

**Identifizierung und Charakterisierung
von *knock-out* Mutanten
der plastidären Proteine DAP1 und DAP2
in *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniel Marquardt

aus Rostock

September 2007

Berichtersteller:

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der evolutionäre Ursprung der Plastiden	1
1.2 Die Plastiden höherer Pflanzen.....	3
1.3 Proteinimport in pflanzliche Plastiden	6
1.4 Die Funktionen der Plastiden in der Pflanzenzelle.....	9
1.4.1 Photosynthese.....	9
1.4.2 Photorespiration.....	11
1.4.3 Nitrat- und Sulfatassimilation	13
1.4.4 Aminosäuresynthese.....	16
1.4.5 Lipidsynthese.....	17
1.4.6 Isoprenoidsynthese	19
1.4.7 Chlorophyllsynthese.....	20
1.5 Identifizierung und Charakterisierung von plastidären Proteinen und Transportern.....	22
 2. Material und Methoden	 26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Enzyme	26
2.1.3 Molekularbiologische Kits	26
2.1.4 Vektoren	27
2.1.5 Bakterienstämme	29
2.1.6 Pflanzenmaterial	31
2.1.7 Kultivierungsbedingungen und Nährmedien.....	32
2.1.8 Antibiotika	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	36
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	36
2.2.1.2 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	36
2.2.1.3 Herstellung elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	36
2.2.1.4 Transformation elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	37

2.2.1.5	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.2.1.6	Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	38
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	39
2.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.2.4	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	40
2.2.2.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	41
2.2.2.6	DNA-Sequenzierung.....	41
2.2.2.7	DNA-Techniken.....	42
2.2.2.7.1	Allgemeine DNA-Techniken.....	42
2.2.2.7.2	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	42
2.2.2.7.3	Plasmidisolierung aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
2.2.2.7.4	Schnellpräparation genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.2.2.7.5	Schnellpräparation genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ...	44
2.2.2.7.6	Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe.....	45
2.2.2.7.7	Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen mittels PCR.....	45
2.2.2.7.8	Präparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe	46
2.2.2.7.9	Southern-Blot mit genomischer DNA	47
2.2.2.8	RNA-Techniken.....	49
2.2.2.8.1	Allgemeine RNA-Techniken	49
2.2.2.8.2	Präparation von Total-RNA aus Pflanzengewebe	50
2.2.2.8.3	Semiquantitative RT-PCR	50
2.2.2.9	Klonierungsmethoden.....	51
2.2.2.9.1	Allgemeine Klonierungsmethoden	51
2.2.2.9.2	Gateway Klonierungstechnologie.....	52
2.2.2.9.3	Klonierung der cDNAs der <i>AtDAPs</i>	52
2.2.2.9.4	Klonierung von Promotor GUS-Reportergenkonstrukte für <i>AtDAP1</i> und <i>AtDAP2</i>	53
2.2.2.9.5	Klonierung von GFP-Fusionskonstrukten der <i>AtDAPs</i>	53
2.2.2.9.6	Klonierung von amiRNA-Konstrukten gegen <i>AtDAP1</i> und <i>AtDAP2</i>	54
2.2.2.9.7	Klonierung von Konstrukten für die Komplementation der <i>dap1</i> - und <i>dap2</i> -Mutanten.....	55

2.2.2.9.8	Klonierung eines Insertionskonstruktes für das <i>DAP</i> -Homolog aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	56
2.2.3	Botanische und pflanzenphysiologische Methoden	56
2.2.3.1	Oberflächensterilisation von Saatgut	56
2.2.3.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
2.2.3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur	57
2.2.3.2.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	58
2.2.3.3	Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	59
2.2.3.4	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	59
2.2.3.5	Selektion transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	60
2.2.3.6	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	60
2.2.3.7	Anzucht und Protoplastierung einer Tabak-Zellsuspension	61
2.2.3.8	Transfektion von Tabakprotoplasten	62
2.2.3.9	Anzucht und Transformation einer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellsuspension	64
2.2.3.10	Messung der Chlorophyllfluoreszenz (PAM-Fluorometrie)	65
2.2.3.11	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	68
2.2.4	Biochemische Methoden	69
2.2.4.1	Bestimmung von lösliche Zuckern und Stärke	69
2.2.4.2	GUS-Färbung von Pflanzengewebe	71
2.2.4.3	Wasserstoffperoxid-Färbung	72
2.2.5	Analytische Methoden	73
2.2.5.1	Mikroskopie	73
2.2.5.1.1	Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie	73
2.2.5.1.2	Elektronen-Mikroskopie	74
2.2.6	Photodokumentation	75
2.2.7	Statistische Analysen	75
2.2.7.1	Pearson's χ^2 -Test	75
2.2.7.2	Student's <i>t</i> -Test (<i>t</i> -Test nach Welch)	76
3.	Ergebnisse	77
3.1	<i>in silico</i> Analysen der AtDAP-Proteine	77
3.2	Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine	82

3.2.1	Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine in Tabakprotoplasten	82
3.2.2	Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine in einer <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur	84
3.3	Expressionanalyse der <i>AtDAP</i> -Gene	87
3.3.1	<i>in silico</i> Analyse der Expression der <i>AtDAP</i> -Gene.....	87
3.3.2	Analyse der Expression der <i>AtDAP</i> -Gene durch semiquantitative RT-PCR	89
3.3.3	Analyse der Expression von <i>AtDAP1</i> und <i>AtDAP2</i> durch Promotor-GUS-Fusionen.....	90
3.4	Isolierung und molekularbiologische Analyse von T-DNA Insertionsmutanten für die <i>AtDAP</i> -Gene.....	95
3.4.1	Identifizierung und Isolierung von T-DNA Insertionsmutanten.....	95
3.4.2	Verifikation des <i>knock-out</i> für die T-DNA Insertionsmutanten	99
3.5	Phänotypische Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutanten	101
3.5.1	Phänotyp der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten	101
3.5.2	Phänotyp der <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutante	101
3.5.3	Phänotyp der Kreuzungen der <i>dap1-1</i> , <i>dap1-2</i> und <i>dap2-1</i> T-DNA Insertionsmutanten	105
3.5.4	Phänotyp der <i>dap3</i> , <i>dap4</i> und <i>dap5</i> T-DNA Insertionsmutanten	106
3.6	Molekulare Analyse und phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit amiRNA-Konstrukten gegen <i>AtDAP1</i> und <i>AtDAP2</i>	108
3.6.1	Phänotyp der Mutanten mit dem amiRNA-Konstrukt gegen <i>AtDAP1</i>	108
3.6.2	Phänotyp der Mutanten mit dem amiRNA-Konstrukt gegen <i>AtDAP2</i>	111
3.7	Physiologische Charakterisierung der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten	114
3.7.1	Wachstumscharakteristika der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten	114
3.7.2	Wachstumscharakteristika der <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutante	116
3.7.3	Chlorophyllgehalt.....	117
3.7.4	Photosyntheseeigenschaften der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten ...	118
3.7.4.1	Bestimmung der Photosynthese-Parameter Fv/Fm, ΦPSII, qP, qN und ETR	118
3.7.4.2	Bestimmung der Photosynthese-Parameter qP, qN und ETR bei verschiedenen Lichtintensitäten	120
3.7.4.3	Bestimmung einer Chlorophyllfluoreszenz-Induktionskurve.....	123

3.7.5	Wasserstoffperoxid-Färbung der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten	125
3.7.6	Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten	127
3.7.6.1	Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten	127
3.7.6.2	Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutante	128
3.8	Elektronenmikroskopische Analyse der Chloroplastenmorphologie der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten	130
3.8.1	Chloroplastenmorphologie der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten.....	130
3.8.2	Chloroplastenmorphologie der <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutante.....	131
3.9	Generierung einer <i>Synechocystis</i> Insertionsmutante	133
3.10	Analyse von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Deletionsmutanten.....	134
3.11	Komplementation der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten	138
3.11.1	Komplementation der <i>dap1</i> und <i>dap2</i> T-DNA Insertionsmutanten durch die entsprechenden cDNAs	138
3.11.2	Komplementation der <i>dap1</i> T-DNA Insertionsmutanten mit den <i>DAP</i> - Homologen aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	141
3.12	Analyse der <i>dap1</i> - und <i>dap2</i> -Mutanten in Verbindung mit einer limitierten plastidären Pyruvatkonzentration	144
3.12.1	Wachstum der <i>dap1</i> - und <i>dap2</i> -Mutanten auf Pyruvat.....	145
3.12.2	Überexpression von <i>AtPPT1</i> und <i>AtPPT2</i> in den <i>dap1</i> -Mutanten.....	147
4.	Diskussion	150
4.1	<i>in silico</i> Vorhersagen zu den DAP-Proteinen.....	150
4.2	Lokalisation der AtDAP-Proteine	152
4.3	Expression der <i>AtDAP</i> -Gene	154
4.4	Molekularbiologische Analyse der Mutanten für die <i>AtDAP</i> -Genfamilie	155
4.5	Phänotyp der <i>dap</i> -Mutanten	161
4.5.1	Phänotyp der <i>dap1</i> -Mutanten.....	161
4.5.1.1	Morphologie und Wachstumscharakteristika.....	161
4.5.1.2	Photosynthesecharakteristika	163
4.5.1.3	Photooxidativer Stress.....	165
4.5.1.4	Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern	166

4.5.2	Phänotyp der <i>dap2</i> -Mutanten und der <i>dap1 dap2</i> -Doppelmutanten.....	167
4.5.2.1	Morphologie und Wachstumscharakteristika.....	167
4.5.2.2	Photosynthesecharakteristika	168
4.5.2.3	Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern	169
4.6	Die homologen <i>DAP</i> -Gene aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170
4.7	Funktion von <i>AtDAP1</i> und <i>AtDAP2</i>	171
4.8	Ausblick.....	172
5.	Zusammenfassung.....	173
6.	Literaturverzeichnis.....	175
7.	Anhang	190
7.1	Datenbanken und Internetadressen.....	190
7.2	Oligonukleotide	192
7.3	Abkürzungsverzeichnis	198

1. Einleitung

Die Photosynthese ist die Grundlage für das Leben auf unserem Planeten. Durch sie findet die Umwandlung von Lichtenergie in die chemische Energie von organischen Verbindungen unter Assimilation von Kohlendioxid durch die Spaltung von Wasser oder anderer an- bzw. organischer Substanzen statt. Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen führen eine oxygene Photosynthese durch. Als Folge der photolytischen Spaltung von Wasser, das als Elektronendonator dient, kommt es dabei zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff. Diese Gruppen von photoautotrophen Organismen sind für den überwiegenden Teil der Nettoprimärproduktion der Erde verantwortlich. Damit stellen sie die stoffliche und energetische Lebensgrundlage für alle heterotrophen Organismen dar.

In Algen und höheren Pflanzen wird die Photosynthese in speziellen Zellorganellen, den Chloroplasten, durchgeführt.

1.1 Der evolutionäre Ursprung der Plastiden

Plastiden sind semiautonome Organellen, die vornehmlich in Pflanzen und Algen vorkommen. Darüber hinaus findet man Plastiden aber auch in einigen parasitischen Protisten (Apicomplexa). Nach der Endosymbionten-Theorie stammen Plastiden und Mitochondrien phylogenetisch von Prokaryoten ab, welche durch Phagozytose von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurden (Margulis, 1970; Gray und Dolittle, 1982; Cavalier-Smith, 2000). Alle Plastiden gehen auf ein primäres symbiontisches Ereignis vor über 1,6 Milliarden Jahren (Hedges *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004) zurück. Bei diesem Ereignis kam es zur Aufnahme eines photoautotrophen Cyanobakteriums, genauer gesagt eines Vorfahren heutiger Cyanobakterien, durch eine mitochondrienhaltige eukaryotische Wirtszelle. Diese Form der Endosymbiose wird aufgrund von Sequenzvergleichen der rRNA und proteinkodierender Gene als singuläres Ereignis angesehen. Somit haben alle Plastiden, unabhängig von ihrer Form und Funktion, sowie des jeweiligen Organismus, in dem sie vorkommen, einen monophyletischen Ursprung (Yoon *et al.*, 2002). Vor ca. 1,558 Milliarden Jahren kam es zur Aufspaltung der Abstammungslinien der Glaucophyta und der Linie der Chlorophyta plus Rhodophyta (Yoon *et al.*, 2004). Plastiden diese Gruppen sind von zwei Hüllmembranen umgeben (Cavalier-Smith, 2000). Die Aufspaltung der Chlorophyta und Rhodophyta erfolgte vor ca. 1,5 Milliarden Jahren (Yoon *et al.*, 2004). Die weitere evolutionäre Entwicklung der

Chlorophyta führte zu den Landpflanzen, welche zwischen 432 bis 476 Millionen Jahren erstmals auftraten (Yoon *et al.*, 2004). Aus diesen gingen vor 355 bis 370 Millionen Jahren die ersten Samenpflanzen hervor (Yoon *et al.*, 2004). Durch sekundäre Endosymbiose eines Rhodophyten entstanden vor ca. 1,3 Milliarden Jahren die Gruppe der Chromista (Cryptophyta, Haptophyta und Stramenopila) (Yoon *et al.*, 2002; 2004). Auch die Apicomplexa sind vermutlich durch sekundäre Endosymbiose eines Rhodophyten entstanden (McFadden *et al.*, 1997; Stoebe *et al.*, 1999; Fast *et al.*, 2001). Die Gruppe der Dinoflagellaten sind wahrscheinlich durch tertiäre Endosymbiose eines Haptophyten entstanden (Yoon *et al.*, 2002). Plastiden, die aus einer sekundären oder tertiären Endosymbiose hervorgegangen sind, besitzen drei oder vier Plastidenhüllmembranen (Cavalier-Smith, 2000). Im Verlauf der evolutionären Entwicklung hat der ursprüngliche cyanobakterielle Endosymbiont einen Großteil seiner Eigenständigkeit verloren. Dabei kam es durch lateralen Gentransfer (LGT) in den Zellkern (Martin *et al.*, 2002) zu einer rapiden Reduktion des Organellengenoms auf 5 - 10% der ursprünglichen Größe. Der Zellkern erhielt dadurch die genetische Kontrolle über das Organell. Diese Verlagerung von genetischer Information stellte den kritischen Schritt im Übergang vom Endosymbionten zum Organell dar (Dyall *et al.*, 2004). Obwohl die Maschinerie dieses Gentransfers noch immer aktiv ist (Millen *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003; Stegemann *et al.*, 2003), scheint dieser Prozess jedoch ein gewisses Plateau erreicht zu haben (Millen *et al.*, 2001; Adams und Palmer *et al.*, 2003; Dyall *et al.*, 2004). Vom Genom des cyanobakteriellen Vorfahren sind nur noch 60 - 200 proteinkodierende Gene im Plastom heutiger Pflanzen existent (Martin und Herrmann, 1998). Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält nach Analysen von Martin *et al.* (2002) etwa 4500 proteinkodierende Gene (~ 18% aller Gene) mit cyanobakteriellem Ursprung. Durch die Kodierung der Gene der ehemaligen Endosymbionten, aus denen Plastiden und Mitochondrien hervorgingen, im Zellkern, war es möglich, die entsprechenden Proteine auch in anderen Zellkompartimenten oder für neue Funktionen zu nutzen. So wird ein erheblicher Anteil der Proteine mit cyanobakteriellem Ursprung (ca. 50%) nicht in die Plastiden sondern in andere Zellkompartimente transportiert (Martin *et al.*, 2002). Umgekehrt stammt ein Teil der Enzyme des Calvin-Zyklus von der ehemaligen eukaryotischen Wirtszelle oder dem Endosymbionten, aus dem die Mitochondrien hervorgingen (Martin und Schnarrenberger, 1997; Martin und Herrmann, 1998). Trotzdem sind verschiedene ursprüngliche Eigenschaften und Funktionen des cyanobakteriellen Endosymbionten, wie z.B. Reproduktion, Replikation, Transkription, Translation, Ribosomen, t-RNAs, Transportsysteme und andere Stoffwechselfunktionen, in den Plastiden weitgehend erhalten geblieben. Weiterhin bestand

aber auch die Notwendigkeit für Innovation, Weiterentwicklung und Neukombination von bestehenden Systemen. Dies wird z.B. an der Maschinerie des Proteinimports für kernkodierte Proteine, den Proteinen des Lichtsammelkomplexes (LHC) oder an den Transportproteinen für Metabolite über die Plastidenhüllmembranen, deutlich. Obwohl nur noch ein geringer Teil der Gene höherer Pflanzen plastomkodiert sind, enthält das Proteom der Plastiden zwischen 1000 und 5000 Proteine (Martin *et al.*, 2002). Diese kernkodierten Gene werden im Cytosol synthetisiert und müssen im Anschluss über die Plastidenhüllmembranen in die Plastiden transportiert werden.

1.2 Die Plastiden höherer Pflanzen

Die Plastiden höhere Pflanzen sind durch eine doppelte Hüllmembran gekennzeichnet (Abb. 1.1). Dabei stammt die innere Hüllmembran vom cyanobakteriellen Endosymbionten ab. Die äußere Hüllmembran trägt sowohl Merkmale des Endosymbionten als auch der ehemaligen Wirtszelle (Kilian und Kroth, 2003). Vermutlich ist diese aber eukaryotischen Ursprungs (Cavalier-Smith, 2000; Joyard *et al.*, 1998) und stammt von der Plasmamembran der ehemaligen Wirtszelle ab (Heldt, 2003). Die beiden Hüllmembranen sind durch den Intermembranraum voneinander getrennt. Das Innere der Plastiden wird als Stroma bezeichnet. Im Falle der Chloroplasten enthält das Stroma ein inneres Membransystem, die Thylakoide. Sie sind der Ort der Lichtreaktion der Photosynthese und tragen Chlorophyll a und b. Die Thylakoide höherer Pflanzen werden in zwei Bereiche, die Stroma- und die

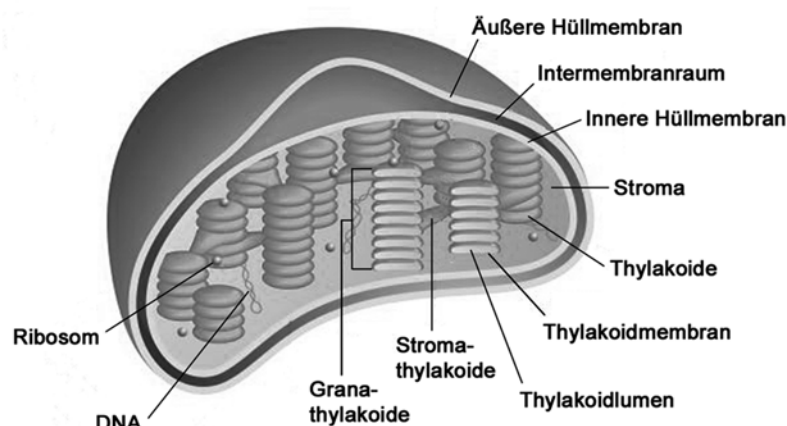


Abb.1.1:
Schematische Darstellung
des Aufbaus eines Chloro-
plasten.

Granathylakoide unterteilt. Die Thylakoidmembran umschließt einen weiteren Reaktionsraum, das Thylakoidlumen.

Plastiden sind mit wenigen Ausnahmen in fast jedem Zellentypen vorhanden, werden maternal vererbt und vervielfältigen sich durch Teilung. Aufgrund der Gewebedifferenzierung höherer Pflanzen treten die Plastiden in verschiedenen Struktur- und Funktionstypen auf. Dabei ist ihr Metabolismus eng mit der Funktion des entsprechenden Gewebes verknüpft.

Proplastiden oder Eoplasten sind sehr kleine ($\sim 1 \mu\text{m}$) undifferenzierte Plastiden und sind in meristematischen Zellen von Sproß und Wurzel sowie im embryonalen Gewebe der Samen vorhanden. Sie haben ein kaum differenziertes internes Membransystem, welches aus wenigen Tubuli besteht. Von ihnen stammen alle anderen Plastidentypen ab. Bei der Abwesenheit von Licht oder bei extrem geringen Lichtintensitäten wird die Entwicklung der Proplastiden zu Chloroplasten unterbrochen und die Plastiden verweilen im Stadium des Etioplasten. Etioplasten sind durch einen parakristallinen Prolamellarkörper gekennzeichnet (Gunning, 2001). Dieser besteht aus Protochlorophyllid a und Carotinoiden. Des Weiteren kann der Prolamellarkörper in geringem Maße auch Ribosomen und Plastoglobuli enthalten. Bei Belichtung geht aus dem Prolamellarkörper in sehr kurzer Zeit die Thylakoidmembran hervor. Im Licht findet diese Entwicklung direkt statt. Dabei entwickeln sich aus den Proplastiden ohne Verzögerung Chloroplasten.

Chloroplasten beinhalten das für die Photosynthese benötigte Chlorophyll und sind daher deutlich grünlich gefärbt. Sie sind neben ihrer Hauptfunktion, der Photosynthese, die metabolisch vielseitigsten Plastiden und beinhalten ca. 75% des Gesamtproteingehalts der Blätter (Peoples und Dalling, 1988). Des Weiteren können zum Teil starke strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen ihnen existieren, wie die Mesophyllchloroplasten von C_3 - und C_4 -Pflanzen oder Licht- und Schattenblättern verdeutlichen. Des Weiteren sind die Schließzellchloroplasten der Spaltöffnungen hervorzuheben, deren primäre Funktion nicht in der Photosynthese sondern in der Regulation des Öffnungsmechanismus der Stomata liegt.

Als Leukoplasten werden ausdifferenzierte nichtpigmentierte Plastiden zusammengefasst, denen zumeist Speicherfunktionen zukommen. Dabei werden generell drei unterschiedliche Formen von Leukoplasten: Amyloplasten, Elaioplasten (Elioplasten) und Proteinoplasten (Proteoplasten) unterschieden. Den Amyloplasten kommt die Funktion der Stärkespeicherung in nichtgrünen Geweben wie Wurzeln, Knollen, Samen und in pigmentierten Geweben des Stängels und der Früchte zu. Sie sind durch ein oder mehrere große Stärkekörner und ein kaum entwickeltes internes Membranensystem gekennzeichnet. Zusätzlich sind sie für die Lipidsynthese und die Nitratassimilation in nichtgrünen Geweben verantwortlich.

Elaioplasten dienen der Speicherung von Triacylglycerolen und Sterolestern, z.B. Monogalactosyldiacylglycerol (Hernandez-Pinozon *et al.*, 1999). Sie sind von runder Form und ihre innere Struktur wird durch viele Öltröpfchen gekennzeichnet. Von Bedeutung sind Elaioplasten vor allem bei der Pollenentwicklung (Ross *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2004). Proteoplasten zeigen kristalline oder amorphe Proteineinschlüsse, die von einer Membran umgeben sind. Dabei wird angenommen, dass Proteoplasten Ort der Speicherung von Proteinen sind, welches aber keinesfalls als eindeutig gesichert anzusehen wird (Thompson und Whatley, 1980).

Chromoplasten sind Plastiden, die durch ihren Gehalt an Carotinoiden eine rötliche, gelbliche oder orange Farbe aufweisen. Dabei können vier Feinbautypen globulöse, tubulöse, kristallöse und membranöse Chromoplasten unterschieden werden (Sitte *et al.*, 1991). Ihr Inneres zeichnet sich durch Carotinoid/Lipid-Tröpfchen und supramolekulare Strukturen, den sogenannten Fibrillen aus. Diese bestehen aus einem Carotinoid-Kern, einer Lipidschicht und einer äußeren Schicht von Fibrillin (Deruère *et al.*, 1994). Chromoplasten kommen in Früchten, Blüten, Blättern und bei einigen Pflanzen in der Wurzel vor. Dabei kommt Ihnen eine Rolle bei der Farbgebung zu, die bei der Attraktion von Bestäubern (Zoophilie) und der Samenverbreitung durch Tiere (Zoochorie) bedeutsam ist. In Früchten gehen Chromoplasten häufig aus Chloroplasten, in anderen Geweben hingegen direkt aus Proplastiden hervor.

Gerontoplasten entwickeln sich während der Seneszenz von Blattgewebe aus Chloroplasten. Sie sind jedoch biochemisch und metabolisch stark von diesen abzugrenzen. Der progressive Übergang von Chloroplasten zu Gerontoplasten ist durch einen fortschreitenden Abbau der Stapelung der Granathylakoide, der Auflösung der Thylakoidmembran und die Akkumulation von Plastoglobuli gekennzeichnet. Dieser Prozess ist ab einem bestimmten Schritt irreversibel. Dabei kommt den Gerontoplasten die Funktion der Degradierung der Photosynthesemaschinerie, der Photosynthesepigmente und der Lipide der Thylakoidmembran sowie deren Recycling zu. Mit Ausnahme von Gerontoplasten können sich alle Plastidenformen ineinander umwandeln.

s- und p-Typ Plastiden kommen in den Siebröhren des Phloems vor und dienen als Stärke- (s-Typ) oder Proteinspeicher (p-Typ) (Behnke, 1991). Ihre physiologische Funktion ist jedoch noch weitgehend unklar (van Bel, 2003). Die p-Typ Plastiden könnten eine Rolle bei Verschluss von beschädigten Siebröhren in Folge einer Verletzung zukommen.

1.3 Proteinimport in pflanzliche Plastiden

Ca. 95% der plastidären Proteine (~ 2,500) sind kernkodiert, werden im Cytosol translatiert und müssen über die Hüllmembranen in die Plastiden importiert werden (Leister, 2003). Die meisten plastidären Proteine verfügen über einen N-terminalen Peptidbereich, das sogenannte Transitpeptid (cTP), welches die Proteine zum Chloroplasten leitet und deren Import vermittelt. Dabei zeichnen sich Transitpeptide durch eine sehr hohe Heterogenität aus. Sie haben eine Länge von etwa 20 - 100 Aminosäureresten und eine positive Nettoladung. Im Fall der Chloroplasten müssen die entsprechenden Proteine in sechs Substrukturen die äußere Hüllmembran (OE, *outer envelope membrane*), den Intermembranraum, die innere Hüllmembran (IE, *inner envelope membrane*), das Stroma, die Thylakoidmembran und das Thylakoidlumen transportiert werden.

Während die meisten Proteine für das Innere der Chloroplasten über ein Transitpeptid verfügen, entbehren die meisten Proteine der äußeren Hüllmembran (OEP, *outer envelope proteins*) eine solche Sequenz. Zur Zeit sind noch keine Komponenten, die eine Integration von OEP in die äußere Hüllmembran vermitteln, bekannt. Daher wird eine spontane oder eine von cytosolischen Proteinen vermittelte Insertion dieser Proteine angenommen (Vothknecht und Soll, 2006). Aufgrund experimenteller Schwierigkeiten sind bisher kaum lösliche Proteine des Intermembranraums bekannt (Vothknecht und Soll, 2006). Daher kann über die Art des Transportmechanismus nur spekuliert werden. Auch die Insertion von Proteinen in die innere Hüllmembran ist noch nicht abschließend geklärt. Es werden jedoch zwei Mechanismen für möglich gehalten (Vothknecht und Soll, 2006). Zum einen könnte eine komplette Translokation über das Tic-Toc-Translokon (s.u.) stattfinden, das Transitpeptid abgeschnitten werden und anschließend eine Insertion des Proteins in die innere Hüllmembran vom Stroma aus erfolgen. Die Alternative wäre eine teilweise Translokation über das Tic-Toc-Translokon. Dabei würde die Translokation durch das Tic-Translokon nur soweit erfolgen, dass das Transitpeptid abgespalten werden kann und anschließend eine laterale Insertion des Proteins in die innere Hüllmembran vermittelt wird.

Der Transport über die Plastidenhüllmembranen wird durch ein Zusammenspiel von zwei multimeren Proteinkomplexen, dem Toc- (*translocon on the outer envelope membrane of chloroplasts*) und dem Tic-Translokon (*translocon on the inner envelope membrane of chloroplasts*), vermittelt. Der genaue Funktionsmechanismus dieses Transportmechanismus ist jedoch nur teilweise aufgeklärt. Da die Tic-Toc-Maschinerie nur ungefaltete Proteine transportieren kann, sind auch cytosolische Proteine des sogenannten *guidance complex*, wie

Hsp70 und 14-3-3, für die Führung und die Unterbindung einer vorzeitigen Faltung der plastidären Proteine bedeutsam. Die Komponenten des Toc-Translokons sind Toc159, Toc75, Toc34, Toc64 und Toc12. Toc159, Toc75 und Toc34 stellen die Kerneinheit dar, an die Toc64 und Toc12 assoziiert sind (Schnell *et al.*, 1997; Sohr und Soll, 2000; Becker *et al.*, 2004). Toc75 ist tief in die Membran eingebettet und bildet eine β -barrel-Struktur aus 16 transmembranen β -Faltblättern aus (Hinnah *et al.*, 1997; 2002; Sveshnikova *et al.*, 2000). Somit stellt Toc75 die Translokationspore dieses Komplexes dar. Toc159 und Toc34 haben eine GTP-Bindungsstelle und werden als Rezeptoren für die zu transportierenden Präproteine angesehen. *A. thaliana* besitzt für viele dieser Komponenten verschiedene Isoformen mit zum Teil Substratspezifitäten (Jackson-Constan und Keegstra, 2001). Für Toc34 existieren zwei unterschiedliche Formen, AtToc33 und AtToc34 (Jarvis *et al.*, 1998; Gutensohn *et al.*, 2000). Von Toc159 und Toc75 sind jeweils vier Isoformen, AtToc159, AtToc132, AtToc120 und AtToc90 bzw. AtToc75-I, -II, -III und -IV, bekannt (Jarvis *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2000; Jackson-Constan und Keegstra, 2001). Vom Tic-Translokons sind bislang sieben Komponenten, Tic110, Tic62, Tic55, Tic40, Tic32, Tic22 und Tic20, identifiziert (Jarvis und Soll, 2002; Kuchler *et al.*, 2002; Hörmann *et al.*, 2004). Die exakte Komposition des Tic-Translokons ist allerdings noch unklar (Vothknecht und Soll, 2006). Tic110 wird als Importpore angesehen. Tic62, Tic55 und Tic32 besitzen redoxregulierte Motive und sind vermutlich an der Regulation des Transportprozesses beteiligt. Tic20 ist ein kleines integrales Membranprotein und mit Tic110 assoziiert. Es wird daher es als ein Teil der Translokationspore in Verbindung mit Tic110 oder als alternative Pore diskutiert (Soll, 2002). Tic22 ist an die Oberfläche der inneren Hüllmembran zum Intermembranraum lokalisiert und mit Tic20 assoziiert. Es könnte eine Aufgabe bei der Insertion von Proteinen in die innere Hüllmembran haben (Nada und Soll, 2004). Für Tic40 wird eine Funktion als Chaperon-Bindungsprotein im Translokationsprozess vermutet.

Nach der Translokation des Proteins wird dessen Transitpeptid durch die im Stroma lokalisierte Metallo-Peptidase, SPP (*stromal processing peptidase*), vom restlichen Protein abgeschnitten und anschließend durch eine weitere Metallo-Peptidase (*transit peptide subfragment-degrading enzyme*) komplett abgebaut (Oblong und Lamppa, 1992; Richter und Lamppa, 1999).

Die importierten Proteine können je nach ihrer Funktion im Stroma verbleiben oder intraplastidär in die Thylakoidmembran oder das Thylakoidlumen weitertransportiert werden. Für diesen Transport sind vier Mechanismen, namentlich der *signal recognition particle pathway*, der *Sec pathway*, der *twin arginine translocation pathway* und der *spontaneous*

insertion pathway, bekannt (Jarvis und Robinson, 2004; Robinson und Mant, 2005). Für die Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran sind der *signal recognition particle pathway* und der *spontaneous insertion pathway* verantwortlich. Für den *signal recognition particle pathway* werden zwei lösliche Komponenten cpSRP54 und cpSRP43, die sogenannten *signal recognition particle* (SRP), und cpFtsY im Stroma benötigt (Schünemann *et al.*, 1998; Kogata *et al.*, 1999). Für Ihre Funktion benötigen die cpSRPs und cpFtsY GTP. Die Insertion von Proteinen erfolgt anschließend durch das Membranprotein ALB3 (Moore *et al.*, 2000). Für einige Proteine der *light-harvesting chlorophyll-binding protein* (LHCP), wie Proteine Lhcb1, Lhcb4.1 und Lhcb5, wurde eine Insertion in die Thylakoidmembran über den *signal recognition particle pathway* nachgewiesen (Cline, 1986; Woollhead *et al.*, 2001). Der Großteil der Proteine der Thylakoidmembran scheint jedoch über den *spontaneous insertion pathway* integriert zu werden. Dieser Mechanismus bedarf keiner Energie (Moore, 2003).

Die Translokation über die Thylakoidmembran ins Thylakoidlumen erfolgt durch die Mechanismen des *Sec pathway* oder des *twin arginine translocation pathway*. Proteine dieser Translokationswege weisen eine zweiteilige Präsequenz auf. Sie besteht aus dem N-terminalen Transitpeptid (cTP) für den Chloroplastenimport und einer nachfolgenden Erkennungssequenz (ITP) für den jeweiligen Translokationsweg. Diese zweite Erkennungssequenz wird nach der Translokation von einer Peptidase (*thylakoid processing peptidase*, TPP) im Thylakoidlumen abgespalten.

Der *Sec pathway* kann nur ungefaltete Proteine transportieren und ist mit ATP-Verbrauch verbunden. Dieser Weg beinhaltet die zwei membrangebundenen Komponenten SecY und SecE sowie die lösliche Komponente SecA (Schünemann *et al.*, 1999). Durch ATP-Hydrolyse ist SecA in der Lage, sich und das zu transportierende Protein in die Thylakoidmembran zu integrieren. Ob SecY, SecE oder weitere noch unbekannte Proteine dabei die Translokationspore bilden, ist unbekannt.

Der *twin arginine translocation pathway* kann gefaltete Proteine transportieren und benötigt einen Protonengradienten (ΔpH) an der Thylakoidmembran. Für diesen Mechanismus wurden bisher drei Proteine, Hcf106, Tha4 und cpTatC, identifiziert. Der exakte Funktionsmechanismus ist noch nicht genau bekannt. Hcf106 und cpTatC dienen vermutlich als Rezeptoren, während Tha4 die Translokation ins Thylakoidlumen vermittelt (Cline und Mori, 2001).

Neuere Untersuchungen weisen auf die Existenz eines fünften Proteintransportmechanismus von der inneren Hüllmembran zur Thylakoidmembran hin, welcher durch Vesikeltransport vermittelt wird. Hinweise dafür liefert eine Mutante für das Protein VIPP1 (*vesicle-inducing*

in plastid protein 1), welche durch einen verminderten intrachloroplastidären Lipidtransport gekennzeichnet ist (Kroll *et al.*, 2001).

1.4 Die Funktionen der Plastiden in der Pflanzenzelle

Im Folgenden wird auf einige essentielle Funktionen der Plastiden für die Pflanzenzelle und deren Metabolismus näher eingegangen werden. Dabei soll nur ein kurzer Überblick über einige wichtige plastidäre Stoffwechselwege und deren Bedeutung aufgezeigt werden.

1.4.1 Photosynthese

Die Photosynthese kann formal in zwei Schritte, die Primär- bzw. Lichtreaktion und die Sekundär- bzw. Dunkelreaktion, unterteilt werden. Bei der Primärreaktion werden unter Nutzung der Lichtenergie der Energieträger ATP und Reduktionsäquivalente in Form von NADPH gebildet. Diese werden in der Sekundärreaktion, auch Calvin-Zyklus genannt, unter Fixierung von CO₂ zum Aufbau von Kohlenhydraten genutzt.

Die Primärreaktion der Photosynthese findet in bzw. an der Thylakoidmembran statt. An dieser Reaktion sind vier supramolekulare Proteinkomplexe beteiligt: das Photosystem I (PSI), das Photosystem II (PSII), der Cytochrom-*b₆/f*-Komplex und die ATP-Synthase, welche ungleichmäßig über die Thylakoidmembran verteilt vorliegen. Das PSI und die ATP-Synthase sind hauptsächlich in den Stromathylakoiden und den Randbereichen der Granathylakoide lokalisiert, was einen freien Zugang von ADP und NADP⁺ ermöglicht. Dahingegen befindet sich das PSII vorwiegend in den Granathylakoiden. Diese Anordnung verhindert einen unkontrollierten Excitonentransfer zwischen den beiden Photosystemen. Der Cytochrom-*b₆/f*-Komplex ist gleichmäßig über die Thylakoidmembran verteilt und vermittelt über Plastochinon und Plastocyanin den Elektronentransport vom PSII zum PSI.

An die Photosysteme sind die Lichtsammelkomplexe (LHCs) der äußeren und inneren Antennen assoziiert, welche die Absorption von Lichtquanten und den Excitonentransfer zum Reaktionszentrum der beiden Photosysteme (P680 für das PSII bzw. P700 für das PSI) vermitteln. Die Reaktionszentren werden dadurch in den angeregten Zustand überführt, was diese zu einer Ladungstrennung befähigt. Durch die Ladungstrennung am Reaktionszentrum

von PSII wird zunächst das festgebundene Plastochinon Q_A und durch dieses das lose gebundene Plastochinon Q_B reduziert. Die dadurch am PSII Reaktionszentrum entstandene Elektronenlücke wird durch die oxidative Spaltung von Wasser (Photolyse) ausgeglichen, was zur Freisetzung von Sauerstoff und Protonen im Lumen führt. Das lose gebundene Plastochinon Q_B ist durch Diffusion in der Thylakoidmembran frei beweglich. Das vom PSII reduzierte Plastochinon wird durch den Cytochrom-*b₆/f*-Komplex schrittweise oxidiert, wobei Protonen in das Thylakoidlumen transportiert werden. Die Elektronen werden vom Cytochrom-*b₆/f*-Komplex auf Plastocyanin (PC) übertragen, welches im Lumen zur Akzeptorseite des PSI diffundiert. Das durch Licht angeregte PSI katalysiert den Elektronentransfer von der Lumenseite zur Stromaseite der Thylakoidmembran von PC zu Ferredoxin (Fd). Der weitere Elektronentransfer von Fd zu $NADP^+$ wird durch Ferredoxin-NADP-Reduktase im Stroma katalysiert, wodurch NADPH als Endprodukt des photosynthetischen Elektronentransports entsteht. Durch die lichtgetriebenen Spaltung von Wasser, die Reduktion von $NADP^+$ und die Verlagerung von Protonen während des Elektronentransports in das Lumen wird ein Protonengradient (ΔpH) an der Thylakoidmembran generiert. Dieser Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt.

Die Sekundärreaktion der Photosynthese ist im Stroma der Chloroplasten lokalisiert. In ihr werden die in der Lichtreaktion synthetisierten Energieträger bzw. Reduktionsäquivalente ATP und NADPH zur Bildung von Kohlenhydraten durch die Assimilation von CO_2 verwendet. Dabei wird die Sekundärreaktion in drei Phasen eingeteilt: die carboxylierende Phase, die reduzierende Phase und die regenerierende Phase.

In der carboxylierenden Phase wird durch die Aktivität der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) CO_2 an Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) gebunden. Dabei entsteht das instabile Zwischenprodukt 2-Carboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisphosphat, welches hydrolytisch zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (3-PGA) gespalten wird. Diese Reaktion stellt die Schlüsselfunktion für die photosynthetische CO_2 -Assimilation dar.

Das gebildete 3-PGA wird in der reduzierenden Phase unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Phosphoglycerat-Kinase zu 1,3-Bisphosphoglycerat phosphoryliert, welches anschließend unter Verbrauch von NADPH durch die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase zum Triosephosphat Glycerinaldehyd-3-phosphat reduziert wird. Die Triosephosphat-Isomerase katalysiert anschließend die reversible Isomerisierung des Glycerinaldehyd-3-phosphats zu Dihydroxyacetonphosphat. Es kann jedoch nur jedes sechste

Triosephosphatmolekül aus dem Kreislauf entzogen und als Nettogewinn der CO₂-Assimilation angesehen werden. Dieses Triosephosphat kann über den Triosephosphat/Phosphat-Translokator in das Cytosol transportiert werden, wo es in die Saccharosesynthese eingeht, oder der intraplastidären Synthese von transitorischer Stärke dienen. Die fünf restlichen Moleküle Triosephosphat fließen in die regenerierende Phase ein. In dieser erfolgt die Rückgewinnung von RuBP aus den Triosephosphaten. Dadurch wird ein kontinuierlicher Ablauf des Calvin-Zyklus sichergestellt. Durch das Enzym Aldolase werden jeweils ein Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat zu Fruktose-1,6-bisphosphat verknüpft, welches durch die Fruktose-1,6-bisphosphatase anschließend dephosphoryliert wird. Durch das Enzym Transketolase werden von einem Molekül Fruktose-6-phosphat zwei Kohlenstoffatome auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen, wobei ein Molekül Xylulose-5-phosphat und ein Molekül Erythrose-4-phosphat entstehen. Anschließend katalysiert die Aldolase eine Kondensation von Erythrose-4-phosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat und es entsteht Sedoheptulose-1,7-bisphosphat, welches zu Sedoheptulose-7-phosphat dephosphoryliert wird. Danach werden durch die Transketolase zwei Kohlenstoffatome von Sedoheptulose-7-phosphat auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen. Dabei entstehen jeweils ein Molekül Ribose-5-phosphat ein Molekül Xylulose-5-phosphat. Bei den bisherigen Reaktionsschritten wurden zwei Moleküle Xylulose-5-phosphat und ein Molekül Ribose-5-phosphat erhaltenen, die durch die Ribulosephosphat-Epimerase bzw. die Ribosephosphat-Isomerase zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt werden. Die Moleküle Ribulose-5-phosphat werden abschließend unter Verbrauch von ATP durch die Aktivität der Ribulosephosphat-Kinase zu RuBP umgewandelt, wodurch der Calvin-Zyklus geschlossen wird.

1.4.2 Photorespiration

Die Photorespiration oder C₂-Zyklus (engl. *C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle*) ist Folge der Oxygenase-Aktivität der RubisCO (Husic *et al.*, 1987; Tolbert, 1997). Das Verhältnis der Oxygenierung zu Carboxylierung beträgt in etwa 1:3. Als Produkt dieser Reaktion entsteht aus einem Molekül Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) jeweils ein Molekül 3-Phosphoglycerat (3-PGA) und ein Molekül 2-Phosphoglycolat (2-PG). Durch die Photorespiration wird aus 2-PG 3-PGA für den Calvin-Zyklus zurückgewonnen. Der C₂-Zyklus erfolgt jedoch unter erheblichem Mehraufwand an Energie, von über 50% in Form

von ATP und NADPH, und dem Verlust von jeweils einem Molekül an fixiertem CO_2 und NH_4^+ . Bei dieser Rückgewinnung von 2-PG sind 16 verschiedene Enzyme und vermutlich sechs Translokatorproteine beteiligt, die auf drei Kompartimente, nämlich die Chloroplasten, die Peroxisomen und die Mitochondrien, verteilt vorliegen. Im ersten Schritt wird 2-PG im Stroma der Chloroplasten durch die Glycolatphosphatase zu Glycolat hydrolysiert, das anschließend in die Peroxisomen transportiert wird. Dort wird das Glycolat zunächst durch die Glycolat-Oxidase oxidiert, wobei Glyoxylat und Wasserstoffperoxid gebildet werden. Danach findet eine Transaminierung des Glyoxylat zu Glycin durch die Aktivität der Glutamat- oder der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase statt. Zwei Moleküle des entstandenen Glycins werden dann in den Mitochondrien durch die Zusammenarbeit des Glycin-Decarboxylase-Komplexes (H-, P-, T- und L-Protein) und der Serin-Hydroxymethyl-Transferase zu jeweils einem Molekül Serin, CO_2 und NH_4^+ oxidiert. Anschließend wird Serin in den Peroxisomen durch die schon erwähnte Serin-Glyoxylat-Aminotransferase zu Hydroxypyruvat und anschließend weiter zu D-Glycerat umgesetzt. Den letztgenannten Schritt katalysiert dabei die Hydroxypyruvat-Reduktase. Durch die Aktivität der Glycerat-Kinase wird abschließend aus D-Glycerat in den Chloroplasten 3-PGA synthetisiert, welches in den Calvin-Zyklus einfließt. Über die Transportproteine, die den Metabolitaustausch über die verschiedenen Membranen der an der Photorespiration beteiligten Kompartimente gewährleisten, ist wenig bekannt (Weber, 2006). Die Existenz eines Transporters für Austausch von Glyoxylat gegen D-Glycerat konnte für die Chloroplastenhüllmembran nachgewiesen werden (Howitz und McCarty, 1985a, b; 1991). Die molekulare Identität dieses Proteins ist jedoch noch nicht geklärt. Allerdings wird derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Weber ein vielversprechender Kandidat für diesen Transportprozess untersucht. Für den Austausch von Metaboliten über die Membran der Peroxisomen werden Porine vermutet (Douce und Neuburger, 1999). Auch für den Transport von Glycin und Serin über die Mitochondrienmembran sind keine Proteine bekannt (Douce und Neuburger, 1999; Weber, 2006). Für den Glycin-Transport wurde vor kurzem in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Weber ein vielversprechender Kandidat identifiziert. Durch die Transaminierung von Glyoxylat und die Freisetzung von NH_4^+ am Glycin-Decarboxylase-Komplex besteht in Pflanzen eine enge Verknüpfung der Photorespiration mit dem Stickstoffmetabolismus. Der Export des in den Peroxisomen benötigten Glutamats aus den Chloroplasten und der Import von α -Ketoglutarat für die Glutamatsynthese wird von den Translokatoren DiT1 und DiT2 vermittelt. Dafür wurde ein Transport mittels eines Zwei-Translokatormodell vorgeschlagen (Woo und Osmond, 1987; Weber und Flüge, 2002). Ob das in den Mitochondrien

freiwerdende NH_4^+ zur Glutaminsynthese über Diffusion oder spezifische Ionenkanäle in die Chloroplasten gelangt, ist ebenfalls noch ungeklärt (Douce und Neuburger, 1999). Die in den Peroxisomen zur Reduktion von Hydroxypyruvat benötigten Reduktionsäquivalente werden durch den sogenannte Malat-Oxalacetat-Shuttle von den Mitochondrien und Chloroplasten bereitgestellt (Heldt, 2003).

Die gezielte Suche und Analyse von photorespiratorischen Mutanten in *A. thaliana* aber auch weiteren Pflanzen, welche unter atmosphärischen CO_2 -Bedingungen konditionell letal aber unter erhöhten CO_2 -Bedingungen überlebensfähig sind, führte zur Identifizierung vieler photorespiratorischer Enzyme und der Aufklärung ihrer Funktion und Bedeutung in der Photorespiration (Somerville und Ogren, 1979, Somerville und Ogren, 1981; Somerville, 1986; Blackwell *et al.*, 1988; Wingler *et al.*, 1997; Wingler *et al.*, 1999; Somerville *et al.*, 2001; Renne *et al.*, 2003; Boldt *et al.*, 2005; Voll *et al.*, 2006).

Die Photorespiration kann jedoch nicht nur unter dem Gesichtspunkt einer aufwendigen Nebenreaktion aufgrund der Oxygenase-Aktivität der RubisCO gesehen werden. Vielmehr ist sie durch den in der englischsprachigen Literatur verwendeten Ausspruch „*wasteful but useful*.“ gekennzeichnet (Douce und Neuburger, 1999; Wingler *et al.*, 2000). Dabei wird der Photorespiration eine bedeutende Rolle bei der Energiedissipation und der Vermeidung von Photoinhibition, z.B. unter Streßbedingungen, zugesprochen (Osmond *et al.*, 1997; Wingler *et al.*, 2000). Weiterhin wird durch die Photorespiration eine Vielzahl von bedeutenden Metaboliten, z.B. Serin und Glycin generiert. Glycin ist vor allem für die Synthese der antioxidativen Substanz Glutathion von Bedeutung.

1.4.3 Nitrat- und Sulfatassimilation

Stickstoff stellt neben Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff einen hohen Anteil des Trockengewichts von Pflanzen (Taiz und Zeiger, 2002). Dabei ist er vor allem in organischen Verbindungen wie Aminosäuren, Proteinen, Nukleosiden, Nukleinsäuren und verschiedenen Cofaktoren bedeutsam. Stickstoff wird von Pflanzen vornehmlich in Form von Nitrat oder Ammonium über die Wurzel aufgenommen. Die Nitrataufnahme in Pflanzen erfolgt durch Plasmamembran-lokalisierte Nitrattransporter, die in den Epidermis- und Cortexzellen der Wurzel lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um einen sekundäraktiven Symport von Nitrat und Protonen, der vom Protonengradienten an der Plasmamembran angetrieben wird. Die Nitrataufnahme wird durch Nitrattransporter der NNP- und POT-

Familie vermittelt (Forde, 2000). Das aufgenommene Nitrat wird entweder sofort zu Nitrit reduziert, in der Vakuole gespeichert oder über das Xylem in die Blätter transportiert. Die daran beteiligten Transporter sind noch nicht identifiziert. Die Assimilation von Nitrat findet sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern statt. Dabei wird das aufgenommene Nitrat zunächst im Cytosol durch die Aktivität der Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Danach erfolgt der Transport von Nitrit in die Plastiden. Dieser Transport könnte nach neusten Untersuchungen von Sugiura *et al.* (2007) durch ein Transportprotein der POT-Familie vermittelt zu werden. Im Stroma der Chloroplasten reduziert die Nitritreduktase Nitrit zu Ammonium. Die Fixierung des Ammoniums erfolgt durch die Glutamin-Synthetase (GS) und die Glutamatsynthase (Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase, GOGAT) im sogenannten GS/GOGAT-Zyklus. Dabei kommt der Refixierung des in der Photorespiration freiwerdenden Ammoniums eine besondere Bedeutung zu. Durch die GS wird Ammonium unter Verbrauch von ATP auf Glutamat übertragen, und es entsteht Glutamin. Das gebildete Glutamin wird anschließend mit α -Ketoglutarat durch die GOGAT zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt. Diese Reaktion findet unter Verbrauch von sechs Reduktionsäquivalenten in Form von Ferredoxin (Fd) oder NAD(P)H statt. Die Reduktionsäquivalente werden in den Chloroplasten durch die Photosynthese und in den Leukoplasten durch den oxidativen Pentosephosphatweg bereitgestellt. Für die GOGAT ist eine Ferredoxin-abhängige (Fd-GOGAT) Isoform, die Hauptform photosynthetischer Gewebe, und eine NADH-abhängige (NADH-GOGAT) Isoform, die Hauptform nichtphotosynthetischer Gewebe, bekannt (Lancien und Lea, 2006). Der genaue enzymatische Weg zur Bereitstellung von α -Ketoglutarat ist noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen (Lancien *et al.*, 2000; Lemaitre *et al.*, 2007). Da aber α -Ketoglutarat oder Vorstufen davon im Cytosol und/oder den Mitochondrien synthetisiert werden und das Endprodukt der Ammoniumassimilation, Glutamat, exportiert wird, besteht die Notwendigkeit für ein plastidäres Transportsystem. Für diesen Transportprozess wurden ein Zwei- und ein Drei-Translokatormodell vorgeschlagen, in welchen die plastidären Translokatoren DiT1 und DiT2 bzw. DiT1, DiT2 und der Glutamin/Glutamat-Translokator involviert sind (Woo *et al.*, 1987; Weber und Flügge, 2002).

Schwefel ist essentieller Bestandteil von Proteinen, in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin, und von Antioxidanzien (Glutathion), Sulfolipiden (SQDG), sekundären Pflanzenstoffen (Glukosinolate) sowie von Vitaminen und Cofaktoren (Biotin, Thiamin, CoA, S-Adenosyl-Met). Der Schwefel wird dabei hauptsächlich als anorganisches Sulfat über die Wurzel aufgenommen. Weiterhin ist Sulfat die Hauptspeicher- und Transportform für den

Schwefel innerhalb der Pflanze. Die Aufnahme und Verteilung von Sulfat innerhalb der Pflanze wird dabei von einer Gruppe membrangebundener Sulfattransporter, den sogenannten Sultr realisiert (Bucher *et al.*, 2004). Auf der Basis von Aminosäurevergleichen wurden diese Sulfattransporter in fünf Gruppen eingeteilt (Aravind und Koonin, 2000; Hawkesford, 2003). Die Sulfataufnahme in den Symplasten wird in *A. thaliana* durch hochaffine Transporter der Gruppe 1 (AtSultr1;1, AtSultr1;2), welche in der Plasmamembran von Epidermis- und Cortexzellen der Wurzel lokalisiert sind, vermittelt (Takahashi *et al.*, 2000; Shibagaki *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2002; Howarth *et al.*, 2003). Die Aufnahme von Sulfat ist ein sekundäraktiver Transportsmechanismus, bei dem ein Symport von Protonen und Sulfat stattfindet. Er wird von dem Protonengradienten an der Plasmamembran, der von einer ATPase generiert wird, angetrieben. Die niederaffinen Sulfattransporter AtSultr2;1 und AtSultr2;2 der Gruppe 2 und der hochaffine Transporter AtSultr1;3 der Gruppe 1, welche in den Zellen des Xylem-Parenchyms und des Phloems der Wurzel und des Blattes exprimiert sind, sind an der Sulfatverteilung innerhalb der Pflanze beteiligt (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2003). Die Transporter der Gruppe 4 sind im Tonoplast lokalisiert und scheinen am Transport von Sulfat aus der Vakuole, welche der intrazelluläre Speicherort von Sulfat ist, beteiligt zu sein (Kataoka *et al.*, 2004). Über die Funktion der Sulfattransporter der Gruppe 3 und 5 ist derzeit nichts bekannt. In Pflanzen erfolgt die Sulfatassimilation hauptsächlich in den Plastiden, vorwiegend in den Chloroplasten, aber in geringerem Umfang auch in den Plastiden der Wurzel. Das plastidäre Transportsystem für die Aufnahme von Sulfat ist zur Zeit noch nicht identifiziert (Hawkesford, 2003; Buchner *et al.*, 2004). Im Stroma der Chloroplasten muß das Sulfat aufgrund seines relativ hohen Redoxpotentials zunächst durch die ATP-Sulfrylase und ATP aktiviert werden. Das entstandene AMP-Sulfat (APS) wird zum Großteil durch die APS-Reduktase unter Verwendung von Glutathion (GSH) zu Sulfit und AMP umgesetzt. Es kann aber auch durch die APS-Kinase zu Phosphoadenosin-Phosphosulfat (PAPS) phosphoryliert werden, welches als Sulfatdonor für Brassinosteroide, Glukosinolate und Flavonide dient. Die Sulfit-Reduktase reduziert anschließenden unter Verwendung von sechs Molekülen Ferredoxin Sulfit zu Sulfid. Des Weiteren wird Sulfit auch für die Synthese von Sulfolipiden genutzt. Durch die Aktivität der O-Acetylserin-(thiol)-Lyase wird Sulfid und O-Acetylserin zu Cystein und Acetat umgesetzt. Das entstandene Cystein wird zur Synthese von Methionin, Glutathion und Proteinen genutzt. Weiterhin dient Cystein als Schwefeldonor für Fe-S-Zentren, Biotin, Thiamin, Molybdän-Cofaktoren und CoA.

1.4.4 Aminosäuresynthese

Pflanzen sind in der Lage, alle zwanzig proteinogenen Aminosäuren *de novo* zu synthetisieren. Auf die Synthese von Glutamat, Glutamin und Cystein wurde bereits im Zusammenhang mit der Nitrat- und Sulfatassimilation eingegangen (Kap. 1.4.3). Die Aminosäuren Arginin und Prolin werden aus Glutamat synthetisiert. Das bei der Photorespiration gebildete Phosphoglycolat ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Glycin und Serin. In nichtgrünen Geweben können Glycin und Serin auch aus 3-Phosphoglycerat gebildet werden (Heldt, 2003). Alanin und Aspartat werden durch Transaminierung von Pyruvat bzw. Oxalacetat unter Verwendung von Glutamat synthetisiert. Die Aminosäure Asparagin wird hauptsächlich in der Wurzel aus Aspartat mit Glutamin als NH_2 -Donor gebildet. Die Biosynthese der Aminosäuren Lysin, Threonin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Valin, Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Cystein, Glutamat und Glutamin findet ausschließlich oder größtenteils in den Plastiden statt (Lancien und Lea, 2006). Dabei ist Aspartat die Vorstufe für die Synthese von Lysin, Threonin, Methionin und Isoleucin. Der letzte Schritt der Methionin Synthese findet jedoch im Cytosol statt. Dafür wird Homocystein über einen nicht bekannten Transporter exportiert und mit Methylentetrahydrofolat durch die Methionin-Synthase zu Methionin umgesetzt. Die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin erfolgt ausgehend von Pyruvat und für Isoleucin ausgehend von Threonin. Über den plastidär lokalisierten Shikimatweg werden die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet (Herrmann, 1995; Herrmann und Weaver, 1999). Vorläufer sind dabei Erythrose-4-Phosphat (Ery-4-P) aus dem Calvin-Zyklus und Phosphoenolpyruvat (PEP), welches über den Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) aus dem Cytosol importiert wird (Streatfield *et al.*, 1999; Knappe *et al.*, 2003b; Voll *et al.*, 2003). Im Shikimatweg wird aus Ery-4-P zunächst schrittweise Shikimat gebildet und dieses mit PEP in Chorismat umgewandelt. Aus Chorismat werden dann die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan synthetisiert (Lancien und Lea, 2006). Zahlreiche auxotrophe Mutanten und die Hemmung verschiedener Synthesewege durch Herbizide, z.B. Glyphosat (Round up[®]) oder Chlorsulfuron (Glean[®]), belegen die Bedeutung der plastidären Aminosäuresynthese (Wright *et al.*, 1992; Radwanski und Last, 1995; Craciun *et al.*, 2000).

1.4.5 Lipidsynthese

Polare Glycerolipide sind amphiphile Moleküle, können Lipiddoppelschichten bilden und sind die Grundbausteine jeder biologischen Membran. Triacylglyceride dienen Pflanzen als Kohlenstoffspeicher, z.B. in Samen, wo sie in sogenannten Ölkörpern eingelagert sind.

Die Neusynthese von Fettsäuren erfolgt bei Pflanzen in grünen Geweben im Stroma der Chloroplasten bzw. im Stroma der Leukoplasten und Chromoplasten in nichtgrünen Geweben. Nur ein sehr geringer Anteil wird in den Mitochondrien synthetisiert (Ohlrogge *et al.*, 1979). Da Fettsäuren nicht über lange Strecken transportiert werden können, dienen sie, außer in Samen und Früchten, dem Eigenbedarf der jeweiligen Zelle. Die Produkte der Fettsäuresynthese und der plastidären Stearoyl-ACP-Desaturase sind Acylreste der Länge 16:0, 18:1 und in sehr geringem Maße Acylreste der Länge 18:0. Diese sind dabei an das *acyl carrier protein* (ACP) gebunden. Für die anschließende Metabolisierung der Fettsäuren außerhalb der Plastiden erfolgt eine hydrolytische Abspaltung von ACP durch die Acyl-ACP-Thioesterase und ein Export der Fettsäuren über die Plastidenhüllmembranen. Dabei ist nicht bekannt, ob der Export durch unspezifische Diffusion oder ein spezifisches Transportproteine erfolgt (Heldt, 2003). An der äußeren Hüllmembran werden die freien Fettsäuren sofort durch die Acyl-CoA-Synthase zu Acyl-CoA umgesetzt.

Bei der Synthese von Glycerolipiden in Pflanzen kann zwischen dem prokaryotischen Syntheseweg der Plastiden und dem eukaryotischen Syntheseweg des endoplasmatischen Retikulums (ER) entsprechend ihrer evolutionären Herkunft unterschieden werden. Im plastidären Weg erfolgt die Synthese der Glycerolipide durch eine direkte Übertragung der Acylreste von Acyl-ACP auf Glycerin-3-Phosphat. Diese werden dementsprechend als prokaryotischen Lipide bezeichnet. Beim eukaryotischen Weg, der am ER abläuft, wird für die Übertragung des Acylrestes auf Glycerol-3-Phosphat Acyl-CoA verwendet. Der größte Teil des Glycerol-3-Phosphats für die Lipidsynthese im Plastidenstroma sowie im Cytosol entsteht durch die Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) aus Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) und stammt aus der Glykolyse. Für beide Wege existieren jeweils zwei Enzyme, die bestimmte Acylreste auf die C-1- (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*, GPAT) bzw. C-2-Position (*lysophosphatidic acid acyltransferase*, LPAAT) von Glycerol-3-Phosphat übertragen. Dabei werden im prokaryotischen Weg in den Plastiden überwiegend 18:1-Acylreste auf die C-1-Position und 16:0 oder 18:1-Acylreste auf die C-2-Position übertragen, und es entsteht Phosphatidsäure (Frentzen, 1993). Beim eukaryotischen Weg am ER werden 16:0 oder 18:1-Acylreste an der C-1-Position und 18:1-Acylreste an der

C-2-Position verestert (Frentzen, 1993). Durch Dephosphorylierung der Phosphatidsäuren in der ER-Membran entsteht Diacylglycerin (DAG), welches dann mit CDP-Cholin zu Phosphatidylcholin (Lecithin) umgesetzt wird. Durch weitere Desaturierungen in der ER-Membran werden 18:2 und 18:3-Acylreste generiert, welche gegen die Acylreste des Phosphatidylcholin ausgetauscht werden können. Auch die Kettenverlängerung von Fettsäuren (C₂₀ bis C₂₄) für Wachse findet durch Elongasen am ER statt. Ein Teil der Phosphatidsäuren und des Phosphatidylcholins wird wiederum in die Plastiden zurücktransportiert. An den Hüllmembranen der Plastiden werden die Phosphatidsäuren des pro- und eukaryotischen Weges mit UDP-Sulfochinovose und UDP-Galactose zu Phosphatidylglycerol (PG), Sulfolipiden (Sulfochinovosyldiacylglycerol, SQDG) bzw. Glactolipiden (Monogalactosyldiacylglycerol, MGDG; Digalactosyldiacylglycerol, DGDG) umgesetzt. Der Transport dieser Lipide von der Hüll- zur Thylakoidmembran verfolgt vermutlich über Vesikeltransport. Eine Mutation des VIPP1-Proteins verhindert einen korrekten Aufbau der Thylakoidmembran durch eine Verringerung dieses Lipidtransports (Kroll *et al.*; 2001). Es wird dabei angenommen, dass VIPP1 kritisch für den Vesikeltransport und -transport an der inneren Hüllmembran ist.

Das Vorkommen von MGDG, DGDG und SQDG beschränkt sich fast ausschließlich auf phototrophe Organismen. Röntgenstrukturanalysen des PSI, des LHCI und des Cytochrom-*b₆/f*-Komplexes zeigen eine enge Assoziation von PG, MGDG, DGDG und SQDG mit diesen photosynthetischen Proteinkomplexen an (Jordan *et al.*, 2001 *et al.*, Stroebel 2003; Liu *et al.*, 2004). Das spricht für eine entscheidende Rolle dieser Glycolipide für die Leistungsfähigkeit der Photosynthese. Verschiedene Mutanten von *A. thaliana*, die in der Synthese dieser Substanzen beeinträchtigt sind, belegen diese Annahme. Die *mgd1*-Mutante, welche in der Synthese von MGDG betroffen ist, zeichnet sich durch einen mehr als 50% verringerten MGDG-Gehalt und eine damit verbundene Reduktion der Thylakoidmembranen sowie des Chlorophyllgehalts aus (Jarvis *et al.*, 2000). Die Mutante *dgd1* sowie die *dgd1 dgd2*-Doppelmutante, welche in den DGDG-Synthesegenen mutiert sind, zeigen drastisch verringerte DGDG-Gehalte (Dörmann *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 2003). Die *dgd1*-Mutante zeigt ein verringertes Wachstum und eine reduzierte photosynthetische Leistungsfähigkeit (Dörmann *et al.*, 1995). Die *dgd1 dgd2*-Doppelmutante ist nicht in der Lage, photoautotroph zu wachsen (Kelly *et al.*, 2003). Eine Mutante in der PG-Synthese, *pgp1*, ist hellgrün, hat einen verringerten Thylakoidgehalt und kann nicht photoautotroph wachsen (Hagio *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Babiychuk *et al.*, 2003). Des Weiteren kommt es in Pflanzen durch Phosphatmangel zu einer Erhöhung des Anteils der phosphatfreien Verbindungen DGDG und

SQDG nicht nur in den Plastidenmembranen, sondern auch in extraplastidären Membranen (Härtel *et al.*, 2000). Damit steht das verbleibende Phosphat für andere zelluläre Prozesse zur Verfügung (Dörmann und Benning, 2002). Auch der Sättigungsgrad der Fettsäuren hat einen großen Einfluss auf die Membranfluidität und somit auf das Wachstum unter nicht optimalen Temperaturbedingungen. Dies belegt das verändertes Wachstumsverhalten einiger Mutanten für Fettsäuredesaturasen von *A. thaliana* (Hugly and Somerville, 1992; McConn und Browse, 1996; Murakami *et al.*, 2000). Des Weiteren sind plastidäre Fettsäuren auch als Signalstoffe in der Pathogenabwehr beteiligt. Sie sind Ausgangsstoffe der Oxylipinsynthese, welche über 12-Oxo-Phytodienonsäure (OPDA) zu Jasmonsäure führt (Weber *et al.*, 1997; Farmer *et al.*, 2003).

1.4.6 Isoprenoidsynthese

Die Isoprenoide von Pflanzen sind durch eine ungewöhnliche Vielfalt gekennzeichnet. Die Isoprenoidsynthese stellt zahlreiche wichtige Intermediate für die unterschiedlichsten pflanzlichen Stoffwechselwege zur Verfügung. Isoprenoide sind die Ausgangsstoffe für die Synthese von Carotinoiden, Chlorophyllen, Sterolen, Chinonen, Isopren, Abwehrstoffen, Duftstoffen, Phytohormonen (Gibberilline, Abscisinsäure, Brassinosteroide) und sind bedeutsam bei der Prenylierung und Glycosylierung von Proteinen. Die Synthese der Isoprenoide kann in vier Phasen gegliedert werden (Lange und Ghassemian, 2003). Die erste Phase führt zur Synthese der C5-Einheiten Isopentenylpyrophosphat (IPP). In Algen und höheren Pflanzen sind für diesen Schritt zwei unterschiedliche Synthesewege, der Acetat-Mevalonat-Weg (MVA-Weg) und der Mevalonat-unabhängige Weg (1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DOXP)-Weg oder MEP-Weg), bekannt (Lichtenthaler *et al.*, 1997a, b; Lichtenthaler, 1999; Lange und Ghassemian, 2003). Der Acetat-Mevalonat-Weg ist in höheren Pflanzen im Cytosol lokalisiert und verwendet als Substrat Acetyl-CoA. Der Mevalonat-unabhängige Weg ist in den Plastiden höheren Pflanzen lokalisiert, verwendet als Substrate Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat und verläuft über DOXP. Die zweite Phase beginnt mit der Isomerisierung von IPP zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), welches als Startermolekül für die nachfolgenden Kondensationen mit IPP unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP) dient. Durch Kopf-zu-Schwanz- und/oder Kopf-zu-Kopf-Kondensationen wird das Monoterpen Geranylpyrophosphat (GPP, C10), das Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat (FPP, C15), das Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C20),

das Triterpen Squalen (C30), die Tetraterpene Phytylpyrophosphat und Phytoen (C40) sowie noch längerkettige Polyprenylpyrophosphate synthetisiert. In der dritten Phase können die Prenylpyrophosphate und deren Derivate eine Cyclisierung (intramolekulare Prenylierung), wie z.B. im Falle der Sterole oder Carotinoide, durchlaufen. Bei der vierten Phase findet eine Umformung dieser cyclischen Verbindungen über Redox-, Isomerisations-, Substitutions- und Konjugationsreaktionen statt, welche zu einer sehr breiten Palette an Endprodukten führt.

Radioaktive Markierungsuntersuchungen zeigen, dass durch den Acetat-Mevalonat-Weg über Mevalonat Sesquiterpene (C15), Triterpene (Sterole, C30) und die Seitenkette von Ubiquinon synthetisiert werden. Dahingegen werden vom Mevalonat-unabhängigen Weg über DOXP Hemiterpene (Isopren, C5), Monoterpene (C10), einige Sesquiterpene (C15), Diterpene (Gibberilline, C20), sowie Tetraterpene (Carotenoide, C40) und die Phytol-Seitenketten (C20) von Chlorophyll, Phyllochinon und Tocopherol gebildet (Lange und Ghassemian, 2003). Zwischen den beiden Synthesewegen existiert eine metabolische Schnittstelle, die vermutlich auf dem Austausch von IPP beruht. Ob auch auf anderen Ebenen ein Austausch besteht, ist Gegenstand aktueller Forschungen und noch nicht abschließend geklärt. Für den relativ spät entdeckten Mevalonat-unabhängigen Weg konnten vor einigen Jahren alle plastidären Enzyme identifiziert werden (Rodríguez-Concepción und Boronat, 2002). Mutanten für den Mevalonat-unabhängigen Weg wie die *clal*-Mutante (Hoeffler *et al.*, 2002), die durch einen nahezu Albino-Phänotyp gekennzeichnet ist, verdeutlichen seine Bedeutung. Weiterhin zeigt diese Mutante, dass, auch wenn eine metabolische Verbindung zwischen dem MVA-Weg und dem MEP-Weg besteht, diese nicht ausreicht, um den Verlust der plastidären Isoprenoidsynthese zu kompensieren.

1.4.7 Chlorophyllsynthese

Neben der Synthese von Chlorophyllen ist die Tetrapyrrolbiosynthese auch für die Bildung von Häm, Sirohäm und Phytochromobilin verantwortlich (Tanaka und Tanaka, 2007). Die Eisen-haltigen Häme und Sirohäme sind vor allem bei der Photosynthese, Respiration bzw. als prosthetische Gruppen der Nitrit- und Sulfitreduktase von Bedeutung. Phytochromobilin ist ein lineares Tetrapyrrol und dient als Chromophorgruppe der Phytochome. Die Chlorophylle haben eine einzigartige und essentielle Funktion für die Lichtabsorption und den Licht- bzw. Energietransfer bei der Photosynthese. Die Tetrapyrrolsynthese findet hauptsächlich in den Plastiden statt. Nur die letzten Schritte der Hämsynthese sind vermutlich

in den Plastiden und den Mitochondrien lokalisiert. Die Synthese von Chlorophyll ist ein hochkomplexer Stoffwechselweg, unterliegt einer strikten transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation und ist eng mit weiteren zellulären Prozessen wie z.B. der Signaltransduktion vom Plastiden zum Nucleus, der Chloroplastenbiogenese, der Photomorphogenese, der Photosynthese, der Seneszenz und dem programmierten Zelltod verknüpft (Tanaka und Tanaka, 2007). Für *A. thaliana* sind seit kurzem alle Gene und Enzyme der Chlorophyllbiosynthese bekannt (Nagata *et al.*, 2005). Die ersten enzymatischen Schritte sind für Chlorophyll-, Häm-, Sirohäm- und Phytychromobilinsynthese dieselben. In höheren Pflanzen ist Glutamat die Ausgangssubstanz für die Synthese von Tetrapyrrolen. Dabei wird Glutamat zunächst durch die Glutamyl-tRNA-Synthase durch Übertragung auf die tRNA^{Glu} aktiviert und durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) umgesetzt. Danach erfolgt die Synthese des wichtigen Intermediats δ -Aminolävulinat (ALA). Bei der Synthese von ALA kommt der GluTR eine Schlüsselrolle in der Regulation zu. Aus zwei Molekülen ALA wird Porphobilinogen (PBG) gebildet. Vier Moleküle PBG werden dann zum ersten linearen Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan verknüpft und weiter zu Uroporphyrinogen III, der ersten ringförmigen Verbindung und Abzweig für die Sirohäm, umgesetzt. Das Uroporphyrinogen III wird in weiteren Decarboxylierungs- und Oxygenierungsschritten zu Protoporphyrin IX umgebaut. Das Protoporphyrin IX stellt den Verzweigungspunkt der Chlorophyll- und Hämsynthese dar. In die Chlorophylle wird Magnesium und in die Häm Eisen als Zentralatom durch die Magnesium-Chelatase bzw. Ferro-Chelatase eingefügt. Die Aktivität der Magnesium-Chelatase scheint dabei von der freien Magnesiumkonzentration, dem ATP/ADP-Verhältnis und von Thioredoxin abhängig zu sein bzw. reguliert zu werden. Das entstandene Mg-Protoporphyrin IX wird anschließend in drei weiteren Schritten, unter anderem durch die Beteiligung der lichtabhängigen Protochlorophyllid-Reduktase (POR), zunächst in Protochlorophyllid und dann in Chlorophyllid überführt. Die POR scheint dabei durch die circadiane Uhr, Cytokinin, ABA und Phytochrome reguliert zu sein. Im letzten Schritt wird von GGPP durch die Prenyltransferase (Chlorophyll-Synthase) die Phytolseitenkette auf das Chlorophyllid übertragen, was zur Bildung von Chlorophyll a führt. Die Synthese von Chlorophyll b erfolgt anschließend im Chlorophyll-Zyklus (Tanaka *et al.*, 1998).

Als Hauptregulationspunkte der Chlorophyllbiosynthese und der daran gekoppelten Prozesse gelten die Schritte der ALA-Synthese, die Magnesium-Chelatase und die Protochlorophyllid-Reduktase (Willows, 2006; Tanaka und Tanaka, 2007). Anhand von Mutanten für die

Chlorophyllsynthese werden die komplexen Regulationsmechanismen und deren Bedeutung für den pflanzlichen Metabolismus und die Pflanzenentwicklung besonders deutlich.

Während die Mutanten für die ALA-Synthese keine nekrotischen Läsionen bei Belichtung zeigten, sind die Mutanten für spätere Reaktionsschritte durch nekrotischen Läsionen infolge der Anreicherung reaktiver Chlorophyll-Intermediate charakterisiert (Tanaka und Tanaka, 2007). Die bekannten Mutanten für die verschiedenen Untereinheiten (I, D, H) der Magnesium-Chelatase *cs*, *ch-42*, *gun5*, *cch*, *chlD* zeigen reduzierte Chlorophyllgehalte und sind dementsprechend durch eine hellgrüne oder gelbliche Blattfarbe gekennzeichnet (Koncz *et al.*, 1990; Mochizuki *et al.*, 2001; Rissler *et al.*, 2002; Larkin *et al.*, 2003; Strand *et al.*, 2003). Darüber hinaus scheint Mg-Protoporphyrin IX für die Signaltransduktion vom Plastiden zum Nucleus von Bedeutung zu sein, wie die Beeinträchtigung dieses Mechanismus in den Mutanten *gun4* und *gun5* zeigt. Die *gun4 gun5*-Doppelmutante ist durch einen Albino-Phänotyp gekennzeichnet (Mochizuki *et al.*, 2001).

1.5 Identifizierung und Charakterisierung von plastidären Proteinen und Transportern

In den letzten Jahren hat die Anwendung und Weiterentwicklung von verschiedenen Methoden der funktionellen Genomanalyse (*functional genomics*) einen großen Beitrag zur Aufklärung und zum Verständnis der Funktionen von Plastiden beigetragen. Dadurch sind Chloroplasten die vermutlich am besten untersuchten Kompartimente der Pflanzenzelle (Leister, 2003). Die Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) war die erste Pflanzenspezies und der dritte mehrzellige Organismus, von dem eine komplette Sequenzierung des Genoms durchgeführt wurde (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Deshalb kommt ihr in vielen Fällen eine bedeutende Rolle als pflanzlicher Modell-Organismus zu. Dennoch ist das Wissen über die Bedeutung, Funktion und Regulation vieler plastidärer Prozesse sowie deren Interaktion mit dem restlichen Zellmetabolismus in vielen Details noch lückenhaft oder komplett unbekannt.

Bioinformatische *in silico* Analysen des Plastoms und des Kerngenoms von *A. thaliana* zeigen, dass im Plastom etwa 90 Proteine kodiert sind (Leister und Schneider, 2003). Anhand der Vorhersage von plastidären Transitpeptiden wurden zwischen 2100 und 3600 Gene, die für plastidäre Proteine kodieren, im Kerngenom ermittelt (Abdallah *et al.*, 2000; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Richly und Leister, 2004). Des Weiteren wurden

verschiedene Proteomstudien zur Aufklärung der intraplastidären Lokalisation von Proteinen für die Chloroplasten von *A. thaliana* durchgeführt. Diese Analysen waren auf Proteine der Chloroplastenhüllmembran (Ferro *et al.*, 2002, 2003; Froehlich *et al.*, 2003), des Stromas (Zabrouskov *et al.*, 2003), der Thylakoidmembran (Friso *et al.*, 2004), des Thylakoidlumens (Peltier *et al.*, 2000) oder des kompletten Chloroplasten (Kleffmann *et al.*, 2004) fokussiert. Für einen Großteil der identifizierten Proteine ist die Funktion jedoch noch unbekannt.

Die Isolierung von Mutanten mittels *forward* und *reverse genetics* zur Charakterisierung des Phänotyps und der entsprechenden Genfunktion bzw. *vice versa* wurde zu einer weit verbreiteten Strategie in der funktionellen Genomanalyse. Eine breite Anwendung dieser beiden Methoden wurden vor allem durch die relative unkomplizierte Erzeugung von Mutanten und der Verfügbarkeit großer Kollektionen von T-DNA Insertionsmutanten (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003) für *A. thaliana* ermöglicht. Durch die Strategie der *forward genetics* wurde für plastidäre Proteine eine erhebliche Anzahl an Mutanten anhand ihrer Phänotypen isoliert. Dabei wurden sowohl unspezifische als auch spezifische Ansätze gewählt. Durch unspezifische *screening*-Programme konnten Mutanten für plastidäre Proteine mit keimlingsletalem Phänotyp oder einer veränderter Pigmentierung isoliert werden (Budziszewski *et al.*, 2001). Dabei wurden die schon bekannten keimlingsletalen Phänotypen von *CLAI*, *PAC* und *TatC* sowie weitere Mutanten-Allele von *AtpD*, *PetC*, *Tic40* und auch Proteine des MEP-Weges identifiziert (Leister und Schneider, 2003). Anhand der isolierten Mutanten mit einer veränderten Pigmentierung konnten plastidäre Proteine mit Funktionen in der Proteintranslokation, der Metallionen-Homeostase, der Proteolyse sowie der Chloroplasten- und Thylakoidmembranbiogenese, z.B. Toc33, Toc159, Tic20, FtsH, IMMUTANTS und ALB3, identifiziert werden (Leister und Schneider, 2003). Aufgrund von pleiotropen Effekten, die in Verbindung mit einer veränderten Pigmentierung häufig auftreten, ist eine funktionelle Charakterisierung und Identifizierung der dabei mutierten Proteine oft problematisch. Spezifische *screening*-Ansätze wurde für Mutanten der Photosynthese mittels der Bestimmung von verschiedenen Parametern der Chlorophyllfluoreszenz durchgeführt. Dabei wurden Mutanten mit erhöhter Fluoreszenz *high chlorophyll fluorescence (hcf)*, Veränderungen im *non-photochemical quenching (npq)* und im *effective quantum yield of PSII (Φ_{II})* ermittelt (Leister und Schneider, 2003). Weiterhin wurden spezifische *screening*-Ansätze zur Identifizierung von Mutanten für die Signaltransduktion vom Plastiden zum Nucleus, die Plastidenteilung und die *state transition* durchgeführt, welches unter anderem in der Isolation der *chlorophyll a/b-binding protein underexpressed (cue)*, *genome-uncoupled (gun)*, *long after far-red (laf)*, *accumulation and*

replication of chloroplasts (arc) und *fluorescence after etiolation (flu)* Mutanten resultierte (Leister, 2003).

Wie im vorangegangenen Kapitel (Kap. 1.4) teilweise aufgeführt, besitzen Plastiden vielfältige und essentielle Funktionen und Stoffwechselwege für die Pflanzenzelle. Daher besteht die Notwendigkeit für eine koordinierte und regulierte Integration dieser plastidären Stoffwechselvorgänge in den Zellmetabolismus. Die Plastiden höherer Pflanzen werden von zwei Hüllmembranen (Abb. 1.1) umgeben und sind dadurch vom Cytosol abgegrenzt. Es wird angenommen, dass dabei vor allem die innere Hüllmembran die eigentliche Diffusionsbarriere für den Austausch polarer Verbindungen zwischen dem Cytosol und den Plastiden darstellt. Dahingegen scheint die äußere Hüllmembran durch Poren mehr oder minder frei permeabel für Moleküle unterhalb eines Molekulargewicht von 10 kDA zu sein (Flügge und Benz, 1984; Flügge, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch die äußere Hüllmembran durch in ihr befindliche substratspezifische Poren in gewissem Umfang über selektive Filtereigenschaften verfügt (Soll *et al.*, 2000; Bölter und Soll, 2001). Der regulierte Austausch von Vorstufen, Intermediaten, Endprodukten, Polypeptiden und Signalmolekülen zwischen dem Cytosol und den Plastiden wird durch eine Vielzahl spezifischer Transportproteine, z.B. Translokatoren, Kanäle und Poren, vermittelt. Obwohl für viele dieser Transportvorgänge über die Plastidenhüllmembran physiologische, biochemische und kinetische Daten und Indizien existieren, sind nur wenige der entsprechenden Transportproteine auf molekularer Ebene identifiziert (Weber *et al.*, 2004). Bioinformatische Analysen (Koo und Ohlrogge, 2002; Schwacke *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005) und Proteomstudien der Chloroplastenhüllmembranen (Ferro *et al.*, 2002, 2003; Froehlich *et al.*, 2003) deuten auf die Existenz von 140 - 660 Transmembranproteinen in der plastidären Hüllmembran hin. Für einen Großteil dieser Membranproteine wird eine Funktion als Transporter angenommen (Koo und Ohlrogge, 2002; Weber *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit vorausgegangenen Untersuchungen, im Rahmen eines GABI-Forschungsprojektes zur Identifikation, Klassifikation und Charakterisierung von bislang unbekanntem Transportproteinen in *A. thaliana* (*Functional Genomics of A. thaliana Membrane Transport Proteins*), wurden anhand der Vorhersage von plastidären Transitpeptiden in Verbindung mit mindestens vier α -helikalen Transmembrandomänen potentielle Kandidaten für Transportproteine der Plastidenhüllmembran identifiziert. Diese Kandidaten wurden durch einen Ansatz der *reverse genetics* in einem *screening*-Programm untersucht. Dazu wurden homozygote T-DNA Insertionsmutanten für die entsprechenden

Kandidatengene isoliert und hinsichtlich phänotypischer Auffälligkeiten analysiert. Dabei wurde eine Mutante mit reduzierter Größe und einer gelblichen Blattfarbe isoliert. Darüber hinaus zeigte diese Mutante eine drastisch reduzierte Elektronentransportrate und wurde daraufhin mit der Bezeichnung *dwarf affected in photosynthetic electron transport rate 1* (*dapl*) versehen. Für diese Mutante wurde eine homozygote T-DNA-Insertion im Gen *At1g61450* nachgewiesen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Mutante zu verifizieren und durch eine molekularbiologische und physiologische Charakterisierung Hinweise auf die Funktion des betroffenen Proteins zu erarbeiten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die zur Durchführung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D), Biomol (Hamburg, D), Bio-Rad (München, D), Difco (Hamburg, D), Duchefa (Haarlem, NL), ICN (Heidelberg, D), Fluka (Neu-Ulm, D), KMF (Sankt Augustin, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Schleicher & Schuell (Dassel, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (München, D), VWR (Darmstadt, D) bezogen. Die zur PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martensried, D) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen GibcoBRL (Karlsruhe, D), New England Biolabs (Schwalbach, D), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D) bezogen. Weitere Enzyme für molekularbiologische und biochemische Anwendungen wurden von den Firmen Qiagen (Hilden, D), Invitrogen (Paisley, UK), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D), Promega (Mannheim, D), Sigma-Aldrich (München, D), Stratagene (La Jolla, USA) und Roche (Mannheim, D) verwendet.

2.1.3 Molekularbiologische Kits

Zur Plasmidisolierung wurden das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit der Firma Bio-Rad (München, D) unter Verwendung selbsthergestellter Puffer und Diatomeenerde verwendet. Weiterhin fanden das Plasmid Midi und Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) sowie das PureYield Plasmid Midiprep System der Firma Promega (Mannheim, D) Anwendung. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die QIAquick Gel Extraction Kit und das MinElute Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) genutzt. Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde das Big Dye Reaction

Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit oder das Reaction Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D) verwendet.

2.1.4 Vektoren

Die beiden den Arbeiten verwendeten und hergestellten Vektoren sind in Tab. 2.1 und 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.1: Auflistung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Basisvektoren.

Bezeichnung	Charakteristika/Verwendungszweck	Referenz
pBIN-AR-Kan	Pflanzentransformationsvektor	Höfgen und Willmitzer, 1990
pBIN-AR-Kan-PPT1	Proteinexpression des <i>AtPPT1</i> in <i>planta</i>	Knappe <i>et al.</i> , 2003b
pBIN-AR-Kan-PPT2	Proteinexpression des <i>AtPPT1</i> in <i>planta</i>	Knappe <i>et al.</i> , 2003b
pBluescript-Serie	Klonierungsvektor	Stratagene (La Jolla, USA)
pENTR/D-TOPO	Klonierungsvektor	Invitrogen (Paisley, UK)
pda04495 Acc. No. AY045639	cDNA-Klon von <i>AtDAP1</i>	RIKEN Bioresource Center (BRC; Ibaraki, Japan)
pda11771 Acc. No. AK118742	cDNA-Klon von <i>AtDAP3</i>	RIKEN Bioresource Center (BRC; Ibaraki, Japan)
pda12590 Acc. No. BT002846	cDNA-Klon von <i>AtDAP4</i>	RIKEN Bioresource Center (BRC; Ibaraki, Japan)
pda04246 Acc. No. AY054477	cDNA-Klon von <i>AtDAP5</i>	RIKEN Bioresource Center (BRC; Ibaraki, Japan)
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor	Promega (Mannheim, D)
pGREEN II	Pflanzentransformationsvektor	Hellens <i>et al.</i> , 2000
pGREEN II-35Snos-Kan	Pflanzentransformationsvektor	Dr. V. G. Maurino (Universität zu Köln, D)
pGREEN II-35Snos-Hyg	Pflanzentransformationsvektor	Dr. V. G. Maurino (Universität zu Köln, D)
pGREEN II-35Snos-Bar	Pflanzentransformationsvektor	Dr. V. G. Maurino (Universität zu Köln, D)
pGWB2	Proteinexpression in <i>planta</i>	Dr. T. Nakagawa (Shimane University, Japan)
pGWB3	Expressionanalyse mittels GUS-Reportergen in <i>planta</i>	Dr. T. Nakagawa (Shimane University, Japan)
pGWB5	Analyse der Proteinenlokalisierung mittels GFP-Reportergen in <i>planta</i>	Dr. T. Nakagawa (Shimane University, Japan)
pUK4K	Klonierungsvektor	New England Biolabs (Frankfurt/Main, D)
pRS300	Matrize für das miR319a-Rückkrat	Schwab <i>et al.</i> , 2006

Tab. 2.2: Auflistung der für die vorliegende Arbeit hergestellten Vektoren.

Bezeichnung	Charakteristika/Verwendungszweck	Referenz
pENTR/D- <i>AtDAP1</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP1</i> ohne Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP1</i> +ST	cDNA von <i>AtDAP1</i> mit Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP2</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP2</i> ohne Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP2</i> +ST	cDNA von <i>AtDAP2</i> mit Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP3</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP3</i> ohne Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP3</i> +ST	cDNA von <i>AtDAP3</i> mit Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP4</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP4</i> ohne Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP4</i> +ST	cDNA von <i>AtDAP4</i> mit Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP5</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP5</i> ohne Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP5</i> +ST	cDNA von <i>AtDAP5</i> mit Stop-Kodon in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP1</i> -P2kb	ca. 2kb-Promotorfragment von <i>AtDAP1</i> pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP2</i> -P2kb	ca. 2kb-Promotorfragment von <i>AtDAP2</i> pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
pENTR/D- <i>AtDAP1</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP1</i> in pENTR/D-TOPO	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pENTR/D- <i>AtDAP2</i> ₍₁₃₁₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP2</i> in pENTR/D-TOPO	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pENTR/D- <i>AtDAP3</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP3</i> in pENTR/D-TOPO	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pENTR/D- <i>AtDAP4</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP4</i> in pENTR/D-TOPO	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pENTR/D- <i>AtDAP5</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP5</i> in pENTR/D-TOPO	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGWB2- <i>AtDAP1</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP1</i> ohne Stop-Kodon in pGWB2	diese Arbeit
pGWB2- <i>AtDAP2</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP2</i> ohne Stop-Kodon in pGWB2	diese Arbeit
pGWB3- <i>AtDAP1</i> -P2kb	ca. 2kb-Promotorfragment von <i>AtDAP1</i> in pGWB3	diese Arbeit
pGWB3- <i>AtDAP2</i> -P2kb	ca. 2kb-Promotorfragment von <i>AtDAP2</i> in pGWB3	diese Arbeit
pGWB5- <i>AtDAP1</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP1</i> ohne Stop-Kodon in pGWB5	diese Arbeit
pGWB5- <i>AtDAP2</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP2</i> ohne Stop-Kodon in pGWB5	diese Arbeit
pGWB5- <i>AtDAP3</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP3</i> ohne Stop-Kodon in pGWB5	diese Arbeit
pGWB5- <i>AtDAP4</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP4</i> ohne Stop-Kodon in pGWB5	diese Arbeit

pGWB5- <i>AtDAP5</i> -ST	cDNA von <i>AtDAP5</i> ohne Stop-Kodon in pGWB5	diese Arbeit
pGWB5- <i>AtDAP1</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP1</i> in pGWB5	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGWB5- <i>AtDAP2</i> ₍₁₃₁₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP2</i> in pGWB5	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGWB5- <i>AtDAP3</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP3</i> in pGWB5	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGWB5- <i>AtDAP4</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP4</i> in pGWB5	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGWB5- <i>AtDAP5</i> ₍₁₋₃₀₀₎	Basenpaare 1-300 der cDNA von <i>AtDAP5</i> in pGWB5	B. Kleinhenz (Universität zu Köln, D)
pGREEN II-35Snos-Kan- <i>TP1-AtDAP2</i>	cDNA von <i>AtDAP2</i> mit dem Transitpeptid von <i>AtDAP1</i> in pGREEN II-35Snos-Kan	diese Arbeit
pGREEN II-35Snos-Kan- <i>TP1-sll0615</i>	cDNA von <i>Synechocystis sll0615</i> mit dem Transitpeptid von <i>AtDAP1</i> in pGREEN II-35Snos-Kan	diese Arbeit
pGREEN II-35Snos-Hyg- <i>TP1-YBR187w</i>	cDNA von <i>S. cerevisiae YBR187w</i> mit dem Transitpeptid von <i>AtDAP1</i> in pGREEN II-35Snos-Hyg	diese Arbeit
pGEM-T-sll0615/apHII	<i>Synechocystis sll0615</i> mit integrierter apHII-Kassette in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pGWB2-amiR-dap1-1	amiRNA-Konstrukt gegen <i>AtDAP1</i> in pGWB2	diese Arbeit
pGWB2-amiR-dap2-1	amiRNA-Konstrukt gegen <i>AtDAP2</i> in pGWB2	diese Arbeit

2.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*)

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und XL10-Gold verwendet (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Auflistung der für die vorliegende Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme.

Bezeichnung	Charakteristika/Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (Paisley, UK)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^fZAM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a	Stratagene (La Jolla, USA)

***Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)**

Bei der vorliegenden Arbeit fanden die in Tab. 2.4 aufgeführten *A. tumefaciens*-Stämme Anwendung.

Tab. 2.4: Auflistung der für die vorliegende Arbeit verwendeten *A. tumefaciens*-Stämme.

Bezeichnung	Charakteristika/Verwendungszweck	Referenz
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 GV3101 (pMP90RK)	Rif ^r , Gm ^r , Transformation von <i>A. thaliana</i>	Koncz und Schnell, 1986
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 GV3101 (pMP90RK, pSoup)	Rif ^r , Gm ^r , Tet ^r , Transformation von <i>A. thaliana</i>	Koncz und Schnell, 1986; Hellens <i>et al.</i> , 2000
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 (pBBR1MCS.virGN54D)	Rif ^r , Cm ^r , Transformation der <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskulturen	Kovach <i>et. al.</i> 1995
<i>A. tumefaciens</i> RK19	Rif ^r , Kan ^r , <i>antisilencing</i> -Stamm zur Transformation der <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionskulturen	-
<i>A. tumefaciens</i> GV2260	Rif ^r , Car ^r , Transformation der <i>Nicotiana tabacum</i> Protoplastenkulturen	Deblaere <i>et al.</i> , 1985

***Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)**

Zur Untersuchung von *knock-out* Mutanten für das homologe *DAP*-Gen von *S. cerevisiae* wurden die in Tab. 2.5 aufgeführten Mutanten sowie die korrespondierenden Kontrollstämme verwendet. Diese Stämme wurden von EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis; Winzeler *et al.*, 1999) bezogen.

Tab. 2.5: Auflistung der für die vorliegende Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme.

Bezeichnung	Charakteristika/Genotyp	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> FY1679-06C (Wildtyp-1)	MAT α ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2</i> Δ 1; <i>trp1</i> Δ 63; <i>his3</i> Δ 200; GAL2	EUROSCARF (Universität Frankfurt, D)
<i>S. cerevisiae</i> FSRE018-03B(AL) (<i>ybr187w</i> Δ -1)	FY; Mat α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 200; <i>leu2</i> Δ 1; LYS2; TRP1; YBR187w(4,728)::kanMX4	EUROSCARF (Universität Frankfurt, D)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 (Wildtyp-2)	MAT α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0	EUROSCARF (Universität Frankfurt, D)
<i>S. cerevisiae</i> (<i>ybr187w</i> Δ -2)	BY4741; Mat α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YBR187w::kanMX4	EUROSCARF (Universität Frankfurt, D)

***Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*)**

Zur Erzeugung von Insertionsmutanten von *Synechocystis* wurde der sequenzierte Wildtypstamm *Synechocystis* sp. PCC6803 verwendet (Kaneko *et al.*, 1996).

2.1.6 Pflanzenmaterial

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana*, *Arabidopsis*)**

Für die Arbeiten an *A. thaliana* wurden der Ökotyp Columbia-0 sowie T-DNA Insertionsmutanten des gleichen genetischen Hintergrund verwendet. Dabei wurden T-DNA Insertionslinien der SALK- (Alonso *et al.*, 2003), GABI-Kat- (Rosso *et al.*, 2003) und der SAIL-Kollektion (Sessions *et al.*, 2002) verwendet. Die entsprechenden Samen wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC; Scholl *et al.*, 2000), vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) oder von der Kölner Ressourcenzentrum für *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Linien Kollektion (GABI-Kat) bezogen (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Auflistung der für die vorliegende Arbeit verwendeten *A. thaliana*-Linien.

Bezeichnung	Ökotyp	Referenz
<i>A. thaliana</i> , Wildtyp	Columbia-0 (Col-0)	ABRC
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-166A05 (N415845)	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-094C03 (N408955)	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-107G11	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-145H02	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien SALK_129037 (N629037)	Columbia-0 (Col-0)	ABRC
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien SALK_011783 (N511783)	Columbia-0 (Col-0)	ABRC
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-402B01 (N438509)	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien SAIL_892_B03 (N840167)	Columbia-0 (Col-0)	NASC
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-484G10 (N446450)	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien SALK_143524 (N643524)	Columbia-0 (Col-0)	ABRC
<i>A. thaliana</i> , T-DNA Insertionslinien GK-027F07	Columbia-0 (Col-0)	GABI-Kat

Nicotiana tabacum (*N. tabacum*)

Für die Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden Protoplasten der Zelllinie „Bright Yellow 2“ von *Nicotiana tabacum* verwendet.

- *N. tabacum* „Bright Yellow 2“ (BY2)
Protoplastensuspension

2.1.7 Kultivierungsbedingungen und Nährmedien

E. coli

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium (Bertani, 1951) im Schüttelinkubator bei 200 U/min oder auf LB-Agarplatten im Inkubator bei einer Temperatur von jeweils 37°C.

Die kurzfristige Lagerung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C oder längerfristig als Glycerin-Stammkulturen (500 µl Bakterienkultur plus 500 µl LB-Medium mit 30% Glycerin) bei -80°C.

Die Zelldichte von *E. coli*-Kulturen wurde photometrisch über die Extinktion bei 600 nm bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Eine optische Dichte von 1 entspricht etwa einer Zellzahl von 8×10^8 Zellen/ml.

LB-Flüssigmedium:

10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl

LB-Festmedium :

10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, 16 g/l Bacto Agar

A. tumefaciens

Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte in LB-Flüssigmedium (Bertani, 1951) oder YEB-Flüssigmedium im Schüttelinkubator bei 200 U/min oder auf YEB-Agarplatten im Inkubator bei einer Temperatur von jeweils 28°C.

Die kurzfristige Lagerung von *A. tumefaciens* erfolgte auf Agarplatten bei 4°C oder längerfristig als Glycerin-Stammkulturen (500 µl Bakterienkultur plus 500 µl LB-Medium mit 30% Glycerin) bei -80°C.

YEB-Flüssigmedium:

5 g/l Bacto Fleisch Extrakt, 1 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 1 g/l Bacto Pepton, 5 g/l Saccharose, 0,5 g/l MgSO₄

YEB-Festmedium:

5 g/l Bacto Fleisch-Extrakt, 1 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 1 g/l Bacto Pepton, 5 g/l Saccharose, 0,5 g/l MgSO₄, 16 g/l Bacto Agar

S. cerevisiae

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in YPD-Flüssigmedium im Schüttelinkubator bei 200 U/min oder auf YPD-Agarplatten im Inkubator bei einer Temperatur von jeweils 30°C. Die kurzfristige Lagerung von *S. cerevisiae* erfolgte auf Agarplatten bei 4°C oder längerfristig als Glycerin-Stammkulturen (500 µl Bakterienkultur plus 500 µl LB-Medium mit 30% Glycerin) bei -80°C.

YPD-Flüssigmedium (Flüssigmedium):

1 g/l Bacto Pepton, 0,5 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 2 g/l Glukose

YPD-Festmedium:

1 g/l Bacto Pepton, 0,5 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 2 g/l Glukose, 16 g/l Bacto Agar

Synechocystis sp. PCC 6803

Die Kultivierung von *Synechocystis* unter phototrophen Bedingungen erfolgte bei einer Temperatur von 30°C entweder auf BG11-Agarplatten bei kontinuierlicher Belichtung mit 30 µE oder in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 30 µE und kontinuierlichem Schütteln von 150 U/min. Alternativ dazu wurden größere *batch*-Kulturen in BG11-

Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 100 μE und einer kontinuierlichen Begasung mit einem 3%-igen (v/v) CO_2 /Luftgemisch angezogen. Das Wachstum von *Synechocystis*-Kulturen wurde photometrisch über die Extinktion bei 750 nm bestimmt.

Die kurzfristige Lagerung von *Synechocystis* erfolgte in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 20°C und einer Lichtintensität von ca. 15 μE . Eine längerfristige Lagerung erfolgte als Glycerin-Stammkulturen (800 μl Bakterienkultur plus 200 μl DMSO) bei -80°C.

BG11-Flüssigmedium (pH 8,0):

Stocklösung 1	2 ml
Stocklösung 2	50 ml
Stocklösung 3	2 ml
A6-Spurenelement-Mix	1 ml
1 M TES/KOH (pH 8,0)	20 ml
	ad 1000 ml A. dest.

Stocklösung 1:

3 g/l Zitronensäure, 3 g/l Ammonium-Eisen(III)-Citrat, 0,5g/l Na_2EDTA 0,05 g

Stocklösung 2:

30 g/l NaNO_3 , 0,78 g/l K_2HPO_4 , 1,5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Stocklösung 3:

19 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,

A6-Spurenelement-Mix:

2,86 g/l H_3BO_3 , 1,81 g/l MnCl_2 , , 0,222 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,079 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,021 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0494 g/l $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

BG11-Festmedium (pH 8,0):

BG11-Flüssigmedium + 15 g/l Bacto Agar

A. thaliana

Die Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur erfolgte auf ½ MS-Agarplatten (Murashige und Skoog, 1962).

½ MS-Festmedium (pH 5,7):

4,4 g/l Murashige & Skoog-Salze inklusive modifizierter Vitamine (M0245; Duchefa, Haarlem, NL), 10 g/l Saccharose, 8 g/l Difco Agar

2.1.8 Antibiotika

Zur Selektion der rekombinanten Organismen wurden, sofern nicht anders vermerkt, die in Tab. 2.7 angegebenen Konzentrationen der entsprechenden Antibiotika verwendet.

Tab. 2.7: Auflistung der Endkonzentrationen der Antibiotika, die zur Selektion von rekombinanten Organismen verwendeten wurden.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Synechocystis</i>	<i>A. thaliana</i>
Ampicillin	50 µg/ml	50 - 100 µg/ml	-	-
Carbenicillin	50 µg/ml	50 µg/ml	-	-
Chloramphenicol	50 µg/ml	75 µg/ml	15 µg/ml	-
Gentamycin	-	25 µg/ml	-	-
Hygromycin	40 µg/ml	40 µg/ml	-	15 - 30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml
Rifampicin (in DMSO)	-	20 µg/ml	-	-
Spectinomycin	50 - 100 µg/ml	50 - 100 µg/ml	-	-
Streptomycin	50 µg/ml	-	50 µg/ml	-
Tetracyclin (in 75%-igem EtOH)	5 µg/ml	5 µg/ml	-	-
D/L-Phosphinothricin	-	-	-	10 µg/ml
BASTA (Selektion auf Erde)	-	-	-	0,1% BASTA 0,01% Tween 80

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen wurde eine modifizierte Version der Methode von Inoue *et al.* (1990) verwendet. Dabei wurden 250 ml SOB-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) mit 10 - 12 Kolonien des entsprechenden *E.coli* Stammes angeimpft und bei 19°C und 200 U/min in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min auf Eis gelagert und dann für 10 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 80 ml TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂; pH 6,7) resuspendiert, 10 min auf Eis gelagert, bei 2.500 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und anschließend in 20 ml TB-Puffer mit 1,4 ml DMSO resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 50 µl Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Anwendung gelagert.

2.2.1.2 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Für die Transformation wurden 50 µl Aliquots der kompetenter *E.coli* Zellen (Kap. 2.2.1.1) auf Eis aufgetaut und nach Zugabe einer entsprechenden Menge Plasmids für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und kurz auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurden mit 1ml LB-Medium versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert, anschließend zentrifugiert und in ca. 100 µl Überstand resuspendiert. Die Selektion rekombinanter Klone erfolgte durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten, welche mit den zur Selektion benötigten Antibiotika versetzt waren, ü. N. bei 37°C.

2.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Für eine Vorkultur wurde eine Kolonie des entsprechenden Agrobakterienstammes in 5 ml MGL-Medium (0,5% Bacto Trypton, 0,25% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl, 0,5% Mannitol,

0,116% Na-Glutamat, 0,025% KH_2PO_4 , 0,01% MgSO_4 , 0,0001% Biotin) mit den entsprechenden Antibiotika, angeimpft und für 2 Tage bei 28°C und 200 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Vorkultur in 100 ml MGL-Medium überführt, so dass eine OD_{600} 0,04 - 0,08 erreicht wurde. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 28°C und 200 U/min im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend bei 4°C für 5 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Während der folgenden Arbeitsschritte wurden die Zellen stets auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES-Puffer (pH 7,0) resuspendiert, erneut zentrifugiert (2.500 x g, 5 min, 4°C), in 40 ml 1 mM HEPES-Puffer mit 10% Glycerin (pH 7,0) resuspendiert und wieder zentrifugiert (2.500 x g, 5 min, 4°C). Anschließend wurde das Bakterienpellet in 2 ml 1 mM HEPES-Puffer mit 10% Glycerin (pH 7,0) aufgenommen und auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt, zentrifugiert (2.500 x g, 1 min, 4°C) und in je 200 μl 1 mM HEPES-Puffer mit 10% Glycerin (pH 7,0) resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 50 μl Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Transformation elektrokompenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Für die Elektrotransformation wurden die 50 μl Aliquots der kompetenten Agrobakterien (Kap. 2.2.1.3) auf Eis aufgetaut und nach Zugabe einer entsprechenden Menge Plasmids (ca. 200 ng DNA) für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Molecular BioProducts, San Diego, USA) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Elektroporator Genepulser II (Bio-Rad, München, D) bei 25 μF , 400 Ω und einem Puls von 2,5 kV. Der Transformationsansatz wurde mit 1 ml YEB-Medium versetzt, für 2 h Stunden bei 28°C inkubiert, zentrifugiert und in ca. 100 μl Überstand resuspendiert. Die Selektion rekombinanter Klone erfolgte durch Ausplattieren des Überstandes auf LB-Agarplatten, welche mit den zur Selektion benötigten Antibiotika versetzt waren, für 2 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.1.5 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte auf LB- bzw. YPD-Medium. Zur Analyse des Wachstums auf nichtfermentativen Kohlenstoffquelle wurde YP-Medium verwendet. Dabei

wurden die fermentativen und nichtfermentativen Kohlenstoffquellen in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

2% Glukose

2% Galaktose

2% Ethanol

2% Glycerol

2% Acetat

2% Pyruvat

2% Laktat

0,2% Ölsäure

Um das Wachstum zu ermitteln, wurden zuerst eine Flüssigkultur in 5 ml YPD-Medium für 24 h bei 30°C im Schüttelinkubator bei 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ mit YP-Medium auf den Wert 0,4 eingestellt. Davon wurde eine serielle Verdünnungsreihe von $1, 2 \cdot 10^{-1}, 4 \cdot 10^{-2}, 8 \cdot 10^{-3}, 1,6 \cdot 10^{-3}$ und $3,2 \cdot 10^{-4}$ in YP-Medium erstellt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 10 µl auf YP-Agarplatten mit der zu testenden Kohlenstoffquelle aufgetropft und trocknen gelassen. Diese Platten wurden im Anschluss 2 - 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.1.6 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA, so dass eine spezielle Vorbehandlung der Zellen nicht notwendig war. Zur Transformation von *Synechocystis* wurden 2 ml einer Kultur mit einer OD₇₅₀ von ca. 2 (ca. 10^9 Zellen) für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstandes wurde verworfen und die Zellen in ca. 200 µl Rücklauf resuspendiert. 1 µg der gewünschten Plasmid-DNA wurde dazugegeben und die Zellen anschließend bei 30°C ü. N. im Dunkeln inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf BG11-Agarplatten ausplattiert und nach ca. 2 - 3 Tagen mit den zur Selektion benötigten Antibiotika unterschichtet. Nach ca. 14 Tagen waren die Wildtyp-Zellen in der Regel lysiert und die Kolonien rekombinanter Klone erkennbar. Diese wurden anschließend auf BG11-Agarplatten mit den entsprechenden Antikiotika überimpft und nach ausreichendem Wachstum in 5ml BG11-Flüssigmedium zur weiteren Kultivierung überführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Molekularbiologische Standard Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1991) oder Ansel *et al.* (1997) durchgeführt.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986) wurde zur enzymatischen Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmenten *in vitro* verwendet. Dabei werden zwei sequenzspezifische Starter-Oligonukleotide oder Primer (in *sense*- und *antisense*-Orientierung) verwendet, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Durch einen sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung, Oligonukleotid-Anlagerung und Kettenverlängerung der Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase, z.B. (*Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) wurde eine exponentielle Vervielfachung der DNA erzielt. Ein normaler 20 µl PCR-Ansatz bestand aus folgender Zusammensetzung: 1-10 ng DNA, je 100 pmol der *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide, je 10 nmol an dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1-fach Reaktions-Puffer und 1-2 Unit DNA-Polymerase. Dabei wurden das Kit Taq DNA Polymerase der Firma Qiagen (Hilden, D) sowie das Kit GoTaq DNA Polymerase der Firma Promega (Mannheim, D) verwendet. Zur Durchführung der PCR ist der Thermocycler MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, München, D) nach dem angefügten Standardprogramm verwendet worden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen and Skaletsky, 2000) erstellt und von der Firma Metabion (Martinsried, D) bezogen.

PCR-Standardprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Wiederholungen
1	94°C	2 min	-
2	94°C	30 sec	←
3	55°C	30 sec	
4	72°C	1,5 min	—
5	72°C	10 min	-
6	4°C	∞	-

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese (Maniatis, 1982). In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0,8 - 2%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde dabei in 1x TAE-Puffer (40mM Tris/HAc, 1mM EDTA; pH 7,5) gelöst, mit einer 1%-igen Ethidiumbromid-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und in eine vorgefertigte Gussform überführt. Die DNA-Proben wurden mit Stop-Puffer (20% Ficoll 400, 1% SDS, 100 mM EDTA, 40 mM Tris/HAc, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol; pH 7,5) versetzt und in die Taschen des erstarrten Gels überführt. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach Größe des verwendeten Gels, bei einer Spannung von 80-140V. Die Analyse der DNA erfolgte unter UV-Licht (~254 nm) und wurde mit einem Photodokumentationssystem (Intas, Göttingen, D) dokumentiert.

2.2.2.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen für eine weitere Verwendung in Restriktion- oder Ligationansätzen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit oder des MinElute Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte entweder durch Abschätzung anhand einer Auftrennung im Agarose-Gel oder durch photometrische Konzentrationsbestimmung mittels Photometer (Ultrospec III Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D).

Bei der Bestimmung im Agarose-Gel wurde die Intensität der Ethidiumbromid gefärbten Fragmentbande optisch zu der Intensität einer Markerbande, gleicher Größe und bekannter DNA-Menge, verglichen und so die Menge grob geschätzt.

Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert. Eine Absorption (A_{260}) von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNA oder einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngiger DNA. Zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$c = A_{260} \cdot Vf \cdot F$$

c: Konzentration der Nukleinsäure-Lösung [$\mu\text{g/ml}$]

A_{260} : Absorption bei 260 nm

Vf: Verdünnungsfaktor

F: Konzentrationsfaktor
($F = 50 \mu\text{g/ml}$ für dsDNA, $F = 40 \mu\text{g/ml}$ für ssRNA, $F = 33 \mu\text{g/ml}$ für ssDNA)

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm. Eine Verunreinigung mit Proteinen wurde über den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Eine reine DNA-Lösung hat einen Quotienten (A_{260}/A_{280}) von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0. Zusätzlich gibt eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über Verunreinigungen durch Phenole oder Polysacchariden. Dabei sollte das Verhältnis der Werte bei 260 nm und 230 nm ungefähr 2 sein.

2.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Modifikationen nach Zimmermann *et al.* (1990) durchgeführt. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des Big Dye Reaction Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit oder

des Big Dye Reaction Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit der automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Zur Auswertung wurden die Programme ABI PRISM Edit View und ABI PRISM Auto Assembler (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D) verwendet.

Standard-Sequenzierungsprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Wiederholungen
1	95°C	20 sec	-
2	95°C	10 sec	←
3	55°C	10 sec	
4	60°C	4 min	—
5	4°C	∞	-

2.2.2.7 DNA-Techniken

2.2.2.7.1 Allgemeine DNA-Techniken

Standardmethoden zur Handhabung und Manipulation von DNA wurden nach Sambrook *et al.* (1991) oder Ansubel *et al.* (1997) durchgeführt.

2.2.2.7.2 Plasmidisolation aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmiden aus *E.coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Bimboim und Doly, 1979). Es kam für die Mini-Präparation von Plasmiden das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, München, D) unter Verwendung selbsthergestellter Lösungen zum Einsatz. Dabei wurden 2 ml einer LB-Übernachtskultur für 1 min bei 20.000 x g sedimentiert, in 200 µl Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 20 µg/ml RNase A; pH 8,0) resuspendiert, 2 min bei RT inkubiert, mit 200µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt, vorsichtig vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung III (5,3 M Guanidinium-HCl, 0,7 M Kaliumacetat; pH 5,0)

dazugegeben, gemischt und der Zelldebris für 5 min bei 20.000 x g sedimentiert. Der Überstand dann auf eine mit 200 µl Binde-Matrix (5,3 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-HCl, 0,15 g/ml Diatomeenerde; pH 8,0) gefüllte Säule überführt, gemischt und für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal durch Zugabe von 500 µl Wasch-Puffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA , 0,2 M NaCl, 50% Ethanol; pH 8,0) und Zentrifugation bei 20.000 x g für 2 min gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 50-100 µl Wasser und Zentrifugation bei 20.000 x g für 2 min.

Für die Midi- und Maxi-Präparation von Plasmiden aus *E.coli* kamen die Midi- und Maxi Kits der Firma Qiagen (Hilden, D) sowie das PureYield Plasmid Midiprep System der Firma Promega (Mannheim, D) nach Angaben der Hersteller zur Anwendung.

2.2.2.7.3 Plasmidisolation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* erfolgte unter Anwendung einiger Modifikationen nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Es wurden 2 ml einer für zwei Tage inkubierten LB-Kultur für 1 min bei 20.000 x g sedimentiert und in 100 µl Lösung I + Lysozym (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 4% (w/v) Lysozym; pH 8,0) resuspendiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 200µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) dazugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei 4°C inkubiert. Darauf wurden 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat; pH 5,0) zugegeben, gemischt, für 15 min bei 4°C inkubiert und der Zelldebris für 15 min bei 20.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl PCI versetzt und gut gemischt. Danach wurde für 5 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen, mit 400 µl CI versetzt und nach kräftigem Mischen für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml 96%-igen Ethanol bei RT für 15 min präzipitiert. Anschließend wurde die DNA für 5 min bei 20.000 x g pelletiert, das erhaltene Pellet in 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet im Exsikkator getrocknet. Im Anschluss das Pellet in 20-50 µl Wasser mit RNase (40 µg/ml) resuspendiert.

2.2.2.7.4 Schnellpräparation genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden 5 ml einer bei 30°C ü.N. gewachsenen Kultur verwendet. Die Zellen wurden bei 20.000 x g abzentrifugiert und mit 1 ml dH₂O gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und ca. 750 mg Glasperlen (Ø 0,5 mm) zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 2 min geschüttelt und die Flüssigkeit mit einer Pipette in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Dann erfolgte die Zugabe von 275 µl 7 M Ammoniumacetat (pH 7,0). Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 500 µl Chloroform gemischt. Danach wurden die Proben für 2 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde die DNA für 5 min bei RT präzipitiert. Die DNA wurde anschließend für 10 min bei 20.000 x g pelletiert, in 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut pelletiert. Das DNA-Pellet wurde im Exsikkator getrocknet und im Anschluss in 50 µl Wasser resuspendiert.

Lysis-Puffer:

100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA, 1% SDS

2.2.2.7.5 Schnellpräparation genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Synechocystis* wurde 1 ml einer dicht gewachsenen Zellkultur für 5 min bei 11.000 x g abzentrifugiert und in 200 µl dH₂O resuspendiert. Alternativ wurden die Zellen mittels Impföse direkt von einer BG11-Agarplatte in 200 µl dH₂O überführt. Nach Zugabe von 200 µl saurem Phenol wurde die Zellsuspension gut gemischt und zum Zellaufschluss für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gut gemischt. Darauf erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann erfolgte, zur vollständigen Entfernung des Phenols, eine erneute Zugabe von 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und eine Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g und 4°C. Der wässrige Überstand mit der gelösten DNA wurde direkt für die PCR verwendet.

2.2.2.7.6 Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Für eine schnelle Präparation von genomischer DNA aus *A. thaliana* wurde die Methode nach Edwards *et al.* (1991) verwendet. Die auf diese Weise isolierte genomische DNA ist zwar nicht hochrein, aber die Methode ist durch ihre Einfachheit besonders gut zur Aufarbeitung einer großen Anzahl von Proben bei einer relativ geringen Menge an Probenmaterial geeignet. Deshalb wurde diese Methode zur Identifikation von T-DNA Insertionslinien und anderer transgenen Pflanzen mittels PCR verwendet.

Es wurden zuerst 1-3 Rosettenblätter in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in gefrorenem Zustand mittels eines Bohrers grob zerkleinert und unter Zugabe von zweimal 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS; pH 7,5) weiter homogenisiert. Die Proben wurden dann kurz gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Dann wurden 300 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gefällte DNA-Pellet im Exsikkator getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl Wasser resuspendiert.

2.2.2.7.7 Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen mittels PCR

Von der isolierten genomischen DNA (Kap. 2.2.2.7.6) wurden 0,5 - 1 µl für die folgende Analyse mittels PCR (Kap. 2.2.2.2) eingesetzt. Hierbei wurden ein 20 µl PCR-Ansatz und das folgende PCR-Programm verwendet. Des weitern wurde im PCR-Programm die Anlagerungstemperatur den Schmelzpunkten der sequenzspezifische Oligonukleotide und die Zeitspanne für die Kettenverlängerung den zu erwartenden Fragmentgrößen angepasst. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der entstandenen PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.3).

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Wiederholungen
1	94°C	2 min	-
2	94°C	30 sec	←
3	55°C	30 sec	
4	72°C	1,5 min	—
5	72°C	10 min	-
6	4°C	∞	-

2.2.2.7.8 Präparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Die Präparation von genomischer DNA hoher Qualität aus *A. thaliana*, z.B. für Southern-Blot Analysen, erfolgte nach der Methode von Liu *et al.* (1995). Dafür wurden 2-4 Blütenstände in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in gefrorenem Zustand mittels eines Bohrers grob zerkleinert und unter Zugabe von zweimal 250 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 20 mM EDTA, 2% Sakrosyl, 0,5% SDS, 4,8 M Harnstoff, 0,05% Phenol; pH 7,5) weiter homogenisiert. Anschließend wurden 400 µl PCI (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1) hinzugefügt und durch invertieren gemischt. Im Anschluss wurden die Proben für 15 min bei 1.700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit 800 µl Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben für 10 min bei 1.700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gefällte DNA-Pellet zwei Mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA im Exsikkator getrocknet, in 50 µl TE-Puffer mit RNase (10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1-10 µg/ml RNase; pH 8,0) resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert.

2.2.2.7.9 Southern-Blot mit genomischer DNA

Restriktion genomischer DNA:

30 μ l genomische DNA (ca. 30-50 μ g)

5 μ l Restriktionsenzym

5 μ l 10 x Reaktionspuffer

10 μ l dH₂O

50 μ l gesamt Ansatz

Agarose-Gelelektrophorese:

1%-iges TAE-Agarosegel, Elektrophorese für 4 - 6 h bei 50 - 80 V

Southern-Blot (Southern, 1975):

Im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 min unter vorsichtigem Schwenken in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) inkubiert. Danach wurde das Gel kurz in H₂O gewaschen und für 30 min unter vorsichtigem Schwenken in Neutralisierungslösung (1M NH₄Ac, 10 mM NaOH) inkubiert.

Für den Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente vom Gel auf eine Nylon-Membran (Hybond N; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) wurde die *upward*-Methode des Kapillartransfer verwendet. Dazu wurde zunächst eine Wanne mit 20 x SSC gefüllt und mit einem aufliegenden Glassteg versehen. Quer über den Glassteg wurde ein Streifen mit 20 x SSC befeuchtetes Whatman-Papier ausgelegt, so dass beide Ende in den Puffer eintauchen. Auf den Steg wurden vier Lagen in 20 x SSC getränktes Whatman-Papier in Größe des Gels gelegt. Das Agarosegel wurde anschließend mit der Oberseite nach unten auf die vier Lagen Whatman-Papier gelegt. Darauf wurde die in 20 x SSC getränkte Nylon-Membran platziert. Auf diese Anordnung wurden wiederum vier Lagen in 20 x SSC getränktes Whatman-Papier in Größe des Gels gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen eingeschlossen wurden. Im Anschluss erfolgte das Abdichten der das Gel umgebenden Seiten mit Plastikfolie. Auf die vier Lagen Whatman Papier wurde ein ca. 5 cm hoher Stapel aus saugfähigem Papier positioniert. Zum Abschluss wurde der Blot obenauf mit einer Glasplatte und einem kleinen Gewicht beschwert. Nach ca. 10 Stunden wurde der Blot abgebaut und die Nylon-Membran entnommen. Danach wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 μ J x 1000) im Crosslinker (UV Stratalinker 2400; Stratagene, La Jolla, USA) kovalent an die Nylon-Membran gebunden.

Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde (Feinberg und Vogelstein, 1983):

Zur radioaktiven Markierung von DNA wurden ca. 30 µl DNA (20 - 100 ng Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) mit 10 µl Labelling-Mix für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 20 - 30 µCi α -³²P-dATP, 2 µl BSA (1mg/ ml) und 3 U Klenow-Fragment zugegeben und mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt. Dann erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 1 - 2 h oder ü.N. bei 37°C. Die Einbaurate der Radioaktivität wurde durch eine TCA-Fällung bestimmt. Dazu wurde 1 µl Labellingansatz mit 10 % (w/v) TCA und 0.1 mg Heringssperma-DNA versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit dH₂O aufgefüllt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Im gefällten Pellet war die DNA enthalten, während sich im Überstand nicht eingebaute Nukleotide, inklusive des radioaktiven dATPs, befanden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, und die enthaltene Radioaktivität konnte so getrennt vom Pellet mit einem Geigerzähler gemessen werden. Dabei sollte die Rate der eingebauten Radioaktivität im Pellet ca. 80% betragen. Dann erfolgte die Trennung der im Gesamtansatz nicht eingebauten Nukleotide von der Sonde über eine Säule (MicroSpin S-200 HR; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Die Gelmatrix in der Säule wurde vor Gebrauch kräftig geschüttelt. Dann wurde der Deckel der Säule gelöst, der untere Verschlussstopfen abgebrochen und die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Durch Zentrifugation für 1 min bei 720 x g wurde die Säulenflüssigkeit abgetrennt. Der radioaktive Reaktionsansatz wurde dann in die Mitte der Matrix gegeben und die Säule für 2 min bei 720 x g zentrifugiert. Damit erfolgte Abtrennung der markierten DNA-Moleküle von nicht eingebauten Nukleotiden und Salzen, welche aufgrund ihrer Größe in der Matrix verblieben. Der Durchfluss mit der markierten Sonde wurde in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt. Die Sonde wurde nun in 25 ml Hybridisierungslösung verdünnt, für 10 min bei 95°C denaturiert und dann direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Lösung A :

1,25 M Tris/HCl; pH 8,2, 0,125 M MgCl₂, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, jeweils 0,5 M dCTP, dGTP, dTTP

Lösung B:

2 M HEPES/ NaOH; pH 6,6

Lösung C:

3,6 µg/ µl Hexadesoxynukleotide pd(N)₆

5 x Labelling-Mix:

Lsg. A : Lsg. B : Lsg. C 100 : 250 : 100

Hybridisierung:

Zur Vorhybridisierung wurde die Nylon-Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, mit ca. 25 ml Vorhybridisierungslösung (RotiHybriQuick; Roth, Karlsruhe, D) befeuchtet und für 1 - 3 h bei 65°C in einem Rotationsofen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und durch die Hybridisierungslösung, in der die denaturierte Sonde gelöst war, ersetzt. Die Hybridisierung mit der markierten Sonde erfolgte ü.N. bei 65°C im Rotationsofen. Danach wurde die Sondenlösung entfernt und die Nylon-Membran, zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Sondenfragmenten, mit zunehmender Stringenz zuerst für 30 min bei 65°C mit frischer Hybridisierungslösung (RotiHybriQuick; Roth, Karlsruhe, D), dann zweimal für jeweils 30 min bei 65°C mit Waschlösung I (2 x SSC, 0,1 % SDS) und anschließend für 10 min bei 65°C mit Waschlösung I (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen. Die Membran wurde abschließend kurz getrocknet. Die Detektion des radioaktiven Signal erfolgte über die Exponierung eines Phosphor-Image Screens (Kodak Storage Phosphor Screen SO230; Molecular Dynamics GmbH, Krefeld, D). Je nach Signalstärke wurde der Screen einen oder mehreren Tagen exponiert und mit dem Phosphor-Imager (Storm 860; Molecular Dynamics GmbH, Krefeld, D) ausgelesen.

2.2.2.8 RNA-Techniken

2.2.2.8.1 Allgemeine RNA-Techniken

Standardmethoden zur Handhabung und Manipulation von DNA wurden nach Sambrook *et al.* (1991) oder Ansubel *et al.* (1997) durchgeführt.

2.2.2.8.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* wurde das TRIsure-Reagenz (Bioline, Luckenwalde, D) verwendet. Dafür wurden zuerst 50-100 mg Blattmaterial in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in gefrorenem Zustand mittels eines Bohrers grob zerkleinert und unter Zugabe von zweimal 500 µl TRIsure-Reagenz weiter homogenisiert. Dann erfolgte eine kurzes Mischen der mittels Vortex und eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 15 s geschüttelt und für 2 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgte ein Zentrifugation der Proben für 10 min bei 4°C und 12.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 75%-igem Ethanol gewaschen. In Anschluss wurde für 5 min bei 4°C und 7.500 x g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend im Exsikkator getrocknet und in 30-50 µl DEPC/dH₂O (0,01% DEPC) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch, wie unter Kap. 2.2.2.5 beschrieben. Die Lagerunge der isolierten RNA erfolgte bei -70°C.

2.2.2.8.3 Semi quantitative RT-PCR

cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA wurde mit dem Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) oder BioScript (Bioline, Luckenwalde, D) durchgeführt.

Zuvor wurde die erhaltene RNA (Kap. 2.2.2.8.2) einer DNase Behandlung unterzogen, um eventuell vorhandenen DNA-Kontaminationen zu beseitigen. Dazu wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA mit DNase (10 U; Roche, Mannheim, D) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von EDTA (2,5 mM Endkonzentration) und Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min gestoppt.

Für das SuperScript II Reverse Transcriptase Kit wurde folgender 12 µl Reaktionsansatz verwendet: 1 - 2 µg Gesamt-RNA, 1 µl Oligo pd(T)₁₈-Primer (500 ng/µl), 1 µl dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 8 - 9 µl dH₂O. Dann erfolgte eine erhitzen des Ansatzes für 5 min auf 65°C, Abkühlen auf Eis und eine kurz Zentrifugation. Anschließend

wurden 4 µl 5x First-Strand Buffer, 1 µl 0,1 M DTT und optional 1 µl RNaseOUT (40 U/µl; Invitrogen, Paisley, UK) hinzugegeben und für 2 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 µl (200 U) SuperScript II Reverse Transkriptase dazugegeben und der Ansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen bei 70°C gestoppt. Die cDNA wurde dann bei -20°C gelagert oder direkt verwendet.

Für das BioScript Kit ist folgender 12 µl Reaktionsansatz verwendet worden: 1-2 µg Gesamt-RNA, 1 µl Oligo pd(T)₁₈-Primer (500 ng/µl) und 9 - 10 µl dH₂O. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden 4 µl 5x Reaction buffer, 1 µl dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), optional 10 U RNase Inhibitor hinzugegeben und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 19,75 µl aufgefüllt. Dann wurden 0,25 µl BioScript Reverse Transkriptase dazugegeben und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 70°C gestoppt. Die cDNA wurde dann bei -20°C gelagert oder direkt verwendet.

PCR

Für die Amplifikation von cDNA wurden 1 µl der cDNA-Reaktion für eine PCR (Kap. 2.2.2.2) eingesetzt. Dabei ist zuerst eine Kontrollreaktion unter Verwendung eines spezifischen Primerpaares für die mRNA des Haushaltsgenes Aktin2 durchgeführt worden. Damit konnte die Quantität der cDNA-Probe eingeschätzt und eventuelle genomische DNA-Kontaminationen detektiert werden. Anhand der erhaltenen Signalstärke war eine Normalisierung von verschiedenen cDNA-Proben, z.B. aus verschiedenen Organen und Geweben, möglich. Durch die Verwendung spezifischer Primer für die mRNAs, der zu untersuchenden Gene, konnte in den folgenden PCRs eine semiquantitative Aussage über deren Expression in den cDNA-Proben getroffen werden. Des Weiteren wurde diese Methode auch zur Isolierung der genspezifischen cDNAs verwendet.

2.2.2.9 Klonierungsmethoden

2.2.2.9.1 Allgemeine Klonierungsmethoden

Standard Methoden für die Klonierung und Manipulation von DNA wurden nach Sambrook *et al.* (1991) oder Ansubel *et al.* (1997) durchgeführt.

2.2.2.9.2 Gateway Klonierungstechnologie

Gateway ist eine universelle Klonierungstechnologie (Invitrogen, Paisley, UK), welcher als Grundlage das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda dient. Dabei wird das effiziente und gerichtete Rekombinationsverhalten zur Klonierung von DNA-Fragmenten in verschiedene Vektorsysteme, z.B. zur funktionellen Analyse oder zur Proteinexpression, genutzt.

Das gewünschte DNA-Fragment wird dabei zuerst über klassische Klonierungsverfahren in einen sogenannten *entry vector* integriert, welcher mit zwei *att*-Sequenzen (engl. *site-specific attachment site*) ausgestattet ist. Die Rekombination von dem *entry vector* in einen gewünschten *destination vector* wird über Proteine des *Clonase enzyme mix* vermittelt. Dabei erfolgt die gerichtete und sequenzspezifische Rekombination des DNA-Fragments über diese spezifischen *att*-Sequenzen. Im gegebenen Fall wird die Rekombination zwischen den *attL*-Sequenzen des *entry vector* und den *attR*-Sequenzen des *destination vector* durch den *LR Clonase enzyme mix* katalysiert. Es existiert eine Vielzahl von *destination vector*-en, mit unterschiedlichsten Eigenschaften, die eine flexible Analysen der Expression oder der funktionellen Eigenschaften einer beliebigen DNA-Sequenz ermöglicht.

Die Rekombination zwischen den *attP*-Sequenzen eines *donor vector* und den *attB*-Sequenzen eines DNA-Fragments wird über *BP Clonase enzyme mix* vermittelte. Durch diese Reaktion kann auf einem alternativen Weg ein *entry vector* mit *attL*-Sequenzen erzeugt werden.

2.2.2.9.3 Klonierung der cDNAs der *AtDAPs*

Zur Klonierung der *full-length* cDNAs von *AtDAP1*, 3, 4 und 5 wurden RAFL cDNA-Klone (Tab. 1) des RIKEN Bioresource Center (BRC; Ibaraki, Japan) verwendet (Seki *et al.*, 1998; 2002). Für *AtDAP2* erfolgte die Isolierung der cDNA aus Blattgewebe wie unter Kap. 2.2.2.8.2 und Kap. 2.2.2.8.3 beschrieben. Der proteinkodierende Teile der jeweiligen cDNA wurde mit sequenzspezifischen Primern unter Verwendung der PCR amplifiziert. Dabei wurden die *sense*-Primer mit einem 5' CACC-Überhang versehen, um die Klonierung in den *Gateway entry vector* pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Paisley, UK) zu ermöglichen. Als *antisense*-Primer wurden für jede cDNA zwei verschieden Oligonukleotide verwendet, die entweder das Stop-Kodon des Gens beinhalteten oder nicht. Um Fehler in der Basensequenz

auszuschließen, ist die *proofreading* DNA-Polymerasen *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) oder iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, München, D) nach Angaben der Hersteller verwendet worden. Die Überprüfung der Basensequenz dieser Klone, auf eventuelle Fehler, erfolgte durch Sequenzierung.

2.2.2.9.4 Klonierung von Promotor GUS-Reportergernekonstrukte für *AtDAP1* und *AtDAP2*

Um die organ- und gewebespezifische Aktivität der Promotoren von *AtDAP1* und *AtDAP2* zu untersuchen, wurden 2 kb-Fragmente direkt *upstream* des STAR-Kodons der entsprechenden Gene durch PCR unter Verwendung einer *proofreading* DNA-Polymerase amplifiziert. Dabei wurden die *sense*-Primer mit einem 5' CACC-Überhang versehen, um die Klonierung in den *Gateway entry vector* pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Paisley, UK) zu ermöglichen. Die Überprüfung der Basensequenz dieser Klone, auf eventuelle Fehler in der Basensequenz, erfolgte durch Sequenzierung. Anschließend wurden diese Fragmente unter Verwendung des *Clonase enzyme mix* (Invitrogen, Paisley, UK), nach Angaben des Herstellers, in den *destination vector* pGWB3 (Dr. T. Nakagawa; Shimane University, Japan) überführt. Durch diese Rekombination wurde eine C-terminale Fusion des Promotor-Fragmentes mit dem GUS-Reportergerne erzeugt. Dabei wird die Expression des GUS-Reportergerne über die Promotor-Fragmente vermittelt. Die Termination der Transkription erfolgt durch den *nos*-Terminator (T_{nos}).

2.2.2.9.5 Klonierung von GFP-Fusionskonstrukten der *AtDAPs*

Zur Analyse der möglichen Funktion des N-Terminus der AtDAP-Proteine als Transitpeptide, welche eine eventuelle subzelluläre Lokalisation vermitteln, wurden die ersten 300 Basenpaare der entsprechenden Gene durch PCR unter Verwendung einer *proofreading* DNA-Polymerase amplifiziert. Dabei wurden die *sense*-Primer mit einem 5' CACC-Überhang versehen, um die Klonierung in den *Gateway entry vector* pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Paisley, UK) zu ermöglichen. Die Überprüfung der Basensequenz dieser Klone, auf eventuelle Fehler in der Basensequenz, erfolgte durch Sequenzierung. Diese Klonierungen führte Barbara Kleinhenz durch. Des weitern wurden die vollständige Proteinsequenz der

AtDAP-Proteine zur Analyse der subzellulären Lokalisation herangezogen. Für diese Untersuchungen wurden die erzeugten *full-length* cDNA-Klone der entsprechenden Gene ohne Stop-Kodon (Kap. 2.2.2.9.3) verwendet.

Zur Klonierung wurden die N-terminalen DNA-Fragmente und die cDNA unter Verwendung des *Clonase enzyme mix* (Invitrogen, Paisley, UK), nach Angaben des Herstellers, in den *destination vector* pGWB5 (Dr. T. Nakagawa; Shimane University, Japan) überführt. Dadurch wurde eine C-terminale Fusion mit dem GFP-Reporter gen erzeugt. Die Expression der Fusions-Konstrukte wird dabei von dem 35S-CaMV-Promotor (P_{35S}) und dem nos-Terminator (T_{nos}) reguliert.

2.2.2.9.6 Klonierung von amiRNA-Konstrukten gegen *DAP1* und *DAP2*

Um den Phänotyp der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten zu verifizieren, wurde versucht ein *knock-out* der Gene durch *gene silencing* mittels artifizierender MirkoRNAs (amiRNAs) gegen *DAP1* und *DAP2* zu generieren. Dies ist nach der Methode von Schwab *et al.* (2006) unter Verwendung des Programms Web MicroRNA Designer (WMD, <http://wmd.weigelworld.org>) und des von Schwab erstellten Klonierungsprotokolls (<http://wmd.weigelworld.org>) durchgeführt worden. Dabei wurde der Vektor pRS300 als Matrize für das Rückgrat der miR319a und sechs Oligonukleotide verwendet. Davon enthalten je zwei Primerpaare (I und II, III und IV) zueinander komplementäre Sequenzen, welche spezifisch für einen Sequenzbereich des entsprechenden Genes sind. Des Weiteren sind diese Primer auch für Bereiche des Rückgrats der miR319a komplementär. Diese Primer wurden mit dem Programm Web MicroRNA Designer erstellt. Die zwei restlichen Primer (A und B) sind komplementär zu dem 5'- bzw. 3'- des miR319a-Fragments. Dabei wurde der *sense*-Primer mit einem 5' CACC-Überhang versehen, um die Klonierung in den *Gateway destination vector* pGWB2 (Dr. T. Nakagawa; Shimane University, Japan) zu ermöglichen. Zunächst erfolgten drei PCR-Reaktionen (1. A + IV, 2. II + III, 3. I + B), in denen mittels der Primer die genspezifischen Sequenzen für das Rückgrat der miR319a eingefügt wurden. Anschließend wurden diese Fragmente durch die Methode der *PCR-based fusion* nach Horton *et al.* (1989) unter Verwendung der Primer A und B fusioniert. Danach erfolgte eine Überführung dieser Fragmente unter Verwendung des *Clonase enzyme mix* (Invitrogen, Paisley, UK), nach Angaben des Herstellers, in den *destination vector* pGWB2 (Dr. T. Nakagawa; Shimane University, Japan). Die Expression der amiRNA wird dabei von dem

35S-CaMV-Promotor (P_{35S}) und dem nos-Terminator (T_{nos}) reguliert. Die Überprüfung der Basensequenz dieser Klone, auf eventuelle Fehler in der Basensequenz, erfolgte durch Sequenzierung.

2.2.2.9.7 Klonierung von Konstrukten für die Komplementation der *dap1*- und *dap2* - Mutanten

Um die T-DNA Insertionsmutanten *dap1* und *dap2* genetisch zu komplementieren, sind die erzeugten *full-length* cDNA-Klone der Gene (Kap. 2.2.2.9.3) verwendet worden. Dafür wurden die entsprechenden cDNAs in den *destination vector* pGWB2 (Dr. T. Nakagawa; Shimane University, Japan) überführt. Dadurch unterliegt die Expression der cDNAs der 35S-Promotor (P_{35S}) und dem nos-Terminator (T_{nos}).

Des Weiteren wurde versucht, die *dap1* Mutanten mit den homologen Genen aus *S. cerevisiae* (*YBR187w*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*sll0615*) und mit *AtDAP2* zu komplementieren. Um die proteinkodierende Basensequenz von *YBR187w* (keine Introns) und *sll0615* zu erhalten, wurde genomische DNA, wie unter Kap. 2.2.2.7.4 und Kap. 2.2.2.7.5 beschrieben, von diesen Organismen isoliert. Diese genomische DNA diente als Matrize für die PCRs, wobei eine *proofreading* DNA-Polymerase verwendet worden ist. Um die subzelluläre Lokalisation von AtDAP1 zu erzielen, war es nötig diese Gene mit der transitpeptidkodierenden N-terminalen Sequenz von AtDAP1 zu fusionieren. Dafür wurde die Methode der *PCR-based fusion* nach Horton *et al.* (1989) mit Modifikationen nach (Wurch *et al.*, 1998) und (Shevchuk *et al.*, 2004) verwendet. Da das Gen *YBR187w* eine transitpeptidkodierende N-terminale Präsequenz aufweist, wurde die ungefähre Größe des reifen Proteins durch Sequenzvergleiche und *cleavage site* Vorhersagen bestimmt und die Fusionsprimer dementsprechend positioniert. Zuerst wurden die DNA-Fragmente der zu fusionierenden Gene und der transitpeptidkodierenden Sequenz durch PCR amplifiziert und anschließend mit dem Vektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim, D) ligiert. Im Anschluss erfolgte eine Sequenzierung der erhaltenen Klone. Die von diesen Vektoren reamplifizierten Fragmente wurden dann durch die Methode der *PCR-based fusion* miteinander fusioniert. Diese PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Vektor pGEM-T Easy ligiert. Unter Verwendung der in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen erfolgte eine Klonierung dieser Fragmente in modifizierte Vektoren der pGreen II-Serie Dr. V. Maurino (Universität zu Köln, D). Die Fusionskonstrukte $TP_1:DAP2$ und $TP_1:sll0615$ wurde über die

Restriktionsschnittstellen von *Kpn* I und *Sal* I in den Vektor pGREEN II-35SnosKan kloniert. Das Fusionskonstrukt *TP₁:YBR187w* wurde über die Restriktionsschnittstelle *Bam*H I in den Vektor pGREEN II-35SnosHyg kloniert. Die Expression der Fusions-Konstrukte wird dabei von dem 35S-CaMV-Promotor (*P_{35S}*) und dem nos-Terminator (*T_{nos}*) reguliert.

2.2.2.9.8 Klonierung eines Insertionskonstruktes für das *DAP*-Homolog aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur Erzeugung einer Insertionsmutante für das homologe *DAP*-Gen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde genomische DNA, wie unter Kap. 2.2.2.7.4 beschrieben, isoliert. Durch PCR unter Verwendung einer *proofreading* DNA-Polymerase wurde der entsprechende Leserahmen, *sll0615*, amplifiziert und mit dem Vektor pGEM-T Easy ligiert. Dieser Vektor wurde mit *Msc* I, welches im Leserahmen *sll0615 blunt* schneidet, geöffnet. Im Anschluss erfolgt eine Phosphatasebehandlung des geöffneten Vektors. Aus dem Vektor pUK4Kan wurde durch Restriktion mit *Eco*R I die Kanamycin-Resistenzgenkassette *apHII* isoliert. Das *apHII*-Fragment wurde anschließend einem *Klenow fill-in* unterzogen, um *blunt ends* zu erzeugen. Zum Abschluss wurden das so behandelte *apHII*-Fragment mit dem phosphatasebehandelten Vektor ligiert. Der so erhaltene Vektor trägt eine Insertion im Leserahmen *sll0615*, welche die vollständige Transkription des Gens verhindert und eine Selektion über das Antibiotikum Kanamycin ermöglicht.

2.2.3 Botanische und pflanzenphysiologische Methoden

2.2.3.1 Oberflächensterilisation von Saatgut

Zur Oberflächensterilisation des Saatgutes von *A. thaliana* wurden die Methoden der Flüssigsterilisation mittels 30%-iger Natriumhypochlorid-Lösung oder die Gassterilisation mittels Chlorgas verwendet.

Flüssigsterilisation mit 30%-iger Natriumhypochlorid-Lösung:

Die Samen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 1ml 30%-iger NaClO₄ mit 0,2% Tween 20 überschichtet und anschließend für 10 min geschüttelt. Danach ist die Lösung

abgesaugt und die Samen sind zweimal mit sterilem Leitungswasser gewaschen worden. Abschließend wurden die Samen entweder auf sterilem Filterpapier unter der Sterilbank getrocknet oder in 0,15%-iger Agarose-Lösung aufgenommen und anschließend auf Agar-Platten ausgebracht.

Gassterilisation mit Chlorgas:

Die Samen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit geöffnetem Deckel in einen Exsikkator gestellt. In den Exsikkator wurde ein Becherglas gestellt, mit 100 ml NaClO₄ gefüllt und mit 5 ml 37%-iger HCl versetzt. Der Exsikkator ist anschließend schnell verschlossen und die Samen sind bei sich entwickelndem Chlorgas für 3 - 12 h inkubiert worden. Danach wurden die geöffneten Eppendorfgefäße zum Abdampfen des restlichen Chlorgases für 2 h unter die Sterilbank gestellt.

2.2.3.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzenanzucht erfolgte entweder in Sterilkultur auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) oder auf Erde.

2.2.3.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

Die Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur erfolgte auf ½ MS-Festmedium (4,4 g/l Murashige & Skoog-Salze inklusive modifizierter Vitamine (M0245; Duchefa, Haarlem, NL), 10 g/l Saccharose, 8 g/l Difco Agar; pH 5,7) nach Murashige and Skoog (1962) in Petrischalen (Ø 90 mm). Für die Selektion transgener Pflanzen wurden die entsprechenden Antibiotika dazugegeben. Die oberflächensterilisierten Samen wurden mittels steriler Zahnstocher oder in 0,15%-iger Agarose-Lösung mittels Pipette ausgelegt. Die Petrischalen wurden mit Gewebeklebeband versiegelt für drei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend unter den gewünschten Kulturbedingungen angezogen. Die Pikierung auf Erde erfolgte gegebenenfalls nach ca. 1½ Wochen.

2.2.3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

A. thaliana wurde auf Vermehrungssubstrat A210 (Stender AG, Schermbeck, D) oder alternativ auf Einheitserde Typ ED73 (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa, D) angezogen. Vor der Aussaat erfolgte eine Befeuchtung des Substrats mit Wasser. Die Samen wurden für drei Tage zur Brechung der Samenruhe und Synchronisation der Keimung bei 4°C stratifiziert und anschließend unter den gewünschten Kulturbedingungen angezogen. Bis zur vollständigen Ausbildung der Keimblätter wurden die Keimlinge unter einer Pikierhaube gehalten. Nach ca. zwei Wochen erfolgte eine Pikierung in Rundtöpfen (Ø 6 cm oder Ø 9 cm) oder in 77-er Multitray-Platten. Die Wässerung der Pflanzen erfolgte einmal wöchentlich durch Anstauen. Sobald ein beginnendes Abreifen der Schoten zu erkennen war, wurden die Stängel mit einer Pergamenttüte überzogen und verschlossen, um die Samen aufzufangen.

Die Schädlingsbekämpfung von Weißer Fliege, Minierfliege, Trauermücke und geflügelte Blattlaus erfolgte mit Gelbtafeln (Hermann Meyer KG, Willich, D). Zur Bekämpfung von Blütenthrips wurden Blautafeln (Hermann Meyer KG, Willich, D) verwendet.

Die biologische Schädlingsbekämpfung erfolgte durch routinemäßiges Applizieren einer Nematodensuspension (*Steinernema feltiae*; Sautter und Stepper, Ammerbuch, D) zur präventiven Bekämpfung eines Befalls mit Trauermückenlarven und Thrips. Des Weiteren wurden Florfliegenlarve (*Chrysoperla carnea*; Sautter und Stepper, Ammerbuch, D) präventiv gegen den Befall mit Blattläusen, Thrips, Spinnmilben, Raupen oder Woll-/Schmierläusen eingesetzt.

Bei der chemischen Schädlingsbekämpfung kamen die Insektizide Confidor (Bayer CropScience, Mohnheim, D), Consereve (Spiess-Uranic Chemical GmbH, Hamburg, D) und Bulldock (Feinchemie Schwelda GmbH, Eschwege, D) gegen Weiße Fliege, Trauermücken, Blattläuse, Thrips sowie weitere beißende und saugende Insekten zum Einsatz. Weiterhin wurden das Fungizid Baymat (Bayer CropScience, Mohnheim, D) gegen echten Mehltau und Rost eingesetzt.

2.2.3.3 Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen in Sterilkultur erfolgte in Phytokammern (Percival Scientific, Iowa, USA). Die Anzucht auf Erde erfolgte in Phytokammern (Percival Scientific, Iowa, USA) oder im Gewächshaus bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50%.

Dabei wurden folgende Anzuchtbedingung realisiert:

- Phytokammer:
 - Kurztag
 $LD = 8 \text{ h (22}^\circ\text{C)/16 h (18}^\circ\text{C), PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
 - Langtag
 $LD = 12 \text{ h (22}^\circ\text{C)/12 h (18}^\circ\text{C), PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
 $LD = 16 \text{ h (22}^\circ\text{C)/8 h (18}^\circ\text{C), PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
- Gewächshaus:
 - Langtag
 $LD = 16 \text{ h (20}^\circ\text{C)/8 h (18}^\circ\text{C), PFD} = 80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

2.2.3.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde mit der Methode der Vakuuminfiltration von Infloreszenzen mit Agrobakterien nach Bechthold *et al.* (1993) durchgeführt.

Von den zu transformierenden Pflanzen wurden je fünf in einen mit Erde gefüllte Rundtöpfe (\varnothing 10 cm) pikiert und bis zur Blüte angezogen. Nach Resektion der Primärinfloreszenzen und der Ausbildung von zahlreichen blühenden Sekundärinfloreszenzen sind diese Pflanzen zur Transformation eingesetzt worden.

Die zur Transformation benötigten rekombinaten Agrobakterien wurden in 5ml LB-Medium, versetzt mit den zur Selektion benötigten Antibiotika, inokuliert und bei 28°C und 200 U/min für ca. 36 h Tage im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend erfolgte eine Überführung der Vorkultur in eine 300 ml LB-Medium, versetzt mit den zur Selektion benötigten Antibiotika, und eine Inkubation ü. N. bei 28°C und 200 U/min bis zu einer OD_{600} von 0,8 - 1,0. Die Zellen wurden dann für 15 min bei 2.500 x g abzentrifugiert und in Infiltrationsmedium (0,5 g/l MES, 2,2 g/l MS-Salze inklusive modifizierten Vitaminen (M0222; Duchefa, Haarlem, NL), 50 g/l Saccharose, 0,01% Tween 20; pH 5,8) resuspendiert. Die Agrobakterien-

suspension ist in eine Petrischale (Ø 13,5 cm) überführt und in einen Exsikkator gestellt worden. Die *A. thaliana* Pflanzen wurden mit den Infloreszenzen kopfüber in die Suspension getaucht. Dann erfolgte das Anlegen von Unterdruck mittels einer Wasserstrahlpumpe für zweimal 5 min. Die infiltrierten Pflanzen wurden für vier Tage unter einer Plastikhaube angezogen und unterer Langtagbedingungen zur Samenreife gebracht.

2.2.3.5 Selektion transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Selektion auf MS-Festmedium:

Die Selektion von *A. thaliana* in Sterilkultur erfolgte durch Ausbringen von oberflächensterilisierten Samen (Kap. 2.2.3.1) auf ½ MS-Agar-Platten (Kap. 2.1.7) unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika. Die Pikierung auf Erde erfolgte nach ca. 1½ Wochen.

BASTA-Selektion auf Erde:

Die Selektion auf Erde mittels BASTA erfolgte nach der Ausbildung der ersten beiden Rosettenblätter (ca. 10 - 12 Tage) durch BASTA-Lösung (0,1% Basta (Aventis, Düsseldorf, D), 0,01% Tween 80 gelöst in Leitungswasser). Gegebenenfalls wurde diese Behandlung nach 4 - 6 Tagen wiederholt. Nach ca. 1½ Wochen wurden die resistenten Pflanzen in Einzeltöpfe pikiert.

2.2.3.6 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Für das Kreuzen von *A. thaliana* wurden Primärinfloreszenzen von 6 - 8 Wochen alten Pflanzen verwendet. Dabei wurde unter Verwendung eines Binokulars und Pinzetten bei den Akzeptorpflanzen drei junge, noch nicht geöffneten, Blütenknospen emaskuliert sowie die Kelch- und Kroneblätter entfernt. Die restlichen Blütenknospen wurden ebenfalls entfernt. Anschließend erfolgte eine Übertragung der Pollen der entfernten Saublätter der Donorpflanze auf die Narbe der Akzeptorpflanze. Die so bestäubten Blüten wurden markiert und die Pflanzen für zwei Tage unter einer Pikierhaube in feuchten Bedingungen gehalten. Die aus der Kreuzung hervorgehenden Schoten wurden separat geerntet.

2.2.3.7 Anzucht und Protoplastierung einer Tabak-Zellsuspension

Anzucht:

Für die Tabak-Suspensionskulturen wurden Zellen von *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow-2 verwendet. Die BY2-Suspensionskulturen wurden für vier Tage in 70 ml BY2-Zellkulturmedium bei 22°C und 120 U/min auf einem Schüttler unter Ausschluss von Licht herangezogen.

BY2-Zellkulturmedium: (autoklaviert)

4,4 g/l MS-Salze, 30 g/l Saccharose, 100 mg/l myo-Inositol, 1 mg/l Thiamin-HCl, 0,2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 255 mg/l KH₂PO₄; pH 5,0

Protoplastierung:

Von der vier Tage alten BY2-Zellkultur wurden zweimal jeweils 20 ml mit einer Plastikpipette (große Öffnungsweite; Corning, New York, USA) entnommen und in 50 ml Reaktionsgefäße (Corning, New York, USA) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei RT für 5 min und 400 x g schonend pelletiert. (Bei allen folgenden Zentrifugationschritten wurde ohne Bremswirkung der Zentrifuge gearbeitet.) Der Überstand ist verworfen und das Pellet in 25 ml Waschlösung resuspendiert worden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei RT für 5 min und 400 x g. Der erhaltene Überstand wurden anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 13 ml Verdaulösung resuspendiert und der Ansatz in Petrischalen (Ø 90 mm) überführt. Diese wurden mit Parafilm abgedichtet und für den Zellwandverdau ü. N. bei 26°C abgedunkelt inkubiert.

Waschlösung: (sterilfiltriert)

0,5 % (w/v) BSA, 0,01 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Na-Acetat (pH 5,8), 0,25 mM Mannitol

Verdaulösung: (sterilfiltriert)

Waschlösung mit folgende Enzyme:

1 % (w/v) Cellulase Onozuka RS (Serva, Heidelberg, D)

0,5 % (w/v) Macerozyme OnozukaR-10 (Serva, Heidelberg, D)

0,1 % (w/v) Pectinase (Sigma-Aldrich, München, D)

2.2.3.8 Transfektion von Tabakprotoplasten

Zur Transformation von Tabakprotoplasten wurde die Methode der PEG-vermittelten Transfektion angewendet. In Vorbereitung auf die Transfektion wurde die PEG-Lösung bei 37° C aufgetaut und für einige Stunden bei dieser Temperatur inkubiert. Die restlichen Lösungen wurden bei RT verwendet. Um die Zellwände von den Protoplasten zu lösen, sind die Petrischalen mit den BY2-Tabakprotoplasten nach der Inkubationszeit jeweils mehrere Male alle 10 min vorsichtig geschwenkt worden. Die Protoplasten wurden mit einer Plastikpipette (große Öffnungsweite) vorsichtig in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 5 min und 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein kleines Restvolumen abgenommen. Anschließend erfolgte langsam die Zugabe von 25 ml Waschlösung und vorsichtiges Mischen. Die Suspension wurde erneut bei RT für 5 min und 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum bis auf ein kleines Restvolumen abgenommen. Anschließend wurden in 1 ml- Schritten langsam insgesamt 10 ml W5-Lösung zugegeben und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Die Suspension ist dann erneut bei RT für 5 min und 100 x g pelletiert worden. Anschließend wurde der Überstand möglichst komplett abgenommen. Danach wurde zum ersten Ansatz 5 ml, zum zweiten 10 ml W5-Lösung in 1 ml-Schritten zugegeben. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Protoplastendichte durch eine Doppelbestimmung mit einer Neubauer-Zellzählkammer. Dazu wurden je Ansatz 10 µl Protoplastensuspension verwendet.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} = \text{ermittelte Anzahl der Zellen} \cdot \text{Kammerzahl} (10^4) \cdot \text{Volumen Zellsuspension (ml)}$$

Die Protoplastensuspension wurde nun für 60 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend sind die Protoplasten erneut für 5 min und 100 x g bei RT pelletiert und der Überstand ist vollständig entfernt worden. Die Protoplasten wurden in 1 ml- Schritten vorsichtig in insgesamt 10 ml MMM-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde erneut für 5 min bei 100 x g und RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun erfolgte eine Einstellung der Konzentration der Protoplasten durch Zugabe von MMM-Lösung, unter Berücksichtigung der ermittelten Zellzahl, auf ca. 10^6 Zellen je 300 µl Zellsuspension. Zur Transformation wurden 25 µg Plasmid-DNA (Midi-Präparation; Volumen max. 30 µl) in eine 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 300 µl der Protoplastensuspension (ca. 10^6 Zellen) hinzugegeben. Dann sind 300 µl PEG-Lösung tropfenweise, unter ständigen Drehen des Reaktionsgefäßes, vorsichtig dazugegeben worden. Im Anschluss erfolgte eine

Inkubation des Ansatzes für 20 min bei RT. Zum Abstoppen der Transfektion wurden 10 ml W5-Lösung, in Schritten von 1 ml, 2 ml, 3 ml und 4 ml vorsichtig und unter ständigem Drehen des Reaktionsgefäße dazugegeben. Die Protoplasten wurden dann erneut bei RT für 5 min und 100 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Es sind dann in 0,2 ml-, 0,5 ml- und in 1 ml-Schritten insgesamt 4 ml K3-Medium vorsichtig und unter ständigem Drehen hinzugegeben worden. Nach der ersten Zugabe wurde bis zum nächsten Schritt 2 min gewartet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellsuspension für 2 min bei RT. Die Protoplasten wurden darauf in Petrischalen (Ø 45 mm) überführt und mit Parafilm verschlossen. Zum Abschluss wurde die Protoplastensuspensionen ü.N. im Dunkeln bei 22 - 26°C inkubiert. Die Analyse der GFP-Expression erfolgte innerhalb der folgenden zwei Tage nach Transfektion der Protoplasten am Fluoreszenzmikroskop. Die ermittelte subzelluläre Lokalisation wurde exemplarisch dokumentiert.

W5-Lösung: (pH 5,8 - 6,0) (sterilfiltriert)

154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glucose

MMM-Lösung: (sterilfiltriert)

15 mM MgCl₂, 0,5 % (w/v) MES/KOH (pH 5,8), 0,5 M Mannitol

PEG-Lösung: (pH 8,0 - 9,0) (sterilfiltriert)

40 % (w/v) PEG 4000, 0,4 M Mannitol, 0,1 M Ca(NO₃)₂

K3-Medium (Stammlösungen):

Makroelemente: (sterilfiltriert)

1,5 g/l NaH₂PO₄ x H₂O, 9 g/l CaCl₂ x 2H₂O, 25 g/l KNO₃, 2,5 g/l NH₄NO₃, 1,34 g/l (NH₄)₂SO₄, 2,5 g/l MgSO₄ x 7H₂O

Mikroelemente: (sterilfiltriert)

75 mg/l KI, 300 mg H₃BO₃, 1 g/l MnSO₄ x 7H₂O, 200 mg/l ZnSO₄ x 7H₂O, 25 mg/l Na₂MoO₂ x 2H₂O, 2,5 mg/l CuSO₄ x 5H₂O, 2,5 mg/l CoCl₂ x 6H₂O

Vitamine: (sterilfiltriert)

100 mg/l Nicotinsäure, 100 mg/l Pyridoxin-HCl, 1 g/l Thiamin-HCl

EDTA/Eisen: (autoklaviert)

7,46 g/l EDTA (in 300 ml dH₂O vorgelöst, erwärmt), 5,56 g/l Fe(II)SO₄ x 7H₂O (in 300 ml dH₂O vorgelöst, erwärmt)

Ca-Phosphat: (pH 3,0, mit 25 % HCl) (autoklaviert)

1,26 g/l CaHPO₄ x 2H₂O in 200 ml dH₂O gelöst

Naphtylessigsäure (NAA): (sterilfiltriert)

1 mg/ml Naphtylessigsäure (in dH₂O gelöst + einige Tropfen NaOH)

Kinetin: (sterilfiltriert)

0,5 mg/ml Kinetin in 0,1 M HCl

K3-Medium (pH 5,6): (sterilfiltriert)

100 ml Makroelemente, 1 ml Mikroelemente, 1 ml Vitamine, 5 ml EDTA/Eisen, 10 ml Ca-Phosphat, 100 mg myo-Inositol, 250 mg D(+)-Xylose, 137 g Saccharose, 1 ml NAA, 0,4 ml Kinetin

2.2.3.9 Anzucht und Transformation einer *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspension

Die Anzucht und Transformation einer *A. thaliana*-Zellkultur erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Koroleva *et al.* (2005). Dazu wurde die Zellsuspension in AT-Medium im Dunkeln bei 25°C in einem Schüttelinkubator bei 175 U/min angezogen. Die Zellsuspension wurde alle 7 Tage 1 : 5 mit frischem AT-Medium verdünnt. Für die Transformation erfolgte eine Überführung der zu untersuchenden Konstrukte in den supervirulenten Agrobakterienstamm LB4404 (pBBR1MCS.virGN54D) (Kovach *et al.* 1995). Die rekombinanten Agrobakterien sowie der *antisilencing*-Stamm RK19 wurden in YEB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, für 24 h bei 28°C in einem Schüttelinkubator bei 200 U/min angezogen. Anschließend sind die Agrobakterienkulturen für 15 min bei 2.500 x g abzentrifugiert und in 1 ml AT-Medium resuspendiert worden. Zur Transformation wurden je 3 ml einer frisch verdünnten *A. thaliana*-Zellkultur in eine Mikrotiterplatte mit 6 Kavitäten fassende Zellkulturplatte (Corning, New York, USA) überführt. Dazu wurden je 25 µl der Agrobakterienkultur des konstrukttragenden Stammes

LB4404 (pBBR1MCS.virGN54D) und der Agrobakterienkultur des *antisilencing*-Stammes RK19 dazugegeben. Die Ansätze wurden im Dunkeln bei 25°C in einem Schüttelinkubator bei 175 U/min inkubiert. Die Analyse der GFP-Expression erfolgte im Anschluß an eine 2 bis 4-tägiger Inkubation mittels Fluoreszenzmikroskop. Die ermittelte subzelluläre Lokalisation wurde exemplarisch dokumentiert.

AT-Medium: (pH 5,8) (autoklaviert)

4,4 g/l MS-Salze (M0221; Duchefa, Haarlem, NL), 30 g/l Saccharose, 400 mg/l myo-Inositol, 4 ml/l B5-Vitamin-Lösung, 1 ml/l 2,4D-Lösung (nach dem autoklavieren dazugeben)

B5-Vitamin-Lösung: (sterilfiltriert)

100 mg/ml Nicotinsäure, 100 mg/l Pyridoxin-HCl, 1 g/l Thiamin-HCl

2,4D-Lösung: (sterilfiltriert)

1 mg/ml 2,4D (40 mg 2,4D in 4ml EtOH lösen, mit dH₂O auf 40 ml auffüllen)

2.2.3.10 Messung der Chlorophyllfluoreszenz (PAM-Fluorometrie)

Im Prinzip dient die Chlorophyllfluoreszenz als Indikator für die Aktivität einer Vielzahl von photosynthetischen Prozessen, z.B. der primäre Lichtreaktion, dem Elektronentransport an der Thylakoidmembran, Dunkelreaktion, langsamer regulatorischer *feedback*-Mechanismen oder Prozessen auf der Pigmentebene. Die Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz an intakten Blättern bei Raumtemperatur beruht im wesentlichen auf der Fluoreszenzemission des Photosystem II (PSII) (Krause und Weis, 1991). Zur Quantifizierung der Chlorophyllfluoreszenz wurde die Methode der Puls-Amplituden-Modulations (PAM)-Fluorometrie (Schreiber *et al.*, 1986) benutzt. Bei dieser Methode wird das Messlicht schwach gepulst (moduliert) verwendet. Das Messlicht ist dabei durch eine Pulszeit von 1 µs, eine Frequenz von 1,6 kHz, eine Wellenlänge $\lambda < 680$ nm und eine Photonenflussdichte (PFD) von 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gekennzeichnet. Dabei ist das Messlicht zu schwach, um photosynthetischen Elektronentransport zu initiieren, regt aber die Chlorophyll a-Moleküle an, getaktet Fluoreszenz auszusenden. Von einem getakteten Detektor, welcher mittels eines Filter ($\lambda < 700$ nm) Störsignale durch aktinisches Licht ignoriert, werden die modulierten Fluoreszenzsignale registriert und verstärkt. Bei Belichtung mit photosynthetisch aktivem

(aktinischem) Licht kann so selektiv die Fluoreszenzausbeute des PSII gemessen werden, welches Rückschlüsse auf die Photosyntheseleistung zulässt. Eine schematische Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz ist in Abb. 2.1 dargestellt.

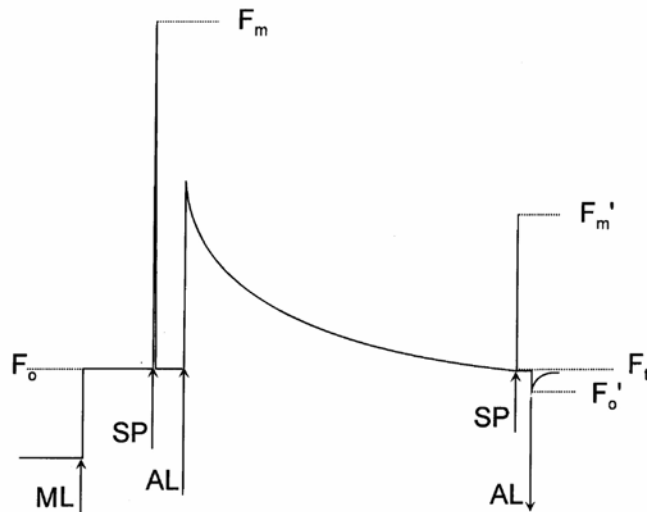


Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz mit Fluoreszenzparametern. (verändert nach Maxwell und Johnson, 2000) $AL \uparrow$ = aktinisches Licht an, $AL \downarrow$ = aktinisches Licht aus, $ML \uparrow$ = Messlicht an, $SP \uparrow$ = saturierende Lichtpulse. Die Fluoreszenzparameter und Fluoreszenzkoeffizienten sind in Tab. 2.8, 2.9 und im Text erklärt.

Durch Einschalten des Messlichts, welches von so geringer Lichtintensität ist ($PDF < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), dass keine Photosynthese betrieben werden kann, wird die Messung gestartet. Diese Lichtintensität stellt sicher, dass alle Reaktionszentren im offenen Zustand sind, und Q_A vollständig oxidiert ist. Die ermittelte Chlorophyllfluoreszenzausbeute stellt F_0 , die Grundfluoreszenz, dunkeladaptierter Blätter dar. Durch einen kurzen sättigenden Lichtpuls ($PDF > 4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) wird F_m , die maximale Fluoreszenz, dunkeladaptierter Blätter ermittelt. Dabei werden alle Reaktionszentren in einen geschlossenen Zustand überführt, und Q_A wird vollständig reduziert. Die Differenz von F_m und F_0 ist F_v , die variable Fluoreszenz. Aus dem Verhältnis von F_v/F_m wird die maximale Quanteneffizienz des PSII abgeleitet (Butler, 1978). Durch Einschalten einer aktinischen Lichtquelle wird ein Teil von Q_A in den ersten Sekunden der Belichtung reduziert und die Fluoreszenzausbeute steigt. Danach ist, mit dem Einsetzen photochemischer Prozesse und Wärmedissipation, wieder eine Abnahme der Fluoreszenzausbeute zu verzeichnen (Kautsky-Effekt). Diese wird als transiente Fluoreszenzausbeute (F_t) bezeichnet und strebt einen konstanten Wert an (*steady state*). Nach der Applikation weiterer sättigenden Lichtpulse, bei gleichzeitiger Belichtung mit

aktinischem Licht, wird die maximale Fluoreszenzausbeute (F_m') lichtadaptierter Blätter erhalten. Daraus lassen sich vielfältige Parameter, wie die photochemische Fluoreszenzlöschung (qP), die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (qN), die Quantenausbeute des PSII Elektronentransports (Φ_{PSII} ; Genty *et al.*, 1989) und die Elektronentransportrate (ETR), ableiten (Tab. 2.9).

Zur Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz wurde das Fluorometer PAM-2000 mit Fiberotic 2010-F und Leaf-Clip Holder 2030-B (Walz, Effeltrich, D) eingesetzt. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software DA-2000 (Walz, Effeltrich, D).

Dabei wurde das F_v/F_m -Verhältnis für dunkeladaptierten Blättern (10 min) ermittelt. Die Bestimmung der Photosynthese-Parameter F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP, qN und ETR wurde an dunkeladaptierten Blättern mit anschließender Belichtung bei einer Lichtintensität von $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durchgeführt. Die Experimente zur Erfassung von qP, qN und ETR erfolgten in einer Lichtreihe an dunkeladaptierten Blättern und Lichtintensitäten von 20, 35, 60, 125, 250, 300, 500, 750 und $1100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Zur Erfassung einer Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz wurden dunkeladaptierte Blätter und eine Lichtintensität von $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ verwendet.

Tab. 2.8: Fluoreszenzparameter und -koeffizienten.

ETR	Elektronentransportrate
F_0	minimale Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter, Grundfluoreszenz
F_0'	minimale Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_m	maximale Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter, Maximalfluoreszenz
F_m'	maximale Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_t	transiente Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_v	variable Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter
F_v'	variable Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_v/F_m	maximale Quanteneffizienz des PSII
Φ_{PSII}	Quantenausbeute des PSII Elektronentransports
PDF	Photonenflussdichte
qN	nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung
qP	photochemische Fluoreszenzlöschung

Tab. 2.9: Berechnung der Fluoreszenzkoeffizienten.

$$\text{ETR} = \text{Yield} \cdot \text{PAR} \cdot 0,5 \cdot 0,84$$

$$qP = (F_{m'} - F_t) / (F_{m'} - F_0')$$

$$qN = 1 - (F_{m'} - F_0') / (F_m - F_0)$$

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

$$\Phi\text{PSII} = (F_{m'} - F_0') / F_{m'}$$

2.2.3.11 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte erfolgte photometrisch nach der Methode von Graan und Ort (1984).

Dazu wurde 25 mg Blattmaterial in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in 1 ml 80%-igem Aceton homogenisiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min im Dunkeln inkubiert und für 1 min bei 5°C und 20.000 x g zentrifugiert. Je nach Konzentration des Ansatz wurde dieser mit 80%-igem Aceton verdünnt und in eine 1 ml Küvette überführt. Die photometrische Konzentrationsbestimmung des Ansatzes erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda = 648 \text{ nm}$ (Chl b), $\lambda = 652 \text{ nm}$ (Gesamtchlorophyll) und $\lambda = 664 \text{ nm}$ (Chl a). Unter Verwendung der von Graan und Ort (1984) definierten Extinktionskoeffizienten wurden die Chlorophyllgehalte ermittelt.

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = 13,19 \cdot A_{664} - 2,57 \cdot A_{648}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = 22,10 \cdot A_{648} - 5,26 \cdot A_{664}$$

$$\text{Chl a+b } (\mu\text{g/ml}) = 7,93 \cdot A_{664} + 19,53 \cdot A_{648}$$

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung von lösliche Zuckern und Stärke

Zur Bestimmung der Gehalte an löslichen Zuckern (Glukose, Fruktose, Saccharose) und Stärke wurden 30 - 100 mg Blattmaterial in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in gefrorenem Zustand mittels eines Bohrers grob zerkleinert und mit 500 µl 80%-igem Ethanol versetzt. Die Extraktion der löslichen Zuckern erfolgte zweimal für je 30 min bei 80°C, wobei der 80%-ige Ethanol einmal gewechselt wurde. Die ethanolischen Extrakte wurden anschließend vereinigt und im Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen, D) eingeengt. Das Pellet wurde in 200 µl Wasser resuspendiert und die Schwebstoffe bei 20.000 x g für 10 min präzipitiert. Die Ansätze wurden entweder sofort analysiert oder bei -20°C gelagert.

Von dem ausgebleichten Blattmaterial erfolgte parallel dazu die Stärkeextraktion. Dazu wurde die Blattfragmente unter Zugabe von zweimal 250 µl 0,2 M KOH mittels Bohrers erneut homogenisiert. Die Ansätze wurden anschließend für 45 min bei 90°C erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Proben mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,5 bis 6,0 eingestellt. Durch Zugabe von 3,5 U α -Amylase und 2,5 U Amyloglucosidase (in Na-Acetat-Puffer, pH 4,6) erfolgte eine enzymatische Hydrolyse der Stärke zu Glukose bei RT ü.N.. Die Reaktion wurde danach durch eine Inkubation bei 95°C für 10 min gestoppt. Die Präzipitation von Schwebstoffen erfolgte durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und entweder sofort analysiert oder bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration von Glukose, Fruktose und Saccharose wurde in einem gekoppelten optischen Test nach Bergmeyer (1970) durchgeführt. Dabei wurde die Extinktionsänderung bei 340 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät SpectroFlour Plus (TECAN GmbH, Crailsheim, D) und der Software EasyWin Kinetics V6.0a (TECAN GmbH, Crailsheim, D) ermittelt.

Die Bestimmung erfolgte in folgenden Reaktionsansatz (200µl):

100 mM Hepes/ KOH (pH 8,0), 0,6 mM NADP⁺, 2 mM ATP, 10 mM MgCL₂
+ 2,5 % (v/v) Probe

Die Bestimmung der löslichen Zucker erfolgte durch sequentielle Zugabe der folgenden Enzyme:

- 0,07 U Glk-6-P-DH
- 0,75 U Hexokinase Bestimmung der Glukose-Konzentration
- 0,07 U Phosphoglukose-Isomerase Bestimmung der Fruktose-Konzentration
- 120 U Invertase Bestimmung der Saccharose-Konzentration

Die Bestimmung von Stärke, welche zuvor zu Glukose hydrolysiert wurde, erfolgte durch Zugabe der folgenden Enzyme:

- 0,07 U Glk-6-P-DH
- 0,75 U Hexokinase Bestimmung der Glukose-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der Zucker erfolgt anhand der absoluten Extinktionsänderung des entstandenen NAD(P)H bei 340 nm unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

- E : Extinktion
- ϵ : Extinktionskoeffizient des gelösten Stoffes
- c : Konzentration des gelösten Stoffes
- d : Schichtdicke der Lösung

Unter Umformung nach c und Anwendung einer variablen Schichtdicke wurde die Konzentrationsänderung von NAD(P)H mit der folgenden Formel berechnet:

$$\Delta c = \frac{\Delta E \cdot \pi \cdot r^2}{\epsilon_{340}(\text{NADPH}) \cdot V_E}$$

- Δc : absolute Konzentrationsänderung
- ΔE : absolute Extinktionsänderung
- r : Radius [cm]
- $\epsilon_{340}(\text{NADPH})$: Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm [$\text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$]
- V_E : eingesetztes Probevolumen [cm^3]

2.2.4.2 GUS-Färbung von Pflanzengewebe

Der qualitative histochemische Nachweis von β -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Test; Jefferson *et al.*, 1987) in den Organen und Geweben von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen wurde mit der Methode nach Stomp (1992) durchgeführt. Dazu wurden DNA-Fragmente der entsprechenden Promotoren mit dem Reporterogen *uidA* (GUS, β -Glucuronidase) aus *E. coli* (Novel and Novel, 1973) fusioniert. Diese Konstrukte wurden anschließend durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer stabil in das Genom von *A. thaliana* überführt. Verschiedene Linien der T₂-Generation dieser Pflanzen wurden dann hinsichtlich des GUS-Expressionsmusters untersucht. Durch die β -Glucuronidase wird das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) zu Brom-4-Chlor-Indol umgesetzt, welches zu einem blauen Indigofarbstoff dimerisiert (Abb. 2.2). Dieser Farbstoff ist wasserunlöslich und nicht diffusibel. Über diese spezifische Färbung kann daher die Aktivität des GUS-Reportergens dort nachgewiesen, wo es exprimiert wird. Dadurch ist ein sehr detaillierter Rückschluss auf die organ- und gewebespezifische Aktivität des zu untersuchenden Promotorfragmentes und die daraus resultierende Expression des entsprechenden Gene möglich. Dazu wurden die Proben je nach ihrer Größe in entsprechende Reaktionsgefäße überführt und mit GUS-Färbelösung bedeckt. Anschließend wurde zweimal für 15 min eine Vakuuminfiltration der Proben im Exsikkator durchgeführt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 37°C. Je nach der Stärke der β -Glucuronidase-Aktivität wurden die Inkubation von wenigen Minuten bis auf mehrere Stunden ausgedehnt bis eine deutliche Blaufärbung erkennbar war. Die Reaktion wurde durch das Entfernen der GUS-Färbelösung und anschließender Zugabe der GUS-Fixierungslösung gestoppt. Im Anschluss wurde für 30 min bei 60°C inkubiert. Danach wurden die chlorophyllhaltigen Proben zweimal in 80%-igem Ethanol bei 60°C entfärbt. Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Proben in Parafin eingebettet. Ansonsten wurden die Proben direkt mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

GUS-Färbelösung:

0,1 M NaPO₄-Puffer (pH 7,2), 10 mM EDTA, 0,5 mM K₃Fe(CN)₆ (K-Ferricyanid), 0,5 mM K₄Fe(CN)₆ (K-Ferrocyanid), 0,1 % Triton X-100, 1 mM X-Glucuronid (gelöst in DMF)

GUS-Fixierungslösung:

50 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure, 3,7 % (v/v) Formaldehyd

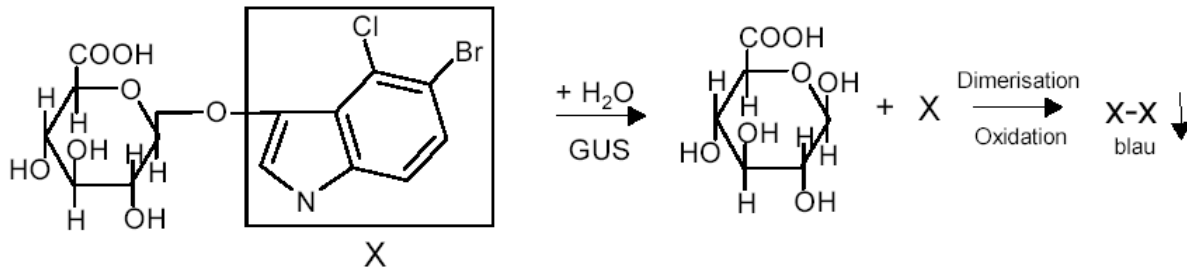


Abb. 2.1: Reaktionsschema des Nachweises der β -Glucuronidase (GUS) -Aktivität unter Verwendung des Substrates X-Gluc im quantitativen GUS-Test.

2.2.4.3 Wasserstoffperoxid-Färbung

Die Färbung von Wasserstoffperoxid wurde mittels Färbung von 3,3-Diaminobenzidin (DAB) nach der Methode von Thordal-Christensen *et al.* (1997) durchgeführt. Dabei polymerisiert DAB spontan und lokal in Kontakt mit Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit einer Peroxidase. Das polymerisierte DAB ist dabei durch eine bräunliche Färbung gekennzeichnet.

Für die Färbung wurden ganze Blattrosetten verwendet und in Petrischalen (\varnothing 90 mm) überführt. Nach Zugabe der DAB-Färbelösung wurde zweimal für ca. 15 min eine Vakuumfiltration durchgeführt. Danach sind die Blattrosetten auf feuchtes Whatman-Papier ausgelegt und dem gewünschten Stress ausgesetzt worden. Anschließend erfolgte eine Überführung der Blattrosetten in die DAB-Fixierungslösung und eine Inkubation für 45 min. Im Anschluss wurde das Blattmaterial bei 60°C in 80%-gem Ethanol entfärbt.

DAB-Färbelösung:

1 mg/ml 3,3-Diaminobezidin (DAB) gelöst in 1 x PBS (pH 7,2)

(DAB wurde zunächst in 10 ml dH₂O unter Zugabe von 10 N HCl gelöst)

1 x PBS (pH 7,2):

8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄

DAB-Fixierungslösung:

33 % (v/v) Ethanol, 33 % (v/v) Milchsäure, 33 % (v/v) Glycerol

2.2.5 Analytische Methoden

2.2.5.1 Mikroskopie

2.2.5.1.1 Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die Mikroskopischen Analysen wurde das Binokulare Nikon SMZ-U (Nikon AG, Düsseldorf, D) sowie das Epifluoreszenz-Mikroskope Nikon Eclipse E800 (Nikon AG, Düsseldorf, D) mit den folgenden Filtern verwendet:

GFP (R) – BP	EX 460-500
	DM 505
	BA 510-560
UV – 2A	EX 330-300
	DM 400
	BA 420

Des Weiteren wurde das Epifluoreszenz-Mikroskope LEICA-DMRE (Leica, Wetzlar, D) mit den folgenden Filtern verwendet:

EGFP-LP	BP 470/40
	LP 500
N2.1	BP 515-560
	LP 590
Ds-Red	BP 546/10
	BP 600/40

Die Bilddokumentation erfolgte mittels der CCD-Farbvideokamera (KY-F1030; JVC, Singapore, Thailand) für das Nikon Eclipse E800 oder für das LEICA-DMRE mit der CCD-Farbvideokamera (KY-F70 3-CCD; JVC, Singapore, Thailand) unter Verwendung des DISKUS Software-Pakets (Technisches Büro Hilgers, Königswinter, D).

2.2.5.1.2 Elektronen-Mikroskopie

Für die Elektronenmikroskopische Analyse wurden ca. 2 x 2 mm große Blattstücke der *A. thaliana* Mutanten sowie des Wildtyps verwendet. Diese wurden zur Fixierung in eine 2%-ige Glutaraldehydlösung überführt und im Excikator durch Anlegen eines Vakuums infiltriert. Wenn es nicht zu einem Absinken der Proben kam, wurde eine geringe Menge 0,01%-iges Triton X 100 dazugegeben oder leicht anzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 4°C ü.N.. Danach wurde die Glutaraldehyd-Lösung verworfen und die Proben dreimal in 100 mM NaPi-Puffer gewaschen. Der Puffer wurde anschließend entfernt und die Proben mit 2%-iger Osmiumtetroxid-Lösung bei 4°C ü.N. inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und dreimal mit dH₂O gewaschen. Danach wurde das dH₂O abgenommen und die Proben in einer Acetonreihe entwässert. Dabei erfolgte zunächst eine Überschichtung der Proben mit 25%-igem Aceton und eine Inkubation für 15 - 20 min. Anschließend wurde die Lösung abgenommen, die Proben mit 50%-igem Aceton mit 1% Uranylacetat überschichtet und für 2 h inkubiert. Dieser Schritt wurde danach mit 70%-, 96%- und dreimal 100%-igem Aceton für jeweils 15 – 20 min wiederholt. Im Anschluss folgte die Einbettung in Spurr. Zunächst wurden die Proben in Spurr und Aceton im Verhältnis 1:1 ü.N. bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Spurr und Aceton im Verhältnis 3:1 und purem Spurr für jeweils für 4 h überschichtet, sowie abschließend eine Inkubation in frischem Spurr ü.N.. Die Proben wurden dann mit purem Spurr in Formmatten eingebettet. Die Polymerisation erfolgte zunächst für 3 - 4 h bei 40°C und abschließend bei 50°C für 2 - 3 Tage. Die Ultra-Dünnschnitte (60 bis 70 nm) der Proben wurden mit dem Leica Ultracut UCT Mikrotom (Leica Microsystems, Wien, Österreich) unter Verwendung von Diamantmessern (Micro Star, Huntsville, USA) hergestellt. Diese wurden auf einem mit Pioloform bezogenen Kupfergittern befestigt und mit Bleicitrat und Uranlyacetat (Reynolds, 1963) kontrastiert. Die Analyse erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop Zeiss EM 109 (Carl Zeiss, Oberkochen, D) bei 80 kV. Mikrographen wurden mit So-163 EM film (Kodak, Rochester, USA) aufgenommen. Die Elektronenmikroskopie wurden von Dr. Stefan Geimer (Universität Bayreuth) durchgeführt. Die Flächenanalyse der Granastapel erfolgte mit der Software ImageJ 1.37v (Dr. W. Rasband; National Institute of Health, Bethesda, USA).

1M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2):

2,8 (v/v) 1M NaH₂PO₄, 7,2 (v/v) 1M Na₂HPO₄

(vor Gebrauch auf 100mM mit dH₂O verdünnen)

2% Glutaraldehyd (pH 7,2):

2 % (w/v) Glutaraldehyd in 100 mM NaPi-Puffer (pH 7,2)

2% Osmiumtetroxid:

2 % (w/v) OsO₄ in dH₂O

Spurr-Harz:

26 g Nonenylsuccinic anhydride pure (NSA), 10 g ERL-4221 D, 6 g D.E.R. 736 pract., 0,4 g Dimethylaminoethanol

2.2.6 Photodokumentation

Zur visuellen Dokumentation der Pflanzen wurde die Digitalkamera Nikon Coolpix 995 (Nikon AG, Düsseldorf, D) verwendet.

2.2.7 Statistische Analysen

2.2.7.1 Pearson's χ^2 -Test (Anpassungstest)

Der χ^2 -Test untersucht die Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit. Durch den χ^2 -Anpassungstest wurde die Nullhypothese, ob die empirisch ermittelten Daten einer theoretischen Verteilung entstammen, geprüft. Ist der ermittelte χ^2 -Wert > dem Tafelwert, bei der gegebenen Anzahl von Freiheitsgraden, ist die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α abzulehnen, d.h. die beobachtete Verteilung der empirischen Daten unterscheiden sich von der theoretischen Verteilung.

Formel des χ^2 -Anpassungstest:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(B_i - E_i)^2}{E_i}$$

B_i : beobachtete Häufigkeit

E_i : theoretische Häufigkeit

2.2.7.2 Student's t -Test (t -Test nach Welch)

Der t -Test nach Welch wurde angewendet um die Nullhypothese, ob sich die Mittelwerte von zwei normalverteilten Stichproben (die sich in Varianz und Stichprobenumfang unterscheiden) gleichen, zu untersuchen. Ist der ermittelte t -Wert \geq dem Tafelwert, bei der gegebenen Anzahl von Freiheitsgraden, ist die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α abzulehnen, d.h. die Mittelwerte der Stichproben unterscheiden sich.

Formel des t -Test nach Welch:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

\bar{x}_1 : Mittelwert der Stichprobe 1

\bar{x}_2 : Mittelwert der Stichprobe 2

s_1^2 : Varianz der Stichprobe 1

s_2^2 : Varianz der Stichprobe 2

n_1 : Stichprobenumfang 1

n_2 : Stichprobenumfang 2

3. Ergebnisse

3.1 *in silico* Analysen der AtDAP-Proteine

Um einen Überblick über die phylogenetischen und molekularen Eigenschaften des in der isolierten Mutante *dap1* (*dap1-1*) beeinträchtigten Proteins AtDAP1 (At1g64150) zu erhalten, kamen verschiedene *in silico* Analyseprogramme zur Anwendung.

Ausgehend von dessen Aminosäuresequenz wurden BLAST-Analysen in den Datenbanken von TAIR und NCBI durchgeführt. Basierend auf der Genom-Annotation von *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) konnten vier homologe Proteine identifiziert werden, die wie folgt benannt wurden: AtDAP2 (At4g13590), AtDAP3 (At1g68650), AtDAP4 (At1g25520) und AtDAP5 (At5g36290). Weiterhin wurden homologe Proteine bei Cyanobakterien, z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803, bei einigen heterotrophen Bakterien sowie für Eukaryoten wie Pilze, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, und Tiere, z.B. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, identifiziert (Abb. 3.1A). Auch für andere

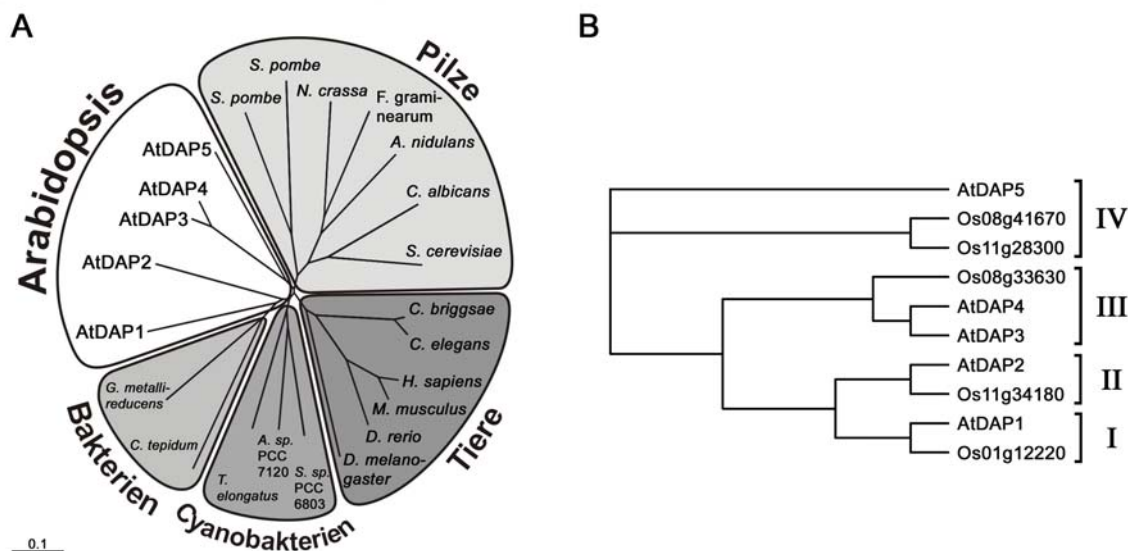


Abb. 3.1: Phylogenetische Bäume der DAP-Proteine von *A. thaliana* und weiteren Spezies. (A) Unverwurzelter phylogenetische Baum der DAP-Proteine von *A. thaliana*, Bakterien, Pilzen und Tieren. (B) Rechtwinkliges Cladogramm der DAP-Proteine von *A. thaliana* (At) und *O. sativa* (Os). Die Bäume wurden basierend auf der Aminosäuresequenz der Proteine unter Verwendung der Programme ClustalX und TreeView erstellt.

höhere Pflanzen, z.B. *Oryza sativa*, *Medicago truncatula* und *Populus trichocarpa* konnten homologe DAP-Proteine ermittelt werden. Anhand der Genom-Annotation von Reis (International Rice Genome Sequence Project, 2005) wurde für diese monokotyledone Pflanze ein ähnlicher Satz an DAP-Proteinen identifiziert (Abb. 3.1B). Dabei war eine Einordnung der Proteine in vier separate Gruppen möglich. Innerhalb dieser Gruppen befinden sich Proteine, die anhand von Vorhersagen die gleiche subzellulären Lokalisation aufweisen. Für die Proteine der Gruppen I und II werden plastidäre Signalpeptide vorhergesagt. Die Proteine der Gruppe IV zeigen Signalpeptide für den sekretorischen Weg. In der Gruppe III befinden sich Proteine mit ungenauen Vorhersagen, für die jeweils mitochondriale Signalpeptide als auch Signalpeptide des sekretorischen Wegs vorhergesagt werden.

Zur Zeit ist für keines der ermittelten Homologe aus den verschiedenen Organismen eine konkrete Funktion beschrieben. Aktuelle Ergebnisse postulieren für das homologe DAP-Protein aus *S. cerevisiae* jedoch eine nichteingehend charakterisierte Beteiligung in der Ribosomenbiogenese (Barbara *et al.*, 2007).

Ein auf der Aminosäuresequenz basierender Vergleich, zeigt Aminosäureidentitäten von 34 bis 89% zwischen den AtDAP-Proteinen (Tab. 3.1). Dabei besitzen AtDAP1 und AtDAP2 mit 47% sowie AtDAP3 und AtDAP4 mit 89% eine höhere Identität zueinander als zu den jeweils anderen Proteinen. Weiterhin ist anzunehmen, dass die Gene *AtDAP3* und *AtDAP4* sehr wahrscheinlich auf eine Genduplikation zurückgehen, da diese sich in einem duplizierten

Tab. 3.1: Homologievergleich der DAP-Proteine auf Aminosäureebene. Vergleich der Aminosäureidentität (I) in % und des Überlappungsbereichs (C, coverage) der DAP-Proteine von *A. thaliana* (At) mit denen von *O. sativa* (Os), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn.) und *S. cerevisiae* (S.c.). Die aufgelisteten Daten entstammen der ARAMEMNON-Datenbank (Schwacke *et al.*, 2003).

	AtDAP1		AtDAP2		AtDAP3		AtDAP4		AtDAP5	
	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C
AtDAP1	-	-	47	0,52	34	0,56	34	0,56	38	0,54
AtDAP2	47	0,52	-	-	39	0,58	39	0,58	41	0,60
AtDAP3	34	0,56	39	0,58	-	-	89	1,00	43	0,72
AtDAP4	34	0,56	39	0,58	89	1,00	-	-	44	0,72
AtDAP5	38	0,54	41	0,60	43	0,72	44	0,72	-	-
Os01g12220	58	0,49	46	0,27	37	0,28	36	0,28	31	0,48
Os11g34180	36	0,90	70	0,84	36	0,61	38	0,61	42	0,60
Os08g33630	33	0,56	37	0,58	76	0,96	76	0,97	41	0,73
Os08g41670	37	0,57	41	0,57	44	0,74	45	0,74	69	0,97
Os11g28300	36	0,56	39	0,62	45	0,75	47	0,72	73	0,98
Syn sll0615	40	0,54	44	0,54	40	0,90	38	0,89	40	0,90
S.c. YBR187W	29	1,00	33	0,85	37	0,83	37	0,84	37	0,88

Genombereich auf dem Chromosom I befinden. Weitere Indizien für diese Vermutung sind die konservierte Intron/Exon-Struktur dieser Gene und die schon erwähnten Übereinstimmungen auf Aminosäuresequenzebene (MATDB Redundancy Viewer, BLASTP, P-value = $7,9^{-94}$). Für die restlichen *AtDAP*-Gene konnte keine ähnliche Intron/Exon-Struktur ermittelt werden. AtDAP5 und die anderen Mitgliedern der *A. thaliana*-Proteinfamilie besitzen untereinander Aminosäureidentitäten von 38 bis 44%. Die Aminosäureidentität zwischen den DAP-Proteinen von *A. thaliana* und *O. sativa* liegen zwischen 31 und 76%. Dabei ist auffällig, dass AtDAP1 und AtDAP2 jeweils nur ein Homolog mit starker Aminosäureidentität in Reis besitzen (Os01g12220, 58% bzw. Os11g34180, 70%). Für AtDAP3 und AtDAP4 ist mit 76% die Identität zum Protein Os08g33630 am höchsten. AtDAP5 weist hohe Aminosäureidentitäten zu zwei Proteinen, Os11g28300 (73%) und Os08g41670 (69%), von Reis auf. Die Ähnlichkeit der DAP-Proteine von *A. thaliana* zu den Homologen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *S. cerevisiae* ist deutlich geringer. Diese beträgt nur 44% bzw. 37%.

In Protein-alignments weisen AtDAP1, AtDAP2 und AtDAP5 im Vergleich zu AtDAP3, AtDAP4 und zu bakteriellen DAP-Proteinen eine N-terminale Verlängerungen auf. Dabei wäre eine Funktion als Signalpeptide denkbar, welche eine unterschiedliche subzelluläre

Tab. 3.2: Vorhersagen über potentielle Signalpeptide für die AtDAP-Proteine.

Auflistung der Ergebnisse von verschiedenen Vorhersageprogramme über die Existenz von chloroplastidären (c), mitochondrialen (m) oder Signalpeptiden des sekretorischen Signalwegs (s) für die AtDAP-Proteine. Die hervorgehobenen Werte stehen für die vom jeweiligen Programm bevorzugte Proteinlokalisierung. Die angegebenen Zahlenwerte der einzelnen Programme sind untereinander nicht direkt vergleichbar.

Programm	AtDAP1			AtDAP2			AtDAP3			AtDAP4			AtDAP5		
	c	m	s	c	m	s	c	m	s	c	m	s	c	m	s
BaCelLo	ja	-	-	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ja
ChloroP v1.1	0,59	-	-	0,56	-	-	0,5	-	-	0,49	-	-	0,45	-	-
iPSort	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
Mitopred	-	nein	-	-	nein	-	-	nein	-	-	nein	-	-	nein	-
MitoProd v2	-	0,65	-	-	0,85	-	-	0,26	-	-	0,17	-	-	0,26	-
MultiLoc	0,96	0,03	0,00	0,95	0,03	0,00	0,11	0,20	0,42	0,09	0,24	0,54	0,00	0,00	0,99
PCLR v0.9	0,99	-	-	0,98	-	-	0,12	-	-	0,06	-	-	0,04	-	-
Pprowler v1.1	0,97	0,01	0,00	0,94	0,02	0,00	0,05	0,07	0,58	0,02	0,09	0,60	0,00	0,00	0,97
PrediSi	-	-	0,02	-	-	0,11	-	-	0,78	-	-	0,78	-	-	0,73
Predotar v1	0,79	0,18	0,00	0,11	0,06	0,03	0,11	0,06	0,01	0,12	0,21	0,05	0,00	0,03	0,92
PredSL	0,97	0,19	0,00	1,00	0,00	0,01	0,01	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
SignalP HMM v3	-	-	0,00	-	-	0,03	-	-	0,38	-	-	0,28	-	-	0,98
SignalP NN v3	-	-	0,04	-	-	0,11	-	-	0,35	-	-	0,4	-	-	0,85
TargetLoc	0,90	0,06	0,02	0,92	0,05	0,02	0,26	0,18	0,47	0,24	0,18	0,50	0,01	0,03	0,94
TargetP v1	0,98	0,05	0,01	0,74	0,02	0,08	0,03	0,04	0,41	0,02	0,05	0,41	0,02	0,02	0,97

Lokalisationen dieser Proteine vermittelt könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die AtDAP-Proteine mit verschiedenen Vorhersageprogrammen zur Bestimmung von Signalpeptiden analysiert (Tab. 3.2). Dabei deutet die überwiegende Mehrzahl dieser Programme auf die Existenz von chloroplastidären Transitpeptiden für AtDAP1 und AtDAP2 hin. Ein weiterer Hinweis für die chloroplastidäre Lokalisation von AtDAP2 wurde in einer Proteomanalyse der Chloroplastenhüllmembran von *A. thaliana* durch Ferro *et al.* (2003) erbracht. Dabei konnte mittels Massenspektrometrie das AtDAP2-Protein in einer Fraktion der Hüllmembran nachgewiesen werden. Signalsequenzen für den *Sec pathway*, den *twin arginine translocation pathway* oder den *signal recognitionparticle pathway*, welche eine spezifische intraplastidäre Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2 in der Thylakoidmembran oder im -lumen vermitteln könnten, wurden nicht ermittelt. Für das Protein AtDAP5 wird ein Signalpeptid des sekretorischen Wegs angezeigt. Für Proteine, die über den sekretorischen Signalweg transportiert werden, ist eine Lokalisation in verschiedenen subzellulären Kompartimenten möglich (Jürgens 2004, Matheson *et al.*, 2007, Hanton *et al.*, 2007). Proteine, die ein solches Signalpeptid tragen, können sowohl im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat aber auch in der Vakuole, in der Plasmamembran oder extrazellulär lokalisiert sein. Obwohl AtDAP3 und AtDAP4 keine N-terminale Verlängerung besitzen, geben einzelne Vorhersageprogramme Signalpeptide für den sekretorischen Weg an. Weiterhin zeigen einige Programme auch mitochondriale Transitpeptide für AtDAP3 und AtDAP4 an. Diese Vorhersagen sind jedoch nicht einheitlich.

Die DAP-Proteine von *A. thaliana* sind relative kleine Proteine mit einer Länge von 228 bis 370 Aminosäureresten. Das resultierende rechnerische Molekulargewicht beträgt 39 kDA für AtDAP1, 40 kDA für AtDAP2, 25 kDA für AtDAP3 und AtDAP4 sowie 30 kDA für AtDAP5. Unter Verwendung des Programms SignalP v3 (Emanuelsson *et al.*, 2000; 2007; Nielson *et al.*, 1997) wurden Proteaseschnittstellen für die jeweiligen Transitpeptide ermittelt. Damit war es möglich, das rechnerische Molekulargewicht der reifen Proteine zu bestimmen. Anhand dieser Vorhersagen ergeben sich für die reifen Proteine rechnerische Molekulargewichte von 31 kDA für AtDAP1, von 30 kDA für AtDAP2 und von 32 kDa für AtDAP5. Für AtDAP3 und AtDAP4 wurden keine Schnittstellen ermittelt.

Verschiedene Programme zur Vorhersage α -helikaler Transmembrandomänen (ARAMEMNON Datenbank; Schwacke *et al.*, 2003) deuten die Existenz von fünf bis acht Membranhelices für die AtDAP-Proteine an (Abb. 3.2). Dabei werden für AtDAP1 acht, für AtDAP2 sieben, für AtDAP3 und AtDAP4 jeweils fünf und für AtDAP5 durchschnittlich sechs Transmembranhelices angegeben. Daher ist anzunehmen, dass es sich um stark

hydrophobe Proteine handelt, die als integrale Membranproteine vorliegen. Des Weiteren ist ein relativ hydrophiler Aminosäurebereich für AtDAP1 und AtDAP2 nach der vierten, für AtDAP3 und AtDAP4 nach der zweiten und für AtDAP5 nach der dritten Transmembrandomäne auffällig (Abb. 3.2).

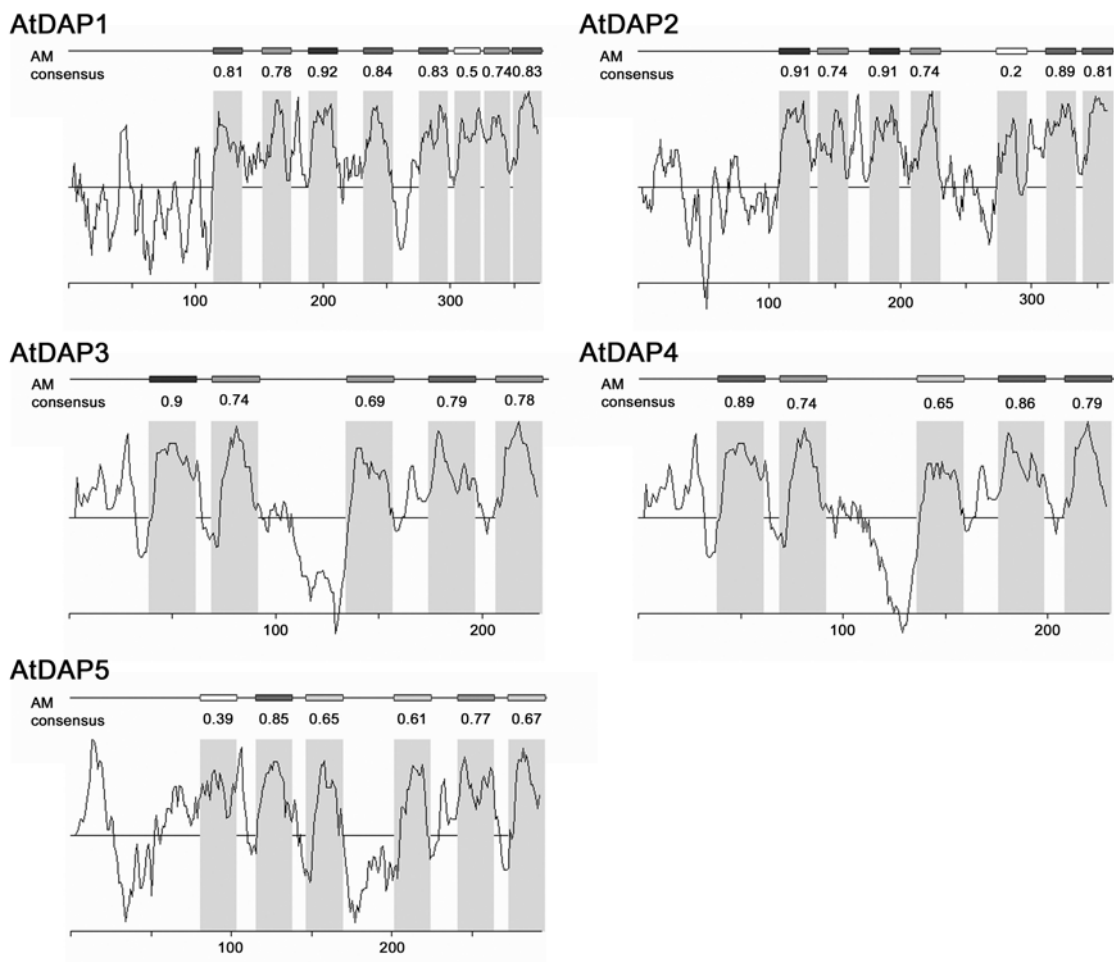


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Position α -helikaler Transmembranspannen für die AtDAP-Proteine.

Vorhersagen zur Position von α -helikalen Transmembranspannen für die AtDAP-Proteine anhand von Hydropathiediagrammen. Dabei kennzeichnen die grau schattierten Bereiche die Lage der Transmembranhelices innerhalb der Aminosäuresequenz der Proteine. Der AM consensus beschreibt die Wahrscheinlichkeit für die Existenz der jeweiligen Membranspanne (Kästchen) durch den darunter dargestellten Zahlenwert. Die Daten entstammen der ARAMEMNON Datenbank (Schwacke *et al.*, 2003).

3.2 Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine

Aufgrund der Hinweise über Signalpeptide, die anhand der *in silico* Analysen im Kapitel 3.1 gewonnen wurden, sollte für die Mitglieder der AtDAP-Familie die subzelluläre Lokalisation der Proteine unter Verwendung des Reporterproteins GFP (*green fluorescent protein*) *in vivo* ermittelt werden.

3.2.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine in Tabakprotoplasten

Um die Existenz der mutmaßlichen Signalpeptide zu verifizieren, wurden zunächst einmal die ersten 100 N-terminalen Aminosäurereste der AtDAP-Proteine C-terminal mit dem Reporterprotein GFP fusioniert. Dabei stand die Expression der Fusionskonstrukte unter Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), welcher eine starke konstitutive Expression in Pflanzenzellen realisiert. Nach einer transienten Transformation von BY2 Tabakprotoplasten mit diesen Konstrukten wurde die Lokalisation der zu untersuchenden GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 3.3).

Wie zu erwarten, wurde für nicht transformierte Tabakprotoplasten kein GFP-Fluoreszenzsignal ermittelt (Abb. 3.3A - C). Als Positivkontrolle diente ein Konstrukt, welches nur das GFP-Protein exprimiert. Tabakprotoplasten, die mit diesem Konstrukt transformiert wurden, zeigten, da GFP ein lösliches Protein ist, ein Fluoreszenzsignal im Cytosol (Abb. 3.3D - F). Die GFP-Fluoreszenz für das AtDAP1-Fusionsprotein ergab ein deutlich lokal begrenztes Signal (Abb. 3.3G - I). Das GFP-Signal war dabei auf die Plastiden beschränkt, welche in BY2 Tabakprotoplasten eine ringförmige Anordnung aufweisen. Auch für das AtDAP2-Fusionsprotein wurde so eine Lokalisation in Plastiden nachgewiesen (Abb. 3.3J - L). Damit konnte die Existenz von plastidären Transitpeptiden, wie sie von mehreren Vorhersagenprogrammen vorgeschlagen wurde (vgl. Tab. 3.2), für diese beiden Proteine experimentell bestätigt werden. Für die GFP-Fusionsproteine von AtDAP3, AtDAP4 und AtDAP5 wurde durch die Transformation von BY2 Tabakprotoplasten keine eindeutigen GFP-Signale erhalten, die eine zuverlässige Aussage über die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine zulassen würden.

Kontrolle

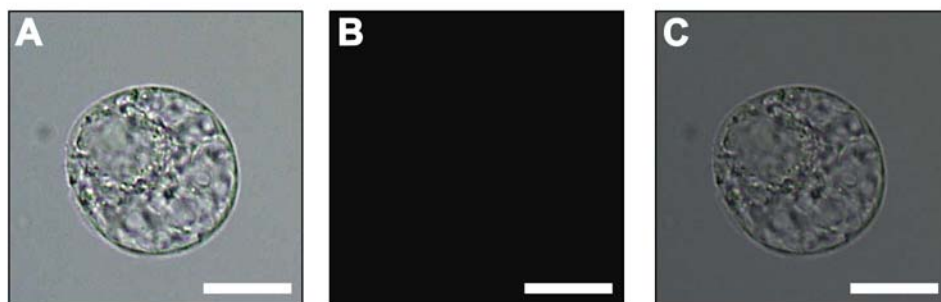
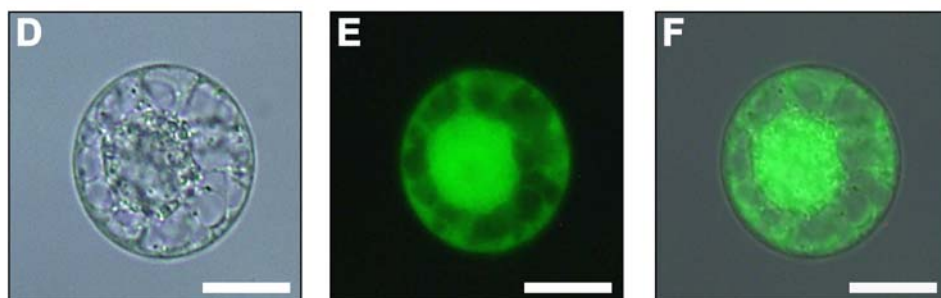
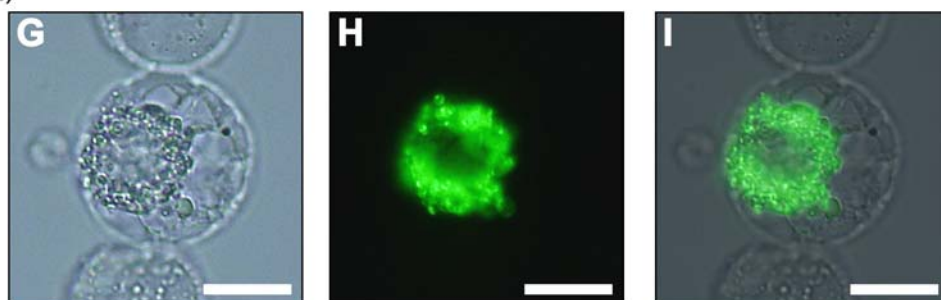
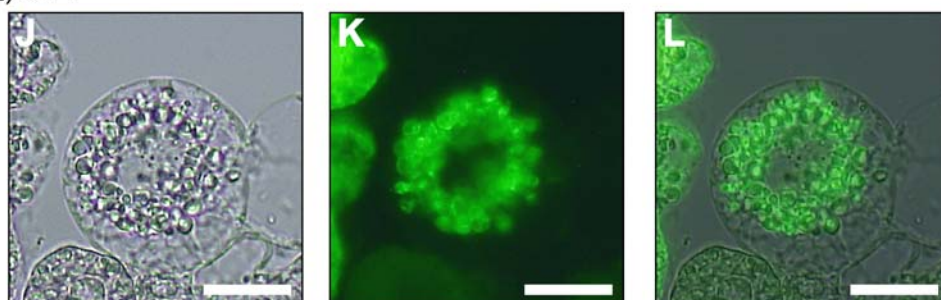
*P_{35S}:GFP**P_{35S}:DAP1₍₁₋₁₀₀₎:GFP**P_{35S}:DAP2₍₁₋₁₀₀₎:GFP*

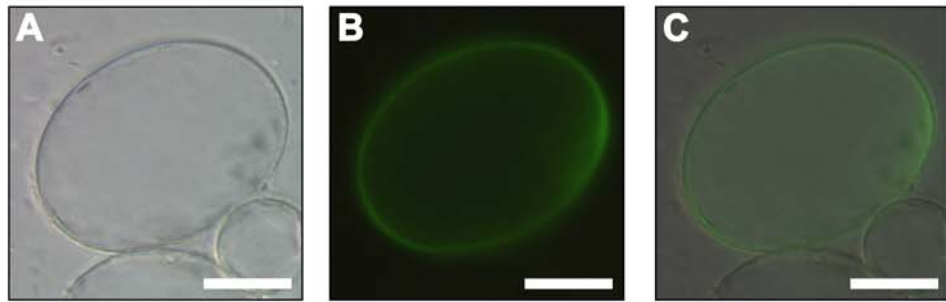
Abb. 3.3: Lokalisation der GFP-Fusionsproteine von AtDAP1 und AtDAP2 in BY2 Tabakprotoplasten.

Lichtmikroskopische Aufnahme nach Nomarski (A, D, G und J), GFP-Fluoreszenz (B, E, H und K), Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (C, F, I und L). Balken = 20 μ m.

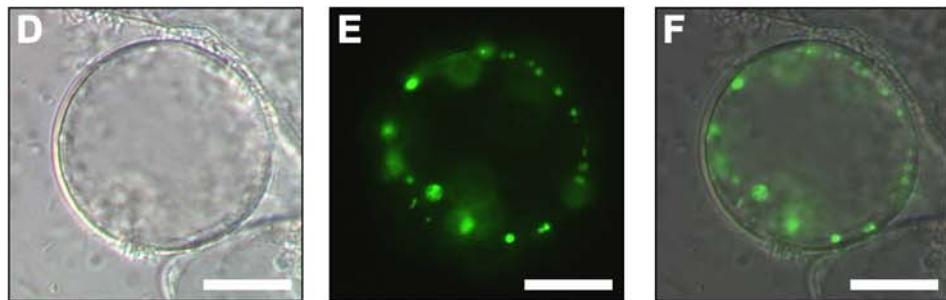
3.2.2 Analyse der subzellulären Lokalisation der AtDAP-Proteine in einer *Arabidopsis*-Zellkultur

Da unter Verwendung der ersten 100 N-terminalen Aminosäurereste nur für AtDAP1 und AtDAP2 ein funktionelles Transitpeptid bestimmt werden konnte, wurden Konstrukte mit der kompletten Aminosäuresequenz der verschiedenen AtDAP-Proteine in Verbindung mit einer C-terminalen GFP-Fusion generiert. Dadurch sollte in einem alternativen Ansatz versucht werden, die Lokalisation von AtDAP3, AtDAP4 und AtDAP5 zu bestimmen. Weiterhin sollte dadurch die Lokalisation des kompletten Proteins von AtDAP1 bzw. AtDAP2 in den Plastiden bestätigt werden. Die entsprechenden Konstrukte durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer stabil in das Genom von Zellen einer *A. thaliana*-Zellkultur überführt. Als Kontrollen wurden zwei weitere GFP-Konstrukte mitgeführt. Als erste Kontrolle diente eine GFP-Fusion mit dem im Cytosol lokalisierten Protein BCAT4 (*branched-chain amino acid transaminases 4*; Diebold *et al.*, 2002) von *A. thaliana*. Eine Fusion der ersten 100 N-terminalen Aminosäurereste des TPT-Proteins (Triosephosphat/Phosphattranslokator; Flügge *et al.*, 1989) von *A. thaliana* dienten als Positivkontrolle für eine plastidäre Lokalisation. Die beiden Kontrollen zeigten die jeweils erwartete Lokalisationen im Cytosol bzw. in den Plastiden (Abb. 3.4A - F). Die GFP-Fusionsproteine mit den kompletten Aminosäuresequenzen von AtDAP1 und ATDAP2 waren wie im vorangegangenen Experiment deutlich in den Plastiden lokalisiert (Abb. 3.4G - L). Die Fusionsproteine von AtDAP3 und AtDAP4 wiesen eine cytosolische Anreicherung auf (Abb. 3.4M - R). Da für AtDAP3 und AtDAP4 jeweils fünf Membranspannen vorhergesagt werden, ist anzunehmen, dass die GFP-Fusion die Löslichkeit dieser Proteine verändert und so zu einer Misslokalisierung im Cytosol führt. Dadurch war eine abschließende Klärung der Lokalisation für diese Proteine nicht möglich. Für AtDAP5 war ein sehr schwaches GFP-Signal, welches sich über die gesamte Zelle erstreckt, detektierbar (Abb. 3.4S - U). Dementsprechend wäre von einer Lokalisation in der Zentralvakuole auszugehen. Da die Stärke des GFP-Fluoreszenzsignals jedoch sehr gering war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich möglicherweise um ein Artefakt handelte. Somit war auch die Lokalisation AtDAP5 nicht eindeutig zu bestimmen.

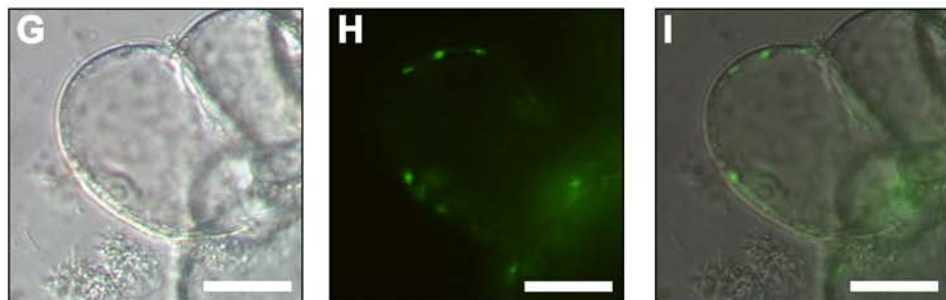
*P*_{35S}:BCAT4:GFP



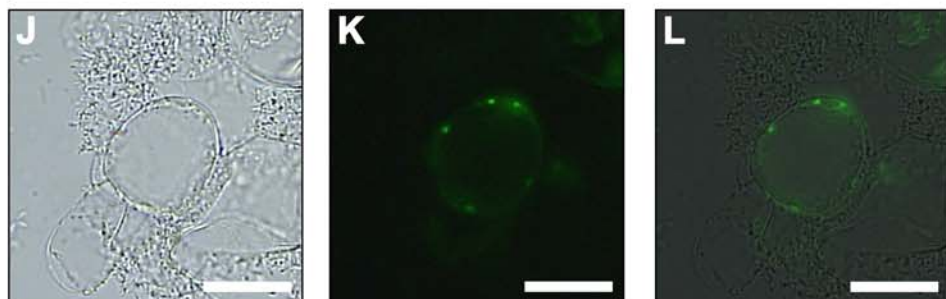
*P*_{35S}:TPT₍₁₋₁₀₀₎:GFP



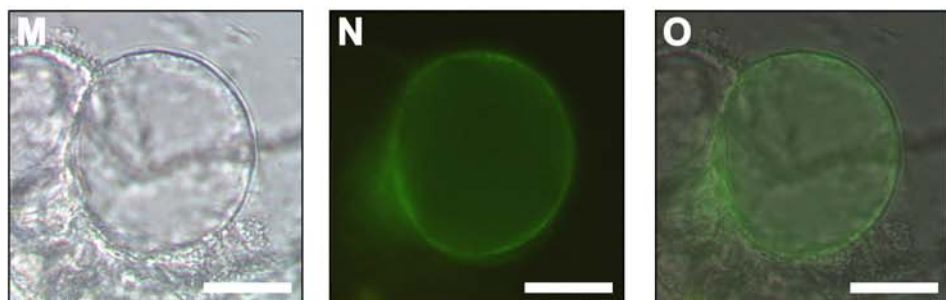
*P*_{35S}:DAP1:GFP



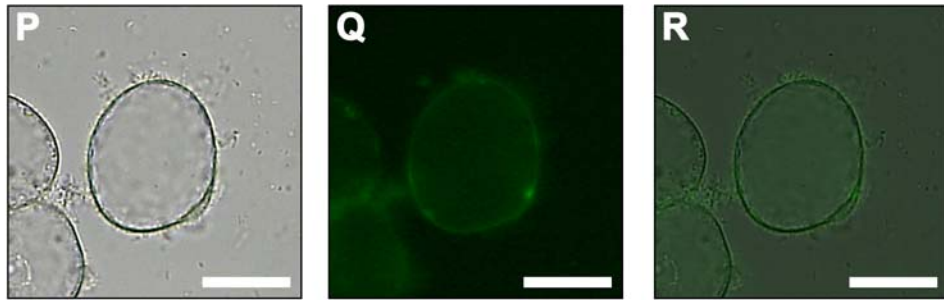
*P*_{35S}:DAP2:GFP



*P*_{35S}:DAP3:GFP



*P*_{35S}:DAP4:GFP



*P*_{35S}:DAP5:GFP

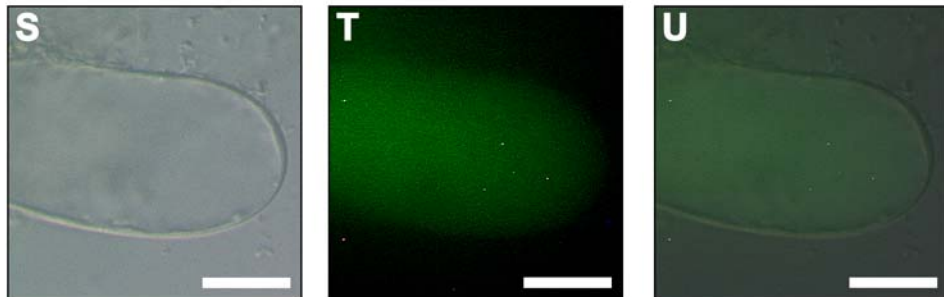


Abb. 3.4: Lokalisation der GFP-Fusionsproteine von AtDAP1, AtDAP2 AtDAP3, AtDAP4 und AtDAP5 in einer Zellkultur von *A. thaliana*.

Lichtmikroskopische Aufnahme nach Nomarski (A, D, G, J, M, P und S), GFP-Fluoreszenz (B, E, H, K, N, Q und T), Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (C, F, I, L, O, R und U). Balken = 20 μ m.

3.3 Expressionanalyse der *AtDAP*-Gene

3.3.1 *in silico* Analyse der Expression der *AtDAP*-Gene

Die Veröffentlichung einer großen Anzahl von DNA Microarray-Experimenten durch nationale Institute und Kooperationen von Wissenschaftlern (AtGenExpress, NASCArrays, Gruissem Lab, GEO, FGCZ, ArrayExpress) auf der standardisierten Basis des ATH1 full genome array von Affymetrix (Redman *et al.*, 2004) und die Visualisierung der Resultate in Datenbanken ist ein sehr hilfreiches Werkzeug zur Expressionsanalyse von Genen in *A. thaliana*. Dabei ist neben der Analyse des entwicklungs-, organ- und gewebespezifischen Expressionsmusters auch die Expression von Genen in Abhängigkeit von verschiedensten biotischen und abiotischen Stressfaktoren möglich. Für die Expressionsanalyse der *AtDAP*-Gene wurde die Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) verwendet. Die gezeigten Daten sind normalisiert und die Expressionsstärke in einer Farbkodierung dargestellt. Dabei stellt die Farbe weiß eine geringe und die Farbe dunkelblau einer hohe Genexpression dar (Abb. 3.5A). Da diese Farbkodierung bei geringen Expressionsunterschieden irreführend sein kann, wurde zusätzlich der $\log_2(n)$ des Zahlenwerts der entsprechenden Expressionsstärke angegeben.

Eine Expressionsanalyse war für *AtDAP2* nicht möglich, da die auf dem Microarray befindlichen Sonden für dieses Gen nicht spezifisch genug sind und auch das angrenzende Gen At4g13580 detektierten. Die Expressionsanalyse für die restlichen *AtDAP*-Gene zeigte eine nahezu durchgängige Expression der *AtDAP*-Gene in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Dabei wies *AtDAP1* eine höhere Expression in der vegetativen Entwicklung, besonders in den späteren Phasen der Blattentwicklung, und in der generativen Phase bei der Blütenbildung und -differenzierung. Das Gen *AtDAP3* war geringfügig stärker in den Phasen der Blatt- und Blütenentwicklung und etwas schwächer in der Keimungsphase und der Schotenausbildung exprimiert. Dahingegen zeigte *AtDAP4* eine etwas stärkere Expression in der Phase der Keimung, der Blütenentwicklung und der Schotenbildung. In den Keimlingen und in der vegetativen Phase war *AtDAP4* etwas schwächer exprimiert. Für *AtDAP5* war eine annähernd gleich starke Expression in allen Entwicklungsstadien nachzuweisen.

Eine Analyse der organ- und gewebespezifischen Expression von *AtDAP1* zeigte dessen Aktivität in Keimlingen und adulten Pflanzen vor allem in den oberirdischen Pflanzenteilen an. Dahingegen war die Expression nur sehr gering in der Wurzel, in der Keimwurzel, in Kalli

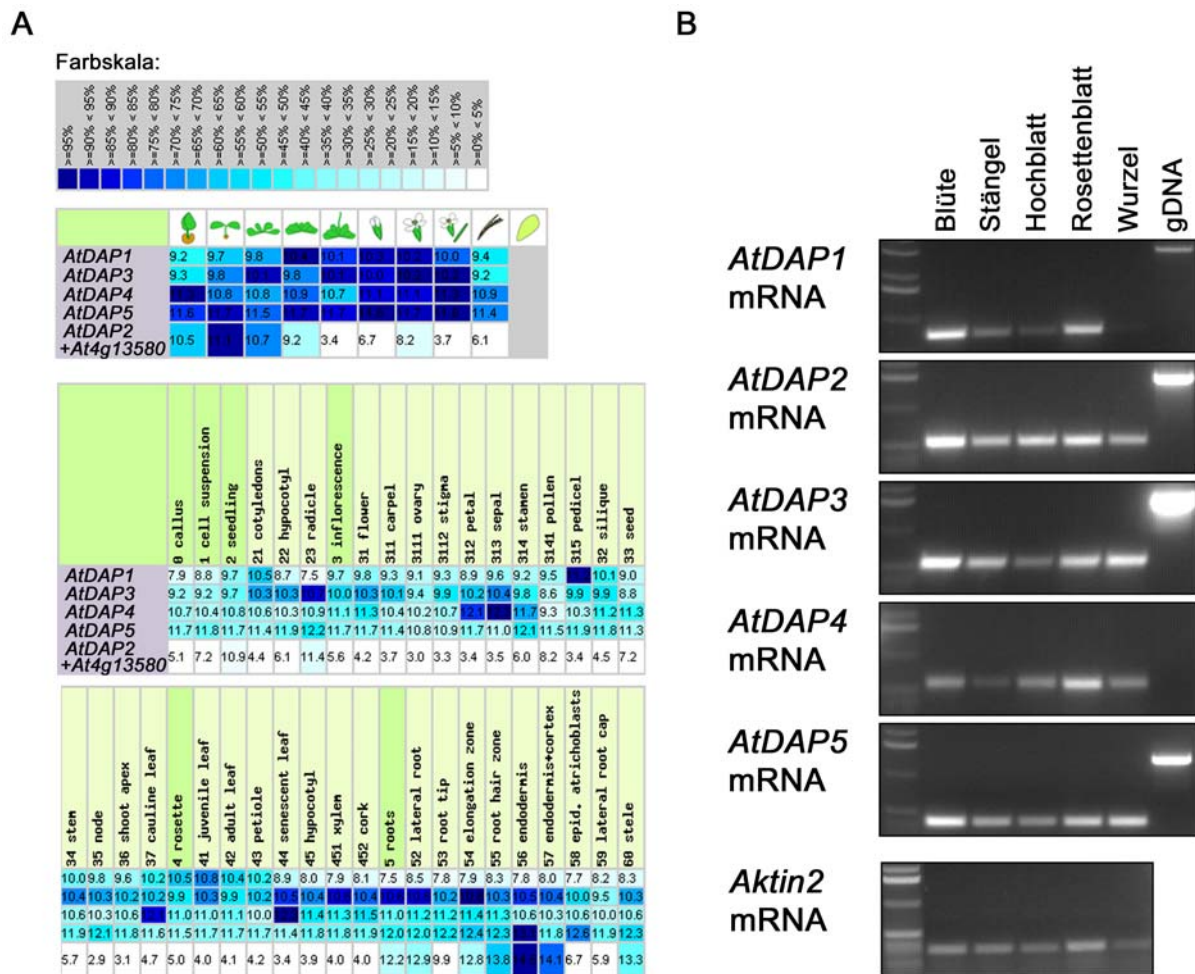


Abb. 3.5: Expressionsanalyse der *AtDAP*-Gene.

(A) Entwicklungs-, organ- und gewebespezifische Expressionsmuster der *AtDAP*-Gene ermittelt auf der Grundlage von Microarray-Experimenten und deren Visualisierung durch das Programm Genevestigator. Die Expressionsstärke ist als Farbintensität sowie als numerischer Wert (Log₂(n)) dargestellt.

(B) Analyse der Expressionsmuster der *AtDAP*-Gene mittels semiquantitativer RT-PCR. Dargestellt sind die erhaltenen RT-PCR Fragmente von *AtDAP1*, *AtDAP2*, *AtDAP3*, *AtDAP4*, *AtDAP5* und einer Kontrolle mit genomischer DNA (gDNA) nach 35 Zyklen sowie von *Aktin2* nach 25 Zyklen aus verschiedenen Organen.

und in der Zellsuspension ausgeprägt. *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* zeigten eine breite organ- und gewebespezifische Expression. Die Expression von *AtDAP3* im Keimling war eher gering, obwohl die Einzelwerte für die Keimblätter, das Hypokotyl und die Keimwurzel eine höhere Expression widerspiegeln. Des Weiteren war eine etwas höhere Expression im Spross, in Blättern aber vor allem in verschiedenen Teilen der Wurzel nachweisbar. Die Expression von *AtDAP4* war in Kelch-, Kron- und Staubblättern sowie in Hoch- und seneszenten Rosettenblättern stärker nachzuweisen. Dahingegen war das Expressionsmuster von *AtDAP5* in den aufgeführten Organen und Geweben in etwa gleich. Eine etwas stärkere Expression war nur in Teilen der Wurzel zu verzeichnen.

3.3.2 Analyse der Expression der *AtDAP*-Gene durch semiquantitative RT-PCR

Zu den auf Basis der Microarray-Analysen (Kap. 3.3.1) erhaltenen Expressionsmustern wurde die Expression der *AtDAP*-Gene zusätzlich durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen wie Blüte, Stängel, Hochblatt, Rosettenblatt und Wurzel von Wildtyppflanzen isoliert.

In diesen Untersuchungen war die Expression von *AtDAP1* in der Blüte sehr stark, in Rosettenblättern stark und im Stängel und in Hochblättern schwächer (Abb. 3.5B). Für die Wurzel konnte keine Expression ermittelt werden. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich gut mit dem aus Microarray-Analysen erhaltenen Expressionsmuster von *AtDAP1*. Bei diesen Analysen wurde allerdings eine schwache Expression von *AtDAP1* auch in der Wurzel nachgewiesen. Weiterhin wurde durch die Expressionsanalyse mittels RT-PCR eine etwas höhere *AtDAP1*-Expression für die Blüte und die Rosettenblätter im Vergleich zum Stängel und zu den Hochblättern bestimmt. Die Expression von *AtDAP2* war in etwa gleich stark im Stängel und der Wurzel nachweisbar. Etwas höher war die Expression im Hoch- und Rosettenblatt. Für die Blüte wurde der höchste Expression von *AtDAP2* ermittelt. Eine Expression von *AtDAP3* war sehr stark in der Blüte sowie stark im Stängel, im Rosettenblatt und der Wurzel nachzuweisen. Eine schwächere Expression wurde hingegen für die Hochblätter ermittelt. Auch die Daten der Microarray-Analysen zeigen eine höhere Expression von *AtDAP3* in der Blüte an. In den Microarray-Analysen wurden allerdings keine großen Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen Rosetten- und Hochblättern ermittelt. Die Expression von *AtDAP4* war am stärksten in Rosettenblättern. Im Microarray-Expressionsmuster von *AtDAP4* war eine erhöhte Expression erst in seneszenten

Rosettenblättern auffällig. Des Weiteren wurde mittels RT-PCR eine Expression auch in der Blüte, dem Hochblatt und der Wurzel sowie etwas schwächer im Stängel ermittelt. Dabei konnte eine erhöhte Expression in Blüte und Hochblatt, wie sie bei den Microarray-Experimenten zu verzeichnen war, nicht bestätigt werden. Eine Expression von *AtDAP5* konnte in Blüte, Stängel, Hochblatt, Rosettenblatt und Wurzel nachgewiesen werden. Dabei war die Expression in der Blüte, dem Rosettenblatt und der Wurzel etwas stärker. Obwohl anhand der Microarray-Experimente keine erhöhte Expression von *AtDAP5* in der Blüte zu verzeichnen war, stimmen die beiden Expressionsmuster näherungsweise überein. Zusammenfassend läßt sich für die organspezifische Expression der einzelnen *AtDAP*-Gene festhalten, dass, obwohl kleinere Unterschiede in den Daten der Microarray-Experimente und der semiquantitativen RT-PCR-Analysen existieren, die erhaltenen Resultate eine hohe Übereinstimmung zeigen.

3.3.3 Analyse der Expression von *AtDAP1* und *AtDAP2* durch Promotor-GUS-Fusionen

Da die plastidären Proteine der Gene *AtDAP1* und *AtDAP2* von besonderem Interesse waren, sollten das Expressionsmuster dieser Gene *in vivo* verifiziert werden. Hierzu wurde ein qualitativer Nachweis der Promotoraktivität dieser beiden Gene durch den histochemischen GUS-Test (Jefferson *et al.*, 1987) durchgeführt. Dafür wurden 2kb-Fragmente der entsprechenden Promotoren mit dem Reportergen *uidA* (GUS, β -Glucuronidase) aus *E. coli* (Novel and Novel, 1973) fusioniert. Diese Konstrukte wurden anschließend durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer stabil in das Genom von *A. thaliana* überführt. Verschiedene Linien der T₂-Generation wurden dann hinsichtlich ihres GUS-Expressionsmusters untersucht. Durch die β -Glucuronidase wird das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) zu Brom-4-Chlor-Indol umgesetzt, welches zu einem blauen Indigofarbstoff dimerisiert. Dieser Farbstoff ist wasserunlöslich und nicht diffusibel. Über diese spezifische Färbung kann daher die Aktivität des GUS-Reportergens dort nachgewiesen werden, wo es exprimiert wird. Dadurch ist ein sehr detailreicher Rückschluss auf die organ- und gewebespezifische Aktivität des zu untersuchenden Promotorfragments und die daraus resultierende Expression des entsprechenden Gens

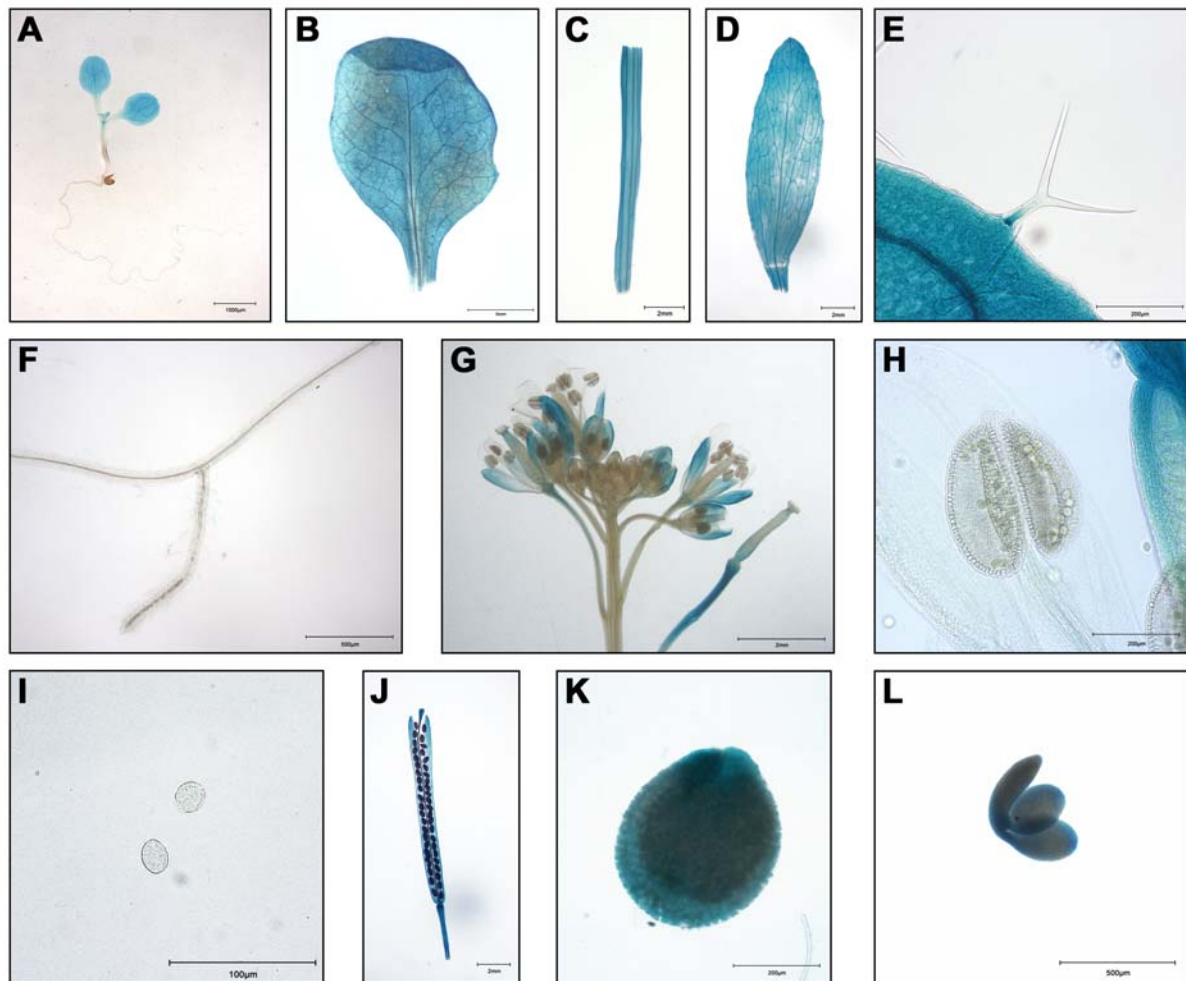


Abb. 3.6: Expression des Promotor-GUS-Konstruktes von *AtDAP1* ($P_{DAP1}::GUS$).
Histologische Lokalisation der GUS-Aktivität (blaue Färbung). (A) Keimling, (B) Rosettenblatt, (C) Spross, (D) Hochblatt, (E) Trichom, (F) Wurzel, (G) Blüte, (H) Staubblatt, (I) Pollen, (J) Schote, (K) Samen und (L) Embryo.

möglich. Die GUS-Expression vermittelt durch das Promotorfragment von *AtDAP1* konnte schon früh in der Keimlingsentwicklung nachgewiesen werden (Abb. 3.6A). Dabei war eine GUS-Färbung in den Keimblättern und in abgeschwächter Weise auch im Hypokotyl zu beobachten. In der Keimwurzel hingegen wurde keine GUS-Färbung detektiert. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Microarray-Expressionsmuster (vgl. Abb. 3.5A). In adulten Pflanzen wurde die GUS-Expression in den Rosetten- und Hochblättern sowie im Spross nachgewiesen (Abb. 3.6B, C, D). In der Wurzel wurde jedoch keine Färbung beobachtet (Abb. 3.6F). Auch diese Resultate stimmen mit den zuvor gewonnenen Expressionsdaten von *AtDAP1* (vgl. Abb. 3.5) überein. Des Weiteren war eine GUS-Färbung in Trichomen, Blüten, Schoten, Samen und ausdifferenzierten Embryos zu beobachten (Abb. 3.6E, G, J, K, L). In der Blüte war eine GUS-Färbung in Kelchblättern zu verzeichnen. In älteren Blüten war eine Färbung auch im Bereich des Blütenbodens sowie im Griffel nachzuweisen. Eine Promotoraktivität in Kelchblättern, Staubblättern und den Pollenkörnern wurde im Gegensatz zu den Microarray-Expressionsdaten nicht ermittelt (Abb. 3.6G, H, I). Insgesamt war dabei auffällig, dass *AtDAP1* mit Ausnahme der Trichome, Samen und Embryos, vornehmlich in chlorophyllhaltigen Organen und Geweben exprimiert war. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zur Promotoraktivität von *AtDAP1* gewonnenen Ergebnisse, bis auf wenige Ausnahmen, in Übereinstimmung mit den ermittelten Expressionsdaten der Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 stehen.

Eine durch das Promotorfragment von *AtDAP2* vermittelte GUS-Expression wurde für Keimlinge in den Keimblättern, im Hypokotyl und in der Keimwurzel beobachtet (Abb. 3.7A). Darüber hinaus war die GUS-Färbung in Blüten, im Spross, in Rosettenblättern, in Hochblättern sowie in der Wurzel ausgeprägt (Abb. 3.7B, C, D, F, G). Damit ist die beobachtete Promotoraktivität identisch mit dem durch die RT-PCR-Analysen erhaltenen Expressionsprofil (vgl. Abb. 3.5B). In der Blüte waren die Kelchblätter und der Fruchtknoten kräftig gefärbt. Für das Filament und die Antheren der Staubblätter war nur eine leichte GUS-Färbung erkennbar (Abb. 3.7H). Die Pollenkörner hingegen wiesen eine deutliche GUS-Färbung auf (Abb. 3.7I). Auch Trichome, Schoten, Samen und ausdifferenzierte Embryos waren gefärbt (Abb. 3.7E, J, K, L). Im Gegensatz zu *AtDAP1* deutet vor allem die Expression von *AtDAP2* in der Wurzel von Keimlingen sowie adulten Pflanzen auf eine zusätzliche Funktion in heterotrophen Organen und Geweben hin. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte ein detailliertes, aber vor allem verlässliches Bild von der Expression der *AtDAP*-Gene gewonnen werden. Dabei zeigt das Expressionsmuster von *AtDAP1* im

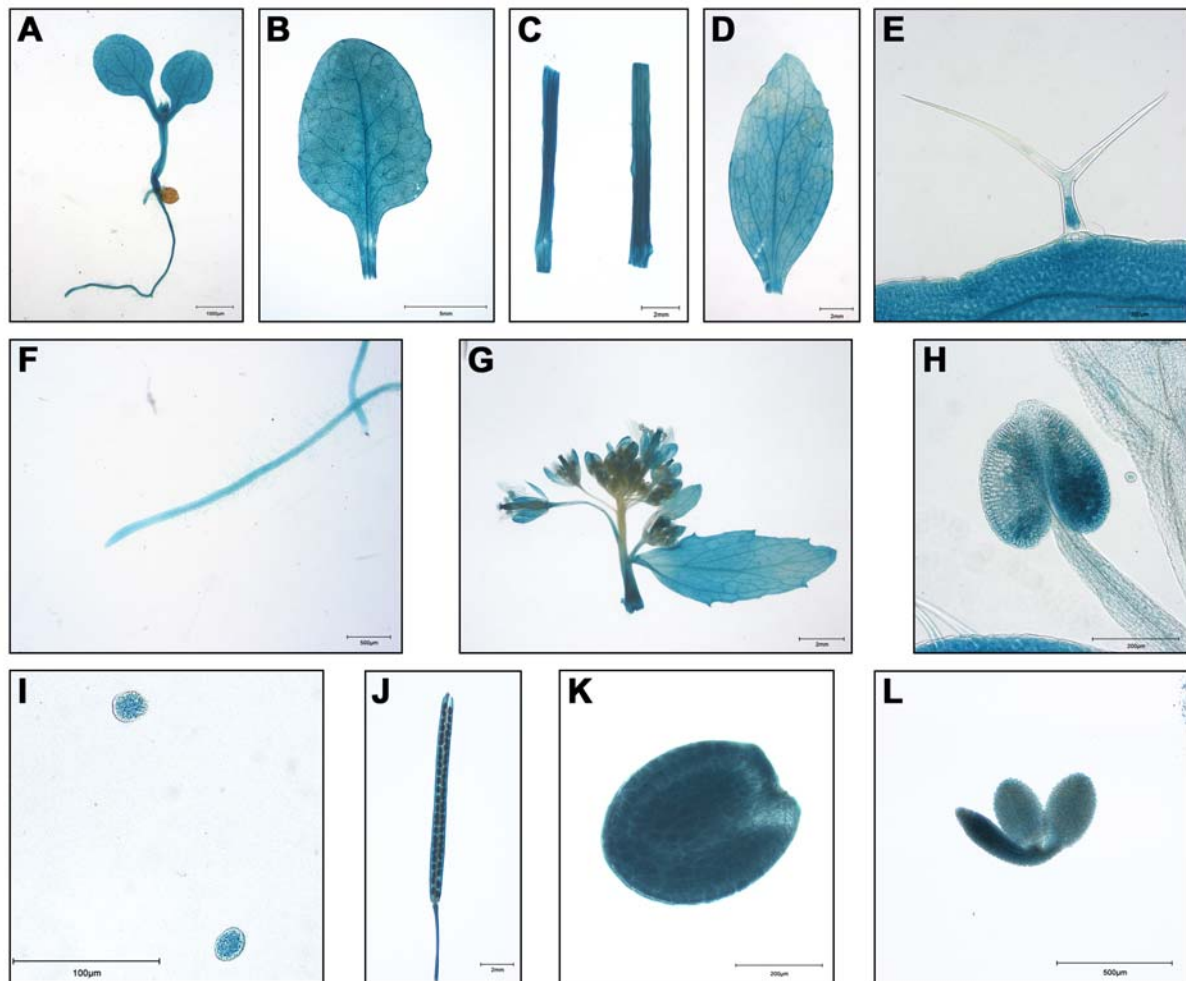


Abb. 3.7: Expression des Promotor-GUS-Konstruktes von *AtDAP2* ($P_{DAP2}:GUS$).
Histologischer Nachweis der GUS-Aktivität (blaue Färbung). (A) Keimling, (B) Rosettenblatt, (C) Spross, (D) Hochblatt, (E) Trichom, (F) Wurzel, (G) Blüte, (H) Staubblatt, (I) Pollen, (J) Schote, (K) Samen und (L) Embryo.

Vergleich zu den restlichen *AtDAP*-Gene die deutlichsten Unterschiede. Während *AtDAP2*, *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* eine Expression in den Organen aufweisen, erfolgt die Expression von *AtDAP1* vornehmlich in chlorophyllhaltigen Organen und Geweben wie z.B. in Stängel, Laubblatt, Kelchblatt und Fruchtblatt. Ausgehend von der Expression und der plastidären Lokalisation wäre daher für von *AtDAP1* eine direkt oder indirekt mit der Photosynthese assoziierte Funktion in den Chloroplasten denkbar. Weiterhin wäre für das ebenfalls plastidär lokalisierte Protein *AtDAP2* aufgrund seiner zusätzlichen Expression in heterotrophen Organen und Geweben eine eher grundlegende Funktion in Plastiden anzunehmen. Anhand des Expressionsmusters von *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* konnten keine Anhaltspunkte für eine spezifische Funktion der entsprechenden Proteine ermittelt werden.

3.4 Isolierung und molekularbiologische Analyse von T-DNA Insertionsmutanten für die *AtDAP*-Gene

3.4.1 Identifizierung und Isolierung von T-DNA Insertionsmutanten

Reverse genetics hat sich als wichtiges Werkzeug bei der Analyse von Genen und Proteinen und der Aufklärung deren Funktionen in den unterschiedlichen Pflanzenwissenschaften etabliert. Eine Methode dabei ist die Verwendung von *knock-out*-Mutanten, z.B. T-DNA Insertionsmutanten, und die Untersuchung des resultierenden Phänotyps.

Zur Identifizierung von T-DNA Insertionsmutanten für die einzelnen Mitglieder der *AtDAP*-Genfamilie wurden verschiedene Kollektionen von T-DNA Insertionsmutanten (SALK-Kollektion (Alonso *et al.*, 2003), GABI-Kat-Kollektion (Rosso *et al.*, 2003), SAIL-Kollektion (Sessions *et al.*, 2002)) durchsucht. Die Samen der entsprechenden T-DNA-Linien wurden direkt über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC; Scholl *et al.*, 2000), vom Kölner Ressourcenzentrum für *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Linien (GABI-Kat) oder vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) bezogen. Für jedes *AtDAP*-Gen konnte wenigstens eine T-DNA-Linie identifiziert werden. Da die Samen der entsprechenden Linien als segregierende Population (*pool*) vorliegen und versendet werden, wurden Einzelpflanzen der entsprechenden *pools* in Hinblick auf den Segregationszustand der T-DNA Insertion analysiert. Diese Untersuchungen wurden mittels PCR unter Verwendung von Gen- und T-DNA-spezifischer Primer in jeweils zwei parallelen PCR-Reaktionen durchgeführt. In der ersten PCR-Reaktion wird mit zwei genspezifischen Primern, welche den Locus der T-DNA Insertion umspannen, das Vorhandensein des wildtypischen Allels geprüft. In einer zweiten PCR wird mit einem genspezifischen Primer und einem für die *left border*-Region der T-DNA spezifischen Primer, versucht die Integration der T-DNA im Gen-Locus direkt nachzuweisen. Die Kombination dieser beiden PCR-Reaktionen lässt einen Rückschluss auf den genomischen Allelzustand der entsprechenden Pflanze zu. Dabei sind als Resultat drei Kombinationen möglich: (I) ein Fragment tritt nur im PCR-Ansatz für das wildtypische Allel, nicht aber im PCR-Ansatz für die T-DNA Insertion, auf. Dies Ergebnis entspricht einer Pflanze, die homozygot für das Wildtypgen ist. (II) Es treten Fragmente in beiden PCR-Ansätzen auf. Die entsprechende Pflanze ist demzufolge heterozygot für das Gen, mit einem Wildtyp-Allel und einem Mutanten-Allel. (III) Es wird nur im PCR-Ansatz für die T-DNA Insertion, nicht aber im PCR-Ansatz für das Wildtypgen, ein Fragment nachgewiesen. Diese

Tab. 3.3: Auflistung der untersuchten T-DNA Insertionslinien für die *AtDAP*-Gene. Dargestellt sind die vergebenen Bezeichnungen und die ermittelten Eigenschaften der einzelnen T-DNA Insertionslinien für die Gene *AtDAP1*, *AtDAP2*, *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5*. Die angegebenen Werte über die Position der T-DNA Insertion beziehen sich auf das Start-Kodon des entsprechenden Gens und sind in Basenpaaren angegeben. n.b.: nicht bestimmt, 5' UTR: 5' *untranslated region*

Bezeichnung des Gens	AGI-Nummer des Gens	Bezeichnung der Mutante	Bezeichnung der T-DNA Insertionslinie	Position der T-DNA Insertion	Zygotiestatus der T-DNA Insertion	Anzahl der T-DNA Insertionen im Genom	knock-out des Gens	Phänotyp der Mutante
<i>AtDAP1</i>	At1g64150	<i>dap1-1</i>	GK-166A05	+2909 11. Intron	homozygot	1	ja	retardiert
		<i>dap1-2</i>	GK-094C03	+1083 5. Exon	homozygot	1	ja	retardiert
		-	GK-107G11	+605 3. Exon	heterozygot	n.b.	n.b.	n.b.
		-	GK-145H02	+2371 10. Intron	heterozygot	n.b.	n.b.	n.b.
<i>AtDAP2</i>	At4g13590	<i>dap2-1</i>	SALK_129037	+763 2. Intron	homozygot	mehrere	ja	retardiert
		<i>dap2-2</i>	SALK_011783	-121 5' UTR	homozygot	n.b.	nein	wildtypisch
<i>AtDAP3</i>	At1g68650	<i>dap3-1</i>	GK-402B01	+63 1. Intron	homozygot	mehrere	nein	wildtypisch
		-	SAIL_892_B03	keine Insertion	-	n.b.	n.b.	n.b.
<i>AtDAP4</i>	At1g25520	<i>dap4-1</i>	GK-484G10	+445 2. Intron	homozygot	mehrere	knock-down	wildtypisch
		<i>dap4-2</i>	SALK_143524	+649 4. Exon	homozygot	mehrere	ja	wildtypisch
<i>AtDAP5</i>	At5g36290	<i>dap5-1</i>	GK-027F07	+1389 6. Intron	homozygot	2	ja	wildtypisch

Pflanzen sind dementsprechend homozygot für das mutierte Gen. Es wurde versucht Pflanzen zu isolieren, die dem letztgenannten Allel- Zustand entsprechen, da nur diese Pflanzen potentielle Kandidaten für einen *knock-out* des entsprechenden Gens auf beiden Chromosomen darstellen. Für die meisten der untersuchten T-DNA Insertionslinien konnten Pflanzen isoliert werden, die homozygot für das entsprechende Mutanten-Allel waren. Diesen Linien wurde entsprechend der von Meinke und Koornneef (1997) vorgeschlagenen Nomenklatur eine Bezeichnung zugeteilt (Tab. 3.3). Für einige Linien war es allerdings nicht möglich, die T-DNA Insertion im entsprechenden Locus nachzuweisen oder homozygote Mutanten zu erhalten. Bei diesen Linien wird von einer fehlerhaften Annotation des Insertionsorts der T-DNA oder von multiplen T-DNA Insertionen mit letalem Effekt ausgegangen. Für die restlichen Linien wurden die für die entsprechende mutierten Allele, erhaltenen PCR-Produkte sequenziert, um die Position der T-DNA Insertion zu verifizieren.

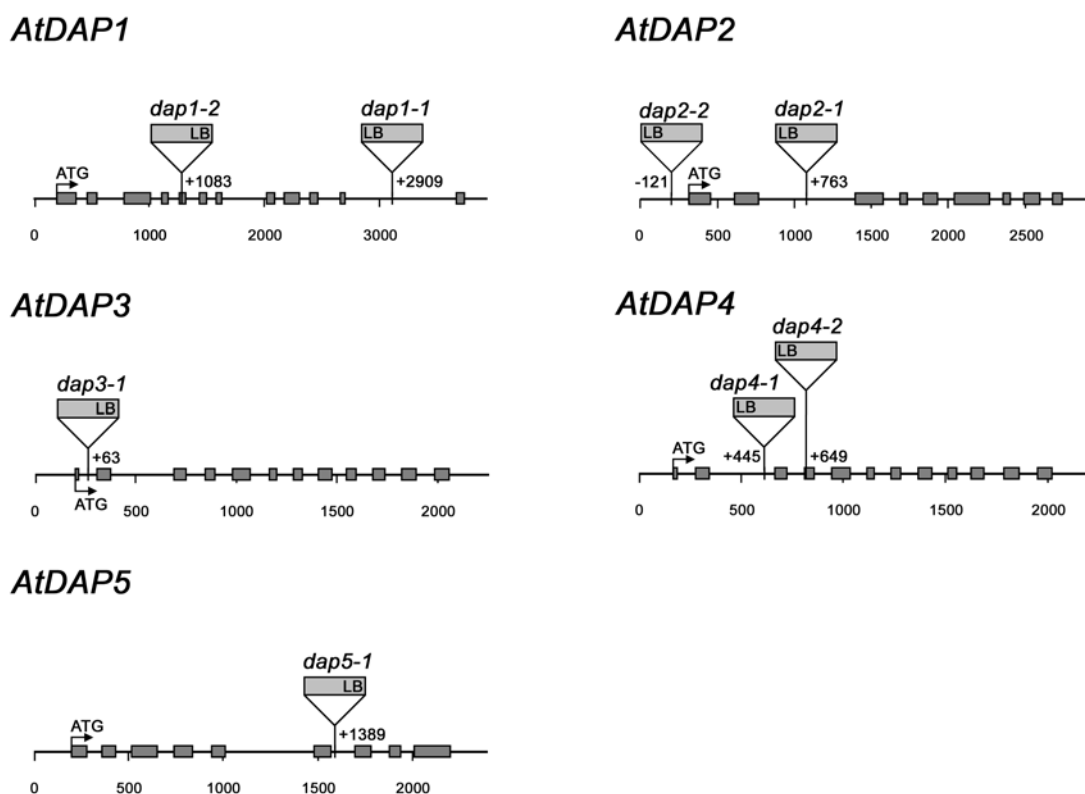


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur der *AtDAP*-Gene und die Position der T-DNA Insertion in den entsprechenden Linien.

Dargestellt sind die genomischen Loci der Gene *AtDAP1*, *AtDAP2*, *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* mit Exons (dunkelgraue Kästchen), Introns (verbindende Striche), T-DNA Insertion (hellgraues Fähnchen), Namen der T-DNA Insertionslinie, Position der T-DNA Insertion, *left border* (LB), Startkodon (ATG) und Längenmaßstab in Basenpaaren.

Des Weiteren wurde die Kopienzahl der T-DNA Insertionen durch Southern-Blot Analysen mittels einer *left border*-spezifischen Sonde ermittelt. Für einige der Linien wurde die Existenz von multiplen T-DNA Insertionen nachgewiesen. Dabei können die Insertionen in verschiedenen chromosomalen Loci oder als Mehrfachinsertion (*tandem insertions*) im selben Locus vorliegen. Dies ist kein unbekanntes Phänomen. So wurden in Untersuchungen von Rosso *et al.* (2003) auf Basis der GABI-Kat-Kollektion für ca. 38% der Linien Mehrfachinsertionen nachgewiesen. Alonso *et al.* (2003) wiesen anhand der SALK-Kollektion durchschnittlich 1,5 Insertionen pro Linie nach, was mit Werten für andere Kollektionen von T-DNA Insertionsmutanten vergleichbar ist (McElver *et al.*, 2001). Ein einmaliges Rückkreuzen der in dieser Arbeit isolierten Linien mit dem Wildtyp führte nicht zu einer Reduktion der Anzahl der T-DNA Insertionen. In Tabelle 3.3 und Abbildung 3.8 sind die ermittelten Ergebnisse für die einzelnen T-DNA Insertionslinien in einer Liste aufgeführt oder schematisch dargestellt.

3.4.2 Verifikation des *knock-out* für die T-DNA Insertionsmutanten

Das Vorhandensein von einer großer Insertion innerhalb des genomischen Locus eines Gens führt normalerweise zum Abbruch der Transkription in diesem Bereich und dadurch zum Funktionsverlust des entsprechenden Proteins. Um den *knock-out* der entsprechenden Genen in T-DNA Insertionsmutanten zu bestätigen, wurden RT-PCRs unter Verwendung von Gesamt-RNA, welche von homozygoten Pflanzen der T-DNA Insertionslinien und dem Wildtyp isoliert wurde, durchgeführt (Abb. 3.9). Dafür wurden Primer verwendet, die um den Insertionsort der T-DNA im Protein-kodierenden Bereich des Gens liegen.

Für *AtDAP1* konnte, neben der im Vorfeld isolierten homozygoten Mutante *dap1-1*, eine zweite homozygote T-DNA Insertionslinie, *dap1-2*, isoliert werden. Die Insertionen liegt bei *dap1-1* im 11. Intron und bei *dap1-2* im 5. Exon des Gens (Abb. 3.8). In beiden Insertionslinien konnten keine Wildtyp-spezifische mRNA-Fragmente mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Damit wurde gezeigt, dass es sich bei *dap1-1* und *dap1-2* um *knock-out*-Linien handelt. Im Falle von *AtDAP2* wurden zwei homozygote T-DNA Insertionslinien, *dap2-1* und *dap2-2*, isoliert. *dap2-1* trägt die Insertion im 2. Intron und *dap2-2* im 5'-untranslatierten Bereich des Gens. Für die Linie *dap2-1* konnte der *knock-out* von *AtDAP2*, durch das Fehlen dessen Transkripts gezeigt werden (Abb. 3.9). Obwohl die T-DNA Insertion bei *dap2-2* im 5'-untranslatierten Bereich liegt und eine Deregulation des Gens erwartet wurde, zeigte diese Linie keine Veränderung der Genexpression von *AtDAP2* (Daten nicht gezeigt). Die Insertionslinie *dap3-1* hat eine T-DNA Insertion im 1. Intron von *AtDAP3*. Dies führte im gegebenen Fall jedoch nicht zum Abbruch der Genexpression, da das entsprechende Transkript im Vergleich zum Wildtyp noch in gleicher Größe und Stärke vorhanden war. Somit konnte für *AtDAP3* keine *knock-out*-Linie isoliert werden. Für *AtDAP4* wurden zwei homozygote T-DNA Insertionslinien, *dap4-1* und *dap4-2*, isoliert. Diese tragen die Insertion im 2. Intron bzw. im 4. Exon des Gens. Die Mutante *dap4-1* enthielt jedoch noch geringe Mengen des entsprechenden Transkripts. Für diese Linie war somit nur ein *knock-down* von *AtDAP4* nachzuweisen. Bei *dap4-2* war ein vollständiges Transkript von *AtDAP4* nicht mehr detektierbar, so dass von einem *knock-out* des entsprechenden Gens ausgegangen wird. Die Linie *dap5-1* trägt eine T-DNA Insertion im 6. Intron des Gens *AtDAP5*. Der *knock-out* dieses Gens wurde durch die Abwesenheit des entsprechenden mRNA-Fragments nachgewiesen. Somit wurde, mit Ausnahme von *AtDAP3*, für jedes der anderen *AtDAP*-Gene mindestens eine T-DNA Insertionslinie mit einem *knock-out* des entsprechenden Gens isoliert und verifiziert.

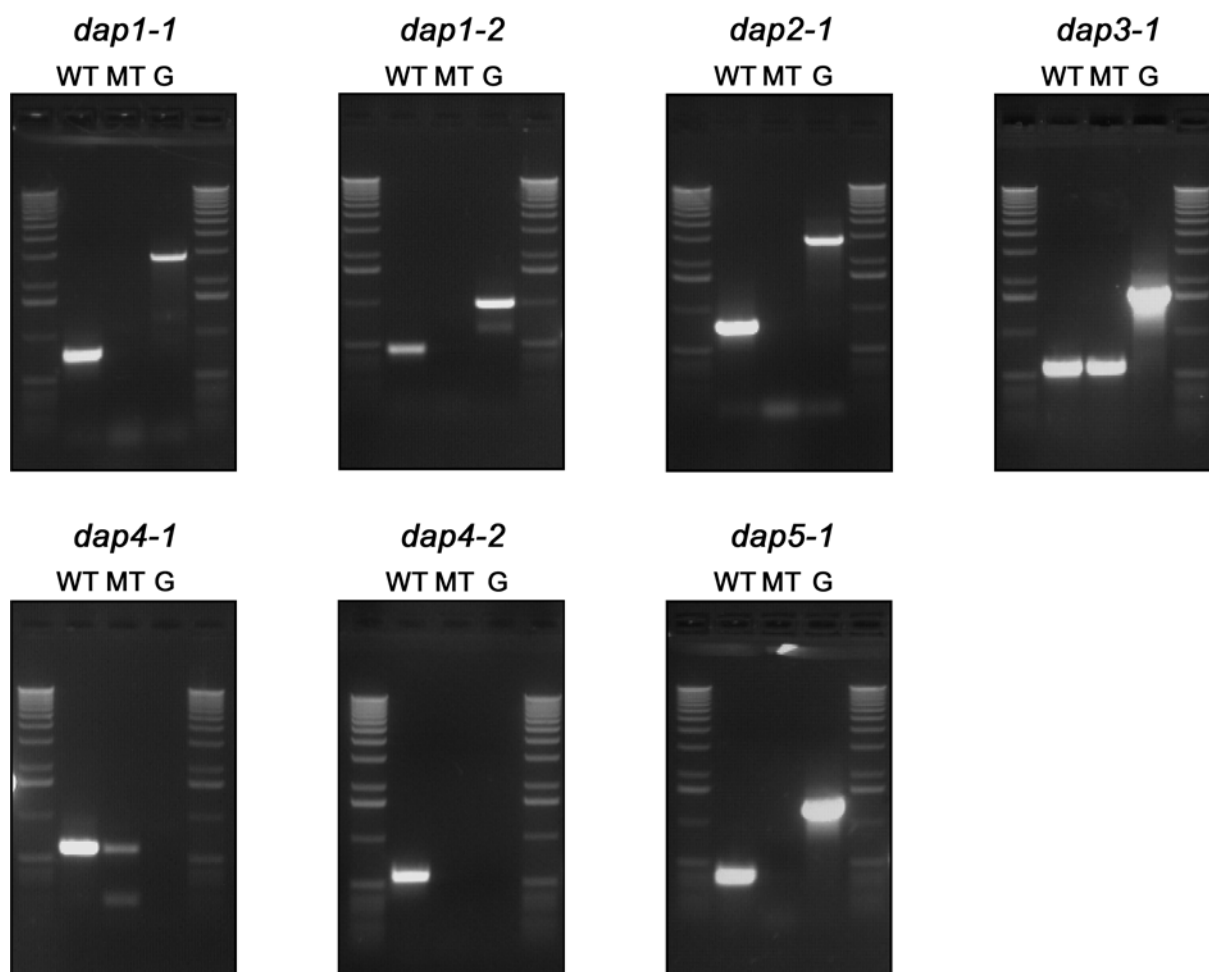


Abb. 3.9: Analyse der Expression der *AtDAP*-Gene in den korrespondierenden homozygoten T-DNA Insertionsmutanten.

Dargestellt sind die erhaltenen RT-PCR-Fragmente von Wildtyppflanzen (WT), homozygoten T-DNA Insertionsmutanten (MT) sowie einer Kontrolle mit genomischer DNA (G) nach 40 Zyklen.

3.5 Phänotypische Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutanten

Um die homozygoten T-DNA Insertionsmutanten und den damit verbundenen Funktionsverlust der entsprechenden Proteine zu charakterisieren, wurden die isolierten Linien zunächst hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten und Veränderungen untersucht. Dazu wurde der Phänotyp der Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen im Langtag analysiert.

3.5.1 Phänotyp der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten

Die Mutante *dap1-1* wurde aufgrund ihres auffälligen Phänotyps in vorausgegangenen Untersuchungen isoliert. Dabei war sie über die gesamte vegetative Entwicklungsphase durch eine Größenreduktion auf ca. ein Drittel der Wildtyppflanzen und durch eine gelbliche Blattfarbe gekennzeichnet (Abb. 10). Diese Auffälligkeiten waren auch in der zweiten *knock-out*-Linie, *dap1-2*, ausgeprägt. Eine verminderte Größe wurde auch für alle anderen Organe, wie anhand der Blattfläche, der Wurzellänge, der Stängelhöhe, der Blütengröße und -anzahl und der Schotenlänge nachgewiesen wurde, ermittelt. Daher scheint für die *dap1*-Mutanten eine generelle Größenreduktion vorzuliegen. Auf einige dieser Besonderheiten wird im Rahmen der physiologischen Charakterisierung dieser Mutanten näher eingegangen (Kapitel 3.6). Da beide T-DNA Insertionsmutanten einen identischen Phänotyp zeigten, wird davon ausgegangen, dass die ermittelten phänotypischen Auffälligkeiten ihre Ursache direkt im Funktionsverlust des Gens *AtDAP1* haben. Des Weiteren ist festzuhalten, dass es sich bei den beiden isolierten *knock-out*-Mutationen um rezessive Allele handelt, da die durch Rückkreuzungen mit dem Wildtyp erzeugten heterozygoten *dap1-1*- und *dap1-2*-Mutanten keine phänotypischen Auffälligkeiten gezeigt haben.

3.5.2 Phänotyp der *dap2* T-DNA Insertionsmutante

Von der T-DNA Insertionslinie *dap2-1* wurden nach einer Keimung auf Erde zunächst keine homozygoten Mutanten ermittelt. Dabei wurden aus der Nachkommenschaft heterozygoter *dap2-1*-Mutanten nur Pflanzen isoliert, welche heterozygot für das mutierte Allel oder homozygot für das Wildtyp-Allel waren. Dabei war auffällig, dass ein Teil der

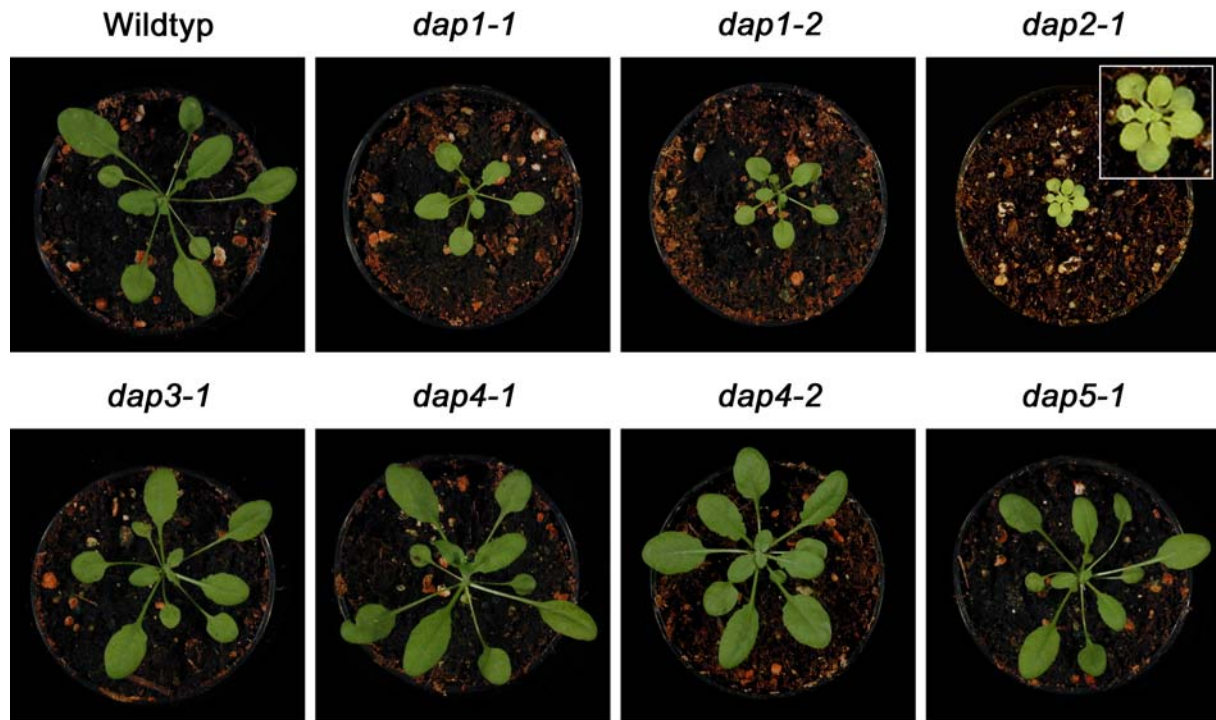


Abb. 3.10: Darstellung des Phänotyps der T-DNA Insertionsmutanten für die *AtDAP*-Gene. Die dargestellten Pflanzen sind für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auf Erde gewachsen. Eine Ausnahme war *dap2-1*, die auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose angezogen und nach ca. drei Wochen auf Erde überführt wurde. Der Einsatz zeigt eine zweifache Ausschnittsvergrößerung.

Nachkommenschaft zwar keimte, sich jedoch nicht über das Keimlingsstadium hinaus entwickelte und im weiteren Verlauf abstarb (Abb. 3.11B). Es wurde vermutet, dass es sich bei den keimlingsletalen Pflanzen um die homozygoten T-DNA Insertionsmutanten handeln könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Verteilungseigenschaften dieses Phänotyps ermittelt und die Ergebnisse einer statistischen Analyse unterzogen. Dazu wurde der Pearson's χ^2 -Test angewendet, welcher analysiert, ob die vorliegenden Daten mit einer statistischen Wahrscheinlichkeitsverteilung korrelieren. Hierbei ist die statistische Verteilung der Allele durch die Mendel'sche Spaltungsregel (2. Mendel'sche Regel) im Verhältnis 1:2:1 definiert. Bei einer Dominanz eines der beiden Allele ist das Verhältnis der Phänotypen aber 3:1. Im Fall der *dap2-1*-Mutante wurde geprüft, ob das Auftreten der Phänotypen (wildtypisch und arretiert) in einer statistischen Verteilung von 3:1 vorlag. Dazu wurden die F_1 -Keimlingspopulationen von zwei unabhängigen heterozygoten Pflanze der F_0 -Generation untersucht. Die ermittelten Verteilungen des χ^2 -Tests ergaben Werte von 0,18 ($n = 153$) und 0,06 ($n = 145$). Bei einem α von 0,05 liegt der kritische Wert der Testprüfgröße χ^2 ($p = 0,95$, FG = 1) bei 3,84. Somit sind die erhaltenen Werte signifikant und die Nullhypothese, dass die

beobachtete Häufigkeit der theoretischen Verteilung folgt, ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05% anzunehmen. Da die beobachtete Häufigkeit der Phänotypen der theoretischen Verteilung von 3:1 entsprach, wird davon ausgegangen, dass die T-DNA Insertion im Gen für *AtDAP2* für das veränderte Keimverhalten der *dap2-1*-Mutanten verantwortlich ist. Um adulte homozygote *dap2-1*-Mutanten zu erhalten, wurden Samen der heterozygoten *dap2-1*-Mutanten auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose ausgebracht. Pflanzen, die unter diesen Bedingungen angezogen wurden, waren in der Lage, sich zu entwickeln. Somit konnten homozygote *dap2-1*-Mutanten isoliert werden. Diese Pflanzen zeigten eine sehr starke Wachstumsreduktion und eine gelbliche Blattfarbe gekennzeichnet (Abb. 3.10 und 3.11A). Nach der Anzucht auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose konnten die homozygoten Mutanten auf Erde überführt werden. Dabei blieb der zwerghafte Phänotyp und die gelbe Blattfarbe erhalten. Nach der Überführung auf Erde waren die Pflanzen fertil und entwickelten Samen. So war es möglich die homozygoten *knock-out* Mutanten für *dap2-1* zu vermehren. Es ist aber hervorzuheben, dass die Seneszenz und die Samenentwicklung im Vergleich zu Wildtyppflanzen erheblich verlangsamt war. Eine Entwicklung homozygoter *dap2-1*-Mutanten auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ohne externe Energie- und Kohlenstoffquelle, war ebenfalls keimlingsletal (Abb. 3.11B). Auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose war die Keimungsrate der Samen von homozygoten *dap2-1*-Mutanten (93%) und des Wildtyps (92%) vergleichbar. Der beobachtete Phänotyp der homozygoten *dap2-1*-Mutanten stellte sich jedoch pleiomorph dar. Bei einer genaueren Untersuchung waren starke Größenunterschiede zwischen den gekeimten Pflanzen festzustellen. Deshalb wurde nach dreiwöchigem Wachstum auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose eine Einteilung der *dap2-1*-Mutanten in vier Gruppen vorgenommen (Abb. 11A). Die Pflanzen der Gruppen 1 bis 3 waren entwicklungsfähig. Dem gegenüber entwickelten Pflanzen der Gruppe 4 zwar Keimlinge, welche aber in diesem Stadium arretiert blieben und im weiteren Verlauf abstarben. Die Klassifizierung der Gruppen 1 bis 3 erfolgte anhand des Durchmessers der Blattrosette: Gruppe 1, Pflanzen mit einer Blattrosette größer als 10 mm; Gruppe 2, Pflanzen mit einer Blattrosette von 4 bis 10 mm; Gruppe 3, Pflanzen mit einer Blattrosette kleiner als 4 mm. Für diese Gruppen wurde folgende Verteilung ermittelt: Gruppe 1, 62%; Gruppe 2, 19%; Gruppe 3, 16%; Gruppe 4, 3%. Alle weiteren Untersuchungen wurden nur Pflanzen der Gruppe 1 durchgeführt.

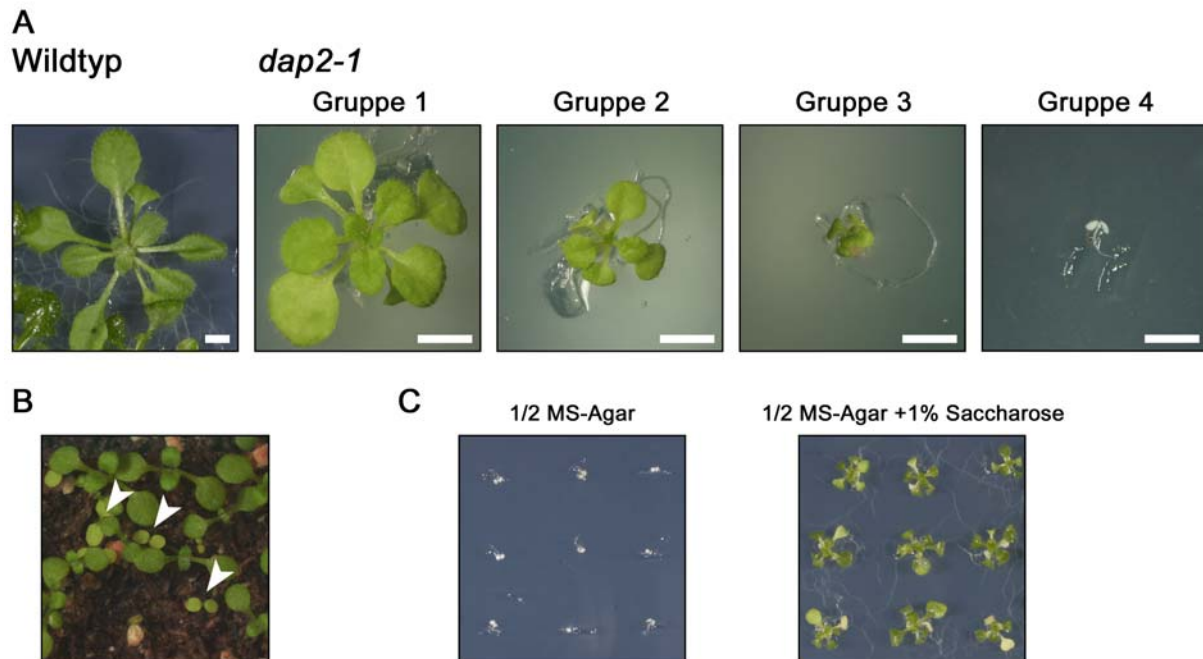


Abb. 3.11: Darstellung der des Phänotyps der *dap2-1*-Mutanten.

(A) Gruppeneinteilung der homozygoten Mutanten von *dap2-1*. Die dargestellten Pflanzen von *dap2-1* sind für 22 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose gewachsen. Balken = 4 mm.

(B) Wachstum der homozygoten Mutanten von *dap2-1* nach 10 Tagen nach der Keimung auf Erde. Die homozygote Mutanten von *dap2-1* sind mit Pfeilen markiert.

(C) Wachstum der homozygoten *dap2-1*-Mutanten nach 22 Tagen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit oder 1% (w/v) Saccharose.

Das Auftreten der starken Größenvarianz innerhalb der Pflanzenpopulation der *dap2-1*-Mutante legt die Vermutung nahe, dass diese Unterschiede möglicherweise durch die Segregation weiterer T-DNA Insertionen verursacht werden. Eine Bestimmung der Kopienzahl der im Genom dieser Mutanten enthaltenen T-DNA-Insertionen zeigte das Vorhandensein mehrerer Insertionen an (vgl. Tab. 3.3). Durch Rückkreuzungen mit dem Wildtyp wurde versucht, die Anzahl nicht gekoppelter T-DNA-Insertionen zu verringern. Nach einmaliger Rückkreuzung wurde jedoch keine Verringerung der Anzahl der Insertionen erzielt. Die F₁-Generation dieser Kreuzungen war durch einen uniformen wildtypischen Phänotyp gekennzeichnet. Dabei wurden heterozygote *dap2-1*-Mutanten isoliert, die allesamt durch eine wildtypischen Phänotyp gekennzeichnet waren. Damit wurde weiterhin gezeigt, dass das isolierte *knock-out* Allel von *dap2-1* rezessiv ist. In der F₂-Generation der Kreuzungen wurden wiederum Pflanzen mit dem Phänotyp homozygoter *dap2-1*-Mutanten oder des Wildtyps beobachtet. Für die restlichen Pflanzen wurden keine auffälligen Unterschiede in der Größe der Blattrosette oder der Blattpigmentierung ermittelt werden. Des Weiteren entsprach die in diesem Versuch beobachtete Verteilung der Phänotypen (Wildtyp :

Mutante) wiederum in etwa dem Verhältnis 3:1. Dabei waren die homozygoten *dap2-1*-Mutanten und deren Nachkommenschaft wiederum durch die schon beschriebenen Größengruppen gekennzeichnet. Diese Ergebnisse dieser Rückkreuzungen deuten darauf hin, dass die Größenunterschiede innerhalb der *dap2-1*-Mutantenpopulation entweder auf weitere gekoppelte T-DNA Insertionen zurückzuführen sind, oder dass die Ausprägung des *dap2-1* Phänotyp in seiner morphologischen Erscheinungsform variabel ist.

3.5.3 Phänotyp der Kreuzungen der *dap1-1*, *dap1-2* und *dap2-1* T-DNA Insertionsmutanten

Um genetisch sicherzustellen, dass es sich bei *dap1-1* und *dap1-2* um *knock-out*-Allele des selben Gens handelt, wurden zusätzlich reziproke Kreuzungen zwischen diesen beiden Mutanten durchgeführt. Dabei wurden homozygote *dap1-1*-Mutanten als Akzeptor- und homozygote *dap1-2*-Mutanten als Donorpflanzen und *vice versa* verwendet. Die resultierenden F₁-Generationen dieser Kreuzungen wurden mittels PCR analysiert. Sie waren, wie erwartet, heterozygot für die Allele von *dap1-1* und *dap1-2* und wiesen die gleichen phänotypischen Auffälligkeiten wie die homozygoten Elternpflanzen auf (Abb. 12). Damit konnte bestätigt werden, dass *dap1-1* und *dap1-2* allelisch sind, d.h. die beiden T-DNA Insertionslinien tragen *knock-out*-Allele für dasselbe Gen.

Um eine teilweise Redundanz der Gene *AtDAP1* und *AtDAP2* zu untersuchen, wurden Kreuzungen zwischen den Insertionsmutanten dieser Gene, *dap1-1*, *dap1-2* und *dap2-1*, erzeugt. Aus den resultierenden Kreuzungen konnten in der F₃-Generation die homozygoten Doppelmutanten *dap1-1 dap2-1* und *dap1-2 dap2-1* isoliert werden. Der Zygotiestatus der Doppelmutanten wurde in Bezug auf die beiden Gene mit PCR überprüft. Morphologisch stimmten die beiden Doppelmutanten mit der phänotypischen Erscheinung von *dap2-1* überein. Weitere oder zusätzliche morphologische Auffälligkeiten, die über den Phänotyp von *dap2-1* hinausgehen, wurden nicht erkannt. Des Weiteren waren diese Doppelmutanten, wie die Keimlinge von *dap2-1*, auf Erde keimlingsletal und konnten sich nur nach einer Keimung auf ½ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose weiterentwickeln. Aufgrund der phänotypischen Erscheinung der Einzel- und Doppelmutanten und unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Expressionsmusters kann eine Redundanz von *AtDAP1* und *AtDAP2* in heterotrophen Organen und Geweben ausgeschlossen werden. Auch für phototrophe Gewebe scheint eine Redundanz auszuschließen zu sein.

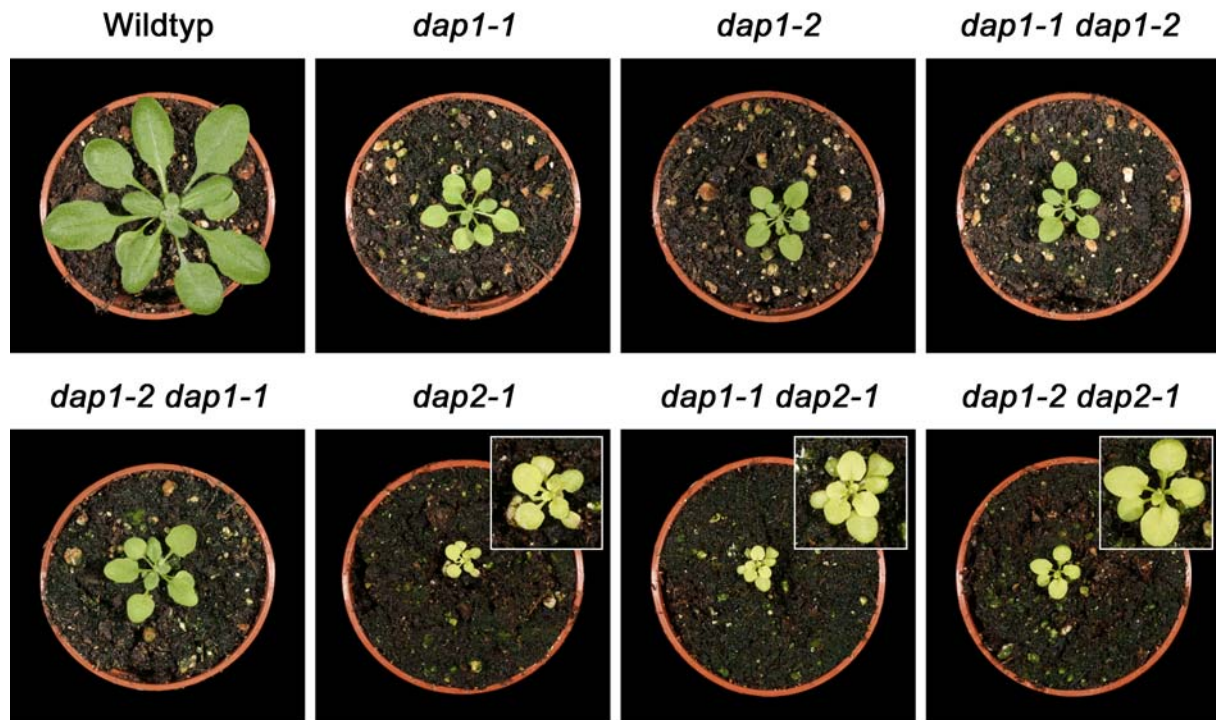


Abb. 3.12: Darstellung des Phänotyps der Mutanten *dap1-1*, *dap1-2*, *dap2-1* sowie der Doppelmutanten *dap1-1 dap2-1* und *dap1-2 dap2-1*.

Die dargestellten Pflanzen sind für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auf Erde gewachsen. Ausnahme waren *dap2-1*, *dap1-1 dap2-1*, *dap1-2 dap2-1*, welche auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose angezogen und nach ca. drei Wochen auf Erde überführt wurden. Der Einsatz zeigt eine 2-fache Ausschnittsvergrößerung.

3.5.4 Phänotyp der *dap3*, *dap4* und *dap5* T-DNA Insertionsmutanten

Die T-DNA Insertionsmutanten der Gene *AtDAP3* und *AtDAP4* zeigten unter Langtagbedingungen keine morphologischen oder entwicklungsbedingtem Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.10). Im Fall von *dap3-1* war die Ursache hierfür die unveränderten Expression des Gens (Abb. 3.9). Da für diese Mutante die T-DNA Insertion im 1. Intron nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass das Gen vollständig transkribiert wird, die mRNA korrekt prozessiert (*splicing*) wird und somit auch ein funktionelles Protein vorhanden ist. Für *AtDAP4* wurden zwei homozygote T-DNA Insertionslinien isoliert und untersucht. Dabei wurde für *dap4-1* nur ein verminderter Transkriptgehalt ermittelt (Abb. 3.9). Es wird angenommen, dass in diesem Fall die Transkriptionseffizienz erniedrigt ist. Dahingegen war für die Linie *dap4-2*, welche die T-DNA Insertion im 4. Exon trägt, kein vollständiges Transkript nachzuweisen (Abb. 3.9). Diese Linie ist eine kompletter *knock-out*

von *AtDAP4*. Aufgrund der hoher Ähnlichkeit in der Aminosäureidentität von *AtDAP3* und *AtDAP4* und eines ähnlichen Expressionsmusters kann eine Redundanz für diese Gene vermutet werden. Deshalb ist anzunehmen, dass es in einer Einzelmutante, in der nur eines der beiden Gene ausgeschaltet ist, aufgrund der Aktivität des jeweils anderen Proteins zu keinem kompletten Funktionsverlust kommt. Nur ein Doppelmutante würde eventuell Auffälligkeiten, die im Zusammenhang mit der Funktion der Proteine stehen, zeigen. Da, wie zuvor angesprochen, für das Gen *AtDAP3* keine *knock-out*-Allel isoliert werden konnte, ist eine Überprüfung dieser Hypothese durch eine Kreuzungen der entsprechenden Einzelmutanten nicht möglich. Auch die *knock-out*-Linie *dap5-1*, welche die T-DNA Insertion im 6. Intron von *AtDAP5* trägt, zeigt keine morphologischen oder Entwicklungsauffälligkeiten unter den gewählten Wachstumsbedingungen (3.10). Ob für die *knock-out*-Mutanten von *AtDAP4* und *AtDAP5* möglicherweise ein konditioneller oder metabolischer Phänotyp existiert, wurde noch nicht eingehender untersucht.

3.6 Molekulare Analyse und phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit amiRNA-Konstrukten gegen *AtDAP1* und *AtDAP2*

Zur Verifizierung des Phänotyps der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten, wurde versucht die Expression der verantwortlichen Gene durch eine weitere unabhängige Methode mittels *reverse genetics* zu unterbinden. Damit sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Phänotypen der isolierten T-DNA Insertionslinien im direkten Zusammenhang mit dem Funktionsverlust von *AtDAP1* und *AtDAP2* stehen. Dafür wurde die Methode des gerichteten *gene silencing* durch artifizielle microRNAs (amiRNAs) von Schwab *et al.* (2006) eingesetzt.

MicroRNAs (miRNAs) sind bedeutende Negativregulatoren der Genexpression in Eukaryoten. Dabei unterbinden sie die Genexpression posttranskriptionell, meist durch einen gezielten Transkriptabbau oder durch Inhibition der Translation entsprechender Zielgene. In Pflanzen werden miRNAs durch die RNA-Polymerase II transkribiert und so zunächst die sogenannte pri-miRNA (*primary transcripts of miRNA gene*) synthetisiert. Diese wird durch die Doppelstrang-spezifische Ribonuklease (RNase), DICER-LIKE1 (DCL1), sequentiell zunächst zur pre-miRNA (*precursor miRNA*) und anschließend zu einer miRNA-Duplex prozessiert. Der komplementäre Strang der miRNA-Duplex wird dann in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingelagert. Unter Verwendung der sequenzspezifischen 19 - 24 bp langen miRNA wird das Transkript des Zielgens erkannt, gerichtet geschnitten und so dessen nachfolgender Abbau eingeleitet. Bei der Methode von Schwab *et al.* (2006) wird mittels PCR eine sequenzspezifische amiRNA auf Grundlage der miR319a erzeugt, welche die Expression des entsprechenden Zielgens in der zuvor beschriebenen Weise unterdrückt. Eine konstitutive Expression der amiRNA-Konstrukte in fast allen Geweben wurde in den geführten Untersuchungen durch den 35S-Promotors des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) realisiert.

3.6.1 Phänotyp der Mutanten mit dem amiRNA-Konstrukt gegen *AtDAP1*

Zur Analyse der Mutanten, welche das amiRNA-Konstrukt amiR-dap1-1 tragen, wurde die morphologische Erscheinung der Mutanten und der Transkriptgehalt von *AtDAP1* untersucht (Abb. 3.13). In der T₁-Generation dieser Mutanten wurden Pflanzen identifiziert, die den Phänotyp der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten widerspiegeln (Abb. 3.13A). Neben diesen

Pflanzen (ca. 36%) für den überwiegenden Teil der Mutanten nur intermediäre (ca. 36%) oder wildtypische (ca. 28%) Phänotypen beobachtet. Auch in den Untersuchungen von Schwab *et al.* (2006) waren Varianzen in der Ausprägungsstärke der Phänotypen für verschiedene amiRNA-Konstrukte zu verzeichnen. Eine Ursache dafür könnte in der unterschiedliche Stärke des *gene silencing*-Effektes liegen, was z.B. durch eine unterschiedliche Expression der amiRNA in Abhängigkeit vom entsprechenden Integrationsort der T-DNA zu erklären wäre. Deshalb wurde der *AtDAP1*-Transkriptgehalt von den amiR-dap1-1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und der *dap1-1*-Mutante durch semiquantitative RT-PCR untersucht (Abb. 3.13B). Die *dap1-1* Mutante wies, wie auch schon in vorangegangenen Untersuchungen, kein Transkript für *AtDAP1* auf. Dahingegen zeigte sich, dass die amiR-dap1-1-Mutanten der Linien 1, 8, 11, 15 und 24, welche die höchsten morphologischen Ähnlichkeiten zum Phänotyp der *dap1-1* Mutante hatten, nur einen drastisch reduzierten *AtDAP1*-Transkriptgehalt aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass in diesen Linien dementsprechend auch der Proteingehalt von AtDAP1 deutlich verringert ist. Im Gegensatz dazu war für die amiR-dap1-1-Mutante der Linie 2, die von der phänotypischen Erscheinung dem Wildtyp glich, nur eine geringfügige Reduktion des *AtDAP1*-Transkriptgehalts zu verzeichnen. Somit kann auf eine Korrelation der Ausprägungsstärke des *dap1*-Phänotyps in Abhängigkeit von dem noch vorhandenen Transkriptgehalt des *AtDAP1*-Gens geschlossen werden. Obwohl es Unterschiede in der Ausprägung des *dap1*-Phänotyps innerhalb der amiR-dap1-1-Mutantenpopulation gab, war deutlich erkennbar, dass die phänotypischen Auffälligkeiten dieser Mutanten in der verminderten Expression von *AtDAP1* begründet lag. Dabei war allerdings nur ein *knock-down* und kein kompletter *knock-out* des Gens zu verzeichnen gewesen. Dennoch zeigte der Phänotyp von Pflanzen mit starkem *knock-down*- oder *gene silencing*-Effekt hohe morphologische Übereinstimmung mit dem für die T-DNA Insertionslinien *dap1-1* und *dap1-2* beschriebenen Phänotyp. Damit wird deutlich, dass der im Kap. 3.5.1 für diese Mutanten beschriebenen Phänotyp als Folge des Funktionsverlusts des Gens *AtDAP1* angesehen werden muss.

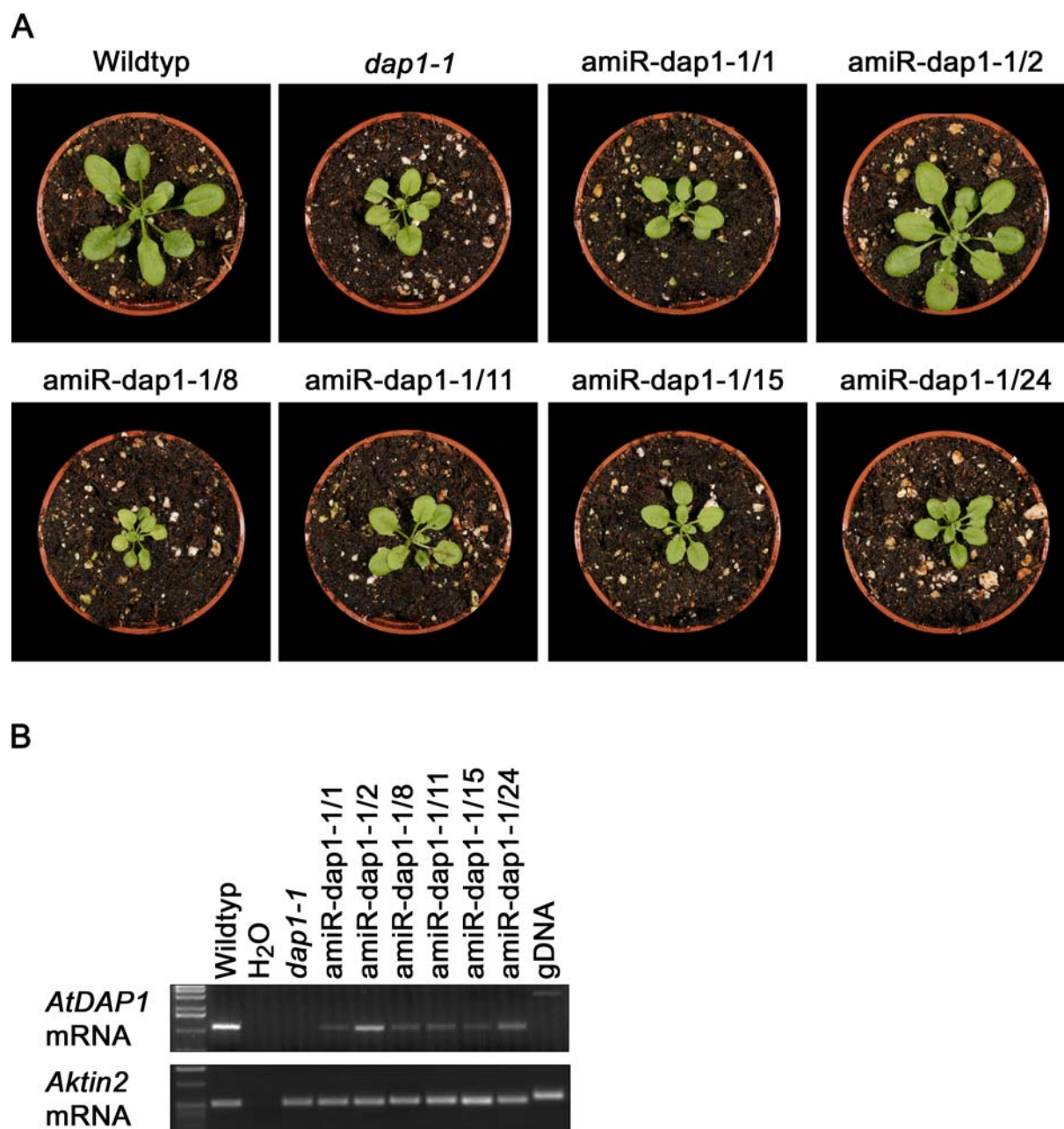


Abb. 3.13: Darstellung des Phänotyps und der *AtDAP1*-Expression der amiRNA-Mutanten mit dem Konstrukt amiR-dap1-1.

(A) Dargestellt sind der Wildtyp, die T-DNA Insertionsmutante *dap1-1* sowie die amiRNA-Mutanten der T₁-Generation mit dem Konstrukt amiR-dap1-1. Die Pflanzen wurden für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen.

(B) Nachweis der Expression von *AtDAP1* in verschiedenen Linien der amiRNA-Mutanten des Konstrukts amiR-dap1-1 mittels semiquantitative RT-PCR. Dargestellt sind die erhaltenen RT-PCR Fragmente von *AtDAP1*, genomischer DNA (gDNA) (40 Zyklen) und von *Aktin2* (25 Zyklen) aus Blattgewebe.

3.6.2 Phänotyp der Mutanten mit dem amiRNA-Konstrukt gegen *AtDAP2*

Die Analyse der Mutanten mit dem amiRNA-Konstrukt amiR-dap2-1, welches gegen *AtDAP2* gerichtet ist, wurden in gleicher Weise wie für die Mutanten des amiRNA-Konstrukt amiR-dap1-1 (Kap. 3.6.1) durchgeführt. Dabei wurde allerdings ein Teil der selektierten Keimlinge weiterhin auf ½ MS-Agarplatten mit 1% (w/v) Saccharose kultiviert und nicht, wie die übrigen Keimlinge, nach ca. einer Woche auf Erde pikiert. Damit sollte die Fähigkeit der Keimlinge zur Entwicklung auf Erde getestet werden, welches bei Pflanzen der T-DNA Insertionsmutante *dap2-1* gestört war (Kap. 3.5.2). Im Gegensatz zur *dap2-1*-Mutante war für die amiRNA-Mutanten mit dem Konstrukt amiR-dap2-1 keine Keimlingsletalität bei einem Wachstum auf Erde festzustellen. An adulten Pflanzen der amiR-dap2-1-Mutante traten jedoch die phänotypischen Charakteristika der *dap2-1*-Mutante auf (Abb. 3.14A). Auch für die amiR-dap2-1-Mutanten wurde eine hohe Varianz in der Ausprägung des Phänotyps beobachtet. Die amiR-dap2-1-Mutanten waren nur teilweise kleiner als der Wildtyp und durch eine gelbliche Blattfarbe gekennzeichnet. Dabei zeigten ca. 28% der amiR-dap2-1-Mutanten einen ähnlichen Phänotyp wie die *dap2-1*-Mutante. Ca. 56 % der Mutanten waren durch einen intermediären Phänotyp und die restlichen ca. 16% durch einen eher wildtypischen Phänotyp gekennzeichnet. Dabei war auffällig, dass viele der Mutanten mit *dap2-1*-ähnlichem oder intermediärem Phänotyp durch eine hellere Blattfarbe, vor allem im Bereich der Mittelrippe, gekennzeichnet waren (Abb. 3.14 Linie 8). Diese Auffälligkeit wurde für die *dap2-1*-Mutante, welche sich durch eine einheitlich gelbliche Blattfarbe auszeichnete, nicht beobachtet. Des Weiteren wurde vor allem für ältere Blätter der amiR-dap2-1-Mutanten ein zunehmendes chlorotisches Ausbleichen beobachtet, welches in einigen Fälle zu nekrotischen Läsionen führte (Abb. 3.14B). Dieses Phänomen war bei der *dap2-1*-Mutante nur selten in abgeschwächter Form, z.B. nach dem Überführen auf Erde oder bei besonders ungünstigen Wachstumsbedingungen, zu beobachten. Auch für die amiR-dap2-1-Mutanten wurde der Transkriptgehalt von *AtDAP2* im Vergleich zum Wildtyp und der *dap2-1*-Mutante durch semiquantitative RT-PCR analysiert (Abb. 3.14C). Dabei war für die *dap2-1* T-DNA Insertionsmutante, wie in den vorherigen Untersuchungen, kein Transkript von *AtDAP2* nachweisbar. Die Pflanzen mit den größten morphologischen Ähnlichkeiten zum Phänotyp der *dap2-1*-Mutante wiesen einen deutlich reduzierten Gehalt von *AtDAP2*-Transkript auf. Zudem wurde jedoch nur ein *knock-down* und kein kompletter *knock-out* dieses Gens, wie in der T-DNA Insertionslinie *dap2-1*, nachgewiesen. Dies war für die amiR-dap2-1-

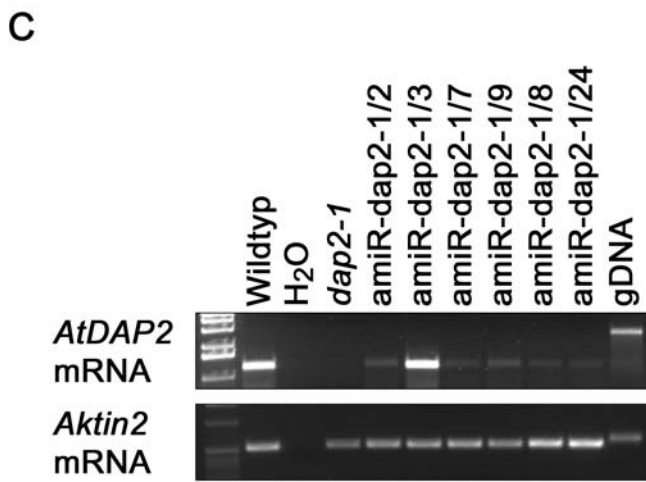
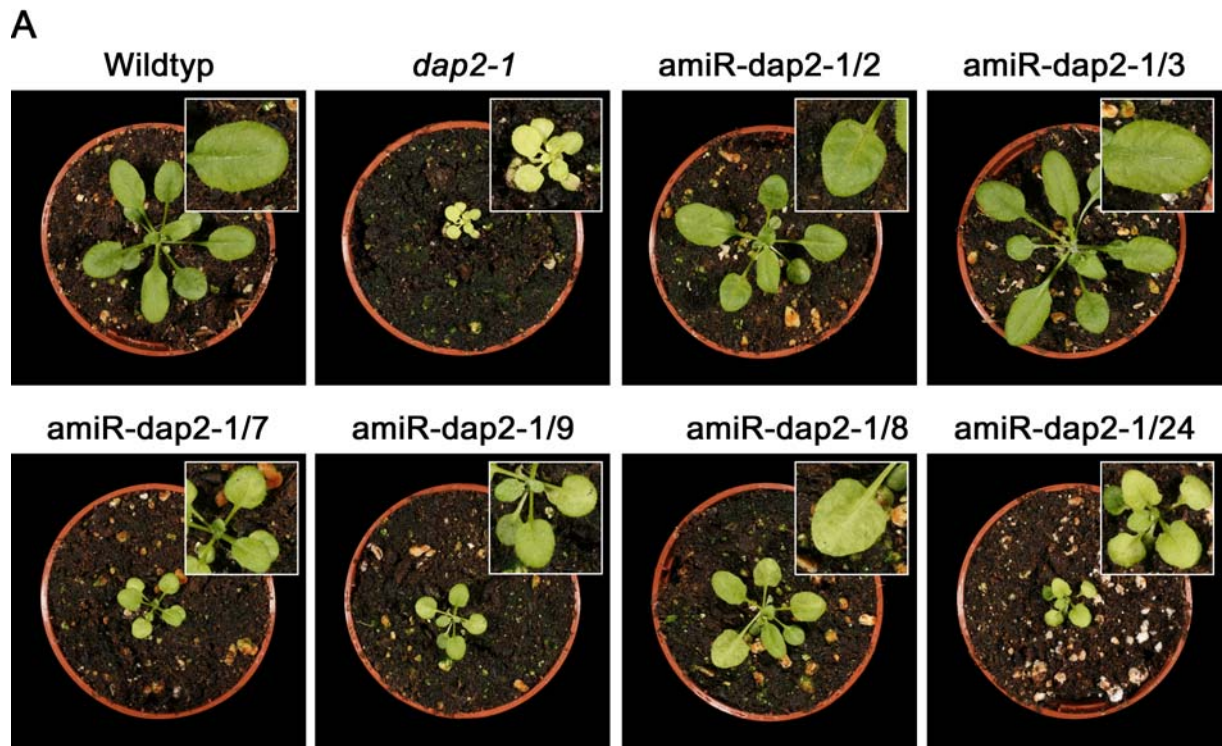


Abb. 3.14: Darstellung des Phänotyps und der *AtDAP2*-Expression der amiRNA-Mutanten mit dem Konstrukt amiR-dap2-1.

(A) Dargestellt sind der Wildtyp, die T-DNA Insertionsmutante *dap2-1* sowie die amiRNA-Mutanten der T₁-Generation mit dem Konstrukt amiR-dap2-1. Die Pflanzen wurden für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen. Der Einsatz zeigt eine zweifache Ausschnittsvergrößerung.

(B) Blattphänotyp der amiRNA-Mutante amiR-dap2-1 26 Tage (1), 29 Tage(2) und 36 Tage (3) nach der Aussaat.

(C) Nachweis der Expression von *AtDAP2* in verschiedenen Linien der amiRNA-Mutanten des Konstrukts amiR-dap2-1 mittels semiquantitative RT-PCR. Dargestellt sind die erhaltenen RT-PCR Fragmente von *AtDAP2*, genomischer DNA (gDNA) (40 Zyklen) und von *Aktin2* (25 Zyklen) aus Blattgewebe.

Mutanten der Linien 2, 7, 8, 9 und 24 der Fall. Für die Linie amiR-dap2-1/3, welche durch eine wildtypische Erscheinung gekennzeichnet war, wurde in etwa die gleiche Menge an *AtDAP2*-mRNA nachgewiesen. Obwohl die amiR-dap2-1-Mutanten nicht in allen Einzelheiten den Phänotyp der *dap2-1* T-DNA Insertionsmutante widerspiegelten, zeigte sich trotzdem ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem erniedrigten Transkriptgehalt von *AtDAP2* und der Ausprägung des Phänotyps. Da aber immer eine geringe Menge von *AtDAP2*-mRNA in den amiR-dap2-1-Mutanten nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass noch in gewissem Umfang ein funktionelles Protein gebildet werden kann. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass der Phänotyp der amiR-dap2-1-Mutanten schwächer ausgeprägt war und nicht in allen Einzelheiten mit dem der *knock-out*-Mutante *dap2-1* übereinstimmte. Trotzdem wird davon ausgegangen, dass der in Kap. 3.5.2 beschriebene Phänotyp die Folge des Funktionsverlusts von *AtDAP2* ist.

3.7 Physiologische Charakterisierung *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

3.7.1 Wachstumscharakteristika der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten

Um vor einer eingehenderen physiologischen Untersuchung einen Eindruck über Veränderungen in den Wachstumseigenschaften der isolierten Mutanten *dap1* und *dap2* zu erhalten, wurden für diese verschiedene Wachstumsparameter bestimmt. Die Quantifizierung der Wachstumsunterschiede wurde bei drei verschiedene Tageslängen, Langtagbedingungen (LD 16/8 h bzw. 12/12 h) und Kurztagbedingungen (LD 8/16 h), durchgeführt.

Wie unter Kapitel 3.5.1 beschrieben, sind die *dap1*-Mutanten neben der gelblichen Blattfarbe vor allem durch eine deutliche Größenreduktion im Vergleich zum korespondierenden Wildtyp gekennzeichnet. Dies wurde besonders an der Größe der Blattrosette zum Zeitpunkt der Anthese deutlich. Der Blattrosettendurchmesser des Wildtyps war für die beiden gewählten Langtagbedingungen identisch (Tab. 3.4). Dies war für die *dap1*-Mutanten nicht der Fall. Bei einer Photoperiode von LD 16/8 h war der Rosettendurchmesser für beide *dap1*-Mutanten um ca. 60% verringert. Dahingegen betrug die Reduktion bei einer Photoperiode von LD 12/12 h ca. 40%. Unter Kurztagbedingungen (LD 8/16 h) wurde, wie zu erwarten war, für den Wildtyp eine Vergrößerung des Rosettendurchmessers verzeichnet. Für die *dap1*-Mutanten wurde jedoch keine derartige Zunahme beobachtet, und der Durchmesser blieb im Vergleich zu der Photoperiode von LD 12/12 h unverändert. Damit wurde unter Kurztagbedingungen eine Reduktion um ca. 50% im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Im Zusammenhang mit dem Rosettendurchmesser wurde auch die Anzahl der Rosettenblätter bestimmt. Dabei war die Blattanzahl unter Langtagbedingungen um jeweils ca. 30% (LD 16/8 h und 12/12 h) und unter Kurztagbedingungen um ca. 10% verringert.

Weiterhin war eine Reduktion der Größe bzw. Länge auch an weiteren Organen der *dap1*-Mutanten wie der Blüte, der Wurzel, des Stängels (Daten nicht gezeigt) und den Schoten (Tab. 3.4) festgestellt. Auch die Anzahl der Samenanlagen pro Schote war reduziert. Somit konnte für die *dap1*-Mutanten eine generelle Größenreduktion festgestellt werden. Auch die Entwicklung der *dap1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp war verzögert. Das war am Zeitpunkt für das Auftreten der ersten Blütenknospe, der Blüte und die Ausbildung der ersten Schote nachweisbar. Bei einer Photoperiode von LD 16/8 h war das Auftreten der ersten Blütenknospe, die Blüte, und die Ausbildung der ersten Schote um durchschnittlich jeweils 2 Tage gegenüber dem Wildtyp verzögert. Unter Langtagbedingungen von LD 12/12 h betrug die Verzögerung durchschnittlich jeweils 14 Tage. Am drastischsten war der Effekt unter

Kurztagbedingungen von LD 8/16 h. Dabei war eine Verzögerung von durchschnittlich 74 Tage zu ermitteln. Daran wird deutlich, dass für die *dap1*-Mutanten nur der Übertritt in die generative Phase verlangsamt ist und dass für die nachfolgenden Phasen der Blüten- und Schotenbildung in etwa die gleiche Zeit wie im Wildtyp benötigt wurden.

Tab. 3.4: Auflistung der Wachstumseigenschaften des Wildtyps und der *dap1-1*-, *dap1-2*-Mutanten.

Die dargestellten Pflanzen wurden unter Langtag- (LD = 16/8 h, LD = 12/12 h) oder Kurztagbedingungen (LD = 8/16 h) bei einer PFD von 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils zwölf Messungen ($n = 12$). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

Parameter	WT			<i>dap1-1</i>			<i>dap1-2</i>		
	LD 16/8 h	LD 12/12 h	LD 8/16 h	LD 16/8 h	LD 12/12 h	LD 8/16 h	LD 16/8 h	LD 12/12 h	LD 8/16 h
Durchmesser der Blattrosette am Tag der Knospung (cm)	12,8 $\pm 1,23$	12,8 $\pm 0,78$	16,2 $\pm 2,13$	5,3 $\pm 0,44^*$	8,0 $\pm 0,55^*$	8,2 $\pm 0,46^*$	5,0 $\pm 0,88^*$	8,1 $\pm 0,82^*$	8,3 $\pm 0,51^*$
Rosettenblattanzahl zum Zeitpunkt der Knospung	15,6 $\pm 1,46$	34,2 $\pm 1,82$	52,5 $\pm 2,31$	10,6 $\pm 0,98^*$	22,5 $\pm 1,61^*$	46,7 $\pm 4,81^*$	10,7 $\pm 1,13^*$	24,4 $\pm 2,29^*$	47,9 $\pm 4,25^*$
Zeitpunkt für das Auftreten der ersten Blütenknospe (Tage)	27,0 $\pm 0,00$	51,8 $\pm 1,47$	78,9 $\pm 4,69$	29,1 $\pm 0,32^*$	66,9 $\pm 1,98^*$	154,6 $\pm 7,29^*$	29,0 $\pm 0,00^*$	65,8 $\pm 3,10^*$	152,5 $\pm 6,08^*$
Zeitpunkt der Blüte (Tage)	31,3 $\pm 0,69$	57,5 $\pm 1,55$	84,6 $\pm 4,69$	33,4 $\pm 1,42^*$	72,1 $\pm 2,40^*$	162,4 $\pm 7,73^*$	32,6 $\pm 1,25^*$	70,5 $\pm 3,85^*$	159,8 $\pm 7,35^*$
Zeitpunkt für das Auftretens der ersten Schote (Tage)	33,8 $\pm 0,88$	61,4 $\pm 1,76$	98,2 $\pm 2,99$	35,5 $\pm 1,50^*$	75,1 $\pm 2,21^*$	170,0 $\pm 11,4^*$	34,5 $\pm 1,25^*$	73,8 $\pm 4,60^*$	164,9 $\pm 6,33^*$
Schotenlänge (mm)	1,60 $\pm 0,11$	1,28 $\pm 0,09$	1,11 $\pm 0,10$	1,32 $\pm 0,08^*$	1,25 $\pm 0,08^*$	1,00 $\pm 0,09^*$	1,34 $\pm 0,09^*$	1,24 $\pm 0,09^*$	1,02 $\pm 0,08^*$
Samenanlagen je Schote	59,00 $\pm 7,32$	48,06 $\pm 4,21$	40,63 $\pm 4,45$	44,91 $\pm 6,21^*$	45,80 $\pm 4,68^*$	34,56 $\pm 5,45^*$	43,14 $\pm 6,35^*$	44,93 $\pm 4,28^*$	35,11 $\pm 5,91^*$

3.7.1 Wachstumscharakteristika der *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

Wie unter Kapitel 3.5.2 dargestellt, ist die *dap2-1*-Mutante durch einen sehr drastischen Phänotyp gekennzeichnet, der durch eine deutliche Größenreduktion und eine gelbe Blattfarbe im Vergleich zum Wildtyp charakterisiert ist. Des Weiteren sind die Keimlinge der *dap2-1*- auf Erde keimlingsletal. Deshalb wurden die Pflanzen der *dap2-1*-Mutante und des Wildtyps zur Erfassung der Wachstumseigenschaften zunächst für drei Wochen auf ½ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose angezogen und erst im Anschluss auf Erde überführt. Dies führte beim Wildtyp im Vergleich zu auf Erde gekeimten Samen zu einer deutlichen Größenreduktion. Dies ist vermutlich auf Platzmangel, vor allem im Wurzelbereich, bedingt durch die Größe der Petrischalen zurückzuführen. Die Quantifizierung der Wachstumsunterschiede wurde für die *dap2-1*-Mutante nur unter Langtagbedingungen mit einer Photoperiode von LD 16/8 h durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war der Rosettendurchmesser der *dap2-1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp bei der Anthese um ca. 60% verringert (Tab. 3.5). Die Blattanzahl dahingegen war nur um ca. 10% geringer. Des weiteren war eine deutliche Entwicklungsverzögerung für die *dap2-1*-

Tab. 3.5: Auflistung der Wachstumseigenschaften des Wildtyps und der *dap2-1*-Mutante. Die dargestellten Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h) bei einer PFD von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogen. Die Pflanzen sind zunächst für 3 Wochen auf ½ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose gewachsen und anschließend auf Erde überführt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils vierzehn Pflanzen ($n = 14$). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutante gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

Parameter	WT LD 16/8 h	<i>dap2-1</i> LD 16/8 h
Durchmesser der Blattrosette am Tag der Knospung (cm)	5,4 $\pm 0,63$	2,1 $\pm 0,23^*$
Rosettenblattanzahl zum Zeitpunkt der Knospung	9,4 $\pm 0,63$	8,6 $\pm 0,79^*$
Zeitpunkt für das Auftreten der ersten Blütenknospe (Tage)	30,0 $\pm 1,04$	33,0 $\pm 1,62^*$
Zeitpunkt der Blüte (Tage)	35,7 $\pm 1,54$	40,2 $\pm 1,88^*$
Zeitpunkt für das Auftretens der ersten Schote (Tage)	39,6 $\pm 1,28$	45,1 $\pm 2,30^*$

Mutante im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Dabei war das Auftreten der ersten Blütenknospe um 3 Tage, die Blüte um 4 Tage, und des Auftretens der ersten Schote um 5 Tage gegenüber dem Wildtyp verzögert.

3.7.3 Chlorophyllgehalt

Aufgrund des auffälligen Blattphänotyps wurden die Chlorophyllgehalte der *dap1*- und *dap2*-Mutanten bestimmt. Wie die gelbliche Blattfarbe der Mutanten schon andeutet, waren die Chlorophyll a+b-Gehalte für die Mutanten *dap1* und *dap2* gegenüber dem Wildtyp reduziert (Tab. 3.6). Dabei wurde eine Reduktion des Chlorophyllgehalts für *dap1-2* um ca. 50% und für *dap1-1* um ca. 32% ermittelt. Das Verhältnis von Chlorophyll a zu b war jedoch nicht signifikant verändert, d. h. beide Chlorophyllvarianten sind im gleichem Maße reduziert. Für die Mutante *dap2-1*, die durch eine deutlich gelbere Blattfarbe als die *dap1*-Mutanten gekennzeichnet war, wurde eine Verringerung des Chlorophyllgehalt um ca. 65% im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Weiterhin zeigte diese Mutante eine leichte aber signifikante Verschiebung im Chlorophyll a/b-Verhältnis. Da Chlorophyll b in höheren Pflanzen ausschließlich in den Lichtsammelkomplexen (LHC) vorkommt, deutet ein höheres Chlorophyll a/b-Verhältnis eine geringere Anzahl an Lichtsammelkomplexen im Verhältnis zu den Reaktionszentren an. Somit scheinen die verringerten Chlorophyllgehalte der *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten die Ursache für deren hellere Blattfarbe zu sein, was auf eine verminderte Anzahl an Photosystemen schließen lässt.

Tab. 3.6: Chlorophyllgehalt des Wildtyps und der *dap1-1*-, *dap1-2*-, *dap2-1*-Mutanten. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Pflanzen (n = 3). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

	WT	<i>dap1-1</i>	<i>dap1-2</i>	<i>dap2-1</i>
Chlorophyll a+b-Gehalt (mg Chl · g FG⁻¹)	1,64 ± 0,06	1,12 ± 0,07*	0,89 ± 0,19*	0,58 ± 0,05*
Chlorophyll a/b-Verhältnis	2,58 ± 0,03	2,48 ± 0,07	2,66 ± 0,18	2,96 ± 0,09*

3.7.4 Photosyntheseigenschaften der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

Die Wachstumsreduktion und die Auffälligkeiten im Chlorophyllgehalt der Mutanten könnten in Zusammenhang mit Veränderungen in der Leistungsfähigkeit der Photosynthese stehen. Daher sollten die Photosyntheseigenschaften der Mutanten geprüft werden. Hierfür wurden Messungen der Chlorophyll a-Fluoreszenz mittels Puls-Amplituden-Modulations (PAM)-Fluorometrie (Schreiber *et al.*, 1986) durchgeführt.

3.7.4.1 Bestimmung der Photosynthese-Parameter F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP , qN und ETR

Als Parameter für die Photosyntheseleistung der Mutanten wurde die maximale Quanteneffizienz (F_v/F_m -Verhältnis), die Quantenausbeute des Elektronentransports (Φ_{PSII}), die photochemische Fluoreszenzlöschung (qP), die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (qN) sowie die Elektronentransportrate (ETR) für das Photosystem II untersucht. Diese Messungen erfolgten mittels PAM-Fluorometrie an intakten Blättern. Dabei gibt das F_v/F_m -Verhältnis Auskunft über die maximale Effizienz der Lichtabsorption und der anschließenden Umwandlung in chemische Energie (Reduktion von Q_A) durch die Lichtsammelkomplexe und das PSII-Reaktionszentrum. Unabhängig von der jeweiligen Pflanzenspezies beträgt dieser Wert in gesunden Blättern ca. 0,8. Ein geringerer Wert für das F_v/F_m -Verhältnis deutet auf eine Schädigung am PSII, spezifischer formuliert am D1-Protein, hin. Die Quantenausbeute des Elektronentransports (Φ_{PSII} , Gentry *et al.*, 1989) gibt den Anteil des bei der vorherrschenden Lichtbedingung vom PSII absorbierten Lichts an, welches photochemisch genutzt wird. Die photochemische Fluoreszenzlöschung der Anregungsenergie (qP) spiegelt den Redoxstatus von Q_A (Plastochinon A), dem primären Elektronenakzeptor des PSII, wider. qP gibt Auskunft in welchem Umfang die Pflanzen in der Lage sind photochemische Arbeit zu leisten und steht somit im Zusammenhang mit dem linearen Elektronentransport. Die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (qN) spiegelt die thermische Dissipation von Anregungsenergie wider und schützt den Photosyntheseapparat vor überschüssiger Anregungsenergie. Dabei tragen mehrere Faktoren zur nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung bei. Eine Hauptkomponente ist die pH-abhängige Fluoreszenzlöschung (qE), welche die Energiedissipation durch den Protonengradienten an der Thylakoidmembran reflektiert. Weitere Faktoren sind die Fluoreszenzlöschung durch Photoinhibition (qI) sowie die Fluoreszenzlöschung durch Umverteilung (*state transition*;

qT). ETR ist die photosynthetische Elektronentransportrate und spiegelt die Photosynthesekapazität wider.

Die Ergebnisse der Messungen für die *dap1*- und *dap2*-Mutanten sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Dabei wiesen dunkeladaptierte Blätter der *dap1*-Mutanten unter normalen Anzuchtbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) eine Reduktion des Fv/Fm-Verhältnisses um ca. 30% auf. In dunkeladaptierten Blättern der *dap2-1*-Mutante war das Fv/Fm-Verhältnis um ca. 40% verringert. Die *dap1 dap2*-Doppelmutante wies eine Verringerung um ca. 30% auf. Diese Reduktion deutet auf eine geringere maximale Quanteneffizienz des PSII schon bei fehlender Belichtung hin. Weiterhin zeigt dies eine Schädigung des PSII bzw. aktiver Mechanismen der Fluoreszenzlöschung an. Bei lichtadaptierten Blättern (PFD \sim 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) war die Quantenausbeute des PSII-Elektronentransports (ΦPSII) für die *dap1*-Mutanten um ca. 50% und für die *dap2-1*-Mutante sowie die *dap1 dap2*-Doppelmutante um ca. 40% reduziert. Folglich können die Mutanten bei Belichtung nur einen deutlich geringeren Anteil der absorbierten Lichtenergie photochemisch nutzen. Die photochemische Fluoreszenzlöschung (qP) für *dap1-2* ist im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Bei *dap1-1* wurde nur eine leichte, jedoch nicht signifikante, Erhöhung für qP bestimmt. Die Pflanzen von *dap2-1* und der Doppelmutante *dap1-1 dap2-1* wiesen unter diesen Bedingungen eine signifikante Reduktion von qP und damit einen geringeren Reduktionszustand von Q_A auf. Das zeigt, dass ein geringerer Teil der Anregungsenergie von der *dap2-1*-Mutante und der *dap1 dap2*-Doppelmutante unter diesen Bedingungen tatsächlich für photochemische Arbeit genutzt wird. Weiterhin wurde für die *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten eine Erhöhung der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (qN) um jeweils mehr als 45% beobachtet. qN war für die *dap1 dap2*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50% erhöht. Daher scheint in allen Mutanten ein Grossteil der Anregungsenergie dissipiert zu werden. Dies spiegelt sich auch in der reduzierten Elektronentransportraten (ETR) der Mutanten wider, welche um jeweils mehr als 45% verringert waren.

Tab. 3.7: Photosynthese-Parameter des Wildtyps und der *dap1-1*-, *dap2-1*-, *dap2-1*-, *dap1-1 dap2-1*-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Pflanzen ($n = 3$), die bei einer PFD von 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ analysiert wurden. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

Parameter	WT	<i>dap1-1</i>	<i>dap1-2</i>	<i>dap2-1</i>	<i>dap1-1 dap2-1</i>
Fv/Fm	0,819 \pm 0,002	0,551 \pm 0,015*	0,578 \pm 0,036*	0,492 \pm 0,068*	0,551 \pm 0,045*
ΦPSII	0,763 \pm 0,003	0,383 \pm 0,017*	0,371 \pm 0,018*	0,429 \pm 0,007*	0,425 \pm 0,009*
qP	0,794 \pm 0,006	0,801 \pm 0,005	0,811 \pm 0,006*	0,692 \pm 0,019*	0,723 \pm 0,009*
qN	0,295 \pm 0,009	0,456 \pm 0,015*	0,433 \pm 0,029*	0,453 \pm 0,024*	0,599 \pm 0,018*
ETR	44,55 \pm 0,205	23,62 \pm 1,126*	23,46 \pm 1,121*	22,23 \pm 0,273*	24,41 \pm 0,176*

3.7.4.2 Bestimmung der Photosynthese-Parameter qP, qN und ETR bei verschiedenen Lichtintensitäten

Da die Mutanten im vorangegangenen Experiment Auffälligkeiten für die photochemische und nicht photochemische Fluoreszenzlöschung sowie die Elektronentransportrate aufwiesen (Kap. 3.7.4.1), sollten diese Parameter in einer Lichtreihe unter Verwendung unterschiedlichen Lichtintensitäten eingehender untersucht werden.

Hierbei war in Abhängigkeit zu steigenden Lichtintensität eine Zunahme der ETR für alle Pflanzen zu verzeichnen (Abb. 3.15). Dabei war auffällig, dass schon bei Lichtintensitäten ($\text{PFD} < 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), welche unterhalb der PFD der Anzuchtbedingung lagen, eine drastische Reduktion im ETR der *dap1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erkennbar war. Diese Differenz wurde mit zunehmender Lichtintensität umso deutlicher. Auch die *dap2-1*-Mutante sowie die *dap1 dap2*-Doppelmutante zeigten über die gesamte Lichtreihe eine deutliche Reduktion der ETR in gleicher Weise. Daraus kann eine spezifisch verringerte PSII-Aktivität und eine Limitierung des linearen Elektronentransport für alle Mutanten abgeleitet werden.

Mit steigender Lichtintensität war für qP eine generelle Abnahme zu verzeichnen, welches den zunehmenden Reduktionsstatus von Q_A widerspiegelt. Hierbei lag qP für die *dap1*-Mutanten bei Lichtintensitäten bis $750 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ über dem des Wildtyps. Im weiteren Verlauf war jedoch ein Angleichen an die Werte des Wildtyps zu verzeichnen, so dass bei hohen Lichtintensitäten über $750 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nur noch geringe Unterschiede für qP ermittelt wurden. Daher scheint vor allem bei niedrigen und moderaten Lichtintensitäten in den *dap1*-Mutanten eine höhere photochemische Fluoreszenzlöschung ausgeprägt zu sein, welches einen geringeren Reduktionsstatus von Q_A andeutet. Auffällig bei diesem Experiment war, dass dabei auch die *dap1-1*-Mutante bei Lichtintensitäten von 100 bis $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ein signifikant höheres qP als der Wildtyp aufwies (vgl. Kap. 3.7.4.1). Für qP wurden bei der *dap2-1*-Mutante sowie der *dap1 dap2*-Doppelmutante Unterschiede zu dem qP der *dap1*-Mutanten bei steigenden Lichtintensitäten ermittelt. Im Vergleich zum Wildtyp existierte bei der *dap2-1*-Mutante sowie der *dap1 dap2*-Doppelmutante bis zu einer Lichtintensität von $320 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ein annähernd gleiches qP . Bei höheren Lichtintensitäten kam es zu einer zunehmenden Verminderung von qP im Vergleich zum Wildtyp. Diese Unterschiede waren ab Lichtintensitäten über $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ deutlich ausgeprägt. Das spiegelt eine stärkere Reduktion von Q_A für die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante bei höheren Lichtintensitäten wider.

Über die gesamte Lichtreihe waren die Mutanten von *dap1*, *dap2* sowie die Doppelmutante *dap1 dap2* im Vergleich zum Wildtyp durch eine signifikant erhöhte qN gekennzeichnet. Das weist darauf hin, dass in den Mutanten verstärkt Anregungsenergie dissipiert wird.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass die *dap1*-Mutanten neben dem erhöhten qN auch über ein erhöhtes qP bei fast allen Lichtintensitäten verfügen. Die *dap1*-Mutanten zeichneten sich also durch eine erhöhte Dissipation von Anregungsenergie (qN) aus. Des Weiteren lässt das erhöhte qP ($1 - qP = Q_{A\text{red}}$), auf einen geringeren Reduktionsstatus von Q_A schließen. Dies deutet auf eine Störung direkt in Verbindung mit dem PSII und nicht in den nachfolgenden Komponenten der Elektronentransportkette hin. Die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante waren durch ein erhöhtes qN gekennzeichnet. Auch für diese Mutanten liegt somit eine erhöhte Dissipation der Anregungsenergie vor. Das qP für die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante war vor allem bei höheren Lichtintensitäten deutlich erniedrigt. Eine Limitation des Elektronentransports vom PSII durch einen erhöhten Reduktionszustand von Q_A scheint damit für diese Mutanten nur bei höheren Lichtintensitäten gegeben zu sein.

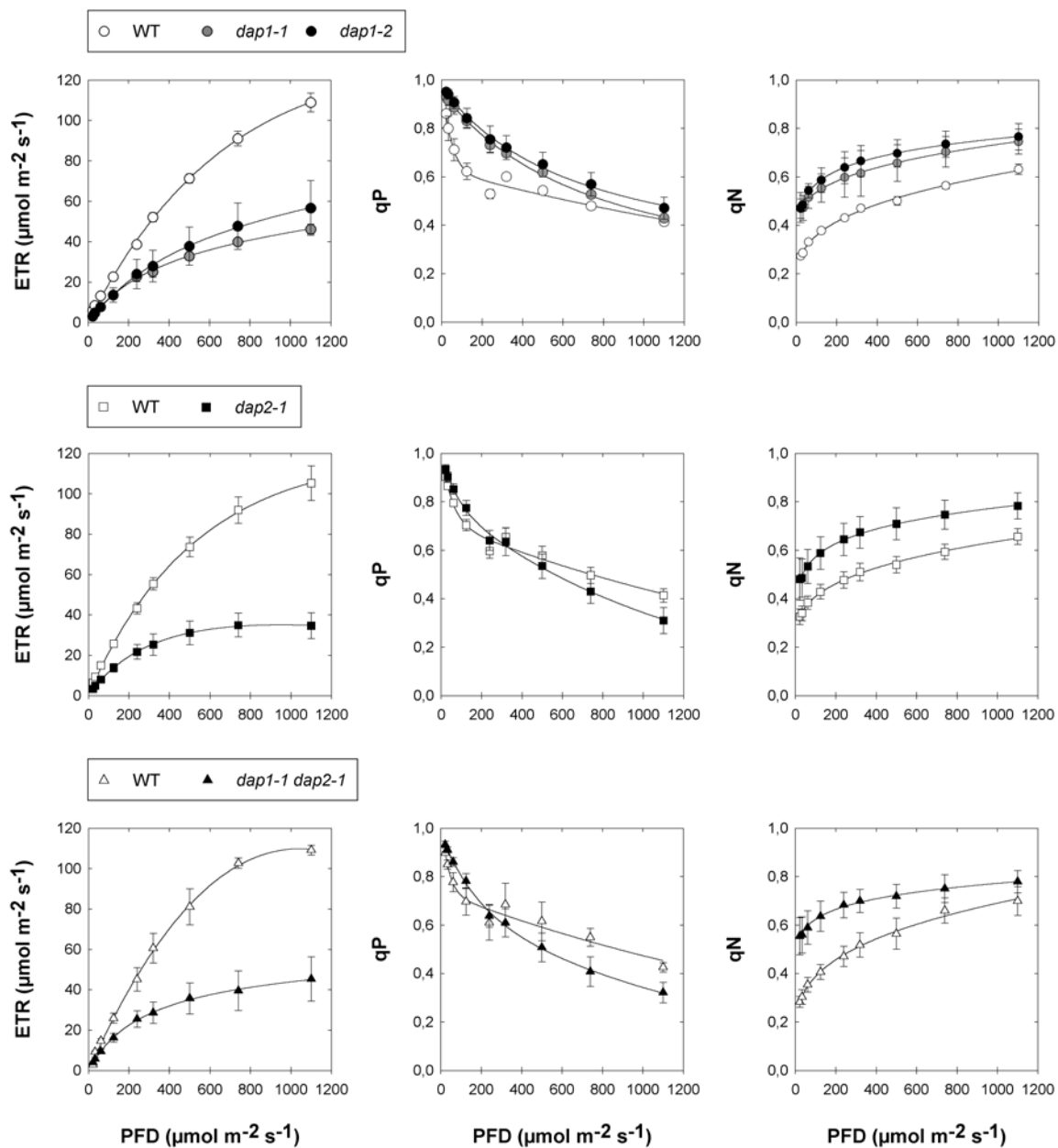


Abb. 3.15: Bestimmung des photosynthetischen Elektronentransports (ETR) sowie der photochemischen und nicht photochemischen Fluoreszenzlöschung (qP , qN) für den Wildtyp und die Mutanten *dap1-1*, *dap1-2*, *dap2-1*, *dap1-1 dap2-1*.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von mindestens drei Pflanzen ($n \geq 3$), bei Raumtemperatur ($22 - 25^\circ\text{C}$) und steigenden Lichtintensitäten (PFD = $25 - 1100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Die Regressionskurven wurden mit dem Programm SIGMA Plot erstellt.

Die ETR war in allen Mutanten drastisch verringert, was eine reduzierte photosynthetische Leistungsfähigkeit zeigt. Dies ist vor allem durch die stark erhöhte Dissipation von Anregungsenergie (q_N) der Mutanten zurückzuführen. Die gewonnenen Ergebnisse decken sich mit den im vorangegangenen Kapitel beobachteten geringen Werten für Φ_{PSII} und für das F_v/F_m -Verhältnis (vgl. Kap. 3.7.4.1), welche Aufschluss über die Intaktheit und die photochemische Effizienz des PSII geben. Die Verminderung dieser Werte spricht für eine Schädigung des PSII, welche die Effizienz des Elektronentransports limitierte. Weiterführend zeigen die Ergebnisse der PAM-Fluorometrie, dass die *dap1 dap2*-Doppelmutante neben dem schon beschriebenen Wachstumsphänotyp (Kap. 3.5.3) auch in den Fluoreszenz-Parametern eher der *dap2*- Mutante als den Mutanten von *dap1* ähnelt. Das wird vor allem anhand des Verlaufs von q_P deutlich.

3.7.4.3 Bestimmung einer Chlorophyllfluoreszenz-Induktionskurve

Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzlöschung der *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten zu erhalten, wurden kinetische Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Für diese Messungen wurden dunkeladaptierte Blättern verwendet. Dabei wurde zunächst durch Einschalten des Messlichts die Grundfluoreszenz (F_0) bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp wurde für die *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten eine erhöhte F_0 ermittelt (Abb. 3.16). Da F_0 die Fluoreszenzausbeute bei maximal oxidiertem Q_A widerspiegelt, kann für diese Mutanten ein erhöhter Reduktionszustand von Q_A angenommen im Dunklen werden. Durch Einschalten des aktinischen Lichts und simultaner Applikation eines gesättigten Lichtpulses wurde im Anschluss die Maximalfluoreszenz (F_m) gemessen. Dabei zeigte sich, dass das F_m der *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten gegenüber dem des Wildtyps deutlich erniedrigt war. Da F_m erniedrigt und F_0 erhöht waren, ist die variable Fluoreszenzausbeute (F_v), welche die Differenz aus beiden Faktoren darstellt, dementsprechend verringert. Die Reduktion von F_v spiegelt ein reduziertes Vermögen des PSII zur Reduktion von Q_A , also zur Durchführung primärer Photochemie wider. Weiterhin wird daraus der rechnerische Zusammenhang mit dem auffällig reduzierten F_v/F_m -Verhältnis (Kap. 3.7.4.1) ersichtlich. Im Anschluss war eine Abnahme von F_t , der transienten Fluoreszenzausbeute, zu verzeichnen (Kautsky-Effekt). Durch die Applikation gesättigter Lichtpulse wurde F_m' , die maximale Fluoreszenzausbeute, lichtadaptierter Blätter ermittelt.

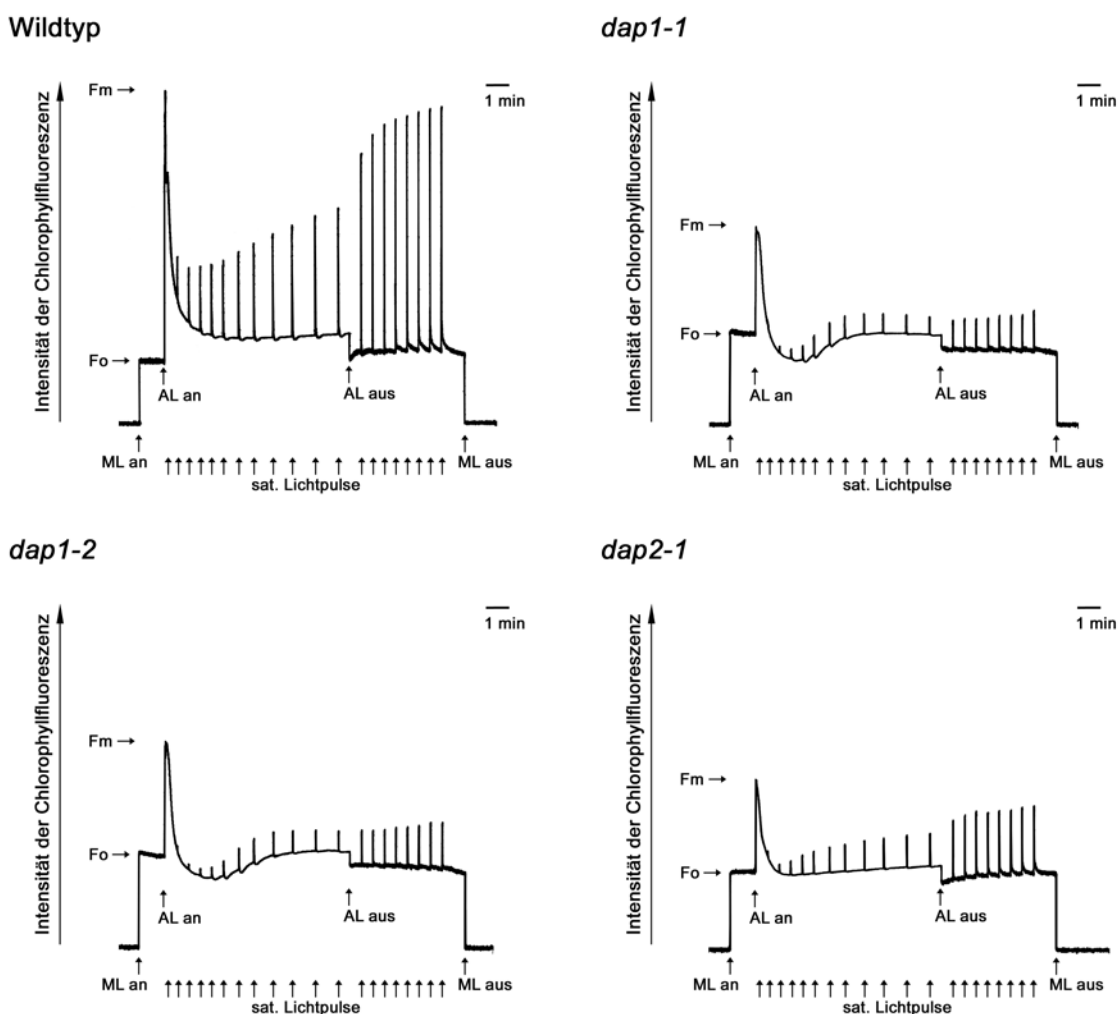


Abb. 3.16: Chlorophyllfluoreszenz-Induktion für den Wildtyp und die Mutanten *dap1-1*, *dap1-2* und *dap2-1*.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen. Dargestellt sind repräsentative Kurven der Chlorophyllfluoreszenz von jeweils einer Pflanze. F_0 , minimale Fluoreszenzausbeute; F_m , maximale Fluoreszenzausbeute; ML, Messlicht (PFD < $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); AL, aktinisches Licht (PFD = $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); saturierende Lichtpulse (PFD > $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Die *dap1*-Mutanten zeigten dabei einen sehr ungewöhnlichen Fluoreszenzverlauf. Dabei war ein lichtinduzierter Abfall der Chlorophyllfluoreszenz unter F_0 zu verzeichnen, welcher daraufhin wieder sigmoid anstieg. Das lässt vermuten, dass im belichteten Zustand, wenigstens über wenige Minuten, schnelle Mechanismen der Fluoreszenzlöschung aktiviert werden, welche die Fluoreszenz kurzzeitig drastisch verringern, aber im weiteren Verlauf nicht mehr effektiv sind. Dabei könnte es sich um qE, die pH-abhängige Komponente der

nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung, handeln. Des Weiteren war auch F_m' im Verhältnis zu F_m gegenüber deutlich verringert, was sich in der geringeren Quanteneffizienz des PSII Elektronentransports (Φ_{PSII}) widerspiegelt (vgl. Kap. 3.4.7.1). In der anschließenden Dunkelphase war nur eine geringe Erholung (*dark relaxation*) von F_m zu erkennen. Dabei fehlten die Komponenten der schnellen (qE) und mittleren Erholungskinetik (qT) von qN komplett. Nur die langsame Komponente der Erholungskinetik (*dark relaxation kinetic*), qI , war schwach ausgeprägt. Der gesamte Kinetikverlauf der *dap1*-Mutanten zeigte eine massive Störung der Mechanismen der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung an. Die *dap2-1*-Mutante zeigte, aufgrund des geringeren F_m , einen etwas früheren Übergang in den *steady state* als der Wildtyp. Im *steady state* war für die *dap2*-Mutante ein relativ normaler kinetischen Verlauf der Fluoreszenz zu ermitteln. Dabei war das F_m' gegenüber dem Wildtyp jedoch deutlich verringert. Das erklärt, weshalb auch im belichteten Zustand die Quantenausbeute für den Elektronentransport des PSII (Φ_{PSII}) geringer war (vgl. Kap. 3.4.7.1). Nach Abschalten des aktinischen Lichts waren alle drei Komponenten der Erholungskinetik von qN ausgeprägt. Dabei waren qE , qT und qI im Vergleich zum Wildtyp aber deutlich schwächer. Zusammenfassend wurde für die *dap2-1*-Mutante über die gesamten Kinetik ein reduzierter aber relativ normaler Fluoreszenzverlauf ermittelt.

3.7.5 Wasserstoffperoxid-Färbung der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten

Da bei den *dap1*-Mutanten massive Störungen der Photosynthese festgestellt wurden, sollte überprüft werden, ob die Mutanten durch ein höheres Maß an photooxidativem Stress gekennzeichnet sind. Daher wurde das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid mittels der Färbung von 3,3-Diaminobenzidin (DAB) untersucht. DAB polymerisiert spontan und lokal bei Kontakt mit Wasserstoffperoxid und Anwesenheit einer Peroxidase. Das polymerisierte DAB ist dabei durch eine bräunliche Färbung gekennzeichnet.

Unter den Kontrollbedingungen zeigten sich keine Unterschiede in den Färbungen des Wildtyps und der *dap1*-Mutanten (Abb. 3.17A, B, C). Weiterhin wurde das Verhalten der Pflanzen unter Lichtstress bei zweistündiger Belichtung mit Starklicht ($PFD \sim 900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) untersucht (Abb. 3.17D, E, F). Dabei zeigte sich eine stärkere DAB-Färbung infolge des ausgeübten photooxidativen Stress. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten beobachtet. Als Kontrolle für photooxidativen Stress wurde für zwei Stunden das Herbizid DCMU appliziert, welches den Elektronentransport vom PSII zu

Plastochinon inhibiert (Abb. 3.17G, H, I). Auch dabei war eine verstärkte DAB-Färbung zu verzeichnen, welche für den Wildtyp und die Mutanten aber vergleichbar war. Diese Untersuchungen zeigen, dass, falls es in den *dap1*-Mutanten unter Normal- oder Starklichtbedingungen zu einer vermehrten Bildung von Wasserstoffperoxid infolge von photooxidativen Stress kommt, diese kompensiert werden kann.

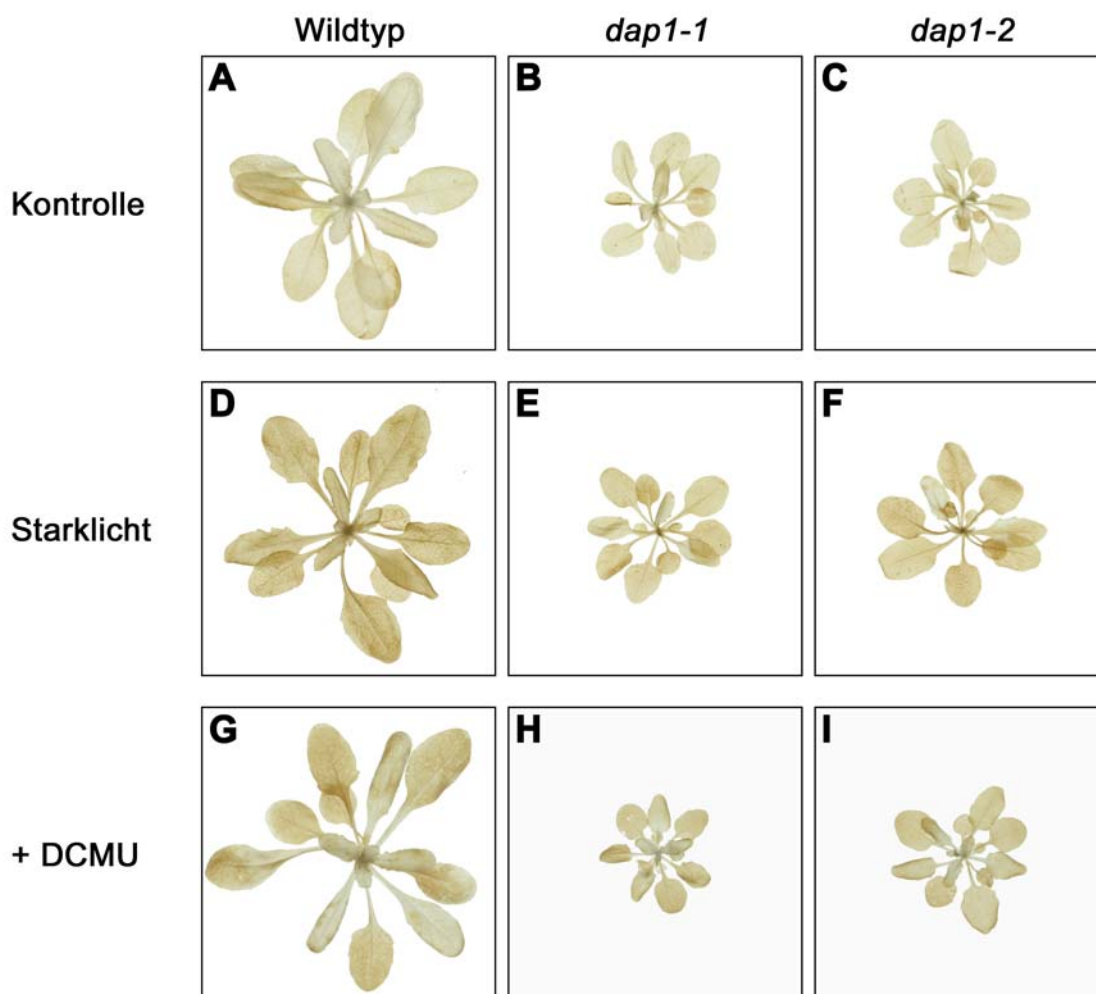


Abb. 3.17: Nachweis von Wasserstoffperoxid mittels DAB-Färbung.

Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels DAB (bräunliche Färbung) des Wildtyps und der Mutanten *dap1-1* und *dap1-2*. Dargestellt sind repräsentative Pflanzen unter Kontrollbedingungen (PFD $\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), nach zweistündiger Applikation von Starklicht (PFD $\sim 900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und nach zweistündiger Inkubation mit $200 \mu\text{M}$ DCMU (PFD $\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

3.7.6 Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

Um die Auswirkungen des verminderten Elektronentransports auf die Synthese von Photoassimilaten zu untersuchen, wurden die Gehalte an Stärke, Saccharose, Glukose und Fruktose für die *dap1*- und *dap2-1*-Mutanten im tageszeitlichen Verlauf analysiert.

3.7.6.1 Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten

Die Gehalte an Stärke der *dap1-1*- und *dap1-2*-Mutanten waren nur vor Beginn der Lichtperiode mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3.18A). Bei Belichtung wurde für diese Mutanten aber deutlich verminderte Stärkegehalte ermittelt. Dabei war eine Zunahme der Differenz für den Stärkegehalt zwischen den *dap1*-Mutanten und dem Wildtyp mit fortschreitender Dauer der Lichtperiode zu beobachten. Am Ende der Lichtperiode hatten die *dap1*-Mutanten nur ca. 60% des Stärkegehalts des Wildtyps. Auch vier Stunden nach Ende der Photoperiode waren noch deutliche Unterschiede messbar. Für die Saccharosegehalte waren keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *dap1*-Mutanten auszumachen (Abb. 3.18B). Dahingegen waren die Glukosegehalte der Mutanten über den gesamten Tagesverlauf um ca. 30% verringert (Abb. 3.18C). Für den Gehalt an Fruktose wurden zum Ende der Lichtperiode und in den ersten vier Stunden der Dunkelperiode eine Verringerung für die *dap1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp ermittelt (Abb. 3.18D). Daher wäre es denkbar, dass die *dap1*-Mutanten den Saccharosegehalt zu Lasten der Glukose- und Fruktosekonzentration aufrecht erhalten können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die reduzierte photosynthetische Leistungsfähigkeit der *dap1*-Mutanten zu einem verminderten Gehalt an Photoassimilaten, im besonderen Stärke, führt. Dies könnte eine Erklärung für die Wachstumsreduktion und die verzögerte Anthese der *dap1*-Mutanten sein.

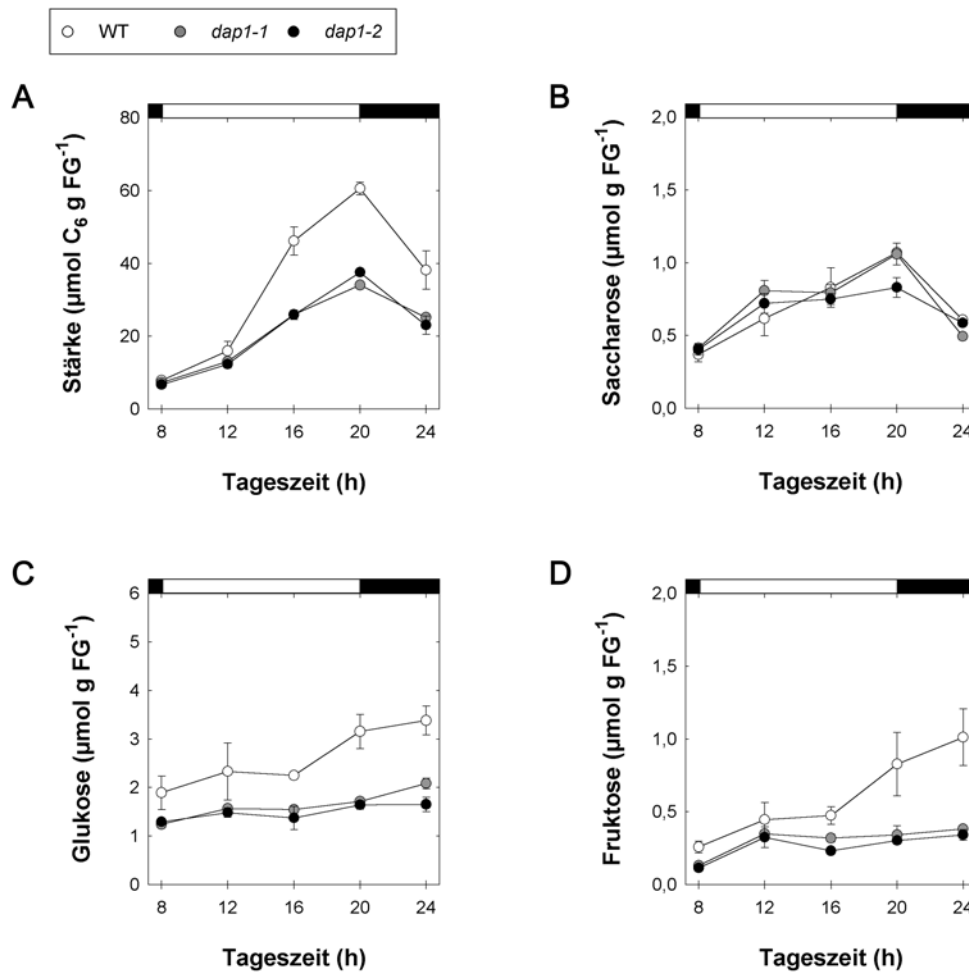


Abb. 3.18: Stärke-, Saccharose-, Glukose- und Fruktosegehalte des Wildtyps und der Mutanten *dap1-1* und *dap1-2*.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Blattgehalte an Stärke, Saccharose, Glukose und Fruktose mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Pflanzen ($n = 3$) im tageszeitlichen Verlauf (LD = 12/12 h). Die verwendeten Pflanzen wurden dabei auf Erde angezogen.

3.7.6.2 Gehalte an Stärke und löslichen Zuckern der *dap2* T-DNA Insertionsmutante

Da die *dap2-1*-Mutanten nicht auf Erde angezogen werden können, wurden die Pflanzen zunächst für vier Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose angezogen. Für photoautotrophes Wachstum wurden die Pflanzen im Anschluss für zwei Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ohne Saccharose kultiviert. Mit den Wildtyppflanzen wurde analog verfahren, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Da die *dap2-1*-Mutanten weiterhin durch eine sehr geringe Blattmasse gekennzeichnet sind, wurden jeweils ca. drei Pflanzen benötigt, um eine dem Wildtyp entsprechende Probemenge zu erhalten. Obwohl die *dap2*-Mutante eine starke

Verringerung der photosynthetischen Leistungsfähigkeit zeigt, wurden im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede für den Stärke-, Saccharose-, Glukose- oder Fruktosegehalt nachgewiesen (Abb. 3.19A, B, C, D). Dies könnte vielleicht auf die artifiziiellen, aber notwendigen Anzuchtbedingungen zurückzuführen sein.

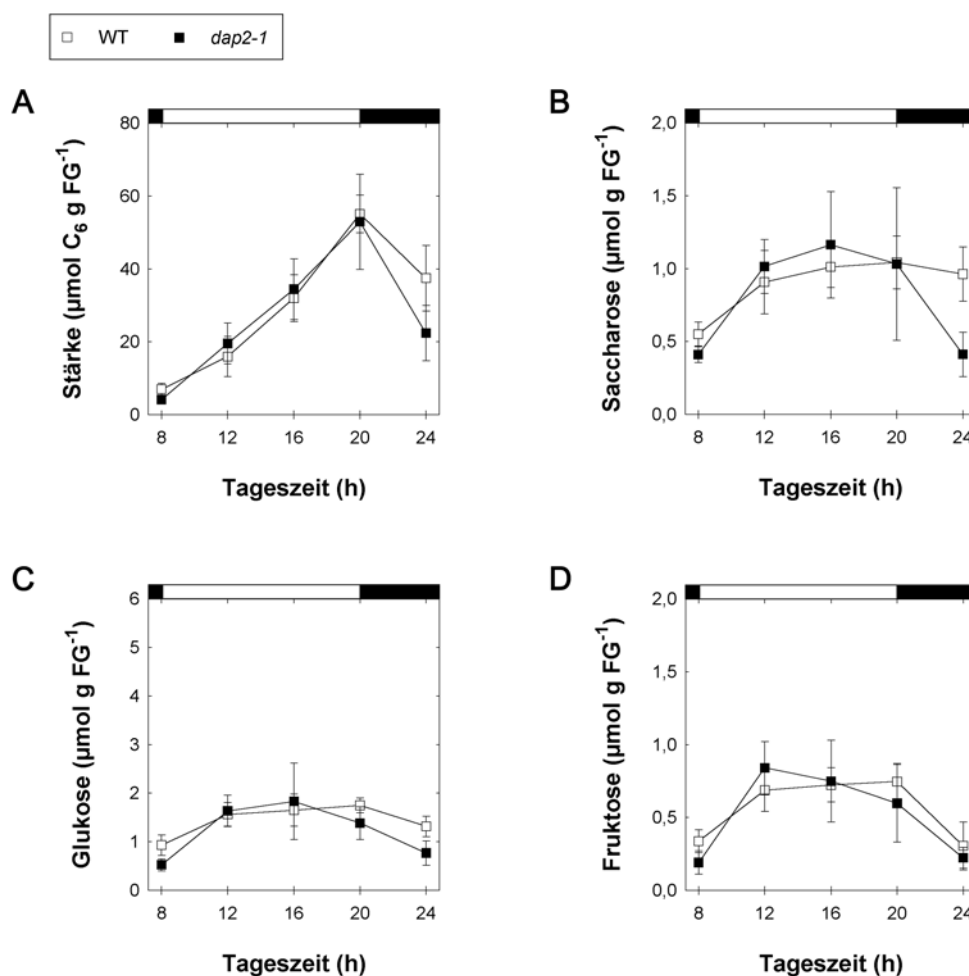


Abb. 3.19: Stärke-, Saccharose-, Glukose- und Fruktosegehalte des Wildtyps und der Mutante *dap2-1*.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Blattgehalte an Stärke, Saccharose, Glukose und Fruktose mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Proben ($n = 3$) im tageszeitlichen Verlauf (LD = 12/12 h). Dabei wurden die Pflanzen zunächst vier Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose und anschließend für zwei Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ohne Saccharose kultiviert.

3.8 Elektronenmikroskopische Analyse der Chloroplastenmorphologie der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

Um Aufschluss über einen Einfluss der *dap1*- und *dap2-1*-Mutationen auf die Morphologie und Ultrastruktur der Chloroplasten zu erhalten, wurden Ultradünnschnitte von den Blättern dieser Mutanten mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert.

3.8.1 Chloroplastenmorphologie der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten

Die Chloroplasten der *dap1-1*-Mutante glichen in der Größe und Form den Chloroplasten des Wildtyps (Abb. 3.20A). Auch die Akkumulation von transitorischer Stärke war nicht beeinflusst. Es war aber eine deutliche Veränderung in der Anordnung und Verteilung der Thylakoide in der Mutante zu beobachten. Die *dap1-1*-Mutante wies eine erhöhte Stapelung der Granathylakoide (engl. *grana stacking*) auf. Dies wurde anhand der Fläche der Granastapel deutlich erkennbar (Abb. 3.20B). Dabei hatten der überwiegende Anteil der Granathylakoide des Wildtyps eine Fläche von 0,005 - 0,060 μm^2 . Die durchschnittliche Fläche der Granathylakoide der *dap1-1*-Mutante war vergrößert. Bei dieser Mutante wurden für die Granathylakoide Flächen im Bereich von 0,005 - 0,150 μm^2 nachgewiesen. Des Weiteren war die Anzahl an Granastapel pro Chloroplast bei der Mutante verringert (Daten nicht gezeigt). Die Differenz aus der relativen Anzahl der Granastapel pro Granafläche von Wildtyp und *dap1-1*-Mutante zeigt, dass der Wildtyp gegenüber der Mutante vor allem durch einen höheren Anteil kleiner Granastapel mit Flächen von 0,005 - 0,035 μm^2 gekennzeichnet ist. Dahingegen weist die *dap1-1*-Mutante einen höheren Anteil an Granastapeln mit größeren Flächen im Bereich von 0,040 - 0,150 μm^2 auf.

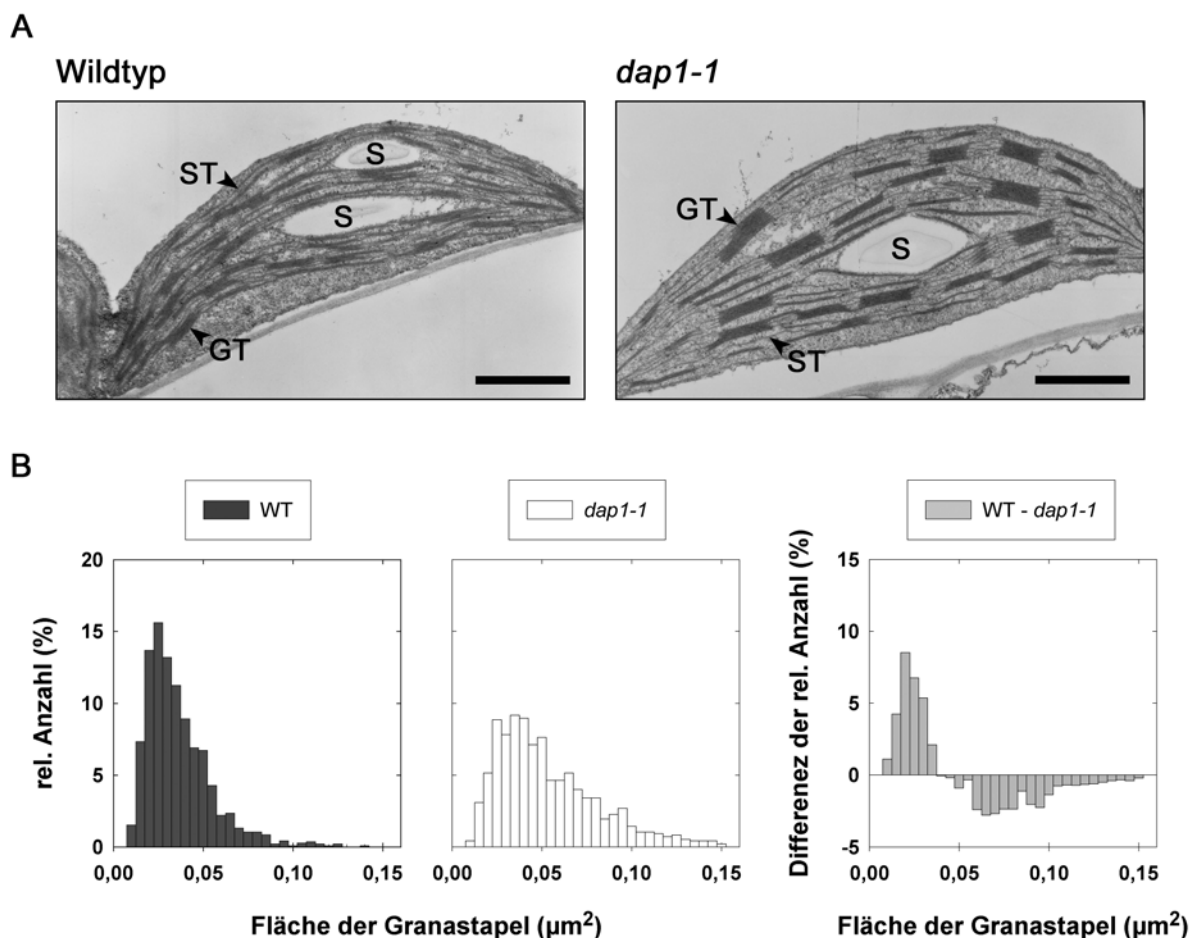


Abb. 3.20: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Chloroplasten des Wildtyps und der *dap1-1*-Mutante.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Mesophyllchloroplasten

(A) des Wildtyps und der *dap1-1*-Mutante.

Stärkekorner (S) Stromathylakoide (ST), Granathylakoide (GT), Balken = 0,6 μm .

(B) Statistische Verteilung der Fläche der Granastapel vom Wildtyp und der *dap1-1*-Mutante.

3.8.2 Chloroplastenmorphologie der *dap2* T-DNA Insertionsmutante

Für die Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante wurde eine Vielzahl von Erscheinungsformen beobachtet (Abb. 3.21). Der überwiegende Teil der Chloroplasten der Mutante (Abb. 3.21B, C) war in Form und Größe mit denen des Wildtyp vergleichbar. Dennoch waren für eine gewisse Anzahl von Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante keine Stärkekorner nachweisbar (Abb. 3.21C). Des Weiteren waren aber auch einige Chloroplasten mit augenscheinlichen Auffälligkeiten zu erkennen (Abb. 3.21D, E). Dabei waren unterschiedliche Morphologien erkennbar, die vor allem Defekte in der Anordnung der Thylakoide zeigten. In einem Teil der

Chloroplasten waren so gut wie keine Granathylakoide, aber eine große Anzahl an globulären Körperchen, vermutlich Plastoglobuli, zu verzeichnen (Abb. 3.21D). Weiterhin waren aber auch Chloroplasten auffällig, welche zum überwiegenden Teil durch rudimentäre Stromathylakoide und extrem stark gestapelte Granathylakoide gekennzeichnet waren (Abb. 3.12E). Da der überwiegende Teil der Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante eine normale Erscheinung hatte, wird davon ausgegangen, dass für diese Mutante keine ultrastrukturelle Veränderung der Chloroplasten vorliegt.

Wildtyp



dap2-1

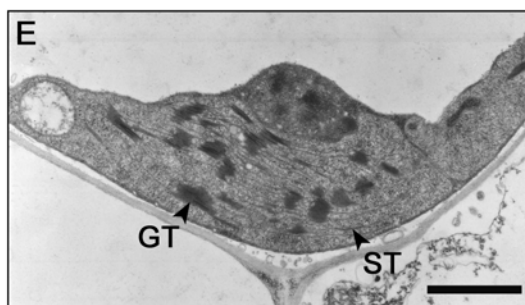
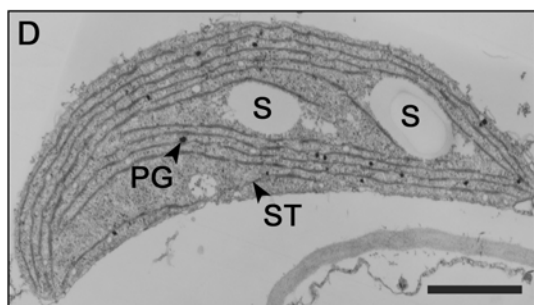
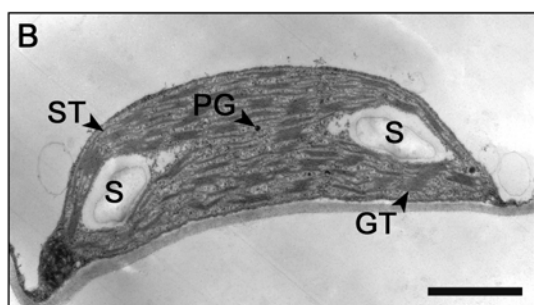


Abb. 3.21: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Chloroplasten des Wildtyps und der *dap2-1*-Mutante.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Mesophyllchloroplasten

(A) des Wildtyps und (B - E) eine Anzahl von Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante.

Stärkekorner (S) Stromathylakoide (ST), Granathylakoide (GT), Peroxisome (P), Plastoglobuli (PG), Balken = 0,6 μm .

3.9 Generierung einer *Synechocystis* Insertionsmutante

Um die Auswirkungen eines *kock-out* von homologen *DAP*-Gene für weitere phototrophe Organismen zu untersuchen, wurde versucht, eine Insertionsmutante vom Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu erzeugen. Anhand des Phänotyps sollten Rückschlüsse auf die Funktion des entsprechenden Proteins erarbeitet werden. Für die Wahl von *Synechocystis* sprachen die Möglichkeit zur gentechnischen Manipulation und das komplett sequenzierte Genom (Kaneko *et al.*, 1996). Es war möglich, ein homologes *DAP*-Protein von *Synechocystis* in der Datenbank CyanoBase (Nakamura *et al.*, 1998; 1999; 2000) zu identifizieren (Kap. 3.1). *Synechocystis* verfügt über nur ein homologes *DAP*-Protein, welches im Leserahmen *sll0615* kodiert ist. Dies Protein ist 206 Aminosäurereste lang und verfügt über eine Aminosäureidentität von ca. 40% zu den *AtDAP*-Proteinen (vgl. Tab. 3.1). Weiterhin werden für dieses Protein, in Übereinstimmung mit den *DAP*-Proteinen von *A. thaliana*, sechs α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt.

Die Erzeugung der entsprechenden Insertionsmutante erfolgte über homologe Rekombination. Dazu wurde der entsprechende Leserahmen mittels PCR amplifiziert und über eine im Leserahmen vorhandene Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease eine Kanamycin-Resistenzgenkassette eingefügt. Das so erhaltene Konstrukt trägt eine Insertion im Leserahmen *sll0615*, welche die vollständige Transkription des Genes verhindert und eine Selektion mit dem Antibiotikum Kanamycin ermöglicht. Dieses Konstrukt wurde nach *Synechocystis* transformiert und die resultierenden Transformanten durch Zugabe von Kanamycin selektiert. Da *Synechocystis* über ein *multicopy genome* verfügt (Kaneko *et al.*, 1996), wurden die erhaltenen Transformanten anschließend in Hinblick auf die Vollständigkeit der Segregation mittels PCR überprüft (Abb. 3.22). Für alle Transformanten war neben der vergrößerten Bande für das Insertionsfragment auch die Bande für das

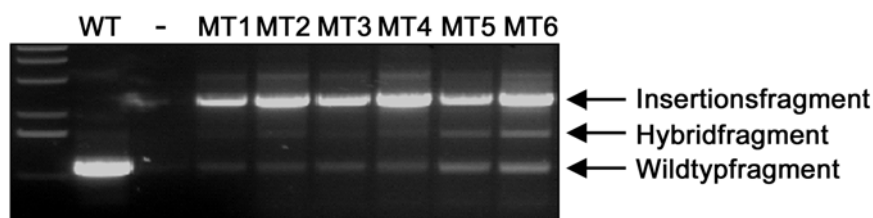


Abb. 3.22: Segregationsanalyse der Insertionsmutanten von *Synechocystis*. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR-Fragmente des mutierten Leserahmens *sll0615* für den Wildtypstamm (WT) und separate Transformanten (MT).

Wildtypfragment vorhanden. Weiterhin trat durch den Zusammenschluss von jeweils einem DNA-Strang des Wildtypfragments und des Insertionsfragments eine Hybridbande auf. Es konnte keine komplett segregierte Insertionsmutante, welche nur noch das mutierte Allel und kein Wildtyp-Allel mehr trägt, ermittelt werden. Auch eine längerfristige Kultivierung unter erhöhten Konzentrationen des Antibiotikums und die mehrfache Vereinzelung der Kulturen führte nicht zur Identifizierung von komplett segregierten Mutanten. Des Weiteren zeigten die nicht segregierten Transformanten keine augenscheinlichen phänotypischen Auffälligkeiten. Das Fehlen von komplett segregierten Mutanten legt nahe, dass es sich bei dem mutierten Leserahmen um ein essentielles Gen für *Synechocystis* handelt.

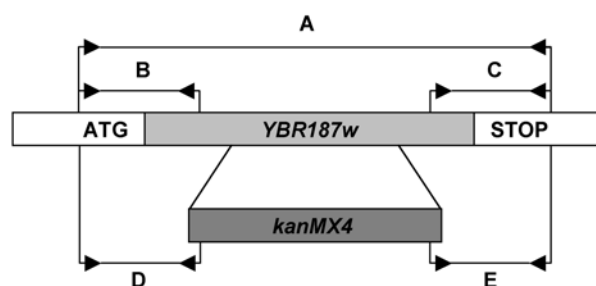
3.10 Analyse von *Saccharomyces cerevisiae* Deletionsmutanten

Auch für einen heterotrophen Organismus sollte ermittelt werden, welche phänotypischen Auswirkungen ein *knock-out* der *DAP*-Genen hat. Aufgrund der komplett bekannten Genomsequenz (Goffeau *et al.*, 1996) und der einfachen Verfügbarkeit von Deletionsmutanten (EUROSCARF; Winzeler *et al.*, 1999) wurde hierfür *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Auch für *S. cerevisiae* wurde nur ein homologes DAP-Protein identifiziert (Kap. 3.1), welches im Leserahmen *YBR187w* kodiert ist. Dabei zeigt *YBR187w* eine geringfügig höhere Aminosäureidentität zu AtDAP3, AtDAP4 und AtDAP5 (jeweils 37%) als zu AtDAP1 (29%) und AtDAP2 (30%). Auch für dieses Protein werden sechs α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt. Weiterhin verfügt *YBR187w* über eine N-terminale Verlängerung, für die eine Funktion als Signalpeptid des sekretorischen Wegs vorhergesagt wird. Die Lokalisation des entsprechenden Proteins konnte in einer genomweiten GFP-Studie durch Huh *et al.* (2003) ermittelt werden. Das GFP-Fusionsprotein wurde dabei innerhalb der Vakuole von *S. cerevisiae* lokalisiert. Da, bedingt durch den methodischen Ansatz, nur ein relativ kurzes Fragment des Proteins mit GFP fusioniert war, wäre durch das Fehlen einiger Membranspannen, aber auch eine Lokalisation in der Tonoplastenmembran oder eine Misslokalisierung denkbar.

Durch *functional genome profiling* wurde für eine *knock-out*-Mutante des Gens *YBR187w* ein reduziertes Wachstum auf nichtfermentativen Kohlenstoffquellen zwar nachgewiesen, aber nicht im Detail analysiert (Giaever *et al.*, 2002; Steinmetz *et al.*, 2002). Aktuelle Untersuchungen postulieren für dieses Protein eine nicht eingehender charakterisierte Beteiligung in der Ribosomenbiogenese von *S. cerevisiae* (Barbara *et al.*, 2007).

Zur Analyse von *knock-out*-Mutanten für dieses Gen wurden zwei Deletionsmutanten in verschiedenen Genotypen von *S. cerevisiae* vom EUROSCARF-Projekt (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis; Winzeler *et al.*, 1999) bezogen. In beiden Mutantenstämmen sollte ein Teil des ursprünglichen Leserahmens über homologe Rekombination deletiert und an dessen Stelle eine Resistenzkassette vorhanden sein (Abb. 3.23A). Eine solche Mutation verhindert die vollständige Transkription des Gens und somit die Synthese eines funktionellen Proteins. Die Verifizierung der Mutanten wurde mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Primerkombinationen, die das Vorhandensein der Insertion nachweisen, durchgeführt (Abb. 3.23B). Dabei wurde durch Verwendung der Primerkombination A, die den kompletten Leserahmen amplifiziert, für beide Mutantenstämmen eine Vergrößerung der erhaltenen Fragmentbanden im Vergleich zu den

A



B

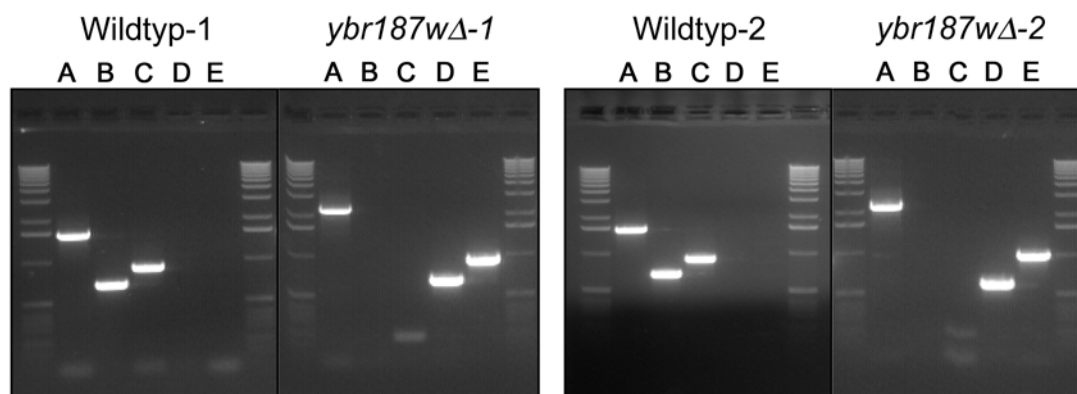


Abb. 3.23: Analyse der Deletionsmutanten von *S. cerevisiae*.

(A) Schematische Darstellung der Deletion des Gens *YBR187w* sowie die Positionen der zur Verifizierung der Deletion verwendeten Primerkombinationen A, B; C, D und E.

(B) Nachweis der Deletion im Gen *YBR187w* unter Verwendung der Primerkombinationen A, B, C, D, E in zwei unabhängigen Deletionsmutanten. Dargestellt ist die Auftrennung der erhaltenen PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Wildtypstämmen erkennbar. Bei Verwendung der Primerkombinationen B und C, welche für das Wildtypgen spezifisch sind, traten nur für die Wildtypstämme Fragmentbanden auf. Dahingegen wurden unter Verwendung der Primerkombinationen D und E, welche für das mutierte Gen spezifisch sind, nur Fragmentbanden für die Mutantenstämmen nachgewiesen. Dadurch wurde für beide Deletionstämme (*ybr187wΔ-1*, *ybr187wΔ-2*) das Vorhandensein der Mutationen bestätigt.

Um die von Giaever *et al.* (2002) und Steinmetz *et al.* (2002) ermittelten Wachstumseigenschaften zu verifizieren, wurde das Wachstumsverhalten der Mutantenstämmen mittels Tropftest in einer seriellen Verdünnungsreihe auf YP-Medium unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen analysiert. Für das Wachstum auf den fermentativen Zuckern Glukose und Galaktose zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Mutantenstämmen (Abb. 3.24A). Im Gegensatz zu den fermentativen Zuckern wurde jedoch ein reduziertes Wachstum der Mutantenstämmen auf den nichtfermentativen Kohlenstoffquellen Ethanol, Glycerol, Ölsäure, Acetat und Laktat beobachtet (Abb. 3.24B). Dabei könnte es sich sowohl um ein verlangsamtes Wachstum beim Vollzug des *diauxic shift* als auch um eine generelle Verlangsamung der Wachstumsrate für die Mutantenstämmen auf den genannten Kohlenstoffquellen handeln. Es war zu beobachten, dass der Wildtypstamm-2 und die Mutante dieses Genotyps (*ybr187wΔ-2*) etwas besser wuchsen als der Wildtypstamm-1 und dessen entsprechende Mutante (*ybr187wΔ-1*). Diese Unterschiede beruhen aber vermutlich auf dem entsprechenden Genotyp der Hefestämme. Im Gegensatz zu den zuvor genannten nichtfermentativen Kohlenstoffquellen waren auf der nichtfermentativen Kohlenstoffquelle Pyruvat keine Wachstumsunterschiede zwischen den Mutanten- und den Wildtypstämmen zu ermitteln. Diese physiologische Komplementation deutet einen Einfluss von Pyruvat auf das Wachstumsvermögen der Mutanten an. Da allerdings Laktat und Pyruvat strukturell sehr ähnlich sind und auch in ähnlicher Weise katabolisiert werden, ist die Ursache für die Wachstumsunterschiede auf diesen beiden nichtfermentativen Kohlenstoffquellen noch nicht eindeutig erklärbar.

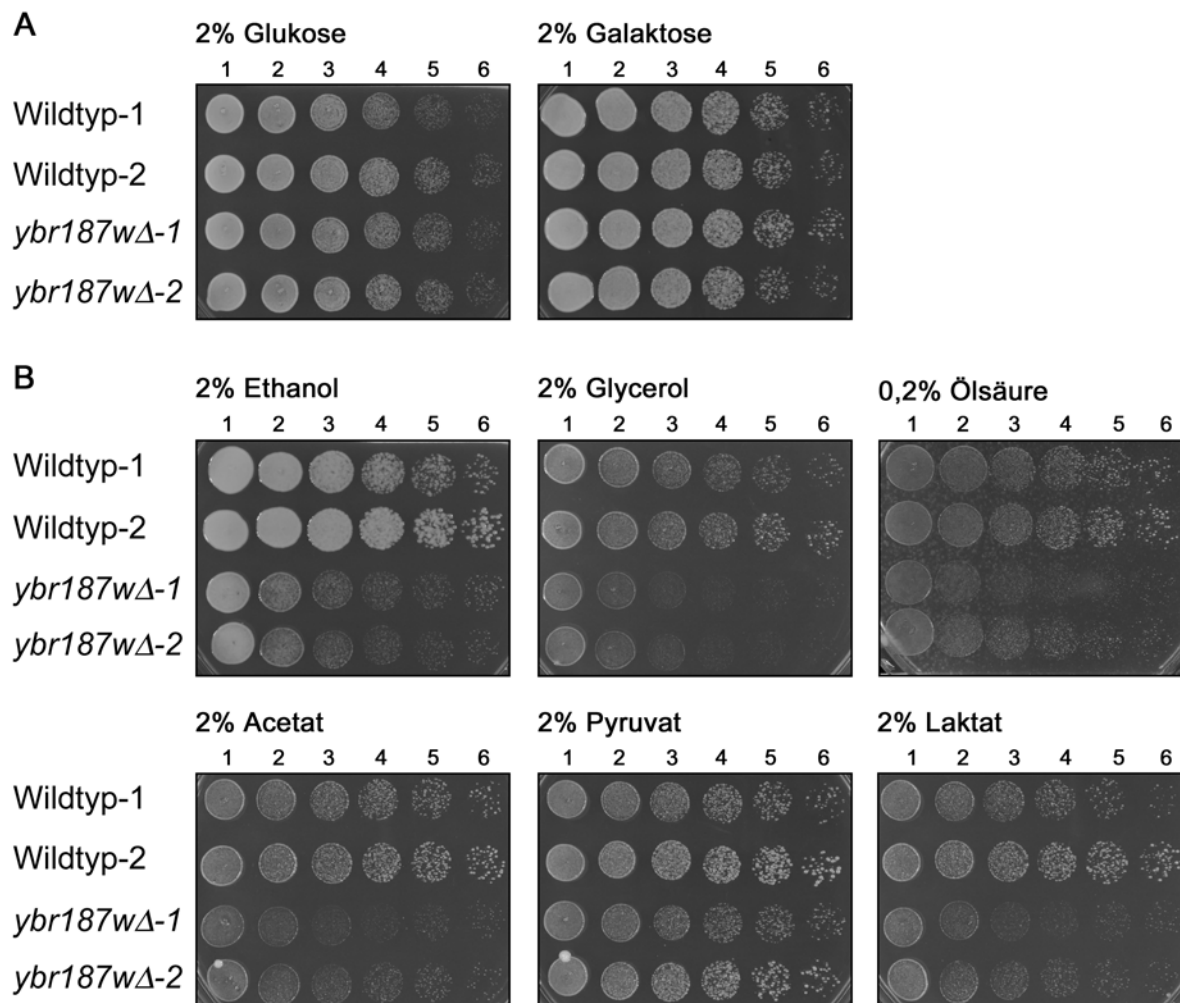


Abb. 3.24: Charakterisierung des Wachstums der Wildtypen bzw. der Mutanten *ybr187wΔ-1* und *ybr187wΔ-2* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Dargestellt ist das Wachstum der Hefestämme Wildtyp-1, Wildtyp-2 und der Mutanten *ybr187wΔ-1* und *ybr187wΔ-2* in einer seriellen Verdünnungsreihe (1 = $1 \cdot 10^0$; 2 = $2 \cdot 10^{-1}$; 3 = $4 \cdot 10^{-2}$; 4 = $8 \cdot 10^{-3}$; 5 = $1,6 \cdot 10^{-3}$; 6 = $3,2 \cdot 10^{-4}$) auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

(A) Wachstum auf fermentativen Kohlenstoffquellen.

(B) Wachstum auf nichtfermentativen Kohlenstoffquellen.

3.11 Komplementation der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten

3.11.1 Komplementation der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten durch die entsprechenden cDNAs

Um sicherzustellen, dass die Ursache der Phänotypen der *dap1* und *dap2* T-DNA Insertionsmutanten tatsächlich im *knock-out* dieser Gene begründet liegen, wurde versucht, die Mutanten mit den entsprechenden cDNAs genetisch zu komplementieren. Dabei standen die cDNAs unter der Kontrolle des 35S Promotors des Cauliflower Mosaic Virus. Des Weiteren wurden als Kontrolle und zur Analyse der Folgen einer Überexpression dieser Gene, Pflanzen des Wildtyps mit denselben Konstrukten transformiert. Die entsprechenden Konstrukte wurden durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer unter Verwendung der Methode der Vakuuminfiltration von Infloreszenzen (Bechthold *et al.*, 1993) stabil in das Genom von *A. thaliana* überführt und die resultierenden Transformanten selektiert. Zur Analyse des morphologischen Phänotyps wurden Pflanzen der T₂-Generation verwendet. Die Expression der einzelnen Konstrukte war in den verschiedenen Linien mittels RT-PCR nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde das Fv/Fm-Verhältnis mittels PAM-Fluorometrie ermittelt, um eine physiologische Aussage über Vollständigkeit der Komplementation treffen zu können.

Unter Verwendung des Konstrukts *P_{35S}:DAP1* konnten die T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1*, *dap1-1* und *dap1-2*, genetisch komplementiert werden (Abb. 3.25F, G). Auch die ermittelten Werte des Fv/Fm-Verhältnisses dieser Linien waren mit dem des Wildtyp vergleichbar sind (Tab. 3.8). Eine Überexpression der cDNA von *AtDAP1* im genetischen Hintergrund des Wildtyps führte zu keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten (Abb. 3.25E). Auch eine Expression des Konstrukts *P_{35S}:DAP2* im Hintergrund von *dap2-1* erzielte eine komplette Reversion des Phänotyps und des verringerten Fv/Fm-Verhältnisses (Abb. 3.25K, Tab. 3.8). Weiterführend waren die Keimlinge der so komplementierten Pflanzen, im Gegensatz zu den Keimlingen der *dap2-1*-Mutanten, zu einer vollständigen Entwicklung auf Erde in der Lage. Auch eine Überexpression des Konstrukts *P_{35S}:DAP2* im Wildtyp Hintergrund führte keine phänotypischen Auffälligkeiten (Abb. 3.25H). Diese Untersuchungen zeigen, dass der Phänotyp der T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* durch die Expression der entsprechenden cDNAs vollständig revertiert werden kann. Des Weiteren führt eine Überexpression der Gene *AtDAP1* und *AtDAP2* im Wildtyp zu keinen phänotypischen Auffälligkeiten.

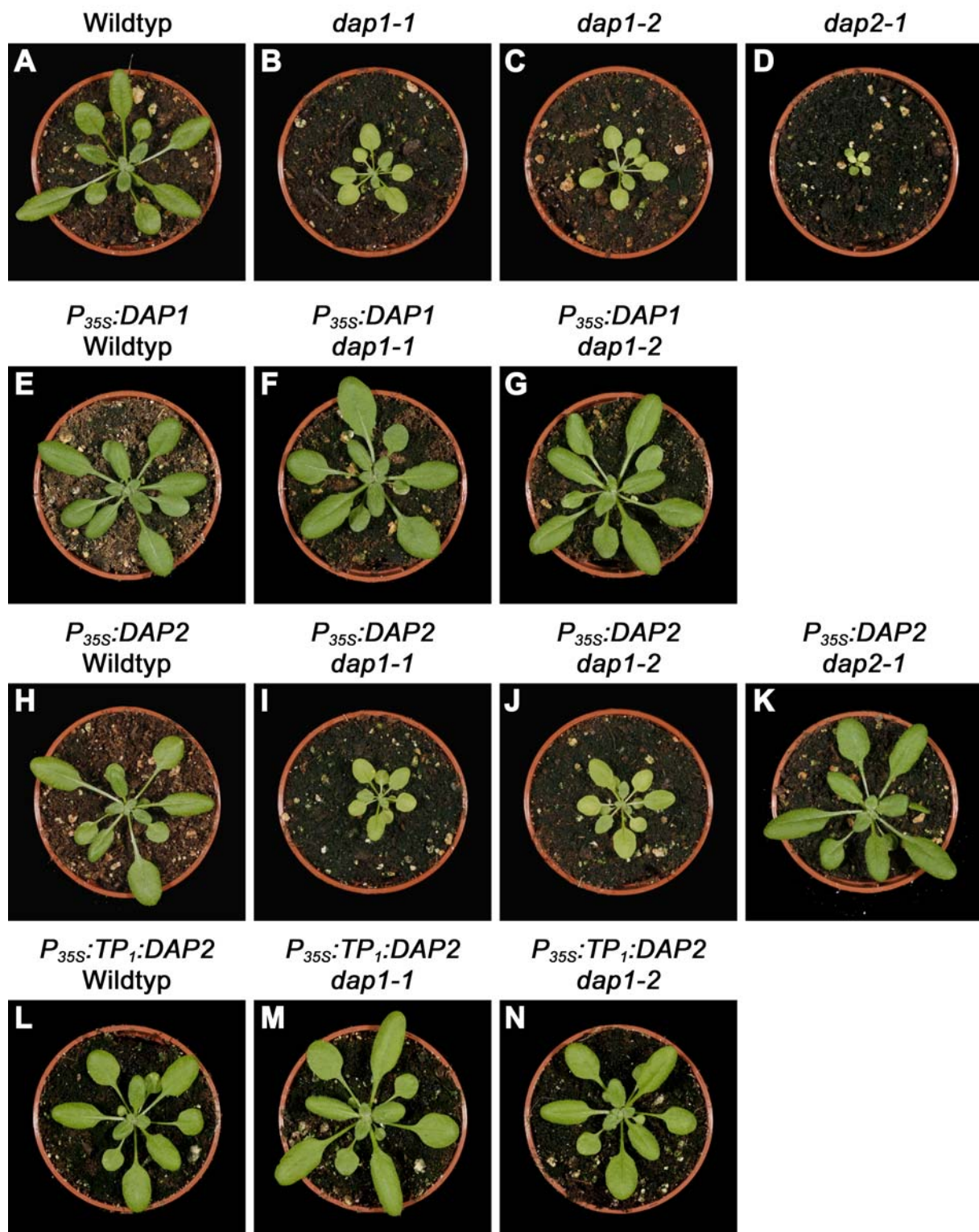


Abb. 3.25: Darstellung des Phänotyps, der mit den Konstrukten *P*_{35S}:*DAP1*, *P*_{35S}:*DAP2* und *P*_{35S}:*TP*₁:*DAP2* erhaltenen Transformanten.

Dargestellt sind der Wildtyp (A), die Mutanten *dap1-1*, *dap1-2*, *dap2-1* (B, C, D) und die selektierten Transformanten der T₂-Generation, welche die Konstrukte *P*_{35S}:*DAP1* (E, F, G), *P*_{35S}:*DAP2* (H, I, J, K) oder *P*_{35S}:*TP*₁:*DAP2* (L, M, N) im genetischen Hintergrund des Wildtyps oder der entsprechenden Mutanten tragen. Die Pflanzen wurden für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 μmol·m⁻²·s⁻¹) angezogen. Die Mutante *dap2-1* und die Transformanten mit diesem genetischen Hintergrund wurden auf ½ MS-Festmedium mit 1% (w/v) Saccharose angezogen und nach ca. drei Wochen auf Erde überführt.

Tab. 3.8: Fv/Fm-Verhältnis des Wildtyps, der Mutanten *dap1-1*, *dap1-2*, *dap2-1* und von Pflanzen der T₂-Generation, die mit den Konstrukten *P_{35S}:DAP1*, *P_{35S}:DAP2* und *P_{35S}:TP₁:DAP2* transformiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Messungen an einer Pflanze (n = 3), die unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen wurden. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

Komplementations-konstrukt	Genetischer Hintergrund	Linie	Fv/Fm
-	Wildtyp	-	0,797 \pm 0,007
-	<i>dap1-1</i>	-	0,524 \pm 0,012*
-	<i>dap1-2</i>	-	0,537 \pm 0,018*
-	<i>dap2-1</i>	-	0,343 \pm 0,019*
<i>P_{35S}:DAP1</i>	Wildtyp	1	0,796 \pm 0,015
<i>P_{35S}:DAP1</i>	Wildtyp	2	0,807 \pm 0,001
<i>P_{35S}:DAP1</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,787 \pm 0,008
<i>P_{35S}:DAP1</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,793 \pm 0,003
<i>P_{35S}:DAP1</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,798 \pm 0,004
<i>P_{35S}:DAP1</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,810 \pm 0,004*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	Wildtyp	1	0,799 \pm 0,005
<i>P_{35S}:DAP2</i>	Wildtyp	2	0,806 \pm 0,013
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,523 \pm 0,035*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,512 \pm 0,011*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,565 \pm 0,015*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,534 \pm 0,041*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap2-1</i>	1	0,777 \pm 0,007*
<i>P_{35S}:DAP2</i>	<i>dap2-1</i>	2	0,799 \pm 0,004
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	Wildtyp	1	0,787 \pm 0,002
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	Wildtyp	2	0,789 \pm 0,006
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,794 \pm 0,006
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,787 \pm 0,008
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,743 \pm 0,027*
<i>P_{35S}:TP₁:DAP2</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,736 \pm 0,043

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Überexpression von *AtDAP1* und *AtDAP2* die *knock-out*-Mutante des jeweils anderen Gens komplementieren kann. Damit sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine eine ähnliche Funktion haben. Die T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1*, welche mit dem Konstrukt *P_{35S}:DAP2* transformiert wurden, zeigten keine Komplementation (Abb. 3.25I, J). In den entsprechenden Linien war die Überexpression des Konstrukts *P_{35S}:DAP2* anhand von RT-PCR nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Auch für die Werte des Fv/Fm-Verhältnisses waren keine Veränderungen gegenüber den nichttransformierten *dap1*-Mutanten nachzuweisen. Weiterhin wurde ein Konstrukt generiert, in welchem die Basensequenz des reifen *AtDAP2*-Proteins mit der Sequenz des

Transitpeptids von AtDAP1 fusioniert war. Damit sollte der Einfluss des Transitpeptids, z.B. durch eine unterschiedliche intraplastidäre Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2, auf die Funktionalität des zur Komplementation verwendeten Konstrukts überprüft werden. Dieses Konstrukt, $P_{35S}:TP_1:DAP2$, zeigte bei Überexpression im Wildtyphintergrund keine Auffälligkeiten (Abb. 3.25L). Die Expression in den Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* hingegen führte zu einem wildtypischen Phänotyp (Abb. 3.25M, N). Darüber hinaus bestätigen auch die ermittelten Werte des Fv/Fm-Verhältnisses eine physiologische Reversion für diese Mutanten (Tab. 3.8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beiden Proteine eine ähnliche Funktion haben, diese aber in ihrer physiologischen Bedeutung maßgeblich durch das Transitpeptid mitbestimmt wird.

3.11.2 Komplementation der *dap1* T-DNA Insertionsmutanten mit den *DAP*-Homologen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Saccharomyces cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob die homologen DAP-Proteine aus *Synechocystis* und *S. cerevisiae* fähig sind, die *A. thaliana* T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1* genetisch zu komplementieren, wurden Konstrukte mit diesen Genen erzeugt und nach *A. thaliana* transformiert. Da das cyanobakterielle Gen nicht über ein plastidäres Transitpeptid verfügt, wurde die Basensequenz des entsprechenden Leserahmens, *sll0615*, mit der transitpeptidkodierenden DNA-Sequenz von *AtDAP1* fusioniert. Das Protein von *S. cerevisiae* weist eine N-terminale Verlängerung, für die Hinweise auf eine mögliche Funktion als Signalpeptid existieren, auf (vgl. Kap. 3.10). Deshalb wurde die Sequenz des reifen Proteins im Abgleich zu bakteriellen DAP-Proteinen ermittelt. Die entsprechende DNA-Sequenz des reifen Proteins wurde anschließend mit der transitpeptidkodierenden DNA-Sequenz von *AtDAP1* fusioniert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden als $P_{35S}:TP_1:sll0615$ bzw. $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ bezeichnet und stehen unter der Kontrolle des 35S CaMV-Promotors. Diese Konstrukte wurden in den Wildtyp und die Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* von *A. thaliana* transformiert. Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde in Pflanzen der T₂-Generation dieser Linien durch RT-PCR verifiziert und anschließend morphologisch sowie anhand des Fv/Fm-Verhältnisses analysiert. Für die Konstrukte $P_{35S}:TP_1:sll0615$ und $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ wurden eine Überexpression der Gene im jeweiligen genetischen Hintergrund durch RT-PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dennoch war für die im Mutantenhintergrund von *dap1-1* und *dap1-2* erhaltenen Transformanten des Konstruktes $P_{35S}:TP_1:sll0615$ keine Reversion des Mutantenphänotyps

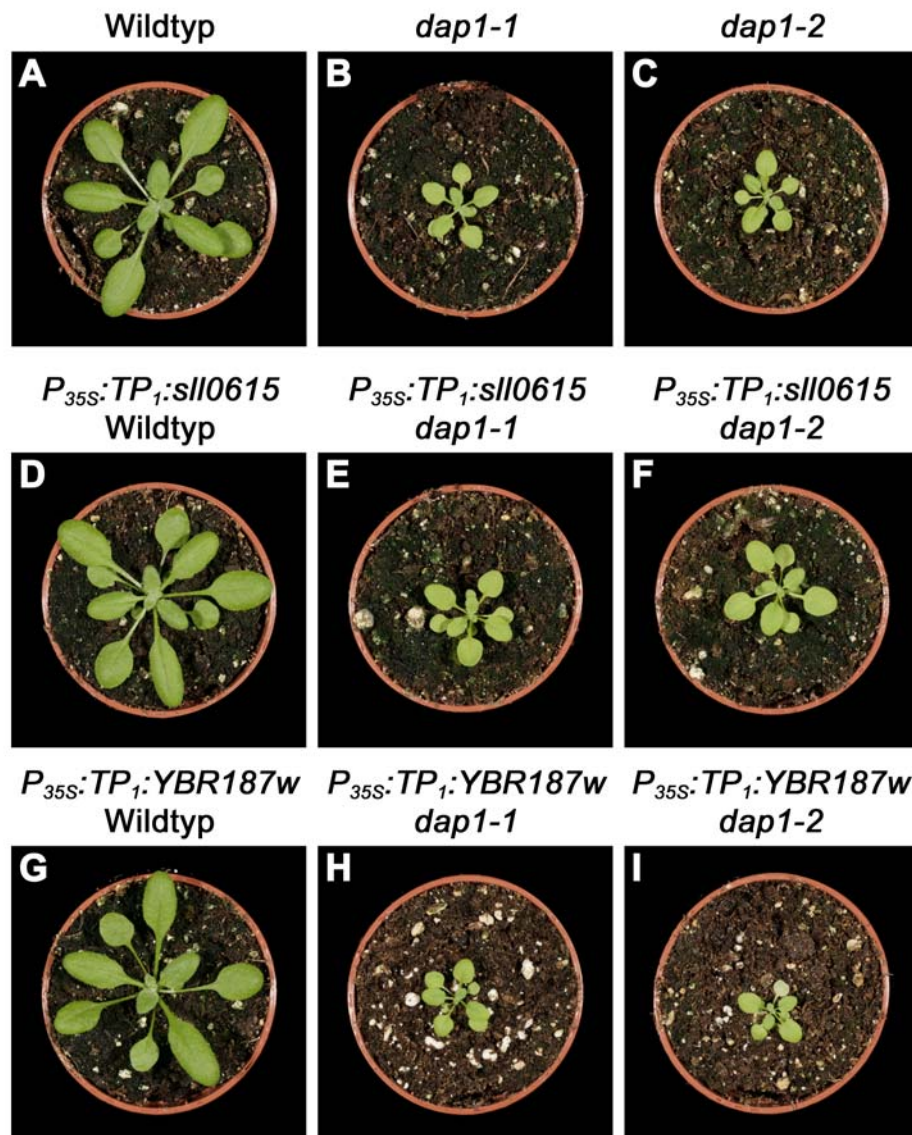


Abb. 3.26: Darstellung des Phänotyps, der mit den Konstrukten $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ und $P_{35S}:TP_1:sll0615$ erhaltenen Transformanten.

Dargestellt sind der Wildtyp (A), die Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* (B, C) und die selektierten Transformanten der T₂-Generation, welche die Konstrukte $P_{35S}:TP_1:sll0615$ (D, E, F) oder $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ (G, H, I) im genetischen Hintergrund des Wildtyps oder der entsprechenden Mutanten tragen. Die Pflanzen wurden für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen.

festzustellen (Abb. 3.26E, F). Auch eine Überexpression dieses Konstrukts im Wildtyp wies keine phänotypischen Auffälligkeiten auf. (Abb. 3.26D). Eine Komplementation durch Überexpression des Konstrukts $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ im Mutantenhintergrund von *dap1-1* und *dap1-2* war für die erzeugten Transformanten nicht zu ermitteln (Abb. 3.26H, I). Auch die Überexpression des Konstrukts $P_{35S}:TP_1:YBR187w$ im genetischen Hintergrund des Wildtyps wies keine phänotypischen Auffälligkeiten auf (Abb. 3.26G). Entsprechend dieser

Beobachtung war auch das Fv/Fm-Verhältnis der erzeugten transgenen Pflanzen gegenüber dem entsprechenden genetischen Hintergrund der *dap1*-Mutanten bzw. des Wildtyps unverändert (Tab. 3.9). Somit war eine Komplementation der *dap1*-Mutanten mit den Homologen aus *Synechocystis* und *S. cerevisiae* nicht erfolgreich.

Tab. 3.9: Fv/Fm-Verhältnis des Wildtyps, der Mutanten *dap1-1*, *dap1-2* und von Pflanzen der T₂-Generation, die mit den Konstrukten *P_{35S}:TP₁:sll0615* und *P_{35S}:TP₁:YBR187w* transformiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Messungen an einer Pflanze (n = 3), die unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen wurden. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert. Da die Untersuchungen zu *P_{35S}:TP₁:sll0615* und *P_{35S}:TP₁:YBR187w* separat durchgeführt wurden, sind diese Daten dementsprechend geteilt aufgelistet.

Komplementations-konstrukt	Genetischer Hintergrund	Linie	Fv/Fm
-	Wildtyp	-	0,789 \pm 0,007
-	<i>dap1-1</i>	-	0,477 \pm 0,015*
-	<i>dap1-2</i>	-	0,476 \pm 0,010*
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	Wildtyp	1	0,794 \pm 0,001
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	Wildtyp	2	0,792 \pm 0,003
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,494 \pm 0,022*
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,507 \pm 0,013*
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,479 \pm 0,013*
<i>P_{35S}:TP₁:sll0615</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,504 \pm 0,023*
-	Wildtyp	-	0,813 \pm 0,002
-	<i>dap1-1</i>	-	0,524 \pm 0,012*
-	<i>dap1-2</i>	-	0,537 \pm 0,018*
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	Wildtyp	1	0,800 \pm 0,010
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	Wildtyp	2	0,807 \pm 0,009
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,518 \pm 0,016*
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,523 \pm 0,031*
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,491 \pm 0,030*
<i>P_{35S}:TP₁:YBR187w</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,518 \pm 0,016*

3.12 Analyse der *dap1*- und *dap2*-Mutanten in Verbindung mit einer limitierten plastidären Pyruvatkonzentration

Durch Microarray-Experimente der *cue1-6*-Mutante (Streatfield *et al.*, 1999) mit dem korrespondierenden Wildtyp wurde eine signifikant erhöhte Expression für das *AtDAP1*-Gen in dieser Mutante ermittelt (Dr. A. Schneider persönliche Mitteilung). Die *cue1*-Mutanten sind im *AtPPT1*-Gen, welches den Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator 1 von *A. thaliana* kodiert, mutiert (Streatfield *et al.*, 1999; Knappe *et al.*, 2003b; Voll *et al.*, 2003). Die Mutante *cue1-6* trägt eine Mutation an der Position 54 des unreifen Proteins, welche als Stop-Kodon agiert und so die Translation eines funktionellen Proteins verhindert (Streatfield *et al.*, 1999). In *A. thaliana* existieren zwei AtPPTs (AtPPT1 und AtPPT2) mit ähnlicher Substratspezifität, aber unterschiedlicher gewebespezifischer Expression (Knappe *et al.*, 2003b). Dabei ist *AtPPT1* in der Lage die *cue1-6*-Mutante komplett zu komplementieren, während *AtPPT2* die *cue1-6*-Mutante nur partiell komplementieren kann (Knappe *et al.*, 2003b). Beide AtPPTs transportieren neben Phosphoenolpyruvat (PEP) auch 2-Phosphoglycerat (2-PGA) und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) im Austausch mit Phosphat in Plastiden (Knappe *et al.*, 2003a; 2003b). Der PEP-Transport stellt in C₃-Pflanzen den Ausgangspunkt für mehrere plastidär lokalisierte Biosynthesewege, wie der Synthese von verzweigt-kettigen Aminosäuren (Schulze-Siebert *et al.*, 1984; Hanson und Gregory, 2002), Fettsäuren (Qi *et al.*, 1995; Singh und Shaner, 1995), Isoprenoiden (Lichtenthaler *et al.*, 1997a) und über den Shikimatweg der Synthese von aromatischen Aminosäuren und einer Vielzahl weiterer Sekundärmetabolite (Phenylpropanoide, Flavonoide, Plastochinon, Tocopherol, Vitamin K) dar. Zur Synthese von Fettsäuren und verzweigt-kettigen Aminosäuren wird PEP dabei durch die Aktivität der plastidären Pyruvatkinase unter Bildung von ATP zu Pyruvat umgesetzt (Sangwan *et al.*, 1992; Plaxton, 1989; McHugh *et al.*, 1995). In Plastiden von C₄-Pflanzen ist die Bildung von PEP aus Pyruvat durch die Aktivität der ATP-abhängigen Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK) möglich (Matsuoka, 1995). Dabei wird Pyruvat aus dem Cytosol importiert, was anhand von Importstudien an isolierten Mesophyllchloroplasten von verschiedenen C₄-Pflanzen dokumentiert wurde (Huber und Edwards 1977; Flüge *et al.*, 1985; Ohnishi *et al.*, 1990). Dieser Pyruvattransporter ist zur Zeit jedoch weder in C₃- noch C₄-Pflanzen auf molekularer Ebene identifiziert (Weber *et al.*, 2004). Durch Überexpression der PPDK aus *Flaveria trinervia* konnte die *cue1-6*-Mutanten komplementiert werden (Voll *et al.*, 2003). Auch für *A. thaliana* wurde eine plastidär lokalisierte PPDK (Parsley und Hibberd, 2006) mit nur geringer Aktivität nachgewiesen (Voll

al., 2003). Es wird vermutet, dass ein erhöhter Import von Pyruvat in die Plastiden möglicherweise die PEP-Limitation in der *cue1-6*-Mutante teilweise mildern kann. Die erhöhte Expression von *AtDAP1* in der *cue1-6*-Mutante könnte eventuell damit in Zusammenhang stehen oder direkt am Pyruvattransport beteiligt sein. Da auch die *knock-out*-Mutanten des *DAP*-Gens von *S. cerevisiae* eine Auffälligkeit beim Wachstum auf Pyruvat zeigten (vgl. Kap. 3.10), wurden die *knock-out*-Mutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* in Hinsicht auf eine mögliche Pyruvat-Limitation in den Plastiden analysiert. Dabei wurden das Wachstum dieser Mutanten unter Verwendung von Pyruvat als externer Kohlenstoffquelle untersucht. Zum Zweiten wurden versucht, die plastidäre Konzentration an PEP in den *dap1*-Mutanten durch Überexpression des *AtPPT1* und *AtPPT2* zu erhöhen. In Verbindung mit der Aktivität der plastidären Pyruvatkinase sollte das zu einer Erhöhung des plastidären Pyruvatgehalts führen.

3.12.1 Wachstum der *dap1*- und *dap2*-Mutanten auf Pyruvat

Um eine plastidäre Limitation von Pyruvat zu untersuchen, wurde zunächst das Wachstum der *dap1-1*- und *dap2-1*-Mutante bei Zugabe von Pyruvat ins Medium untersucht. Da die Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* im Gegensatz zum Wachstum auf Pyruvat beim Wachstum auf Laktat einen veränderten Wachstumsphänotyp aufwiesen (vgl. Abb. 3.24B), wurde diese Substanz als zusätzliche Kontrolle mitgeführt. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern das Vorhandensein von Saccharose in Kombination mit diesen beiden Substanzen das Wachstum beeinflusst.

Für den Wildtyp wurde keine Wachstumsveränderung durch Saccharose beobachtet (Abb. 3.27A, D). Dahingegen zeigte die *dap1*-Mutante ein geringfügig verbessertes Wachstum bei Zusatz von Saccharose (Abb. 3.27A, D). Die *dap2-1*-Mutante war, wie im Kap. 3.5.2 beschrieben, nur bei Zugabe von Saccharose in der Lage, sich über das Keimlingsstadium hinaus zu entwickeln (Abb. 3.27G, J). Für die Untersuchung des Wachstums auf Pyruvat und Laktat wurden im Medium Konzentrationen von 10 mM, 100 mM und 250 mM untersucht. Dabei war ab einer Konzentration von 100 mM der jeweiligen Substanzen die Keimung für die Samen des Wildtyps und der beiden Mutanten nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Auch bei einer Konzentration von 10 mM an Pyruvat oder Laktat war eine Inhibition des Wachstums vom Wildtyp und der *dap1-1*-Mutante erkennbar (Abb. 3.27A, B, C, D, E, F). Die

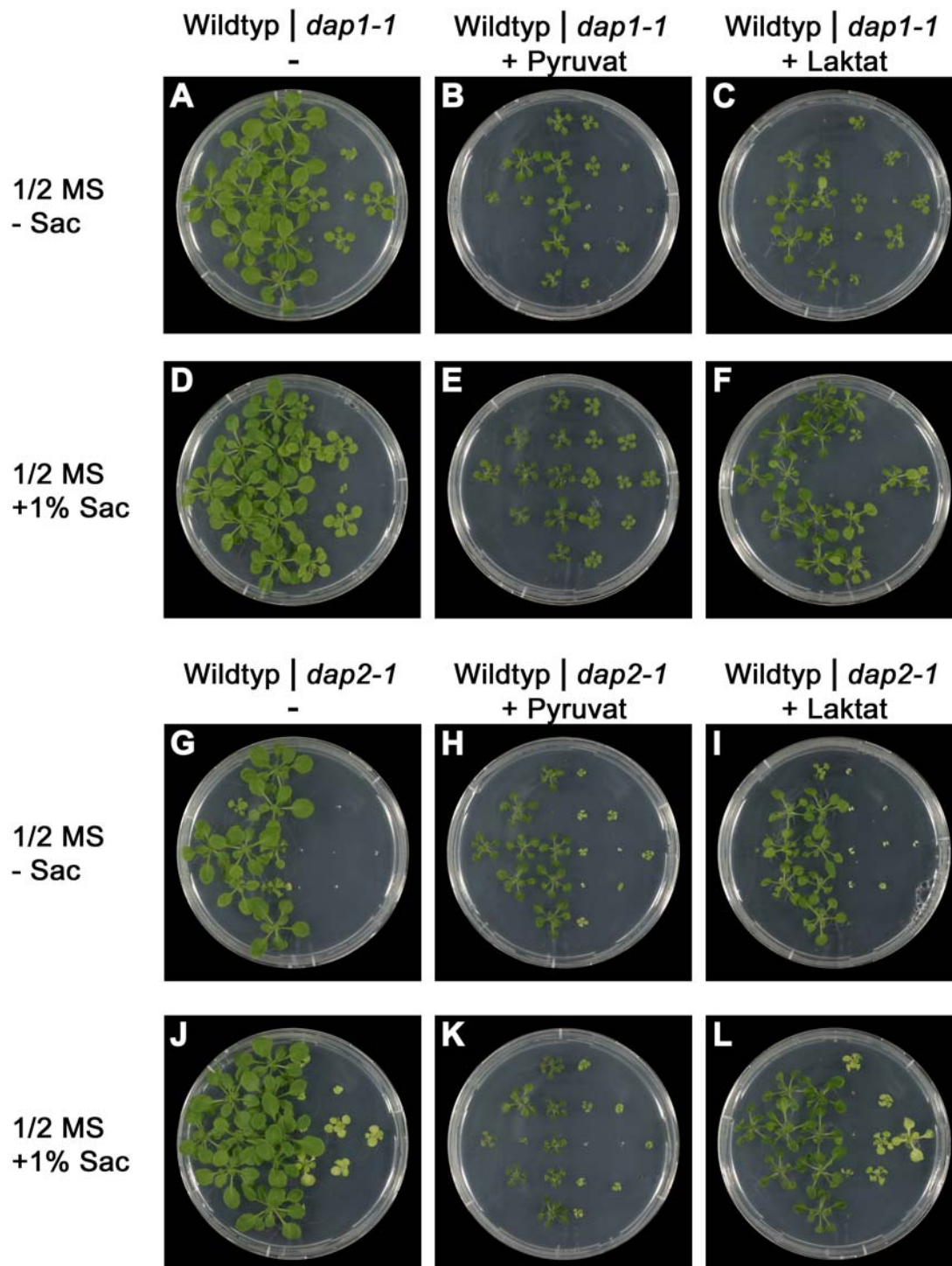


Abb. 3.27: Darstellung des Phänotyps der Mutanten *dap1-1* und *dap2-1* beim Wachstum mit 10 mM Pyruvat bzw. 10 mM Laktat.

Die dargestellten Pflanzen wurden für 25 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium mit (D, E, F, J, K, L) oder ohne 1% (w/v) Saccharose (A, B, C, G, H, I) unter Zusatz von 10 mM Pyruvat (B, E, H, K) bzw. 10 mM Laktat (C, F, I, L) angezogen.

Mutante *dap2-1* war jedoch bei Zugabe von Pyruvat oder Laktat auch ohne Saccharose in der Lage zu überleben und bildete vereinzelt Rosettenblätter (Abb. 3.27H, I). Dies Ergebnis unterstützt die in Kap. 3.5.2 beschriebene Beobachtung, dass die *dap2-1*-Mutante nur unter Zufuhr einer externen Energie- und Kohlenstoffquelle zur Entwicklung befähigt ist. Abgesehen von dieser Ausnahme wurde jedoch eine Wachstumsreduktion durch Pyruvat oder Laktat sowohl auf Medium mit als auch ohne Saccharose sowohl für den Wildtyp und als auch für die beiden Mutanten ermittelt. Dabei war die Wachstumsreduktion durch Pyruvat stärker ausgeprägt als durch Laktat. Außer dem Überleben der *dap2-1*-Mutante auf Saccharose-freiem Medium wurde durch die Zugabe von Pyruvat und Laktat unter den gewählten Bedingungen kein verbessertes Wachstum oder eine physiologische Komplementation für die Phänotypen der Mutanten ermittelt.

3.12.2 Überexpression von *AtPPT1* und *AtPPT2* in den *dap1*-Mutanten

Da Pflanzen neben einer cytosolischen Pyruvatkinase auch über eine plastidäre Pyruvatkinase verfügen (Sangwan *et al.*, 1992; Plaxton, 1989; McHugh *et al.*, 1995), sollte untersucht werden, ob durch eine erhöhte PEP-Zufuhr in die Plastiden die vermutete plastidäre Pyruvatlimitation der *dap1*-Mutanten teilweise oder komplett zu revertieren ist. So wurde versucht, die beiden plastidären Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokatoren von *A. thaliana*, *AtPPT1* und *AtPPT2*, zu überexprimieren. Dabei wurden die cDNAs von *AtPPT1* und *AtPPT2* unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors (Knappe *et al.*, 2003b) in die *dap1-1*-, *dap1-2*-Mutanten und den Wildtyp transformiert. Eine Funktionalität der verwendeten Konstrukte wurde anhand einer Komplementation der *cue1-6*-Mutante von Knappe *et al.* (2003b) bereits gezeigt. Die resultierenden Mutanten wurden anhand der morphologischen Erscheinung und des Fv/Fm-Verhältnisses im Hinblick auf eine Komplementation analysiert. Für die isolierten Transformanten im genetischen Hintergrund von *dap1-1*, *dap1-2* und des Wildtyps wurde die Integration des entsprechenden Konstruktes im Genom sowie dessen Transkription nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Anhand der phänotypischen Erscheinung und des Fv/Fm-Verhältnisses war jedoch sowohl für das Konstrukt *P_{35S}:PPT1* als auch für das Konstrukt *P_{35S}:PPT2* keine Komplementation der *dap1*-Mutanten erkennbar (Abb. 3.28, Tab. 3.10). Allerdings waren einige Transformanten im Durchmesser der Blattrosette etwas größer oder hatten ein leicht erhöhtes Fv/Fm-Verhältnis. Dennoch war in allen transformierten

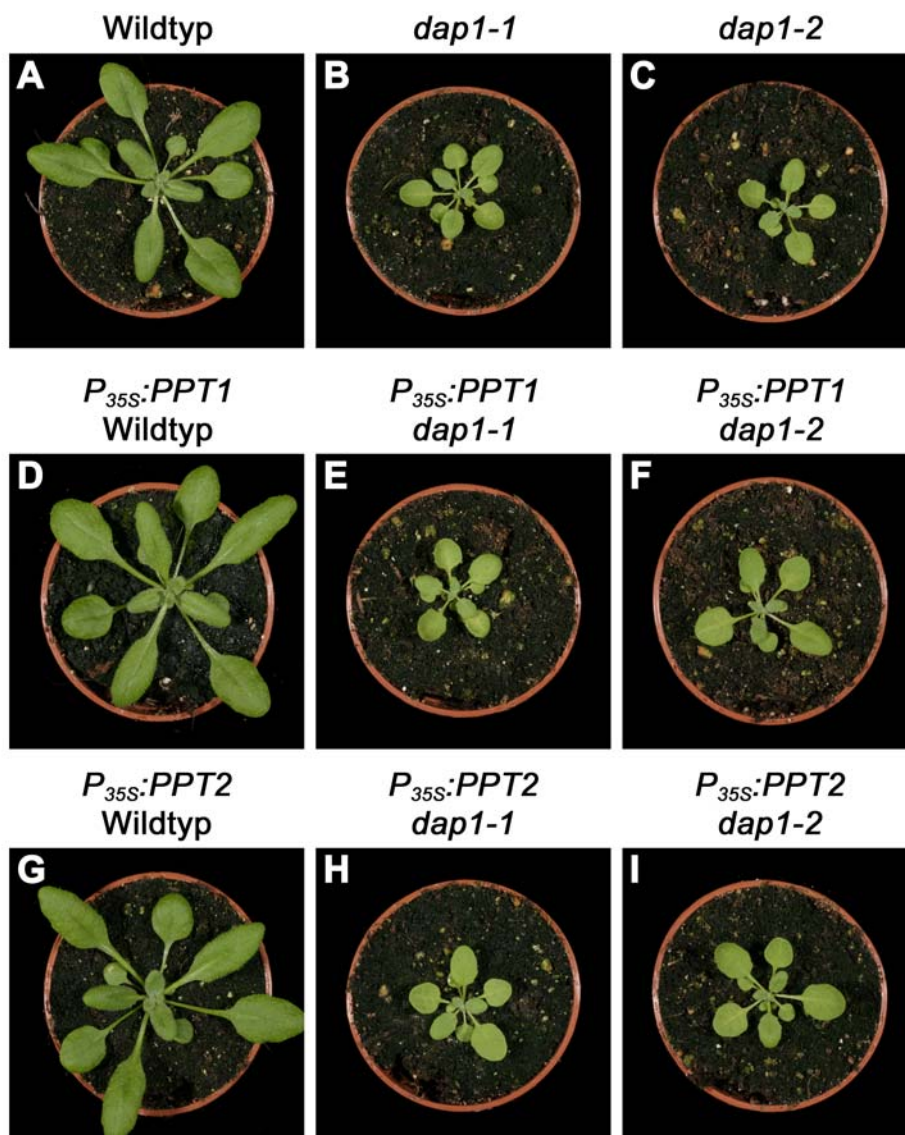


Abb. 3.28: Darstellung des Phänotyps der mit den Konstrukten $P_{35S}:PPT1$ und $P_{35S}:PPT2$ erhaltenen Transformanten.

Dargestellt sind Wildtyp- (A), Mutanten (B, C) und die selektierten Transformanten der T₂-Generation, welche die Konstrukte $P_{35S}:PPT1$ (D, E, F) oder $P_{35S}:PPT2$ (G, H, I) im genetischen Hintergrund des Wildtyps oder der Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* tragen. Die dargestellten Pflanzen wurden für 26 Tage unter Langtagbedingungen (LD = 16/8 h, PFD = 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen.

Mutanten der *dap1-knock-out*-Phänotyp deutlich ausgeprägt. Ein teilweise erhöhtes Frischgewicht für Wildtyppflanzen, die das Konstrukt $P_{35S}:PPT1$ tragen, wurde auch von Voll *et al.* (2003) ermittelt. Deshalb wird eine partielle Komplementation der *dap1*-Mutanten auch in diesen Fällen ausgeschlossen. Weiterhin wiesen einige Mutanten, die das Konstrukt $P_{35S}:PPT1$ tragen, an manchen Blättern den retikulären Blattphänotyp der *cuel*-Mutante auf (Daten nicht gezeigt). In diesen Fällen ist von einer sehr starken Überexpression des

Konstruktes auszugehen, welche zum *gene silencing* des *AtPPT1*-Gens führt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch eine Überexpression von *AtPPT1* und *AtPPT2* in den *dap1*-Mutanten keine Wiederherstellung der wildtypischen Erscheinung erzielt wurde.

Tab. 3.10: Fv/Fm-Verhältnis des Wildtyps, der Mutanten *dap1-1*, *dap1-2* und von Pflanzen der T₂-Generation, die mit den Konstrukten *P_{35S}:PPT1* und *P_{35S}:PPT2* transformiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) von jeweils drei Messungen an einer Pflanze (n = 3), die unter Langtagbedingungen (LD= 16/8h, PFD= 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) angezogen wurden. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's *t*-Test nach Welch durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 mit * markiert.

Komplementations-konstrukt	Genetischer Hintergrund	Linie	Fv/Fm
-	Wildtyp	-	0,810 \pm 0,010
-	<i>dap1-1</i>	-	0,600 \pm 0,039*
-	<i>dap1-2</i>	-	0,524 \pm 0,067*
<i>P_{35S}:PPT1</i>	Wildtyp	1	0,811 \pm 0,002
<i>P_{35S}:PPT1</i>	Wildtyp	2	0,794 \pm 0,008
<i>P_{35S}:PPT1</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,517 \pm 0,053*
<i>P_{35S}:PPT1</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,532 \pm 0,045*
<i>P_{35S}:PPT1</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,613 \pm 0,027*
<i>P_{35S}:PPT1</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,521 \pm 0,054*
<i>P_{35S}:PPT2</i>	Wildtyp	1	0,796 \pm 0,009
<i>P_{35S}:PPT2</i>	Wildtyp	2	0,788 \pm 0,017
<i>P_{35S}:PPT2</i>	<i>dap1-1</i>	1	0,567 \pm 0,037*
<i>P_{35S}:PPT2</i>	<i>dap1-1</i>	2	0,543 \pm 0,002*
<i>P_{35S}:PPT2</i>	<i>dap1-2</i>	1	0,557 \pm 0,042*
<i>P_{35S}:PPT2</i>	<i>dap1-2</i>	2	0,541 \pm 0,057*

4. Diskussion

In dieser Arbeit vorausgegangen Untersuchungen wurde eine homozygote *knock-out*-Mutante mit phänotypischen Auffälligkeiten isoliert. Aufgrund des ermittelten Phänotyps wurde die isolierte Mutante als *dwarf affected in photosynthetic electron transport rate 1 (dap1)* bezeichnet. Diese Mutante sollte verifiziert und anschließend molekularbiologisch und physiologische charakterisiert werden, um Hinweise auf die Funktion des betroffenen Gens zu erarbeiten. Für die vorliegende Arbeit waren die Mutanten der plastidären Proteine AtDAP1 und AtDAD2 von vorrangigem Interesse, weshalb diese im Verlauf der Arbeit eingehender untersucht worden sind.

Wie sich im späteren Verlauf dieser Arbeit herausstellte, wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Jahns (Universität Düsseldorf) etwa zeitgleich mit Hilfe des Video-Imagingverfahrens eine weitere homozygote *knock-out*-Mutante für dasselbe Gen isoliert und mit der Bezeichnung *affected in non-photochemical energy quenching 2 (que2)* versehen. Im Folgenden sollen die von Beran (2006) an der *que2*-Mutante durchgeführten Untersuchungen und gewonnenen Erkenntnisse in die Diskussion miteinbezogen werden.

4.1 *in silico* Vorhersagen zu den DAP-Proteinen

Auf Basis der Aminosäuresequenz von AtDAP1 konnten mittels BLAST-Analysen vier weitere homologe Protein für *A. thaliana* ermittelt werden (Abb. 3.1A). Homologe Proteine wurden auch für weitere dikotyledone und monokotyledone bestimmt. Anhand einer Clusteranalyse werden die DAP-Proteine von *A. thaliana* und *O. sativa* in vier Gruppen eingeteilt (Abb. 3.1B). Dabei wird für jedes der AtDAP-Proteine das Vorhandensein von mindestens jeweils einem homologen Protein von *O. sativa* angezeigt. Darüber hinaus stimmen sogar die vorhergesagten subzellären Lokalisationen der Proteine in den jeweiligen Gruppen überein. Daher wird vermutet, dass ein ähnlicher Satz an DAP-Proteinen in dem jeweiligen Organismus benötigt wird und dass auch in anderen höheren Pflanzen eine ähnliche Anzahl an DAP-Proteinen existiert. Da neben *A. thaliana* und *O. sativa* nur für wenige weitere höhere Pflanzen die Genomsequenz komplett bekannt und annotiert ist, konnte diese Hypothese nicht eingehender überprüft werden. Darüber hinaus wurde die Existenz von homologen DAP-Proteinen auch für Cyanobakterien, Pilze, Tiere und für einige heterotrophe Bakterien ermittelt (Abb. 3.1A). Hierbei ist auffällig, dass obwohl eine große

Anzahl von Bakteriengenomen bekannt ist, nur für wenige heterotrophe Bakterien homologe Proteine identifiziert werden konnten. Da AtDAP1, AtDAP2 und AtDAP5 N-terminale Verlängerungen aufweisen, wurden Vorhersagen zur Existenz von Signalsequenzen für alle AtDAP-Proteine durchgeführt (Tab. 3.2). Dabei werden für AtDAP1 und AtDAP2 durch die Mehrzahl der Computerprogramme deutlich chloroplastidäre Transitpeptide angezeigt. Für AtDAP5 deuten die Vorhersageprogramme ein Signalpeptid des sekretorischen Weges an. Daraus kann eine extrazelluläre Lokalisation oder eine intrazelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat oder der Vakuole vermutet werden. Für AtDAP3 und AtDAP4 gibt keine eindeutigen Vorhersagen. Es werden sowohl mitochondriale Transitpeptide als auch Signalpeptide für den sekretorischen Signalweg angegeben. Da AtDAP3 und AtDAP4 im Vergleich zu den bakteriellen Proteinen und den reifen Proteinen von AtDAP1, AtDAP2 und AtDAP5 aber keine N-terminale Verlängerungen aufweisen, wird davon ausgegangen, dass diese Vorhersagen nicht aussagekräftig sind und keine Signalpeptide für AtDAP3 und AtDAP4 existieren. Des Weiteren wurden Analysen zur Bestimmung von Signalsequenzen für eine mögliche intraplastidäre Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2 durchgeführt. In den Präsequenzen dieser Proteine wurden jedoch keine Hinweise für weiteren Signalsequenzen des *Sec pathway*, des *twin arginine translocation pathways* oder des *signal recognition particle pathway* für den Proteinimport in die Thylakoidmembran oder das Thylakoidlumen ermittelt. Vorhersagen für eine Integration von Membranproteinen in die Thylakoidmembran über den *spontaneous pathway* sind nicht möglich. Deshalb sind diese Analysen nur in begrenztem Maße aussagekräftig, und es könnten keine definitiven Aussagen über die intraplastidäre Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2 getroffen werden.

Weiterhin werden für jedes der AtDAP-Proteine von *A. thaliana* mindestens fünf hydrophobe α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt (Abb. 3.2). Daher wird angenommen, dass es sich bei den AtDAP-Proteine um integrale Membranproteine handelt.

Zusammenfassend muss jedoch gesagt werden, dass *in silico* Vorhersagen nur mehr oder minder zuverlässige Indizien liefern, die nicht als gesicherte Aussagen zu interpretieren sind.

Bis *dato* ist für keines der ermittelten DAP-Proteine eine Funktion bekannt. Aktuelle Ergebnisse postulieren für das homologe DAP-Protein aus *S. cerevisia* auf Basis von Promotorbindestellen und Proteininteraktionsstudien eine nicht eingehend charakterisierte Beteiligung in der Ribosomenbiogenese (Barbara *et al.*, 2007). Spezifische experimentelle Beweise für diese Hypothese stehen jedoch noch aus. Unter der Annahme, dass die DAP-

Proteine aufgrund der ermittelten Transmembranhelices Membranproteine sind, wäre eine Interaktion mit den sich im Cyosol, im Stroma von Chloroplasten oder in der Matrix von Mitochondrien befindlichen Ribosomen unwahrscheinlich. Allerdings ist eine Interaktion mit membrangebundenen Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums, der Hüllmembran des Zellkerns, der inneren Hüllmembran der Mitochondrien und Chloroplasten sowie der Thylakoidmembran denkbar.

4.2 Lokalisation der AtDAP-Proteine

Um die Existenz der vorhergesagten N-terminalen Signalpeptide für die AtDAP-Proteine zu überprüfen, wurden zwei Strategien angewendet. Da sich die Überexpression von kompletten Proteinen zum Teil als problematisch erweisen kann, wurde zunächst versucht, nur den Signalpeptid-kodierende Bereich in Verbindung mit einer C-terminalen Fusion des GFP-Reportergens zu exprimieren. Dazu wurden die jeweils ersten 300 Basenpaare der cDNA der zu untersuchenden Gene verwendet. Das entspricht den ersten 100 N-terminalen Aminosäureresten der Proteine und stellt einen ausreichend großen Sequenzbereich für die Untersuchungen dar. Es wurden dabei neben *AtDAP1*, *AtDAP2* und *AtDAP5* zusätzlich die Gene *AtDAP3* und *AtDAP4*, für welche keine N-terminale Verlängerung existieren, aber zum Teil Signalpeptide vorhergesagt wurden, überprüft. Die unter Kontrolle des 35S-Promotors stehenden GFP-Fusionskonstrukte wurden in Tabak-Protoplasten transformiert. In Übereinstimmung mit den Vorhersagen konnte für die Fusionskonstrukte von *AtDAP1* und *AtDAP2* die GFP-Fluoreszenz eindeutig in den Plastiden nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Die Fusionskonstrukte von *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* zeigten keine eindeutige Lokalisierung der GFP-Signale. Somit konnte für diese Proteine keine Aussagen über die Existenz von Signalpeptiden oder über eine subzelluläre Lokalisation getroffen werden. Daraufhin wurde die komplette cDNA des jeweiligen Proteins C-terminal mit GFP fusioniert, um Aussagen über die subzelluläre Lokalisation der kompletten Proteine zu erhalten. Dieses Mal wurde eine Suspensionskultur von *A. thaliana* transformiert, um die Untersuchungen direkt im Herkunftsorganismus dieser Proteine zu führen. Zusätzlich wurden auch die schon zuvor verwendeten Fusionskonstrukte, welche nur die ersten 100 N-terminalen Aminosäurereste beinhalten, auf diese Weise analysiert. Mit diesen Konstrukten wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie bei der Transformation von Tabak-Protoplasten (Daten nicht gezeigt). Für die Fusionskonstrukte von *AtDAP1* und *AtDAP2*, welche unter Verwendung der

komplette cDNA des jeweiligen Gens erzeugt wurden, war auch in der *Arabidopsis*-Zellsuspension eine eindeutige Lokalisation der Fusionsproteine in den Plastiden zu verzeichnen (Abb. 3.4). Somit wurden sowohl die Existenz eines funktionellen Transitpeptids als auch die plastidäre Lokalisation dieser beiden Proteine nachgewiesen. Des Weiteren konnte damit die von Ferro *et al.* (2003) ermittelte plastidäre Lokalisation von AtDAP2 experimentell bestätigt werden. Für die Fusionsproteine von AtDAP3 und AtDAP4 wurde, ähnlich wie für das lösliche GFP-Protein, das GFP-Signal im Cytosol detektiert (Abb. 3.4). Die *in silico* Analysen geben für AtDAP3 und AtDAP4 fünf Transmembranhelices an, daher ist davon auszugehen, dass diese Proteine einen deutlich hydrophoben Charakter aufweisen. Folglich ist zu vermuten, dass die beobachtete cytosolische Anreicherung nicht der normalen, ursprünglichen Lokalisation dieser Proteine entspricht. Für das Fusionsprotein von AtDAP5 wurde nur eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 3.5). Das GFP-Signal war dabei über die gesamte Zelle verteilt. Dementsprechend wäre eine Lokalisation in der Zentralvakuole anzunehmen. Aufgrund der geringen Fluoreszenz kann ein Messartefakt aber nicht ausgeschlossen werden. Da die Vakuole unter anderem auch dem Abbau von Proteinen dient, könnte das schwache Signal innerhalb der Vakuole auch ein Resultat für die Degradierung des Fusionsproteins sein. Des Weiteren werden auch für AtDAP5 mehrere Membranhelices vorhergesagt, so dass auch für dieses Protein eher eine Lokalisation in einem Membransystem anzunehmen ist. Da es sich bei AtDAP3, AtDAP5 und AtDAP4 zudem um recht kleine Proteine von 230, 228 bzw. 293 Aminosäureresten handelt, ist es denkbar, dass die Fusion mit GFP die hydrophoben Eigenschaften dieser Proteine verändert oder eine Integration in die Membran behindert. Daher konnte auch in diesem zweiten Ansatz die Lokalisation von AtDAP3, AtDAP5 und AtDAP4 nicht eindeutig ermittelt werden. Da alle Experimente mit C-terminalen GFP-Fusionen durchgeführt wurden, wäre die Integration von GFP in einen nichtmembranständigen Teil der zu untersuchenden Proteine eine weitere Möglichkeit für weitere Untersuchungen. Dadurch könnten eventuelle Probleme bei der Membranintegration minimieren werden. Bei den Untersuchungen zur Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2 war es nicht möglich, Aufschluss über die intraplastidäre Lokalisation oder die Integration dieser Proteine in ein Membransystem zu erhalten. Solche Aussagen könnten durch *in organello* Importexperimente erzielt werden. Dabei wird das entsprechende Gen *in vitro* transkribiert und bei der sich anschließenden Transkription radioaktiv markiert. Im Anschluss daran wird der Import des markierten Proteins in isolierten Chloroplasten untersucht. Nach einer Auftrennung der Subkompartimente (Hüllmembran, Stroma und Thylakoidmembran) ist die Detektion des radioaktiv markierten Proteins in den

entsprechenden Fraktionen und somit eine sehr exakte Aussage über dessen Lokalisation möglich. Es wurden mehrere *in organello* Importexperimente für AtDAP1 und AtDAP2 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte unter Verwendung eines gekoppelten Systems zur Transkription und Translation aber keine ausreichende Menge an markierten Proteinen synthetisiert werden. Ein Alternative wäre die separate Transkription und Translation, um so die Einzelvorgänge optimieren zu können. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Proteinlokalisierung ist die Verwendung von Antikörpern. Dabei wäre es möglich die Lokalisation der AtDAP-Proteine mit Protein-spezifischen Antikörpern oder Antikörpern gegen den *tag* eines entsprechenden Fusionsproteinen mittels Western-Blot Analysen oder durch *immunogold labelling* elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Diese Strategien wurden zum Teil auch schon in Angriff genommen. So konnten die Proteine AtDAP1 und AtDAP2 zur Herstellung proteinspezifischer Antikörper erfolgreich in *S. cerevisiae* überexprimiert werden. Weiterhin wurden transgene Pflanzen erzeugt, welche *myc-tag*-Fusionsproteine von AtDAP1 und AtDAP2 exprimieren, um eine Lokalisation mittels eines *myc*-spezifischen Antikörper nachzuweisen. Die aufgeführten Untersuchungen würden einen detailreicheren Aufschluss über die Lokalisation von AtDAP1 und AtDAP2 innerhalb der Plastiden und deren mutmaßliche Membranintegration erlauben. Diese Ergebnisse könnte eventuell eine differenziertere Aussage und eine Eingrenzung der mögliche Funktionen dieser Proteine zulassen.

4.3 Expression der *AtDAP*-Gene

Die Expressionsanalyse der *AtDAP*-Gene wurde durch semiquantitative RT-PCR, Promotor-GUS-Fusionen (AtDAP1 und AtDAP2) und unter Verwendung der Mikroarray-Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) durchgeführt. Durch die Verwendung mehrerer Analysemethoden konnten sehr verlässliche und detailreiche Erkenntnisse über die Expressionsmuster der *AtDAP*-Gene gewonnen. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Gene, mit geringfügigen Abweichungen, über die gesamten Ontogenese von *A. thaliana* durchgängig und in etwa gleich stark exprimiert werden (Abb. 3.5). Auch das organ- und gewebespezifische Expressionsmuster der *AtDAP*-Gene ist mit Ausnahme von *AtDAP1* fast ubiquitär (Abb. 3.5). Daher wird angenommen, dass die entsprechenden Proteine eine grundlegende Funktion im Stoffwechsel von *A. thaliana* haben und nicht nur in bestimmten Geweben, Organen, Entwicklungsstadien oder unter speziellen Stressbedingungen notwendig

sind. Weiterhin waren aber zum Teil Unterschiede in der Expressionsstärke in einzelnen Organen und Geweben ausgeprägt. Auch waren geringfügige Abweichungen der Expressionsstärke der Gene zwischen den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR und den Mikroarraydaten zu verzeichnen. Dennoch konnte anhand der Expressionsmuster eine generelle Übereinstimmung zwischen diesen Experimenten ermittelt werden. Vor allem das Expressionsmuster von *AtDAP1* war herausstechend, da dessen Expression vornehmlich auf chlorophyllhaltige Organe und Gewebe, z.B. den Kotyledonen, Hypokotyl, Stängel, Rosetten- und Hochblatt beschränkt war. Besonders deutlich wurde dies anhand der Promotor-GUS-Studien (Abb. 3.6). Dabei wurde keine Promotoraktivität von *AtDAP1* in der Keimwurzel oder in der Wurzel adulter Pflanzen ermittelt. Des Weiteren war eine klare Differenzierung der Expression innerhalb der Blüte erkennbar. Eine Expression war in Kelch- und Fruchtblättern, nicht aber in den heterotrophen Blüten- und Staubblättern zu verzeichnen. Die Korrelation der Expression von *AtDAP1* mit chlorophyllhaltigen, photosynthetischaktiven Organen und Geweben und die plastidäre Lokalisation, lässt auf eine Assoziation mit Prozessen in Verbindung oder Abhängigkeit von der Photosynthese vermuten. Somit wäre für das ebenfalls plastidär lokalisierte Protein AtDAP2, aufgrund der zusätzlichen Expression in heterotrophen Organen und Geweben (Abb. 3.5, Abb. 3.6), eine eher grundlegende Funktion in Plastiden anzunehmen. Anhand der Expressionsmuster und der nicht gesicherten subzellulären Lokalisationen von AtDAP3, AtDAP4 und AtDAP5 (Abb. 3.5) konnten keine Anhaltspunkte für spezifische Funktionen dieser Proteine gewonnen werden.

4.4 Molekularbiologische Analyse der Mutanten für die *AtDAP*-Genfamilie

Um die Funktion der einzelnen *AtDAP*-Gene zu untersuchen, wurden zwei Ansätze der *reverse genetics* verfolgt. Zunächst wurden T-DNA Insertionslinien für die einzelnen Gene im Genom von *A. thaliana* identifiziert, homozygote Pflanzen isoliert und molekularbiologisch analysiert. Dabei konnten für jedes *AtDAP*-Gen mindestens eine T-DNA Insertionslinie in verschiedenen Kollektionen von T-DNA Insertionsmutanten (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003) als potenzieller Kandidat für einen Gen-*knock-out* identifiziert werden. Für diese Linien konnten in der überwiegenden Anzahl der Fälle homozygote Mutanten isoliert werden, von welchen die Kopienzahl der im Genom befindlichen T-DNA Insertionen mittels Southern-Blot Analysen ermittelt wurde (Tab. 3.3, Abb. 3.8). Für die T-DNA Mutanten des Gens *AtDAP1* wurden in den Linien *dap1-1* und *dap1-2* jeweils nur eine

Insertion im 11. Intron bzw. im 5. Exon nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass für beide Allele kein vollständiges Transkript von *AtDAP1* mehr nachweisbar war (Abb. 3.9). Demzufolge werden *dap1-1* und *dap1-2* als *knock-out*- oder *null*-Mutanten angesehen. Die schon angesprochene *que2*-Mutante trägt eine T-DNA Insertion im 5'UTR von *AtDAP1* (Beran, 2006). Wie viele T-DNA Insertionen in dieser Linie vorhanden sind und im welchen Umfang noch ein Transkript von *AtDAP1* existiert, wurde noch nicht verifiziert. Es wird jedoch aufgrund des Phänotyps dieser Linie davon ausgegangen, dass es sich um eine *knock-out*-Mutante handelt (Beran, 2006). Da beide *knock-out*-Linien *dap1-1* und *dap1-2* sowie die *que2*-Mutante (Beran, 2006) einen identischen Phänotyp zeigen, kann mit hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Ursache des beobachteten Phänotyps im Gendefekt von *AtDAP1* zu suchen ist.

Für die Mutante *dap2-1* wurde neben einer T-DNA Insertion im 1. Intron des Gens *AtDAP2* weitere Insertionen detektiert. Untersuchungen für T-DNA Insertionslinien aus verschiedenen Kollektionen zeigen, dass durchschnittlich ca. 1,5 Insertionen pro Linie im Genom dieser zu detektieren sind (McElver *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003). Rückkreuzungen der Mutante *dap2-1* mit dem Wildtyp führten zu keiner Verringerung der Anzahl an T-DNA Insertionen. Es konnte aber statistisch abgesichert werden, dass der Phänotyp der *dap2-1*-Mutante nur in Verbindung mit einer homozygoten T-DNA Insertion im Gen für *AtDAP2* auftritt. Weiterhin handelt es sich auch bei der Mutante *dap2-1* um ein *knock-out*-Allel, da für das entsprechenden Gen kein vollständiges Transkript nachzuweisen war (Abb. 3.9). In der Mutante *dap3-1*, die eine T-DNA Insertion im 1. Intron im Gen von *AtDAP3* trägt, wurde für *AtDAP3* der gleiche Transkriptgehalt wie im Wildtyp ermittelt (Abb. 3.9). In diesem Fall wird das *AtDAP3* vollständig transkribiert, die mRNA korrekt prozessiert (*splicing*) und somit sollte auch ein funktionelles Protein vorhanden sein. Auch für die Mutante *dap4-1* und *dap4-2*, welche T-DNA Insertionen im 2. Intron bzw. 4. Exon im Gen von *AtDAP4* haben, wurden mehrere Insertionen nachgewiesen. Die Mutanten *dap4-1* zeigt einen verminderten Transkriptgehalt von *AtDAP4* (Abb. 3.9). Somit ist *dap4-1* als ein *kock-down*-Allel anzusehen. Weiterhin ist anzunehmen, dass in dieser Mutante in geringem Umfang noch funktionelles Protein von *AtDAP4* gebildet wird. Dahingegen war für *dap4-2* kein Transkript des entsprechenden Genes zu ermitteln (Abb. 3.9). Daher wurde mit der *dap4-2*-Mutante ein *kock-out*-Allel von *AtDAP4* isoliert. Für die Mutante *dap5-1* wurde neben der T-DNA Insertion im 6. Intron des Gens *AtDAP5* eine weitere Insertion im Genom festgestellt. Da kein vollständiges Transkript von *AtDAP5* in der *dap5-1*-Mutante zu detektieren war (Abb. 3.9), muss diese als *kock-out* angesehen werden. Es ist weiterführend anzumerken, dass

nicht in allen Linien untersucht wurde, in wie weit der vor der T-DNA Insertion liegenden Teil des Gens transkribieren wird. Daher kann nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass gegebenenfalls nicht doch noch kürzere (*truncated*) Proteinefragmente synthetisiert werden können. Inwieweit solche Proteine noch funktionell sein würden ist spekulativ.

Zusammenfassend konnte mit Ausnahme von *AtDAP3* für jedes der *AtDAP*-Gene mindestens eine T-DNA Insertionslinie mit *knock-out* des entsprechenden Gens isoliert werden. Die erzeugten Rückkreuzungen der verschiedenen Linien mit dem Wildtyp führten dabei nicht zu einer Reduktion der Anzahl der T-DNA Insertionen. Daher wird angenommen, dass die Insertionen kosegregieren, d.h. dass sich die Insertionen in relativer Nähe zum Zielgen befinden und/oder dass es sich um Mehrfachinsertionen, sogenannte *tandem insertions*, im Zielgen handelt. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass es sich bei den Mutanten von *dap1-1*, *dap1-2* und *dap2-1* um rezessive Allele der entsprechenden Gene handelt. Des Weiteren konnte durch Kreuzungen dieser Mutanten gezeigt werden, dass sich *dap1-1* und *dap1-2* zueinander allelisch verhalten (Abb. 3.12). Da sowohl *AtDAP1* als auch *AtDAP2* eine chloroplastidäre Lokalisation aufweisen, wurde eine teilweise funktionelle Redundanz durch Kreuzungen der *knock-out*-Mutanten untersucht. Da sich das Expressionsmuster der beiden Gene in heterotrophen Organen und Geweben aber markant unterscheidet (siehe Kap. 3.3), ist *per se* nicht von einer Redundanz in diesen Geweben auszugehen. Die erzeugten *dap1 dap2*-Doppelmutanten sind identisch mit dem Phänotyp von *dap2-1*, welche den drastischeren Phänotyp hat (Abb. 3.12). Daraus wird geschlossen, dass diese beiden Proteine unterschiedliche Funktionen in der Pflanze haben, auch wenn sie vielleicht den gleichen oder einen ähnlichen Prozess ausüben. Dabei wäre, z.B. an die Ausübung des gleichen Prozesses aber in unterschiedlichen intraplastidären Reaktionsräumen, z.B. Membransystemen denkbar. Des Weiteren kann eine direkte Interaktion von beiden Proteinen ausgeschlossen werden, da ansonsten identische Phänotypen schon bei den jeweiligen Einzelmutanten zu erwarten gewesen wären.

Als zweiter Ansatz der *reverse genetics* wurde versucht, die Expression der *AtDAP*-Gen mittels gerichtetem *gene silencing* durch die Expression artifizieller microRNAs (amiRNAs) (Schwab *et al.*, 2006) zu unterbinden. Dadurch sollten die Phänotypen der *knock-out*-Mutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* mittels einer unabhängigen Methodik verifiziert werden.

Die Mutanten mit den amiRNA-Konstrukte gegen *AtDAP1* (amiR-dap1-1) und gegen *AtDAP2* (amiR-dap2-1) waren durch eine hohe phänotypische Varianz gekennzeichnet. Eine

ähnliche Varianz in der Ausprägungsstärke des Phänotyps war auch in den Untersuchungen von Schwab *et al.* (2006) zu verzeichnen. Daher muss angenommen werden, dass die Ursache dafür in der Methode selbst begründet liegt. Für ca. ein Drittel der amiR-dap1-1-Mutanten bestand große morphologische Ähnlichkeiten zum Phänotyp der T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1* (Abb. 3.13A). Diese amiRNA-dap1-1-Mutanten wiesen einen drastisch reduzierten *AtDAP1*-Transkriptgehalt auf (Abb. 3.13B). Bei den restlichen Linien wurden intermediäre oder wildtypische Phänotypen beobachtet, was auf eine nur geringfügige Reduktion des *AtDAP1*-Transkriptgehalts zurückzuführen war. Auch von den amiR-dap2-1-Mutanten zeigten ca. ein Drittel der Pflanzen morphologische Übereinstimmungen mit dem Phänotyp der T-DNA Insertionsmutanten *dap2-1* (Abb. 3.14A). Dieser Teil der Mutanten durch einen deutlich reduzierten Gehalte von *AtDAP2*-Transkript gekennzeichnet (Abb. 3.14C). Es wurden für diese *knock-down*-Mutanten, aber nicht alle phänotypischen Eigenheiten der *knock-out*-Mutante *dap2-1*, wie z.B. die Keimungsletalität auf Erde, wiedergefunden. Darüber hinaus wurden in einigen Fällen zusätzliche Auffälligkeiten, z.B. eine Aufhellung im Bereich der Mittelrippe oder die Entwicklung von chlorotischen und nekrotischen Zonen für einzelne Blätter, beobachtet (Abb. 3.14B). Die restlichen Linien zeigten intermediäre Phänotypen oder den Phänotyp des Wildtyps. Diese amiR-dap2-1-Mutanten zeigten eine nur schwache Reduktion des *AtDAP2*-Transkriptgehalts.

Zusammenfassend lässt sich für die amiRNA-Mutanten gegen *AtDAP1* und *AtDAP2* festhalten, dass für beide verwendeten Konstrukte kein kompletter *knock-out* der entsprechenden Gene erzielt wurde. Dennoch konnten durch den amiRNA-vermittelten *gene silencing*-Effekt *knock-down*-Mutanten isoliert werden, für welche eine deutliche Korrelation zwischen der Stärke des auftretenden Phänotyps und der noch vorhandenen Transkriptmenge des Zielgens zu ermitteln war. Da die starken *knock-down*-Mutanten des amiRNA-Konstrukts amiR-dap1-1 und die *knock-out*-Linien *dap1-1* und *dap1-2* morphologisch über einen identischen Phänotyp verfügen, konnte verifiziert werden, dass die Ursache für den Phänotyp in einem Gendefekt von *AtDAP1* liegt. In Bezug auf den morphologischen Phänotyp zeigen die starken *knock-down*-Mutanten des Konstrukts amiR-dap2-1 und die *knock-out*-Linien *dap2-1* große Übereinstimmungen. Dennoch konnten einige Auffälligkeiten der *dap2-1*-Mutante nicht in den amiRNA-Mutanten gegen *AtDAP2* und umgekehrt wiedergefunden werden. Da in den amiRNA-Mutanten immer noch eine geringe Mengen an *AtDAP2*-Transkript existiert, wird angenommen, dass auch noch in geringem Umfang das entsprechende Protein gebildet werden kann. Dadurch könnten eventuelle die gravierendsten Folgen des Funktionsverlusts von *AtDAP2* abgemildert werden, was eine Erklärung für die

Unterschiede, z.B. der Keimungsletalität auf Erde, liefern würde. Trotz der Unterschiede wird davon ausgegangen, dass der Gendefekt von *AtDAP2* die Ursache für den Phänotyp, der die beiden Mutanten *dap2-1* und *amiR-dap2-1* kennzeichnet, ist.

Durch eine genetische Komplementation der T-DNA Insertionsmutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* sollte untersucht werden, ob die *knock-out*-Mutanten zu revertieren sind (Abb. 3.25). Zusätzlich wurde analysiert, welche Auswirkung die Überexpression dieser Gene im Wildtyp hervorruft. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs der Gene unter Verwendung des 35S CaMV-Promotors konstitutiv überexprimiert. Durch eine Expression der cDNA von *AtDAP1* konnten die *knock-out*-Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* morphologisch und physiologisch komplementiert werden, wodurch der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt wurde. Dahingegen war es nicht möglich, die *dap1*-Mutanten durch Expression der cDNA von *AtDAP2* zu komplementieren, was eine unterschiedliche Funktion der beiden Proteine vermuten lässt. Auch für die *knock-out*-Mutante *dap2-1* war es durch Expression der cDNA von *AtDAP2* möglich, die Mutante morphologisch und physiologisch wiederherzustellen. Auch das gestörte Keimverhalten der *dap2-1*-Mutante auf Erde konnte revertiert werden. Diese Komplementation zeigt eindeutig, dass die Keimlingsletalität auf Erde mit dem *knock-out* von *AtDAP2* und nicht mit einer weiteren T-DNA Insertion zusammenhängt. Eine Überexpression der Gene *AtDAP1* und *AtDAP2* im Wildtyp zeigte keine erkennbaren Auffälligkeiten. Weiterhin wurde ein Konstrukt von *AtDAP2* generiert, in welchem das Transitpeptid von *AtDAP2* gegen das Transitpeptid von *AtDAP1* ausgetauscht wurde. Interessanterweise war es durch die Überexpression dieses Fusionsproteins möglich, die *knock-out*-Mutanten von *dap1* morphologisch und physiologisch wiederherzustellen. Das verdeutlicht, dass *AtDAP1* und *AtDAP2* die gleiche Funktion ausüben können. Auch durch mehrmalige Transformation der *dap2-1*-Mutante mit diesem Konstrukt war es bisher nicht möglich, transgene Pflanzen zu erhalten. Da die *dap2-1*-Mutante durch einen sehr drastischen Phänotyp gekennzeichnet ist und infolgedessen nur eine geringe Samenanzahl liefert, ist eine abschließende Aussage vorerst jedoch noch nicht gesichert. Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Komplementation der *dap2-1*-Mutanten auch für ein Konstrukt von *AtDAP1* mit dem Transitpeptid von *AtDAP2* zu beobachten wäre. Die vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Proteine *AtDAP1* und *AtDAP2* durchaus eine ähnliche Funktion haben, dass diese aber maßgeblich durch das Transitpeptid bestimmt wird. Daher wird vermutet, dass für die Proteine von *AtDAP1* und *AtDAP2* tatsächlich eine unterschiedliche intraplastidäre Lokalisation vorhanden ist, die bestimmend für deren

physiologische Funktion ist. Durch die erfolgreiche morphologische und physiologische Komplementation der *knock-out*-Mutanten von *dap1* und *dap2* mit den cDNAs der entsprechenden Gene wird es als gesichert angesehen, dass die Ursache der Phänotypen in den jeweiligen Mutanten auf einem Funktionsverlust von *AtDAP1* bzw. *AtDAP2* beruht.

Weiterhin wurde untersucht, ob die homologen DAP-Proteine aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage sind, die *dap1*-Mutanten genetisch zu komplementieren (Abb. 3.26). Die homologe Proteine wurden dazu mit dem Transitpeptid von *AtDAP1* versehen, um die gleiche subzelluläre Lokalisation zu gewährleisten. Obwohl eine Expression der beiden Homologen in den transgenen Pflanzen durch RT-PCR bestätigt wurde, war für beide Konstrukte keine Komplementation der *dap1-knock-out*-Mutanten zu erkennen. Daraus müsste geschlossen werden, dass die DAP-Homologe aus *Synechocystis* und *S. cerevisiae* entweder nicht translatiert werden oder aufgrund der verhältnismäßig geringen Aminosäureidentität zu *AtDAP1* (40 bzw. 29%) unterschiedliche Funktionen in den jeweiligen Organismen haben. Für die DAP-Homologe aus *Synechocystis* und *S. cerevisiae* bestehen zum Teil geringfügig höhere Aminosäureidentitäten zu den anderen Mitgliedern der DAP-Familie von *A. thaliana* (vgl. Tab. 3.1). Es wäre denkbar, dass Unterschiede in der metabolischen Kompatibilität, in der Regulation oder in der Interaktion mit weiteren Komponenten und Proteinen zwischen den homologen Proteinen aus phototrophen und heterotrophen Organismen bestehen, die eine direkte Komplementation erschweren. So wäre erklärbar, warum z.B. das DAP-Homolog aus *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist die Mutante des plastidären Proteins *AtDAP1* wiederherzustellen. Weiterhin weist das DAP-Homolog aus *Synechocystis* bei gleicher Sequenzabdeckung eine geringfügig höhere Aminosäureidentität zu *AtDAP2* (44%) als zu *AtDAP1* (40%) auf. Dabei könnte es sich eventuell, wie zuvor beschrieben, um essentielle Unterschiede handeln. Um diese Annahme zu überprüfen, müssten weitere Untersuchungen geführt werden. Dafür würde sich eine Komplementation der *knock-out*-Mutante von *AtDAP2* mit dem DAP-Homolog aus *Synechocystis* anbieten. Weiterführend könnte auch eine Komplementation der Mutanten von *S. cerevisiae* mit den einzelnen DAP-Proteinen von *A. thaliana* einen geeigneten Ansatz zur Überprüfung dieser Hypothese darstellen.

4.5 Phänotyp der *dap*-Mutanten

Da die *knock-out*-Mutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* durch phänotypische Auffälligkeiten gekennzeichnet waren, wurden diese im Folgenden eingehender physiologisch charakterisiert.

4.4.1 Phänotyp der *dap1*-Mutanten

4.5.2.1 Morphologie und Wachstumscharakteristika

Die markantesten Charakteristika der *knock-out*-Mutanten *dap1-1* und *dap1-2* waren die generelle Größenreduktion und die gelbliche Blattfarbe (Abb. 3.10). Dabei waren die Phänotypen der beiden *knock-out*-Allele *dap1-1* und *dap1-2* morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Ähnliche phänotypische Auffälligkeiten wurden auch für die *que2*-Mutante ermittelt (Beran, 2006). Weiterhin war für die *dap1*-Mutanten eine Größenreduktion in der Blattfläche, der Wurzellänge, der Stängelhöhe, der Blüthengröße und der Schotenlänge nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden die Wachstumseigenschaften der Mutanten unter Langtag- und Kurztagbedingungen untersucht (Tab. 3.4). Mit abnehmender Photoperiode war eine Zunahme der Blattanzahl und des Blattrosettendurchmessers sowohl für Wildtyp als auch die *dap1*-Mutanten zu verzeichnen. Dabei blieben aber die Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp und den *dap1*-Mutanten bei allen Lichtbedingungen bestehen. Für den Blattrosettendurchmesser war die geringste Differenz bei Langtagbedingungen von LD 12/12 h zu verzeichnen. In Hinsicht auf die Blattanzahl wurde die geringste Differenz bei Kurztagbedingungen von LD 8/16 h ermittelt. Des Weiteren war mit Abnahme der Photoperiode eine Zunahme der Zeitdauer zur Anthese, Blüte sowie zur Schotenbildung beim Wildtyp und den *dap1*-Mutanten zu beobachten. Der Zeitpunkt der Anthese war für die *dap1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp bei Langtagbedingung von LD 16/8 h und LD 12/12 um 2 bzw. 14 Tage und bei Kurztagbedingungen um sogar 75 Tage verzögert. Für die Zeitdauer von der Anthese bis zur Blüte und Schotenbildung waren jedoch keine Unterschiede zum Wildtyp zu ermitteln. Dies zeigt, dass bei den *dap1*-Mutanten nur der Übergang von der vegetativen in die generative Phase eine Störungen aufweist. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Schotenlänge und Samenanzahl bei den *dap1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp für die unterschiedlichen Photoperioden ermittelt. Das wurde für die *que2*-Mutante

nicht verzeichnet (Beran, 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den untersuchten Photoperioden die Wachstumsunterschiede und die phänotypischen Auffälligkeiten der *dap1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp bestehen bleiben.

Die Analyse des Chlorophyllgehalts der *dap1*-Mutanten zeigte eine deutliche Verringerung der Chlorophyll a+b-Gehalte (Tab. 3.6). Der Chlorophyll a+b-Gehalt waren für *dap1-1* um 32% und für *dap1-2* um 50% geringer als im Wildtyp. Diese Veränderung ist vermutlich die Erklärung für die gelbliche Blattfarbe der Mutanten. Ein weniger drastischer Wert von -20% wurde von Beran (2006) für *que2* ermittelt. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis der *dap1*-Mutanten war jedoch nicht signifikant verändert. Der reduzierte Gesamtchlorophyllgehalt und das unveränderte Chlorophyll a/b-Verhältnis deutet auf eine geringere Anzahl an Reaktionszentren und Lichtsammelkomplexen hin. Dahingegen wurde für *que2* eine Reduktion des Chlorophyll a/b-Verhältnisses und des β -Carotiningehalts von -12% bzw. -16% unter Normallicht (PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestimmt (Beran, 2006). Der erniedrigte β -Carotiningehalt und Chlorophyll b-Gehalt lässt in diesem Fall auf eine verringerte Anzahl von Reaktionszentren im Verhältnis zu den Lichtsammelkomplexen schließen. Weiterführend zeigten Western-Blot Analysen eine Reduktion des Proteingehalts von D1, PsaC und PsaA/B und unterstützen diese Annahme (Beran, 2006). Auch die um 33% erhöhte Menge der Pigmente des Xanthophyllzyklus (VAZ) deutet auf erhöhten photooxidativen Stress für die Mutante hin (Beran, 2006).

Weiterführend wurde die Ultrastruktur der Chloroplasten der *dap1-1*-Mutanten untersucht (Abb. 3.20). Dabei war keine Form- oder Größenveränderung für die Chloroplasten der Mutante gegenüber den Chloroplasten des Wildtyps zu ermitteln. Auch die Akkumulation transitorischer Stärke war in der Mutante nicht beeinflusst. Es wurde aber eine erhöhte Stapelung der Granathylakoide für die *dap1-1*-Mutante festgestellt. Von Beran (2006) wurde für die *AtDAP1*-Mutante *que2* ein verringerter Gehalt für einige Proteine der Kernkomplexe von PSI (PsaA/B, PsaC) und PSII (D1) sowie ein stark erhöhter Gehalt an PsbS ermittelt. Eine veränderte stöchiometrische Zusammensetzung der Photosysteme könnte eine Ursache für die erhöhte Stapelung der Granathylakoide sein. Des Weiteren hat der pH-Gradient an der Thylakoidmembran einen Einfluss auf die Ausbildung von Granathylakoiden (Chow *et al.*, 2005). Der schnellere Aufbau des pH-Gradienten, der für die *que2*-Mutante aufgrund eines schnellen Aufbaus von qN vermutet wurde (Beran, 2006), könnte ebenfalls eine erhöhten Stapelung der Granathylakoide bewirken. Des Weiteren dienen Granthylakoide als Reservoir für photoinaktiviertes D1-Protein bis eine Reparatur vollzogen ist (Chow *et al.*, 2005). Das verringerte F_v/F_m -Verhältnis der *AtDAP1*-Mutanten zeigt eine erhöhte Photoinhibition des

D1-Proteins an. Somit kommt auch dieser Mechanismus als mögliche Ursache für eine stärkere Granathylakoidstapelung der *AtDAP1*-Mutanten in Betracht.

4.5.2.2 Photosynthesecharakteristika

Eine Untersuchung der Photosynthese-Parameter zeigte, dass das Fv/Fm-Verhältnis und Φ_{PSII} in den *dap1*-Mutanten bei einer PFD von $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ signifikant erniedrigt waren (Tab. 3.7). Das verdeutlicht, dass die Quantenausbeute des PSII sowohl im Dunklen als auch bei Belichtung vermindert war und eine Schädigung des PSII bzw. aktiver Mechanismen der aktiver Fluoreszenzlöschung vorhanden waren. Auch dieses wurde in ähnlicher Weise für die *que2*-Mutante von Beran (2006) beobachtet. Des Weiteren war bei dieser PFD qP für die *dap1*-Mutanten leicht erhöht, qN signifikant erhöht und die ETR signifikant erniedrigt.

Der Verlauf dieser Parameter wurde in einer Lichtreihe bei Lichtintensitäten von 25 bis $1100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ genauer untersucht (Abb. 3.15). Dabei war die ETR der *dap1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp außer bei sehr geringen Lichtintensitäten stark reduziert. Eine Verminderung der ETR wurde in ähnlicher Weise auch für die *que2*-Mutante *in vitro* und auch *in vivo* bestimmt (Beran, 2006). Dabei wurden auch *in vitro*-Messungen über die PSI-Aktivität sowie *in vivo*-Messungen über den Oxidationszustand des PSI durchgeführt. Dabei zeigte die *que2*-Mutante unter sättigenden Lichtbedingungen ($1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro* eine leicht höhere PSI-Aktivität als der Wildtyp. Des Weiteren wies das PSI der *que2*-Mutante schon bei einer Lichtintensität (PFD = $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) einen stark erhöhten Oxidationszustand von über 56% auf. Der Wert des Wildtyps lag bei nur 1,3%. Das zeigt, dass der Elektronentransport der Mutante selbst unter den Anzuchtbedingungen nicht angepasst ist. Ein signifikant erhöhter Oxidationszustand des PSI war auch noch bis zu einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zu verzeichnen (Beran, 2006). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine deutlich verringerter Elektronentransport vom PSII zu PSI in dieser Mutanten von *AtDAP1* existiert, der seine Ursache in einer verminderten PSII-Aktivität hat. Bis zu einer Lichtintensität von $750 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ lag das qP der *dap1*-Mutanten signifikant über dem Wert des Wildtyps. Das deutet eine höhere photochemische Fluoreszenzlöschung der *dap1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in diesem Bereich an, was für einen geringeren Reduktionszustand von Q_A spricht. Bei höheren Lichtintensitäten war qP für den Wildtyp und die Mutanten vergleichbar. Diese Ergebnisse stehen in Konflikt mit den von Beran (2006) erzielten Untersuchungen. In diesen hatte der Wildtyp bis zu einer Lichtintensität von 600

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ein geringfügig höheres qP als die *que2*-Mutante. Ab $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ waren für qP keine Unterschiede mehr zu verzeichnen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse lässt sich nicht erklären. Das qN der *dap1*-Mutanten war bei allen Lichtintensitäten signifikant erhöht. Da qN die thermische Dissipation der Anregungsenergie darstellt, wird ein deutlich erhöhter Anteil der Anregungsenergie von den *dap1*-Mutanten dissipiert und steht somit nicht für die photochemischen Prozesse zur Verfügung. Ein ähnlicher Verlauf von qN wurde auch von Beran (2006) für die *que2*-Mutante ermittelt. Zusätzlich wurden dabei die Hauptkomponenten von qN , qE und qI , einzeln bestimmt. Der Verlauf von qI war für den Wildtyp und die *que2*-Mutante identisch. Für qE jedoch war eine drastische Reduktion in der Mutante zu verzeichnen. Da qT nur eine untergeordnete Rolle für qN spielt und qI unverändert war, ist der Unterschied für qN zwischen dem Wildtyp und den *dap1*-Mutanten vornehmlich auf das verminderte qE zurückzuführen.

Weitere Untersuchungen wurden über den kinetischen Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzlöschung durchgeführt (Abb. 3.16). Dabei wurde für *dap1*-Mutanten in dunkeladaptierten Blättern ein erniedrigtes F_m und ein erhöhtes F_0 ermittelt. Da die Differenz von F_m und F_0 F_v ist, stellt die Veränderung dieser beiden Faktoren die Ursache für das verringerte F_v/F_m -Verhältnis und somit eine geringere Fähigkeit des PSII für Photochemie dar. Die Kinetik der Fluoreszenzlöschung der *dap1*-Mutanten bei Belichtung war durch einen sehr ungewöhnlichen Verlauf gekennzeichnet. Dabei war ein lichtinduzierter Abfall der Chlorophyllfluoreszenz sogar unter F_0 zu verzeichnen. Die Chlorophyllfluoreszenz stieg dann im weiteren Verlauf wieder sigmoid an. Somit scheint F_0 im Dunkeln tatsächlich erhöht zu sein, was lässt auf eine stärkere Reduktion von Q_A schließen. Des Weiteren schienen im belichteten Zustand, wenigstens zu Beginn der Belichtung, schnelle Mechanismen der Fluoreszenzlöschung aktiv zu sein. Diese vermittelten einen Abfall von F_t unter F_0 , so dass dabei ein geringerer Reduktionsstatus von Q_A anzunehmen ist. Danach schienen diese Mechanismen nicht mehr ausreichend zu sein und es kam wieder zu einer stärkeren Reduktion von Q_A und somit zu einem Anstieg von F_t . Des Weiteren war in der anschließenden Dunkelphase keine normale Erholungskinetik (*dark relaxation kinetic*) von F_m zu beobachten. Die Komponenten der schnellen (qE) und mittleren Phase der Dunkelerholung (qT) fehlen komplett. Nur die langsame Komponente, qI , war schwach ausgeprägt. Das für die *dap1*-Mutanten zu Beginn der Belichtung beobachtete Phänomen könnte eventuell mit einer schnelleren pH-abhängigen Fluoreszenzlöschung (qE) erklärt werden, die zu einem schnelleren Aufbau der pH-Gradienten über die Thylakoidmembran führen würde. Sobald dieser komplett etabliert ist, sind die Kapazitäten der Mutante

erschöpft, und es würde dann wieder zu einer Zunahme der Fluoreszenz kommen. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von qE ist dessen Fehlen bei der Erholungskinetik im Dunkeln.

4.5.2.3 Photooxidativer Stress

Die verringerte Anzahl an Reaktionszentren, das erhöhte qN sowie der erhöhte Gehalt an Xanthophyll, Tocopherol, Anthocayn und Ascorbat in jungen Pflanzen (Beran, 2006) lässt auf ein erhöhtes Maß an photooxidativem Stress für die Mutanten von *AtDAPI* schließen. Dennoch waren unter Normal- und Starklicht keine Unterschiede in der Konzentration von Wasserstoffperoxid für den Wildtyp und die *dapI*-Mutanten zu ermitteln (Abb. 3.17). Im Chloroplasten kann molekularer Sauerstoff von verschiedenen Komponenten der Elektronentransportkette reduziert werden (Asada, 1996; Apel und Hirt, 2004; Pitzschke *et al.*, 2006). Dabei scheint die Reduktion von molekularem Sauerstoff am PSI, die so genannte Mehler-Reaktion (Mehler 1951, Mehler und Brown, 1952), die dominante Rolle zu spielen. Da aber das PSI der *dapI*-Mutanten vor allem bei moderaten Lichtbedingungen eher in einem höheren Oxidationszustand als im Wildtyp vorliegt (Beran, 2006), wäre keine erhöhte Aktivität der Mehler-Reaktion zu erwarten. In den *dapI*-Mutanten war keine erhöhte Konzentration an Wasserstoffperoxid bei Normal- und Starklichtbedingungen nachzuweisen. Deshalb wird angenommen, dass es zu keiner vermehrten Bildung von Wasserstoffperoxid in den *dapI*-Mutanten kommt, diese effektiv kompensiert wird oder die verwendete Nachweismethode mittels DAP-Färbung nicht sensitiv genug ist, um geringe Unterschiede zu detektieren. Dahingegen deutet das verringerte F_v/F_m -Verhältnis, das erhöhte qN des PSII und der erhöhte Gehalt an Xanthophyll und Tocopherol (Beran, 2006) jedoch auf photooxidative Schäden direkt am PSII, spezifischer am D1-Protein, hin. Ungünstige physiologischen Bedingungen, z.B. Starklicht, haben eine starke Reduktion des PQ-*pool* zur Folge. Um die Überreduktion des PQ-*pool* und Schäden am photosynthetischen Apparat zu vermeiden, findet eine erhöhte Dissipation von Anregungsenergie (qN) statt. Wenn die Schutzmechanismen nicht mehr ausreichen, ist das angeregte Triplett-Chlorophyll im PSII-Reaktionszentrum ($^3P680^*$) in der Lage die Anregungsenergie auf Triplett-Sauerstoff (3O_2) zu übertragen (Durrant *et al.*, 1990; Keren *et al.*, 1995; Adir *et al.*, 2003). Bei dieser Reaktion entsteht das hochreaktive Singulett-Sauerstoff ($^1O_2^*$). Aufgrund seiner hohen Reaktivität ist Singulett-Sauerstoff in Lage mit Proteinen, Pigmenten und Lipiden in der unmittelbaren Umgebung zu reagieren. Dabei wird angenommen, dass Singulett-Sauerstoff die bedeutendste

Variante der Sauerstoffradikalen (ROS) als Ursache für den lichtinduzierten Verlust der PSII-Aktivität und den Abbau des D1-Proteins ist (Aro *et al.*, 1993; Hideg *et al.*, 1994; Hidge *et al.*, 1998; Nixon *et al.*, 2005). Tocopherol scheint dabei eine obligate Funktion bei der Beseitigung von Singulett-Sauerstoff am PSII zu haben (Trebst *et al.*, 2002; Krieger-Liszkay und Trebst, 2006). Somit wird angenommen, dass der erhöhte Gehalt an Xanthophyll, Tocopherol, Anthocyan und Ascorbat der Mutanten von *AtDAP1* eine Adaptation zur Prävention und Kompensation von photooxidativen Schäden des PSII darstellt. Zur Klärung dieses Sachverhalts ist deshalb die Verwendung weiterer Methoden, z.B. die Bestimmung von Singulett-Sauerstoff nach Flors *et al.* (2006) oder eine alternative Bestimmung der Konzentration von Wasserstoffperoxid nach Ngo und Lenhoff (1980), nötig. Weiterhin würde sich eine Untersuchung der Expression von photoprotektiven Enzymen, z.B. der Superoxid-Dismutase und der Ascorbat-Peroxidase, anbieten.

4.5.2.4 Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern

Durch die reduzierte photosynthetische Leistungsfähigkeit der *dap1*-Mutanten war eine Reduktion des Stärkegehaltes für diese Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen gewesen (Abb. 3.18). Der Saccharosegehalt war hingegen nicht verändert. Die Gehalte an Glukose und Fruktose für die *dap1*-Mutanten sind jedoch im Vergleich zum Wildtyp leicht vermindert. Das lässt vermuten, dass die Mutanten den Gehalt an Saccharose unter Verringerung des Hexosephosphat-*pool* aufrechterhalten. Da die Funktion von *AtDAP1* noch nicht genauer eingegrenzt werden konnte, werden die verminderten Stärke, Glukose- und Fruktosegehalte der Mutanten als eine Folge denn als Ursache der reduzierten photosynthetischen Leistungsfähigkeit angesehen.

Der Saccharosegehalt im Phloemsaft und die Remobilisierung von Stärke zu Saccharose bei einer Limitierung der Photosynthese sind wichtige Faktoren für die Blühinduktion von *A. thaliana* (Corbesier *et al.* 1998). Daher wird vermutet, dass die verzögerte Blüte der *dap1*-Mutanten eine Folge des verringerten Stärkegehalts ist.

4.4.2 Phänotyp der *dap2*-Mutante und der *dap1 dap2*-Doppelmutanten

4.5.2.1 Morphologie und Wachstumscharakteristika

Der Phänotyp der *knock-out*-Mutante *dap2-1* ist durch eine drastische Größenreduktion und eine gelbe Blattfarbe gekennzeichnet (Abb. 3.10, Abb. 3.11). Das auffälligste ist jedoch, dass diese Mutante nicht in der Lage ist, sich auf Erde über das Keimlingsstadium hinaus zu entwickeln und keimlingsletal ist. Nur bei einer Kultivierung unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen auf MS-Festmedium mit einer externen Kohlenstoffquelle, z.B. 1% (w/v) Saccharose, war eine Weiterentwicklung der *dap2-1*-Mutante zu verzeichnen. Im Anschluss daran war für die Mutante ein Überleben auf Erde möglich. Das deutet auf eine essentielle Bedeutung des *AtDAP2*-Gens in diesem Entwicklungsabschnitt hin. Dabei könnte man über eine Rolle in Zusammenhang mit der Chloroplastenbiogenese, der Entwicklung der Primärblättern und/oder der Umstellung auf den photoautotrophen Stoffwechsel spekulieren. Untersuchungen an adulten Pflanzen der *dap2-1*-Mutante waren somit nur bei einer vorherigen Kultivierung auf MS-Festmedium mit Saccharose möglich. Selbst unter diesen Bedingungen zeigte sich eine Größenvarianz innerhalb der Pflanzenpopulation der *dap2-1*-Mutante, was eventuell durch das Vorhandensein von weiteren T-DNA Insertionen in dieser Linie hervorgerufen wird. Das Rückkreuzungen der *dap2-1*-Mutante mit dem Wildtyp, führte nicht zu einer Verringerung der Anzahl der Insertionen. So muss angenommen werden, dass sich die weiteren T-DNA-Insertionen in unmittelbarer Nähe zum Locus oder im Locus von des *AtDAP2*-Gens befinden. Es konnte somit nicht eindeutig geklärt werden, ob die Größe der *dap2-1*-Mutante variabel ist oder ob die weiteren Insertionen dafür verantwortlich sind. Deshalb wurden die Pflanzen der *dap2-1*-Mutante in vier Gruppen eingeteilt (vgl. Abb. 3.11). Für die weiteren Analysen wurden jeweils nur Pflanzen der Gruppe 1 verwendet. Die homozygoten Doppelmutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* sind in ihrer phänotypischen Erscheinung mit der *dap2-1*-Mutante identisch.

Bei Langtagbedingungen mit einer Photoperiode von LD 16/8 h war für die *dap2-1*-Mutante eine Reduktion des Durchmessers der Blattrosette um 60% zu verzeichnen (Tab. 3.5). Dahingegen war die Blattanzahl nur um 10% verringert. Des Weiteren waren die Anthese, die Blüte und die Schotenbildung um 3, 4 bzw. 5 Tage im Vergleich zum Wildtyp verzögert, was die generelle Entwicklungsverzögerung der *dap2-1*-Mutante widerspiegelt. Weitere Reduktionen waren auch in der Blattfläche, der Wurzellänge, der Stängelhöhe, der

Blütengröße und der Schotenlänge nachzuweisen (Daten nicht gezeigt), so dass von einer generellen Größenreduktion für die *dap2-1*-Mutante ausgegangen wird.

Der Chlorophyll a+b-Gehalt der *dap2-1*-Mutante war gegenüber dem Wildtyp um 65% verringert. Dabei war das a/b-Verhältnis erhöht (Tab. 3.6). Zusammen gesehen deutet dies auf eine geringere Anzahl an Lichtsammelkomplexen im Verhältnis zu den Reaktionszentren an. Dieser Sachverhalt könnte in Verbindung mit einem erhöhtes Maß an photooxidativem Stress stehen. Ob dies für die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante tatsächlich der Fall ist, könnte eine Bestimmung von Sauerstoffradikalen (ROS), Pigmenten des Xanthophyllzyklus oder Antioxidantien wie Tocopherol und Ascorbat zeigen.

Auch für die Morphologie der Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante waren keine ultrastrukturellen Veränderungen zu erkennen (Abb. 3.21). Weiterführend wäre eine Analyse von auf Erde gewachsenen Keimlingen dieser Mutante interessant, da aufgrund der Keimlingsletalität eine essentielle Funktion von AtDAP2 in diesem Entwicklungsabschnitt vermutet wird.

4.5.2.2 Photosynthesecharakteristika

Auch für die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante fand eine Bestimmung der Photosynthese-Parameter bei einer PFD von $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ statt (Tab. 3.7). In beiden Mutanten war das Fv/Fm-Verhältnis und das ΦPSII erniedrigt. Dabei war das Fv/Fm-Verhältnis der *dap2-1*-Mutante etwas stärker verringert als für die *dap1*-Mutanten. Das Fv/Fm-Verhältnis der *dap1 dap2*-Doppelmutante war ähnlich dem der *dap1*-Mutanten erniedrigt. Auch diese Mutanten zeigten eine verminderte Quantenausbeute des PSII sowohl im Dunklen als auch bei Belichtung an. Weiterhin war qN signifikant erhöht und qP und die ETR signifikant vermindert. Dabei waren unter diesen Bedingungen qP und qN für die Doppelmutante etwas höher als für die *dap2-1*-Mutante. Im Vergleich zu den *dap1*-Mutanten war für die *dap2-1*-Mutante qP niedriger und qN etwa gleich groß. Die Verminderung der ETR war für die *dap1*-, *dap2*-Mutanten und die *dap1 dap2*-Doppelmutanten in etwa gleich.

In eine Reihe mit verschiedenen Lichtintensitäten wurde auch für die *dap2-1*-Mutante und die *dap1 dap2*-Doppelmutante eine signifikante Reduktion der ETR ähnlich wie für die *dap1*-Mutanten ermittelt (Abb. 3.15). Da für diese Mutanten keine PSI-Aktivitäten gemessen wurden, kann nur spekuliert werden, ob auch bei diesen Mutanten die Ursache des verminderten Elektronentransports ausschließlich in einer geringeren PSII-Aktivität

begründet ist. Das qP der *dap2-1*-Mutante und der *dap1 dap2*-Doppelmutante war bis zu einer Lichtintensität von $320 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mit dem Wildtyp vergleichbar. Ab einer Lichtintensität von $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ waren jedoch eine signifikante Verringerungen des qP für beide Mutanten zu verzeichnen, was einen höheren Reduktionsstatus von Q_A widerspiegelt. Das zeigt eine verminderte photochemische Leistungsfähigkeit der Mutanten bei höheren Lichtintensitäten. Das qN der *dap2-1*-Mutante und der *dap1 dap2*-Doppelmutante war, ähnlich wie bei den *dap1*-Mutanten, bei allen Lichtintensitäten signifikant erhöht. Somit wird auch von diesen Mutanten ein deutlich erhöhter Anteil der Anregungsenergie dissipiert und steht nicht für die photochemischen Prozesse zur Verfügung. Eine detaillierte Analyse von qE , qI und qT wurde für diese Mutanten noch nicht durchgeführt, so dass die genaue Ursache für das erhöhte qN unklar ist.

Untersuchungen zum kinetischen Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzlöschung für die *dap2-1*-Mutante zeigten bei dunkeladaptierten Blättern, wie bei den *dap1*-Mutanten, ein deutlich erniedrigtes F_m und ein leicht erhöhtes F_0 (Abb. 3.16). Daraus erklärt sich das reduzierte F_v/F_m -Verhältnis der Mutanten und die verminderte Fähigkeit des PSII für Photochemie. Des Weiteren muss auch für die *dap2-1*-Mutante ein höherer Redoxstatus von Q_A vermutet werden. Die weitere Kinetik der Fluoreszenzlöschung im Licht zeigte einen normalen Verlauf. Dabei war F_m' gegenüber dem Wildtyp ebenfalls verringert. In der anschließenden Dunkelphase wurde eine Erholungskinetik (*dark relaxation kinetic*) mit allen drei Komponenten, qE , qT und qI , beobachtet. Diese war entsprechend der verminderten Maximalfluoreszenz der Mutanten ebenfalls geringer ausgeprägt als im Wildtyp. Daher scheint die verringerte photosynthetische Leistungsfähigkeit der *dap2-1*-Mutante vor allem auf dem stark reduzierten F_m und dem erhöhten qN zu beruhen.

4.5.2.3 Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern

Trotz des verminderten Elektronentransports der *dap2-1*-Mutante waren erstaunlicher Weise keine Veränderungen für den Gehalt von Stärke, Saccharose, Glukose oder Fruktose im Vergleich zum Wildtyp zu ermitteln (Abb. 3.19). Ein Grund hierfür könnte in den unvermeidbaren photoheterotrophen Anzuchtbedingungen liegen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob bei einer längeren Wachstumsdauer (> 2 Wochen) unter photoautotrophen Bedingungen, z.B. bei Kurztagbedingungen, die gleichen Ergebnisse zu ermitteln wären.

4.6 Die homologen *DAP*-Gene aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Saccharomyces cerevisiae*

Um Indizien für eine mögliche Funktion der DAP-Proteine zu ermitteln, wurde versucht *knock-out*-Mutanten von weiteren Organismen zu erzeugen und zu analysieren. Dazu wurde das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 als photoautotropher Organismus und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als organoheterotropher Organismus aufgrund der bekannten Genomssequenzen (Kaneko *et al.*, 1996; Goffeau *et al.*, 1996) und der Möglichkeit zur gentechnischen Manipulation verwendet. Für beide Organismen wurde jeweils ein homologes DAP-Protein ermittelt. Dabei werden, ähnlich wie für die AtDAP-Proteine, α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt. Für das Homolog aus *Synechocystis* sind keine Funktionen bekannt. Das DAP-Protein aus *S. cerevisiae* verfügt über eine N-terminale Verlängerung, welche als Signalpeptid des sekretorischen Signalwegs vorhergesagt wird. Mittels einer GFP-Fusion wurde eine Lokalisation dieses Proteins in der Vakuole ermittelt (Huh *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde für Deletionsmutanten dieses Gens ein reduziertes Wachstum auf nichtfermentativen Kohlenstoffquellen zwar nachgewiesen aber nicht genauer analysiert (Giaever *et al.*, 2002; Steinmetz *et al.*, 2002). Darüber hinaus wird von Barbara *et al.* (2007) eine nichteingehend charakterisierte Beteiligung in der Ribosomenbiogenese postuliert.

Mittels homologe Rekombination wurden von *Synechocystis* Transformanten mit einer Insertion im *DAP*-Gen erzeugt (Kap. 3.9). Diese waren nicht komplett segregiert und zeigten keine augenscheinlichen Pänotyp. Auch durch mehrfache Vereinzlung und Erhöhung der Antibiotikakonzentration war es nicht möglich, komplett segregierte Insertionsmutanten, welche kein Wildtyp-Allel mehr im Genom tragen, zu isolieren. Daher wird angenommen, dass das *DAP*-Gen von *Synechocystis* eine essentielle Funktion hat, welche die Überlebensfähigkeit von *knock-out*-Mutanten stark einschränkt. Aufgrund der fehlenden *knock-out*-Mutanten war es für das DAP-Protein von *Synechocystis* nicht möglich eine Anhaltspunkte über dessen Funktionen zu gewinnen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich segregierte *knock-out*-Mutanten für dieses Gen unter veränderten physiologischen Bedingungen, z.B. bei photoheterotrophem Wachstum auf Glukose, isolieren lassen.

Zur Untersuchung von *knock-out*-Mutanten für das homologe *DAP*-Gen von *S. cerevisiae* wurden zwei unabhängige Deletionsstämme verwendet. Für die Mutantenstämme war ein Teil des Leserahmens des *DAP*-Gens deletiert und an dessen Stelle eine Resistenzgenkassette integriert (Abb. 3.23A). Damit ist die Synthese eines funktionellen Proteins unterbunden.

Eine Überprüfung der Mutanten zeigte die Existenz der Deletion und die Integration der Resistenzkassette in beiden Deletionsstämmen an (Abb. 3.23B). Somit ist für beide Deletionsmutanten ein kompletter *knock-out* des entsprechenden Gens anzunehmen. Das Wachstum der Deletionsmutanten unter Verwendung fermentativer Kohlenstoffquellen, wie Glukose und Galaktose, zeigte keine Auffälligkeiten (Abb. 3.24A). Für das Wachstum auf nichtfermentativen Kohlenstoffquellen, wie Ethanol, Glycerol, Ölsäure, Acetat und Laktat, war jedoch ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Wildtypstämmen zu ermitteln (Abb. 3.24B). Hierbei könnte das verlangsamte Wachstum sowohl auf eine generelle Reduktion der Wachstumsrate als auch auf ein vermindertes Vermögen zur Adaptation im *diauxic shift* zurückzuführen sein. Dabei könnte eine Störung sowohl bei der Erkennung (*sensing*) der Kohlenstoffquelle, deren Verwertung sowie der metabolischen Regulation vorliegen. Für das Wachstum auf Pyruvat, einer weiteren nichtfermentativen Kohlenstoffquelle, war keine Reduktion des Wachstums nachzuweisen (Abb. 3.24B). Da Laktat und Pyruvat strukturell sehr ähnlich sind, durch die Aktivität der Laktatdehydrogenase ineinander umgewandelt werden können und somit in gleicher Weise katabolisiert werden, ist eine Ursache für die Wachstumsunterschiede und die Funktion des DAP-Proteins in *S. cerevisiae* nicht exakt auszumachen.

4.7 Funktion von *AtDAP1* und *AtDAP2*

Da Mikroarray-Experimente von der *cue1-6*-Mutante und die *knock-out*-Mutanten von *S. cerevisiae* (Kap. 3.10) eine Verbindung von Pyruvat mit der Funktion von *AtDAP1* vermuten lassen, wurde versucht, weitere Indizien für diesen Zusammenhang zu ermitteln (Kap. 3.12). Dafür wurde das Wachstum der *dap1*- und *dap2*-Mutanten bei externem Zusatz von Pyruvat untersucht. Dabei wurde eine Wachstumsreduktion sowohl für den Wildtyp als auch die Mutanten durch Pyruvat beobachtet (Abb. 3.27). Weiterführend wurden keine deutliche Veränderung des Phänotyps der Mutanten durch den Zusatz von Pyruvat ermittelt. In einem zweiten Ansatz wurde versucht die plastidäre Verfügbarkeit von Pyruvat durch eine Überexpression der Phosphoenolpyruvat/Phosphattranslokatoren von *A. thaliana* zu erzielen. Dabei war keine Komplementation der *dap1*-Mutanten zu ermitteln (Abb. 3.28). Ob dabei die Aktivität der plastidären Pyruvat-Kinase ausreicht, um genügend Pyruvat aus PEP zu synthetisieren, ist unklar. Beide Experimente lassen nicht auf eine Limitation durch Pyruvat in den Mutanten schließen.

Um einen Einfluss der Proteine AtDAP1 und AtDAP2 auf die plastidäre Pyruvatkonzentration eindeutig zu verifizieren, wäre die Bestimmung der Gehalte von Pyruvat und PEP sowie von Fettsäuren, verzweigt-kettigen Aminosäuren und Terpenen aufschlussreich. Des Weiteren wäre die Überexpression der plastidären Pyruvatkinase, welche Pyruvat aus PEP synthetisiert, ein geeigneter Ansatz um Anhaltspunkte für eine Limitation der plastidären Verfügbarkeit von Pyruvat zu erhalten. Auch Kreuzungen der *dap*-Mutanten mit der *cue1-6*-Mutante und der *cue1-6*/PPDK-Mutante (Voll *al.*, 2003) könnten weitere Erkenntnisse liefern.

4.8 Ausblick

Für eine bestimmte Funktion der DAP-Proteine konnten keine konkreten Indizien gewonnen werden. Ob sie eine Funktion als Transporter haben ist zur Zeit unklar. Um zu klären welche Rolle die DAP-Proteine, speziell AtDAP1 und AtDAP2, für den pflanzlichen Metabolismus und die Entwicklung spielen, sind weitere Untersuchungen nötig. Dabei wäre eine Eingrenzung der Funktion von AtDAP1 und AtDAP2 durch die schon angesprochene Bestimmung der intraplastidären Lokalisation als vorrangiges Ziel anzusehen. Des Weiteren wären Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen, um Anhaltspunkte über die Interaktion der AtDAP-Proteine mit eventuell funktionell charakterisierten Proteinen zu erhalten, hilfreich. Dabei könnte das für Membranproteine geeignete *split-ubiquitin system* (Johnsson und Varshavsky, 1994; Stagljar *et al.*, 1998; Stagljar und Fields, 2002) verwendet werden. Auch vergleichende Expressionsanalysen der *dap*-Mutanten mit dem Wildtyp mittels DNA-Mikroarrays könnten spezifisch deregulierte Gene aufzeigen und somit entscheidende Hinweise über die Funktion der *AtDAP*-Gene liefern. Dabei wäre auch die Verwendung von induzierbaren amiRNA-Mutanten sinnvoll. Durch die Verwendung von induzierbaren Mutanten sollte es möglich sein frühe Veränderungen im Expressionsmuster zu detektieren und einen Großteil der kompensatorischen Mechanismen und pleiotrophen Veränderung auszuschließen. Weiterhin könnten auch Metabolom-Analysen Hinweise auf eine mögliche Funktion der Proteine erbringen. Sobald Hinweise für eine Beteiligung der DAP-Proteine in einem speziellen zellulären Prozeß oder Stoffwechselweg gewonnen wurden, wäre eine Kreuzung mit bekannten Mutanten des jeweiligen Prozesses oder eine physiologische Komplementation möglich, um eine Beteiligung der AtDAP-Proteine zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

Plastiden sind multifunktionelle Organellen von Pflanzenzellen. Neben der Photosynthese sind in ihnen eine Vielzahl von essentiellen Stoffwechselprozessen des pflanzlichen Metabolismus lokalisiert. Daher ist eine exakte Kontrolle und Regulation von Entwicklungs- und Stoffwechselfvorgängen sowie ein koordinierter Import von kernkodierten Proteinen unabdingbar. Der regulierte Stoffaustausch von Vorstufen, Intermediaten und Endprodukten über die Plastidenhüllmembranen durch die Aktivität von Transportproteinen ist eine notwendige Voraussetzung für die Integration plastidärer Stoffwechselprozesse in den Zellmetabolismus.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert, welche ein retardiertes Wachstum zeigte. Aufgrund der phänotypischen Charakteristika wurde die isolierte Mutante als *dwarf affected in photosynthetic electron transport rate 1 (dap1)* bezeichnet. Diese Mutante trägt eine T-DNA Insertion im genomischen Lokus des Gens *At1g64150*, dessen Protein als ein potentieller Kandidat für ein plastidäres Transportprotein angesehen wird. Das Genom von *A. thaliana* enthält vier weitere homologe Gene. Die entsprechenden Gene wurden als *AtDAP1 (At1g64150)*, *AtDAP2 (At4g13590)*, *AtDAP3 (At1g68650)*, *AtDAP4 (At1g25520)* und *AtDAP5 (At5g36290)* bezeichnet. Für diese Proteine werden mindestens fünf hydrophobe α -helikale Transmembrandomänen und zum Teil N-terminale Signalpeptide vorhergesagt. Des Weiteren konnten Paraloge für andere höhere Pflanzen, Cyanobakterien, heterotrophe Bakterien, Pilze und Tiere identifiziert werden. Für keines dieser Proteine ist bislang eine Funktion ermittelt worden.

In Übereinstimmung mit den *in silico* Vorhersagen wurde für *AtDAP1* und *AtDAP2* anhand von GFP-Fusionen die Existenz funktioneller plastidärer Signalpeptide sowie die plastidäre Lokalisation dieser Proteine nachgewiesen. Die subzelluläre Lokalisation von *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5* konnte nicht eindeutig ermittelt werden.

Expressionsanalysen für diese Gene zeigten ein nahezu ubiquitäres Expressionsmuster von *AtDAP2*, *AtDAP3*, *AtDAP4* und *AtDAP5*. Dahingegen wurde eine Expression von *AtDAP1* fast ausschließlich in chlorophyllhaltigen Geweben und Organen nachgewiesen.

Um die Funktion der *AtDAP*-Proteine zu analysieren, wurden für die entsprechenden Gene T-DNA Insertionslinien isoliert und verifiziert. Dabei konnte für *AtDAP1* neben der schon bekannten Mutante eine weitere *knock-out*-Linie ermittelt werden. Von *AtDAP2*, *AtDAP4* und *AtDAP5* wurde jeweils eine *knock-out*-Linie isoliert. Für *AtDAP3* konnte keine *knock-out*-

Linie ermittelt werden. Nur die *knock-out*-Mutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* waren durch phänotypische Auffälligkeiten gekennzeichnet.

Die beiden T-DNA Insertionslinien von *AtDAP1* waren durch beeinträchtigtetes Wachstum und eine gelbliche Blattfarbe charakterisiert. Durch die Überexpression der cDNA von *AtDAP1* war es möglich, die beiden *dap1*-Mutanten genetisch zu komplementieren. Des Weiteren zeigten auch Pflanzen, die mit einem amiRNA-Konstrukt gegen *AtDAP1* transformiert wurden, den gleichen Phänotyp wie die entsprechenden T-DNA Insertionslinien. Somit wurde verifiziert, dass der Phänotyp der *dap1*-Mutanten seine Ursache im Gendefekt von *AtDAP1* hat. Weiterführende Untersuchungen der T-DNA Insertionslinien von *AtDAP1* zeigten einen reduzierten Chlorophyllgehalt, eine verminderte PSII-Aktivität, eine erhöhte nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung und eine reduzierte photosynthetische Elektronentransportrate. Das deutet auf einen erhöhten photooxidativen Stress und eine verringerte photosynthetische Leistungsfähigkeit für die *dap1*-Mutanten hin. Durch die verminderte Leistungsfähigkeit der Photosynthese waren die Gehalte an Stärke, Glukose und Fruktose reduziert, was als Ursache für die Wachstumsreduktion der *dap1*-Mutanten angesehen wird. Des Weiteren zeigten die Chloroplasten der *dap1*-Mutanten eine erhöhte Stapelung der Granathylakoide.

Die T-DNA Insertionslinie von *AtDAP2* war unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen keimlingsletal. Unter photoheterotrophen Bedingungen war die *dap2-1*-Mutante durch ein stark reduziertes Wachstum und eine gelbe Blattfarbe gekennzeichnet. Die Komplementation dieser Mutanten konnte durch Überexpression der cDNA von *AtDAP2* gezeigt werden. Für Mutanten, die ein amiRNA-Konstrukt gegen *AtDAP2* tragen, wurde ein ähnlicher Phänotyp nachgewiesen. Das belegt, dass der Phänotyp der *dap2-1*-Mutante auf einen Gendefekt von *AtDAP2* zurückgeht. Die gelbe Blattfarbe dieser Mutante ist Folge des reduzierten Gesamtchlorophyllgehalts. Des Weiteren war auch die *dap2-1*-Mutante durch eine deutlich geringere PSII-Aktivität, eine reduzierte photosynthetische Elektronentransportrate und eine erhöhte nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung gekennzeichnet. Trotz der beeinträchtigten Photosyntheseleistung waren die Gehalte an Stärke, Saccharose, Glukose und Fruktose unverändert. Die Chloroplasten der *dap2-1*-Mutante zeigten keine ultrastrukturellen Auffälligkeiten.

Für eine Eingrenzung der Funktion der Proteine *AtDAP1* und *AtDAP2* liegen derzeit keine ausreichenden Erkenntnisse vor. Ob ihnen eine Funktion als Transporter zugeschrieben werden kann, ist unklar. Deshalb sind weitere molekulare und physiologische Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung dieser Proteine nötig.

6. Literaturverzeichnis

- Abdallah, F., Salamini, F., Leister, D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 5(4):141-142.
- Adams, K. L., Palmer, J. D. (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29(3):380-395.
- Adir, N., Zer, H., Shochat, S., Ohad, I. (2003) Photoinhibition - a historical perspective. *Photosynth Res* 76(1-3):343-370.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., Ecker, J. R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301(5633):653-657.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1):373-399.
- Aravind, L., Koonin, E. V. (2000) The STAS domain -- a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current Biology* 10(2):R53-R55.
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B. (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1143(2):113-134.
- Asada, K. (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol* 141(2):391-396.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Snuth, F. A., Seidman, J. G., and Struhl, K. (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Babiychuk, E., Muller, F., Eubel, H., Braun, H.-P., Frentzen, M., Kushnir, S. (2003) Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *The Plant Journal* 33(5):899-909.
- Barbara, K., Haley, T., Willis, K., Santangelo, G. (2007) The transcription factor Gcr1 stimulates cell growth by participating in nutrient-responsive gene expression on a global level. *Molecular Genetics and Genomics* 277(2):171-188.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., Kessler, F. (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403(6766):203-207.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sci*(316):1194-1199.
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J., Schleiff, E. (2004) Toc12, a Novel Subunit of the Intermembrane Space Preprotein Translocon of Chloroplasts. *Mol Biol Cell* 15(11):5130-5144.
- Behnke, H. D. (1991) Distribution and evolution of forms and types of sieve-elements plastids in the dicotyledons. *Aliso* 3:167-182.
- Beran, K. C. (2006) Charakterisierung einer Arabidopsis thaliana Knockout-Mutante für einen plastidären Transporter (AT1G64150). Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, Institut für Biochemie der Pflanzen.

- Bergmeyer, H. U. (1970) Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage. Weinheim: Verlags Chemie GmbH.
- Bertani, G. (1951) STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62(3):293-300.
- Bimboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7(6):1513-1523.
- Blackwell, R. D., Murray, A. J. S., Lea, P. J., Kendall, A. C., Hall, N. P., Turner, J. C., Wallgrove, R. M. (1988) The value of mutants unable to carry out photorespiration. *Photosynth Res* 16:155-176.
- Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K., Bauwe, H. (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the Last Unknown Enzyme in the Photorespiratory Cycle in Arabidopsis, Belongs to a Novel Kinase Family. *Plant Cell* 17(8):2413-2420.
- Bölter, B., Soll, J. (2001) Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO J* 20(5):935-940.
- Buchner, P., Takahashi, H., Hawkesford, M. J. (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J Exp Bot* 55(404):1765-1773.
- Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L. S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q., McElver, J., Patton, D. A., Martienssen, R., Grossniklaus, U., Ma, H., Law, M., Levin, J. Z. (2001) Arabidopsis Genes Essential for Seedling Viability: Isolation of Insertional Mutants and Molecular Cloning. *Genetics* 159(4):1765-1778.
- Butler, W. L. (1978) Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29(1):345-378.
- Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science* 5(4):174-182.
- Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S., Botstein, D. (1998) SGD: *Saccharomyces Genome Database*. *Nucl Acids Res* 26(1):73-79.
- Chow, W. S., Kim, E.-H., Horton, P., Anderson, J. M. (2005) Granal stacking of the thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physiochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochem Photobiol Sci* 4:1081-1090.
- Cline, K. (1986) Import of proteins into chloroplasts. Membrane integration of a thylakoid precursor protein reconstituted in chloroplast lysates. *J Biol Chem* 261(31):14804-14810.
- Cline, K., Mori, H. (2001) Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154(4):719-730.
- Corbesier, L., Lejeune, P., Bernier, G. (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206:131-137.
- Craciun, A., Jacobs, M., Vauterin, M. (2000) Arabidopsis loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms. *FEBS Letters* 487(2):234-238.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* 13(13):4777-4788.
- Deruere, J., Romer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kuntz, M., Camara, B. (1994) Fibril Assembly and Carotenoid Overaccumulation in Chromoplasts: A Model for Supramolecular Lipoprotein Structures. *Plant Cell* 6(1):119-133.

- Diebold, R., Schuster, J., Daschner, K., Binder, S. (2002) The Branched-Chain Amino Acid Transaminase Gene Family in Arabidopsis Encodes Plastid and Mitochondrial Proteins. *Plant Physiol* 129(2):540-550.
- Dörmann, P., Benning, C. (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* 7(3):112-118.
- Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., Benning, C. (1995) Isolation and Characterization of an Arabidopsis Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *Plant Cell* 7(11):1801-1810.
- Douce, R., Neuburger, M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Current Opinion in Plant Biology* 2(3):214-222.
- Durrant, J. R., Giorgi, L. B., Barber, J., Klug, D. R., Porter, G. (1990) Characterisation of triplet states in isolated Photosystem II reaction centres: Oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1017(2):167-175.
- Dyall, S. D., Brown, M. T., Johnson, P. J. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304(5668):253-257.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res* 19(6):1349-.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protocols* 2(4):953-971.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000) Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology* 300(4):1005-1016.
- Farmer, E. E., Almeras, E., Krishnamurthy, V. (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6(4):372-378.
- Fast, N. M., Kissinger, J. C., Roos, D. S., Keeling, P. J. (2001) Nuclear-Encoded, Plastid-Targeted Genes Suggest a Single Common Origin for Apicomplexan and Dinoflagellate Plastids. *Mol Biol Evol* 18(3):418-426.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132(1):6-13.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugiere, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. (2003) Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* 2(5):325-345
- Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(17):11487-11492.
- Flors, C., Fryer, M. J., Waring, J., Reeder, B., Bechtold, U., Mullineaux, P. M., Nonell, S., Wilson, M. T., Baker, N. R. (2006) Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green(R). *J Exp Bot* 57(8):1725-1734.
- Flügge, U.-I. (2000) Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends in Plant Science* 5(4):135-137.
- Flügge, U., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C. (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J* 8(1):39-46.
- Flügge, U., Stitt, M., Heldt, H. W. (1985) Light-driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. *FEBS Letters* 183(2):335-339.

- Flügge, U. I., Benz, R. (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett* 169:85-89.
- Forde, B. G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465(1-2):219-235.
- Frentzen, M. Acyltransferases and triacylglycerols. In: Moore T. S. J., editor; (1993) CRC Press, Boca Raton, FL. pp 195-230.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J.-B., Rudella, A., Sun, Q., Wijk, K. J. v. (2004) In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. *Plant Cell* 16(2):478-499.
- Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S., Osteryoung, K. W., Gage, D. A., Phinney, B. S. (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* 2(2):413-425.
- Genty, B., Briantis, J. M., Baker, N. R. (1989) The relation between quantum yield of photosynthetic transport and the quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta* 990:87-92.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.-D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.-y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896):387-391.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* 274(5287):546-567.
- Graan, T., Ort, D. R. (1984) Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 259(22):14003-14010.
- Gray, M. W., Doolittle, W. F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Mol Biol Rev* 46(1):1-42.
- Gunning, B. E. S. (2001) Membrane geometry of "open" prolamellar bodies. *Protoplasma* 215:4-15.
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., Flügge, U.-I. (2000) Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *The Plant Journal* 23(6):771-783.
- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Wada, H. (2002) Phosphatidylglycerol is Essential for the Development of Thylakoid Membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43(12):1456-1464.
- Hanson, A. D., Gregory Iii, J. F. (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3):244-249.
- Hanton, S., Matheson, L., Chatre, L., Rossi, M., Brandizzi, F. (2007) Post-Golgi protein traffic in the plant secretory pathway. *Plant Cell Reports*.

- Härtel, H., Dörmann, P., Benning, C. (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in Arabidopsis. PNAS 97(19):10649-10654.
- Hawkesford, M. J. (2003) Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family; redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* 117(2):155-163.
- Hedges, S., Blair, J., Venturi, M., Shoe, J. (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology* 4(1):2.
- Heldt, H. W. (2003) *Pflanzenbiochemie*. 3. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42(6):819-832.
- Hernández-Pinzón, I., Ross, J. H. E., Barnes, K. A., Damant, A. P., Murphy, D. J. (1999) Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta* 208(4):588-598.
- Herrmann, K. M. (1995) The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7(7):907-919.
- Herrmann, K. M., Weaver, L. M. (1999) THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1):473-503.
- Hideg, E., Kalai, T., Hideg, K., Vass, I. (1998) Photoinhibition of Photosynthesis in Vivo Results in Singlet Oxygen Production Detection via Nitroxide-Induced Fluorescence Quenching in Broad Bean Leaves. *Biochemistry* 37(33):11405-11411.
- Hideg, N., Spetea, C., Vass, I. (1994) Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynthesis Research* 39:191-199.
- Hinnah, S. C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J* 16(24):7351-7360.
- Hoeffler, J.-F., Hemmerlin, A., Grosdemange-Billiard, C., Bach, T. J., Rohmer, M. (2002) Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem J* 366(2):573-583.
- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science* 66(2):221-230.
- Hörmann, F., Küchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y., Soll, J. (2004) Tic32, an Essential Component in Chloroplast Biogenesis. *J Biol Chem* 279(33):34756-34762.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77(1):61-68.
- Howarth, J., Fourcroy, P., Davidian, J.-C., Smith, F., Hawkesford, M. (2003) Cloning of two contrasting high-affinity sulfate transporters from tomato induced by low sulfate and infection by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Planta* 218(1):58-64.
- Howitz, K. T., McCarty, R. E. (1985a) Substrate specificity of the pea chloroplast glycolate transporter. *Biochemistry* 24(14):3645-3650.
- Howitz, K. T., McCarty, R. E. (1985b) Kinetic characteristics of the chloroplast envelope glycolate transporter. *Biochemistry* 24(11):2645-2652.
- Howitz, K. T., McCarty, R. E. (1991) Solubilization, Partial Purification, and Reconstitution of the Glycolate/Glycerate Transporter from Chloroplast Inner Envelope Membranes. *Plant Physiol* 96(4):1060-1069.

- Hsieh, K., Huang, A. H. (2004) Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol* 136(3):3427-3434.
- Huang, C. Y., Ayliffe, M. A., Timmis, J. N. (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422(6927):72-76.
- Huber, S. C., Edwards, G. E. (1977) Transport in C₄ mesophyll chloroplasts characterization of the pyruvate carrier. *Biochim Biophys Acta* 462(3):583-602.
- Hugly, S., Somerville, C. (1992) A Role for Membrane Lipid Polyunsaturation in Chloroplast Biogenesis at Low Temperature. *Plant Physiol* 99(1):197-202.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425(6959):686-691.
- Husic, D. W., Husic, H. D., Tolbert, N. E. (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C₂ cycle. *CRC Crit Rev Plant Sci* 5:45-100.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- International Rice Genome Sequencing Project. (2005) The map-based sequence of the rice genome. 793-800 p.
- Jackson-Constan, D., Keegstra, K. (2001) Arabidopsis Genes Encoding Components of the Chloroplastic Protein Import Apparatus. *Plant Physiol* 125(4):1567-1576.
- Jarvis, P., Chen, L.-J., Li, H.-m., Peto, C. A., Fankhauser, C., Chory, J. (1998) An Arabidopsis Mutant Defective in the Plastid General Protein Import Apparatus. *Science* 282(5386):100-103.
- Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C., Chory, J. (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *PNAS* 97(14):8175-8179.
- Jarvis, P., Robinson, C. (2004) Mechanisms of Protein Import and Routing in Chloroplasts. *Current Biology* 14(24):R1064-R1077.
- Jarvis, P., Soll, J. (2002) Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* 1590(1-3):177-189.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6(13):3901-3907.
- Johnsson, N., Varshavsky, A. (1994) Split Ubiquitin as a Sensor of Protein Interactions In vivo. *PNAS* 91(22):10340-10344.
- Jordan, P., Fromme, p., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., Kraus, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411:909-917.
- Joyard, J., Teyssier, E., Miegé, C., Berny-Seigneurin, D., Marechal, E., Block, M. A., Dorne, A. J., Rolland, N., Ajlani, G., Douce, R. (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol* 118(3):715-723.
- Jürgens, G. (2004) MEMBRANE TRAFFICKING IN PLANTS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20(1):481-504.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996) Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Res* 3(3):109-136.

- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M., Yamaya, T., Takahashi, H. (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* 16(10):2693-2704.
- Kelly, A. A., Froehlich, J. E., Dörmann, P. (2003) Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell* 15(11):2694-2706.
- Keren, N., Gong, H., Ohad, I. (1995) Oscillations of Reaction Center II-D1 Protein Degradation in Vivo Induced by Repetitive Light Flashes. *J Biol Chem* 270(2):806-814.
- Kilian, O., Kroth, P. G. (2003) Evolution of Protein Targeting into "Complex" Plastids: The "Secretory Transport Hypothesis". *Plant Biol* 5:350-358.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjolander, K., Gruissem, W., Baginsky, S. (2004) The Arabidopsis thaliana Chloroplast Proteome Reveals Pathway Abundance and Novel Protein Functions. *Current Biology* 14(5):354-362.
- Knappe, S., Flügge, U.-I., Fischer, K. (2003a) Analysis of the Plastidic phosphate translocator Gene Family in Arabidopsis and Identification of New phosphate translocator-Homologous Transporters, Classified by Their Putative Substrate-Binding Site. *Plant Physiol* 131(3):1178-1190.
- Knappe, S., Lottgert, T., Schneider, A., Voll, L., Flügge, U.-I., Fischer, K. (2003b) Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in Arabidopsis-AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *The Plant Journal* 36(3):411-420.
- Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S., Nakai, M. (1999) Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. *FEBS Letters* 447(2-3):329-333.
- Koncz, C., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Reiss, B., Redei, G. P., Schell, J. (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in Arabidopsis thaliana. *EMBO J* 9(5):1337-1346.
- Koncz, C., Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383-396.
- Koo, A. J. K., Ohlrogge, J. B. (2002) The Predicted Candidates of Arabidopsis Plastid Inner Envelope Membrane Proteins and Their Expression Profiles. *Plant Physiol* 130(2):823-836.
- Koroleva, O. A., Tomlinson, M. L., Leader, D., Shaw, P., Doonan, J. H. (2005) High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *The Plant Journal* 41(1):162-174.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, I. I. R. M., Peterson, K. M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166(1):175-176.
- Krause, G. H., Weis, E. (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42(1):313-349.
- Krieger-Liszky, A., Trebst, A. (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J Exp Bot* 57(8):1677-1684.
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J., Westhoff, P. (2001) From the Cover: VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *PNAS* 98(7):4238-4242.

- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., Heins, L. (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* 21(22):6136-6145.
- Lancien, M., Gadal, P., Hodges, M. (2000) Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. *Plant Physiol* 123(3):817-824.
- Lancien, M., Lea, P. J. 2006. Amino Acid Synthesis in Plastids. Govindjee, editor. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Lange, B. M., Ghassemian, M. (2003) Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology* 51(6):925-948.
- Larkin, R. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Chory, J. (2003) GUN4, a Regulator of Chlorophyll Synthesis and Intracellular Signaling. *Science* 299(5608):902-906.
- Leister, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics* 19(1):47-56.
- Leister, D., Schneider, A. (2003) From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Int Rev Cytol* 228:31-83.
- Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A. R., Hodges, M. (2007) NAD-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Mutants of *Arabidopsis* Suggest the Enzyme Is Not Limiting for Nitrogen Assimilation. *Plant Physiol* 144(3):1546-1558.
- Lichtenthaler, H. K. (1999) THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1):47-65.
- Lichtenthaler, H. K., Jörg, S., Andrea, D., Michel, R. (1997a) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS letters* 400(3):271-274.
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., Schwender, J. (1997b) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 101(3):643-652.
- Liu, Y.-G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R. F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8(3):457-463.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72[thinsp]Å resolution. *Nature* 428(6980):287-292.
- Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven, CT, USA: Yale University Press.
- Martin, W., Herrmann, R. G. (1998) Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiol* 118(1):9-17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. (2002) From the Cover: Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *PNAS* 99(19):12246-12251.
- Martin, W., Schnarrenberger, C. (1997) The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32(1):1-18.
- Matheson, L. A., Hanton, S. L., Brandizzi, F. (2006) Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 9(6):601-609.
- Matsuoka, M. (1995) The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C4 plants: structure, regulation and evolution. *Plant Cell Physiol* 36(6):937-943.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51(345):659-668.

- McConn, M., Browse, J. (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* 8(3):403-416.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M. A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J. Z., Law, M., Meinke, D., Patton, D. (2001) Insertional Mutagenesis of Genes Required for Seed Development in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 159(4):1751-1763.
- McFadden, G. I., Waller, R. F. (1997) Plastids in parasites of humans. *Bioessays* 19(11):1033-1040.
- McHugh, S. G., Knowles, V. L., Blakeley, S. D., Sangwan, R. S., Miki, B. L., Dennis, D. T., Plaxton, W. C. (1995) Differential expression of cytosolic and plastid pyruvate kinase isozymes in tobacco. *Physiologia Plantarum* 95(4):507-514.
- Mehler, A. H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem* 33(1):65-77.
- Mehler, A. H., Brown, A. H. (1952) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. *Arch Biochem Biophys* 38:365-370.
- Meinke, D., Koornneef, M. (1997) Community standards for Arabidopsis genetics. *The Plant Journal* 12(2): 247-253.
- Mewes, H. W., Amid, C., Arnold, R., Frishman, D., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkötter, M., Pagel, P., Strack, N., Stumpflen, V., Warfsmann, J., Ruepp, A. (2004) MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes. *Nucl Acids Res* 32(suppl_1):D41-44.
- Millen, R. S., Olmstead, R. G., Adams, K. L., Palmer, J. D., Lao, N. T., Heggie, L., Kavanagh, T. A., Hibberd, J. M., Gray, J. C., Morden, C. W., Calie, P. J., Jermini, L. S., Wolfe, K. H. (2001) Many Parallel Losses of *infA* from Chloroplast DNA during Angiosperm Evolution with Multiple Independent Transfers to the Nucleus. *Plant Cell* 13(3):645-658.
- Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A., Chory, J. (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *PNAS* 98(4):2053-2058.
- Moore, M., Goforth, R. L., Mori, H., Henry, R. (2003) Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. *J Cell Biol* 162(7):1245-1254.
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., Henry, R. (2000) Chloroplast Oxa1p Homolog Albino3 Is Required for Post-translational Integration of the Light Harvesting Chlorophyll-binding Protein into Thylakoid Membranes. *J Biol Chem* 275(3):1529-1532.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. . *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 263-273 p.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., Iba, K. (2000) Trienoic Fatty Acids and Plant Tolerance of High Temperature. *Science* 287(5452):476-479.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497.
- Nachtigaller, A., Kolibril, O. (1999) Use of bipolar lenses in multiple arrays. *Metaphys Sci* 9(6):469-496.
- Nada, A., Soll, J. (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J Cell Sci* 117(17):3975-3982.
- Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S., Tanaka, A. (2005) Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in Arabidopsis thaliana and Implications for the Evolution of Prochlorococcus Species. *Plant Cell* 17(1):233-240.

- Nakamura, Y., Kaneko, T., Hirose, M., Miyajima, N., Tabata, S. (1998) CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl Acids Res* 26(1):63-67.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Miyajima, N., Tabata, S. (1999) Extension of CyanoBase. CyanoMutants: repository of mutant information on *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl Acids Res* 27(1):66-68.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Tabata, S. (2000) CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp. strain PCC6803: status for the year 2000. *Nucl Acids Res* 28(1):72-.
- Ngo, T. T., Lenhoff, H. M. (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal Biochem* 105(2):389-397.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10(1):1-6.
- Nixon, P. J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R., Komenda, J. (2005) FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot* 56(411):357-363.
- Novel, G., Novel, M. (1973) Mutants of *E. coli* K 12 unable to grow on methyl-beta-D-glucuronide: map location of uid A. locus of the structural gene of beta-D-glucuronidase. *Mol Gen Genet.* 120(4):319-339.
- Oblong, J. E., Lamppa, G. K. (1992) Precursor for the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein synthesized in *Escherichia coli* blocks import of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Biol Chem* 267(20):14328-14334.
- Ohlrogge, J. B., Kuhn, D. N., Stumpf, P. K. (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1194-1198.
- Ohnishi, J.-i., Flügge, U.-I., Heldt, H. W., Kanai, R. (1990) Involvement of Na⁺ in Active Uptake of Pyruvate in Mesophyll Chloroplasts of Some C₄ Plants : Na⁺/Pyruvate Cotransport. *Plant Physiol* 94(3):950-959.
- Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Bjorkman, O., Leegood, R. (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2(4):119-121.
- Parsley, K., Hibberd, J. (2006) The Arabidopsis PPDK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins. *Plant Molecular Biology* 62(3):339-349.
- Peltier, J.-B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., van Wijk, K. J. (2000) Proteomics of the Chloroplast: Systematic Identification and Targeting Analysis of Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteins. *Plant Cell* 12(3):319-342.
- Peoples, M. B., Dalling, M. J. (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. Nooden L. D., Leopold A. C., editors. San Diego: Academic Press. 181-217 p.
- Pitzschke, A., Forzani, C., Hirt, H. (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(9-10):1757-1764.
- Plaxton, W. C. (1989) Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor oil plant leaf and endosperm. *Eur J Biochem* 181:444-451.
- Qi, Q., Kleppinger-Sparace, K. F., Sparace, S. A. (1995) The Utilization of Glycolytic Intermediates as Precursors for Fatty Acid Biosynthesis by Pea Root Plastids. *Plant Physiol* 107(2):413-419.
- Radwanski, E. R., Last, R. L. (1995) Tryptophan Biosynthesis and Metabolism: Biochemical and Molecular Genetics. *Plant Cell* 7(7):921-934.

- Redman, J. C., Haas, B. J., Tanimoto, G., Town, C. D. (2004) Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *The Plant Journal* 38(3):545-561.
- Renne, P., Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U.-I., Westhoff, P., Weber, A. P. M. (2003) The Arabidopsis mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *The Plant Journal* 35(3):316-331.
- Reynolds, E. S. (1963) THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. *J Cell Biol* 17(1):208-212.
- Richly, E., Leister, D. (2004) An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice. *Gene* 329:11-16.
- Richter, S., Lamppa, G. K. (1999) Stromal Processing Peptidase Binds Transit Peptides and Initiates Their ATP-dependent Turnover in Chloroplasts. *J Cell Biol* 147(1):33-44.
- Rissler, H. M., Collakova, E., DellaPenna, D., Whelan, J., Pogson, B. J. (2002) Chlorophyll Biosynthesis. Expression of a Second Chl I Gene of Magnesium Chelatase in Arabidopsis Supports Only Limited Chlorophyll Synthesis. *Plant Physiol* 128(2):770-779.
- Robinson, C., Mant, A. (2005) Biogenesis of the thylakoid membrane. Moller S. G., editor. Oxford: Blackwell Publishing.
- Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A. (2002) Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiol* 130(3):1079-1089.
- Ross, J. H. E., Milanese, C., Murphy, D. J., Cresti, R. (2000) Rapidfreeze fixation and substitution improves tissue preservation of microspores and tapetum in *Brassica napus*. *Sex Plant Reprod* 12:237-240.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B. (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* V53(1):247-259.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. 365-386 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2. edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5463-5467.
- Sangwan, R. S., Gauthier, D. A., Turpin, D. H., Pomeroy, M. K., Plaxton, W. C. (1992) Pyruvate-kinase isoenzymes from zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Planta* 187(2):198-2002.
- Schnell, D. J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K., Soll, J. (1997) A consensus nomenclatur for protein-import components of the chloroplast envelop. *Trend Cell Bio* 7:3003-3304.
- Scholl, R. L., May, S. T., Ware, D. H. (2000) Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiol* 124(4):1477-1480.
- Schoof, H., Ernst, R., Nazarov, V., Pfeifer, L., Mewes, H.-W., Mayer, K. F. X. (2004) MIPS Arabidopsis thaliana Database (MAtdB): an integrated biological knowledge resource for plant genomics. *Nucl Acids Res* 32(suppl_1):D373-376.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* V10(1):51-62.
- Schulze-Siebert, D., Heineke, D., Scharf, H., Schultz, G. (1984) Pyruvate-Derived Amino Acids in Spinach Chloroplasts : Synthesis and Regulation during Photosynthetic Carbon Metabolism. *Plant Physiol* 76(2):465-471.

- Schünemann, D., Amin, P., Hartmann, E., Hoffman, N. E. (1999) Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* 274:12177-12182.
- Schünemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V., Jones, J. D. G., Nussaume, L., Hoffman, N. E. (1998) A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10312-10316.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(5):1121-1133.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I., Kunze, R. (2003) ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol* 131(1):16-26.
- Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (1998) High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *The Plant Journal* 15(5):707-720.
- Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., Shinozaki, K. (2002) Functional Annotation of a Full-Length Arabidopsis cDNA Collection. *Science* 296(5565):141-145.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S. A. (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* 14(12):2985-2994.
- Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M., Ladisch, S. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucl Acids Res* 32(2):e19.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., Davies, J. P. (2002) Selenate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *The Plant Journal* 29(4):475-486.
- Singh, B. K., Shaner, D. L. (1995) Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell* 7(7):935-944.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1991) *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 33. Auflage. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Sohrt, K., Soll, J. (2000) Toc64, a New Component of the Protein Translocon of Chloroplasts. *J Cell Biol* 148(6):1213-1222.
- Soll, J., Bolter, B., Wagner, R., Hinnah, S. C. (2000) ...response: The chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends in Plant Science* 5(4):137-138.
- Somerville, C. R. (1986) Analysis of Photosynthesis with Mutants of Higher Plants and Algae. *Annual Review of Plant Physiology* 37(1):467-506.
- Somerville, C. R. (2001) An Early Arabidopsis Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. *Plant Physiol* 125(1):20-24.
- Somerville, C. R., Ogren, W. L. (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. *Nature* 280(5725):833-836.
- Somerville, C. R., Ogren, W. L. (1981) Photorespiration-deficient Mutants of Arabidopsis thaliana Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. *Plant Physiol* 67(4):666-671.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.

- Stagljar, I., Fields, S. (2002) Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends in Biochemical Sciences* 27(11):559-563.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *PNAS* 95(9):5187-5192.
- Stegemann, S., Hartmann, S., Ruf, S., Bock, R. (2003) High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):8828-8833.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., Davis, R. W. (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* 31(4):400-404.
- Stoebe, B., Kowallik, K. V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends in Genetics* 15(9):344-347.
- Stomp, M.-A. (1992) *Histochemical Localization of β -Glucuronidase* San Diego: Academic Press. 103-113p.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R., Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421(6918):79-83.
- Streatfield, S. J., Weber, A., Kinsman, E. A., Hausler, R. E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W. M., Pyke, K. A., Flügge, U.-I., Chory, J. (1999) The Phosphoenolpyruvate/Phosphate Translocator Is Required for Phenolic Metabolism, Palisade Cell Development, and Plastid-Dependent Nuclear Gene Expression. *Plant Cell* 11(9):1609-1622.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* 426(6965):413-418.
- Sugiura, M., Georgescu, M. N., Takahashi, M. (2007) A Nitrite Transporter Associated with Nitrite Uptake by Higher Plant Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48(7):1022-1035.
- Sveshnikova, N., Grimm, R., Soll, J., Schleiff, E. (2000) Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biol Chem* 381(8):687-693.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. 3rd. edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc. Inc. Publ.
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., Saito, K. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 23(2):171-182.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N. K., Yoshida, K., Okada, K. (1998) Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *PNAS* 95(21):12719-12723.
- Tanaka, R., Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 58(1):321-346.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796-815.
- Thomson, W. W., Whatley, J. M. (1980) Development of nongreen plastids. *Annu Rev Plant Physiol* 31:375-394.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11(6):1187-1194.
- Tolbert, N. E. (1997) THE C₂ OXIDATIVE PHOTOSYNTHETIC CARBON CYCLE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1):1-25.
- Trebst, A., Depka, B., Hollander-Czytko, H. (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 516(1-3):156-160.

- van Bel, A. J. E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cel Environ* 26:125-149.
- Voll, L., Hausler, R. E., Hecker, R., Weber, A., Weissenbock, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S., Flügge, U.-I. (2003) The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *The Plant Journal* 36(3):301-317.
- Voll, L. M., Jamai, A., Renne, P., Voll, H., McClung, C. R., Weber, A. P. M. (2006) The Photorespiratory *Arabidopsis shm1* Mutant Is Deficient in SHM1. *Plant Physiol* 140(1):59-66.
- Vothknecht, U. C., Soll, J. (2006) Protein import into Chloroplasts: Who, When, and How? Govindjee, editor. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Weber, A., Flügge, U.-I. (2002) Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot* 53(370):865-874.
- Weber, A. P. M. (2006) Synthesis, Export and Partitioning of the End Products of Photosynthesis. Govindjee, editor. Dordrecht, The Netherlands: Springer
- Weber, A. P. M., Schneiderei, J., Voll, L. M. (2004) Using mutants to probe the in vivo function of plastid envelope membrane metabolite transporters. *J Exp Bot* 55(400):1231-1244.
- Weber, A. P. M., Schwacke, R., Flügge, U.-I. (2005) SOLUTE TRANSPORTERS OF THE PLASTID ENVELOPE MEMBRANE. *Annual Review of Plant Biology* 56(1):133-164.
- Weber, H., Vick, B. A., Farmer, E. E. (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *PNAS* 94(19):10473-10478.
- Willow, R. D. (2006) Chlorophyll Synthesis. Govindjee, editor. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Wingler, A., Lea, P. J., Leegood, R. C. (1997) Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase. *Planta* 202(2):171-178.
- Wingler, A., Lea, P. J., Leegood, R. C. (1999) Photorespiratory metabolism of glyoxylate and formate in glycine-accumulating mutants of barley and *Amaranthus edulis*. *Planta* 207(4):518-526.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., Leegood, R. C. (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355(1402):1517-1529.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., ccedil, oise, Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., eacute, ronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Davis, R. W. (1999) Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* 285(5429):901-906.
- Woo, K. C., Flügge, U. I., Heldt, H. W. (1987) A Two-Translocator Model for the Transport of 2-Oxoglutarate and Glutamate in Chloroplasts during Ammonia Assimilation in the Light. *Plant Physiol* 84(3):624-632.
- Woolhead, C. A., Thompson, S. J., Moore, M., Tissier, C., Mant, A., Rodger, A., Henry, R., Robinson, C. (2001) Distinct Albino3-dependent and -independent Pathways for Thylakoid Membrane Protein Insertion. *J Biol Chem* 276(44):40841-40846.

- Wright, A. D., Moehlenkamp, C. A., Perrot, G. H., Neuffer, M. G., Cone, K. C. (1992) The Maize Auxotrophic Mutant orange pericarp Is Defective in Duplicate Genes for Tryptophan Synthase [beta]. *Plant Cell* 4(6):711-719.
- Wurch, T., Lestienne, F., Petrus, J. P. (1998) A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques* 12(9):653-657.
- Xu, C., Hartel, H., Wada, H., Hagio, M., Yu, B., Eakin, C., Benning, C. (2002) The *pgp1* Mutant Locus of *Arabidopsis* Encodes a Phosphatidylglycerolphosphate Synthase with Impaired Activity. *Plant Physiol* 129(2):594-604.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., Bhattacharya, D. (2004) A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21(5):809-818.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Pinto, G., Bhattacharya, D. (2002) From the Cover: The single, ancient origin of chromist plastids. *PNAS* 99(24):15507-15512.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T., Takahashi, H. (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, *Sultr1;3*, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131(4):1511-1517.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F. W., Yamaya, T., Saito, K. (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 29(4):465-473.
- Zabrouskov, V., Giacomelli, L., van Wijk, K. J., McLafferty, F. W. (2003) A New Approach for Plant Proteomics: Characterization of Chloroplast Proteins of *Arabidopsis thaliana* by Top-down Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2(12):1253-1260.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T., Ansorge, W. (1990) A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucl Acids Res* 18(4):1067.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol* 136(1):2621-2632.

7. Anhang

7.1. Datenbanken und Internetadressen

ABRC, Arabidopsis Biological Resource Center

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm>

ARAMEMNON, plant membrane protein database (Schwacke *et al.*, 2003)

<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>

BRC, RIKEN Bioresource Center

<http://www.brc.riken.go.jp/lab/epd/Eng/index.html>

CyanoBase (Nakamura *et al.*, 1998; 1999; 2000)

<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/index.html>

EUROSCARF, EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis
(Winzeler *et al.*, 1999)

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

GABI-Kat, Kölner Ressourcenzentrum für *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Linien
(Rosso *et al.*, 2003)

<http://www.gabi-kat.de>

GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004)

<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>

MATDB, MIPS *Arabidopsis thaliana* Database (Schoof *et al.*, 2004)

<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/main.html>

MIPS, Munich Information Centre for Protein Sequences (Mewes *et al.*, 2002)

<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>

NASC, The European *Arabidopsis* Stock Centre, seed and DNA service

(Scholl *et al.*, 2000)

<http://arabidopsis.info>

NCBI, National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NCBI Entrez PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

PGreen

<http://www.pgreen.ac.uk>

Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000)

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

SIGnAL, "T-DNA Express" *Arabidopsis* Gene Mapping Tool

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

SGD, *Saccharomyces* Genome Database (Cherry *et al.*, 1998)

<http://www.yeastgenome.org>

TAIR, The *Arabidopsis* Information Resource

<http://www.arabidopsis.org>

WMD, Web MicroRNA Designer

<http://wmd.weigelworld.org>

7.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Primer zur cDNA-Synthese:		
oligo pdT	TTTTTTTTTTTTTTTTVN	Primer zur „first strand“-Synthese der cDNA
1g64150-GW-F	<u>CACCATGCTAAGTTTGAATCTCTCGGAG</u>	„sense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP1</i> mit START-Kodon und <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
4g13590-GW-F	<u>CACCATGAAGCTCACAAAGCTTGAGCAAG</u>	„sense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP2</i> mit START-Kodon und <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
1g68650-GW-F	<u>CACCATGGGGTCACTTTTGCAGGGTTTT</u>	„sense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP3</i> mit START-Kodon und <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
1g25520-GW-F	<u>CACCATGAGCTCGGTTTTTGCAGGGTTTT</u>	„sense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP4</i> mit START-Kodon und <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
5g36290-GW-F	<u>CACCATGGGTTTGATTTCAAACCCTACC</u>	„sense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP5</i> mit START-Kodon und <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
1g64150-GWc-1R	<u>TTACGTAACGATCTCAGCCACCGTCAC</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP1</i> mit STOP-Kodon
4g13590-GWc-3R	<u>TCAGAACACTCCAAAGAAATGTGGCTGC</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP2</i> mit STOP-Kodon
1g68650-GWc-1R	<u>TCAAGCATCAACCCGGAGTAAAGACCGA</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP3</i> mit STOP-Kodon
1g25520-GWc-1R	<u>TTAAGCCTCAACAGAAAGTAAAGATACGA</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP4</i> mit STOP-Kodon
5g36290-GWc-1R	<u>CTACAATGGAGGATAGAAATAGGAGGA</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP5</i> mit STOP-Kodon
1g64150-GWc-2R	<u>CGTAACGATCTCAGCCACCGTCACAGC</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP1</i> ohne STOP-Kodon
4g13590-GWc-4R	<u>GAACACTCCAAAAGAATGTGGCTGCAGC</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP2</i> ohne STOP-Kodon
1g68650-GWc-2R	<u>AGCATCAACCCGGAGTAAGAAGCGGACTG</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP3</i> ohne STOP-Kodon
1g25520-GWc-2R	<u>AGCCTCAACAGAAAGTAAGATACGATTG</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP4</i> ohne STOP-Kodon
5g36290-GWc-2R	<u>CAATGGAGGATAGAAAATAGGAGGAGAC</u>	„antisense“ Primer zur Synthese der cDNA von <i>AiDAP5</i> ohne STOP-Kodon
AiDAP2-Bam-1R	<u>GGATTCTCAGAACACTCCAAAAGAA</u>	„antisense“ Primer zur Analyse der Expression von <i>AiDAP2</i> in den <i>amiR-dap2-1</i> Mutanten

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Primer zur RT-PCR:		
AtAktin2-B2	GAAGCAAGAATGGAACCACCCG	„sense“ Primer zur Amplifikation der mRNA von Aktin2 aus <i>A. thaliana</i>
AtAktin2-F6	GGCAAGTCATCACGATTGG	„antisense“ Primer zur Amplifikation der mRNA von Aktin2 aus <i>A. thaliana</i>
Actin_1g_Fw	TAACTCTCCCGCTATGTATGTCCG	„sense“ Primer zur Amplifikation der mRNA von Aktin2 aus <i>A. thaliana</i>
Actin_1g_Rv	CCACTGAGCACAAATGTTACCGTAC	„antisense“ Primer zur Amplifikation der mRNA von Aktin2 aus <i>A. thaliana</i>
1g64150-RT2-F	CAAGAAAGAGAGATTCCAGAGAGTTC	„sense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP1 und der dap1-1 Mutante
1g64150-RT2-R	GAAACAGAACTCCTCCGACATAAG	„antisense“ Primer zur Verifikation und Analyse der gewebsspezifischen Expression von AtDAP1, der dap1-1 und den amiR-dap1-1 Mutanten
1g64150-RT4-F	CAATTGCGTCGAAATGAATCTCAG	„sense“ Primer zur Verifikation der dap1-2 Mutante
1g64150-RT4-R	GAAAGTGCCTCCAAGCACTACAGA	„antisense“ Primer zur Verifikation der dap1-2 Mutante
4g13590-RT1-F	TGAGCAAGAATGCTAATTCCACAG	„sense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP2 und der dap2-1 Mutante
4g13590-RT1-R	AGATAAAGCCCCCATTGAAACCTAA	„antisense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP2 und der dap2-1 Mutante
1g68650-RT1-F	AAGCCATGGGGTCACTTTTG	„sense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP3 und der dap3-1 Mutante
1g68650-RT1-R	AGCAGCTGTGGTACACAAATGTTTG	„antisense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP3 und der dap3-1 Mutante
1g25520-RT1-F	TTGTATCGGAGATTGGTGACAAGA	„sense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP4 und der dap4-1, dap4-2 Mutanten
1g25520-RT1-R	CATTCCACCAGAAAAGGCCACTAT	„antisense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP4 und der dap4-1, dap4-2 Mutanten
5g36290-RT2-F	ATTGATGGCTATGCGACATCCT	„sense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP5 und der dap5-1 Mutante
5g36290-RT2-R	CACTCCTATGGCGTTCCTTGTA	„antisense“ Primer zur Verifikation der gewebsspezifischen Expression von AtDAP5 und der dap5-1 Mutante
1g64150-5UTR-RT-2F	AGAAGCGAAAATACAAAATCCTCAG	„sense“ Primer zur Analyse der Expression von AtDAP1 in den amiR-dap1-1 Mutanten
4g13590-Prom-RT-1F	TCTCAATCTTTCTTTCTGGGTTTC	„sense“ Primer zur Analyse der Expression von AtDAP2 in den amiR-dap2-1 Mutanten
AIDAP2-Bam-1R	GGATTCTCAGAACACTCCAAAAGAA	„antisense“ Primer zur Analyse der Expression von AtDAP2 in den amiR-dap2-1 Mutanten

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Primer zur Isolation homozygoter T-DNA Mutanten:		
GK-LB	ATATTGACCATCATACTACTTGC	Primer zur Amplifikation der „left border“ von GABI-KAT T-DNA Insertionslinien
GK-RB	CCAAAGATGGACCCCCACCCAC	Primer zur Amplifikation der „right border“ von GABI-KAT T-DNA Insertionslinien
AE-LB1	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	Primer zur Amplifikation der „left border“ von SALK T-DNA Insertionslinien
AE-RB1	ATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAG	Primer zur Amplifikation der „right border“ von SALK T-DNA Insertionslinien
1g64150-F	ATTTCTCCTGAAACTTGAAGACA	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-Fragmentes für die <i>dap1-1</i> Mutante
1g64150-R	TTCCGTCTTTAGAACACACTCTCT	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap1-1</i> Mutante
1g64150-1F	TCTTGATGTTCTGGTTGAGTCATCG	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap1-2</i> Mutante
1g64150-1R(GABI)	ACTGAACCAAAACCCAAAAACAAC	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-Fragmentes für die <i>dap1-2</i> Mutante
4g13590-2F	TTGTCCGAAGAGTTCGAGAAAACC	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap2-1</i> Mutante
4g13590-2R	TGTGAAGCCTGACTTTTGCTACTGC	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap2-1</i> Mutante
4g13590-1F	AGACCAAAAGTTGGATTTGCTCTGG	„sense“ Primer zur Amplifikation des Mutanten-Fragmentes für die <i>dap2-1</i> Mutante
4g13590P-GW-2F	CACCTAAAATCTACCAAAACCCCGAAAT	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-Fragmentes für die <i>dap2-2</i> Mutante
4g13590P-GW-1R	GATCTTTTTATTTCAGAAATTCACGG	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap2-2</i> Mutante
1g68650-1F	AACAAAAACCATAACATAACTCATG	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap3-1</i> Mutante
1g68650-1R(GABI)	AAAACATATACCGAAGCTGAGGAG	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-Fragmentes für die <i>dap3-1</i> Mutante
1g25520-1F(GABI)	ATCTTTTAGCTCTTCAGCGAATGT	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp- und Mutanten-Fragmentes für die <i>dap4-1</i> , <i>dap4-2</i> Mutanten
1g25520-1R	AACCCCTGCCAACAAAAGTCAGATA	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap4-1</i> , <i>dap4-2</i> Mutanten

Name	Sequenz	Verwendungszweck
5g36290-2F	CATTGATGGCTATGCGACATCCTA	„sense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap5-1</i> Mutanten
5g36290-2R	CGAGGAAGAGTAAGCCTCCAACAG	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Wildtyp-Fragmentes für die <i>dap5-1</i> Mutanten
5g36290-1R(GABI)	CCTCCAACAACACTGCTAGTGAAGTA	„antisense“ Primer zur Amplifikation des Mutanten-Fragmentes für die <i>dap5-1</i> Mutanten
Primer zur Generierung der amiRNA-Konstrukte gegen <i>AiDAP1</i> und <i>AiDAP2</i>:		
A miRNA GW	<u>CACCCTGCAAGGCGGATTAAGTTGGGTAAC</u>	„sense“ Primer A zur Amplifikation des mir319a Rückrats mit <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
B miRNA	GCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAG	„antisense“ Primer B zur Amplifikation des mir319a Rückrats
1g64150-I miR-s	GATTAGTGGAAAAGTGCGTCCGAGTCTCTCTTTTGTAT TCC	„sense“ Primer I zur Amplifikation der <i>AiDAP1</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
1g64150-II miR-a	GACTCGGACGCACCTTCCACTAATCAAAAGAGAAATCAA TGA	„antisense“ Primer II zur Amplifikation der <i>AiDAP1</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
1g64150-III miR*s	GACTAGGACGCACCTACCACATTTACACAGGTCGTGAT ATG	„sense“ Primer III zur Amplifikation der <i>AiDAP1</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
1g64150-IV miR*a	GAATAGTGGTAAGTGCGTCCCTAGTCTACATATATATTC CT	„antisense“ Primer IV zur Amplifikation der <i>AiDAP1</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
4g13590-I miR-s	GATATCCGCAAAAGAACACGGGGTCTCTCTTTTGTAT TCC	„sense“ Primer I zur Amplifikation der <i>AiDAP2</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
4g13590-II miR-a	GACCCCGTGTCTTTTCCGGAATATCAAAAGAGAAATCAA TGA	„antisense“ Primer II zur Amplifikation der <i>AiDAP2</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
4g13590-III miR*s neu	GACCACGTGTCTTTTCCGGAATTTACACAGGTCGTGAT ATG	„sense“ Primer III zur Amplifikation der <i>AiDAP2</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
4g13590-IV miR*a neu	GAATTTCCGGAAGAACACGGTGGTCTACATATATATATT CCT	„antisense“ Primer IV zur Amplifikation der <i>AiDAP2</i> -spezifischen Sequenz in das Rückrat der mir319a
Primer zur Promoter:GUS-Fusion:		
1g64150P-GW-F	<u>CACCCAAAGGACTCAGCCTCTTCTCTCT</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des 2kb-Promoterfragmentes von <i>AiDAP1</i> mit <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>
1g64150P-GW-R	TTCTTTTCTGAGGATTTTGTATTT	„antisense“ Primer zur Amplifikation des 2kb-Promoterfragmentes von <i>AiDAP1</i>
4g13590P-GW-1F	<u>CACCTCATATTCATATTTGGAGAGAGAGAG</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des 2kb-Promoterfragmentes von <i>AiDAP2</i> mit <u>CACC-Klonierungsüberhang</u>

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Primer für die T-DNA-Sonden (Kopienzahlbestimmung):		
pAC161-LBfow	CCACAAAATTACGATCCGTCGTA	„sense“ Primer zur Amplifikation einer „left border“-spezifischen Fragmentes für GABI-KAT-Linien
pAC161-LBrev	GGCCTTCGCTGCCCATATTA	„antisense“ Primer zur Amplifikation einer „left border“-spezifischen Fragmentes für GABI-KAT-Linien
pROK2-LBiv	TTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTAC	„sense“ Primer zur Amplifikation einer „left border“-spezifischen Fragmentes für SALK-Linien
p-ROK2-LBfv	AAACAAAATGACGCTTAGACAA	„antisense“ Primer zur Amplifikation einer „left border“-spezifischen Fragmentes für SALK-Linien
Primer zu „PCR-based fusion“ des Transitpeptides von DAP1:		
AIDAP1-TP-Kpn-1F	<u>GGTACCATGCTAAGTTTGAATCTC</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des TP-Fragmentes von AIDAP1 mit START-Kodon und Kpn I-Restriktionsschnittstelle für AIDAP2 und sII0615
AIDAP1-TP-Bam-1F	<u>GGATCCATGCTAAGTTTGAATCTC</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des TP-Fragmentes von AIDAP1 mit START-Kodon und BamH I-Restriktionsschnittstelle für YBR187W
1g-TP-sII0615-2R	<u>AGCGGICAGAAATATCTCCAAGGCTCTCC</u>	„antisense“ Primer zur Amplifikation des TP-Fragmentes von AIDAP1 mit der komplementären Überlappung zu sII0615
1g-TP-YBR187W-2R	<u>AGACTTCAAAAATATCTCCAAGGCTCTCC</u>	„antisense“ Primer zur Amplifikation des TP-Fragmentes von AIDAP1 mit der komplementären Überlappung zu YBR187W
1g-TP-DAP2-2R	<u>GCCIGACTTAAATATCTCCAAGGCTCTCC</u>	„antisense“ Primer zur Amplifikation des TP-Fragmentes von AIDAP1 mit der komplementären Überlappung zu AIDAP2
1g-TP-sII0615-2F	<u>GGAGATATTTCTGACCGCTTTTACTGCC</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des sII0615-Fragmentes mit der komplementären Überlappung zum TP von AIDAP1
1g-TP-YBR187W-2F	<u>GGAGATATTTTGAAGTCTTTTTTAATG</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des YBR187W-Fragmentes mit der komplementären Überlappung zum TP von AIDAP1
1g-TP-DAP2-2F	<u>GGAGATATTAAGTCAGGCTTCACAGC</u>	„sense“ Primer zur Amplifikation des AIDAP2-Fragmentes mit der komplementären Überlappung zum TP von AIDAP1
AIDAP2-Bam-1R	GGATTCTCAGAACACTCCAAGAA	„antisense“ Primer zur Amplifikation des AIDAP2-Fragmentes mit STOP-Kodon
sII0615-Bam-1R	GGATTCCCTATGCAATCTTGGTCCA	„antisense“ Primer zur Amplifikation des sII0615-Fragmentes mit STOP-Kodon
YBR187W-Bam-2R	<u>GGATCCTCAATCCTGAGTTGTGAA</u>	„antisense“ Primer zur Amplifikation des YBR187W-Fragmentes mit STOP-Kodon und BamH I-Restriktionsschnittstelle

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Primer zur Generierung und Verifizierung der <i>Synechocystis</i> Insertionsmutante:		
sl0615-INS-2F	ATTGGGCAGGTGTTTACTGC	„sense“ Primer zur Amplifikation des sl0615-Fragmentes aus <i>Synechocystis</i>
sl0615-INS-2R	CCAAACAGTTGCACGTCAAAAG	„antisense“ Primer zur Amplifikation des sl0615-Fragmentes aus <i>Synechocystis</i>
Primer zur Verifizierung der <i>Saccharomyces</i> Insertionsmutante:		
Y-KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	„antisense“ Primer B zur Amplifikation der <i>kanMX4</i> -Kassette mit 5'UTR dem von <i>YBR187w</i>
Y-KanC	TGATTTTGTGACGAGCGTAAT	„sense“ Primer C zur Amplifikation der <i>kanMX4</i> -Kassette mit 3'UTR dem von <i>YBR187w</i>
YBR187W-A-F	AGGAAATTGCCCTTGATGTG	„sense“ Primer A zur Amplifikation des 5'UTR von <i>YBR187w</i>
YBR187W-B-R	AAAGAAAAGCAACGGCTGAA	„antisense“ Primer zur Amplifikation des 5'UTR von <i>YBR187w</i>
YBR187W-C-F	TTCAGCCGTTGCTTTTCTTT	„sense“ Primer C zur Amplifikation des 3'UTR von <i>YBR187w</i>
YBR187W-D-R	GAAACCAGCGATCTCAAAGC	„antisense“ Primer zur Amplifikation des 3'UTR von <i>YBR187w</i>

7.3. Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
AGI	The Arabidopsis Genome Initiative
ALA	δ -Aminolävulinat
amiRNA	<i>artificial mircoRNA</i>
Amp	Ampicillin
APS	AMP-Sulfat
<i>arc</i>	<i>accumulation and replication of chloroplasts</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BY2	Bright Yellow 2
BCAT	<i>branched-chain amino acid transaminase</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BRC	RIKEN Bioresource Center
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
Car	Carbenicillin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cm	Chloramphenicol
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia 0
cTP	plastidäres Transitpeptid
<i>cue</i>	<i>chlorophyll a/b binding protein underexpressed</i>
cv	Kultivar
D	Deutschland
<i>dap</i>	<i>dwarf affected in photosynthetic electron transport rate</i>

DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosin
dCTP	Desoxycytidin
DCL1	DICER-LIKE1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
dGTP	Desoxyguanosin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTTP	Desoxythymidin
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ery-4-P	Erythrose-4-Phosphat
et al.	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
ETR	Elektronentransportrate
F ₀	minimale Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter
F ₀ '	minimale Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
Fd	Ferredoxin
FG	Frischgewicht
<i>flu</i>	<i>fluorescence after etiolation</i>

F_m	maximale Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter
F_m'	maximale Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
FPP	Farnesylpyrophosphat
F_t	transiente Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_v	variable Fluoreszenzausbeute dunkeladaptierter Blätter
F_v'	variable Fluoreszenzausbeute lichtadaptierter Blätter
F_v / F_m	maximale Quanteneffizienz des PSII
Φ_{PSII}	Quantenausbeute des PSII Elektronentransports
Φ_{II}	<i>effective quantum yield of PSII</i>
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
[Zahl] x g	x-fache Erdbeschleunigung
GABI-Kat	Kölner Ressourcenzentrum für <i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA-Linien
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
Gm	Gentamycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glk-6-P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GluTR	Glutamyl-tRNA-Reduktase
GPAT	<i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
GPDH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase oder Dihydroxyaceton-Phosphat-Reduktase
GPP	Geranylpyrophosphat
GSA	Glutamat-1-semialdehyd
GSH	Glutathion
<i>gun</i>	<i>genome-uncoupled</i>
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunden
<i>hcf</i>	<i>high chlorophyll fluorescence</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin
IPP	Isopentenylpyrophosphat

Kan	Kanamycin
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	<i>left border</i>
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LHC	<i>light-harvesting complex</i>
LHCP	<i>light-harvesting chlorophyll-binding protein</i>
<i>laf</i>	<i>long after far-red</i>
log	logarithmischer Wert
LPAAT	<i>lysophosphatidic acid acyltransferase</i>
Lsg.	Lösung
ITP	lumenales Transitpeptid
M	Molar
MATDB	MIPS <i>Arabidopsis thaliana</i> Database
MEP	Methylerythritol-4-Phosphat
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
min	Minuten
MIPS	Munich Information Centre for Protein Sequences
amiRNA	<i>artificial microRNA</i>
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA, engl.: <i>messenger RNA</i>
MVA	Mevalonsäure
NAD ⁺	Nicotinadenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinadenindinukleotid-Phosphat
NASC	The European Arabidopsis Stock Centre

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
<i>npq</i>	<i>non-photochemical quenching</i>
OD _[Zahl]	optische Dichte
OPDA	12-Oxo-Phytodienonsäure
<i>P_{35S}</i>	Promotor des 35S RNA-Gens aus dem CaMV
PAM	Pulsamplitudenmodulationsverfahren, engl. <i>pulse-amplitude-modulation</i>
PAPS	Phosphoadenosin-Phosphosulfat
PBG	Porphobilinogen
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFD	Photonenflussdichte
PG	Phosphatidylglycerol
2-PG	2-Phosphoglycolat
2-PGA	2-Phosphoglycerat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
POR	Protochlorophyllid-Reduktase
PP	Pyrophosphat
PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary transcripts of miRNA gene</i>
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q _A	Plastochinon A
Q _B	Plastochinon B
qE	pH-abhängige Fluoreszenzlösung

qI	Photoinhibition
qN	nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung
qP	photochemische Fluoreszenzlöschung
qT	Fluoreszenzlöschung durch <i>state transition</i>
RAFL	RIKEN Arabidopsis full-length cDNA clones
RB	<i>right border</i>
Rif	Rifampicin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
Spec	Spectinomycin
SQDG	Sulfochinovosyldiacylglycerol
Strept	Streptomycin
T-DNA	Transfer-DNA
Tab.	Tabelle
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
Tet	Tetracyclin
Tic	<i>translocon on the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
<i>T_{nos}</i>	Terminator der Nopaline-Synthese Gens aus <i>A. tumefaciens</i>
Toc	<i>translocon on the outer envelope membrane of chloroplasts</i>

Tris	(Tris-hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>unit</i>
UK	Großbritannien
ü.N.	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
VAZ	Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin; Pigmente des Xanthophyllzyklus
VIPP1	<i>versicle-inducing in plastid protein 1</i>
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	volumenbezogenes Gewichtsprozent
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-glucuronid
YPD-Medium	<i>Yeast extract Peptone Dextrose medium</i>
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
∞	unendlich

Des Weiteren wurden die üblichen Abkürzungen des “Internationalen Einheitensystems” (Système international d’Unités, SI) verwendet.

Kurzzusammenfassung

Plastiden sind multifunktionelle Organellen der pflanzlichen Zelle und besitzen essentielle Stoffwechselwege. Die Integration der plastidären Stoffwechselfvorgänge in den pflanzlichen Zellmetabolismus erfolgt durch die Aktivität von zahlreichen Transportproteinen in den Plastidenhüllmembranen, welche einen geregelten Stoffaustausch von Vorstufen, Intermediaten und Endprodukten zwischen den Plastiden und dem Cytosol sicherstellen.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine homozygote T-DNA Insertionsmutante im Gen *At1g64150*, das für einen potentiellen Kandidaten eines plastidären Transportproteins kodiert, isoliert. Aufgrund ihres Phänotyps wurde die Mutante mit der Bezeichnung *dwarf affected in photosynthetic electron transport rate 1 (dap1)*. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden insgesamt fünf homologe Gene *AtDAP1 (At1g64150)*, *AtDAP2 (At4g13590)*, *AtDAP3 (At1g68650)*, *AtDAP4 (At1g25520)* und *AtDAP5 (At5g36290)* identifiziert. Eine plastidäre Lokalisation der Proteine AtDAP1 und AtDAP2 konnte anhand von GFP-Fusionen nachgewiesen werden. Um die Funktion der AtDAP-Proteine zu analysieren, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Weiterhin wurden homozygote T-DNA Insertionsmutanten für die entsprechenden Gene isoliert. Die *knock-out*-Mutanten von *AtDAP1* und *AtDAP2* waren durch auffällige Phänotypen gekennzeichnet. Sie zeigten ein retardiertes Wachstum, einen verringerten Chlorophyllgehalt und eine Beeinträchtigung der Photosynthese. Des Weiteren war die Mutante von *AtDAP2* keimlingsletal und nur unter photoheterotrophen Bedingungen lebensfähig. Beide *knock-out*-Mutanten konnten durch die Expression der entsprechenden cDNAs komplementiert werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um die Funktion dieser beiden Proteine zu charakterisieren.

Abstract

Plastids are multifunctional organelles and possess essential biosynthetic pathways for plant cells. The integration of the plastidial biosynthetic capacities into the cell metabolism depends on the activity of several transport proteins within the plastid envelope, which facilitate the exchange of precursors, intermediates and end products between the plastid and the cytosol.

In a previous mutant-screen a homozygous T-DNA insertion mutant in the gene *At1g64150* was isolated, which represents a putative candidate for plastidial transporter. According to its phenotype the mutant was named *dwarf affected in photosynthetic electron transport rate 1* (*dap1*). The genome of *Arabidopsis thaliana* contains five homologous genes *AtDAP1* (*At1g64150*), *AtDAP2* (*At4g13590*), *AtDAP3* (*At1g68650*), *AtDAP4* (*At1g25520*) and *AtDAP5* (*At5g36290*). The plastidial localization of *AtDAP1* and *AtDAP2* was verified by GFP protein fusions. To analyze their function, expression studies were performed. Furthermore, homozygous T-DNA insertion mutants for these genes were isolated. The *knock-out* mutants of *AtDAP1* and *AtDAP2* were characterized by severe phenotypes. They showed retarded growth, decreased chlorophyll content and a reduced photosynthetic performance. In Addition, the mutant of *AtDAP2* has a seedling lethal phenotype and could only survive when grown under photoheterotrophic conditions. Both *knock-out* mutants could be complemented by expressing the corresponding cDNAs. Further investigations are needed to elucidate and characterize the functions of both proteins.

Danksagung

Herrn Prof. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung und Durchführung meiner Promotion an seinem Lehrstuhl, die Bereitstellung des Themas sowie für die langjährige Finanzierung.

Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer, Dr. Kay Marin, Dr. Anja Schneider, Dr. Stefan Geimer und Prof. Dr. Peter Jahns danke ich für die Zusammenarbeit und die geleistete Unterstützung.

Dr. Frank Ludewig danke ich für den Korrekturmarathon.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung meines Promotionsstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 306 „Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“.

Weiterhin gilt mein Dank den Kollegen und ehemalige Mitarbeitern der AG Flügge:

Dr. Rainer Schwacke, Dr. Rainer E. Häusler, Prof. Reinhard Kunze, Frau S. Lorbeer, Dr. Eric van der Graaff, Dr. Markus Gierth, Dr. Karsten Fischer, Dr. Veronica Maurino, Dr. Tamara Gigolashvili, Dr. Silke Knappe, Dr. Lars Voll, Dr. Michael Hubert Eicks, Dr. Lihzi Zang, Dr. Marcella H. Santaella-Tenorio, Dr. Tanja Löttgert, Dr. Ester Grube, Dr. Bettina Berger, Dr. Inga Rollwitz, Rainer Waadt, Alexander Schildt, Wjekoslav Beljo, Nicole Walczyk, Andre Guballa (geb. König), Holger Fahnenstich, Sharis Hagnazarian, Christian Greiten, Hans-Henning Kunz, Andreas Steimel, Anke Hüser, Martin Engqvist, Ruslan Yatusevich, Kirsten Bell, Diana Hille, Sonja Hetfeld, Barbara Kleinhenz, Kerstin Kunze, Claudia Nothelle, Claudia Schwanitz, Iris Smitz und allen Anderen großen und kleinen „Terroristen“ die mich tagtäglich in den „Wahnsinn“ getrieben haben.

Danke auch an meine Freunde von der AG Hülskamp Ulli Herrmann, Elena Galiana Jaime und Rainer Saedler.

Ein großer Dank geht des Weiteren an Klaus Menrath, Christiane Herzog, Jürgen Hintzsche und an das gesamte Gewächshaus-Team. Leo Leson, Marcus Resky, Uwe Bagusche, Ronald Zürner und den restlichen Mitarbeiter der Feinmechanischen Werkstatt sowie Prof. Bildermacher alias Siggie Werth danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe bei einer Vielzahl von großen und kleinen Problemen.

Des Weiteren Danke ich meinen Graduiertenkollegiaten Gaelle Rivory, Kerstin Brachhold, Marc Hein, Elena Galiana Jaime, Oliver Zobell, Andrea Busch, Anna Ihnatowicz, Antonis Giakountis, Chiara Consonni, Andrea Lauri, Vera Bonardi, Ingo Ciolkowski, Patrycja Niewiadomski, Wei-Hsin Chiu und deren Betreuern sowie Dr. Ralf Petri und vielen weiteren Mitarbeitern vom MPIZ.

Ich danke weiterhin meinen Freunden und ehemaligen Kollegen aus der Doberaner- und späteren Albert Einsteinstraße Prof. Dr. Martin Hagemann, Dr. Sabine Fulda, Dr. Josef Vinnemeier, Dr. Kay Marin, Matthias Scharnagl, Dr. Arne Schoor, Dr. Jana Huckauf, Dr. Kathrin Ribbeck-Busch, Dr. Inga Oberpichler, Robert Steinbruch und alle den Anderen, die mir stets die Augen für die „kleinen grünen Dinge des Lebens“ offengehalten haben.

Ein „spezieller Dank“ gilt den Kölner Heinzelmännchen für die vielen verschollenen Stifte, Agar-Platten, Lösungen, Pipetten, die kontaminierten Lösungen, die Hilfe bei der Sauberkeit an meinem Arbeitsplatz etc. pp. UND für die kaputte Waschmaschine.

„Danke Jungs!“

... (1).

Weiterhin danke auch meinen Freunden in der Heimat Matthias Hahn, Andreas Lau und Alexander Darr.

Der größte Dank von allen geht an meine Familie.

Fußnote:

(1) Eine große Entschuldigung und meine Dankbarkeit gilt all den nichtgenannten Personen und denen mit falschgeschriebenen Name. „Ihr wisst schon wen ich meine!“

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Teilpublikationen:

keine

Datum:

Unterschrift:

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Daniel Marquardt
Geburtsdatum: 23.04.1976
Geburtsort: Rostock
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1982-1991 Grundsule, 52. POS, Rostock
1991-1994 Gymnasium, Gymnasium Evershagen, Rostock
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

Oktober 1994 - September 1995 Panzerjägerkompanie 180, Boostedt

Studium

Oktober 1995 - April 2001 Studium der Biologie an der Universität Rostock
Abschluss: Diplom Biologie
November 2001 Auszeichnung der Diplomarbeit mit dem
Wissenschaftspreis Rostocker Kreis

Berufstätigkeit

April 2001 - September 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
NORIKA GmbH, Groß Lüsewitz
Oktober 2001 - Juni 2002 Wissenschaftlicher Angestellter,
Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Promotion

April 2003 - Dezember 2007 Universität zu Köln, Botanisches Institut, Lehrstuhl II
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I Flügge
Promotionsstipendium der DFG, Graduiertenkolleg 306
„Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen bei
Pflanzen“
ab Juni 2005 Studentensprecher des Graduiertenkollegs