

**Biochemische Charakterisierung der Fettsäure- β -Oxidation
als Teil des Dunkelstoffwechsels von *Arabidopsis thaliana***

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Hans-Henning Kunz
aus Regensburg**

Dezember 2009

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Januar 2006 bis Dezember 2009 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt und in Teilen im September 2009 publiziert.

Kunz, H. H., M. Scharnewski, K. Feussner, I. Feussner, U. I. Flügge, M. Fulda and M. Gierth (2009). "The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal β -Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of Arabidopsis during Extended Darkness." *The Plant Cell* 21(9): 2733-2749.

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt
Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Februar 2010

In Dankbarkeit gewidmet
meiner Großmutter

Irmgard Kunz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diurnaler Stoffwechsel in Pflanzen am Beispiel von <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2	Der Fettstoffwechsel.....	2
1.3	Subzelluläre Lokalisation.....	3
1.4	Defekte der β -Oxidation haben schwerwiegende physiologische Konsequenzen.....	4
1.5	Die Fettsäure β -Oxidation in Pflanzen am Beispiel von <i>A. thaliana</i>	5
1.6	Die β -Oxidation als Teil von Hormonwirkungen.....	8
1.7	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Pflanzenmaterial.....	11
2.2	Pflanzenanzucht.....	11
2.2.1	Anzucht auf Erde.....	11
2.2.2	Anzucht in Sterilkultur.....	12
2.2.3	Sterilisieren und Selektieren von Samen.....	13
2.3	Verwendete Bakterienstämme.....	14
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	14
2.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
2.4	Anzucht von Bakterien.....	15
2.4.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	15
2.4.2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	15
2.4.3	Verwendete Antibiotika in der Bakterienanzucht.....	16
2.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	16
2.5.1	Herstellung TSS-kompetenter <i>E. coli</i>	16
2.5.2	Heat-Shock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	17
2.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	17
2.6.1	Herstellung Elektro-Shock-kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	17
2.6.2	Elektro-Shock-Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	18
2.7	Transformation von <i>A. thaliana</i>	19
2.8	Isolation und Präparation von DNA.....	20
2.8.1	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	20
2.8.1.1	Isolation von <i>E. coli</i> Plasmid-DNA im Mini-Maßstab.....	20

2.8.1.2	Isolation von <i>E. coli</i> Plasmid-DNA im Midi-Maßstab	20
2.8.2	Schnellpräparation von genomischer DNA (gDNA) aus <i>A. thaliana</i>	20
2.9	Analyse und Klonieren von DNA	21
2.9.1	DNA Analyse mit Hilfe verschiedener PCR Methoden	21
2.9.1.1	Die Colony-PCR zur DNA-Analyse von Mikroorganismen	22
2.9.1.2	Screening-PCR zur Genotypisierung transgener <i>A. thaliana</i>	22
2.9.2	Verwendete Primer	23
2.9.3	Agarosegelelektrophorese	23
2.9.4	Elution von DNA aus Agarosegelen	24
2.9.5	Quantifizierung von DNA	24
2.9.6	Restriktion von DNA	25
2.9.7	Ligation von DNA-Enden	25
2.9.8	Topo [®] - und Gateway [®] -Klonierung	25
2.10	Proteinbiochemie	26
2.10.1	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.10.2	Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.10.4	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	29
2.10.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	29
2.10.6	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau	30
2.11	Pulse Amplitude Modulation (PAM) Messungen	30
2.11.1	PAM Messungen an intakten <i>A. thaliana</i> Pflanzen	30
2.11.2	Plastidenisolierung und PAM Messung an isolierten Plastiden	31
2.12	Probenvorbereitung und Spurreinbettung von Pflanzengewebe zur licht- und trans- missionselektronenmikroskopischen Untersuchung	32
2.12.1	Probenfixierung	32
2.12.2	Gewebeentwässerung	33
2.12.3	Einbettung in das Spurrmedium	33
2.12.4	Schnitte und Einfärbung	33
2.13	Fettprofil- und IAA-Analysen	34
2.14	Pigmentanalyse aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.14.1	Pigmentisolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34

2.14.2	Dünnschichtchromatographie von <i>A. thaliana</i> Blattpigmenten.....	34
2.14.3	Isolation und Charakterisierung einzelner Pigmente.....	35
2.15	ATP/ADP-Messungen	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Isolierung sowie Beschreibung von T-DNA Insertionsmutanten	37
3.2	Verlängerte Dunkelphasen führen zu starken Schädigungen in <i>pxa1-2</i> Pflanzen.....	39
3.3	Welche Mutanten zeigen den Dunkelphänotyp?.....	41
3.4	Partielle Verdunklung durch Einzelblattabdeckung	43
3.5	Variationen des Phänotyps.....	44
3.5.1	Abhängigkeit von der Dauer der Lichtperiode	44
3.5.2	Abhängigkeit von der Länge der Verdunklungsphase	45
3.5.3	Abhängigkeit von der Temperatur während der Dunkelinkubation	47
3.5.4	Abhängigkeit vom Zustand des Materials	48
3.6	Photosynthetischer Phänotyp.....	49
3.6.1	Messungen mit Hilfe der Imaging PAM	49
3.6.2	Abundanz photosynthetisch aktiver Proteine	51
3.6.3	LM/TEM-Untersuchungen der Chloroplasten.....	52
3.7	Analytik von Metaboliten des Lipidstoffwechsels	55
3.7.1	Freie Fettsäuren im Verlauf der Dunkelinkubation.....	56
3.7.2	Der Acyl-CoA-Pool im Verlauf der Dunkelinkubation	57
3.7.3	Die Triacylglyceride im Verlauf der Dunkelinkubation	58
3.7.4	Indolessigsäurekonzentrationen im Verlauf der Dunkelinkubation	59
3.8	Toxizitätstests der 18:3 Fettsäure	61
3.8.1	Toxizität von α -Linolensäure auf intakte Pflanzen.....	62
3.8.2	Toxizität von α -Linolensäure auf isolierte Chloroplasten.....	63
3.9	Einführung und Beschreibung des phototoxischen Phänotyps.....	65
3.9.1	Pigmentisolierung und chromatische Auftrennung.....	65
3.9.2	Isolierung und Bestimmung des zusätzlichen Pigmentspots	67
3.9.2.1	Photometrische Eigenschaften der isolierten Substanz.....	68
3.9.2.2	Massenspektroskopische Identifizierung des Phaeophorbid a	69
3.9.3	Akkumulationskinetik von Phaeophorbid a in <i>pxa1</i> Mutanten über die Dauer einer Dunkelinkubation	70

3.10	Kontext zum Stärkemetabolismus	71
3.10.1	Stärkeabbau in Abhängigkeit vom Zustand des untersuchten Gewebes.....	71
3.10.2	Ausprägung des Phänotyps in abgeschnittenen Einzelblättern in Abhängigkeit von der Sinkstärke	73
3.10.3	Zellulärer Energiestatus ATP/ADP	75
3.10.4	Saccharose- Fütterung verringert die Dunkelschädigung	77
3.10.5	Saccharose-Fütterung reduziert die Anreicherung freier Fettsäuren während der Dunkelheit.....	79
3.11	Generierung und Analyse von stärkefreien <i>pxa1</i> Doppelmutanten.....	80
3.11.1	Klonierung des amiRNA <i>pxa1</i> Konstrukts	82
3.11.2	Verhalten der Doppelmutanten im Dunkelexperiment.....	83
3.11.3	Initiale Beschreibung von Entwicklungsphänotypen in <i>adg1-1 x pxa1-2</i> Doppelmutanten...	84
3.11.3.1	Wachstumsphänotypen in Abhängigkeit der Anzucht.....	84
3.11.3.2	Kurzbeschreibung des Primärblütenphänotyps.....	86
3.11.3.3	Einfluss der Tageslänge auf die Samenbildung	87
4	Diskussion	89
4.1	Ein Defekt in der β -Oxidation ist der Grund für das Auftreten und die Ausprägung des <i>pxa1</i> und <i>kat2</i> Dunkelphänotyps	89
4.2	Die Ursache des Phänotyps ist ein dramatischer Anstieg von freien Fettsäuren, dominiert von α -Linolensäure	92
4.3	Die während der Dunkelheit in <i>pxa1</i> akkumulierenden Neutralfette unterscheiden sich von den TAGs der Samen	95
4.4	Phaeophorbid a, ein Chlorophyllabbauprodukt, führt zu einem phototoxischen Effekt.....	97
4.5	Der Dunkelphänotyp von <i>pxa1</i> Mutanten ist abhängig vom Stoffwechsel	100
4.6	Exogene Saccharose mildert den Phänotyp ab	103
4.7	Der <i>pxa1</i> Dunkelphänotyp – ein Modell	104
4.8	Kontext zwischen dem Stärkemetabolismus und der Fettsäure- β -Oxidation	105
4.8.1	Die Sinkstärke entscheidet über das zeitliche Auftreten des Phänotyps	105
4.8.2	Doppelmutanten aus stärkefreien Mutanten und <i>pxa1</i> zeigen eine Verschlimmerung des Phänotyps.....	106
5	Fazit und Ausblick.....	110
6	Zusammenfassung.....	111
7	Abstract.....	113

8	Literaturverzeichnis	114
9	Abbildungsverzeichnis	123
10	Danksagung	125
11	Erklärung	126
12	Lebenslauf	127

1 Einleitung

1.1 Diurnaler Stoffwechsel in Pflanzen am Beispiel von *Arabidopsis thaliana*

Das grüne Pflanzengewebe ist mithilfe der Photosynthese und des Calvin Zyklus dazu befähigt, Lichtenergie in chemische Energie in Form von Zucker umzuwandeln. Dieser Prozess findet exklusiv in den Chloroplasten statt. Da höhere Zuckerkonzentrationen aufgrund ihres hohen osmotischen Potentials zu vermeiden sind, werden die einzelnen Glucose-Einheiten im osmotisch günstigeren Polymer Stärke gespeichert. Deshalb wird zumeist die transitorische Stärke als das primäre Endprodukt der Photosynthese bezeichnet (Zeeman et al. 2004). Misst man die Stärkekonzentration im Verlauf eines Tagesgangs, findet man im Licht einen stetigen Anstieg; sobald die Dunkelperiode beginnt, nimmt der Stärkegehalt konstant ab (Lu et al. 2005).

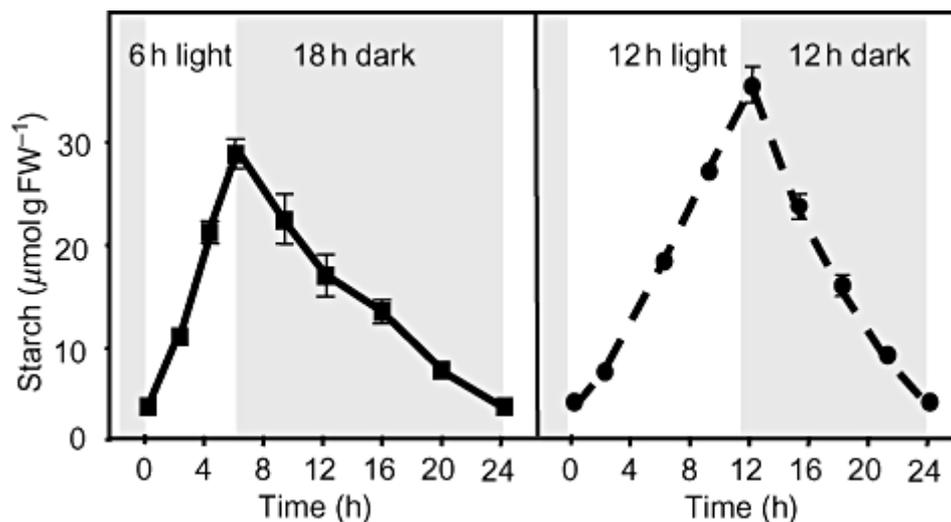


Abb. 1. Diurnaler Verlauf der Stärkekonzentration im Blattgewebe von *A. thaliana*: Linkes Diagramm Kurztaganzucht (hier 6/18 h), rechtes Diagramm 12/12 h Rhythmus; helle Fläche = Tag; graue Fläche = Nacht (Smith and Stitt 2007)

In Abb. 1 sind zwei charakteristische Tagesgänge des Stärkegehalts in Blättern von *A. thaliana* abgebildet. Die Stärke Auf- beziehungsweise Abbaurrate ist dabei abhängig von den jeweiligen Anzuchtbedingungen (Gibon et al. 2009).

Die Endprodukte des Stärkeabbaus in den Plastiden sind Maltose und in geringerem Maße Glucose (Zeeman et al. 2007). Sie werden durch die Transportproteine MEX1 (Niittyla et al. 2004) beziehungsweise pGlcT (Weber et al. 2000) über die innere Envelopmembran in das Zytosol exportiert. Dort können sie entweder über die Glykolyse verstoffwechselt oder zu Saccharose umgebaut werden. Saccharose ist

die wichtigste Transportform für fixierten Kohlenstoff in Pflanzen und wird über das Phloem in photosynthetisch inaktive, als Sink bezeichnete Gewebe, transportiert (Sivitz et al. 2007).

Bereits nach 8 h bis 10 h Dunkelheit beträgt der Stärkegehalt im Blatt nur noch 5-10% des Maximums am Ende der Lichtphase (Lu et al. 1995; Stadler et al. 2003). Nach Verlängerung der Dunkelphase auf 24 h ist der zelluläre Stärkepool vollständig erschöpft (Smith and Stitt 2007). Erstaunlicherweise gelingt es jedoch *A. thaliana* Pflanzen trotzdem problemlos mehrere Tage in völliger Dunkelheit zu überleben (Lin and Wu 2004). Hinzu kommt, dass sowohl stärkefreie als auch stärkeabbaufiziente Mutanten keine drastischen Phänotypen aufweisen (Kofler et al. 2000; Yu et al. 2000). Dies wirft die Frage auf, welcher alternativen Energiequelle sich diese Pflanzen bedienen. Zwei größere Stoffgruppen kommen hierbei in Betracht: einerseits der Protein- beziehungsweise Aminosäurepool oder andererseits der Lipidpool.

Bei genauerer Betrachtung der publizierten Daten gibt es mehrere unabhängige Hinweise auf den Fettabbau als alternative Energiequelle. So wurde gezeigt, dass in verlängerter Dunkelheit das Transskriptniveau für Gene der Fettsäure- β -Oxidation in Wildtypen und stärkefreien Mutanten kontinuierlich anstieg (Lin and Wu 2004; van der Graaff et al. 2006; Usadel et al. 2008). Konsistent dazu nimmt der Lipidgehalt in den Blättern während langen Nachtphasen sowohl in den Mutanten als auch in Wildtypen deutlich ab (Gibon et al. 2006; Usadel et al. 2008). Da jedoch das Wissen über die physiologische Relevanz der pflanzlichen β -Oxidation bis heute weitestgehend auf die Prozesse während der Keimung und Seneszenz fokussiert ist, wurde wahrscheinlich deshalb diesen Hinweisen keinerlei nähere Beachtung zuteil.

1.2 Der Fettstoffwechsel

Der Fettstoffwechsel ist von großer Wichtigkeit für die Zelle. Dies wird deutlich, vergegenwärtigt man sich, dass der Hauptbestandteil von biologischen Membranen Fette wie zum Beispiel die Phospho- und Glycolipide sind. Die Membranen sind es, die der Zelle eine Abgrenzung gegen das externe Medium gewährleisten. Zusätzlich ermöglichen die Endomembranen Eukaryonten kleine isolierte Reaktionsräume zu bilden. Hierdurch können eine Vielzahl biochemischer Prozesse parallel zueinander

ablaufen, was einen Vorteil gegenüber prokaryontischen Zellen darstellt, die frei von Organellen also ohne subzelluläre Kompartimentierung sind.

Neben der Funktion als Bestandteil von Membranen dienen Fette auch zur Proteinmodifikation, die es erlaubt Proteine, mit Membranen zu assoziieren oder in ihnen zu verankern. Desweiteren sei auf ihre Energiespeicherfunktion hingewiesen. Die Neutralfette, auch als Triacylglyceride bezeichnet, können durch ihre apolaren Eigenschaften nahezu wasserfrei in Form von membranumschlossenen Tropfen in der Zelle gelagert werden. Da es möglich ist die Bindungen der Kohlenwasserstoffketten stark zu reduzieren, sind Fette eine sehr effektive und somit lukrative Energiespeicherform für die Zelle (Berg et al. 2006).

Zuletzt besitzen Lipide auch essentielle Botenfunktionen. Viele tierische aber auch pflanzliche Hormone (Steroide, Jasmonsäure) leiten sich strukturell von Lipiden ab und werden daher als Fettderivate beschrieben (Berg et al. 2006; Heldt und Piechulla 2008).

Abgesehen von Modifikations- und Nachfolgereaktionen besteht der Fettstoffwechsel aus der Fettsäure-Synthese und der als β -Oxidation bezeichneten Degradation von Fetten. Im Wesentlichen stellen sie biochemisch betrachtet einfache Umkehrreaktionen von einander dar. Bei der Synthese gradzahliger Fettsäuren wird ein Keto-Acyl-Carrier-Protein Komplex pro Runde durch Kondensation mit einem Malonyl-CoA um zwei Kohlenstoff-Atome verlängert (Kachroo and Kachroo 2009). Analog dazu wird in der β -Oxidation die abzubauen Fettsäure in jeder Reaktionsrunde um zwei Kohlenstoff-Atome in der Form von Acetyl-CoA verkürzt (Baker et al. 2006; Goepfert and Poirier 2007).

1.3 Subzelluläre Lokalisation

Unterschiede im Fettmetabolismus lassen sich in erster Linie in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation im Vergleich verschiedener Organismen feststellen. In Prokaryonten, die wie bereits erwähnt, keinerlei Kompartimentierung aufweisen, finden sowohl Auf- als auch Abbau im Zytosol der Bakterien statt. Betrachtet man die Situation hingegen innerhalb der Eukaryonten so treten weitere Unterschiede zu Tage. In höheren Tieren und auch Pilzen wie zum Beispiel Hefen findet die Fettsäure-Synthese im Zytosol und den Mitochondrien statt (Hiltunen et al. 2009). Pflanzen dagegen produzieren die langkettigen Kohlenwasserstoffe hauptsächlich in

ihren Plastiden mit späterer Modifikation im Endoplasmatischen Retikulum (Browse and Somerville 1991).

Der Abbau, also die β -Oxidation, läuft hingegen nur in tierischen Zellen in zwei Organellen, den Peroxisomen und den Mitochondrien, ab. Daher können sie die Endprodukte direkt in der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Synthese nutzen.

In Hefen und Pflanzen ist die β -Oxidation exklusiv in den Peroxisomen lokalisiert. Das freiwerdende Acetyl-CoA wird in Pflanzen während der Keimung als Succinat und Malat, später wahrscheinlich exklusiv als Citrat, exportiert (Graham 2008). *Saccharomyces cerevisiae* nutzt Carnitin und Succinat als Carriersubstrat. Die exportierten Moleküle werden in die Mitochondrien importiert und dort zur ATP-Synthese im Citratzyklus (TCA-Zyklus) verbrannt (Baker et al. 2006; Franken et al. 2008).

1.4 Defekte der β -Oxidation haben schwerwiegende physiologische Konsequenzen

Defekte des zellulären Fettstoffwechsels führen aufgrund der zentralen Bedeutung zu schwerwiegenden Folgen, die abhängig vom jeweiligen Organismus unterschiedlich starke Ausprägungen haben.

Im Menschen sind eine Reihe verschiedener Erkrankungen im Detail studiert. Als bekannte, wenn auch seltene Beispiele für Defekte des Fettabbaus gelten die Cholesterinester-Speicherkrankheit (CESD) oder auch die Adrenoleukodystrophie (X-ALD). In beiden Fällen liegt die Ursache in rezessiv vererbten Gendefekten. Der Ausfall einer Lipase verursacht bei CESD einen bedrohlichen Konzentrationsanstieg von Cholesterin-Estern und Triglyceriden (Du et al. 1998), was zu einer starken Erhöhung des Arteriosklerose-Risikos und zu Organschäden von Leber und Milz führt (Chatrath et al. 2009). Im Falle von X-ALD sorgt der Defekt eines peroxisomalen ABC-Transporters (ABCD1) für einen drastischen, toxischen Anstieg von sehr langkettigen ($C \geq 22:0$), gradzahligen und gesättigten Fettsäuren (Mosser et al. 1993; van Roermund et al. 2008). Diese können sich in der Zellmembran einlagern, wodurch es zu Störungen entscheidender zellulärer Prozesse kommt. Vor allem betroffen hiervon ist das Gewebe der weißen Gehirns substanz, der Nebennierenrinde und der Hoden. Der begleitende neurodegenerative Effekt der Erkrankung ist eine Folge des Myelinscheide-Abbaus (Semmler et al. 2008).

Neben Studien an Humanerkrankungen wurden wie häufig in der biochemischen Grundlagenforschung viele der fundamentalen Untersuchungen und Erkenntnisse an *S. cerevisiae* durchgeführt und gewonnen. *S. cerevisiae* stellte den ersten eukaryotischen Organismus dar, dessen gesamte Genomsequenz entschlüsselt wurde (van der Klei and Veenhuis 2006). Die zusätzliche Entdeckung eines simplen Screening-Verfahrens trug maßgeblich zur Isolierung einer Vielzahl verschiedener „Knock-Out“-Stämme bei: Hefe-Mutanten mit defekter β -Oxidation oder defekten Peroxisomen sind nicht in der Lage, exogene Fette abzubauen und können daher nicht auf Ölsäure (18:1) als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Veenhuis et al. 1987). Darüber hinaus besitzt Oleat eine konzentrationsabhängige Toxizität für Mikroorganismen, die vermutlich aufgrund ihres Detergens-Charakter bei Akkumulation zu Porosität der Zellmembran führt (Lockshon et al. 2007).

Auf dieser Basis gelang es innerhalb der letzten 20 Jahre eine beachtliche Anzahl verschiedener β -Oxidations-„Knock-Out“-Hefen zu isolieren und deren genetische Defekte zu lokalisieren. Eine gute Zusammenstellung all dieser Mutanten gibt Hiltunen et al. 2003. Als prominentes Beispiel sind die *PXA1* beziehungsweise *PXA2* Mutante zu nennen. Beide besitzen einen Gendefekt im Lokus eines „half-size“ ABC-Transporters, welcher das Hefehomolog des humanen ABCD1 Proteins darstellt (Bossier et al. 1994; Shani et al. 1995).

Diese Screeningansätze haben maßgeblich zu unserem heutigen Verständnis bezüglich der Biochemie und genetischen Determinierung der β -Oxidation beigetragen. Für *S. cerevisiae* wird heute davon ausgegangen, dass der Großteil aller beteiligten Gene sowie die Kernreaktionen der β -Oxidation aufgeklärt sind (Hiltunen et al. 2003).

1.5 Die Fettsäure β -Oxidation in Pflanzen am Beispiel von *A. thaliana*

A. thaliana war der erste pflanzliche Organismus dessen Genom vollständig sequenziert und dessen Erbgutinformationen der wissenschaftlichen Gemeinschaft zugänglich gemacht wurden (Kaul et al. 2000). Von diesem Zeitpunkt an konnten mithilfe verschiedener Screening- und Mappingverfahren wesentlich zeitsparender als zuvor pflanzliche Mutanten isoliert und so unter anderem am Fettsäureabbau beteiligte Genloki identifiziert werden. Detaillierte Studien an diesen Mutanten erbrachten wertvolle Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz der β -Oxidation

in Pflanzen und führten zur Identifizierung der an der β -Oxidation beteiligten pflanzlichen Enzyme (Baker et al. 2006; Goepfert and Poirier 2007; Graham 2008).

Der Modelorganismus *A. thaliana* ist eine fett-speichernde Pflanze, das heißt sie besitzt sehr ölhaltige Samen (Li et al. 2006). Während der Keimung und der Keimlingsetablierung ist der Energiebedarf außerordentlich hoch (Dietrich et al. 2009). In der frühen Entwicklungsphase, zu deren Zeitpunkt noch keine Photosynthese möglich ist, greift die heranwachsende Pflanze auf den Lipidpool als Lieferant für Kohlenstoffgerüste und zur ATP-Synthese zurück. Folgerichtig inhibiert ein Defekt in der β -Oxidation den Etablierungsprozess des Keimlings und sorgt für einen Wachstumsstopp. Dies lässt sich jedoch durch eine exogene Fütterungen von Saccharose kompensieren (Graham 2008).

Während der Keimung verfügen Pflanzen über einen zusätzlichen biochemischen Pathway, den Glyoxylat-Zyklus. Er ist der β -Oxidation nachgeschaltet und ermöglicht aus den C2 Einheiten des Fettabbaus, über die Gluconeogenese, Zucker aufzubauen. Dieser Pathway ist allerdings nur für wenige Tage aktiv. Im Lebenszyklus von *A. thaliana* konnte in späteren Stadien nach der Keimung keinerlei Aktivität gefunden werden (Charlton et al. 2005; Graham 2008). Die Peroxisomen wurden in diesem Entwicklungsstadium der Pflanze lange Zeit als Glyoxysomen bezeichnet, wovon man heute Abstand nimmt, da diese Definition aufgrund der nur temporär aktiven Enzyme irreführend war (Pracharoenwattana and Smith 2008).

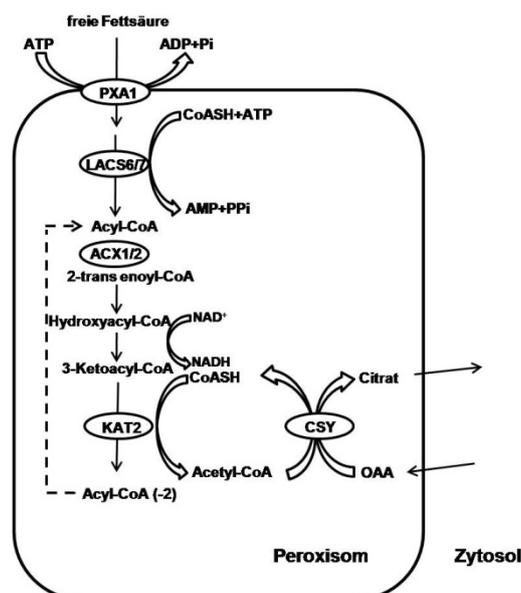


Abb. 2. Schematische Übersicht der pflanzlichen β -Oxidation in Peroxisomen und einiger relevanter Proteine

Einer der Gen-Loki dessen Verlust zu zuckerabhängiger Keimung führt, ist der als Comatose (CTS) bezeichnete Locus (Footitt et al. 2002). Er kodiert für einen peroxisomalen ABC-Transporter (PXA1) (Abb. 2). Im Folgenden wird ausschließlich der Name *PXA1* für diesen Locus und sein Produkt verwendet.

ABC-Transporter sind ubiquitäre, integrale Membranproteine mit breitem Substratspektrum (Verrier et al. 2008). Soweit bekannt kommen sie in allen Organismen vor. Defekte dieser Proteine führen häufig zu schwerwiegenden physiologischen Störungen, da sie unter anderem an der Nährstoffaufnahme aber auch am Transport toxischer Substanzen beteiligt sind. Letztgenannte Funktion spielt vor allem eine Rolle in der Resistenzbildung vieler Bakterien gegenüber diversen Antibiotika (Dawson et al. 2007). Allen ABC-Transportern liegt eine konservierte Architektur zu Grunde. Diese beinhaltet mehrere Transmembrandomänen (TMD), bestehend aus einer Vielzahl von hydrophoben α -Helices, und zwei Nukleotidbindedomänen (NBD). Die NBD ist wiederum aus drei charakteristischen Motiven aufgebaut, dem Walker A beziehungsweise B Motiv und dem Q-Loop (Dietrich et al. 2009). Alle drei sind essentiell für die ATP Bindung und Hydrolyse, die zur Energetisierung des Transportes dient. Während die meisten Loci für „half-size“ Transporter kodieren, weshalb die korrespondierenden, funktionellen ABC-Transporter Homo- oder Heterodimere darstellen, kodiert der *PXA1* Locus für einen „full-size“ Transporter, in dem zwei Monomere in einer einzigen Aminosäurekette vereint sind (Schwacke et al. 2003; Verrier et al. 2008).

PXA1 ist das pflanzliche Homolog des in Kapitel 1.4 eingeführten humanen ABCD1 Transport-Proteins (Footitt et al. 2002). Analog zum Krankheitsverlauf der X-ALD in Menschen kommt es in *A. thaliana* „Knock-Out“ Mutanten dieses Locus zu einem stark verzögerten Abbau von Neutralfetten bei gleichzeitiger Akkumulation von TAG-spezifischen Acyl-CoAs während des Keimungsprozesses (Footitt et al. 2002). Da durch Aktivitätsmessung der Ketoacyl-Thiolase gezeigt wurde, dass die β -Oxidation dieser Mutanten per se nicht beeinträchtigt ist, wurde gefolgert, dass *PXA1* maßgeblich am Import von Fettsäuren in die Peroxisomen beteiligt sein muss (Footitt et al. 2002; Graham 2008). Wie erwähnt, besitzen viele ABC Transporter ungewöhnlich breite Substratspektren (Theodoulou et al. 2006; Verrier et al. 2008). Dies ist auch für *PXA1* zutreffend. Als mögliche Substrate werden neben den langen Fettsäuren und Acetat auch verschiedene natürliche Hormonvorstufen, wie Indolbuttersäure (IBA) und 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) aber auch artifizielle

Substrate wie 4-(2,4-Dichlorphenoxy)Buttersäure (2,4-DB) oder Fluoracetat vermutet (Zolman et al. 2001; Theodoulou et al. 2005; Hooks et al. 2007).

In Abb. 2 ist eine schematische Übersicht relevanter Reaktionen der β -Oxidation dargestellt. Die Mutanten beziehungsweise Doppelmutanten der dargestellten Loci sind allesamt β -Oxidations-defizient und ihre Keimung daher von externer Zuckergabe abhängig. Die *lacs6 lacs7* (*lacs6/7*) Doppelmutante weist Defekte in zwei Long-Chain-Acy-CoA Synthetasen (LACS) auf (Fulda et al. 2002; Fulda et al. 2004). Diese aktivieren die importierten Fettsäuren durch Veresterung mit Acetyl-CoA. *ACX1* und *ACX2* kodieren beide für Acy-CoA Oxidasen (Adham et al. 2005; Pinfield-Wells et al. 2005), die einen zentralen und essentiellen Schritt der β -Oxidation katalysieren ebenso wie der letzte wichtige Locus Ketoacy-Thiolase 2 (*KAT2*) (Hayashi et al. 1998; Germain et al. 2001). *KAT2* verkürzt die Fettsäure pro Oxidationszyklus, indem sie jeweils eine C2 Einheit in der Form von Acetyl-CoA abspaltet. Der verbleibende Acyl-CoA-Rest tritt in einen erneuten β -Oxidations-Zyklus ein (Abb. 2).

Eine detaillierte Auflistung aller bereits isolierten β -Oxidations-Mutanten ist in Graham 2008 zu finden.

1.6 Die β -Oxidation als Teil von Hormonwirkungen

Wie bereits in 1.5 erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass *PXA1* den Import von Hormonvorstufen vermittelt. In den Peroxisomen sind essentielle Reaktionen zur Produktion von Phytohormonen lokalisiert. Zunächst ist hier die Biosynthese der Jasmonsäure (JA) zu nennen. Jasmonsäure gilt im Allgemeinen als Hormon der pflanzlichen Abwehr, da es als Reaktion auf Verwundung des Blattgewebes, Ozon oder bei Angriff von Fraßfeinden und anderen Schädlingen ausgeschüttet wird (Liechti and Farmer 2006). Die JA-Akkumulation induziert neben der Expression von Abwehrgenen auch die Bildung von H_2O_2 , die den kontrollierten Zelltod im Bereich der Verwundung bewirkt (Reinbothe et al. 2009). In den letzten Jahren sind weitere Funktionen zum Beispiel als Wachstums- und Entwicklungsregulator bekannt geworden. So ist Jasmonsäure essentiell für die Blütenbildung. In Abwesenheit des Phytohormons kommt es zu verzögerter Antherenausbildung und Inhibition der Filamentelongation was zu männlich sterilen Mutanten führt (Wasternack 2007).

Im unverwundeten Zustand ist die Jasmonsäurekonzentration in Blättern auf ein niedriges Basisniveau reduziert. Als Reaktion auf eine Verwundung der Pflanze

kommt es jedoch zu einem sprunghaften Anstieg des Jasmonatspiegels (McConn et al. 1997). Verantwortlich hierfür sind zwei Galactolipasen (DGL und DAD1), die in den Plastiden α -Linolensäure aus dem Membranbestandteil Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) abspalten (Hyun et al. 2008). Nach diversen enzymatischen Modifikationsreaktionen entsteht das erste stabile Zwischenprodukt, die cis-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA). OPDA wird aus den Plastiden durch einen unbekanntem Mechanismus ins Zytosol exportiert und von dort in die Peroxisomen importiert. Durch Durchlaufen eines Zyklus β -Oxidation wird OPDA zum Endprodukt Jasmonsäure umgesetzt (Liechti and Farmer 2002; Baker et al. 2006). Faszinierend ist hierbei vor allem die Geschwindigkeit dieses wohl koordinierten Zusammenspiels. Obgleich die diversen beteiligten enzymatischen Reaktionen in unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind, ist bereits wenige Minuten nach der Verwundung ein deutlicher Anstieg der JA Konzentration zu messen (McConn et al. 1997).

Im Vergleich dazu zeigen *pxa1* Mutanten nach Verwundung ihrer Blattspreite einen weniger stark ausgeprägten Jasmonsäure-Anstieg, woraus gefolgert wurde, dass PXA1 am Import des OPDA aus dem Zytosol in die Peroxisomen beteiligt ist (Theodoulou et al. 2005). Korrespondierend dazu wurden ähnliche Resultate bei Verwundungsexperimenten der *acx1 acx2* und der *kat2* Mutante erzielt (Cruz et al. 2004; Schillmiller et al. 2007).

Indolessig- (IAA) und Indolbuttersäure (IBA) sind beide natürliche Auxine, die in einer Vielzahl verschiedener Pflanzenspezies identifiziert wurden (Epstein and Ludwigmuller 1993). Auxin reguliert komplexe Wachstums- und Entwicklungsprozesse (Woodward and Bartel 2005). Es wird vermutet, dass IBA in der Pflanze zu IAA umgesetzt wird. Auf Wildtyp Pflanzen hat die exogene Gabe von IBA oder IAA identische Wirkung; erstens eine Inhibierung des Wurzelwachstums, zweitens eine starke Induktion des Lateralwurzelwachstums (Zolman et al. 2000). Mutanten mit defekten Peroxisomen oder Beeinträchtigungen der β -Oxidation sind resistent gegen beide Effekte bei IBA Fütterung, aber weiterhin sensitiv bei IAA Fütterung. IBA wird demnach zunächst in die Peroxisomen importiert und dort durch β -Oxidation zu IAA umgesetzt (Zolman et al. 2008). Aus diesem Grund eignet sich IBA als hervorragendes Tool zum Screening solcher Mutanten (Zolman et al. 2000). Eine analoge Verstoffwechslung in der β -Oxidation wird auch für das Herbizid 2,4-

Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) angenommen (Hayashi et al. 1998), das dann ebenfalls erst nach Verkürzung durch die β -Oxidation aktiv ist.

Zusätzlich zur Biosynthese über IBA existieren mindestens zwei weitere Wege via Tryptophan oder indolische Tryptophanvorstufen zur IAA-Synthese (Woodward and Bartel 2005).

1.7 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Bis heute ist das Wissen über die physiologische Bedeutung der Fettverbrennung in Pflanzen weitestgehend auf den Prozess während der Keimung limitiert. Darüber hinaus existieren Hinweise, die für eine Relevanz in der Seneszenz sprechen.

Die im Vorfeld gesammelten Daten aus publizierten Transkriptions- und Metabolomanalysen deuteten auf eine weitere physiologische Funktion für die β -Oxidation als Teil des pflanzlichen Dunkelstoffwechsels hin. Um dies näher zu beleuchten, sollten daher an *A. thaliana* Mutanten mit defektem Fettsäureabbau (zum Beispiel *pxa1* und *kat2*) detaillierte Studien zu ihrem Verhalten in verlängerten Nachtphasen durchgeführt werden. Stärke ist das zentrale, diurnal regulierte Endprodukt der Photosynthese und gilt als die primäre Energiequelle während der Nacht. Da die Stärkespiegel jedoch in der Dunkelheit schnell auf 5-10% erschöpft sind, muss ein weiterer Puffer zur Energiegewinnung existieren. Durch Generierung und Studien von Doppelmutanten sollte eine mögliche Verbindung zwischen Stärke- und Fettstoffwechsel untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Distributor	Population	Linie	Linien- Name	Insertions/ Mutationsort
NASC	SALK Institute	SALK_019334	<i>pxa1-2</i>	At4g39850
		SALK_002100	<i>pxa1-3</i>	At4g39850
Steven M. Smith	Versailles collection		<i>kat2-1</i>	At2g33150
Martin Fulda	University of Wisconsin– Madison		<i>lacs6/7</i>	At3g05970
				At5g27600
Annick Stintzi	ABRC Ohio	CS2338	<i>opr3</i>	At2g06050
AG Flügge		EMS	<i>adg1-1</i>	At5g48300
AG Flügge		EMS	<i>pgm1-1</i>	At5g51820
AG Flügge		EMS	<i>pgi1-1</i>	At4g24620

Als Wildtyp diente *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. cv. Columbia (NASC-Nr. N1093).

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Anzucht auf Erde

Die Samen von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) wurden auf einem Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgelegt. Vor der Aussaat wurde die Mischung mit Leitungswasser durchtränkt. Die Pflanzschalen wurden mit Pikierhauben abgedeckt, um etwaige Kontaminationen durch Fremdsamen weitestgehend zu vermeiden. Zur Brechung der Samenruhe und Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat zunächst für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Keimung und Anzucht erfolgten anschließend in einem Gewächshaus oder einer Phytokammer. Die Pflanzen wurden bei einer Photonenflussdichte von circa 150-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Quantameter LI-1000 der Fa. Li-Cor) im Gewächshaus beziehungsweise 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in einer Phytokammer angezogen. Falls nicht

anders beschrieben wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 16:8 Stunden als Standard verwendet. Für die Beleuchtung in der Phytokammer wurde eine Mischung aus Tageslicht-Neonröhren verschiedener spektraler Qualitäten (Tageslicht L58W/11-860, Warmweiss L58W/30, Natura de Luxe L58W/76 und Fluora L58W/77) der Firma Osram verwendet. Die Temperatur betrug in der Lichtphase 22°C, während der Nachtphase 18°C. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 60%.

Nach circa 7 Tagen, sobald die Keimblätter vollständig entfaltet waren, konnte die Pikierhaube entfernt werden. Weitere 3 Tage später wurden die Pflanzen vorsichtig mit einer Pinzette in runde Einzeltöpfe (\varnothing 6 oder 9 cm) oder in eine Multitray-Schale vereinzelt. Die Bewässerung erfolgte ein - bis zweimal pro Woche durch Anstauung von Leitungswasser.

Bei den durch Gärtnerpersonal durchgeführten Maßnahmen zur Schädlingsbekämpfung kamen Gelbtafeln (Fa. Neudorff, Emmerthal, FRG), Nematodensuspension (Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG), Nützlinge (Chrysoperla; Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG) und bei starkem Blattlausbefall Confidor als 25% Emulsionsspritzlösung zum Einsatz.

Zur Samenernte nach Abschluss der Blütezeit wurden die Infloreszenzen zum Zeitpunkt der sichtbaren Gelbfärbung der Schoten mit Pergamentpapiertüten umhüllt und die Bewässerung eingestellt. Nach beendeter Samenreife wurden die getrockneten Blütenstiele abgeschnitten und in den Tüten zerrieben, um die Samen aus den Schoten zu lösen. Durch wiederholtes Sieben (Maschenweite 450 μ m) konnten die Samen nahezu rein gewonnen werden. Pflanzenreste blieben größtenteils im Sieb. Die Lagerung der Samen erfolgte in beschrifteten 2 ml Kunststoffgefäßen mit Schraubdeckel und Dichtungsring bei Raumtemperatur.

Aufgrund der S1-Bestimmung wurden Reste transgener Pflanzen, insbesondere Samen und reproduktive Organe bei 121°C und 1,2 bar für 40 min autoklaviert.

2.2.2 Anzucht in Sterilkultur

Aufgrund des Keimungsphänotyps von β -Oxidations-defizienten Mutanten wurde zur Keimung ihrer Samen, sowie der wildtypischen Kontrollsamens, stets die *in vitro*-Kultivierung von *A. thaliana* auf Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962), kurz MS-Medium, verwendet. Besagte Mutanten benötigen den Zusatz von Saccharose für die Keimung. Auf Erde bleibt daher die Keimung vollständig aus.

Die *in vitro*-Kultivierung von *A. thaliana* auf MS-Medium Platten wurde auch zur Selektion transformierter Pflanzen verwandt.

Murashige-Skoog (MS) Medium

Murashige & Skoog medium including modified vitamins (Duchefa)	2,2	g
Saccharose	2	% [w/v]
Phyto-Agar	1	% [w/v]
mit KOH pH auf 5,6 – 5,8 einstellen		
H ₂ O _{dest}	1	l
autoklavieren		

Zur Selektion transformierter Pflanzen wurde das autoklavierte Medium bis zur Handwärme abgekühlt und die jeweilige Menge an steril-filtrierte Antibiotika hinzugegeben.

Antibiotikum	Endkonzentration	Stock-Konzentration	Lösungsmittel
Kanamycin	50 µg/ ml	50 mg/ ml	H ₂ O
Hygromycin	50 µg/ ml	50 mg/ ml	H ₂ O

2.2.3 Sterilisieren und Selektieren von Samen

Vor der Aussaat der Samen erfolgte stets eine Nasssterilisation. Hierzu wurden jeweils circa 80 – 100 mg Samen in beschriftete Eppendorfgefäße eingewogen. Nun erfolgte unter einer Sterilbank zunächst die Zugabe von 1 ml 75% EtOH. Die Samen in den Eppendorfgefäßen wurden unter Verwendung eines Vortexes durchmischt und für 10 s bei 7.500 rpm in einer Zentrifuge pelletiert. Der ethanolische Überstand wurde vollständig mit einer Pipette entfernt und durch 1 ml 100% EtOH ersetzt. Es folgten erneut Mixen und Pelletieren. Der 100% EtOH-Überstand wurde vollständig abgenommen und das Eppendorfgefäß mit dem Sameninhalt für circa 30 min geöffnet unter der Sterilbank stehen gelassen. Nach genannter Zeit war das EtOH vollständig verdunstet, sodass Gefäß inklusive Samen verschlossen und für 48 h bei 4°C zur Stratifikation gelagert werden konnten.

Hiernach wurden die Samen unter einer Sterilbank auf die MS-Medien Platten ausgebracht. Diese wurden mit luftdurchlässigem Vliesklebeband (Omnipor der Fa. Hartmann) versiegelt und in einem Phytoinkubationsschrank der Firma Percival unter Langtagbedingungen (Light/Dunkel: 16/ 8 h) bei einer Temperatur von 22°C und 60% Luftfeuchte gekeimt.

Transformanten, die auf Selektionsmedium angezogen wurden, konnten 7 Tage nach Keimung von Nicht-Transformanten selektiert und, wie in 2.2.1 beschrieben, vereinzelt und auf Erde angezogen werden.

2.3 Verwendete Bakterienstämme

2.3.1 *Escherichia coli*

Zur Klonierung der beschriebenen Konstrukte wurden die folgenden *E. coli* Stämme verwandt:

DH5α zur Amplifikation von Plasmiden

supE44 ΔlacU169 (Φ80, lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1

relA1

DB3.1 zur Amplifikation der Destination-Vektoren mit *ccdB* Gen

F- *gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2*

lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 - leu mtl1

2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Transformation von *A. thaliana* mit den im Text beschriebenen DNA-Konstrukten wurden die folgenden *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) Stämme verwandt:

GV3101 zur Transformation von *A. thaliana*

Rif^RGm^R

2.4 Anzucht von Bakterien

2.4.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte stets in autoklavierten LB-Nährmedien beziehungsweise auf autoklavierten LB-Nährmedien-Platten bei 37°C:

LB-Medium

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
H ₂ O _{dest.}	1	l
Für Platte: Bacto-Agar	1,5	%

autoklavieren

2.4.2 Anzucht von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* Bakterien erfolgte stets in autoklavierten YEB-Nährmedien, beziehungsweise auf autoklavierten YEB-Nährmedien-Platten bei 28°C:

YEB-Medium

Bacto Peptone	5	g
Fleischextrakt	5	g
Hefeextrakt	1	g
Saccharose	5	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5	g
H ₂ O _{dest.}	1	l
Für Platte: Bacto-Agar	1,5	%

autoklavieren

2.4.3 Verwendete Antibiotika in der Bakterienanzucht

Antibiotikum	Endkonzentration	Stocklösung	Lösungsmittel
Ampicillin	50 µg/ml	50 mg/ml	Wasser
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml	Wasser
Hygromycin	50	50 mg/ml	Wasser
Gentamycin	25	25 mg/ml	Wasser
Rifampicin	150	30 mg/ml	DMSO

2.5 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

2.5.1 Herstellung TSS-kompetenter *E. coli*

Die Herstellung TSS-kompetenter Bakterien erfolgte nach Chung & Miller (Chung et al. 1989). Zunächst wurde hierzu bei 37°C eine Über-Nacht-Kultur des gewünschten Bakterienstammes (zum Beispiel DH5α) in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angezogen. Am folgenden Tag wurde mit 1 ml der Über-Nacht-Kultur eine 100 ml Kultur in einem Erlenmeierkolben mit frischem LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde solange bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4 und somit der Eintritt der exponentiellen Wachstumsphase erreicht war. Es folgte eine Aufteilung der Kultur in zwei 50 ml-Röhrchen. Zur Ernte der Zellen durch Sedimentation wurden die 50 ml Röhrchen für 10 min bei 4°C und 5.000 rpm (Rotor GS, Sorvall RC5B) zentrifugiert. Beide Pellets wurden in je 10 ml eiskaltem TSS-Medium aufgenommen, vereinigt und dann für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine schnelle Aliquotierung der Zellen à 50 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße, die direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für maximal 2 Monate bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

TSS-Medium

Polyethylen Glykol 8000 in LB-Medium	10	% (v/v)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	5	(v/v)
MgCl ₂	20-50	mM
MgSO ₄	20-50	mM

mit NaOH pH 6,5 einstellen

ad H₂O_{dest}

autoklavieren

2.5.2 Heat-Shock-Transformation kompetenter *E. coli*

Für die Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der TSS-kompetenter *E. coli* (2.5.1) auf Eis aufgetaut und mit der DNA, bspw. aus einer Gateway-Reaktion, versetzt. Die Bakterien-DNA-Mischung wurden dann 5 min auf Eis inkubiert. Mittels eines auf 42°C vortemperierten Wasserbads erfolgte dann die eigentliche Transformation durch die Heat-Shock-Methode. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß mit der Mischung für exakt 90 s im Wasser auf 42°C erhitzt und im Anschluss für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann in einer Zentrifuge für 3 min bei 7.500 rpm (Eppendorf 5417) pelletiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 100 µl LB resuspendiert. Diese Suspension wurde vollständig auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.6 Herstellung und Transformation kompetenter *A. tumefaciens***2.6.1 Herstellung Elektro-Shock-kompetenter *A. tumefaciens***

Als Vorkultur wurden *A. tumefaciens* Bakterien in einer 5 ml MGL-Medium angezogen. Nachdem sie bis zur frühen stationären Phase gewachsen waren, wurde dies genutzt, um eine 100 ml MGL-Medium-Kultur mit einer OD₆₀₀ von circa 0,04-0,08 anzupflanzen und so die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 heranzuziehen. Diese Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor GS, Sorvall RC5B) und in 40 ml eiskaltem 1 mM HEPES, pH 7,0 aufgenommen, erneut abzentrifugiert und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES/ 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor SS34, Sorvall RC5B) wurden die Zellen in 2 ml 1 mM HEPES/ 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, kurz sedimentiert und in

200-400 µl HEPES/ 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Es folgte eine schnelle Aliquotierung der Zellen à 50 µl in 1,5 ml EppendorfgefäÙe, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert wurden.

MGL-Medium

Bacto-Trypton	0,5	% (w/v)
Hefe-Extrakt	0,25	% (w/v)
NaCl ₂	0,5	% (w/v)
Mannit	0,5	% (w/v)
Na-Glutamat	0,116	% (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,025	% (w/v)
MgSO ₄	0,01	% (w/v)
Biotin	1	mg
H ₂ O _{dest}	1	l

autoklavieren

2.6.2 Elektro-Shock-Transformation kompetenter *A. tumefaciens*

Für die Transformation wurde zunächst ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen aufgetaut und ungefähr 200 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Mischung wurde für 5 min auf Eis gehalten und dann vollständig in eine eiskalte 0,2 cm Elektro-Shock-Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω, 2,5 kV Puls und 8-9 ms Verzögerung (Genepulser II, Biorad). Im direkten Anschluss wurde 1 ml YEB Medium zum Ansatz hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 28°C unter leichtem Schütteln, wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min, 7.500 rpm, Eppendorf 5417 Zentrifuge). Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 200 µl LB resuspendiert und 50 µl der Bakteriensuspension auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden dann 2 Tage lang bei 28°C inkubiert.

2.7 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* wurde mit der „floral dip“ Methode ausgeführt (Clough and Bent 1998). Hierzu wurden zunächst die Samen der gewünschten *A. thaliana* Pflanzen, Wildtyp (Col-0) oder aber Mutanten, zur Keimung gebracht. Im Vier- bis Sechsstadium erfolgte die Vereinzelnung von vier bis fünf Pflanzen auf einen Topf (\varnothing 9 cm). Nach circa 2-3 Wochen im Gewächshaus bildeten die Pflanzen eine Primärblüte, die zurückgeschnitten wurde, worauf sie eine Woche später buschig neu ausblühen. Dies hatte zum Zweck, möglichst viele Infloreszenzen für die Transformation zu bekommen.

War dieses Stadium erreicht, wurde mit der Anzucht der *A. tumefaciens* Kultur für die Transformation begonnen. Hierzu wurde zunächst von einer bewachsenen YEB-Platte, eine 5 ml Vorkultur des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht bei 28°C auf dem Schüttler angezogen. Am folgenden Tag wurde eine 500 ml YEB-Flüssigmediumkultur mit 1 ml der Vorkultur inokuliert und abermals über Nacht bei 28°C geschüttelt. Zur Selektion beinhalteten die Medien jeweils die notwendigen Antibiotika.

Tags drauf war die 500 ml Kultur dicht genug bewachsen, sodass die Sedimentation der Zellen durch 15 min zentrifugieren bei 3.500 g erfolgte (Rotor GS, Sorvall RC5B). Das Pellet wurde durch Schütteln in 400 ml Transformationsmedium resuspendiert und war somit gebrauchsfertig. Um die Zahl negativer Samen zu reduzieren, wurden alle bereits gebildeten Samenschoten an den Pflanzen entfernt und die verbleibenden Infloreszenzen für jeweils 40 s in das Transformationsmedium mit den *A. tumefaciens* Bakterien getaucht. Die transformierten Pflanzen wurden dann für 2 Tage kühl und dunkel gelagert, bevor sie wieder ins Gewächshaus gestellt wurden. Hier erfolgte die weitere Anzucht bis hin zur Samenernte.

Transformationsmedium

Saccharose	5	% (w/v)
Silwet-L77	0,05	% (v/v)
ad H ₂ O _{dest}		

2.8 Isolation und Präparation von DNA

2.8.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.8.1.1 Isolation von *E. coli* Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Zur Plasmid-DNA im Mini-Maßstab aus *E. coli* wurde standardmäßig eine 5 ml Kultur benutzt. Hierzu wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Um Laborkosten einzusparen, wurde die Bindungsmatrix im Labor hergestellt und die gelieferten Säulchen nach gründlicher Reinigung mit H₂O_{dest} mehrfach benutzt.

Bindungsmatrix

Guanidin-HCl	5,3	M
Tris pH 8,0	20	mM
Diatomeenerde	0.15	g/ml

2.8.1.2 Isolation von *E. coli* Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Zur Gewinnung von *E. coli* Plasmid-DNA in größeren Mengen und sehr reiner Qualität wurde zunächst eine Übernachtskultur von 50 ml Volumen angezogen. Am nächsten Morgen erfolgte die Bakterienernte durch einfaches 15 min Zentrifugieren der Bakterienlösung bei 7000 rpm. Im Folgenden kam das Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben zu Verwendung.

2.8.2 Schnellpräparation von genomischer DNA (gDNA) aus *A. thaliana*

Eine einfache und schnelle Methode zur Präparation genomischer Pflanzen-DNA ist die sogenannte Edwards-Methode (Edwards et al. 1991). Auf diese Weise isolierte genomische DNA eignet sich gut als Matrize in PCR-Analysen und wurde daher zur Isolation pflanzlicher gDNA für PCR-basierte Genotypisierung eingesetzt.

Ein bis drei Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und entweder sofort verarbeitet oder bis zur DNA-Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde mit einem Bohrer bei Raumtemperatur in 1,5 ml Eppendorfgefäßen homogenisiert. Zum homogenisierten Gewebe wurden 400 µl des Extraktionspuffers hinzugefügt und für 3 - 4 s gevortext. Waren alle gewünschten Proben aufgearbeitet, erfolgte eine anschließende Klärung des Extrakts durch 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm. Der resultierende Überstand

wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und zur Fällung mit 300 µl Isopropanol gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA konnte nun durch 10 min Zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer Eppendorf 5417 Zentrifuge pelletiert werden. Hiernach wurde der Überstand verworfen. Sofern eine erhöhte Reinheit der gDNA erforderlich war, wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol versetzt, gewaschen und erneut 5 min bei 13.000 rpm pelletiert. Es folgte das bestmögliche Entfernen des ethanolischen Überstands, sodass das Pellet auf der Laborbank innerhalb von circa 30 min lufttrocknen konnte. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in 50 µl H₂O_{dest} resuspendiert und hiervon 1 µl pro 20 µl PCR-Reaktion eingesetzt.

Extraktionspuffer

Tris/HCl pH 7,5	200	mM
NaCl	250	mM
EDTA	25	mM
SDS	0,5	% (w/v)

autoklavieren

2.9 Analyse und Klonieren von DNA

2.9.1 DNA Analyse mit Hilfe verschiedener PCR Methoden

Die 1986 von Kary Mullis entwickelte Methode ermöglicht es, mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen, spezifische DNA-Abschnitte, in der Polymerase-Ketten-Reaktion (kurz PCR, „Polymerase-Chain-Reaction“) exponentiell zu vermehren (Mullis 1990). Der zu amplifizierende Abschnitt wird durch flankierende, kurze, meist synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer festgelegt. Diese binden dann die komplementären Sequenzen auf dem Template-Strang. Durch die zyklische Abfolge von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation werden neue doppelsträngige DNA-Moleküle des gewünschten DNA-Bereiches gebildet. Die vier zur Synthese benötigten Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) müssen im Überschuss im PCR-Ansatz vorhanden sein.

Zu beachten ist die jeweilige Auswahl der zu verwendenden Polymerase. So genannte Taq-Polymerasen beispielsweise erzeugen T/A-Überhänge am PCR-Produkt und besitzen eine höhere Fehlerquote. Falls ein Produkt ohne Überhang

erwünscht wird oder die Fehlerquote nur sehr gering sein darf, empfiehlt sich der Einsatz einer sogenannten Pfu-Polymerase.

2.9.1.1 Die Colony-PCR zur DNA-Analyse von Mikroorganismen

Als schnelle und zuverlässige Methode, um eine Vielzahl von Mikroorganismenklonen nach einer Transformation mit beispielsweise einem ligierten Plasmid auf dessen Vorhandensein zu überprüfen, gilt die Colony-PCR. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden hierzu zum Beispiel einige Bakterienzellen einer Kolonie in ein 50 µl PCR-Reaktions-Tube überführt. Mit derselben Pipettenspitze wurde danach kurz eine selektive LB-Agar-Platte berührt, um eine Replikat-Platte zu erzeugen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. In das PCR-Reaktions-Tube wurde direkt auf die Zellen 20 µl des PCR-Mastermix gegeben. Für die anschließende Reaktion im Thermocycler ist zu beachten, dass der Initialschritt bei 96°C mindestens eine Dauer von 5 min besitzt. Nur so wird gewährleistet, dass genügend Zellen zerstört werden und ihre DNA als Matrize dienen kann.

2.9.1.2 Screening-PCR zur Genotypisierung transgener *A. thaliana*

Da *A. thaliana* einen diploiden Chromosomensatz besitzt, ist es von großer Wichtigkeit sicherzustellen, dass eine T-DNA Insertion homozygot, das heißt auf beiden Chromosomen vorhanden ist. Ist sie nur auf einer Kopie erfolgt, spricht man von Heterozygotie. Da die meisten Gendefekte rezessiv sind, können heterozygote Pflanzen nicht zum Experimentieren benutzt werden.

Zur Bestimmung der Zygotie müssen stets zwei PCR-Reaktionen pro Pflanze durchgeführt werden. Zunächst wurde, wie in 2.8.2 beschrieben, gDNA isoliert und als PCR-Template eingesetzt. Der erste Ansatz beinhaltete beide genspezifische Primer. Der zweite Ansatz enthielt ein zum linken Ende der T-DNA homologes Oligonukleotid (left border primer) und, je nach zuvor bestimmter Orientierung der T-DNA durch den Distributor, den jeweiligen genspezifischen forward- oder reverse-Primer. Im gewünschten Fall der Homozygotie einer T-DNA Insertionslinie entstand nur im zweiten Ansatz ein Amplifikationsprodukt, während das genspezifische Produkt der ersten Reaktion, aufgrund der bis zu 5 kb großen inserierten T-DNA, nicht erfolgreich amplifiziert werden konnte.

Eine leicht abgeänderte Methode wurde auch dazu verwendet, positiv selektionierte Pflanzen (2.2.3), unabhängig von ihrer Resistenz, als transgen zu bestätigen.

2.9.2 Verwendete Primer

Für die Klonierung, Screenings oder die Isolierung von T-DNA Insertionsmutanten wurden die folgenden Primer verwendet:

Primername	Primersequenz (5'-3')
PXA1 Intron s	tacgcttctccagtttgca
PXA1 s11	ctgctcagaaattgatggctag
PXA1 as12	cactgggtgtacaactttgctgc
PXA1 as14	agaagctagataccgcaatg
SALK LB A1	tgggtcacgtagtgggccatcg
pRS300 A topo s	caccctgcaaggcgattaagttgggtaac
pRS300 B as	gcgataacaattcacacaggaacag
PXA I miRNA s	gattatgtgtaaagtatggcgactctctct
PXA II miRNA as	gagtcgccatactttacacataat
PXA III miRNA s	gagtagccatactttcacatattcacaggtcgtgatatg
PXA IV miRNA as	gaatatgtgaaaagtatggctactctacatatatattcct
35s s	gcaagacccttctctatataag

2.9.3 Agarosegelelektrophorese

Analytische und präparative Gründe machen es häufig notwendig, die in einer Probe enthaltenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Diese Aufgabe erfüllt die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook and Russel 2001).

Hierzu wurden je nach gewünschter Auflösung der Fragmente 0,8 – 2% (w/v) Agarose-Lösungen in 1 x TAE-Puffer angesetzt. Um die Agarose vollständig zu schmelzen, wurde die Lösung für einige Minuten in einer Mikrowelle erhitzt.

Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und ist unter UV-Licht aktiv, womit sich einzelne DNA-Fragmente sichtbar anfärben lassen. Daher wurde in die erhitzte Agarose-Lösung 1:20.000 Vol Ethidiumbromid zugesetzt. Die so vorbereitete Mischung wurde dann in eine Kammer mit Kamm gegossen. Nach Erkalten und Entfernen des Kammes, konnte der entstandene Hohlraum im Gel zum Einfüllen der jeweiligen Probe genutzt werden.

Um zu verhindern, dass die in den Proben enthaltene DNA auftreibt oder diffundiert, wurden die Proben stets mit 10 x Ladepuffer verdünnt und dann auf das Gel geladen.

Die anschließende Elektrophorese wurde bei einer angelegten Stromstärke von 1 - 1,5 mA/cm² Gelfläche in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Zur Größenbestimmung einzelner Fragmente wurde auf dasselbe Gel mindestens auf eine Tasche ein DNA-Längenstandard, auch DNA-Leiter genannt, aufgetragen (1 kb-Längenmarker, Invitrogen). Durch die oben genannte Interkalierung des Ethidiumbromids mit doppelsträngiger DNA konnten im Anschluss an den Auftrennungsprozess die einzelnen DNA-Banden auf einer UV-Durchlichtapparatur (254 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (Video-Bildverarbeitungsgerät, Intas)

50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE)

Tris/ HAc, pH 7,5	2	M
EDTA	50	mM

2.9.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Hierbei ist zu beachten, dass die DNA nicht zu lange dem UV-Licht ausgesetzt wird. Dies kann zu Mutationen in der DNA-Sequenz führen. Die im Gel enthaltene DNA wurde anschließend unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerinstruktionen aus dem Agarosegel isoliert.

2.9.5 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA erfolgte auf zweierlei Arten, entweder durch abschätzenden Vergleich mit einer bekannten Konzentration des DNA 1 kb-Längenmarkers (Fa. Invitrogen) oder durch die Absorptionsmessung einer Nukleinsäurelösung im Spektralphotometer (BioPhotometer plus, Eppendorf).

Die Quantifizierung einer Nukleinsäurelösung mit Hilfe eines Photometers erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 260 nm. Hierzu wurden 2 µl einer DNA-Probe in 98 µl H₂O_{dest} verdünnt. Zunächst wurde das Photometer mit dem Lösungsmittel (hier H₂O_{dest}) auf null geeicht, im Anschluss wurden dann die Absorptionswerte der Probe bei einer Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 280 nm in einer UVette® (Eppendorf) gemessen. Proteinverunreinigungen in der Lösung lassen sich aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm abschätzen. Ihr Quotient E_{260} / E_{280} sollte

zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Eine zusätzliche Messung der Absorption bei 230 nm kann Auskunft über Verunreinigungen durch Phenolrückstände oder Polysaccharide geben. Dabei sollte der Quotient E_{260}/E_{230} ungefähr 2 betragen.

2.9.6 Restriktion von DNA

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurde das Restriktionsendonukleasen- und Puffer-System der Firma MBI Fermentas gemäß der Herstelleranweisung verwendet.

2.9.7 Ligation von DNA-Enden

Die T4 DNA-Ligase ermöglicht durch Verbinden der endständigen 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatgruppen einzelne DNA-Abschnitte miteinander zu verknüpfen. Diese Reaktion ist ATP-abhängig. Es können sowohl zueinander komplementäre oder auch glatte Enden miteinander verknüpft werden.

DNA- und linearisierte Vektorfragmente wurden im molaren Verhältnis 3:1 gemischt. Zusätzlich enthielt ein 10 µl-Ansatz 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 1-2 U T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) sowie $H_2O_{dest.}$ Die Reaktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Tags darauf wurde der gesamte Ansatz für die Transformation kompetenter *E. coli* verwendet (2.5.2).

2.9.8 Topo[®]- und Gateway[®]-Klonierung

Alternativ zum in 2.9.7 beschriebenen Klonieren unter Verwendung von T4 DNA-Ligase ist in den letzten Jahren die Topo[®]- und Gateway[®]-Klonierung (Invitrogen) entstanden.

Der für Gateway[®]-Klonierungen notwendige Entry-Klon wurde mit Hilfe des Topoisomerase, kurz Topo, basierten Systems erstellt. Es ermöglicht ein PCR-Produkt ohne Ligase in einen käuflich erworbenen linearisierten Vektor (pENTR-D-topo) einzufügen und wurde gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen) verwendet.

Das Gateway[®]-System beruht auf dem Rekombinase-Klonierungssystem des Bakteriophagen λ . Dieses besitzt insgesamt vier, als att-sites bezeichnete, Erkennungssequenzen. Diese können auf spezifische Weise miteinander rekombiniert werden. So ist es möglich, die DNA zwischen den att-sites eines Entry-Klons in einen Expressions- oder Destination-Vektor, der ebenfalls über korrespondierende att-sites verfügt, zu transferieren.

Unerwünschte Rekombinationsnebenprodukte werden durch verschiedene Resistenzgene in den jeweiligen Vektor-Backbones und durch das toxische *ccdB*-

Gen, das vom Destination-Vektor in den Entry-Vektor rekombiniert, wegselektiert. So wird es beispielsweise möglich mit nur einem Entry-Klon viele verschiedene Expressionssysteme einfach und effizient zu klonieren. Dies kann dazu beitragen, in kurzer Zeit eine Vielzahl verschiedener Fragestellungen zu untersuchen.

Das Gateway[®]-System wurde gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen) verwendet.

2.10 Proteinbiochemie

2.10.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Die Proteinextraktion aus *A. thaliana* wurde mit Blattgewebe durchgeführt. Hierfür wurden 3-4 Rosettenblätter geerntet und unmittelbar bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Falls erwünscht, konnte das Material bei -80°C gelagert werden.

Zum Gewebeaufschluss wurde das Blattmaterial in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu Pulver zerrieben. Von diesem Pulver wurden jeweils 100 mg in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen und mit exakt 100 µl des Proteinextraktionspuffers versetzt. Nachdem die Mischung auf Eis getaut war, wurde sie mit Hilfe eines Vortex für 5-10 s gut gemischt. Dieser Vorgang unterstützte den Extraktionsprozess.

Um Gewebetrümmer aus dem Extrakt zu entfernen, wurde der Ansatz zweimal für jeweils 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der geklärte Überstand in ein vorgekühltes, sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem letzten Schritt erschien der Extrakt klar und farblich nur noch fahl grün. Bis zur Proteinbestimmung wurde er auf Eis gelagert.

Proteinextraktionspuffer

Tris/HCl pH 7,5	50	mM
EDTA	1	mM
NaCl	150	mM
DTT	1	mM
Glycerin	10	% (v/v)
50 x Proteinase Inhibitor Mix	1	% (v/v)

(Sigma)

2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt in detergentenfreien, wässrigen Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Dazu wurde zunächst die Bradford-Farbreaktionslösung (Roth) 1:1 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt. 998 μl der Verdünnung wurden jeweils mit 2 μl der zu bestimmenden Proteinlösung in eine Messküvette gegeben, durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption der Lösung gegen einen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ -Leerwert bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer (Biophotometer; Eppendorf) gemessen. Zur Referenz wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) eine Eichgerade erstellt. Die hier gemessenen Absorptionswerte der bekannten BSA-Konzentrationen dienen zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Pflanzenextrakten.

Die Konzentration der einzelnen Proben wurde auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und 5 x Ladepuffer zugesetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden alle vorbereiteten Extrakte für 5 min auf 100°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte nach Laemmli (Laemmli 1970). Die hierfür notwendigen SDS-Polyacrylamidgele wurden in einer Minigel-Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Der Start der Polymerisierungsreaktionen erfolgte durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED. Pro Tasche wurden dann exakt 12,5 μl Probe geladen. Als Größenreferenz dienten 5 μl eines Molekulargewichtsmarkers (SM0671 Prestained Marker, MBI Fermentas). Um eine möglichst gleichmäßige Auftrennung zu erhalten, wurde die Stromstärke für die ersten 10 min bei 10 mA konstant gehalten. Der restliche Lauf erfolgte bis zum Erreichen der Proteinfront am Ende des Trenngels bei 25 mA.

4 x Trenngelpuffer

Tris/HCl pH 8,8	1,5	M
SDS	0,4	% (w/v)

4 x Sammelgelpuffer

Tris/HCl pH 6,8	0,5	M
SDS	0,4	% (w/v)

12,5% Acrylamid Trenngel

4 x Trenngelpuffer	25	% (v/v)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)	42	% (v/v)
APS	0,05	% (w/v)
TEMED	0,05	% (w/v)

Acrylamid Sammelgel

4 x Trenngelpuffer	25	% (v/v)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)	15	% (v/v)
APS	0,06	% (w/v)
TEMED	0,3	% (w/v)

10 x Elektrodenpuffer

Tris	250	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,5	% (w/v)

5 x Probenpuffer

Tris/HCL pH 6,8	312,5	mM
Glycerin	50	% (v/v)
SDS	12,5	% (w/v)
β-Mercaptoethanol	12,5	% (v/v)
Bromphenolblau	0,00625	% (w/v)

2.10.4 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (BioRad) wurde mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) in einer Transfer-Kammer (Carboglass, Schleicher & Schuell) durchgeführt. Der Aufbau der Apparatur sowie die Vorbereitung der Transfer-Puffer erfolgten gemäß den Herstellerangaben der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot® - System, Roth). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 10 s in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer dauerte 120 min bei 1 mA/cm^2 Gelfläche.

2.10.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran für mindestens 1 h im Block-Puffer bei Raumtemperatur geschüttelt, um sie mit Proteinen der Milchlösung abzusättigen. Dieser Vorgang verhindert die unspezifische Bindung der Antikörper. Der primäre Antikörper wurde je nach Bedarf 1:2.500 bis 1:3.000 in 4% Milchpulver TBS-Puffer verdünnt und 1-3 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min mit TBST-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen. Nun wurde der sekundäre Antikörper in einer 1:3.000-Verdünnung in 4% Milchpulver TBS-Puffer mit der Membran für 1-2 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist zu Detektionszwecken mit dem horse-radish peroxidase (HRP)-Protein (Sigma) konjugiert. Durch Zugabe des Substrats entsteht Chemolumineszenz. Somit lässt sich die Antikörperbindung an eine Membran sehr gut nachweisen.

Die Antikörperlösungen konnten bei -20°C eingefroren und mehrfach wiederverwendet werden.

Block-Puffer

Magermilchpulverin 1 x TBS 4 % (w/v)

10 x TBS

Tris/ HCl pH 7,4	0,1	M
NaCl	1,5	M

TBST-T

10 x TBS	10	% (v/v)
Triton X-100	0,2	% (v/v)
Tween 20	0,05	% (v/v)

2.10.6 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Um im Anschluss an die immunologische Proteindetektion zu bestätigen, dass der Proteintransfer auf die PVDF-Membran gleichmäßig und somit quantitativ erfolgte, wurde die Coomassie-Proteinfärbung nach Weber und Osborn (1969) angewandt. Dazu wurden die Färbelösungen I und II zu gleichen Teilen gemischt und die PVDF-Membran hierin für 15 s unter leichtem Schütteln gefärbt. Nach dieser Zeit wurde die Membran mit Hilfe einer Pinzette in die Entfärbelösung überführt und bis zum gewünschten Grad der Entfärbung unter Wechseln der Lösung geschüttelt. Bei Bedarf wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Färbelösung I

Coomassie-Brilliantblau (Serva)	0,5	% (w/v)
---------------------------------	-----	---------

Färbelösung II

Essigsäure	20	% (v/v)
------------	----	---------

Entfärbelösung

Essigsäure	10	% (v/v)
Methanol	40	% (v/v)

2.11 Pulse Amplitude Modulation (PAM) Messungen

2.11.1 PAM Messungen an intakten *A. thaliana* Pflanzen

Die in vivo Chlorophyll a Fluoreszenz Messungen an intakten Pflanzen wurden mit einer IMAGING-PAM der Maxi-Serie (Heinz-Walz Instrumente) durchgeführt.

Zur PAM Messung intakter Pflanzen wurden stets 3 Wochen alte, in Sterilkultur oder auf Erde angezogene Pflanzen verwendet. Für alle Messungen, die nicht direkt im

Verlauf eines Dunkelexperiments stattfanden, mussten die Pflanzen stets unmittelbar vor der Messung für 20 min in Dunkelheit präinkubiert werden.

Um Schädigungen des pflanzlichen Photosystems II (PS II) quantitativ erfassen zu können, wurde stets eine Hell-Dunkel-Induktionskurve aufgenommen. Die hierbei verwendeten Parameter sind die Folgenden: Aktinisches Licht 8 ($186 \text{ mmol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$), Slow-Induction Parameter: delay 40 s, clock 20 s, duration time 315 s. Zu Beginn jeder Messung wurde das F_v/F_m berechnet. Es kann als Maß für die Intaktheit des Photosystems II angesehen werden. Die Quanteneffizienz für den Elektronenfluss von PS II (Φ_{PSII}) wurde nach Genty et al. (1989) berechnet.

2.11.2 Plastidenisolierung und PAM Messung an isolierten Plastiden

Für die PAM Messungen an isolierten Chloroplasten wurden zunächst circa 10 g Blattmaterial am Ende einer normalen Nachtperiode im Dunkeln geerntet (Kunst et al. 1988). Mit Hilfe eines Mixers wurde das Blattgewebe dann in eiskaltem Puffer I homogenisiert. Um Zell- und Gewebetrümmer aus der Lösung zu entfernen, wurde sie zunächst 2 x durch eine Lage aus Mullgewebe filtriert und im direkten Anschluss für 1 min bei 4.000 rpm zentrifugiert (Sorvall SS-34). Die im Pellet gesammelten Chloroplasten wurden vorsichtig in Puffer II resuspendiert, gewaschen, dann erneut pelletiert (15 s; 6.000 rpm) und in einem kleinen Volumen Puffer II gelöst. In jeder in vitro PAM Messung wurden Plastiden korrespondierend einer Chlorophyll-Konzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ in 2 ml Puffer III mit der jeweiligen Menge an 18:3 α -Linolensäure oder EtOH verdünnt. Im direkten Anschluss wurde dann mit einer WATER-PAM (Heinz-Walz Instrumente) eine Induktionskurve gemessen.

Puffer I

Sorbitol	450	mM
Tricin/ KOH pH 8,4	20	mM
EDTA	10	mM
BSA	0,1	% [w/v]

Puffer II

Sorbitol	330	mM
Tricin/ KOH pH 7,6	20	mM
EDTA	2,5	mM
MgCl ₂	5	mM

Puffer III

Sorbitol	330	mM
Tricin/ KOH pH 7,6	20	mM
EDTA	2,5	mM
MgCl ₂	5	mM
Kalium-Phosphat Puffer pH 7,5	5	mM
Oxalacetat	3	mM

2.12 Probenvorbereitung und Spurreinbettung von Pflanzengewebe zur licht- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung

Für die Einbettung von *A. thaliana* Blattgewebe wurde eine leichte Abwandlung des Originalprotokolls (Spurr 1969) mit niedrigeren Konzentrationen verwandt.

2.12.1 Probenfixierung

Zu gewünschten Zeitpunkten wurde das Pflanzenmaterial mithilfe einer Rasierklinge in kleine Teile (Minimum 1 mm²) zertrennt und in ein Reaktionsgefäß mit 1% Glutaraldehyd gegeben. Die Gewebeschnipsel wurden solange unter Vakuum infiltriert, bis alle Stücke im Glutaraldehyd abgesunken waren. Geschah dies nicht, konnte nach Bedarf 0.01%– max. 0.1% Triton X 100 im Extremfall zugegeben werden. Es folgte eine Inkubation für 4–5 h bei Raumtemperatur und die Probenlagerung bei 4°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit 50 mM PIPES-Puffer gewaschen und bei der letzten Pufferabnahme auf besondere Vollständigkeit geachtet. Es folgte die Überschichtung des Probenmaterials mit Osmiumtetroxid (OsO₄) und eine Inkubation für 4 h bei 4°C, in deren Anschluss dreimal mit H₂O gewaschen wurde.

Lösungen

PIPES-Puffer pH 7.2	50	mM
Glutaraldehyd in 50mM PIPES, pH 7.2	1	% [w/v]
Osmiumtetroxid in H ₂ O	1	% [w/v]
Uranylacetat in H ₂ O	2	% [w/v]

2.12.2 Gewebeentwässerung

Um dem pflanzlichen Gewebe vollständig das Wasser zu entziehen, wurde nach vollständiger Entfernung des Überstands schrittweise mit aufsteigenden Konzentrationen an Aceton (10, 20, 30, 40%) überschichtet und jeweils 5-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 50% Aceton/ 1% Uranylacetat hinzugefügt und erneut für 90-120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme des Überstands wurde der Acetongradient mit 60, 70, 80, 90, 96% und dreimal mit 100% Aceton für jeweils 5-20 min bei Raumtemperatur fortgesetzt.

2.12.3 Einbettung in das Spurrmedium

Nach vollständiger Entwässerung des Gewebes wurde nun das Material mit einem ansteigenden Spurrmediumgradient überschichtet. Gestartet wurde mit 10% Spurr in Aceton für 1 h, dann 25% Spurr/ Aceton bei Raumtemperatur über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Gradient für jeweils 2 h in 50, 70, 90% Spurr/ Aceton fortgesetzt. Über Nacht folgte dann die Inkubation in 100% Spurr. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnipsel in frischem 100% Spurr in kleine Förmchen gegeben und bei 55-60°C zwei Tage lang auspolymerisieren und aushärten gelassen.

Spurrmedium

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

2.12.4 Schnitte und Einfärbung

Im Falle von lichtmikroskopischen Analysen des Blattgewebes wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, für 1 min in Toluidinblau angefärbt und dann mit H₂O_{des} wieder gewaschen.

Für die transmissionselektronische Mikroskopie wurden mithilfe eines Ultramikrotoms (MT-600; RMC) 60 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt, die mittels Uranyl Acetat und Bleicitrat kontrastiert wurden.

2.13 Fettprofil- und IAA-Analysen

Zur Analyse der Fettprofile wurde Blattmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser pulverisiert.

Die weitere Aufarbeitung, Extraktion und Analytik erfolgte, wie in Kunz et al. (2009) beschrieben, im Arbeitskreis für Pflanzenbiochemie von Herrn Professor Feußner an der Universität Göttingen.

2.14 Pigmentanalyse aus *Arabidopsis thaliana*

2.14.1 Pigmentisolation aus *Arabidopsis thaliana*

Die Pigmentisolation aus *A. thaliana* Blattgewebe wurde im Wesentlichen nach Lichtenthaler (1987) durchgeführt. Hierzu wurden 3-4 Rosettenblätter zum gegebenen Zeitpunkt geerntet und unmittelbar bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Falls erwünscht, konnte das Material bei -80°C gelagert werden.

Zum Gewebeaufschluss wurde das Blattmaterial in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Jeweils 50 mg des Pulvers wurden in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen und zur Extraktion mit exakt 1 ml eiskaltem Aceton versetzt. Die Proben wurden mit einem Vortex gut durchmischt und anschließend möglichst lichtgeschützt für 10 min auf Eis gelagert. Zur Klärung des Extraktes von Zelltrümmern wurden die Proben 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

2.14.2 Dünnschichtchromatographie von *A. thaliana* Blattpigmenten

Jeweils 250 µl des Pigmentextraktes wurden auf 0.2-mm Alugram SilG Dünnschichtchromatographie-Platten (Macherey-Nagel) gespottet. Parallel wurde eine Chromatographie-Kammer vorbereitet, indem sie vorab mit dem Laufmittel Petroleum Äther-Isopropanol-H₂O (100:15:0.25) zur Auftrennung beschickt wurde, um sie vollständig zu sättigen. Waren die Spots auf der Chromatographie-Platte vollständig eingetrocknet, wurde die Platte zur Separation senkrecht in die Kammer gestellt. Der Chromatographie-Prozess wurde beendet, sobald die Lauffront des Laufmittels das obere Ende der Platte erreicht hatte. Nach Evaporation des

Laufmittels wurde das Resultat photographisch dokumentiert. Falls eine sensitivere Detektion erwünscht war, wurde diese unter UV-Licht durchgeführt.

2.14.3 Isolation und Charakterisierung einzelner Pigmente

Falls erwünscht, wurden einzelne Pigmentspots aus der Silicamatrix ausgekratzt und mit eiskaltem Aceton wieder in Lösung gebracht. Dieser Extrakt wurde dann entweder zur Spektralanalyse in einem Photometer verwandt oder eingedampft und zur massenspektroskopischen Analyse (Ag Feußner, Uni Göttingen) aufbewahrt.

2.15 ATP/ADP-Messungen

Die Extraktion der Proben aus *A. thaliana* Blattmaterial erfolgte methodisch nach Häusler et al. (2000). Die Detektion der Nukleotide erfolgte mithilfe der sensitiven Fluoreszenzmethode von Haink and Deussen (2003). Zuvor mussten dafür die Adenosin Nukleotide in fluoreszierende Etheno-Adenosin-Nukleotide derivatisiert werden, bevor sie mittels HPLC (high-performance liquid chromatography) aufgetrennt werden konnten.

Für die Derivatisierung wurden 50 µl des Extrakts mit 400 µl des Derivatisierungspuffers und 45 µl Chloracetaldehyd gemischt und für 40 min bei 80°C inkubiert. Nach schnellem Abkühlen auf Eis folgte 2 min Zentrifugieren bei 4°C und 13.000 rpm. Hiernach konnte der Überstand für die HPLC-Analyse eingesetzt werden. Die Auftrennung erfolgte in einem reversed-phase HPLC-System (Waters Alliance 2795; Waters, Milford, USA).

Eluent A: TBAS-Puffer

Eluent B: TBAS-Puffer : Acetonitril (Roth) (2:1)

Ein Lauf dauerte 5.4 min. Anschließend erfolgte 3 min Waschen und Rekallibrieren der Säule mit Acetonitril. Die Fluoreszenz wurde mit Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 410 nm detektiert.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Empower Software (Waters, Milford, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung sowie Beschreibung von T-DNA Insertionsmutanten

Für detaillierte Studien zur physiologischen Relevanz verschiedenster biochemischer Pathways in einer Vielzahl von Organismen dienen seit vielen Jahren so genannte „loss-of-function“-Mutanten (Krysan et al. 1996; Alonso et al. 2003; Schneider et al. 2005). Wie in der Zielsetzung (1.7) formuliert, sollte in der vorliegenden Arbeit die Funktion der Fettsäure- β -Oxidation in adultem Pflanzengewebe näher untersucht werden. Daher wurden zunächst *A. thaliana* T-DNA Insertionsmutanten isoliert, die einen Defekt in genannter Fettsäure- β -Oxidation besitzen.

Da die Proteine vieler Reaktionsschritte von mehreren Genloki kodiert werden, treten häufig funktionelle Redundanzen auf. Das bedeutet, dass der Verlust eines Gens nicht in der gewünschten Blockade eines Stoffwechselwegs resultiert, da dieser Verlust durch die Transkription eines weiteren Lokus funktionell kompensiert werden kann. Da es sich bei *PXA1* um ein „single-copy“ Gen handelt, war dieser Lokus prädestiniert für die geplanten Untersuchungen, denn Redundanzen sind in diesem Fall nahezu unmöglich. Wie bereits einleitend in 1.5 beschrieben kann die Blockade der β -Oxidation durch eine saccharoseabhängige Keimung beziehungsweise Keimlingsetablierung angezeigt werden (Graham 2008). Für besagten *PXA1* Lokus ist dieses Phänomen bereits mehrfach beschrieben worden (Zolman et al. 2001; Footitt et al. 2002; Hayashi et al. 2002).

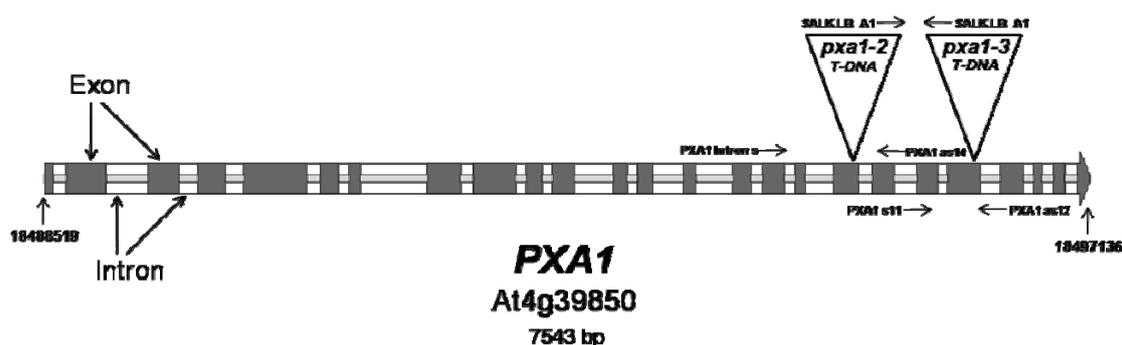


Abb. 3. Übersicht über die Genstruktur von *PXA1* und die Positionen der isolierten T-DNA Insertionen: Der auf Chromosom 4 liegende *PXA1* Lokus weist eine Größe von 7543 Basenpaaren (bp), bestehend aus 25 Exons, auf. Die T-DNA Insertionen der *pxa1-2*, beziehungsweise der *pxa1-3* Linie finden sich in Exon 18 und 21.

Der *PXA1* Lokus befindet sich auf Chromosom 4. Da er für einen Volllängen-ABC-Transporter kodiert, ist er mit 7543 bp verhältnismäßig groß. Die in Abb. 3 grau gekennzeichneten Flächen repräsentieren die 25 Exons. Die dazwischenliegenden

Introns (helle Bereiche) werden aus der mRNA herausgespliced. In Exon 18 beziehungsweise 21 sind die als Dreiecke markierten T-DNA Insertionen lokalisiert. Sie verhindern in den Mutantenlinien die Synthese einer vollständigen mRNA und dadurch die Synthese eines funktionellen Transporterproteins.

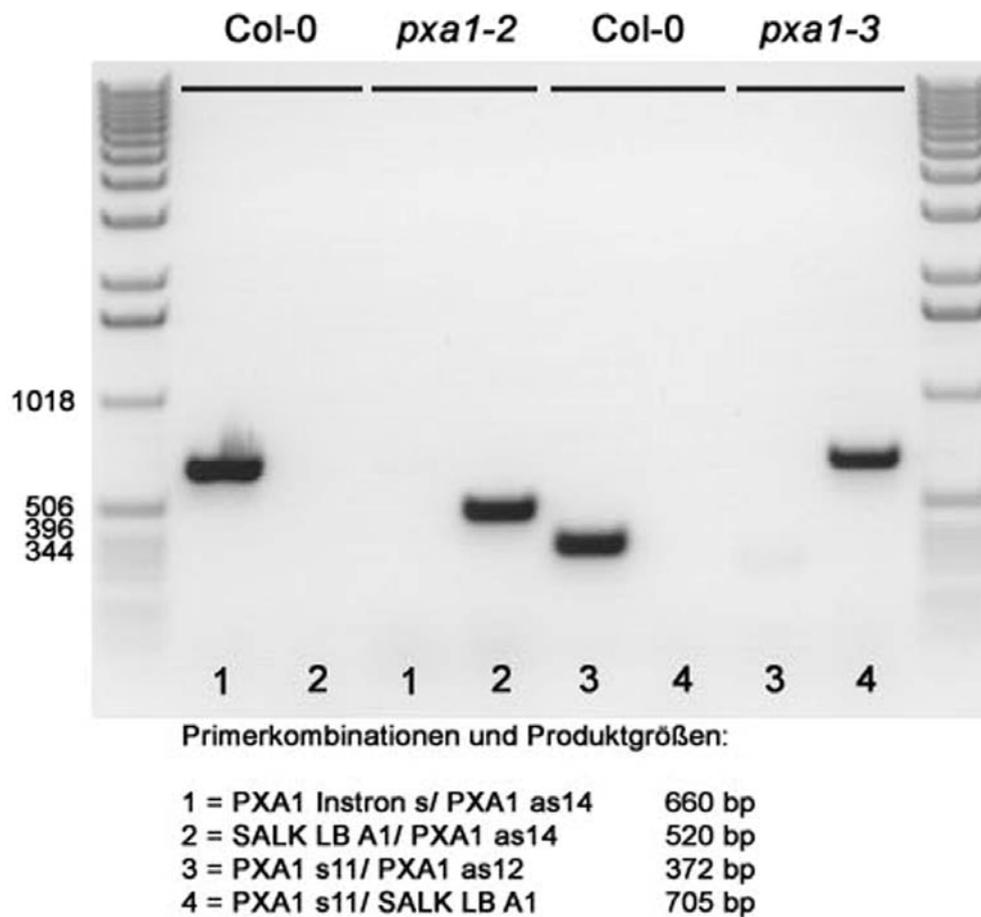


Abb. 4. Agarosegel nach Auftrennung der PCR-Produkte des *pxa1* Mutantenscreenings: Die Annealing-Temperatur PCR betrug 57°C, in der gesamten Reaktion wurden 35 Zyklen gefahren.

Für das Screening der *pxa1* Mutanten wurde aus 3 Wochen alten Pflanzen genomische DNA extrahiert und in einer PCR-Reaktion mit den angebenen Primern benutzt (2.9.2). Die Bindungsstellen der Primer beziehungsweise ihre Lage im *PXA1* Locus sind in Abb. 3 zu betrachten. Das Screeningverfahren beruht darauf, dass im Falle einer T-DNA Insertion aufgrund ihrer Größe an der gewünschten Stelle kein wildtypisches PCR-Produkt mehr gebildet werden kann. Dies kann man deutlich in Abb. 4 exemplarisch für die Primerkombination 1 verfolgen. Wurde Col-0 gDNA als Template eingesetzt, konnte das gewünschte PCR-Produkt in der erwarteten Größe gebildet werden. Nicht so bei Verwendung einer *pxa1-2* gDNA in der dritten Spur von links. Die Anwesenheit der T-DNA verhinderte hier die Bildung eines PCR-Produktes. Die T-DNA wurde nochmals mithilfe der Primerkombination 2 bestätigt. Die

Kombination beinhaltete einen Primer der auf der artifizialen T-DNA und einen der im *PXA1* Locus bindet. Wie in Abb. 4 erkennbar, konnte mit dieser Kombination nur ein Produkt mit der genomischen DNA der Mutante *pxa1-2* gebildet werden (Spur 4), für Col-0 gDNA war dies nicht zutreffend. Die PCR-Produkte der Mutanten wurden anschließend sequenziert, um den Ort der T-DNA Insertion nochmals genau zu verifizieren.

3.2 Verlängerte Dunkelphasen führen zu starken Schädigungen in *pxa1-2* Pflanzen

Wie in der Einleitung unter 1.1 beschrieben, nimmt die Stärke eine zentrale Position im diurnalen pflanzlichen Zellstoffwechsel ein. Die Synthese dient zur chemischen Energiespeicherung der Photosynthese, der Stärkeabbau zur Freisetzung dieser gespeicherten Energie. Somit kann Stärke als das wichtigste Kohlenhydrat in Pflanzen betrachtet werden (Zeeman et al. 2007). Die Blattstärke wird im Verlauf der Lichtphase auf- und in der darauf folgenden Nacht abgebaut (Lu et al. 2005). Am Ende einer 8 h Dunkelperiode, also einer normalen Langtagnacht, befindet sich lediglich ein Restgehalt von 5-10% an Stärke im Blattgewebe (Gibon et al. 2009). Überraschenderweise können Wildtyp *A. thaliana* Pflanzen trotzdem mehrere Tage völliger Dunkelheit schadlos überstehen (Lin and Wu 2004). Da dies in gleichem Maße auch für stärkefreie Mutanten gilt (Gibon et al. 2009), muss ein effektiver Backup-Mechanismus existieren, der alternativ aktiviert werden kann.

Viele unabhängige Hinweise existieren in der Literatur, die die β -Oxidation als alternative Energiequelle zur Diskussion stellen. So zeigen Arraydaten, dass die Transkription von Genen des Fettkatabolismus in verlängerter Dunkelheit sowohl in Wildtypen als auch stärkefreien Mutanten kontinuierlich gesteigert wird (Lin and Wu 2004; van der Graaff et al. 2006; Usadel et al. 2008). Die in 3.1 isolierten *pxa1* Mutanten, die durch den Verlust eines ABC-Transporters eine Blockade der β -Oxidation zeigen (Zolman et al. 2001), sollten daher auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, längere Dunkelphasen zu überleben.

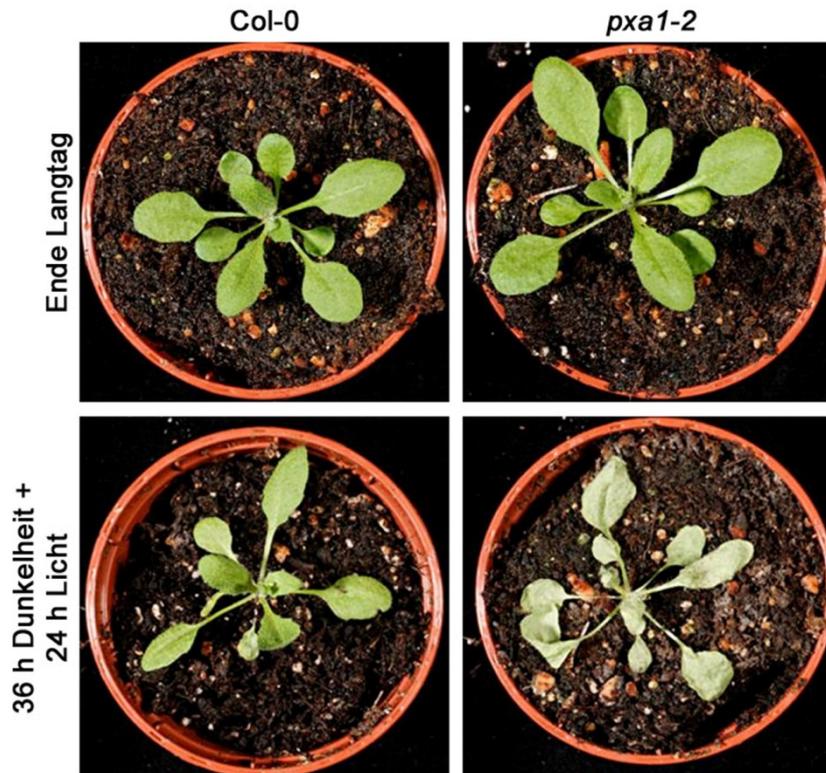


Abb. 5. Gewebeschädigung in *pxa1-2* nach 36 h Dunkelheit und 24 h Dauerlicht: Langtagpflanzen im Alter von 21 Tagen wurden einer verlängerten Nachtphase von 36 h bei 24°C ausgesetzt. Die Dokumentation erfolgte nach einer 24 h Dauerlichtinkubation im Anschluss an die verlängerte Nachtphase.

Die *pxa1-2* Mutanten wurden zusammen mit korrespondierenden Wildtyp Pflanzen im Langtag angezogen und im Alter von 21 Tagen einer verlängerten Nachtphase von 36 h bei 24°C ausgesetzt. Im Anschluss an die Dunkelheit wurden die Pflanzen für 24 h im Dauerlicht gehalten, um ihnen Gelegenheit zur Regeneration zu geben.

In Abb. 5 ist der Zustand von *pxa1-2* und Col-0 Pflanzen zu diesem Zeitpunkt gezeigt. Unmittelbar nach der 36 h Dunkelphase konnte bereits registriert werden, dass die Mutante weniger turgeszent wirkte. Typischerweise stellen die Pflanzen ihre Blätter in der Dunkelheit sehr stark auf, eventuell um neue Lichtquellen aufzuspüren. Hierzu ist ausreichender Zellturgor von Nöten, der das Gewebe versteift. Die Blätter von *pxa1-2* lagen jedoch flach auf der Erde des Topfes ausgebreitet, wohingegen Col-0 das charakteristische Dunkelverhalten zeigte. Desweiteren konnte eine farbliche Veränderung des Blattgewebes der Mutante beobachtet werden. Unmittelbar nach der Dunkelphase wirkte es blaugrün, während der anschließenden Dauerlichtphase veränderte sich die Farbe rapide in einen farblosen, fahlen Grauton. Diese interessante phänotypische Entwicklung wurde in einem online verfügbaren Zeitrafferfilm dokumentiert.

(<http://www.plantcell.org/content/vol0/issue2009/images/data/tpc.108.064857/DC1/movie.mp4>).

Während sich Col-0 Pflanzen von der Dauer der verlängerten Nachtphase unbeeindruckt zeigten und ihr Wachstum im Dauerlicht unverändert fortsetzen konnten, bedeuteten die durch die Dunkelheit verursachten Schädigungen des Blattgewebes für die *pxa1-2* Mutante den Tod. Keinerlei Wachstum oder Regeneration konnte hier nach der Reillumination beobachtet werden.

3.3 Welche Mutanten zeigen den Dunkelphänotyp?

Wie in 1.6 beschrieben ist die β -Oxidation auch maßgeblich an der Biosynthese des Phytohormons Jasmonsäure beteiligt. Einige der Jasmonsäure-Synthese-Enzymreaktionen sind jedoch exklusiv und sind nicht in die β -Oxidation von Fettsäuren eingebunden. Die OPDA-Reduktase (OPR3) stellt ein solches exklusives Enzym dar, das keinerlei Relevanz für den Fettsäureabbau besitzt. Für die JA-Biosynthese hingegen stellt die OPDA-Reduktase eine Flaschenhals-Reaktion dar. Das bedeutet, dass die *opr3* Mutante keinen Keimungsphänotyp besitzt. Da jedoch Jasmonsäure zur Ausbildung fertiler Pollen zwingend notwendig ist (1.6), sind die Blüten dieser Mutante männlich steril (Stintzi and Browse 2000). Diese Beobachtung sollte dazu genutzt werden, um einen Jasmonsäuremangel als eventuelle Ursache für den beobachteten Phänotyp zu untersuchen.

In 1.5 wurden mit *lacs6/7* und *kat2* bereits weitere Mutanten der β -Oxidation vorgestellt (Abb. 2). Diese Mutanten sollten genutzt werden, um nach Phänokopien von *pxa1* zu suchen. Beide Mutanten sind in der β -Oxidation von Fettsäuren beeinträchtigt und zeigen daher eine saccharoseabhängige Keimlingsetablierung.

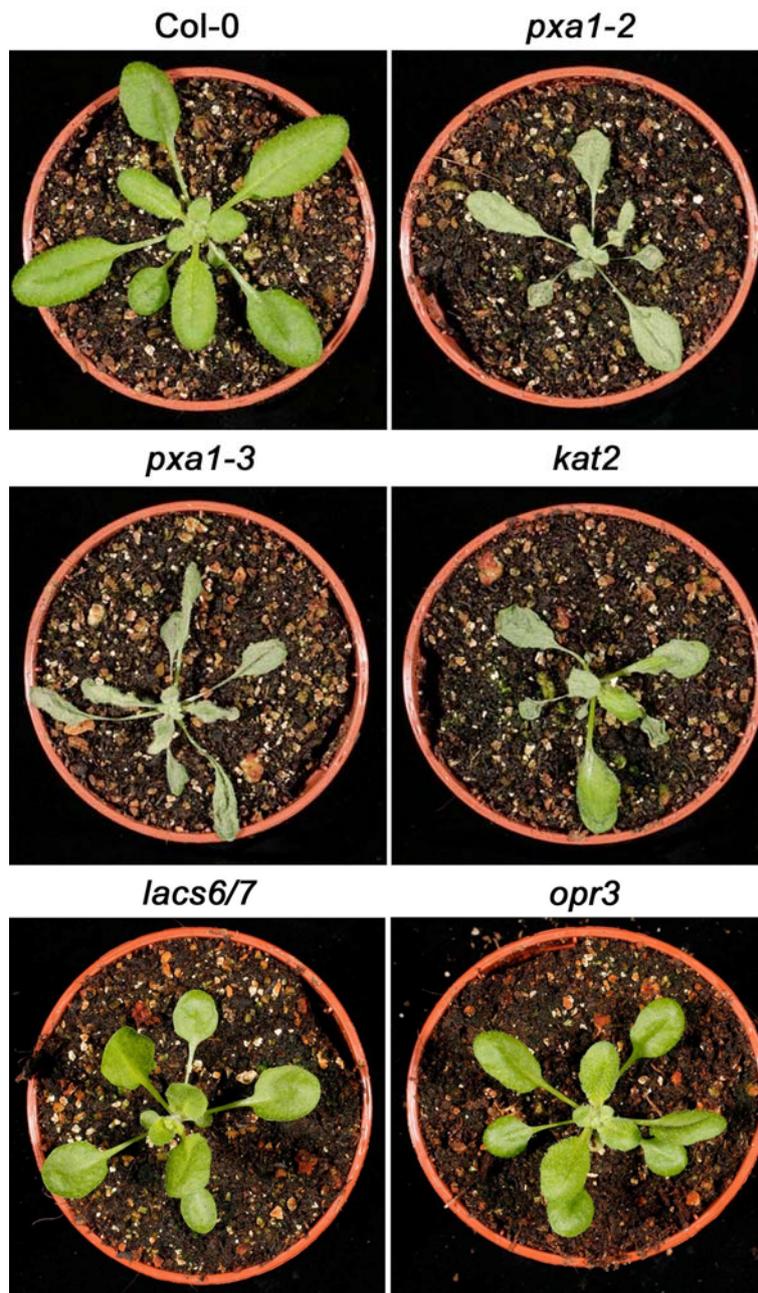


Abb. 6. Untersuchung des Dunkel-Phänotyps in verschiedenen Mutanten: Alle gezeigten Pflanzen waren 21 Tage alt, im Langtag angezogen und für 36 h bei 24°C dunkelinkubiert. Das Photo dokumentiert den Zeitpunkt 24 h nachdem die Pflanzen in das Dauerlicht transferiert worden waren.

Im Langtagrhythmus angezogene, 3 Wochen alte Pflanzen wurden erneut für 36 h im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 24 h Dauerlichtphase und die photographische Dokumentation.

Die Untersuchung der verschiedenen Mutanten zeigte, dass nur Mutanten der Fettsäure- β -Oxidation, mit Ausnahme von *lacs6/7*, den in 3.2 beschriebenen Phänotyp zeigten (Abb. 6). Sowohl bei der zweiten unabhängigen T-DNA Insertionslinie *pxa1-3* als auch der *kat2* Mutante wurden starke Ähnlichkeiten nach der 36 h Dunkelinkubation festgestellt, sodass sie als Phänokopien gewertet werden

konnten. Es sei hier jedoch betont, dass für *kat2* mildere Schädigungen beobachtet wurden. Interessanterweise verhielt sich die *lacs6/7* Doppelmutante wildtypisch.

Die *opr3* Mutante hingegen, die einen exklusiven Defekt der Jasmonsäure-Biosynthese besitzt, wies keinerlei phänotypischer Veränderungen nach der Dunkelinkubation auf. Somit galt ein Mangel des Phytohormons Jasmonsäure als Ursache für die beobachteten Phänomene als unwahrscheinlich.

3.4 Partielle Verdunklung durch Einzelblattabdeckung

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp auch bei individueller Verdunklung auftrat, wurden mithilfe von Aluminiumfolie-Hüllen Einzelblätter für 64 h bei 24°C verdeckt. Hierzu wurden 21 Tage alte im Langtag angezogene Pflanzen verwendet. Die Versuchsobjekte wurden während des Versuchs weiterhin im 16/8 Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten.

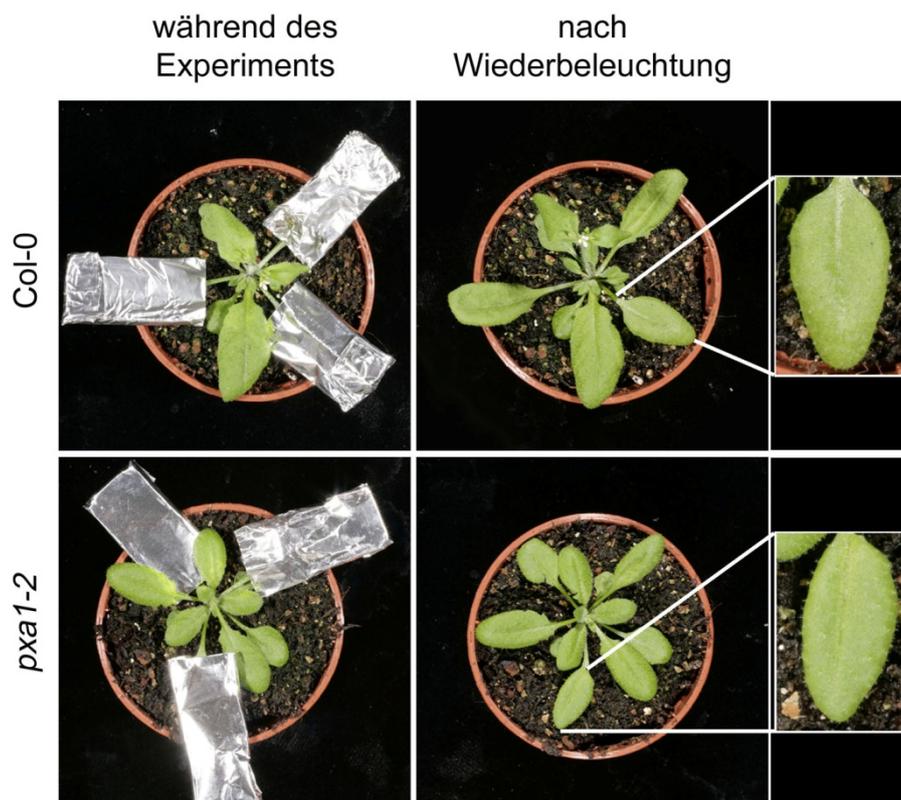


Abb. 7. Verdunklung von Einzelblättern: Mithilfe von Aluminiumfolie-Hüllen wurden jeweils einzelne Blätter von 3 Wochen alten Langtag Col-0 und *pxa1-2* verdeckt und so für 64 h bei 24°C im normalen Langtag-Zyklus belassen. Danach wurden die Alufolie-Hüllen entfernt und die Pflanzen für 24 h wieder im normalen 16/8 Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die rechte Spalte gibt eine Detailansicht eines Blattes.

Wie in Abb. 7 ersichtlich, konnten keinerlei phänotypische Veränderungen festgestellt werden, sofern lediglich Einzelblätter an Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen abgedeckt wurden. Obwohl im gezeigten Experiment die Dunkelphase für die individuellen

Blätter sogar auf 64 h verlängert wurde. Dieses Ergebnis deutete daraufhin, dass entweder die dunkelinkubierten Blätter von den beleuchteten Pflanzenteilen metabolisch mitversorgt werden konnten oder dass sie sich im Falle eines Anstaus toxischer Metaboliten über die lichtexponierten Teile entgifteten.

3.5 Variationen des Phänotyps

Um zusätzliche Erkenntnisse über die Ursachen des Dunkelphänotyps zu erhalten, wurden die Anzucht- beziehungsweise die Experimentalbedingungen verändert.

3.5.1 Abhängigkeit von der Dauer der Lichtperiode

Da Stoffwechsel und Energieversorgung von Pflanzen durch ihre autotrophe Lebensweise stark von den Anzuchtbedingungen abhängig sind (Gibon et al. 2009; Sulpice et al. 2009), sollte untersucht werden, ob beziehungsweise welche Auswirkungen die Tageslänge während des Wachstums auf den Phänotyp hatte.



Abb. 8. Ausprägung des Dunkelphänotyps in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen: 4 Wochen alte Kurztag beziehungsweise 3 Wochen alte Langtag oder Dauerlicht Pflanzen wurden bei 24°C für 36 h in Dunkelheit und anschließend für 24 h bei Dauerlicht inkubiert.

Es wurden Pflanzen im Kurztag (8/16), Langtag (16/8) und Dauerlicht angezogen. Da Kurztagpflanzen langsamer wachsen, wurden 4 Wochen alte Individuen zusammen mit 3 Wochen alten Langtag- und Dauerlichtpflanzen für die Experimente verwandt. Der Dunkelversuch wurde standardmäßig bei 24°C und für 36^h durchgeführt.

Zunächst sei erwähnt, dass die Linien im Dauerlicht generell eine dunklere Farbe sowie Anzeichen von Anthocyanakkumulation zeigten. Wie in Abb. 8 erkennbar, konnten jedoch auch deutliche Unterschiede bezüglich der phänotypischen Ausprägung der *pxa1-2* Mutanten in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingung nach verlängerten Nachtphasen festgestellt werden. Die im Langtag gewachsene Mutante zeigte erneut die bereits in 3.2 beschriebenen phänotypischen Merkmale, das heißt deutliche, letale Gewebeschädigungen, begleitet von starken Ausbleicherscheinungen. Im Vergleich dazu konnten die im Kurztag angezogenen *pxa1-2* Pflanzen wesentlich besser mit der Abwesenheit von Licht umgehen. Zwar ließen sich auch hier deutliche Schädigungen des Blattgewebes dokumentieren, jedoch verblieben diese eher lokal. Vor allem junges Blattgewebe schien stärker betroffen zu sein und starb größtenteils ab. In älteren Blättern blieben die Schäden vereinzelt und räumlich begrenzt. Nach erneuter Belichtung konnte die Pflanze im Gegensatz zur Langtag-Anzucht überleben. Betrachtet man zuletzt die im Dauerlicht angezogene *pxa1-2* Mutante im unteren Teil von Abb. 8 so ließ sich feststellen, dass derartige Anzuchtbedingungen zu einer drastischen Reduktion des Dunkelphänotyps führten. Lediglich leichte und vereinzelt Schädigungen waren in jungen Blättern auszumachen. Problemlos konnten sie im wiedereingeschalteten Licht ihr Wachstum fortsetzen. Hier sei angemerkt, dass der phänotypische Effekt, sowie die begleitenden Schädigungen nicht generell unterblieben. Vielmehr musste die Dauer der Dunkelinkubation für im Dauerlicht angezogene Mutanten auf bis zu 48 h verlängert werden, um vergleichbare Effekte wie bei Langtag-Pflanzen zu erzielen.

Wie gewohnt blieben alle Col-0 Wildtyp Pflanzen im Experiment unabhängig von ihren Anzuchtbedingungen frei von Schädigungen.

3.5.2 Abhängigkeit von der Länge der Verdunklungsphase

Es sollte studiert werden, welche Auswirkungen die Dauer der Dunkelinkubation auf die Mutanten hat und ob die beobachteten Gewebeschädigungen einer Kinetik folgten. Hierzu wurden 21 Tage alte Langtagpflanzen erneut bei 24°C in verlängerte Nachtphasen gebracht, jedoch jeweils einzelne Pflanzen nach 16 h, 20 h, 24 h und

34 h aus der Dunkelheit entfernt, für 24 h zurück ins Dauerlicht transferiert und anschließend photographisch dokumentiert.

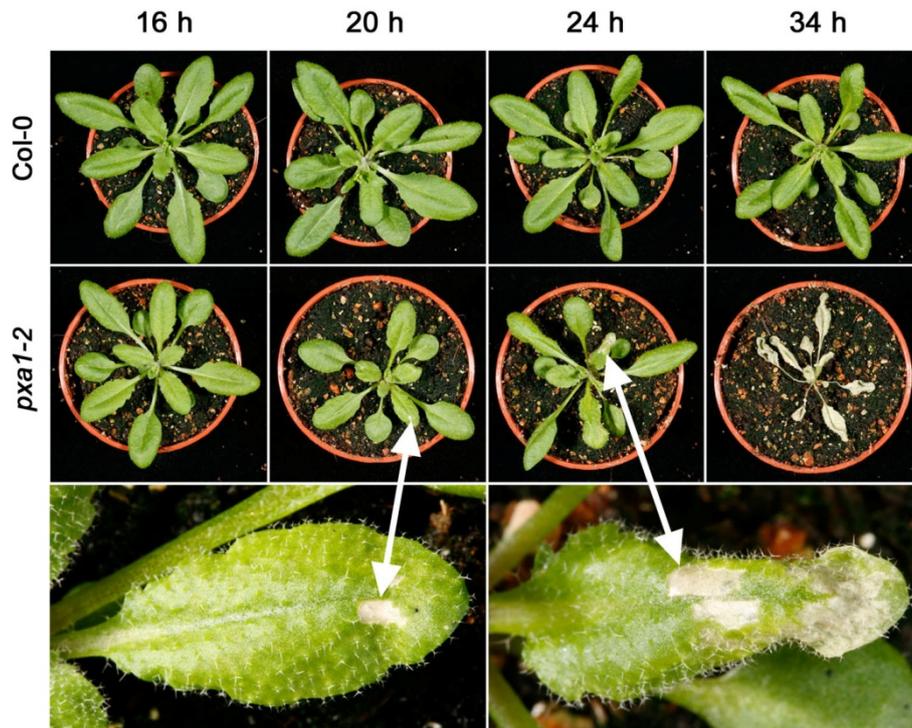


Abb. 9. Gewebeschädigung in der *pxa1-2* Mutante in Abhängigkeit von der Dauer der Dunkelinkubation: Im Langtag angezogene, 21 Tage alte *Col-0* und *pxa1-2* Pflanzen wurden bei 24°C in verlängerte Nachtphasen gestellt, jedoch jeweils nach 16 h, 20 h, 24 h und 34 h aus der Dunkelheit entfernt und für 24 h ins Dauerlicht gebracht. Nach 24 h unter kontinuierlicher Beleuchtung wurden die Einzelpflanzen dokumentiert. Die beiden Detailausschnitte zeigen jeweils ein geschädigtes Blatt der *pxa1-2* Mutanten nach 20 h beziehungsweise 24 h in Dunkelheit.

Verfolgt man die in Abb. 9 gezeigten *pxa1-2* Pflanzen, so ließ sich in diesem Experiment feststellen, dass die phänotypische Ausprägung der Gewebeschädigung in der Mutante kinetisch der Dauer der gewählten Dunkelphase folgte. Konnte nach 16 h Dunkelphase noch keinerlei Schädigung beobachtet werden, so wird durch die linke Detailabbildungen in Abb. 9 deutlich, dass die Schädigung ab einer Dauer von 20 h in den jungen Blättern in der Mitte der Blattrosette begann und bereits 4 h später eine fortschreitende Ausprägung zeigte. Eine Nachtperiode von 34 h führte hingegen zur Schädigung der gesamten Blattrosette. Unabhängig vom Blattalter waren nun alle Teile betroffen. Es bleibt festzuhalten, dass die Schädigung offenbar in zeitlichem Kontext mit der Länge der Dunkelphase stand und dass die beobachteten Gewebeschädigungen in den jungen Blättern der Blattrosette begannen.

3.5.3 Abhängigkeit von der Temperatur während der Dunkelinkubation

Da enzymatische Reaktionen und somit auch die Stoffwechselrate temperaturabhängig sind, sollte überprüft werden, welche Konsequenzen eine Temperaturabsenkung während der Dunkelinkubation auf die Ausprägung des Phänotyps in den *pxa1* Mutanten hat.

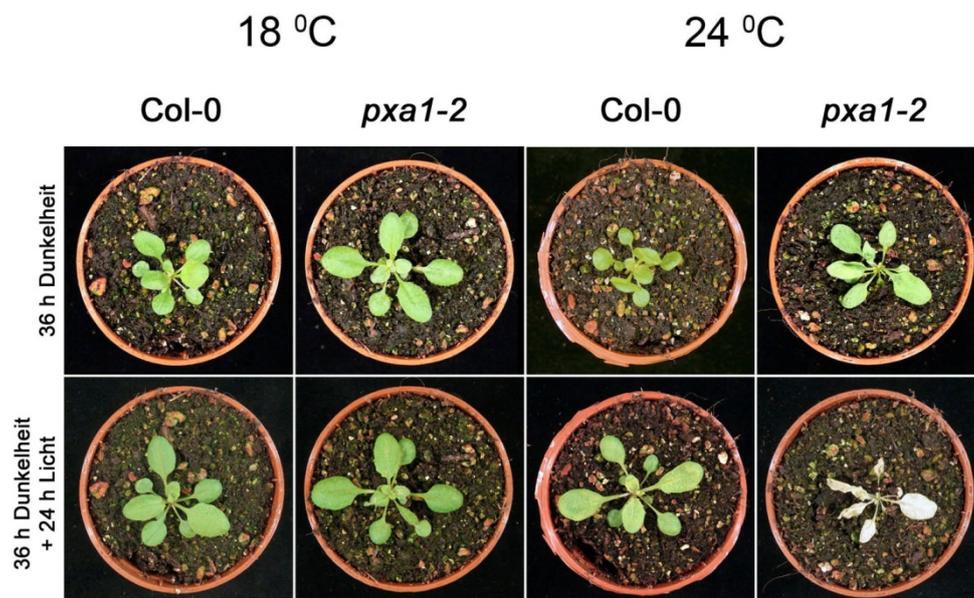


Abb. 10. Temperaturabhängigkeit des *pxa1* Phänotyps: 21 Tage alte, im Langtag angezogene Col-0 und *pxa1-2* Pflanzen wurden 36 h Dunkelheit und anschließend 24 h Dauerlicht ausgesetzt. Der Versuch wurde zeitgleich bei 18°C (linke Spalten) und bei 24°C (rechte Spalten) durchgeführt.

Abb. 10 zeigt das Resultat zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des *pxa1* Phänotyps. Im Experiment wurden 21 Tage alte, im Langtag angezogene Pflanzen verwendet. Im Gegensatz zu 3.5.2 wurde nun die Dauer der Dunkelinkubation konstant bei 36 h und 24 h Dauerlicht gehalten, die Temperatur hingegen variiert. Links im Bild ist das Resultat bei 18°C gezeigt, rechts als Kontrolle bei 24°C.

Deutlich wurde hierbei erkennbar, dass der Phänotyp sehr stark von der Umgebungstemperatur während der Behandlung abhängig war. Wie gewohnt wurde bei der Standardtemperatur von 24°C eine sehr drastische Schädigung des Pflanzengewebes beobachtet. Diese war jedoch vollständig abwesend, sofern die Temperatur bei moderaten 18°C während der Dunkelphase gehalten wurde. Die Abhängigkeit der phänotypischen Ausprägung von der Umgebungstemperatur ließ sich als Hinweis für ein stoffwechselabhängiges Phänomen werten.

3.5.4 Abhängigkeit vom Zustand des Materials

Wie in Abb. 7 im Kapitel 3.4 gezeigt, führte die Verdunklung einzelner Blätter an intakten Pflanzen zu keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten. Dies wurde als Hinweis auf ein stoffwechselbedingtes Phänomen oder auf den Anstau eines toxischen Abbau- oder Zwischenproduktes gewertet.

Falls es sich um einen Vergiftungsprozess handelte, der durch die beleuchteten Pflanzenteile kompensiert werden konnte, sollten abgetrennte *pxa1* Einzelblätter die phänotypischen Merkmale nach verlängerter Dunkelphase zeigen.

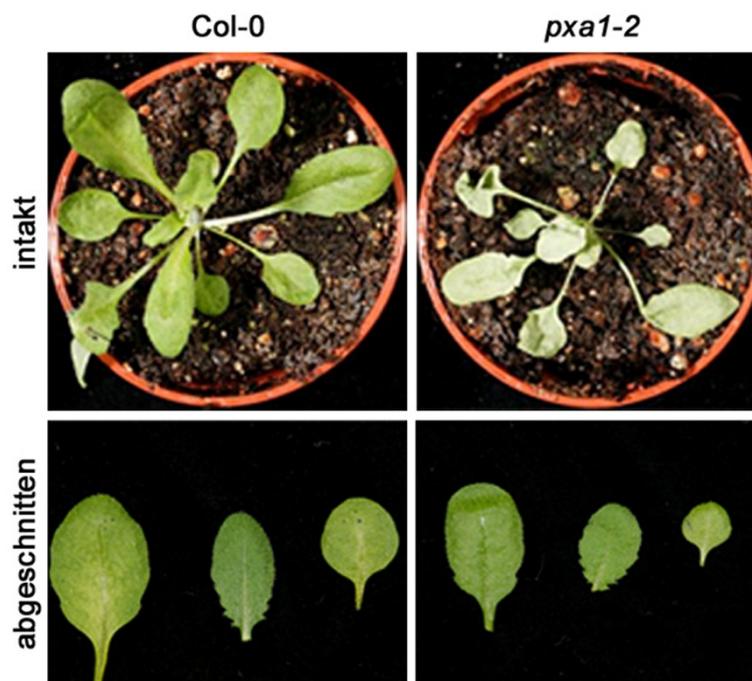


Abb. 11. Resultat eines 36 h Dunkelexperiment mit intakten Pflanzen und abgeschnittenen Einzelblättern: Am Ende der Lichtphase wurden von 21 Tage alten Langtag Pflanzen einzelne Blätter abgetrennt und zusammen mit intakten Pflanzen für 36 h bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine 24 h Dauerlichtphase.

Von 21 Tage alten Langtag Pflanzen wurden am Tagesende einzelne Blätter von *pxa1-2* und Col-0 abgeschnitten und zusammen mit intakten Pflanzen beider Linien als Kontrollen bei 24°C für 36 h Dunkelheit inkubiert. In Abb. 11 ist das Resultat nach anschließender 24 h Dauerlichtphase dargestellt.

Deutlich waren in den intakten *pxa1-2* Kontrollpflanzen auf Erde die typischen letalen Gewebeschädigungen zu erkennen. Interessanterweise war dies nicht in den vor der Verdunklung abgeschnittenen Einzelblättern der Fall. Hier zeigten sich keine Merkmale des gewohnten Phänotyps, vielmehr waren die ausgewählten *pxa1-2* Einzelblätter nicht von den Wildtypkontrollen unterscheidbar. Die These einer

möglichen Entgiftung von toxischen Produkten durch Export in illuminiertes Pflanzengewebe galt daher als unwahrscheinlich.

3.6 Photosynthetischer Phänotyp

3.6.1 Messungen mit Hilfe der Imaging PAM

Die Pulse Amplitude Modulation (PAM) Messung eröffnet die Möglichkeit, durch Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung des Photosystems II (PS II) bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in intakten Pflanzen Veränderungen in der Photosyntheseleistung zu bemerken. Solche Veränderungen gehen zumeist mit Schädigungen der Chloroplasten einher.

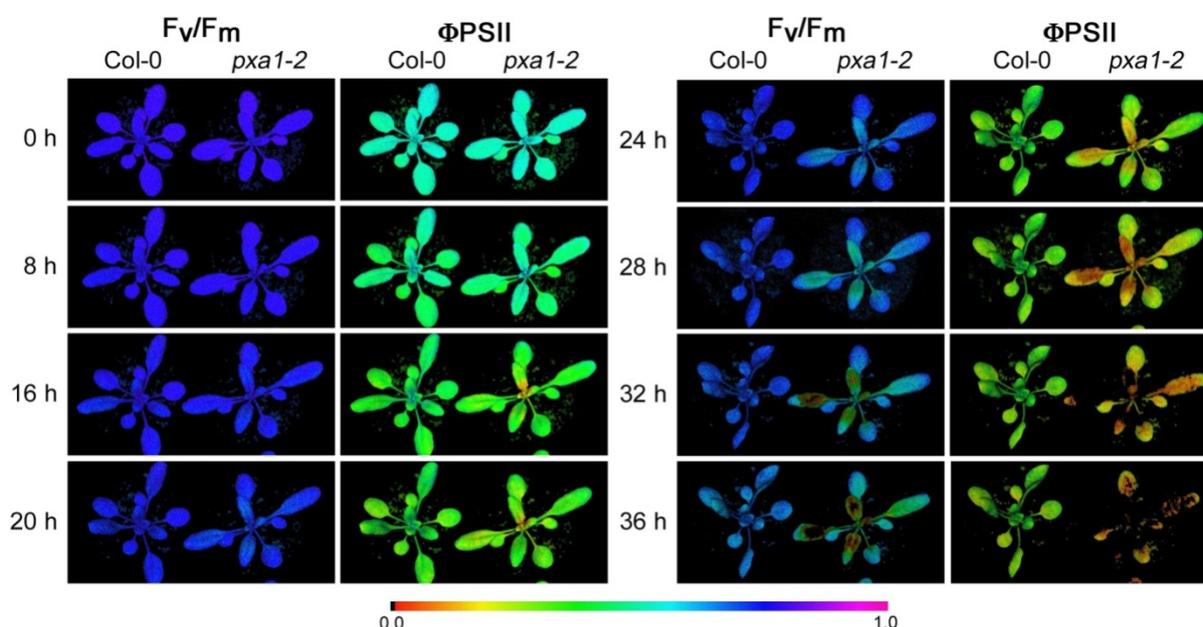


Abb. 12. Fv/Fm und Φ PSII während 36 h Dunkelinkubation: 21 Tage alte Col-0 und *pxa1-2* Pflanzen wurden für 36 h in Dunkelheit bei 24°C inkubiert und währenddessen alle 4 h das Fv/Fm Verhältnis und Φ PSII bestimmt.

Um detaillierter und zu früheren Zeitpunkten Veränderungen in der *pxa1* Mutante visualisieren zu können, wurden 21 Tage alte Langtag Col-0 Wildtyp Pflanzen und *pxa1-2* Mutanten einer verlängerten Dunkelphase bei 24°C ausgesetzt. Alle 4 h wurde dann mithilfe einer IMAGING-PAM eine Induktionskinetik aufgenommen. In Abb. 12 sind in der linken Spalte die hieraus folgenden Fv/Fm Verhältnisse dargestellt. Das Fv/Fm Verhältnis gilt als Indikator für die Intaktheit des Photosystems II. Nach 24 h konnte bereits eine leichte Reduktion, beginnend in den jungen Blättern der *pxa1-2* Blattrosette, festgestellt werden. Mit fortlaufender Dauer der Dunkelinkubation wurde der Unterschied zum Wildtyp deutlich prägnanter. Vor allem nach 32 h und 36 h zeigte sich eine dramatische Verschlechterung des Fv/Fm

Verhältnisses. In der jeweils rechten Bildspalte von Abb. 12 ist der zeitliche Verlauf von ΦPSII abgebildet. Dieser Wert gibt Auskunft über den Anteil des vom PS II absorbierten Lichts, das photochemisch genutzt wird, also die Quantenausbeute. Er kann daher als Wert für die Effizienz der Photosynthese betrachtet werden (Maxwell and Johnson 2000). Auffällig war, dass sich schon nach 16 h erste Hinweise auf eine Abnahme des Wertes in *pxa1-2* ergaben. Mit zunehmender Dauer der Dunkelinkubation nahm der Wert weiter rapide ab. Nach 32 h wurde in einzelnen Blättern der Mutanten bereits der Wert Null gemessen. Weitere 4 h später galt dies für die gesamte Blattrosette der Mutante. Zu diesem Zeitpunkt war also keinerlei Photosynthese-Aktivität des Photosystems II mehr detektierbar.

Vergleicht man Abb. 12 mit Abb. 9 so fällt auf, dass übereinstimmend die Gewebeschädigung in den jungen Blättern der *pxa1-2* Mutante begann und sich von dort über die gesamte Blattrosette ausbreitete.

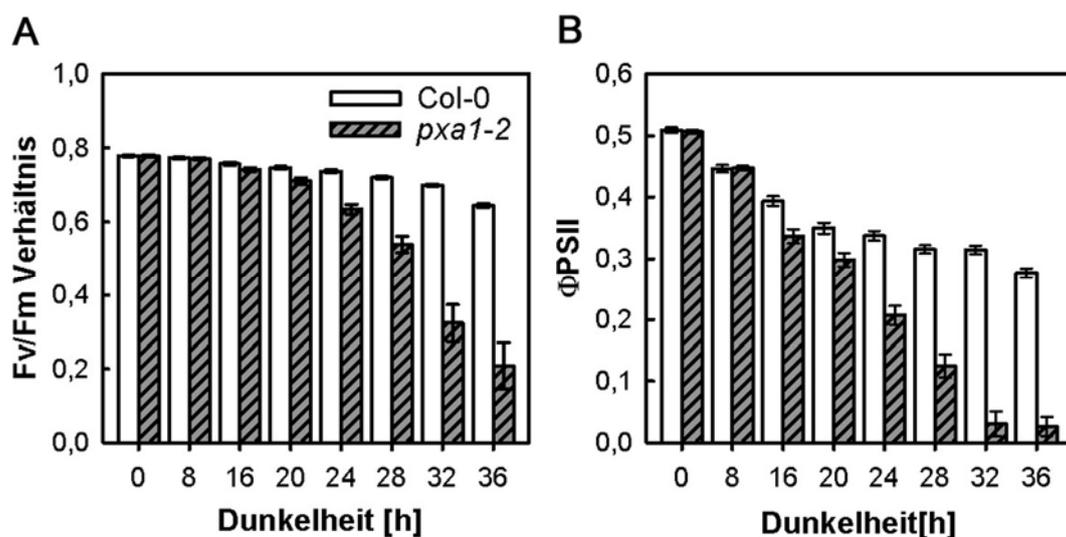


Abb. 13. Verlauf des Fv/Fm Verhältnisses (A) und ΦPSII (B) während der 36 h Dunkelphase: Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Anzuchten (2 Pflanzen pro Anzucht, 10 Messpunkte pro Pflanze). 21 Tage alte, im Langtag angezogene Pflanzen wurden bei 24°C für 36 h in Dunkelheit inkubiert. Fehlerbalken: Standardfehler.

Abb. 13 spiegelt in Zahlenwerten die Beobachtungen aus Abb. 12 wider. So zeigt Abb. 13A, dass die in *pxa1-2* gemessenen Fv/Fm Verhältnisse nach 24 h begannen zunehmend deutlich vom Wildtyp abzuweichen. Entsprechend sank das Fv/Fm Verhältnis in der Mutante nach 24 h noch circa 80% des Wildtypwertes, so sank das Fv/Fm Verhältnis im weiteren Experimentverlauf auf 68%, beziehungsweise auf 50% und 30% nach 32 h und 36 h. Die in Abb. 13B gezeigte Entwicklung von ΦPSII zeichnete ebenfalls die Beobachtungen aus Abb. 12 nach. Zwar muss angemerkt werden, dass auch der ΦPSII Wert des Wildtyps über die Dauer der Dunkelinkubation sank, jedoch

stand dies in keinem Verhältnis zur rapide fortschreitenden Φ PSII Reduktion in *pxa1-2*. Wie aus Abb. 13B ersichtlich, wurde bereits nach 16 h eine circa 20% Abnahme von Φ PSII gemessen. Nach 24 h erreichte die Mutante nur noch 60%, dann 40% nach 28 h, bis hin zu circa 14% nach 32 h und 36 h.

3.6.2 Abundanz photosynthetisch aktiver Proteine

Bereits in 3.6.1 konnte mit Hilfe der PAM gezeigt werden, dass es im Verlauf der verlängerten Dunkelphasen zu einer deutlichen Verminderung der Effizienz des Elektronentransports am Photosystem II in den *pxa1-2* Mutanten kam. Dieser Befund ließ eine Schädigung des Photosystems II vermuten, was mithilfe immunologischer Detektion einiger ausgewählter Proteine des Photosyntheseapparates untersucht werden sollte.

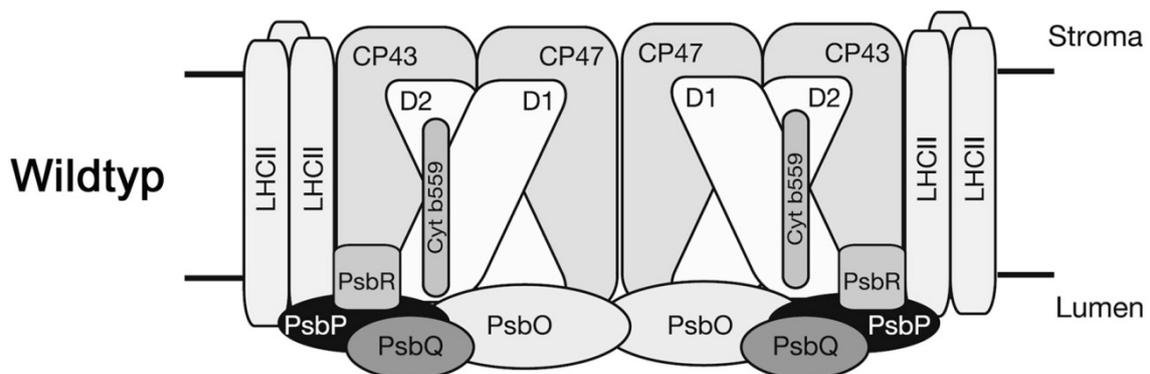


Abb. 14. Schematische Darstellung des Photosystems II höherer Pflanzen; adaptiert nach Ifuku et al. 2008

Abb. 14 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau des gesamten Photosystem II Proteinkomplexes höherer Pflanzen (Ifuku et al. 2008). Zur Immunodetektion wurden Antikörper gegen die Kern-Proteine D1 und D2 und gegen den Lichtsammelkomplex II (LHCII) der Firma Agrisera verwendet.

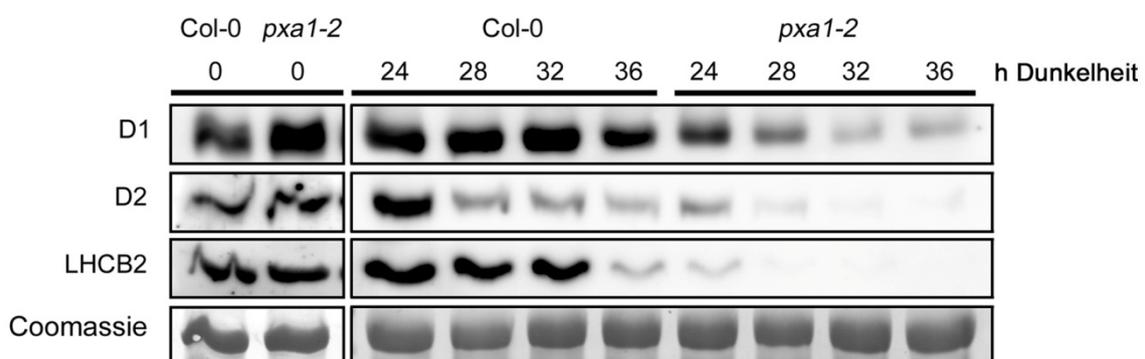


Abb. 15. Immunodetektion von D1, D2 und LHCB2 in Col-0 und *pxa1-2* über die Dauer eines 36 h Dunkelexperimentes: 21 Tage alte, Langtag angezogene Pflanzen wurden bei 24°C unterschiedlich langen Dunkelperioden ausgesetzt. Nach angegebener Zeit wurde eine Gesamt-Proteinextraktion aus Blattgeweben durchgeführt und pro Spur 10 µg Gesamt-Protein mithilfe einer 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt.

21 Tage altes, im Langtag angezogenes Pflanzenmaterial wurde für 36 h bei 24°C dunkelinkubiert und das Blattmaterial zu den angegebenen Zeitpunkten in Dunkelheit geerntet. Im Anschluss wurde eine Gesamt-Proteinextraktion durchgeführt und mittels Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Pro Spur wurden genau 10 µg Gesamtprotein auf die 12.5% SDS-PAGE geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 15 zeigt die Membran des Western-Blots nach der Immuno-detektion. Als Beladungskontrolle diente die Coomassie-Brilliant Blue angefärbte Bande der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase.

Wie in Abb. 15 dargestellt, wurde über die Dauer der Dunkelinkubation erkennbar, dass die Menge der detektierten PS II Proteine in *pxa1-2* Mutanten dramatisch schnell abnahm, wohingegen die Beladungskontrolle auf keinerlei generelle Proteindegradation schließen ließ. Am prägnantesten war dies für die LHCB2 und D2 Proteine zu beobachten. Verglichen hierzu verschwand die D1 Bande deutlich langsamer, war jedoch nach 32 h Dunkelheit ebenfalls nur noch schwach detektierbar. Auffällig war, dass es auch im Wildtyp zu einer Abnahme des Kern-Proteins D2 und des Lichtsammelkomplexproteins LHCB2 kam (Abb. 15)

Abschließend lässt sich feststellen, dass die gezeigten Proteindaten in gute Übereinkunft mit den Fluoreszenzdaten der PAM Messungen zu bringen sind (Abb. 12). Über die Dauer der verlängerten Nachtphase fand in beiden Linien ein Abbau der PS II Proteine statt, jedoch war der Abbau in den untersuchten *pxa1-2* Mutanten wesentlich stärker ausgeprägt. Daher musste nun nach der Ursache für diesen beschleunigten PS II-Abbau gesucht werden.

3.6.3 LM/TEM-Untersuchungen der Chloroplasten

Die bis dato durchgeführten Untersuchungen lieferten ausschließlich makroskopische Daten und Eindrücke der beobachteten Schädigungen in den *pxa1* Mutanten. Obwohl in den studierten Mutanten jeweils Defekte der peroxisomalen β -Oxidation vorherrschten, wurden interessanterweise bereits in 3.6.1 und 3.6.2 deutliche Hinweise darauf gefunden, dass es aufgrund der Dunkelinkubationen auch zu negativen Beeinträchtigungen der Chloroplasten kam.

Um ein detaillierteres Bild hiervon zu erlangen, sollten mikroskopische Untersuchungen an dunkelinkubierten Blättern durchgeführt werden.

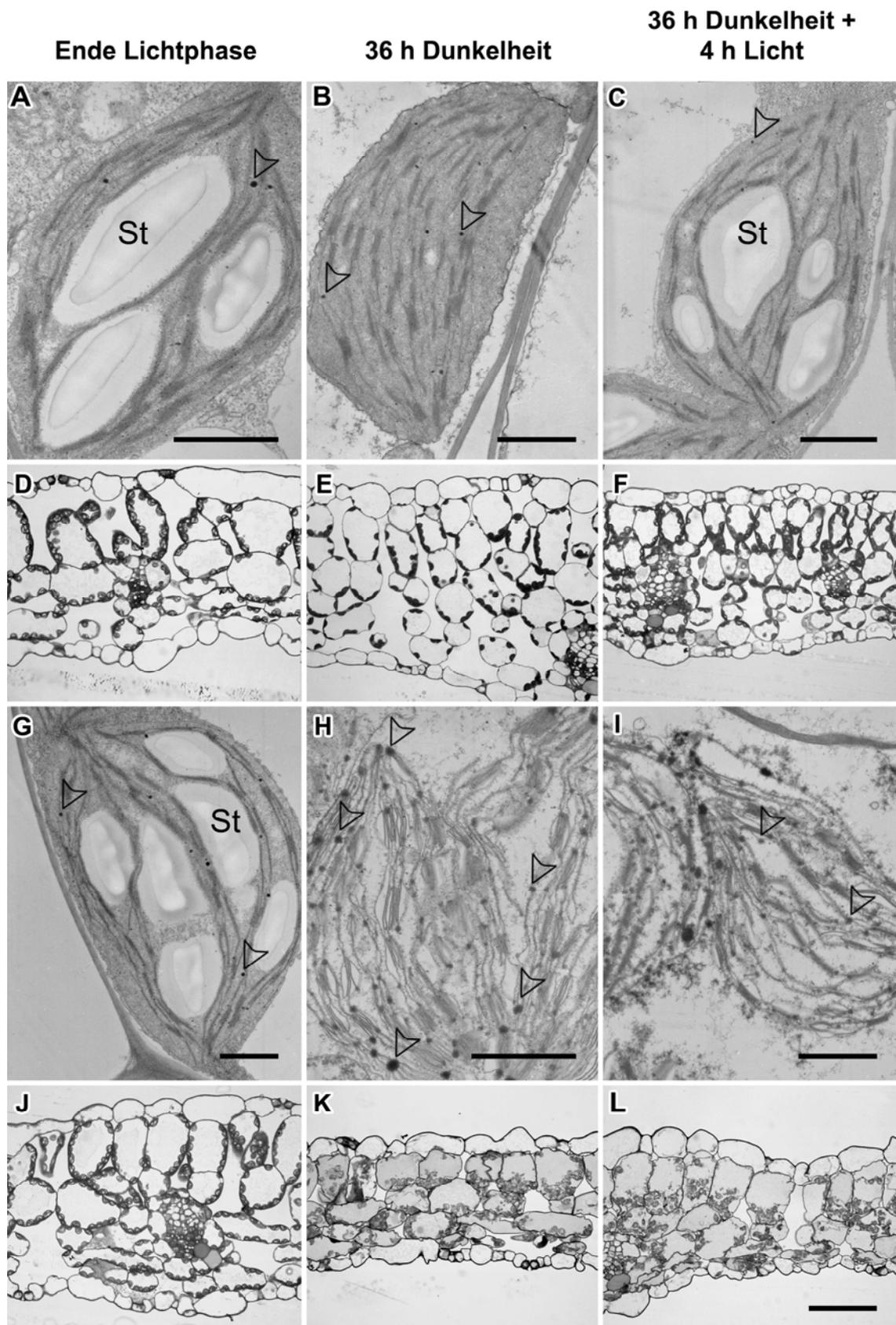


Abb. 16. Transmissions- und lichtmikroskopische Studien im Verlauf eines Dunkelexperimentes: Die Aufnahmen zeigen Material von 21 Tage alten Langtag angezogenen Col-0 (A-F) und *pxa1-2* (G-L) Pflanzen. A-C und G-I stellen TEM-Bilder einzelner repräsentativer Chloroplasten dar. In D-F und J-L sind die korrespondierenden LM-Abbildungen von Querschnitten des Blattgewebes zu sehen. Lipidtropfen sind durch Pfeile gekennzeichnet, Stärkegrana mit ST beschriftet. Balken = 1 μ m

Im Langtag angezogene, 3 Wochen alte Pflanzen wurden zunächst einer Dunkelinkubation von 36 h ausgesetzt. Unmittelbar vor Beginn des Experimentes wurden Gewebeproben am Ende der 16 h Belichtungsphase genommen. Wie in Abb. 16A, D, G und J ersichtlich, konnten zu diesem Zeitpunkt keinerlei Unterschiede, weder in den Chloroplasten, noch im Blattquerschnitt beobachtet werden. Der Wildtyp und die Mutante zeigten gleichermaßen intaktes Gewebe, vollturgeszente Zellen sowie intakte, funktionelle Plastiden. Letzteres ließ sich sehr deutlich am Vorhandensein großer Stärkegrana (ST) dokumentieren. Nur sehr vereinzelt waren kleine schwarze Lipidtröpfchen (Plastoglobuli) im Stroma erkennbar, die durch Pfeile in Abb. 16 gekennzeichnet sind.

Nach einer Dunkelphase von 36 h wurden deutliche Unterschiede auf zellulärer- und Gewebeebene im Vergleich beider Linien festgestellt. Durch die Abwesenheit der Photosynthese waren die Reserven der transitorischen Blattstärke vollständig aufgebraucht. Weder in Wildtyp (Abb. 16B) noch in *pxa1-2* Chloroplasten (Abb. 16H) konnten Überreste der Stärkegrana gefunden werden. Der Wildtyp-Chloroplast zeigte weiterhin vollständige strukturelle Intaktheit. Deutlich ließen sich Thylakoide erkennen sowie eine leichte Zunahme an Plastoglobuli. Im Blattquerschnitt des Wildtyps (Abb. 16E) konnte unbeeinträchtigtes Gewebe mit turgeszenten Zellen dokumentiert werden. Aufgrund der voll turgeszenten Zellen waren die Plastiden ausschließlich im Zytoplasmasaum entlang der Zellwand lokalisiert.

Im Vergleich dazu konnten drastische Veränderungen nach 36 h Dunkelheit in Blättern von *pxa1-2* festgestellt werden. Wie in Abb. 16H erkennbar, löste sich hier der Chloroplast quasi auf. Eine den Chloroplasten umgebende Envelopmembran konnte nicht mehr beobachtet werden und die strukturelle Organisation der Thylakoidmembranen in Grana- und Stromathylakoide ging völlig verloren, sodass der Plastid aufgebläht wirkte. Begleitet wurde dieser Effekt von einer massiven Anhäufung der Lipidtröpfchen. Sie waren nun sowohl in Anzahl als auch Größe wesentlich präsenter. Diese Veränderungen waren nicht lokal, beziehungsweise zellulär begrenzt. Der in Abb. 16K dargestellte Blattquerschnitt gibt den Blick auf die im Gewebe vorherrschenden Schädigungen frei. Deutlich ließ sich ein vollständiger Verlust des Zellurgors erkennen, ausgelöst durch die Auflösung der Vakuolen. Als Indikator hierfür können die vorgefundenen Anhäufungen von Zelltrümmern und anderen Organellresten im unteren Bereich der Zellen angesehen werden.

Um zu untersuchen, ob die vorgefundenen Schädigungen zu einer Inaktivierung des gesamten zellulären Metabolismus führten, wurde eine weitere Gewebereinbettung nach 36 h Dunkelheit und 4 h Licht vorgenommen. Im Wildtyp führte die Belichtung der Pflanzen zu einer sofortigen Aktivierung der Photosynthese, deutlich sichtbar durch die Akkumulation von Stärke in den Chloroplasten (Abb. 16C). Hingegen verhinderte der bereits nach 36 h dokumentierte Integritätsverlust der *pxa1-2* Plastiden eine Stärkeakkumulation (Abb. 16I). Im Gewebequerschnitt konnte in *pxa1-2* Blättern keinerlei weitere Veränderung zum vorhergehenden Zeitpunkt festgestellt werden.

Berücksichtigt man die Resultate zur Messung der photosynthetischen Aktivität in Wildtyp und *pxa1* Pflanzen (3.6.1) und die Abwesenheit beziehungsweise den Abbau essentieller Proteine des Photosystems II in *pxa1-2* Blättern (3.6.2), so lässt sich abschließend feststellen, dass alle Ergebnisse in gutem Einklang miteinander stehen und Stringenz in ihren Folgen zeigen.

3.7 Analytik von Metaboliten des Lipidstoffwechsels

pxa1 Mutanten besitzen eine saccharoseabhängige Keimlingsetablierung (Zolman et al. 2001). Detaillierte Messungen von Metaboliten des Fettstoffwechsels während der ersten fünf Tage nach der Keimung zeigten einen deutlichen Anstieg sowohl der freien Fettsäuren, als auch der aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoAs) (Footitt et al. 2002). Darüber hinaus konnte in mikroskopischen Aufnahmen festgestellt werden, dass der Abbau der Speicherfette, also der Triacylglyceride (TAGs), inhibiert war (Footitt et al. 2002; Hayashi et al. 2002). Es sollte daher überprüft werden, ob es in adulten Pflanzen während verlängerter Dunkelphasen, ähnlich wie in der Keimung und den frühen Entwicklungsphasen, durch den Verlust des PXA1 ABC-Transporters zu einer Veränderung im Gehalt von Intermediaten des Fettstoffwechsels kam. Dies könnte eine neue physiologische Bedeutung für die β -Oxidation offenlegen, deren Relevanz bis dato lediglich in der Keimung und in manchen Pflanzen in der Seneszenz gesehen wurde (Charlton et al. 2005).

Die Metabolitenanalyse wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis für Pflanzenbiochemie von Herrn Professor Feußner an der Universität Göttingen durchgeführt.

3.7.1 Freie Fettsäuren im Verlauf der Dunkelinkubation

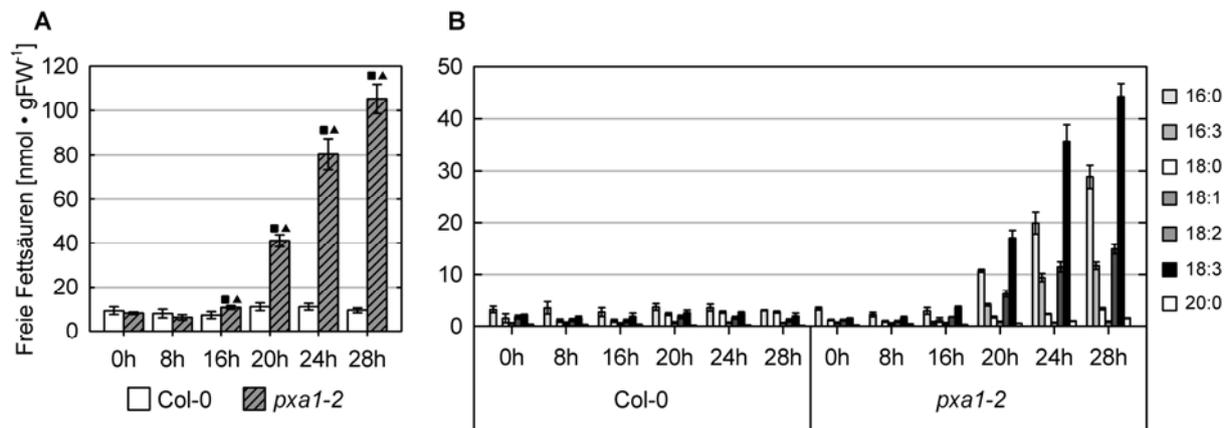


Abb. 17. (A) Summe der freien Fettsäuren im Verlauf einer Dunkelinkubation. (B) Profilanalyse der freien Fettsäuren aus A: Zu genannten Zeitpunkten wurde Pflanzenmaterial von 21 Tage alten Langtagpflanzen im Verlauf eines Dunkelexperimentes bei 24°C geerntet und jeweils der Gehalt an freien Fettsäuren bestimmt. Fehlerbalken: Standardfehler. Quadrate: Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen zum selben Zeitpunkt ($p \leq 0.05$). Dreiecke: Signifikante Unterschiede innerhalb einer Linie im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ($p \leq 0.05$).

Es wurden jeweils 3 Wochen alte Col-0 und *pxa1-2* Langtagpflanzen bei 24°C einer verlängerten Nachtphase ausgesetzt. Zunächst wurden Vergleichsproben am Ende einer Lichtphase und am Ende einer normalen Nacht von 8 h genommen. Die weiteren Probenahmen erfolgten vierstündlich von 16 h bis 28 h Dunkelheit. Auf Probenahmen zu späteren Zeitpunkten (32 h oder 36 h) wurde auf Basis der Ergebnisse mittels PAM (3.6.1) sowie der TEM Untersuchungen (3.6.3) verzichtet. Aufgrund der dramatischen Gewebeschädigungen zu diesen Zeitpunkten musste davon ausgegangen werden, keinerlei physiologisch aussagekräftige Messwerte zu erhalten.

In Abb. 17A ist die Summe der freien Fettsäuren pro Gramm Frischgewicht im zeitlichen Verlauf verlängerter Dunkelphasen dargestellt. Weder am Tagesende noch zum Ende einer normalen Nachtperiode von 8 h konnten signifikante Unterschiede zwischen Wildtypkontrolle und *pxa1-2* festgestellt werden. Die Werte lagen in beiden Fällen bei circa 8-10 nmol · gFW⁻¹. Die Verdopplung der normalen Nachtphase auf 16 h sorgte für die erste signifikante Erhöhung in der Summe freier Fettsäuren. In den *pxa1-2* Mutanten war nun zum ersten Mal ein erhöhter Wert gegenüber der Wildtypkontrolle zu messen. Dieser Trend setzte sich konsequent mit Verlängerung der Dunkelheit fort, wohingegen die Spiegel in Col-0 stets um einen Durchschnittswert von 10 nmol · gFW⁻¹ schwankten. Die gemessene Differenz zwischen beiden Linien wurde also immer größer. Nach 20 h lag der Wert in *pxa1-2* mit 40 nmol · gFW⁻¹ bereits vierfach über Wildtypniveau. Nach 24 h achtfach mit

einem Mutantenwert von $80 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$, weitere 4 h später nach insgesamt 28 h wurde eine mehr als zehnfache Akkumulation ($110 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$) freier Fettsäuren gemessen.

In Abb. 17B ist die Fettsäurezusammensetzung der Daten aus Abb. 17A dargestellt. Da die Organellmembranen teilweise aus Fettsäuren charakteristischer Längen aufgebaut sind, lassen sich häufig Rückschlüsse auf den Ursprungsort der Moleküle schließen. Im Wildtyp konnte kein deutlicher Anstieg einer speziellen Fettsäureart in dem verhältnismäßig kleinen Pool ausgemacht werden. Wesentlich interessanter war dagegen das gemessene Fettsäureprofil in der Mutante. Bei gleich vier verschiedenen Verbindungen konnten deutliche Anstiege über die Zeit verzeichnet werden: 16:0 (Palmitinsäure), 16:3 (Hexadecatriensäure), 18:2 (Linolsäure) und 18:3 Fettsäuren (α -Linolensäure). Am dominantesten akkumulierte die α -Linolensäure mit einem Wert von bis zu $45 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ nach 28 h Dunkelheit, was demnach fast die Hälfte des Gesamtpools der freien Fettsäuren bedeutete. Gefolgt wurde sie von Palmitinsäure mit $28 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$, vor Linolsäure mit 15 beziehungsweise der 16:3 Fettsäure mit immerhin noch $11 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$.

3.7.2 Der Acyl-CoA-Pool im Verlauf der Dunkelinkubation

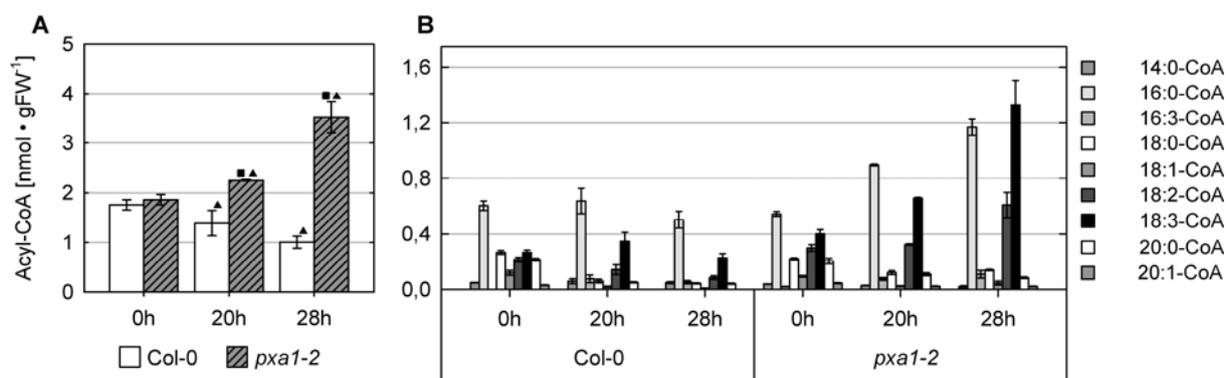


Abb. 18. (A) Summe aller Acyl-CoAs im Verlauf einer Dunkelinkubation. (B) Profilanalyse der Acyl-CoAs aus A: Zu genannten Zeitpunkten wurde Pflanzenmaterial von 21 Tage alten Langtagpflanzen im Verlauf eines Dunkelversuchs bei 24°C geerntet und jeweils der Acyl-CoA Gehalt bestimmt. Fehlerbalken: Standardfehler. Quadrate: Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen zum selben Zeitpunkt ($p \leq 0.05$). Dreiecke: Signifikante Unterschiede innerhalb einer Linie im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ($p \leq 0.05$).

Bei der Analyse der Acyl-CoAs fällt auf, dass im Verlauf der verlängerten Nacht deren Gesamtmenge im Wildtyp sogar leicht abnahm (Abb. 18A), während sie, wie schon im Fall der freien Fettsäuren, mit zunehmender Dauer der Dunkelinkubation in der *pxa1-2* Mutante deutlich zunahm. Dies führte nach 28 h Dunkelheit zu einem signifikanten Unterschied mit mehr als dreifachem Überschuss in der Mutante verglichen zu Col-0. Allgemein war festzustellen, dass der Pool an aktivierten

Fettsäuren deutlich geringer war, verglichen zum in 3.7.1 gemessenen Pool an freien Fettsäuren. Die in Abb. 18B dargestellte Profilanalyse zeigte, dass der kleinere Wildtyppool vor allem von den 16:0-CoA Fettsäuren dominiert wurde, die jedoch keine zeitabhängige Fluktuation zeigten. Am zweithäufigsten war die aktivierte Form der α -Linolensäure zu finden. Die übrigen aktivierten Fettsäuren kamen in ähnlichen, sehr geringen Konzentrationen vor.

Der Blick auf die 28 h Werte von *pxa1-2* spiegelt ein vergleichbares Profil wie bei den freien Fettsäuren wider. Obwohl zu den früheren Zeitpunkten 0 h und 20 h noch 16:0-CoA dominierte, fand sich zu dem spätesten Zeitpunkt von 28 h mit einer Konzentration von circa $1.3 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ vor allem die aktivierte Form der α -Linolensäure. Deutlich konnte zusätzlich ein zeitabhängiger Anstieg in der 18:2-CoA Fraktion bis auf $0.65 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ verzeichnet werden. Die übrigen Acyl-CoAs zeigten hingegen keinerlei Anstau.

3.7.3 Die Triacylglyceride im Verlauf der Dunkelinkubation

Bereits in den transmissionsmikroskopischen Analysen (Abb. 16) konnten in der Mutante nach 36 h starke Anhäufungen von Plastoglobuli ausgemacht werden. Diese wurden durch das verwendete Kontrastmittel Osmiumtetroxid (OsO_4) deutlich angefärbt und ließen sich daher gut innerhalb der Plastiden erkennen. Die Plastoglobuli enthalten Triacylglyceride (Kaup et al. 2002). Daher sollten ebenso die TAGs im zeitlichen Verlauf eines Dunkelexperimentes analysiert werden.

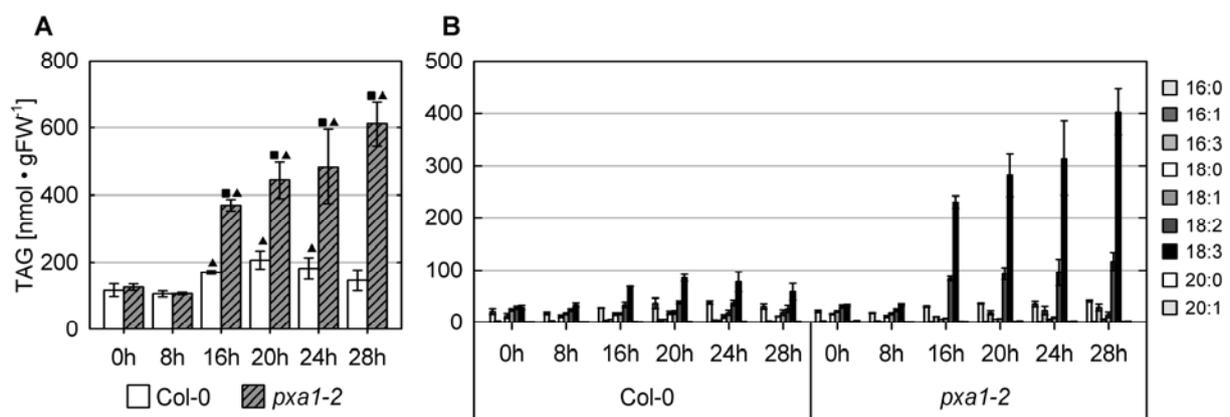


Abb. 19. (A) Summe der TAGs im Verlauf einer Dunkelinkubation. **(B)** Profilanalyse der TAG Fraktionen aus A: Zu genannten Zeitpunkten wurde Pflanzenmaterial von 21 Tage alten Langtagpflanzen im Verlauf eines Dunkelexperimentes bei 24°C geerntet und jeweils die Menge an Triacylglyceriden bestimmt. Fehlerbalken: Standardfehler. Quadrate: Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen zum selben Zeitpunkt ($p \leq 0.05$). Dreiecke: Signifikante Unterschiede innerhalb einer Linie im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ($p \leq 0.05$).

Bei der Analyse der Triacylglyceride in 3 Wochen alten Langtagpflanzen konnten die transmissionsmikroskopischen Daten aus 3.6.3 bestätigt werden. Wie in Abb. 19A

erkennbar, fand ein deutlicher Anstieg der TAGs bereits nach 16 h Dunkelheit in der *pxa1-2* Mutante statt. Früher und deutlicher als bei den freien Fettsäuren und den Acyl-CoAs wurde zu diesem Zeitpunkt mit $390 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ schon der doppelte Wert des Wildtyps erreicht. Mit fortschreitendem Verlauf des Experiments blieb der TAG-Gehalt in Col-0 stets zwischen 180 und $200 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$, wohingegen in *pxa1-2* Pflanzen weitere, kontinuierliche Zunahmen bis auf den dreifachen Wildtypwert von $600 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ nach 28 h detektiert wurden.

Die in Abb. 19B dargestellte Profilanalyse der TAGs zeigte für Col-0 ein gleichbleibendes Verhältnis in der Zusammensetzung des Pools, leicht dominiert von α -Linolen- und Linolsäure. Vergleicht man dazu den links dargestellten Verlauf der *pxa1-2* TAGs fällt sofort die große Dominanz der 18:3 Fettsäuren auf. Ihre Konzentration stieg kontinuierlich an und machte bei 28 h Dunkelheit mit $400 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ über 60% des gesamten TAG-Pools aus. Die zweithäufigste Komponente stellte mit 20% die Linolsäure, die ebenfalls kinetisch anstieg und nach 28 h einen Maximalwert von etwa $120 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ erreichte.

Vergleicht man das Profil der in den TAG enthaltenen Fettsäuren mit dem der freien Fettsäuren, so stellt man fest, dass die Komposition der Neutralfette von Fettsäuren mit einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen dominiert wurde. Ungewöhnlicher Weise waren im TAG-Pool der *pxa1-2* Mutante auch 16:3 Fettsäuren nachweisbar. Diese kommen jedoch im regulären TAG normalerweise nicht vor. Relativ betrachtet, war der Anteil der 16 Kohlenstoff Fettsäuren wie Palmitin gemessen am Vorkommen der 18 Kohlenstoff Fettsäuren sowohl im Wildtyp als auch der *pxa1-2* Mutante gering.

3.7.4 Indolessigsäurekonzentrationen im Verlauf der Dunkelinkubation

Indolessigsäure (IAA) ist ein natürlich vorkommendes Auxin, das an der Regulation von Wachstums- und komplexen Entwicklungsprozessen beteiligt ist (Woodward and Bartel 2005). Indolbuttersäure (IBA) ist ebenfalls ein natürliches Auxin und bereits in einer Vielzahl verschiedener Pflanzenspezies identifiziert worden (Epstein and Ludwigmuller 1993). Zur gezielten Bewurzelung findet es auch kommerziell Anwendung (Morgan 1983). Aufgrund seiner Struktur sowie durch Studien an Mutanten, ohne Reaktion auf exogen gefüttertes IBA, wird jedoch vermutet, dass es seine Auxinwirkung erst durch biochemische Umwandlung zu IAA entwickelt (Zolman et al. 2008). Die hieran beteiligten Prozesse sind Teil der peroxisomalen β -Oxidation. IAA kann jedoch nicht nur durch Modifikation von IBA entstehen, es existieren zwei

weitere Synthesewege ausgehend von Tryptophan oder einer indolischen Tryptophanvorstufe (Woodward and Bartel 2005). Um den Zusammenhang zwischen dem Phytohormon Auxin und dem Auftreten des Dunkelphänotyps zu klären, sollten vergleichend die endogenen Konzentrationen von IAA im Wildtyp und *pxa1-2* während verlängerter Nachtphasen gemessen werden. Hierbei wurden nur Messungen bis zu 20 h Dunkelheit durchgeführt, da angenommen werden musste, dass aufgrund der in Abb. 9 zu beobachtenden Schädigungen zu späteren Zeitpunkten keine aussagekräftigen Daten mehr erhoben werden konnten.

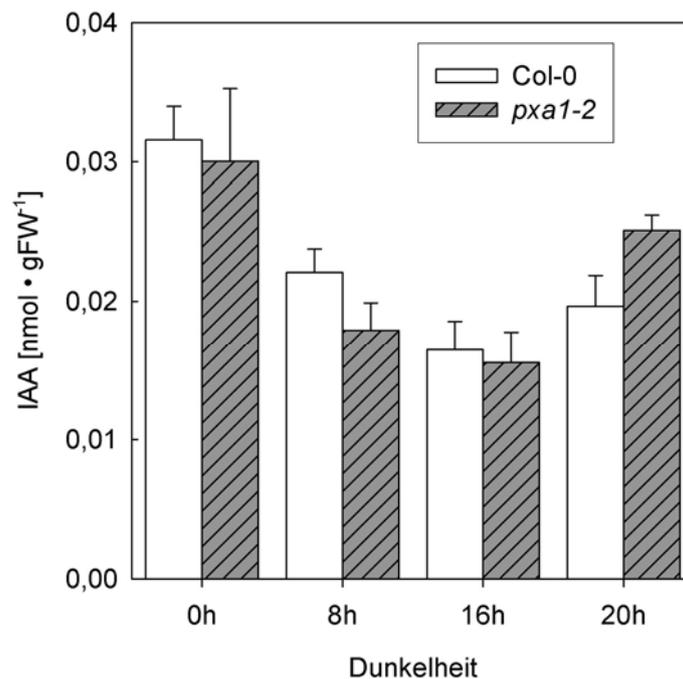


Abb. 20. IAA Konzentrationen in Verlauf einer 20 h Dunkelinkubation: Das Blattmaterial von 21 Tage alten Langtagpflanzen wurde bei 24°C in eine verlängerte Nachtphase gebracht, zu angegebenen Zeitpunkten wurde Blattmaterial zur IAA Bestimmung geerntet. Fehlerbalken: Standardfehler.

Mit 21 Tage alten Langtagpflanzen wurde bei 24°C ein Dunkelexperiment durchgeführt und zu den in Abb. 20 angegebenen Zeitpunkten die IAA Konzentration im Blattgewebe bestimmt. Die Werte zeigten in Wildtyp wie in der Mutante einen einheitlichen Verlauf ohne dabei signifikant voneinander abzuweichen. Der Defekt der β -Oxidation in *pxa1-2* führte also nicht zu einem Einbruch des Gehalts an aktivem Auxin IAA. Daher galt ein veränderter Auxingehalt als Phänotypursache als unwahrscheinlich.

3.8 Toxizitätstests der 18:3 Fettsäure

In der Analyse der Fettmetabolite (3.7) konnte α -Linolensäure als Hauptverursacher für den Anstieg des Pools an freien Fettsäuren identifiziert werden. Um die Toxizität der 18:3 Fettsäure gegenüber intakten Pflanzen und isolierten Chloroplasten studieren zu können, wurden zwei Assays hierfür entwickelt und etabliert:

- Toxizitätstest an intakten Pflanzen
- Toxizitätstest an isolierten Chloroplasten

3.8.1 Toxizität von α -Linolensäure auf intakte Pflanzen

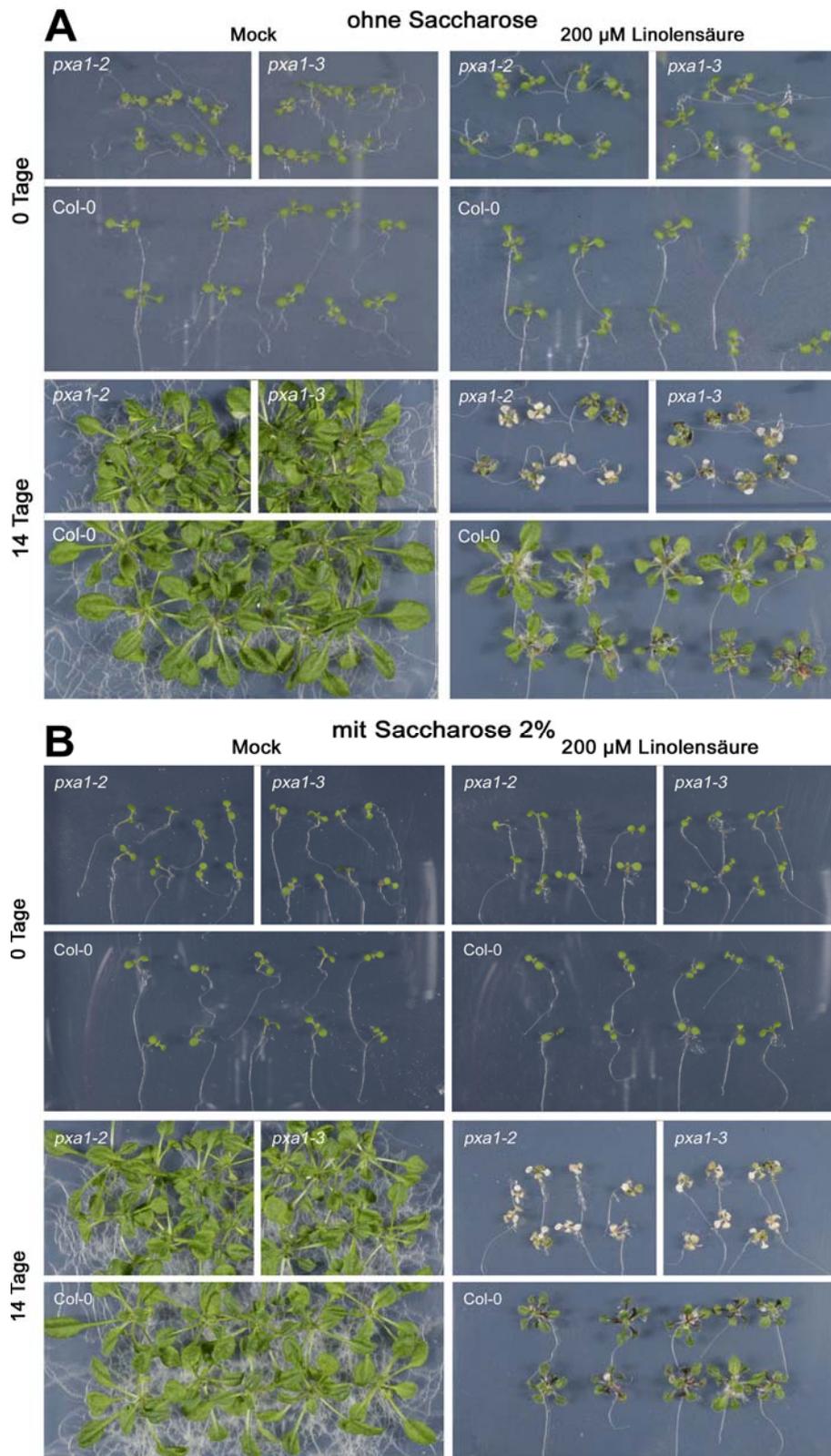


Abb. 21. Toxizität der Linolensäure auf intakte Pflanzen: Nach Keimung auf MS + Saccharose (2%) wurden die 10 Tage alten Langtag Pflanzen auf MS ohne Saccharose mit oder ohne 200 μ M α -Linolensäure (A) oder auf MS mit Saccharose mit oder ohne 200 μ M α -Linolensäure (B) umgesetzt. Direkt nach dem Transfer (0 Tage) und nach weiteren 14 Tagen Langtag wurde das Wachstum dokumentiert.

Samen von Col-0 und *pxa1-2* und *pxa1-3* wurden auf MS Medium mit Saccharose gekeimt und für 10 Tage unter Langtag Bedingungen angezogen. Dann wurden die Pflanzen steril auf MS Platten mit (Abb. 21A) oder ohne (Abb. 21B) Saccharose und mit oder ohne α -Linolensäure (200 μ M) umgesetzt und weiterhin im Langtag kultiviert. Der Kontrollansatz (Mock) beinhaltete das Lösungsmittel EtOH in 1% Endkonzentration. Die Pflanzen wurden direkt nach dem Umsetzen und nach weiteren 14 Tagen Wachstum auf den fetthaltigen Platten dokumentiert. Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass sowohl Wildtyp als auch *pxa1* Mutanten in Gegenwart von 200 μ M α -Linolensäure schlechter wuchsen als unter Kontrollbedingungen (Abb. 21). Allerdings wurde aus Abb. 21 auch deutlich, dass beide *pxa1* Mutanten Linien verglichen mit dem Wildtyp bei Anwesenheit von α -Linolensäure im Medium wesentlich stärkere Schädigungen aufwiesen. Die Pflanzen waren stärker retardiert und zeigten anstelle von grünen Blättern, durchgehende weißgraue Verfärbungen. Diese Beobachtung war unabhängig von An- oder Abwesenheit von Saccharose im Medium (Abb. 21A; B). Untersuchungen mit der PAM ergaben, dass die Mutanten zu diesem Zeitpunkt keinerlei photosynthetische Aktivität mehr aufwiesen und somit vollständig tot waren (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich demnach festhalten, dass die exogene Fütterung von α -Linolensäure, der Substanz die am deutlichsten während der Dunkelinkubation in den Mutanten anstieg, einen sehr ähnlichen Effekt auf intakte Pflanzen hervorrief wie der endogene Anstieg in *pxa1-2* Mutanten während verlängerter Dunkelheit.

3.8.2 Toxizität von α -Linolensäure auf isolierte Chloroplasten

Da in 3.8.1 festgestellt wurde, dass α -Linolensäure Fütterung zur Weißverfärbung des Blattgewebes von Mutanten führte, wurden intakte Chloroplasten aus Col-0 und *pxa1-2* isoliert, um die Wirkung der 18:3 Fettsäure direkt auf die Organellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob *pxa1* Chloroplasten eine erhöhte Sensitivität hierfür aufweisen. Als Indikator für verursachte Schädigungen wurde die photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) mittels Chlorophyll Fluoreszenz Messung in wässriger Lösung (WATER-PAM) bei steigenden α -Linolensäure Konzentrationen gemessen.

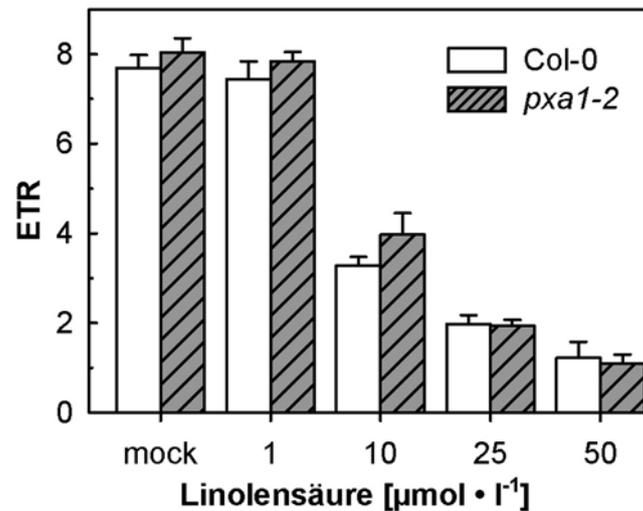


Abb. 22. Toxizität von α -Linolensäure auf Chloroplasten: Aus 3 Wochen alten, Langtag angezogenen Col-0 und *pxa1-2* Blättern isolierte Chloroplasten wurden mit ansteigenden Konzentrationen von α -Linolensäure inkubiert. Als Indikator für die hierdurch verursachte Schädigung wurden mithilfe einer Water-PAM die Elektronentransportrate (ETR) in jedem Ansatz bestimmt.

Aus Abb. 22 wird deutlich, dass bereits $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -Linolensäure für eine Halbierung der ETR sorgten. Proportional wurden Konzentrationserhöhungen der α -Linolensäure von weiterer Reduktion der ETR begleitet. $25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Linolensäure führte zu circa 75%, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zu gut 85% Reduktion.

Festzustellen bleibt, dass keinerlei Anzeichen für unterschiedliche Sensitivitäten der Chloroplasten beider Linien gemessen wurden. Deutlich zeigte sich, dass Col-0 und *pxa1-2* Plastiden gleichermaßen sensitiv auf die 18:3 Fettsäure reagierten.

3.9 Einführung und Beschreibung des phototoxischen Phänotyps

In den Dunkelversuchen wurde auffällig, dass die *pxa1* Pflanzen im direkten Anschluss an die Dunkelinkubation eine blaugrüne Farbe aufwiesen, sich nach einigen Stunden im Licht jedoch weißlich grau verfärbten. Die Ursachen für diese Veränderung des Phänotyps sollten daher im Detail studiert und erforscht werden.



Abb. 23. Phototoxischer Phänotyp der *pxa1* Mutante nach verlängerten Dunkelphasen: 21 Tage alte, Langtag angezogene Pflanzen wurden für 36 h bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde eine Hälfte der Pflanze mit Aluminiumfolie verdeckt und der Topf für 24 h ins Licht gestellt. Das linke Bild zeigte den Zustand vor Entfernung der Folie, rechts danach.

Zunächst wurden hierzu 21 Tage alte Langtag angezogene Pflanzen für 36 h bei 24°C in völliger Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde noch im Dunkeln eine Hälfte der Pflanze mit Aluminiumfolie abgedeckt, die Andere blieb hingegen frei. So präparierte Pflanzen wurden nun für 24 h dem Licht exponiert. Wie links in Abb. 23 zu sehen, wurde zunächst der halb verdeckte Topf dokumentiert, dann vorsichtig die Alufolie entfernt, um die gesamte Pflanze zu photographieren. Deutlich war ein Unterschied in der Farbe des Pflanzengewebes erkennbar. Die unbedeckte, belichtete Hälfte zeigte die grau-weiße Verfärbung, wohingegen die vor Licht geschützte andere Seite die ursprüngliche blaugrüne Farbe behielt, die charakteristisch für den Zeitpunkt direkt nach der Dunkelinkubation war. Der Versuch zeigte, dass der Verfärbungsprozess abhängig vom Licht war. Somit handelte es sich um einen sogenannten phototoxischen Effekt.

3.9.1 Pigmentisolierung und chromatische Auftrennung

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf phototoxische Tetrapyrrolverbindungen in Pflanzen. Chlorophyll ist die Tetrapyrrolverbindung mit der höchsten Konzentration in pflanzlichen Zellen. Alle Zwischenprodukte der Chlorophyll-Biosynthese sowie die frühen Abbaustufen des Pigments sind phototoxisch, wenn frei und in größeren Konzentrationen vorliegend (Moulin and Smith 2005; Tanaka and Tanaka 2007).

Durch ihre Molekülstruktur können die Tetrapyrrolverbindungen leicht vom Licht angeregt werden. Die Anregungsenergie wird dann im Falle von Chlorophyll a auf ein Magnesium-Zentralatom übertragen und von dort auf weitere Akzeptormoleküle. Fehlen diese, wird die Energie des angeregten Chlorophylls zum Beispiel auf Sauerstoff übertragen, wodurch zellschädigende Radikale entstehen. Die Bildung solcher Radikale kann auch durch die Pigment Vor- oder Abbaustufen ohne chelatiertes Zentralatom erfolgen, sofern sie eine Tetrapyrrolstruktur aufweisen (Pruzinska et al. 2003; Reinhold et al. 2007). Daher müssen sowohl die Biosynthese als auch der Katabolismus dieser Verbindungen in der Pflanze strikt reguliert und kompartimentiert ablaufen (Pruzinska et al. 2007).

Da wie in 3.9 beschrieben ein phototoxischer Effekt in *pxa1-2* Mutanten nach verlängerten Dunkelphasen und Rücktransfer ins Licht beobachtet wurde, sollten die Pflanzen auf ihre Pigmentzusammensetzung hin überprüft werden.

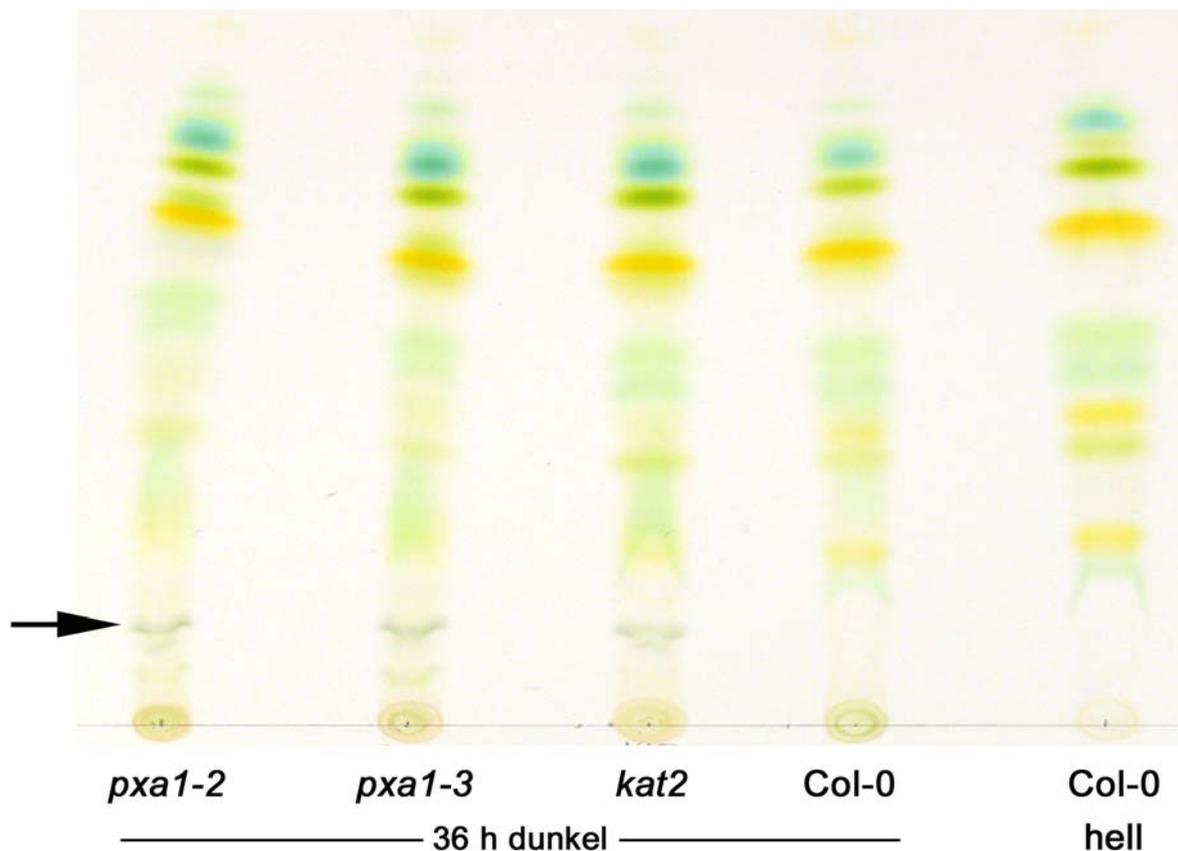


Abb. 24. Dünnschichtchromatographie der Pigmentextrakte: 21 Tage alte, im Langtag angezogene Pflanzen wurden für 36 h im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Pigmente mit eiskaltem Aceton extrahiert, auf die Silikamatrix aufgetragen und mit dem Laufmittel, Petroleum Äther : Isopropanol : H₂O (100:15:0.25) aufgetrennt. Als Kontrollen dienten Extrakte aus dunkelinkubierten, beziehungsweise im Licht belassenen Col-0 Blättern.

Um die Pigmentzusammensetzung näher untersuchen zu können, wurden 21 Tage alte, im Langtag angezogene Pflanzen für 36 h im Dunkeln inkubiert. Ihr

Gewebematerial wurde im Dunkeln geerntet, pulverisiert und mit eiskaltem Aceton extrahiert. Die Extrakte wurden auf einer Silikamatrix Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Zur Auftrennung diente eine Mischung aus Petroleum Äther-Isopropanol-H₂O (100:15:0.25) als Laufmittel. Nachdem das Laufmittel bis zum oberen Rand der Platte gelaufen war, wurde die Platte getrocknet und das Resultat dokumentiert. In Abb. 24 ist eine Dünnschichtchromatographieplatte nach erfolgreicher Trennung abgebildet. Deutlich wurde eine, durch den Pfeil gekennzeichnete, zusätzliche Bande erkennbar. Interessanterweise konnte sie nur in den β -Oxidations-defizienten Mutanten gefunden werden, welche auch den phototoxischen Phänotyp zeigten. In keiner der beiden Wildtypkontrollen war sie hingegen zu identifizieren. Bei allen anderen aufgetrennten Pigmenten wie den Chlorophyllen, Xanthophyllen und Carotinoiden konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt werden.

3.9.2 Isolierung und Bestimmung des zusätzlichen Pigmentspots

Die in Abb. 24 beschriebene zusätzliche Bande im unteren Bereich der Dünnschichtchromatographieplatte wurde vorsichtig mit einem Skalpell ausgekratzt und die Substanz anschließend durch Zugabe von etwas eiskaltem Aceton in einem Reaktionsgefäß wieder aus der Matrix extrahiert.

3.9.2.1 Photometrische Eigenschaften der isolierten Substanz

Zur näheren Charakterisierung der unbekanntes Substanz sollten die Absorptions- als auch die Emissionseigenschaften mithilfe einer photometrischen Spektralanalyse gemessen werden.

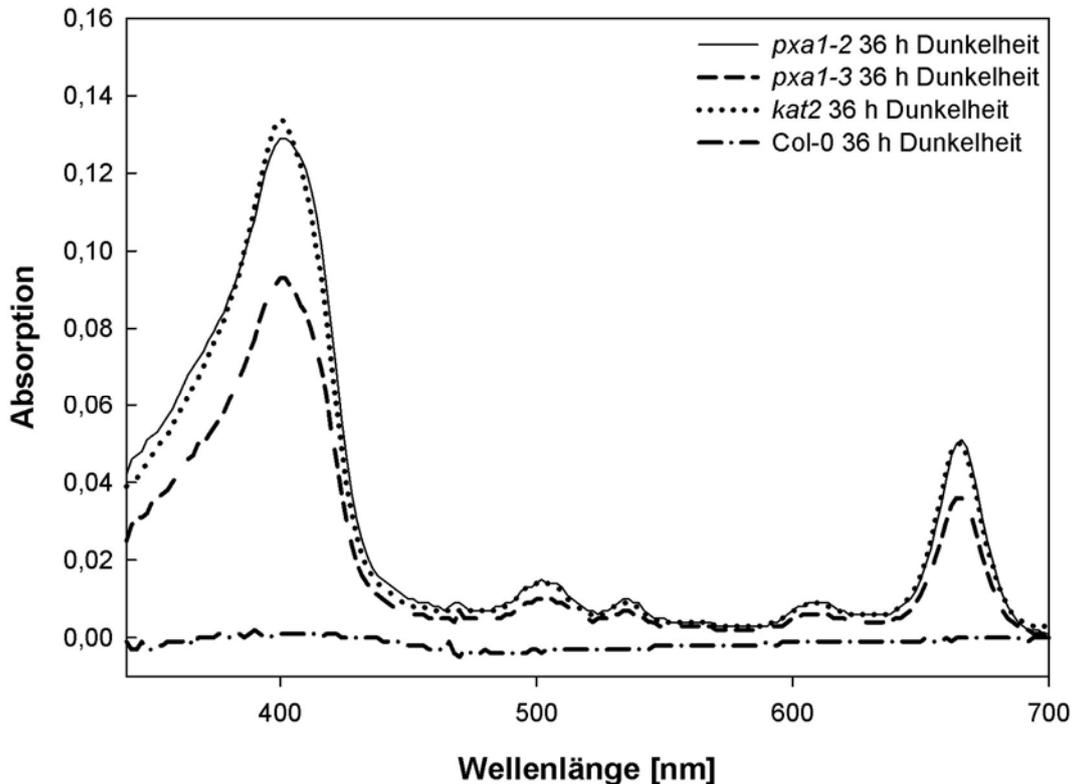


Abb. 25. Photometrische Spektralanalyse von 350 – 700 nm der isolierten Bande aus entsprechenden Pflanzen.

Mithilfe der Spektralanalyse gelang es, erste Erkenntnisse über die Eigenschaften der extrahierten Banden zu gewinnen. Zunächst konnte anhand der Nulllinie für Col-0 gezeigt werden, dass sich kein absorbierendes Pigmentmaterial mit einem identischen Retentionsfaktor (R_f -Wert) im Extrakt des Wildtyps befand. Dies bestätigte den ersten Eindruck, dass es sich hierbei um die mutantenspezifische Akkumulation einer Substanz handelte. In allen Extrakten der drei Mutanten ließen sich, wie aus Abb. 25 hervorgeht, sehr ähnliche Absorptionscharakteristika messen. Die höchste Absorption wurde bei 400 nm identifiziert, ein zweiter deutlicher Peak befand sich bei 666 nm. Der Vergleich mit Literaturwerten zeigte erste Hinweise auf Phaeophorbid a einem Chlorophyllabbauprodukt. Die Absorptionsmaxima hierfür liegen laut Publikation bei 660 und 410 nm in einem Verhältnis von 0,46 (Pröll et al. 2006).

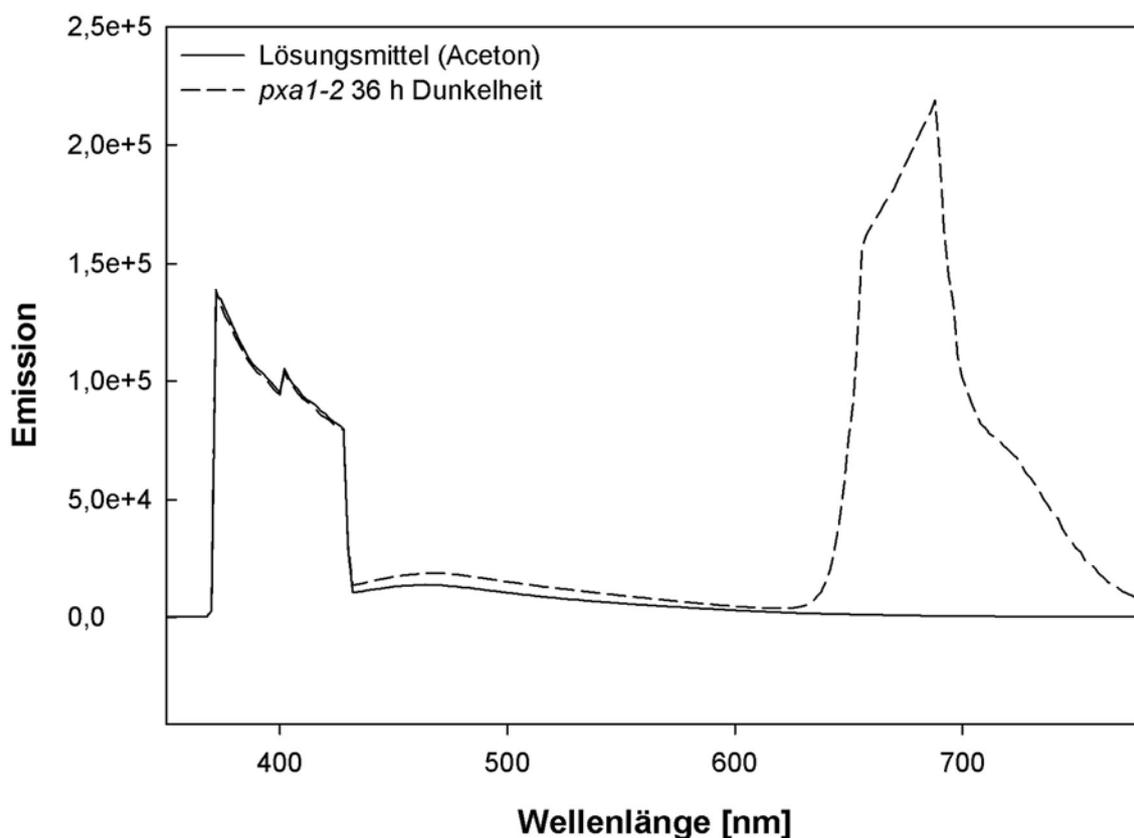


Abb. 26. Photometrische Emissionsanalyse von 350 – 780 nm der isolierten Bande aus *pxa1-2*.

Zusätzlich zur Absorption wurden auch die Emissionseigenschaften der Substanz bestimmt. Da, wie in Abb. 25 gezeigt, der höchste Absorptionswert bei 400 nm lag, wurde diese Wellenlänge zur Anregung der Substanz genutzt. Mit 2 μ s Verzögerung erfolgte die Emissionsbestimmung über ein Spektrum von 350 – 780 nm. Wie in Abb. 26 gezeigt, lag die maximale Emission der isolierten Substanz bei 688 nm. Ein Vergleich mit der Literatur ergab für Phaeophorbid a bei Anregung von 410 nm einen Emissionswert von 670 nm (Oster et al. 2000).

3.9.2.2 Massenspektroskopische Identifizierung des Phaeophorbid a

Da in Köln nur erste photometrische Voranalysen der isolierten Substanz gemacht werden konnten, wurde sie eingedampft und in der Abteilung Pflanzenbiochemie im Arbeitskreis von Herrn Professor Feußner (Universität Göttingen) weitergehend massenspektrometrisch analysiert.

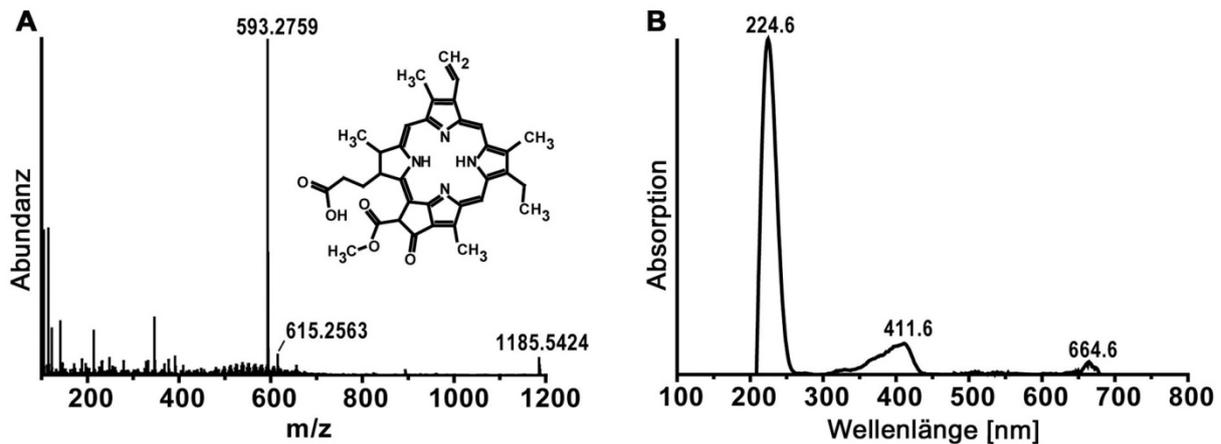


Abb. 27. (A) Massenspektrum der isolierten Substanz sowie Molekülstruktur von Phaeophorbid a (B) Absorptionsspektrum der Substanz.

Mithilfe der Massenspektrometrie wurde die Masse der Substanz, wie in Abb. 27A gezeigt, auf 593.28 bestimmt. Durch Datenabgleich mit einer Massenspektrenbibliothek wurde die Substanz als Phaeophorbid a (Pheide a) identifiziert. In Abb. 27B ist noch einmal ein Absorptionsspektrum der Messung in Göttingen gezeigt.

Phaeophorbid a ist eine Zwischenstufe des pflanzlichen Chlorophyllabbaus. Die Molekülstruktur ist in Abb. 27A zu sehen. Es handelt sich hierbei um ein dechelatiertes, Chlorophyllmolekül (Hörtensteiner 2006; Hörtensteiner 2009) ohne Phytolseitenkette, wodurch die Wasserlöslichkeit von Pheide a gegenüber seinen Pigmentvorstufen zunimmt (Schelbert et al. 2009). Durch seine Tetrapyrrolstruktur ist Phaeophorbid a stark phototoxisch und leicht in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, sofern es durch Licht angeregt wird (Pruzinska et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Pruzinska et al. 2005).

3.9.3 Akkumulationskinetik von Phaeophorbid a in *pxa1* Mutanten über die Dauer einer Dunkelinkubation

Um zu überprüfen, ob das Phaeophorbid a kontinuierlich über die Dauer eines Dunkel-experiments anstieg, wurde eine neue Versuchsreihe gestartet. Bei 20 h Dunkelheit beginnend wurde alle 4 h der Gehalt von Phaeophorbid a quantifiziert. Der erste Zeitpunkt wurde bewusst mit 20 h gewählt, da, wie in 3.5.2 beschrieben, bei dieser Inkubationsdauer die ersten visuellen Gewebeschädigungen auftraten.

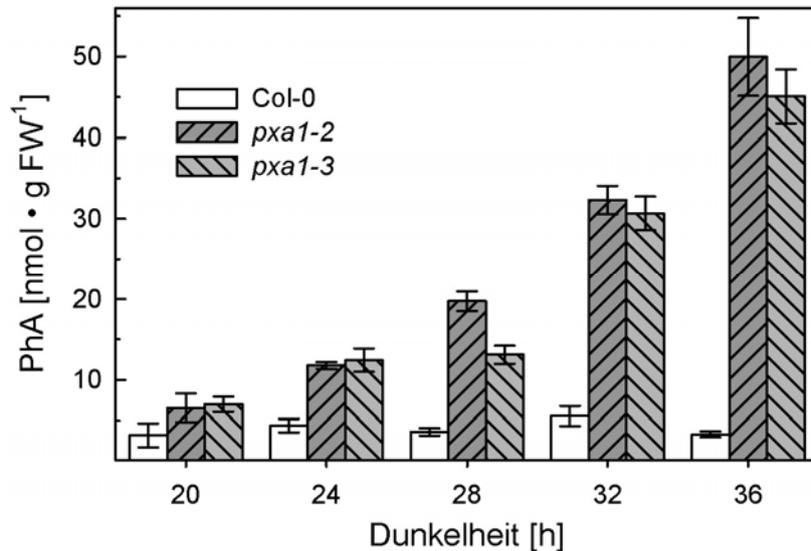


Abb. 28. Phaeophorbid a Akkumulation über die Dauer eines 36 h Dunkelexperiments: 21 Tage alte, im Langtag angezogene Pflanzen wurden bei 24°C in verlängerte Nachtphasen gebracht. Beginnend nach 20 h wurde alle 4 h Pflanzenmaterial geerntet und der Gehalt an Phaeophorbid a bestimmt.

Für die Experimente wurden Langtag-Pflanzen im Alter von 21 Tagen verwandt. Wie aus Abb. 28 hervorgeht, wurde ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg von Phaeophorbid a im Verlauf eines 36 h Dunkelexperimentes im Blattgewebe beider *pxa1* Linien gemessen. Verglichen dazu blieb eine zeitabhängige Anhäufung in Col-0 hingegen aus. Bereits nach 24 h war der Gehalt des Chlorophyllabbauproduktes in den Mutanten doppelt, nach 28 h mehr als dreifach so hoch wie im Wildtyp. Zu den weiteren Messzeitpunkten 32 h und 36 h wurden weitere Zunahmen bis hin zu zehnfachen Werten gemessen. Es sei angemerkt, dass der massive Anstieg von Phaeophorbid a zeitversetzt zu dem nach kürzerer Dunkelinkubation einsetzenden Anstieg an freien Fettsäuren begann (Abb. 17).

3.10 Kontext zum Stärkemetabolismus

3.10.1 Stärkeabbau in Abhängigkeit vom Zustand des untersuchten Gewebes

Wie in 3.5.4 gezeigt, wurde im Laufe der Untersuchungen festgestellt, dass der Dunkelphänotyp von *pxa1* Mutanten nach 36 h nur im Gewebe intakter Pflanzen zu beobachten war. Abgetrennte Einzelblätter hingegen zeigten nach gleicher Inkubationsdauer keinerlei visuelle Gewebeschädigungen. Es sollte daher nach Ursachen hierfür gesucht werden, da angenommen werden konnte, dass Wildtyp Pflanzen in verlängerter Dunkelheit Fettsäuren zur Energiegewinnung nutzen, während *pxa1* Mutanten diese Energiequelle nicht nutzen können und stattdessen freie Fettsäuren akkumulieren. Intakte Pflanzen besitzen nicht ausschließlich das

photosynthetisch aktive Blatt- beziehungsweise Sourcegewebe; alle nicht grünen Pflanzenteile können die Energie aus Sonnenlicht nicht zur Biosynthese von Zuckern nutzen und müssen deshalb vom Sourcegewebe mitversorgt werden. Man bezeichnet diese Gewebe daher als Sinkgewebe. Es umfasst vor allem unterirdische Teile, also die Wurzel, jedoch auch das oberirdische Blütengewebe. Wie in der Einleitung unter 1.1 beschrieben, ist der Stärkegehalt in den Blättern, also des Hauptprodukts der Photosynthese, diurnal reguliert, dass heißt abhängig vom Tageszeitpunkt. Im Verlauf der Lichtphase eines Tagesgangs nimmt er ständig zu, sobald es hingegen dunkel wird, nimmt er kontinuierlich ab. Der beim Stärkeabbau freiwerdende Zucker (in Form von Glucose und Maltose) wird teilweise von der eigenen Zelle zur Energiegewinnung genutzt oder zur Versorgung der Sinkgewebe exportiert. Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Vorhandensein eines Sinkgewebes auf den Energiestatus einzelner Blätter in der Dunkelheit hat, wurde die Stärkefärbung intakter Blätter mit denen abgetrennter Einzelblätter zu gleichen Zeitpunkten der Dunkelinkubation verglichen.

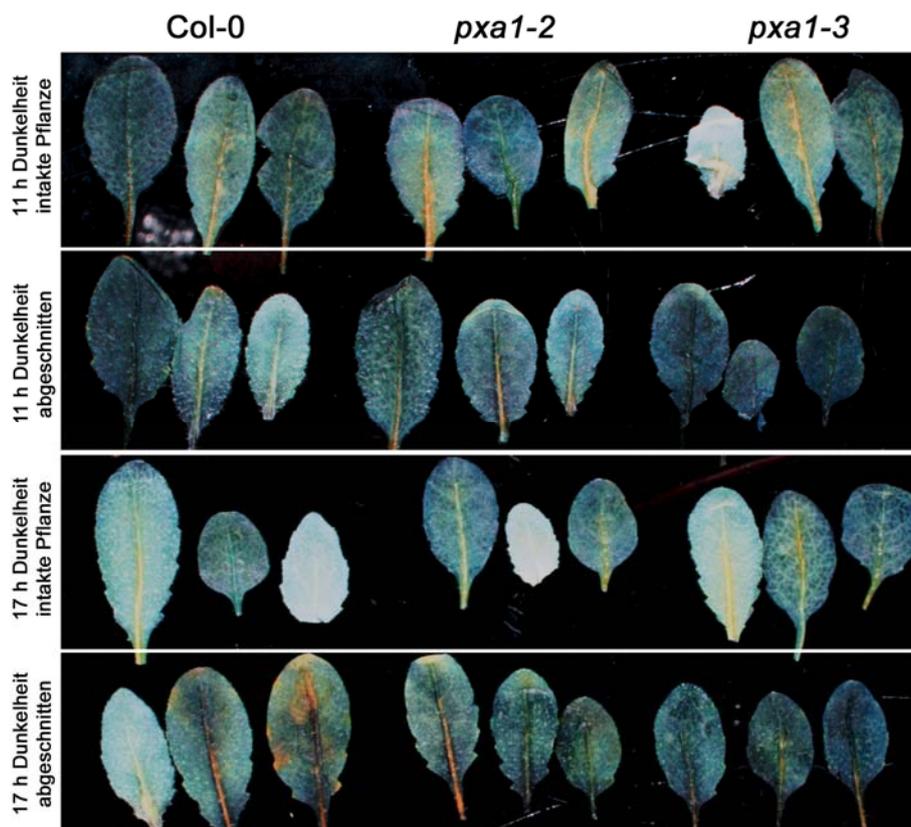


Abb. 29. Stärkefärbung nach verschieden langen Dunkelphasen in Blättern intakter Pflanzen auf Erde oder abgeschnittenen Blättern: Die Blätter von 21 Tage alten Langtag angezogenen Pflanzen wurden entweder an der Pflanze belassen und nach 11 h beziehungsweise 17 h Dunkelheit abgetrennt (intakte Pflanze) oder direkt am Ende der Lichtphase abgeschnitten und ebenfalls nach 11 h beziehungsweise 17 h Dunkelheit (abgeschnitten) mit Lugol'scher Lösung gefärbt.

Die Blätter von 3 Wochen alten, im Langtag angezogenen Pflanzen wurden entweder am Ende der 16 h Lichtphase abgetrennt und für 11 h oder 17 h im Dunkeln gelagert oder an intakten Pflanzen in die verlängerte Nachtphase gestellt. Zu identischen Zeitpunkten, also nach 11 h beziehungsweise 17 h wurden auch von den intakten Pflanzen einzelne Blätter entfernt und zunächst wie die Einzelblätter mit 75% EtOH entfärbt, dann mit Lugol'scher Lösung die Blattstärke angefärbt und photographisch dokumentiert.

In Abb. 29 ist das Resultat der Stärkefärbung gezeigt. Bereits nach 11 h in der Dunkelheit wurde erkennbar, dass der Gehalt an Blattstärke in den Blättern intakter Pflanzen geringer war als der in abgetrennten Einzelblättern. Vergleicht man die Intensität der durch die Lugol'scher Lösung hervorgerufene Blaufärbung, so sind die abgeschnittenen Einzelblätter stärker blau angefärbt. Ein Blick auf den späteren Zeitpunkt nach 17 h Dunkelheit zeigt, dass sich dieser Trend fortsetzte. Nun waren die Blätter intakter Pflanzen auf Erde drastisch heller als die Vergleichsproben der direkt abgetrennten Blätter. Unterschiede im Stärkegehalt zwischen Wildtyp und den *pxa1* Mutanten konnten hingegen innerhalb eines Ansatzes nicht gefunden werden. Obwohl es sich bei der Stärkefärbung mehr um einen qualitativen als einen quantitativen Nachweis handelte, konnten die erzielten Ergebnisse trotzdem als Hinweis für einen günstigeren Energiestatus in den abgetrennten Einzelblättern gewertet werden. Demnach blieb durch das Entfernen des Sinkgewebes und dem dadurch geringeren Export, netto mehr Energie in Form von Zuckern pro Zelle übrig. Offensichtlich verlangsamte dies auch den Stärkeabbau in den abgetrennten Einzelblättern.

Der höhere Stärkegehalt und der daraus resultierende erhöhte zelluläre Energiestatus in den abgetrennten Blättern könnte der Grund für die Unversehrtheit der Mutanteneinzelblätter nach 36 h Dunkelheit sein.

3.10.2 Ausprägung des Phänotyps in abgeschnittenen Einzelblättern in Abhängigkeit von der Sinkstärke

Zur Überprüfung der in 3.10.1 erhaltenen Hinweise sollte der Experimentaufbau angepasst werden. Da nach 16 h Dunkelheit in Abb. 9 noch keine offensichtlichen oder bleibenden Gewebeschädigungen zu beobachten waren, jedoch wie in Abb. 29 gezeigt, zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger Reststärke in Blättern der auf Erde verbliebenen Pflanzen vorhanden war, sollte dieser Zeitpunkt genutzt werden, um zu

untersuchen, ob Einzelblätter den *pxa1* Dunkelphänotyp intakter Pflanzen auf Erde widerspiegeln, sofern man sie erst nach 16 h Dunkelheit von der Pflanze und somit vom Vorhandensein eines Sinkgewebes entfernt.

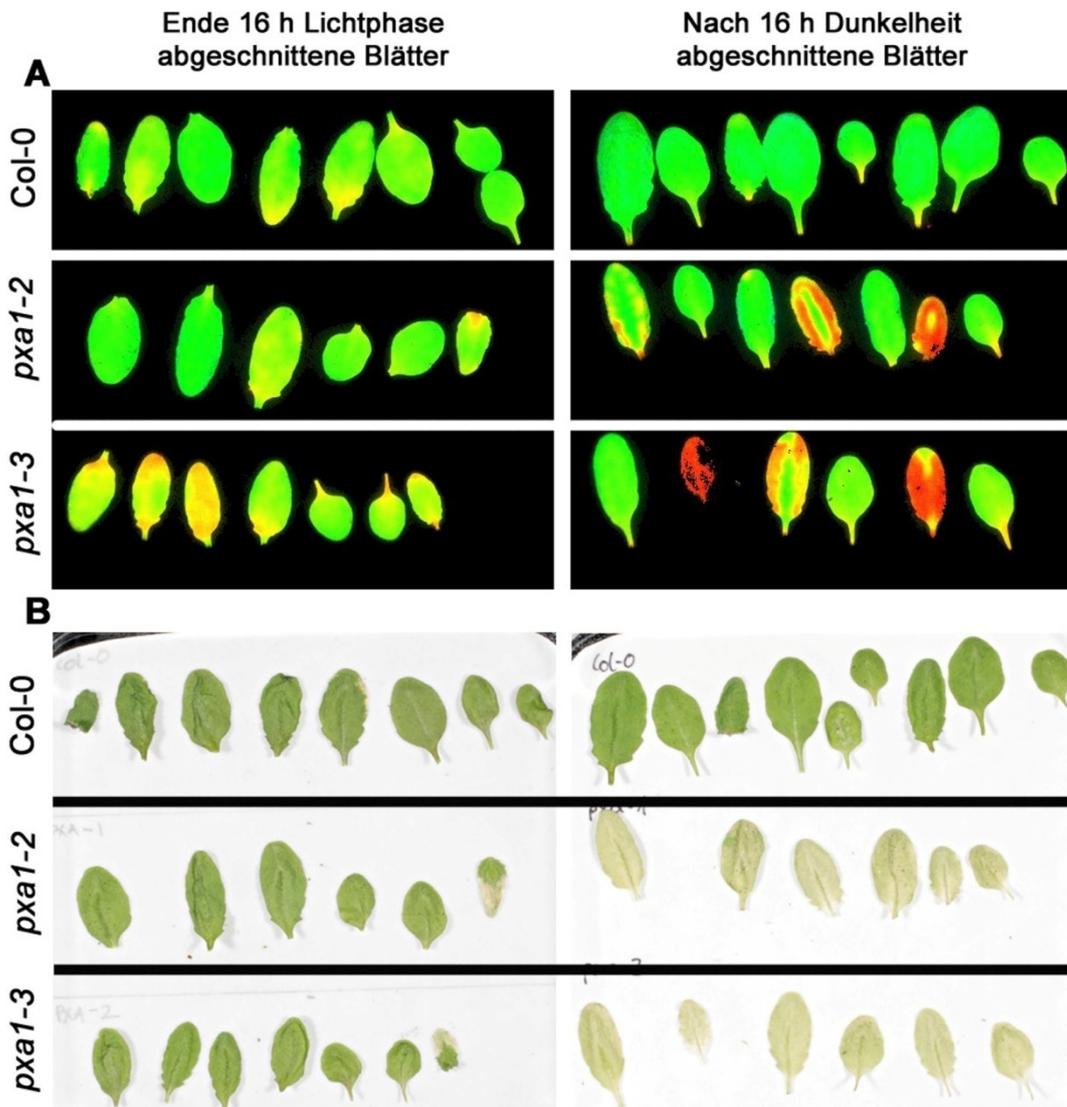


Abb. 30. Auswirkungen auf den Dunkelphänotyp in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blattabtrennung: Von 21 Tage alten, Langtag angezogenen Pflanzen wurden einzelne Blätter entweder am Ende der Lichtphase oder nach 16 h in Dunkelheit entfernt. (A) zeigt Φ PSII des Blattmaterials nach 18 h Dunkelinkubation in einem Fluoreszenzbild der Imaging-PAM. (B) zeigt das identische Pflanzenmaterial aus A, nach 36 h Dunkelinkubation und 12 h Licht.

Einzelne Blätter von 21 Tagen alten, im Langtag angezogenen Pflanzen wurden entweder am Ende einer normalen 16 h Lichtphase entfernt und dunkelinkubiert oder für weitere 16 h in Dunkelheit an der Pflanze belassen und erst dann entfernt. Nach insgesamt 18 h Nachtphase wurde mit der Imaging-PAM eine Induktionskurve des Materials gemessen. In Abb. 30A ist ein hieraus resultierendes Fluoreszenzbild dargestellt. Im Vergleich wurde nun klar, dass es durch den längeren Verbleib der Einzelblätter am Sinkgewebe gelang denselben Phänotyp zu induzieren, der stets

auf Erde zu beobachten war. Einzelne Blätter beider *pxa1* Linien zeigten einen Trend zu deutlich reduzierten Φ PSII Werten. Um den gewebeletalen Phänotyp auch an den abgeschnittenen Blättern zu induzieren, wurde das Experiment fortgesetzt und das Material für weitere 18 h im Nachtmodus, gefolgt von einer 12 h Dauerlichtphase, belassen. Das Resultat ist in Abb. 30B zu betrachten. Während an Blättern, die am Ende der Lichtphase entfernt wurden, erneut kaum visuelle Schädigungen auftraten, waren nun in den für 16 h an intakten Pflanzen belassenen Blättern dieselben dramatischen Gewebeschädigungen zu beobachten, wie in intakten *pxa1* Pflanzen auf Erde nach 36 h Dunkelheit.

Bei genauer Betrachtung konnten interessanterweise auch geringe Schädigungen an den äußerst jungen Blättern, die am Ende der Lichtphase getrennt wurden, beobachtet werden. Möglicherweise war aufgrund des frühen Entwicklungsstatus ihre Photosyntheseleistung geringer, was in einem geringeren Stärkegehalt resultierte. Denkbar wäre jedoch auch der Umkehrschluss, nämlich das ihre Stoffwechselrate und damit der Stärketurnover deutlich höher verglichen zu älterem Gewebe war.

3.10.3 Zellulärer Energiestatus ATP/ADP

Geht man davon aus, dass der Gehalt an Zuckern, die aus dem Stärkeabbau frei werden, mit fortschreitender Dunkelinkubation abnimmt, stellt sich die Frage, welche Auswirkungen dies auf den ATP/ADP-Pool der Zelle hatte. Das Vorhandensein von ausreichenden Mengen von ATP ist essentiell für das Überleben der Zelle. Bei Abwesenheit der Photosynthese produzieren Pflanzen ATP vornehmlich durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien (Heldt und Piechulla 2008). Hierzu bedarf es jedoch verwertbarer Verbindungen für den Citratzyklus, der die notwendige reduktive Kraft generiert. Als solche Verbindungen bieten sich neben Aminosäuren vor allem organische Säuren an. Um Einblick in die Entwicklung des zellulären Energiestatus während verlängerter Dunkelphasen zu bekommen, sollte daher das Verhältnis von ATP zu ADP im Wildtyp sowie den *pxa1* Mutanten bestimmt werden.

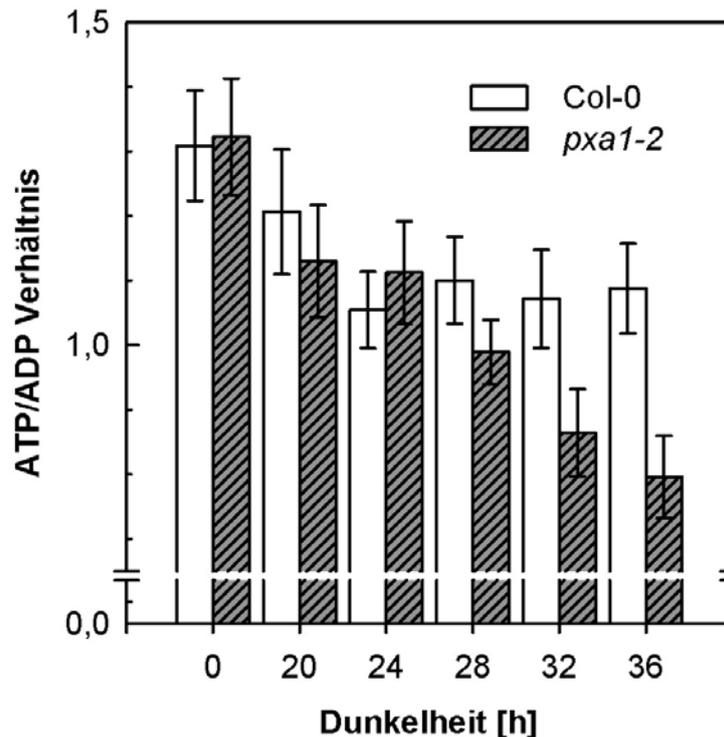


Abb. 31. ATP/ADP-Verhältnis im Verlauf einer 36 h Nachtphase: Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen wurden im Langtag angezogen und im Alter von 21 Tagen einer 36 h Dunkelinkubation bei 24°C ausgesetzt. Als Nullwert wurde Material am Ende einer 16 h Lichtphase gesammelt, ab einer Dauer von 20 h alle 4 h.

Drei Wochen altes Pflanzenmaterial wurde bei 24°C einer 36 h Dunkelinkubation exponiert. Als Nullwert diente am Tagesende geerntetes Material. Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde ab einer Dauer von 20 h Dunkelheit, alle 4 h Blattmaterial gesammelt. Nach Extraktion und Derivatisierung der Proben folgte die Auftrennung der Nukleotide mithilfe einer HPLC. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmethode.

Am Ende eines normalen Langtags war das Verhältnis mit 1.4 in Wildtyp und *pxa1-2* zunächst identisch. Nach 20 h beziehungsweise 24 h sank dieser Wert und schwankte in beiden Linien zwischen 1.1 bis 1.2. Im weiteren Verlauf der Dunkelinkubation konnte jedoch eine fortschreitende Abnahme in den *pxa1-2* Mutanten verzeichnet werden. Nach 28 h betrug der Wert in etwa 1, zu den späteren Zeitpunkten 32 h und 36 h jedoch nur noch 0.9 beziehungsweise 0.8. Hingegen stabilisierte sich das ATP/ADP-Verhältnis im Wildtyp und blieb auch im weiteren Verlauf des Experimentes konstant bei circa 1.1.

Es bleibt festzuhalten, dass in *pxa1-2* eine Korrelation zwischen fortschreitender Dunkelinkubation und stetig geringeren Mengen an regeneriertem, energiereichem ATP gezeigt werden konnte.

3.10.4 Saccharose- Fütterung verringert die Dunkelschädigung

Fettspeichernde Pflanzen mit ihrem charakteristisch hohen Ölanteil in den Samen beziehen den Großteil der notwendigen Energie für die Keimung und Keimlingsetablierung aus dem Lipidabbau (Levin 1974). Zusätzlich wird in diesem Entwicklungsstadium über den Glyoxylat-Zyklus und die Gluconeogenese aus den Abbauprodukten der Fettverbrennung Zucker aufgebaut (Graham 2008).

Wie bereits in der Einleitung unter 1.5 beschrieben, wird die Keimfähigkeit und die Keimlingsetablierung in *A. thaliana* Mutanten durch eine Blockade der β -Oxidation stark reduziert oder sogar vollkommen unmöglich (Penfield et al. 2007). An einer Reihe solcher β -Oxidations-defizienten Mutanten wurde jedoch gezeigt, dass diese Blockade der Keimlingsetablierung durch die exogene Fütterung von Saccharose umgangen werden kann (Pinfield-Wells et al. 2005). Die *pxa1* Mutante zählt zu diesen Mutanten, bei denen durch Zuckergabe eine Etablierung des Keimlings erreicht wird (Zolman et al. 2001; Footitt et al. 2002; Hayashi et al. 2002). Es sollte daher überprüft werden, ob auch der Dunkelphänotyp erwachsener *pxa1* Mutanten durch Saccharose-Fütterung aufgehoben werden konnte. Angenommen der Zucker würde nach der Aufnahme durch die Wurzel effektiv in der Pflanze verteilt, könnte er durch die zytosolische Glykolyse, den anschließenden Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung zur ATP-Synthese genutzt werden. Dies könnte die Reduktion des zellulären Energiestatus abschwächen (3.10.3).

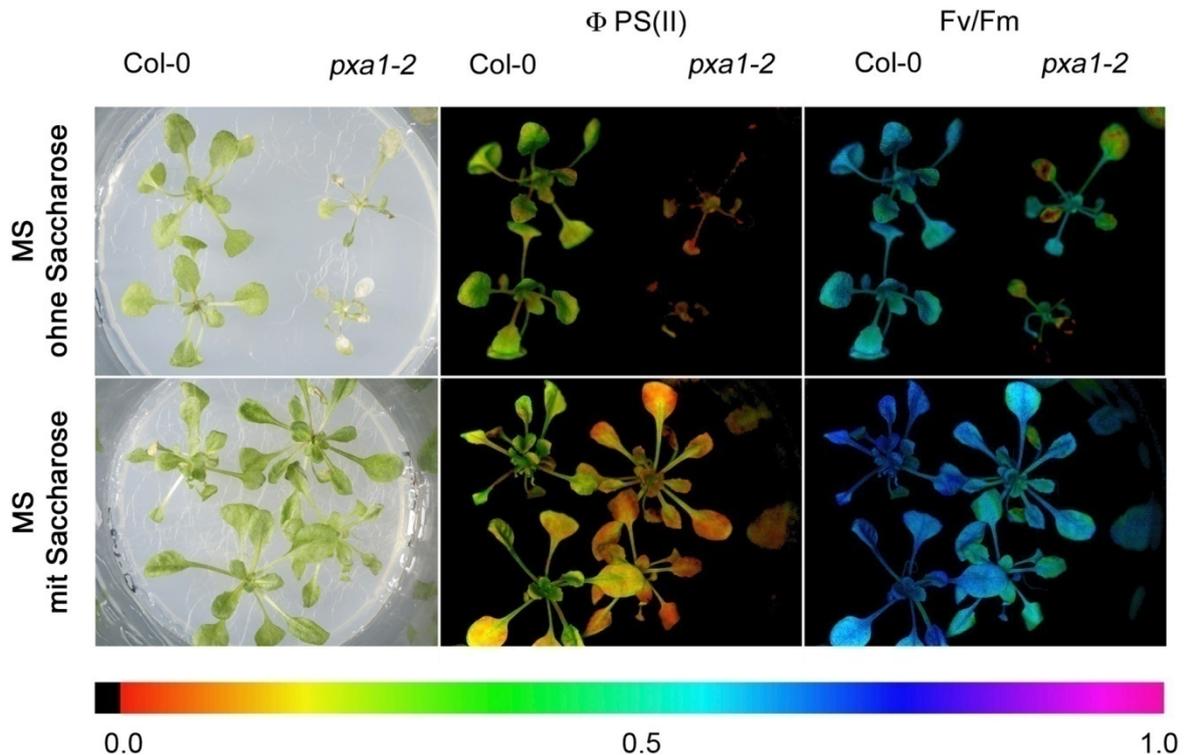


Abb. 32. Effekt von exogener Saccharose-Fütterung auf den *pxa1* Dunkelphänotyp: Nach dem Keimen wurden die Pflanzen entweder auf MS ohne (oben) oder MS mit 2% Saccharose (unten) umgesetzt. Im Alter von 3 Wochen folgte ein 39 h Dunkelexperiment bei 24°C. In der Mitte und rechts sind Φ PSII und Fv/Fm Verhältnis im Fluoreszenzbild der Imaging-PAM nach 39 h dargestellt. Das linke Foto zeigt dieselben Pflanzen nach 39 h Dunkelheit und 24 h im Dauerlicht.

Die Versuchspflanzen wurden nach der Keimung aufgeteilt und steril entweder auf 2% Saccharose MS oder auf zuckerfreies MS Medium umgesetzt. Die weitere Anzucht erfolgte im Langtag. 21 Tage altes Pflanzenmaterial wurde dann einer 39 h Nachtphase bei 24°C exponiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass die hohe Luftfeuchtigkeit in den verwendeten Sterilkulturen den Phänotyp etwas verlangsamte. Nach 39 h Dunkelheit wurde zunächst mit der Imaging-PAM eine Induktionskurve aufgezeichnet. In der Mitte beziehungsweise der rechten Spalte von Abb. 32 sind Φ PSII und Fv/Fm Verhältnis im Fluoreszenzbild dargestellt. Hierbei ließ sich feststellen, dass sich in beiden Fällen bessere Werte durch Saccharose-Fütterungen erzielen ließen. Für Φ PSII war zwar auch ein deutlicher Unterschied im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle auszumachen, jedoch weitaus geringer in Relation zum gemessenen Unterschied von Φ PSII ohne exogenen Zucker. Dieser Trend spiegelte sich schwächer ausgeprägt auch im Fv/Fm Verhältnis wider.

Um zu überprüfen, ob die Zuckerfütterung auch positive Auswirkungen auf die Ausprägung des phototoxischen Phänotyps hatte, wurden die Pflanzen nach der Dunkelinkubation für 24 h im Dauerlicht gehalten und dann dokumentiert. Wie aus

der linken Spalte von Abb. 32 hervorgeht, konnte eine deutlich geringere Gewebeschädigung durch die Zugabe von Saccharose erzielt werden. Die *pxa1-2* Pflanzen zeigten nur in Randbereichen der Blätter leichte phänotypische Ausprägungen. Vergleicht man hierzu den Ansatz ohne Saccharose, so fällt auf, dass die dramatischen Schädigungen hier zu einer nahezu vollständigen Auflösung des Blattgewebes führten.

3.10.5 Saccharose-Fütterung reduziert die Anreicherung freier Fettsäuren während der Dunkelheit

Da die Saccharose-Fütterung zu einer Reduktion der phänotypischen Merkmale in den *pxa1* Mutanten führte, sollte überprüft werden, ob dieses Phänomen von einer geringeren Anreicherung der freien Fettsäuren während einer verlängerten Dunkelphase begleitet wurde.

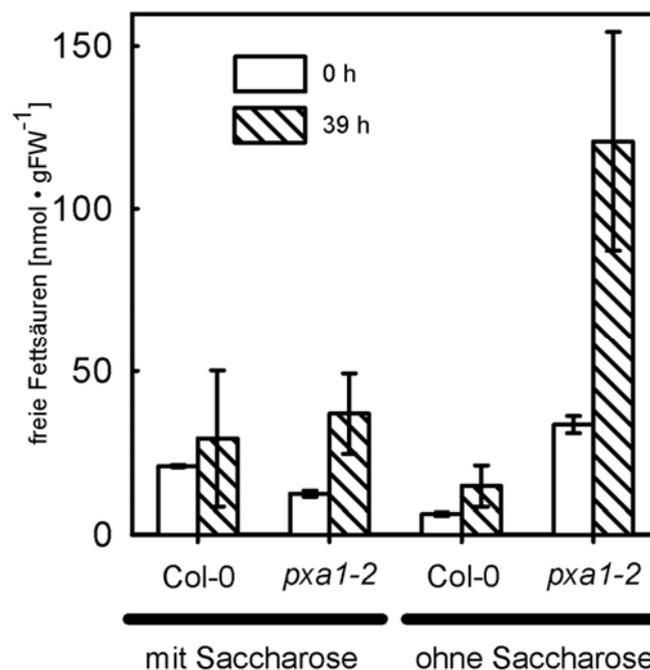


Abb. 33. Anstau freier Fettsäuren in Abhängigkeit von exogener Saccharose: Nach der Keimung wurden die jungen Pflanzen entweder auf MS mit 2% oder ohne Saccharose umgesetzt. Im Alter von 3 Wochen folgte ein 39 h Dunkelexperiment bei 24°C. Nach angegebener Zeit wurde das Blattmaterial geerntet und die Summe der freien Fettsäuren gemessen.

Identisch wie in 3.10.4 beschrieben wurden gekeimte Pflanzen auf MS Medium mit 2% oder ohne Saccharose umgesetzt. Nach 21 Tagen weiterer Anzucht im Langtag wurden die Pflanzen für eine Dauer von 39 h bei 24°C dunkelinkubiert, im Dunkeln das Blattmaterial geerntet und nach Extraktion und Derivatisierung die Menge an freien Fettsäuren bestimmt.

Das Ergebnis zeigte einen deutlichen Anstieg der Summe an freien Fettsäuren in *pxa1-2* nach 39 h Dunkelheit, sofern keine Saccharose im Medium vorhanden war (Abb. 33). Unter diesen Bedingungen betrug ihre Konzentration circa $120 \text{ nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ und war somit circa dreifach höher als in Blättern der korrespondierenden Kontrolle mit Zucker zum selben Zeitpunkt. Die Fettsäuremessungen deckten sich also mit den phänotypischen Beobachtungen aus 3.10.4 und unterstützten erneut die Hypothese der freien Fettsäuren als maßgeblichen Auslöser des Dunkelphänotyps in *pxa1* Mutanten.

3.11 Generierung und Analyse von stärkefreien *pxa1* Doppelmutanten

Die Stärkesynthese von *A. thaliana* besitzt zwei verschiedene sogenannte Flaschenhalsreaktionen in sequentieller Folge; erstens die Glucose-6-Phosphatisomerase (PGI) und zweitens die Glucose-6-Phosphatmutase (PGM) (Heldt und Piechulla 2008). Beide Enzyme werden jeweils von nur einem Genlocus kodiert. Zusätzlich folgt hierauf die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (ADG) Reaktion, die von einem heteromeren Proteinkomplex, bestehend aus zwei Untereinheiten, katalysiert wird. Mutationen dieser Loci können daher zur Inaktivierung des gesamten Synthesewegs führen, was zu stärkefreien Pflanzen führt.

Bereits eine Vielzahl unterschiedlicher stärkefreier Mutanten wurden in unabhängigen Forward-Genetic-Screens isoliert (Lin et al. 1988; Kofler et al. 2000; Yu et al. 2000). In ihren Blättern konnten jeweils lediglich marginale Level an Reststärke um 0,3% gemessen werden (Fritzius et al. 2001). Interessanterweise wurden bereits verschiedene Untersuchungsreihen mit stärkefreien Mutanten in verlängerten Nachtphasen durchgeführt, um zu klären, wovon sie sich alternativ ernähren, sofern keine Photosynthese möglich ist (Gibon et al. 2004; Usadel et al. 2008). Abgesehen von verminderten Wachstumsraten zeigte keine der untersuchten Linien hierbei phänotypische Auffälligkeiten.

Ein Beispiel für eine stärkefreie Pflanze ist die *adg1-1* Mutante. Sie trägt eine Punktmutation in der kleinen, katalytischen Untereinheit der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, durch die der gesamte Proteinkomplex inaktiviert und die Stärkebildung inhibiert wird (Lin et al. 1988).

Diese Mutante sollte als genetischer Hintergrund genutzt werden, um zu überprüfen, ob die β -Oxidation von Fettsäuren in adulten Pflanzen tatsächlich an den

Stärkemetabolismus gekoppelt ist. Deshalb sollten Doppelmutanten zwischen *adg1-1* und *pxa1-2* generiert und anschließend studiert werden.

Hierzu bieten sich prinzipiell zwei Möglichkeiten an. Die erste ist eine Kreuzung mit beiden Mutanten durchzuführen, die zweite nutzt die Möglichkeit durch artifizielle mikroRNA (amiRNA) spezifisch den Transskriptgehalt eines gewünschten Gens zu reduzieren. Beide Techniken beinhalten Vor- und Nachteile, die es gegeneinander abzuwägen gilt. So bringt zum Beispiel die Arbeit mit gekreuzten Doppelmutanten Vorteile, da der Transskriptgehalt im Falle von „Knock-Out“-Mutanten permanent auf null bleibt. Ein Nachteil stellt jedoch die lange Wartezeit dar. Um nach der Kreuzung Doppelmutanten isolieren zu können, benötigt es mindestens drei Generationen mit entsprechenden Vegetationsphasen.

Die zweite relativ junge Technologie der artifiziellen mikroRNA verursacht durch spezifischen, permanenten Abbau einer gewünschten mRNA das sogenannte Gene-Silencing. Im Effekt vergleichbare Methoden wie zum Beispiel Sense, Antisense und RNAi existierten bereits längere Zeit, jedoch wird vermutet, dass sie ein geringes Maß an Spezifitäten und Kontinuität in Bezug auf ihre Zielgene aufweisen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sich Doppelmutanten sehr zeitnah durch Transformation des gewünschten genetischen Hintergrunds erzeugen lassen. Ob der Gene-Silencing-Effekt über mehrere Generationen stabil bleibt, ist jedoch bis dato noch nicht restlos geklärt (Schwab et al. 2006).

Sowohl die Kreuzung der *adg1-1* und *pxa1-2* Mutanten als auch die Generierung der artifiziellen mikroRNA gegen die *PXA1* mRNA wurden durchgeführt.

3.11.1 Klonierung des amiRNA *pxa1* Konstrukts

Die Sequenz der artifiziellen mikroRNA gegen *PXA1* wurde gemäß den Instruktionen des Online-Tools der Webseite Weigel-World erstellt (<http://wmd3.weigelworld.org>).

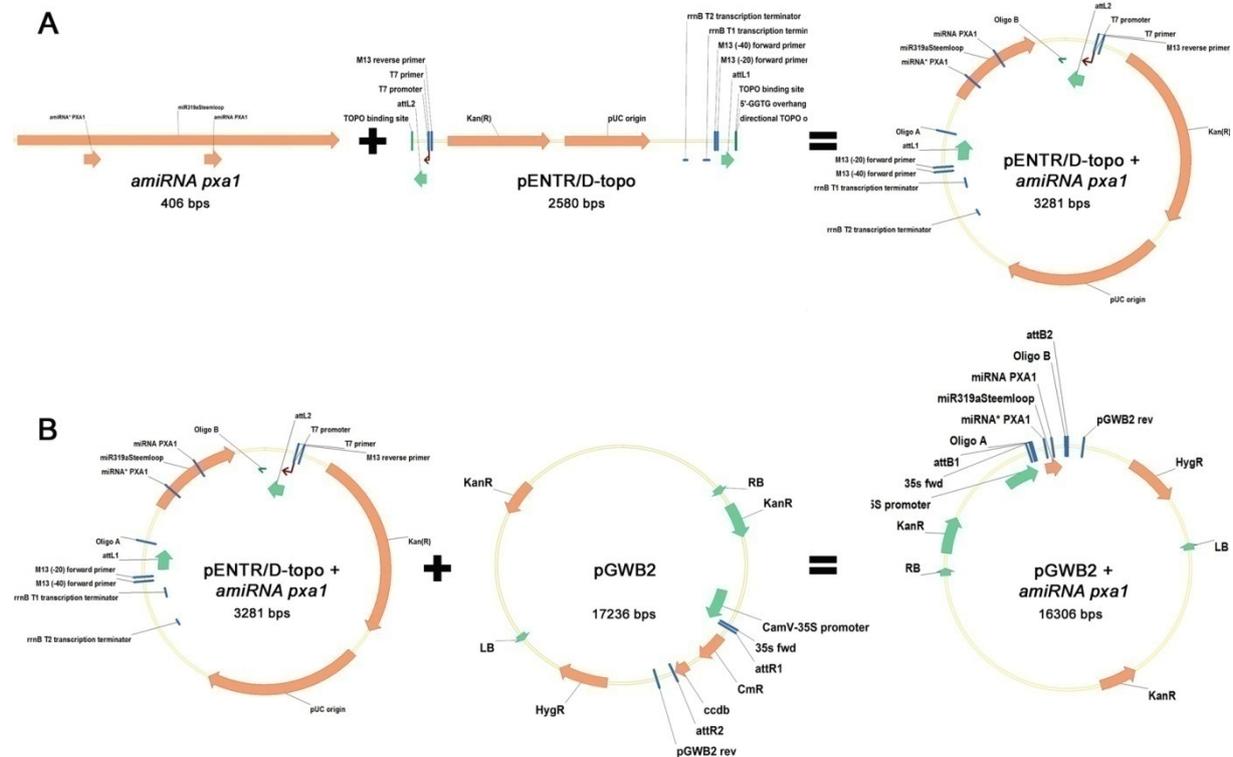


Abb. 34. Klonierungsstrategie zur Herstellung des amiRNA *pxa1* Expressionsklons: (A) Topo-Reaktion mit dem amiRNA *pxa1* PCR-Produkt und pENTR/D-topo zur Herstellung des Entry-Klons. (B) Gateway L/R-Reaktion unter Verwendung des aus A resultierenden Entry-Klons und des Destination-Vektor pGWB2 zur Herstellung des finalen amiRNA *pxa1* Expressionsklons.

Mit Hilfe der notwendigen Primer wurde zunächst, wie in der Literatur beschrieben (Schwab et al. 2006) das in Abb. 34A gezeigte amiRNA *pxa1* PCR-Produkt erstellt. Mithilfe einer Topo-Reaktion wurde der Entry-Klon pENTR/D-topo + amiRNA *pxa1* generiert. Dieses Plasmid wurde zusammen mit pGWB2 (Nakagawa et al. 2007) in einer Gateway-L/R-Reaktion genutzt, um den Expressions-Klon pGWB2 + amiRNA *pxa1* herzustellen. pGWB2 vermittelte die Expression der amiRNA *pxa1* unter der Kontrolle des Cauliflower Mosaik Virus 35S Promotors, was zu einer starken Expression in allen Geweben und Entwicklungsstadien führte.

Das Expressions-Plasmid wurde zunächst in kompetente *A. tumefaciens* Zellen des Stammes GV3101 transformiert. Resultierende Klone wurden für die Pflanzentransformation benutzt. Das Konstrukt wurde in zwei verschiedene genetische Hintergründe gebracht, in den bereits in 3.11 erwähnten stärkerfreien *adg1-1* Hintergrund und den Wildtyp Col-0, der als funktionelle Kontrolle diente.

3.11.2 Verhalten der Doppelmutanten im Dunkelexperiment

Positiv generierte Mutanten konnten durch die Hygromycin- oder Kanamycin-Resistenz, vermittelt durch den verwendeten pGWB2 Vektor, isoliert werden. Da zunächst unklar war, welche Auswirkung eine Reduktion der β -Oxidation im stärkefreien Hintergrund haben würde, wurde die Selektion im Dauerlicht durchgeführt. Vorexperimente der amiRNA *pxa1* Einzelmutante hatten gezeigt, dass sich der Phänotyp mit vergleichbarer Intensität wie in den beiden T-DNA Insertionsmutanten *pxa1-2* und *pxa1-3* nach 36 h Dunkelheit bei 24°C einstellte (Daten nicht gezeigt).

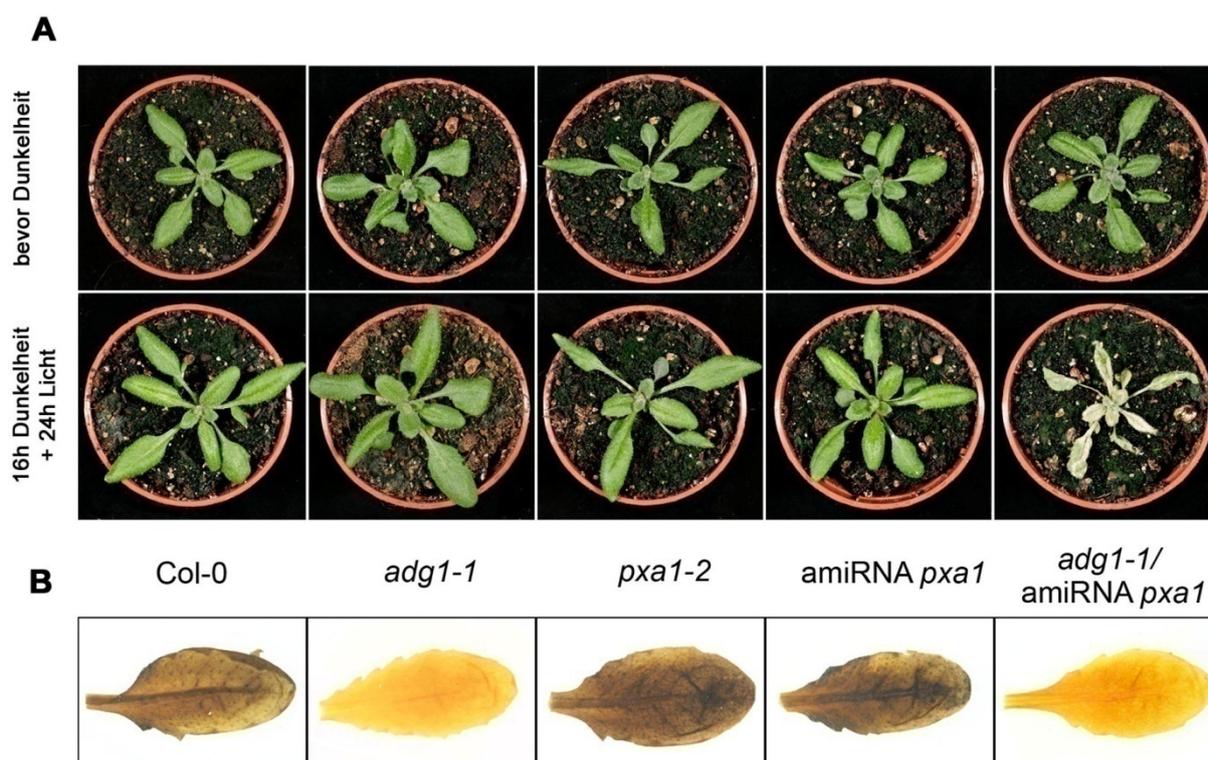


Abb. 35. Dunkelexperiment mit *adg1-1/amiRNA pxa1* Doppelmutanten und Kontrollmutanten: (A) 19Tage alte, im Dauerlicht angezogene Pflanzen wurden bei 24°C für 16 h einer Dunkelphase ausgesetzt und im Anschluss für 24 h im Dauerlicht gehalten. (B) vor Beginn des Dunkelexperiments erfolgte eine Stärkefärbung in Einzelblättern aller gezeigten Mutanten im Dauerlicht.

Vor der Durchführung des Dunkelexperiments wurden zunächst Einzelblätter aller Mutanten sowie der Wildtyp-Kontrolle im Dauerlicht geerntet und einer Stärkefärbung unterzogen. Anhand der dunklen Färbung konnte gezeigt werden, dass durch die kontinuierliche Beleuchtung große Mengen an Blattstärke gebildet wurden. Deutlich erkennbar war im Gegensatz dazu die völlige Abwesenheit von Stärke in Blättern der *adg1-1* Einzelmutante sowie in der *adg1-1/amiRNA pxa1* Doppelmutante.

Im Anschluss an die Stärkefärbung wurde ein Dunkelexperiment mit 19 Tage alten Pflanzen durchgeführt. Weil es sich um eine Dauerlicht-Anzucht handelte, wurden

etwas jüngere Pflanzen verwendet, die dementsprechend früher entwickelt waren. Im Verlauf des Experiments wurden alle 4 h Kontrollmessungen mit der Imaging-PAM durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Als bereits nach 16 h Dunkelheit in der *adg1-1/amiRNA pxa1* Doppelmutante keine Aktivierung des Photosystems II mehr gemessen werden konnte, wurde zur 24 h Dauerlichtphase gewechselt. Wie in Abb. 35A gezeigt, war deutlich erkennbar, dass alle Einzelmutanten sowie der Wildtyp Col-0 die gewählten Bedingungen phänotypfrei überstanden. Im Gegensatz dazu wies die Doppelmutante durch die 16 h Dunkelphase verursachte, letale Schädigungen auf. Die Dramatik der phänotypischen Ausprägung in der Doppelmutante muss vor allem unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Anzucht von *pxa1* Einzelmutanten im Dauerlicht normalerweise, wie in Abb. 8 gezeigt, zu einer starken zeitlichen Verzögerung des Dunkelphänotyps führt, wodurch sie problemlos auch 36 h Dunkelheitsphasen überstehen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Größe des zellulären Stärkepools und der Notwendigkeit zur β -Oxidation von Fettsäuren zur Energiegewinnung pflanzlicher Zellen in Dunkelheit festgestellt werden konnte.

3.11.3 Initiale Beschreibung von Entwicklungsphänotypen in *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutanten

Die nun folgenden Beobachtungen stellen finale, mehrfach bestätigte phänotypische Beobachtungen dar. Aufgrund der verbleibenden Zeit konnten hierzu leider keine statistischen Analysen durchgeführt werden, was jedoch für die nahe Zukunft geplant ist.

3.11.3.1 Wachstumsphänotypen in Abhängigkeit der Anzucht

Um zu untersuchen, ob die Tageslänge zu phänotypischen Veränderungen in der Doppelmutante führte, wurden zwei verschiedene Anzuchtbedingungen getestet. Es sei hier darauf hingewiesen, dass es sich bei der im folgenden dargestellten Doppelmutante stets um die Kreuzung von *adg1-1* und *pxa1-2* EMS beziehungsweise T-DNA Insertionsmutanten handelte, die in der Zwischenzeit erfolgreich isoliert werden konnte.

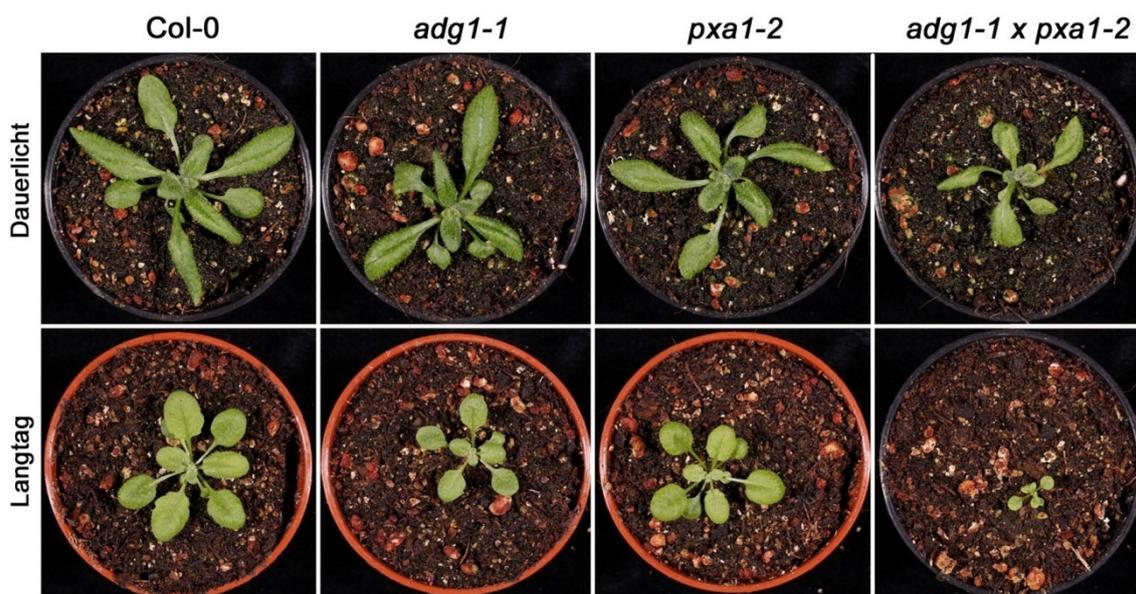


Abb. 36. Wachstumspheänotyp der *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutante in Abhängigkeit der Tageslänge: Die Pflanzen wurden entweder für 21 Tage im Dauerlicht oder unter Langtagbedingungen angezogen.

Die verschiedenen Linien wurden 3 Wochen lang entweder bei Dauerlicht oder im Langtag angezogen und am selben Tag dokumentiert.

Wie in Abb. 36 gezeigt, war der Blattdurchmesser der Doppelmutante bereits im Dauerlicht geringfügig kleiner, wohingegen die stärkefreie Einzelmutante *adg1-1* genau wie die *pxa1-2* Mutante keinen Größenunterschied zum Wildtyp Col-0 aufwies. Dieser im Dauerlicht zu beobachtende Trend verstärkte sich deutlich bei Anzucht im Langtag-Rhythmus. Wie im unteren Teil von Abb. 36 zu sehen, zeigte nun die Doppelmutante ein weitaus geringeres Wachstum, sodass man hier von einem Zwergenphänotyp sprechen konnte. In Übereinstimmung mit Literaturwerten war auch die stärkefreie *adg1-1* Mutante im Langtag etwas kleiner als der Wildtyp (Schneider et al. 2002), dies galt nur marginal für *pxa1-2*. Der Umstand, dass die Kombination aus beiden weitestgehend ähnlich großen Einzelmutanten zu einer so deutlichen additiven Verschlechterung der Wachstumsrate führte, konnte, neben der in 3.11.2 gezeigten Beschleunigung der Dunkelphänotyps, als weiterer guter Hinweis für einen engen Zusammenhang zwischen Stärke- und Fettmetabolismus gewertet werden.

3.11.3.2 Kurzbeschreibung des Primärblütenphänotyps

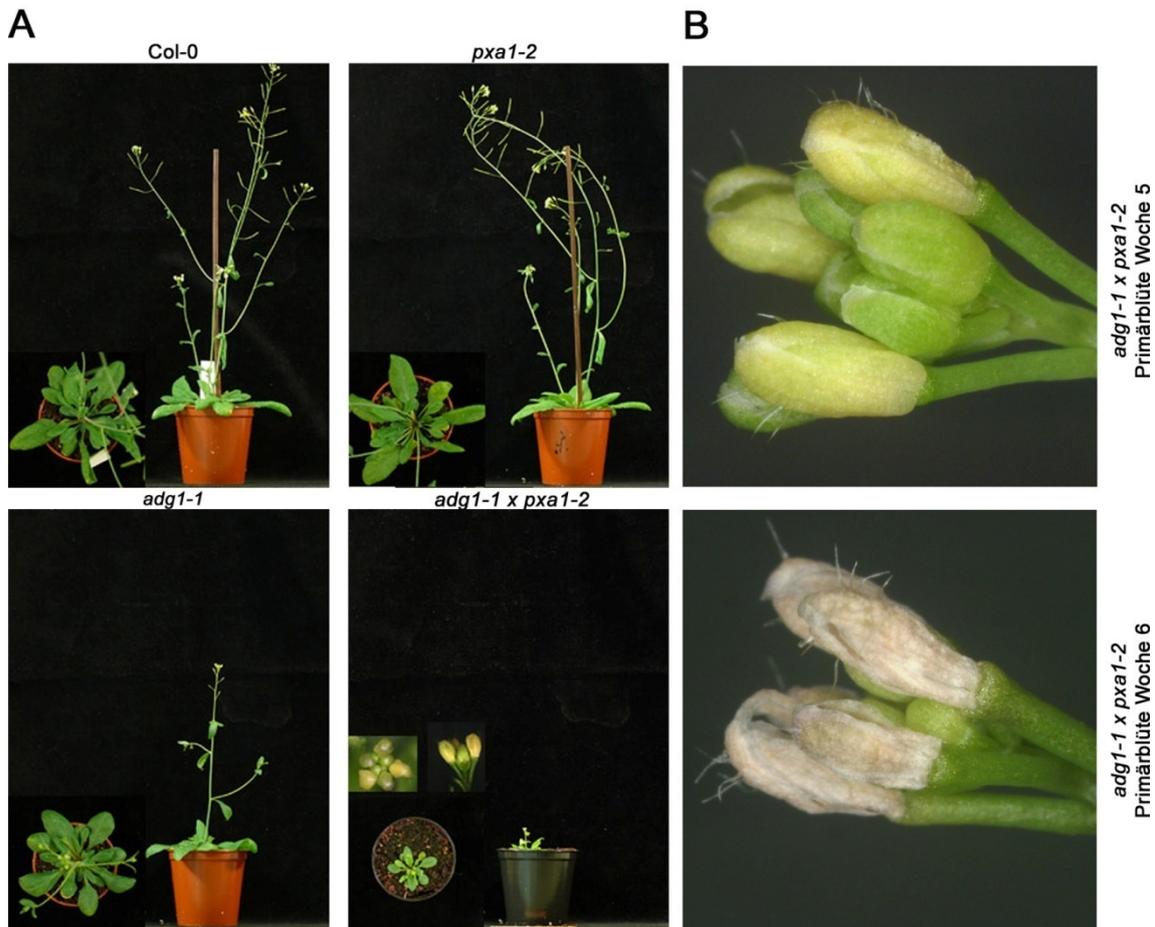


Abb. 37. Blütenentwicklung der *adg1-1 x pxa1-2*: (A) Stark verzögerte Blüte der Doppelmutante nach 5 Wochen Anzucht im Langtag. (B) Detailaufnahme der *adg1-1 x pxa1-2* Primärblüte nach 5 beziehungsweise 6 Wochen.

Im weiteren Verlauf einer Langtaganzucht konnten die *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutanten den Entwicklungsrückstand nicht wettmachen, blieben zwergwüchsig und blühten wesentlich später. Auch *adg1-1* zeigte eine leichte Verzögerung der Blütenbildung im Langtag, verglichen zu den Doppelmutanten jedoch weniger stark ausgeprägt. Dieses Verhalten ist charakteristisch für stärkefreien Mutanten und in der Literatur detailliert beschrieben (Yu et al. 2000). Weitere Veränderungen waren bezüglich der Blattfarbe zu beobachten; *adg1-1 x pxa1-2* Mutanten wiesen im Gegensatz zu Wildtypen und Einzelmutanten gelbgrüne Blätter auf.

Bei genauer Beobachtung der Primärblüten (Abb. 37B) fiel auf, dass sie sich noch vor ihrer Öffnung gelblich verfärbten (Woche 5) und eine Woche später ohne aufzublühen grauweiß verfärbt, ausgetrocknet und abgestorben an der Pflanze zurückblieben. Dieses Verhalten war limitiert auf die Primärblüte, spätere Blüten

hatten ein normales Erscheinungsbild. Dieses Verhalten wurde einheitlich bei allen Kombinationen aus stärkefreien Mutanten (*pgi1-1*, *pgm1-1*, *adg1-1*) und *pxa1-2* beobachtet.

3.11.3.3 Einfluss der Tageslänge auf die Samenbildung

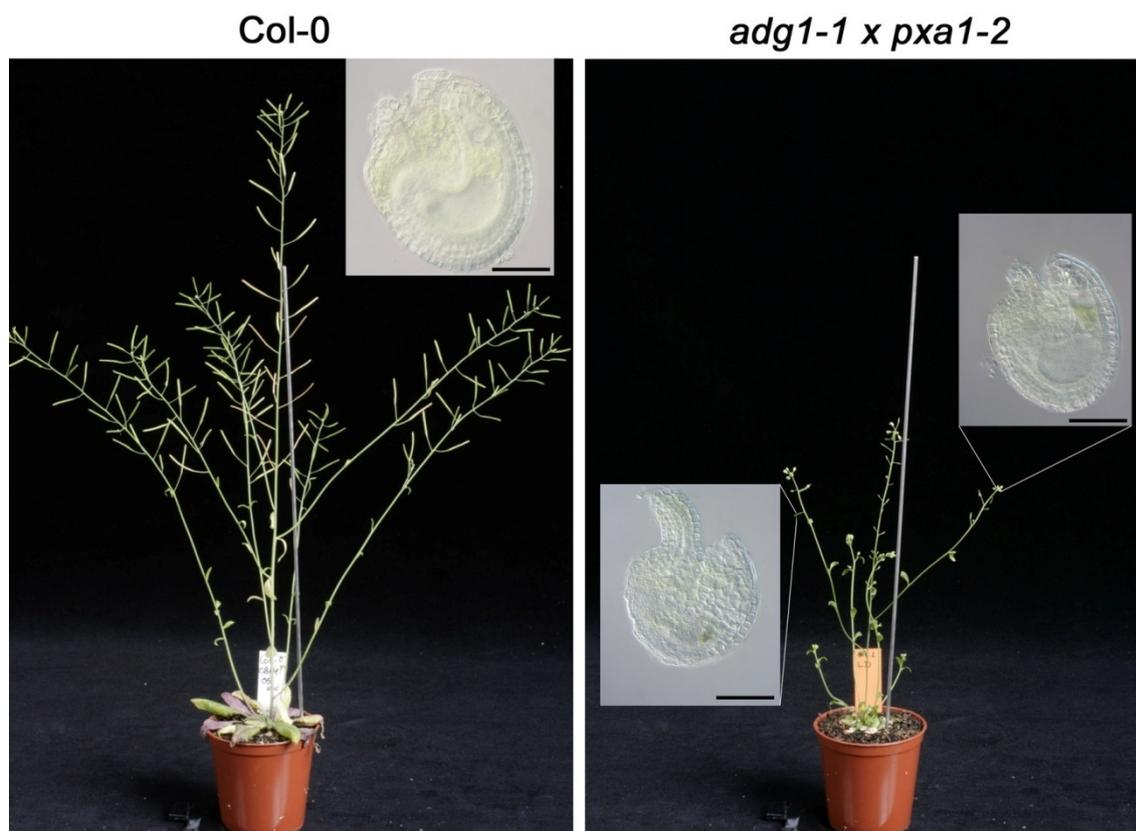


Abb. 38. Die *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutanten können im Langtag keine Samen bilden und besitzen deformierte Ovulen: Col-0 und *adg1-1 x pxa1-2* im Alter von 8 Wochen bei Langtaganzucht. Die Detailansichten zeigen exemplarische Ovulen beider Pflanzen. Balken = 50 μ M

Die in Abb. 38 gezeigten zwergwüchsigen *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutanten wurden bis zur Entwicklung der äußerlich intakten Sekundärblüten (8 Wochen) im Langtag angezogen. Hierbei wurde registriert, dass unter diesen Anzuchtbedingungen keine Samenbildung in der Doppelmutante erfolgte. In den mikroskopischen Abbildungen in Abb. 38 sind exemplarische Ovulen, die weiblichen Gameten von Pflanzen, gezeigt. Die Ovulen der Doppelmutanten waren kleiner und wirkten im Vergleich zu den Wildtypischen deformiert und im Reifeprozess arretiert. Dieser erste Eindruck benötigt jedoch dringend weiterer Untersuchungen.

In allen getesteten Linien der Kombination aus stärkefreien Mutanten (*pgi1-1*, *pgm1-1*, *adg1-1*) und *pxa1-2* waren die charakteristischen, mit Samen gefüllten

Schoten abwesend. Durch den Transfer der Pflanzen in Dauerlicht-Anzuchtbedingungen konnte dies jedoch behoben werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte die detaillierte Untersuchung der β -Oxidation von Fettsäuren in adulten Pflanzengewebe zur Zielsetzung. Obwohl Arraydaten, Transkriptionsanalysen sowie Proteomdaten die Anwesenheit der an diesem Pathway beteiligten Gene beziehungsweise Proteine im Blattgewebe gezeigt hatten (Lin and Wu 2004; van der Graaff et al. 2006; Reumann et al. 2007), konnte bis dato keine wirkliche physiologische Notwendigkeit für diesen Stoffwechselweg, abgesehen von Keimung und Seneszenz, gezeigt werden.

4.1 Ein Defekt in der β -Oxidation ist der Grund für das Auftreten und die Ausprägung des *pxa1* und *kat2* Dunkelphänotyps

Das wichtigste Kohlenhydrat mit zentraler Rolle im pflanzlichen Metabolismus ist die Stärke (Zeeman et al. 2007). Während der Dunkelphasen gewinnen Pflanzen ihre überlebensnotwendige Energie aus dem Abbau der transitorischen Blattstärke (Heldt und Piechulla 2008). Mit Restgehalten von 5-10% ist dieser Pool jedoch bereits am Ende einer 8 h Nacht weitestgehend aufgebraucht (Gibon et al. 2009). Da *A. thaliana* Wildtypen und stärkefreie Mutanten mehrere Tage in völliger Dunkelheit schadlos überstehen (Lin and Wu 2004), muss eine alternative Quelle in den Zellen existieren. Am wahrscheinlichsten sind Proteine, beziehungsweise deren Aminosäuren oder der Katabolismus von Lipiden. Bei der Analyse unabhängiger Arraydaten zum pflanzlichen Verhalten während verlängerten Nachtphasen zeigten Gene des Fettstoffwechsels auffällige Erhöhungen ihres Transkriptionsniveaus (Lin and Wu 2004; Buchanan-Wollaston et al. 2005; van der Graaff et al. 2006). Daher sollte in dieser Arbeit der Fettstoffwechsel auf seine Rolle im Dunkelstoffwechsel, beziehungsweise auf die Relevanz von Lipiden als Stärkealternative untersucht werden.

pxa1 Mutanten besitzen aufgrund einer T-DNA Insertion einen defekten peroxisomalen ABC-Transporter (Abb. 3), der von zentraler Bedeutung für die Funktionalität der β -Oxidation ist (Hayashi et al. 2002). Diese „loss-of-function“-Mutanten sollten daher benutzt werden, um die Konsequenzen eines Ausfalls der zellulären β -Oxidation während verlängerter Nachtphasen zu studieren. Interessanterweise konnten dabei in zwei unabhängigen T-DNA Insertionslinien (*pxa1-2*, *pxa1-3*) dramatische phänotypische Veränderungen in *pxa1* Mutanten festgestellt werden, die bereits nach 36 h Dunkelheit letale Konsequenzen für die

Pflanzen hatten (Abb. 5; Abb. 6). Die Blätter zeigten durchweg grünblaue Verfärbungen und blichen nach Reillumination rapide aus, was zu einer grauen Gewebefärbung führte. Begleitet wurde dieses Phänomen vom Verlust des Zellurgors und Austrocknung sowie Lyse des Blattgewebes (Abb. 6; Abb. 16).

Da die Peroxisomen nicht nur Ort der Fettsäure- β -Oxidation sind, sondern gekoppelt daran, auch die Biosynthese der Phytohormone Jasmonsäure und Auxin beherbergen (Goepfert and Poirier 2007), wurden zur Eingrenzung der phänotypischen Ursache verschiedene Mutanten auf analoges Verhalten in Dunkelheit überprüft. Die OPDA-Reduktase (OPR3) ist ein peroxisomal lokalisiertes Enzym, das nicht in der β -Oxidation von Lipiden partizipiert, jedoch zwingend notwendig zur Jasmonsäuresynthese ist (Baker et al. 2006), weshalb *opr3* Mutanten männlich steril sind (Stintzi and Browse 2000). Die Beobachtung, dass *opr3* Pflanzen keinen Dunkelphänotyp zeigten (Abb. 6), belegte eindeutig, dass Jasmonsäuremangel als Phänotypursache ausgeschlossen werden konnte.

Das zweite in Peroxisomen gebildete Phytohormon IAA kann, wie bereits einleitend in 3.7.4 erwähnt, aus drei verschiedenen Vorstufen gebildet werden: IBA, Tryptophan und indolische Tryptophanvorstufen (Woodward and Bartel 2005). Der letztgenannte tryptophanabhängige Syntheseweg benötigt keine Beteiligung von peroxisomalen Enzymen, sondern ist ausschließlich in den Plastiden und dem Zytosol lokalisiert (Kim et al. 2007). Da die Konzentration dieser alternativen IAA-Vorstufen die IBA Konzentration in *A. thaliana* circa 100fach übersteigt (Woodward and Bartel 2005), ist nur ein geringer Einfluss der β -Oxidation auf den Gesamtgehalt an aktivem Auxin zu erwarten. In Konsistenz dazu konnten in verlängerter Dunkelheit bei der Bestimmung der IAA Konzentrationen in Wildtyp und *pxa1-2* Pflanzen keine signifikanten Unterschiede gemessen werden (Abb. 20). Es ist daher davon auszugehen, dass der Verlust des durch β -Oxidation produzierten Auxin-Anteils, durch die Nutzung der alternativen, im Überfluss vorhandenen Vorstufen kompensiert wurde. Da es zu keiner Zeit zu einem starken Einbruch der IAA-Gehalte kam (Abb. 20), konnte ein Auxin-Mangel ebenfalls als ursächlich ausgeschlossen werden.

Als weitere Mutanten der Fettsäure- β -Oxidation wurden *lac6/7* und *kat2* getestet (Abb. 2). Beide Mutanten zeigen wie *pxa1* eine saccharoseabhängige Keimlingsetablierung (Graham 2008). Wohingegen bei *kat2* Mutanten dieselben, wenngleich auch schwächer ausgeprägten, phänotypischen Merkmale nach 36 h

Dunkelheit (Abb. 6) festgestellt wurden, konnten auch nach längeren Nachtphasen keine ähnlichen Veränderungen in *lacs6/7* Doppelmutanten beobachtet werden.

Dies ist interessant, zeigt es doch, dass die beiden peroxisomalen Aycl-CoA Ligasen, die essentiell während der Keimung für die Aktivierung von langkettigen Fettsäuren sind (Fulda et al. 2004), im späteren Entwicklungsstadium der Pflanzen entweder nicht mehr exprimiert werden oder ihre Funktion aufgrund von Redundanzen durch andere Loki kompensiert werden kann. Expressionsanalysen anhand des Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) zeigten für beide Gene, vor allem für *LACS6*, eine Expression im adulten Blattgewebe. Diese Daten fanden Bestätigung in semiquantitativen PCRs und Northern Blots (Fulda et al. 2002; Shockey et al. 2003). Das Genom von *A. thaliana* besitzt zwar insgesamt neun Loki, die für LACS Proteine kodieren, hiervon sind jedoch laut der Peroxisomen Proteom Datenbank AraPerox (<http://www3.uis.no/araperoxv1/>) nur *LACS6* und *LACS7* in den Peroxisomen lokalisiert. Sie bilden daher einen separaten Cladus im phylogenetischen Baum aller LACS Proteine (Shockey et al. 2002).

Es existiert jedoch eine weitere Genfamilie, die als 4-Coumarat-CoA Ligase ähnliche (4CL-like) bezeichnet wird und für peroxisomale Proteine kodiert. Sie partizipieren durch Aktivierung von OPDA an der Jasmonsäuresynthese (Schneider et al. 2005; Koo et al. 2006), zeigen jedoch auch Aktivität bei der Aktivierung von langkettigen Fettsäuren (Kienow et al. 2008). Die 4CL-like Proteine sind daher mögliche Kandidaten für die beobachtete biochemische Redundanz in *lacs6/7* Mutanten, insbesondere da sich ihre Expressionsmuster im Blatt mit *LACS6* und *LACS7* überschneiden (Kienow et al. 2008).

Das Auftreten derselben phänotypischen Merkmale in *kat2* wie in *pxa1* Mutanten, die stabilen IAA-Level und die Unversehrtheit von *opr3* Mutanten nach verlängerter Dunkelheit identifizierten den Defekt der β -Oxidation als Ursache für die Schädigungen. Während *PXA1* ein „single-copy“ Gen darstellt, sind drei verschiedene KAT Proteine (*KAT1*, *KAT2*, *KAT5*) in Peroxisomen des *A. thaliana* Blattgewebes vorhanden (Carrie et al. 2007; Reumann et al. 2007). Obwohl *KAT1* und *KAT5* nur schwache Expression im Blatt zeigten und die Proteine eventuell ein anderes Substratspektrum aufweisen, ist es durchaus denkbar, dass sie eine leichte Kompensation im Blattgewebe der *kat2* Mutante bewirkten, wodurch der Dunkelphänotyp verglichen zu *pxa1* Pflanzen etwas milder ausfiel (Carrie et al. 2007; Reumann et al. 2007). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung, die zum Zeitpunkt

der Abfassung dieser Arbeit noch nicht vorlag, zeigte dasselbe phänotypische Verhalten von *pxa1* und *kat2* Mutanten für die *acx1/2* Doppelmutante (Abb. 2) (Slocombe et al. 2009). Da ACX1 und ACX2 zentrale β -Oxidations-Enzyme sind, unterstützt dieses Ergebnis die These, dass eine eingeschränkte Fettsäure- β -Oxidation verantwortlich für die in der Dunkelheit auftretenden Schädigungen war.

4.2 Die Ursache des Phänotyps ist ein dramatischer Anstieg von freien Fettsäuren, dominiert von α -Linolensäure

Nach 20 h Dunkelheit waren erste minimale Schädigungen mit dem bloßen Auge an *pxa1* Pflanzen auszumachen (Abb. 9) Durch Chlorophyll a Fluoreszenzmessungen und Bestimmung des Φ PSII Wertes in einer Imaging-PAM konnten hingegen bereits nach 16 h erste Veränderungen am Photosystem II nachgewiesen werden (Abb. 13), die ihren Ursprung in den jungen Blättern der Rosette hatten (Abb. 12). In Konsistenz dazu wurde bei andauernder Dunkelheit in Westernblotanalysen an drei exemplarischen Proteinen (D1, D2 und LHCB2) der fortschreitende Abbau des Photosystem II Komplexes in *pxa1-2* Pflanzen gefunden (Abb. 15).

Zunächst scheint es verwunderlich, dass Defekte in den Peroxisomen zu so schnellen und deutlichen Schädigungen der Chloroplasten, also eines anderen Organells, führen können. Verständlich wird es, bedenkt man, wie spezialisiert einzelne Organellen auf Ana- beziehungsweise Katabolismus der verschiedenen Biomoleküle einer Zelle sind. Zum Beispiel ist in Pflanzenzellen die Fettsäurebiosynthese vornehmlich in den Plastiden lokalisiert (Browse and Somerville 1991; Rawsthorne 2002), wohingegen der Abbau ausschließlich in den Peroxisomen stattfindet (Hiltunen et al. 2009). Als ein weiteres Beispiel sei auch die Photorespiration genannt. Sie benötigt ein koordiniertes Zusammenwirken von drei Organellen, den Plastiden, Peroxisomen und Mitochondrien (Foyer et al. 2009). Viele der Gendefekte dieses Pathways haben verheerende Auswirkungen auf die anderen Organellen. Zwei solcher Mutanten, die hier exemplarisch beschrieben werden sollen, sind *gls1* und *shm1* (Coschigano et al. 1998; Voll et al. 2006). Beide wurden in Screenings isoliert und zeigen die Charakteristika Photorespirations-defizienter Mutanten. Sie können unter normalen CO₂ Konzentrationen kaum überleben und haben aufgrund ihres geringen Chlorophyllgehalts ein chlorotisches Erscheinungsbild (Coschigano et al. 1998). Die *gls1* Mutante weist eine Mutation von *GLU1* auf. Dieser Locus kodiert für eine Ferredoxin-abhängige Glutamat Synthase (Fd-GOGAT) (Coschigano et al. 1998). *shm1* besitzt einen Gendefekt der mitochondrialen Serine-

Hydroxymethyltransferase (SHMT) (Voll et al. 2006). Kürzlich konnte interessanterweise gezeigt werden, dass GLU1 Proteine sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien importiert werden. In den Mitochondrien wiederum interagiert GLU1 mit SHM1, welches ohne diese Interaktion inaktiv ist (Jamai et al. 2009). Dies zeigte, dass die geringen Chlorophyllkonzentrationen und die chlorotische Erscheinung der Mutanten durch den Defekt eines mitochondrialen Proteinkomplexes ausgelöst wurden.

Durch das hohe Maß an Spezialisierung der einzelnen Kompartimente und die metabolischen Flüsse die dafür koordiniert zwischen den Organellen ablaufen müssen, können Defekte eines einzelnen Organells also zu weitreichenden Konsequenzen für weitere Kompartimente führen (Lunn 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten unter anderem Schädigungen der Chloroplasten durch den Ausfall eines peroxisomalen Transportproteins beobachtet werden (Abb. 16H). Setzte man *pxa1* Mutanten für 36 h der Dunkelheit aus, traten zusätzlich letale Schädigungen an der gesamten Pflanze auf (Abb. 5).

Die Ursache hierfür war ein Anstieg von freien Fettsäuren, der aufgrund einer Blockade der β -Oxidation in *pxa1* zustande kam (Abb. 17). Verglichen zu den Acyl-CoAs (Abb. 18) und den TAGs (Abb. 19) akkumulierten die freien Fettsäuren bis zu zehnfach stärker in *pxa1* als in Col-0 (Abb. 17). Die Akkumulation wurde mit einem gut 40% Anteil deutlich von der 18:3 Fettsäure dominiert. Während die TAGs oder die wasserlöslichen aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoAs) keine Gefahr für die Zelle darstellen, sind freie Fettsäuren extrem toxisch und werden daher generell nicht in größeren Mengen in gesunden und intakten Pflanzenzellen gefunden (Wang et al. 2000). Zumeist stellen sie eine Art Alarmsignal infolge von Verwundungen dar (Wang et al. 2000). Im Umkehrschluss bedeutet dies, um einen Anstieg freier Fettsäuren zu vermeiden, muss die Pflanze entweder möglichst effektiv für einen Abbau durch β -Oxidation oder für einen Umbau in unschädliche Verbindungen sorgen. Wie jedoch die zuckerabhängigen Keimungsstadien zeigten, ist die β -Oxidation der *pxa1* Mutanten stark beeinträchtigt.

Mithilfe zweier Assays sollte durch exogene Fütterung die Toxizität der 18:3 Fettsäure als Hauptverursacher des Phänotyps näher untersucht werden. Hierzu wurde zunächst ein neues System für einen Assay in intakten Pflanzen etabliert (Abb. 21).

Durch stark retardiertes Wachstum zeigte sich die generelle Toxizität der freien α -Linolensäure, wenn Wildtyp oder Mutanten Pflanzen auf Medium mit freier 18:3 Fettsäure angezogen wurden. Während sich der Wildtyp jedoch mit den widrigen Bedingungen arrangierte und lediglich das Wachstum verlangsamte, zeigte die Mutante, obwohl im Langtag wachsend, weißgraue Gewebeerfärbungen die zu letalen Schädigungen auswuchsen (Abb. 21). Dieses Verhalten ähnelte sehr stark dem Verhalten von *pxa1* im Verlauf eines Dunkelexperiments (Abb. 5). Im Gegensatz dazu waren Col-0 Pflanzen in der Lage durch effektive β -Oxidation den letalen Auswirkungen der exogenen Fettsäure entgegenzuwirken und dadurch ein verlangsamtes Wachstum auf α -Linolensäure-haltigem Medium zu ermöglichen (Abb. 21).

Im zweiten Assay wurden isolierte, intakte Chloroplasten mit freier α -Linolensäure inkubiert. Es wurden aufsteigende Konzentrationen, vergleichbar zu den im Gewebe gemessenen, verwendet. Die Plastiden beider Linien zeigten einheitlich mit aufsteigenden α -Linolensäure-Konzentrationen eine zunehmend reduzierte Elektronentransportrate (Abb. 22).

In Summe betrachtet deuteten der dramatische, zehnfache Anstieg der freien Fettsäuren in den Mutanten, die erhöhte Sensitivität von *pxa1* Pflanzen gegenüber exogener 18:3 Fettsäuren mit ähnlicher phänotypischer Erscheinung wie nach Dunkelheit sowie die negativen Auswirkungen steigender Konzentrationen der Fettsäure auf isolierte Plastiden darauf hin, dass die nach Dunkelheit beobachteten letalen Schädigungen in den *pxa1* Pflanzen, der Abbau von Photosystem II Proteinen sowie der damit einhergehende Verlust von Photosyntheseaktivität durch den Anstau von α -Linolensäure im Blattgewebe hervorgerufen wurde.

Die Ursache dieses Anstiegs war der genetische Defekt der Fettsäure- β -Oxidation in *pxa1* Pflanzen, was einen effektiven Abbau verhinderte.

Diese These findet Betätigung in der wissenschaftlichen Literatur, in der die Toxizität der α -Linolensäure bereits seit Jahrzehnten bekannt ist. So zeigten TEM Bilder isolierter Spinat Chloroplasten, die mit verschiedenen Konzentrationen der 18:3 Fettsäure inkubiert wurden einen vergleichbaren Integritätsverlust des Membransystems, wie er in *pxa1* nach 36 h Dunkelheit (Abb. 16H) beobachtet wurde (Okamoto et al. 1977). Zusätzlich wurden schädigende Effekte von α -Linolensäure auf isolierte Erbsen Thylakoidmembranen gezeigt (Vernotte et al. 1983). Höchstwahrscheinlich liegt die Ursache der Toxizität in dem amphipatischen und

detergensartigen Charakter des Moleküls (Vernotte et al. 1983). Die freie Fettsäure kann sich in Biomembranen einlagern und führt so zu deren Auflösung (Lockshon et al. 2007). Zusätzlich kann sie durch die drei Doppelbindungen leicht peroxidiert werden, was in der Bildung zellschädigender Radikale resultiert (Barclay and McKersie 1994).

4.3 Die während der Dunkelheit in *pxa1* akkumulierenden Neutralfette unterscheiden sich von den TAGs der Samen

Bei Betrachtung der *pxa1-2* Chloroplasten nach 36 h Dunkelheit im transmissionsmikroskopischen Bild wurden neben dem völligen Integritätsverlust der Envelop- und Thylakoidmembranen, eine Vielzahl von Lipidtröpfchen beziehungsweise Plastoglobuli in den Plastiden beobachtet (Abb. 16H). Wie aus den PAM Messungen bereits gefolgert werden konnte, führte dies zur Inaktivierung des gesamten Organells und der Photosynthese (Abb. 12). In Übereinstimmung damit war keinerlei Stärkeakkumulation in *pxa1-2* Plastiden nach Wiederbeleuchtung zu beobachten (Abb. 16I).

Durch Bestimmung der Triacylglyceride wurde der mikroskopische Eindruck bestätigt. Tatsächlich zeigten die Messwerte, spezifisch für die *pxa1-2* Mutante, einen drastischen Anstieg der TAG Speicherlipide (Abb. 19), die sich in Form von Tröpfchen in den Chloroplasten ansammelten (Abb. 16H). Bei der Detailanalyse der TAGs fiel auf, dass erneut die α -Linolensäure mit 60% den bei weitem größten Anteil dieses Fettpools ausmachte. Am zweithäufigsten konnten 18:2 gefolgt von 16:0 und 16:3 Fettsäuren identifiziert werden. Dies spiegelt im Wesentlichen die normale Zusammensetzung des *A. thaliana* Blattgewebe-Lipidpools wider. Dominierend sind hier 18:3 (47.7%) und 16:0 (17.5%), gefolgt von 18:2 beziehungsweise 16:3 Fettsäuren (14.4 beziehungsweise 11.8%) (Browse et al. 1989; Bonaventure et al. 2003). Aufgrund des unverhältnismäßig hohen Anteils von 16:3, die in anderen Pflanzenarten selten vorkommt, wird *A. thaliana* auch als 16:3 Pflanze bezeichnet. Hierzu zählen auch *Brassica napus* und *Spinacia oleracea* (Heilmann et al. 2004).

Da die 16:3 Fettsäure ausschließlich zu Digalactosyldiacylglycerol oder Monogalactosyldiacylglycerol verestert vorkommt, findet man sie exklusiv als Bestandteil der Thylakoidmembranen (Heilmann et al. 2004). Konsistent dazu sind 16:3 Fettsäuren nur in den Chloroplasten vorzufinden (Browse and Somerville 1994; Bonaventure et al. 2003).

Aus diesem Grund besitzt diese Fettsäure eine gewisse Markerfunktion. Sie deutet darauf hin, dass die in der TAG Fraktion gefundenen Fettsäuren dem Chloroplasten, genauer der Thylakoidmembran von *pxa1* Pflanzen entstammten. Passend dazu wurden die Lipidtröpfchen mikroskopisch eindeutig in den Plastiden lokalisiert (Abb. 16H).

Normalerweise finden sich Triacylglyceride ausschließlich im Samengewebe von *A. thaliana*. Obwohl nach 36 h Dunkelheit in *pxa1* wie in den Samen eine Anhäufung an TAGs gemessen wurde, unterschieden sich die Situationen doch fundamental voneinander (Footitt et al. 2002). Die im Samen vorzufindenden Öl-Körper liegen im Zytosol vor und leiten sich aus dem Kennedy-Pathway des endoplasmatischen Retikulums (ER) ab (Quettier and Eastmond 2009). Der Kennedy-Pathway ist der plastidären Fettsäuresynthese nachgeschaltet und dient zur Modifikation der Lipide. Er wird häufig auch als eukaryotischer Syntheseweg bezeichnet. Die in dieser Arbeit gefundenen TAGs waren jedoch de facto in den Plastiden lokalisiert (Abb. 16H). Zusätzlich enthielten sie 16:3 Fettsäuren, weshalb anzunehmen ist, dass sie aus Thylakoidmembranen gebildet wurden (Abb. 19).

Beim Vergleich der TAG-Kompositionen offenbarten sich weitere Unterschiede. So sind laut Literatur 16:3 Fettsäuren in den Samenspeicherlipiden völlig abwesend (Footitt et al. 2002; Bonaventure et al. 2003; O'Neill et al. 2003). Dafür findet man im Metabolitprofil der Samen zusätzlich längere Fettsäuren mit bis zu 20 Kohlenstoff (O'Neill et al. 2003; Eastmond 2006). Derartige Säuren konnten jedoch nicht in den Neutralfetten nach verlängerten Dunkelphasen gemessen werden (Abb. 19). Es bleibt demnach festzuhalten, dass obwohl es in beiden Fällen, also Samenbildung und den hier behandelten Dunkelexperimenten, zu einer Akkumulation von TAGs kam, deren Ursprung, Komposition und Lokalisation völlig verschieden waren.

Eine kürzlich erschienene Publikation, die einen biotechnologischen Ansatz verfolgte und sich hierbei vor allem auf die Akkumulation der TAGs in dunkelinkubierten *pxa1* Mutanten fokussierte, steht in gutem Einklang mit den in dieser Arbeit gemessenen TAG Daten. Auch in dieser Veröffentlichung wurde die Anwesenheit der 16:3 als Zeichen für eine samenuntypische Neutralfettakkumulation gewertet und die Lipidtröpfchen zweifelsfrei in den Chloroplasten lokalisiert (Slocombe et al. 2009).

Die Analyse der aktivierten Fettsäuren, den Acyl-CoAs, erbrachte ebenfalls in der Summe eine signifikante Zunahme in den Mutanten mit fortschreitender Dauer der Dunkelphasen (Abb. 18).

4.4 Phaeophorbid a, ein Chlorophyllabbauprodukt, führt zu einem phototoxischen Effekt

In der Dunkelheit kam es in *pxa1* Mutanten zu einem massiven Anstieg von freien Fettsäuren (Abb. 17), was Membran-Auflösungsprozesse und starken Gewebeschädigungen zur Folge hatte (Abb. 16H; K). Es konnte jedoch auch ein zweiter Phänotyp beobachtet werden. Nach Rücktransfer der Mutanten ins Dauerlicht wurde ein schnelles Ausbleichen des Blattgewebes dokumentiert (Abb. 5) (<http://www.plantcell.org/content/vol0/issue2009/images/data/tpc.108.064857/DC1/movie.mp4>). Dass Licht für diesen Prozess verantwortlich war, verdeutlichte die halbseitige Abdeckung zum Zeitpunkt der Reillumination mit lichtdichter Aluminiumfolie (Abb. 23). Der geschützte Bereich blieb vom Ausbleicheffekt unbeeinträchtigt.

Die Energie für die Photosynthese wird von den in Lichtsammelkomplexen gebundenen Pigmentmolekülen eingefangen und deren Anregungsenergie an die Reaktionszentren der Photosysteme koordiniert übertragen (Barros and Kühlbrandt 2009). Das mengenmäßig häufigste Pigment in Pflanzen ist die Tetrapyrrolverbindung Chlorophyll (Tanaka and Tanaka 2007). Ungebundenes, freies Chlorophyll sowie dessen Auf- und Abbaustufen sind extrem phototoxisch und bilden Triplettstadien im Licht, die wiederum zu stark reaktiven und zellschädigenden Singulett-Sauerstoffradikalen führen (Tanaka and Tanaka 2007; Barros and Kühlbrandt 2009).

Bei der chromatischen Auftrennung der Pigmentextrakte nach 36 h Dunkelinkubation konnte eine zusätzliche Bande einheitlich in den β -Oxidations-defizienten Mutanten registriert werden (Abb. 24). Die Analyse der photometrischen Eigenschaften sowie deren Massenspektrum identifizierte die akkumulierende Substanz als Phaeophorbid a (Pheide a), ein Chlorophyllabbauprodukt (Abb. 25; Abb. 26; Abb. 27).

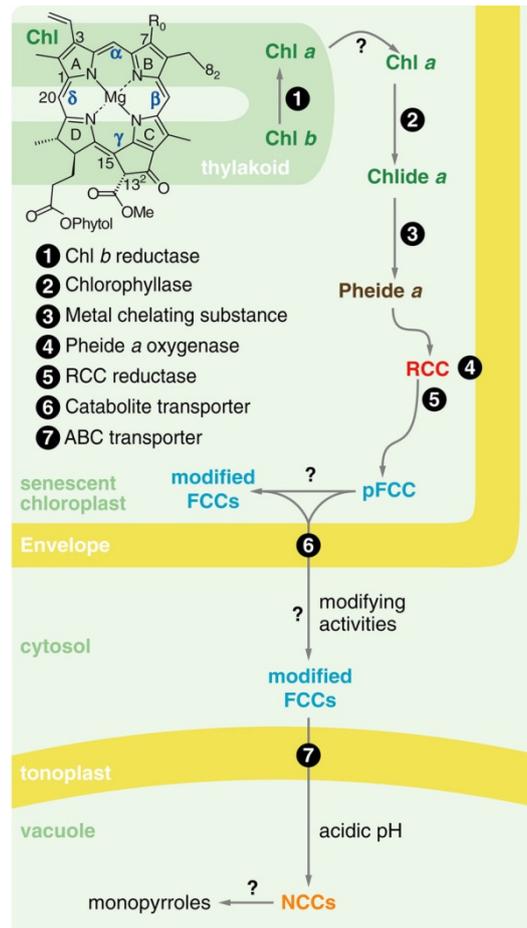


Abb. 39. Schematische Übersicht des Chlorophyllabbaus (Hörtensteiner 2006): Chl, Chlorophyll; RCC, Rotes Chlorophyll Katabolit; pFCC, Blau-fluoreszierendes Zwischenprodukt; NCC, nicht-fluoreszierendes Chlorophyll Katabolit.

In Abb. 39 ist ein schematischer Überblick des Chlorophyllabbauwegs dargestellt (Hörtensteiner 2006). Der Chlorophyllabbau beginnt im Plastid, wo Chlorophyll a durch die Chlorophyllase freigesetzt wird, indem die Phytolseitenkette abgespalten wird. Es folgt die Dechelatierung des Mg²⁺ Zentralatoms. Das entstandene Pheide a ist durch seine Porphyrinringstruktur die letzte grüne Substanz in diesem Prozess. Katalysiert durch die plastidäre Pheide a (Mono)oxxygenase (PAO) wird der Porphyrinring durch Oxygenierung geöffnet, sodass ein rotes Chlorophyllkatabolit entsteht. Eine Reduktase setzt wiederum diese Substanz zu einem blau-fluoreszierenden Zwischenprodukt (pFCC) um, welches aus dem Plastid exportiert und nach unbekannter Modifikation als nicht-fluoreszierendes Chlorophyllkatabolit (NCC) in der Vakuole eingelagert wird (Hörtensteiner 2006).

Mehrere unabhängige Forschergruppen, die am Chlorophyllabbau arbeiten, konnten hierbei Mutanten mit starken Blattschädigungen isolieren, die *lethal leaf spot 1 (lls1)* oder *accelerated cell death 1 (acd1)* benannt wurden (Tanaka et al. 2003; Yang et al.

2004). Das Mapping dieser Mutanten ergab in beiden Fällen einen Gendefekt des PAO Lokus. Diese Mutanten zeigten interessanterweise bei dunkelinduzierter Seneszenz ebenfalls einen massiven Anstau an Phaeophorbid a. Wurden sie erneut dem Licht exponiert, zeigten sie denselben phototoxischen Phänotyp und die Gewebeschädigungen, die sich auch in *pxa1* Mutanten nach Reillumination beobachten ließen (Tanaka et al. 2003; Yang et al. 2004).

Ob der Abbau des Photosystem II Komplexes durch den starken Anstieg der toxischen α -Linolensäure während der Dunkelheit (Abb. 17) direkt induziert wurde oder ob dies eine Folgeerscheinung der von der freien Fettsäure ausgelösten Membranschädigungen war (Abb. 16H), bleibt schwer abzuschätzen. Die Literaturdaten lassen beide Möglichkeiten zu, da einerseits die Lyse der Plastiden, andererseits der Abbau von PS II Proteinen an isolierten Thylakoidmembranen, infolge von α -Linolensäure-Zugabe gezeigt wurde (Okamoto et al. 1977; Lüthy et al. 1986).

Fakt ist, dass in dieser Arbeit durch Westernblotanalysen der Abbau von LHCB2 Proteinen, den Lichtsammelkomplexen des PS II, eindeutig nachgewiesen wurde (Abb. 15). Da die LHCB2 Proteine fast die Hälfte aller Chlorophyllmoleküle pro Zelle binden (Barros and Kuhlbrandt 2009), ist es vorstellbar, dass größere Mengen durch die LHCB2 Degradation freigesetzt wurden. Es wäre daher denkbar, dass dies zu einer Überlastung des Chlorophyllabbaus führte. Hinzukommt, dass die Pheide a (Mono)oxygenase ein redoxabhängiges Enzym ist, welches Redoxkraft in Form von reduziertem Ferredoxin für die Aktivität benötigt (Hörtensteiner et al. 1998). Die Reduktion von Ferredoxin findet im Licht durch die Photosynthese am Photosystem I statt, in Dunkelheit dagegen wird es im oxidativen Pentosephosphatweg (OPPP) gebildet (Hörtensteiner et al. 1998). Erstgenannte Möglichkeit entfiel daher während der Dunkelinkubation. Bedenkt man die massiven Schädigungen der *pxa1-2* Plastiden (Abb. 16), so ist eher unwahrscheinlich, dass komplexe biochemische Abfolgen, wie im oxidativen Pentosephosphatweg notwendig, noch problemlos abliefen. Desweiteren ist anzuzweifeln, ob aufgrund der langen Dunkelheit und des erschöpften Stärkepools noch ausreichend Glucose-6-Phosphat für den OPPP zur Verfügung stand. Es könnte also auch der Mangel an Reduktionsäquivalenten zur Inaktivierung der PAO geführt und somit den Phaeophorbid a Anstau beschleunigt haben.

4.5 Der Dunkelphänotyp von *pxa1* Mutanten ist abhängig vom Stoffwechsel

Bei der Variation der Versuchsbedingungen zeigte sich, dass eine Verdunklung von Einzelblättern an intakten Pflanzen zu keinerlei Schädigungen führten (Abb. 7). Durch die Verdunklung eines einzelnen Blattes werden die biochemischen Verhältnisse im Metabolismus umgekehrt. Da keine Photosynthese mehr möglich ist, wird aus einem Source- ein Sinkgewebe, das wie anderes nichtgrünes Gewebe vom photosynthetisch aktiven Teil der Pflanze mitversorgt wird. Es ist deshalb denkbar, dass die Versorgung der verdunkelten Einzelblätter mit C-Quellen in Form von Saccharose aus den übrigen Blättern dazu führte, dass die phänotypischen Merkmale in der betrachteten Zeitspanne nicht eintraten. Aufgrund dieser Beobachtung wurde angenommen, dass der Anstau freier α -Linolensäure (Abb. 17) und somit das Auftreten des Phänotyps abhängig vom Energiestatus des Blattgewebes beziehungsweise vom Stoffwechsel war.

In den folgenden Experimenten konnten weitere Hinweise für die Stoffwechselthese gesammelt werden. Zunächst zeigte sich, dass der Phänotyp einer zeitlichen Kinetik folgte (Abb. 9), je länger eine Lichtquelle und somit neue Energie fehlte, umso stärker und ausgeprägter wurden die Gewebeschädigungen. Desweiteren zeigte sich in Kapitel 3.5.3, dass die Schädigungen temperaturabhängig waren. Die Inkubation von *pxa1-2* Pflanzen in 36 h Dunkelheit führte bei einer Temperaturabsenkung um nur 6°C auf 18°C zu keinen offensichtlichen Gewebeschäden (Abb. 10).

Wie aus dem Postulat von Arrhenius und der Arrhenius-Gleichung hervorgeht, ist die Reaktionsgeschwindigkeit biochemischer Reaktionen, genau wie die normaler chemischer Reaktionen, temperaturabhängig (Blumenthal et al. 2006). Hierbei gilt die Regel, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit v je 10 K Temperaturanstieg verdoppelt bis verdreifacht (Blumenthal et al. 2006). Somit ist klar, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die gesamte Stoffwechselrate eines Organismus hat.

Dementsprechend lässt sich die geringere Schädigung von *pxa1-2* bei 18°C durch eine Absenkung der Stoffwechselrate erklären. Folgerichtig müsste eine Verlängerung der Dunkelperiode auch bei 18°C zu einem zeitlich verzögerten Einsetzen des Phänotyps durch Akkumulation von freier α -Linolensäure führen.

Der Stärkepool ist der zentrale Energiespeicher der Mesophyllzellen und dient beim Abbau in der Dunkelheit als Energiespender. Nach 24 h Dunkelheit ist der Stärkepool vollständig erschöpft (Smith and Stitt 2007). Ab diesem Zeitpunkt müssen die

Pflanzen auf eine andere Quelle für die obligate ATP-Synthese zurückgreifen. Dieses erfolgreiche Umschalten zeigte sich durch ein konstantes ATP/ADP-Verhältnis ab 24 h Nacht im Wildtyp (Abb. 31). Für die *pxa1* Mutante hingegen galt dies nicht. Ab dem Zeitpunkt 28 h Dunkelheit sank das Verhältnis kontinuierlich ab, da immer weniger ATP neu synthetisiert werden konnte (Abb. 31). Während *pxa1* Mutanten daher unter fortschreitendem Energiemangel litten, konnte der Wildtyp mithilfe der β -Oxidation Fettsäuren verbrennen, Citrat zur Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus bereitstellen und so weiterhin in den Mitochondrien ATP durch oxidative Phosphorylierung produzieren (Abb. 31).

In Bezug auf die Größe des Stärkepools der einer Pflanze zur Verfügung steht, ist es interessant, die Ausprägung des *pxa1* Phänotyps unter dem Aspekt der Tageslänge während der Anzucht zu betrachten (3.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Schädigungen von Langtagpflanzen wesentlich dramatischer im Vergleich zu Kurztagpflanzen waren (Abb. 8). Bei Dauerlicht-Anzucht konnten nach 36 h sogar keinerlei Defekte ausgemacht werden (Abb. 8).

Dies mag zunächst verwundern, erwartet man doch einen beschleunigten, dramatischeren Phänotyp bei Kurztagpflanzen, da von einem geringeren Stärkepool auszugehen ist. Bei genauer Betrachtung der Literatur lassen sich die Beobachtungen jedoch erklären. Zwar sind am Tagesende einer Kurztagpflanze (6-8 h Licht) die absoluten Stärkegehalte geringer als am Tagesende einer Langtagpflanze (Abb. 1) (12-16 h Licht) (Lu et al. 2005; Smith and Stitt 2007). Vergleicht man jedoch die Werte am Tagesende einer Kurztagpflanze (6-8 h) mit den korrespondierenden Stärkegehalten von Langtagpflanze nach derselben Dauer im Licht, so sind die Werte der Kurztagpflanze deutlich höher (Abb. 1) (Lu et al. 2005; Smith and Stitt 2007). Folgerichtig bedeutet dies, die Stärkesyntheserate ist umso höher, je kürzer die Tageslänge ist (Lu et al. 2005; Gibon et al. 2009). Im selben Maße wie die Syntheserate steigt, sinkt aber die Abbaurate. Je nach Messung haben Kurztagpflanzen bei doppelt so langen Nächten mit circa 5-10% dieselbe Menge (Abb. 1) (Lu et al. 2005; Smith and Stitt 2007) oder sogar etwas mehr Reststärke als Langtagpflanzen (Gibon et al. 2009).

Ihre niedrigere Stoffwechselrate lässt sie vermutlich im Dunkeln länger erfolgreich überdauern. Sie können ihre Stärkereserven länger und effektiver nutzen. Folgerichtig äußert sich dies, im Falle von im Kurztag angezogenen *pxa1* Mutanten, in weniger stark ausgeprägten Gewebeschädigungen (Abb. 8).

Zieht man hingegen Pflanzen im Dauerlicht an, ist eine weitere Steigerung des Stärkegehalts nicht unwahrscheinlich (Lu et al. 2005). Hierzu existieren jedoch kontroverse Daten, so maßen Lu et al. (2005) mit $150 \mu\text{mol Glc} \cdot \text{gFW}^{-1}$ eine Zunahme des Stärkegehalts um circa $30 \mu\text{mol Glc} \cdot \text{gFW}^{-1}$ im Vergleich von Dauerlicht- zu Langtagbedingungen, wohingegen eine andere Veröffentlichung nur die Hälfte an Stärke verglichen zum Langtag fand (Lin et al. 1988). Zur Abbaurate indes sind keine Daten bekannt. Unter Berücksichtigung der Daten aus erstgenannter Publikation ist darauf zu schließen, dass die permanente Lichtzufuhr zu einem hohen Gehalt an weiteren Kohlenstoffverbindungen in Form von Zuckern, Fetten und Proteinen führte. Ein solch großer Pool an Speicherstoffen könnte dafür gesorgt haben, dass bei Dauerlicht-Anzucht der Mutantenphänotyp erst nach Verlängerung der Dunkelphasen über die standardmäßig verwendeten 36 h auftrat, also erst nachdem alle zusätzlichen Speicherstoffe erschöpft waren (Daten nicht gezeigt).

In den gezeigten Experimenten konnte wiederholt festgestellt werden, dass die zu beobachtenden Schädigungen zuerst in den jüngsten Blättern auftraten (Abb. 9; Abb. 12). Junge, auswachsende Blätter sind in ihrer Ernährungsweise zunächst heterotroph und importieren Saccharose (Shao et al. 2004). Erst nach Durchleben einer sehr komplexen Phase, die als „sink-to-source“-Transition bezeichnet wird, beginnen sie mit Photosynthese (Turgeon 1989). Von da an sind die jungen Blätter allmählich autotroph und tragen zum Export von Assimilaten bei (Turgeon 1989). Dass dies ein zeitlicher Entwicklungsprozess ist, konnte durch Stärkemessungen an verschieden alten Blättern gezeigt werden. Hierbei wurden signifikant geringere Werte in jungen verglichen zu ausgewachsenen Blättern gemessen (Stessman et al. 2002; Shao et al. 2004).

Zusätzlich ist vorstellbar, dass im Wachstum befindliches, sich ausdifferenzierendes Gewebe einen gesteigerten Energiebedarf und dementsprechend höhere Stoffwechselraten aufweist. Passend dazu wurde mit Lugol'schen Färbungen der schnellste Stärkeabbau in jungen Blättern gefunden (Abb. 29). Beides zusammen, also Heterotrophie und höhere Umsatzraten, könnten zu früherer Energieerschöpfung und somit zur frühesten phänotypischen Ausprägung in jungem Blattgewebe geführt haben.

4.6 Exogene Saccharose mildert den Phänotyp ab

Die Messung des ATP/ADP-Pools bei anhaltender Dunkelheit hatte verdeutlicht, dass *pxa1* Mutanten unter fortschreitender Energieverarmung litten (Abb. 31). Die Situation stellte einen echten Teufelskreis dar. Sinn und Zweck der Fettsäureverbrennung sollte die Bereitstellung neuer Energie für die Zelle sein. Durch die defekte β -Oxidation in *pxa1* Mutanten addierten sich jedoch die negativen Effekte, einerseits führten sie zur ATP-Verarmung (Abb. 31), andererseits zur fortschreitenden Vergiftung durch den Anstieg toxischer freier Fettsäuren (Abb. 17).

Der Ausfall der β -Oxidation während der Keimung kann durch exogene Zuckerfütterung kompensiert werden (Graham 2008). Wie anhand von ¹⁴C-markierten Zuckerfütterungen gezeigt wurde, ist *A. thaliana* auch im adulten Stadium in der Lage, exogene Saccharose durch die Wurzel aufzunehmen und in der Pflanze zu verteilen (Furuichi et al. 2001). Es wurde daher überprüft, ob das Auftreten des Phänotyps vermindert, beziehungsweise zeitlich verzögert werden konnte, indem man *pxa1* Mutanten durch Saccharose-Fütterung eine leicht nutzbare Energiequelle zur Verfügung stellte. Tatsächlich konnte eine Reduktion der phänotypischen Ausprägung an *pxa1* Pflanzen auf zuckerhaltigem Medium dokumentiert werden (Abb. 32). Konsistent dazu wurden niedrigere Level an freien Fettsäuren im Blattgewebe der gefütterten Mutanten im Vergleich zu ungefütterten Kontrollen gemessen (Abb. 33).

Die Verfügbarkeit von Saccharose als Energielieferant verzögerte also die Notwendigkeit und somit die Induktion der Fettsäure- β -Oxidation. Der Zucker konnte von den Zellen durch Glykolyse und TCA-Zyklus beziehungsweise oxidativer Phosphorylierung zur ATP-Synthese genutzt werden, sodass es unter diesen Bedingungen erst später zu einem Energiemangel kam.

4.7 Der *pxa1* Dunkelphänotyp – ein Modell

Um die gewonnenen Erkenntnisse in Kontext miteinander zu bringen, wurde ein Modell entwickelt, das eine Übersicht über die Abläufe in Wildtyp und *pxa1* Pflanzen vermitteln soll.

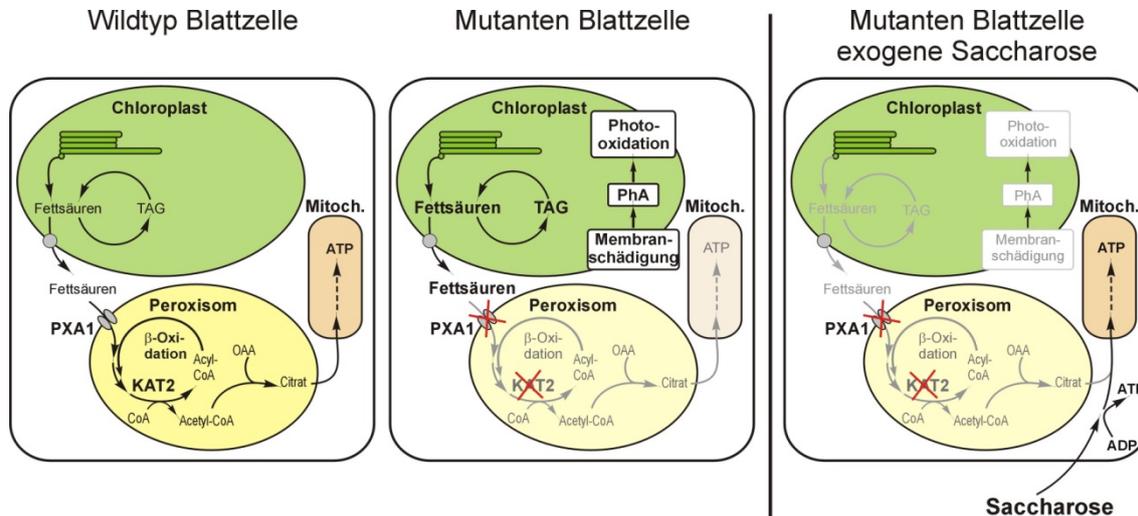


Abb. 40. Modell des zellulären Dunkelstoffwechsels in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen und β -Oxidations-defizienten Mutanten.

Wie aus Abb. 40 hervorgeht, kommt es im Verlauf anhaltender Dunkelheit in den Wildtypzellen zur Freisetzung von Fettsäuren aus den Thylakoidmembranen der Chloroplasten. Diese werden entweder temporär in den TAGs gespeichert oder ins Zytosol freigesetzt. Von hier erfolgt über den ABC-Transporter PXA1 der Import in die Peroxisomen, wo sie durch mehrere Zyklen β -Oxidation in Acetyl-CoA umgesetzt werden. Die C2 Einheiten Acetyl-CoA werden mit Oxalacetat (OAA) zu Citrat umgesetzt. Dieser Reaktionsschritt wird von zwei peroxisomalen Citrat-Synthasen (CSY) katalysiert (Abb. 2) (Pracharoenwattana et al. 2005). Die *csy2/3* Doppelmutante ist β -Oxidations-defizient und kann keine TAGs abbauen, weshalb ihre Keimung von exogener Saccharose zur ATP-Gewinnung abhängig ist (Pracharoenwattana et al. 2005).

Obwohl bis heute der notwendige peroxisomale Citrat-Exporter nicht auf molekularer Ebene identifiziert wurde, geht man davon aus, dass Citrat von den Peroxisomen in die Mitochondrien transportiert wird. Dort wird es in den TCA-Zyklus eingespeist und für die ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung genutzt (Pracharoenwattana et al. 2005). Deshalb gelingt es den Wildtyp-Pflanzen einen konstanten Energiespiegel in langer Dunkelheit aufrechtzuerhalten (Abb. 31).

Vergleicht man dazu in Abb. 40 die Situation in einer Mutantenzelle, so sieht man, dass es im Zuge eines PXA1 beziehungsweise KAT2 Defekts zur Blockade der nachgeschalteten β -Oxidation kommt. Nach den erhaltenen Ergebnissen zu urteilen, setzt die Pflanze offenbar trotzdem Fettsäuren aus den Thylakoidmembranen frei. Dies führt zunächst zur schnellen Anhäufung von TAGs (Abb. 19). Sind die Speicherkapazitäten hiervon erschöpft, steigt zeitversetzt auch die intrazelluläre Konzentration der toxischen, freien Fettsäuren an (Abb. 17). Wie im Mikroskop beobachtet, kommt es hierdurch zu starken Membranschädigungen und zum Abbau von Proteinen des PS II (Abb. 16; Abb. 15). Die LHCs enthalten den Großteil der Chlorophyllpigmente, die daher in großer Menge freigesetzt werden. Durch den ungünstigen Energiestatus und die Zellschädigung fehlt es an Reduktionskraft für die Aktivität der PAO. Die Folge ist ein fortschreitender, massiver Anstau von Phaeophorbid a (Abb. 28). Wird die Pflanze nun wieder Licht ausgesetzt, kommt es zur Anregung der Pheide a Moleküle. Sie benötigen Akzeptoren auf die sie ihre Anregungsenergie übertragen können, was zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie zur Peroxidation von Lipiden führt. Makroskopisch ist dieser Vorgang im schnellen Ausbleichen der Mutantpflanzen zu beobachten (Abb. 23). Füttert man dagegen exogen Saccharose, kann diese zur ATP-Synthese durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung genutzt werden. Dies verbessert den Energiestatus der Zelle und der Abbau der Thylakoidmembranen wird vorerst nicht induziert. Dadurch kann die defekte β -Oxidation länger umgangen werden, der Anstau von freien Fettsäuren bleibt zunächst aus (Abb. 33) und Schädigungen treten nur vermindert auf (Abb. 32).

4.8 Kontext zwischen dem Stärkemetabolismus und der Fettsäure- β -Oxidation

4.8.1 Die Sinkstärke entscheidet über das zeitliche Auftreten des Phänotyps

In Abb. 11 wurde gezeigt, dass am Ende der Lichtphase abgetrennte *pxa1* Einzelblätter im Gegensatz zu intakten *pxa1* Pflanzen nach 36 h Dunkelheit keinerlei Schädigungen aufwiesen. Unter Berücksichtigung der diskutierten Hinweise auf stoffwechselbedingte Gründe für das zeitliche Auftreten des beobachteten phänotypischen Verhaltens, sollte geklärt werden, ob die Anwesenheit des Sinkgewebes in intakten Pflanzen zu einer deutlichen Erniedrigung des Gehalts von Photoassimilaten führte.

Hierzu wurden Stärkefärbungen von Blättern vergleichbarer Entwicklungsstadien in Dunkelheit durchgeführt (Abb. 29). Entweder verweilten sie bis zum Zeitpunkt der Färbung an intakten Pflanzen oder wurden bereits am Ende eines Langtags abgetrennt. Nach 17 h Dunkelheit zeigte sich, dass die Blätter intakter Pflanzen deutlich weniger Reststärke aufwiesen als korrespondierende Einzelblätter. Dieses Verhalten war unabhängig vom genetischen Hintergrund. Wie zu erwarten, entscheidet also die Anwesenheit von nicht grünem Sinkgewebe sehr deutlich über die Stärkeabbaurate in den Sourceblättern. Entfernt man das Sinkgewebe und verringert somit die Sinkstärke, kann der aus der transitorischen Stärke freiwerdende Zucker vollständig für den Stoffwechsel jeder einzelnen Blattzelle genutzt werden. Folgerichtig kann daher jede Zelle effektiver und länger mit ihren Energieressourcen haushalten.

Um diese These zu überprüfen, wurde eine neue Versuchsreihe gestartet. Es sollte getestet werden, ob durch das Abtrennen der Blätter zu einem fortgeschrittenen Dunkelzeitpunkt (16 h), der jedoch noch zu keinen visuellen Schädigungen führte (Abb. 9), der Phänotyp auch in Einzelblättern erzeugt werden konnte (Abb. 30). Der These nach würde das Sinkgewebe den Stärkeabbau und den Zuckerverbrauch in den Sourceblättern an intakten Pflanzen stark beschleunigen. Hierdurch sollte die Notwendigkeit zur Aktivierung der Fettsäure- β -Oxidation zu einem früheren Zeitpunkt entstehen. Tatsächlich gelang es durch diesen Ansatz, wie in Abb. 30 erkennbar, die phänotypischen Merkmale auch in abgetrennten Einzelblättern zu erzeugen.

4.8.2 Doppelmutanten aus stärkefreien Mutanten und *pxa1* zeigen eine Verschlimmerung des Phänotyps

Zur metabolischen Adaption stärkefreier *A. thaliana* Mutanten an verlängerte Nachtphasen wurde in der Vergangenheit bereits eine Vielzahl von Publikationen veröffentlicht. Vor allem die Arbeitsgruppe von Professor Mark Stitt am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie Golm hat sich eingehend mit dieser Thematik beschäftigt und detaillierte metabolische, transkriptionelle und enzymkinetische Daten hierzu erhoben (Gibon et al. 2004; Gibon et al. 2004; Usadel et al. 2008). Obwohl stärkefreie Mutanten bereits wenige Stunden nach Beginn einer Dunkelphase ihren Zuckervorrat nahezu vollständig erschöpft haben, können sie mehrere Tage in Dunkelheit überleben (Caspar et al. 1985; Schneider et al. 2002; Gibon et al. 2004). Sie reagieren auf verlängerte Nachtphasen mit einem Wachstumsstopp, was mit einer Reduktion der Energie- und Stoffwechselbedürfnisse

einhergeht (Sulpice et al. 2009). Die Anpassungsstrategie des Wildtyps ähnelt dem stärkerfreier Mutanten. Sind Wildtyp Pflanzen für mehrere Tage Dunkelheit ausgesetzt, gleichen sich deren metabolische Enzymaktivitäten dem Niveau in Mutanten an (Gibon et al. 2006).

In Bezug auf den Gehalt an Lipiden wurden in diesem Zusammenhang Hinweise gefunden, die eine deutliche Reduktion dieses Pools, sowohl in stärkerfreien Mutanten während normaler Nächte, als auch in Wildtyp Pflanzen bei mehreren Tagen Dunkelheit zeigten (Gibon et al. 2006; Usadel et al. 2008). Die Generierung einer Doppelmutante aus der stärkerfreien *adg1-1* und *pxa1-2*, beziehungsweise eines amiRNA *pxa1* Konstrukts, sollte dazu genutzt werden, diesen Zusammenhang näher zu beleuchten (Abb. 34).

Die isolierten Doppelmutanten zeigten unter Dauerlicht-Anzucht zunächst keinerlei Beeinträchtigung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 35). Wurden sie jedoch einer Dunkelinkubation ausgesetzt, führte dies zu beschleunigtem Auftreten des *pxa1* Phänotyps. Bereits 16 h Nachtphasen bewirkten eine letale Schädigung der Doppelmutante. Ruft man sich die Ergebnisse aus Abb. 8 ins Gedächtnis, ist dies als umso schwerwiegender zu bewerten, da Dauerlicht-Anzucht in *pxa1* Einzelmutanten zu zeitlich verzögerter Letalität verglichen mit Langtag-Anzucht führte. Wurde also der Stärkepool als der primäre Energiepuffer entfernt, musste die Pflanze frühzeitig auf die β -Oxidation von Fetten zurückgreifen, um ihren Energiebedarf zu decken. Dies steht im Einklang mit den in 4.8.1 diskutierten Daten, wonach sich bei Entfernung des Sinkgewebes durch den eingesparten Export ins Phloem die Menge an Photoassimilaten pro Zelle erhöhte. So konnten die Einzelblätter länger auf eine Aktivierung der Fettverbrennung verzichten, was zu einer Verzögerung des Phänotyps führte.

Da im Blattgewebe keine Expression der zentralen Glyoxylat-Zyklus-Gene Malat-Synthase oder Isocitratlyase sowie deren Proteine detektiert wurde (Charlton et al. 2005; Pracharoenwattana et al. 2005; Lingard et al. 2009) und die Aktivität beider Enzyme wenige Tage nach der Keimung verschwindet (Cornah et al. 2004), wird davon ausgegangen, dass der Glyoxylat-Zyklus in adulten *A. thaliana* Pflanzen nicht aktiv ist (Charlton et al. 2005). Deshalb können aus den freiwerdenden C2 Einheiten der Fettverbrennungen keine Zucker aufgebaut werden. Ist die Photosynthese längere Zeit abwesend und der aus Stärkeabbau freiwerdende Zucker verbrannt, dient daher das Acetyl-CoA aus dem Fettabbau zur mitochondrialen ATP-Synthese

durch oxidative Phosphorylierung (Abb. 40). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass *pxa1-2* Einzelmutanten bei fortschreitender Dunkelheit unter zunehmendem ATP-Mangel leiden (Abb. 31).

Dass Chloroplasten während der Nacht auf ATP-Import angewiesen sind und dementsprechend sensitiv auf ATP-Mangel reagieren, konnte durch Studien der *ntt* Doppelmutante gezeigt werden (Reiser et al. 2004; Reinhold et al. 2007). Die Abwesenheit eines funktionellen ATP-Import-Carriers in der Envelopmembran führte in Abhängigkeit von der Nachtlänge zu starker Wachstumsretardierung (Reiser et al. 2004). Interessanterweise zeigte auch die *ntt* Doppelmutante einen Dunkelphänotyp, dessen Ursache jedoch die Inhibition der Chlorophyll-Synthese infolge eines plastidären ATP-Mangels war (Reinhold et al. 2007). Als Folgeerscheinung kam es zum dramatischen Anstau von Protoporphyrin IX, einer phototoxischen Chlorophyll-Vorstufe (Reinhold et al. 2007).

Stärkefreie Mutanten haben in der Lichtphase höhere Saccharosegehalte, dieser Vorrat ist jedoch nach wenigen Stunden Dunkelheit bereits erschöpft (Caspar et al. 1985). Da zusätzliche Zucker nicht aus Stärke freigesetzt werden können, muss eine alternative ATP-Quellen existieren. Nach Bewertung der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist diese Quelle sehr wahrscheinlich der zelluläre Lipidpool (Abb. 40).

Demnach kam es wahrscheinlich in den generierten *adg1-1/amiRNA pxa1* Doppelmutanten in der Dunkelheit schnell zu einem ATP-Mangel. Die Zelle setzte daher Fettsäuren aus den Thylakoidmembranen frei, da jedoch die β -Oxidation blockiert war, konnte erstens kein ATP nachgebildet werden, zweitens staute die toxische α -Linolensäure schneller an. Daher konnten bereits nach 16 h die letalen Schädigungen an *adg1-1/amiRNA pxa1* Pflanzen beobachtet werden (Abb. 35).

Darüber hinaus zeigte sich, dass die *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutante bei der Anzucht im Langtag einen zwergwüchsigen Phänotyp zeigte (Abb. 36). Obwohl auch für *adg1-1* Einzelmutanten eine leichte Wachstumsretardierung bekannt war (Schneider et al. 2002), stellte die Größe der Doppelmutante eine deutliche Verschlechterung dar (Abb. 36). Dieser additive Effekt, der erst durch die Kombination beider Defekte auftrat, kann als weiterer Beleg für den engen Zusammenhang zwischen Stärke- und Fettstoffwechsel gewertet werden. Verfolgt man die Idee des nächtlichen ATP-Mangels weiter, könnte es sich um analoges Verhalten zur *ntt* Doppelmutante handeln (Reiser et al. 2004; Reinhold et al. 2007). ATP-Messungen gegen Ende der Nacht könnten hierüber Klarheit verschaffen.

Als zweite Möglichkeit sollte jedoch auch eine täglich wiederkehrende Vergiftung der Zellen durch den Anstieg der freien Fettsäuren in Betracht gezogen werden. Deshalb sollten bei zukünftigen Messungen auch die Konzentrationen der freien Fettsäuren beziehungsweise der TAGs am Ende der Dunkelphase bestimmt werden.

Im Langtag konnte ein weiteres Phänomen der Doppelmutante beobachtet werden. So zeigte sie eine stark verzögerte Blühinduktion (Abb. 37A), was in geringerem Maße jedoch auch für stärkefreie Einzelmutanten bekannt war (Yu et al. 2000). Darüber hinaus aber zeigte der primäre Blütenstand stets eine gelbliche Erscheinung, die sich dann weißgrau verfärbte und die Blüten wie vertrocknet aussehen ließ (Abb. 37B). Sie öffneten hierbei nicht. Dieses Phänomen wurde in allen Kombinationen aus stärkefreien Mutanten mit defektem PXA1 gefunden. Wie in Abb. 38 beschrieben, entwickelten sich jedoch die späteren Blütenstände phänotypisch unauffällig. Eine vorläufige Untersuchung der Ovulen brachte missgebildete weibliche Gameten zutage (Abb. 38). Konsistent dazu unterblieb jegliche Samenbildung. Interessanterweise konnte die ausbleibende Samenbildung jedoch durch den Transfer der Doppelmutante in kontinuierliche Beleuchtung komplementiert werden. In der Literatur finden sich hierzu nur äußerst wenige Daten. Mark Stitt gelang es jedoch mit seinem Kollegen zu zeigen, dass unter Kohlenstoff- und Energiemangelbedingungen, hervorgerufen durch Dunkelinkubation von Col-0 Pflanzen, ebenfalls die Samenbildung unterblieb (Smith and Stitt 2007). Er schloss hieraus, dass die Phase der Gametenbildung extrem sensibel gegenüber derartigen Mangelerscheinungen ist. Weiter folgerte er, dass die Pflanze aufgrund des hohen Energiebedarfs für die Samenbildung diese zunächst unterdrückt, um günstigere Phasen abzuwarten (Smith and Stitt 2007).

Es ist anzunehmen, dass die *adg1-1 x pxa1-2* Doppelmutanten aufgrund ihrer Stärkefreiheit und der defekten β -Oxidation sehr schnell an Energiemangel leiden. Dies drückt sich auch in ihrer Zwergwüchsigkeit bei Langtaganzucht aus (Abb. 36). Für die Doppelmutante herrschen daher in jeder Nacht ähnliche Umstände, wie sie eine blühende Col-0 Pflanze in anhaltender Dunkelheit erleidet. Als Folge des schlechten Energiestatus des Blütengewebes könnte es daher zu unterentwickelten Gameten gekommen sein. Erst eine permanente Energiezufuhr durch Dauerlicht brachte kontinuierlich Assimilate in das Blütengewebe, weshalb die Bildung fertiler Gameten und Samen so ermöglicht wurde.

5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang es eine neue physiologische Relevanz der Fettsäure- β -Oxidation für den pflanzlichen Dunkelstoffwechsel in adultem Gewebe zu zeigen. Durch Untersuchungen verschiedener „loss-of-function“-Mutanten (*pxa1*, *kat2*) stellte sich heraus, dass eine Inhibition dieses biochemischen Pathways letale Konsequenzen für die Pflanze hat. Bereits nach 36 h Dunkelheit kam es in den Einzelmutanten zu einer starken Zunahme der TAG-Konzentration, begleitet von einer Akkumulation der toxischen α -Linolensäure. Letztere verursachte starke Organellen- und Gewebeschädigungen, in deren Verlauf es zum Abbau des Photosystems II und einem massiven Anstau von Phaeophorbid a kam.

Durch Kombination mit der stärkefreien *adg1-1* konnte ein zeitlicher und biochemischer Zusammenhang zwischen Stärke- und Fettsäureabbau gezeigt werden. Die generierten Doppelmутanten konnten nur Nachtphasen von maximal 16 h überleben, was zurzeit der schnellste, letale bekannte Dunkelphänotyp ist.

Die hier gesammelten Erkenntnisse können zum Beispiel dazu beitragen, neue Aspekte bei der Generierung biotechnologisch veränderter Pflanzen für die Biodieselproduktion zu berücksichtigen, da hierbei hohe Lipidgehalte in der Pflanze von großem Interesse sind.

Weiterhin lassen sich neue Einblicke durch den beobachteten Blütenphänotyp der Doppelmутanten gewinnen. Darüber hinaus eignet sich die Entdeckung des Dunkelphänotyps dazu, einfachere Untersuchungen am Chlorophyllabbau zu unternehmen. Bis dato mussten solche Studien stets an seneszierenden Pflanzen durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Blattstärke ist das primäre Endprodukt der Photosynthese und dient als zentraler Kohlenstoff- und Energiespeicher für die Pflanze. Am Ende einer normalen 8 h Nacht sind die Levels auf 5-10% abgesunken, bereits wenige Stunden später sind sie vollständig erschöpft. Da Pflanzen des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* mehrere Tage in völliger Dunkelheit überlebensfähig sind, müssen ihr alternative Energiequellen zur Verfügung stehen.

Die Fettsäure- β -Oxidation wurde bis dato vor allem bezüglich ihrer physiologischen Relevanz während der Keimung untersucht. Daten und Kenntnisse zur Bedeutung dieses biochemischen Pathways im adulten Blattgewebe waren äußerst limitiert und beschäftigten sich vor allem mit der Produktion von Jasmonsäure als Reaktion auf Verwundungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von β -Oxidation-defizienten Mutanten Untersuchungen zu deren Überlebensfähigkeit in verlängerten Nachtperioden angestellt. Hierfür dienten vor allem *pxa1* Mutanten als Studienobjekte. Der Genlokus *PXA1* kodiert für einen peroxisomalen ABC-Transporter, dessen Verlust zu einer Inhibition der Fettsäure- β -Oxidation führt.

Interessanterweise zeigten diese Mutanten nach bereits 36 h in Dunkelheit letale Schädigungen des Blattgewebes. Weitere Studien an β -Oxidation-defizienten Mutanten mit Defekten in anderen Loci bestätigten, dass die Blockade der Fettverbrennung ursächlich für das Auftreten des Dunkelphänotyps war. In detaillierten Metabolitanalysen konnte ein früher Anstau an Speicherlipiden aus Bestandteilen der Thylakoidmembranen, gefolgt von freien Fettsäuren gefunden werden. Die hierbei dominierende α -Linolensäure zeigte toxische Eigenschaften und bewirkte eine Organell- und Gewebeauflösung in den Mutanten. Begleitet wurde dies von einer massiven Freisetzung der Chlorophyllpigmente aus dem Photosystem II, sodass phototoxische Chlorophyll-Abbauprodukte anstauten und einen additiven, phototoxischen Phänotyp erzeugten.

Durch Generierung von Doppelmutanten mit verschiedenen stärkefreien Linien konnte erstmals ein zeitlicher und physiologischer Zusammenhang zwischen Stärke- und Fettsäuremetabolismus gezeigt werden. Besagte stärkefreie, β -Oxidationsdefiziente Doppelmutanten starben bereits nach 16 h Dunkelheit und waren bei Langtaganzucht zwergwüchsig.

Aus den erhaltenen Daten wurde ein Modell entwickelt, demzufolge Pflanzen nach Ausschöpfung des Stärkepools, die notwendige Energie aus der Verbrennung von Fettsäure beziehen.

7 Abstract

Transitory starch is the primary end product of photosynthesis in leaves and therefore serves as carbon and energy storage throughout the night. At the end of an 8 h dark period starch levels are decreased by 90-95% and are totally depleted a few hours later. Since the model plant *Arabidopsis thaliana* is capable of enduring several days of entire darkness, an alternative energy pool must exist.

Until now, knowledge about the physiological role of fatty acid β -oxidation is limited to the developmental stage of germination. Studies using adult tissue were mainly focused on jasmonic acid production, which is known to be involved in the plants' wounding response.

In this thesis β -oxidation deficient mutants were analyzed regarding their capability to cope with prolonged periods of darkness. Herein a focus was set on *pxa1* mutants. The *PXA1* locus encodes for a peroxisomal ABC transporter known to be crucial for β -oxidation activity.

Interestingly, mutant plants developed lethal tissue damage after 36 h of darkness which was proven to be caused exclusively by the loss of fatty acid β -oxidation since additional mutants, impaired in β -oxidation showed the same phenotype. Metabolic analysis revealed an early increase in triacylglycerols, accompanied by an accumulation of free fatty acids dominated by α -linolenic acid (18:3). Exogenous feeding of 18:3 fatty acids proved its toxicity, making it responsible for the observed organelle- and tissue damage. As a consequence of tissue damage degradation of Photosystem II and a massive release of chlorophyll molecules were detected along with an increase of Phaeophorbid a, a chlorophyll degradation intermediate, which produced a secondary phototoxic effect in *pxa1* mutants.

By generating double mutants between *pxa1* and starch free lines a link between starch and fatty acid metabolism could be established for the first time in adult plants. Having no energy buffer in the form of starch these plants died after dark periods as short as 16 h and showed dwarfish growth under long day conditions.

The obtained data were merged into a model in which plants use β -oxidation of lipids to generate energy in the form of ATP when starch is depleted.

8 Literaturverzeichnis

- Adham, A. R., B. K. Zolman, A. Millius and B. Bartel (2005). "Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation." Plant J. **41**(6): 859-874.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk et al. (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." Science **301**(5633): 653-657.
- Baker, A., I. A. Graham, M. Holdsworth, S. M. Smith and F. L. Theodoulou (2006). "Chewing the fat: beta-oxidation in signalling and development." Trends Plant Sci. **11**(3): 124-132.
- Barclay, K. and B. McKersie (1994). "Peroxidation reactions in plant membranes: Effects of free fatty acids." Lipids **29**(12): 877-882.
- Barros, T. and W. Kuhlbrandt (2009). "Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II." Biochim.Biophys.Acta **1787**(6): 753-772.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2006). Biochemistry. New York, Freeman.
- Blumenthal, G., D. Linke and S. Vieth (2006). Chemische Kinetik (Reaktionskinetik). Chemie: Grundwissen für Ingenieure. E. Müller-Erlwein, W. Trowitsch-Kienast and H. Widdecke, Vieweg+Teubner: 197-212.
- Bonaventure, G., J. J. Salas, M. R. Pollard and J. B. Ohlrogge (2003). "Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth." Plant Cell **15**(4): 1020-1033.
- Bossier, P., L. Fernandes, C. Vilela and C. Rodriguespousada (1994). "The yeast ykl741 gene situated on the left arm of chromosome-xi codes for a homolog of the human ALD protein." Yeast **10**(5): 681-686.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal.Biochem **72**: 248-254.
- Browse, J., L. Kunst, S. Anderson, S. Hugly and C. Somerville (1989). "A Mutant Of *Arabidopsis* Deficient In The Chloroplast 16-1/18-1 Desaturase." Plant Physiology **90**(2): 522-529.
- Browse, J. and C. Somerville (1991). "Glycerolipid synthesis - biochemistry and regulation." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**: 467-506.
- Browse, J. A. and C. R. Somerville (1994). "Arabidopsis." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 881-912.
- Buchanan-Wollaston, V., T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P. O. Lim, H. G. Nam, J. F. Lin, S. H. Wu, J. Swidzinski, K. Ishizaki and C. J. Leaver (2005). "Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*." Plant J. **42**(4): 567-585.
- Carrie, C., M. W. Murcha, A. H. Millar, S. M. Smith and J. Whelan (2007). "Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria." Plant Mol Biol. **63**(1): 97-108.
- Caspar, T., S. C. Huber and C. Somerville (1985). "Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucosyltransferase Activity." Plant Physiol **79**(1): 11-17.
- Charlton, W. L., B. Johnson, I. A. Graham and A. Baker (2005). "Non-coordinate expression of peroxisome biogenesis, beta-oxidation and glyoxylate cycle genes in mature *Arabidopsis* plants." Plant Cell Rep. **23**(9): 647-653.
- Chatrath, H., S. Keilin and B. M. Attar (2009). "Cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in an asymptomatic adult." Dig.Dis.Sci. **54**(1): 168-173.
- Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **86**(7): 2172-2175.

- Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J. **16**(6): 735-743.
- Cornah, J. E., V. r. Germain, J. L. Ward, M. H. Beale and S. M. Smith (2004). "Lipid Utilization, Gluconeogenesis, and Seedling Growth in *Arabidopsis* Mutants Lacking the Glyoxylate Cycle Enzyme Malate Synthase." Journal of Biological Chemistry **279**(41): 42916-42923.
- Coschigano, K. T., R. Melo-Oliveira, J. Lim and G. M. Coruzzi (1998). "Arabidopsis gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes: Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation." Plant Cell **10**(5): 741-752.
- Cruz, C. M., C. Martinez, A. Buchala, J. P. Metraux and J. Leon (2004). "Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*." Plant Physiol **135**(1): 85-94.
- Dawson, R. J., K. Hollenstein and K. P. Locher (2007). "Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism." Mol Microbiol. **65**(2): 250-257.
- Dietrich, D., H. Schmuths, C. M. Lousa, J. M. Baldwin, S. A. Baldwin, A. Baker, F. L. Theodoulou and M. J. Holdsworth (2009). "Mutations in the *Arabidopsis* peroxisomal ABC transporter COMATOSE allow differentiation between multiple functions in planta: insights from an allelic series." Mol Biol. Cell **20**(1): 530-543.
- Du, H., S. Sheriff, J. Bezerra, T. Leonova and G. A. Grabowski (1998). "Molecular and enzymatic analyses of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease." Mol Genet. Metab **64**(2): 126-134.
- Eastmond, P. J. (2006). "SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds." Plant Cell **18**(3): 665-675.
- Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucleic Acids Res. **19**(6): 1349.
- Epstein, E. and J. Ludwigmuller (1993). "Indole-3-butyric acid in plants - occurrence, synthesis, metabolism and transport." Physiologia Plantarum **88**(2): 382-389.
- Footitt, S., S. P. Slocombe, V. Lerner, S. Kurup, Y. Wu, T. Larson, I. Graham, A. Baker and M. Holdsworth (2002). "Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP." EMBO J. **21**(12): 2912-2922.
- Foyer, C. H., A. J. Bloom, G. Queval and G. Noctor (2009). "Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling." Annu. Rev. Plant Biol. **60**: 455-484.
- Franken, J., S. Kroppenstedt, J. Swiegers and F. Bauer (2008). "Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection." Current Genetics **53**(6): 347-360.
- Fritzius, T., R. Aeschbacher, A. Wiemken and A. Wingler (2001). "Induction of ApL3 expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant adg2-1 lacking ApL1, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase." Plant Physiol **126**(2): 883-889.
- Fulda, M., J. Schnurr, A. Abbadi, E. Heinz and J. Browse (2004). "Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Cell **16**(2): 394-405.
- Fulda, M., J. Shockey, M. Werber, F. P. Wolter and E. Heinz (2002). "Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation." Plant J **32**(1): 93-103.
- Furuichi, T., I. C. Mori, K. Takahashi and S. Muto (2001). "Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants." Plant and Cell Physiology **42**(10): 1149-1155.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker (1989). "The relationship between the quantum yield of photosynthetic transport and quenching of chlorophyll fluorescence." Biochimica et Biophysica Acta **990**(1): 87-92.
- Germain, V., E. L. Rylott, T. R. Larson, S. M. Sherson, N. Bechtold, J. P. Carde, J. H. Bryce, I. A. Graham and S. M. Smith (2001). "Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in

- peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings." Plant J **28**(1): 1-12.
- Gibon, Y., O. E. Blaesing, J. Hannemann, P. Carillo, M. Hohne, J. H. Hendriks, N. Palacios, J. Cross, J. Selbig and M. Stitt (2004). "A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness." Plant Cell **16**(12): 3304-3325.
- Gibon, Y., O. E. Blasing, N. Palacios-Rojas, D. Pankovic, J. H. Hendriks, J. Fisahn, M. Hohne, M. Gunther and M. Stitt (2004). "Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period." Plant J **39**(6): 847-862.
- Gibon, Y., E. T. Pyl, R. Sulpice, J. E. Lunn, M. Hohne, M. Gunther and M. Stitt (2009). "Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods." Plant Cell Environ. **32**(7): 859-874.
- Gibon, Y., B. Usadel, O. E. Blaesing, B. Kamlage, M. Hoehne, R. Trethewey and M. Stitt (2006). "Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes." Genome Biol. **7**(8): R76.
- Goepfert, S. and Y. Poirier (2007). "beta-Oxidation in fatty acid degradation and beyond." Current Opinion in Plant Biology **10**(3): 245-251.
- Graham, I. A. (2008). "Seed storage oil mobilization." Annu.Rev.Plant Biol. **59**: 115-142.
- Haink, G. and A. Deussen (2003). "Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds." J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci **784**(1): 189-193.
- Hausler, R. E., N. H. Schlieben and U. I. Flugge (2000). "Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator." Planta **210**(3): 383-390.
- Hayashi, M., K. Nito, R. Takei-Hoshi, M. Yagi, M. Kondo, A. Suenaga, T. Yamaya and M. Nishimura (2002). "Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation." Plant and Cell Physiology **43**(1): 1-11.
- Hayashi, M., K. Toriyama, M. Kondo and M. Nishimura (1998). "2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid β -oxidation." The Plant Cell **10**(2): 183-196.
- Heilmann, I., S. Mekhedov, B. King, J. Browse and J. Shanklin (2004). "Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol Delta 7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the fad5 mutant phenotype." Plant Physiology **136**(4): 4237-4245.
- Heldt, H. W. and B. Piechulla (2008). Pflanzenbiochemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Hiltunen, J. K., Z. Chen, A. M. Haapalainen, R. K. Wierenga and A. J. Kastaniotis (2009). "Mitochondrial fatty acid synthesis - An adopted set of enzymes making a pathway of major importance for the cellular metabolism." Prog.Lipid Res. doi:10.1016/j.plipres.2009.08.001.
- Hiltunen, J. K., A. M. Mursula, H. Rottensteiner, R. K. Wierenga, A. J. Kastaniotis and A. Gurvitz (2003). "The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Fems Microbiology Reviews **27**(1): 35-64.
- Hooks, M. A., J. E. Turner, E. C. Murphy, K. A. Johnston, S. Burr and S. Jaroslawski (2007). "The *Arabidopsis* ALDP protein homologue COMATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism." Biochemical Journal **406**(3): 399-406.
- Hörtensteiner, S. (2006). "Chlorophyll degradation during senescence." Annual Review of Plant Biology **57**(1): 55-77.
- Hörtensteiner, S. (2009). "Stay-green regulates Chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence." Trends Plant Sci. **14**(3): 155-162.

- Hörtensteiner, S., K. L. Wüthrich, P. Matile, K.-H. Ongania and B. Kräutler (1998). "The Key Step in Chlorophyll Breakdown in Higher Plants." Journal of Biological Chemistry **273**(25): 15335-15339.
- Hyun, Y., S. Choi, H.-J. Hwang, J. Yu, S.-J. Nam, J. Ko, J.-Y. Park, Y. S. Seo, E. Y. Kim, S. B. Ryu, W. T. Kim, Y.-H. Lee, H. Kang and I. Lee (2008). "Cooperation and Functional Diversification of Two Closely Related Galactolipase Genes for Jasmonate Biosynthesis." Developmental Cell **14**(2): 183-192.
- Ifuku, K., S. Ishihara, R. Shimamoto, K. Ido and F. Sato (2008). "Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants." Photosynth.Res. **98**(1-3): 427-437.
- Jamai, A., P. A. Salome, S. H. Schilling, A. P. M. Weber and R. McClung (2009). "Arabidopsis Photorespiratory Serine Hydroxymethyltransferase Activity Requires the Mitochondrial Accumulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase." Plant Cell **21**(2): 595-606.
- Kachroo, A. and P. Kachroo (2009). "Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense." Annual Review of Phytopathology **47**(1): 153-176.
- Kaul, S., H. L. Koo, J. Jenkins, M. Rizzo, T. Rooney, L. J. Tallon, T. Feldblyum, W. Nierman, M. I. Benito, X. Y. Lin et al. (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 796-815.
- Kaup, M. T., C. D. Froese and J. E. Thompson (2002). "A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence." Plant Physiology **129**(4): 1616-1626.
- Kienow, L., K. Schneider, M. Bartsch, H. P. Stuible, H. Weng, O. Miersch, C. Wasternack and E. Kombrink (2008). "Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*." Journal of Experimental Botany **59**(2): 403-419.
- Kim, J. I., A. Sharkhuu, J. B. Jin, P. Li, J. C. Jeong, D. Baek, S. Y. Lee, J. J. Blakeslee, A. S. Murphy, H. J. Bohnert, P. M. Hasegawa, D. J. Yun and R. A. Bressan (2007). "yucca6, a dominant mutation in arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes." Plant Physiology **145**: 722-735.
- Kofler, H., R. E. Häusler, B. Schulz, F. Groner, U. I. Flugge and A. Weber (2000). "Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA." Molecular and General Genetics **263**(6): 978-986.
- Koo, A. J. K., H. S. Chung, Y. Kobayashi and G. A. Howe (2006). "Identification of a Peroxisomal Acyl-activating Enzyme Involved in the Biosynthesis of Jasmonic Acid in *Arabidopsis*." Journal of Biological Chemistry **281**(44): 33511-33520.
- Krysan, P. H., J. C. Young, F. Tax and M. R. Sussman (1996). "Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **93**(15): 8145-8150.
- Kunst, L., J. Browse and C. Somerville (1988). "Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **85**(12): 4143-4147.
- Kunz, H. H., M. Scharnewski, K. Feussner, I. Feussner, U. I. Flügge, M. Fulda and M. Gierth (2009). "The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal β -Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of *Arabidopsis* during Extended Darkness." The Plant Cell **21**(9): 2733-2749.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Levin, D. A. (1974). "The Oil Content of Seeds: An Ecological Perspective." The American Naturalist **108**(960): 193.
- Li, Y., F. Beisson, M. Pollard and J. Ohlrogge (2006). "Oil content of *Arabidopsis* seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation." Phytochemistry **67**(9): 904-915.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc.

- Liechti, R. and E. E. Farmer (2002). "The Jasmonate Pathway." Science **296**(5573): 1649-1650.
- Liechti, R. and E. E. Farmer (2006). "Jasmonate biochemical pathway." Sci STKE **2006**(322): cm3.
- Lin, J. F. and S. H. Wu (2004). "Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves." Plant J **39**(4): 612-628.
- Lin, T. P., T. Caspar, C. Somerville and J. Preiss (1988). "Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity." Plant Physiology **86**(4): 1131-1135.
- Lingard, M. J., M. Monroe-Augustus and B. Bartel (2009). "Peroxisome-associated matrix protein degradation in Arabidopsis." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106**(11): 4561-4566.
- Lockshon, D., L. E. Surface, E. O. Kerr, M. Kaeberlein and B. K. Kennedy (2007). "The Sensitivity of Yeast Mutants to Oleic Acid Implicates the Peroxisome and Other Processes in Membrane Function." Genetics **175**(1): 77-91.
- Lu, P., S. Q. Zhang, W. H. Outlaw, Jr. and K. A. Riddle (1995). "Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard- cell symplast of open stomata." FEBS Lett. **362**(2): 180-184.
- Lu, Y., J. P. Gehan and T. D. Sharkey (2005). "Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism." Plant Physiology **138**(4): 2280-2291.
- Lüthy, B., H. Thomas and P. Matile (1986). "Linolenic acid-dependent chlorophyll oxidase-activity - a property of photosystem-I and photosystem-II." Journal of Plant Physiology **123**(3): 203-209.
- Lunn, J. E. (2007). "Compartmentation in plant metabolism." J Exp.Bot. **58**(1): 35-47.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000). "Chlorophyll fluorescence--a practical guide." Journal of Experimental Botany **51**(345): 659-668.
- McConn, M., R. A. Creelman, E. Bell, J. E. Mullet and J. Browse (1997). "Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**(10): 5473-5477.
- Morgan, P. W. (1983). "PLANT-GROWTH REGULATORS AGRICULTURAL USES - NICKELL,LG." Quarterly Review of Biology **58**(2): 262-263.
- Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel and P. Aubourg (1993). "Putative X-Linked Adrenoleukodystrophy Gene Shares Unexpected Homology With ABC Transporters." Nature **361**(6414): 726-730.
- Moulin, M. and A. G. Smith (2005). "Regulation of tetrapyrrole biosynthesis in higher plants." Biochemical Society Transactions **33**: 737-742.
- Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." Ann.Biol.Clin.(Paris) **48**(8): 579-582.
- Nakagawa, T., T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo and T. Kimura (2007). "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation." Journal of Bioscience and Bioengineering **104**(1): 34-41.
- Niittyä, T., G. Messerli, M. Trevisan, J. Chen, A. M. Smith and S. C. Zeeman (2004). "A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves." Science **303**(5654): 87-89.
- O'Neill, C. M., S. Gill, D. Hobbs, C. Morgan and I. Bancroft (2003). "Natural variation for seed oil composition in *Arabidopsis thaliana*." Phytochemistry **64**(6): 1077-1090.
- Okamoto, T., S. Kato and S. Murakami (1977). "Effects of linolenic acid on spinach chloroplast structure." Plant and Cell Physiology **18**(3): 551-560.
- Oster, U., R. Tanaka, A. Tanaka and W. Rudiger (2000). "Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal **21**(3): 305-310.
- Penfield, S., H. Pinfield-Wells and I. A. Graham (2007). Lipid Metabolism in Seed Dormancy. Seed Development, Dormancy and Germination. H. N. Kent J. Bradford: 133-152.
- Pinfield-Wells, H., E. L. Rylott, A. D. Gilday, S. Graham, K. Job, T. R. Larson and I. A. Graham (2005). "Sucrose rescues seedling establishment but not germination of

- Arabidopsis* mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism." Plant J **43**(6): 861-872.
- Pracharoenwattana, I., J. E. Cornah and S. M. Smith (2005). "*Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination." The Plant Cell **17**(7): 2037-2048.
- Pracharoenwattana, I. and S. M. Smith (2008). "When is a peroxisome not a peroxisome?" Trends in Plant Science **13**(10): 522-525.
- Pröll, S., B. Wilhelm, B. Robert and H. Scheer (2006). "Myoglobin with modified tetrapyrrole chromophores: Binding specificity and photochemistry." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1757**(7): 750-763.
- Pruzinska, A., I. Anders, S. Aubry, N. Schenk, E. Tapernoux-Luthi, T. Muller, B. Krautler and S. Hörtensteiner (2007). "In vivo participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown." Plant Cell **19**(1): 369-387.
- Pruzinska, A., G. Tanner, I. Anders, M. Roca and S. Hörtensteiner (2003). "Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **100**(25): 15259-15264.
- Pruzinska, A., G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, T. Muller, K. H. Ongania, B. Krautler, J. Y. Youn, S. J. Liljegren and S. Hörtensteiner (2005). "Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction." Plant Physiology **139**(1): 52-63.
- Quettier, A.-L. and P. J. Eastmond (2009). "Storage oil hydrolysis during early seedling growth." Plant Physiology and Biochemistry (Paris) **47**(6, Sp. Iss. SI): 485-490.
- Rawsthorne, S. (2002). "Carbon flux and fatty acid synthesis in plants." Prog.Lipid Res. **41**(2): 182-196.
- Reinbothe, C., A. Springer, I. Samol and S. Reinbothe (2009). "Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence." FEBS J **276**(17): 4666-4681.
- Reinhold, T., A. Alawady, B. Grimm, K. C. Beran, P. Jahns, U. Conrath, J. Bauer, J. Reiser, M. Melzer, W. Jeblick and H. E. Neuhaus (2007). "Limitation of nocturnal import of ATP into *Arabidopsis* chloroplasts leads to photooxidative damage." Plant J **50**(2): 293-304.
- Reiser, J., N. Linka, L. Lemke, W. Jeblick and H. E. Neuhaus (2004). "Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*." Plant Physiol **136**(3): 3524-3536.
- Reumann, S., L. Babujee, C. Ma, S. Wienkoop, T. Siemsen, G. E. Antonicelli, N. Rasche, F. Luder, W. Weckwerth and O. Jahn (2007). "Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms." Plant Cell **19**(10): 3170-3193.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schelbert, S., S. Aubry, B. Burla, B. Agne, F. Kessler, K. Krupinska and S. Hörtensteiner (2009). "Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*." Plant Cell **21**(3): 767-785.
- Schillmiller, A. L., A. J. K. Koo and G. A. Howe (2007). "Functional Diversification of Acyl-Coenzyme A Oxidases in Jasmonic Acid Biosynthesis and Action." Plant Physiology **143**(2): 812-824.
- Schneider, A., R. E. Häusler, U. Kolukisaoglu, R. Kunze, G. E. van der, R. Schwacke, E. Catoni, M. Desimone and U. I. Flugge (2002). "An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished." Plant J **32**(5): 685-699.
- Schneider, A., T. Kirch, T. Gigolashvili, H. P. Mock, U. Sonnewald, R. Simon, U. I. Flugge and W. Werr (2005). "A transposon-based activation-tagging population in

- Arabidopsis thaliana* (TAMARA) and its application in the identification of dominant developmental and metabolic mutations." FEBS Lett. **579**(21): 4622-4628.
- Schneider, K., L. Kienow, E. Schmelzer, T. Colby, M. Bartsch, O. Miersch, C. Wasternack, E. Kombrink and H. P. Stuible (2005). "A New Type of Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Synthetase from *Arabidopsis thaliana* Has the Catalytic Capacity to Activate Biosynthetic Precursors of Jasmonic Acid." Journal of Biological Chemistry **280**(14): 13962-13972.
- Schwab, R., S. Ossowski, M. Riester, N. Warthmann and D. Weigel (2006). "Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*." Plant Cell **18**(5): 1121-1133.
- Schwacke, R., A. Schneider, E. van der Graaff, K. Fischer, E. Catoni, M. Desimone, W. B. Frommer, U. I. Flügge and R. Kunze (2003). "ARAMEMNON, a Novel Database for *Arabidopsis* Integral Membrane Proteins." Plant Physiology **131**(1): 16-26.
- Semmler, A., W. Kohler, H. H. Jung, M. Weller and M. Linnebank (2008). "Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy." Expert.Rev.Neurother. **8**(9): 1367-1379.
- Shani, N., P. A. Watkins and D. Valle (1995). "PXA1, A Possible *Saccharomyces cerevisiae* Ortholog Of The Human Adrenoleukodystrophy Gene." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **92**(13): 6012-6016.
- Shao, M., H. Zheng, Y. Hu, D. Liu, J. C. Jang, H. Ma and H. Huang (2004). "The GAOLAOZHUANGREN1 gene encodes a putative glycosyltransferase that is critical for normal development and carbohydrate metabolism." Plant Cell Physiol **45**(10): 1453-1460.
- Shockey, J. M., M. S. Fulda and J. Browse (2003). "*Arabidopsis* Contains a Large Superfamily of Acyl-Activating Enzymes. Phylogenetic and Biochemical Analysis Reveals a New Class of Acyl-Coenzyme A Synthetases." Plant Physiology **132**(2): 1065-1076.
- Shockey, J. M., M. S. Fulda and J. A. Browse (2002). "*Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism." Plant Physiology **129**(4): 1710-1722.
- Sivitz, A. B., A. Reinders, M. E. Johnson, A. D. Krentz, C. P. Grof, J. M. Perroux and J. M. Ward (2007). "*Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype." Plant Physiol **143**(1): 188-198.
- Slocombe, S. P., J. Cornah, H. Pinfield-Wells, K. Soady, Q. Y. Zhang, A. Gilday, J. M. Dyer and I. A. Graham (2009). "Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways." Plant Biotechnology Journal **7**(7): 694-703.
- Smith, A. M. and M. Stitt (2007). "Coordination of carbon supply and plant growth." Plant Cell Environ. **30**(9): 1126-1149.
- Spurr, A. R. (1969). "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." Journal of Ultrastructure Research **26**(1-2): 31-43.
- Stadler, R., M. Buttner, P. Ache, R. Hedrich, N. Ivashikina, M. Melzer, S. M. Shearson, S. M. Smith and N. Sauer (2003). "Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*." Plant Physiol **133**(2): 528-537.
- Stessman, D., A. Miller, M. Spalding and S. Rodermel (2002). "Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continuous light." Photosynth.Res. **72**(1): 27-37.
- Stintzi, A. and J. Browse (2000). "The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97**(19): 10625-10630.
- Sulpice, R., E. T. Pyl, H. Ishihara, S. Trenkamp, M. Steinfath, H. Witucka-Wall, Y. Gibon, B. Usadel, F. Poree, M. C. Piques, M. Von Korff, M. C. Steinhauser, J. J. Keurentjes, M. Guenther, M. Hoehne, J. Selbig, A. R. Fernie, T. Altmann and M. Stitt (2009). "Starch as a major integrator in the regulation of plant growth." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106**(25): 10348-10353.
- Tanaka, R., M. Hirashima, S. Satoh and A. Tanaka (2003). "The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: Inhibition of the

- pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the "Stay-Green" phenotype in *Arabidopsis*." Plant and Cell Physiology **44**(12): 1266-1274.
- Tanaka, R. and A. Tanaka (2007). "Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants." Annu.Rev.Plant Biol. **58**: 321-346.
- Theodoulou, F. L., M. Holdsworth and A. Baker (2006). "Peroxisomal ABC transporters." FEBS Lett. **580**(4): 1139-1155.
- Theodoulou, F. L., K. Job, S. P. Slocombe, S. Footitt, M. Holdsworth, A. Baker, T. R. Larson and I. A. Graham (2005). "Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes." Plant Physiology **137**(3): 835-840.
- Turgeon, R. (1989). "The Sink-Source Transition in Leaves." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**(1): 119-138.
- Usadel, B., O. E. Blasing, Y. Gibon, K. Retzlaff, M. Hoehne, M. Gunther and M. Stitt (2008). "Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes." Plant Physiology **146**(4): 1834-1861.
- van der Graaff, E., R. Schwacke, A. Schneider, M. Desimone, U. I. Flügge and R. Kunze (2006). "Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence." Plant Physiology **141**(2): 776-792.
- van der Klei, I. J. and M. Veenhuis (2006). "Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**(12): 1364-1373.
- van Roermund, C. W., W. F. Visser, L. Ijlst, A. van Cruchten, M. Boek, W. Kulik, H. R. Waterham and R. J. Wanders (2008). "The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters." FASEB J **22**(12): 4201-4208.
- Veenhuis, M., M. Mateblowski, W. H. Kunau and W. Harder (1987). "Proliferation Of Microbodies In *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **3**(2): 77-84.
- Vernotte, C., C. Solis, I. Moya, B. Maison, J. M. Briantais, B. Arrio and G. Johannin (1983). "Multiple effects of linolenic acid addition to pea thylacoids." Biochimica et Biophysica Acta **725**(2): 376-383.
- Verrier, P. J., D. Bird, B. Burla, E. Dassa, C. Forestier, M. Geisler, M. Klein, U. Kolukisaoglu, Y. Lee, E. Martinoia, A. Murphy, P. A. Rea, L. Samuels, B. Schulz, E. J. Spalding, K. Yazaki and F. L. Theodoulou (2008). "Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory." Trends Plant Sci. **13**(4): 151-159.
- Voll, L. M., A. Jamai, P. Renne, H. Voll, C. R. McClung and A. P. M. Weber (2006). "The photorespiratory *Arabidopsis shm1* mutant is deficient in SHM1." Plant Physiology **140**(1): 59-66.
- Wang, C., C. A. Zien, M. Afithile, R. Welti, D. F. Hildebrand and X. Wang (2000). "Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*." Plant Cell **12**(11): 2237-2246.
- Wasternack, C. (2007). "Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development." Ann.Bot. **100**(4): 681-697.
- Weber, A., J. C. Servaites, D. R. Geiger, H. Kofler, D. Hille, F. Groner, U. Hebbeker and U. I. Flügge (2000). "Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator." Plant Cell **12**(5): 787-802.
- Woodward, A. W. and B. Bartel (2005). "Auxin: regulation, action, and interaction." Ann.Bot.(Lond) **95**(5): 707-735.
- Yang, M., E. Wardzala, G. S. Johal and J. Gray (2004). "The wound-inducible Lls1 gene from maize is an orthologue of the *Arabidopsis* Acd1 gene, and the LLS1 protein is present in non-photosynthetic tissues." Plant Mol.Biol. **54**(2): 175-191.
- Yu, T.-S., W.-L. Lue, S.-M. Wang and J. Chen (2000). "Mutation of *Arabidopsis* Plastid Phosphoglucose Isomerase Affects Leaf Starch Synthesis and Floral Initiation." Plant Physiol. **123**(1): 319-326.

- Zeeman, S. C., S. M. Smith and A. M. Smith (2004). "The breakdown of starch in leaves." New Phytologist **163**(2): 247-261.
- Zeeman, S. C., S. M. Smith and A. M. Smith (2007). "The diurnal metabolism of leaf starch." Biochem J **401**(1): 13-28.
- Zolman, B. K., N. Martinez, A. Millius, A. R. Adham and B. Bartel (2008). "Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes." Genetics **180**(1): 237-251.
- Zolman, B. K., I. D. Silva and B. Bartel (2001). "The *Arabidopsis pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation." Plant Physiology **127**(3): 1266-1278.
- Zolman, B. K., A. Yoder and B. Bartel (2000). "Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes." Genetics **156**(3): 1323-1337.
- Zolman, B. R., N. Martinez, A. Millius, A. R. Adham and B. Bartel (2008). "Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes." Genetics **180**(1): 237-251.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Diurnaler Verlauf der Stärkekonzentration im Blattgewebe von <i>A. thaliana</i>	1
Abb. 2.	Schematische Übersicht der pflanzlichen β -Oxidation	6
Abb. 3.	Übersicht über die Genstruktur von <i>PXA1</i>	37
Abb. 4.	Agarosegel nach Auftrennung der PCR-Produkte des <i>pxa1</i> Mutantenscreening	38
Abb. 5.	Gewebeschädigung in <i>pxa1-2</i> nach 36 h Dunkelheit und 24 h Dauerlicht.	40
Abb. 6.	Untersuchung des Dunkel-Phänotyps in verschiedenen Mutanten	42
Abb. 7.	Verdunklung von Einzelblättern	43
Abb. 8.	Ausprägung des Dunkelphänotyps in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen	44
Abb. 9.	Gewebeschädigung in der <i>pxa1-2</i> Mutante in Abhängigkeit von der Dauer der Dunkel- inkubation	46
Abb. 10.	Temperaturabhängigkeit des <i>pxa1</i> Phänotyps	47
Abb. 11.	Resultat eines 36 h Dunkelexperiment mit intakten Pflanzen und abgeschnittenen Einzelblättern	48
Abb. 12.	Fv/Fm und Φ PSII während 36 h Dunkelinkubation.....	49
Abb. 13.	Verlauf des Fv/Fm Verhältnisses (A) und Φ PSII (B) während der 36 h Dunkelphase	50
Abb. 14.	Schematische Darstellung des Photosystems II höherer Pflanzen	51
Abb. 15.	Immundetektion von D1, D2 und LHCB2 in Col-0 und <i>pxa1-2</i> über die Dauer eines 36 h Dunkelexperiments	51
Abb. 16.	Transmissions- und lichtmikroskopische Studien im Verlauf eines Dunkelexperimentes	53
Abb. 17.	(A) Summe der freien Fettsäuren im Verlauf einer Dunkelinkubation. (B) Profilanalyse der freien Fettsäuren aus A.....	56
Abb. 18.	(A) Summe aller Acyl-CoAs im Verlauf einer Dunkelinkubation. (B) Profilanalyse der Acyl- CoAs aus A	57
Abb. 19.	(A) Summe der TAGs im Verlauf einer Dunkelinkubation. (B) Profilanalyse der TAG Fraktionen aus A.....	58
Abb. 20.	IAA Konzentrationen in Verlauf einer 20 h Dunkelinkubation	60
Abb. 21.	Toxizität der Linolensäure auf intakte Pflanzen	62
Abb. 22.	Toxizität von α -Linolensäure auf Chloroplasten.....	64
Abb. 23.	Phototoxischer Phänotyp der <i>pxa1</i> Mutante nach verlängerten Dunkelphasen.....	65
Abb. 24.	Dünnschichtchromatographie der Pigmentextrakte.....	66
Abb. 25.	Photometrische Spektralanalyse von 350 – 700 nm der isolierten Bande aus ent- sprechenden Pflanzen	68
Abb. 26.	Photometrische Emissionsanalyse von 350 – 780 nm der isolierten Bande aus <i>pxa1-2</i>	69
Abb. 27.	(A) Massenspektrum der isolierten Substanz sowie Molekülstruktur von Phaeophorbid a (B) Absorptionsspektrum der Substanz	70
Abb. 28.	Phaeophorbid a Akkumulation über die Dauer eines 36 h Dunkelexperiments	71
Abb. 29.	Stärkefärbung nach verschiedenen langen Dunkelphasen in Blättern intakter Pflanzen auf Erde oder abgeschnittenen Blättern	72

Abb. 30. Auswirkungen auf den Dunkelphänotyp in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blattabtrennung.....	74
Abb. 31. ATP/ADP-Verhältnis im Verlauf einer 36 h Nachtphase.....	76
Abb. 32. Effekt von exogener Saccharose-Fütterung auf den <i>pxa1</i> Dunkelphänotyp.....	78
Abb. 33. Anstau freier Fettsäuren in Abhängigkeit von exogener Saccharose.....	79
Abb. 34. Klonierungsstrategie zur Herstellung des amiRNA <i>pxa1</i> Expressionsklons.....	82
Abb. 35. Dunkelexperiment mit <i>adg1-1/</i> amiRNA <i>pxa1</i> Doppelmutanten und Kontrollmutanten.....	83
Abb. 36. Wachstumsphänotyp der <i>adg1-1 x pxa1-2</i> Doppelmutante in Abhängigkeit der Tageslänge.....	85
Abb. 37. Blütenentwicklung der <i>adg1-1 x pxa1-2</i>	86
Abb. 38. Die <i>adg1-1 x pxa1-2</i> Doppelmutanten können im Langtag keine Samen bilden und besitzen deformierte Ovulen.....	87
Abb. 39. Schematische Übersicht des Chlorophyllabbaus.....	98
Abb. 40. Modell des zellulären Dunkelstoffwechsels in <i>A. thaliana</i> Wildtyp Pflanzen und β -Oxidations-defizienten Mutanten.....	104

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen einigen wichtigen Menschen meine Dankbarkeit auszudrücken.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Professor Dr. U.-I. Flügge für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und meine Dissertation zu verfassen. Ich bin überaus dankbar für die wissenschaftlichen Hilfestellungen und abendlichen Diskussionen, die einen wichtigen Anteil am Resultat meiner Forschung haben. Zusätzlich danke ich für das Erstellen diverser Gutachten für meine berufliche Zukunft.

Als zweites Danke ich Frau Professor Dr. S. Waffenschmidt, die sich dazu bereiterklärt hat, das Zweitgutachten zu dieser Arbeit zu erstellen.

Frau Professor Dr. K. Schnetz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Freund Dr. Markus Gierth, der mich durch alle Höhen und Tiefen in den letzten vier Jahren begleitet hatte und stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dank auch an Dr. Frank Ludewig für viele schöne Abende voller emotionalen Diskussionen.

Dank an die ehemaligen Gruppenmitglieder: Dr. Inga Rollwitz, Dr. Bettina Berger, Dr. Holger Fahnenstich, Dr. Christian Greiten und Dr. Daniel Marquart.

Und die aktuelle AG Flügge, besonders: Martin Enqvist, Alexandra Maier, Simon von Berlepsch, Pia Staehr, Jessica Schmitz, Annemarie Reichel, Katja Wester und Sonja Lott.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin Katrin Nonn und meinen Eltern Eva-Maria und Markwart Kunz sowie meinen Geschwistern Andreas, Sebastian, Nikola und Tobias Kunz.

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, 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 vorgelegen 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 dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Hans-Henning Kunz

12 Lebenslauf

Name: Kunz

Vorname: Hans-Henning

Anschrift: Vorgebirgstr. 11
50677 Köln

E-Mail: hkunz@uni-koeln.de

Geburtsdatum: 15.09.1979

Geburtsort: Regensburg

1992 - 1993: Gymnasium Ricarda-Huch-Schule,
Braunschweig

1993 - 1999: Gauß-Gymnasium, Worms
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Sept 1999 - Juli 2000: Wehrdienst, schweres Pionier-Bataillon 330 Speyer

Okt 2000 - Apr 2001: Rettungssanitäter beim Deutschen Roten
Kreuz Worms

Apr 2001 - Juli 2003: Grundstudium an der TU Kaiserslautern mit
Abschluss: Vordiplom

Juli 2003 - Jan 2006: Hauptstudium an der TU Kaiserslautern mit
Abschluss: Diplom Biologe
Biologisches Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Biologisches Nebenfach: Biotechnologie
Nichtbiologisches Nebenfach: Biochemie

Seit Jan 2006: Promotionsstudent am Lehrstuhl II des
Botanischen Institutes der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Flügge