homologen ein gemeinsames Ursprungprotein haben, von dem alle abstammen (Abb. 7 A). Des Weiteren zeigt der phylogenetische Baum die nahe Verwandtschaft zu gut untersuchten F-Box Proteinen wie den EBF Proteinen, die im Ethylensignalweg fungieren (Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004). Auch die F-Box Proteine des Jasmonsäuresignalwegs COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE 1) und der Auxinantwort TIR1 (TRANSPORT-INHIBITOR-RESPONSE 1) bzw. AFB1 bis 3 (AUXIN REZEPTOR F-BOX PROTEINE 1 bis 3) sind Verwandte (Devoto et al., 2003 und 2005; Dharmasiri et al., 2005a, b; Kepinski und Leyser 2005). Ein Vergleich der Struktur dieser Proteine mit den VFB F-Box Proteinen unterstreicht die nahe Verwandtschaft (Abb. 7 B).

4.2 Expressionsanalysen der *VFB* Gene anhand des GUS Reporters und mittels RT-PCR

Um die Expressionsmuster der *VFB* Proteine zu untersuchen, wurden Promotorfusionen der *VFB* Gene untersucht. Hierzu wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Stephan Knierer je 1 kB Fragmente der Promotoren der vier *VFB* Gene in den pCAMBIA Z1391 Vektor kloniert und in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia eingebracht. Es wurden so pro Konstrukt mindestens 10 unabhängige transgene Linien generiert und getestet. Eine Analyse der GUS Expression und der Expressionsmuster wurde schließlich im Rahmen dieser Arbeit mit T3 Pflanzen der generierten Linien durchgeführt. Um die Ergebnisse der GUS Färbungen zu vertiefen, wurde zusätzlich eine RT-PCR Analyse auf cDNA aus verschiedenen Geweben des Columbia Ökotyps durchgeführt.

4.2.1 Expression von *VFB1*

In Embryos konnte keinerlei GUS Expression detektiert werden, während in Keimlingen und adulten Pflanzen Färbung in diversen Pflanzenorganen nachzuweisen war. Besonders in der Vaskulatur von Blättern und in Blütenständen konnte eine starke GUS Expression detektiert werden. Auch in der Vaskulatur der Wurzel sowie in den Stomata der Blätter war eine Färbung deutlich zu erkennen (Abb. 8 A). *VFB1* Transkript konnte mittels RT-PCR schwach in Blüten und Stengel, besonders jedoch in Wurzeln und Blättern sowie in Keimlingen nachgewiesen werden (Abb. 8 B). Daraus lässt sich schließen, dass *VFB1* in den meisten Organen der Pflanze nach dem Embryostadium exprimiert ist und daher in der gesamten Pflanze aktiv sein könnte.

4.2.2 Expression von *VFB2*

Für *VFB2* konnte bereits im Embryo GUS Expression in den Keimblättern detektiert werden. In der späteren Entwicklung wurde Promotor:GUS Aktivität in Blüten und der Vaskulatur von Blättern und Wurzel gefunden (Abb. 8 A). Die RT-PCR zeigte *VFB2* Transkript vor allem in Blüten, Wurzeln und Blättern, weniger jedoch in Keimlingen und im Stengel (Abb. 8 B). *VFB2* scheint daher in der Pflanze exprimiert zu sein und könnte bereits in frühen Stadien eine Rolle spielen.

4.2.3 Expression von *VFB3*

Für das *VFB3* Promotorkonstrukt konnte nur geringe GUS Aktivität in der Wurzel festgestellt werden (Abb. 8 A), mittels RT-PCR konnte kein Transkript nachgewiesen werden (Abb. 8 B). Wenn überhaupt, so sollte *VFB3* nur in geringem Maße exprimiert sein.

4.3.4 Expression von *VFB4*

Für *VFB4*-Promotor:GUS konnte eine Färbung ähnlich der von *VFB2* detektiert werden (Abb. 8 A). Zusätzlich wurde eine starke Expression in den Seitenwurzeln gefunden. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass *VFB4* in allen getesteten Pflanzenorganen exprimiert ist (Abb. 8 B). *VFB4* könnte also wie *VFB2* bereits im Embryo aktiv sein und über den gesamten Lebenszyklus der Pflanze hinweg eine Rolle spielen. Die zusätzliche Färbung in den Seitenwurzeln könnte ein Hinweis auf eine Funktion von *VFB4* bei der Entwicklung von Seitenwurzeln sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis auf *VFB3* alle *VFB* Gene exprimiert sind und dies in fast allen pflanzlichen Organen.

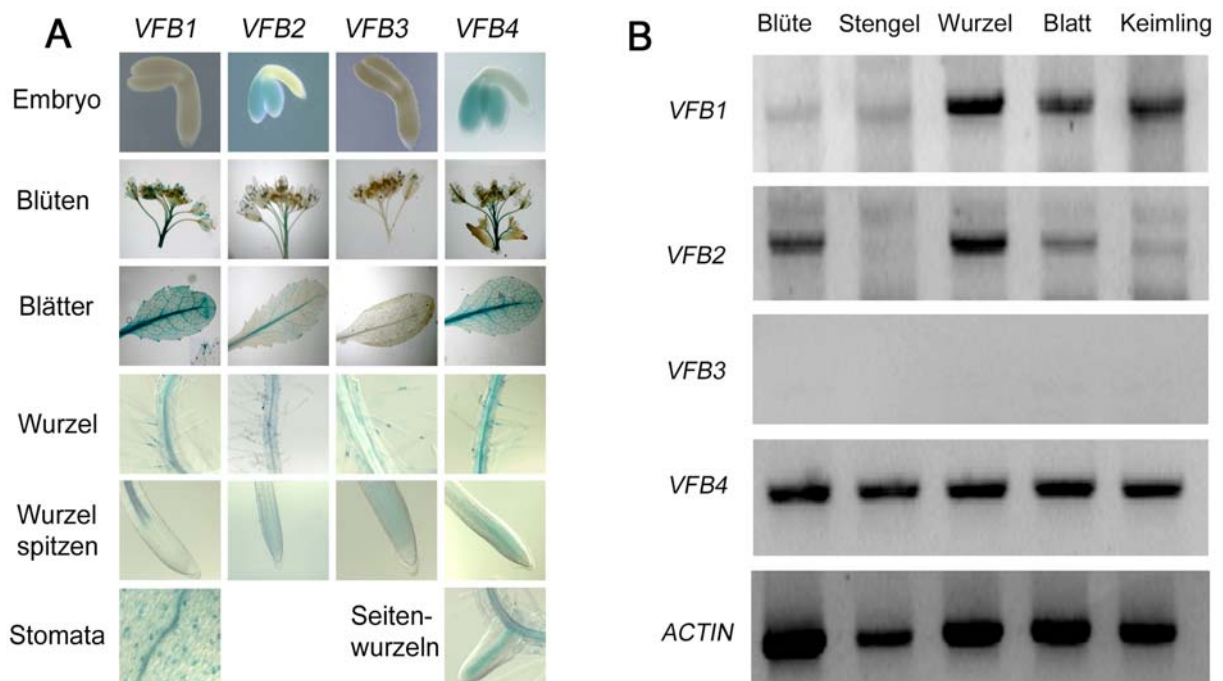


Abb. 8: Expressionsstudien zur VFB F-Box Familie (A) GUS gefärbte Pflanzenorgane der Promotor:GUS Linien der einzelnen VFB Proteine; Analysen wurden an Embryonen, Blütenständen, Blättern und Wurzeln durchgeführt. Für *VFB1* und *VFB4* konnte zusätzlich eine spezifische Färbung in

Stomata bzw. Seitenwurzeln gezeigt werden. (B) RT-PCR Analyse auf Columbia cDNA. Amplifikat für *ACTIN* wurde als Kontrolle verwendet. Es wurden je 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

4.3 Lokalisierungsexperimente in Protoplasten

Um die Lokalisierung der VFB Proteine in der Zelle zu untersuchen, wurden GFP- bzw. YFP-markierte Konstrukte der *VFB* Gene in Protoplasten transformiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Während es aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht möglich war, *VFB1* in einen GFP Vektor einzubringen, konnten für *VFB2* sowohl ein Konstrukt mit einem N-terminalen YFP (Yellow/Gelb fluoreszierendes Protein) als auch ein Konstrukt mit einem C-terminalen GFP (Grün fluoreszierendes Protein) erstellt werden. Beide Fusionen wurden konstitutiv unter dem 35S Cauliflower Mosaik Virus (35S CaMV) Promotor exprimiert. Zusätzlich konnte für *VFB2* ein Konstrukt unter dem eigenen Promotor erstellt werden. Für *VFB3* und *4* wurden ebenfalls C-terminale Fusionen unter dem 35S CaMV Promotor mit GFP Markierung erstellt (Abb. 9 A). Alle Konstrukte wurden in *Arabidopsis* Protoplasten eingebracht (Caterina Brancato, ZMBP).

Die Betrachtung der lebenden Protoplasten im Fluoreszenzmikroskop ergab eine zytoplasmatische Lokalisierung für alle VFB Fusionsproteine, sowohl bei Überexpressions des jeweiligen Proteins (Abb. 9 C) als auch bei einer Expression unter dem eigenen Promotor (Abb. 9 B). Das 35S:VFB3:GFP Konstrukts war in den Protoplasten kaum exprimiert, was die Dokumentation der Lokalisierung unmöglich machte. Da sich in Lokalisationsstudien anderer F-Box Proteine wie EBF1 und EBF2, TIR1 und den AFB Proteinen ausschließlich Lokalisierungen der Proteine im Kern ergaben (Potuschak et al., 2003; Dharmasiri et al., 2005b), wurde die Lokalisierung nochmals im Vergleich mit dem Farbstoff Hoechst 33342 durchgeführt, welcher den Nukleus markiert (Meadows and Potrykus, 1981). Im Bereich des Nukleus konnte keine Überlagerung des GFP Signals mit dem Hoechst Farbstoff festgestellt werden. So konnte bestätigt werden, dass mit den getesteten Konstrukten das GFP Signal im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert war (Abb. 9 C).

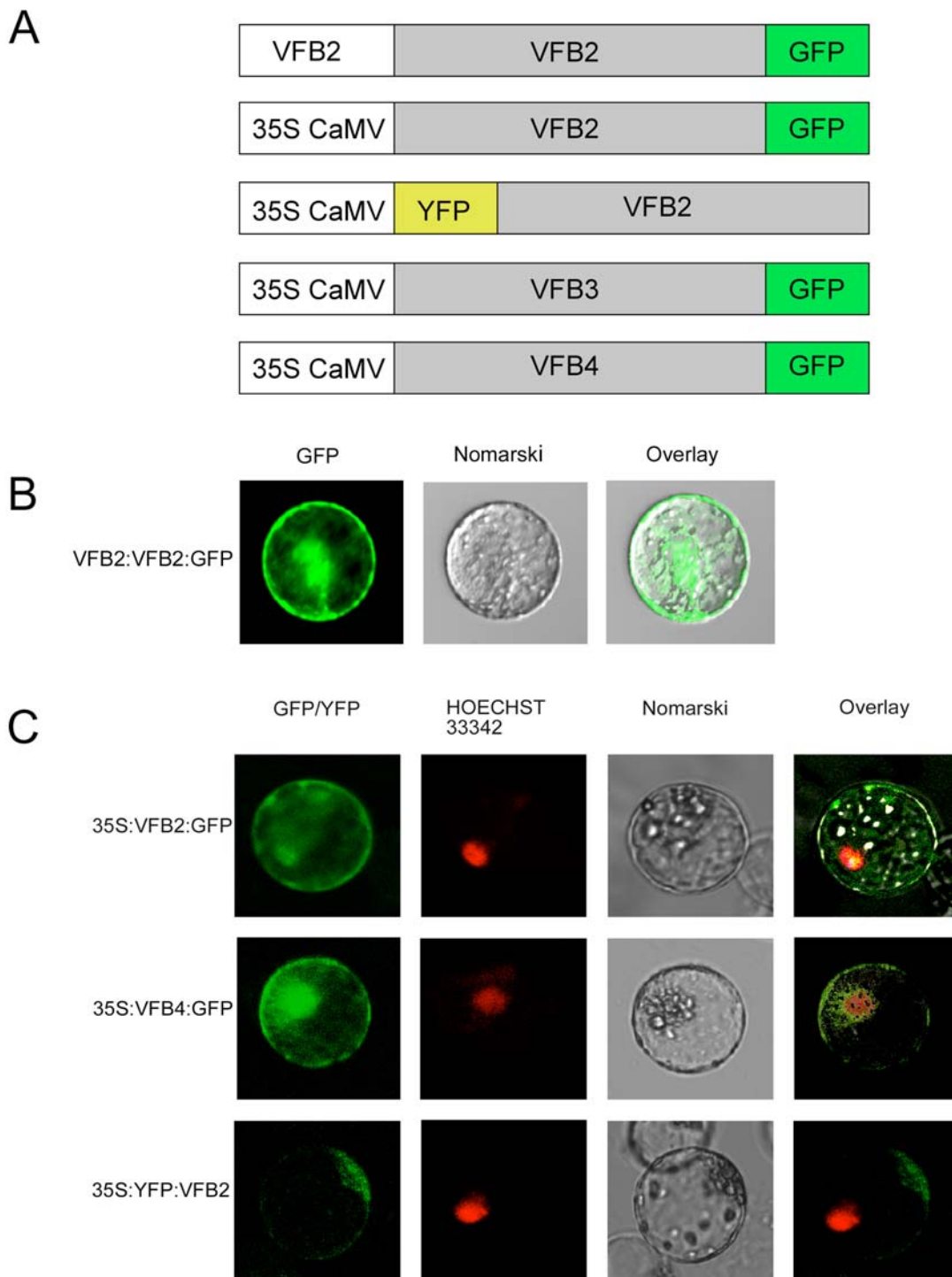


Abb. 9: Konfokalmikroskopie von Protoplasten, transformiert mit verschiedenen VFB Konstrukten. (A) Schematische Darstellung aller erstellten GFP/YFP Konstrukte für *VFB2*, *VFB3* und *VFB4*. (B) Fluoreszenzmikroskopie des *VFB2:VFB2:GFP* Konstrukts. (C) Obere Reihe: *VFB2* unter dem 35S CaMV Promotor (*35S:VFB2:GFP*), darunter *VFB4* mit C-terminalen GFP (*35S:VFB4:GFP*). Untere Reihe: N-terminal mit YFP markiertes *VFB2* (*35S:YFP:VFB2*). Es wurde ein Durchlichtbild (Nomarski) erstellt sowie eine Überlagerung aller Signale (Overlay).

Da von der Lokalisierung in Protoplasten nicht zwangsläufig auf die Lokalisierung in der Pflanze geschlossen werden kann, wurden das 35S:VFB2:GFP Konstrukt sowie das 35S:YFP:VFB2 Konstrukt in Pflanzen transformiert. Als Hintergrund wurden hier der Columbia Ökotyp und die dreifach *vfb1-1vfb2-1vfb3-1* Knock-out Mutante gewählt. Zusätzlich wurde 35S:VFB2:GFP in den mutanten *tir1-1* Hintergrund eingebracht. Im Gegensatz zu früheren Versuchen mit überexprimiertem VFB2 (Daten nicht gezeigt), bei denen keine transgenen Pflanzen generiert werden konnten, konnten hier jeweils mehr als 10 transgene Pflanzen selektioniert werden. Allerdings konnte in keiner der generierten Linien funktionelles GFP bzw. YFP markiertes Protein mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Western Blot nachgewiesen werden. Daher konnte die Lokalisierung der VFB Proteine *in situ* nicht bestimmt werden, auch wenn durch das Protoplastenexperiment eine Lokalisierung im Zytoplasma wahrscheinlich ist.

4.4 Interaktionsanalyse mit Komponenten des SCF Komplexes mittels des Hefe-2 Hybridsystems

F-Box Proteine fungieren als Substratrezeptoren der SCF E3 Ubiquitin Ligasen. Sie interagieren mit der konservierten SKP1 Untereinheit mittels ihrer F-Box Domäne. Das SKP1 Protein kann seinerseits mit Cullin1 interagieren, welches an RBX1 bindet. Um zu untersuchen, ob die VFB Proteine in der Lage sind, ihre Funktion in einem SCF Komplex wahrzunehmen, wurde das Hefe-2-Hybridsystem eingesetzt. Da *VFB2* nachweislich exprimiert ist und hohe Homologien zu den anderen 3 Familienmitgliedern aufweist, wurde *VFB2* als repräsentatives Protein der VFB Familie in diesem Versuch verwendet. Als putative Interaktoren wurden das *Arabidopsis* Homolog zu SKP1, ASK2, herangezogen. Dieses Protein ist ein Vertreter der in *Arabidopsis* 21 Mitglieder umfassenden SKP1-Familie. Zusätzlich wurden Cullin1 und RBX1 im Hefe-Experiment auf eine Interaktion mit *VFB2* getestet. Als Kontrollen wurden die leeren Vektoren miteinbezogen. Zusätzlich zum Volllängen-*VFB2* Protein wurde auch noch ein *VFB2* Konstrukt mitgetestet, bei dem die F-Box Domäne deletiert worden war, *VFB2*ΔFbox. Es konnte eine Interaktion von *VFB2* mit ASK2 gezeigt werden (Abb. 10 A). Wie zu erwarten, ging diese Interaktion verloren, wenn die F-Box Domäne nicht vorhanden war (Abb. 10 A). Mit Cullin1 und

RBX1 konnte erwartungsgemäß keine Interaktion nachgewiesen werden. Um die Expression der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden Westernblotanalysen von Björn Willige durchgeführt (Abb. 10 B). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten von VFB2 mit den anderen Mitgliedern der VFB F-Box Proteinfamilie kann angenommen werden, dass alle VFB Proteine in der Lage sind, die Substratrezeptorfunktion in einer SCF E3 Ubiquitin Ligase zu erfüllen.

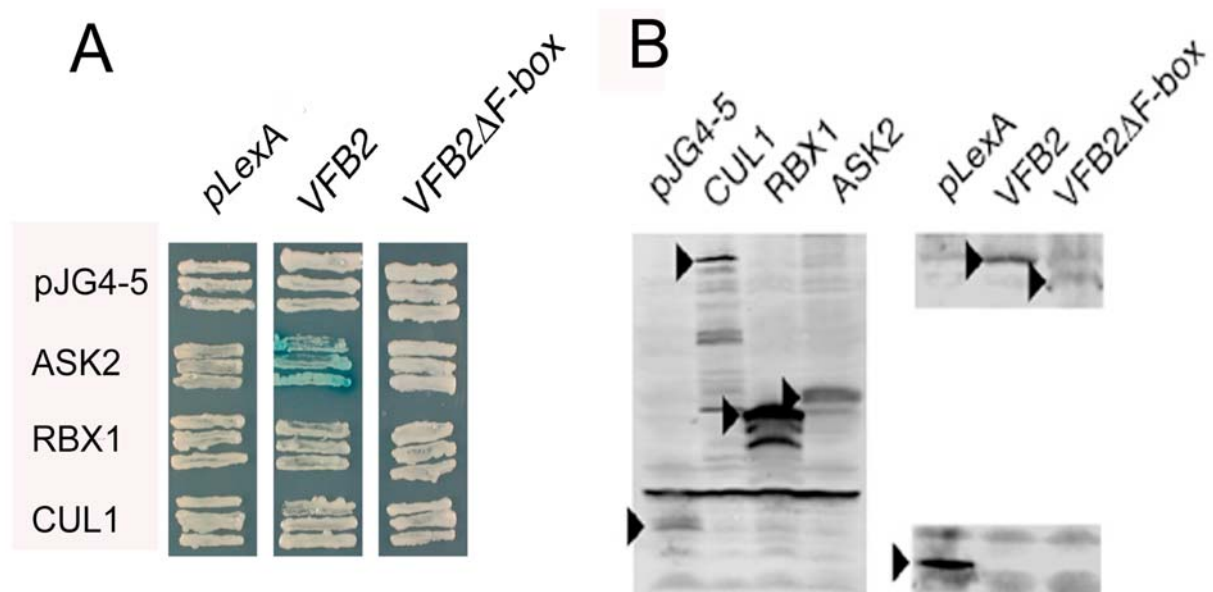


Abb. 10: Interaktion von VFB2 und ASK2 im Hefe-2-Hybridssystem. (A) Ein Hefe-2-Hybridexperiment zeigte die Interaktion von VFB2 und ASK2. Die auftretende Blaufärbung ist auf die Aktivität des LacZ Reporters zurückzuführen und indiziert die Interaktion der Proteine. VFB2 und VFB2ΔF-Box, eine Deletionsvariante ohne den N-terminus des Proteins und ohne die F-Box Domäne, wurden im pLEX A Vektor exprimiert. Die Proteine ASK2, RBX1 und CUL1 wurden im pJG4-5 Vektor exprimiert. Die leeren Vektoren pJG4-5 und pLexA wurden als Negativkontrollen ins Experiment mit einbezogen. (B) Westernblotanalysen zur Kontrolle der Expression der verschiedenen Konstrukte in Hefe mit den spezifischen Antikörpern α -B42 (linker Blot) und α -pLEX A (rechter Blot). Die Fusionsproteine konnten mit den erwarteten Größen detektiert werden: pJG4-5 B42 (12kD), CUL1 (98 kD), RBX1 (25 kD) und ASK2 (30kD), pLEX A DNA Bindedomäne (26 kD), VFB2 (84kD) und VFB2ΔF-Box (76kD).

4.5 Suche nach Interaktoren mittels Hefe-2-Hybridscreen

Neben der Interaktion von VFB2 mit Komponenten des SCF Komplexes wurde das Hefe-2-Hybridsystem auch zur aktiven Suche nach Interaktoren eingesetzt. Dieser Ansatz könnte Aufschluß über potentielle für den Abbau zu rekrutierende Substrate der VFB F-Box Proteine geben. Hierzu wurde das pLEX:VFB2 Konstrukt als „Köder“ gegen eine cDNA Bank aus *Arabidopsis* eingesetzt. Die Transformationseffizienz betrug $5,5 \times 10^4$ Kolonien pro $1 \mu\text{g}$ cDNA. Die im Kolonie-Lift Filterassay ermittelten interagierende Klone wurden mittels Kolonie-PCR in Gruppen eingeteilt und Klone aus jeder Gruppe in KC8 *E.coli* Zellen transformiert und sequenziert. Klone deren Identität durch die Sequenzierung ermittelt werden konnte, wurden zurück in Hefezellen transformiert und erneut auf Interaktion getestet. Schlussendlich konnten 8 verschiedene Klone als putative Interaktoren identifiziert und bestätigt werden (Tab. 2). Die Klone # 34 und # 42 scheinen jedoch, aufgrund der Interaktion mit dem leeren Vektor Autoaktivatoren zu sein. Weiterführende Experimente wurden im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht durchgeführt.

Tab. 2: Putative Interaktoren von VFB2 im Hefescreen

Klon	Genidentität	Beschreibung	Lokalisierung in der pflanzlichen Zelle	Referenzen
# 6	At1g67090	RIBULOSE-BISPHOSPHAT CARBOXYLASE, kleine Untereinheit 1A (RBCS 1A)	Thylakoidmembran der Chloroplasten	Kawamura und Uemura, 2003; Benhamed et al., 2006; Lee et al., 2007
# 13	At5g18670	Putative Beta-Amylase 3 (BM3)	Keine Angaben	Keine Angaben
# 20	At5g26742	EMBRYO DEFECTIVE 1138 (EMB1138); ATP binding / ATP-dependent helicase; Identical to DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3 (RH3)	Chloroplast, Nukleus	Keine Angaben
# 25	At5g25180	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 14	Keine Angaben	Keine Angaben
# 29	At1g05850	POM1, Chitinase-like Protein	Endomembransystem	Rogers et al.,

				2005
# 34	At1g80560	IMD 2 (3-Isopropylmalat-dehydrogenase)	Plastid	Nozawa et al., 2005
# 36	At3g06510	SFR2 (β -Glukosidase)	Chloroplastenmembran	Thorlby et al., 2004
# 42	At5g14200	IMD 1 (3-Isopropylmaladehydrogenase)	Plastid	Nozawa et al., 2005

4.6 Tandem-Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag

Eine Möglichkeit, Proteine unter nativen Bedingungen inklusive ihrer Interaktoren oder Substrate zu reinigen, stellt die Tandem-Affinitäts Reinigung dar (Rigaut et al., 1999). Der TAP (Tandem-affinity-purification)-Tag ermöglicht nach der Fusion an ein Zielprotein eine Zwei-Stufen Aufreinigung desselben unter nativen Bedingungen mit dessen interagierenden Proteinen. Der Tag besteht aus zwei Proteinen, der IgG-bindenden Untereinheit des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* (Prot A) und dem Calmodulin-bindendem Protein (CBP). Zwischen diesen beiden Proteinen befindet sich eine TEV (*Tobacco etch virus*) Proteaseschnittstelle.

Wie schon für die Hefe-2-Hybridexperimente wurde VFB2 als Vertreter der VFB Familie gewählt, da es gut exprimiert ist und hohe Homologien zu den anderen 3 Familienmitgliedern aufweist. Es wurde ein 35S CaMV:VFB2:TAP Konstrukt im pEXSGTAP Vektor (Laurent Noel) erstellt und in Pflanzen transformiert. Wie schon zuvor war es jedoch nicht möglich, VFB2 in Pflanzen unter dem 35S CaMV Promotor zu exprimieren. Daher wurde VFB2:TAP in ein induzierbares System umklontiert (pTA 7002 Vektor; Aoyama und Chua, 1997) und in wildtypische Columbia Pflanzen und die *vfb2-1* Mutante transformiert. Um die Expression des mit Dexamethason induzierten Fusionsproteins zu gewährleisten, wurden Western Blotanalysen der erzeugten Pflanzenlinien durchgeführt (Abb. 11 B). Da VFB2:TAP nach Induktion mit Dexamethason nachgewiesen werden konnte, wurde die Reinigung im Batchverfahren durchgeführt. Proteinextrakte der transgenen Pflanzen wurden zunächst mit IgG Sepharose inkubiert, an welche der IgG bindende Teil des Protein A des Fusionsproteins bindet. Mittels der in den TAP-Tag integrierten TEV-Protease Schnittstelle kann der IgG-bindene Teil des Fusionsproteins abgeschnitten werden und das Eluat mit den mit Calmodulin beschichteten Kügelchen (Beads) inkubiert

werden. Die VFB2 Fusionsproteine binden mit der CBP Untereinheit an die Beads, um schließlich nativ eluiert zu werden. Im Anschluß an eine erfolgreiche Reinigung könnten SDS-PAGE und Massenspektrometrie Aufschluß über die Identität interagierender Proteine geben (Abb. 11 A). Trotz des Nachweises von exprimiertem VFB2-TAP Protein war eine Aufreinigung desselben mit seinen interagierenden Proteinen jedoch nicht möglich.

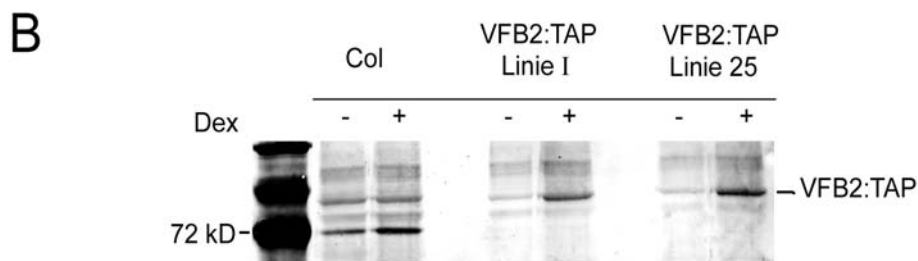
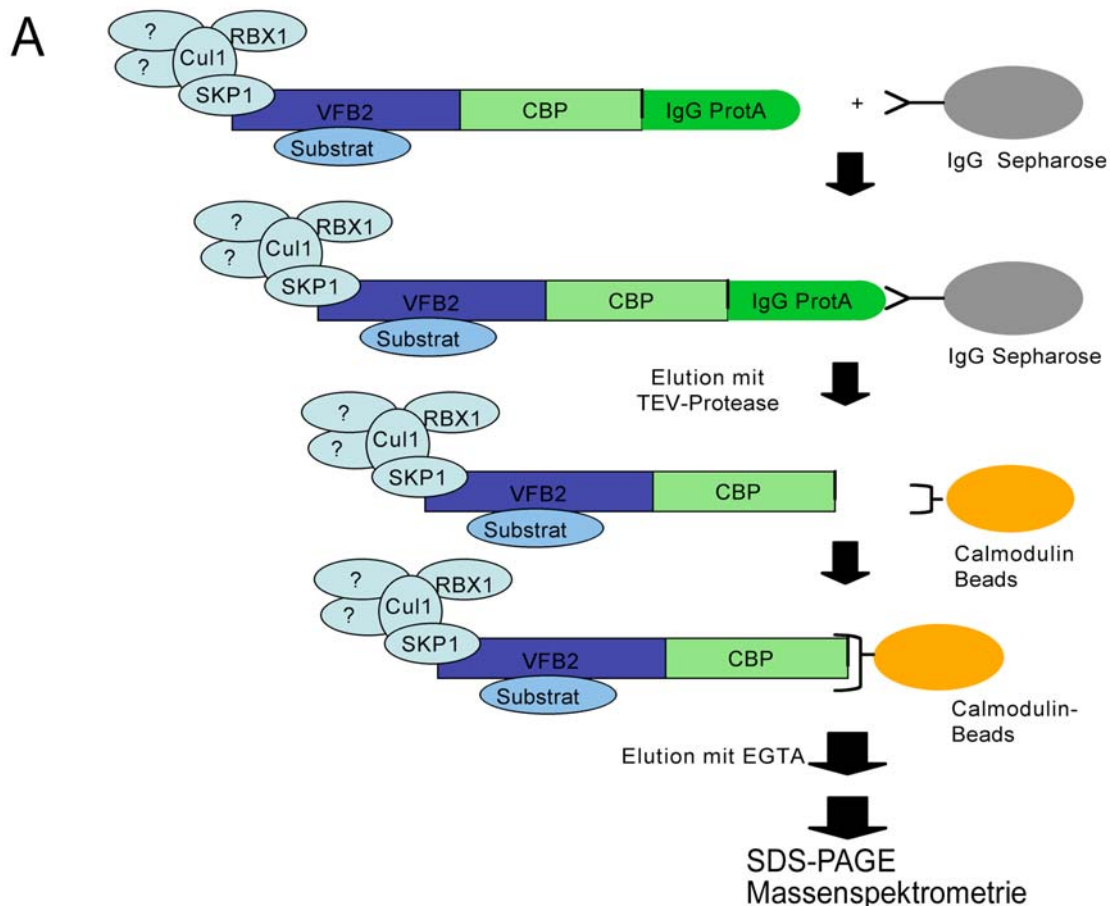


Abb. 11: Versuch der TAP-Tag Aufreinigung von VFB2. (A) Schema der Aufreinigung mittels Tandem-Affinitäts Tag (TAP-Tag). Unter nativen Bedingungen sollte das mit dem Tag markierte VFB2 Protein mit seinen Interaktoren aus dem SCF Komplex, SKP1, Cul1 und RBX1 und seinem Substrat vorliegen. Zusätzlich könnte es mit unbekanntem Proteinen, wie z.B. putativen Abbausubstraten interagieren (durch ein Fragezeichen angedeutet). Der Tag besteht aus der IgG-bindenden

Untereinheit des Proteins A (IgG ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Protein (CBP). (B) Westernblotanalyse mit dem α -VFB2 Antikörper. In zwei Linien von VFB2:TAP Pflanzen konnte nach Induktion durch Dexamethason das Fusionsprotein detektiert werden (79 kD).

4.7 Untersuchung von Insertionslinien für *VFB1*, *VFB2*, *VFB3* und *VFB4*

4.7.1 Identifizierung von „Knock-out“ Mutanten

Um mehr Information über die Rolle von Proteinen während der Pflanzenentwicklung und des Wachstums zu erhalten, wird oft das Prinzip der reversen Genetik angewandt. Hierbei werden die Auswirkungen einer Mutation im Zielgen auf das äußere Erscheinungsbild der Pflanze, den Phänotyp, untersucht. Besonders die Identifizierung von so genannten „Knock-out“-Mutanten ist von Interesse, da hier die Expression des Zielgens nicht mehr gegeben ist. Meist wird hierzu die von Agrobakterien vermittelte T-DNA Mutagenese verwendet, bei der die T-DNA zufällig in das Genom integriert wird und stabil an die Folgegenerationen weitergegeben wird (Krysan et al., 1999). Prinzipiell kann sowohl eine Insertion der T-DNA im Leseraster als auch im 5´-UTR die Transkription des Zielgens verhindern. Bei der Insertion im Promotor ist dies allerdings nicht immer der Fall. Zur Analyse von Insertionsmutanten können die Randsequenzbereiche, die „Border“-Bereiche, herangezogen werden.

Für die vier *VFB* Gene waren in der T-DNA Express: SIGnAL Datenbank (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) spezifische T-DNA Insertionen aufgelistet. Samen dieser Linien wurden aus den Stammsammlungen bezogen. Für *VFB1* wurde die Linie SALK_128933 (*vfb1-1*) ermittelt, für *VFB2* SALK_047599 (*vfb2-1*) und SALK_047600, für *VFB3* SALK_054809 (*vfb3-1*). Für *VFB4* waren zwei Insertionslinien aus der GABI-KAT Kollektion, GABI_414F05 (*vfb4-1*) und GABI_323B07, und eine SALK Linie (SALK_086664) mit Promotorinsertionen verfügbar (Abb. 12A und nicht gezeigte Daten). Inzwischen sind für *VFB4* weitere Insertionslinien aus der SALK (SALK_114463), der GABI-KAT Kollektion (GABI_760C08) und aus der SAIL Kollektion (SAIL_407_A05) verfügbar. Die Insertionen dieser Linien sind jedoch ebenfalls im 5´-UTR annotiert.

Die Analyse der Pflanzen erfolgte durch Genotypisierung mittels PCR mit einem für die T-DNA spezifischen Oligonukleotid, LBb1, und genspezifischen Oligonukleotiden (siehe Material und Methoden, Tab. 4). Nach Identifizierung

homozygoter „Knock-out“ Linien für alle *VFB* Gene wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die Auswirkungen auf die Genexpression zu untersuchen (Abb. 12 B). Für die Allele *vfb1-1*, *vfb2-1* und *vfb3-1* konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Diese Allele stellen somit „Knock-out“ Mutationen der jeweiligen *VFB* Gene dar. Im Fall von *VFB4*, in welchem die Insertion im Promotor lokalisiert ist, konnte trotz der Insertion das Gen amplifiziert werden. Somit stellt *vfb4-1* keine „Knock-out“ Mutation dar (Abb. 12 B).

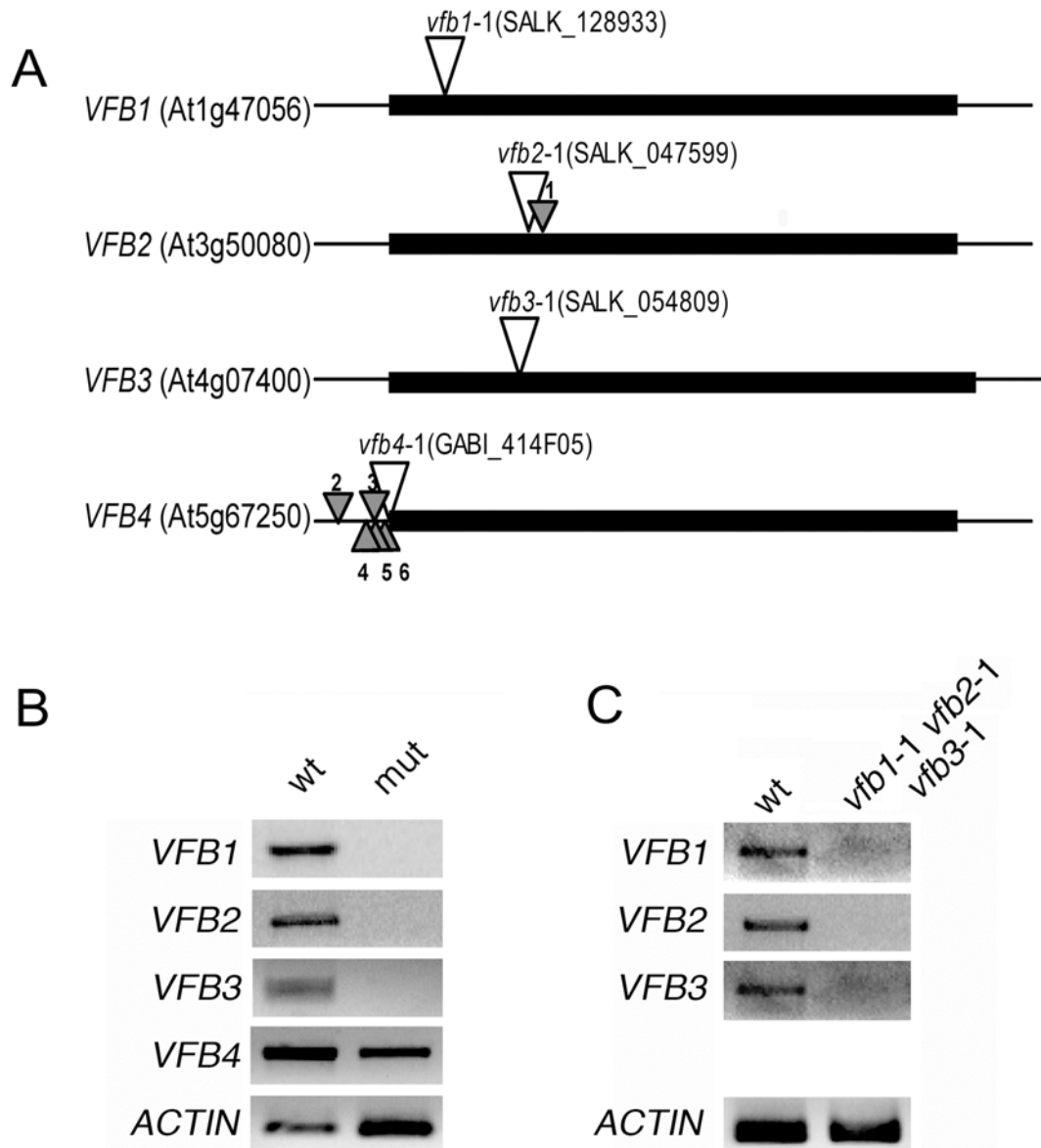


Abb. 12 Analyse von T-DNA Insertionslinien für die *VFB*-Familie (A) Schematische Abbildung aller vier *VFB* Gene; der kodierende Bereich ist in Schwarz gehalten, und die Lage der jeweiligen Insertion ist mit einem weißen Dreieck markiert. Zusätzliche Insertionen sind mit einem grauen Dreieck und einer Nummer markiert: 1: SALK_047600; 2: SALK_086664; 3: GABI_323B07; 4: SALK_114463; 5: SAIL_407_A05; 6: GABI_760C08. (B) RT-PCR Analyse der einzelnen Allele; wt steht für Wildtyp (Columbia Ökotyp), mut steht für die jeweilige Einzelmutante (*vfb1-1*, *vfb2-1*, *vfb3-1*, *vfb4-1*); als

Kontrolle wurde das *ACTIN* Gen amplifiziert. (C) RT-PCR Analyse der homozygoten *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Mutante; *ACTIN* diente als Kontrolle.

4.7.2 Generierung von Doppel- und Dreifachmutanten

Keine der Einzelmutanten der *VFB* Gene zeigte einen offensichtlichen Phänotyp. Da angenommen wurde, dass die *VFB* Gene funktionale Redundanz besitzen, wurden durch Kreuzung der homozygoten Einzelmutanten zunächst Doppelmutanten und schließlich eine Dreifachmutante generiert (Abb. 12 C und 13). Jedoch konnte auch bei den Doppel- und der Dreifachmutante keine Veränderung im äußeren Erscheinungsbild beobachtet werden. Sowohl der Keimling als auch die adulte Pflanze sind phänotypisch vom Wildtyp nicht zu unterscheiden (Abb. 13 A und B).

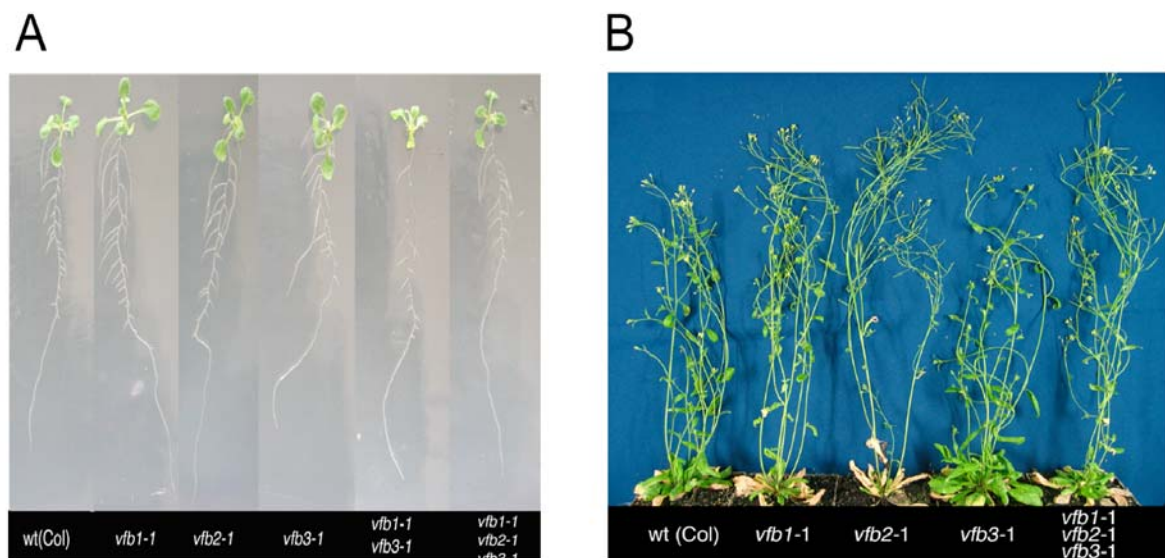


Abb. 13: Phänotyp der *vfb*-Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten. (A) 10 Tage alte Keimlinge wurden auf GM Medium angezogen. Als Wildtypkontrolle wurde der Columbia Ökotyp verwendet. Getestete Allele waren *vfb1-1*, *vfb2-1*, *vfb3-1*, die homozygote Doppelmutante *vfb1-1vfb3-1* und die Dreifachmutante *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1*. (B) Adulte Pflanzen wurden kurz vor der Seneszenz verglichen. Als Wildtypkontrolle wurde der Columbia Ökotyp verwendet. Getestete Allele waren *vfb1-1*, *vfb2-1*, *vfb3-1* und die Dreifachmutante *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1*.

4.7.3 Vergleich der Dreifachmutante mit dem Wildtyp unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Da unter normalen Wachstumsbedingungen keine Änderung im Phänotyp der Dreifachmutante beobachtet werden konnte (Abb. 13), wurden homozygote Keimlinge der Dreifachmutante *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* im Vergleich mit dem Wildtyp unter verschiedenen physiologischen Bedingungen getestet. Aufgrund der Verwandtschaft zu anderen F-Box Proteinen, von denen fast alle in Hormonsignalwegen agieren, wurden Behandlungen mit verschiedenen Pflanzenhormonen durchgeführt und deren Wachstum analysiert.

Um die Reaktion der Pflanzen auf Abszisionsäure (ABA) zu testen, wurden Keimlinge zunächst auf GM-Medium angezogen und nach vier Tagen auf GM-Medium mit 0 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM ABA transferiert. Nach weiteren sieben Tagen wurde das Wurzelwachstum gemessen (Abb. 14 A).

Das Wachstum auf Ethylen wurde anhand von drei Tage alten dunkelgewachsenen Keimlingen überprüft. Hierzu wurden Samen des Wildtyps und der Dreifachmutante auf GM-Medium mit 0 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 2 μM , 10 μM und 50 μM ACC (einer Vorform von Ethylen) ausgelegt und nach dem genannten Zeitraum die Hypokotyllänge vermessen (Abb. 14 B)

Für die Analyse des Wachstums auf Auxin wurden Keimlinge zuerst vier Tage auf GM-Medium angezogen und anschließend auf Medium übertragen, das mit 0 μM , 0,02 μM , 0,04 μM , 0,06 μM , 0,08 μM und 0,1 μM 2,4 D komplettiert war. Nach weiteren 5 Tagen wurde das Wurzelwachstum ausgewertet (Abb. 14 C).

Des Weiteren wurden Keimlinge auf 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Epi-Brassinolid angezogen und nach einer Woche das Hypokotylwachstum verglichen (Abb. 14 D).

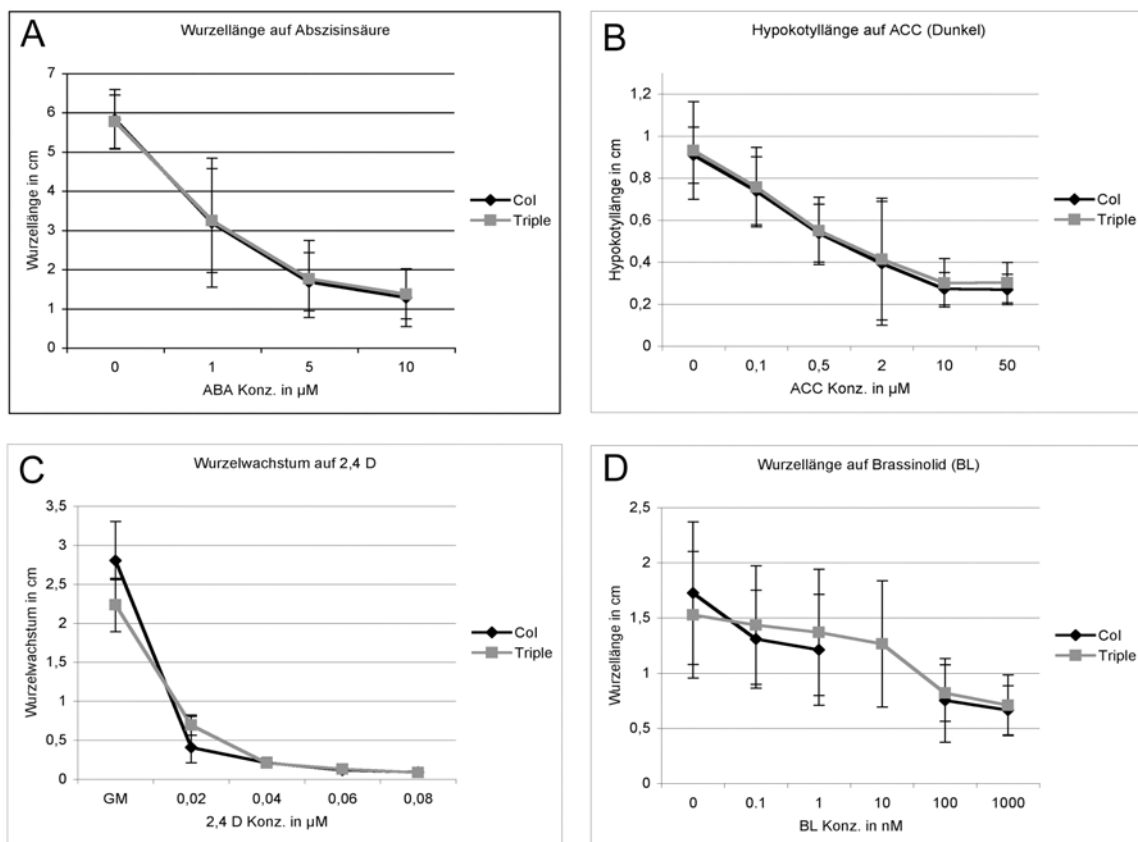
Das Wurzelwachstum der Keimlinge wurde auch auf GM Medium mit 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM und 1 μM Methyljasmonat getestet. Hier wurden die Wurzeln nach sieben Tagen vermessen und das Ergebnis ausgewertet (Abb. 14 E).

Als Vertreter der Cytokinine wurde Kinetin ausgewählt. Hierfür wurden Keimlinge auf GM Medium mit 0 μM , 0,25 μM und 0,1 μM Kinetin angezogen und nach sieben Tagen die Wurzellängen bestimmt (Abb. 14 F).

Um die Reaktion der Pflanzen auf Gibberellinsäure (GA) zu testen, wurden die Samen vom Wildtyp und der Dreifachmutante auf 0 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM GA angezogen und nach sieben Tagen die Hypokotyllänge ausgemessen (Abb. 14 H).

Neben den Hormonen wurde die Reaktion der Pflanzen unter Salzstress überprüft. Dafür wurden vier Tage alte Keimlinge auf Medium mit 0 mM, 20 mM, 50 mM und 100 mM NaCl übertragen und nach weiteren sieben Tagen das Wurzelwachstum analysiert (Abb. 14 G).

Das Ergebnis aller Assays kann so zusammengefasst werden, dass es keinerlei Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Dreifachmutante unter den verschiedenen Bedingungen gibt (Abb. 14). Somit spielen die VFB Proteine entweder in keinem der angesprochenen Wege eine essentielle Rolle oder VFB4 ist in der Lage, die anderen F-Box Proteine funktionell zu ersetzen. Um die Funktion von *VFB4* zu klären und eine redundante Wirkungsweise der Proteine auszuschließen, sollte auch *VFB4* ausgeschaltet oder herabreguliert werden.



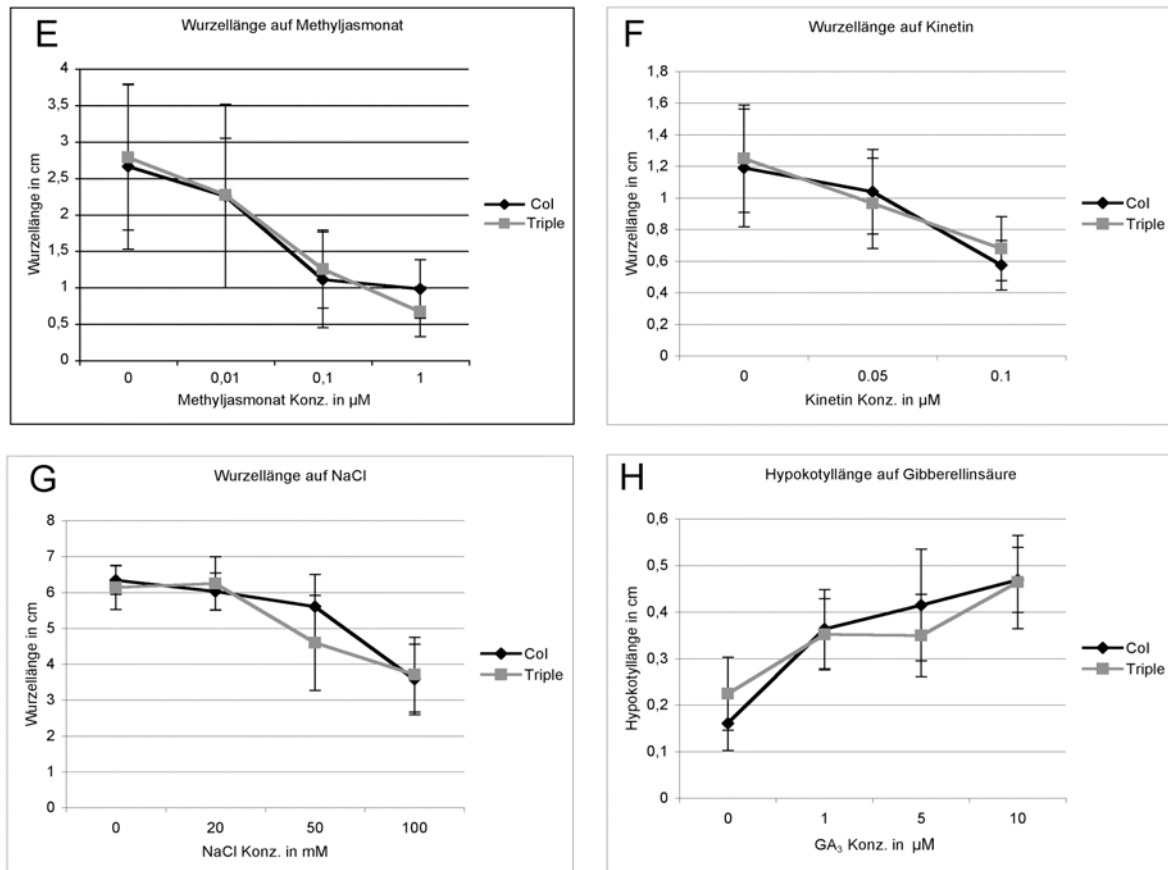


Abb. 14: Wachstum der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp auf verschiedenen Hormonen und Salz. Getestet wurden (A) die Wurzellänge auf Abszisisäure, (B) die Hypokotylänge auf ACC (Ethylen), (C) das Wurzelwachstum auf Auxin (2,4D), (D) die Wurzellänge auf Brassinolid, (E) die Wurzellänge auf Methyljasmonat, (F) die Wurzellänge auf Cytokinin (Kinetin), (G) die Wurzellänge bei Salzstress (NaCl), (H) die Hypokotylänge auf Gibberellinsäure. In allen Assays wurde der Wildtyp (Col) mit der *vfb* Dreifachmutante (Triple) verglichen.

4.7.4 Ergänzender Versuchsansatz zum Ausschalten von *VFB4* – Aktivierung des *Ds* Elements in Insertionslinien

Bei allen aus Stammsammlungen bezogenen T-DNA Insertionslinien für *VFB4* waren die Insertionen im Promotor lokalisiert, und es konnte kein negativer Einfluss auf die Expression von *VFB4* nachgewiesen werden. Somit konnten keine homozygoten „Knock-out“ Linien für *VFB4* identifiziert werden. Da jedoch die Dreifachmutante *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* keinerlei Phänotyp im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia) aufwies,

und da bekannt war, dass *VFB4* das am höchsten exprimierte Gen der *VFB* Familie ist, wurde ein weiterer, ebenfalls auf T-DNA Insertionslinien basierender Versuch initiiert. So sollte eine Pflanzenlinie generiert werden, die *VFB4* nicht mehr oder auf niedrigerem Level exprimiert. Hierzu wurden Insertionslinien verwendet, die ein sogenanntes *Ds* (*Dissociation*) Element (Medberry et al., 1995) auf der T-DNA tragen. Das *Ds* Element ist stabil ins Genom integriert, kann jedoch von einem *Activation* Element (*Ac*) aktiviert werden und transponieren (Bancroft et al., 1992; Bhatt et al., 1996; Swinburne et al., 1992; Long und Coupland, 1998). Dieses 2-Komponenten-System wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung von Mutanten genutzt (Long et al., 1993). Um *VFB4* auszuschalten, wurden zwei *Ds* Element tragende Insertionslinien in der T-DNA Express: SIGnAL Datenbank (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) identifiziert und aus der Stammsammlung bezogen. Die WiscDsLox_507C03 Insertion ist im Gen At5g67220 annotiert, die WiscDsLox_292G9 Insertion im Promotor des Gens At5g67290. Diese Linien wurden aufgrund ihres Abstands im Genom von nicht mehr als 10 kB zu *VFB4* gewählt. Nach Genotypisierung beider Insertionslinien für das *Ds* Element und den angegeben Locus konnte nur die WiscDsLox_507C03 bestätigt werden. Daher wurde nur diese Linie weiterverwendet. Um die Transposition des *Ds* Elements zu erreichen, wurden Pflanzen dieser Linie mit Aktivator *Ac* Linien gekreuzt. Die wenigen erhaltenen F1 Samen wurden bis zum Abreifen auf Erde angezogen. Die resultierenden F2 Samen segregieren für das *Ds* als auch für das *Ac* Element heterozygot. Die F2 Generation wurde ebenfalls angezogen und die Samen abgesammelt. Die F3 Samen wurden nun mittels Hygromycin Selektion auf die Transposition des *Ds* Elements überprüft. Hygromycin-resistente Keimlinge wurden auf Erde übertragen, genomische DNA wurde isoliert, gepoolt und mittels PCR Analyse getestet. Die Pflanzen wurden sowohl für das *Ds* Element selbst als auch für das wildtypische *VFB4* Gen, sowie für das Vorkommen des *Ds* Elements im *VFB4* Gen genotypisiert. (Kombinationen der Oligonukleotide für die PCR siehe Tab. 5). Die Annahme war, dass man bei Pflanzen, bei denen das *Ds* Element im *VFB4* Gen integriert ist, kein *VFB4* Gen mehr nachweisen kann.

Es konnte mittels dieser Kriterien jedoch keine Pflanzenlinie identifiziert werden, die die Insertion im *VFB4* Gen trägt. Somit wurden andere experimentelle Ansätze verwendet, um *VFB4* auszuschalten oder herabzuregulieren.

4.8 Herstellung von *vfb4* (RNAi) und *vfb1 vfb2 vfb3 vfb4* (miRNA) bzw. *vfb4* (miRNA) Konstrukten und Analyse der erzeugten transgenen Pflanzen

Die Dreifachmutante *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* weist keinen Phänotyp auf (Abb. 13 und 14). Zusätzlich war bekannt, dass *VFB4* das am höchsten exprimierte Gen der *VFB* Familie ist. Zusätzlich weist die hohe Sequenzähnlichkeit der *VFB* Gene auf eine Redundanz der vier Familienmitglieder hin. Um genauere Untersuchungen bezüglich der Funktionen der *VFB* Familie durchzuführen, müsste man folglich auch *VFB4* ausschalten oder zumindest herabregulieren. Da die untersuchten T-DNA Insertionslinien für *VFB4* das Gen noch exprimierten, mussten andere experimentelle Ansätze dafür in Betracht gezogen werden. Es bot sich die Herstellung von Antisense und RNAi Konstrukten an, welche in den Wildtyp und in die dreifache *vfb* Mutante eingebracht werden sollten. Hierzu wurde ein 146 bp *VFB4* Fragment mittels der Gateway Klonierungsmethode (Invitrogen) in den pDONR Vektor eingebracht und mit der LR-Reaktion in den 35S (GW) GFP Vektor bzw. den pJAWOHL17 (RNAi) Vektor umklontiert (Abb. 15 A). Beide Konstrukte wurden in den wildtypischen (Col) und den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Mutantenhintergrund transformiert, und T1 Pflanzen wurden selektioniert. Für das Antisense Konstrukt konnten nur wenige Linien generiert werden und somit konzentrierten sich die Versuche auf die *vfb4* (RNAi) Pflanzen.

Zunächst fiel auf, dass der Rosettendurchmesser im *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Hintergrund im Vergleich zu Pflanzen, die das *vfb4* (RNAi) Konstrukt im Columbia Hintergrund trugen, deutlich reduziert war (Abb. 16 A und B). Daher wurden die Blattlängen vermessen, um den beobachteten Phänotyp zu quantifizieren (Abb. 16 D). Querschnitte durch die Blätter der *vfb4* (RNAi) Pflanzen im Dreifachmutanten Hintergrund zeigten, dass der Phänotyp nicht auf einer Reduktion der Zellzahl, sondern auf einer Reduktion der Zellgröße beruht (Abb. 16 C). Bei T2 Nachkommen der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) Pflanzen wurden Defekte im Wurzelwachstum und in der Bildung der Seitenwurzeln festgestellt (Abb. 16 E). Um sicherzugehen, dass es sich bei diesen Pflanzen um *vfb4* (RNAi) Knock-down Pflanzen handelte, wurden semi-quantitative RT-PCR Analysen verschiedener Linien durchgeführt. Diese konnten bestätigen, dass das *VFB4* Transkript in den getesteten Linien reduziert war (Abb. 16 F).

Ein weiterer experimenteller Ansatz, um *VFB4* zu regulieren, war die Herstellung künstlicher miRNA Konstrukte gegen *VFB4* allein und gegen alle Mitglieder der *VFB* Genfamilie zusammen. Diese wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Detlef Weigel am Tübinger Max Planck Institut erstellt, auf dem miR319 Stemloop in pBluescript mit einer speziellen PCR-Strategie (Abb. 15 B) amplifiziert, anschließend kloniert und ebenfalls in den Wildtyp und die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Mutante transformiert (Schwab et al., 2006; Clough et al., 1998). Nachkommen der auf Phosphinotricin selektierten Pflanzen zeigten, dass im *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Hintergrund ebenfalls eine Reduktion im Wurzelwachstum und der Bildung von Seitenwurzeln auftritt (Abb. 16 E). Im Vergleich mit den *vfb4* (RNAi) Pflanzen wurde die Anzahl der Seitenwurzel pro cm Wurzel gezählt, und so konnte festgestellt werden, dass Pflanzen, die das *vfb4* (RNAi) oder *vfb4* (miRNA) Konstrukt trugen, deutlich weniger Seitenwurzeln aufweisen als der Wildtyp (Abb. 16 G). Die VFB Proteine scheinen also für das Pflanzenwachstum und das Wachstum von Wurzeln sowie für die Ausbildung der Seitenwurzeln essentiell zu sein.

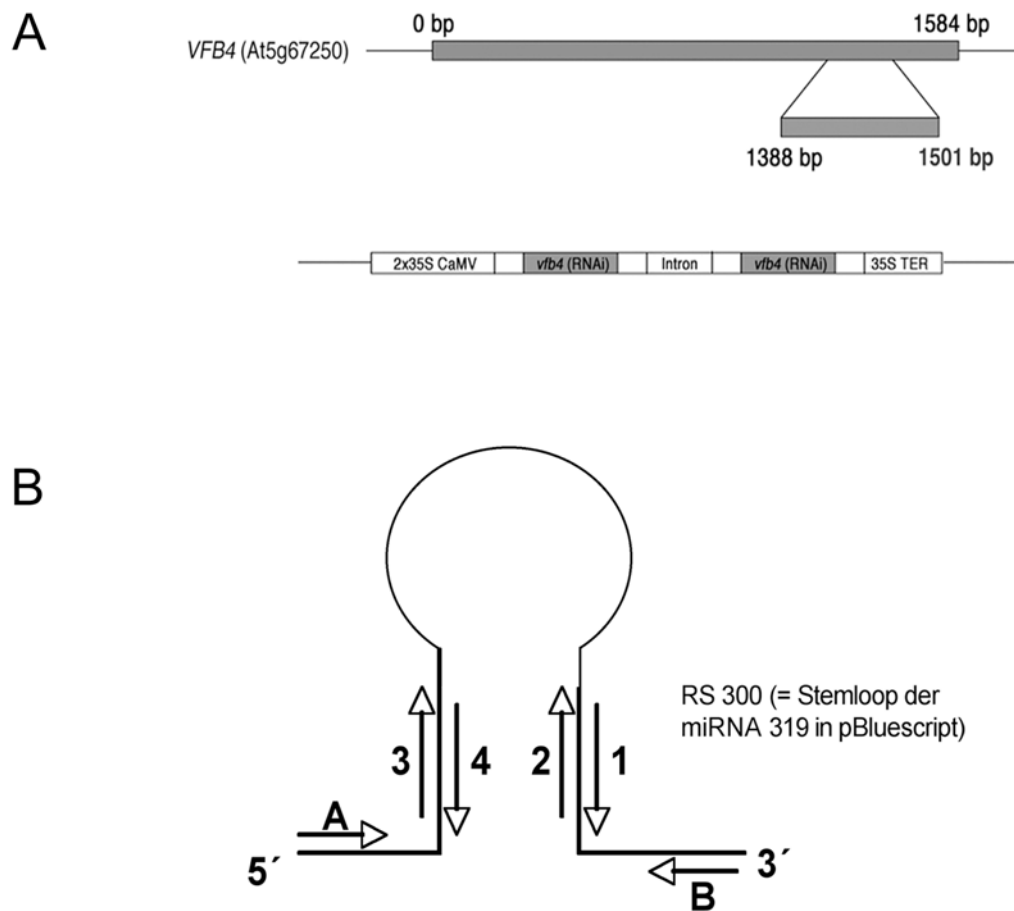


Abb. 15: Schema der RNAi und miRNA Konstrukte (A) Schematische Darstellung von *VFB4*. Die zur Erstellung des RNAi Konstrukts benutzte Sequenz ist vergrößert. Darunter ist das Schema des RNAi Konstrukts wie es im pJAWOHL17 Vektor vorliegt abgebildet. (B) Klonierungsschema der miRNA Konstrukte. Mit A, B, 1, 2, 3 und 4 sind die jeweiligen Primer und Ihre Richtung abgebildet. Für beide miRNA Konstrukte wurde vier spezifische Oligonukleotidsequenzen (Primer 1 bis 4) ermittelt (siehe 8. Anhang) und das Konstrukt nach einem speziellen PCR Schema erstellt. Mit den Primern A und 4 wurde das erste PCR Fragment auf dem Konstrukt RS 300, dem miR319 Stemloop in pBluescript, amplifiziert (270 bp). Mit den Primern 3 und 2 wurde das nächste Fragment amplifiziert (100 bp). PCR Produkt 3 wurde schließlich mit den Primern 1 und B gebildet (270 bp). Mit den Primern A und B wurde das finale PCR-Fragment schließlich auf den erhaltenen PCR Produkten amplifiziert (rund 700 bp) und kloniert (siehe auch 6. Material und Methoden).

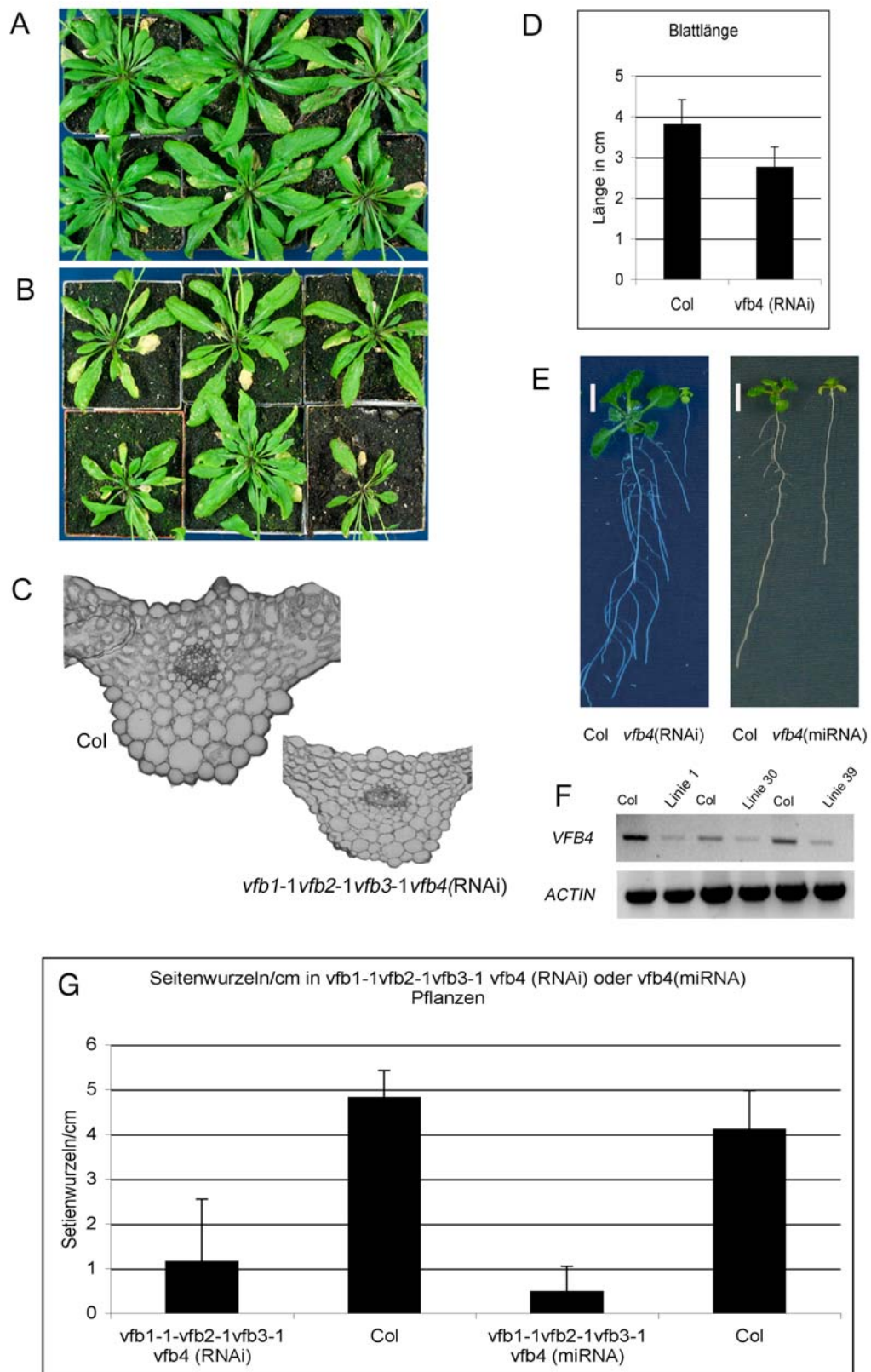


Abb. 16: Analyse von Pflanzen die *vfb4*(RNAi) und die miRNA Konstrukte exprimieren. Aufsichtsbilder von 21 Tage alten Pflanzenrosetten Col:*vfb4*(RNAi) (A) und *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) (B). (C) Schnitt durch die Blattmitte von zwei Wochen alten Columbia und *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) Keimlingen. (D) Blattlängen von *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) Pflanzen im

Vergleich mit wildtypischen Columbia Pflanzen (Col). (E) Phänotypen von *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Pflanzen mit *vfb4*(RNAi) und *vfb4*(miRNA) Konstrukt im Vergleich mit dem Wildtyp (Col). Der abgebildete Größenmarker repräsentiert 1 cm. (F) RT-PCR dreier *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Linien im Vergleich mit dem WT (Col); als Kontrolle wurde das *ACTIN* Gen amplifiziert. (G) Quantitative Analyse der ausgewachsenen Seitenwurzeln pro cm Wurzel in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) und *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (miRNA) Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp (Col).

Da der Phänotyp der *vfb4* (RNAi) Pflanzen bislang vor allem bei Pflanzen beobachtet wurde, die in Genen der Auxinantwort defekt sind, wie Mutanten von *AUX/IAA* Genen oder *TIR1* (*axr5-1*: Yang et al., 2004 b; *shy2-2*: Tian and Reed, 1999; *slr1/iaa14*: Fukaki et al., 2002; Vanneste et al., 2005; *msg2-1*: Tatematsu et al., 2004; *tir1-1*: Ruegger et al., 1998), wurde getestet, ob Auxin einen Einfluß auf die Seitenwurzelbildung in den *vfb4* (RNAi) Pflanzen hat. Dazu wurden die Wurzelabschnitte von phänotypischen *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen auf Medium mit IAA übertragen und im Vergleich mit dem Wildtyp und der *tir1-1* Mutante auf die Anzahl von ausgewachsenen Seitenwurzeln hin verglichen (Abb. 17). Während die *tir1-1* Mutante signifikant weniger Seitenwurzeln als der Wildtyp ausbildet (Abb. 17 und Ruegger et al., 1998), konnte zwischen dem Wildtyp und den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen kein Unterschied festgestellt werden.

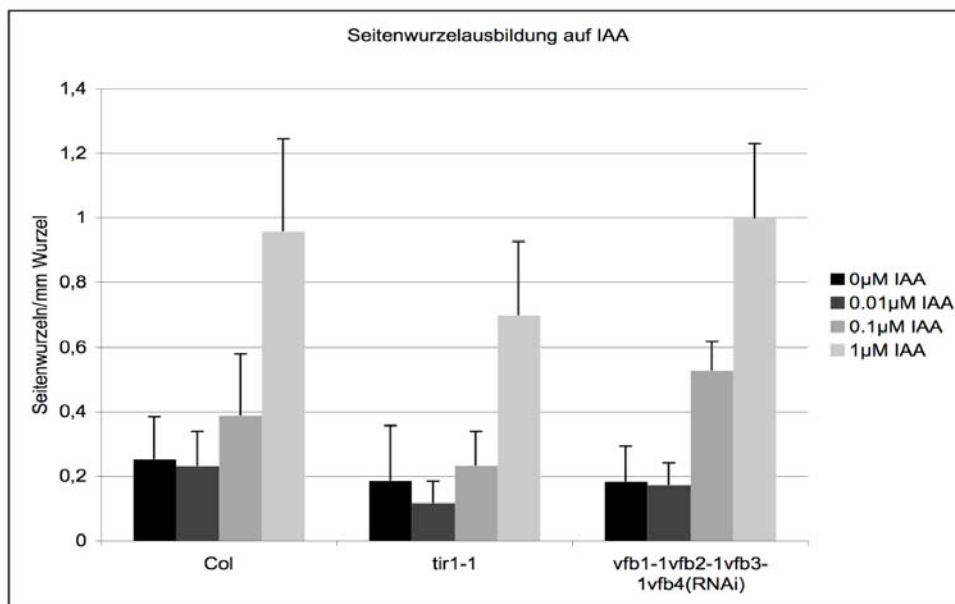


Abb. 17: Seitenwurzelwachstum der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4*(RNAi) Pflanzen auf IAA. Wurzelabschnitte der genannten Pflanzen (Wildtyp (Col), *tir1-1* und *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi)) wurden auf mit verschiedenen Konzentrationen IAA (0 μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM) komplettiertes Medium übertragen und nach 5 Tagen die vorhandenen Seitenwurzeln pro mm Wurzel ausgezählt.

Einen weiteren Aspekt des *vfb4* (RNAi) Phänotyps entdeckten wir anhand eines Gravitationsexperiments (Geldner et al., 2004). Hierzu wurden phänotypische *vfb4* (RNAi) Pflanzen im *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Hintergrund mit wildtypischen Columbia und *tir1-1* Pflanzen verglichen. Die Pflanzen wurden sobald der Phänotyp erkennbar war, um 135° Grad gedreht und der Winkel der Wurzelspitze nach festgelegten Zeitpunkten gemessen. Schon nach wenigen Stunden konnte man bei den *vfb4* (RNAi) Pflanzen eine rasche Reorientierung feststellen, während der Wildtyp hierzu länger brauchte. Die *tir1-1* Pflanzen wachsen allgemein etwas agravitropisch (Ruegger et al., 1998) und haben außerdem Probleme sich zu reorientieren. Nach 48 Stunden waren die Wurzeln des Wildtyps (Col) fast vollständig reorientiert, während die *tir1-1* Mutanten Probleme mit der Reorientierung aufwiesen. Die phänotypischen *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen waren bereits nach 30 Stunden vollständig orientiert und sind daher leicht hypergravitrop (Abb. 18).

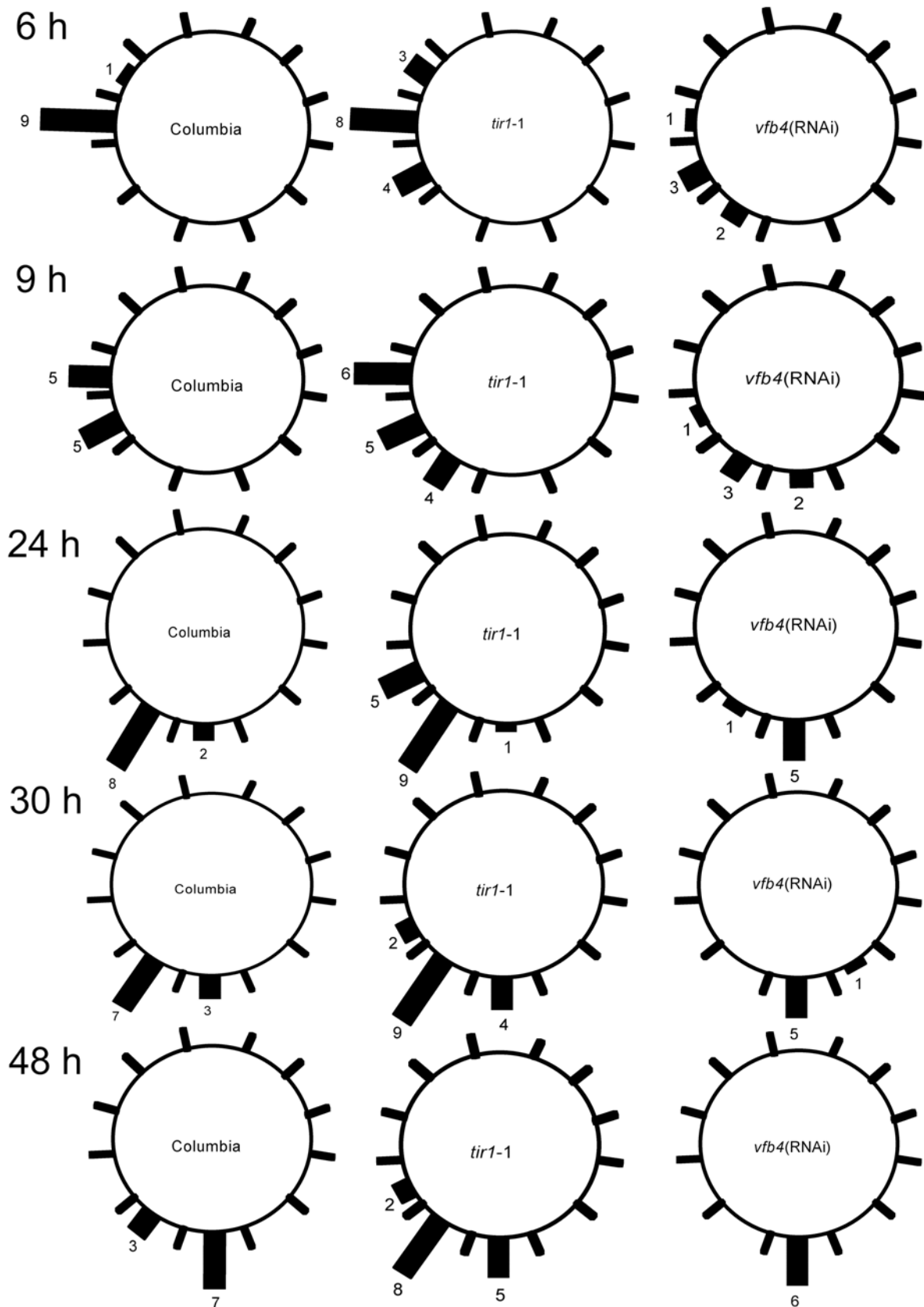


Abb. 18: Gravitationsexperiment mit Columbia, *tir1-1* und phänotypischen *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4 (RNAi)* Pflanzen. Als Messzeitpunkte dienten 6 Stunden (h), 9 h, 24 h, 30 h und 48 h nach dem Drehen.

4.9 Microarray – Erstellung von Expressionsprofilen

4.9.1 Genexpression in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp

Um weiterführende Erkenntnisse über die molekularen Ursachen des Phänotyps der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) zu gewinnen, wurde ein Microarrayexperiment durchgeführt. Dieses Experiment konnte in Zusammenarbeit mit Markus Schmid am Max Planck Institut in Tübingen und mit Hilfe von Luz I. A. Calderon Villalobos erfolgen. Zur Erstellung des Genexpressionsprofils wurde der Affimetrix ATH1 Chip hybridisiert. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate von 10 Tage alten Columbia Wildtyp Pflanzen und gleichaltrigen *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen mit offensichtlichem Phänotyp analysiert. Bei der Auswertung mit der GENESPRING Software durch Claus Schwechheimer konnten 213 Gene identifiziert werden, die in der Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp hochreguliert waren. Daneben konnten außerdem 220 Gene gefunden werden, die in ihrer Expression reprimiert waren. Während die Proteinprodukte der missregulierten Gene ein weites Spektrum an Funktionen abdeckten, konnten 2 Genfamilien identifiziert werden, die deutlich überrepräsentiert waren. Dies waren Gene der Auxinantwort sowie Gene des Zellwandmetabolismus. Unter den reprimierten Genen der Auxinantwort waren *AXR5/IAA1*, *IAA2*, *IAA3* (*SHORT HYPOKOTYL 2; SHY 2*), *IAA6* (*SHORT HYPOKOTYL 1; SHY 1*), sowie *IAA27* (*PHYTOCHROME ASSOCIATED PROTEIN 2; PAP2*) und *IAA 19* (*MASSUGU 2*) (Yang et al., 2004 b; Tian et al., 1999, 2002, 2003; Tatematsu et al., 2004; Dreher et al., 2006). Auch 10 Gene der *SAUR* (*SHORT AUXIN UP RNAs*) Familie waren vertreten (Tab. 8 und 9). Auf Grund dessen, dass viele der genannten Gene von Auxin induziert werden, scheinen die *VFB* Gene Prozesse zu regulieren, die der Auxinantwort vorgeschaltet sind.

4.9.2 Vergleich des Expressionsprofils der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante mit dem einer COP9 Signalosom Mutante

Für die korrekte Funktion von E3 Ubiquitin Ligasen des SCF Typs ist die Aktivität des COP9 Signalosoms (CSN) von großer Bedeutung. Die CSN5 Untereinheit des CSN Komplexes ist für die Deneddylierung der Cullin1-Untereinheit zuständig, die es ermöglicht, dass CAND1 an Cullin1 bindet und so die Dissoziierung von SKP1 stattfindet. Findet die Interaktion des CSN mit den E3 Ligasen nicht statt, ist deren Funktion gestört. Mutanten des CSN Komplexes weisen einen starken Phänotyp auf, der letztendlich zu einem Wachstumsstopp der Keimlinge führt (Kwok et al., 1996; Schwechheimer, 2004; Dohmann et al., 2005). Dieser Effekt resultiert wohl aus der Kombination der Effekte vieler negativ beeinflusster SCF Komplexe. Allein die kombinierten Effekte bekannter SCF Komplexe, wie dem SCF^{COI1} (Xu et al., 2002), SCF^{SLY1} (McGinnis et al., 2003) oder dem SCF^{TIR1} (Gray et al., 2001) könnten die Pflanzen stark im Wachstum inhibieren oder zu einem vollständigen Wachstumsstopp führen. So sollten die auf Grund einer Fehlfunktion des SCF^{VFB} beeinflussten Gene auch Teil der fehlregulierten Gene einer *csn* Mutante sein. Da im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in unserem Labor ein Microarrayexperiment mit *csn4* Mutanten durchgeführt wurde, konnte ein Vergleich mit den Genexpressionsdaten dieser Mutante erfolgen. Dabei wurden 61 Gene identifiziert, die in beiden Mutanten hochreguliert sind, sowie 120 Gene die reprimiert sind. Darunter fallen viele Gene, die für noch nicht charakterisierte Signalkomponenten und Transkriptionsfaktoren kodieren, aber auch 7 *AUX/IAA* Gene und 8 Gene der *SAUR* Familie. Auch 12 Familienmitglieder der Enzyme des Zellwandmetabolismus konnten identifiziert werden (Tab. 10 und 11). Eine Überlappung von in beiden Mutanten fehlregulierter Gene scheint daher gegeben zu sein, und diese Gene könnten gemeinsame Zielgene des SCF^{VFB} und des CSN sein.

4.10 Expression von GUS/GFP Markerproteinen in der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante

4.10.1 Expressionsanalyse von Markern der Auxinantwort in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen

Um den Einfluß der verminderten Expression der *VFB* Gene, inklusive *VFB4*, auf Regulationsprozesse in der Pflanze genauer zu untersuchen, wurden die phänotypischen *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen mit Pflanzenlinien gekreuzt, die GUS oder GFP Marker enthielten. Inzwischen gab es viele Hinweise darauf, dass die *VFB* Proteine eine Rolle bei der Auxinantwort spielen könnten. Zu nennen wäre hier die nahe Verwandtschaft zu TIR 1 und den AFB F-Box Proteinen, die Fehlregulation mehrerer Gene der Auxinantwort im Microarray und der Seitenwurzelphänotyp. Daher wurden zunächst Marker für Auxin und die Auxinantwort ausgewählt, wie DR5:GFP (Friml et al., 2003), DR5:GUS (Ulmasov et al., 1997 a und b) und das AUX/IAA Protein BDL:GUS (Weijers et al., 2006; Dharmasiri et al., 2005b). Die Expression der GFP und GUS Reporter wurde *in vivo* untersucht, um eventuelle Unterschiede zwischen den phänotypischen Pflanzen und dem Wildtyp aufzudecken. Daraus könnten Rückschlüsse auf die Funktion der *VFB* Proteine gezogen werden.

Nach dem Einkreuzen der genannten Markerlinien wurden die wildtypischen und die F2 Nachkommen mit dem Seitenwurzelphänotyp auf die Expression der Markerproteine hin untersucht. Das DR5:GFP Konstrukt in den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen wurde mittels konfokaler Mikroskopie in den Wurzelspitzen untersucht. Es konnte jedoch keine Änderung im Expressionsmuster detektiert werden (Abb. 19 A und B). Für phänotypische DR5:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen konnten im Vergleich mit dem Wildtyp jedoch deutliche Veränderungen in der Expression des GUS Markers beobachtet werden (Abb. 19 C und D). Die Expression des Markerproteins war sowohl in den Blättern als auch bei auswachsenden Seitenwurzeln, sowie in Seitenwurzeln reduziert. Besonders auffällig war jedoch, dass in den Wurzelspitzen der phänotypischen Pflanzen fast keine GUS Färbung mehr detektierbar war. Dies würde bedeuten, dass in diesem Gewebe kaum Auxin vorhanden ist, oder dass die Auxinantwort beeinträchtigt ist.

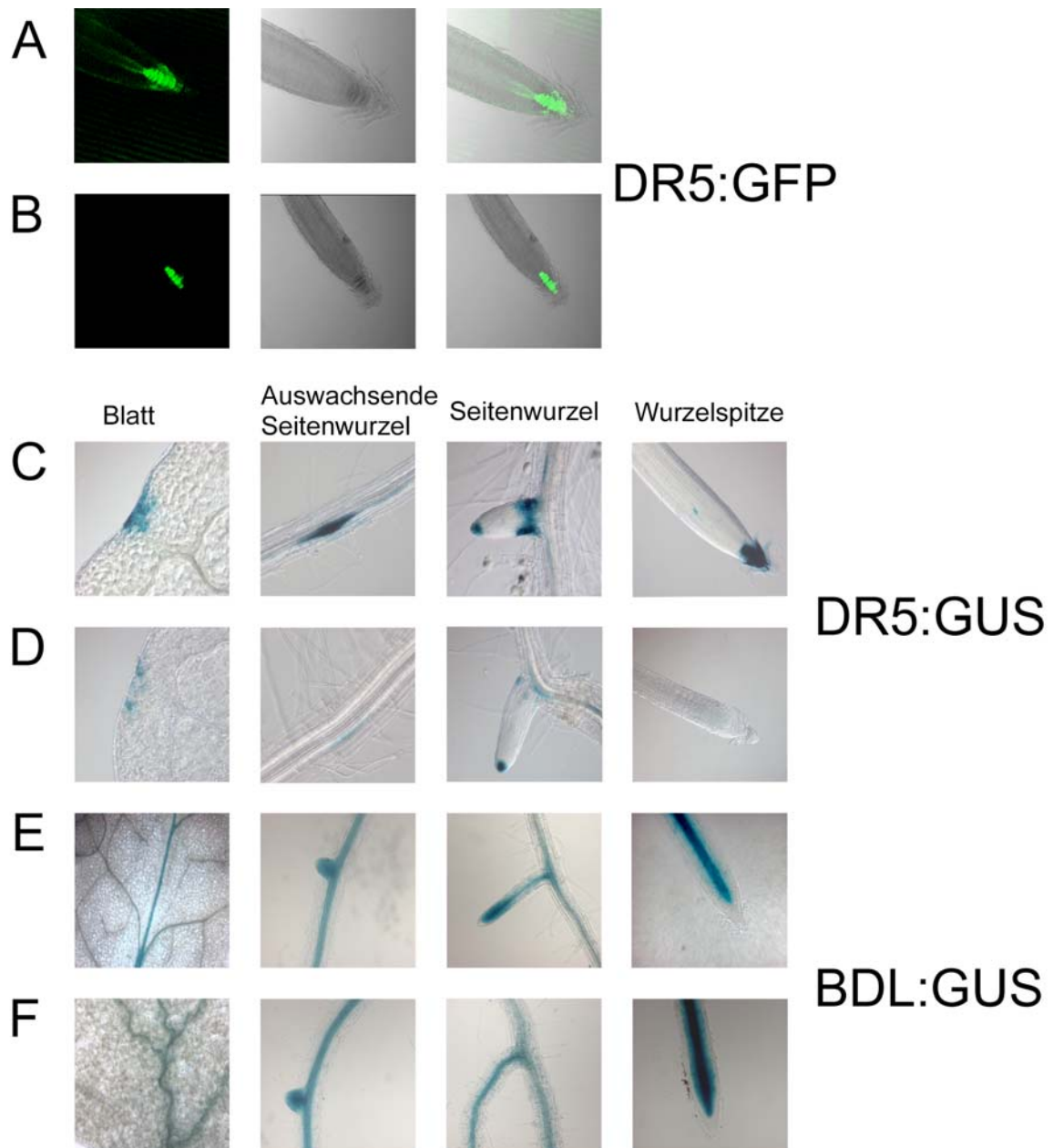


Abb. 19: Analyse der auf Auxin bezogenen GUS/GFP Markerlinien, gekreuzt mit *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen. Die Analyse der DR5:GFP *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Linien erfolgte in Wurzelspitzen im Konfokalmikroskop. Die wildtypischen Pflanzen (A) wiesen dieselbe Fluoreszenz auf wie die phänotypischen Mutanten. (B). Für die Analyse der DR5:GUS Expression wurden Blätter, auswachsende Seitenwurzeln, Seitenwurzeln sowie die Wurzelspitzen verschiedener Linien nach GUS Färbung im Lichtmikroskop untersucht und digital dokumentiert. (C) zeigt die wildtypischen Nachkommen der DR5:GUS Kreuzung, während (D) die Unterschiede dazu in den phänotypischen Mutanten zeigt. In (E) und (F) sind die Expressionsstudien in den Nachkommen der BDL:GUS Kreuzung abgebildet; (E) Wildtyp und (F) phänotypische Mutanten.

Die Analyse der Pflanzen mit dem BDL:GUS Konstrukt ergab, dass es zwischen den wildtypischen und den phänotypischen Nachkommen der Kreuzung keinen Unterschied in der Expression des Proteins gab (Abb. 19 E und F).

Eine detailliertere Analyse für Pflanzen die DR5:GUS trugen, schien jedoch interessant. Hierzu wurden bei DR5:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Keimlingen die Zahl der sich bildenden Seitenwurzeln pro cm gezählt. Die GUS Färbung ist hier ein Indikator für die Initiierung von Seitenwurzeln, da vor dem Auswachsen der Seitenwurzel eine Kanalisierung von Auxin zum Punkt des Auswachsens in Perizykelzellen stattfindet. Phänotypische DR5:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen weisen deutlich weniger Seitenwurzeln als die wildtypischen auf. Jedoch konnte kein Unterschied in der Anzahl der gefärbten initiierten Wurzeln gezählt werden (Abb. 20). Dies würde bedeuten, dass die DR5:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Keimlinge zwar Seitenwurzeln initiieren, diese jedoch nicht auswachsen.

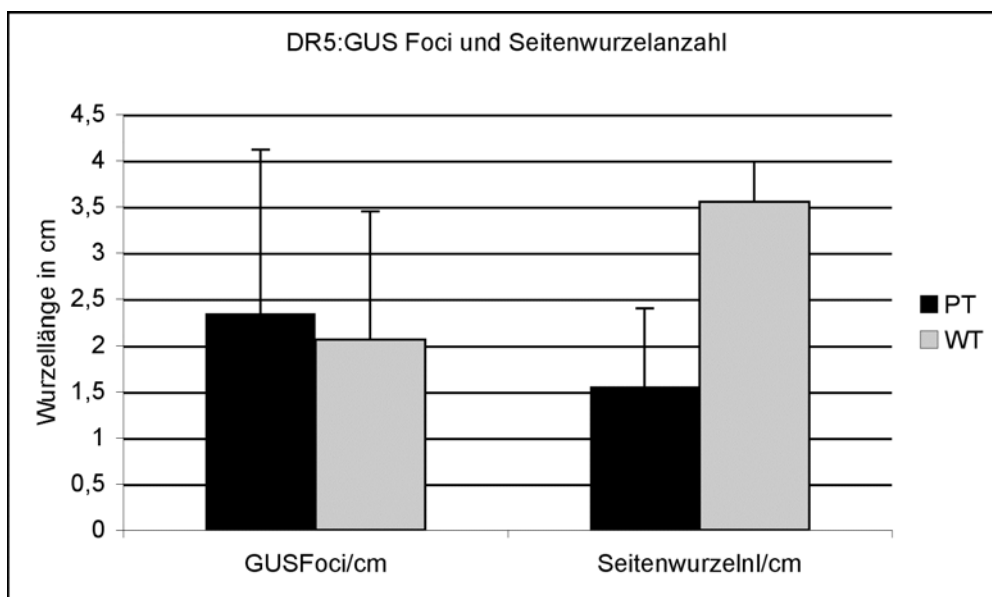


Abb. 20: Analyse des DR5:GUS Konstrukts in den Seitenwurzeln der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen. Abgebildet sind links die Anzahl der gefärbten auswachsenden Seitenwurzeln (GUS Foci) in wildtypischen Pflanzen (WT) und phänotypischen Pflanzen (PT). Die Balken rechts zeigen die Gesamtanzahl von Seitenwurzeln in wildtypischen Pflanzen (WT) und phänotypischen Pflanzen (PT). Beide Kriterien wurden pro cm/Wurzel ausgezählt.

Um die Untersuchung der Expression von Proteinen der Auxinantwort in den dreifachen *VFB* Mutanten mit dem *vfb4* (RNAi) Konstrukt auszuweiten, wurde eine weitere Kreuzung mit HS:*AXR3/IAA17*NT:GUS durchgeführt. Der N-Terminus des AUX/IAA Proteins *AXR3/IAA17* ist hier mit dem GUS Protein fusioniert, und das Fusionskonstrukt ist unter Kontrolle eines Hitzeschock-induzierbaren Promotors in Columbia Pflanzen eingebracht worden (Gray et al., 2001). Pflanzen mit diesem Konstrukt exprimieren dieses daher erst nach einem Hitzeschock bei 42° C. Das *AXR3/IAA17* Protein ist ein Substrat von TIR1 und den AFB F-Box Proteinen, die mit den *VFB* F-Box Proteinen verwandt sind. Die Fragestellung dieser Untersuchungen war daher, ob *AXR3/IAA17* in den *vfb* Mutanten stabilisiert ist oder ob der Abbau normal stattfindet und die *VFB* Proteine damit nicht am Abbau des AUX/IAAs beteiligt sind.

Nach dem Kreuzen wurden zunächst F1 Pflanzen angezogen und die Samen abgesammelt. Die F2 Pflanzen wurden nach einem Hitzeschock auf das HS:*AXR3/IAA17*NT:GUS-Signal überprüft. GUS positive Pflanzen wurden genotypisiert und eine Linie propagiert. Diese war als *vfb1-1 vfb2-1* homozygot und *VFB3/vfb3-1* heterozygot genotypisiert worden. Zusätzlich enthielt sie das *vfb4* (RNAi) Konstrukt. Mit den F3 Nachkommen wurde mehrmals eine GUS Färbung durchgeführt. Analysiert wurde jeweils die HS:*AXR3/IAA17*NT:GUS Ausgangslinie und die phänotypischen Nachkommen der Kreuzung. Alle Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt 14 Tage alt. Die phänotypischen Pflanzen zeigten deutlich weniger Seitenwurzeln als die Kontrollpflanzen. Mehrmals wurde nach der Färbung beobachtet, dass die phänotypischen Nachkommen eine intensivere GUS Färbung, folglich mehr *AXR3/IAA17*:GUS Protein, aufweisen als die wildtypischen Pflanzen (Abb. 21 A und B). Daraus wurde geschlossen, dass die phänotypischen Pflanzen nicht, oder zumindest nicht im selben Ausmaß wie der Wildtyp, in der Lage sind, das Protein abzubauen. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde die GUS Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Hitzeschock durchgeführt. Dabei sollte deutlich werden, ob der Abbau des HS:*AXR3/IAA17*:GUS Proteins normal stattfinden kann oder nicht. Als Zeitpunkte für die GUS Färbung wurden nach Vorversuchen 0 min, 60 min, 120 und 180 min gewählt.

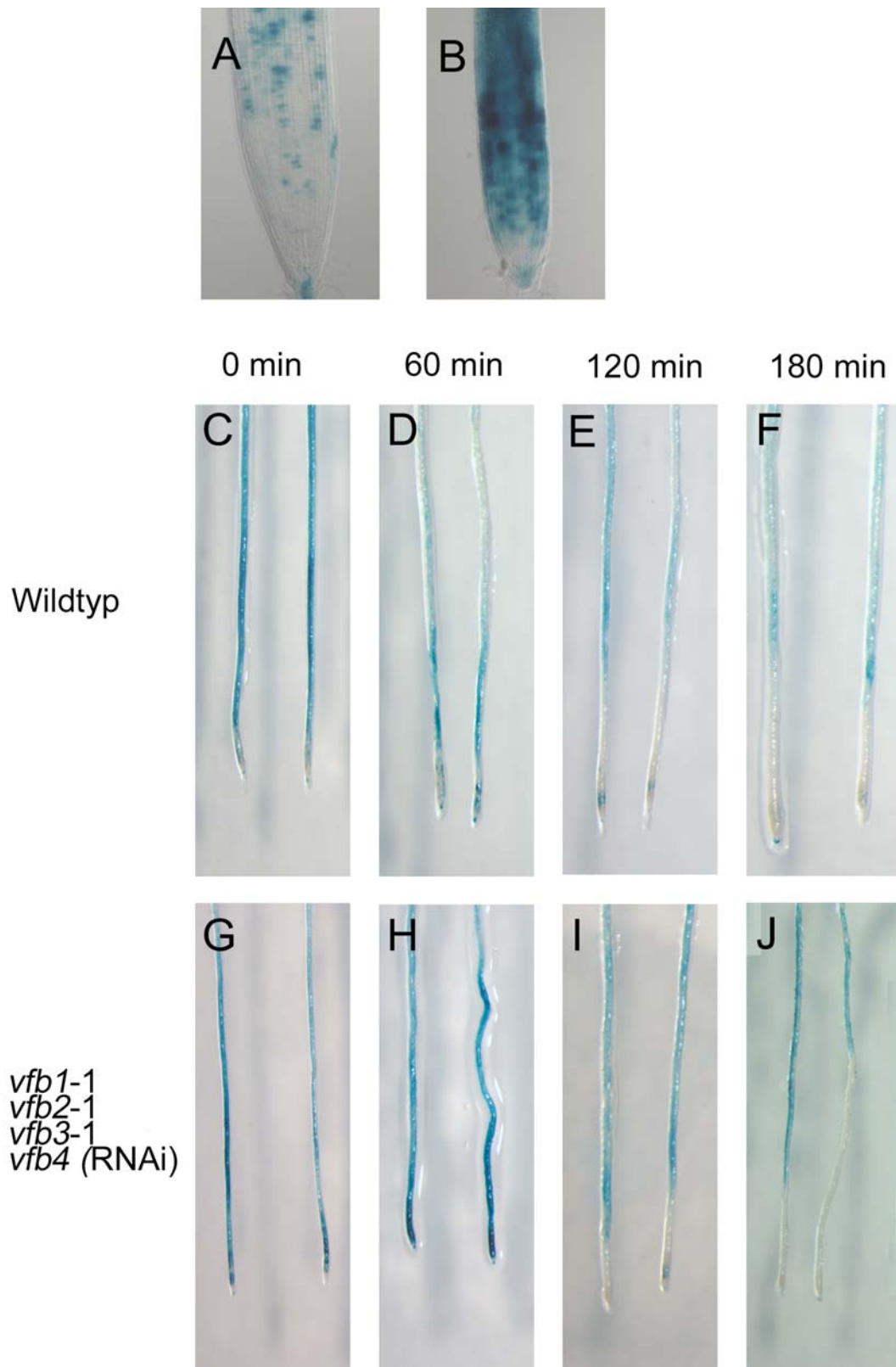


Abb. 21: GUS Färbung von HS:AXR3/IAA17NT:GUS *vfb1-1vfb2-1vfb3-1vfb4 (RNAi)* Pflanzen. (A) und (B) Vergleich wildtypischer (A) und phänotypischer (B) Nachkommen der Kreuzungen. Aufnahmen von 10 Tage alten Keimlingen. (C) bis (J) GUS Färbungen von Wildtyp HS:AXR3/IAA17NT:GUS (C bis F) und HS:AXR3/IAA17NT:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4(RNAi)* Pflanzen (G bis J) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 60 min, 120 min und 180 min). Die GUS Färbung nimmt proportional zur Zeit ab, was den Abbau von AXR3/IAA17 optisch verdeutlicht.

Man kann erkennen, dass die GUS Färbung proportional zur Zeit abnimmt, was den Abbau des AUX/IAAs optisch verdeutlicht. Sowohl bei den wildtypischen Nachkommen der HS:AXR3/IAA17NT:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Kreuzungen (Abb. 21 C bis F) als auch bei den phänotypischen wurde derselbe Effekt gefunden (Abb. 21 G bis J). Das bedeutet, dass in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen keine Stabilisierung von AXR3/IAA17 stattfindet wie dies bei *tir1-1* Mutanten der Fall ist (Gray et al., 2001). Die VFB Proteine agieren folglich nicht in derselben Weise wie TIR1 und die AFB F-Box Proteine, da in Mutanten dieser Proteine AXR3/IAA17 stabilisiert ist und nicht effizient abgebaut werden kann.

4.10.2 Analyse der Expression weiterer Markerlinien in *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen

Da die VFB Proteine bislang nicht deutlich einem Signalweg der Pflanze zugeordnet werden konnten, wurde auch die Expression weiterer GUS-Fusionsproteine untersucht. Für die Untersuchung der möglichen Auswirkungen auf den Zellzyklus wurde CyclinB1:GUS (CYCB1:GUS) gewählt, welches in sich teilenden Zellen exprimiert wird (Ferreira et al., 1994). Hier konnten keine Veränderungen der Expression in den phänotypischen *vfb4* (RNAi) Pflanzen beobachtet werden (Abb. 22 A und B). Als Marker für die Cytokinin-induzierte Pflanzenantwort wurde das Promotor:GUS Konstrukt ARR5:GUS eingekreuzt (Brandstatter und Kieber, 1998). Bei Analyse des Expressionsmusters mittels GUS Färbung konnte jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp keine Veränderung festgestellt werden (Abb. 22 C und D). Die VFB Proteine scheinen also keinen Einfluß auf den Zellzyklus und den Cytokinin-signalweg zu haben.

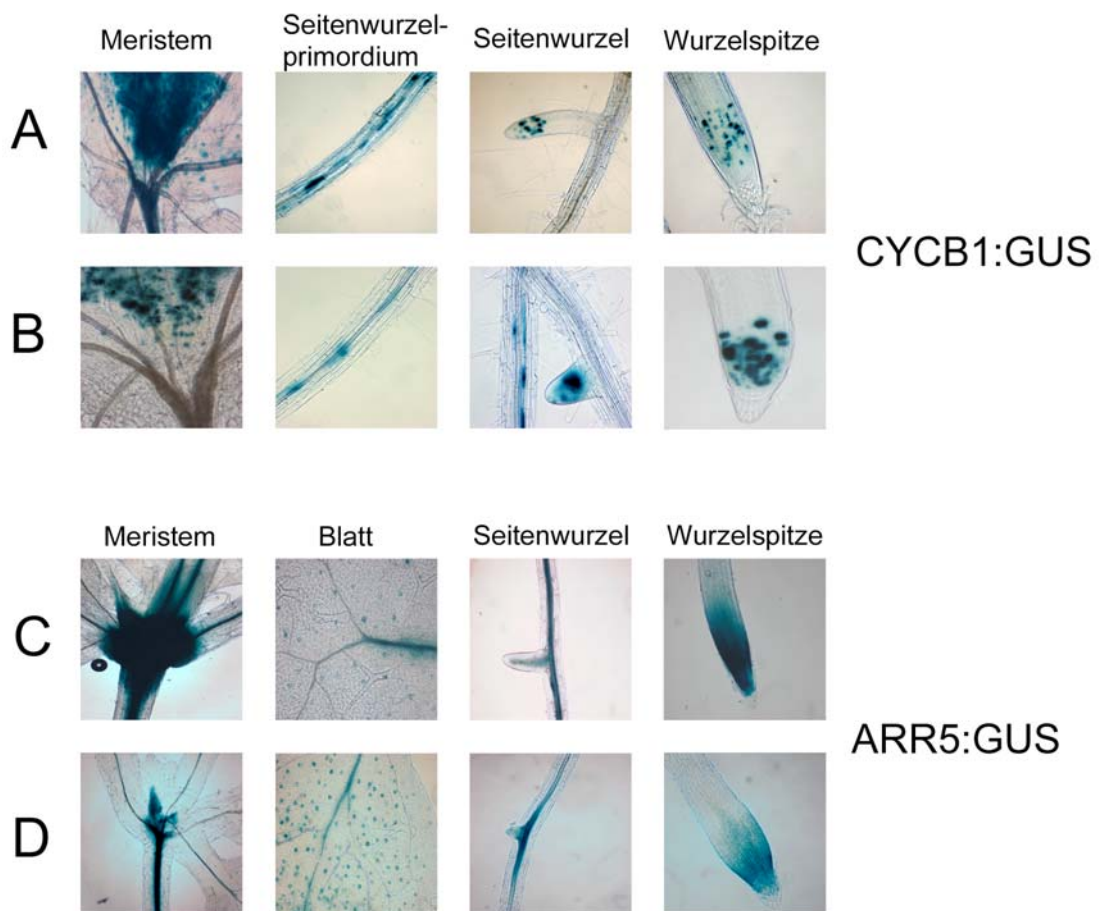


Abb. 22: Expressionsanalyse der CYCB1:GUS und ARR5:GUS Konstrukte in den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen. Es wurden jeweils 14 Tage alte Keimlinge einer GUS Färbung unterzogen. (A) Wildtypische CYCB1:GUS Keimlinge; gezeigt sind Auschnitte vom Meristem, den Seitenwurzelpremordien, Seitenwurzeln und die Wurzelspitzen. In (B) sind korrespondierende Auschnitte der phänotypischen CYCB1:GUS Nachkommen aufgezeigt. (C) und (D) zeigt GUS Färbungen in ARR5:GUS Keimlingen. Dabei sind (C) die wildtypischen und (D) die phänotypischen Keimlinge.

Da die DR5:GUS Linien (Abb. 19 und 20) einen Hinweis darauf gaben, dass die *vfb4* (RNAi) Pflanzen einen Defekt beim Auswachsen der Seitenwurzeln haben, wurden weitere Versuche mit der CYCB1:GUS Linie durchgeführt. Diese könnte genaueren Aufschluss über das Auswachsen der Seitenwurzeln geben. Dafür wurde zusätzlich zur GUS Färbung eine Behandlung mit Auxin in das Experiment miteinbezogen. Die Gabe von Auxin stimuliert das Seitenwurzelnwachstum. Beim Wildtyp, in diesem Fall die Ausgangslinie CYCB1:GUS, wurde schon nach 4 Stunden Auxinbehandlung ein Ansteigen der GUS Färbung (GUS Foci) in den Seitenwurzelnanlagen festgestellt

(Abb. 23 A). Nach 24 Stunden war diese nochmals erhöht. Bei den phänotypischen Keimlingen erhöhte sich die Anzahl der sogenannten GUS Foci trotz Auxin über den gesamten Zeitraum nicht. Der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Phänotyp scheint also, was die Initiierung von Seitenwurzeln betrifft, resistent gegen Auxin zu sein (Abb. 23 A). Wie erwartet, war die Summe der Seitenwurzeln in den phänotypischen Pflanzen gegenüber dem wildtypischen reduziert (Abb. 23 B).

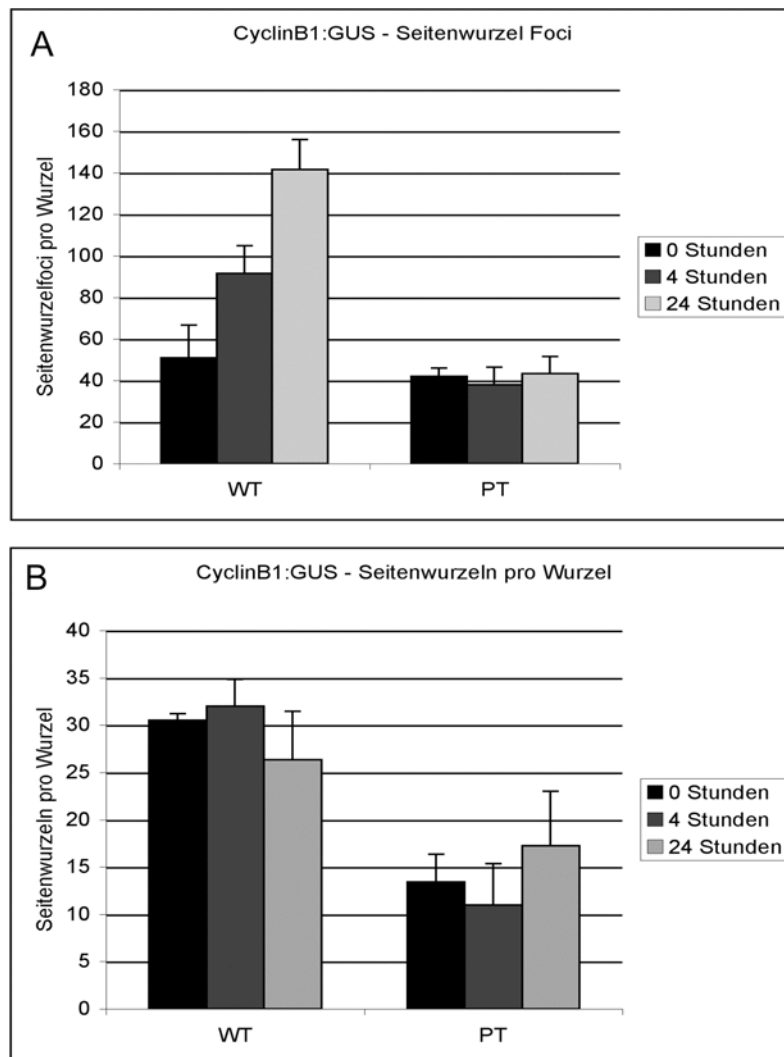


Abb. 23: Auswertung der GUS Färbungen von CYCB1:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen im Auxinexperiment. (A) CYCB1:GUS *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi): GUS Foci der sich neubildenden Seitenwurzeln im Auxinexperiment. (B) Als Kontrolle wurden die Seitenwurzeln pro Wurzel der Pflanzen gezählt.

4.11 Analyse zur möglichen Komplementierung des *tir1-1* Phänotyps

Die *tir1-1* Mutanten haben weniger Seitenwurzeln und sind leicht agravitrop. Außerdem sind diese Mutanten resistent gegen Auxin. Bei Anzucht auf Auxin zeigt die *tir1-1* Mutante noch Wurzelelongation, während der Wildtyp keine Elongation der Wurzel aufweist (Ruegger et al., 1998).

Die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutanten ebenso wie die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (miRNA) Mutanten zeigen einen Phänotyp mit weniger Seitenwurzeln und verkürzter Primärwurzel, der in dieser Hinsicht dem *tir1-1* Phänotyp ähnlich ist. Zusätzlich besteht eine relativ nahe Verwandtschaft zu TIR1 und den AFB Proteinen. Aufgrund dieser Tatsachen wurde versucht herauszufinden, ob *VFB2* als repräsentatives Mitglied der *VFB* Familie in der Lage ist, TIR1 funktionell zu ersetzen und den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Hierzu wurden *tir1-1* Pflanzen generiert, die *VFB2* unter dem 35S CaMV Promotor exprimieren, um diese im Vergleich mit *tir1-1* Pflanzen auf Auxinresistenz zu testen. Da es in anderen Versuchen nicht möglich war, transgene Pflanzen zu erzeugen, die ein Mitglied der *VFB* Familie überexprimieren, transformierten wir *tir1-1* Pflanzen mit einem Dexamethason-induzierbarem *VFB2* Konstrukt. Die erhaltenen transgenen Pflanzen wurden schließlich mit den *tir1-1* Pflanzen auf Auxin verglichen, um eine mögliche Komplementation des Mutantenphänotyps zu untersuchen. Zuerst wurde unmarkiertes *VFB2* in den Dexamethason-induzierbaren pTA 7002 Vektor (Aoyama und Chua, 1997) kloniert und in die *tir1-1* Mutante transformiert. Die generierten F1 Pflanzen wurden daraufhin getestet, ob sie bei der Behandlung mit Dexamethason *VFB2* exprimieren. Dies wurde mittels RT-PCR bei 3 Linien verifiziert (Abb. 24).

Anschließend wurden die Nachkommen der Linien, die nachweislich induzierbar waren, einem Auxinexperiment unterzogen. Falls *VFB2* das mutierte *tir1* Protein funktionell ersetzen könnte, sollten sich diese Linien wie Columbia Pflanzen verhalten. Wenn das *VFB2* Protein nicht in der Lage ist, *tir1-1* zu komplementieren, sollten sich die Pflanzen wie die *tir1-1* Mutante verhalten und somit Auxinresistenz aufweisen. Wie in Abb. 25 gezeigt, war *VFB2* nicht in der Lage die Aufgaben von TIR1 zu übernehmen und den mutanten Phänotyp zu komplementieren.

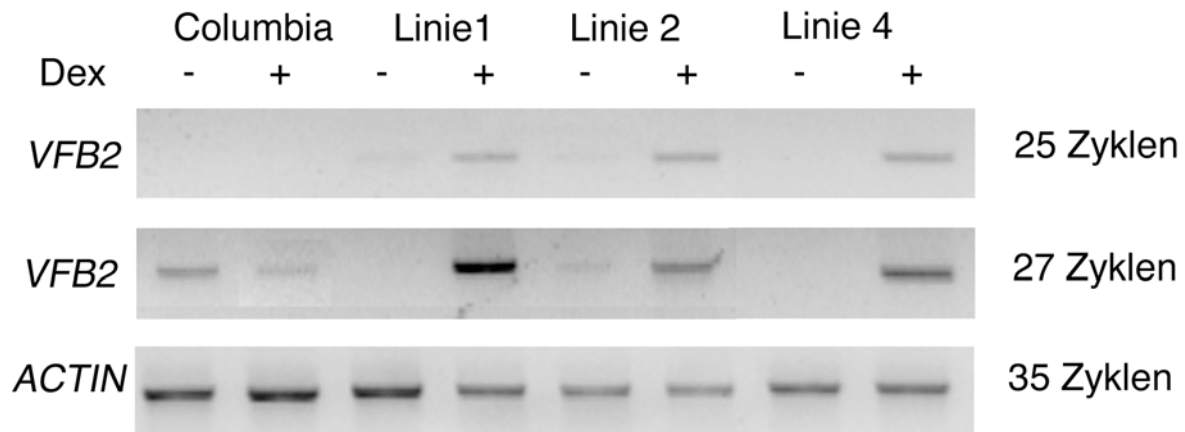


Abb. 24 RT-PCR Analyse Dex-induzierter pTA:VFB2 (*tir1-1*) Linien. Drei pTA:VFB2 (*tir1-1*) Linien wurden im Vergleich mit dem Wildtyp Columbia auf die Expression von VFB2 hin getestet. Es wurden verschiedene Anzahlen von PCR Zyklen verwendet, um den linearen Bereich der PCR Amplifikation zu erfassen. Als Kontrolle wurde das *ACTIN* Gen amplifiziert.

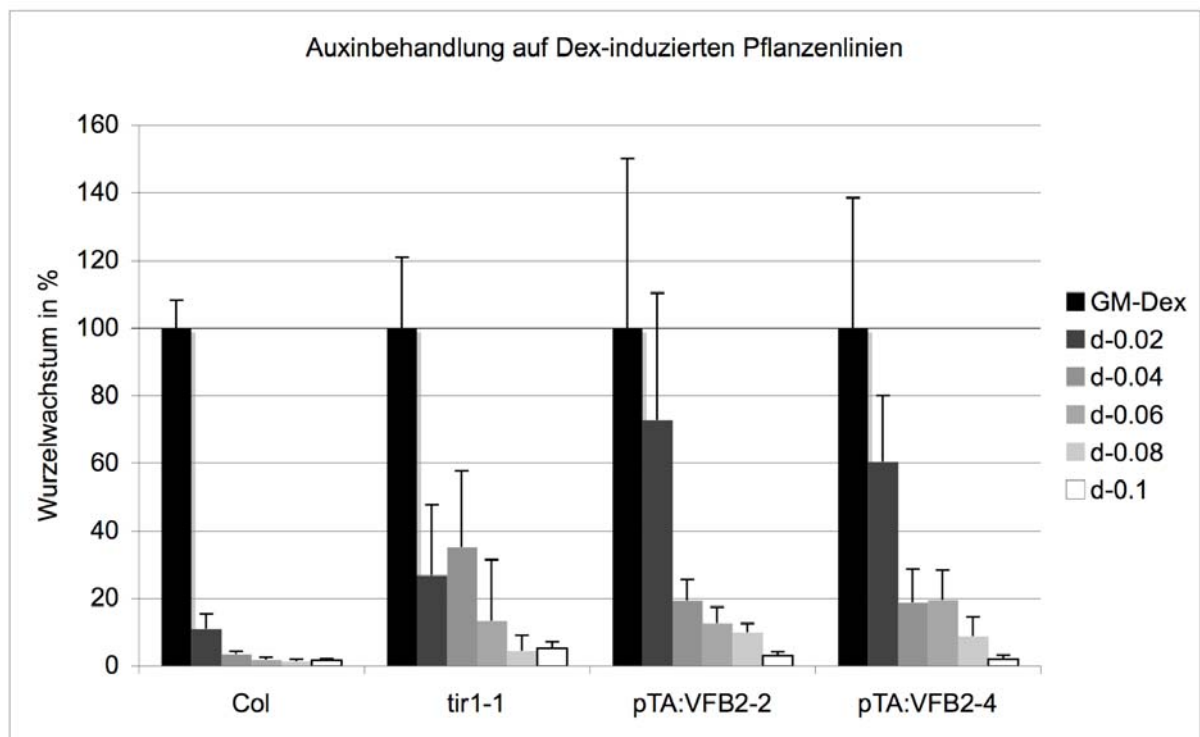


Abb. 25 Auxinbehandlung von Dexamethason induzierten Pflanzenlinien. Der Wildtyp (Col) ist ganz links abgebildet. Daneben befinden sich die *tir1-1* Mutante und die Linien pTA:VFB2-2 (*tir1-1*) und pTA:VFB2-4(*tir1-1*). Es wurde eine Kontrolle ohne Auxin durchgeführt (GM-Dex) und verschiedenen Auxinkonzentrationen benutzt (0.02 μ M bis 0.1 μ M). Bei allen Konzentrationen wurde gleichzeitig die Expression der Konstrukte mit Dexamethason induziert (d).

5. Diskussion

Eukaryotische Organismen regulieren viele zelluläre Entwicklungsprozesse über den gezielten Abbau von Proteinen durch das 26S-Proteasom. Für die Entdeckung und die Erforschung des Ubiquitin Proteasom Systems wurde im Jahre 2004 der Nobelpreis für Chemie an die Wissenschaftler Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose verliehen.

In der *Arabidopsis thaliana* Forschung wurde die Bedeutung des regulatorischen Proteinabbaus durch die Entdeckung des F-Box Proteins TIR1, welches gleichzeitig als Rezeptor für das wichtige Pflanzenhormon Auxin fungiert, unterstrichen (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski und Leyser, 2005). Doch allein die Tatsache, dass mehr als 1400 Gene in *Arabidopsis* für Komponenten dieses Abbauweges kodieren, also ungefähr 5% des Genoms, macht das Ubiquitin Proteasom System interessant für die Forschung (Bachmair et al., 2001; Vierstra, 2003; Smalle und Vierstra, 2004; Schwechheimer und Schwager, 2004). In diesem Proteinabbauweg werden Proteine mit Polyubiquitinketten markiert, dadurch vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut. Eine Möglichkeit, die Spezifität dieses Prozesses zu gewährleisten, sind spezifische Substratrezeptoren. Bei einer Form der E3 Ubiquitin Ligasen sind dies die sogenannten F-Box Proteine. In *Arabidopsis thaliana* kodieren 694 Gene für F-Box Proteine. Dies bietet der Pflanze eine immense Anzahl SCF Ligasen zu bilden, von denen bis heute jedoch nur wenige bekannt sind und einer bestimmten Funktion zugeordnet werden konnten.

5.1 Die VFB F-Box Protein Familie und Ihre Stellung in der C-Subfamilie der F- Box Proteine

Die am besten untersuchten pflanzlichen F-Box Proteine gehören zur C-Subfamilie (Gagne et al., 2002) und agieren meist in Hormonsignalwegen. Den F-Box Proteinen der C-Subfamilie gemeinsam sind die sogenannten Leucin-reichen Regionen (LRR), welche allgemein Proteininteraktionen vermitteln und bei den F-Box Proteinen für die Interaktion mit dem abzubauenen Substrat wichtig sind. Auffällig ist jedoch, dass im humanen Genom 21 LRR F-Box Proteine vorkommen, während diese Familie von F-Box Proteinen in *Arabidopsis thaliana* mit 202 Mitgliedern eine dramatische

Ausweitung erfahren hat (Jin et al., 2004; Gagne et al., 2002). Das am besten verstandene F-Box Protein dieser Familie ist das TIR1 Protein und seine nächsten Verwandten, die AFB F-Box Proteine, welche alle als Auxinrezeptor fungieren und die Auxinantwort steuern (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski und Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005b).

In einer vergleichenden phylogenetischen Studie aller 694 F-Box Proteine wurde eine eigenständige Familie von F-Box Proteinen identifiziert, die verwandtschaftlich gesehen zwischen den F-Box Proteinen EBF1 und EBF2 des Ethylensignalweges, (Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004), COI1 der Jasmonsäureantwort (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002), und TIR1, AFB1 bis 3 der Auxinantwort (Dharmasiri et al., 2005a und b; Kepinski und Leyser, 2005), liegt. Diese Familie von F-Box Proteinen, genannt VFB (Vier F-Box Proteine) Familie, wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

5.2 Expression der *VFB* Gene

Mittels Datenbankanalysen wurde zunächst festgestellt, dass für *VFB2* und *VFB4* jeweils 7 bzw. 31 ESTs, für *VFB1* und *VFB3* keine ESTs annotiert sind. Die durchgeführten Analysen der jeweiligen Promotor:GUS Fusionen zeigten, dass *VFB2* und *VFB4* in der Pflanze gut exprimiert sind, während *VFB1* und *VFB3* nur auf niedrigem Level exprimiert sind. Diese Daten wurden von der RT-PCR Analyse auf cDNA des Columbia Ökotyps von *Arabidopsis thaliana* unterstützt. Aufgrund dieser Expressionsstudien scheint *VFB4*, welches in der gesamten Pflanze und über die gesamte Entwicklung hinweg exprimiert ist, das wichtigste VFB F-Box Protein zu sein. *VFB2* scheint ebenfalls weit in der Pflanze verbreitet und ebenfalls schon in frühen Stadien exprimiert, jedoch nicht im selben Ausmaß wie *VFB4*. *VFB1* könnte eine spezielle Funktion in den Stomata haben, beruhend auf der GUS Aktivität in diesen spezialisierten Zellen. *VFB3* ist scheinbar nicht exprimiert und scheint so keine Rolle zu spielen.

5.3 Lokalisierung der VFB Proteine und die daraus folgende Auswirkung auf deren Funktion

Untersuchungen zur Lokalisierung bekannter F-Box Proteine wie EBF1 und EBF2, sowie TIR1 und AFB1, ABF2 und ABF3 ergaben jeweils eine Lokalisierung im Nukleus (Potuschak et al., 2003; Dharmasiri et al., 2005 b). Auch die bekannten Substrate dieser F-Box Proteine sind im Nukleus lokalisiert. Für EBF1 und EBF2 ist dies der Transkriptionsfaktor EIN3, für TIR1 und AFB1 bis 3 sind es die AUX/IAA Proteine (Potuschak et al., 2003; Reed, 2001; Overvoorde et al., 2005). Auch das Substrat von COI1, dem F-Box Protein der Jasmonsäureantwort, RPD3b (HDA6), ist als Histondeacetylase im Nukleus lokalisiert (Devoto et al., 2002). Aufgrund der Verwandtschaft der VFB Proteine zu den genannten F-Box Proteinen, wäre anzunehmen, dass auch die VFB Proteine im Nukleus lokalisiert sein. Die Untersuchung von Fusionsproteinen in Protoplasten ergab für VFB2 und VFB4 jedoch eine zytoplasmatische Lokalisierung (Abb. 9). Im Vergleich mit der Lokalisierung der anderen F-Box Proteine war dies zunächst überraschend. Da das 26S-Proteasom als proteolytische Komponente des Ubiquitin Proteasom Systems jedoch sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma aktiv ist (Smalle und Vierstra, 2004), erscheint eine Funktion der VFBs im Zytoplasma durchaus möglich. Auch Substrate des SCF^{VFB} müssten folglich im Zytoplasma zu suchen sein.

Um zunächst herauszufinden, ob die VFB Proteine in einen SCF Komplex eingebunden sind, wurde ein Hefe-2-Hybrid Experiment durchgeführt. Das VFB2 Protein wurde als Vertreter der VFB Familie auf Interaktionen mit den SCF Komplex Komponenten Cullin1, RBX1 und ASK2 getestet, und eine Interaktion mit ASK2 konnte nachgewiesen werden (Schwechheimer et al., 2001; Risseeuw et al., 2003; Abb. 10). Daher scheint ein SCF^{VFB} möglich.

Um aktiv Substrate identifizieren zu können, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verwendet. Eine zweistufige Aufreinigung von VFB2 mittels des TAP-Tags konnte uns keinen Aufschluss geben, da die Aufreinigung nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dagegen konnten mittels eines Hefescreens putative Interaktoren identifiziert werden (Tab. 2). Dabei fällt die identifizierte putative Beta-Amylase 3 (BMY3) auf. Diese wurde im durchgeführten Microarrayexperiment der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp als induziert gefunden (Tab. 8). Leider konnten für dieses Protein keine Daten zur

Lokalisierung gefunden werden, wodurch für den Moment eine Vorhersage, ob das Protein ein Substrat von VFB2 sein könnte, schwierig wird. Dies trifft auch auf einen weiteren putativen Interaktor, das CYTOCHROME P450 71B14 zu. Auch hier wurden keine spezifischen Daten zur Lokalisierung gefunden.

Ein weiteres putativ interagierendes Protein aus dem Hefescreen ist POM1, ein Chitinase ähnliches Protein. Die *pom-pom1* Mutante wurde bereits untersucht (Rogers et al., 2005) und eine Verbindung mit dem Zellwandmetabolismus und der Lignifizierung von Zellen festgestellt. Da im Microarray viele Proteine, die dem Zellwandmetabolismus zugeordnet werden können, missreguliert waren, wäre eine Interaktion mit den VFB Proteinen denkbar.

Das als interagierend gefunden SFR2 (SENSITIVE TO FREEZING 2) Protein erscheint ebenfalls interessant. Es ist in der Membran der Chloroplasten lokalisiert, kommt also somit in den grünen Geweben der Pflanzen vor (Thorlby et al., 2004) und könnte mit den VFBs kolokalisieren. Jedoch weisen die durchgeführten Experimente mit den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) und (miRNA) Pflanzen auf eine Rolle der VFB Proteine bei der Entwicklung der Wurzel und Seitenwurzeln hin. Dies schließt eine direkte Interaktion der VFBs mit SFR2 eigentlich aus, da SFR2 in den Wurzeln kaum exprimiert zu sein scheint (Thorlby et al., 2004). Da SFR2 eine Rolle bei der pflanzlichen Reaktion auf Kälte spielt und die *vfb* Mutante nicht auf Kältesensitivität getestet wurde, könnte dies in der Fortführung des Projektes untersucht werden.

Die identifizierten Proteine IMD1 und 2 wurden bereits in einem anderen Hefescreen mit derselben cDNA Bank gefunden (L.I.A Calderon Villalobos, persönliche Mitteilung) und gelten als Autoaktivatoren, so dass eine Interaktion mit den VFBs ausgeschlossen werden kann.

5.4 Rolle der VFB Proteine bei der Auxinantwort

Die VFB Familie liegt verwandtschaftlich gesehen zwischen den F-Box Proteinen des Ethylensignalweges, EBF1 und EBF2, der Jasmonsäureantwort, COI1, und der Auxinantwort, TIR1 und AFB1 bis 3 (Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004; Devoto et al., 2003 und 2005; Dharmasiri et al., 2005a und b; Kepinski und Leyser, 2005). Um mehr über die biologische Funktion der VFB F-Box

Proteine zu erfahren, benutzten wir den Ansatz der reversen Genetik. So konnten die Kock-out Allele *vfb1-1*, *vfb2-1* und *vfb3-1* identifiziert werden. Da jedoch weder die Einzel-, noch die Doppel- oder Dreifachmutante einen Phänotyp aufwies, und da bekannt war, dass VFB4 das am höchsten exprimierte und damit vermutlich wichtigste Familienmitglied ist, mussten weitere experimentelle Ansätze zugezogen werden, um die VFB4 Expression zu unterdrücken. Es wurden RNAi und miRNA Konstrukte erstellt, und in den Wildtyp und den dreifach mutierten Hintergrund eingebracht. Pflanzen, die das *vfb4* (RNAi) oder (miRNA) Konstrukt im *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Hintergrund trugen, wiesen Defekte im Pflanzenwachstum und in der Bildung und dem Auswachsen der Seitenwurzeln auf. Dieser Phänotyp erinnert an die Auxin-vermittelten Phänotypen bekannter Mutanten, unter anderem auch dem *tir1-1* Phänotyp (*shy2-2*:Tian and Reed, 1999; *gnom*: Geldner et al., 2004; *msg2-1*:Tatematsu et al., 2004; *axr5-1*: Yang et al., 2004; *slr1/iaa14*: Fukaki et al., 2002; Vanneste et al., 2005; *tir1-1*: Ruegger et al., 1998). Könnten die VFB Proteine also eine Rolle bei der Auxinantwort spielen? Ein erstes Experiment dazu, nämlich die Anzucht der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) auf Auxin (IAA), konnte diese Annahme zunächst nicht unterstützen, da die Ausbildung von Seitenwurzeln auf Auxin im Gegensatz zu *tir1-1* nicht negativ beeinflusst war (Abb. 17). In den genannten Mutanten des Auxinsignalweges beruht der Phänotyp auf der Stabilisierung der AUX/IAAs (*shy2-2*:Tian and Reed, 1999; *msg2-1*:Tatematsu et al., 2004; *axr5-1*: Yang et al., 2004; *slr1/iaa14*: Fukaki et al., 2002; Vanneste et al., 2005) oder auf dem Fehlen von Komponenten des AUX/IAA Abbaus (*tir1-1*: Ruegger et al., 1998; *afb1-1*, *afb2-1*, *afb3-1*: Dharmasiri et al., 2005 b). Am Beispiel des AUX/IAA Proteins AXR3/IAA17, welches ein Substrat von TIR1 darstellt, konnte festgestellt werden, dass der Abbau des AUX/IAAs in den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen normal stattfindet (Abb. 21). Die Expression eines weiteren AUX/IAAs, IAA12/BODENLOS, schien ebenfalls nicht beeinflusst zu sein. Auch die versuchte Komplementation des *tir1-1* Phänotyps durch ein Mitglied der VFB Familie war nicht erfolgreich. Die VFB Proteine scheinen daher nicht in den bekannten Wegen der Auxinantwort zu agieren.

Trotz dieser Ergebnisse gibt es einige Fakten, die dennoch für eine Rolle der VFB Proteine bei der Auxinantwort sprechen. In den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutanten zeigte der Auxinmarker DR5:GUS Abweichungen von der Expression im Wildtyp (Abb. 19). Zusätzlich wurde das Expressionsprofil der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1*

vfb4 (RNAi) mittels Microarray mit dem des Wildtyps verglichen und unter den fehlregulierten Genen waren viele Gene der Auxinantwort überrepräsentiert. Neben diesen war jedoch eine weitere Familie von fehlregulierten Genen in unserem Microarray überrepräsentiert. Dies waren Gene, die für Enzyme des Zellwandmetabolismus kodieren. Diese stehen primär nicht unter der Kontrolle von Auxin, dennoch gibt es einen Zusammenhang mit dem Auxinsignalweg. Das Expressionsprofil der „gain-of-function“ Mutante *axr3/iaa17* weist eine hohe Anzahl an fehlregulierten Genen des Zellwandmetabolismus auf (Overvoorde et al., 2005), und auch in einem Microarrayexperiment zur Untersuchung von auxininduzierten Genen während der Seitenwurzelbildung, fielen Missregulationen unter Genen für Enzyme des Zellwandmetabolismus auf (Laskowski et al., 2006). Da die Bildung von Zellwänden und das Streckungswachstum für die Bildung von Seitenwurzelprimordien und Seitenwurzeln benötigt wird, ist es nicht überraschend, eine Vernetzung der Auxinantwort mit dem Zellwandmetabolismus zu finden. Die VFB Proteine könnten also über die Beeinflussung von Proteinen der Auxinantwort auf den Zellwandmetabolismus und die Bildung von Seitenwurzeln wirken. Interessant zu wissen wäre, ob eine Überexpression von *VFB4* ausreicht, um eine verstärkte Seitenwurzelbildung anzuregen. Leider konnten keine Pflanzen generiert werden, die ein Mitglied der VFB Familie überexprimieren. Bei Pflanzen die das Dexamethason-induzierbare pTA:VFB2 Konstrukt enthielten, wurden im Rahmen der durchgeführten Experimente keine offensichtlichen Veränderungen des Seitenwurzelwachstums festgestellt.

Dem Auswachsen von Seitenwurzeln geht scheinbar eine Kanalisierung von Auxin zum Seitenwurzelprimordium, und später zur Spitze der auswachsenden Wurzel voraus. Dies geschieht durch die polare Lokalisierung des Auxineffluxcarriers PIN1 durch den ARF-GEF GDP/GTP Austauschfaktor GNOM (Geldner et al., 2004). Eine schwache *gnom* Mutante weist genau wie die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante weniger Seitenwurzeln auf (Geldner et al., 2004). Auch scheint die Auxinantwort in den Seitenwurzeln der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante reduziert zu sein (Abb. 19). Das Auswachsen der Seitenwurzeln ist blockiert (Abb. 23), kann jedoch prinzipiell stattfinden (Abb. 17). Basierend auf diesen Daten könnte in den *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Pflanzen die Kanalisierung des Auxins ab einem bestimmten Zeitpunkt gestört sein, so dass das Auswachsen der Seitenwurzeln nur bedingt stattfindet. Dies könnte auf einer Interaktion mit PIN1

beruhen. Dies ist allerdings nur eine Spekulation, da bislang keine Experimente in diese Richtung durchgeführt wurden.

5.5 VFB vs. CSN – Übereinstimmungen im Expressionsprofil der Mutanten

Für die normale Funktion von SCF E3 Ligasen ist die Aktivität des konservierten CSN Komplexes von großer Bedeutung. Bislang konnte in *Arabidopsis* die Interaktion von SCF^{TIR1}, SCF^{COI1} und SCF^{UFO} mit dem CSN nachgewiesen werden (Schwechheimer et al., 2001; Feng et al., 2003; Wang et al., 2003). Dies und weitere Daten aus anderen Organismen weisen daraufhin, dass alle Cullin-RING Ligasen von der Funktion des CSN abhängig sind (Schwechheimer et al., 2004). Im Vergleich mit Daten aus einem Microarray der *csn4* Mutante konnten 181 Gene identifiziert werden, die sowohl in der *csn* Mutante als auch in der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante fehlreguliert sind. Darunter waren ebenfalls Gene der Auxinantwort. Die fehlregulierten Gene der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutanten könnten also zum Phänotyp und der reduzierten Auxinantwort der *csn* Mutanten beitragen.

5.6 Biologische Rolle der VFB Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die VFB F-Box Proteine in *Arabidopsis thaliana* exprimiert sind und in einem SCF Komplex funktionieren könnten. Jedoch scheinen die vier Gene zumindest partiell redundant zu sein, da erst ein Phänotyp auftritt und das Wachstum der Pflanze negativ beeinflusst wird, wenn alle vier Mitglieder der Familie ausgeschaltet sind. Eine Rolle der VFB Proteine bei der Auxinantwort scheint gegeben zu sein, jedoch nicht auf den bislang bekannten Wegen. Aufgrund der Verwandtschaft zum F-Box Protein TIR1 und dessen nahesten Verwandten AFB1, AFB2 und AFB3, schien zunächst eine ähnliche Funktion möglich. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da die VFB Proteine aufgrund Ihrer Lokalisierung nicht dieselben Substrate wie TIR1 abbauen können und auch eine Komplementierung des *tir1-1* Phänotyps nicht möglich war.

Allerdings sollten weitere Verwandte F-Box Proteine in Analysen miteinbezogen werden. Auch COI1, das F-Box Protein der Jasmonsäureantwort ist

ein naher Verwandter der VFB F-Box Proteine (Devoto et al., 2002 und 2005). Jedoch gibt es keinerlei Hinweise auf eine Rolle der VFBs in diesem Hormonsignalweg. Im physiologischen Assay war die Antwort der Dreifachmutante normal (Abb. 14 E) und auch hier ist die Lokalisierung des F-Box Proteins im Gegensatz zu den VFB Proteinen nuklear. Für die Verwandtschaft zu den F-Box Proteinen des Ethylensignalweges, EBF1 und EBF2, gilt dasselbe (Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003). Allerdings wurde die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante nicht auf ihre Antwort auf die genannten Hormone hin überprüft. Dennoch erscheint eine Rolle in einem der beiden Hormonsignalwege unwahrscheinlich, da auch im Microarray keine Hinweise auf eine Fehlregulierung dieser Signalwege gefunden wurden. Ein weitere naher Verwandter in der C-Subfamilie der F-Box Proteine ist das *Arabidopsis* Ortholog zum humanen SKP2 Protein. Dieses F-Box Protein wird für den Abbau von Zellzyklusregulatoren und -inhibitoren benötigt (Marti et al., 1999; Sutterluty et al., 1999; Ungermannova et al., 2005). Erste Untersuchungen, ob die VFB Proteine eine Rolle beim Zellzyklus spielen, wurden anhand des CYCB1:GUS Markers in der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutante durchgeführt. Jedoch konnte keine Veränderung in der Expression des Zellzyklusmarkers festgestellt werden. Allerdings konnte mit diesem Marker gezeigt werden, dass die *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) Mutanten bei Behandlung mit Auxin im Gegensatz zum Wildtyp, resistent sind, was das Auswachsen von Seitenwurzeln betrifft (Abb. 23).

Ein zu den VFB Proteinen homologes Protein aus Tabak, AVR9/CF-9 RAPIDLY ELICITED PROTEIN 189, wird durch die Behandlung mit Flagellin induziert (Rowland et al., 2005). Auch VFB4 wurde in einer Studie bereits als Flagellin-induzierbar identifiziert (Navarro et al., 2004). Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte dies anhand von Proben von Andrea Gust (ZMBP Tübingen, FG Nürnberger) nachvollzogen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurden jedoch keine weiteren Experimente in diese Richtung durchgeführt. Eine Rolle der VFB Proteine bei der Erkennung bzw. der Antwort auf PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) scheint somit möglich, dies sollte aber noch näher untersucht werden.

5.7 Ausblick

Um die Rolle der VFB Proteine aufzuklären, sind bereits vielversprechende Versuche durchgeführt worden. Leider haben die Arbeiten keine eindeutige Funktion der VFB Proteine aufzeigen können.

Um die Lokalisierung der VFB Proteine *in situ* zu zeigen, sollten transgene Pflanzen hergestellt werden. Jedoch war es nicht möglich, Linien zu erzeugen, die ein VFB Protein unter dem 35S CaMV Promotor trugen. So konnte keine Analyse eines GFP/YFP markierten Proteins in der Pflanze durchgeführt werden. Über die tatsächliche Lokalisierung kann also bislang, basierend auf den Protoplastenexperimenten, nur spekuliert werden. Da mit dem α -VFB2 Antikörper das VFB2 Protein nicht reproduzierbar detektiert werden konnte, wurde auch von einer Immunlokalisierung abgesehen.

Die Funktion der VFB Proteine in einem SCF Komplex konnte zwar mittels der Hefe-2-Hybridsystems angenommen werden, jedoch konnten auch hier wegen des unzureichenden Antikörpers, keine weiterführende Experimente, wie z.B. eine Koimmunopräzipitation, erfolgreich durchgeführt werden.

Ergebnisse in Bezug auf mögliche Substrate konnten zwar mittels eines Hefescreens gewonnen werden, jedoch konnte ein zweiter Ansatz, die Tandem-Affinitätsaufreinigung, nicht erfolgreich durchgeführt werden. Hier lagen die Probleme in der Konstruktion des verwendeten TAP-Tags (Rigaut et al., 1999). Da die Information über die Substrate der F-Box Proteine den Schlüssel zur biologischen Funktion der VFBs darstellen, könnte dieser Ansatz eventuell mit einem anderen Tags, wie z.B. dem Strep-II-Tag wiederholt werden (Witte et al., 2004).

Die Analysen der Insertionsmutanten konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Die Limitierung bei der Analyse der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1 vfb4* (RNAi) und (miRNA) Pflanzen liegt in der Penetranz des Phänotyps. Diese ist mit ca. 20% sehr gering und macht umfangreiche Analysen wie physiologische Assays oder genetische Interaktionsstudien nur schwer möglich.

Die Charakterisierung der VFB F-Box Proteine ist noch nicht abgeschlossen, jedoch konnten viele Informationen gesammelt werden. Weitere Experimente konnten im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt werden. Da jedoch die untersuchten F-Box Proteine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Pflanze und speziell der Bildung von Seitenwurzeln spielen und dies auf einem bislang

unbekannten Weg, welcher mit der Auxinantwort vernetzt scheint, stattfindet, ist eine weitere Untersuchung der Rolle der VFB Proteine von großem Interesse.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Pflanzenmaterial

Als Wildtypkontrollen wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia verwendet. Alle aus Stammsammlungen bezogenen T-DNA Insertionslinien, sowie von Dritten bezogene Linien mit GUS/GFP Markern sind ebenfalls im Columbia Ökotyp erzeugt worden. Die *tir1-1* Mutante, sowie *tir1-1* Linien, die die Konstrukte TIR1:myc und *tir1:myc* enthalten, wurden von William Gray (Universität Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt (Ruegger et al., 1998; Gray et al., 1999). Von Joe Kieber (Universität von North Carolina, USA) erhielten wir ARR5:GUS exprimierende Pflanzen (Brandstatter und Kieber, 1998). Dirk Inzé (Universität Gent, Belgien) stellte uns CYCB1:GUS Pflanzen zur Verfügung (Ferreira et al., 1994). Pflanzenlinien die BDL:GUS oder HS:AXR3/IAA17:GUS exprimieren wurden von Dolf Weijers (Universität Wageningen, Niederlande) und Gerd Jürgens (ZMBP, Universität Tübingen) bezogen (Weijers et al., 2006; Dharmasiri et al, 2005 b; Gray et al., 2001). Die DR5:GUS und DR5:GFP Linien erhielten wir von J. Friml (ZMBP, Universität Tübingen) (Ulmasov et al., 1997 a und b; Friml et al., 2003). Alle transgenen *Arabidopsis* Pflanzenlinien sind im Anhang aufgeführt.

6.1.2 Bakterienstämme

Für Plasmidvermehrung und Klonierungen wurden die *E.coli* Stämme XL1-Blue (Stratagene) [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (tetr)*] oder DH5α (Invitrogen) [*F'φ80lacZΔM15 (lacZYAargF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) gal⁻ pho A sup E44 λ⁻ thi⁻1 gyrA96 relA1*] verwendet. Zur Vermehrung von Gateway Plasmiden wurde der Stamm DB3.1 [*F-gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB⁻, mB⁻) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1*] verwendet.

Für die Pflanzentransformationen wurden die Agrobakterienstämme GV3101 pMP90 ohne und mit pSoup (Genotyp nach Koncz und Schell, 1986; Haselhoff et al. 1997), sowie GV3101 pMP90 RK (Genotyp nach Koncz und Schell, 1986; Haselhoff

et al., 1997) verwendet. Eine Liste aller verwendeten und erstellten Konstrukte befindet sich im Anhang.

6.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Abszisin säure	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
6-BA (Cytokinin)	Sigma-Aldrich, München
BCIP	Appllichem GmbH, Darmstadt
Carbenicillin	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
DTT	Appllichem GmbH, Darmstadt
Epibrassinolid	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
β -Estradiol	Sigma-Aldrich, München
Hygromycin	Sigma-Aldrich, München
IAA	Sigma-Aldrich, München
	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
IPTG	Appllichem GmbH, Darmstadt
Kinetin	Sigma-Aldrich, München
Lachssperma-DNA	Appllichem GmbH, Darmstadt
Methyljasmonat	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
Murashige und Skoog Salze	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
β -Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
NBT	Appllichem GmbH, Darmstadt
Phosphinotricin	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Rifampicin	Appllichem GmbH, Darmstadt
	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
Ribonuklease A	Roth GmbH, Karlsruhe
Spectinomycin	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
Ticarcillin (Timentin)	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande
X-Gal	Appllichem GmbH, Darmstadt
X-Glc A	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von Applichem GmbH (Darmstadt), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St.Leon-Rot), Greiner Holding AG (Kremsmünster, Österreich), Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Oligonukleotide wurden anfänglich von Sigma-Aldrich (München) später von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

6.1.3.1 Antibiotika

Für die Anzucht von *E.coli* Bakterien wurden in Abhängigkeit des zu transformierenden Plasmids und des Stamms Ampicillin (100 µg/mL), Gentamycin (60 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL) oder Spectinomycin (50 µg/mL) verwendet. Bei der Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* wurden Gentamycin (25-40 µg/mL), Rifampicin (25 µg/mL), Carbenicillin (20 bis 100 µg/mL) und Tetracyclin (5 mg/mL) verwendet. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden, abhängig vom Selektionsmarker der T-DNA, Hygromycin (50 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL), Phosphinotrizin (1,5 µg/mL) oder Sulfadiazin (50 µg/mL) verwendet. Eine Liste der transgenen Pflanzenlinien mit den zugehörigen Selektionsmarkern befindet sich im Anhang.

6.1.3.2 Enzyme

Alle DNA modifizierenden Enzyme und Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Ipswich, England) bezogen. Die AcTEV Protease für die TAP-Tag Aufreinigung wurde von Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

6.1.3.3 Kits

Es wurden folgende Kits verwendet:

Plasmid DNA Isolierung:	Mini	PEQGold Plasmid Miniprep Kit 1 PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Midi	JETStar Plasmid Purification Kit GENOMED, Löhne
RNA-Isolierung:		RNeasy Plant Mini Kit Qiagen GmbH, Hilden
PCR-Produktaufreinigung:		JETQuick PCR Purification Kit

Gel-Extraktion: GENOMED, Löhne
 JETQuick Gel Extraction Kit
 GENOMED, Löhne

6.1.3.4 Marker

DNA-Größenstandard: Gene Ruler 1kB DNA Ladder
 (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)

Protein-Größenstandard: See Blue Plus2 Pre-Stained Standard
 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
 Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus
 (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)

6.1.3.5 Membranen

Für Western Blot Analysen wurde die Nitrozellulosemembran Hybond ECL und für Southern Blots die Hybond+ Membran von Amersham Biosciences (München) verwendet.

6.2 Methoden

6.2.1 Pflanzenarbeiten

6.2.1.1 Sterilisation von Samen und Wachstumsbedingungen

Für eine unsterile Pflanzenanzucht wurden Samen auf feuchter Pflanzenerde ausgebracht und anschließend für zwei Tage bei 4° C im Dunklen stratifiziert. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte danach bei 22° C unter Dauerbeleuchtung. Zur Sterilisierung von Samen wurden Samen zuerst in gesättigter Calciumhypochloritlösung für zehn Minuten inkubiert und dann kurz in 70% Ethanol sterilisiert. Anschließend wurden die Samen fünfmal in sterilem Milliporewasser gewaschen. Danach wurden die Samen auf festem Pflanzenmedium in Petrischalen ausgebracht. Das sogenannte GM Medium (Growth Media) setzt sich wie folgt zusammen:

Murashige und Skoog Salze	4,2 g/L
Sacharose	1%
MES (Morpholinoethansulfonsäure – Kaliumsalz)	0,5 g/L
Agar für Pflanzenmedien	5,5 g/L
Kaliumhydroxid zum Einstellen des pH Wertes auf	pH 5,4

Bei Bedarf wurden dem Medium noch Antibiotikum oder Hormone zugefügt. Auch hier wurden die Samen 2 Tage bei 4° C stratifiziert und bei 22° C unter Dauerbeleuchtung kultiviert.

6.2.1.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzentransformation erfolgte gemäß der „Floral Dip“ Methode (Clough et al., 1998). Zu transformierende DNA wurde gemäß dem verwendeten Vektor entweder in den Agrobakterienstamm GV3101 pMP90 oder GV3101 pMP90 RK mittels Elektroporation eingebracht. Anschließend wurden die Bakterien auf festem LB-Medium mit entsprechender Selektion kultiviert. Der GV3101 pMP90 Stamm enthält bereits Selektionsmarker für Gentamycin (25 µg/mL) und Rifampicin (40 µg/mL), der GV3101 pMP90 RK Stamm zusätzlich einen Marker für Kanamycin (50 µg/mL) (Koncz und Schell, 1986; Haselhoff et al. 1997). Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde eine Kolonie in 10 mL flüssigem LB (inklusive entsprechender Antibiotika) bei 30° C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Volumen mit 200 mL frischem Medium versetzt und wieder über Nacht im Schüttler inkubiert. Das Volumen wurde mit frischem Medium auf 1 L erhöht und eine weitere Nacht inkubiert. Nun wurden die Agrobakterien bei 4500 rpm 10 Minuten abzentrifugiert und in 600 mL Transformationslösung (Murashige und Skoog Salze 2,2g/L; MES 0,5 g/L; Silwett 77 200 µL/L; 6-BA (Cytokinin) 10 µL/L) resuspendiert. Die Pflanzen wurden anschließend für 12 Minuten in diese Lösung eingetaucht. Die transformierten Pflanzen wurden schließlich in Plastikfolie verpackt, welche dem Erhalt der Feuchtigkeit diente, und über Nacht unter normalen Wachstumsbedingungen gehalten. Am nächsten Tag wurde die Plastikfolie entfernt, und die Pflanzen wurden kurz mit Wasser besprüht, um die Transformationslösung zu entfernen. Die Pflanzen wurden bis zum Abreifen unter den genannten Bedingungen angezogen.

6.2.1.3 Selektion transgener Pflanzen

Die verwendeten transgenen Konstrukte enthielten in Abhängigkeit von der T-DNA folgende Resistenzmarker (siehe Anhang):

Carbenicillin	30 µg/mL
Hygromycin	50 µg/mL
Phosphinotricin	15 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL

Selektionsplatten mit Phosphinotricin wurde außerdem 25 µg/mL Timentin zugesetzt, um das Wachstum von Agrobakterien zu verhindern. Für die genaue Analyse des Genotyps resistenter Pflanzen wurde die PCR Analyse verwendet.

6.2.1.4 GUS-Färbung

Der zu untersuchende Pflanzenteil wurde für 15 min bei Raumtemperatur in n-Heptan inkubiert, um das Gewebe zu fixieren. Das Lösungsmittel wurde danach abgenommen, und das wurde Gewebe 5 min getrocknet. Die GUS-Färbelösung (Zusammensetzung: 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; Triton-X 100 0,2%; 10 mM Kaliumferricyanid; 10 mM Kaliumferrocyanid; 2 mM X-GlcA) wurde auf die Pflanze gegeben, und der Ansatz bei 37° C inkubiert, bis sich Färbung zeigte. Anschließend wurde mit 70 % Ethanol das Chlorophyll entfernt. Die Lagerung gefärbter Pflanzen erfolgte in 70 % Ethanol bei 4° C. Die Analyse erfolgte mit dem Mikroskop und wurde anschließend digital dokumentiert.

6.2.1.5 Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten

Zur Lokalisationsanalyse wurden 30 µg DNA GFP-oder YFP-markierter Konstrukte in *Arabidopsis* Protoplasten transformiert (Negrutiu et al., 1987). Alle Schritte wurden von Caterina Brancato (ZMBP, Tübingen) durchgeführt. Transformierte Protoplasten wurden in einem Konfokalmikroskop (Leica TCS Laser Scanning Microscope) untersucht und die Ergebnisse dokumentiert.

6.2.1.6 Physiologische Assays

Aus Stammsammlungen bezogene und selbst generierte Pflanzenlinien wurden unter verschiedenen Bedingungen analysiert, um Veränderungen im Wachstum zu überprüfen. Wachstum von Hypokotyl und Wurzeln wurde mit dem Programm NIH Image 1.63 anhand von Digitalbildern vermessen und analysiert.

Um das Wurzelwachstum auf Abszisionsäure (ABA) zu untersuchen, wurden Keimlinge zuerst 4 Tage auf normalem GM (Growth-Medium) angezogen und dann auf Platten mit 0 µM, 1 µM, 5 µM and 10 µM ABA transferiert. Nach weiteren 7 Tagen wurde das Wurzelwachstum vermessen und ausgewertet.

Um Pflanzen mit verschiedenen Ethylenkonzentrationen zu behandeln, wurden Samen direkt auf GM mit 0 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 2 µM, 10 µM and 50 µM ACC (eine Vorform von Ethylen) ausgelegt und für 3 bis 5 Tage im Dunklen

angezogen. Analysiert wurde nur ein Aspekt der sogenannten „Triple response“, nämlich die Länge des Hypokotyls.

Für die Bestimmung der Wurzelelongation auf Auxin wurden zunächst Keimlinge für 4 Tage auf normalem GM Medium angezogen und schließlich auf Platten mit verschiedenen Auxinkonzentrationen, 0 μM , 0,02 μM , 0,04 μM , 0,06 μM , 0,08 μM und 0,1 μM 2,4-D übertragen. Nach weiteren 5 Tagen wurde das Wurzelwachstum analysiert. Die Seitenwurzelbildung auf Auxin wurde untersucht, indem 1 cm lange Wurzelabschnitte auf Platten mit 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM und 1 μM IAA transferiert wurden und die gebildeten Seitenwurzeln nach 4 Tagen ausgezählt und verglichen wurden.

Der Einfluß von Brassinosteroiden wurde anhand von Keimlingen untersucht, die auf Platten mit 0 nM, 0,1 nM, 1 nM and 10 nM Epibrassinolid angezogen wurden. Nach insgesamt sieben Tagen wurde die Länge des Hypokotyls vermessen.

Um den Einfluß von Gibberellinsäure (GA) zu untersuchen, wurden Samen auf 0 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM GA angezogen, und nach insgesamt sieben Tagen wurde die Hypokotyllänge ausgemessen.

Für die Untersuchung des Wurzelwachstums auf Jasmonsäure wurden Samen direkt auf Platten mit 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM and 1 μM Methyl-Jasmonat ausgebracht und die Wurzeln nach sieben Tagen vermessen.

Auch das Wurzelwachstum auf 0 μM , 0,025 μM , 0,05 μM , 0,075 μM und 0,1 μM Kinetin wurde getestet. Hier wurde ebenfalls nach insgesamt sieben Tagen die Länge der Wurzeln vermessen.

Desweiteren wurden Pflanzen Salzstress ausgesetzt, indem sie nach viertägigem Wachstum auf normalem GM auf Medium mit 0 mM, 20 mM, 50 mM and 100 mM NaCl umgesetzt wurden. Nach weiteren 7 Tagen wurde die Wurzellänge vermessen.

Die Fähigkeit sich an der Schwerkraft zu orientieren wurde getestet, indem Pflanzenplatten mit 14 Tage alten Keimlingen um 135° Grad gedreht wurden und nach verschiedenen Zeitpunkten (6 bis 48 Stunden) der Drehungswinkel der Wurzel gemessen wurde (Geldner et al., 2004).

6.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

6.2.2.1 Bakterienkulturen

Für die Anzucht von Bakterienkulturen wurden 3 mL flüssiges LB Medium mit einer Einzelkolonie Bakterien angeimpft. Dem LB Medium wurde der jeweilige Selektionsmarker des Plasmids zugefügt (Ampicillin 100 µg/mL, Gentamycin 60 µg/mL oder Kanamycin 50 µg/mL). *Escherichia coli* Kulturen wurden unter Schütteln bei 37° C, *Agrobacterium tumefaciens* bei 30° C inkubiert.

6.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien

Für die Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien wurde 1 mL einer Übernachtskultur 1 Minute bei 16000 g abzentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µL Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM EDTA) resuspendiert. Nun wurden 300 µL Puffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben und das Gemisch 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300µL Puffer 3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) zugegeben und nach kurzem invertieren 3 min bei 16000 g zentrifugiert. 750 µL des Überstandes wurden mit derselben Menge Phenol:Chloroform (1:1) pH 8,0 versetzt. Nach gründlichem vortexen wurde nochmals für 3 min bei 16000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit dem gleichem Volumen an Isopropanol gemischt und nach Invertieren für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, um die DNA auszufällen. Das erhaltene DNA-Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde jeweils in 50 µL mit RNase (Stockkonzentration: 10 mg/mL) versetztem sterilem Wasser suspendiert und verwendet.

6.2.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Genomische DNA wurde aus verschiedenen Pflanzenorganen, im Normalfall jedoch aus einem Keimblatt, gewonnen. Dazu wurde das Pflanzenmaterial in 300 µL DNA Extraktionspuffer (200 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 % SDS) zerkleinert und für 20 min bei 65° C inkubiert. Das erhitzte Gemisch wurde mit 300 µL eines 1:1 Gemisches aus equilibriertem Phenol pH 8,0 und Chloroform versetzt, gevortext und für 3 min bei 16000 g zentrifugiert. 200 µL der oberen wässrigen Phase wurden mit demselben Volumen Isopropanol gemischt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Danach wurde die DNA in 200 μ L sterilem Wasser aufgenommen und stand so für weitere Versuche zur Verfügung.

6.2.2.4 PCR Analyse

Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet. Für DNA Amplifikationen wurde eine im Labor hergestellte und gereinigte Taq-Polymerase verwendet. Im Folgenden sind die benutzten Reagenzien aufgeführt:

Standard PCR-Ansatz:

- 5 μ L genomische DNA
- 1 μ L Taq Polymerase
- 5 μ L 10x Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl)
- 5 μ L dNTP-Mischung (Stock: 2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP in H₂O)
- 1 μ L Oligonukleotid 1 (100 mM)
- 1 μ L Oligonukleotid 2 (100 mM)
- 28 μ L steriles H₂O

Protokoll einer Standardamplifikation (NL58):

Schritt 1:	94° C Grad	4 min
Schritt 2:	94° C Grad	1 min
Schritt 3:	58° C Grad	1 min
Schritt 4:	72° C Grad	2,5 min
Schritt 5:	34 x zurück zu Schritt 2	
Schritt 6:	72° C Grad	6 min
Schritt 7:	4° C Grad	(Ende)

Tab.3: Übersicht der Oligonukleotidkombinationen der hergestellten Konstrukte

Konstrukt	Oligonukleotide	PCR-Amplifikat	Strategie
35S:VFB2:GFP	VFB2 CT (GW) FW VFB2 CT (GW) RV	<i>VFB2</i> auf genomischer DNA (1,5 kB) für C-terminale Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in 35S(GW) – GFP Vektor
35S:YFP:VFB2	VFB2 NT (GW) FW VFB2 NT (GW) RV	<i>VFB2</i> auf genomischer DNA (1,5 kB) für N-terminale Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in pEXSTAG-(GW)YFP Vektor
VFB2:VFB2-GFP	VFB2prom FW EcoV 1kB VFB2prom RV Xho1 VFB2prom FW Eco5 2kB VFB2prom RV Xho1	1 kB Fragment <i>VFB2</i> Promotor auf genomischer DNA 2 kB Fragment <i>VFB2</i> Promotor auf genomischer DNA	PCR Produkte wurden in den pCR 2.1 TOPO Vektor kloniert und EcoRV/Xho1 in das VFB2:GFP Konstrukt umklontiert, nachdem der 35S Promotor entfernt wurde
35S:VFB2:TAP	VFB2 (GW) FW VFB2 (GW) RV	<i>VFB2</i> auf genomischer DNA (1,5 kB) für C-terminale Fusion	BP Reaktion mit pENTR/D-TOPO; LR-Reaktion in PEXSGTAP
pTA:VFB2	VFB2 FW Xho1 VFB2 RV Xho1	<i>VFB2</i> auf genomischer DNA (1,5 kB); keine Fusion	PCR Produkt zuerst in pGEM Vektor und dann <i>Xho1/Xho1</i> in den pTA Vektor umklontiert
pTA:VFB2:TAP	VFB2 FW Xho1 TAP RV2 Spe1	<i>VFB2-TAP</i> (2,1 kB) auf dem Ausgangskonstrukt 35S:VFB2:TAP	<i>VFB2-TAP</i> wurde auf dem pEXSGTAP-VFB2 Konstrukt amplifiziert, in den pCR11 TOPO Vektor kloniert und <i>Xho1/Spe1</i> in den pTA Vektor umklontiert
35S:VFB3	VFB3 (GW) FW NOF VFB3 (GW) RV	<i>VFB3</i> auf genomischer DNA (1,6 kB); keine Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in pJawohl2B
35S:VFB3:HA	VFB3 (GW) FW CONF VFB3 (GW) RV	<i>VFB3</i> auf genomischer DNA (1,7 kB) für N-terminale Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in pJawohl2B

35S:VFB3:GFP	VFB3 (GW) FW NOF VFB3 (GW) RV	<i>VFB3</i> auf genomischer DNA (1,7 kB) für C-terminale Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in pMCD83
VFB3:VFB3(4kB)	VFB3 4kB Xho1 FW VFB3 4kB Xho1 RV	4 kB Fragment <i>VFB3</i> Promotor und <i>VFB3</i> auf genomischer DNA	TOPO Klonierung des PCR Produkts in pCRII TOPO; <i>Xho1/Xho1</i> umklontiert in pGREENII
VFB4(RNAi)	VFB4 (GW) FW RNAi VFB4 (GW) RV RNAi	<i>VFB4</i> Fragment auf genomischer DNA (146 bp)	BP Reaktion mit pDONR 201; LR Reaktion in pJawohl 17 RNAi
VFB4-Antisense	VFB4 (AS) FW VFB4 (AS) RV	<i>VFB4</i> Fragment auf genomischer DNA (144 bp)	BP Reaktion mit pDONR 201; LR Reaktion in 35S(GW)GFP
35S:VFB4:GFP	VFB4 (GW) FW VFB4 (GW) RV	<i>VFB4</i> auf genomischer DNA (1,5 kB) für C-terminale Fusion	BP Reaktion mit pDONR 201; LR-Reaktion in pMCD83

6.2.2.5 Gateway Klonierung

Einige Konstrukte wurden mittels des Gateway Klonierungssystems der Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Protokolle wurden den zugehörigen Invitrogen Klonasekits (BP- und LR-Clonase) entnommen. Als Vektoren wurden die pDONR-Vektoren von Invitrogen und Gateway-kompatible Pflanzentransformationsvektoren verwendet. Eine Auflistung aller verwendeten Plasmide findet sich im Anhang.

BP-Reaktion:	PCR Produkt	150ng	1-7 µL
	pDONR201	150ng	1 µL
	TE-Puffer, pH 8.0		auf 8 µL

LR-Reaktion	BP-Klon	150 ng	1-7 μ L
	Zielvektor	150 ng	1 μ L
	TE-Puffer, pH 8.0		auf 8 μ L

Zum jeweiligen Reaktionsansatz wurden 2 μ L aufgetauter und gemischter BP bzw. LR Clonase 2 Mix gegeben, kurz gevortext und der Ansatz mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 1 μ L Proteinase K 10 min bei 37° C abgestoppt und anschließend in *E.coli* Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37° C kultiviert. Erhaltene Kolonien wurden mittels Restriktionsverdau analysiert und so genannte BP-Klone bzw. die Klone nach der LR Reaktion sequenziert. Erhaltene Zielkonstrukte wurden anschließend in Agrobakterien transformiert, kultiviert und zur Transformation von Pflanzen oder Protoplasten genutzt.

6.2.2.6 Topo-TA Klonierung

Für Klonierungen mit dem TOPO-TA Kit von Invitrogen GmbH, Karlsruhe wurde zuerst das PCR Produkt gemäß dem Standardprotokoll amplifiziert und gereinigt. Anschließend wurde folgender Ansatz (Volumen 6 μ L) pipettiert:

PCR Produkt	0,5 bis 4 μ L
Salzlösung 1:4 (aus dem Kit)	1 μ L
Steriles Wasser	auf 5 μ L auffüllen
Topo Vektor 2.1	1 μ L

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 μ L des Ansatzes in elektrokompetente *E.coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Die Analyse putativ richtiger Klone erfolgte mittels eines Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen.

6.2.2.7 Klonierung der artifiziiellen miRNA Konstrukte

Die Erstellung der artifiziiellen miRNA gegen *VFB4* (single) bzw. gegen die *VFB* Genfamilie (family) erfolgte gemäß der Anleitung von Rebecca Schwab (Schwab et al., 2006 Plant Cell). Die miRNA Sequenzen wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Detlef Weigel erstellt. Das Klonierungsfragment wurde folgendermaßen auf dem miR319 Stemloop in pBluescript (Konstrukt von R. Schwab) amplifiziert:

PCR 1: Primer A und 4 (miRNA single 4/ family 4)

PCR 2: Primer 3 und 2 (miRNA single 3 und 2/ family 3 und 2)

PCR 3: Primer 1 (miRNA single 1/family 1) und B

PCR 4: Primer A und B auf den PCR Produkten der PCRs 1 bis 3

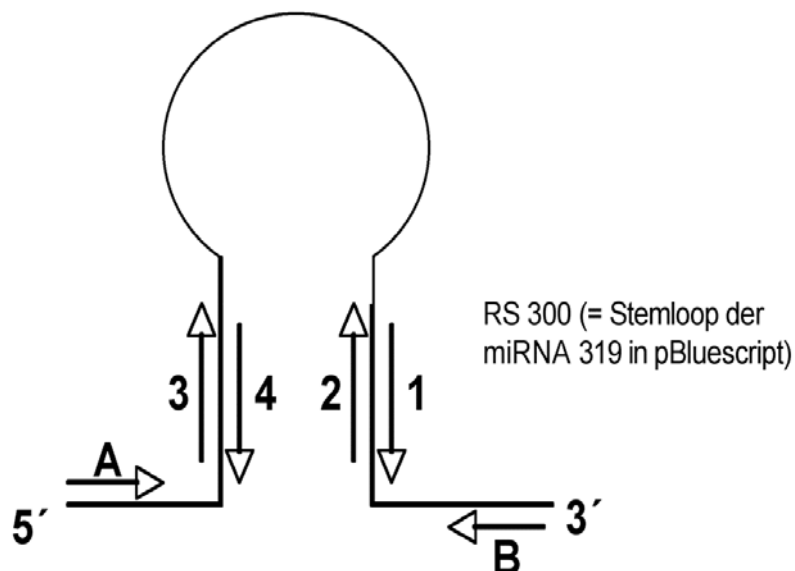


Abb. 26: Klonierungsstrategie der artifiziiellen miRNA Konstrukte. Klonierungsschema der miRNA Konstrukte. Mit A, B, 1, 2, 3 und 4 sind die jeweiligen Primer und Ihre Richtung abgebildet. Für beide miRNA Konstrukte wurde vier spezifische Oligonukleotidsequenzen (Primer 1 bis 4) ermittelt (siehe 8. Anhang) und das Konstrukt nach einem speziellen PCR Schema erstellt. Mit den Primern A und 4 wurde das erste PCR Fragment auf dem Konstrukt RS 300, dem miR319 Stemloop in pBluescript, amplifiziert (270 bp). Mit den Primern 3 und 2 wurde das nächste Fragment amplifiziert (100 bp). PCR Produkt 3 wurde schließlich mit den Primern 1 und B gebildet (270 bp). Mit den Primern A und B wurde das finale PCR-Fragment schließlich auf den erhaltenen PCR Produkten amplifiziert (rund 700 bp) und kloniert.

Die Sequenzen der genannten Primer sind im Anhang aufgelistet. Das erhaltene Fragment wurde zuerst in den pCR TOPO 2.1 Vektor kloniert und anschließend als *EcoR1/EcoR1* Fragment in den pEXSGTAP-Vektor umklontiert.

6.2.2.8 Klonierung der Konstrukte für das Hefe-2-Hybridsystem

Das Konstrukt pLex::*VFB2* für das Hefe-2 Hybridsystem wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Stephan Knierer erstellt. Das *VFB2ΔFbox* Konstrukt wurde aus dem pER8 Vektor, ebenfalls kloniert von S.Knierer, in den pLex-Vektor (Gyuris et al., 1993) als *Xho1/Xho1* umklontiert. Die Konstrukte im pJG-4-5 Vektor (Gyuris et al., 1993), *ASK2*, *AtRBX1* und *AtCUL1* wurden bereits publiziert (Schwechheimer et al. 2001, Risseeuw et al., 2003).

6.2.2.9 RT-PCR Analysen

Die benötigte RNA aus pflanzlichen Organen wurde mittels des RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden) isoliert. Für die Herstellung komplementärer DNA wurde die M-MuLV-Reverse Transkriptase von Fermentas (St.Leon-Rot), verwendet. Hierzu wurden 2 µg RNA in einem Volumen von 10 µL mit 1 µL dT Oligonukleotid 100 mM versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 9 µL Reaktionsmix (4 µL 5xPuffer; 2µL dNTPs (Stock: 2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP in H₂O); 2 µL Transkriptase; 1 µL H₂O) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 42° C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, erfolgte im Anschluß ein Inkubationsschritt bei 65° C für 10 min.

Tab.4: Oligonukleotidkombinationen für RT-PCR Analysen

Gen	Oligonukleotide	PCR Produkt
<i>VFB1</i>	VFB1 START - VFB1 STOP	1,5 kB
<i>VFB2</i>	VFB2 FW/FW2 - VFB2 RV	1,5 kB
<i>VFB3</i>	VFB3 START - VFB3 STOP	1,6 kB
<i>VFB4</i>	VFB4 START – VFB4 RV	1,5 kB
<i>ACTIN</i>	ACTIN FW – ACTIN RV	200 bp

6.2.2.10 Screen von T-DNA Insertionslinien

Zur Genotypisierung der Insertionslinien für *VFB1* (At1g47056: SALK_128933; *vfb1-1*), *VFB2* (At3g50080: SALK_047599; *vfb2-1*), *VFB3* (At4g07400: SALK_054809; *vfb3-1*) und *VFB4* (At5g67250: GABI_323B07 und GABI_414F05) wurden jeweils PCRs für das wildtypische Genprodukt und das Insertionsprodukt durchgeführt. Bei der Analyse der *Ac/Ds* Linien wurden PCRs zum Nachweis des *Ds* Elements, zur Kontrolle der ursprünglichen Insertion (in Atg67220 für WiscDsLox_507C03; in Atg67290 für WiscDsLox_292G9), zum Nachweis von *VFB4* und eine Test-PCR ob das *Ds* Element in *VFB4* inseriert wurde, durchgeführt. Hierfür wurden folgende Oligonukleotidkombinationen benutzt. Die Sequenzen der genannten Primer sind im Anhang aufgelistet.

Tab.5: Übersicht der Oligonukleotidkombinationen für die Genotypisierung der Insertionslinien

Insertionslinie	Oligonukleotide	PCR-Amplifikat
SALK_128933: WT Insertion	VFB1 FW - VFB1 RV	1,8 kB
	VFB1 FW - VFB 1 RV/HR	1,6 kB
	VFB1 START – VFB1 STOP	1,5 kB
	LBb1-1 – VFB1 RV	1,6 kB
	LBb1-1 – VFB1 RV/HR	1,4 kB
SALK_047599: WT Insertion	VFB2 FW – VFB2 RV	1,5 kB
	VFB2 FW 2 – VFB2 RV	1,5 kB
	VFB2 FW – Lbb1-1	650 bp
	VFB2 FW 2 – Lbb1-1	650 bp
SALK_054809: WT Insertion	VFB3 FW – VFB3 RV	2,4 kB
	VFB3 FW/HR – VFB3 RV	1,5 kB
	VFB3 FW/HR – VFB3 RV/HR	1,2 kB
	VFB3 START – VFB3 STOP	1,6 kB
	LBb1-1 – VFB3 RV/HR	1,3 kB
GABI_323B07; GABI_414F05: WT Insertion	VFB4 Start – VFB4 RV	1,5 kB
	VFB4pFW – VFB4pRV	1,0 KB
	VFB4 prom Fw - VFB4 RV	1,8 kB
	GABI KAT FW – VFB4 RV	1,9 kB
WiscDsLox_507C03: <i>Ds</i> Element Insertion <i>VFB4</i> <i>Ds</i> in <i>VFB4</i>	DS Fw – DS RV	250 bp
	C03 Fw – p745	800 bp
	VFB4 Start – VFB4 RV	1,5 kB
	VFB4 Start – DS FW	nicht bestimmt
	VFB4 Start – DS RV	nicht bestimmt

WiscDsLox_292G9: <i>Ds</i> Element Insertion <i>VFB4</i> <i>Ds</i> in <i>VFB4</i>	DS Fw – DS RV	250 bp
	Locus 2G9 – p745	700 bp
	Locus 2G9 – 2G9 RV True	700 bp
	Locus 2G9 – 2G9 RV2	700 bp
	VFB4 Start – VFB4 RV	1,5 kB
	VFB4 Start – DS FW	nicht bestimmt
	VFB4 Start – DS RV	nicht bestimmt

6.2.2.11 Sequenzierungen

Um die klonierten Konstrukte zu prüfen, wurde die Basenabfolge der jeweiligen DNA sequenziert. Alle Sequenzierungen wurden selbst durchgeführt.

PCR-Ansatz: 5 µL DNA
 1 µL Primer 5µM
 2 µL Big Dye Puffer
 2 µL Big Dye

PCR-Programm für Sequenzierungen:

Schritt 1: 96° C 1 min
Schritt 2: 96° C 0,5 min
Schritt 3: 53° C 0,5 min
Schritt 4: 60° C 4 min
Schritt 5: 35 mal zurück zu Schritt 2
Schritt 6: 60° C 3 min
Schritt 7: 4° C endlos

Jedem Ansatz wurde 10 µL steriles Wasser, 2 µL 3 M Natriumacetat und 50 µL Ethanol 100% zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 45 min bei 16000 g. Der Überstand wurde entfernt, und das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und noch mal für 30 min bei 16000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Alkohols wurde das erhaltene Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Sequenzierung wurde die gefällte DNA in 20 µL TSR (Template Suppression Reagent) Lösung aufgenommen.

6.2.2.12 Microarray

Je 3 biologische Replikate mit jeweils 10 Tage alten Keimlingen des Columbia Wildtyps und Pflanzen die *vfb1-1vfb2-1vfb3-1* homozygot mutant waren und zusätzlich das *vfb4*(RNAi) Konstrukt trugen, wurden erstellt. Die benötigte RNA wurde mittels des RNeasy Plant Kit (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert und anschließend gefällt. Alle weiteren Schritte, inklusive der Hybridisierung und dem Scannen der ATH1 Chips (Affimetrix, Santa Clara, USA), wurden in Zusammenarbeit mit E. Dohmann und Markus Schmid am Max Planck Institut Tübingen durchgeführt. Das genaue Protokoll ist auf <http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/AtGEprobesynthesis.pdf> zu finden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der GeneSpring XT Software (Silicon Genetics).

6.2.3 Biochemische Arbeiten

6.2.3.1 Proteinextraktion

Die Extraktion von Proteinen erfolgte aus Keimlingen sowie aus Blättern und Blüten von adulten *Arabidopsis* Pflanzen. Hierzu wurden die zur Extraktion bestimmten Pflanzenorgane zuerst in flüssigem Stickstoff eingefroren, um alle *in vivo* Reaktionen zu stoppen und um die Organe zu fixieren. Nach diesem Schritt konnte das gefrorene Material bei -80° C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Meist erfolgte jedoch sofort die Extraktion. Hierzu wurden die pflanzlichen Organe in mit Proteaseinhibitorcocktail (1%; Sigma), PMSF (1%) und Proteasominhibitor MG132 (1%) komplettiertem HL- Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 40% NP40, 150 mM NaCl) gemörsert und die Proteine extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt 15 min bei 16000 g zentrifugiert, um die festen Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und mittels Bradford-Test (Bradford, 1976) auf seinen Proteingehalt hin geprüft.

6.2.3.2 SDS-PAGE und Western-Blotanalyse

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde gemäß Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Abweichend davon wurde dem Probenpuffer 2% β -Mercaptoethanol zur Trennung der Disulfidbrücken der Proteine zugesetzt. Zusätzlich wurden die Proteinproben 3 min bei 95° C im Wasserbad

denaturiert. Es wurden jeweils 5 % Sammelgele und 10 % bis 12 % Trenngele verwendet. Die Elektrophorese wurde in Mini Protean III Zellen (BioRad) bei 120 V und 500 mA durchgeführt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel mittels eines Semidry Blotters (BioRad) bei 16 V und 300 mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Semi-Dry Blot Puffer: 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; 1,3 mM SDS; pH 8,3). Alternativ wurde eine Proteinfärbung im Gel durchgeführt.

Die Entwicklung des Western Blots wurde folgendermaßen durchgeführt. Einem Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Membran in 5% Milchlösung in PBS (1,39 M NaCl; 27 mM KCl; 125 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄) für 30 min, folgte die Inkubation im primären Antikörper. Diese wurde meist über Nacht unter Schütteln bei 4° C durchgeführt. Alternativ wurde der Blot mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Behandlung mit dem primären Antikörper folgten 3 Waschschrte zu je 10 min mit PBS-T (1,39 M NaCl; 27 mM KCl; 125 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄; 1% Tween 20). Nun konnte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für mindestens ein Stunde bei Raumtemperatur erfolgen. Der sekundäre Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt und ermöglicht so eine Farbreaktion mittels NBT und BCIP (McGadey, 1970; Knecht 1984; Sambrook et al., 2001). Nach dem sekundären Antikörper folgten nochmals 3 Waschschrte von je 10 min mit PBS und ein Equilibrierungsschritt in AP Puffer (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂). Anschließend wurde die Farbreaktion auf der Membran mit NBT (50 mg/mL in 70% DMF) und BCIP (50 mg/mL in DMF) durchgeführt, der Western Blot getrocknet und zur Analyse gescannt. Verwendete Antiseren sind mit den jeweiligen Verdünnungen im Anhang aufgeführt.

6.2.3.3 Coomassie Färbung

Ein Proteingel wurde für mindestens eine Stunde in Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgt durch Inkubierung in Entfärber. Durch mehrfaches Wechseln der Lösung konnte dieser Vorgang beschleunigt werden. Die entfärbten Gele wurden zur Dokumentation getrocknet.

Coomassie Färbelösung: 0,5 g Coomassie Brilliant Blau R-250
 0,5 g Coomassie Brilliant Blau G-250
 400 mL Ethanol 100%

100 mL Eisessig
auf 1 L mit Milliporewasser auffüllen

Entfärbelösung: 200 mL Ethanol 100%
50 mL Eisessig
auf 0,5 L mit Milliporewasser auffüllen

6.2.3.4 Tandem-Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag

Mit der Tandem-Affinitäts Reinigung ist es möglich, Proteine unter nativen Bedingungen inklusive interagierender Proteine in einem 2-Schritt Verfahren aufzureinigen. Hiefür wurde der sogenannte TAP-Tag konstruiert (Rigaut et al., 1999). Dieser besteht aus der IgG-bindenden Untereinheit des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* (Prot A) und dem Calmodulin-bindendem Protein (CBP). Zwischen diesen beiden Proteinen ist eine TEV (*Tobacco etch virus*) Proteaseschnittstelle eingefügt, welche die Aufreinigung in zwei Schritten erst ermöglicht.

Das Konstrukt für die Expression des Fusionsproteins wurde im pEXSGTAP Vektor erstellt. Dieser Vektor wurde uns von Laurent Noel (Université Aix-Marseille II, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Da eine Expression des erstellten 35S CaMV:VFB2:TAP Konstrukts nicht möglich war, wurde das VFB2:TAP Fragment in den induzierbaren pTA 7002 Vektor (Aoyama und Chua, 1997) umkloniert, in Pflanzen transformiert und mittels Dexamethason Induktion exprimiert.

Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte nach Rigaut et al. (1999). Diese Methode wurde ausschließlich in kleinem Maßstab im Batchverfahren durchgeführt. Pro Ansatz wurde mindestens 1 mg Protein eingesetzt. Die Extraktion der Proteine erfolgte wie in Punkt 6.2.3.1 beschrieben.

Zunächst wurden je 50 µL IgG Sepharose und Calmodulin Beads in Puffer IPP 150 bzw. IPP 150 CBP gewaschen. 1mg Protein wurde mit Bindungspuffer auf 1mL aufgefüllt und 2 Stunden bei 4° C rotierend mit der vorbereiteten IgG Sepharose inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sepharose mit 3mL IPP 150 gewaschen und anschließend mit TEV Puffer äquilibriert. Nun erfolgte die Spaltung des TAP-tags mit 10 Units TEV Protease in 300 µL TEV Puffer. Hiefür wurde der Ansatz 2 Stunden bei 16 °C unter Rotation inkubiert. Die 300 µL wurden

abgenommen und mit dem dreifachen Volumen (hier 900 μ L) an CBP Puffer und 1 M CaCl_2 versetzt. Das CaCl_2 dient dem austitrieren des EDTA aus dem TEV Puffer. Nun wurde diese Mischung auf die vorbereiteten CBP Beads gegeben und für 1 Stunde bei 4° C rotierend inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads mit 3 mL IPP 150 CBP gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 5 Fraktionen zu je 50 μ L mit dem CEP Puffer eluiert. Die Eluate wurden zusammen mit Aliquots der Waschschritte und dem Ausgangsextrakt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

IPP150:	10 mM Tris-Cl pH 8,0 150 mM NaCl 0.1% NP40 mit sterilem H_2O auf 100 mL auffüllen
TEV Spaltungspuffer:	10 mM Tris-Cl pH8,0 150 mM NaCl 0.1% NP40 0,5 mM EDTA 1mM DTT (erst vor Gebrauch zugeben) mit sterilem H_2O auf 100 mL auffüllen
IPP150 Calmodulin Bindungspuffer (CBP):	10 mM β -Mercaptoethanol 10 mM Tris-Cl pH8,0 150 mM NaCl 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 2 mM CaCl_2 0.1% NP40 mit sterilem H_2O auf 100 mL auffüllen
IPP150 Calmodulin Elutionspuffer (CEP):	10 mM β -Mercaptoethanol 10 mM Tris-Cl pH8,0 150 mM NaCl 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 2 mM EGTA 0.1% NP40 mit sterilem H_2O auf 100 mL auffüllen

6.2.4 Analysen im Hefe-2-Hybridsystem

Alle Arbeiten im Hefe-2-Hybridsystem erfolgten gemäß dem „Yeast Protocols Handbook“ von CLONTECH und nach Schwechheimer und Deng (2002). Die benutzten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme waren EGY48 mit pSH4 [MAT α ura3-52 trp1-901 his3-200 6lex A_{UAS}-LEU2] und L40 [MAT α trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ].

6.2.4.1 Anzucht von Hefekulturen

Hefekulturen wurden jeweils bei 30° C über Nacht mit entsprechender Selektion angezogen. Auf festen Medien erfolgte die Inkubation meist über mehrere Tage hinweg.

6.2.4.2 Transformation von Hefezellen

Für die Transformation von Hefezellen mit Plasmiden wurde zunächst eine 50 mL Übernachtkultur in YPD oder entsprechendem Selektionsmedium bei 30° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 300 mL YPD Medium mit dieser Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 überimpft und weitere 3 Stunden inkubiert. Bei einer finalen OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 wurden die Hefezellen mittels Zentrifugation bei 1000 g geerntet und mehrmals mit 1x TE Puffer gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1xTE/1xLiAc resuspendiert.

Zu 100 μ L Hefezellen wurde 0,1 μ g Plasmid DNA und 0,1 mg Lachssperma DNA, welche als Träger fungiert, zugegeben und die Mixtur gut gemischt. Nun wurden 600 μ L sterile PEG/LiAc Lösung zugegeben und mit hoher Geschwindigkeit gevortext. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt unter Schütteln bei 30° C für 30 min. Nach der Zugabe von 70 μ L DMSO pro Ansatz erfolgte der Hitzeschock zur Transfektion der Zellen für 15 min bei 42° C Grad. Abschließend wurden die Zellen für einige Minuten auf Eis gekühlt, mittels Zentrifugation geerntet und in 200 μ L 1x TE Puffer resuspendiert. Die transformierten Hefezellen wurden auf passendem Selektionsmedium ausgebracht.

YPD-Medium: 20 g/L Trypton
 10 g/L Hefeextrakt
 20 g/L Agar (für feste Medien)
 2 % Glukose

SD-Medium:	6,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 1,7 g Dropout Medium (Sigma-Aldrich, München) 2 % Glukose oder andere Zucker Aminosäuren gemäß dem herzustellenden Medium
10 x TE Puffer:	0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA, pH 7,5
10 x LiAc:	1 M Lithiumacetat, pH 7,5
50 % PEG:	PEG 4000 1:1 mit sterilem Wasser versetzt
PEG/LiAc:	40 % PEG 4000 1 x TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) 1 x LiAc (100 mM LiAc)

6.2.4.3 Screen nach Interaktoren mit dem Hefe-2-Hybridsystem

Um nach Interaktoren der VFB Proteinfamilie zu suchen, wurde ein Screen mit pLEX:VFB2 gegen eine cDNA Bank aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das pLEX:VFB2 Konstrukt in den EGY48 Hefestamm mit pSH4 transformiert (siehe 6.2.4.2). Nach drei Tagen wurden mehrere Kolonien in flüssigem Medium angeimpft und 30 µg der cDNA Bank pro Ansatz in die EGY48:pSH4:pLEX:VFB2 Hefezellen transformiert. Dieser Ansatz wurde parallel 20 mal durchgeführt und jede Transformation auf einer 20 cm x 20 cm großen Hefepatte mit der entsprechenden Selektion ausplattiert. Um die Transformationseffizienz zu testen, wurden Verdünnungen ausplattiert und die Effizienz wie im „Yeast protocol Handbook“ (CLONTECH) beschrieben, errechnet. Nach mehreren Tagen Inkubation bei 30° C wurden die erhaltenen Kolonien von den Platten gekratzt und 1:1 mit Glycerin versetzt. Diese Glycerinstocks wurden bei 80° C aufbewahrt.

Um nun VFB2 Interaktoren zu finden, wurde ein Aliquot des Glycerinstocks 1:10 in flüssigem Hefemedium angeimpft und für 4 Stunden bei 30° C inkubiert. Anschließend wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Es wurden 10^7 Zellen, dies entspricht einer $OD_{600}=0,5$, auf festem Medium ausplattiert und mehrere Tage bei 30° C inkubiert. Erhaltene Klone wurden auf Selektionsmedium replattiert und ein Kolonie-Lift Filterassay (CLONTECH) zur

Bestimmung von interagierenden Klonen durchgeführt. Auf den positiven Klonen wurden eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde die einzelne Kolonie gepickt und mit 20 µL sterilem H₂O versetzt und gemischt. Dies diente als DNA für eine PCR Reaktion (siehe 6.2.2.4). Die erhaltenen PCR Produkte wurden anschließend einem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Alu1* und *Hae3* unterzogen. Die PCR Produkte und die Restriktionsansätze wurden mittels DNA Gelelektrophorese analysiert und die Klone anhand ihres Restriktionsmusters in Gruppen eingeteilt. Ein Klon jeder Gruppe wurde ausgewählt und DNA daraus isoliert (CLONTECH). Diese wurde in *E.coli* Zellen des KC8 Stammes transformiert und die Zellen auf M9 Medium (Schwechheimer und Deng, 2002) ausplattiert. Aus den erhaltenen Kolonien wurde DNA isoliert (siehe 6.2.2.2) und eine Sequenzierung (siehe 6.2.2.11) mit dem pLEX AD FW Oligonukleotid durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit der DNA STAR Software analysiert. Zusätzlich wurde DNA der Klone in Hefezellen retransformiert und wiederum ein Kolonie-Lift Filterassay (CLONTECH) zur Bestimmung von interagierenden Klonen durchgeführt.

7. Literaturverzeichnis

- Ang, L.H., S. Chattopadhyay, N. Wei, T. Oyama, K. Okada, A. Batschauer, and X.W. Deng. 1998. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell*. 1:213-22.
- Aoyama, T., and N.H. Chua. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J*. 11:605-12.
- Bachmair, A., M. Novatchkova, T. Potuschak, and F. Eisenhaber. 2001. Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci*. 6:463-70.
- Bancroft, I., A.M. Bhatt, C. Sjodin, S. Scofield, J.D. Jones, and C. Dean. 1992. Development of an efficient two-element transposon tagging system in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet*. 233:449-61.
- Bashir, T., N.V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano. 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*. 428:190-3.
- Bates, P.W., and R.D. Vierstra. 1999. UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin-protein ligases from Arabidopsis thaliana related to the HECT-domain protein family. *Plant J*. 20:183-95.
- Benhamed, M., C. Bertrand, C. Servet, and D.X. Zhou. 2006. Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell*. 18:2893-903.
- Bhatt, A.M., T. Page, E.J. Lawson, C. Lister, and C. Dean. 1996. Use of Ac as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant J*. 9:935-45.
- Binder, B.M., J.M. Walker, J.M. Gagne, T.J. Emborg, G. Hemmann, A.B. Bleecker, and R.D. Vierstra. 2007. The Arabidopsis EIN3 BINDING F-BOX Proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*. 19:509-23.
- Blilou, I., F. Frugier, S. Folmer, O. Serralbo, V. Willemsen, H. Wolkenfelt, N.B. Eloy, P.C. Ferreira, P. Weisbeek, and B. Scheres. 2002. The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev*. 16:2566-75.

- Bornstein, G., D. Ganoth, and A. Hershko. 2006. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-Box protein and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11515-20.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brandstatter, I., and J.J. Kieber. 1998. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis. *Plant Cell.* 10:1009-19.
- Calderon-Villalobos, L.I., C. Nill, K. Marrocco, T. Kretsch, and C. Schwechheimer. 2007. The evolutionarily conserved Arabidopsis thaliana F-Box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress. *Gene.* 392:106-16.
- Capron, A., L. Okresz, and P. Genschik. 2003a. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* 8:83-9.
- Capron, A., O. Serralbo, K. Fulop, F. Frugier, Y. Parmentier, A. Dong, A. Lecureuil, P. Guerche, E. Kondorosi, B. Scheres, and P. Genschik. 2003b. The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell.* 15:2370-82.
- Cardozo, T., and M. Pagano. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:739-51.
- Chaban, C., F. Waller, M. Furuya, and P. Nick. 2003. Auxin responsiveness of a novel cytochrome p450 in rice coleoptiles. *Plant Physiol.* 133:2000-9.
- Chen, H., Y. Shen, X. Tang, L. Yu, J. Wang, L. Guo, Y. Zhang, H. Zhang, S. Feng, E. Strickland, N. Zheng, and X.W. Deng. 2006. Arabidopsis CULLIN4 forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in mediating light control of development. *Plant Cell.* 18:1991-2004.
- Clough, S.J., and A.F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16:735-43.
- CLONTECH. 2001. Yeast protocols Handbook
- De Smet, I., S. Vanneste, D. Inze, and T. Beeckman. 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol.* 60:871-87.

- del Pozo, J.C., M.B. Boniotti, and C. Gutierrez. 2002a. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell*. 14:3057-71.
- del Pozo, J.C., S. Dharmasiri, H. Hellmann, L. Walker, W.M. Gray, and M. Estelle. 2002b. AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell*. 14:421-33.
- del Pozo, J.C., S. Diaz-Trivino, N. Cisneros, and C. Gutierrez. 2006. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*. 18:2224-35.
- del Pozo, J.C., and M. Estelle. 1999. The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:15342-7.
- Deng, X.W., M. Matsui, N. Wei, D. Wagner, A.M. Chu, K.A. Feldmann, and P.H. Quail. 1992. COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell*. 71:791-801.
- Devoto, A., C. Ellis, A. Magusin, H.S. Chang, C. Chilcott, T. Zhu, and J.G. Turner. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol*. 58:497-513.
- Devoto, A., M. Nieto-Rostro, D. Xie, C. Ellis, R. Harmston, E. Patrick, J. Davis, L. Sherratt, M. Coleman, and J.G. Turner. 2002. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J*. 32:457-66.
- Dharmasiri, N., S. Dharmasiri, and M. Estelle. 2005a. The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435:441-5.
- Dharmasiri, N., S. Dharmasiri, D. Weijers, E. Lechner, M. Yamada, L. Hobbie, J.S. Ehrismann, G. Jurgens, and M. Estelle. 2005b. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell*. 9:109-19.
- Dharmasiri, S., N. Dharmasiri, H. Hellmann, and M. Estelle. 2003. The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis. *EMBO J*. 22:1762-70.
- Di Fiore, P.P., S. Polo, and K. Hofmann. 2003. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:491-7.

- Dieterle, M., Y.C. Zhou, E. Schafer, M. Funk, and T. Kretsch. 2001. EID1, an F-Box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Genes Dev.* 15:939-44.
- Dill, A., S.G. Thomas, J. Hu, C.M. Steber, and T.P. Sun. 2004. The Arabidopsis F-Box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell.* 16:1392-405.
- Dohmann, E.M., C. Kuhnle, and C. Schwechheimer. 2005. Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell.* 17:1967-78.
- Dong, L., L. Wang, Y. Zhang, Y. Zhang, X. Deng, and Y. Xue. 2006. An auxin-inducible F-Box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 60:599-615.
- Dornan, D., S. Bheddah, K. Newton, W. Ince, G.D. Frantz, P. Dowd, H. Koeppen, V.M. Dixit, and D.M. French. 2004. COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer Res.* 64:7226-30.
- Dornan, D., H. Shimizu, A. Mah, T. Dudhela, M. Eby, K. O'Rourke, S. Seshagiri, and V.M. Dixit. 2006. ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage. *Science.* 313:1122-6.
- Downes, B.P., R.M. Stupar, D.J. Gingerich, and R.D. Vierstra. 2003. The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* 35:729-42.
- Dreher, K.A., J. Brown, R.E. Saw, and J. Callis. 2006. The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell.* 18:699-714.
- El Refy, A., D. Perazza, L. Zekraoui, J.G. Valay, N. Bechtold, S. Brown, M. Hulskamp, M. Herzog, and J.M. Bonneville. 2003. The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol Genet Genomics.* 270:403-14.
- Farras, R., A. Ferrando, J. Jasik, T. Kleinow, L. Okresz, A. Tiburcio, K. Salchert, C. del Pozo, J. Schell, and C. Koncz. 2001. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 20:2742-56.

- Feng, S., L. Ma, X. Wang, D. Xie, S.P. Dinesh-Kumar, N. Wei, and X.W. Deng. 2003. The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell*. 15:1083-94.
- Feng, S., Y. Shen, J.A. Sullivan, V. Rubio, Y. Xiong, T.P. Sun, and X.W. Deng. 2004. Arabidopsis CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein Degradation. *Plant Cell*. 16:1870-82.
- Ferreira, P.C., A.S. Hemerly, J.D. Engler, M. van Montagu, G. Engler, and D. Inze. 1994. Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell*. 6:1763-74.
- Fu, X., D.E. Richards, B. Fleck, D. Xie, N. Burton, and N.P. Harberd. 2004. The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*. 16:1406-18.
- Fukaki, H., S. Tameda, H. Masuda, and M. Tasaka. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J*. 29:153-68.
- Gagne, J.M., B.P. Downes, S.H. Shiu, A.M. Durski, and R.D. Vierstra. 2002. The F-Box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:11519-24.
- Gagne, J.M., J. Smalle, D.J. Gingerich, J.M. Walker, S.D. Yoo, S. Yanagisawa, and R.D. Vierstra. 2004. Arabidopsis EIN3-BINDING F-BOX 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:6803-8.
- Geldner, N., S. Richter, A. Vieten, S. Marquardt, R.A. Torres-Ruiz, U. Mayer, and G. Jurgens. 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis. *Development*. 131:389-400.
- Glotzer, M., A.W. Murray, and M.W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349:132-8.
- Gray, W.M., J.C. del Pozo, L. Walker, L. Hobbie, E. Risseuw, T. Banks, W.L. Crosby, M. Yang, H. Ma, and M. Estelle. 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev*. 13:1678-91.

- Gray, W.M., H. Hellmann, S. Dharmasiri, and M. Estelle. 2002. Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell*. 14:2137-44.
- Gray, W.M., S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, and M. Estelle. 2001. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*. 414:271-6.
- Gray, W.M., P.R. Muskett, H.W. Chuang, and J.E. Parker. 2003. Arabidopsis SGT1b is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell*. 15:1310-9.
- Gray, W.M., A. Ostin, G. Sandberg, C.P. Romano, and M. Estelle. 1998. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:7197-202.
- Guo, H., and J.R. Ecker. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*. 115:667-77.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*. 75:791-803.
- Han, L., M. Mason, E.P. Risseuw, W.L. Crosby, and D.E. Somers. 2004. Formation of an SCF(ZTL) complex is required for proper regulation of circadian timing. *Plant J*. 40:291-301.
- Harmon, F.G., and S.A. Kay. 2003. The F box protein AFR is a positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling. *Curr Biol*. 13:2091-6.
- Harper, J.W., J.L. Burton, and M.J. Solomon. 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev*. 16:2179-206.
- Hermant, D. 2006. F-Box proteins: more than baits for the SCF? *Cell Div*. 1:30.
- Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67:425-79.
- Holm, M., L.G. Ma, L.J. Qu, and X.W. Deng. 2002. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev*. 16:1247-59.
- Imaizumi, T., T.F. Schultz, F.G. Harmon, L.A. Ho, and S.A. Kay. 2005b. FKF1 F-Box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*. 309:293-7.
- Jin, J., T. Cardozo, R.C. Lovering, S.J. Elledge, M. Pagano, and J.W. Harper. 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-Box proteins. *Genes Dev*. 18:2573-80.

- Kawamura, Y., and M. Uemura. 2003. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36:141-54.
- Kepinski, S., and O. Leyser. 2005. The Arabidopsis F-Box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 435:446-51.
- Kevei, E., P. Gyula, A. Hall, L. Kozma-Bognar, W.Y. Kim, M.E. Eriksson, R. Toth, S. Hanano, B. Feher, M.M. Southern, R.M. Bastow, A. Viczian, V. Hibberd, S.J. Davis, D.E. Somers, F. Nagy, and A.J. Millar. 2006. Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiol.* 140:933-45.
- Kim, H., P.J. Park, H.J. Hwang, S.Y. Lee, M.H. Oh, and S.G. Kim. 2006. Brassinosteroid signals control expression of the AXR3/IAA17 gene in the cross-talk point with auxin in root development. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70:768-73.
- Kim, H.S., and T.P. Delaney. 2002. Arabidopsis SON1 is an F-Box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 14:1469-82.
- Kim, W.Y., R. Geng, and D.E. Somers. 2003. Circadian phase-specific degradation of the F-Box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4933-8.
- Kim, Y.M., J.C. Woo, P.S. Song, and M.S. Soh. 2002. HFR1, a phytochrome A-signalling component, acts in a separate pathway from HY5, downstream of COP1 in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 30:711-9.
- Knecht DA, Dimond RL. 1984. Visualization of antigenic proteins on Western blots. *Anal Biochem.* 136(1):180-4
- Koncz, C., F. Kreuzaler, Z. Kalman, and J. Schell. 1984. A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO J.* 3:1029-37.
- Krysan, P.J., J.C. Young, and M.R. Sussman. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell.* 11:2283-90.
- Kwok, S.F., B. Piekos, S. Misera, and X.W. Deng. 1996. A complement of ten essential and pleiotropic arabidopsis COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* 110:731-42.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Laskowski, M., S. Biller, K. Stanley, T. Kajstura, and R. Prusty. 2006. Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol*. 47:788-92.
- Lee, J., K. He, V. Stolc, H. Lee, P. Figueroa, Y. Gao, W. Tongprasit, H. Zhao, I. Lee, and X.W. Deng. 2007. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell*. 19:731-49.
- Leyser, H.M., C.A. Lincoln, C. Timpte, D. Lammer, J. Turner, and M. Estelle. 1993. Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*. 364:161-4.
- Lincoln, C., J.H. Britton, and M. Estelle. 1990. Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *Plant Cell*. 2:1071-80.
- Liu, F., W. Ni, M.E. Griffith, Z. Huang, C. Chang, W. Peng, H. Ma, and D. Xie. 2004. The ASK1 and ASK2 genes are essential for Arabidopsis early development. *Plant Cell*. 16:5-20.
- Long, D., M. Martin, E. Sundberg, J. Swinburne, P. Puangsomlee, and G. Coupland. 1993. The maize transposable element system Ac/Ds as a mutagen in Arabidopsis: identification of an albino mutation induced by Ds insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10370-4.
- Long D. und Coupland G. 1998. Transposon tagging with *Ac/Ds* in *Arabidopsis*. Aus *Methods in Molecular Biology*. 82. José M. Martínez-Zapater and Julio Salinas
- Marrocco, K., Y. Zhou, E. Bury, M. Dieterle, M. Funk, P. Genschik, M. Krenz, T. Stolpe, and T. Kretsch. 2006. Functional analysis of EID1, an F-Box protein involved in phytochrome A-dependent light signal transduction. *Plant J*. 45:423-38.
- Marti, A., C. Wirbelauer, M. Scheffner, and W. Krek. 1999. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol*. 1:14-9.
- Mas, P., W.Y. Kim, D.E. Somers, and S.A. Kay. 2003. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature*. 426:567-70.
- McGadey J. 1970. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase.

- Histochemie*. 23(2):180-4
- McGinnis, K.M., S.G. Thomas, J.D. Soule, L.C. Strader, J.M. Zale, T.P. Sun, and C.M. Steber. 2003. The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-Box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*. 15:1120-30.
- Meadows, M.G. and Potrykus, I. 1981. Hoechst 33258 as a vital Stain for Plant Cell Protoplasts. *Plant Cell Reports* 1:77-79
- Medberry, S.L., E. Dale, M. Qin, and D.W. Ow. 1995. Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 23:485-90.
- Navarro, L., C. Zipfel, O. Rowland, I. Keller, S. Robatzek, T. Boller, and J.D. Jones. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135:1113-28.
- Negrutiu, I., Shillito, R.D., Potrykus, I., Biasini, G. and Sala, F. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 8, 363-373
- Nozawa, A., J. Takano, K. Miwa, Y. Nakagawa, and T. Fujiwara. 2005. Cloning of cDNAs encoding isopropylmalate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana and accumulation patterns of their transcripts. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:806-10.
- Olmedo, G., H. Guo, B.D. Gregory, S.D. Nourizadeh, L. Aguilar-Henonin, H. Li, F. An, P. Guzman, and J.R. Ecker. 2006. ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-Box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13286-93.
- Osterlund, M.T., C.S. Hardtke, N. Wei, and X.W. Deng. 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature.* 405:462-6.
- Overvoorde, P.J., Y. Okushima, J.M. Alonso, A. Chan, C. Chang, J.R. Ecker, B. Hughes, A. Liu, C. Onodera, H. Quach, A. Smith, G. Yu, and A. Theologis. 2005. Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* 17:3282-300.
- Pfleger, C.M., and M.W. Kirschner. 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14:655-65.

- Pfleger, C.M., E. Lee, and M.W. Kirschner. 2001. Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 15:2396-407.
- Potuschak, T., E. Lechner, Y. Parmentier, S. Yanagisawa, S. Grava, C. Koncz, and P. Genschik. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell.* 115:679-89.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, and B. Seraphin. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* 24:218-29.
- Reed, J.W. 2001. Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 6:420-5.
- Ren, C., J. Pan, W. Peng, P. Genschik, L. Hobbie, H. Hellmann, M. Estelle, B. Gao, J. Peng, C. Sun, and D. Xie. 2005. Point mutations in Arabidopsis Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *Plant J.* 42:514-24.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 17:1030-2.
- Risseuw, E.P., T.E. Daskalchuk, T.W. Banks, E. Liu, J. Cotelesage, H. Hellmann, M. Estelle, D.E. Somers, and W.L. Crosby. 2003. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J.* 34:753-67.
- Rogers, L.A., C. Dubos, C. Surman, J. Willment, I.F. Cullis, S.D. Mansfield, and M.M. Campbell. 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol.* 168:123-40.
- Rowland, O., A.A. Ludwig, C.J. Merrick, F. Baillieul, F.E. Tracy, W.E. Durrant, L. Fritz-Laylin, V. Nekrasov, K. Sjolander, H. Yoshioka, and J.D. Jones. 2005. Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell.* 17:295-310.
- Ruegger, M., E. Dewey, W.M. Gray, L. Hobbie, J. Turner, and M. Estelle. 1998. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* 12:198-207.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition

- Schwab, R., S. Ossowski, M. Riester, N. Warthmann, and D. Weigel. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*. 18:1121-33.
- Schwechheimer, C., and X.W. Deng. 2001. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 11:420-6.
- Schwechheimer, C. and Deng, X.W. 2002. Studying protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. Aus Molecular Plant Biology, P.M.Gilmartin und C.Bowler, eds (Oxford, UK: Oxford University Press), S.173-198
- Schwechheimer, C., and L.I. Calderon Villalobos. 2004. Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 7:677-86.
- Schwechheimer, C., and K. Schwager. 2004. Regulated proteolysis and plant development. *Plant Cell Rep.* 23:353-64.
- Seo, H.S., E. Watanabe, S. Tokutomi, A. Nagatani, and N.H. Chua. 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev.* 18:617-22.
- Seo, H.S., J.Y. Yang, M. Ishikawa, C. Bolle, M.L. Ballesteros, and N.H. Chua. 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature.* 423:995-9.
- Shiloh, Y., and A.R. Lehmann. 2004. Maintaining integrity. *Nat Cell Biol.* 6:923-8.
- Sivaprasad, U., Y.J. Machida, and A. Dutta. 2007. APC/C - the master controller of origin licensing? *Cell Div.* 2:8.
- Smalle, J., and R.D. Vierstra. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.* 55:555-90.
- Stacey, M.G., O.R. Kopp, T.H. Kim, and A.G. von Arnim. 2000. Modular domain structure of Arabidopsis COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localization signal in planta. *Plant Physiol.* 124:979-90.
- Stirnberg, P., K. van De Sande, and H.M. Leyser. 2002. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development.* 129:1131-41.
- Stone, S.L., E.M. Anderson, R.T. Mullen, and D.R. Goring. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell.* 15:885-98.
- Strader, L.C., S. Ritchie, J.D. Soule, K.M. McGinnis, and C.M. Steber. 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*. 101:12771-6.
- Sufan, R.I., and M. Ohh. 2006. Role of the NEDD8 modification of Cul2 in the sequential activation of ECV complex. *Neoplasia*. 8:956-63.
- Sutterluty, H., E. Chatelain, A. Marti, C. Wirbelauer, M. Senften, U. Muller, and W. Krek. 1999. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol*. 1:207-14.
- Swinburne, J., L. Balcells, S.R. Scofield, J.D. Jones, and G. Coupland. 1992. Elevated levels of Activator transposase mRNA are associated with high frequencies of Dissociation excision in Arabidopsis. *Plant Cell*. 4:583-95.
- Tan, X., L.I. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C.V. Robinson, M. Estelle, and N. Zheng. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 446:640-5.
- Tatematsu, K., S. Kumagai, H. Muto, A. Sato, M.K. Watahiki, R.M. Harper, E. Liscum, and K.T. Yamamoto. 2004. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*. 16:379-93.
- Thorlby, G., N. Fourrier, and G. Warren. 2004. The SENSITIVE TO FREEZING2 gene, required for freezing tolerance in Arabidopsis thaliana, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell*. 16:2192-203.
- Tian, Q., P. Nagpal, and J.W. Reed. 2003. Regulation of Arabidopsis SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant J*. 36:643-51.
- Tian, Q., and J.W. Reed. 1999. Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development*. 126:711-21.
- Tian, Q., N.J. Uhlir, and J.W. Reed. 2002. Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*. 14:301-19.
- Tiryaki, I., and P.E. Staswick. 2002. An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant axr1. *Plant Physiol*. 130:887-94.
- Tiwari, S.B., G. Hagen, and T.J. Guilfoyle. 2004. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*. 16:533-43.
- Ulmasov, T., G. Hagen, and T.J. Guilfoyle. 1997a. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*. 276:1865-8.

- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen, and T.J. Guilfoyle. 1997b. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9:1963-71.
- Ungermannova, D., Y. Gao, and X. Liu. 2005. Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem*. 280:30301-9.
- van den Heuvel, S. 2004. Protein degradation: CUL-3 and BTB--partners in proteolysis. *Curr Biol*. 14:R59-61.
- Vanneste, S., B. De Rybel, G.T. Beemster, K. Ljung, I. De Smet, G. Van Isterdael, M. Naudts, R. Iida, W. Gruissem, M. Tasaka, D. Inze, H. Fukaki, and T. Beeckman. 2005. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 17:3035-50.
- Vierstra, R.D. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci*. 8:135-42.
- von Arnim, A.G., and X.W. Deng. 1994. Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell*. 79:1035-45.
- Wang, H., L.G. Ma, J.M. Li, H.Y. Zhao, and X.W. Deng. 2001. Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*. 294:154-8.
- Wang, K.L., H. Yoshida, C. Lurin, and J.R. Ecker. 2004. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature*. 428:945-50.
- Wang, X., S. Feng, N. Nakayama, W.L. Crosby, V. Irish, X.W. Deng, and N. Wei. 2003. The COP9 signalosome interacts with SCF UFO and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell*. 15:1071-82.
- Wei, W., N.G. Ayad, Y. Wan, G.J. Zhang, M.W. Kirschner, and W.G. Kaelin, Jr. 2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*. 428:194-8.
- Weijers, D., E. Benkova, K.E. Jager, A. Schlereth, T. Hamann, M. Kientz, J.C. Wilmoth, J.W. Reed, and G. Jurgens. 2005. Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J*. 24:1874-85.

- Weijers, D., A. Schlereth, J.S. Ehrismann, G. Schwank, M. Kientz, and G. Jurgens. 2006. Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. *Dev Cell*. 10:265-70.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:169-78.
- Wertz, I.E., K.M. O'Rourke, Z. Zhang, D. Dornan, D. Arnott, R.J. Deshaies, and V.M. Dixit. 2004. Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science*. 303:1371-4.
- Willemsen, V., H. Wolkenfelt, G. de Vrieze, P. Weisbeek, and B. Scheres. 1998. The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. *Development*. 125:521-31.
- Wimuttisuk, W., and J.D. Singer. 2006. The Cullin3 Ubiquitin Ligase Functions as a Nedd8-bound Heterodimer. *Mol Biol Cell*.
- Witte, C.P., L.D. Noel, J. Gielbert, J.E. Parker, and T. Romeis. 2004. Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol*. 55:135-47.
- Woelk, T., S. Sigismund, L. Penengo, and S. Polo. 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div*. 2:11.
- Woo, H.R., K.M. Chung, J.H. Park, S.A. Oh, T. Ahn, S.H. Hong, S.K. Jang, and H.G. Nam. 2001. ORE9, an F-Box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell*. 13:1779-90.
- Worley, C.K., N. Zenser, J. Ramos, D. Rouse, O. Leyser, A. Theologis, and J. Callis. 2000. Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J*. 21:553-62.
- Wu, J.T., H.C. Lin, Y.C. Hu, and C.T. Chien. 2005. Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol*. 7:1014-20.
- Xie, Q., H.S. Guo, G. Dallman, S. Fang, A.M. Weissman, and N.H. Chua. 2002. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*. 419:167-70.
- Xu, L., F. Liu, E. Lechner, P. Genschik, W.L. Crosby, H. Ma, W. Peng, D. Huang, and D. Xie. 2002. The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*. 14:1919-35.
- Yan, N., J.H. Doelling, T.G. Falbel, A.M. Durski, and R.D. Vierstra. 2000. The ubiquitin-specific protease family from Arabidopsis. AtUBP1 and 2 are

- required for the resistance to the amino acid analog canavanine. *Plant Physiol.* 124:1828-43.
- Yanagawa, Y., J.A. Sullivan, S. Komatsu, G. Gusmaroli, G. Suzuki, J. Yin, T. Ishibashi, Y. Saijo, V. Rubio, S. Kimura, J. Wang, and X.W. Deng. 2004. Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev.* 18:2172-81.
- Yanagisawa, S., S.D. Yoo, and J. Sheen. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature.* 425:521-5.
- Yang, H.Q., R.H. Tang, and A.R. Cashmore. 2001. The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell.* 13:2573-87.
- Yang, P., H. Fu, J. Walker, C.M. Papa, J. Smalle, Y.M. Ju, and R.D. Vierstra. 2004a. Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem.* 279:6401-13.
- Yang, X., S. Lee, J.H. So, S. Dharmasiri, N. Dharmasiri, L. Ge, C. Jensen, R. Hangarter, L. Hobbie, and M. Estelle. 2004b. The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant J.* 40:772-82.
- Yi, C., and X.W. Deng. 2005. COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 15:618-25.
- Zheng, J., X. Yang, J.M. Harrell, S. Ryzhikov, E.H. Shim, K. Lykke-Andersen, N. Wei, H. Sun, R. Kobayashi, and H. Zhang. 2002a. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell.* 10:1519-26.
- Zheng, N., B.A. Schulman, L. Song, J.J. Miller, P.D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D.M. Koepp, S.J. Elledge, M. Pagano, R.C. Conaway, J.W. Conaway, J.W. Harper, and N.P. Pavletich. 2002b. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature.* 416:703-9.

8. Anhang

8.1. Verwendete Antiseren

Tab. 6: Im Rahmen des Projektes verwendete Antiseren

Antiserum	Verdünnung im WB	Organismus	Herkunft	Bemerkung
α -B42-Q19	1:300	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	Polyklonal
α -Hase IgG, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase	1:5000	Ziege	Sigma-Aldrich	Polyklonal
α -HA	1:1000	Ratte	Roche	Monoklonal
α -LexA	1:1000	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	Polyklonal
α -Maus IgG, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase	1:10.000	Ziege	Sigma-Aldrich	Polyklonal
α -Myc (9E10)	1:1000	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Monoklonal
α -VFB2	1:1000	Hase	Eurogentec	Peptidantikörper
α -Ziege IgG, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase	1:3000	Hase	Sigma-Aldrich	Polyklonal

8.2. Verwendete Oligonukleotide

A= Adenin; C= Cytosin; G= Guanin; T= Thymin;

M= A oder C; K= G oder T; Y= C oder T;

Genotypisierung der T-DNA und AC/DS Insertionslinien

2G9 RV True	5'-TTATTAATTAGAGGATGGCTACTAGTTTGG-3'
2G9 RV2	5'-TTATTAATTAGAGGATGGCTACTAGTTC-3'
C03 FW	5'-GTA AAAATCCGGATTTTCCCGAACCT-3'
DS FW	5'-CAGGGATGAAAAGTAGGATGGGAAAATC-3'
DS RV	5'-CATATTGCAGTCATCCCGAATTAG-3'
GABI KAT FW	5'-CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC-3'
LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
LBb1-1	5'-CAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCA-3'
Locus 2G9	5'-CTTTGAATAGCTAAATAATAAATGT-3'
p745	5'-AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3'
VFB1 FW	5'-GACGACCACCGGAGACTTTCGTGGATGGGCCA-3'
VFB1 FW HR	5'-GACGACCACCGGAGACTTTCGTGGATGGGCCA-3'
VFB1 RV	5'-CCTGCTTTGCCCGTCGTTGTCTCGAAGT-3'
VFB1 RV HR	5'-ATCGATAGGTAAGCATCACGCTAACGAAT-3'
VFB1 START	5'-ATGGGCCAATCAACCTCCGCCGCCGGA-3'
VFB1 STOP	5'-CCTGCTTTGCCCGTCGTTGTCTCGAAGT-3'
VFB2 FW	5'-ATGGGCCAAGCTCCGTCGTCTCCGGCGGAA-3'
VFB2 FW2	5'-ATGGGCCAAGCTCCGTCGTCTCCGGCGGAACCAAACGTA-3'
VFB2 RV	5'-AATGGAAGTAGTAGCTTCCACT-3'
VFB2+4 FW	5'-ATGGGCCAAGCKCCGTCGTCTMCGGCGGAA-3'
VFB2+4 RV	5'-GACCATCTTCTSAAYGTGCAAGYYACCAA-3'
VFB3 FW	5'-GGGTGGCATTCTTGCCATTTTCTCCACAT-3'
VFB3 FW-HR	5'-TTGACTATGGCCATTGGAGGCCTCAGATCTTATTTAGTG-3'
VFB3 FW-HR-2	5'-GGGTGGCATTCTTGCCATTTTCTCCACAT-3'
VFB3 START	5'-ATGAATATTTACATTTTTAGCAAAGAA-3'
VFB3 STOP	5'-TTCATTCCGGGACCTGCTTCGACTTCCCA-3'
VFB3 RV	5'-GCCGGCTACTGGCTTCGACTTGATTCTGA-3'
VFB3 RV-HR	5'-CGGAATTAGCTTGGCTGCAGGTATTCATTC-3'
VFB3 RV-HR-2	5'-CGGAATTAGCTTGGCTGCAGGTATTCATTCCGGGACCTG-3'
VFB4 FW	5'-CACCAGCGACTTCGAGGAATTCATGAAG-3'
VFB4 FW neu	5'-AGCGACTTCGAGGAATTCATG-3'
VFB4 prom FW	5'-GTGCGAGTCTGAGTTGGGTCGAGCGTG-3'
VFB4 Pfw	5'-GAATTCTCCTATCGATCCAATTAAGTGGTT-3'
VFB4 Prv	5'-CCATGGACGAAAAGTCTCCGGTGGTCGTTTCGT-3'
VFB4 FW Start	5'-ATGGGCCAAGCGCCGTCGTCTACGGCG-3'

VFB4 RV 5'-AGTAGAACTACTAGCATTATCATTGTGAGA-3'

Klonierung der miRNA Konstrukte

A 5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'
 B 5'-GCCGATAACAATTCACACAGGAAACAG-3'
 miRNA single 1 5'-GATCAACCAACAGCGAGGGCCTGTCTCTCTTTTGTATTCC-3'
 miRNA single 2 5'-GACAGGCCCTCGCTGTTGGTTGATCAAAGAGAATCAATGA-3'
 miRNA single 3 5'-GACAAGCCCTCGCTGATGGTTGTTACAGGTCGTGATATG-3'
 miRNA single 4 5'-GAACAACCATCAGCGAGGGCTTGTCTACATATATATTCCT-3'
 miRNA family-1 5'-GATCAATATGAAGCTTCCTCAGCTCTCTCTTTTGTATTCC-3'
 miRNA family-2 5'-GAGCTGAGGAAGCTTCATATTGATCAAAGAGAATCAATGA-3'
 miRNA family-3 5'-GAGCCGAGGAAGCTTGATATTGTTACAGGTCGTGATATG-3'
 miRNA family-4 5'-GAACAATATCAAGCTTCCTCGGCTCTACATATATATTCCT-3'

Klonierung und Sequenzierung der GFP/YFP-Fusionskonstrukte

35-S FW 5'-CCCCCACTATCCTTCGCAAGACCC-3'
 35-S Term FW 5'-TCTAGATCACTGGATTTTAGGAA-3'
 GFP-C-Terminus 5'-GGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCT-3'
 GFP-RV 5'-CGGACACGCTGAACTTGTGGCCGT-3'
 pDONR FW 5'-TCGCGTTAACGCTAGCACCGATCTC-3'
 pDONR Rv 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
 VFB1 (GW) FW 5'GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGGCCAA
 TCAACCTCCGCCGC-3'
 VFB1 (GW) FW neu 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGGCCAATC
 AACCTCCGCCGCCGGA-3'
 VFB1 (GW) RV 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTGCTT
 GCCCGTCGTTGTCTCG-3'
 VFB1 (GW)RV neu 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTGCTT
 GCCCGTCGTTGTCTCGA-3'
 VFB2 1.9KB Xho1 FW 5'-CTCGAGAGGCTGTTGATGGGGCCATGGCT-3'
 VFB2 1.9kB Xho1 RV 5'-CTCGAGAATGGAAGTAGTAGCTTCACTTTGAGAC-3'
 VFB2 2 kB Xho1 FW 5'-CTCGAGAATTTGTTAACGAAATTTTGCAGTTCT-3'
 VFB2 2kB Xho1 RV 5'-CTCGAGTCAAATGGAAGTAGTAGCTTCACT-3'
 VFB2 prom (GW) FW 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA
 AATGTAACCTCCACGACAGAGGCACAG-3'
 VFB2 prom (GW) RV 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
 TTAATGGAAGTAGTAGCTTCACTTTGAG-3'
 VFB2 prom FW
 Eco5 1kB 5'-GATATCAATAAAAAGTTCTTCAATAACTTTAAAGA-3'

VFB2prom FW	
Eco5 2kB	5'-GATATCAATTTGTTAACGAAATTTTGCAGTTCT-3'
VFB2prom RV Xho1	5'-CTCGAGTGTTGTGTGGTTGAGTATTGGGTAAGGT-3'
VFB2 (GW) FW	5'-CACCATGGGCCAAGCTCCGTCGTCTCCGGCGGA-3'
VFB2 (GW) RV	5'-TCAAATGGAAGTAGTAGCTTCACTTTGA-3'
VFB2 CT (GW) FW	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGGGCCAAGCTCCGTCGTCTCGGGCG-3'
VFB2 CT (GW) RV	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CAATGGAAGTAGTAGCTTCACTTTG-3'
VFB2 NT (GW) FW	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGCGCCAAGCTCGGTCGTCTCCG-3'
VFB2 NT (GW) RV	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TCAAATGGAAGTAGTAGCTTCACTTTG-3'
VFB2 direction	
Promoter FW	5'-ATTCGCAATCGAGAAATTCCGGTGACCA-3'
VFB3 (GW) FW NOF	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAATATTTACATTT TTAG-3'
VFB3 (GW) RV	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCATTCCGGGACCT GCTTCG-3'
VFB4(GW) FW	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGGCCAAGCGCCGTCCG TCTACG-3'
VFB4 (GW) RV	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGTAGAACTACTAGC ATTATCA-3'

Klonierung von pTA:VFB2

VFB2 FW Xho1	5'-CTCGAGATGGGCCAAGCTCCGTCGTCT-3'
VFB2 RV Xho1	5'-CTCGAGTCAAATGGAAGTAGTAGCTTCACT-3'

Klonierung und Sequenzierung der 35S:VFB2:TAP und pTA:VFB2:TAP Konstrukte

CBP FW	5'-AGAAGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTC-3'
M13 FW	5'-GTA AACGACGGCCAG -3'
M13 RV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pTA FW	5'-GACCTCGATCGATCGAGATCTTCGCAAG-3'
RBCS RV	5'-CGATGATACGGACGAAAGCTGGG-3'
TAP RV Xho1	5'-CTCGAGTCAGGTTGACTTCCCCGCGGA-3'
TAP RV Spe1	5'-AGGCGCCCCTTCAGTTGGACTTGATCA-3'
TAP RV2 Spe1	5'-AACTAAGATCTCAGGCGTTGATCA-3'
VFB2 FW Xho1	5'-CTCGAGATGGGCCAAGCTCCGTCGTCT-3'
VFB2 FW Spe1	5'-ACTAGTATGGGCCAAGCTCCGTCGTCT-3'
VFB2 Seq 1	5'-CGTTTATCACTTGACGCTAAATCTG-3'
VFB2 Seq 2	5'-GTGGCTCTTGACTTTCGGTGCGAA-3'

VFB2 Seq 3 5'-TAACTGAGATTCGTCTAGAGAGGCT-3'
 VFB2 Seq 4 5'-TGTTTGAATTTGCAAGAGCTTGTAC-3'
 VFB2 Seq5 5'-GGTGAAGAAATGTAGTTTGGTTACA-3'

Klonierung und Sequenzierung der 35S:HA:VFB3 35S:VFB3 Konstrukte

VFB3 (GW) FW CONF 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAA
 TATTTACATTTTGTAG-3'
 VFB3 (GW) FW NOF 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAATATTT
 ACATTTTGTAG-3'
 VFB3 (GW) RV 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCATT
 CCGGGACCTGCTTCG-3'

Klonierung und Sequenzierung des 4kB-VFB3 Konstrukts

VFB3-4kB Xho1-FW 5'-CTCGAGAGAGTTTGGATAATCAACCAGTAGACA-3'
 VFB3-4kB Xho1-RV 5'-CTCGAGTGGTGTGAGGCTCCAAAAAGAGATTA-3'
 VFB3 (200) RV 5'- ATCGTACGGCTCATCGGCACCAGA-3'
 VFB3 Seq1 5'-TTAAACGGTTACGCGGAATCGGTGCT-3'
 VFB3 Seq2 5'-GATTGGTGTGAATCCTACTACTAAGT-3'

Klonierung und Nachweis der VFB4 Antisense und RNAi Konstrukte

Ins FW 5'- CATAGAATAAATATGATGAGTTAAAGA -3'
 Intron FW p17 5'-AGCTTCTCCTCCTCTGCTAACGTA-3'
 Intron FW p17-2 5'-CTCTCGACTCTTTCTTAATTATGT-3'
 VFB4 (AS) FW 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCTAATCATCGCTA
 ATCTAC-3'
 VFB4(AS) RV 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGGTTGAAACCGTTG
 TGGAGG-3'
 VFB4 AS control FW 5'-GTACAAAAAAGCAGGCTTCACCT-3'
 VFB4 (GW)-FW RNAi 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAGGTTGAAACCGTT
 GTGGAGG-3'
 VFB4 (GW)-RV RNAi 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCTAATCATCGCTA
 ATCTAC-3'
 RNAi FW 5'-CGTTCCATGGGCTAGAAGCT-3'
 RNAi FW neu 5'-CTCCGTTCCATGGGCTAGAAGCTT-3'
 RNAi RV 5'-AACCCAGTCCCGGGCGATG-3'
 RNA RV neu 5'-GTGGTGATAACCCAGTCCCGGGCGATG-3'

Nur für RT-PCR verwendete Oligonukleotide

dT Adaptor 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
 Actin FW 5'- ATTCAGATGCCAGAAAGTCTTGTTTC -3
 Actin RV 5'-GCAAGTGCTGTGATTTCTTTGCTCA-3

Oligonukleotide zu Sequenzierung der Konstrukte im Hefe-2-Hybridsystem

pLex AD FW 5'-GATGTTAACGATACCAGCC -3'
 pLex AD RV 5'-GGAGACTTGACCAAACCTCTGGCG -3'

8.3. Verwendete und hergestellte Konstrukte**Tab. 7:** Liste aller erstellten und verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Resistenz	Stamm
35S(GW)GFP	Ampicillin	DB3.1
35S(GW)GFP:VFB4(Antisense)	Ampicillin	XL1Blue
35S(GW)GFP:VFB4(Antisense)	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101 RK
35S:VFB2:GFP # 11	Ampicillin	XL1Blue
35S:VFB2:GFP # 12	Ampicillin	XL1Blue
35S:VFB2:GFP # 11	Rif /Gen/Kan/Carb	GV3101 RK
DR5:GFP (Friml et al., 2003)	Ampicillin	XL1Blue
DR5(7x)-4GS-GUS-NOS (Ulmasov et al.,1997 a, b)	Ampicillin	XL1Blue
pB7RWG 2.0 (K.Harter)	Spectinomycin	XL1Blue
pB7RWG 2.0::VFB3	Spectinomycin	XL1Blue
pB7RWG 2.0::VFB4	Spectinomycin	XL1Blue
pCR-TOPO:VFB2-TAP # 2	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCR II TOPO:VFB3-4kB # 12	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCRII TOPO:VFB3 4kB # 3	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCR TOPO2.1::miRNA single # 1	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCR TOPO2.1::miRNA single # 8	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCR TOPO2.1::miRNA family # 5	Ampicillin, Kanamycin	XL1Blue
pCR TOPO2.1:VFB2promotor 1kB #2	Amp/Kan	XL1Blue
pCR TOPO2.1:VFB2promotor 2kB #6	Amp/Kan	XL1Blue
pCR T7/CT:VFB2 # 2	Ampicillin	XL1Blue
pCR T7/CT:VFB2 # 6	Ampicillin	XL1Blue
pCR T7/CT:VFB2 # 9	Ampicillin	XL1Blue
pDEST 14	Ampicillin	DB3.1
pDONR 201	Kanamycin	DB3.1
pDONR 201:VFB3 NOF # 8	Kanamycin	XL1Blue
pDONR201:VFB2(GW C-terminal) #10	Kanamycin	XL1Blue
pDONR201:VFB2(GW C-terminal) #14	Kanamycin	XL1Blue
pDONR201:VFB2(GW N-terminal) # 15	Kanamycin	XL1Blue

pDONR201:VFB2(GW N-terminal) # 24	Kanamycin	XL1BLue
pDONR201:VFB3 # 13	Kanamycin	XL1Blue
pDONR201:VFB4 # 6	Kanamycin	XL1Blue
pENTRY:VFB2	Kanamycin	XL1Blue
pER8:AT3-XVE	Gen/Rif/Spec	GV3101
pER8:VFB2ΔF-Box	Spectinomycin	XL1Blue
pEXSTAG(GW)YFP (leer)	Ampicillin	XL1BLue
pEXSTAG:YFP:VFB2 #16	Ampicillin	XL1BLue
pEXSTAG:YFP:VFB2 #17	Ampicillin	XL1BLue
pEXSTAG:YFP:VFB2 #16	Rif /Gen/Kan/Carb	GV3101RK
pEXSGTAP:: miRNA single	Ampicillin	XL1Blue
pEXSGTAP:: miRNA single	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101RK
pEXSGTAP:: miRNA family	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101RK
pG:CycB1:GUS (Ferreira et al.1994)	Spectinomycin	XL1Blue
pG:CycB1:GUS (Ferreira et al.1994)	Rif/Spec/Carb	C58-C1
pGB 117(pGEXT:axr2-GST)	Ampicillin	XL1Blue
pGB 76 (pGEXT:AXR2-GST)	Ampicillin	XL1Blue
pGEM:VFB2 #18	Ampicillin	XL1Blue
pGEM:VFB2 #19	Ampicillin	XL1Blue
pGREEN 0179 (leer)	Gen/Rif/Tet/Kan	GV3101+pSoup
pGREEN0179:VFB3 4kB	Gen/Rif/Tet/Kan	GV3101+pSoup
pGREEN II:3xGFP	Kanamycin	XL1Blue
pGREEN II:VFB3 4kB #8	Kanamycin	XL1Blue
pGREEN II:VFB3 4kB # 9	Kanamycin	XL1Blue
pIB-1.6TC:ARR5:GUS (Brandstatter und Kieber, 1998)	Kanamycin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 CONF # 3	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 CONF # 4	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 CONF # 3	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101 RK
pJawohl2B:VFB3 CONF # 6	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 CONF # 6	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101 RK
pJawohl2B:VFB3 NOF # 8	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 NOF # 9	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl2B:VFB3 NOF # 8	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101 RK
pJawohl 8(RNAi) (leer)	Ampicillin	DB3.1
pJawohl 17(RNAi) (leer)	Ampicillin	DB3.1
pJawohl 17(RNAi):VFB4	Ampicillin	XL1Blue
pJawohl 17 (RNAi):VFB4	Gen/Rif/Kan/Carb	GV3101 RK

pJG4-5 (leer) (Gyuris et al., 1997)	Ampicillin	XL1Blue
pJG4-5:ASK2 (Schwechheimer et al. 2001, Risseeuw et al., 2003)	Ampicillin	XL1Blue
pJG4-5:RBX1 (Schwechheimer et al. 2001, Risseeuw et al., 2003)	Ampicillin	XL1Blue
pJG4-5:CUL1 (Schwechheimer et al. 2001, Risseeuw et al., 2003)	Ampicillin	XL1Blue
pLEX A (leer) (Gyuris et al., 1997)	Ampicillin	XL1Blue
pLEX A:VFB2	Ampicillin	XL1Blue
pLEX A:VFB2 Δ F-Box #5	Ampicillin	XL1Blue
pLEX A:: VFB2 Δ F-Box #9	Ampicillin	XL1Blue
pMCD 83	Kanamycin	DB3.1
pMCD 83:VFB3 # 3	Kanamycin	XL1Blue
pMCD 83:VFB3 # 4	Kanamycin	XL1Blue
pMCD 83:VFB4 #1	Kanamycin	XL1Blue
pMCD 83:VFB4 # 3	Kanamycin	XL1Blue
pMCD 107	Kanamycin	DB3.1
pTA Vektor 7002 (Aoyama und Chua, 1997)	Kanamycin	DB3.1
pTA:VFB2-TAP # 15	Kanamycin	XL1Blue
pTA:VFB2-TAP # 11	Kanamycin	XL1Blue
pTA:VFB2-TAP # 23	Kanamycin	GV3101
pTA:VFB2 # 14	Kanamycin	XL1Blue
VFB2 promotor 1 kB:VFB2	Ampicillin	XL1Blue
VFB2 promotor 2 kB:VFB2	Ampicillin	XL1Blue

8.4 Übersicht der transgenen Pflanzenlinien

+/+ = Wildtyp; +/- = heterozygot; -/- = homozygot mutant

Amp = Ampicillin; Hyg = Hygromycin; Kan = Kanamycin; PPT = Phosphinotricin;

Sulf = Sulfadiazin

Salk-Linien/GABI-KAT Linien für VFB1 bis 4

VFB1

Linien	Generation	Genotyp	Resistenz
SALK_128933: 1; 3	T2	+/+	-
2; 5	T2	+/-	Kan
6; 8	T2	-/-	Kan
SALK_128933 (<i>vfb1-1</i>): 8	T3 und >	-/-	Kan

VFB2

Linien	Generation	Genotyp	Resistenz
SALK_047599: 1; 2; 3; 5; 6; 7	T2	+/-	Kan
4	T2	+/+	-
8	T2	n.a.	Kan
SALK_047599: 1-1; 1-2; 1-4; 2-1; 4-2	T3	+/-	Kan

2.Genotypisierung:

SALK_047599: 1; 2; 3; 4; 5; 6	T2	+/-	Kan
SALK_047599 (<i>vfb2-1</i>): 4-3	T3	-/-	Kan
4-1; 4-2; 4-5 - 4-8; 4-11 - 4-13; 4-16 - 4-18	T3	+/-	Kan
SALK_047599 (<i>vfb2-1</i>): 4-3	T4 und >	-/-	Kan

VFB3

Linien	Generation	Genotyp	Resistenz
SALK_054809 (von S.Knierer): 1; 3; 5; 6; 7; 9	T2	+/-	Kan
2; 8; 10	T2	+/+	-
4	T2	-/-	Kan
Salk_054809 :1-1; 1-3	T3	+/-	Kan
1-7; 4-6	T3	-/-	Kan
2-3	T3	+/+	-
Salk_054809 (<i>vfb3-1</i>): 1-7	T4	-/-	Kan
4-6	T4	-/-	Kan
Salk_054809 (<i>vfb3-1</i>): 1-7	T5 und >	-/-	Kan

VFB4

Linien	Generation	Genotyp	Resistenz
SALK_086664	T2	+/-, +/+	Kan
GABI_323B07	T2	+/-, +/+	Sulf
GABI_414F05 (<i>vfb4-1</i>)	T2	-/-,+/-, +/+	Sulf

Kreuzungen *vfb1-1*, *vfb2-1*, *vfb3-1*

Linien	Generation	Genotyp	Resistenz
<i>vfb1-1</i> 8-/- x <i>vfb3-1</i> 1-7 -/-	F0	<i>vfb1</i> +/- <i>vfb3</i> +/-	Kan
<i>vfb1-1</i> 8-/- x <i>vfb3-1</i> 1-7 -/-: Linien 3, 5, 11	F1	+/-,+/-	Kan
<i>vfb1-1</i> 8-/- x <i>vfb3-1</i> 1-7 -/-: Linien 3-1, 3-2, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-11 3-12 11-13, 11-16, 11-20, 11-21 11-15	F1	+/- +/- +/- -/-,-/-	Kan
<i>vfb1-1</i> <i>vfb3-1</i> 11-15 -/- x <i>vfb2-1</i> 4-3 -/-	F0	+/-	Kan
<i>vfb1-1</i> <i>vfb3-1</i> 11-15 -/- x <i>vfb2-1</i> 4-3 -/-: Linien 1; 2; 5; 6; 7	F1	+/-	Kan
<i>vfb1-1</i> <i>vfb3-1</i> 11-15 -/- x <i>vfb2-1</i> 4-3 -/-: Linien 1-2; 1-3; 1-5; 1-6; 1-8; 1-12; 1-14; 1-17 1-22; 1-23; 1-24 1-13 5-2; 5-3; 5-9; 5-14; 5-21; 5-22; 5-27; 5-38; 5-40	F2 F2 F2	+/-,+/-,+/- -/- -/- +/-,+/- ;+/-,-/-	Kan Kan Kan

Promotor:GUS-Linien (ursprünglich von S.Knierer)

Linie	Generation	Resistenz
VFB1:GUS (Col) : 1-2; 1-2; 2-1; 2-2; 5-1; 5-2; 9-1; 9-2	T3	Hyg
VFB2:GUS (Col) : 3-2 bis 3-5; 3-7; 3-8; 3-10; 3-11 2-2; 2-3; 2-8; 2-10; 2-11	T3	Hyg
VFB3:GUS (Col) : 6-1; 6-2; 13-1; 13-2; 25-1; 25-2	T3	Hyg
VFB4:GUS (Col) : 2-1; 2-2; 3-1; 3-2; 10-1; 10-2 12-1; 12-2; 14-1; 14-2	T3	Hyg

VFB2 induzierbar

Linie	Generation	Resistenz
pTA (<i>tir1-1</i>)	T0	Hyg
pTA:VFB2 (<i>tir1-1</i>)	T0	Hyg
pTA:VFB2 (<i>tir1-1</i>): Linien 1-70 (1.Selektion)	T1	Hyg
Linien 1-30 (2.Selektion)	T1	Hyg

VFB2-GFP/YFP/XVE

Linie	Generation	Resistenz
35S:YFP:VFB2 (Col)	T0	PPT
35S:YFP:VFB2 (<i>vfb1-1vfb2-1vfb3-1</i>)	T0	PPT
35S:VFB2:GFP (Col)	T0	Kan
35S:VFB2:GFP (Col) : 44 Linien	T1	Kan
35S:VFB2:GFP (Col) : 12 Linien	T1	Kan
35S:VFB2:GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) :	T0	Kan
35S:VFB2:GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) : 28 Linien	T1	Kan
35S:VFB2:GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) : 11 Linien	T1	Kan
35S:VFB2:GFP (<i>tir1-1</i>) :	T0	Kan
35S:VFB2:GFP (<i>tir1-1</i>) : Linien 1-27 (nicht getestet)	T1	Kan
35S:VFB2(XVE) (<i>tir1-1</i>):	T0	Hyg
35S:VFB2(XVE) (<i>vfb2-1</i>):	T0	Hyg

VFB2-TAP

Linie	Generation	Resistenz
pTA (Col)	T0	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col)	T0	Hyg
pTA (Col) : Linien: 1 bis 6; 8 bis 16; 19 bis 26	T1	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) : Linien: I; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 11;	T1	Hyg
15; 18; 19; 21; 25; 26; 27; 28	T1	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) 8: Linien 1-9	T2	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) 8	T3	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) 25: Linien1, 2	T2	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) 25-1	T3	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) I: 1	T2	Hyg

pTA:VFB2:TAP (Col) I	T3	Hyg
pTA:VFB2:TAP (Col) I	T4	Hyg
35S:VFB2:TAP (Col)	T0	PPT
35S:VFB2:TAP (Col): Linien 1; 2 (1.Selektion)	T1	PPT
Linien 1-10 (2.Selektion)	T1	PPT
Linien 1; 2; 3 (3.Selektion)	T1	PPT
Linien 2-10 (4.Selektion)	T1	PPT
35S:VFB2:TAP (Col): Linien 2-1; 2-3; 2-5	T2	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>):	T0	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>): Linien 1; 2; 3; 4; 5; 6	T1	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>): Linien 8-3; 9-5; 9-7; 9-8	T3	PPT
5-2; 5-6; 2-7	T3	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>) 5-2: Linien 1-4	T4	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>) 2-7: Linien 1, 3, 4	T4	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1 +/-</i>) 5-6: Linie 2	T4	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1</i>):	T0	PPT
35S:VFB2:TAP (<i>vfb2-1</i>): Linien 4; 5; 6; 8; 9	T1	PPT
pTA:VFB2:TAP (<i>vfb2-1</i>)	T0	Kan/Hyg
pTA:VFB2:TAP (<i>vfb2-1</i>): Linien: 3; 6; 8; 11; 14; 15; 16	T1	Kan/Hyg
pTA:VFB2:TAP (<i>vfb2-1</i>): Linien: 3; 10; 22; 23; 25; 28; 29; 51	T1	Kan/Hyg
53; 56 bis 64; 66; 67; 69; 70		
pTA (<i>vfb2-1</i>)	T0	Hyg
pTA (<i>vfb2-1</i>): Linien 5; 6; 15; 18; 19; 52-55; 57; 59; 60-65	T1	Hyg
pTA:VFB2:TAP (<i>tir1-1</i>)	T0	Hyg
pTA:VFB2:TAP (<i>tir1-1</i>): Linien 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12	T1	Hyg
pTA:VFB2:TAP (<i>tir1-1</i>): Linien 3-1 bis 3-9; 3-11; 6-1; 6-3 bis	T2	Hyg
6-10; 8-1 bis 8-10; 11-1 bis 11-10		
12-1 bis 12-10		
pGB28 (= pTA:TIR1-myc) (<i>tir1-1</i>)	T0	Hyg
pGB28 (= pTA:TIR1-myc) (<i>tir1-1</i>): Linien 1; 11	T1	Hyg
pGB28 (= pTA:TIR1-myc) (<i>tir1-1</i>): Linien 11-1 bis 11-10	T2	Hyg

35S:HA:VFB3 und VFB3-Promotor:VFB3:GFP (4kB-Fragment)

Linie	Generation	Resistenz
35S:HA:VFB3 (Col) (CONF; eigentlich NOF)	T0	PPT
35S:HA:VFB3 (Col) (CONF; eigentlich NOF): Linien 3; 4; 7; 8; 11; 12; 14; 33; 32; 34; 36	T1	PPT
35S:HA:VFB3 (Col) CONF Nr.6	T0	PPT
35S:HA:VFB3 (Col) CONF Nr.6 : Linien 1-28	T1	PPT
35S:HA:VFB3 (Col) CONF Nr.6 : Linien 1-12, 8, 13	T1	PPT
HA-Strep-RUB (Col) (von E. Dohmann als Kontrolle)		
35S:VFB3 (Col) (NOF)	T0	PPT
35S:VFB3 (Col) (NOF): Linien 1, 6, 10, 13	T1	PPT
pGREEN II (<i>vfb3-1</i>)	T0	Hyg
VFB3Promotor:VFB3:GFP (<i>vfb3-1</i>)	T0	Hyg
VFB3Promotor:VFB3:GFP (<i>vfb3-1</i>) : Linien 1-6, 8-14	T1	Hyg

VFB4(Antisense)

Linie	Generation	Resistenz
35S(GW)GFP (Col)	T0	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (Col)	T0	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>)	T0	Kan
35S(GW)GFP (Col): Linien 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 11; 12; 13; 32; 34	T1	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (Col) : 1-3, 11-14, 16, 20, 21, 40- 42, 44, 45, 47, 49, 51	T1	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>): 1	T1	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) 1: 1; 2; 3; 4; 21; 22; 26; 28; 30; 31; 35	T2	Kan
35S: <i>vfb4</i> (antisense):GFP (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) 1 (2.Selektion): Linien 20; 23; 24; 25; 27; 28; 29; 32; 33; 34; 36	T2	Kan

VFB4(RNAi)

Linie	Generation	Resistenz
<i>vfb4</i> (RNAi) (Col)	T0	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>)	T0	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (Col):		
Selektion 1: Linien 30, 31, 33, 39, 40, 41	T1	Kan
mit Phänotyp	T1	Kan
Linien 1-20, 32, 34, 35-38, 42-53	T1	Kan
Selektion 2: Linien 1-34	T1	Kan
Selektion 3: Linien 1-34	T1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (Col) 39: Linien 20-25, 28-32	T2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>):		
Selektion 1: Linien 30, 39, 40 mit Phänotyp	T1	Kan
Selektion 2: Linien 1-34	T1	Kan
Selektion 3: Linien 1-22, „small“ 0-3; Normal 1	T1	Kan
Selektion 4: S1-12; N13-23	T1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) 40 : Linien 1-4, 23	T2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) 40 (2. Mal propagiert):		
Linien 1-5 „small „ Phänotyp, 6+7 schwacher Phänotyp	T2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>) 40 (3.Mal propagiert):		
Linien 1-15; „small“0“: 1-14	T3	Kan

miRNA Konstrukte gegen VFB4 und die VFB Familie

Linie	Generation	Resistenz
<i>vfb4</i> (miRNA) (Col)	T0	PPT
<i>vfb4</i> (miRNA) (Col): Linien 4 bis 25; 52 bis 64	T1	PPT
<i>vfb4</i> (miRNA) (Col): Linien 8-1 bis 8-14; 6-7	T2	PPT
<i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) (Col)	T0	PPT
<i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) (Col): Linien 1-23	T1	PPT
<i>vfb4</i> (miRNA) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>)		
<i>vfb4</i> (miRNA) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>):		
Linien 1-10 (1.Selektion)	T1	PPT
Linien 1-10 (2.Selektion)	T1	PPT
<i>vfb4</i> (miRNA) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>):		
Linien 1-1 bis 1-20	T2	PPT
2-2 bis 2-11; 3-1 bis 3-14	T2	PPT

<i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>):	T0	PPT
<i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>): Linien 1-10	T1	PPT

Weitere Linien

Linie	Generation	Resistenz
pGB 28 (TIR-myc) (<i>tir1-1</i>) (Gray et al., 1999)		Hyg
pGB 37 (<i>tir-myc</i>) (<i>tir1-1</i>) (Gray et al., 1999)		Hyg
<i>tir1-1</i> (Ruegger et al., 1998)		

Markerlinien

Linie	Generation	Resistenz
ARR5:GFP (Brandstatter und Kieber, 1998)		Kan
ARR5:GFP: <i>vfb4</i> (RNAi)	T0	Kan
ARR5:GFP: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
ARR5:GFP: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-30	T1	Kan/PPT
ARR5:GFP: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
ARR5:GFP: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) : Linien 1-34	T1	Kan/PPT
ARR5:GUS (Brandstatter und Kieber, 1998)		Kan
ARR5:GUS: <i>vfb4</i> (RNAi)	T0	Kan
ARR5:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
ARR5:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-18	T1	Kan/PPT
ARR5:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
ARR5:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA): Linien 1-33	T1	Kan/PPT
BDL:GUS 447 -/- (Weijers et al., 2006)		
BDL:GUS 447 -/-: Linien 1-12		
BDL:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	PPT
BDL:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	PPT
bdl:GUS 393 +/- (Weijers et al., 2006)		
bdl:GUS 393 +/- : Linien 1-13		
bdl:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	PPT
bdl:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-34	T1	PPT
bdl:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	PPT
bdl:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) : Linien 1-34	T1	PPT
CYCB1:GUS (Ferreira et al., 1994)		Kan
CYCB1:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
CYCB1:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-21	T1	Kan/PPT
CYCB1:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT

CYCB1:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA): Linien 1-32	T1	Kan/PPT
DR5:GFP (Friml et al., 2003)		
DR5:GFP: <i>vfb4</i> (RNAi)	T0	Kan
DR5:GFP: <i>vfb4</i> (RNAi): Linien 1-12	T1	Kan
DR5:GFP: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	PPT
DR5:GFP: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-32	T1	PPT
DR5:GFP: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	PPT
DR5:GFP: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) : Linien 1-29	T1	PPT
DR5:GUS (Ulmasov et al., 1997a und b)		
DR5:GUS: <i>vfb4</i> (RNAi)	T0	Kan
DR5:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	PPT
DR5:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA) : Linien 1-43	T1	PPT
DR5:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	PPT
DR5:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) : Linien 1-34	T1	PPT
HS:AXR3/IAA17NT:GUS (Gray et al., 2001)	T2	Kan
HS:AXR3/IAA17NT:GUS Linien 3, 4, 6, 7, 10	T3	Kan
HS:AXR3/IAA17NT:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
HS:AXR3/IAA17NT:GUS: <i>vfb4</i> (miRNA) :Linien 1-15	T1	Kan/PPT
HS:AXR3/IAA17NT:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA)	T0	Kan/PPT
HS:AXR3/IAA17NT:GUS: <i>vfb1,2,3,4</i> (miRNA) : Linien 1-30	T1	Kan/PPT

Kreuzungen der Markerlinien mit *vfb4*(RNAi)(*vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1*)

Der *vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1* Hintergrund der Linien mit dem RNAi Konstrukt ist in diesem Abschnitt mit einem „t“ gekennzeichnet (für „Triple“). Vorhandene Phänotypen sind mit „PT“ bezeichnet, wildtypischen Linien wurde mit „WT“ gekennzeichnet.

Linie	Generation	Resistenz
ARR5:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1-12	F1	Kan
ARR5:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t 2-1 bis 2-8 (WT)	F2	Kan
2-1 bis 2-4 (PT)	F2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x ARR5:GUS : Linien 1-4	F1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x ARR5:GUS : 1-1 bis 1-5; 2-1 bis 2-4 (WT)	F2	Kan
1-1 bis 1-5; 2-1;2-2;2-5 - 2-8(PT)	F2	Kan
ARR5:GFP x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1-12	F1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x ARR5:GFP : Linien1-12	F1	Kan
BDL:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1 bis 9	F1	Kan

BDL:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : 1-1 bis 1-261	F2	Kan
1-245 (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>)	F2	Kan
(<i>vfb4</i> (RNAi)/t x BDL:GUS : Linien 1-10	F1	Kan
bdl:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1, 4, 8, 10	F1	Kan
bdl:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : 1-1 bis 1-158	F2	Kan
1-12 (<i>vfb1-1/VFB1; vfb2-1 vfb3-1</i>)	F2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x bdl:GUS : Linien1, 2, 3	F1	Kan
CYCB1:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1, 3, 5, 7, 8	F1	Kan
CYCB1:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : 3-2, 3-4, 3-5 (WT); 3-3 (PT)	F2	Kan
8-small 1 bis 8 (PT)	F2	Kan
8-1 bis 8-13 (WT)	F2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x CYCB1:GUS: Linien 1 bis 11	F1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x CYCB1:GUS: 1-1 bis 1-5 (WT); 1-1 bis 1-7 (PT)	F2	Kan
2-1 bis 2-4 (WT); 2-1 bis 2-4 (PT)	F2	Kan
DR5:GFP x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1-5, 12	F1	Kan
DR5:GFP x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : 1-3; 5-1 bis 5-5; 12-7 bis 12-10	F2	Kan
(WT)	F2	Kan
1-4 bis 1-12; 2-3 bis 2-12	F2	Kan
5-6; 12-1 bis 12-6 (PT)		
DR5:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linie1	F1	Kan
DR5:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1-7, 13, 16, 18, 21, 22, 25	F2	Kan
27, 29, 35, 65, 71, 73	F2	Kan
DR5:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t : Linien 1-5 (WT); Linien 1-5 (PT)	F2	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x DR5:GUS Linie 1	F1	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x DR5:GUS : Linien 1; 2 (WT); 1 bis 5 (PT)	F2	Kan
HS:AXR3/IAA17NT:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t :		
Linien1, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 21,22, 26	F1	Kan
HS:AXR3/IAA17NT:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t:		
5-1 bis 5-231	F2	Kan
5-188 (<i>vfb1-1 vfb2-1 vfb3-1</i>)	F2	Kan

HS:AXR3/IAA17NT:GUS x <i>vfb4</i> (RNAi)/t 5-188 propagiert		
Linien 9, 37, 40, 59 (GUS+)	F3	Kan
<i>vfb4</i> (RNAi)/t x HS:AXR3/IAA17NT:GUS	F1	Kan
Linien 1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15		

Tab. 8: Liste der in den *vfb1-1vfb2-1vfb3-1vfb4*(RNAi) Keimlingen induzierten Gene im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia)

Fold induction	Genidentität	Beschreibung	Wildtyp (min to max)	<i>vfb</i> Mutante (min to max)
18,9	AT3G28270	expressed protein	43,17 (37,47 to 49,56)	891,6 (447 to 1.333)
13,2	AT5G24420	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related	56,49 (54,25 to 57,87)	870,1 (347,3 to 1.449)
12,0	AT3G28220	mepirin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	258,3 (221,8 to 283,1)	3.403 (1.683 to 5.029)
10,7	AT2G41260	glycine-rich protein / late embryogenesis abundant protein (M17)	6,671 (5,039 to 9,932)	69,33 (54,15 to 92,74)
8,8	AT1G02820	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein	41,76 (30,43 to 57,97)	359,7 (278,8 to 464)
8,2	AT1G09500	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family / CAD family	11,04 (10,64 to 11,57)	97,11 (55,99 to 141,8)
7,7	AT4G31870	glutathione peroxidase, putative	11,15 (9,917 to 13,14)	86,45 (72,18 to 107,6)
7,5	AT2G04040	MATE efflux family protein	9,507 (8,318 to 10,13)	71,4 (63,06 to 77,93)
7,1	AT4G22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	62,38 (21,7 to 91,85)	379,3 (311,5 to 441,4)
7,0	AT1G19610	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.4)	38,61 (26 to 62,87)	252,9 (186,5 to 295)
6,6	AT1G52100	jacalin lectin family protein	43,16 (35,92 to 52,49)	284,9 (253,2 to 342,7)
6,4	AT4G36700	cupin family protein	10,98 (7,992 to 14,79)	69,24 (49,84 to 80,77)
6,3	AT5G17300	myb family transcription factor	28,14 (24,57 to 31,22)	184,1 (138,3 to 258,3)
6,3	AT2G05540	glycine-rich protein	355,4 (267,1 to 400,9)	2.217 (1.802 to 2.806)
6,2	AT1G62510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	177,9 (116,3 to 218,2)	1.070 (904,7 to 1.164)
6,1	AT2G21320	zinc finger (B-box type) family protein	21,05 (17,71 to 25,52)	129,2 (96,67 to 148,6)
5,7	AT1G12030	expressed protein	51,63 (30,84 to 82,07)	273,4 (237 to 341,2)
5,7	AT2G31380	zinc finger (B-box type) family protein / salt tolerance-like protein (STH)	27,99 (24,61 to 32,86)	159,6 (125,5 to 180,4)
5,6	AT5G39580	peroxidase, putative	77,46 (20,93 to 106,3)	346 (298,9 to 425,5)
5,5	AT5G42760	O-methyltransferase N-terminus domain-containing protein	13,96 (11,53 to 16,58)	78,34 (53,51 to 91,27)
5,4	AT2G27420	cysteine proteinase, putative	5,136 (4,805 to 5,742)	28,76 (19,38 to 39,71)
5,2	AT1G47400	expressed protein	221,1 (184,2 to 261,4)	1.146 (937,7 to 1.315)
5,1	AT2G15020	expressed protein	12,35 (11,57 to 13,72)	64,12 (49,91 to 71,79)
5,1	AT5G24150	squalene monooxygenase 1,1 / squalene epoxidase 1,1 (SQP1,1)	106,9 (94,93 to 121,4)	551,3 (427,9 to 620,7)
5,1	AT5G36910	thionin (THI2.2)	35,71 (27,98 to 47,75)	180,7 (131,1 to 240,2)
5,0	AT5G64120	peroxidase, putative	455,2 (158,4 to 634,3)	1.947 (1.642 to 2.158)
4,9	AT2G46830	myb-related transcription factor (CCA1)	48,98 (44,12 to 56,17)	240,6 (219,5 to 277,2)
4,9	AT3G02380	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)	39,88 (34,71 to 43,84)	200 (130,6 to 236,9)
4,8	AT1G19670	coronatine-responsive protein / coronatine-induced protein 1 (COR11)	163,6 (153,6 to 175,7)	849,8 (470,4 to 1.296)
4,8	AT5G14180	lipase family protein	6,167 (5,429 to 7,075)	30,02 (24,16 to 39,81)
4,8	AT2G17740	DC1 domain-containing protein	29,12 (14,76 to 40,6)	128,9 (104,4 to 149,8)
4,7	AT4G15680	glutaredoxin family protein	27,35 (23,41 to 33,57)	128,3 (99,9 to 157,8)
4,7	AT5G46050	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	32,37 (21,41 to 39,13)	146,8 (131,2 to 161,3)
4,6	AT5G24120	RNA polymerase sigma subunit SigE (sigE) / sigma-like factor (SIG5)	60,64 (56,41 to 66,54)	280,6 (240,9 to 334,1)

4,5	AT1G64500	glutaredoxin family protein	40,14 (30,22 to 51,8)	177,8 (163,9 to 199,9)
4,4	AT3G01970	WRKY family transcription factor	15,69 (9,471 to 24,58)	64,65 (53,66 to 70,45)
4,4	AT5G51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	8,696 (6,551 to 10,49)	38,02 (30,44 to 43,04)
4,4	AT5G09570	expressed protein	16,84 (14,91 to 18,69)	78,13 (51,56 to 114,2)
4,4	AT2G41250	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	92,55 (74,92 to 105,8)	406,4 (353,6 to 450,6)
4,4	AT5G20150	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	76,14 (56,21 to 91,63)	330,2 (273,9 to 361,9)
4,4	AT1G55960	expressed protein	82,88 (76,95 to 90,09)	365,2 (325,5 to 441,3)
4,4	AT2G34810	FAD-binding domain-containing protein	52,54 (49,73 to 57,07)	251 (125,5 to 365,8)
4,3	AT1G65870	disease resistance-responsive family protein	4,647 (4,15 to 5,36)	20,46 (15,38 to 23,74)
4,3	AT3G21670	nitrate transporter (NTP3)	107,3 (89,64 to 118,1)	464,7 (414,6 to 491,2)
4,2	AT3G49580	expressed protein	67,41 (44,83 to 101,8)	287,9 (151 to 380,6)
4,1	AT5G58770	dehydrodolichyl diphosphate synthase, putative / DEDOL-PP synthase, putative	46 (39,32 to 50,68)	189,6 (178,8 to 209,4)
4,1	AT5G64170	dentin sialophosphoprotein-related	37,32 (35,08 to 41,07)	155,6 (126,8 to 193,5)
4,1	AT3G12320	expressed protein	22,84 (19,65 to 26,62)	93,78 (71,96 to 106,8)
4,0	AT5G20230	plastocyanin-like domain-containing protein	171,2 (95,78 to 237,8)	650,8 (506,3 to 750)
4,0	AT1G64900	cytochrome P450, putative	66,3 (52,67 to 78,33)	261,5 (256,5 to 267,6)
4,0	AT4G16690	esterase/lipase/thioesterase family protein	33 (27,38 to 40)	132,8 (94,96 to 159,6)
4,0	AT2G39200	seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 12 (MLO12)	64,32 (24,99 to 84,58)	222,3 (213,4 to 228,7)
3,9	AT1G52410	caldesmon-related	212 (204,6 to 225,1)	935,9 (429,1 to 1.451)
3,9	AT3G17610	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 35429.	28,21 (21,18 to 34,39)	109,6 (89,36 to 120,6)
3,9	AT3G47420	glycerol-3-phosphate transporter, putative / glycerol 3-phosphate permease, putative	36,95 (33,83 to 38,62)	148,1 (122,1 to 196,6)
3,9	AT1G51820	leucine-rich repeat protein kinase, putative	18,22 (9,156 to 23,17)	65,67 (58,2 to 73,5)
3,9	AT2G36690	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	32,75 (16,03 to 46,41)	116,4 (103,9 to 124,5)
3,8	AT3G44450	expressed protein	19,86 (19,09 to 21,11)	77,74 (50,97 to 100,8)
3,8	AT1G22500	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	46,55 (34,35 to 58,83)	174,5 (134,1 to 206,3)
3,8	AT5G62430	Dof-type zinc finger domain-containing protein	24,29 (23,49 to 25,02)	93,74 (68,12 to 120,8)
3,7	AT1G18710	myb family transcription factor (MYB47)	24,39 (23,99 to 24,62)	98,54 (50,9 to 128,2)
3,7	AT2G04050	MATE efflux family protein	12,62 (10,45 to 14,89)	48,27 (33,47 to 64,48)
3,7	AT3G28740	cytochrome P450 family protein	77,54 (67,29 to 90,16)	284,4 (269,9 to 306,6)
3,6	AT3G26290	cytochrome P450 71B26, putative (CYP71B26)	89,44 (85,36 to 94,19)	332,9 (244,8 to 417,8)
3,6	AT3G17790	acid phosphatase type 5 (ACP5)	83,94 (66,01 to 94,11)	309,7 (204,6 to 395,9)
3,6	AT5G53970	aminotransferase, putative	69,51 (50,34 to 85,29)	244,5 (222,3 to 267,3)
3,6	AT4G24700	expressed protein	30,96 (28,06 to 34,64)	110,8 (98,82 to 118,5)
3,6	AT1G07180	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	51,92 (46,36 to 57,2)	185,6 (154,4 to 206,3)
3,5	AT1G10070	branched-chain amino acid aminotransferase 2 / branched-chain amino acid transaminase 2 (BCAT2)	22,49 (16,79 to 26,78)	78,2 (73,98 to 80,38)
3,5	AT3G46280	protein kinase-related	92,67 (38,14 to 126,2)	290,4 (281,5 to 301,3)

3,5	AT1G27730	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)	56,55 (25,55 to 73,26)	182,4 (158,2 to 213,2)
3,5	AT3G56980	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	120,8 (114,4 to 129,8)	427,7 (384,4 to 485,6)
3,5	AT1G18330	myb family transcription factor	32,46 (29,93 to 36,77)	113,5 (89,58 to 134,3)
3,4	AT1G32900	starch synthase, putative	97,85 (88,58 to 114,9)	340,6 (273,8 to 429)
3,4	AT2G24540	kelch repeat-containing F-box family protein	26,55 (22,93 to 30,46)	90,79 (83,48 to 96,34)
3,4	AT1G01060	myb family transcription factor	74,71 (54,92 to 88,39)	253,9 (220,8 to 296,6)
3,4	AT2G19190	light-responsive receptor protein kinase / senescence-responsive receptor-like serine/threonine kinase, putative (SIRK)	21,07 (15,43 to 26,4)	69,96 (67,9 to 72,85)
3,4	AT5G13170	nodulin MtN3 family protein	8,359 (7,955 to 9,127)	29,11 (22,68 to 39,03)
3,4	AT5G48430	expressed protein	15,93 (12,41 to 22,46)	52,14 (45,47 to 64,63)
3,3	AT5G24160	squalene monooxygenase 1,2 / squalene epoxidase 1,2 (SQP1,2)	193,7 (150,6 to 244,8)	633,4 (625,1 to 645,5)
3,3	AT1G24260	MADS-box protein (AGL9)	12,41 (9,947 to 16,83)	41 (32,78 to 54,26)
3,3	AT1G18810	phytochrome kinase substrate-related	23,78 (23,24 to 24,73)	78,78 (72,74 to 82,04)
3,3	AT1G15045	hypothetical protein contains Pfam profile: PF00117 Glutamine amidotransferase class-I	18,11 (16,31 to 21,25)	60,3 (43,18 to 72,15)
3,2	AT1G65500	expressed protein	250,4 (161,1 to 323,5)	785,5 (601,2 to 901)
3,2	AT1G05680	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	29,73 (22,76 to 38,74)	94,86 (75,96 to 130,8)
3,1	AT3G56290	expressed protein	102,5 (83,16 to 112,4)	321,5 (263,6 to 389,6)
3,1	AT5G43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	90,53 (76,87 to 106,4)	278,2 (236,7 to 299,3)
3,1	AT1G10370	glutathione S-transferase, putative (ERD9)	30,82 (25,05 to 34,27)	94,68 (82,6 to 107,6)
3,1	AT4G15490	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	28,98 (24,72 to 35,08)	88,69 (82,55 to 91,76)
3,0	AT4G28290	expressed protein	52,19 (48,63 to 57,49)	160,4 (131,5 to 184,2)
3,0	AT3G54500	expressed protein	122,4 (116,9 to 125,6)	375,9 (334,6 to 453,2)
3,0	AT4G26200	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, putative / ACC synthase, putative	15,83 (11,04 to 20,35)	46,47 (41,38 to 49,68)
3,0	AT3G47500	Dof-type zinc finger domain-containing protein	65,82 (59,5 to 75,42)	199,2 (166,3 to 237,3)
3,0	AT5G67370	expressed protein	397,9 (369,2 to 418,2)	1.195 (1.110 to 1.313)
3,0	AT4G11460	protein kinase family protein	12,93 (7,255 to 17,26)	36,57 (33,9 to 40,86)
3,0	AT3G57020	strictosidine synthase family protein	229,7 (165,8 to 266,3)	668,5 (599,5 to 772,7)
2,9	AT1G31820	amino acid permease family protein	22,66 (20,6 to 26,05)	66,56 (61,07 to 72,91)
2,9	AT3G14770	nodulin MtN3 family protein	48,98 (35,44 to 60,3)	142 (119,7 to 158,1)
2,9	AT4G14690	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein, putative	29,47 (25,38 to 33,1)	86,78 (77,05 to 105,1)
2,9	AT5G20240	floral homeotic protein PISTILLATA (PI)	8,63 (7,449 to 9,662)	26,09 (16,92 to 31,75)
2,9	AT5G58570	expressed protein	36,73 (31,1 to 46,61)	106 (93,7 to 119,3)
2,9	AT2G44370	DC1 domain-containing protein	35,3 (25,65 to 41,2)	101,2 (86,75 to 117,4)
2,9	AT2G37770	aldo/keto reductase family protein	25,82 (25,1 to 27,06)	75,25 (63,69 to 83)
2,9	AT1G72920	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	33,99 (25,03 to 43,11)	97,9 (75,37 to 118,9)
2,9	AT5G24660	expressed protein	88,66 (63,39 to 136,3)	246 (176 to 295,5)

2,9	AT1G75750	gibberellin-regulated protein 1 (GASA1) / gibberellin-responsive protein 1	979,6 (558,7 to 1.458)	2.677 (2.159 to 3.416)
2,9	AT5G47610	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	18,18 (16,15 to 20,31)	52,34 (48,88 to 58,12)
2,9	AT4G23300	protein kinase family protein	66,56 (53,13 to 80,25)	189,1 (166,8 to 201,4)
2,9	AT5G39520	expressed protein	12,23 (10,28 to 14,92)	34,58 (33,18 to 36,25)
2,8	AT5G49480	sodium-inducible calcium-binding protein (ACP1) / sodium-responsive calcium-binding protein (ACP1)	305,8 (256,2 to 392,8)	874,5 (630 to 1.022)
2,8	AT5G52570	beta-carotene hydroxylase, putative	42,31 (40,71 to 44,14)	122,7 (88,6 to 141,6)
2,8	AT3G24470	hypothetical protein predicted by genscan+	7,512 (5,75 to 8,425)	21,67 (14,82 to 28,22)
2,8	AT1G80160	lactoylglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein	7,627 (5,219 to 9,697)	22,51 (15,18 to 35,18)
2,8	AT3G28540	AAA-type ATPase family protein	21,9 (20,5 to 23,47)	63,42 (52,13 to 85,21)
2,8	AT1G51800	leucine-rich repeat protein kinase, putative	72,02 (44,3 to 89,53)	196,2 (162 to 226,7)
2,8	AT5G04150	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	50,16 (48,39 to 53,55)	146,7 (94,84 to 181,4)
2,8	AT1G60590	polygalacturonase, putative / pectinase, putative	96,21 (72,64 to 109,7)	267,7 (237,9 to 302,8)
2,8	AT5G48540	33 kDa secretory protein-related	52,28 (36,48 to 61,45)	143,3 (121,5 to 158)
2,8	AT3G18250	expressed protein	51,48 (38,15 to 67,12)	140,5 (126,4 to 150,6)
2,8	AT3G01060	expressed protein	100 (82,38 to 128,4)	275,8 (231,6 to 304,3)
2,8	AT4G15690	glutaredoxin family protein	22,55 (15,72 to 28,17)	61,67 (54,33 to 72,55)
2,8	AT4G20860	FAD-binding domain-containing protein	104,4 (91,36 to 119,8)	290,3 (259,7 to 332,9)
2,8	AT1G52200	expressed protein	299,3 (243,9 to 336,7)	827,5 (735,7 to 947,6)
2,8	AT1G20390	gypsy-like retrotransposon family	31,72 (29,17 to 36,61)	88,6 (70,01 to 99,85)
2,8	AT1G07390	leucine-rich repeat family protein	22,9 (16,16 to 26,66)	62,24 (58,51 to 69,55)
2,8	AT1G71030	myb family transcription factor	153,8 (137,4 to 175,5)	430,5 (353 to 535,9)
2,8	AT4G16880	disease resistance protein-related	18,88 (17,01 to 21,17)	52,32 (42,85 to 60,25)
2,7	AT2G29120	glutamate receptor family protein (GLR2.7)	15,61 (13,49 to 18,77)	42,65 (37,97 to 49,23)
2,7	AT5G18670	beta-amylase, putative (BMY3) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	84,91 (72,95 to 96,09)	236 (169,9 to 275)
2,7	AT3G51860	cation exchanger, putative (CAX3)	42,57 (31,18 to 51,36)	114,3 (98,51 to 130,7)
2,7	AT4G19170	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative / neoxanthin cleavage enzyme, putative / carotenoid cleavage dioxygenase, putative	164 (127,3 to 192,9)	438,9 (373,5 to 505,3)
2,7	AT3G47640	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	34,2 (33,17 to 35,95)	93,77 (71,07 to 113,8)
2,7	AT1G23205	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	41,56 (33,63 to 52,02)	110,6 (104,3 to 122,6)
2,7	AT2G43620	chitinase, putative	1.187 (714,2 to 1.638)	3.026 (2.814 to 3.234)
2,7	AT2G25680	expressed protein	8,842 (7,971 to 10,47)	23,88 (21,07 to 29,22)
2,7	AT5G35970	DNA-binding protein, putative	245 (242,4 to 246,4)	658,5 (553,1 to 736,2)
2,7	AT1G65480	flowering locus T protein (FT)	19,58 (15,96 to 23,53)	52,8 (36,82 to 61,41)
2,7	AT4G15530	pyruvate phosphate dikinase family protein	159,6 (121,4 to 199)	416,1 (395,7 to 441,3)
2,6	AT4G23260	protein kinase family protein	79,23 (69,79 to 89,2)	209,3 (193,1 to 235,6)
2,6	AT5G26340	hexose transporter, putative	69,1 (64,43 to 71,93)	183,2 (158,5 to 203,1)
2,6	AT3G03470	cytochrome P450, putative	54,48 (48,59 to 59,23)	142,8 (131,7 to 152,8)

2,6	AT2G19650	DC1 domain-containing protein	16,32 (14,5 to 18,16)	43,72 (30,95 to 50,49)
2,6	AT3G12580	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative	53,31 (45,87 to 65,98)	139,4 (111,9 to 156,6)
2,6	AT4G36670	mannitol transporter, putative	239,1 (173,2 to 313,7)	610,9 (548,6 to 692,7)
2,6	AT1G66540	cytochrome P450, putative	10,73 (9,814 to 12,46)	27,98 (24,69 to 30,69)
2,6	AT5G53450	protein kinase family protein	738 (603,1 to 936,8)	1.904 (1.626 to 2.064)
2,6	AT1G57770	amine oxidase family	64,8 (58,64 to 72,29)	168,5 (160,2 to 180,9)
2,6	AT5G01540	lectin protein kinase, putative	13,56 (11,45 to 15,41)	35,09 (31,23 to 38,25)
2,6	AT3G09440	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3)	285,3 (262,9 to 316,2)	736,4 (696 to 793,7)
2,6	AT4G23680	major latex protein-related / MLP-related	411,1 (306,1 to 482,7)	1.049 (951,6 to 1.223)
2,6	AT1G78510	solanesyl diphosphate synthase (SPS)	35,8 (30,45 to 40,66)	92,04 (83,97 to 98,94)
2,6	AT1G42560	seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 9 (MLO9)	5,651 (5,21 to 6,291)	14,72 (12,17 to 17,93)
2,6	AT3G22840	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	11,94 (11,52 to 12,22)	30,76 (25,39 to 34,33)
2,6	AT5G45820	CBL-interacting protein kinase 20 (CIPK20)	52,6 (50,04 to 54,7)	134,1 (126,6 to 137,9)
2,6	AT4G26850	expressed protein	440 (394,8 to 496)	1.124 (1.007 to 1.292)
2,5	AT1G71890	sucrose transporter / sucrose-proton symporter (SUC5)	7,581 (5,585 to 10,54)	18,88 (15,39 to 23,28)
2,5	AT4G02410	lectin protein kinase family protein	54,2 (48,16 to 59,53)	137,2 (131,6 to 141,9)
2,5	AT1G13080	cytochrome P450 family protein	108,7 (89,86 to 129,5)	274 (236,5 to 309,2)
2,5	AT5G13330	AP2 domain-containing transcription factor family protein	23,12 (14,26 to 29,3)	56,04 (49,38 to 59,38)
2,5	AT3G14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	11,97 (11,74 to 12,33)	30,72 (24,19 to 37,2)
2,5	AT1G02850	glycosyl hydrolase family 1 protein	170,7 (113,3 to 214,9)	417,1 (364,4 to 454,4)
2,5	AT1G31290	PAZ domain-containing protein / piwi domain-containing protein	9,106 (6,495 to 11,24)	22,37 (20,45 to 24,62)
2,5	AT4G39780	AP2 domain-containing transcription factor, putative	20,54 (15,46 to 25,44)	50,42 (47,39 to 53,65)
2,5	AT3G19550	expressed protein	12,8 (12,19 to 13,44)	32,07 (29,68 to 34,9)
2,5	AT4G37310	cytochrome P450, putative	54,48 (48,18 to 62,9)	134,7 (128,6 to 139,9)
2,5	AT2G28630	beta-ketoacyl-CoA synthase family protein	84,96 (61,71 to 97,84)	208,4 (185 to 250)
2,5	AT1G52400	glycosyl hydrolase family 1 protein / beta-glucosidase, putative (BG1)	3.706 (3.528 to 3.896)	9.474 (6.569 to 12.765)
2,5	AT2G36080	DNA-binding protein, putative	26,89 (22,02 to 31,29)	66 (55,83 to 76,79)
2,5	AT3G24500	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative	24,03 (20,72 to 26,74)	59,75 (47,62 to 75,03)
2,5	AT4G27030	expressed protein	164,4 (146,3 to 181,7)	404,4 (360,4 to 459,8)
2,5	AT1G53090	WD-40 repeat family protein / phytochrome A-related	35,02 (31,44 to 38,42)	86,78 (71,94 to 102,9)
2,5	AT5G27420	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	16,19 (12,87 to 19,07)	39,51 (33,23 to 44,38)
2,5	AT3G61220	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	181,6 (143,6 to 204,6)	441,9 (409,3 to 496,5)
2,4	AT2G42750	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	286,9 (272,8 to 308,1)	698,8 (666,5 to 725,2)
2,4	AT2G22880	VQ motif-containing protein	9,197 (6,857 to 10,47)	22,28 (18,69 to 27,1)
2,4	AT5G26270	expressed protein	28,1 (26,37 to 29,89)	69,72 (51,06 to 83,99)
2,4	AT2G44380	DC1 domain-containing protein	46,13 (37,51 to 50,47)	111,2 (100,4 to 126,1)
2,4	AT5G39660	Dof-type zinc finger domain-containing protein	17,67 (15,22 to 21,71)	42,43 (36,13 to 46,26)

2,4	AT5G19850	hydrolase, alpha/beta fold family protein	51,07 (37,91 to 63,77)	120,3 (116,4 to 122,6)
2,4	AT1G67070	phosphomannose isomerase, putative (DIN9)	13,59 (12,57 to 14,62)	32,61 (30,38 to 34,09)
2,4	AT1G13990	expressed protein	89,13 (79,99 to 106)	210,8 (195,7 to 222,7)
2,4	AT1G77760	nitrate reductase 1 (NR1)	1.122 (1.045 to 1.202)	2.699 (2.362 to 3.282)
2,4	AT4G23290	protein kinase family protein	110,9 (82,03 to 129,3)	259,6 (238,9 to 271,3)
2,4	AT4G15610	integral membrane family protein	104,6 (71,02 to 130,5)	241,3 (222,6 to 258,9)
2,4	AT1G76930	proline-rich extensin-like family protein	496,1 (321,2 to 585)	1.151 (981,5 to 1.429)
2,4	AT1G03020	glutaredoxin family protein	12,51 (10,31 to 14,68)	29,39 (27,92 to 30,64)
2,4	AT2G41120	expressed protein	36,9 (33,4 to 39,47)	86,89 (81,25 to 93,96)
2,4	AT4G37370	cytochrome P450, putative	43,53 (35,04 to 53,25)	103,2 (77,97 to 131,1)
2,3	AT4G17840	expressed protein	170,9 (151,7 to 186,1)	400,6 (364,5 to 423)
2,3	AT1G73680	pathogen-responsive alpha-dioxygenase, putative	70,85 (66,68 to 78)	166,1 (156,4 to 179,9)
2,3	AT5G38780	S-adenosyl-L-methionine	16,27 (14,4 to 18,43)	38,13 (32,65 to 42,91)
2,3	AT3G04000	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	33,63 (30,47 to 36,52)	79,3 (67,21 to 95,36)
2,3	AT2G43510	trypsin inhibitor, putative	181 (142,6 to 214)	425,1 (359,7 to 540,9)
2,3	AT4G00050	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	71,72 (54,7 to 87,7)	164,4 (156,3 to 179,6)
2,3	AT1G69930	glutathione S-transferase, putative	6,619 (4,893 to 7,647)	15,5 (11,68 to 19,77)
2,3	AT3G21870	cyclin family protein	63,89 (51,54 to 77,73)	148,2 (114,9 to 165,2)
2,3	AT3G44970	cytochrome P450 family protein	22,59 (16,98 to 28,45)	51,63 (44,38 to 58,35)
2,3	AT1G75100	expressed protein	81,21 (72,32 to 93,67)	189,4 (152,1 to 214,1)
2,3	AT1G70810	C2 domain-containing protein	164,2 (142,3 to 200,4)	375,8 (357,3 to 406,4)
2,3	AT2G21640	expressed protein	39,32 (35,74 to 45,65)	94,27 (73,3 to 134,6)
2,3	AT3G52740	expressed protein	29,63 (28,16 to 32,36)	69,24 (54,15 to 77,15)
2,3	AT3G04110	glutamate receptor family protein (GLR1.1) (GLR1)	19,36 (14,79 to 25,96)	43,48 (41,78 to 45,88)
2,3	AT3G26280	cytochrome P450 family protein	63,88 (59,24 to 67,28)	146,6 (135 to 158,2)
2,3	AT4G20000	VQ motif-containing protein	12,26 (10,86 to 12,97)	28,45 (21,47 to 33,73)
2,3	AT4G11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 / ACC synthase 6 (ACS6)	59,39 (47,91 to 67,42)	134,1 (133,2 to 135,4)
2,3	AT3G22370	alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A)	118,7 (101 to 134,4)	270,6 (244,4 to 311,5)
2,3	AT4G27830	glycosyl hydrolase family 1 protein	122,3 (113 to 128,1)	279,7 (249,8 to 302,2)
2,3	AT1G17050	geranyl diphosphate synthase, putative / GPPS, putative / dimethylallyltransferase, putative / prenyl transferase, putative	106,6 (93,87 to 126,1)	242,8 (217,4 to 285,5)
2,3	AT3G07350	expressed protein	128,5 (112,3 to 147,4)	292,8 (254 to 343,2)
2,3	AT5G16970	NADP-dependent oxidoreductase, putative (P1)	146,6 (126,3 to 160)	332,2 (309,7 to 352,3)
2,3	AT5G15850	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 1 (COL1)	183,7 (144,3 to 216,6)	413,4 (359,9 to 454,6)
2,3	AT5G64840	ABC transporter family protein	436,1 (392,3 to 464,9)	995,7 (806,8 to 1.122)
2,3	AT5G65010	asparagine synthetase 2 (ASN2)	801,8 (658,4 to 943,4)	1.813 (1.491 to 2.045)
2,3	AT1G51790	leucine-rich repeat protein kinase, putative	52,79 (44,4 to 64,85)	118,6 (105,5 to 131,2)

2,3	AT1G07010	calcineurin-like phosphoesterase family protein	121,9 (103,4 to 131,5)	276,2 (230 to 308,3)
2,3	AT5G61820	expressed protein	491,5 (412,6 to 547,2)	1.108 (1.009 to 1.231)
2,3	AT5G65870	phytosulfokines 5 (PSK5)	45,24 (41,61 to 48,57)	103,5 (88,28 to 127,4)
2,3	AT5G54130	calcium-binding EF hand family protein	26,08 (19,87 to 29,69)	59,25 (43,07 to 69,37)
2,3	AT1G06570	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD)	130,3 (118,5 to 142,8)	293,7 (265,5 to 322,5)
2,3	AT3G16770	AP2 domain-containing protein RAP2.3 (RAP2.3)	522,9 (345,3 to 617,2)	1.141 (1.071 to 1.215)
2,3	AT1G56430	nicotianamine synthase, putative	79,37 (70,19 to 84,46)	178,3 (167 to 185,4)
2,2	AT4G22200	potassium channel protein 2 (AKT2) (AKT3)	48,16 (42,56 to 56,17)	107,8 (98,9 to 119,8)
2,2	AT3G18280	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	676,4 (523,1 to 772,7)	1.510 (1.240 to 1.727)
2,2	AT5G02180	amino acid transporter family protein	16,6 (13,06 to 20,75)	36,5 (33,79 to 38,11)
2,2	AT2G32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	11,35 (10,77 to 11,9)	25,49 (22,97 to 29,63)
2,2	AT5G67330	NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)	328,6 (318,6 to 339,3)	739 (619,6 to 836,9)
2,2	AT2G41290	strictosidine synthase family protein	44,26 (39,06 to 48,6)	98,54 (93,23 to 107,8)
2,2	AT1G04770	male sterility MS5 family protein	113,3 (90,68 to 134,4)	250,2 (227,7 to 288,5)
2,2	AT5G52640	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	53,95 (50,98 to 59,1)	120,9 (101,3 to 145,5)
2,2	AT5G44190	myb family transcription factor (GLK2)	118,3 (114,9 to 124,6)	260,3 (254,6 to 271,6)
2,2	AT1G51700	Dof-type zinc finger domain-containing protein (ADOF1)	61,95 (50,62 to 69,33)	135,8 (116,2 to 149,7)
2,2	AT4G27410	no apical meristem (NAM) family protein (RD26)	52,7 (38,28 to 62,13)	113,5 (104 to 126,9)
2,2	AT1G64950	cytochrome P450, putative	62,17 (53,69 to 71,19)	139,3 (105,1 to 186,7)
2,2	AT1G72770	protein phosphatase 2C P2C-HA / PP2C P2C-HA (P2C-HA)	114,5 (107,1 to 124,5)	250,4 (234,1 to 262,9)
2,2	AT2G30520	signal transducer of phototropic response (RPT2)	78,22 (67,99 to 86,4)	169,9 (157 to 184,1)
2,2	AT4G35090	catalase 2	1.921 (1.508 to 2.190)	4.133 (3.801 to 4.549)
2,2	AT4G01700	chitinase, putative	98,6 (72,44 to 120,1)	210,7 (184,6 to 227,8)
2,2	AT2G37970	SOUL heme-binding family protein	177,1 (167,2 to 188,9)	385,3 (355,3 to 404,1)
2,2	AT4G01870	tolB protein-related	164,1 (131,3 to 197,6)	351,4 (342,4 to 364)
2,2	AT4G33150	lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	77,66 (67,48 to 93,79)	168,2 (136,1 to 194,5)
2,2	AT2G38870	protease inhibitor, putative	1.408 (1.094 to 1.732)	3.003 (2.816 to 3.294)
2,2	AT5G03230	expressed protein	77,14 (68,47 to 81,79)	166 (159,3 to 170,1)
2,2	AT2G39210	nodulin family protein	165,9 (131,4 to 194,8)	355,5 (306,9 to 384,5)
2,2	AT3G48460	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	50,95 (47,86 to 52,84)	110 (98,45 to 117)
2,2	AT5G67030	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)	545,4 (494,9 to 579,9)	1.175 (1.064 to 1.237)
2,2	AT2G21185	expressed protein	102,8 (97,85 to 108,4)	220,9 (216,8 to 223,4)
2,1	AT5G36220	cytochrome P450 81D1 (CYP81D1) (CYP91A1)	21,03 (17,15 to 23,07)	44,64 (40,5 to 50,29)
2,1	AT2G27660	DC1 domain-containing protein	27,69 (19,19 to 32,52)	57,57 (54,59 to 61,65)
2,1	AT4G38540	monooxygenase, putative (MO2)	127,6 (103,8 to 143,4)	270,4 (237,3 to 294,7)
2,1	AT5G26200	mitochondrial substrate carrier family protein	49,19 (42,49 to 53,34)	104,8 (91,59 to 118,9)

2,1	AT1G62300	WRKY family transcription factor	35,04 (29,73 to 39,42)	74,56 (65,07 to 85,09)
2,1	AT1G79600	ABC1 family protein	263,8 (231,8 to 322,5)	554 (506,9 to 613,2)
2,1	AT1G71480	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	60,67 (54,97 to 71,66)	127,4 (120,1 to 132,6)
2,1	AT2G37760	aldo/keto reductase family protein	204,6 (157,6 to 229,2)	425,3 (396,4 to 463,9)
2,1	AT3G11090	LOB domain family protein / lateral organ boundaries domain family protein (LBD21)	75,47 (69,12 to 80,57)	158,6 (144,3 to 166,8)
2,1	AT5G62130	Per1-like protein-related	31,26 (27,52 to 34,27)	65,49 (62,79 to 67,08)
2,1	AT5G47560	sodium/dicarboxylate cotransporter, putative	272,6 (257,6 to 282,2)	573 (549,6 to 590,9)
2,1	AT5G05250	expressed protein	190,9 (189,5 to 192,6)	402 (354,8 to 477,8)
2,1	AT3G22640	cupin family protein	5,075 (4,502 to 5,643)	10,7 (8,753 to 13,74)
2,1	AT2G30510	unknown protein	714,8 (679,1 to 767,2)	1.495 (1.255 to 1.653)
2,1	AT4G02920	expressed protein	404,3 (360,7 to 462,4)	832,1 (731,8 to 897,6)
2,1	AT2G29650	inorganic phosphate transporter, putative	291,9 (268,9 to 336,6)	599,9 (535 to 637,7)
2,1	AT3G27060	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative / ribonucleotide reductase, putative	439,1 (403,5 to 495,1)	903,2 (864,7 to 941,6)
2,1	AT5G03555	permease, cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin family protein	66,98 (56,63 to 72,27)	137 (128 to 145,4)
2,1	AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	99,55 (75,08 to 117,2)	202,5 (171,8 to 227,1)
2,1	AT3G17510	CBL-interacting protein kinase 1 (CIPK1)	274,7 (269,1 to 282,9)	567,6 (502 to 665,5)
2,1	AT2G40400	expressed protein	90,56 (88,56 to 92,44)	186,3 (174,2 to 201)
2,0	AT5G51390	expressed protein	35,76 (33,54 to 38,47)	73,87 (57,42 to 84,3)
2,0	AT1G07350	transformer serine/arginine-rich ribonucleoprotein, putative	88,63 (76,39 to 98,74)	180,5 (166,3 to 207)
2,0	AT4G25700	beta-carotene hydroxylase	268 (261,6 to 279,7)	547,5 (457,8 to 603,7)
2,0	AT4G27710	cytochrome P450 family protein	94,28 (89,55 to 97,84)	191 (170,7 to 205,7)
2,0	AT4G16370	oligopeptide transporter OPT family protein	403 (356,6 to 450,3)	811,2 (778,9 to 837,7)
2,0	AT5G58870	FtsH protease, putative	213,5 (207,7 to 222,1)	430,3 (396 to 452,1)
2,0	AT1G23020	ferric-chelate reductase, putative	325,6 (275,2 to 364,5)	647,7 (631,4 to 656,4)
2,0	AT5G04340	zinc finger (C2H2 type) family protein	13,06 (10,71 to 14,77)	26,15 (21,45 to 29,24)
2,0	AT5G55570	expressed protein	7,613 (6,145 to 9,111)	15,27 (13,26 to 19,25)
2,0	AT1G16730	expressed protein	15,9 (13,74 to 19,51)	32,73 (22,82 to 46,08)
2,0	AT1G65490	expressed protein	552 (461,5 to 675,6)	1.091 (997,9 to 1.205)
2,0	AT1G23390	kelch repeat-containing F-box family protein	1.006 (976,2 to 1.062)	2.015 (1.777 to 2.262)
2,0	AT1G66330	senescence-associated family protein	223,3 (196,9 to 251,6)	443,4 (436 to 457,4)
2,0	AT5G64940	ABC1 family protein	314,4 (277,7 to 362)	621,4 (599,1 to 663,8)
2,0	AT1G06430	FtsH protease, putative	285,2 (255,5 to 313)	566 (547,2 to 597,8)
2,0	AT5G56100	glycine-rich protein / oleosin	78,78 (59,87 to 89,31)	157,3 (115,7 to 183,3)
2,0	AT5G54160	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	746,1 (669,1 to 859,2)	1.479 (1.332 to 1.571)
2,0	AT4G09350	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	71,72 (67,93 to 75,28)	144,1 (110,3 to 165)

2,0	AT4G33666	expressed protein	404 (344,6 to 454,7)	807,3 (625,7 to 951,9)
2,0	AT4G03260	leucine-rich repeat family protein	181,9 (165 to 192,3)	359,4 (329 to 386,9)
2,0	AT1G20350	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17, putative	6,721 (5,178 to 7,829)	13,05 (11,69 to 14,02)
2,0	AT3G24190	ABC1 family protein	159,1 (144,8 to 176,7)	311 (282,8 to 350,5)
2,0	AT1G05300	metal transporter, putative (ZIP5)	14,31 (12,58 to 16,95)	28,31 (21,54 to 35,99)
2,0	AT1G01720	no apical meristem (NAM) family protein	227,3 (200,3 to 246,3)	442,8 (407,3 to 465,7)
2,0	AT3G47430	peroxisomal biogenesis factor 11 family protein / PEX11 family protein	160,1 (136,3 to 173,9)	313,2 (261,2 to 346,3)
1,9	AT5G37260	myb family transcription factor	185,1 (173,4 to 206,6)	361,7 (313,5 to 408,8)
1,9	AT3G15760	expressed protein	51,44 (45,55 to 57,03)	99,8 (95,33 to 102,9)
1,9	AT1G55910	metal transporter, putative (ZIP11)	45,26 (37,46 to 51,96)	87,8 (73,98 to 94,79)
1,9	AT1G01520	myb family transcription factor	7,185 (6,995 to 7,526)	14,19 (10,96 to 17,13)
1,9	AT3G26570	phosphate transporter family protein	387,1 (367,1 to 425,7)	752,1 (711,1 to 823,3)
1,9	AT1G74790	expressed protein	99,26 (82,97 to 111,8)	191,4 (179,8 to 208,7)
1,9	AT5G04950	nicotianamine synthase, putative	278,8 (260,7 to 289,9)	540,7 (506,8 to 595,1)
1,9	AT3G45140	lipoxygenase (LOX2)	3.104 (2.619 to 3.508)	6.246 (4.078 to 8.822)
1,9	AT1G33110	MATE efflux family protein	79,13 (72,17 to 91,86)	152 (145,5 to 156,2)
1,9	AT3G48990	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	1.615 (1.446 to 1.805)	3.108 (2.770 to 3.395)
1,9	AT5G58350	protein kinase family protein	83,88 (62,7 to 102,4)	158,4 (147,1 to 172,9)
1,9	AT4G32770	tocopherol cyclase, chloroplast / vitamin E deficient 1 (VTE1) / sucrose export defective 1 (SXD1)	56,26 (52,67 to 58,29)	107,9 (100,3 to 117,2)
1,9	AT4G38960	zinc finger (B-box type) family protein	18,85 (16,12 to 21,92)	35,85 (34,16 to 37,34)
1,9	AT4G28270	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	132,9 (128,6 to 140,5)	255,6 (219,2 to 278,3)
1,9	AT3G19030	expressed protein	693,8 (649,7 to 750,9)	1.332 (1.128 to 1.447)
1,9	AT4G10120	sucrose-phosphate synthase, putative	259,9 (223,5 to 280,4)	497,1 (456 to 574,7)
1,9	AT4G36380	cytochrome P450 90C1 (CYP90C1) / rotundifolia3 (ROT3)	41,76 (38,46 to 45,06)	79,36 (73,9 to 83,29)
1,9	AT3G11670	digalactosyldiacylglycerol synthase 1 (DGD1) / MGDG	99,23 (91,79 to 104,4)	188,6 (175,2 to 204,1)
1,9	AT3G27170	chloride channel protein (CLC-b)	42,04 (34,22 to 46,43)	79,49 (67,58 to 89,49)
1,9	AT3G18290	zinc finger protein-related	322,3 (287,3 to 353,8)	610,6 (587,9 to 654,3)
1,9	AT3G20270	lipid-binding serum glycoprotein family protein	47,42 (41,52 to 59,2)	89 (77,14 to 95,84)
1,9	AT1G64780	ammonium transporter 1, member 2 (AMT1.2)	76,25 (69,06 to 80,34)	144,2 (129,7 to 154,1)
1,9	AT2G05380	glycine-rich protein (GRP3S)	1.930 (1.645 to 2.436)	3.586 (3.317 to 3.808)
1,9	AT1G66130	oxidoreductase N-terminal domain-containing protein	59,92 (56,86 to 62,26)	112,6 (112,1 to 113,4)
1,9	AT1G76570	chlorophyll A-B binding family protein	71,67 (68,68 to 74,83)	134,7 (126,6 to 146)
1,9	AT3G45300	isovaleryl-CoA-dehydrogenase (IVD)	96,88 (89,16 to 106,3)	183 (153,8 to 212,4)
1,9	AT2G29320	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative	86,91 (81,25 to 96,12)	163 (143,1 to 183,1)
1,9	AT3G23410	alcohol oxidase-related	117,2 (100,3 to 132,5)	217,2 (213,6 to 222,1)
1,9	AT5G20380	transporter-related	78,86 (67,77 to 90,46)	146,6 (135,9 to 163,1)

1,9	AT2G24820	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	244,1 (204,7 to 293,5)	449,9 (421,9 to 464,8)
1,9	AT2G33250	expressed protein	142,1 (136,2 to 150,8)	264,7 (247,3 to 298,5)
1,9	AT5G06980	expressed protein	109,4 (100,5 to 113,8)	202,8 (186,7 to 224,2)
1,8	AT4G11570	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	303,9 (292,4 to 317,5)	562,8 (497,6 to 638,8)
1,8	AT5G10380	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	48,65 (44,55 to 55,19)	89,61 (77,74 to 99,95)
1,8	AT4G33660	expressed protein	296,8 (290,1 to 305,3)	547,3 (502,8 to 627,6)
1,8	AT2G36460	fructose-bisphosphate aldolase, putative	234,1 (208,9 to 258,8)	428,3 (422,2 to 437,5)
1,8	AT2G37240	expressed protein	170,7 (150,2 to 181,4)	312,3 (290,6 to 338,1)
1,8	AT2G36950	heavy-metal-associated domain-containing protein	260,5 (234 to 301,2)	473,7 (462,7 to 490,3)
1,8	AT4G25780	pathogenesis-related protein, putative	43,05 (38,99 to 46,34)	78,64 (67,02 to 84,55)
1,8	AT2G25450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	1.737 (1.368 to 2.214)	3.097 (2.786 to 3.266)
1,8	AT1G62180	5'-adenylylsulfate reductase 2, chloroplast (APR2) (APSR) / adenosine 5'-phosphosulfate 5'-adenylylsulfate (APS) sulfotransferase 2 / 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) reductase homolog 43 (PRH-43)	691,4 (546,4 to 781,7)	1.236 (1.199 to 1.296)
1,8	AT3G17800	expressed protein	386,9 (377 to 392,7)	706,4 (577,1 to 779,3)
1,8	AT1G56010	transcription activator NAC1 (NAC1)	28,57 (20,72 to 33,24)	50,7 (45,62 to 55,61)
1,8	AT4G34350	LytB family protein	1.001 (979,5 to 1.031)	1.806 (1.666 to 1.878)
1,8	AT2G28190	superoxide dismutase (Cu-Zn), chloroplast (SODCP) / copper/zinc superoxide dismutase (CSD2)	153,5 (142,8 to 168,3)	278 (235,6 to 314,3)
1,8	AT1G74930	AP2 domain-containing transcription factor, putative	7,055 (6,6 to 7,719)	13,33 (9,82 to 19,63)
1,8	AT3G14690	cytochrome P450, putative	285,3 (263,8 to 319,8)	511,6 (457,2 to 549,2)
1,8	AT1G21410	F-box family protein	107,7 (96,64 to 119,7)	192,6 (188,9 to 197,6)
1,8	AT1G64980	expressed protein	236,3 (197,4 to 269,2)	421,2 (382,9 to 453,2)
1,8	AT3G07700	ABC1 family protein	111,5 (96,57 to 122,3)	199,1 (187,1 to 220,3)
1,8	AT5G49520	WRKY family transcription factor	22,93 (20,8 to 25,02)	41,35 (33,13 to 47,14)
1,8	AT1G06040	zinc finger (B-box type) family protein / salt-tolerance protein (STO)	500 (448,3 to 580,8)	894,4 (764,8 to 987,7)
1,8	AT2G22360	DNAJ heat shock family protein	93,71 (79,89 to 103,6)	166,5 (159,1 to 174)
1,8	AT1G73750	expressed protein	84,86 (72,78 to 105,5)	149,4 (141 to 155,1)
1,8	AT3G25410	bile acid	108 (94,07 to 120,7)	191,1 (187,5 to 196,6)
1,8	AT1G68670	myb family transcription factor	173,7 (160,6 to 185,3)	309,9 (265,3 to 344,2)
1,8	AT5G66740	hypothetical protein	4,235 (3,869 to 4,75)	7,639 (5,733 to 9,553)
1,8	AT2G23670	expressed protein	307,1 (291,9 to 322,2)	544,3 (498,4 to 581,8)
1,8	AT1G62290	aspartyl protease family protein	70,6 (62,59 to 78,05)	124,5 (110 to 140,3)
1,8	AT4G34630	expressed protein	153,8 (146,4 to 159,4)	272,1 (244,7 to 306,6)
1,8	AT5G57785	expressed protein	364,8 (332,1 to 390,4)	639,2 (614,2 to 676)
1,8	AT3G13062	expressed protein	176,3 (162,2 to 186,4)	311,3 (260,2 to 356)
1,8	AT3G21720	isocitrate lyase, putative	6,304 (6,134 to 6,503)	11,34 (8,035 to 13,9)
1,7	AT2G34460	flavin reductase-related	331,5 (298,7 to 361,3)	575,6 (547,6 to 606,9)

1,7	AT1G22850	expressed protein	449,2 (412,3 to 521,9)	775,9 (750,3 to 826,9)
1,7	AT2G15050	lipid transfer protein, putative	300,1 (272,1 to 345,3)	519 (486 to 574,7)
1,7	AT1G04350	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	208,5 (199 to 214,2)	362,6 (287 to 402,6)
1,7	AT1G71040	multi-copper oxidase type I family protein	189,8 (177,5 to 211,4)	326,7 (283,4 to 351,6)
1,7	AT2G04039	expressed protein	335,9 (306,9 to 357,6)	575,6 (551,1 to 601)
1,7	AT2G26080	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative / glycine decarboxylase, putative / glycine cleavage system P-protein, putative	1.365 (1.248 to 1.513)	2.335 (2.057 to 2.581)
1,7	AT3G02910	expressed protein	116,5 (98,39 to 139,7)	196,5 (194,6 to 197,8)
1,7	AT1G42540	glutamate receptor family protein (GLR3.3)	53,49 (44,92 to 58,15)	90,61 (83,6 to 97,76)
1,7	AT3G19450	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	155,9 (127,4 to 171,2)	259,4 (226,3 to 281,7)
1,7	AT5G13770	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	318,6 (295,1 to 334,2)	530,4 (469,2 to 582,9)
1,7	AT5G02810	pseudo-response regulator 7 (APRR7)	166,4 (145,6 to 181,7)	274,8 (263,5 to 288,1)
1,7	AT3G26510	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	360,4 (314,6 to 393,9)	597,2 (520,4 to 665,9)
1,7	AT3G48000	aldehyde dehydrogenase (ALDH2)	997,8 (947,6 to 1.063)	1.647 (1.555 to 1.737)
1,7	AT4G13010	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	357,8 (310,3 to 422,6)	585,2 (571,5 to 603,3)
1,6	AT5G15910	dehydrogenase-related	117,7 (110,4 to 122,1)	193,2 (188,8 to 198,1)
1,6	AT1G19700	homeobox-leucine zipper family protein	29,68 (26,05 to 34,13)	48,33 (47,62 to 49,41)
1,6	AT4G36530	hydrolase, alpha/beta fold family protein	267,1 (252,3 to 291,2)	437 (429,1 to 446,8)
1,6	AT1G23740	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	645,4 (570,7 to 711)	1.067 (853,6 to 1.221)
1,6	AT4G15430	early-responsive to dehydration protein-related / ERD protein-related	10,78 (10,19 to 11,72)	17,9 (14,59 to 22,26)
1,6	AT2G19310	expressed protein	115,8 (105,3 to 123,2)	189 (182,5 to 193,7)
1,6	AT4G24050	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	14,62 (14,33 to 15,1)	23,89 (21,45 to 25,51)
1,6	AT5G52420	expressed protein	86,6 (83,95 to 88,85)	141,7 (121,6 to 162,2)
1,6	AT5G15450	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative	361,7 (315,6 to 393,4)	586,7 (543,7 to 624,4)
1,6	AT5G19855	expressed protein	154,9 (136 to 177,4)	249,2 (230,8 to 265,6)
1,6	AT2G21330	fructose-bisphosphate aldolase, putative	1.795 (1.675 to 1.979)	2.883 (2.764 to 3.066)
1,6	AT1G72680	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	141,1 (133,9 to 147,4)	226,1 (207,4 to 243,8)
1,6	AT1G10960	ferredoxin, chloroplast, putative	2.331 (2.071 to 2.497)	3.725 (3.292 to 4.113)
1,6	AT2G02810	UDP-galactose/UDP-glucose transporter	45,03 (44,04 to 45,82)	71,98 (64,08 to 77,19)
1,6	AT4G35250	vestitone reductase-related	653,4 (574,6 to 709,7)	1.042 (935,5 to 1.182)
1,6	AT4G18810	expressed protein	123,3 (113,9 to 136,3)	196,1 (179,3 to 209,1)
1,6	AT1G16720	expressed protein	571,4 (519,2 to 648,3)	908 (774,2 to 975,1)
1,6	AT2G40140	zinc finger (CCCH-type) family protein	98,67 (75,22 to 114,3)	154,5 (137,7 to 173,6)
1,6	AT2G35940	homeodomain-containing protein	74,95 (66,8 to 84,93)	118,3 (107,8 to 127,9)
1,6	AT2G38530	nonspecific lipid transfer protein 2 (LTP2)	1.419 (1.322 to 1.495)	2.254 (2.085 to 2.578)
1,6	AT1G17100	SOUL heme-binding family protein	501,5 (488,6 to 521,8)	794,9 (714,1 to 920,5)
1,6	AT1G75460	ATP-dependent protease La (LON) domain-containing protein	340,4 (316,2 to 364,7)	536,3 (472,5 to 570,1)

1,6	AT1G32220	expressed protein	374,7 (353,8 to 389,4)	589,2 (549,5 to 618)
1,6	AT1G08570	thioredoxin family protein	212,5 (206 to 218,8)	331,5 (312,4 to 368,4)
1,5	AT5G49910	heat shock protein 70 / HSP70 (HSC70-7)	554,2 (529 to 593,4)	857,7 (786,5 to 907,2)
1,5	AT3G07430	YGGT family protein	516,5 (485,9 to 542,6)	799,3 (781,2 to 814,3)
1,5	AT5G62140	expressed protein	81,49 (71,12 to 88,93)	125,6 (120,1 to 134,6)
1,5	AT3G19480	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, putative / 3-PGDH, putative	103,5 (99,03 to 108,1)	159,9 (144,4 to 180)
1,5	AT3G48690	expressed protein	484,1 (433,6 to 537,9)	745,9 (665,3 to 798,3)
1,5	AT3G54900	CAX-interacting protein 1 (CAXIP1)	364,1 (335,4 to 407,8)	559,2 (519,2 to 597,4)
1,5	AT1G73650	expressed protein	211,6 (206,9 to 218,2)	321 (311 to 327)
1,5	AT1G50250	cell division protein ftsH homolog 1, chloroplast (FTSH1) (FTSH)	820,1 (799,1 to 837,6)	1.225 (1.157 to 1.338)
1,5	AT2G26800	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative / 3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA lyase, putative / HMG-CoA lyase, putative	142,4 (122,4 to 153,3)	210,4 (198,3 to 217,5)
1,5	AT3G54660	glutathione reductase, chloroplast	550,6 (498,3 to 609,5)	811,7 (687,3 to 891,4)
1,5	AT5G13630	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH)	3.370 (3.076 to 3.618)	4.944 (4.879 to 5.037)
1,5	AT1G35420	dienelactone hydrolase family protein	283 (279,1 to 286,3)	412,7 (395,4 to 422,9)
1,4	AT3G54090	pfkB-type carbohydrate kinase family protein	356,9 (304,2 to 407,2)	512,4 (502,4 to 520,7)
1,4	AT1G01320	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	628,8 (617 to 636,8)	910,5 (842,3 to 952,6)
1,4	AT2G31400	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	698 (665,2 to 723)	1.006 (916,3 to 1.121)
1,4	AT3G51600	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	2.280 (2.169 to 2.459)	3.272 (3.083 to 3.444)
1,4	AT1G14345	expressed protein	512,2 (504,2 to 526)	720,7 (701,7 to 742,1)
1,4	AT3G22120	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.610 (2.407 to 2.795)	3.661 (3.473 to 3.802)
1,4	AT1G11910	aspartyl protease family protein	2.793 (2.287 to 3.279)	3.793 (3.641 to 3.934)
1,4	AT4G28660	photosystem II reaction centre W (PsbW) family protein	623,8 (597,8 to 675,7)	855,1 (811,6 to 910,2)
1,4	AT1G24020	Bet v I allergen family protein	1.393 (1.278 to 1.519)	1.906 (1.720 to 2.196)
1,4	AT4G39330	mannitol dehydrogenase, putative	604,1 (585,4 to 639,2)	817,9 (776,2 to 884,2)
1,3	AT1G36320	expressed protein	427,5 (419 to 431,9)	575,1 (547 to 593,5)
1,3	AT4G39730	lipid-associated family protein	1.036 (929 to 1.106)	1.387 (1.207 to 1.520)
1,3	AT5G02120	thylakoid membrane one helix protein (OHP)	1.156 (1.107 to 1.208)	1.539 (1.436 to 1.613)
1,3	AT3G01120	cystathionine gamma-synthase, chloroplast / O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase (CGS)	1.719 (1.607 to 1.840)	2.268 (2.154 to 2.380)
1,3	AT5G23060	expressed protein	1.823 (1.708 to 2.015)	2.395 (2.337 to 2.476)
1,3	AT2G30950	FtsH protease (VAR2)	3.601 (3.500 to 3.691)	4.721 (4.365 to 5.133)
1,3	AT5G02500	heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1) (HSP70-1)	5.730 (5.573 to 5.969)	7.338 (7.077 to 7.600)

Tab. 9: Liste der in der *vfb1-1vfb2-1vfb3-1vfb4*(RNAi) Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Col) herabregulierten Gene

Fold Repression	Genidentität	Beschreibung	Wildtyp (min to max)	<i>vfb</i> Mutante (<i>min to max</i>)
11,46	AT5G24240	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin family protein	83,1 (75,12 to 96,5)	7,259 (6,086 to 7,949)
10,43	AT4G32280	auxin-responsive AUX/IAA family protein	94,76 (54,55 to 130,2)	8,632 (7,184 to 10,23)
8,39	AT5G12050	expressed protein	483,2 (361,4 to 562,8)	56,73 (51,11 to 61,31)
7,26	AT5G62280	expressed protein	234,2 (185,9 to 284,9)	31,76 (31,42 to 31,93)
6,47	AT2G42870	expressed protein	151 (128,7 to 174)	23,73 (17,28 to 29,45)
5,67	AT3G45860	receptor-like protein kinase, putative	163,9 (132 to 217,2)	28,56 (24,87 to 35,31)
5,04	AT1G22740	Ras-related protein (RAB7) / AtRab75 / small GTP-binding protein, putative	259,2 (246,1 to 270,4)	52,95 (38,3 to 69,61)
4,89	AT3G50080	F-box family protein (FBL16)	43,11 (42,02 to 44,33)	8,833 (8,2 to 9,385)
4,66	AT5G57760	expressed protein	61,4 (59,79 to 62,37)	13,41 (10,11 to 15,98)
4,64	AT3G04210	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	271,4 (204,1 to 376,1)	57,06 (46,12 to 64,41)
4,56	AT4G16780	homeobox-leucine zipper protein 4 (HAT4) / HD-ZIP protein 4	93,83 (76,55 to 109,7)	21,22 (14,68 to 29,38)
4,50	AT2G28085	auxin-responsive family protein	45,39 (41,41 to 47,77)	10,15 (8,866 to 11,82)
4,37	AT1G49860	glutathione S-transferase, putative	165,4 (153,7 to 182,1)	38,05 (32,44 to 44,88)
4,36	AT1G29395	stress-responsive protein, putative	94,12 (90,8 to 96,68)	22,95 (12,93 to 29,59)
4,28	AT5G02760	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein	447,7 (288,1 to 549,5)	102,2 (79,51 to 119,7)
3,88	AT3G59350	serine/threonine protein kinase, putative	469,9 (390 to 549,4)	121,9 (100,7 to 152,6)
3,86	AT3G22231	expressed protein	4.210 (3.852 to 4.459)	1.115 (883,5 to 1.461)
3,83	AT2G47880	glutaredoxin family protein	72,43 (52,6 to 97,28)	18,61 (14,43 to 22,17)
3,81	AT1G79700	ovule development protein, putative	155,8 (130,1 to 187)	43,18 (24,12 to 59,28)
3,76	AT3G21550	expressed protein	74,79 (67,68 to 83,85)	20,84 (12,31 to 25,73)
3,72	AT4G02290	glycosyl hydrolase family 9 protein	260,2 (175,1 to 318,5)	67,82 (64,34 to 70,36)
3,71	AT4G31800	WRKY family transcription factor	186,3 (99,92 to 283)	46,83 (40,52 to 59,39)
3,69	AT4G08950	phosphate-responsive protein, putative (EXO)	1.182 (773,9 to 1.766)	319,2 (188,2 to 435,9)
3,67	AT2G14560	expressed protein	337 (268,3 to 394,1)	91,15 (79,44 to 97,22)
3,55	AT2G16060	non-symbiotic hemoglobin 1 (HB1) (GLB1)	173,4 (151,5 to 185)	49,78 (37,98 to 63,66)
3,51	AT1G28330	dormancy-associated protein, putative (DRM1)	1.277 (1.225 to 1.336)	391,3 (224,6 to 580,3)
3,50	AT3G45970	expansin family protein (EXPL1)	932,3 (757,2 to 1.153)	273,8 (185,4 to 375,4)
3,48	AT4G14400	ankyrin repeat family protein	471,3 (360,9 to 539,9)	134,9 (109,5 to 156,4)
3,48	AT3G19680	expressed protein	230,7 (171,4 to 331,3)	74,97 (31,94 to 132,5)
3,47	AT3G23550	MATE efflux family protein	184,2 (134,6 to 267,7)	53,11 (37,35 to 77,15)
3,47	AT2G34510	expressed protein	685 (586,1 to 869,2)	201,2 (149,9 to 279,6)
3,43	AT1G52820	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	22,54 (15,7 to 35,06)	6,168 (5,619 to 7,213)
3,42	AT4G14060	major latex protein-related / MLP-related	100,7 (81,24 to 119)	29,15 (27,11 to 32,13)

3,35	AT1G78970	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	181,3 (167 to 195,4)	54,26 (50,05 to 60,57)
3,34	AT1G26820	ribonuclease 3 (RNS3)	53,92 (46,01 to 66,61)	16,32 (12,96 to 21,5)
3,29	AT2G34770	fatty acid hydroxylase (FAH1)	714,2 (654,9 to 811,2)	219,9 (174,8 to 275)
3,28	AT2G33570	expressed protein	216,6 (202,7 to 226,6)	66,1 (58,9 to 71,55)
3,27	AT3G15540	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 19 (IAA19)	109,2 (103,3 to 115,9)	33,6 (27,75 to 37,8)
3,26	AT4G34770	auxin-responsive family protein	65,48 (56,96 to 77,05)	20,46 (15,62 to 26,81)
3,19	AT2G44500	expressed protein	162,6 (153 to 181,5)	52,96 (36,12 to 72,52)
3,15	AT3G58120	bZIP transcription factor family protein	427,4 (391 to 446)	139,5 (99,5 to 180,7)
3,14	AT1G49230	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	74,81 (70,23 to 79,4)	23,84 (21,83 to 24,97)
3,11	AT5G37990	S-adenosyl-L-methionine	313,6 (262,5 to 358,6)	100,4 (92,58 to 114,8)
3,07	AT2G42580	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	486,5 (447,3 to 518,2)	158,6 (143,9 to 168,6)
3,06	AT2G17230	phosphate-responsive 1 family protein	556,3 (459,6 to 714,3)	185,6 (132,7 to 260,6)
3,05	AT3G13784	beta-fructosidase, putative / beta-fructofuranosidase, putative / cell wall invertase, putative	24,16 (18,99 to 30,26)	7,807 (7,28 to 8,769)
3,04	AT1G69230	expressed protein	67,36 (57,94 to 83,67)	22,11 (18,88 to 26,69)
2,99	AT4G07400	F-box family protein (FBL8) (FBL24)	20,73 (17,76 to 23,51)	6,984 (5,5 to 8,352)
2,99	AT2G31010	protein kinase family protein	73,52 (60,13 to 86,96)	24,41 (22,1 to 27,06)
2,98	AT4G28085	expressed protein	75,29 (53,85 to 106,8)	25,5 (15,23 to 33,58)
2,98	AT2G26560	patatin, putative	207,9 (170,1 to 275,5)	69,23 (55,59 to 86,71)
2,98	AT4G38400	expansin family protein (EXPL2)	53,47 (46,56 to 63,42)	18,14 (15,11 to 23,3)
2,97	AT1G04240	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 3 (IAA3)	198,6 (171,9 to 243,3)	66,2 (63,8 to 68,37)
2,94	AT5G51550	phosphate-responsive 1 family protein	2.066 (1.937 to 2.321)	717,9 (554,1 to 942,9)
2,92	AT1G43790	expressed protein	170 (136 to 203,3)	57,65 (51,53 to 62,64)
2,92	AT1G52290	protein kinase family protein	140,6 (111,2 to 186,5)	47,69 (39,76 to 59,6)
2,90	AT4G13280	terpene synthase/cyclase family protein	35,66 (27,96 to 42,83)	12,17 (11,26 to 13,55)
2,88	AT1G22330	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	102,9 (91,09 to 115,7)	35,52 (34,68 to 37,1)
2,87	AT5G47370	homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2) / HD-ZIP protein 2	237,9 (187,9 to 273,2)	82,06 (74,25 to 86,45)
2,86	AT1G64360	expressed protein	103,3 (84,34 to 122,1)	36,18 (28,5 to 43)
2,86	AT3G47340	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)	820,1 (615,3 to 1.072)	288,2 (193,8 to 348,6)
2,84	AT2G41090	calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22)	2.582 (2.437 to 2.717)	913,8 (783,7 to 1.046)
2,84	AT5G61660	glycine-rich protein	612,2 (560,6 to 654,4)	216,1 (186,4 to 236,2)
2,83	AT3G06370	sodium proton exchanger, putative (NHX3)	22,07 (20 to 23,89)	7,775 (7,306 to 8,08)
2,83	AT1G03870	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA9)	1.494 (1.433 to 1.615)	536 (415,9 to 641,6)
2,81	AT4G35320	expressed protein	58,38 (51,32 to 66,12)	20,9 (17,62 to 25,48)
2,81	AT5G44680	methyladenine glycosylase family protein	1.577 (1.490 to 1.745)	570,8 (481,5 to 732,4)

2,79	AT1G17430	hydrolase, alpha/beta fold family protein	78,04 (75,32 to 82,09)	28,49 (21,63 to 34,85)
2,78	AT5G23210	serine carboxypeptidase S10 family protein	453 (364,1 to 555,9)	162,2 (141,9 to 196,9)
2,77	AT3G62040	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	208,3 (200,9 to 215)	75,45 (66,34 to 84,19)
2,76	AT1G67865	expressed protein	1.476 (1.328 to 1.767)	533,8 (453,4 to 616,4)
2,75	AT2G32160	expressed protein	53,8 (46,92 to 65,28)	20,75 (11,41 to 28,43)
2,74	AT3G50650	scarecrow-like transcription factor 7 (SCL7)	57,11 (52,17 to 60,53)	20,89 (17,83 to 22,76)
2,73	AT1G11260	glucose transporter (STP1)	1.493 (1.453 to 1.533)	577,2 (348,4 to 786)
2,72	AT1G21250	wall-associated kinase 1 (WAK1)	436,3 (382,2 to 523,4)	162,2 (134,3 to 211,5)
2,71	AT5G12940	leucine-rich repeat family protein	84,36 (76,67 to 99,64)	32,41 (24,25 to 47,16)
2,71	AT3G05490	rapid alkalization factor (RALF) family protein	558,8 (412,1 to 746,1)	209,1 (148,6 to 296)
2,70	AT3G62680	proline-rich family protein	41,21 (35,17 to 52,48)	15,11 (12,48 to 17,33)
2,70	AT2G30210	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	98,11 (69,15 to 136,3)	35,66 (26,57 to 44,69)
2,70	AT5G58670	phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC1)	61,22 (53,29 to 74,83)	22,51 (19,64 to 24,42)
2,68	AT5G59670	leucine-rich repeat protein kinase, putative	28,9 (23,17 to 32,2)	10,84 (8,459 to 13)
2,68	AT4G19690	iron-responsive transporter (IRT1)	146,9 (110,4 to 165,9)	55,66 (38,21 to 71,56)
2,67	AT5G52390	photoassimilate-responsive protein, putative	52,1 (39,6 to 63,62)	19,87 (12,98 to 25,05)
2,67	AT1G22335	expressed protein	159,5 (145 to 182,4)	59,73 (53,65 to 65,09)
2,67	AT1G06830	glutaredoxin family protein	92,95 (77,59 to 106,5)	35,32 (27,47 to 45,17)
2,66	AT5G03260	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	32,17 (28,33 to 38,73)	12,13 (10,68 to 14,85)
2,65	AT2G30930	expressed protein	737,7 (597,9 to 904,8)	278,3 (213,8 to 327,4)
2,65	AT1G64640	plastocyanin-like domain-containing protein	142,9 (131,7 to 159,1)	54,69 (41,86 to 63,17)
2,63	AT2G28780	expressed protein	42,65 (38,32 to 46,48)	16,22 (14,26 to 17,86)
2,60	AT4G35350	cysteine endopeptidase, papain-type (XCP1)	158,4 (138,6 to 177,5)	60,78 (54,1 to 64,97)
2,60	AT3G45160	expressed protein	1.021 (957,7 to 1.120)	393,1 (363,8 to 434,9)
2,59	AT1G65310	xyloglucan	59,11 (52,88 to 67,11)	22,85 (19,78 to 26,07)
2,59	AT1G18400	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	40,21 (37,73 to 42,31)	15,56 (14,1 to 16,38)
2,58	AT4G20230	terpene synthase/cyclase family protein	45,98 (37,86 to 50,8)	17,8 (14,94 to 20,28)
2,58	AT3G46490	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	84,79 (82,55 to 86,97)	32,97 (30,65 to 34,16)
2,57	AT1G59710	expressed protein	112,7 (106,5 to 122,9)	43,85 (39,8 to 48,48)
2,57	AT5G65390	arabinogalactan-protein (AGP7)	280,2 (253,2 to 305,8)	110 (94,63 to 131,5)
2,56	AT1G66940	protein kinase-related	535,5 (463,1 to 583,9)	209,1 (188,5 to 237,3)
2,56	AT5G01930	(1-4)-beta-mannan endohydrolase, putative	25,41 (22,98 to 27,5)	10,05 (7,824 to 11,92)
2,56	AT4G03210	xyloglucan	3.058 (2.889 to 3.283)	1.212 (1.011 to 1.501)
2,55	AT4G37770	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, putative / ACC synthase, putative	21,71 (20,19 to 22,81)	8,5 (8,478 to 8,545)
2,55	AT1G19530	expressed protein	41,97 (31,34 to 53,04)	16,11 (15,5 to 16,44)
2,54	AT2G32860	glycosyl hydrolase family 1 protein	321 (301,3 to 336,6)	126,7 (117,8 to 141,6)
2,53	AT4G11190	disease resistance-responsive family protein / dirigent family	135,6 (132,2 to 137,6)	53,97 (48,22 to 62,61)

		protein		
2,53	AT2G31000	hypothetical protein predicted by genefinder	22,26 (18,98 to 24,16)	8,758 (8,704 to 8,859)
2,53	AT4G17460	homeobox-leucine zipper protein 1 (HAT1) / HD-ZIP protein 1	473,5 (389,1 to 609,6)	191,2 (123 to 239,7)
2,52	AT2G21100	disease resistance-responsive protein-related / dirigent protein-related	36,02 (29,51 to 42,56)	14,2 (12,42 to 15,71)
2,52	AT1G76800	nodulin, putative	32,62 (29,43 to 36)	13,03 (10,73 to 14,84)
2,52	AT1G02640	glycosyl hydrolase family 3 protein	269,6 (250,4 to 289,7)	109,4 (78,45 to 127,9)
2,51	AT1G21270	wall-associated kinase 2 (WAK2)	220,2 (168,3 to 278)	85,89 (82,07 to 89,64)
2,49	AT2G42530	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	802,6 (705 to 924,7)	332,1 (225,5 to 432,6)
2,48	AT5G54380	protein kinase family protein	335 (296,7 to 369,6)	135,9 (109,3 to 159,8)
2,48	AT4G03190	F-box family protein (FBL18)	247,2 (219,1 to 280,2)	99,22 (94,58 to 107,2)
2,48	AT2G42610	expressed protein	116,6 (112,3 to 122,7)	47,08 (43,36 to 52,25)
2,48	AT5G44400	FAD-binding domain-containing protein	326,3 (282,7 to 395,3)	130,7 (119,7 to 141,3)
2,47	AT1G25230	purple acid phosphatase family protein	662,8 (592,9 to 710,3)	270,9 (213,4 to 313,7)
2,47	AT1G14920	gibberellin response modulator (GAI) (RGA2) / gibberellin-responsive modulator	432,5 (366,1 to 488,6)	176,4 (141,2 to 210,5)
2,47	AT1G67870	glycine-rich protein	703,1 (651,4 to 741,1)	287,1 (239,1 to 322,7)
2,47	AT5G56080	nicotianamine synthase, putative	94,91 (76,02 to 108,1)	38,08 (37,68 to 38,34)
2,46	AT5G62360	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	246,5 (203,2 to 313)	100,4 (73,79 to 116,7)
2,46	AT1G22530	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	648,4 (559,2 to 770,4)	265,3 (204,5 to 316,7)
2,45	AT3G01670	expressed protein	142,9 (130 to 154,8)	58,48 (51,01 to 65,5)
2,44	AT5G07080	transferase family protein	31,75 (27,03 to 34,77)	13,07 (10,49 to 15,45)
2,44	AT5G48900	pectate lyase family protein	281,9 (244,2 to 301,3)	115,4 (102,7 to 125,4)
2,44	AT3G23030	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 2 (IAA2)	1.109 (1.015 to 1.264)	454 (414,2 to 490,5)
2,43	AT5G15160	bHLH family protein	106 (87,3 to 121,4)	43,22 (40,07 to 46,33)
2,43	AT4G22160	expressed protein	37,2 (34,8 to 40,02)	15,71 (10,69 to 18,49)
2,43	AT1G13420	sulfotransferase family protein	25,2 (21,5 to 32,56)	10,18 (9,819 to 10,37)
2,41	AT2G16660	nodulin family protein	405 (307,8 to 455,6)	165,5 (153,1 to 180,6)
2,40	AT5G15580	expressed protein	164,6 (139,4 to 179,7)	68,62 (60,23 to 78,22)
2,40	AT3G21770	peroxidase 30 (PER30) (P30) (PRXR9)	265,5 (246,9 to 299,5)	110,7 (99,47 to 117,6)
2,40	AT3G05890	hydrophobic protein (RCI2B) / low temperature and salt responsive protein (LTI6B)	402,9 (347,6 to 433,5)	170,2 (135,5 to 212,2)
2,39	AT3G29370	expressed protein	54,02 (47,59 to 65,86)	22,31 (21,95 to 22,75)
2,39	AT5G63560	transferase family protein	40,37 (34,35 to 48,35)	17,19 (11,78 to 20,51)
2,39	AT4G26070	mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) (MKK1) (MEK1)	130,2 (124,9 to 136,3)	54,83 (47,65 to 61,08)
2,37	AT2G47440	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	745,7 (704,6 to 812)	317 (283,6 to 379,2)

2,36	AT3G07010	pectate lyase family protein	189,1 (185,5 to 194,2)	81,14 (67,69 to 100,9)
2,36	AT1G61100	disease resistance protein (TIR class), putative	311,1 (281,2 to 351,6)	131,9 (115,4 to 150,4)
2,36	AT1G08430	expressed protein	80,35 (76,42 to 83,8)	34,5 (27,2 to 39,87)
2,36	AT4G36610	hydrolase, alpha/beta fold family protein	28,46 (23,18 to 38,42)	11,75 (10,96 to 12,68)
2,36	AT1G29500	auxin-responsive protein, putative	165,1 (146,7 to 201)	69,71 (59,58 to 76,61)
2,35	AT1G64330	myosin heavy chain-related	139,6 (127,9 to 151,4)	60,26 (45,7 to 71,41)
2,34	AT4G16515	expressed protein	175,7 (166,7 to 190,8)	78,1 (50,77 to 101,5)
2,33	AT1G08500	plastocyanin-like domain-containing protein	47,62 (41,9 to 54,64)	20,36 (18,69 to 21,68)
2,33	AT1G08930	early-responsive to dehydration stress protein (ERD6) / sugar transporter family protein	976,4 (729 to 1.317)	419,9 (289,6 to 538,5)
2,33	AT5G67480	TAZ zinc finger family protein / BTB/POZ domain-containing protein	1.418 (1.318 to 1.617)	617,9 (477,7 to 761,9)
2,32	AT1G73830	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	142,8 (136 to 151,7)	61,67 (57,18 to 67,49)
2,32	AT4G25260	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	146,7 (133,9 to 168,7)	63,11 (56,31 to 67,26)
2,32	AT1G29440	auxin-responsive family protein	91,05 (63,75 to 118,8)	38,24 (34,9 to 43,61)
2,32	AT1G20450	dehydrin (ERD10)	821,8 (677,1 to 1.039)	351,5 (315,8 to 414,8)
2,32	AT2G06850	xyloglucan	4.020 (3.945 to 4.058)	1.743 (1.588 to 1.986)
2,31	AT5G47990	cytochrome P450 family protein	138,4 (115,4 to 172,9)	59,39 (49,17 to 66,56)
2,31	AT3G12920	expressed protein	260,7 (237,8 to 284)	112,8 (105,2 to 128,1)
2,30	AT4G29270	acid phosphatase class B family protein	148,2 (119 to 168,7)	63,84 (58,81 to 68,14)
2,29	AT1G28290	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	2.754 (2.613 to 3.030)	1.199 (1.169 to 1.216)
2,29	AT4G12550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	417,5 (394,1 to 456,5)	183,8 (153 to 207)
2,29	AT2G44740	cyclin family protein	35,41 (29,27 to 39,69)	15,5 (13,17 to 18,16)
2,27	AT3G59900	expressed protein	40,57 (33,95 to 49,62)	17,74 (15,68 to 19,12)
2,26	AT5G42900	expressed protein	308,4 (271,4 to 361)	136,2 (116,9 to 153,5)
2,26	AT5G22580	expressed protein	622,5 (542,7 to 704,3)	274,3 (249,9 to 291)
2,26	AT4G01390	meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	121,1 (116,9 to 127,7)	56,04 (35,12 to 72,46)
2,25	AT4G25940	epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein	59,49 (51,39 to 68,75)	26,55 (20,9 to 30,64)
2,25	AT1G29450	auxin-responsive protein, putative	32,79 (26,1 to 36,32)	14,41 (13,91 to 15,16)
2,25	AT4G30410	expressed protein	152,2 (149,9 to 154,5)	67,67 (64,57 to 72,39)
2,25	AT1G52830	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 6 (IAA6)	21,39 (20,44 to 21,96)	9,579 (7,938 to 10,45)
2,25	AT3G57795	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 19033.	131,8 (129,5 to 134,6)	58,58 (57,8 to 59,89)
2,25	AT2G21200	auxin-responsive protein, putative	16,64 (15,88 to 17,89)	7,394 (7,133 to 7,703)
2,24	AT2G46330	arabinogalactan-protein (AGP16)	2.383 (2.177 to 2.630)	1.070 (920,6 to 1.288)
2,24	AT2G40480	expressed protein	71,84 (65,78 to 82,19)	32,08 (27,3 to 35,67)

2,23	AT4G14560	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 1 (IAA1)	73,78 (62,95 to 83,6)	32,93 (31,08 to 34,74)
2,23	AT5G61590	AP2 domain-containing transcription factor family protein	1.926 (1.817 to 2.046)	874,6 (690,2 to 971,1)
2,22	AT4G19530	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	603,3 (572,6 to 634)	275 (225,4 to 336,9)
2,22	AT3G60320	expressed protein	882,3 (801,3 to 945,8)	396,6 (364,9 to 420,3)
2,22	AT4G26690	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	348 (307,1 to 382,5)	155,9 (152,6 to 160,5)
2,22	AT2G35880	expressed protein	321,9 (291,1 to 350,7)	144,7 (137,5 to 155,6)
2,22	AT1G52190	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	553,3 (502,7 to 596,7)	249,9 (224,8 to 284,2)
2,22	AT1G29510	auxin-responsive protein, putative	163,5 (139,3 to 191,9)	73,28 (66,68 to 81,61)
2,22	AT2G36570	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	58,86 (57,73 to 60,1)	26,73 (23,06 to 30,47)
2,21	AT5G44260	zinc finger (CCCH-type) family protein	59,25 (58,37 to 60,92)	27,52 (22,25 to 37,11)
2,21	AT1G66350	gibberellin regulatory protein (RGL1)	54,43 (46,4 to 62,1)	24,66 (20,4 to 27,15)
2,19	AT5G19530	spermine/spermidine synthase family protein	175,3 (166,5 to 185,6)	80,03 (72,24 to 86,25)
2,19	AT3G54260	expressed protein	569,3 (512,4 to 647)	259,4 (235,2 to 279,4)
2,19	AT2G15680	calmodulin-related protein, putative	84,49 (75,79 to 92,1)	38,53 (37,01 to 40,69)
2,19	AT1G44800	nodulin MtN21 family protein	555,9 (535,8 to 589)	255,6 (226,9 to 295,1)
2,18	AT1G32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	529,2 (492,5 to 568,5)	242,3 (224,5 to 255,7)
2,18	PSAA	PSI P700 apoprotein A1	2.159 (1.653 to 2.429)	982,7 (804 to 1.105)
2,18	AT5G08330	TCP family transcription factor, putative	650,9 (594,3 to 679,6)	298,5 (267 to 329)
2,18	AT5G03520	Ras-related GTP-binding protein, putative	908,2 (842,7 to 1.005)	417,1 (386,4 to 469,7)
2,17	AT1G04430	dehydration-responsive protein-related	1.384 (1.291 to 1.537)	635,5 (601,5 to 659)
2,17	AT1G20440	dehydrin (COR47)	1.406 (1.130 to 1.649)	648,4 (522,3 to 741,3)
2,15	AT2G23540	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	144,3 (122,2 to 159,4)	67,46 (55,72 to 79,06)
2,15	AT5G46330	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	70,03 (63,33 to 73,49)	32,55 (31,06 to 33,61)
2,15	AT1G07000	exocyst subunit EXO70 family protein	112,2 (95,88 to 131,8)	51,85 (50,45 to 52,55)
2,14	AT1G14290	acid phosphatase, putative	185,8 (179,6 to 194,5)	86,72 (83,5 to 89,27)
2,14	AT3G02885	gibberellin-regulated protein 5 (GASA5) / gibberellin-responsive protein 5	209,3 (201,5 to 222,4)	97,66 (94,56 to 99,99)
2,14	AT5G22500	acyl CoA reductase, putative / male-sterility protein, putative	152 (145,5 to 162,1)	71,27 (64,88 to 80,22)
2,14	AT1G51940	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	386 (347,3 to 429,8)	180,5 (166,6 to 205)
2,14	AT1G69040	ACT domain containing protein (ACR4)	263 (237,4 to 299)	122,9 (111,5 to 137,8)
2,13	AT2G15040	pseudogene, disease resistance protein-related	22,1 (18,3 to 26,69)	10,62 (7,692 to 14,66)
2,13	AT3G53990	universal stress protein (USP) family protein	876,6 (777,1 to 981,3)	414,8 (369,7 to 503,2)
2,12	AT3G13980	expressed protein	81,51 (74,83 to 88,72)	38,32 (38,06 to 38,68)
2,12	AT4G31940	cytochrome P450, putative	41,07 (39,94 to 43,09)	19,64 (15,21 to 22)
2,12	AT3G28180	glycosyl transferase family 2 protein	358,4 (324,9 to 423,9)	169,4 (141,2 to 194,3)
2,11	AT5G10170	inositol-3-phosphate synthase, putative / myo-inositol-1-	79,52 (70,77 to 89,93)	38,12 (32,04 to 48,78)

		phosphate synthase, putative / MI-1-P synthase, putative		
2,11	AT5G03120	expressed protein	122 (114,8 to 131,8)	58,14 (52,32 to 69,29)
2,11	AT5G06690	thioredoxin family protein	402,9 (374,3 to 444,7)	190,9 (168,5 to 204,7)
2,11	AT5G06610	expressed protein	48,55 (43,95 to 55,44)	23,49 (17,89 to 30,91)
2,11	AT1G11545	xyloglucan	137,3 (116 to 157,7)	64,62 (61,89 to 69,93)
2,11	AT5G51890	peroxidase-related	233,5 (197,5 to 271,5)	110,6 (99,55 to 130,7)
2,11	AT1G14790	RNA-dependent RNA polymerase, putative	34,8 (31,45 to 38,04)	16,46 (15,92 to 16,98)
2,11	AT3G20570	plastocyanin-like domain-containing protein	129,3 (112,7 to 137,8)	61,21 (58,63 to 64,75)
2,10	AT1G30510	ferredoxin--NADP(+) reductase, putative / adrenodoxin reductase, putative	496,6 (465,8 to 536,5)	236,2 (221 to 254,4)
2,10	AT5G14450	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	207,7 (182,1 to 233,8)	98,86 (84,61 to 109,8)
2,10	AT3G62020	germin-like protein (GLP10)	63,77 (54,93 to 80,55)	30,46 (25,06 to 38,38)
2,08	AT1G69840	band 7 family protein	419,1 (306,8 to 546,6)	197 (175,5 to 227,3)
2,08	AT2G39850	subtilase family protein	261 (233,6 to 295,2)	127,6 (109,1 to 163,7)
2,07	AT5G62920	two-component responsive regulator / response regulator 6 (ARR6)	67,41 (51,42 to 83,27)	32,23 (26,34 to 37,56)
2,07	AT1G33700	expressed protein	63,15 (55,62 to 70,45)	30,64 (25,81 to 36,46)
2,07	AT3G27960	kinesin light chain-related	168,8 (154,8 to 178,6)	81,68 (72,06 to 86,92)
2,07	AT1G14240	nucleoside phosphatase family protein / GDA1/CD39 family protein	39,93 (36,46 to 42,63)	19,32 (17,95 to 20,58)
2,06	AT5G19600	sulfate transporter, putative	50,43 (46,92 to 56,33)	24,4 (22,58 to 26,36)
2,06	AT4G34760	auxin-responsive family protein	335,1 (310,8 to 352,2)	162,4 (151 to 170,3)
2,06	AT2G38080	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	58,33 (52,08 to 69)	28,22 (24,42 to 30,78)
2,06	AT2G40750	WRKY family transcription factor	69,95 (59,75 to 80,56)	34,13 (26,67 to 37,94)
2,06	AT4G00230	subtilisin-like serine endopeptidase (XSP1)	46,59 (42,26 to 52,83)	22,85 (19,06 to 28,17)
2,06	AT2G21660	glycine-rich RNA-binding protein (GRP7)	6.458 (6.005 to 7.076)	3.142 (2.839 to 3.308)
2,05	AT3G61210	embryo-abundant protein-related	266,1 (238,1 to 320)	128,7 (117 to 135,4)
2,05	AT1G17620	expressed protein	129,9 (102,4 to 151,3)	62,5 (58,11 to 65,24)
2,05	AT1G63310	expressed protein	53,45 (49,8 to 59,93)	26,07 (22,8 to 28,46)
2,05	AT1G14280	phytochrome kinase, putative	585,2 (552 to 628,2)	285,2 (268,8 to 307,1)
2,05	AT4G13340	leucine-rich repeat family protein / extensin family protein	111,1 (94,37 to 138,8)	54,08 (43,52 to 64,68)
2,05	AT1G11080	serine carboxypeptidase S10 family protein	130,8 (124,7 to 136,1)	64,27 (54,49 to 72,85)
2,04	AT3G61380	expressed protein	51,21 (47,33 to 57,24)	25,11 (21,5 to 27,65)
2,04	AT1G69080	universal stress protein (USP) family protein	39,39 (38,87 to 40,15)	19,37 (17,31 to 21,13)
2,04	AT4G30850	expressed protein	36,05 (31,77 to 39,9)	18 (13,82 to 23)
2,04	AT1G12990	glycosyl transferase family 17 protein	52,63 (46,87 to 57,28)	25,75 (25,32 to 26,02)
2,03	AT3G25930	universal stress protein (USP) family protein	97,35 (91,68 to 105)	48,04 (42,59 to 53,95)
2,03	AT3G62630	expressed protein	280,7 (266,9 to 296,1)	138,7 (125,1 to 156,2)

2,03	AT3G62660	glycosyl transferase family 8 protein	183,1 (170,3 to 198,1)	92,14 (71,46 to 119,9)
2,03	AT3G13650	disease resistance response	87,11 (79,38 to 97,99)	43,16 (38,49 to 51,57)
2,02	AT1G19540	isoflavone reductase, putative	30,18 (27,13 to 34,33)	14,98 (12,57 to 17,24)
2,02	AT4G30170	peroxidase, putative	204,6 (183,2 to 224,2)	102 (81,64 to 114,1)
2,02	AT5G65040	senescence-associated protein-related	77,91 (76,31 to 79,4)	38,86 (34,36 to 45,21)
2,02	AT1G35250	thioesterase family protein	50,56 (42,52 to 63,01)	24,84 (21,27 to 27,13)
2,02	AT4G04955	amidohydrolase family protein	53,2 (41,91 to 65,25)	26,54 (19,43 to 32,09)
2,01	AT1G23030	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing protein	233,3 (204,4 to 280,3)	116,8 (89,39 to 143,7)
2,01	AT5G43700	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 4 (IAA4) / auxin-induced protein (AUX2-11)	313,8 (249 to 366,3)	154,4 (146 to 167,7)
2,00	AT3G26460	major latex protein-related / MLP-related	48,95 (44,9 to 52,55)	24,44 (22,86 to 26,95)
2,00	AT3G54920	pectate lyase, putative / powdery mildew susceptibility protein (PMR6)	458,3 (446,6 to 471,7)	231,1 (197,5 to 269,7)
1,99	AT4G38850	auxin-responsive protein / small auxin up RNA (SAUR-AC1)	36,1 (30,1 to 47,38)	17,87 (15,27 to 21,24)
1,99	AT2G15960	expressed protein	1.943 (1.747 to 2.116)	979,7 (817,5 to 1.100)
1,99	AT4G30440	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	1.043 (982,2 to 1.131)	528,1 (473,7 to 633,9)
1,99	AT3G29410	terpene synthase/cyclase family protein	13,11 (10,25 to 15,99)	6,544 (5,247 to 7,216)
1,98	AT1G75500	nodulin MtN21 family protein	596,2 (571,1 to 627,7)	301,5 (272,2 to 328,6)
1,98	AT1G07880	mitogen-activated protein kinase, putative / MAPK, putative (MPK13)	45,33 (41,39 to 51,67)	22,91 (20,8 to 26,5)
1,97	AT3G16920	glycoside hydrolase family 19 protein	51,38 (44,41 to 62,39)	25,81 (24,02 to 27,95)
1,97	AT4G35470	leucine-rich repeat family protein	282,7 (254,4 to 316,2)	144,2 (116,4 to 160,6)
1,97	AT1G20850	cysteine endopeptidase, papain-type (XCP2)	488,4 (485,2 to 493,2)	249,1 (219,3 to 284,7)
1,97	AT3G12610	DNA-damage-repair/toleration protein, putative (DRT100)	501,7 (456,5 to 538,5)	254,3 (240,9 to 267,7)
1,97	AT3G44540	acyl CoA reductase, putative	53,98 (37,85 to 64)	26,9 (24 to 30,75)
1,97	AT2G35470	expressed protein	150,5 (128,2 to 179,2)	77,21 (64,75 to 99,24)
1,96	AT3G05900	neurofilament protein-related	310,2 (284,6 to 328,1)	158,2 (141,9 to 169,8)
1,95	AT4G19030	major intrinsic family protein / MIP family protein	62,87 (54,72 to 69,42)	32,11 (29,17 to 35,05)
1,95	AT1G12845	expressed protein	176,3 (165,7 to 188,4)	92,13 (68,74 to 107,4)
1,95	AT2G36410	expressed protein	230,5 (212,9 to 245,3)	118,5 (110 to 128)
1,95	AT1G04680	pectate lyase family protein	330 (314,8 to 349,5)	170,1 (153,9 to 188,7)
1,94	AT2G47200	expressed protein	40,21 (32,57 to 46,82)	20,46 (19,95 to 21)
1,94	AT5G37690	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	82,84 (69,84 to 95)	42,36 (41,22 to 44,6)
1,94	AT4G31820	phototropic-responsive NPH3 family protein	141,4 (124,2 to 161,2)	72,65 (64,77 to 79,03)
1,94	AT3G16180	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	202,2 (199,4 to 207,5)	105,1 (93,93 to 125,2)
1,94	AT2G38310	expressed protein	1.402 (1.250 to 1.674)	718,8 (636,7 to 781,8)
1,94	AT3G11700	beta-Ig-H3 domain-containing protein / fasciclin domain-containing protein	416,2 (400,2 to 425,5)	214,7 (210,4 to 219,9)

1,94	AT4G31730	expressed protein	77,24 (68,27 to 83,98)	39,8 (37,04 to 43,75)
1,94	AT3G06770	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	128,1 (120,3 to 137,5)	66,59 (59,01 to 79,22)
1,94	AT4G20780	calcium-binding protein, putative	65,67 (49,78 to 86,11)	33,32 (27,6 to 37,79)
1,94	AT3G02170	expressed protein	206,4 (189,6 to 215,6)	106,6 (99,21 to 114)
1,93	AT1G74670	gibberellin-responsive protein, putative	4.551 (4.228 to 5.038)	2.357 (2.166 to 2.510)
1,93	AT5G51350	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	96,86 (87,87 to 103,4)	50,62 (41,92 to 59,41)
1,93	AT2G18370	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	206,9 (163 to 243,3)	106,1 (97,95 to 112,8)
1,92	AT2G48030	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	89,24 (74,93 to 107,9)	45,96 (42,68 to 49,59)
1,92	AT3G14310	pectinesterase family protein	1.404 (1.318 to 1.546)	736,7 (623,3 to 897,1)
1,92	AT5G58860	cytochrome P450 86A1 (CYP86) (CYP86A1) / CYPLXXXVI / P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase	66,8 (58,06 to 83,55)	34,35 (31,4 to 37,8)
1,92	AT1G13210	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	73,92 (66,96 to 84,8)	38,57 (33,77 to 45,5)
1,92	AT2G47930	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	154,7 (139,7 to 167)	81,12 (71,79 to 98,24)
1,92	AT5G19340	expressed protein	49,99 (43,49 to 54,72)	26 (23,49 to 27,9)
1,92	AT4G15390	transferase family protein	279,8 (261,3 to 301,9)	145,8 (140,5 to 156,1)
1,91	AT1G02810	pectinesterase family protein	31,32 (27,23 to 35,11)	16,45 (13,26 to 18,27)
1,91	AT2G22830	squalene monooxygenase, putative / squalene epoxidase, putative	47,31 (43,86 to 53,67)	24,92 (20,13 to 29,35)
1,91	AT5G07030	aspartyl protease family protein	702,5 (659,3 to 754,4)	367,5 (355,8 to 373,8)
1,91	AT1G49750	leucine-rich repeat family protein	1.414 (1.352 to 1.466)	744,9 (645,2 to 833)
1,91	AT1G03820	expressed protein	183 (178,9 to 190,9)	96,92 (78,55 to 108,1)
1,90	AT5G42590	cytochrome P450 71A16, putative (CYP71A16)	17,47 (13,84 to 20,97)	9,156 (8,047 to 11,28)
1,90	AT2G28900	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein	2.761 (2.492 to 3.071)	1.452 (1.280 to 1.633)
1,90	AT1G02900	rapid alkalization factor (RALF) family protein	150,5 (129,7 to 167,2)	79,56 (66,54 to 95,39)
1,90	AT2G01420	auxin transport protein, putative	304,1 (292,4 to 318,9)	160,4 (151 to 176,4)
1,90	AT1G12080	expressed protein	94,52 (85,73 to 101,5)	50 (45,05 to 58,91)
1,90	AT5G11420	expressed protein	945,9 (856,2 to 1.005)	496,8 (485,6 to 516,4)
1,90	AT5G09520	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	38,42 (33,78 to 43,53)	20,38 (16,06 to 23,41)
1,90	AT5G23830	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein	146,7 (137,9 to 156,8)	77,33 (69,7 to 85,3)
1,90	AT1G70710	endo-1,4-beta-glucanase (EGASE) / cellulase	250,2 (246 to 258,3)	132,1 (122 to 145,3)
1,90	AT1G06160	ethylene-responsive factor, putative	49,89 (37,93 to 63,24)	26,38 (18,88 to 32,81)
1,90	AT1G10120	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	71,49 (66,04 to 74,38)	37,65 (35,87 to 38,89)
1,90	AT1G29660	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	1.076 (871,6 to 1.267)	568,4 (446,4 to 647)
1,89	AT1G24170	glycosyl transferase family 8 protein	380,6 (354,5 to 393,9)	203,1 (164,4 to 224,9)
1,89	AT1G28400	expressed protein	787,7 (736,6 to 838,2)	418,8 (373,7 to 478,7)

1,89	AT4G17215	expressed protein	42,55 (35,66 to 55,06)	22,34 (18,95 to 26,73)
1,88	AT5G46510	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	25,71 (23,41 to 28,32)	13,67 (12,06 to 14,51)
1,88	AT1G47670	amino acid transporter family protein	99,47 (92,72 to 102,9)	52,86 (51,51 to 54,7)
1,88	AT1G63120	rhomboid family protein	136,6 (112,7 to 161,9)	71,95 (69,81 to 75,57)
1,88	AT1G75780	tubulin beta-1 chain (TUB1)	108,3 (96,58 to 129,6)	57,42 (50,55 to 62,01)
1,87	AT4G33490	nucellin protein, putative	133 (118 to 145,8)	71,58 (58,78 to 85,97)
1,87	AT1G17455	expressed protein	72,8 (60,68 to 80,62)	38,84 (33,85 to 42,79)
1,87	AT3G07540	formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein	133,4 (121,2 to 144,8)	71,32 (70,2 to 73,31)
1,87	AT2G30990	expressed protein	265,5 (240,2 to 310,4)	142,1 (129,4 to 161,9)
1,86	AT5G47180	vesicle-associated membrane family protein / VAMP family protein	163 (148,4 to 177,7)	87,99 (79,03 to 103,9)
1,86	AT5G08260	serine carboxypeptidase S10 family protein	444,1 (426,6 to 466,4)	239,5 (210,5 to 255,5)
1,86	AT4G02540	DC1 domain-containing protein	322,3 (290,7 to 340,4)	174,2 (146,3 to 191)
1,86	AT4G29080	auxin-responsive AUX/IAA family protein	158,2 (150,1 to 165,4)	85,19 (82,14 to 88,97)
1,85	AT2G14900	gibberellin-regulated family protein	290 (286 to 293,6)	156,8 (148,3 to 164,8)
1,85	AT1G70940	auxin transport protein, putative (PIN3)	269 (247,5 to 305,5)	145,4 (129,1 to 164,9)
1,85	AT3G26970	'geranylgeranylated protein, putative similar to ATGP4 GB:AAD00115 from [Arabidopsis thaliana]'	149,4 (123,9 to 181,6)	79,91 (75,93 to 87,57)
1,85	AT4G01330	protein kinase family protein	243 (233,4 to 259,9)	131,6 (120,8 to 144,8)
1,85	AT2G21045	senescence-associated family protein	320,3 (280,6 to 381,6)	175,2 (128,1 to 200,3)
1,85	AT1G74740	calcium-dependent protein kinase, putative / CDPK, putative	52,19 (42,8 to 60,86)	28,09 (24,89 to 31,33)
1,84	AT5G40730	arabinogalactan-protein (AGP24)	460,6 (403,5 to 553,5)	252,3 (189,8 to 307,6)
1,84	AT5G52280	protein transport protein-related	85,11 (80,95 to 90,08)	46,29 (42,86 to 50,86)
1,84	AT5G63850	amino acid transporter 4, putative (AAP4)	103 (93,89 to 115,3)	55,75 (54,26 to 58,18)
1,84	AT1G79660	expressed protein	190,2 (164 to 237,1)	101,9 (96,89 to 104,7)
1,84	AT5G11970	expressed protein	150,2 (135,5 to 172,5)	81,32 (76,91 to 88,43)
1,84	AT3G61260	DNA-binding family protein / remorin family protein	858,5 (854,2 to 863,6)	473 (368,6 to 533,8)
1,84	AT1G61170	expressed protein	52,22 (51,7 to 53,17)	28,52 (26,43 to 32,06)
1,84	AT3G27200	plastocyanin-like domain-containing protein	76,89 (69,57 to 86,01)	41,68 (41,51 to 42,03)
1,84	AT1G19050	two-component responsive regulator / response regulator 7 (ARR7)	194,6 (155,1 to 237,1)	106,2 (84,45 to 134,4)
1,83	AT1G06420	expressed protein	41,93 (39,79 to 45,1)	22,9 (20,41 to 24,17)
1,83	AT5G01810	CBL-interacting protein kinase 15 (CIPK15)	209,4 (177,1 to 231,8)	116,5 (92,28 to 154,5)
1,83	AT1G57680	expressed protein	518,4 (508,2 to 533,6)	283,7 (253,2 to 299,5)
1,83	AT2G21050	amino acid permease, putative	111,6 (107,2 to 117,9)	61,08 (56,28 to 64,78)
1,83	AT5G66920	multi-copper oxidase type I family protein	180,2 (150,9 to 201,7)	98,84 (82,08 to 117)
1,83	AT2G15890	expressed protein	2.602 (2.464 to 2.770)	1.443 (1.126 to 1.640)

1,83	AT5G63590	flavonol synthase, putative	46,67 (41,25 to 54,12)	25,41 (24,65 to 25,99)
1,82	AT3G58620	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	208,8 (188,5 to 228,5)	114,4 (105 to 123)
1,81	AT3G60260	phagocytosis and cell motility protein ELMO1-related	122,1 (109,3 to 136,7)	67,51 (60,21 to 78,57)
1,81	AT2G20630	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative	816,3 (740,8 to 865,9)	450,2 (428,2 to 475,4)
1,81	AT5G05960	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	682,7 (571 to 811,3)	373,9 (349,8 to 402,6)
1,81	AT1G71960	ABC transporter family protein	63,07 (56,31 to 69,04)	34,81 (32,8 to 37,45)
1,81	AT2G01610	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	45,57 (45,07 to 46,23)	25,24 (24,64 to 25,8)
1,80	AT3G25500	formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein	249,2 (198,7 to 297,1)	136,3 (136,2 to 136,3)
1,80	AT1G63260	senescence-associated family protein	220,1 (198,7 to 258)	122 (104,9 to 137,9)
1,80	AT5G07580	ethylene-responsive element-binding family protein	371,9 (366,9 to 381,2)	207 (188,7 to 223,4)
1,79	AT2G32990	glycosyl hydrolase family 9 protein	64,14 (60,99 to 66,63)	35,86 (35,42 to 36,44)
1,79	AT2G39900	LIM domain-containing protein	514,9 (456,9 to 544,7)	288,3 (254,7 to 317,1)
1,79	AT1G75960	AMP-binding protein, putative	60,03 (50,57 to 65,49)	33,49 (31,01 to 36,51)
1,78	AT1G10990	expressed protein	63,98 (57,16 to 70,1)	35,91 (30,94 to 38,7)
1,78	AT5G19140	auxin/aluminum-responsive protein, putative	2.346 (2.155 to 2.690)	1.319 (1.137 to 1.511)
1,78	AT3G07470	expressed protein	872,2 (777,7 to 1.022)	490,4 (408,1 to 558,3)
1,78	AT5G23660	nodulin MtN3 family protein	229,2 (205 to 249,3)	128,4 (124,4 to 132,8)
1,78	AT1G18140	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	23,41 (19,9 to 26,9)	13,18 (11,9 to 15,59)
1,78	AT5G09220	amino acid permease 2 (AAP2)	1.134 (992,4 to 1.221)	637,4 (589,1 to 680,4)
1,78	AT4G01120	G-box binding factor 2 (GBF2)	104,1 (98,81 to 112,8)	58,57 (56,92 to 60,52)
1,77	AT3G06035	expressed protein	167 (158,7 to 173,5)	94,35 (85,14 to 102,3)
1,77	AT5G58900	myb family transcription factor	117,4 (101,3 to 140,6)	65,91 (59,76 to 74,41)
1,77	AT3G05800	expressed protein	46,06 (43,34 to 48,85)	26,09 (22,75 to 28,53)
1,77	AT3G58550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	265,6 (219,4 to 298,8)	149 (138,1 to 162,6)
1,77	AT3G17100	expressed protein	325,5 (300,7 to 343,7)	183,7 (176,1 to 193,1)
1,76	AT5G60490	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA12)	22,86 (21,07 to 26,16)	13,12 (11,34 to 16,65)
1,76	AT4G02130	glycosyl transferase family 8 protein	137,2 (134 to 143,4)	78,08 (71,91 to 83,59)
1,76	AT3G61460	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (BRH1)	292,8 (263 to 336,7)	167,3 (141,8 to 198,4)
1,75	AT1G78100	F-box family protein	132,4 (131 to 133,2)	76,47 (63,75 to 88,5)
1,75	AT1G33800	expressed protein	31,11 (28,14 to 36,69)	17,71 (16,62 to 18,8)
1,75	AT3G54810	zinc finger (GATA type) family protein	118 (101 to 141,3)	67,24 (58,74 to 73,83)
1,74	AT4G21600	bifunctional nuclease, putative	36,3 (31,12 to 39,02)	20,83 (17,84 to 22,62)
1,74	AT5G59150	Ras-related GTP-binding protein, putative	381,6 (352,6 to 405,9)	218,9 (203,7 to 228,9)
1,74	AT2G18300	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	595,4 (567,7 to 649,7)	342,2 (313,5 to 367,7)
1,74	AT4G27900	expressed protein	106,1 (93,62 to 120,8)	61,43 (49,18 to 71,84)

1,73	AT5G26734	'putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana, Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster; supported by cDNA: gi_15292726_gb_AY050797.1_'	229 (192,9 to 280,7)	131,2 (112 to 140,8)
1,73	AT1G20090	Rac-like GTP-binding protein (ARAC4) / Rho-like GTP-binding protein (ROP2)	495,1 (463,5 to 553,7)	286,4 (269,9 to 317,5)
1,73	AT1G28050	zinc finger (B-box type) family protein	70,62 (63,75 to 77,54)	40,9 (36,04 to 43,58)
1,73	AT5G13460	calmodulin-binding family protein	187,4 (164 to 219,4)	108,2 (96,01 to 120,6)
1,72	AT3G49220	pectinesterase family protein	535,5 (501,7 to 596)	310,7 (296,8 to 329,1)
1,72	AT4G28190	expressed protein	104,9 (102,3 to 108,1)	61,54 (50,32 to 67,28)
1,72	AT1G21130	O-methyltransferase, putative	456,6 (426,7 to 495,5)	266,8 (239,7 to 309,6)
1,72	AT5G65630	DNA-binding bromodomain-containing protein	318,3 (308,5 to 327,7)	186 (167,8 to 196,5)
1,71	AT5G64240	latex-abundant family protein (AMC3) / caspase family protein	163,1 (162,5 to 163,7)	96,69 (78,24 to 111,7)
1,70	AT2G42570	expressed protein	74,41 (64,43 to 80,8)	43,55 (41,8 to 45,17)
1,70	AT2G25980	jacalin lectin family protein	106,8 (96,12 to 124,9)	63,12 (54,48 to 76,84)
1,70	AT3G57480	zinc finger (C2H2 type, AN1-like) family protein	73,28 (63,7 to 79,42)	43,06 (38,74 to 46,05)
1,70	AT2G30010	expressed protein	345,7 (331,3 to 365,8)	203,6 (194,9 to 215,3)
1,70	AT5G32450	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	1.241 (1.167 to 1.333)	730,9 (680,2 to 782,2)
1,70	AT4G08470	mitogen-activated protein kinase, putative	198,3 (181,7 to 225,5)	116,5 (111,5 to 121,1)
1,69	AT2G33850	expressed protein	604,1 (531,5 to 695,3)	356,2 (312 to 398,3)
1,69	AT1G22440	alcohol dehydrogenase, putative	153,5 (129,8 to 178,8)	90,78 (78,37 to 106,6)
1,69	AT4G28240	wound-responsive protein-related	764,5 (732,7 to 784,3)	452,8 (415,9 to 475,4)
1,69	AT2G19450	diacylglycerol O-acyltransferase / acyl CoA	180,8 (164,9 to 210,8)	106,7 (95,43 to 114)
1,69	AT3G50240	kinesin motor protein-related	178,5 (172 to 188,1)	106,2 (92,78 to 115,9)
1,69	AT5G18240	myb family transcription factor	45,47 (41,93 to 50,11)	26,92 (25,64 to 27,81)
1,68	AT3G61990	O-methyltransferase family 3 protein	178,8 (168,1 to 198,9)	106,9 (95,17 to 129,1)
1,68	AT1G75310	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	103,7 (102,8 to 105,1)	61,74 (57,48 to 66,02)
1,68	AT5G25350	F-box family protein	155,1 (145,6 to 172,6)	92,07 (86,35 to 95,74)
1,68	AT4G36730	G-box binding factor 1 (GBF1)	423,2 (392,2 to 451,9)	251,5 (243,1 to 262,5)
1,68	AT4G05330	zinc finger and C2 domain protein, putative	167,8 (160,1 to 174)	100,8 (85,42 to 121,2)
1,68	AT4G36790	transporter-related	49,67 (47,5 to 53,47)	29,7 (25,71 to 33,58)
1,68	AT5G56540	arabinogalactan-protein (AGP14)	227,6 (213,5 to 241)	140,6 (97,17 to 189,4)
1,68	AT5G48460	fimbrin-like protein, putative	83,55 (79,99 to 88,44)	49,88 (47,19 to 53,16)
1,68	AT2G01910	microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein	265,3 (239,8 to 286,9)	158,1 (150,5 to 169,3)
1,68	AT4G08685	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	593,4 (549,5 to 661,2)	354,5 (324,5 to 396,9)
1,67	AT4G00680	actin-depolymerizing factor, putative	37,69 (31,49 to 46,03)	22,65 (17,78 to 27,95)
1,67	AT3G53190	pectate lyase family protein	352,2 (324,6 to 377,6)	210,5 (200,2 to 220,8)
1,67	AT1G28110	serine carboxypeptidase S10 family protein	175,2 (172 to 177,6)	105,4 (96,29 to 115,3)
1,66	AT2G28930	protein kinase (APK1b)	338,8 (313,6 to 371,2)	203,3 (199,6 to 205,2)

1,66	AT3G56480	myosin heavy chain-related	76,45 (69,88 to 83,43)	46,14 (40,24 to 51,56)
1,66	AT5G16590	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	154,1 (145 to 165)	93,42 (78,04 to 105,6)
1,66	AT5G02290	protein kinase, putative	274,3 (222 to 350,6)	163 (153,5 to 180,2)
1,65	AT1G76040	calcium-dependent protein kinase, putative / CDPK, putative	34,08 (30,95 to 37,52)	20,69 (18,37 to 22,77)
1,64	AT2G28670	disease resistance-responsive family protein / fibroin-related	81,47 (76,57 to 89,47)	49,93 (43,68 to 59,83)
1,64	AT2G41330	glutaredoxin family protein	37,27 (29,76 to 44,31)	22,61 (18,54 to 26,02)
1,64	AT5G50900	armadillo/beta-catenin repeat family protein	212,7 (186,8 to 250,4)	128,6 (120,9 to 135,6)
1,64	AT1G74440	expressed protein	33 (31,41 to 34,44)	20,29 (18,23 to 24,12)
1,64	AT1G27460	calmodulin-binding protein	271,3 (234,1 to 294,3)	165,3 (150,4 to 181,1)
1,64	AT1G56720	protein kinase family protein	114,8 (105 to 121,3)	70 (68,74 to 71,62)
1,64	AT5G35750	histidine kinase (AHK2)	197,5 (189,8 to 202,1)	121,1 (112,2 to 135,7)
1,63	AT3G13310	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	128,5 (110,5 to 143,3)	78,26 (75,13 to 82,8)
1,63	AT2G44180	methionyl aminopeptidase, putative / methionine aminopeptidase, putative / peptidase M, putative	280,5 (252,2 to 334,2)	171 (155,7 to 192,5)
1,63	AT4G00300	fringe-related protein	284,8 (258,9 to 314,6)	174,2 (167 to 182,5)
1,63	AT1G68810	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	45,95 (42,49 to 48,97)	28,22 (25,82 to 29,98)
1,63	AT5G17420	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX3)	42,23 (37,75 to 44,64)	26,06 (23,35 to 30,61)
1,63	AT2G01760	two-component responsive regulator family protein / response regulator family protein	72,12 (62,2 to 80,19)	44,18 (40,33 to 46,44)
1,62	AT1G72150	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	2.748 (2.546 to 2.935)	1.693 (1.543 to 1.775)
1,62	AT4G28250	beta-expansin, putative (EXPB3)	234,4 (217,4 to 251,7)	144,8 (137,6 to 157,3)
1,62	AT3G10080	germin-like protein, putative	118,6 (114 to 122,3)	73,61 (67,14 to 83,85)
1,62	AT4G16500	cysteine protease inhibitor family protein / cystatin family protein	717,6 (673,4 to 781,5)	443,1 (427 to 470,5)
1,62	AT5G41600	reticulon family protein (RTNLB4)	276,9 (258,2 to 305,9)	170,7 (163,8 to 175,9)
1,62	AT4G03390	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	207,4 (185,3 to 234,4)	128,5 (117,2 to 149,2)
1,62	AT1G53400	expressed protein	325,7 (295,3 to 377,3)	202,2 (183 to 240,4)
1,61	AT5G60860	Ras-related GTP-binding protein, putative	138,7 (115 to 171,3)	85,35 (72,97 to 94,51)
1,61	AT1G10020	expressed protein	84,3 (76,88 to 89,72)	53,22 (39,51 to 60,71)
1,61	AT5G19930	integral membrane family protein	58,44 (52,41 to 70,35)	36,11 (32,56 to 40,62)
1,61	AT4G23820	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	436,5 (424,5 to 445,8)	273,5 (231,6 to 304,3)
1,60	AT4G17340	major intrinsic family protein / MIP family protein	260,1 (245,5 to 271,5)	163 (149,4 to 181,3)
1,60	AT1G09570	phytochrome A (PHYA)	436,4 (396,8 to 467,5)	273,2 (257,6 to 282)
1,59	AT3G02250	expressed protein	158,3 (151,2 to 167,2)	99,55 (95,36 to 107,6)
1,59	AT5G39320	UDP-glucose 6-dehydrogenase, putative	223,8 (213,3 to 239,5)	140,7 (129,8 to 149,5)
1,59	AT5G14920	gibberellin-regulated family protein	2.732 (2.583 to 2.866)	1.720 (1.687 to 1.770)
1,58	AT3G04730	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 16	883 (860,9 to 914,5)	558,4 (525,3 to 594)

		(IAA16)		
1,58	AT2G19460	expressed protein	101,7 (90,3 to 122,2)	64,08 (55,94 to 74,4)
1,58	AT1G08510	acyl-(acyl carrier protein) thioesterase / acyl-ACP thioesterase / oleoyl-(acyl-carrier protein) hydrolase / S-acyl fatty acid synthase thioesterase	612,6 (557,5 to 678,3)	387,9 (363,6 to 433,7)
1,58	AT5G12250	tubulin beta-6 chain (TUB6)	1.064 (1.028 to 1.098)	674,3 (650 to 709,6)
1,58	AT1G56220	dormancy/auxin associated family protein	1.472 (1.383 to 1.522)	938,9 (793,3 to 1.062)
1,58	AT5G11150	synaptobrevin / vesicle-associated membrane protein 713 (VAMP713)	91,19 (88,81 to 94)	57,81 (56,01 to 59,56)
1,58	AT3G54430	lateral root primordium (LRP) protein-related	49,96 (37,58 to 57,73)	31,22 (29,76 to 33,74)
1,58	AT4G19390	expressed protein	195,9 (172,4 to 219,4)	123,9 (118,6 to 129,4)
1,57	AT5G44070	phytochelatin synthase 1 (PCS1)	355,8 (321,3 to 413,2)	225,8 (198,8 to 256,8)
1,57	AT5G45560	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein / lipid-binding START domain-containing protein	34,31 (30,75 to 37,46)	21,73 (20,93 to 22,66)
1,57	AT3G06150	expressed protein	227,7 (190,6 to 248,3)	144,3 (134,5 to 159,9)
1,56	AT2G39480	ABC transporter family protein	149,7 (146,6 to 154,6)	96,03 (86,31 to 101,4)
1,56	AT2G24790	zinc finger (B-box type) family protein	1.059 (1.010 to 1.089)	679,6 (608,3 to 736,9)
1,56	AT4G33300	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	311,8 (274,1 to 357,4)	198,9 (190,7 to 214,8)
1,56	AT3G01680	expressed protein	199,8 (185,2 to 212,9)	128,2 (120,4 to 142,4)
1,56	AT5G63810	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	226,5 (217,2 to 241,3)	145,8 (127,9 to 158)
1,56	AT1G19440	very-long-chain fatty acid condensing enzyme, putative	117,9 (111,8 to 123,3)	75,87 (68,97 to 82,89)
1,56	AT2G25800	expressed protein	183,9 (176,2 to 197,6)	118,6 (104,1 to 128,3)
1,55	AT1G68550	AP2 domain-containing transcription factor, putative	126,3 (114,1 to 136,3)	81,76 (70,61 to 90,53)
1,55	AT2G43430	hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial / glyoxalase II (GLX2-1)	189,8 (173,2 to 216,3)	122 (120,3 to 124,1)
1,55	AT3G24530	AAA-type ATPase family protein / ankyrin repeat family protein	86,24 (75,91 to 99,24)	55,95 (46,9 to 64,16)
1,55	AT1G77690	amino acid permease, putative	104 (91,49 to 110,4)	67,09 (63,22 to 71,43)
1,54	AT3G26980	ubiquitin family protein	161,4 (140,4 to 198,7)	103,7 (90,18 to 112,4)
1,54	AT5G11950	expressed protein	283,8 (269,2 to 306,3)	183,8 (176,5 to 193,3)
1,54	AT1G69030	BSD domain-containing protein	173,8 (160,3 to 189,5)	112,5 (108,7 to 116,5)
1,54	AT1G66150	leucine-rich repeat protein kinase, putative (TMK1)	949,6 (927,6 to 970,4)	616,7 (579,1 to 663,3)
1,54	AT1G01750	actin-depolymerizing factor, putative	22,87 (20,31 to 25,77)	15,01 (12,51 to 18,17)
1,53	AT4G17350	expressed protein	44,34 (36,85 to 50,2)	28,68 (28,18 to 29,39)
1,53	AT3G50660	steroid 22-alpha-hydroxylase (CYP90B1) (DWF4)	138 (128,2 to 147,9)	90,19 (84,51 to 95,26)
1,53	AT4G13510	ammonium transporter 1, member 1 (AMT1.1)	423,8 (414,7 to 441,9)	277,7 (260,4 to 294,5)
1,53	AT5G01710	expressed protein	346,5 (307,2 to 377,5)	226,2 (222,2 to 232,9)
1,52	AT1G30440	phototropic-responsive NPH3 family protein	199,5 (191 to 204,2)	131,5 (122 to 136,5)
1,52	AT5G48250	zinc finger (B-box type) family protein	187,6 (184,4 to 193)	124,2 (111,8 to 142)

1,52	AT1G17970	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	45,73 (39,81 to 54,21)	30,02 (26,08 to 33,77)
1,51	AT2G46490	expressed protein (APS2)	311,6 (293,8 to 325,5)	206,4 (198,8 to 217,6)
1,51	AT1G45130	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	281 (271,7 to 295,3)	186,7 (180,2 to 190,7)
1,51	AT2G46225	expressed protein	211 (183,7 to 236,2)	139,5 (136,4 to 142,8)
1,50	AT5G14550	expressed protein	58,26 (52,29 to 63,88)	38,98 (33,11 to 45,26)
1,50	AT5G62580	expressed protein	103,8 (96,02 to 114,6)	69,06 (67,39 to 72,18)
1,50	AT1G27600	glycosyl transferase family 43 protein	74,6 (72,83 to 75,99)	49,77 (47,12 to 51,14)
1,49	AT5G39410	expressed protein	259,7 (239 to 278,3)	173,7 (170,4 to 179,4)
1,49	AT4G39400	brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)	422,2 (385,1 to 461,4)	282,2 (280 to 286,4)
1,49	AT3G23750	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein	273,7 (265,5 to 283,8)	185,1 (161,4 to 207,6)
1,48	AT5G09960	expressed protein	278,7 (263,3 to 306)	187,9 (174 to 195,9)
1,48	AT4G18640	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	60,11 (53,46 to 69,29)	40,41 (37,61 to 42,83)
1,47	AT1G75820	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)	271,3 (251,3 to 290,3)	185,8 (152,7 to 202,8)
1,47	AT3G17440	novel plant SNARE 13 (NPSN13)	290,1 (271,7 to 309,2)	198,7 (171,5 to 226,8)
1,46	AT1G63420	expressed protein	152,9 (149 to 155,3)	105,4 (93,75 to 118,9)
1,46	AT1G74380	galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein	100,9 (88,06 to 117,3)	68,92 (66 to 74,01)
1,46	AT5G64330	non-phototropic hypocotyl 3 (NPH3)	172,6 (159,5 to 184,6)	118,4 (113,6 to 124)
1,45	AT2G19810	zinc finger (CCCH-type) family protein	119,6 (110,8 to 136,3)	82,69 (67,2 to 93,06)
1,45	AT4G35790	phospholipase D delta / PLD delta (PLDDELTA)	253,7 (245,4 to 268)	175,5 (163,9 to 196,3)

Tab. 10: Liste der Gene, die in der *vfb1-1vfb2-1vfb3-1vfb4*(RNAi) und der *csn4* Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia) induziert sind

Fold Induction	Genidentität	Beschreibung	Wildtyp (min to max)	<i>vfb</i> Mutante (min to max)
10,7	AT2G41260	glycine-rich protein / late embryogenesis abundant protein (M17)	6,671 (5,039 to 9,932)	69,33 (54,15 to 92,74)
8,2	AT1G09500	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family / CAD family	11,04 (10,64 to 11,57)	97,11 (55,99 to 141,8)
7,7	AT4G31870	glutathione peroxidase, putative	11,15 (9,917 to 13,14)	86,45 (72,18 to 107,6)
7,5	AT2G04040	MATE efflux family protein	9,507 (8,318 to 10,13)	71,4 (63,06 to 77,93)
7,1	AT4G22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	62,38 (21,7 to 91,85)	379,3 (311,5 to 441,4)
6,4	AT4G36700	cupin family protein	10,98 (7,992 to 14,79)	69,24 (49,84 to 80,77)
6,2	AT1G62510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	177,9 (116,3 to 218,2)	1.070 (904,7 to 1.164)
6,1	AT2G21320	zinc finger (B-box type) family protein	21,05 (17,71 to 25,52)	129,2 (96,67 to 148,6)
5,5	AT5G42760	O-methyltransferase N-terminus domain-containing protein	13,96 (11,53 to 16,58)	78,34 (53,51 to 91,27)
5,1	AT5G24150	squalene monooxygenase 1,1 / squalene epoxidase 1,1 (SQP1,1)	106,9 (94,93 to 121,4)	551,3 (427,9 to 620,7)
4,7	AT5G46050	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	32,37 (21,41 to 39,13)	146,8 (131,2 to 161,3)
4,4	AT3G01970	WRKY family transcription factor	15,69 (9,471 to 24,58)	64,65 (53,66 to 70,45)
4,0	AT1G64900	cytochrome P450, putative	66,3 (52,67 to 78,33)	261,5 (256,5 to 267,6)
3,9	AT3G17610	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 35429.	28,21 (21,18 to 34,39)	109,6 (89,36 to 120,6)
3,9	AT1G51820	leucine-rich repeat protein kinase, putative	18,22 (9,156 to 23,17)	65,67 (58,2 to 73,5)
3,8	AT3G44450	expressed protein	19,86 (19,09 to 21,11)	77,74 (50,97 to 100,8)
3,7	AT2G04050	MATE efflux family protein	12,62 (10,45 to 14,89)	48,27 (33,47 to 64,48)
3,6	AT3G26290	cytochrome P450 71B26, putative (CYP71B26)	89,44 (85,36 to 94,19)	332,9 (244,8 to 417,8)
3,4	AT2G24540	kelch repeat-containing F-box family protein	26,55 (22,93 to 30,46)	90,79 (83,48 to 96,34)
3,4	AT2G19190	light-responsive receptor protein kinase / senescence-responsive receptor-like serine/threonine kinase, putative (SIRK)	21,07 (15,43 to 26,4)	69,96 (67,9 to 72,85)
3,4	AT5G13170	nodulin MtN3 family protein	8,359 (7,955 to 9,127)	29,11 (22,68 to 39,03)
3,3	AT5G24160	squalene monooxygenase 1,2 / squalene epoxidase 1,2 (SQP1,2)	193,7 (150,6 to 244,8)	633,4 (625,1 to 645,5)
3,3	AT1G15045	hypothetical protein contains Pfam profile: PF00117 Glutamine amidotransferase class-I	18,11 (16,31 to 21,25)	60,3 (43,18 to 72,15)
3,2	AT1G65500	expressed protein	250,4 (161,1 to 323,5)	785,5 (601,2 to 901)
3,0	AT4G26200	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, putative / ACC synthase, putative	15,83 (11,04 to 20,35)	46,47 (41,38 to 49,68)
3,0	AT3G57020	strictosidine synthase family protein	229,7 (165,8 to 266,3)	668,5 (599,5 to 772,7)
2,9	AT1G31820	amino acid permease family protein	22,66 (20,6 to 26,05)	66,56 (61,07 to 72,91)
2,9	AT4G14690	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein, putative	29,47 (25,38 to 33,1)	86,78 (77,05 to 105,1)
2,9	AT1G72920	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	33,99 (25,03 to 43,11)	97,9 (75,37 to 118,9)
2,9	AT5G24660	expressed protein	88,66 (63,39 to 136,3)	246 (176 to 295,5)
2,9	AT4G23300	protein kinase family protein	66,56 (53,13 to 80,25)	189,1 (166,8 to 201,4)

2,9	AT5G39520	expressed protein	12,23 (10,28 to 14,92)	34,58 (33,18 to 36,25)
2,8	AT5G49480	sodium-inducible calcium-binding protein (ACP1) / sodium-responsive calcium-binding protein (ACP1)	305,8 (256,2 to 392,8)	874,5 (630 to 1.022)
2,8	AT3G28540	AAA-type ATPase family protein	21,9 (20,5 to 23,47)	63,42 (52,13 to 85,21)
2,8	AT3G18250	expressed protein	51,48 (38,15 to 67,12)	140,5 (126,4 to 150,6)
2,8	AT1G07390	leucine-rich repeat family protein	22,9 (16,16 to 26,66)	62,24 (58,51 to 69,55)
2,7	AT5G18670	beta-amylase, putative (BMY3) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	84,91 (72,95 to 96,09)	236 (169,9 to 275)
2,7	AT3G51860	cation exchanger, putative (CAX3)	42,57 (31,18 to 51,36)	114,3 (98,51 to 130,7)
2,6	AT4G23260	protein kinase family protein	79,23 (69,79 to 89,2)	209,3 (193,1 to 235,6)
2,6	AT1G66540	cytochrome P450, putative	10,73 (9,814 to 12,46)	27,98 (24,69 to 30,69)
2,6	AT1G57770	amine oxidase family	64,8 (58,64 to 72,29)	168,5 (160,2 to 180,9)
2,6	AT5G01540	lectin protein kinase, putative	13,56 (11,45 to 15,41)	35,09 (31,23 to 38,25)
2,6	AT1G78510	solaneyl diphosphate synthase (SPS)	35,8 (30,45 to 40,66)	92,04 (83,97 to 98,94)
2,6	AT3G22840	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	11,94 (11,52 to 12,22)	30,76 (25,39 to 34,33)
2,5	AT1G71890	sucrose transporter / sucrose-proton symporter (SUC5)	7,581 (5,585 to 10,54)	18,88 (15,39 to 23,28)
2,5	AT4G02410	lectin protein kinase family protein	54,2 (48,16 to 59,53)	137,2 (131,6 to 141,9)
2,5	AT5G13330	AP2 domain-containing transcription factor family protein	23,12 (14,26 to 29,3)	56,04 (49,38 to 59,38)
2,5	AT1G02850	glycosyl hydrolase family 1 protein	170,7 (113,3 to 214,9)	417,1 (364,4 to 454,4)
2,5	AT1G31290	PAZ domain-containing protein / piwi domain-containing protein	9,106 (6,495 to 11,24)	22,37 (20,45 to 24,62)
2,5	AT4G37310	cytochrome P450, putative	54,48 (48,18 to 62,9)	134,7 (128,6 to 139,9)
2,5	AT3G61220	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	181,6 (143,6 to 204,6)	441,9 (409,3 to 496,5)
2,4	AT4G23290	protein kinase family protein	110,9 (82,03 to 129,3)	259,6 (238,9 to 271,3)
2,4	AT1G76930	proline-rich extensin-like family protein	496,1 (321,2 to 585)	1.151 (981,5 to 1.429)
2,3	AT5G38780	S-adenosyl-L-methionine	16,27 (14,4 to 18,43)	38,13 (32,65 to 42,91)
2,3	AT2G43510	trypsin inhibitor, putative	181 (142,6 to 214)	425,1 (359,7 to 540,9)
2,3	AT2G21640	expressed protein	39,32 (35,74 to 45,65)	94,27 (73,3 to 134,6)
2,3	AT3G52740	expressed protein	29,63 (28,16 to 32,36)	69,24 (54,15 to 77,15)
2,3	AT4G27830	glycosyl hydrolase family 1 protein	122,3 (113 to 128,1)	279,7 (249,8 to 302,2)
2,3	AT5G16970	NADP-dependent oxidoreductase, putative (P1)	146,6 (126,3 to 160)	332,2 (309,7 to 352,3)
2,3	AT1G51790	leucine-rich repeat protein kinase, putative	52,79 (44,4 to 64,85)	118,6 (105,5 to 131,2)
2,3	AT5G61820	expressed protein	491,5 (412,6 to 547,2)	1.108 (1.009 to 1.231)
2,3	AT3G16770	AP2 domain-containing protein RAP2.3 (RAP2.3)	522,9 (345,3 to 617,2)	1.141 (1.071 to 1.215)
2,2	AT3G18280	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	676,4 (523,1 to 772,7)	1.510 (1.240 to 1.727)
2,2	AT1G64950	cytochrome P450, putative	62,17 (53,69 to 71,19)	139,3 (105,1 to 186,7)
2,2	AT4G01700	chitinase, putative	98,6 (72,44 to 120,1)	210,7 (184,6 to 227,8)
2,2	AT2G37970	SOUL heme-binding family protein	177,1 (167,2 to 188,9)	385,3 (355,3 to 404,1)
2,2	AT4G33150	lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	77,66 (67,48 to 93,79)	168,2 (136,1 to 194,5)

2,2	AT2G38870	protease inhibitor, putative	1.408 (1.094 to 1.732)	3.003 (2.816 to 3.294)
2,1	AT4G38540	monooxygenase, putative (MO2)	127,6 (103,8 to 143,4)	270,4 (237,3 to 294,7)
2,1	AT3G22640	cupin family protein	5,075 (4,502 to 5,643)	10,7 (8,753 to 13,74)
2,1	AT3G27060	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative / ribonucleotide reductase, putative	439,1 (403,5 to 495,1)	903,2 (864,7 to 941,6)
2,1	AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	99,55 (75,08 to 117,2)	202,5 (171,8 to 227,1)
2,0	AT3G24190	ABC1 family protein	159,1 (144,8 to 176,7)	311 (282,8 to 350,5)
1,9	AT5G58350	protein kinase family protein	83,88 (62,7 to 102,4)	158,4 (147,1 to 172,9)
1,9	AT3G23410	alcohol oxidase-related	117,2 (100,3 to 132,5)	217,2 (213,6 to 222,1)
1,9	AT2G33250	expressed protein	142,1 (136,2 to 150,8)	264,7 (247,3 to 298,5)
1,8	AT5G10380	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	48,65 (44,55 to 55,19)	89,61 (77,74 to 99,95)
1,8	AT4G33660	expressed protein	296,8 (290,1 to 305,3)	547,3 (502,8 to 627,6)
1,8	AT2G25450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	1.737 (1.368 to 2.214)	3.097 (2.786 to 3.266)
1,8	AT3G14690	cytochrome P450, putative	285,3 (263,8 to 319,8)	511,6 (457,2 to 549,2)
1,8	AT5G49520	WRKY family transcription factor	22,93 (20,8 to 25,02)	41,35 (33,13 to 47,14)
1,8	AT3G25410	bile acid	108 (94,07 to 120,7)	191,1 (187,5 to 196,6)
1,8	AT3G21720	isocitrate lyase, putative	6,304 (6,134 to 6,503)	11,34 (8,035 to 13,9)
1,7	AT1G71040	multi-copper oxidase type I family protein	189,8 (177,5 to 211,4)	326,7 (283,4 to 351,6)
1,6	AT5G15910	dehydrogenase-related	117,7 (110,4 to 122,1)	193,2 (188,8 to 198,1)
1,6	AT1G10960	ferredoxin, chloroplast, putative	2.331 (2.071 to 2.497)	3.725 (3.292 to 4.113)
1,6	AT1G17100	SOUL heme-binding family protein	501,5 (488,6 to 521,8)	794,9 (714,1 to 920,5)
1,5	AT5G13630	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH)	3.370 (3.076 to 3.618)	4.944 (4.879 to 5.037)
1,4	AT2G31400	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	698 (665,2 to 723)	1.006 (916,3 to 1.121)
1,4	AT3G22120	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.610 (2.407 to 2.795)	3.661 (3.473 to 3.802)
1,4	AT1G11910	aspartyl protease family protein	2.793 (2.287 to 3.279)	3.793 (3.641 to 3.934)
1,3	AT4G39730	lipid-associated family protein	1.036 (929 to 1.106)	1.387 (1.207 to 1.520)
1,3	AT5G02500	heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1) (HSP70-1)	5.730 (5.573 to 5.969)	7.338 (7.077 to 7.600)

Tab. 11: Liste der Gene, die in der *vfb1-1vfb2-1vfb3-1vfb4*(RNAi) und der *csn4* Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (Columbia) herabreguliert sind

Fold Repression	Genidentität	Beschreibung	Wildtyp (min to max)	<i>vfb</i> Mutante (min to max)
11,5	AT5G24240	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin family protein	83,1 (75,12 to 96,5)	7,259 (6,086 to 7,949)
10,4	AT4G32280	auxin-responsive AUX/IAA family protein	94,76 (54,55 to 130,2)	8,632 (7,184 to 10,23)
8,4	AT5G12050	expressed protein	483,2 (361,4 to 562,8)	56,73 (51,11 to 61,31)
7,3	AT5G62280	expressed protein	234,2 (185,9 to 284,9)	31,76 (31,42 to 31,93)
6,5	AT2G42870	expressed protein	151 (128,7 to 174)	23,73 (17,28 to 29,45)
5,0	AT1G22740	Ras-related protein (RAB7) / AtRab75 / small GTP-binding protein, putative	259,2 (246,1 to 270,4)	52,95 (38,3 to 69,61)
4,7	AT5G57760	expressed protein	61,4 (59,79 to 62,37)	13,41 (10,11 to 15,98)
4,6	AT4G16780	homeobox-leucine zipper protein 4 (HAT4) / HD-ZIP protein 4	93,83 (76,55 to 109,7)	21,22 (14,68 to 29,38)
4,5	AT2G28085	auxin-responsive family protein	45,39 (41,41 to 47,77)	10,15 (8,866 to 11,82)
4,4	AT1G49860	glutathione S-transferase, putative	165,4 (153,7 to 182,1)	38,05 (32,44 to 44,88)
4,4	AT1G29395	stress-responsive protein, putative	94,12 (90,8 to 96,68)	22,95 (12,93 to 29,59)
4,3	AT5G02760	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein	447,7 (288,1 to 549,5)	102,2 (79,51 to 119,7)
3,9	AT3G59350	serine/threonine protein kinase, putative	469,9 (390 to 549,4)	121,9 (100,7 to 152,6)
3,8	AT1G79700	ovule development protein, putative	155,8 (130,1 to 187)	43,18 (24,12 to 59,28)
3,8	AT3G21550	expressed protein	74,79 (67,68 to 83,85)	20,84 (12,31 to 25,73)
3,7	AT4G02290	glycosyl hydrolase family 9 protein	260,2 (175,1 to 318,5)	67,82 (64,34 to 70,36)
3,5	AT1G28330	dormancy-associated protein, putative (DRM1)	1.277 (1.225 to 1.336)	391,3 (224,6 to 580,3)
3,5	AT3G23550	MATE efflux family protein	184,2 (134,6 to 267,7)	53,11 (37,35 to 77,15)
3,5	AT2G34510	expressed protein	685 (586,1 to 869,2)	201,2 (149,9 to 279,6)
3,3	AT1G78970	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	181,3 (167 to 195,4)	54,26 (50,05 to 60,57)
3,3	AT1G26820	ribonuclease 3 (RNS3)	53,92 (46,01 to 66,61)	16,32 (12,96 to 21,5)
3,3	AT2G34770	fatty acid hydroxylase (FAH1)	714,2 (654,9 to 811,2)	219,9 (174,8 to 275)
3,3	AT2G33570	expressed protein	216,6 (202,7 to 226,6)	66,1 (58,9 to 71,55)
3,3	AT3G15540	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 19 (IAA19)	109,2 (103,3 to 115,9)	33,6 (27,75 to 37,8)
3,3	AT4G34770	auxin-responsive family protein	65,48 (56,96 to 77,05)	20,46 (15,62 to 26,81)
3,1	AT3G58120	bZIP transcription factor family protein	427,4 (391 to 446)	139,5 (99,5 to 180,7)
3,1	AT1G49230	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	74,81 (70,23 to 79,4)	23,84 (21,83 to 24,97)
3,1	AT5G37990	S-adenosyl-L-methionine	313,6 (262,5 to 358,6)	100,4 (92,58 to 114,8)
3,1	AT2G42580	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	486,5 (447,3 to 518,2)	158,6 (143,9 to 168,6)
3,0	AT1G69230	expressed protein	67,36 (57,94 to 83,67)	22,11 (18,88 to 26,69)
3,0	AT2G31010	protein kinase family protein	73,52 (60,13 to 86,96)	24,41 (22,1 to 27,06)
3,0	AT1G04240	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 3 (IAA3)	198,6 (171,9 to 243,3)	66,2 (63,8 to 68,37)
2,9	AT5G51550	phosphate-responsive 1 family protein	2.066 (1.937 to 2.321)	717,9 (554,1 to 942,9)
2,9	AT1G43790	expressed protein	170 (136 to 203,3)	57,65 (51,53 to 62,64)
2,9	AT1G22330	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	102,9 (91,09 to 115,7)	35,52 (34,68 to 37,1)
2,9	AT5G47370	homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2) / HD-ZIP protein 2	237,9 (187,9 to 273,2)	82,06 (74,25 to 86,45)

2,9	AT3G47340	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)	820,1 (615,3 to 1.072)	288,2 (193,8 to 348,6)
2,8	AT5G61660	glycine-rich protein	612,2 (560,6 to 654,4)	216,1 (186,4 to 236,2)
2,8	AT3G06370	sodium proton exchanger, putative (NHX3)	22,07 (20 to 23,89)	7,775 (7,306 to 8,08)
2,8	AT1G03870	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA9)	1.494 (1.433 to 1.615)	536 (415,9 to 641,6)
2,8	AT4G35320	expressed protein	58,38 (51,32 to 66,12)	20,9 (17,62 to 25,48)
2,8	AT5G44680	methyladenine glycosylase family protein	1.577 (1.490 to 1.745)	570,8 (481,5 to 732,4)
2,8	AT5G23210	serine carboxypeptidase S10 family protein	453 (364,1 to 555,9)	162,2 (141,9 to 196,9)
2,8	AT3G62040	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	208,3 (200,9 to 215)	75,45 (66,34 to 84,19)
2,8	AT1G67865	expressed protein	1.476 (1.328 to 1.767)	533,8 (453,4 to 616,4)
2,7	AT3G50650	scarecrow-like transcription factor 7 (SCL7)	57,11 (52,17 to 60,53)	20,89 (17,83 to 22,76)
2,7	AT1G11260	glucose transporter (STP1)	1.493 (1.453 to 1.533)	577,2 (348,4 to 786)
2,7	AT3G05490	rapid alkalization factor (RALF) family protein	558,8 (412,1 to 746,1)	209,1 (148,6 to 296)
2,7	AT1G22335	expressed protein	159,5 (145 to 182,4)	59,73 (53,65 to 65,09)
2,7	AT1G06830	glutaredoxin family protein	92,95 (77,59 to 106,5)	35,32 (27,47 to 45,17)
2,7	AT5G03260	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	32,17 (28,33 to 38,73)	12,13 (10,68 to 14,85)
2,7	AT2G30930	expressed protein	737,7 (597,9 to 904,8)	278,3 (213,8 to 327,4)
2,6	AT1G64640	plastocyanin-like domain-containing protein	142,9 (131,7 to 159,1)	54,69 (41,86 to 63,17)
2,6	AT4G35350	cysteine endopeptidase, papain-type (XCP1)	158,4 (138,6 to 177,5)	60,78 (54,1 to 64,97)
2,6	AT3G45160	expressed protein	1.021 (957,7 to 1.120)	393,1 (363,8 to 434,9)
2,6	AT1G65310	xyloglucan	59,11 (52,88 to 67,11)	22,85 (19,78 to 26,07)
2,6	AT1G18400	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	40,21 (37,73 to 42,31)	15,56 (14,1 to 16,38)
2,6	AT3G46490	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	84,79 (82,55 to 86,97)	32,97 (30,65 to 34,16)
2,6	AT5G65390	arabinogalactan-protein (AGP7)	280,2 (253,2 to 305,8)	110 (94,63 to 131,5)
2,6	AT1G66940	protein kinase-related	535,5 (463,1 to 583,9)	209,1 (188,5 to 237,3)
2,6	AT4G03210	xyloglucan	3.058 (2.889 to 3.283)	1.212 (1.011 to 1.501)
2,6	AT4G37770	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, putative / ACC synthase, putative	21,71 (20,19 to 22,81)	8,5 (8,478 to 8,545)
2,5	AT1G19530	expressed protein	41,97 (31,34 to 53,04)	16,11 (15,5 to 16,44)
2,5	AT2G32860	glycosyl hydrolase family 1 protein	321 (301,3 to 336,6)	126,7 (117,8 to 141,6)
2,5	AT4G11190	disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein	135,6 (132,2 to 137,6)	53,97 (48,22 to 62,61)
2,5	AT2G31000	hypothetical protein predicted by genefinder	22,26 (18,98 to 24,16)	8,758 (8,704 to 8,859)
2,5	AT4G17460	homeobox-leucine zipper protein 1 (HAT1) / HD-ZIP protein 1	473,5 (389,1 to 609,6)	191,2 (123 to 239,7)
2,5	AT1G76800	nodulin, putative	32,62 (29,43 to 36)	13,03 (10,73 to 14,84)
2,5	AT1G02640	glycosyl hydrolase family 3 protein	269,6 (250,4 to 289,7)	109,4 (78,45 to 127,9)
2,5	AT5G54380	protein kinase family protein	335 (296,7 to 369,6)	135,9 (109,3 to 159,8)
2,5	AT4G03190	F-box family protein (FBL18)	247,2 (219,1 to 280,2)	99,22 (94,58 to 107,2)
2,5	AT2G42610	expressed protein	116,6 (112,3 to 122,7)	47,08 (43,36 to 52,25)
2,5	AT1G25230	purple acid phosphatase family protein	662,8 (592,9 to 710,3)	270,9 (213,4 to 313,7)
2,5	AT1G14920	gibberellin response modulator (GAI) (RGA2) / gibberellin-responsive modulator	432,5 (366,1 to 488,6)	176,4 (141,2 to 210,5)

2,5	AT1G67870	glycine-rich protein	703,1 (651,4 to 741,1)	287,1 (239,1 to 322,7)
2,5	AT5G62360	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	246,5 (203,2 to 313)	100,4 (73,79 to 116,7)
2,5	AT1G22530	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	648,4 (559,2 to 770,4)	265,3 (204,5 to 316,7)
2,5	AT3G01670	expressed protein	142,9 (130 to 154,8)	58,48 (51,01 to 65,5)
2,4	AT5G07080	transferase family protein	31,75 (27,03 to 34,77)	13,07 (10,49 to 15,45)
2,4	AT5G48900	pectate lyase family protein	281,9 (244,2 to 301,3)	115,4 (102,7 to 125,4)
2,4	AT3G23030	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 2 (IAA2)	1.109 (1.015 to 1.264)	454 (414,2 to 490,5)
2,4	AT5G15160	bHLH family protein	106 (87,3 to 121,4)	43,22 (40,07 to 46,33)
2,4	AT5G15580	expressed protein	164,6 (139,4 to 179,7)	68,62 (60,23 to 78,22)
2,4	AT3G05890	hydrophobic protein (RC12B) / low temperature and salt responsive protein (LTI6B)	402,9 (347,6 to 433,5)	170,2 (135,5 to 212,2)
2,4	AT3G29370	expressed protein	54,02 (47,59 to 65,86)	22,31 (21,95 to 22,75)
2,4	AT3G07010	pectate lyase family protein	189,1 (185,5 to 194,2)	81,14 (67,69 to 100,9)
2,4	AT1G61100	disease resistance protein (TIR class), putative	311,1 (281,2 to 351,6)	131,9 (115,4 to 150,4)
2,4	AT1G29500	auxin-responsive protein, putative	165,1 (146,7 to 201)	69,71 (59,58 to 76,61)
2,3	AT4G16515	expressed protein	175,7 (166,7 to 190,8)	78,1 (50,77 to 101,5)
2,3	AT1G08930	early-responsive to dehydration stress protein (ERD6) / sugar transporter family protein	976,4 (729 to 1.317)	419,9 (289,6 to 538,5)
2,3	AT1G73830	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	142,8 (136 to 151,7)	61,67 (57,18 to 67,49)
2,3	AT4G25260	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	146,7 (133,9 to 168,7)	63,11 (56,31 to 67,26)
2,3	AT1G29440	auxin-responsive family protein	91,05 (63,75 to 118,8)	38,24 (34,9 to 43,61)
2,3	AT1G20450	dehydrin (ERD10)	821,8 (677,1 to 1.039)	351,5 (315,8 to 414,8)
2,3	AT2G06850	xyloglucan	4.020 (3.945 to 4.058)	1.743 (1.588 to 1.986)
2,3	AT5G47990	cytochrome P450 family protein	138,4 (115,4 to 172,9)	59,39 (49,17 to 66,56)
2,3	AT3G12920	expressed protein	260,7 (237,8 to 284)	112,8 (105,2 to 128,1)
2,3	AT4G29270	acid phosphatase class B family protein	148,2 (119 to 168,7)	63,84 (58,81 to 68,14)
2,3	AT4G12550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	417,5 (394,1 to 456,5)	183,8 (153 to 207)
2,3	AT5G22580	expressed protein	622,5 (542,7 to 704,3)	274,3 (249,9 to 291)
2,3	AT1G29450	auxin-responsive protein, putative	32,79 (26,1 to 36,32)	14,41 (13,91 to 15,16)
2,3	AT4G30410	expressed protein	152,2 (149,9 to 154,5)	67,67 (64,57 to 72,39)
2,3	AT1G52830	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 6 (IAA6)	21,39 (20,44 to 21,96)	9,579 (7,938 to 10,45)
2,3	AT3G57795	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 19033.	131,8 (129,5 to 134,6)	58,58 (57,8 to 59,89)
2,2	AT2G46330	arabinogalactan-protein (AGP16)	2.383 (2.177 to 2.630)	1.070 (920,6 to 1.288)
2,2	AT2G40480	expressed protein	71,84 (65,78 to 82,19)	32,08 (27,3 to 35,67)
2,2	AT4G14560	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 1 (IAA1)	73,78 (62,95 to 83,6)	32,93 (31,08 to 34,74)
2,2	AT5G61590	AP2 domain-containing transcription factor family protein	1.926 (1.817 to 2.046)	874,6 (690,2 to 971,1)
2,2	AT4G19530	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	603,3 (572,6 to 634)	275 (225,4 to 336,9)
2,2	AT3G60320	expressed protein	882,3 (801,3 to 945,8)	396,6 (364,9 to 420,3)
2,2	AT4G26690	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	348 (307,1 to 382,5)	155,9 (152,6 to 160,5)
2,2	AT2G35880	expressed protein	321,9 (291,1 to 350,7)	144,7 (137,5 to 155,6)

2,2	AT1G52190	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	553,3 (502,7 to 596,7)	249,9 (224,8 to 284,2)
2,2	AT1G29510	auxin-responsive protein, putative	163,5 (139,3 to 191,9)	73,28 (66,68 to 81,61)
2,2	AT2G36570	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	58,86 (57,73 to 60,1)	26,73 (23,06 to 30,47)
2,2	AT5G44260	zinc finger (CCCH-type) family protein	59,25 (58,37 to 60,92)	27,52 (22,25 to 37,11)
2,2	AT5G19530	spermine/spermidine synthase family protein	175,3 (166,5 to 185,6)	80,03 (72,24 to 86,25)
2,2	AT2G15680	calmodulin-related protein, putative	84,49 (75,79 to 92,1)	38,53 (37,01 to 40,69)
2,2	AT1G32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	529,2 (492,5 to 568,5)	242,3 (224,5 to 255,7)
2,2	AT5G08330	TCP family transcription factor, putative	650,9 (594,3 to 679,6)	298,5 (267 to 329)
2,2	AT5G03520	Ras-related GTP-binding protein, putative	908,2 (842,7 to 1.005)	417,1 (386,4 to 469,7)
2,2	AT1G04430	dehydration-responsive protein-related	1.384 (1.291 to 1.537)	635,5 (601,5 to 659)
2,1	AT5G46330	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	70,03 (63,33 to 73,49)	32,55 (31,06 to 33,61)
2,1	AT1G14290	acid phosphatase, putative	185,8 (179,6 to 194,5)	86,72 (83,5 to 89,27)
2,1	AT5G22500	acyl CoA reductase, putative / male-sterility protein, putative	152 (145,5 to 162,1)	71,27 (64,88 to 80,22)
2,1	AT1G51940	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	386 (347,3 to 429,8)	180,5 (166,6 to 205)
2,1	AT3G13980	expressed protein	81,51 (74,83 to 88,72)	38,32 (38,06 to 38,68)
2,1	AT3G28180	glycosyl transferase family 2 protein	358,4 (324,9 to 423,9)	169,4 (141,2 to 194,3)
2,1	AT5G10170	inositol-3-phosphate synthase, putative / myo-inositol-1-phosphate synthase, putative / MI-1-P synthase, putative	79,52 (70,77 to 89,93)	38,12 (32,04 to 48,78)
2,1	AT5G03120	expressed protein	122 (114,8 to 131,8)	58,14 (52,32 to 69,29)
2,1	AT5G06690	thioredoxin family protein	402,9 (374,3 to 444,7)	190,9 (168,5 to 204,7)
2,1	AT1G11545	xyloglucan	137,3 (116 to 157,7)	64,62 (61,89 to 69,93)
2,1	AT5G51890	peroxidase-related	233,5 (197,5 to 271,5)	110,6 (99,55 to 130,7)
2,1	AT3G20570	plastocyanin-like domain-containing protein	129,3 (112,7 to 137,8)	61,21 (58,63 to 64,75)
2,1	AT5G14450	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	207,7 (182,1 to 233,8)	98,86 (84,61 to 109,8)
2,1	AT3G62020	germin-like protein (GLP10)	63,77 (54,93 to 80,55)	30,46 (25,06 to 38,38)
2,1	AT2G39850	subtilase family protein	261 (233,6 to 295,2)	127,6 (109,1 to 163,7)
2,1	AT1G33700	expressed protein	63,15 (55,62 to 70,45)	30,64 (25,81 to 36,46)
2,1	AT4G34760	auxin-responsive family protein	335,1 (310,8 to 352,2)	162,4 (151 to 170,3)
2,1	AT2G38080	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	58,33 (52,08 to 69)	28,22 (24,42 to 30,78)
2,1	AT3G61210	embryo-abundant protein-related	266,1 (238,1 to 320)	128,7 (117 to 135,4)
2,1	AT1G63310	expressed protein	53,45 (49,8 to 59,93)	26,07 (22,8 to 28,46)
2,1	AT1G14280	phytochrome kinase, putative	585,2 (552 to 628,2)	285,2 (268,8 to 307,1)
2,0	AT1G11080	serine carboxypeptidase S10 family protein	130,8 (124,7 to 136,1)	64,27 (54,49 to 72,85)
2,0	AT3G25930	universal stress protein (USP) family protein	97,35 (91,68 to 105)	48,04 (42,59 to 53,95)
2,0	AT3G62630	expressed protein	280,7 (266,9 to 296,1)	138,7 (125,1 to 156,2)
2,0	AT3G62660	glycosyl transferase family 8 protein	183,1 (170,3 to 198,1)	92,14 (71,46 to 119,9)
2,0	AT1G19540	isoflavone reductase, putative	30,18 (27,13 to 34,33)	14,98 (12,57 to 17,24)
2,0	AT5G65040	senescence-associated protein-related	77,91 (76,31 to 79,4)	38,86 (34,36 to 45,21)
2,0	AT4G04955	amidohydrolase family protein	53,2 (41,91 to 65,25)	26,54 (19,43 to 32,09)
2,0	AT5G43700	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 4 (IAA4) /	313,8 (249 to 366,3)	154,4 (146 to 167,7)

		auxin-induced protein (AUX2-11)		
2,0	AT3G54920	pectate lyase, putative / powdery mildew susceptibility protein (PMR6)	458,3 (446,6 to 471,7)	231,1 (197,5 to 269,7)
2,0	AT4G38850	auxin-responsive protein / small auxin up RNA (SAUR-AC1)	36,1 (30,1 to 47,38)	17,87 (15,27 to 21,24)
2,0	AT2G15960	expressed protein	1.943 (1.747 to 2.116)	979,7 (817,5 to 1.100)
2,0	AT1G75500	nodulin MtN21 family protein	596,2 (571,1 to 627,7)	301,5 (272,2 to 328,6)
2,0	AT3G16920	glycoside hydrolase family 19 protein	51,38 (44,41 to 62,39)	25,81 (24,02 to 27,95)
2,0	AT4G35470	leucine-rich repeat family protein	282,7 (254,4 to 316,2)	144,2 (116,4 to 160,6)
2,0	AT1G20850	cysteine endopeptidase, papain-type (XCP2)	488,4 (485,2 to 493,2)	249,1 (219,3 to 284,7)
2,0	AT3G12610	DNA-damage-repair/toleration protein, putative (DRT100)	501,7 (456,5 to 538,5)	254,3 (240,9 to 267,7)
2,0	AT2G35470	expressed protein	150,5 (128,2 to 179,2)	77,21 (64,75 to 99,24)
2,0	AT3G05900	neurofilament protein-related	310,2 (284,6 to 328,1)	158,2 (141,9 to 169,8)
1,9	AT1G12845	expressed protein	176,3 (165,7 to 188,4)	92,13 (68,74 to 107,4)
1,9	AT2G36410	expressed protein	230,5 (212,9 to 245,3)	118,5 (110 to 128)
1,9	AT1G04680	pectate lyase family protein	330 (314,8 to 349,5)	170,1 (153,9 to 188,7)
1,9	AT4G31820	phototropic-responsive NPH3 family protein	141,4 (124,2 to 161,2)	72,65 (64,77 to 79,03)
1,9	AT2G38310	expressed protein	1.402 (1.250 to 1.674)	718,8 (636,7 to 781,8)
1,9	AT3G06770	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	128,1 (120,3 to 137,5)	66,59 (59,01 to 79,22)
1,9	AT4G20780	calcium-binding protein, putative	65,67 (49,78 to 86,11)	33,32 (27,6 to 37,79)
1,9	AT3G02170	expressed protein	206,4 (189,6 to 215,6)	106,6 (99,21 to 114)
1,9	AT1G74670	gibberellin-responsive protein, putative	4.551 (4.228 to 5.038)	2.357 (2.166 to 2.510)
1,9	AT3G14310	pectinesterase family protein	1.404 (1.318 to 1.546)	736,7 (623,3 to 897,1)
1,9	AT2G47930	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	154,7 (139,7 to 167)	81,12 (71,79 to 98,24)
1,9	AT5G19340	expressed protein	49,99 (43,49 to 54,72)	26 (23,49 to 27,9)
1,9	AT4G15390	transferase family protein	279,8 (261,3 to 301,9)	145,8 (140,5 to 156,1)
1,9	AT5G07030	aspartyl protease family protein	702,5 (659,3 to 754,4)	367,5 (355,8 to 373,8)
1,9	AT1G03820	expressed protein	183 (178,9 to 190,9)	96,92 (78,55 to 108,1)
1,9	AT2G01420	auxin transport protein, putative	304,1 (292,4 to 318,9)	160,4 (151 to 176,4)
1,9	AT1G12080	expressed protein	94,52 (85,73 to 101,5)	50 (45,05 to 58,91)
1,9	AT5G11420	expressed protein	945,9 (856,2 to 1.005)	496,8 (485,6 to 516,4)
1,9	AT5G23830	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein	146,7 (137,9 to 156,8)	77,33 (69,7 to 85,3)
1,9	AT1G70710	endo-1,4-beta-glucanase (EGASE) / cellulase	250,2 (246 to 258,3)	132,1 (122 to 145,3)
1,9	AT1G29660	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	1.076 (871,6 to 1.267)	568,4 (446,4 to 647)
1,9	AT1G28400	expressed protein	787,7 (736,6 to 838,2)	418,8 (373,7 to 478,7)
1,9	AT1G47670	amino acid transporter family protein	99,47 (92,72 to 102,9)	52,86 (51,51 to 54,7)
1,9	AT1G63120	rhomboid family protein	136,6 (112,7 to 161,9)	71,95 (69,81 to 75,57)
1,9	AT5G47180	vesicle-associated membrane family protein / VAMP family protein	163 (148,4 to 177,7)	87,99 (79,03 to 103,9)
1,9	AT4G29080	auxin-responsive AUX/IAA family protein	158,2 (150,1 to 165,4)	85,19 (82,14 to 88,97)
1,9	AT2G14900	gibberellin-regulated family protein	290 (286 to 293,6)	156,8 (148,3 to 164,8)
1,9	AT1G70940	auxin transport protein, putative (PIN3)	269 (247,5 to 305,5)	145,4 (129,1 to 164,9)

1,9	AT4G01330	protein kinase family protein	243 (233,4 to 259,9)	131,6 (120,8 to 144,8)
1,8	AT2G21045	senescence-associated family protein	320,3 (280,6 to 381,6)	175,2 (128,1 to 200,3)
1,8	AT1G74740	calcium-dependent protein kinase, putative / CDPK, putative	52,19 (42,8 to 60,86)	28,09 (24,89 to 31,33)
1,8	AT5G63850	amino acid transporter 4, putative (AAP4)	103 (93,89 to 115,3)	55,75 (54,26 to 58,18)
1,8	AT1G79660	expressed protein	190,2 (164 to 237,1)	101,9 (96,89 to 104,7)
1,8	AT5G11970	expressed protein	150,2 (135,5 to 172,5)	81,32 (76,91 to 88,43)
1,8	AT3G61260	DNA-binding family protein / remorin family protein	858,5 (854,2 to 863,6)	473 (368,6 to 533,8)
1,8	AT1G61170	expressed protein	52,22 (51,7 to 53,17)	28,52 (26,43 to 32,06)
1,8	AT3G27200	plastocyanin-like domain-containing protein	76,89 (69,57 to 86,01)	41,68 (41,51 to 42,03)
1,8	AT2G21050	amino acid permease, putative	111,6 (107,2 to 117,9)	61,08 (56,28 to 64,78)
1,8	AT5G66920	multi-copper oxidase type I family protein	180,2 (150,9 to 201,7)	98,84 (82,08 to 117)
1,8	AT2G15890	expressed protein	2.602 (2.464 to 2.770)	1.443 (1.126 to 1.640)
1,8	AT3G58620	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	208,8 (188,5 to 228,5)	114,4 (105 to 123)
1,8	AT3G60260	phagocytosis and cell motility protein ELMO1-related	122,1 (109,3 to 136,7)	67,51 (60,21 to 78,57)
1,8	AT2G20630	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative	816,3 (740,8 to 865,9)	450,2 (428,2 to 475,4)
1,8	AT5G05960	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	682,7 (571 to 811,3)	373,9 (349,8 to 402,6)
1,8	AT1G63260	senescence-associated family protein	220,1 (198,7 to 258)	122 (104,9 to 137,9)
1,8	AT5G07580	ethylene-responsive element-binding family protein	371,9 (366,9 to 381,2)	207 (188,7 to 223,4)
1,8	AT2G32990	glycosyl hydrolase family 9 protein	64,14 (60,99 to 66,63)	35,86 (35,42 to 36,44)
1,8	AT2G39900	LIM domain-containing protein	514,9 (456,9 to 544,7)	288,3 (254,7 to 317,1)
1,8	AT1G10990	expressed protein	63,98 (57,16 to 70,1)	35,91 (30,94 to 38,7)
1,8	AT5G19140	auxin/aluminum-responsive protein, putative	2.346 (2.155 to 2.690)	1.319 (1.137 to 1.511)
1,8	AT3G07470	expressed protein	872,2 (777,7 to 1.022)	490,4 (408,1 to 558,3)
1,8	AT5G23660	nodulin MtN3 family protein	229,2 (205 to 249,3)	128,4 (124,4 to 132,8)
1,8	AT5G09220	amino acid permease 2 (AAP2)	1.134 (992,4 to 1.221)	637,4 (589,1 to 680,4)
1,8	AT4G01120	G-box binding factor 2 (GBF2)	104,1 (98,81 to 112,8)	58,57 (56,92 to 60,52)
1,8	AT3G06035	expressed protein	167 (158,7 to 173,5)	94,35 (85,14 to 102,3)
1,8	AT3G17100	expressed protein	325,5 (300,7 to 343,7)	183,7 (176,1 to 193,1)
1,8	AT5G60490	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA12)	22,86 (21,07 to 26,16)	13,12 (11,34 to 16,65)
1,8	AT4G02130	glycosyl transferase family 8 protein	137,2 (134 to 143,4)	78,08 (71,91 to 83,59)
1,8	AT3G61460	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (BRH1)	292,8 (263 to 336,7)	167,3 (141,8 to 198,4)
1,7	AT2G18300	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	595,4 (567,7 to 649,7)	342,2 (313,5 to 367,7)
1,7	AT4G27900	expressed protein	106,1 (93,62 to 120,8)	61,43 (49,18 to 71,84)
1,7	AT5G26734	'putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana, Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster; supported by cDNA: gi_15292726_gb_AY050797.1_'	229 (192,9 to 280,7)	131,2 (112 to 140,8)
1,7	AT1G20090	Rac-like GTP-binding protein (ARAC4) / Rho-like GTP-binding protein (ROP2)	495,1 (463,5 to 553,7)	286,4 (269,9 to 317,5)
1,7	AT3G49220	pectinesterase family protein	535,5 (501,7 to 596)	310,7 (296,8 to 329,1)
1,7	AT1G21130	O-methyltransferase, putative	456,6 (426,7 to 495,5)	266,8 (239,7 to 309,6)
1,7	AT2G25980	jacalin lectin family protein	106,8 (96,12 to 124,9)	63,12 (54,48 to 76,84)

1,7	AT2G30010	expressed protein	345,7 (331,3 to 365,8)	203,6 (194,9 to 215,3)
1,7	AT5G32450	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	1.241 (1.167 to 1.333)	730,9 (680,2 to 782,2)
1,7	AT2G33850	expressed protein	604,1 (531,5 to 695,3)	356,2 (312 to 398,3)
1,7	AT4G28240	wound-responsive protein-related	764,5 (732,7 to 784,3)	452,8 (415,9 to 475,4)
1,7	AT3G50240	kinesin motor protein-related	178,5 (172 to 188,1)	106,2 (92,78 to 115,9)
1,7	AT4G36730	G-box binding factor 1 (GBF1)	423,2 (392,2 to 451,9)	251,5 (243,1 to 262,5)
1,7	AT4G05330	zinc finger and C2 domain protein, putative	167,8 (160,1 to 174)	100,8 (85,42 to 121,2)
1,7	AT4G08685	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	593,4 (549,5 to 661,2)	354,5 (324,5 to 396,9)
1,7	AT3G53190	pectate lyase family protein	352,2 (324,6 to 377,6)	210,5 (200,2 to 220,8)
1,7	AT2G28930	protein kinase (APK1b)	338,8 (313,6 to 371,2)	203,3 (199,6 to 205,2)
1,7	AT3G56480	myosin heavy chain-related	76,45 (69,88 to 83,43)	46,14 (40,24 to 51,56)
1,7	AT5G16590	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	154,1 (145 to 165)	93,42 (78,04 to 105,6)
1,6	AT1G27460	calmodulin-binding protein	271,3 (234,1 to 294,3)	165,3 (150,4 to 181,1)
1,6	AT1G56720	protein kinase family protein	114,8 (105 to 121,3)	70 (68,74 to 71,62)
1,6	AT5G35750	histidine kinase (AHK2)	197,5 (189,8 to 202,1)	121,1 (112,2 to 135,7)
1,6	AT4G00300	fringe-related protein	284,8 (258,9 to 314,6)	174,2 (167 to 182,5)
1,6	AT1G68810	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	45,95 (42,49 to 48,97)	28,22 (25,82 to 29,98)
1,6	AT1G72150	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	2.748 (2.546 to 2.935)	1.693 (1.543 to 1.775)
1,6	AT4G28250	beta-expansin, putative (EXPB3)	234,4 (217,4 to 251,7)	144,8 (137,6 to 157,3)
1,6	AT3G10080	germin-like protein, putative	118,6 (114 to 122,3)	73,61 (67,14 to 83,85)
1,6	AT4G16500	cysteine protease inhibitor family protein / cystatin family protein	717,6 (673,4 to 781,5)	443,1 (427 to 470,5)
1,6	AT5G41600	reticulon family protein (RTNLB4)	276,9 (258,2 to 305,9)	170,7 (163,8 to 175,9)
1,6	AT1G53400	expressed protein	325,7 (295,3 to 377,3)	202,2 (183 to 240,4)
1,6	AT5G60860	Ras-related GTP-binding protein, putative	138,7 (115 to 171,3)	85,35 (72,97 to 94,51)
1,6	AT1G10020	expressed protein	84,3 (76,88 to 89,72)	53,22 (39,51 to 60,71)
1,6	AT4G23820	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	436,5 (424,5 to 445,8)	273,5 (231,6 to 304,3)
1,6	AT4G17340	major intrinsic family protein / MIP family protein	260,1 (245,5 to 271,5)	163 (149,4 to 181,3)
1,6	AT1G09570	phytochrome A (PHYA)	436,4 (396,8 to 467,5)	273,2 (257,6 to 282)
1,6	AT5G39320	UDP-glucose 6-dehydrogenase, putative	223,8 (213,3 to 239,5)	140,7 (129,8 to 149,5)
1,6	AT3G04730	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 16 (IAA16)	883 (860,9 to 914,5)	558,4 (525,3 to 594)
1,6	AT2G19460	expressed protein	101,7 (90,3 to 122,2)	64,08 (55,94 to 74,4)
1,6	AT1G08510	acyl-(acyl carrier protein) thioesterase / acyl-ACP thioesterase / oleoyl-(acyl-carrier protein) hydrolase / S-acyl fatty acid synthase thioesterase	612,6 (557,5 to 678,3)	387,9 (363,6 to 433,7)
1,6	AT5G12250	tubulin beta-6 chain (TUB6)	1.064 (1.028 to 1.098)	674,3 (650 to 709,6)
1,6	AT1G56220	dormancy/auxin associated family protein	1.472 (1.383 to 1.522)	938,9 (793,3 to 1.062)
1,6	AT3G54430	lateral root primordium (LRP) protein-related	49,96 (37,58 to 57,73)	31,22 (29,76 to 33,74)
1,6	AT3G06150	expressed protein	227,7 (190,6 to 248,3)	144,3 (134,5 to 159,9)
1,6	AT2G39480	ABC transporter family protein	149,7 (146,6 to 154,6)	96,03 (86,31 to 101,4)
1,6	AT2G24790	zinc finger (B-box type) family protein	1.059 (1.010 to 1.089)	679,6 (608,3 to 736,9)

1,6	AT3G01680	expressed protein	199,8 (185,2 to 212,9)	128,2 (120,4 to 142,4)
1,6	AT2G25800	expressed protein	183,9 (176,2 to 197,6)	118,6 (104,1 to 128,3)
1,5	AT2G43430	hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial / glyoxalase II (GLX2-1)	189,8 (173,2 to 216,3)	122 (120,3 to 124,1)
1,5	AT1G77690	amino acid permease, putative	104 (91,49 to 110,4)	67,09 (63,22 to 71,43)
1,5	AT5G11950	expressed protein	283,8 (269,2 to 306,3)	183,8 (176,5 to 193,3)
1,5	AT1G69030	BSD domain-containing protein	173,8 (160,3 to 189,5)	112,5 (108,7 to 116,5)
1,5	AT1G66150	leucine-rich repeat protein kinase, putative (TMK1)	949,6 (927,6 to 970,4)	616,7 (579,1 to 663,3)
1,5	AT1G30440	phototropic-responsive NPH3 family protein	199,5 (191 to 204,2)	131,5 (122 to 136,5)
1,5	AT5G48250	zinc finger (B-box type) family protein	187,6 (184,4 to 193)	124,2 (111,8 to 142)
1,5	AT2G46225	expressed protein	211 (183,7 to 236,2)	139,5 (136,4 to 142,8)
1,5	AT5G62580	expressed protein	103,8 (96,02 to 114,6)	69,06 (67,39 to 72,18)
1,5	AT1G27600	glycosyl transferase family 43 protein	74,6 (72,83 to 75,99)	49,77 (47,12 to 51,14)
1,5	AT4G39400	brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)	422,2 (385,1 to 461,4)	282,2 (280 to 286,4)
1,5	AT3G23750	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein	273,7 (265,5 to 283,8)	185,1 (161,4 to 207,6)
1,5	AT5G09960	expressed protein	278,7 (263,3 to 306)	187,9 (174 to 195,9)
1,5	AT4G18640	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	60,11 (53,46 to 69,29)	40,41 (37,61 to 42,83)
1,5	AT1G75820	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)	271,3 (251,3 to 290,3)	185,8 (152,7 to 202,8)
1,5	AT3G17440	novel plant SNARE 13 (NPSN13)	290,1 (271,7 to 309,2)	198,7 (171,5 to 226,8)
1,5	AT5G64330	non-phototropic hypocotyl 3 (NPH3)	172,6 (159,5 to 184,6)	118,4 (113,6 to 124)
1,5	AT2G19810	zinc finger (CCCH-type) family protein	119,6 (110,8 to 136,3)	82,69 (67,2 to 93,06)
1,4	AT2G45850	DNA-binding family protein	109,9 (103,2 to 121,5)	76,65 (66,59 to 89,46)
1,4	AT5G23020	2-isopropylmalate synthase 2 (IMS2)	363 (329,7 to 403)	253,2 (230,4 to 282,4)
1,4	AT1G20010	tubulin beta-5 chain (TUB5)	953 (892,6 to 1.008)	668,3 (577,3 to 766,4)
1,4	AT1G29390	stress-responsive protein, putative	580,1 (521,4 to 628,5)	403,8 (392,8 to 414,5)
1,4	AT5G50000	protein kinase, putative	409,7 (392 to 435,5)	286,3 (283,8 to 288,8)
1,4	AT3G63420	heterotrimeric G protein gamma-subunit (AGG1)	147,8 (144,7 to 150,3)	103,7 (97,81 to 115,3)
1,4	AT1G09750	chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related	1.327 (1.203 to 1.480)	927,9 (885 to 995,1)
1,4	AT5G39340	two-component phosphorelay mediator 2 (HP2)	307,4 (292,5 to 319,3)	216,3 (192 to 233,6)
1,4	AT3G60030	squamosa promoter-binding protein-like 12 (SPL12)	241,5 (226,6 to 269,4)	170 (156,9 to 187,7)
1,4	AT5G22740	glycosyl transferase family 2 protein	221,1 (213,7 to 231,6)	155,9 (144,9 to 164)
1,4	AT1G75240	zinc finger homeobox family protein / ZF-HD homeobox family protein	137,2 (124 to 157,9)	96,96 (86,78 to 110,4)
1,4	AT3G18050	expressed protein	452,5 (451,7 to 454)	321,4 (293,8 to 354,2)
1,4	AT4G00950	expressed protein	69,46 (62,42 to 76,77)	49,88 (48,27 to 50,86)
1,4	AT1G09630	Ras-related GTP-binding protein, putative	175,5 (166,9 to 184,1)	126,7 (114,5 to 136,9)
1,4	AT5G58300	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	138,4 (130,3 to 144,6)	100,1 (98,39 to 103)
1,4	AT5G48500	expressed protein	62,83 (57,16 to 68,23)	45,67 (40,18 to 51,15)
1,3	AT1G76990	ACT domain containing protein	474 (452,5 to 488,7)	354,1 (312,7 to 381)
1,3	AT1G54090	exocyst subunit EXO70 family protein	80,87 (72,5 to 87,04)	61,34 (56,7 to 65,4)
1,3	AT1G70100	expressed protein	65,39 (62,01 to 70,97)	50,66 (46,26 to 53,79)

9. Lebenslauf

Persönlich Daten:

Name: Katja Melanie Schwager
Geburtsdatum: 25.04.1978
Geburtsort: Ansbach
Familienstand: ledig
Adresse: Maybachstrasse 5
70794 Filderstadt-Sielmingen

Schulische Laufbahn:

1984 – 1988 Weinberg-Grundschule Ansbach
1988 – 1997 Theresien-Gymnasium Ansbach
1997 Abitur (Note 2,4)

Universitätslaufbahn:

1997 – 2002 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander
Universität Erlangen-Nürnberg
1999 Diplomvorprüfung (Note 2,2)
2001 Diplomprüfungen
09.2001 – 07.2002 Diplomarbeit im Lehrstuhl für Pharmazeutische
Biologie
„Charakterisierung eines 23,8 kDa Polypeptids
aus der Wurzel von *Phytolacca americana* L.“
(Diplomnote gesamt 2,3)
ab 10.2002 Doktorandin im Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik am
Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP),
Eberhard Karls Universität Tübingen