

Physiologische Funktion der plastidären Membranproteine
FAX2 und FAX3 in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von
Wassilina Bugaeva

Saarbrücken
2021

Tag des Kolloquiums: 7. April 2022

Dekan: Prof. Dr. Jörn Eric Walter

Berichterstatter: Prof. Dr. Katrin Philippar
Prof. Dr. Uli Müller

Vorsitz: Dr. Frank Hannemann

Akad. Mitarbeiter: Prof. Dr. Volkhard Helms

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fettsäure- und Lipidsynthese im Chloroplasten	1
1.2	Fettsäuren- und Lipidtransport innerhalb der Pflanzenzelle.....	2
1.3	Der potentielle Fettsäuren Transporter FAX1 in <i>A. thaliana</i>	4
1.4	Lipidumwandlung unter abiotischen Stressbedingungen	6
1.4.1	Phosphatmangel	6
1.4.2	Kälteakklimatisierung	7
2	Zielsetzung	10
3	Material	11
3.1	Chemikalien.....	11
3.2	Enzyme	11
3.3	Kits.....	11
3.4	Oligonukleotide	11
3.5	Vektoren und Konstrukte.....	13
3.6	Molekulargewicht- und Größenstandards	13
3.7	Antikörper.....	13
3.8	Bakterienstämme	14
3.9	Pflanzenmaterial	14
4	Methoden.....	15
4.1	Anzuchtbedingungen für Pflanzen	15
4.2	Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i>	15
4.3	Anzuchtbedingungen von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	16
4.4	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.coli</i> und <i>A.tumefaciens</i> Zellen.....	16
4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
4.6	Klonierung	17
4.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	17
4.8	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	18
4.9	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	18
4.10	Sequenzierung von DNA	19
4.11	RNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i>	19
4.12	Reverse Transkription.....	19
4.13	Quantitative Echtzeit <i>real time</i> (qRT) -PCR	19

4.14	Klonierung der RNAi-Konstrukte	20
4.15	Isolierung der chloroplastidären Hüllmembranen aus Erbse.....	24
4.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
4.17	Immunodetektion von Proteinen	24
4.18	Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.....	25
4.19	Kältekonduktivität in <i>A. thaliana</i>	25
4.20	Kältestress in <i>A. thaliana</i>	26
5	Ergebnisse	27
5.1	Familie der pflanzlichen FAX Proteine	27
5.1.1	Untersuchung der FAX1, FAX2 und FAX3 Proteinsequenz.....	29
5.2	Subzelluläre Lokalisation von FAX2 und FAX3	35
5.3	Klonierung und Überprüfung von <i>FAX1 - FAX4</i> RNAi-Linien	38
5.4	Charakterisierung der <i>fax2</i> und <i>fax3</i> Einzel- und <i>fax2/3</i> Doppelmutanten	44
5.4.1	Phänotypisierung der <i>fax2</i> und <i>fax3</i> Mutanten unter Kurztags-Bedingungen ...	49
5.5	Charakterisierung unter Kältestressbedingungen	53
5.6	Mögliche FAX1 Komplementation durch plastidäre FAX Proteine	65
6	Diskussion	69
6.1	Charakteristische Proteinmotive der FAX Proteine in pflanzlichen Organismen	69
6.2	Subzelluläre Lokalisation der FAX2 und FAX3 Proteine.....	71
6.3	Physiologische Auswirkungen beim Verlust des plastidären <i>FAX2</i> in <i>A. thaliana</i> ...	72
6.3.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>fax1</i> , <i>fax2</i> und <i>fax3</i> Mutanten bei Kälte .	74
6.4	Komplementierender Effekt durch FAX3 bei Verlust von FAX1 in <i>A. thaliana</i>	75
6.5	Ausblick.....	80
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	84
9	Abbildungsverzeichnis	85
10	Tabellenverzeichnis.....	87
11	Abkürzungsverzeichnis	88
12	Literaturverzeichnis.....	90
13	Anhang	97
	Danksagung.....	102
	Lebenslauf.....	103

1 Einleitung

1.1 Fettsäure- und Lipidsynthese im Chloroplasten

Pflanzenlipide formen an der Blattoberfläche eine lipophile Barriere als Schutz, dienen als Triacylglycerol (TAG) der Energiespeicherung in Samen von Ölpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und formen als Strukturkomponenten die zellulären Membranen. Zur Herstellung von Lipiden sind Fettsäuren notwendig, die in Chloroplasten gebildet werden (Li-Beisson *et al.*, 2013). Im Stroma der Chloroplasten wird Pyruvat über den Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDHC) zu Acetyl-Coenzym A (CoA) umgebaut, welches als Starteinheit für die Fettsäuresynthese verwendet wird (Li-Beisson *et al.*, 2013). Dabei wird eine irreversible Carboxylierung des Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA über die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) durchführt (Li-Beisson *et al.*, 2013). Durch die Übertragung der Malonyl-Gruppe vom Malonyl-CoA auf das Acyl Carrier Protein (ACP) werden Fettsäureketten in mehreren Zyklen sich wiederholender Kondensation, Reduktion, Dehydrierung und Reduktion durch einen Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese, bestehend aus ACP-Synthasen und –Desaturasen, aufgebaut und verlängert. Als Endprodukte der Fettsäuresynthese entstehen C16:0-ACP, C18:0-ACP und C18:1-ACP (Li-Beisson *et al.*, 2013). In Kulturextrakten und Samen von *Brassica napus* konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von C18:1-ACP an die ACCase, diese inhibiert wird, sodass es zu einer negativen Rückkopplung der Fettsäuren Neusynthese kommt (Andre *et al.*, 2012). Nach der Fettsäuresynthese werden in *A. thaliana* etwa 38% der hergestellten C16- und C18-Fettsäuren über den prokaryotischen Weg zu plastidären Lipiden umgebaut (Li-Beisson *et al.*, 2013). Bei der prokaryotische Lipidsynthese wird zunächst das C18:1-ACP über die Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT) auf die *sn-1* Position eines reduzierten Glycerol-3-Phosphat (G3P) übertragen. Anschließend wird die *sn-2* Position über die Lyso Phosphatidsäure Acyltransferase (LPAAT) mit einer C16:0-ACP acyliert und Phosphatidsäure (PA) generiert (Li-Beisson *et al.*, 2013). Die Phosphatidsäure dient als Vorstufe zum Aufbau von Phospholipiden, wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI) sowie für das Diacylglycerol (DAG), welches als Vorstufe zur Synthese von Mono-(MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) dient (siehe Abb. 1.1). Die über den prokaryotischen Weg gebildeten Lipide MGDG, DGDG, SQDG und PG werden zum Aufbau der Chloroplastenhüll- und Thylakoidmembran verwendet (LaBrant *et al.*, 2018).

1.2 Fettsäuren- und Lipidtransport innerhalb der Pflanzenzelle

In Blättern werden bei C16:3-Pflanzen wie *A. thaliana* mit etwa 62% die Mehrheit der synthetisierten Fettsäuren aus dem Chloroplasten exportiert, um anschließend im Endoplasmatischen Reticulum (ER) über den eukaryotischen Weg zu Lipiden umgebaut zu werden (Li-Beisson *et al.*, 2013). Dabei benötigen sie einen gerichteten, intrazellulären Lipidtransfer, um Membranen zu passieren. Dafür gibt es membran-ständige Proteine, welche den Fettsäure- und Lipidtransport entweder aktiv durchführen oder den intrazellulären Austausch erleichtern (Li *et al.*, 2016; Breuers *et al.*, 2011).

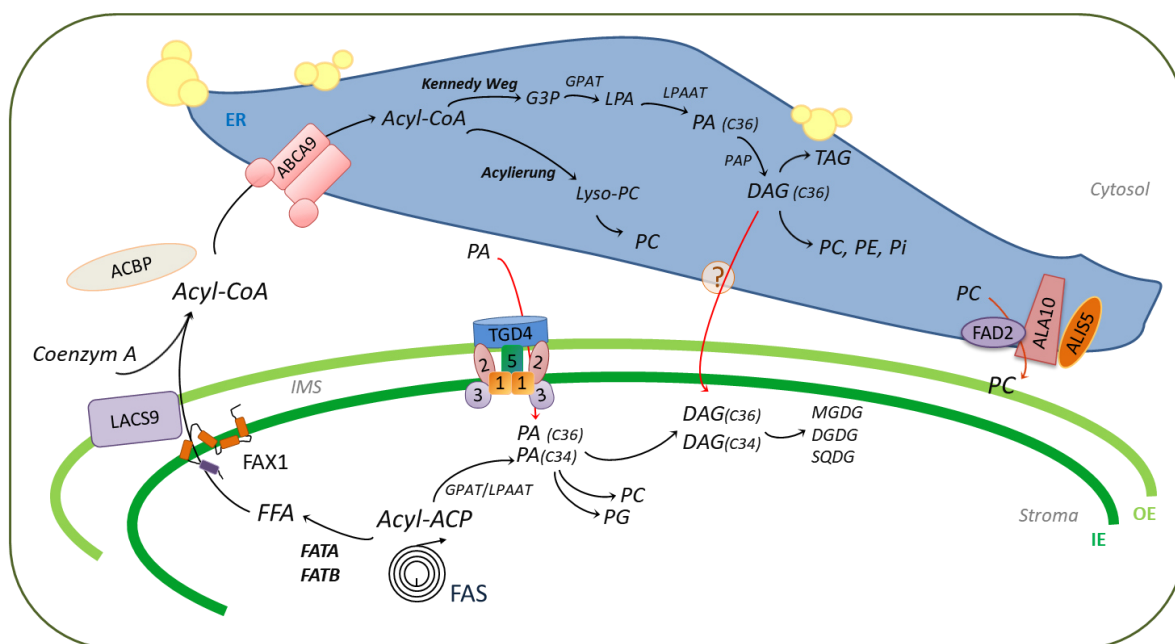


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Fettsäuren- und Lipidtransports innerhalb einer mesophyllischen Pflanzenzelle. Nach der Fettsäuresynthese im Chloroplasten gelangen die freien Fettsäuren (FFA) über FAX1 an der inneren Hüllmembran (IE) in den Intermembranraum (IMS) und werden von LACS9 an der äußeren Hüllmembran (OE) über die Kopplung an das Coenzym A (CoA) zu Acyl-CoA aktiviert, welches von Acyl-CoA Bindeproteinen (ACBP) im Cytosol gebunden werden kann und an der ER Membran über ABCA9 in das ER zur Modifikation von Lipiden importiert wird. In Form von DAG, PA und PC gelangen die modifizierten Fettsäuren wieder zurück zum Chloroplasten, wo sie in plastidäre Lipide eingebaut werden (Li *et al.*, 2016). Die schwarzen Pfeile zeigen die prokaryotische Lipidsynthese sowie den Transport der freien Fettsäuren vom Chloroplasten zum ER, sowie die nachfolgende Modifizierung im ER; die roten Pfeile markieren den Reimport der im ER modifizierten Lipide in den Chloroplasten. Abk: ABCA9: ATP-bindende Kasette Untereinheit A, ACBP: Acyl-CoA Bindeprotein, CoA: Coenzym A, DAG (Anzahl der C-Atome): Diacylglycerol, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerol, ER: endoplasmatisches Reticulum, FAD2: Fettsäuren Desaturase 2, FAS: Fettsäuresynthese, FAT: Fettsäuren Thioesterase A und B, FAX1: Fatty acid export protein 1, FFA: freie Fettsäuren, G3P: Glycerol-3-phosphat, GPAT: Glycerin-3-phosphat-O-Acyltransferase, IE: innere Chloroplastenhüllmembran, IMS: Intermembranraum; LACS: Long-Chain Acyl-CoA Synthetase, LPA: Lysophosphatidsäure, LPAAT: LPA Acyltransferase, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerol, OE: äußere Chloroplastenhüllmembran, PA: Phosphatidsäure, PAP: Phosphatidsäure Phosphatase, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PG: Phosphatidylglycerol, PI: Phosphatidylinositol, TAG: Triacylglycerol, TGD: Trigalaktosyldiacylglycerol. (nach Block und Jouhet, 2015; Manan *et al.*, 2017; Troncoso-Ponce *et al.*, 2016).

Über die Fettsäuresynthese im Chloroplasten werden im Stroma, an das ACP gebundene, Fettsäureketten gebildet und über die Acyltransferasen GPAT und LPAAT zu PA acyliert,

welches dann zur prokaryotischen Lipidsynthese genutzt werden kann (siehe Kap. 1.1; Abb. 1.1). Zur eukaryotischen Lipidsynthese im ER erfolgt ein Transport der freien Fettsäuren, welche erst unmittelbar vor dem Export von der FATA oder FATB Thioesterase hydrolysiert werden (Salas und Ohlrogge, 2002; Li-Beisson *et al.*, 2013). Die freien Fettsäuren diffundieren durch die plastidären Membranen, wobei das Fettsäuren-Transportprotein FAX1 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten (IE) den Transfer der freien Fettsäuren durch die Membran erleichtert (Li *et al.*, 2015 und 2016). An der äußeren Hüllmembran (OE) werden die freien Fettsäuren durch eine ATP-abhängige Kopplung an CoA über die Long-Chain Acyl-CoA Synthetase LACS9 zu Acyl-CoA aktiviert (Schnurr *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 2004). Im Cytosol kann daraufhin das Acyl-CoA von Acyl-CoA Bindeproteinen (ACBP) gebunden und subzellulär verbreitet werden (Du *et al.*, 2016). An der ER Membran wird das Acyl-CoA von dem ABCA9 importiert, welches während der Akkumulierung von Speicherlipiden in Samen nachgewiesen wurde (Kim *et al.*, 2013). Im ER wird das Acyl-CoA zur eukaryotischen Lipidsynthese genutzt (siehe Abb. 1.1). Bei der Acylierung werden die Fettsäuren vom Acyl-CoA auf das Lyso-Phosphatidylcholin übertragen und daraus Phosphatidylcholin (PC) generiert, welches zum Aufbau von weiteren Lipiden dient (Li-Beisson *et al.*, 2013). Über den Kennedy Weg werden die Fettsäuren vom Acyl-CoA über die Acyltransferase GPAT zunächst auf die *sn-1* Position des G3P übertragen und Lysophosphatidsäure (LPA) generiert (Bates *et al.*, 2013). Danach wird die LPA an der *sn-2* Position über die Acyltransferase LPAAT mit einer weiteren Acyl-CoA Fettsäure acyliert und Phosphatidsäure (PA) hergestellt (siehe Abb. 1.1). Anschließend wird das PA zur Synthese von DAG durch die Phosphatidsäure Phosphatase (PAP) dephosphoryliert. Dabei besitzen die im eukaryotischen Weg synthetisierten DAG eine C18:0 Fettsäurenkette an der *sn-2* Position des Glycerols, im Gegensatz zu den im Chloroplasten über den prokaryotischen Weg synthetisierten DAG mit hauptsächlich einer C16:0 Fettsäurenkette an der *sn-2* Position des Glycerols (Li-Beisson *et al.*, 2013). Im ER erfolgt die Modifizierung des DAG in Phospholipide wie PC, PE und PI und zur Synthese des Speicherlipids TAG (Li-Beisson *et al.*, 2013). Das über den eukaryotischen Weg gebildete DAG_(C36) kann im Chloroplasten auch ergänzend zur prokaryotischen Lipidsynthese von Galaktolipiden, wie MGDG und DGDG, einfließen (Chris und John, 1991; Li-Beisson *et al.*, 2013). Das im ER synthetisierte PC wird über die an der ER Membran ständige ATP-getriebene Phospholipid Flippase ALA10 mithilfe der Fettsäuren Desaturase FAD2 transferiert (Botella *et al.*, 2016). Durch eine Interaktion mit ALIS5 kann ALA10 näher an die Plastidmembran geführt werden, wodurch das PC wahrscheinlich direkt über ALA10 in die OE Membran eingebaut wird (Botella *et al.*, 2017). Neben dem Phospholipid PC, wird auch das

eukaryotisch gebildete PA in den Chloroplasten zur Synthese von PC, PG und DAG in den Chloroplasten importiert (siehe Abb. 1.1). Über den an der OE lokalisierten Transferkanal TGD4, ein β -barrel Lipid A Transfer Protein, gelangt das PA in den Intermembranraum IMS (Xu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013) und wird über den ABC-Transporterkomplex (TGD1, 2, 3) weiter ins Stroma importiert (Wang und Benning, 2012). TGD5 bildet dabei möglicherweise eine Brücke für einen gerichteten Lipidtransport durch die IMS (Fan *et al.*, 2015). Das in der IE verankerte TGD2 formt durch den C-Terminus eine Verbindung zum OE, welche den Lipid Transport zu der IE erleichtert (Roston *et al.*, 2011) und besitzt dabei eine hohe Substrataffinität zu PA (Lu und Benning, 2009). Das in der IE lokalisierte TGD1 enthält eine membranständige Permeasedomäne und transportiert PA durch die Membran ins Stroma, während TGD3 mit einer ATPase Domäne des ABC Transporters mithilfe einer ATP Hydrolyse die Energie für den Prozess liefert (Lu *et al.*, 2007). Im chloroplastidären Stroma kann sowohl das importierte PA_(C36) als auch das über den prokaryotischen Weg synthetisierte PA_(C34) zu PC und PG umgewandelt oder zu DAG dephosphoryliert werden, welches dann in die Synthese von MGDG, DGDG und SQDG einfließt (siehe Abb. 1.1).

1.3 Der potentielle Fettsäuren Transporter FAX1 in *A. thaliana*

In *A. thaliana* wurde ein Fettsäuren Transport Protein FAX1 (At3g57280) charakterisiert, welches zur Familie der Transmembranproteine TMEM14 gehört und vermutlich mit vier α -helikalen Transmembrandomänen (Tmemb) in die innere Hüllmembran der Chloroplasten inseriert (Li *et al.*, 2015, Könnel *et al.*, 2019). Funktionelle Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass es FAX1 möglich ist, den hefeeigenen Fettsäuretransporter fat1p zu ersetzen und Fettsäuren, wie die mehrfach ungesättigte α -Linolensäure (C18:3) zu transportieren (Li *et al.*, 2015). In Hefe wird der unidirektionale Import von langkettigen Fettsäuren, mithilfe eines Proteinkomplexes, bestehend aus fat1p, einem membran-ständigen Transportprotein, sowie faa1p und faa4p, intrazellulären Acyl-CoA Synthetasen zur Aktivierung der freien Fettsäuren, durchgeführt (Zou *et al.*, 2002; DiRusso *et al.*, 2003 und 2008). Durch die Aktivität der Acyl-CoA Synthetasen, wird ein starker Gradient zugunsten des synthetisierten Acyl-CoA erzeugt und die Fettsäuren durch die Membran transferiert (Black und DiRusso, 2003). In Hefe war es FAX1 möglich den hefeeigenen Fettsäuretransporter fat1p zu ersetzen und Fettsäuren zu transportieren, jedoch ersetzte FAX1 nicht die Acyl-CoA Synthetasen faa1p/faa4p zur Aktivierung der Fettsäuren. Denn nur bei einem erfolgreichen Transport und einer Aktivierung der C18:3 Fettsäuren entstehen giftige Komponenten, die zum Sterben der Hefezellen führen (Von Berlepsch *et al.*, 2012), was bei einer Komplementation von fat1p mit FAX1

nachgewiesen wurde, jedoch bei einer Komplementation von *faa1p/faa4p* nicht beobachtet wurde (Li *et al.*, 2015). In Pflanzen könnte das membran-ständige FAX1 am Transport der Fettsäuren aus dem Chloroplasten beteiligt sein, indem es durch das Inserieren seiner amphiphilen dritten Helix der Tmemb-Domäne die IE beugt, um so einen engeren Membrankontakt zwischen IE und OE zur erleichterten Diffusion von Fettsäuren herzustellen (Könnel *et al.*, 2019). Es wurde gezeigt, dass ein Verlust von *FAX1* in *A. thaliana* zu einem deutlichen Anstieg der über den prokaryotischen Weg gebildeten Lipide, wie PG, und zu einer Abnahme der im ER über den eukaryotischen Weg gebildeten Lipiden, wie PA, PC und TAG führt (Li *et al.*, 2015). Im Vergleich zum Wildtyp sind *A. thaliana* Pflanzen mit einer *FAX1* Überexpression größer und besitzen dickere Infloreszenzstengel (Li *et al.*, 2015). Durch eine T-DNA Insertion hergestellte *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten in *A. thaliana* zeigten im Vergleich zum Wildtyp Columbia-0 ein verlangsamtes Pflanzenwachstum, weniger C29 Ketonwachs auf der Cuticula von Stengelzellen und einen Defekt bei der Pollenentwicklung, der zur Sterilität der homozygoten *fax1-1* und *fax1-2* Pflanzen führt. Expressionsprofile von *FAX1* zeigen, dass *FAX1* ubiquitär in allen Pflanzengewebe und Entwicklungsstadien exprimiert wird und in spezifischen Geweben, wie im Hypocotyl, in den Kotyledonen und den Rosettenblättern, sowie während der Pollenentwicklung, eine starke Expression aufweist (Supplement Li *et al.*, 2015). Es wurde ein Defekt bei der Entwicklung der Pollenzellwand in homozygoten *fax1-2* Mutanten nachgewiesen. Der Innenraum der Pollensäcke in den Antheren der *fax1-2 knockout* Mutanten war mit einem klebrigen Material angefüllt, was zu einer Beeinträchtigung beim Lösen der Pollenkörner aus den Antheren führte (Li *et al.*, 2015). Während der Pollenentwicklung werden bis zum trizellulären Pollenstadium im Tapetumgewebe der Antheren Vorstufen von Sporopollenin gebildet (Shi *et al.*, 2015), einem lipidhaltigen Biopolymer aus Phenolen und Carotinoiden, die nach der Sekretion für den Aufbau der Exinschicht der Pollenzellwand verwendet werden (Ariizumi und Toriyama, 2011; Quilichini *et al.*, 2014). In den Antheren werden nach einem programmierten Zelltod der Tapetumzellen Lipide und Proteine aus den Elaioplasten in den Innenraum der Pollensäcke entlassen und überlagern dann die Sporopolleninschicht des Pollens, um eine Tryphinschicht als Pollenhülle auszubilden (Quilichini *et al.*, 2015; Ischebeck, 2016). Bei den homozygoten *fax1 knockout* Mutanten kommt es aufgrund von einem atypischen programmierten Zelltod der Tapetumzellen zu einer Störung der Homöostase von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einer beeinträchtigten Entwicklung der Pollenzellwand verursacht durch eine Unterdrückung der Transkriptionsaktivität wichtiger Gene, wie *DYT1*, *TDF1*, *AMS* und *MSI88*, welche die Tapetumentwicklung in frühen Antherenstadien regulieren (Zhu *et al.*, 2020). Somit wird auf

den Pollenkörnern der *fax1 knockout* Mutanten keine Sporopolleninschicht, bestehend aus Tectum- und Baculum-Strukturen aufgebaut, sodass die freiwerdenden Komponenten aus den Tapetosomen nicht aufgelagert werden können, um eine intakte Exinschicht auszubilden und die Pollenkörner miteinander verkleben (Li *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2020). In den homozygoten *fax1 knockout* Pflanze kommt es zur männlichen Sterilität, sodass sich keine Pollen aus den Antheren lösen, die Narbe unbestäubt aus der Blüte herauswächst und keine Samen produziert werden. In den heterozygoten *fax1-1* und *fax1-2* Pflanzen werden die Vorstufen für Sporopollenin in einem für *FAX1* heterozygoten Tapetumgewebe hergestellt, sodass vermutlich eine intakte Exinschicht aufgebaut wird. Jedoch entstehen nachweislich weniger homozygote Nachkommen mit einer nicht mendelschen Segregation von 7% homozygoten Nachkommen bei der Linie *fax1-1* und 4% bei der Linie *fax1-2* (Li *et al.*, 2015). Der Defekt liegt dabei vermutlich in den vegetativen, haploiden Pollenkörnern ohne ein funktionsfähiges FAX1.

1.4 Lipidumwandlung unter abiotischen Stressbedingungen

1.4.1 Phosphatmangel

Bei einem Mangel an Nährstoffen wie Phosphatmangel (Pi-) verändert sich zur Energiegewinnung die Zusammensetzung der Lipidmembranen (Moellering und Benning, 2011; Nakamura, 2013). Zur Gewinnung von ATP wird das Phosphat aus den Phospholipiden der mitochondrialen Membran (Jouhet *et al.*, 2004) und des Tonoplasten (Andersson *et al.*, 2005) genutzt und die degradierten, strukturgebenden Phospholipide PE und PC durch Galaktolipide wie DGDG aus den chloroplastidären Membranen ersetzt (Li-Beisson *et al.*, 2017; Nakamura, 2017). Dazu kann das in der OE hergestellte DGDG auf einem direkten Weg zu der mitochondrialen Membran befördert werden, wobei Kontaktstellen zwischen der chloroplastidären und mitochondrialen Membranen den Transport erleichtern (Jouhet *et al.*, 2004; Michaud *et al.*, 2016). Über TEM-Aufnahmen in Mesophyllzellen von Pi- gestressten Pflanzen konnte ein enger Kontakt zwischen Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen werden (Jouhet *et al.*, 2004), möglicherweise um die Anzahl der Kontaktstellen für den Lipidtransport zu erhöhen (Michaud *et al.*, 2017). In *A. thaliana* wurde in den mitochondrialen Membranen ein Lipoprotein Komplex (MTL-Komplex) identifiziert, der während einem Phosphatmangel mit viel DGDG angereichert war und am Lipidaustausch von PE aus den Mitochondrien und DGDG aus den Chloroplasten beteiligt ist (Michaud *et al.*, 2016). Im MTL-Komplex finden sich Vertreter aus dem TOM-Komplex, wie das Tom40, einem Importkanal für den Proteinimport in Mitochondrien, genauso wie Komponenten aus dem MICOS- (*mitochondria contact site cristae organizing system*) Komplex wie das Mic60 (Pfanner *et al.*,

2014; van der Laan *et al.*, 2016). In Hefe übernimmt der MICOS Komplex durch die Ausbildung von Cristae-Strukturen (tubuläre oder lamellare Membraneinstülpungen) eine Funktion bei der morphologischen Ausprägung der Mitochondrien und formt Kontaktstellen zwischen der inneren und äußeren mitochondriellen Membran (Zerbes *et al.*, 2012). Dabei interagiert das in der inneren mitochondriellen Membran lokalisierte Mic60, mit der an der äußeren mitochondriellen Membran ständigen Translokase Tom40 (Pfanner *et al.*, 2014). Das pflanzliche Homolog AtMic60 ist im MTL-Komplex assoziiert und zeigt über eine Co-Immunopräzipitation eine Interaktion zu Tom40 in der äußeren mitochondriellen Membran (Michaud *et al.*, 2016). Durch eine Bindung zu Cardiolipin kann AtMic60 die Membran destabilisieren und ist an der Ausbildung von *crista junctions* beteiligt (Hessenberger *et al.*, 2017). Um weitere, mögliche Proteine im MTL-Komplex oder andere Komplexe mit einer DGDG- Anreicherung zu identifizieren, wurden Mitochondrien von *A. thaliana* aus Kalluskulturen nach einer viertägigen Anzucht mit und ohne Phosphat im Medium isoliert (Michaud *et al.*, 2016). Über Proteomanalysen wurden dabei mehr als 200 mitochondrielle Proteine als mögliche Komplexpартner identifiziert und sieben chloroplastidäre Proteine, darunter das Fettsäuretransport-Protein FAX2 (At2g38550, NP_565892). FAX2 könnte als möglicher Interaktionspartner des MTL-Komplexes am Lipidtransfer zwischen Mitochondrien und Chloroplasten beteiligt sein, bei welchem eine Umlagerung von Galaktolipiden (DGDG) von der OE der Chloroplasten in die mitochondrielle Membran erfolgt.

1.4.2 Kälteakklimatisierung

Durch die Eisbildung bei Frosttemperaturen (unter 0°C) kommt es zur Dehydrierung der Pflanzenzelle und zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Lipidmembranen. Um die morphologischen Strukturen der Pflanzenzelle zu schützen, findet in Pflanzen bereits während kalten Temperaturen eine Anpassung an Frost, die sogenannte Kälteakklimatisierung, statt (Dörmann und Benning, 2002). Dazu werden in die Zellmembranen mehr Galaktolipide, wie MGDG und DGDG, als kryoprotektive Metabolite eingebaut (Benning, 2009; Kobayashi, 2016). Im Chloroplasten machen Galaktolipide, wie MGDG und DGDG, mit über 75% den größten Anteil an der IE und der Thylakoidmembran aus (LaBrant *et al.*, 2018). Zur Synthese der chloroplastidären Galaktolipide kann als Vorstufe sowohl das über den prokaryotischen Weg, als auch das über den eukaryotischen Weg gebildete DAG, verwendet werden (Benning, 2008; Wang und Benning, 2012; Li-Beisson *et al.*, 2013).

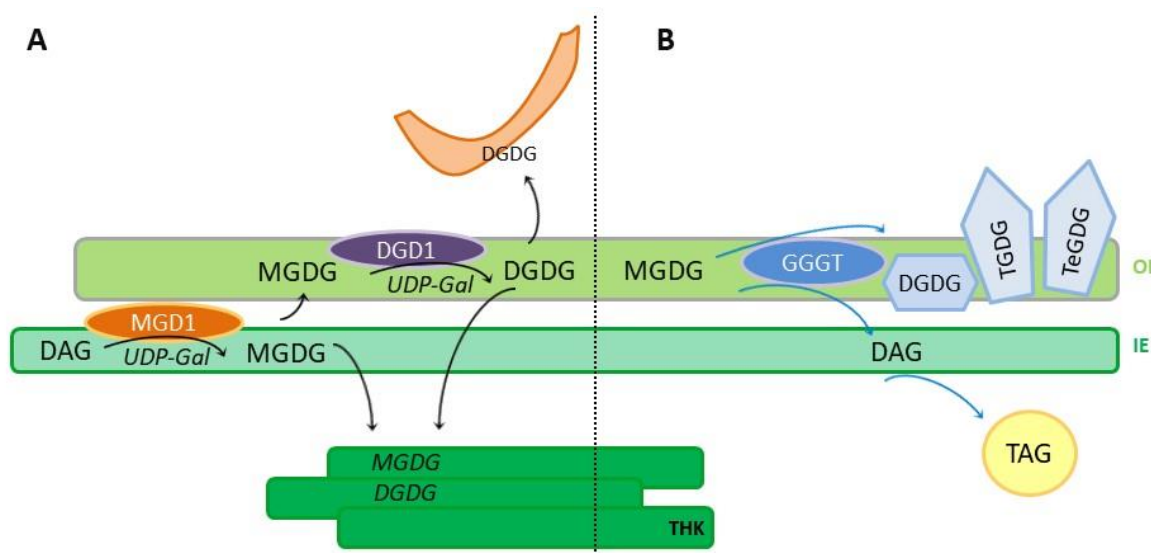


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Lipidumwandlung während der Kälteakklimatisierung in *A. thaliana* zum Kälte- und Frostschutz. Dargestellt ist die Synthese der plastidären Galaktolipide in der inneren (IE) und äußeren (OE) Membran der Chloroplasten (A) unter Normalbedingungen und (B) während der Kälteakklimatisierung. Das plastidär hergestellte DAG kann über membran-lokalisierte Enzyme weiter zu MGDG und DGDG umgewandelt werden, welche als Strukturkomponenten zu unterschiedlichen zellulären Membranen transportiert werden (Wang und Benning, 2012). Während der Anpassung an Kälte verändert sich die Lipidzusammensetzung der Membran, indem mehr Galaktolipide wie DGDG, TGDG und TeGDG in die OE eingebaut werden und das Speicherlipid TAG vermehrt akkumuliert wird (Moellering *et al.*, 2010). Die schwarzen Pfeile zeigen die Umwandlung der Lipide in beiden chloroplastidären Membran bei Normalbedingungen, die blauen Pfeile zeigen die akklimatisierungs-bedingte Umwandlung zu TAG und Galaktolipiden. Substrate sind mit einer schwarzen Schrift, Enzyme mit einer weißen Schrift gekennzeichnet. Abk: DAG (Anzahl der C-Atome): Diacylglycerol, DGD1: DGDG Synthetase 1, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerol, ER: endoplasmatisches Reticulum, GGGT: Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase, IE: innere Chloroplastenmembran, MGD1: MGDG Synthetase 1, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerol, OE: äußere Chloroplastenmembran, TAG: Triacylglycerol, TeGDG: Tetragalaktosyldiacylglycerol, TGDG: Trigalaktosyldiacylglycerol, THK: Thylakoid, UDP-Gal: UDP-Galaktose. (nach Moellering *et al.*, 2010; LaBrant *et al.*, 2018; Lavell und Benning, 2019).

An der inneren Membran der Chloroplasten wird das plastidär hergestellte DAG zusammen mit einer aktivierten Galaktose in Form von UDP-Gal über die MGDG Synthetase 1 (MGD1) zu MGDG umgebaut (Klaus *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2016). Das MGDG kann daraufhin in plastidäre Membranen, wie IE und Thylakoidmembran, eingebaut werden oder an der OE mit UDP-Gal über die DGDG Synthetase 1 (DGD1) zu DGDG synthetisiert werden (Kelly und Dörmann, 2002; Lavell und Benning, 2019). Das gebildete DGDG dient ebenfalls zum Aufbau von plastidären Membranen, wird aber auch in andere subzelluläre Kompartimente transportiert (siehe Abb. 1.2). Bei der Kälteakklimatisierung wird das plastidär gebildete DAG zur Herstellung des Speicherlipids TAG verwendet, welches bei Kälte stark akkumuliert wird (Degenkolbe *et al.*, 2012). In der OE der Chloroplasten werden die Zuckerreste des MGDG über die Galaktosyltransferase GGGT zur Synthese von Oligogalaktolipiden wie DGDG, Trigalaktosyldiacylglycerol (TGDG), und Tetragalaktosyldiacylglycerol (TeGDG) genutzt (Xu *et al.*, 2005) und das von der GGGT aus MGDG wiedergewonnene DAG hauptsächlich zu TAG

metabolisiert (Moellering und Benning, 2011). Das kälteaktive Enzym GGGT wurde als das zu der Glycosyl Hydrolase Familie 1 (GH-1) zugehörige und in der OE lokalisierte SENSITIVE TO FREEZING 2 (SFR2) beschrieben. Die *sfr2* Mutanten zeigten eine beeinträchtigte GGGT Aktivierung und damit verbunden, eine reduzierte TAG Akkumulierung um 50%, sowie eine Abnahme der C16:3-Fettsäuren (Moellering *et al.*, 2010; Roston *et al.*, 2014). Auch wurden in den *sfr2* Mutanten Schädigungen an der Chloroplasten- und der Tonoplastenmembran nachgewiesen, welche vermutlich durch eine Fusion aufgrund von destabilisierten Membranen verursacht wurden (Fourrier *et al.*, 2008). Während einer Kälteakklimatisierung, werden zum Schutz kälteregulierende (*cold-regulated* COR) Proteine, COR15A und COR15B, im Chloroplasten angereichert (Nakayama *et al.*, 2007; Thalhammer und Hinch, 2014), welche eine Funktion bei der Stabilisierung der Membranen übernehmen, wie über eine Messung der elektrischen Leitfähigkeit nachgewiesen werden konnte (Thalhammer *et al.*, 2014). Um eine Dehydrierung der Pflanzenzelle zu simulieren, wurden isolierte COR15A Proteine in einer hohen Konzentration an Glycerol untersucht und dabei eine Faltung in α -helikale, hexagonale II (H_{II})-Strukturen nachgewiesen und faltungsbedingt eine periphere Einlagerung der α -helikalen Domänen in die Membran (Bremer *et al.*, 2017). Dabei sind für eine Veränderung der intrinsischen Beugungsstruktur der Lipidmembran nicht nur COR15A Proteine notwendig, sondern auch ungesättigte Galaktolipide in der Lipidmembran, die mit ihren polaren und geladenen Kopfgruppen die Proteine zur Membranfaltung stabilisieren (Navarro-Retamal *et al.*, 2018). Um Veränderungen an der chloroplastidären Proteinzusammensetzung während der Kälte zu untersuchen, wurden aus dem Blattextrakt von kältegestressten *A. thaliana* Pflanzen massenspektrometrische Proteomanalysen durchgeführt (Trentmann *et al.*, 2020). Dabei zeigten 38 Hüllproteine eine kältebedingte Regulation, darunter einige Transporter wie der ATP/ADP Antiport Nukleotid Transporter 2 (NTT2) mit einer dreifachen Erhöhung der Expression und dem Maltose Exporter (MEX1) mit einer Erniedrigung der Expression. Davon waren mindestens vier Proteine im Lipidmetabolismus involviert, darunter die beiden Untereinheiten TGD2 und TGD3 des PA Transfer Komplexes TGD und der Fettsäuretransporter FAX1 mit einer dreifachen Verringerung der Proteinmenge (Trentmann *et al.*, 2020). In Vorversuchen wurde bereits gezeigt, dass das Pflanzenwachstum der *fax1-1* and *fax1-2* T-DNA Insertionsmutanten bei Kältebedingungen (konstant 10°C) deutlich verlangsamt war, sodass FAX1 eine mögliche Funktion bei der Kälteakklimatisierung übernehmen könnte, genauso wie die putativen, chloroplastidären Fettsäuretransporter FAX2 und FAX3.

2 Zielsetzung

Obwohl FAX1 nachweislich an der Fettsäure- und Lipidhomöostase in Pflanzenzellen beteiligt ist (Li *et al.*, 2015; Roberts, 2015; Xiao *et al.*, 2019), scheint es, dass in beiden *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten nicht der komplette Fettsäurenexport aus dem Chloroplasten beeinträchtigt ist. Andere FAX Proteine könnten am Fettsäuremetabolismus und -transport beteiligt sein und das Fehlen von FAX1 ersetzen.

Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Themen bearbeitet:

- i. Definition der pflanzlichen FAX Proteinfamilie
- ii. Subzelluläre Lokalisation der potentiell plastidären FAX2 und FAX3 Proteine
- iii. Charakterisierung der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten unter Normal- und Kältebedingungen
- iv. Untersuchung der Expression der FAX Gene in der homozygoten *fax1-2* Mutante
- v. Charakterisierung von homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten auf Agarmedium und Erde sowie Untersuchung der Segregation der *fax1-2* Mutation in einem homozygoten *fax3 knockout* Hintergrund

3 Material

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applichem (Darmstadt), BioCat GmbH (Heidelberg), Bionline GmbH (Luckenwalde), Biomol GmbH (Hamburg), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Difco (Detroit, USA), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Penzberg), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA).

3.2 Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) und die Blunting Enzyme von Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA) bezogen. Die T4 DNA Ligase, sowie die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase stammten von New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA). Die Taq-Polymerase wurde von der AG Biochemie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Die M-MLV Reverse Transkriptase stammte von Promega GmbH (Mannheim), die RNase von AppliChem GmbH (Darmstadt), Cellulase »Onozuka« R10 von Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Macerozym R10 von Yakult Honsha Co. LTD (Tokio, Japan).

3.3 Kits

Die Aufreinigung und Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, die Isolierung von Plasmid DNA aus *Escherichia coli* (*E.coli*) mit dem Kit NucleoBond x-tra Midi Plasmid Prep und die RNA Isolierung aus *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) Pflanzen erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA Plant and Fungi Kit. Alle aufgezählten Kits stammten von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren). Die Klonierung der RNAi Konstrukte erfolgte mithilfe der Gateway Klonierung mit dem pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit von Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA).

3.4 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden von Metabion international AG (Planegg) synthetisiert Oligonukleotide verwendetet (siehe Tab. 3.1). Diese wurden zur Klonierung, Genotypisierung und Überprüfung der Mutantenlinien sowie für die quantitative Echtzeit RT-PCR herangezogen.

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligoname	Sequenz (5'-3')	Anwendung
fax1_LP fax1_RP LB1 SAIL GABI-LBseq At-FAX2 LC-NTfw At-FAX2 LC-NTrev Tag5 IJPB fax3_LPnew fax3_RP	TTTCTTCGCAACATTTTGACC AGTGGAGACACTATCAATCCC GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC ATATTGACCATCATACTCATTGC AAACCCTAATTCCACCTTG GTATGCCTCCGATGACA CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC CAATTCAGAACACTTCCGAACC GGAACTCAAATCAAATCCGC	Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien
T-DNA fw T-DNA rev	ATCAGATCTCGGTGACGGGC AGGAACCGCAGGAGTGGACG	T-DNA Hintergrundinsertion
Ps-FAX2 fw0 Ps-FAX2-rev Ps-FAX3 fw Ps-FAX3 rev	ATTCACATTACTTCATTTCAAAACCCTTC GGTTCAAACCTTGGGAAGGTGAAGCAGGA ATGGCGGTTTTAGGCCTTTTCG CGGAATTATGCGTAGTAGTTCCGCACTAG	Klonierung für <i>Ps-FAX2</i> und <i>Ps-FAX3</i>
FAX1-RNAi fw (+cacc) FAX1-RNAi rev FAX2-RNAi fw (+cacc) FAX2-RNAi rev FAX3-RNAi fw (+cacc) FAX3-RNAi rev FAX4-RNAi fw (+cacc) FAX4-RNAi rev	CACCTAAGTACTGGTGTCTCTATGGTGG TTCTTTGGAGGTGGGTTTCC CACCTTATGGTCTACTCTTGCTTG TTTCTCTCTTGACCACCATCTTGAC CACCTCTGTCTATGTCGCAGAAGTTGAC AGACATGATCGACACAACCTCCAG CACCGCTACTTATGGTGTACTTCTTCTAG ATATACGCCATGACAAAGAAGGAC	Klonierung und Sequenzierung der <i>RNAi</i> -Linien
35S fw At-FAX2 LC-NTrev At-FAX3 LC-NTrev pJet1.2 fw pJet 1.2 rev M13 fw (-20) M13 rev GW RNAi-INT fw GW RNAi-INT rev attB1 attB2	GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGG GTATGCCTCCGATGACA AATTTATCACCTCCAATTC GCCTGAACACCATATCCATCC GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC GTAAAACGACGGCCAG CTGGCCGTCGTTTTAC TTTGCAGGTCAGCTTGACACTG CCCCTAAGCGTGACCAGATAAAC ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Sequenzierung
AtAct2/8_fw AtAct2/8_rev FAX1 LCfw FAX1 LCrev FAX2 LC E2 fw FAX2 LC E5 rev FAX3 LC-CT fw FAX3 LC-CT rev FAX4 LC-CT fw FAX4 LC-CT rev FAX5LCfw FAX5LCrev FAX6LCfw FAX6LCrev FAX7LCfw FAX7LCrev	GGTGATGGTGTGTCT ACTGAGCACAATGTTAC CCTATGATTCGTCCCCAG CACTCACAACGAGACCA AAGCGAAAGTGGTTAGTGA AGGAACGTCGATTTCTG TTCTCGTCGGAGTTGG GAGTGTTTGCTACTGCTT TAGGAGGCGGTCTCTT CAACCTCATGCTCTCATC GGAAGTATTGCATCTCTCG ATCCATATACCTTATTTCAACAGT GGGATGCTTCTCATCGG CCACCAGTAGCGATCT TCATCTTTGTGCGCAGAGGT CTTGAGCGAATGAGGC	Quantitative RT- PCR
FAX1 LC new fw FAX1 LC new rev	CTTCTTGGTTTTGCGTTTTTAC AGTATGAAGGACTAGTCGCAGATGG	qRT-PCR auf <i>FAX1 RNAi</i>

3.5 Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierung der jeweiligen Konstrukte wurden in dieser Arbeit folgende Plasmid-Vektoren verwendet (siehe Tab. 3.2).

Tab. 3.2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmid Vektoren.

Plasmid-Vektor	Verwendung	Hersteller
pB7GWIWG2 (I) pH7GWIWG2 (I)	RNAi, konstitutiv Gateway Klonierung	Plant Systems Biology (University of Gent, Belgien)
pJET1.2	Klonierung zur Sequenzierung	Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA)
pCR-Blunt	<i>Ps</i> -FAX2 Klonierung	
pENTR	Entry-Vektor für GATEWAY- Klonierung	

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmid-Konstrukte aufgeführt (siehe Tab. 3.3).

Tab. 3.3: In dieser Arbeit hergestellten Plasmid-Konstrukte.

Insert	Plasmid-Vektor	Verwendung
Ps-FAX2 (mit fw0)	pCR-Blunt	Klonierung für <i>Ps</i> -FAX2 Sequenzierung
<i>FAX2-1</i>	pJet1.2	Sequenzierung der <i>fax2-1</i> T-DNA Insertionslinie
FAX1-RNAi FAX2-RNAi FAX3-RNAi FAX4-RNAi FAX2-RNAi FAX3-RNAi	pH7GWIWG2(I) pH7GWIWG2(I) pH7GWIWG2(I) pH7GWIWG2(I) pB7GWIWG2(I) pB7GWIWG2(I)	Klonierung der RNAi-Linien mithilfe der GATEWAY-Rekombination

3.6 Molekulargewicht- und Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde als Größenstandard der EasyLadder I von BioCat GmbH (Heidelberg) verwendet. Für die SDS-PAGE diente der Roti®-Mark TRICOLOR von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) als Molekulargewichtsstandard.

3.7 Antikörper

In dieser Arbeit wurden gegen *Arabidopsis thaliana* (*At*) und *Pisum sativum* (*Ps*) Proteine gerichteten Antikörper verwendet (siehe Tab. 3.4). Diese stammen aus Kaninchen und wurden von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) bezogen.

Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper	Name	Hersteller
primär	At-FAX1 NT Ps-FAX1 NT Ps-FAX1 CT Ps-FAX2 Ps-FAX3	Pineda Antikörper-Service (Berlin)
	Ps-OEP16 LHCP FBPase	AG Prof. Soll, Department Biologie I, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München
sekundär	α -Kaninchen-IgG alkal. Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

3.8 Bakterienstämme

Für die Klonierung in *Escherichia coli* (*E.coli*) wurden die Stämme TOP10 und Mach1 von Thermo Fischer Scientific Corporation (Waltham, USA) verwendet. Für die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) mittels dem *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) wurde der Stamm GV3101::pMP90RK (Koncz und Schell, 1986) hergezogen.

3.9 Pflanzenmaterial

Bei den Experimenten mit *A. thaliana* wurde der Ökotyp Col-0 (Columbia 0, NASC Nr. N1093) von Lehle (Round Rock, USA) und Ws-4 (Wassilewskija, NASC Nr. N5390) von NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center in Nottingham, United Kingdom) als Wildtyp zur Kontrolle verwendet. Die T-DNA Insertionslinien GABI_599E01 (*fax1-2*), sowie die Linien FLAG_426D07 (*fax2-1*) und FLAG_454B11 (*fax3-1*) mit einer pGKB5 T-DNA Insertion (Bouchez *et al.*, 1993), wurden ebenfalls von NASC bezogen. Die *fax2/3* Doppelmutante wurde in dieser Arbeit über eine Kreuzung homozygoter *fax2-1* Pflanzen (Linie #18 und #21) mit homozygoten *fax3-1* (Linie #4) erzeugt. Die *fax1/3* Doppelmutante wurde über die Kreuzung von heterozygoten *fax1-2* Mutanten mit homozygoten *fax3-1* Mutanten generiert. In der F3 Generation wurden die Linien über eine PCR-Genotypisierung selektiert und der Transkriptverlust über eine quantitative Echtzeit RT-PCR überprüft.

4 Methoden

4.1 Anzuchtbedingungen für Pflanzen

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter nicht sterilen Bedingungen auf Erde oder unter sterilen Bedingungen auf MS-Agarmedium in Petrischalen. Die nicht sterile Aussaat von *A. thaliana*-Samen erfolgte auf Erde (Potground H, Geeste, Deutschland) mit Vermiculit (Verhältnis 3:1), wobei die Samen mit einem Zahnstocher auf die befeuchtete Erdoberfläche gelegt wurden. Für die Aussaat auf MS-Agarmedium (1% Saccharose; 0,05% MES; 0,5% MS; 0,8% Agar-Agar, pH 5,8 mit KOH) wurden die Samen einzeln mit sterilen Zahnstochern ausgesät. Dafür wurden die *A. thaliana* Samen oberflächlich mit Ethanol und einer 5%-igen Hypochlorid Lösung sterilisiert. Zur Selektion der transformierten *A. thaliana*-Pflanzen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (25 µg/ml Hygromycin oder 25 µg/ml Kanamycin) bzw. ein Herbizid (50 µg/ml BASTA) beigemischt. Es wurden 10 mg Samen in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß abgewogen und in einem Exsikkator über Nacht mit Chlorgas bedampft, welches sich aus 20 ml einer 12%-igen Natriumhypochloridlösung und 1 ml rauchender Salzsäure bildete. Nach der Aussaat auf MS-Agarmedium oder Erde erfolgte eine Stratifikation der Samen für 1 bis 3 Tage im Dunkeln bei 4°C, um den Keimungsbeginn zu synchronisieren. Die Agarplatten wurden nach der Stratifikation in einen Anzuchtschrank mit Langtags-Bedingungen gestellt (16 Stunden 100 µmol m⁻² s⁻¹ Licht bei 21°C und 8 Stunden Dunkelheit bei 16°C). Die Pflanzenanzucht auf Erde erfolgte im Anschluss in Klimaschränken bei Kurztags- (8 h Licht mit 100 µmol m⁻² s⁻¹ bei 21°C und 16 h Dunkelheit bei 16°C) oder Langtags-Bedingungen (16 h Licht mit 100 µmol m⁻² s⁻¹ bei 21°C und 8 h Dunkelheit bei 16°C) und einer Luftfeuchtigkeit von 60%. Während der Blüte wurden die Pflanzen bei einem Sollwert von 22°C und bei 30% Luftfeuchtigkeit in einer Langtag-Klimakammer angezogen.

4.2 Stabile Transformation von *A. thaliana*

Die mit *A. tumefaciens* vermittelte, stabile Transformation von *A. thaliana*, erfolgte mithilfe der *floral-dip* Methode nach Bechtold *et al.*, (1993). Drei Tage vor der Transformation wurden 10 ml LB-Medium mit Rifampicin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und dem entsprechenden Antibiotikum der plasmidvermittelten Resistenz mit den transformierten Agrobakterien des Stammes GV3101::pMP90RK angeimpft und für 48 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Am Tag vor der Transformation wurden 500 ml LB-Medium (mit den jeweiligen Antibiotika) mit der Vorkultur beimpft und für 24 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Die zu transformierenden 4 bis 6 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen (Generation T₀), wurden ebenfalls am Tag vor der Transformation vorbereitet, indem die bereits vorhandenen Schoten entfernt

und die Pflanzen anschließend zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit und somit maximalen Öffnung der Stomata, luftdicht unter eine Haube auf eine Anzuchtschale gelegt wurden. Am Tag der Transformation wurden 500 ml Agrobakterien Kultur für 10 min bei 4°C und 5500xg zentrifugiert und das Pellet in 400 ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose; 0,215% MS; 0,05% Silwet L-77) resuspendiert. Die Blütenstände der *A. thaliana* wurden in die Agrobakterien-Suspension in einem Gefäß im Exsikkator getaucht und unter Vakuum für ca. 30 sec infiltriert. Über Nacht wurden die Pflanzen unter einer Haube in eine Anzuchtschale gelegt. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen schonend mit Wasser gewaschen und anschließend bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. Die Samen aus der T1 Generation wurden auf MS-Agarmedium mit entsprechendem Antibiotikum oder Herbizid auf eine positive Transformation mit dem entsprechenden Transformations-Konstrukt selektiert.

4.3 Anzuchtbedingungen von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte schüttelnd bei 180 rpm und 37°C in LB- (*lysogeny broth*) Medium (1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl). Bei der Anzucht auf LB-Agarmedium wurden 1,5% Agar zugesetzt. Bei einer entsprechenden Selektion aufgrund der plasmid-codierten Resistenz, wurde dem Medium entsprechende Antibiotika dazugegeben (100 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Spectinomycin). Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte schüttelnd bei 180 rpm und 28°C in LB-Medium oder auf LB-Agarmedium. Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde der Stamm GV3101::pMP90RK (Koncz und Schell, 1986) eingesetzt und dem Medium die Antibiotika Rifampicin (100 µg/ml, chromosomale Resistenz), Kanamycin (50 µg/ml, Resistenz durch Ti-Plasmid) sowie das Antibiotikum entsprechend der plasmid-vermittelnden Resistenz hinzugefügt.

4.4 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* und *A. tumefaciens* Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Durch Hitzeschock kam es zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien (Maniatis *et al.*, 1982). Für die Herstellung transformations-kompetenter Agrobakterien wurden 500 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Rifampicin; 50 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Carbenicillin) mit Agrobakterien angeimpft und für ca. 30 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 6000xg pelletiert und in 50 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 6000xg, wurde das Pellet in 20 ml LB-Medium resuspendiert und die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots bei -80°C bis zur Transformation

eingefroren. Für die Transformation wurden 1 bis 2 µg Plasmid-DNA zu einem Aliquot Agrobakterien gegeben und dieses 5 min auf Eis und anschließend 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert und danach für 5 min bei 37°C in einen Heizblock gestellt. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium hinzu pipettiert und die Agrobakterien für 4 h bei 28°C und 700 rpm im Heizblock kultiviert. Nachdem die Bakterien für 2 min bei RT und 3220xg pelletiert wurden, wurden sie in 70 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agarmedium mit den jeweiligen Antibiotika (siehe Kap. 4.3) ausgestrichen und für drei Tage bei 28°C inkubiert.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die DNA Fragmente zur Klonierung, zur Genotypisierung oder zum Nachweis positiver Transformation von Bakterien wurden mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Saiki *et al.*, 1988). Dazu wurden die Taq DNA Polymerase, zur Verfügung gestellt von der AG Biochemie der UdS, und der 25-fach Puffer von New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) benutzt. Die PCR wurde in Ansätzen von 25 µl (2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,8 µM Primer fw; 0,8 µM Primer rev; 1 U/25 µl Taq) durchgeführt und durchlief zwischen einer Denaturierung für 3 min bei 95°C und einer finalen Elongation für 3 min bei 72°C, 35 Zyklen: 45 sec bei 95°C (Denaturierung), 45 sec bei der entsprechenden Annealing-Temperatur der Primer, 1 min bei 72°C (Elongation). Bei der Kolonie-PCR wurde eine initiale Denaturierung von 5 min durchgeführt.

4.6 Klonierung

Die DNA-Gelelektrophorese, der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und die Ligation von DNA erfolgten nach Maniatis *et al.*, (1982) sowie nach Angaben der Enzymhersteller. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen erfolgte mit dem DNA, RNA und Protein purification Kit (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG). Die LR-Rekombination wurde nach dem GATEWAY System mit dem Gateway™ LR Clonase™ II Enzym Mix (Thermo Fischer Scientific Corporation) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die *FAX2-1* Klonierung in den pJET1.2/blunt Vektor erfolgte nach Protokoll des CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham Massachusetts, USA).

4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Zellen erfolgte, in Anlehnung an das Protokoll von Zhou *et al.* (1990), durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 4 ml Übernachtskulturen. Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoBond x-tra Midi Plasmid Prep von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG nach Herstellerangaben isoliert.

4.8 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Zur Isolierung genomischer DNA aus mehr als 3 mg Pflanzenmaterial, wurden ein bis zwei junge Rosettenblätter bzw. Keimlinge ohne Wurzeln in einem 2 ml Reaktionsgefäß geerntet und mit 500 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 100 µg/ml RNase) und zwei 3 mm Wolframcarbidkugeln in einer Kugelmühle (TissueLyser, Quiagen GmbH, Hilden) für 3 min bei einer Frequenz von 30/sec, homogenisiert. Der RNase Verdau wurde für 5 min bei 37°C durchgeführt. Das Homogenisat wurde anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei 11.700*

zentrifugiert und 300 µl des klaren Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 300 µl (-20°C) kalten Isopropanols vorgelegt waren. Durch das Invertieren und anschließendes Inkubieren für mindestens 5 min bei 4°C erfolgte die Fällung der DNA. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 11.700xg wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 300 µl (-20°C) kalten, 70%-igen Ethanol während mehrmaligen Invertierens des Reaktionsgefäßes, gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 11.700xg, der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Zur Genotypisierung wurden für einen PCR-Ansatz von 25 µl ein Volumen von 5 µl DNA eingesetzt.

Für die Isolierung aus kleinen Keimlingen mit wenig Pflanzenmaterial (0,2 bis 3 mg), wurden einige Änderungen bei der DNA-Isolierung vorgenommen. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst im flüssigen Stickstoff, pro Keimling je ein 2 ml Reaktionsgefäß, schockgefroren. Danach erfolgte der Aufschluss des Pflanzengewebes mit einem Elektropistill und anschließend wurden 200 µl Extraktionspuffer dazugegeben. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll, jedoch wurde die DNA in 20 µl H₂O gelöst.

4.9 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch am Infinite F200 Pro von Tecan (Männedorf, Schweiz). Die Absorption einer verdünnten Probe wurde bei 260 nm und 320 nm gemessen und im Anschluss die Konzentration in µg/µl automatisch berechnet. Um eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen festzustellen, wurde außerdem die Absorption der Probe bei 280 nm ermittelt, wobei das Verhältnis E₂₆₀/E₂₈₀ bei reinen Nukleinsäuren 1,8 beträgt.

4.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente und ganzer Plasmide erfolgte mit dem Mix2Seq Kit von Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg) und wurde extern durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotiden sind in Tab. 3.1 aufgeführt..

4.11 RNA-Isolierung aus *A. thaliana*

Zur Isolierung von RNA aus *A. thaliana* wurden Keimlinge auf MS-Agarmedium oder Pflanzen auf Erde bei Langtags-Bedingungen (16 h Licht mit $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 21°C und 8 h Dunkelheit bei 16°C) angezogen. Mit dem entsprechenden Alter wurde das Pflanzenmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Für die Isolierung wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial oder ganze Keimlinge eingesetzt und mit dem Kit NucleoSpin® RNA Plant and Fungi von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und der relative Transkriptgehalt über eine quantitative Echtzeit *real-time* (qRT) -PCR überprüft.

4.12 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte in einem Ansatz von 10 μl und einem Einsatz von 0,5 bis 1 μg RNA unter Verwendung von 4 μM oligo-dT Primern, 0,5 mM dNTPs und 2 Units der M-MLV Reversen Transkriptase von Promega GmbH (Mannheim). Die RNA, Primer und dNTPs wurden in einem 1x Reverse Transkriptase-Puffer aufgenommen und für 2 min bei 70°C und danach auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Trankriptase folgte eine Inkubation bei 42°C für 90 min.

4.13 Quantitative Echtzeit *real time* (qRT) -PCR

Für die quantitative Bestimmung von cDNA Kopien in einer Probe wurde eine 1:20 Verdünnung der cDNA eingesetzt, die PCR nach Herstellerangaben mit dem FastStart DNA Master SYBR-Green Plus Kit von Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) angesetzt und die cDNA mit dem PCR-Ansatz in Glaskapillare (Roche Diagnostics GmbH) pipettiert und bei 2000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die PCR erfolgte im LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) und durchlief 45 Zyklen mit dem Aufbau: 1 sec bei 95°C (Denaturierung), 7 sec bei 56°C (Annealing), 19 sec bei 72°C (Elongation) und 5 sec bei 95°C (Denaturierung). Folgende Kombinationen der Oligonukleotid-Primer wurden für die Amplifikation der jeweiligen, spezifischen PCR-Produkte verwendet: FAX1: FAX1 LCfw / FAX1 LCrev (265 bp), FAX2: FAX2 LC E2 fw / FAX2 LC E5 rev (388 bp), FAX3: FAX3 LC-CT fw / FAX3 LC-CT rev

(303 bp), FAX4: FAX4 LC-CT fw / FAX4 LC-CT rev (342 bp), FAX5: FAX5LCfw / FAX5LCrev (347 bp), FAX6: FAX6LCfw / FAX6LCrev (306 bp) und FAX7: FAX7LCfw / FAX7LCrev (317 bp) (Primerbindestellen siehe Abb. 4.3). Zur Quantifizierung wurden die Ergebnisse mit den in den Proben enthaltenen Ausgangsmengen an Aktin normalisiert, wofür zusätzlich PCR-Produkte des Aktin AtACT2 (At3g18780) jeder Probe, mit dem Primerpaar At-ACT28_fw / At-ACT28_rev (435 bp) amplifiziert wurden. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer Probe errechnete sich anhand folgender Beziehung:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{Aktin})-n(\text{Gen})]}$$

Der Exponent zur Basis 2 errechnet sich aus der Differenz der Zyklusanzahl_(Aktin) und Zyklusanzahl_(Gen). Die Zyklusanzahl gibt an, nach wie vielen Zyklen das jeweilige Amplifikat einen festgelegten Schwellenwert erreichte. Dieser Schwellenwert war bei allen miteinander verglichenen Proben identisch. Die der Schwellenwertbestimmung zuzuordnenden Messpunkte lagen dabei innerhalb der exponentiellen Phase der PCR.

4.14 Klonierung der RNAi-Konstrukte

Für die Herstellung der RNAi-Konstrukte wurde das Gateway Invitrogen System (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, USA) herangezogen. Bei der gerichteten Klonierung des Zielgens in den pENTR D-topo Vektor, dient ein CACC-Überhang am 5'-Ende als Erkennungssequenz für die Topoisomerase. Bei der Gateway Rekombination wurde mithilfe der LR Clonase das Insert auf dem pENTR Plasmid mit dem ccdB Gen (induzierbares Markergen aus *E.coli* produziert Gyrase, lethal für Pflanzen) auf dem Zielvektor ausgetauscht (siehe Abb. 4.1). Dabei wurden pro Rekombination zwei PCR-Fragmente an den Stellen attB1 und attB2 des pENTR Plasmids mit den Stellen attR1 und attR2 des Zielvektor anstelle des ccdB inseriert. Als Zielvektoren wurden die binäre Pflanzenvektoren pB7GWIWG2 (I) mit einem Glufosinat-Resistenzmarker und pH7GWIWG2 (I) mit einem Hygromycin-Resistenzmarker verwendet (siehe Abb. 4.1).

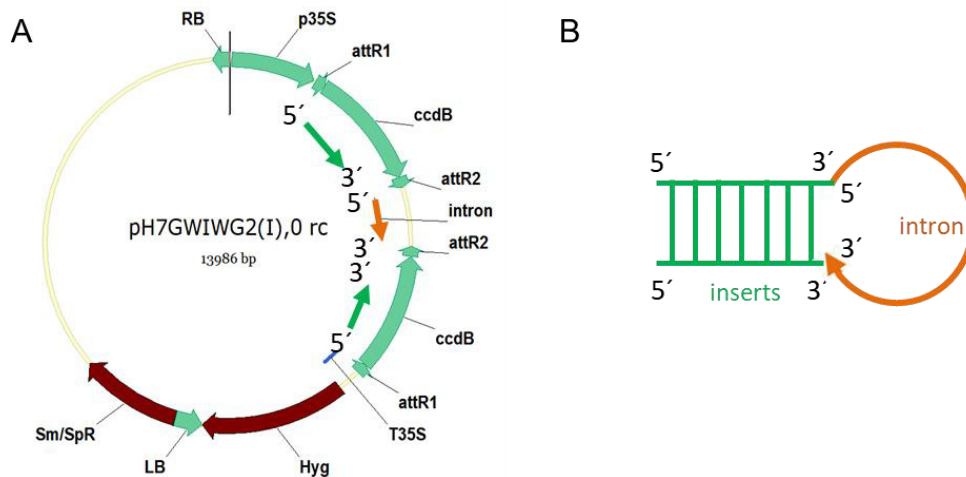


Abb. 4.1: Vektorkarte des binären Pflanzenvektors pH7GWIWG2 (I) zur Herstellung von *knockdown* Mutanten mit einem RNAi-Konstrukt. (A) Gezeigt ist der pH7GWIWG2 (I) Zielvektor mit einem Hygromycin-Resistenzmarker (Hyg) für Pflanzen und einer Resistenz gegen Spectinomycin (Sm/SpR) zur Selektion in Bakterien, konstitutiv exprimiert unter dem 35S-Promotor (p35S) und mit einem 35S-Terminator (T35S). Die Insertion der entsprechenden Konstrukte erfolgt über die Left- (LB) und Rightborder (BR). (B) Durch die Zusammenlagerung der Inserts bildet das Intron eine Haarnadelstruktur (*hairpin*) aus.

Im Laufe der Klonierung wurde festgestellt, dass einige Inserts in der falschen Orientierung in den Zielvektor eingebaut wurden, was zu einer falschen Ausrichtung des Introns führt, sodass keine *hairpin* Struktur ausgebildet wird. Zur Überprüfung der Orientierung des Introns im Zielvektor wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *XbaI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt, der das Intron in zwei unterschiedlich lange Fragmente schneidet (siehe Abb. 4.2).

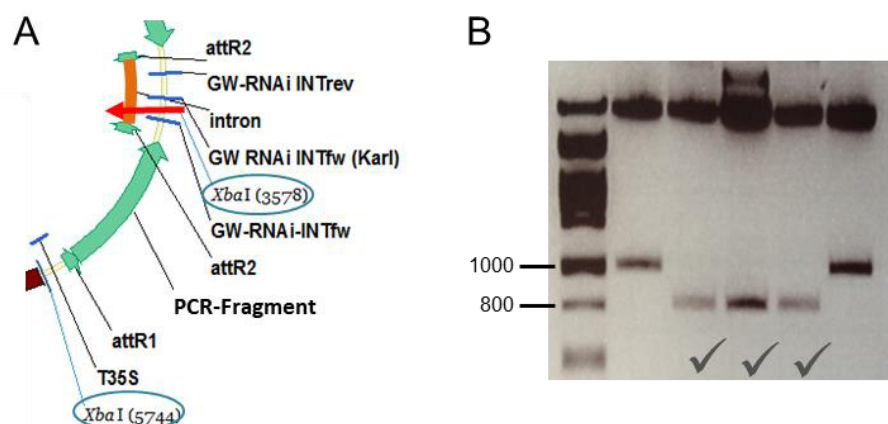


Abb. 4.2: *XbaI* Restriktionsverdau zur Überprüfung der RNAi-Konstrukte. (A) Dargestellt sind die *XbaI* Restriktionsschnittstellen auf dem RNAi-Vektor mit einer richtigen Orientierung des Introns. Eine liegt außerhalb der Insertstelle für das PCR-Fragment, hinter dem 35S-Terminator; die zweite liegt auf dem Intron. Die Primer GW-RNAi INT wurden zur Sequenzierung benutzt. (B) Aufgetragener *XbaI* Restriktionsverdau auf einem 1,5%-igen Agarosegel und einer erwarteten Fragmentgröße von 989 bp. Dabei wurden bei 40% von 20 untersuchten Plasmiden eine gewünschte Orientierung des Introns festgestellt.

Aufgrund eines Fehlers im System führt der *XbaI* Verdau zu einer Restriktionsschnittstelle im Intron und damit zu zwei unterschiedlich großen Fragmenten, sodass anhand der Größe der verdauten Fragmente die Orientierung des Introns bestimmt werden konnte. Dabei wiesen Fragmente mit der kleineren Größe (989 bp), die gewünschte Orientierung auf (siehe Abb. 4.2). Nach einer erfolgreichen Klonierung der RNAi-Konstrukte und anschließender Amplifikation der entsprechenden Plasmide in *E.coli* Top10 Zellen, wurden die Plasmide mithilfe des *A. tumefaciens* in den *A. thaliana* Wildtyp Columbia-0 von Lehle (Round Rock, USA) transformiert. Ebenfalls war mit den RNAi-Konstrukten die Herstellung von FAX Doppelmutanten möglich, indem die *FAX2*-, *FAX3*- und *FAX4*-RNAi Konstrukte in heterozygote Pflanzen der *fax1* Mutante (unabhängige T-DNA Insertionslinien *fax1-1* und *fax1-2*) transformiert wurden. Dafür wurde die *fax1-1* Linie #1 und *fax1-2* Linie #29, beide aus der T4 Generation, verwendet. Dabei wurden die RNAi-Konstrukte mit einer Hygromycin-Resistenz in Pflanzen in beide unabhängigen *fax1* Linien transformiert. Die *FAX2*- und *FAX3*-RNAi Konstrukte mit einer Glufosinat-Resistenz wurden nur in die T-DNA Insertionslinie *fax1-2* transformiert. Nach der Transformation der Pflanzen, wurde die T1 Generation auf den entsprechenden Agar-Selektionsmedien mit dem entsprechenden Antibiotikum (25 µg/ml Hygromycin) bzw. einem Herbizid (50 µg/ml BASTA) selektiert, die Keimlinge auf Erde überführt, mittels PCR genotypisiert und die Samen in der T1 Generation erfolgreich vermehrt. Nach erfolgreicher Genotypisierung wurde der relative Transkriptgehalt der *FAX*-RNAi Linien über eine quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR) überprüft. Die Primer-Bindestellen auf der cDNA sind in Abb. 4.3 dargestellt.

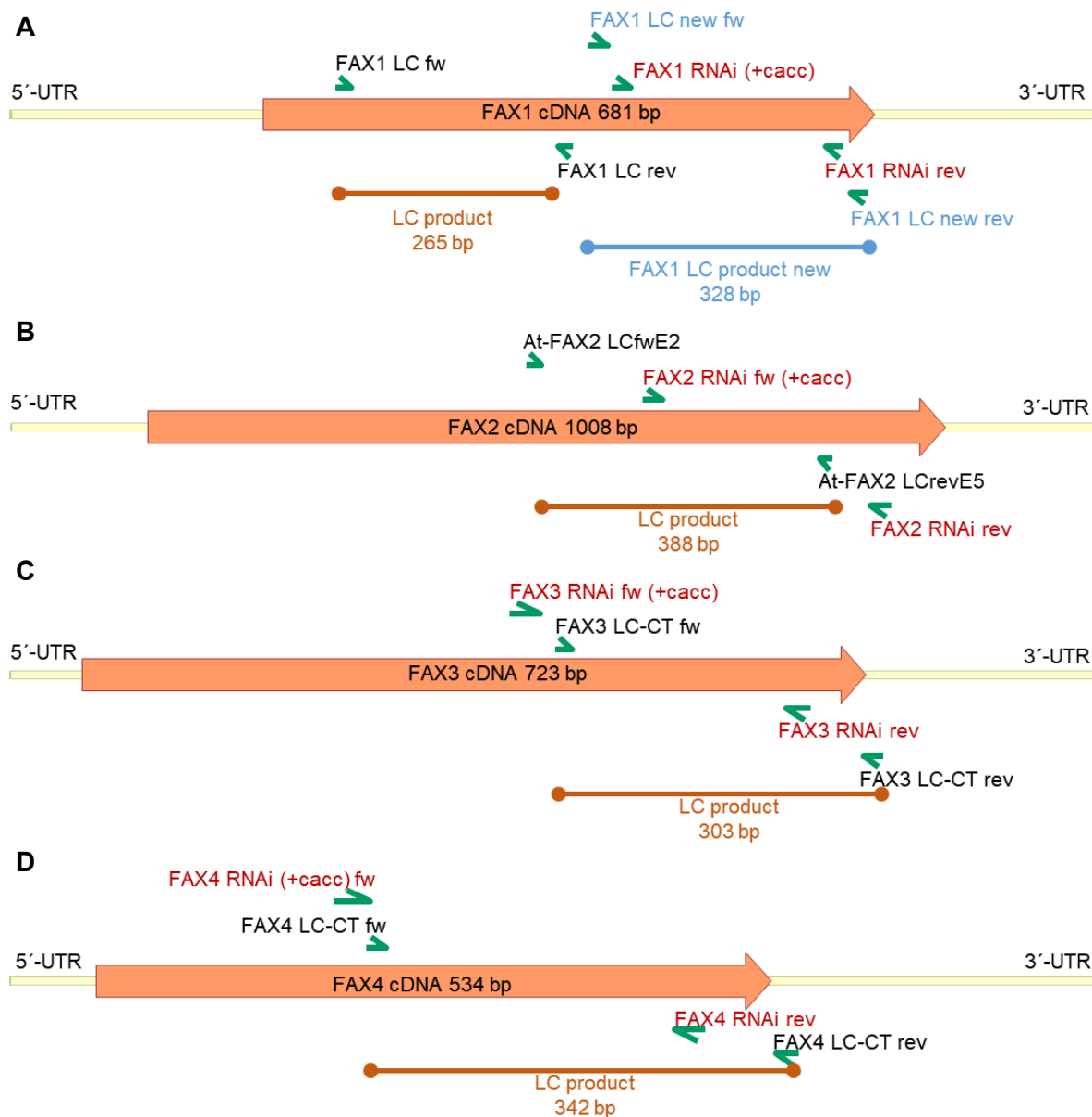


Abb. 4.3: Primerbindestellen der *FAX1* bis *FAX4* RNAi Konstrukte und qRT-PCR. Dargestellt sind die mRNA Sequenzen für (A) *FAX1* (1030 bp), (B) *FAX2* (1366 bp), (C) *FAX3* (997 bp) und (D) *FAX4* (856 bp) mit der entsprechenden 5'- und 3'-untranslatierten Region (UTR) sowie die jeweilige cDNA Sequenz (orangener Pfeil). Die grünen Pfeile markieren die Primerbindestellen bei der Klonierung der *FAX1*-, *FAX2*-, *FAX3*- und *FAX4*-RNAi Konstrukte (rote Primernamen), wie auch die Primerbindestellen für die qRT-PCR zur Bestimmung des relativen Transkriptgehaltes (schwarze Primernamen). Das entstehende qRT-PCR Produkt (LC product) ist mit einem orangenen Strich markiert. Für *FAX1* wurden neue Primer zur qRT-PCR erstellt (blaue Primernamen).

Die vorhergesagte Länge der *At-FAX1* mRNA (NCBI Referenzsequenz NM_15588) beträgt 1.030 bp mit einer 681 bp langen cDNA Sequenz (siehe Abb. 4.3). Die vorhergesagte Länge der *At-FAX2* mRNA (NCBI Referenzsequenz NM_129412.4) ist 1.366 bp lang und hat einen 1008 bp langen codierenden Bereich. Die *At-FAX3* mRNA (NCBI Referenzsequenz NM_114220.4) ist 997 bp lang mit einer 723 bp langen cDNA. Die vorhergesagte Länge der *At-FAX4* mRNA (NCBI Referenzsequenz NM_103055.4) beträgt 856 bp mit einem 534 bp

langen codierenden Bereich (siehe Abb. 4.3). Die erstellten RNAi-Konstrukte sind kürzer als 400 bp (263 bp für FAX1, 315 bp für FAX2, 278 bp für FAX3 und 294 bp für FAX4) und liegen in Richtung des C-Terminus (siehe Abb. 4.3). Die Primerbindestellen für die qRT-PCR liegen am C-Terminus und decken die RNAi-Sequenz ab. Die Bindestellen der ursprünglichen *FAX1* Primer für die qRT-PCR liegen nah am N-Terminus, da aber das RNAi-Konstrukt näher am C-Terminus lokalisiert ist, wurden neue FAX1 LC Primer erstellt, die näher am C-Terminus lokalisiert sind und die *FAX1*-RNAi Sequenz flankieren (siehe Abb. 4.3).

4.15 Isolierung der chloroplastidären Hüllmembranen aus Erbse

Die Isolierung von intakten Chloroplasten aus *Pisum sativum* (*P. sativum*) und anschließende Auftrennung in äußere und innere Hüllmembranen erfolgte nach der Methode von Waegemann *et al.* (1992). Als Ausgangsmaterial dienten 10 Tage alte Blätter von Erbsen, welche im Gewächshaus angezogen wurden.

4.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in einem denaturierenden Gel nach Laemmli (1970). Die Acrylamid-Konzentration betrug 12,5% und das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid war 30:1. Für das Sammelgel wurde 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 und für das Trenngel 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einem Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,25; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS) bei einer Spannung von 80 V bis die Proben-Lauffront das Trenngel erreichte und anschließend bei 120 V bis die Laufmittelfront das Gelende erreichte.

4.17 Immunodetektion von Proteinen

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur von VWR PEQLAB Company (Darmstadt) auf eine PVDF-Membran (Transmembran Immobilon-P, 0,45 µm; Merck KGaA) übertragen. Für den Transfervorgang wurden von der Anode ausgehend, drei mit Anodenpuffer I (300 mM Tris; 20% Methanol; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere, zwei in Anodenpuffer II (30 mM Tris; 20% Methanol; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere und darauf die in Methanol aktivierte und in Anodenpuffer II gewaschene PVDF-Membran gelegt. Das SDS-Gel wurde in Anodenpuffer II befeuchtet, auf die PVDF-Membran gelegt und von drei in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM Aminocaprinsäure; 20% Methanol; pH 7,6) getränkten Whatman-Filterpapieren bedeckt. Die Filterpapiere und die PVDF-Membran hatten die Maße des SDS-Gels und die Schichten des

Aufbaus berührten sich ohne Luft einschüsse. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche.

4.18 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch die Bindung polyklonaler Antikörper an die Proteine und eine Detektion über enzymgekoppelte, sekundäre Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelt an α -Kaninchen-IgG). Die PVDF-Membranen wurden für 30 min bei Raumtemperatur in Magermilch-Puffer (3% Magermilchpulver; 0,1% BSA; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl) geschüttelt, in TTBS (0,1% BSA; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,2% Tween 20) gewaschen und über Nacht bei 4°C in Verdünnungen (1:500 – 1:1000) des primären Antikörpers in Magermilchpuffer rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in TTBS gewaschen und für 45 min bei Raumtemperatur in einer Verdünnung des sekundären Antikörpers mit TTBS (Anti-Rabbit IgG-alkalische Phosphatase 1:6000) inkubiert. Nach zwei Waschschritten für je 2 min in TTBS und zwei Waschschritten für je 2 min in H₂O erfolgte die Detektion. Die Membran wurde für die Färbereaktion durch die alkalische Phosphatase in DIG-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂) unter Zugabe von 13,3 μ l/ml BCIP (12,5 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat in 100% Dimethylformamid) und 6,6 μ l/ml NBT (50 mg/ml 4-Nitrotetrazolium-chloridblau in 70% Dimethylformamid) inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 50 mM EDTA gestoppt.

4.19 Kälteleitfähigkeit in *A. thaliana*

Die Pflanzenanzucht und die Messung der elektrischen Kälteleitfähigkeit wurden in der Abteilung der Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Neuhaus an der TU Kaiserslautern durchgeführt. Um die Anpassung der unterschiedlichen *fax* Mutanten an Kältebedingungen zu untersuchen, wurde die Durchlässigkeit der Pflanzenmembran für Ionen über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit bestimmt. Dazu erfolgte die Pflanzenaussaat auf der Typ ED-73 Einheitserde (DIN 11540 80T) mit der Zusammensetzung von 0,3 g/l N, 0,3 g/l P₂O₅, 0,6 g/l K₂O und 2,0 g/l KCl und anschließender Stratifikation der Pflanzen im Dunkeln bei 4°C für 1 bis 3 Tage. Die Pflanzenanzucht erfolgte für vier Wochen in Klimakammern unter Kurztags-Bedingungen (10 h Licht mit 110 μ mol m⁻² s⁻¹) bei 20°C. Zur Untersuchung der Frosttoleranz bei vorheriger Kälteakklimatisierung wurden sechs Pflanzen einer Linie für 5 Tage bei 4°C gestellt und als Kontrolle sechs Pflanzen weiter bei 20°C wachsen gelassen. Danach wurde je ein Rosettenblatt in ein Glasröhrchen mit sterilem, deionisiertem Wasser transferiert und die Proben zur Temperaturregelung in ein 'RCS 6 Kompakt Kältethermostat

Bad´ von Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland) gestellt. Die Proben wurden für 1 h bei einer Temperatur von 0°C gehalten und anschließend die Temperatur pro Stunde um 1°C reduziert. Mit einer im flüssigen Stickstoff vorgekühlten Impföse wurde bei -1°C das Einfrieren des Wassers im Glasröhrchen induziert und die Temperatur pro Stunde um 1°C auf ein Minimum von -6°C gekühlt. Nach einem langsamen Auftauen wurden die Proben über Nacht bei 4°C geschüttelt, anschließend mit weiteren 3 ml sterilem, deionisiertem Wasser aufgefüllt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit erfolgte bei Raumtemperatur mit dem WTW LF521-Leitfähigkeitsmeter (Weilheim, Deutschland). Um die maximale Leitfähigkeit der Proben zu bestimmen, wurden diese 2 h aufgekocht, über Nacht geschüttelt und danach für einen Referenzwert erneut die Leitfähigkeit bestimmt.

4.20 Kältestress in *A. thaliana*

Zur Anpassung der Mutanten an Kälte, wurden zwei Versuchsreihen mit veränderten Bedingungen durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe wurden die Samen einzeln mit dem Zahnstocher auf die Erdoberfläche (Potground H, Geeste, Deutschland) in einzelne Töpfe gelegt. Die Voranzucht der Pflanzen erfolgte für 28 Tage unter Langtags-Bedingungen (16 h Licht mit $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 21°C und 8 h Dunkelheit bei 16°C und einer Feuchtigkeit von 60%). Für den Kältestress wurden die Pflanzen bei 4°C unter Langtags-Bedingungen (16 h Licht mit $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 21°C und 8 h Dunkelheit bei 16°C) angezogen.

In der zweiten Versuchsreihe wurden 10 mg Samen pro Linie in Pikierschalen ausgesät und die Keimlinge nach ein bis zwei Wochen im Vier-Blatt Stadium in Töpfe pikiert. Die Voranzucht erfolgte für 28 Tage bei Kurztags-Bedingungen (10 h Licht mit $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) konstant bei 22°C ohne eine Nachtabsenkung auf 16°C. Für den Kältestress wurden die Pflanzen bei 4°C unter Kurztags-Bedingungen (10 h Licht mit $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Familie der pflanzlichen FAX Proteine

Die Modellierung der FAX1 Proteinstruktur mit Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) zeigte eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der Transmembran (Tmemb) Region zu den humanen TMEM14 Proteinen, bestehend aus vier α -helikalen Tmemb Domänen, von denen drei die Membran durchspannen und eine amphiphile Domäne mit ihrem hydrophilen Bereich aus der Membran ragt (Klammt *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Familie der pflanzlichen FAX Proteine definiert und für jede FAX Unterfamilie aufgrund von konservierten Aminosäuren charakteristische Proteinmotive und Ladungen herausgestellt (siehe Abb. 5.1). Die *A. thaliana* FAX1 bis FAX7 Sequenzen wurden aus der Datenbank für pflanzliche Membranproteine, *Aramemnon* (AramLocCon; Schwacke *et al.*, 2003), herangezogen und diese für die Suche nach weiteren FAX Verwandten aus dem Pflanzenreich in der NCBI Datenbank (Geer *et al.*, 2009) verwendet. Dazu wurden sowohl evolutionär früh entwickelte Organismen, wie die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, das Laubmoos *Physcomitrella patens*, als auch höher entwickelte Pflanzen, Monokotyledonen wie *Oryza sativa* (Reis) und *Zea mays* (Mais) sowie Dikotyledonen wie *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Brassica rapa* (Raps), *Glycine max* (Soja), *Medicago truncatula* (Klee), *Pisum sativum* (Erbsen), *Beta vulgaris* (Zuckerrübe) und *Solanum lycopersicum* (Tomate) ausgewählt. Da sich die FAX1 bis FAX7 Proteine über ihre vier α -helikalen Tmemb Domänen ähneln, wurde zusätzlich zu der NCBI Suche, auch auf die Tmemb-Domäne von FAX1 (Proteinfamilie pfam 03647) eine Blast-Analyse in der Pfam Datenbank (Finn *et al.*, 2016) durchgeführt. Die gefundenen Proteinsequenzen wurden miteinander verglichen und aufgrund bestimmter Motive und Ähnlichkeiten zu einem der sieben FAX Proteine zugeordnet. Laut den Suchergebnissen finden sich FAX1 Proteine in allen untersuchten Arten, wohingegen FAX2 Proteine nur in Angiospermen zu finden sind. FAX3 Proteine wurden in allen untersuchten Organismen, außer der Zuckerrübe (*B. vulgaris*), gefunden. FAX4 und FAX7 Proteine finden sich in den Monokotyledonen Reis (*O. sativa*) und Mais (*Z. mays*), genauso wie in den Brassicaceae Ackerschmalwand (*A. thaliana*) und Raps (*B. rapa*). Ein FAX4 ähnliches Protein wurde auch in dem Laubmoos *P. patens* und ein FAX7 ähnliches Protein in der Grünalge *C. reinhardtii* identifiziert. Die FAX5 und FAX6 Proteine in *A. thaliana* stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 83% überein und lassen sich in anderen Pflanzenspezies nicht voneinander unterscheiden, wobei aber immer mindestens ein FAX5/6 ähnliches Protein in jedem untersuchten Organismus gefunden wurde (Könnel *et al.*, 2019). Die Zuordnung der

Sequenzen zu jedem FAX Protein erfolgte nach charakteristischen Proteinmotiven, die im Laufe der Suche herausgearbeitet wurden (siehe Abb. 5.1), sowie anhand von Transitpeptid-Vorhersagen mit den Programmen ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) und TargetP1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000). Bei einer Vorhersage eines chloroplastidären Transitpeptids (cTP) wurden die Präproteine auf die mature Proteinsequenz gekürzt. Dabei wurden bei FAX1, FAX2, FAX3 und FAX4 Proteinen ein cTP vorhergesagt, während bei FAX5, FAX6 und FAX7 kein cTP vorhergesagt wurde. Die Vergleiche der Proteinsequenzen zeigten einen konservierten Bereich in der Tmemb Region der FAX Proteine und einen für jedes FAX individuellen N- und C-terminalen Bereich. Für jedes FAX Protein wurde aus dem Vergleich der Sequenzen ein Konsensus erstellt und die Lücken in der Konsensus Sequenz mit den Aminosäuren aus der Proteinsequenz von *A. thaliana* aufgefüllt. Die Anordnung der Aminosäuren in den nach Aramemnon vorhergesagten Helices wurde mit dem Programm NetWheel (Mól *et al.*, 2018) modelliert und damit jeder Helix ein lipophiler oder amphiphiler Charakter zugewiesen. Anschließend wurde über den Konsensus der Sequenzvergleiche für jedes FAX Protein spezifische Proteinmotive und konservierte Ladungen der Aminosäuren-Seitenketten herausgestellt (siehe Abb. 5.1).

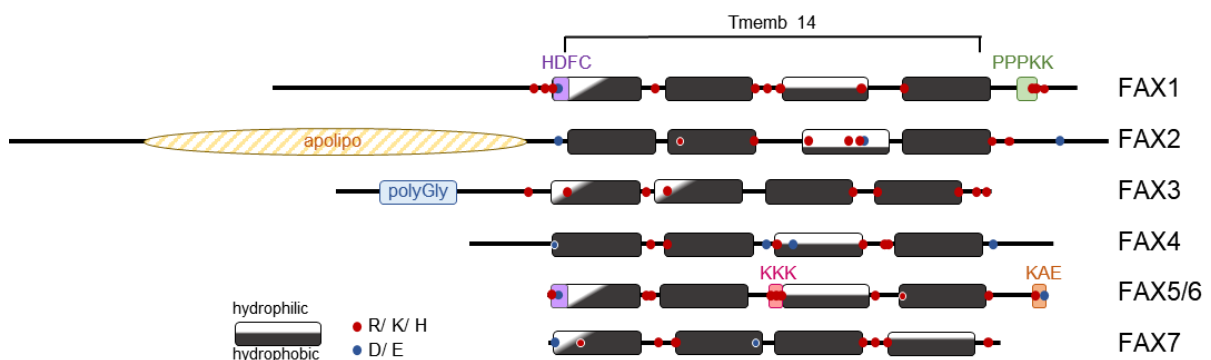


Abb. 5.1: Charakteristika der sieben FAX Proteine. Dargestellt sind die pflanzlichen FAX Proteine (FAX1-7) mit einer Tmemb14 Domäne, bestehend aus vier α -helicalen Domänen, gezeigt als schwarze Balken mit einem hydrophilen (weiß) und einem hydrophoben (schwarz) Charakter. Diese Eigenschaft findet sich konserviert und spezifisch für jedes FAX, genauso wie die positiven (R, K, H: rote Punkte) und negativen (D, E: blaue Punkte) Ladungen der Aminosäuren-Seitenketten und die dargestellten Proteinmotive. Die Länge der Polypeptid Kette entspricht der Länge des jeweiligen *At*-FAX Proteins. Die Tmemb14 Domäne (Proteinfamilie pfam 03647) ist für FAX1 nach der Pfam Datenbank (Finn *et al.*, 2016) eingezeichnet, die helikalen Domänen wurden mit TMHMM (Möller *et al.*, 2001) bestimmt und mit NetWheel (Mól *et al.*, 2018) modelliert.

Der Vergleich der maturen FAX Proteinsequenzen zeigte für die FAX1 bis FAX4 Proteine einen verlängerten und für jedes FAX Protein charakteristischen N-Terminus. FAX1 Proteine hatten mit etwa 60 - 80 aa nach FAX2 den zweitlängsten N-Terminus (siehe Abb. 5.1, Abb. 5.2). FAX2 hatte mit etwa 150 aa den längsten N-Terminus, der sich nach der Phyre²-Vorhersage in drei helikale up- and down Domänen anordnet, ähnlich zum humanen

Apolipoprotein E3 (Hauser *et al.*, 2011). Bei FAX3 Proteinen fand sich ein charakterisches Poly-G Motiv am etwa 50 - 70 aa langem N-Terminus (siehe Abb. 5.1, Abb. 5.4), wogegen FAX4 Proteine mit maximal 10 aa den kürzesten N-Terminus hatten. Bei FAX1 und FAX5/6 Proteinen begann die erste Helix mit einem HDFC-Motiv und war in allen untersuchten Organismen konserviert (für FAX5/6 siehe Könnel *et al.*, 2019). Als prägendes Motiv für FAX1 Proteine wurde eine PPPKK-Abfolge am etwa 20 aa langen C-Terminus identifiziert, für FAX5/6 ein KKK-Motiv vor der dritten Helix in der Tmemb Region und ein KAE-Motiv am etwa 10 aa langem C-Terminus (siehe Abb. 5.1, Könnel *et al.*, 2019). Für FAX4 und FAX7 Proteine konnten keine konservierten Proteinmotive mit Sicherheit identifiziert werden, da für beide Proteine nur wenige Proteinsequenzen gefunden wurden. FAX1 und FAX5/6 Proteine zeigten eine sehr ähnliche Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Bereiche in den Helices. Die dritte Helix der Tmemb zeigte bei FAX1, FAX2, FAX4 und FAX5/6 einen amphiphilen Charakter. In allen Proteinen der FAX Familie fanden sich konservierte, positive Ladungen der Aminosäuren zwischen den einzelnen helikalen Domänen in der Tmemb Region.

5.1.1 Untersuchung der FAX1, FAX2 und FAX3 Proteinsequenz

Die Aminosäuren-Sequenzen der FAX Proteine wurden miteinander verglichen und dabei konservierte Motive gefunden, welche charakteristisch für jedes FAX Protein sind. Im Folgenden sind die Vergleiche aller gefundenen und untersuchten FAX1, FAX2 und FAX3 Proteine aufgeführt (siehe Abb. 5.2, Abb. 5.3, Abb. 5.4). Die Übereinstimmung der Aminosäuren der maturen Proteinsequenzen und der Tmemb Region sind für FAX1 in Abb. 13.1, für FAX2 in Abb. 13.2 und für FAX3 in Abb. 13.3 aufgeführt.

Tmemb 14

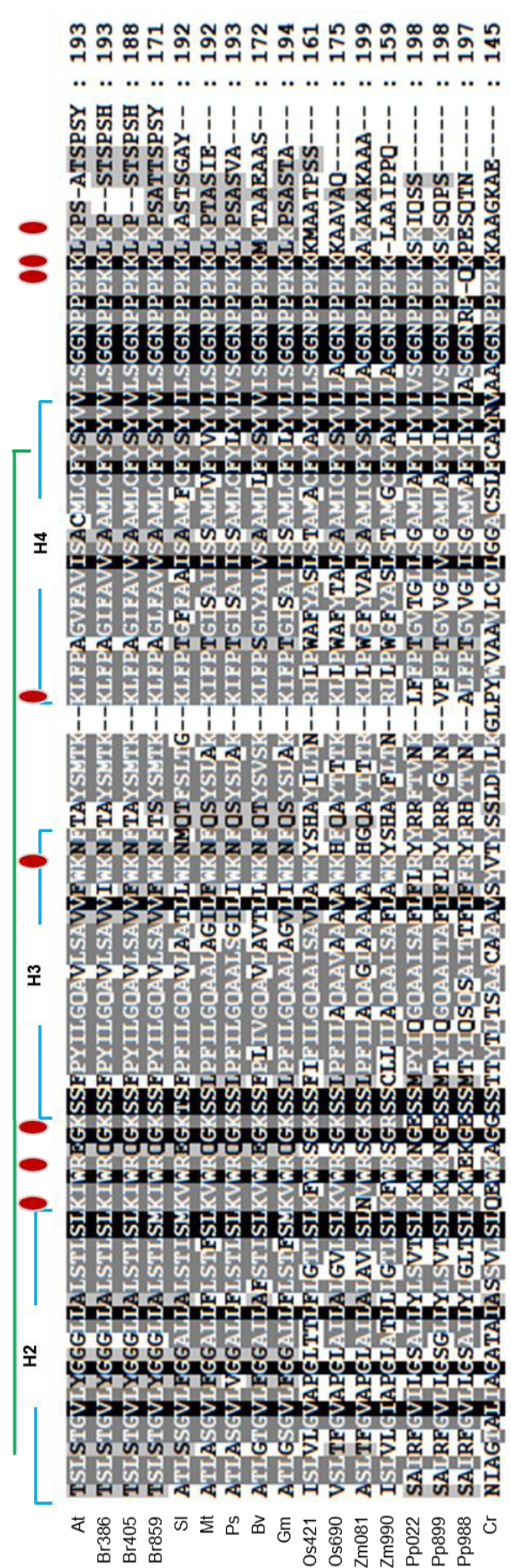
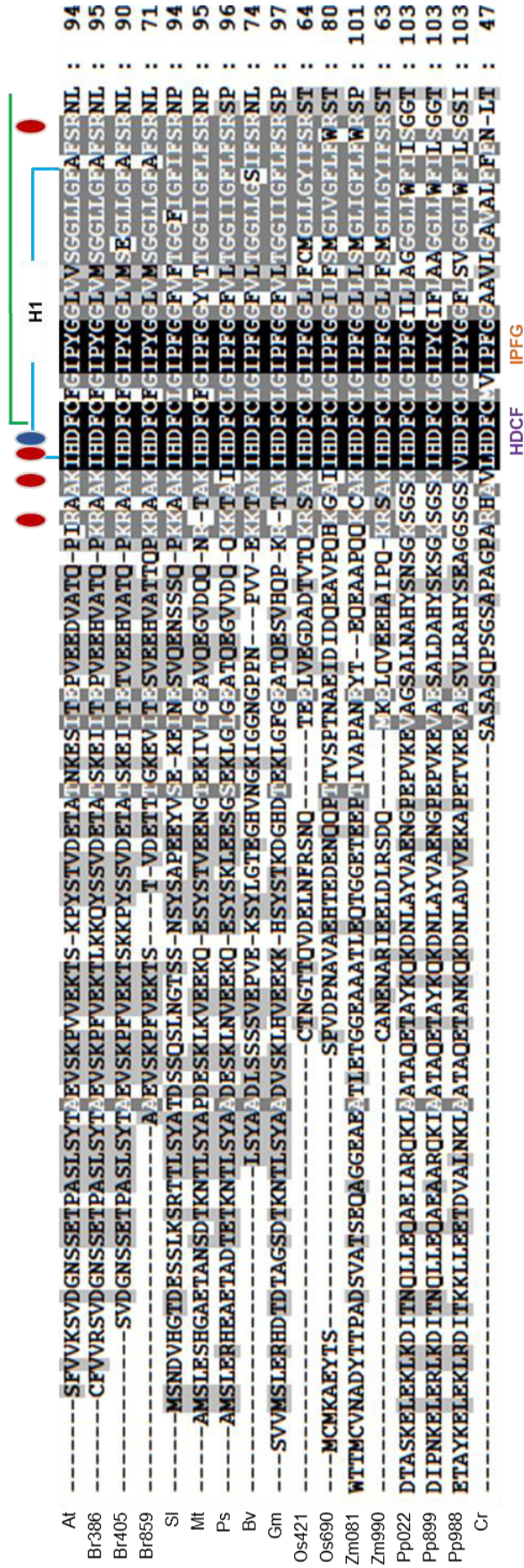


Abb. 5.2: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX1 in Grünalgen und höheren Pflanzen.

Das Transitpeptid cTP der Proteine wurde nach ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) gekürzt, für *C. reinhardtii* erfolgte die Vorhersage mit PredAlgo (Tardif *et al.*, 2012). Die Sequenz für *P. patens* Proteine wurde am N-Terminus zu der Länge der maturen *A. thaliana* FAX1 Sequenz gekürzt, genauso wie die Sequenz für *Gm* und *Zm081*. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At3g57280, NP_567046.1), Br386 (*Brassica rapa*, LR031574.1, VDC99386.1), Br405 (*Brassica rapa*, CM010634.1, RID54405.1), Br859 (*Brassica rapa*, LR031568.1, VDC62859.1), Sl (*Solanum lycopersicum*, NM_001320224., NP_001307153.1), Mt (*Medicago truncatula*, XM_003625049.3, XP_003625097), Ps (*Pisum sativum*, AIX87540.1, KF981436.1), Bv (*Beta vulgaris*, XM_010674623.2, XP_010672925.1), Gm (*Glycine max*, XM_003554106.4, XP_003554154), Os421 (*Oryza sativa*, XM_015779935.2, XP_015635421), Os690 (*Oryza sativa*, Os06g0301100, LOC_Os06g19690.1), Zm081 (*Zea mays*, XM_008653859.2, XP_008652081), Zm990 (*Zea mays*, NCVQ01000002.1, PWZ45990.1), Pp022 (*Physcomitrella patens*, XM_024503254.1, XP_024359022), Pp899 (*Physcomitrella patens*, XM_024546131.1, XP_024401899), Pp988 (*Physcomitrella patens*, XM_024548220.1, XP_024403988) and Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*, CHLRE-DRAFT_160683, A81CM7). Die vier α -helikalen Domänen nach Aramemnon sind in blau, die Tmemb Region nach der pfam Datenbank ist in grün markiert. Die roten Punkte markieren konservierte Aminosäuren mit einer positiven, die blauen mit einer negativen Ladung. Identische Aminosäuren (100%) sind mit schwarz hinterlegt, 60% Übereinstimmung in dunkelgrau und 30% in hellgrau.

Die FAX1 Proteinsequenzen hatten eine eindeutige Vorhersage für ein chloroplastidäres Signalpeptid und wurden nach dem PPPKK-Aminosäurenmotiv am etwa 20 aa langen C-Terminus zur FAX1 Unterfamilie zugeordnet. Wie auch bei FAX5/6 Proteinen (Könnel *et al.*, 2019) beginnt die erste Helix der FAX1 Tmemb Domäne mit einem HDFC-Aminosäurenmotiv und findet sich am etwa 60 – 80 aa langen N-Terminus von FAX1 Proteinen (siehe Abb. 5.1, Abb. 5.2). Die *P. patens* Proteinsequenzen wurden aufgrund des HDCF-Aminosäurenmotives an der ersten Helix und des PPKKK-Motives am C-Terminus zu FAX1 zugeordnet, jedoch zeigten sie einen sehr langen N-Terminus, der ansonsten nur bei FAX2 Sequenzen identifiziert wurde. Die Übereinstimmung der Aminosäuren in der Tmemb Region der FAX1 Proteinsequenzen war prozentual am größten (siehe Abb. 13.1). Am ähnlichsten zu der maturen FAX1 Proteinsequenz in *A. thaliana* waren die drei gefundenen Sequenzen aus *B. rapa* mit 89%, 88% und 77%. Auch bestand eine hohe Übereinstimmung mit Dikotyledonen wie *S. lycopersicum* (54%), *M. truncatula* (53%), *P. sativum* (51%), *B. vulgaris* (48%) und *G. max* (47%) (siehe Abb. 13.1). Die Übereinstimmung zu den Monokotyledonen *O. sativa* (41% und 38%) und *Z. mays* (37%) war dagegen etwas geringer. Zu *P. patens* bestand eine geringe Übereinstimmung von 31% bzw. 33%, genauso wie zu der Grünalge *C. reinhardtii* mit 24% (siehe Abb. 13.1).

At -----**AFA**SHEDS-----GEGVEVGEKES-----DIDVEDDTSKEAKKQTIETSEFKQVSKMGSVSSSEAVSNKAMVTKKE : 69
 Br -----VKEKSVV-----DGDNDNSTQEAQKQTIASVKBQVSKICSVSSEAVNNSKAMTILKD : 56
 Sl -----**ASHEES**-----DKBEAAQAEAKKQTIASFKEQAKVKCAVSEAEVYSDKAMIIKE : 66
 Mt -----ASTPHDS-----DVSE--EESCEAKKQALDTPKEQAKIKQGVSEAEVYSKKAIVLQD : 66
 Ps -----TFAPPHDS-----DHGQVEVEKGN-----DHGQVEVEKGNDDVDV-----TFKEQAKIKQGVSEAEVYSKKAIVLKD : 72
 Bv VAAAAFPKGFAGLSPSCNKQKKNVSVFASQED-----SSSEALDMEKN-----DPKNAGASCEAKKQTIASFKEQAKIKQGVSEAEVYMKKAVITLKD : 98
 Gm -----LAAGWGAPTRRRVIATFAGBES-----EHRLEVEKER-----DVHAGSESEAKKQVIEFTFEQAKBFQCVSCEAEVYSKKAVITD : 94
 Os -----AALAGEOT-----VGSSEGGDKKEG-----KGEKMPBEAEVKBMIKQKDEAQRMHGLTIOAYCVSORAREVILE : 82
 Zm377 -----AALAGEOT-----EGSEVGDCKONS-----NEEIKPERAEAKKVMIEQKAEAIRMCALSMAQAVDYSKRAREVILE : 68
 Zm146 -----AALAGEOTSLECWMOEGSEVGDDRRNG-----EIKPERAEIKKVMIEQKAEAIRMCALSMAQAVDYSETRREVILE : 74



At TSECLRIQEKAKKELGTAWVSEGREYILKAABESPSDVKKEIYVEEAS--TEIDKNVSRANDEFHVGIPYGLIPLVGGFINEMVSGSIPAIRFGVILGCAFEALSDASI : 178
 Br TSECLRIQEKAKKELGTAKEVCEGREYILKAABESPSDVKKEIYVEEAS--SEIDRVSRQTDFHVGIPYGLIPLVGGFLSFMISGSIPIAIRFGVILGCAFEALSDASI : 165
 Sl TSECLKIQADKARQWTLIAKESISEEKHYLTAAENSEPVKQIVETVFSADENNDVKVRDFYVGIPTLISAAGPLFEMLSGSTAIRFGVILGCAFEALSDISSL : 176
 Mt TSECLKIQADKARHDLVVAKEITBECKEYFSSAENSPK--VKBEIYVEEFPSEDDLSKVSVRDFYVGIPTLISAAGPLSEMITGSIPIAIRFGVILGCAFEALSDISSL : 175
 Ps TSECLKIHADKAKHDLVVAKEITBECKEYLSAAENSPD--VKBEIYVEEFPSEDDLSNVSVRDFYVGIPTLISLGGFLSEMTGSIPIAIRFGVILGCAFEALSDISSL : 181
 Bv TADLKIQADQARQDLVVAKEIASEEGRQYATAENSPKQWVEEAS--ARLDDVSVRDFYVGIPTLISAAGFLNEMLTGSLSGIRFGVILGCAFEALSDISSL : 207
 Gm ATECLKVIADKTKNELSVPAKEIIDECKEYLSAADSSE--VKBEIYVEEFPSEIQLKSGVRDFYVGVPTGLLSLGGFLSEMTGNTAAIRFGVILGCAFEALSDISSL : 203
 Os ASECLKIHADKAOKDLSVIAATEVCECEYIKLAAONSPDSIKQIIEEENS--LGKIKIS--EYEDYHVGIPFGTFLAVGGFINEMLTGRTSIRFGIILGCAFEALSDISSL : 190
 Zm377 ASECLKIQADKAOKDLSVIAATEVSECECEYLVMAARNSPDSIKQITTFERA--LGRDNWPFSEYEDYHVGIPFGTFLAVGGFINEMLTGRTSIRFGIILGCAFEALSDISSL : 177
 Zm146 ASECLKIQADKAOKDLSVVAATEICCECEYIMMAARNSPDSIKQITTFERA--LGKDNWPFSEYEDYHVGIPFGTFLAVGGFINEMJAGESTSIRFGIILGCAFEALSDISSL : 183



At KSHFKC--ESSTKFLKGOAIVAIIIFRREIRLILSOKSTELGFFPTLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 263
 Br KACRIG--ESSAKFLKGOAIVAIIIFRREIKMVLFORSTMGLTLLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 251
 Sl RSWKSG--DSTSLKGOAIAIATILEVREFRML--OKPFIENIATISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 251
 Mt KSKYKC--QFSSIALKGOAIAIAGILEFREISVIG---RGSTYFTALISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 247
 Ps KSKYKC--QFSSIALKGOAIAIASILFREINSVIG---RGSTYFTALISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 252
 Bv RSWKSG--ESDSTLTKGOAIAITSLFRDARLDF--EGLTGLGKTLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 281
 Gm KSKYKC--RISPLKGOAIAIASILFREISSVIG---KGSSYFTALISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 275
 Os RSWKSG--RRRPRLLKGOAIAIASVIFRREILTFHYG--WPNIFVLLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 264
 Zm377 RSWKSG--RRRPRLLKGOAIAIASVIFRREILTFHYG--WPKIFIVLLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 251
 Zm146 RSWKSG--RRRPRLLKGOAIAIASVIFRREILTFHYG--WPKIFIVLLISGCVLGFYLVKVVKREKGTLEDGG--EDESDDGFRVREG : 257

Abb. 5.3: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX2 in Pflanzen. Das Transitpeptid cTP der Proteine wurde nach ChloroP gekürzt. Die Sequenz für *Z.mays*947 wurde aus der pfam Datenbank entnommen. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At2g38550, NP_565892.1), Br (*Brassica rapa*, XM_009145127.1, XP_009143375), Sl (*Solanum lycopersicum*, XM_004246239.4, XP_004246287), Mt (*Medicago truncatula*, XM_003623582.3, XP_003623630), Ps (*Pisum sativum*, MN737494), Bv (*Beta vulgaris*, XM_010685179.2, XP_010683481), Gm (*Glycine max*, XM_003552266.3, XP_003552314.1), Os (*Oryza sativa*, XM_015765746.2, XP_015621232), Zm353 (*Zea mays*, GRMZM2G059353.01, NP_001132377.1), Zm441 (*Zea mays*, GRMZM2G166441.01, ACG49146.1) and Zm947 (*Zea mays*, Zm00001d012504, A0A1D6G947). Die vier α -helikalen Domänen nach Aramemnon sind in blau, die Tmemb Region nach der pfam Datenbank ist in grün markiert. Die roten Punkte markieren konservierte Aminosäuren mit einer positiven, die blauen mit einer negativen Ladung. Identische Aminosäuren (100%) sind mit schwarz hinterlegt, 60% Ähnlichkeit in dunkelgrau und 30% in hellgrau.

Die FAX2 Proteine stellen mit etwa 300 – 340 aa die längsten Proteinsequenzen unter den FAX Proteinen dar und zeichnen sich durch ihren etwa 150 aa langen N-Terminus aus (siehe Abb. 5.3). Die ersten drei Helices der Tmemb14 Region weisen stark konservierte Aminosäurenmotive auf. Genauso wie auch bei dem Vergleich der FAX1 Sequenzen, ist bei den murenen FAX2 Proteinsequenzen die Übereinstimmung der Aminosäuren in der Tmemb Region prozentual am größten. Die FAX2 Sequenz aus *A. thaliana* zeigt die höchste Übereinstimmung zu *B. rapa* mit 74%, gefolgt von den Dikotyledonen wie *S. lycopersicum* (50%), *M. truncatula* (48%), *P. sativum* (49%), *B. vulgaris* (43%) und *G. max* (42%). Die Übereinstimmung zu den Monokotyledonen *O. sativa* (37%) und *Z. mays* (38% und 36%) ist am geringsten (siehe Abb. 13.2).

Bei der Zuordnung der Proteinsequenzen zu einer der sieben FAX Unterfamilien wurde auf die Proteidlänge, cTP Vorhersage und das Vorkommen bestimmter Aminosäurenmotive geachtet. Jedes Protein mit einer cTP Vorhersage und einer Wiederholung von Glycinen am N-Terminus wurde daher zu FAX3 zugeordnet und die Proteinsequenzen miteinander verglichen (siehe Abb. 5.4, Abb. 13.3).

Tmemb 14

```

At:  -----KAVEVEPTIDYGGGG-----IGGDKFGGGGGG-----D●CNDGEGEDDKKEESD●GKSTPLSMSQKLTIGZAFIVGVGGIMGYL : 74
Br:  -----AVEVEPIAGGGGG-----IGGDKFGGGGGG-----DDNDEGEGCGEEESGG●TPLPLSMSQKLTIGZAFIVGVGGIMGYL : 74
Sl:  ASVVSVDSTMP●TTFTVDPAGPIDVLP●EAG-GGGD-----IGGANDDGGCRD●NSGNND●CN●EGGSDEGEDHNS●KKMALSMSQKLTIGZAFIVCAGCFMGYL : 99
Mt:  -----SSDSKTTQFDLSAPDL●NTGGCGDIK●GNCD●FS●GGCGGGE-----GGGCGDDSGK●CEEGSDGD●KRNMA●LMSQKLTIGZAFIVCAGGVMGFL : 87
Ps:  -----SDSKATFDLSAPDL●NSGGCGSIK●NGCD●DFGGCGGCG-----GGGCGDDSNK●CEEGSNGD●KRKMA●LMSQKLTIGZAFIVCAGGVMGYL : 85
Gm:  -----AAVTS●DKAATS●LDL●TQ●PD●LDNSGGG-----ANGNGGGGGGGGGGG-----GGE●CGD●NSK●CEEGSDGD●KRKMA●LMSQKLTIGZAFIVGVGGIMGYL : 89
Os:  -----AVAA●SEPELGGSGG-----GAGD●GSE●SGGGGD●SEKPRGG●CGDEEGE●CEE-----E●KMGQG●LMSQKLTIGZAFIVCAGGVMGY : 75
Zm:  -----ATKEPELGG-GGS-----GAGD●GAGSGGGG-----DPRGG●CG-----OEGD●CEE-----E●KMGQG●LMSQKLTIGZAFIVCAGGVMGY : 68
Pp701: -----VEEAKAE●LDSDVGGGG-----EGDD●CGSGD●GR-----EDK●GDD●CEGADDG●KKAG●SMSQKLTIGZAFIVGVGGIMGY : 74
Pp764: -----FEDI●KKAEKDA--VGGCD-----GGD●GD●CGSGCGSG-----ERGD●GDD●CADGEGAK●KL●AG●L●SL●SQKLTIGZAFIVGVGGIMGY : 72
Cr:  -----ADDVPGMSSGNCITD●AT●TRN●L●IKAVGP●GGG-----GGSS●SS●SG●GG●CGSG-----GGSG●SS●GG●SGG-AGGAGDGNAPHLRN●TF●FA●FA●FA●VCS●FA●V : 88
MGY
  
```

```

At:  KSGQKSLLAGCLS●SAVIL●YV●FS●Q●L●PT●KPV●LA●S-----TVGV●W●AGAL●Y●VM●CH●RY●M●RS●KKI●FPAGV●V●S●IMS●FI●MT●GGY●I●HG●IM●RS●LH●-- : 157
Br:  KSGQKSLLAGCLS●SAVIL●FV●FR●DL●PT●KPV●LA●S-----TIGV●W●AGAL●Y●VM●CH●RY●M●GS●KKI●FPAGV●V●S●F●MS●FI●MT●GGY●I●HG●IM●RS●LH●-- : 157
Sl:  KSGTKSLIAGGV●SA●SL●Y●V●Y●TM●L●PI●Q●PV●LA●S-----A●IC●FV●LS●AG●LV●G●VM●SR●FL●KS●KKV●FPAGV●V●S●FV●SF●VMT●GGY●L●HG●IL●RS●AH●-- : 182
Mt:  KSGQKSLIAGCLS●SALL●FY●V●F●TE●L●PGR●PV●LA●S-----SVGL●IS●AAL●V●VM●SR●FK●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SF●IM●TGGY●L●HG●IM●RS●SH●-- : 170
Ps:  KSGSNKSLIAGCLS●SALL●FY●V●F●TE●L●PGR●PV●LA●S-----SVGL●IS●AAL●V●VM●SR●FR●KS●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SL●IM●TGGY●L●HG●IM●RS●SSH●-- : 169
Gm:  KSGSNKSLIAGCLS●SALL●Y●V●Y●TE●L●PGR●PV●LA●S-----SVGL●IS●AAL●V●VM●SR●FK●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SL●IM●TGGY●L●HG●IM●RS●AH●-- : 172
Os:  KSGSQ●SLI●AGGI●SA●IV●LV●FV●HT●QL●PVR●PV●LA●S-----SIGL●IS●AAL●V●VM●SR●FK●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SL●IM●TGGY●I●HG●IL●RS●THA●-- : 159
Zm:  KSGSQ●SLI●AGGI●SA●IV●LV●HT●QL●PVR●PV●LA●S-----SIGL●IS●AAL●V●VM●SR●FK●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SL●IM●TGGY●F●HG●IL●RS●SHA●-- : 152
Pp701: KSGSK●SLI●AGG●SSA●IL●Y●V●Y●IN●L●PN●PV●MA●S-----A●IGL●IS●GM●LL●F●VM●SR●VM●ES●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SF●IM●AGGY●I●HG●IV●RS●AH●H●-- : 158
Pp764: KSCSN●SLI●AGG●SSA●IL●Y●V●Y●EM●N●L●PT●KP●IM●SS-----V●IGL●IS●GL●LL●F●VM●CS●RY●Q●ES●SK●V●FPAGV●V●S●LV●SF●IM●AGGY●I●HG●IM●RG●H●-- : 154
Cr:  KKCST●K●SI●CACCG●AA●IL●IL●GL●CAR●SM●V●GGAA●AA●AG●PAR●V●AF●AL●CT●IL●GL●IA●CRE●N●NT●KK●FF●PAG●IV●AI●SSI●GL●AA●AF●V●GV●CI●----- : 170
  
```

Abb. 5.4: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX3 in Grünalgen und höheren Pflanzen. Das Transitpeptid cTP der Proteine wurde nach ChloroP gekürzt, für *C.reinhardtii* wurde das cTP mit PredAlgo (Tardif *et al.*, 2012) vorhergesagt. Die Sequenz für *P.patens* Proteine wurde am N-Terminus zu der Länge der maturen *A. thaliana* FAX3 Sequenz gekürzt. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At3g43520, NP_566866.1), Br (*Brassica rapa*, RID58705.1, CM010633.1), Sl (*Solanum lycopersicum*, XM_004251268.4, XP_004251316), Mt (*Medicago truncatula*, XM_013602920.2, XP_013458374), Ps (*Pisum sativum*, MN737495), Gm (*Glycine max*, XM_003542343.3, XP_003542391), Os (*Oryza sativa*, XM_015780205.2, XP_015635691), Zm (*Zea mays*, NM_001143430.1, NP_001136902.1), Pp701 (*Physcomitrella patens*, XM_024506933.1, XP_024362701.1), Pp764 (*Physcomitrella patens*, XM_024506996.1, XP_024362764.1) and Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*, CHLRE_08g383300v5, A0A2K3DI83). Die roten Punkte markieren konservierte Aminosäuren mit einer positiven, die blauen mit einer negativen Ladung. Identische Aminosäuren (100%) sind mit schwarz hinterlegt, 60% Ähnlichkeit in dunkelgrau und 30% in hellgrau.

Bei den FAX3 Proteinen wurde ein chloroplastidäres Transitpeptid vorhergesagt und die Proteinsequenzen wurden anhand des Polyglycin-Motives am etwa 50 bis 70 aa langen N-Terminus zur FAX3 Unterfamilie zugeordnet. Dabei zeigen die Helices der Tmemb Region stark konservierte Aminosäuren und einige konservierte, positive Ladungen der Aminosäuren (siehe Abb. 5.4). Vor allem am etwa 10 aa kurzem C-Terminus konnten gleich drei konservierte, positive Ladungen festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen den maturen FAX3 Proteinsequenzen zeigt die höchste Übereinstimmung der Aminosäuren in der Tmemb Region. Die Ähnlichkeit der maturen FAX3 Sequenz aus *A. thaliana* ist zu *B. rapa* mit 84% am höchsten, gefolgt von den Dikotyledonen wie *S. lycopersicum* (51%), *M. truncatula* (57%), *P. sativum* (56%) und *G. max* (51%) (siehe Abb. 13.3). Die Übereinstimmung zu den Monokotyledonen *O. sativa* (53%) und *Z. mays* (51%) ist fast genauso hoch wie zu den Sequenzen des Laubmooses *P. patens* (54% und 53%). Zu der *C. reinhardtii* besteht eine geringe Übereinstimmung von 24% (siehe Abb. 13.3).

5.2 Subzelluläre Lokalisation von FAX2 und FAX3

Durch den Verlust von FAX1 entstehen durch eine veränderte Fettsäuren- und Lipidhomöostase Beeinträchtigungen bei Pflanzenwachstum und -entwicklung. Jedoch sind die durch eine T-DNA Insertion hergestellten homozygoten *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten überlebensfähig (Li *et al.*, 2015). Daher ist es möglich, dass andere plastidäre FAX Proteine am Fettsäuretransport aus den Chloroplasten beteiligt sind und FAX1 teilweise in seiner Funktion ersetzen können. Deswegen wurden im Zuge dieser Arbeit FAX2 und FAX3 als weitere potentielle plastidäre FAX Proteine zunächst auf ihre Lokalisation untersucht. Die Vorhersage einer Tmemb14 Domäne am C-terminalen Ende von FAX2 und FAX3 deutet darauf hin, dass beide Proteine membranständig sind und mit der Tmemb Region in die Lipid Doppelschicht inserieren. Laut der Vorhersage von Aramemnon (AramLocCon; Schwacke *et al.*, 2003) und ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999), sind die *A. thaliana* Proteine FAX1 bis FAX4 in Plastiden

lokalisiert, während FAX5 bis FAX7 wahrscheinlich in Membranen des ER/sekretorischen Weges inserieren. Die Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation von FAX1 bis FAX3 in *A.thaliana* sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Tab. 5.1: FAX1 bis FAX3 Proteine in *A. thaliana*. Gezeigt sind der FAX Proteinname und der *A. thaliana* Genome Initiative (AGI) Code. Für jedes Protein ist die Aminosäurenlänge (aa) des Präproteins (prä) angegeben, genauso wie das Molekulargewicht in kDa des maturen Proteins (mat). Das chloroplastidäre Transitpeptid (cTP) wurde mit ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) vorhergesagt. Die „Score“ Werte für die Lokalisationsvorhersage im Chloroplast (c) stammen aus *Aramemnon* (AramLocCon; Schwacke *et al.*, 2003).

Name	AGI Code	Proteinnr.	prä (aa)	cTP (aa)	mat (kDa)	Score
FAX1	At3g57280	NP_567046	226	33	19.9	25.7 (c)
FAX2	At2g38550	NP_565892	335	72	28.6	24.8 (c)
FAX3	At3g43520	NP_566866	240	84	15.9	24.1 (c)

In der Datenbank AT-CHLORO (Bruley *et al.*, 2012) finden sich Ergebnisse von durchgeführten Proteomanalysen, in welchen *At-FAX2* (At2g38550) and *At-FAX3* (At3g43520) als potentielle plastidäre und pflanzenspezifische Transporter annotiert sind. In Li *et al.*, 2020 wurde die subzelluläre Lokalisation von FAX2 mittels einer transienten Expression mit dem GFP-Konstrukt *Pro-35S::FAX2-GFP* untersucht und dabei eine Lokalisation in der chloroplastidären Membran festgestellt. Auch in Tian *et al.*, 2019 wurden Lokalisationsuntersuchungen mit einem C-terminalen GFP an FAX2 durchgeführt und dabei punktförmige Signale an der plastidären Membran identifiziert. Im Rahmen einer Masterarbeit an der LMU München (Alexander Schmitt, 2015) wurden GFP Untersuchungen mit FAX2 und FAX3 in Tabakprotoplasten durchgeführt. FAX2 Proteine konnten als kleine, punktförmige Signale auf der Chloroplastenhülle detektiert werden, bei FAX3 wurden die Signale als Ringe in der Hüllmembran identifiziert, wobei dabei nicht zwischen der inneren und äußeren Hüllmembran unterschieden werden konnte (Alexander Schmitt, 2015). Da die GFP Untersuchungen keine eindeutige subzelluläre Lokalisation zeigten, sollte im Zuge dieser Arbeit die Lokalisation von FAX2 und FAX3 mit einem Western Blot verifiziert werden, sodass für FAX2 und FAX3 primäre Antikörper generiert wurden. Für die Immunodetektion wurden aufgetrennte innere und äußere Hüllmembranen aus *P. sativum* verwendet und daher die FAX2 bzw. FAX3 Sequenz aus Erbse kloniert. Für die Klonierung der *FAX2* und *FAX3* Sequenz aus *P. sativum* wurden zunächst die cDNA mittels einer RT-PCR amplifiziert. Mithilfe der EST Datenbank (Franssen *et al.*, 2011) wurden die entsprechende Oligonukleotide für eine PCR erstellt (siehe Abb. 13.4). Nach der Sequenzierung der PCR-Produkte ergab sich aus der forward- und reverse-DNA Sequenz eine überlappende, sich ergänzende Sequenz (siehe Abb. 13.4). Anhand der cDNA Sequenz konnte die Aminosäure-Sequenz ermittelt und ein

Fragment zur Synthese der *Ps*-FAX2 und *Ps*-FAX3 Antiseren ausgewählt werden (siehe Abb. 5.5).

Tab. 5.2: FAX1 bis FAX3 Proteine in *P. sativum*. Gezeigt sind der FAX Proteinname und die GenBank Nr. Für jedes Protein ist die Aminosäurenlänge (aa) des Präproteins (prä) angegeben, genauso wie das Molekulargewicht in kDa des murenen Proteins (mat). Das chloroplastidäre Transitpeptid (cTP) wurde mit TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) vorhergesagt und eine Lokalisationsvorhersage im Chloroplast (c) an.

Name	GenBank Nr.	Proteinnr.	prä (aa)	cTP (aa)	mat (kDa)	cTP Score
FAX1	KF981436	AIX87540.1	232	39	20.6	0.845 (c)
FAX2	MN737494	QNQ79270.1	306	54	27.0	0.896 (c)
FAX3	MN737495	QNQ79271.1	226	56	16.6	0.917 (c)

```

At-FAX1 -----SFVVKSV DGNSS ETPASLSYTA E V S K P V V E T S K P Y S T V D E T A : 43
Ps-FAX1 -----AMSLERHEAETADTETKNTLSYAADESINVEEKQESYSKLEESG : 45
At-FAX2 AFAASHEDSGESGVEV GKEKSDIDVED---DTSKEAWKCTLESFKEVSKMQSVSSEAYSVNSCKAMTVIKETSEQLRQAEAKEELGTKAKVV : 92
Ps-FAX2 TFAAPEHSDHGGQVEVEKGNDDVDVDVGSEESQEAWKCALDTEKEQALKVGGVSOEAYELYSKAVVIRKDTSEQLRQAEAKEELGTSVVAKEI : 95
At-FAX3 -----KAVEVEPTIDYGGGGG---IGGDYFGGGGGGG---DG : 31
Ps-FAX3 -----SDSKATSPDLAPDLNDSGGGGSTLNGDDEFGGGGGGGGGG : 42

At-FAX1 YNKES-----ITEPVEEDATQPI-----RAAKITDFCFGIPYGGIVVSGGILGFAPSRNLTSLSTGVLYGGGIDALSTLSLIRREGKS : 123
Ps-FAX1 SEK-----LGLGEATCGVDOCKKTAI-----IDFC LGIPFGGVLGGIIGFTESRSPATIASGVLVGGALFELSTLSLWVRGKS : 125
At-FAX2 SEEGREYILKAAEESP SDVKIIEAFAS-TEDLKNVSRANDFVGIYFGLIIVGGIINFAVSGSIPATIREGVILGGGAFALSIAISLIRREGKS : 186
Ps-FAX2 TEEGKEYLSSAAENSP-DVKIIEETFTSPEDDLNVSQVROFVGIYFGLIIVGGIINFAVSGSIPATIREGVILGGGIALSISLIRREGKS : 189
At-FAX3 NDDG-----G-EDDKESDGKKS-----TPLSMQKTLGAFIVGGIMGYKSKS-----UKSLIAGGISAVLLYVESULPTK : 103
Ps-FAX3 GDDS-----NKGEEGSGNDKRRKMAISMSOKITLGAIVVGGVIMGYKSKS-----NKSLIAGGISALFYVTELEPGR : 114

At-FAX1 SFPYITLGAIVLSAVVEKINFTAYSMTKLFPAVFVAVISACMLCFYSIVLVSGGNPPPKLKLKPSATSPSY----- : 193
Ps-FAX1 SLPEITLGAALSGITLTKNPOSYSLAKIPFTGTSATISSAMLCFYLVLVSGGNPPPKLKLKPSASVA----- : 193
At-FAX2 STRKELKGMATVAVITFLRELRLLLLSSTELGFPFTITSGVILGTYLVKAVVREKGETLEDGGEDESSDGFVRSEG : 263
Ps-FAX2 SSLAKGCTAVASITFLREINSVGGG---TYFTALISGAMAAFYVRLVLEGKP---OKGSNLEGEAG----- : 252
At-FAX3 VLASTGVVMAGALMYMGTRYMRSKLIFPAGVVSINSFIMTGGYHEGIMRSLH----- : 157
Ps-FAX3 VLAASVGLGISALLS MGSFRKSGKLVFPAGVVSLSLIMTGGYHEGIMRSSH----- : 169

```

Abb. 5.5: Aminosäuren-Sequenz zur Synthese von FAX2 und FAX3 Peptidantikörper. Gezeigt sind die murenen FAX1 bis FAX3 Proteinsequenzen in *A. thaliana* (*At*) und *P. sativum* (*Ps*). Die Peptidsequenzen zur Herstellung von *Ps*-FAX2 und *Ps*-FAX3 Antiseren sind in orange gezeigt. Die Bindestellen für FAX1 Antikörper sind in gelb markiert und in Li *et al.*, (2015) publiziert. Die blauen Boxen markieren die helikalen Domänen.

Die murenen *At*-FAX1 und *Ps*-FAX1 Sequenzen sind beide 193 aa lang (siehe Abb. 5.5). Die Bindestellen der *At*- und *Ps*-FAX1 Antikörper liegen am N-terminalen Bereich (NT *At*-FAX1 17 aa; NT *Ps*-FAX1 18 aa) oder am C-terminalen Bereich (CT *Ps*-FAX1, 15 aa) außerhalb der Tmemb Region (siehe Abb. 5.5). Die murene *At*-FAX2 Sequenz ist 263 aa und die *Ps*-FAX2 Sequenz 252 aa lang. Die Bindestelle für *Ps*-FAX2, mit einer Länge von 17 aa, liegt im nicht membranständigen N-terminalen Proteinbereich (siehe Abb. 5.5). Die murene *At*-FAX3 Proteinsequenz ist 156 bp und die *Ps*-FAX3 Sequenz 170 bp lang. Die Bindestelle des *Ps*-FAX3, mit einer Länge von 16 aa, liegt ebenfalls am N-Terminus relativ nah an der vorhergesagten ersten Helix (siehe Abb. 5.5). Bei der Auswahl der Sequenz wurde nicht nur der membranständige (Tmemb) Bereich berücksichtigt, sondern auch die Aminosäuren-Übereinstimmung der Protein-Sequenz von *P. sativum* zu *A. thaliana*, mit dem Ziel die hergestellten Antikörper auch für Untersuchungen in *A. thaliana* zu nutzen. Mit den

hergestellt *Ps*-FAX2 und *Ps*-FAX3 Antiseren (Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland) wurden Western Blots durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von FAX2 und FAX3 im Chloroplasten zu bestimmen. Aufgetragen wurden aufgereinigte, innere und äußere Chloroplasten Hüllmembranen aus zehn Tagen alten Erbsenblättern, genauso wie isolierte Stroma-Proteine und Thylakoidmembranen aus Erbse (siehe Abb. 5.6).

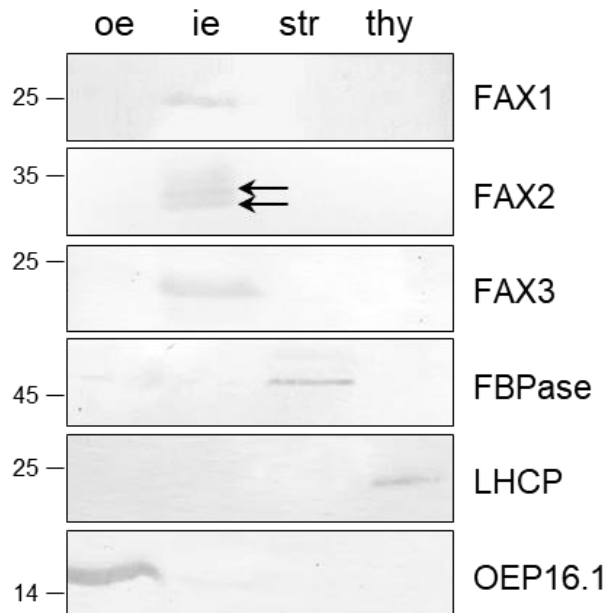


Abb. 5.6: Subzelluläre Lokalisation von FAX2 und FAX3 in *P. sativum*. Die Chloroplasten wurden aus zehn Tagen alten Erbsenblättern isoliert und in äußere (oe) und innere (ie) Hüllmembran, Thylakoid-membran (thy) und Stroma (str) aufgetrennt. Davon wurden 10 µg Protein in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen *Ps*-FAX2 und *Ps*-FAX3 untersucht. Als Kontrollen dienen das Protein FAX1 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten, das Protein OEP16.1 in der äußeren Chloroplasten-hüllmembran, das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) im Stroma und das Light-Harvesting Chlorophyll Protein (LHCP) im Thylakoiden. Die beschrifteten Nummern geben das Molekulargewicht in kDa an.

Der Immunoblot zeigt die Lokalisation von FAX2 als auch FAX3 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten in Erbse (siehe Abb. 5.6). Das vorhergesagte Molekulargewicht für die mature *Ps*-FAX2 Proteinsequenz beträgt 27 kDa und für *Ps*-FAX3 16,6 kDa (siehe Tab. 5.2). Die FAX2 Antikörper detektierten zwei Banden mit einer Größe in dem Bereich von 31 bis 32 kDa in der inneren Hüllmembran von *P. sativum* Chloroplasten. Bei FAX3 wurde eine Bandengröße von 21 kDa detektiert (siehe Abb. 5.6). Die Lokalisation mit *Ps*-FAX1 diente als Kontrolle und zeigte eine Bande bei 25 kDa, wie auch bereits von Li *et al.*, 2015 mit einer Bandengröße von etwa 25 kDa publiziert. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 20,6 kDa (siehe Tab. 5.2). Damit zeigte der Nachweis mit einem Immunoblot ein etwa 4 bis 5 kDa größeres Molekulargewicht der FAX1, FAX2 und FAX3 Proteine als erwartet an.

5.3 Klonierung und Überprüfung von *FAX1* - *FAX4* RNAi-Linien

In den homozygoten *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten führt eine unzureichende Pollenentwicklung zum Verkleben der Pollen in den Antheren und damit einhergehend zu keiner Bestäubung der Narbe (Li *et al.*, 2015). Deswegen ist es nicht möglich Pflanzen der homozygoten *fax1-1* und *fax1-2* T-DNA-Insertionslinien zu vermehren und aus diesen Samen zu gewinnen (Li *et al.*, 2015). Zur Erzeugung von homozygoten *fax1* Mutanten, wurden

heterozygote Pflanzen für das *FAXI* Gen segregiert und erst mit der Genotypisierung älterer Pflanzen konnten homozygote *fax1* Mutanten identifiziert werden. Jedoch war es damit nicht möglich den Effekt von *FAXI* im frühen Entwicklungsstadium der Pflanze zu untersuchen, sodass im Zuge dieser Arbeit über eine Agrobakterien vermittelte, stabile Transformation *FAXI*-RNAi Linien erzeugt wurden (siehe Kap. 4.14). Das RNAi-Konstrukt wird unter einem 35S Promotor exprimiert, der in Pollen und Antheren nicht aktiv ist, und somit keinen Effekt auf die Pollenentwicklung und Reproduktion ausübt. Zur Überprüfung der *FAXI*-RNAi Linien in Col-0 wurde der *FAXI* Transkriptgehalt von vier Wochen alten Rosettenblättern verschiedener *FAXI*-RNAi Pflanzenlinien aus der T2 Generation mittels qRT-PCR untersucht. Die Bestimmung des relativen Transkriptgehalts wurde zunächst mit Primern durchgeführt, welche näher am N-Terminus binden und das *FAXI*-RNAi Konstrukt nicht abdecken (siehe Abb. 4.3). Dabei zeigte sich mit den ursprünglichen Primern in den Keimlingen und den Rosettenblättern der *FAXI*-RNAi Linien ein Unterschied in der *FAXI* Transkriptmenge abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze. Die *FAXI*-RNAi Linie #10 zeigte sowohl in Keimlingen, als auch in dem Rosettenblatt-Stadium eine Verringerung der Genexpression. In Keimlingen der *FAXI*-RNAi Linien #10, #13, #17 und #24 wurde im Vergleich zu Col-0 eine etwa 50%-ige Reduzierung des *FAXI* Transkriptgehaltes festgestellt. Die Bestimmung des relativen Transkriptgehalts in den Rosettenblättern von *FAXI*-RNAi Pflanzen zeigte mit den ursprünglichen Primern bei den Linien #1, #10 und #14 (86%, 90% und 90% *FAXI* Transkriptgehalt) eine leichte Verringerung und bei der Linie #30 mit 22% *FAXI* Transkript eine starke Verringerung des *FAXI* Transkriptgehaltes im Vergleich zu Col-0 auf.

Um den Effekt des *FAXI*-RNAi zu überprüfen, wurden neue Primer erstellt, welche näher am C-Terminus lokalisiert sind und das entsprechende *FAXI*-RNAi Konstrukt flankieren (siehe Abb. 4.3) und die relative *FAXI* Transkriptmenge bestimmt (siehe Abb. 5.7).

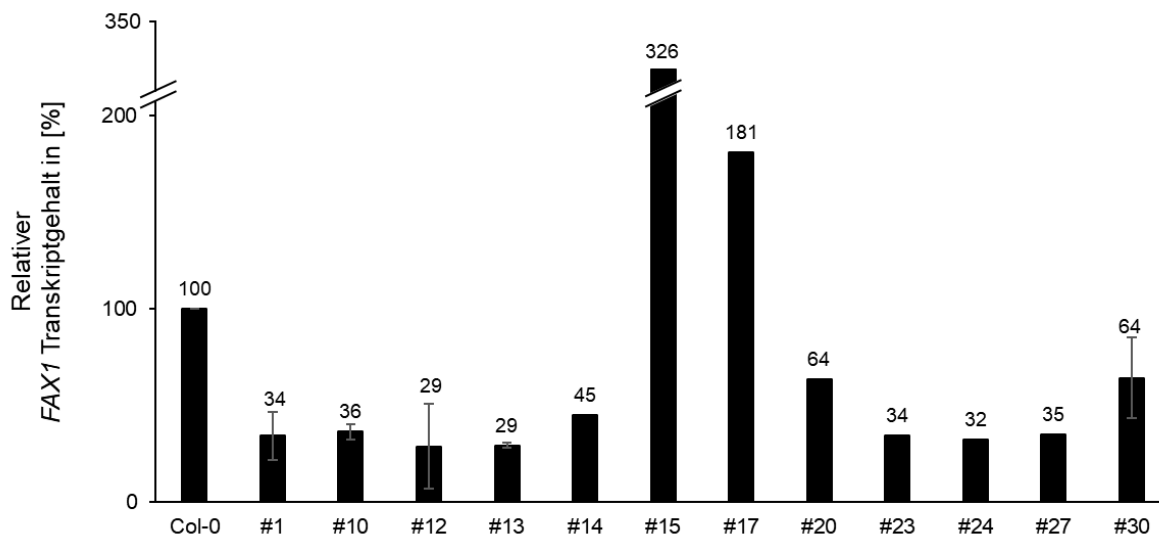


Abb. 5.7: Relativer FAX1 Transkriptgehalt von Pflanzenlinien mit einem FAX1-RNAi Konstrukt.

Die Bestimmung des Transkriptgehaltes erfolgte über eine qRT-PCR aus vier Wochen alten Rosettenblättern verschiedener FAX1-RNAi Pflanzenlinien im wildtypischen Hintergrund Col-0. Zur Überprüfung wurden insgesamt 12 Linien (bezeichnet mit # Nr.) aus der T2 Generation untersucht. Bei der Ernte wurden alle Rosettenblätter von drei Pflanzen pro Linie zu einer Probe vereinigt ($n = 1$). Für die FAX1 Transkriptmessung wurden für die Linie #1 drei technische Replikate, für die Linien #10, #12, #13 und #30 zwei technische Replikate gemessen (gezeigt ist der $MW \pm STABW$). Die PCR wurde bei 56°C Annealing und mit den FAX1 LC fw new und FAX1 LC rev new durchgeführt. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Col-0 normiert.

Bei der Messung der FAX1 Transkriptmenge mit den neu erstellten FAX1 Primern zeigten 10 von 12 untersuchten Linien eine Reduzierung der FAX1 Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (siehe Abb. 5.7). In den Linien #20 und #30 wurde eine Verminderung des FAX1 Transkriptgehaltes um etwa 40% gemessen, bei den übrigen FAX1-RNAi Linien war der FAX1 Transkriptgehalt um mehr als 50% reduziert (siehe Abb. 5.7). In den Linien #15 und #17 konnte eine 3,3-fach bzw. 1,8-fach höhere FAX1 Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Somit konnte in den Rosettenblättern der generierten FAX1-RNAi Linien eine Verringerung der FAX1 Genexpression und damit ein *knockdown* Effekt durch das FAX1-RNAi-Konstrukt nachgewiesen werden. Von der Aussaat bis zur Samenreife zeigten die Pflanzen keinen phänotypischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp Col-0.

Ebenfalls wurde der relative FAX2 Transkriptgehalt in den FAX2-RNAi Linien im wildtypischen Hintergrund Col-0 untersucht (siehe Abb. 5.8).

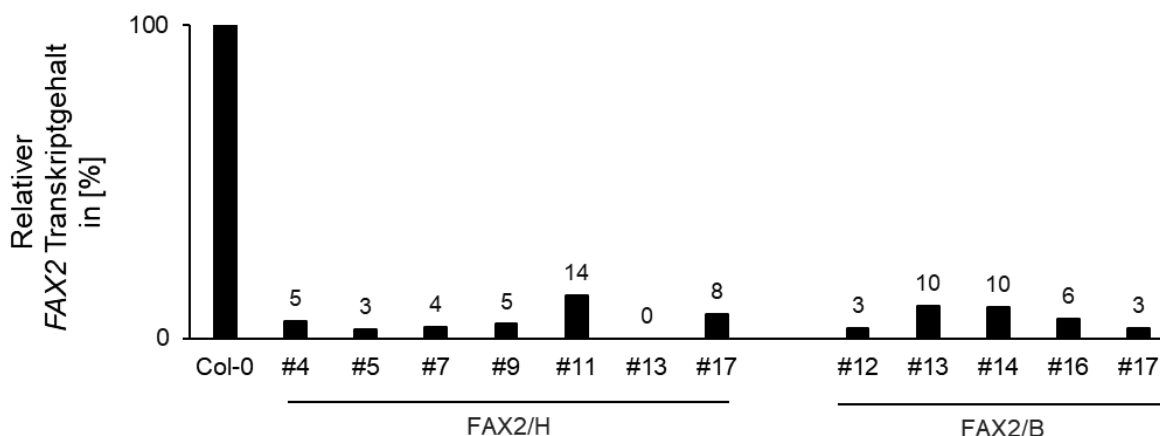


Abb. 5.8: Relativer *FAX2* Transkriptgehalt von Pflanzenlinien mit einem *FAX2*-RNAi Konstrukt. Die Bestimmung des Transkriptgehaltes erfolgte über eine qRT-PCR aus vier Wochen alten Rosettenblättern verschiedener Pflanzenlinien von *FAX2*-RNAi im wildtypischen Hintergrund Col-0. Gezeigt sind die Nummern der untersuchten Linien (bezeichnet mit # Nr.) der jeweiligen Konstrukte (H = pH7GWIWG2 (I) und B = pB7GWIWG2 (I)) aus der T1 Generation, wobei pro Linie nur eine Pflanze (n = 1) gemessen wurde. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Col-0 normiert.

Es wurde in allen überprüften *FAX2*-RNAi Linien eine deutliche Senkung der *FAX2* Transkriptmenge um etwa 75% im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (siehe Abb. 5.8). Phänotypisch zeigten die Pflanze der Linie FAX2/pH #3 einen dicken Stengel. Auch wurden bei einzelnen Pflanzen die Ausbildung mehrerer Vegetationskegel beobachtet. Jedoch konnten diese phänotypischen Ausprägungen nicht in der Folgegeneration T2 verifiziert werden und waren wahrscheinlich durch das Umsetzen der Keimlinge vom Agar-Selektionsmedium auf Erde bedingt, sodass der *knockdown* Effekt des *FAX2*-RNAi zu keinen Beeinträchtigungen bei der Pflanzen- und Samenentwicklung führte.

Zusätzlich zu den *FAX1* und *FAX2* RNAi Linien, wurden im Zuge dieser Arbeit ebenfalls *FAX3* und *FAX4* RNAi Linien generiert. Zur Herstellung von Pflanzenlinien mit einem *FAX1* bis *FAX4* RNAi, wurden entsprechende Konstrukte erstellt (siehe Kap. 4.14) und anschließend in den Wildtyp Columbia-0 transformiert. Auch erfolgte eine Transformation des *FAX2*-, *FAX3*- bzw. *FAX4*-RNAi Konstrukts in heterozygote *fax1-1* bzw. *fax1-2* Mutanten (siehe Tab. 5.3). Konstrukte mit einer Glufosinat-Resistenz eigneten sich aufgrund der Resistenz auf der inserierten T-DNA nicht für eine Transformation in *fax1-1*.

Tab. 5.3: Übersicht der hergestellten FAX1- bis FAX4-RNAi Linien. Die hergestellten RNAi-Konstrukte wurden sowohl in den Wildtyp Columbia-0 (Col-0) als auch in heterozygoten *fax1-1* und *fax1-2* Pflanzen transformiert und die entsprechende Anzahl an transformierten Pflanzen (bezeichnet als T0 Generation) vermerkt. In der T1 Generation erfolgte die Selektion auf Hygromycin (bei pH7GWIWG2 (I)) bzw. Glufosinat (bei pB7GWIWG2 (I)). Jede erfolgreich selektierte Pflanze repräsentiert dabei eine unabhängigen Linie, welche in der T1 Generation über eine PCR-Genotypisierung überprüft und anschließend vermehrt wurde. Abk.: B: pB7GWIWG2 (I), H: pH7GWIWG2 (I), Linien: erfolgreich selektierte, unabhängige Linien, n/a: nicht untersucht, T0, T1, T2: Angabe der Generation.

RNAi	Plasmid	Transformation	T0	Linien T1/T2
FAX1	H	Col-0	4	#1 - 30
FAX2	H	Col-0	4	#1 - 26
FAX2	B	Col-0	3	#1 - 22
FAX2	H	<i>fax1-1</i>	4	#1 - 8
FAX2	B	<i>fax1-2</i>	3	#1 - 20
FAX2	H	<i>fax1-2</i>	1	n/a
FAX3	H	Col-0	4	#1 - 10
FAX3	B	Col-0	3	#1 - 10
FAX3	H	<i>fax1-1</i>	3	n/a
FAX3	B	<i>fax1-2</i>	6	n/a
FAX4	H	Col-0	3	n/a
FAX4	H	<i>fax1-1</i>	6	n/a
FAX4	H	<i>fax1-2</i>	5	n/a

Die *FAX1* bis *FAX4* RNAi-Konstrukte mit einem entsprechenden pH7GWIWG2 (I) oder pB7GWIWG2 (I) Plasmid wurden in den Wildtyp Columbia-0 (Col-0) als auch in heterozygoten *fax1-1* und *fax1-2* Pflanzen transformiert (siehe Tabelle 5.3). Die generierten *FAX1* bis *FAX4* -RNAi Linien wurden in der T1 Generation auf Glufosinat bzw. Hygromycin selektiert und mittels einer PCR-Genotypisierung auf das entsprechende *FAX*-RNAi Konstrukt überprüft. Dabei wurden in der T1 Generation unabhängige Pflanzenlinien identifiziert und diese zu T2 vermehrt (siehe Tabelle 5.3). Die transformierten *FAX3*-RNAi Konstrukte in heterozygoten *fax1-1* bzw. *fax1-2* Linien und die transformierten *FAX4*-RNAi Linien wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Zum Nachweis eines RNAi Effektes wurde in einigen der *FAX1* und *FAX2* RNAi Linien die *FAX1* bzw. *FAX2* Transkriptmenge bestimmt (siehe Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Messung der Transkriptgehalte in den FAX1- und FAX2-RNAi Linien. Die hergestellten RNAi-Konstrukte wurden sowohl in den Wildtyp Col-0 als auch in heterozygote *fax1-1* und *fax1-2* Pflanzen transformiert. Nach einer erfolgreichen Selektion in der T1 Generation und Überprüfung mittels einer PCR-Genotypisierung, wurden unabhängige Linien identifiziert und vermehrt. Über eine qRT-PCR wurde der relative FAX1 bzw. FAX2 Transkriptgehalt bestimmt. Die FAX1-RNAi Linien wurden in der T2 Generation auf ihren relativen FAX1 Transkriptgehalt untersucht, bei den FAX2-RNAi Linien wurde in der T1 Generation der relative FAX2 Transkriptgehalt gemessen. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Col-0 normiert. Abk.: Col-0: Columbia-0, pB: pB7GWIWG2 (I), pH: pH7GWIWG2 (I), T1, T2: Angabe der Generation.

Transformation	Generation	Linie	Transkript [%]
FAX1/pH in Col-0	T2	#1	34,10
		#10	36,19
		#12	28,68
		#13	29,03
		#14	44,66
		#15	326,50
		#17	181,14
		#20	63,60
		#23	34,08
		#24	32,02
		#27	34,80
#30	64,11		
FAX2/pH in Col-0	T1	#4	5,29
		#5	2,86
		#7	3,56
		#9	4,51
		#11	13,58
		#13	0,00
		#17	7,59
FAX2/pB in Col-0	T1	#12	3,04
		#13	10,29
		#14	10,01
		#16	6,12
		#17	3,28
FAX2/pH in <i>fax1-1</i>	T1	#2	4,48
		#5	4,77
		#7	0,00
FAX2/pB in <i>fax1-2</i>	T1	#4	8,84
		#9	0,00
		#17	0,00
		#18	16,61

Die generierten *FAX1*-, *FAX2*-, *FAX3*- bzw. *FAX4*-RNAi Konstrukte wurden in den Wildtyp Col-0 transformiert und dabei aus jeder erfolgreich selektierten Pflanze eine unabhängige Linie gewonnen (siehe Tab. 5.3). Die *FAX1*-RNAi Linien wurden in der T2 Generation über eine qRT-PCR auf den relativen *FAX1* Transkriptgehalt in Rosettenblättern überprüft und für die Messung neue Primer erstellt. Über die Messung des *FAX1* Transkriptgehaltes konnte in 10 von 12 Pflanzen eine Reduzierung im Vergleich zu Col-0 nachgewiesen werden (siehe Tab. 5.4, Abb. 5.7). Bei den Pflanzenlinien mit einem *FAX2*-RNAi Konstrukt wurde über die Bestimmung des *FAX2* Transkriptgehaltes in Rosettenblättern der T1 Generation in allen untersuchten Linien eine Senkung der *FAX2* Transkriptmenge nachgewiesen (siehe Tab. 5.4, Abb. 5.8). Somit konnte in den transformierten *FAX1* und *FAX2* RNAi Linien ein reduzierender Effekt auf der Transkriptebene nachgewiesen werden, jedoch zeigten die untersuchten Pflanzen keinen vom Wildtyp Col-0 abweichenden Phänotyp.

5.4 Charakterisierung der *fax2* und *fax3* Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten

Nachdem durch die Untersuchung der *FAX2*-RNAi Pflanzen in mehreren Linien zwar ein *knockdown* Effekt nachgewiesen wurde, jedoch kein Phänotyp während der Pflanzenentwicklung festgestellt werden konnte, wurden die *fax2-1* (FLAG_426D07) und *fax3-1* (FLAG_454B11) T-DNA Insertionslinien näher untersucht. Diese wurden zur besseren Keimung auf MS-Agarmedium ausgesät und anschließend zur Samenproduktion auf Erde überführt und genotypisiert. Zur Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien *fax2-1* und *fax3-1* wurden Oligonukleotid-Primer entworfen (siehe Abb. 5.9), welche die T-DNA-Insertionen flankieren. Die Genotypisierung der 24 erhaltenen Samen der *fax2-1* T-DNA Insertionsmutante ergab 12 wildtypische Pflanzen ohne eine T-DNA Insertion, 6 heterozygote Pflanzen (T-DNA Insertion auf einem Allel) und 6 homozygote Pflanzen (T-DNA Insertion auf beiden Allelen). Die Primer zur Genotypisierung wurden ebenfalls zur Sequenzierung genutzt, um die Lokalisation der T-DNA in dem *FAX2*- bzw. *FAX3* Gen zu bestimmen (siehe Abb. 5.9).

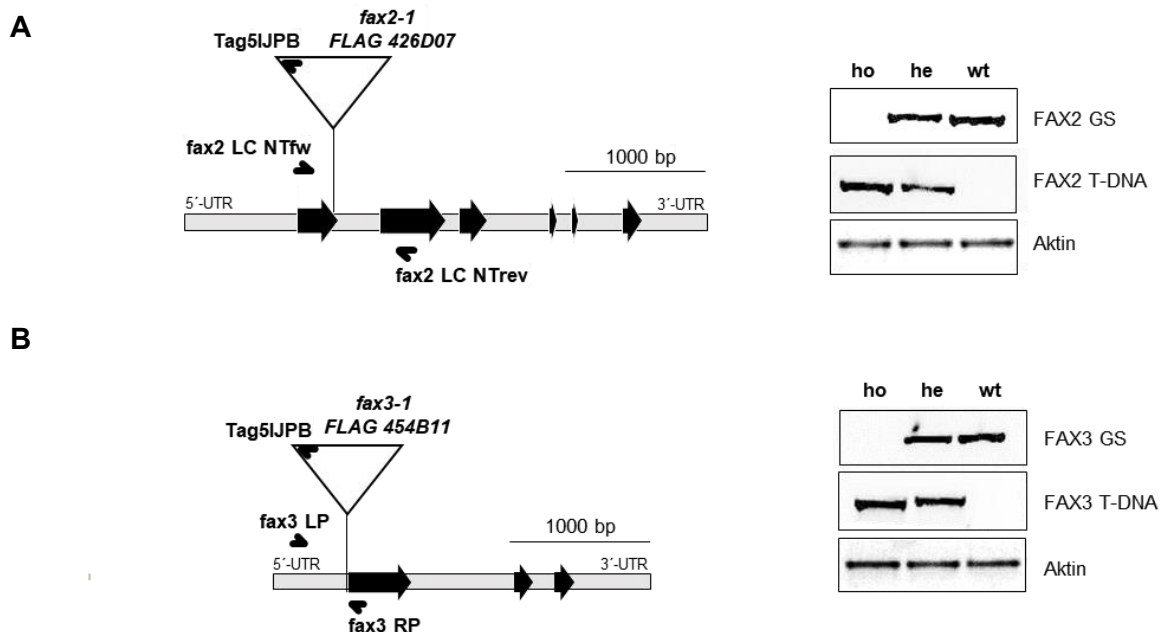


Abb. 5.9: Schematische Darstellung der T-DNA Insertion in *FAX2* und *FAX3* und Verifikation der Insertion über PCR-Genotypisierung. (A) Das *FAX2* Gen (At2g38550) ist 4300 bp lang und besteht aus sechs Exons (schwarze Pfeile). Bei der T-DNA Insertionslinie *fax2-1* (FLAG_426D07) ist die T-DNA (dargestellt als Dreieck) am Ende des ersten Exons an der Position +233 bp lokalisiert. Gezeigt ist die Position, Orientierung und Name der Gen- und T-DNA-spezifischen Primer zur Genotypisierung und Sequenzierung. (B) Das *FAX3* Gen (At3g43520) ist 3850 bp lang und besteht aus drei Exons (schwarze Pfeile). Bei der T-DNA Insertionslinie *fax3-1* (FLAG_454B11) ist die T-DNA (dargestellt als Dreieck) im 5'-UTR Bereich 23 bp vor dem ersten Exon lokalisiert. Gezeigt ist die Position, Orientierung und Name der Gen- und DNA-spezifischen Primer zur Genotypisierung und Sequenzierung.

Zum Nachweis der genomischen Sequenz von *FAX2* in den *fax2-1* Mutanten wurden die Primer At-FAX2 LC-NT fw und rev verwendet mit einem PCR-Produkt von 595 bp (siehe Abb. 5.9). Für die *fax3-1* Mutanten wurden die Primer fax3_LPnew und fax3_RP mit einem PCR-Produkt von 335 bp verwendet (siehe Abb. 5.9). Zum Nachweis der T-DNA Insertion wurde der genspezifische Primer At-FAX2 LC-NT fw bzw. fax3_LPnew und der T-DNA spezifische Primer Tag5 IJPB verwendet (PCR Produkt bei *fax2-1* 466 bp und bei *fax3-1* 536 bp). Die genomischen Primer liegen dabei außerhalb der T-DNA Insertionsstelle, der T-DNA spezifische Primer liegt an der 'Left Border' (LB) der T-DNA (siehe Abb. 5.9). Die T-DNA Insertion in homozygoten Mutanten führt zu einem Transkriptverlust von *FAX2* bzw. *FAX3*, welches mittels einer RT-PCR überprüft wurde (siehe Abb. 5.9). Beide T-DNA Insertionslinien, *fax2-1* und *fax3-1*, haben den Ökotyp Wassilewskija (Ws-4) als Wildtyp. Von der Aussaat bis zur Samenreife konnte unter Standardbedingungen bei den homozygoten Pflanzen kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp festgestellt werden. Daraufhin wurden die Pflanzen der heterozygoten *fax2-1* Linie #18 und #21 und für *fax3-1* Linie #14 und #17 auf ihre Segregation untersucht (siehe Tab. 5.5). Dazu wurden Samen auf Agarmedium ausgesät, unter Langtags-Bedingungen angezogen und der Keimling im Alter von vier Wochen genotypisiert.

Tab. 5.5: Segregation von heterozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmutanten. Die Untersuchung der vier Wochen alten Keimlinge erfolgte durch PCR- Genotypisierung. Gezeigt ist die Anzahl der ausgesäten Samen (Nr. Aussaat), davon die Anzahl der nicht gekeimten Samen, Keimlingen mit einem verminderten Wachstum und nicht funktionierender (n.f.) DNA Isolierung oder PCR. Das Ergebnis zur Segregation bezieht sich auf alle erfolgreich genotypisierten Keimlinge mit den Genotypen: homozygot (ho) für die T-DNA Insertion auf beiden Allelen, heterozygot (he) für die T-DNA Insertion auf einem Allel und der rücksegregierte Wildtyp (wt) ohne eine T-DNA Insertion in *FAX2* bzw. *FAX3*. Die obere Zeile zeigt die absolute Anzahl, die untere Zeile die Prozentangaben (%) an.

Pflanzenlinien	Nr. Aussaat	n. gekeimt	kl. Phänotyp	n.f. DNA/ PCR	Nr. PCR	ho	he	wt
<i>fax2-1</i>	177	9	0	22	146	42	65	39
	%	5,1	0,0	12,4	%	28,8	44,5	26,7
<i>fax3-1</i>	146	2	4	22	122	28	45	49
	%	1,4	2,7	15,1	%	23,0	36,9	40,2

Für *fax2-1* wurden 177 Samen ausgesät, wobei davon 5,1% nicht gekeimt sind und bei 12,4% der Proben die DNA-Isolierung oder PCR-Genotypisierung nicht funktioniert hatte (siehe Tab. 5.5). Es gab keine Pflanzen mit einem auffällig kleinem Phänotyp. Das Segregationsergebnis zeigte eine genotypische Verteilung von 28,8% homozygote, 44,5% heterozygote und 26,7% wildtypischen Nachkommen (siehe Tab. 5.5). Für *fax3-1* wurden 146 Samen ausgesät, wovon 1,4% nicht gekeimt waren und bei 15,1% der Proben die DNA-Isolierung oder PCR-Genotypisierung nicht funktioniert hatte (siehe Tab. 5.5). Dabei zeigten 2,7% der Keimlinge einen kleinen Phänotyp. Das Segregationsergebnis zeigte eine genotypische Verteilung von 23,0% homozygoten, 36,9% heterozygoten und 40,2% wildtypische Nachkommen (siehe Tab. 5.5). Die Segregation der heterozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Mutanten verlief annähernd zu einer mendelschen Verteilung mit 25% homozygoten Nachkommen.

Um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von *FAX2* und *FAX3* zu bekommen, wurden die Einzelmutanten auf eine Regulation durch weitere *FAX* Gene auf Expressionsebene über eine qRT PCR überprüft (siehe Abb. 5.10 für *fax2-1* und Abb. 5.11 für *fax3-1*). Dafür wurden die homozygoten *fax2-1* Linie #1 und *fax3-1* Linie #13, beide aus der T5 Generation, unter Langtangs-Bedingungen angezogen und bei der Ernte je drei Rosetten zu einer Probe vereint. Die daraus gewonnene RNA wurde über reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend der Transkriptgehalt mit den entsprechenden Oligonukleotiden (siehe Abb. 4.3) in einer qRT-PCR überprüft. Als Kontrolle diente für *fax2-1* der rücksegregierte Wildtyp Linie #9 und für *fax3-1* der rücksegregierte Wildtyp Linie #5, ebenfalls beide aus der T5 Generation (siehe Abb. 5.10 für *fax2-1* und Abb. 5.11 für *fax3-1*).

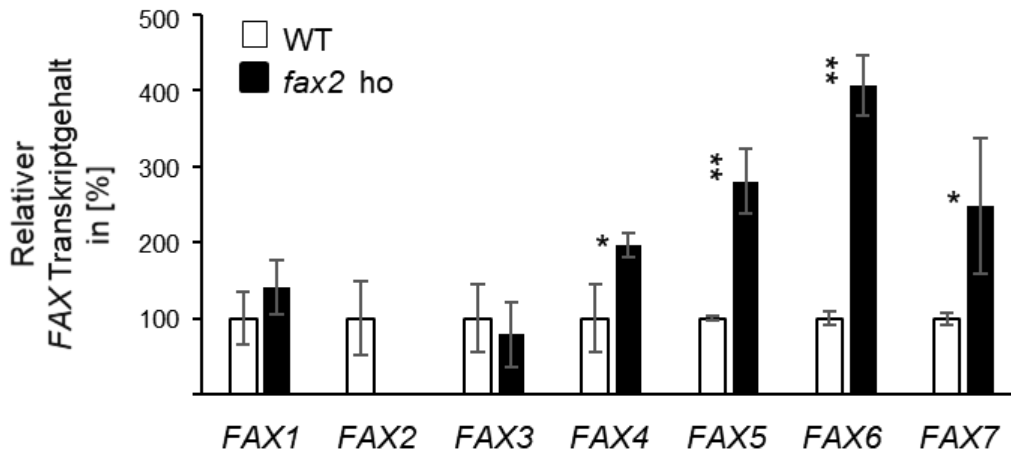


Abb. 5.10: Quantifizierung der FAX Transkriptgehalte in der homozygoten *fax2-1* Mutante. Die Bestimmung des Transkriptgehaltes erfolgte über eine qRT-PCR aus vier Wochen alten Rosettenblättern von homozygoten *fax2-1* Pflanzen. Dabei wurden je 3 Pflanzen zu einer Probe vereinigt und von jeder Probe drei technische Replikate gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert von $n = 3 \pm \text{STABW}$. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Col-0 normiert. Die Signifikanz ist im Vergleich zum Wildtyp Col-0 angegeben (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, nach student's t-test).

Die homozygote *fax2-1* Mutante wurde über die Bestimmung des *FAX2* Transkriptgehaltes nochmals als eine *knockout* Mutante bestätigt und in dieser Veränderungen der *FAX* Transkriptgehalte gemessen (siehe Abb. 5.10). Bei einem Verlust von *FAX2* war der Transkriptlevel von *FAX4* 2-fach, *FAX5* 2,8-fach, *FAX6* 4,1-fach und *FAX7* 2,5-fach höher im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (siehe Abb. 5.10). Bei *FAX1* wurde mit etwa 1,4-fach ein leicht höherer, jedoch nicht signifikanter, Transkriptgehalt im Vergleich zum Wildtyp gemessen (siehe Abb. 5.10). In der homozygoten *fax2-1* Mutante wurde keine Veränderung der *FAX3* Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (siehe Abb. 5.10).

Ebenso wurde die homozygote *fax3-1* Einzelmutante über eine qRT-PCR auf die *FAX* Transkriptgehalte überprüft (siehe Abb. 5.11).

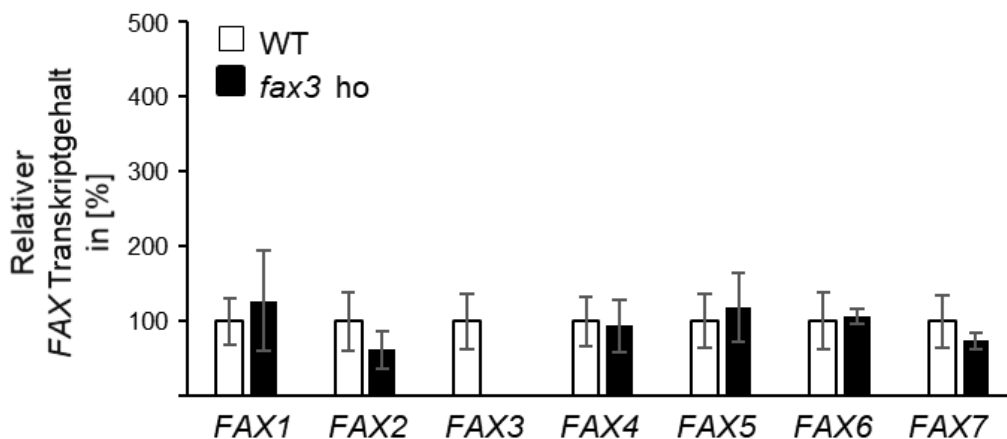


Abb. 5.11: Quantifizierung der FAX Transkriptgehalte in der homozygoten *fax3-1* Mutante. Die Bestimmung der Transkriptgehalte erfolgte über eine qRT-PCR aus vier Wochen alten Rosettenblättern von homozygoten *fax3-1* Pflanzen. Dabei wurden je 3 Pflanzen zu einer Probe vereinigt und von jeder Probe drei technische Replikate gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert von $n = 3 \pm \text{STABW}$. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Wildtyp Col-0 normiert.

Die homozygote *fax3-1* Mutante wurde über die Bestimmung des *FAX3* Transkriptgehaltes nochmals als eine *knockout* Mutante verifiziert. Jedoch wurden keine Änderungen der *FAX* Transkriptgehalte im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (siehe Abb. 5.11). Somit schien der Verlust von *FAX3* keinen Effekt auf die Transkriptmenge der anderen *FAX* Gene zu haben. Damit zeigte die Untersuchung der *fax2-1* und *fax3-1* T-DNA Insertionsmutanten keine Auffälligkeiten bei der Pflanzenentwicklung der homozygoten Pflanzen und keine nennenswerten Unterschiede der heterozygoten Pflanzen bei der Segregation. Die Transkriptuntersuchung der *FAX* Gene in der homozygoten *fax2-1* Einzelmutante ergab eine Erhöhung der Transkriptmengen von *FAX4*, *FAX5/6* und *FAX7*, wogegen in den Rosettenblättern von homozygoten *fax3-1* Einzelmutanten keine Transkriptänderung der restlichen *FAX* Gene nachgewiesen werden konnte.

Während der Pflanzenentwicklung konnten durch die Deletion von entweder *FAX2* oder *FAX3* alleine kein abweichender Phänotyp vom Wildtyp festgestellt werden, deswegen wurden *fax2/fax3* Doppelmutanten, Pflanzenlinien mit beiden ausgeschalteten Genen, erzeugt. Aus der Kreuzung von homozygoten *fax2-1* (Linie #18 und #21) mit homozygoten *fax3-1* (Linie #4) Pflanzen wurden *fax2/3* Doppelmutanten generiert und durch Genotypisierung in der F3 Generation die Linien #2 und #8 als homozygot für *fax2* und *fax3* bestätigt. Die Wildtyp Linien #4 und #10 wurden in der F3 Generation über PCR-Genotypisierung überprüft und vermehrt. Phänotypische Untersuchungen der homozygoten *fax2/3* Linie #8 unter Normalbedingungen ergaben keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp Linie #10 (siehe Tab. 5.6). Um einen möglichen Effekt der *FAX2/FAX3* Deletion auf der Expressionsebene zu untersuchen, wurden

die homozygoten *fax2-1/3-1* Doppelmutanten Linie #8 mit dem entsprechenden rücksegregierten Wildtyp Linie #10 auf die Expression der sieben *FAX* Gene in vier Wochen alten Rosettenblättern über eine qRT-PCR überprüft (siehe Abb. 13.5). Über die Bestimmung der *FAX2* und *FAX3* Transkriptgehalte konnte in der homozygoten *fax2/3* Doppelmutante der Verlust von *FAX2* und *FAX3* auf Transkriptebene bestätigt werden. Die *FAX* Transkriptmenge in der homozygoten *fax2/3* Doppelmutante wurde einmalig und mit einer geringen Anzahl an Pflanzen untersucht und dabei keine relevanten Veränderung der *FAX* Transkriptgehalte im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (siehe Abb. 13.5).

5.4.1 Phänotypisierung der *fax2* und *fax3* Mutanten unter Kurztags-Bedingungen

Zur Charakterisierung der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmutanten sowie der homozygoten *fax2/3* Doppelmutanten wurde die Pflanzenentwicklung bei einer kurzen Lichtperiode überprüft. Dazu wurden Pflanzen der homozygoten *fax2-1* Einzelmutante (Linien #12, #19, #21 und #23) mit dem dazugehörigen rücksegregierten Wildtyp (Linien #3, #6, #7 und #10), homozygote *fax3-1* Einzelmutanten (Linien #13 und #18) mit dem rücksegregierten Wildtyp Linie #2 und #5 sowie homozygote *fax2/3* Doppelmutanten (Linie #8) und entsprechendem Wildtyp (Linie #10) auf Erde ausgesät und bei acht Stunden Licht angezogen (siehe Abb. 5.12, Tab. 5.6). Die ausgewählten T-DNA Insertionslinien hatten als Wildtyp den Ökotyp Ws-4, weswegen *FAX2*-RNAi (Linien #H5, #H7, #H16 und #B12) im Wildtyp Col-0 zur Kontrolle herangezogen wurden. Phänotypische Untersuchungen zeigten nach etwa acht Wochen unter Kurztag keinen Unterschied bei den homozygoten *fax3-1* Einzelmutanten und der *fax2/3* Doppelmutanten (siehe Tab. 5.6). Dagegen war bei einigen Pflanzen der *fax2-1* Mutante ein Unterschied in der Blattfarbe und Struktur erkennbar (siehe Abb. 5.12).



Abb. 5.12: Phänotypisches Erscheinungsbild einiger Pflanzen der homozygoten *fax2-1* Mutanten nach acht Wochen unter Kurztag. Gezeigt sind (A) der Habitus und (B) die Rosettenblätter von acht Wochen alten *fax2-1* Mutanten (*fax2*) und entsprechendem rücksegregiertem Wildtyp (*wt*) auf Erde unter Kurztags-Bedingungen. (C) Zeigt einen mikroskopischen Querschnitt eines eingerollten Rosettenblattes. Die schwarzen Pfeile markieren phänotypische Unterschiede in Zellen des Palisadenparenchyms.

Nach etwa acht Wochen konnte unter Kurztags-Bedingungen ein phänotypischer Unterschied bei einigen Pflanzen der *fax2-1* Mutanten im Vergleich zum rücksegregierten Wildtyp beobachtet werden (siehe Abb. 5.12). Die Rosettenblätter waren dabei hellgrün bis gelblich und an den Seiten stärker eingerollt als beim Wildtyp (siehe Abb. 5.12, Tab. 5.6). Mikroskopische Untersuchungen an eingerollten Rosettenblättern zeigten stark eingedrückte Zellen im Palisadenparenchym in der *fax2-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 5.12). Die *FAX2*-RNAi Pflanzen in Col-0 sowie der rücksegregierte Wildtyp von *fax2-1* zeigten jedoch keinen Phänotyp, was zu der Idee einer möglichen Hintergrundmutation durch eine T-DNA Insertion in *fax2-1* Mutanten geführt hat. Um Pflanzen mit einer möglichen T-DNA Insertion im genetischen Hintergrund zu identifizieren, erfolgte eine Aussaat der zu testenden Linien auf Erde unter Langtags-Bedingungen und eine anschließende PCR-Genotypisierung (siehe Tab. 5.6, Abb. 5.13). Dabei wurde auf phänotypische Merkmale wie Größe der Rosettenblätter, Gelb- und Braunfärbung der Blätter und auf das Einrollen der Blätter geachtet (siehe Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Überprüfung der Pflanzenlinien auf eine mögliche T-DNA Hintergrundinsertion. Untersucht wurden homozygote *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmутanten sowie *fax2/3* Doppelmутanten mit jeweils den entsprechenden rücksegregierten Wildtypen sowie *FAX2*-RNAi Linien im wildtypischen Hintergrund Col-0. Die Phänotypisierung erfolgte unter Kurztags- und Langtagsbedingungen. Unter Kurztag wurden die Samen der homozygoten *fax2-1* Mutante und des rücksegregierten Wildtyps als eine Mischung von vier Pflanzenlinien ausgesät. Manche Pflanzenlinien wurden jeweils nur unter Kurztag oder Langtag phänotypisiert und sind entsprechend als nicht phänotypisiert vermerkt (-). Pflanzenlinien mit einem auffälligen Phänotyp wurden nicht weiter vermehrt. Abk.: gr: groß, grün, ho: homozygot, Pfl. untersch.: Pflanzen unterschiedlich, WT: Wildtyp.

Mutante	Linie	Generation	Phänotyp	
			Kurztag	Langtag
<i>fax2</i> (WT)	#3 #6 #7 #10	T4	gr	-
	#1	T4	-	gr
	#2	T4	-	gr
	#3	T4	-	klein
<i>fax2</i> (ho)	#12 #19 #21 #23	T4	hellgrün-gelb, eingerollt	-
	#9	T5	-	gr
	#12	T4	-	Pfl. untersch.
	#18	T4	-	gr
	#19	T4	-	klein, gelb
#23	T4	-	klein, gelb	
<i>fax3</i> (WT)	#2	T4	gr	gr
	#5	T5	gr	Pfl. untersch.
<i>fax3</i> (ho)	#13	T5	gr	gr
	#18	T4	gr	gr
<i>fax2/3</i> (WT)	#10	F3	gr	gr
<i>fax2/3</i> (ho)	#8	F3	gr	gr
<i>FAX2</i> RNAi	#H5	T2	gr	-
	#H7	T2	gr	-
	#H16	T2	gr	-
	#B12	T2	gr	-

Bei der Aussaat unter Kurztag wurde für die homozygote *fax2-1* Mutante eine Mischung der Linien #12, #19, #21 und #23 verwendet und es zeigten sich bei einigen Pflanzen hellgrüne bis gelbliche Blätter, welche am Rand eingerollt waren (siehe Abb. 5.12, Tab. 5.6). Die Pflanzen des entsprechenden rücksegregierten Wildtyps Linien #3, #6, #7 und #10 zeigten keinen auffälligen Phänotyp und hatten große, grüne Blätter (siehe Abb. 5.12, Tab. 5.6). Unter der Anzucht bei Langtag zeigten die Pflanzen der homozygoten *fax2-1* Linie #9 und Linie #18 keine Auffälligkeiten, wogegen bei Linie #12 die Pflanzen einen unterschiedlich ausgeprägten Phänotyp aufwiesen und bei Linie #19 und #23 die Pflanzen klein und gelb waren (siehe Tab. 5.6). Die homozygoten *fax2-1* Linien #9 und #18, welche keinen auffälligen Phänotyp zeigten, wurden vermehrt und die Linien #12, #19 und #23 aufgrund eines auffälligen Phänotyps vor der Samenreife aussortiert. Beim rücksegregierten Wildtyp der *fax2-1* Pflanzen zeigte die Linie #1 und Linie #2 keine Auffälligkeiten und die Pflanzen hatten große, grüne Blätter, während die Pflanzen der Linie #3 einen kleinen Phänotyp aufwiesen (siehe Tab. 5.6).

Nach einer Überprüfung durch eine PCR-Genotypisierung wurden bei zwei Pflanzen der *fax2-1* WT Linie #3 eine T-DNA Insertion nachgewiesen (siehe Abb. 5.13), sodass die Pflanzenlinie #3 vor der Samenreife aussortiert wurde. Bei der homozygoten *fax3-1* Mutante zeigten unter der Anzucht bei Kurztag und Langtag die Linien #13 und #18 keine Auffälligkeiten und wurden deswegen vermehrt (siehe Tab. 5.6). Die Pflanzen der Linie #5 des rücksegregierten Wildtyps der *fax3-1* Mutanten zeigten einen unterschiedlich ausgeprägten Phänotyp bei Langtags-Bedingungen und wurden deswegen aussortiert (siehe Tab. 5.6). Für die homozygote *fax2/3* Doppelmutante wurden die Linie #8 und der entsprechende rücksegregierten Wildtyp Linie #10 überprüft, dabei kein abweichender Phänotyp und keine T-DNA Insertion im Wildtyp festgestellt, und die Pflanzen dementsprechend vermehrt (siehe Tab. 5.6).

Die Überprüfung einer T-DNA Insertion erfolgte mittels der PCR-Genotypisierung. Dafür wurden für den Vektor pGKB5 T-DNA (INRA, Versailles, Frankreich) spezifische Primer erstellt und die Linien der homozygoten *fax2-1* Einzelmutante sowie der *fax2/3* Doppelmutante und den entsprechenden rücksegregierten Wildtypen über eine PCR auf eine mögliche T-DNA Hintergrundinsertion überprüft (siehe Abb. 5.13). In den homozygoten Linien der untersuchten *fax2-1* Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten wurde eine T-DNA Insertion nachgewiesen, wobei mit dieser Überprüfung nicht zwischen der T-DNA Insertion im Wunschen oder im Hintergrund unterschieden werden konnte. Bei zwei Pflanzen des rücksegregierten *fax2-1* Wildtyps Linie #3 konnte eine spezifische Bande bei der erwarteten Produktlänge von 432 bp detektiert und damit eine T-DNA Insertion im Hintergrund nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.13).

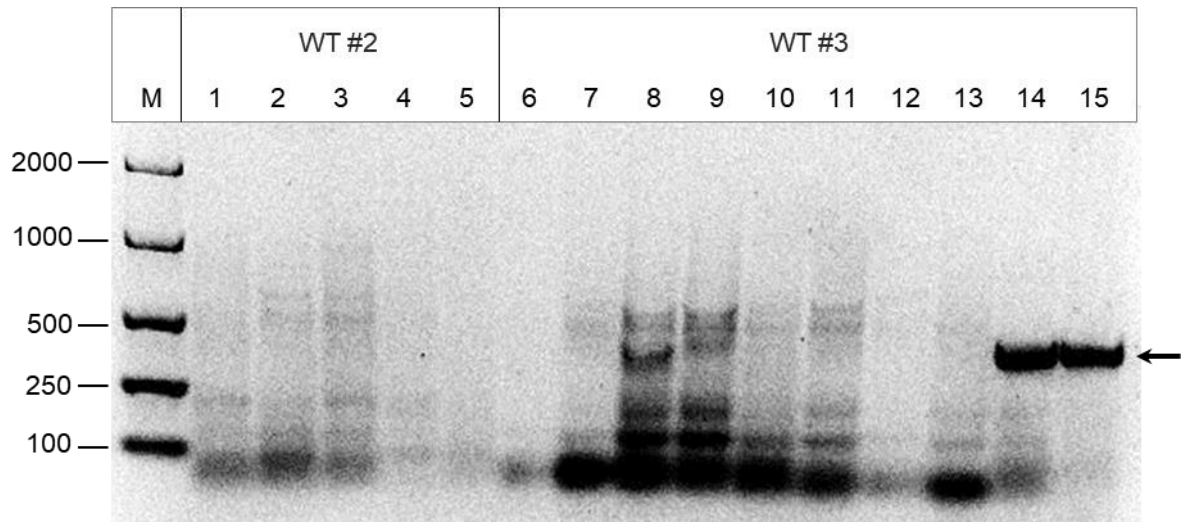


Abb. 5.13: Überprüfung einer T-DNA Insertion mittels einer PCR-Amplifizierung. Zum Nachweis einer möglichen T-DNA Insertion im Hintergrund der rücksegregierten Wildtypen von *fax2-1* Einzelmutanten wurden aus vier bis sechs Wochen alten Rosettenblättern die DNA isoliert und eine PCR mit den Primern T-DNA fw und rev bei einer Annealingtemperatur von 60°C und einer erwarteten Amplifikatgröße von 432 bp (schwarzer Pfeil) durchgeführt. Auf Spur 1 bis Spur 5 sind die PCR-Produkte der untersuchten Pflanzen des rücksegregierten Wildtyps der Linie #2 und auf Spur 6 bis Spur 15 der Linie #3 dargestellt. Der DNA Größenmarker (M) EasyLadder I von BioCat GmbH (Heidelberg) zeigt die Standardgrößen in bp auf einem 2%-igen Agarosegel an.

Die Auftrennung auf einem Agarosegel zeigte in der Linie #2 des rücksegregierten Wildtyps von *fax2-1* Mutante keine spezifischen und nur schwache unspezifische Banden, sodass in diesen überprüften Pflanzen keine T-DNA Insertion im Hintergrund vorlag (siehe Abb. 5.13). In der Linie #3 des rücksegregierten Wildtyps der *fax2-1* Mutante konnte bei zwei Pflanzen (Spur 14 und Spur 15) eine spezifische Bande bei einer erwarteten Amplifikatgröße von 432 bp und somit eine T-DNA Hintergrundinsertion nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.13). Die übrigen untersuchten Pflanzen der Linie #3 zeigten unspezifische Banden mit einer Größe von 100-650 bp. Die Pflanzenlinien mit einem auffälligen Phänotyp und/oder einer T-DNA Hintergrundinsertion wurden nach der Genotypisierung aussortiert und vor der Samenernte entsorgt. Der vermeintliche *fax2-1* Phänotyp unter Kurztags-Bedingungen wurde demnach durch eine Hintergrundmutation durch eine T-DNA Insertion in ein unbekanntes Gen hervorgerufen.

5.5 Charakterisierung unter Kältestressbedingungen

Während der Kälteakklimatisierung werden mehr Galaktolipide, wie MGDG und DGDG, als Kälte- und Frostschutz in die chloroplastidären Lipidmembranen eingebaut (siehe Kap. 1.4.2). Bei diesem Lipidremodeling könnten die FAX Proteine möglicherweise eine Funktion übernehmen. Voruntersuchungen mit homozygoten *fax1-1* and *fax1-2* T-DNA Insertionsmutanten zeigten bei Kälte ein beeinträchtigtes Pflanzenwachstum, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit auch *fax3-1* T-DNA Insertionsmutanten und *fax2/3*

Doppelmutanten auf die Pflanzenentwicklung bei Kälte und ihre Fähigkeit zur Kälteakklimatisierung überprüft wurden. Zur Untersuchung wurden *fax3-1* Einzelmutanten (homozygote Linie #13 aus der T4 Generation) und *fax2/3* Doppelmutanten (homozygote Linie #8 und wildtypische Linie #10, beide aus der F3 Generation) herangezogen, auf Erde ausgesät und vier Wochen unter Kurztags-Bedingungen bei 20°C angezogen. Um die Frosttoleranz der Blätter der *fax3* und *fax2/3* Mutanten mit und ohne vorhergehender Kälteakklimatisierung zu untersuchen, wurden sechs Pflanzen pro Linie für fünf Tage bei 4°C akklimatisiert und je sechs Pflanzen bei 20°C weiter wachsen gelassen. Anschließend wurde in den Blättern, aus fünf Pflanzen pro Linie und Temperaturbedingung, die Durchlässigkeit der Pflanzenmembran für Ionen bei einer Temperatur von bis zu -6°C über die Messung der elektrische Leitfähigkeit bestimmt (siehe Abb. 5.14).

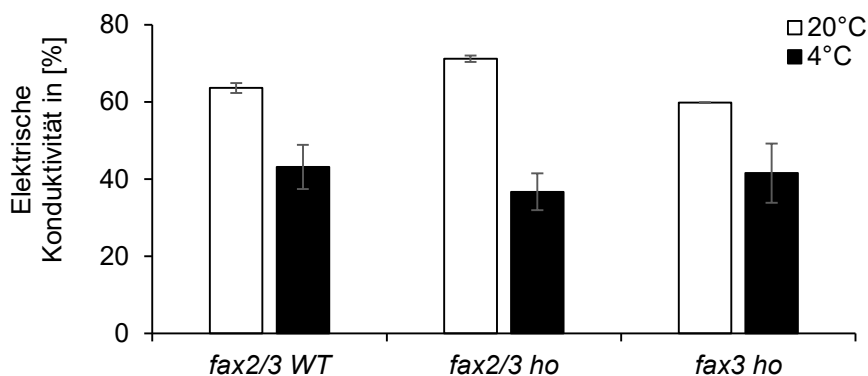


Abb. 5.14: Elektrische Leitfähigkeit bei kälteakklimatisierten *fax2/3* Doppelmutanten. Die *fax3-1* und *fax2/3* Mutanten wurden unter Kurztags-Bedingungen (10h Licht) bei konstant 20°C für vier Wochen angezogen. Danach wurden sechs Pflanzen einer Linie für fünf Tage bei 4°C akklimatisiert und je sechs Pflanzen als Kontrolle bei 20°C kultiviert. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit zeigt die Durchlässigkeit der Membran für Ionen in Rosettenblättern. Dazu wurde je ein Rosettenblatt von fünf Pflanzen einer Linie verwendet. Die maximale Durchlässigkeit entspricht 100%. Gezeigt ist der Mittelwert von $n = 5 \pm \text{STABW}$.

Alle untersuchten Pflanzenlinien konnten sich gut an die Kälte akklimatisieren und zeigten kleine Unterschiede bei der elektrischen Leitfähigkeit (bei *fax2/3* Wildtyp waren es 43%, bei den homozygoten *fax2/3* Doppelmutante 37% und bei der *fax3-1* Einzelmutante 42% Durchlässigkeit der Ionen) (siehe Abb. 5.14). Während der Kälteakklimatisierung wurde die Fluidität der Membranen zum Schutz vor Kälte erhöht, sodass beim Schockfrieren weniger Ionen durch die Membranen diffundierten. Ohne eine vorangegangene Kälteakklimatisierung bei konstant 20°C, wurden die Membranen durch Frost stärker geschädigt und es diffundierten etwa 18 bis 34% mehr Ionen aus der Pflanzenzelle (bei *fax2/3* Wildtyp 64%, bei den homozygoten *fax2/3* Doppelmutante 71% und bei der *fax3-1* Einzelmutante 60%) (siehe Abb. 5.14). Die Pflanzenanzucht und die Messung der elektrischen Leitfähigkeit erfolgten in

der Abteilung der Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Neuhaus an der TU Kaiserslautern.

Der Vorversuch zeigte, dass nach einer kurzen Kälteperiode von fünf Tagen die homozygoten *fax3-1* Einzelmutanten sowie die homozygoten *fax2/3* Doppelmutanten gut an die Kälte angepasst waren. Deswegen wurde die Pflanzenentwicklung der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmutanten sowie der *fax2/3* Doppelmutante unter einer längeren Kälteperiode untersucht. Da die Pflanzen der homozygoten *fax1-1* and *fax1-2* T-DNA Insertionsmutanten bei Kältevorversuchen bei einer Anzucht von konstant 10°C einen Phänotyp gezeigt hatten, aufgrund der männlichen Sterilität jedoch keine homozygoten Nachkommen vermehrt werden konnten, wurden auch *FAX1*-RNAi und *FAX1* Überexpressions Linien herangezogen. In der ersten Versuchsreihe wurde die *FAX1*-RNAi Linie #12 aus der T3 Generation und die 200-fach starke *FAX1* Überexpressionslinie #4 aus der T6 Generation zusammen mit dem Wildtyp Col-0 und die homozygote *fax3-1* Linie #13 (T5 Generation) mit dem entsprechenden, rücksegregierten *fax3-1* WT #2 (T4 Generation) untersucht (siehe Abb. 5.15). Zusätzlich wurde die *FAX1/ABCA9* Überexpressionslinie #3.1 aus der T3 Generation für die phänotypische Untersuchung unter Kältebedingungen herangezogen. Das ABCA9 Protein gehört zur Familie von ABC-Transportern der Unterfamilie A (Kang *et al.*, 2011), ist in der ER Membran lokalisiert und wird während der Samenentwicklung bei der TAG Akkumulierung exprimiert und ist somit in den Fettsäure/Acyl-CoA Import ins ER involviert (Kim *et al.*, 2013). Zunächst erfolgte die Voranzucht für 28 Tage unter Langtags-Bedingungen und danach wurden die Pflanzen für den Kältestress bei 4°C gestellt. Anschließend wurde eine initiale Phänotypisierung der Mutanten bei Kälte durchgeführt und auf Unterschiede bei der Ausbildung der Rosettenblätter geachtet (siehe Abb. 5.15).

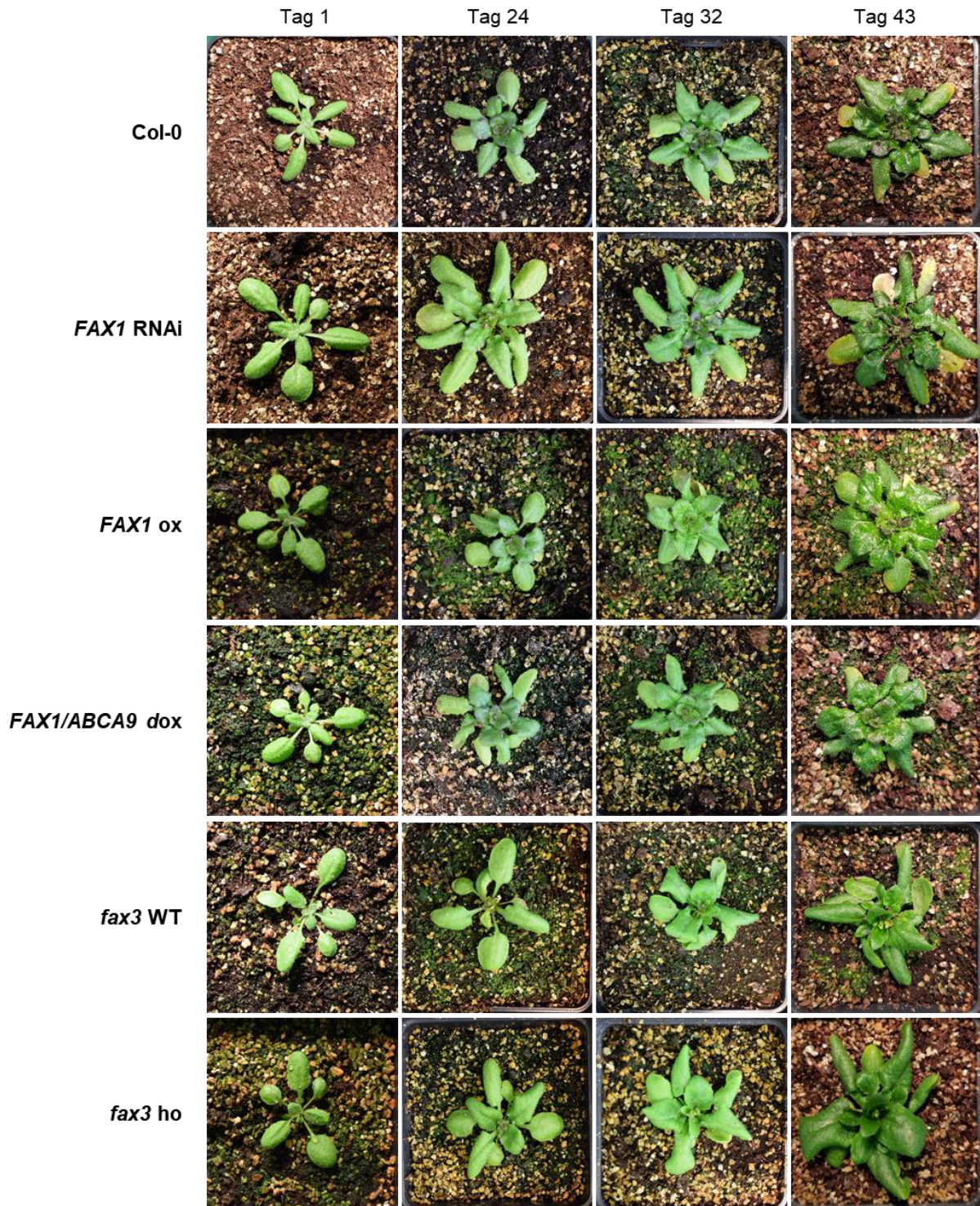


Abb. 5.15: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten Mutanten unter Kälte. Gezeigt ist die Rosette von jeweils einer Pflanze nach 1, 24, 32 und 43 Tagen auf Erde unter Kälte, die den Mittelwert des Erscheinungsbildes aller Pflanzen einer Linie repräsentiert. Der entsprechende Wildtyp der *FAX1*-RNAi-, der *FAX1* Überexpressions- sowie der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie, ist Col-0. Die homozygoten *fax3-1* Mutanten wurden mit dem entsprechenden, rücksegregierten *fax3-1* Wildtyp verglichen. Dabei wurden folgenden Linien untersucht: Col-0 (n=8), *FAX1*-RNAi (n=10), *FAX1* Überexpressionslinie (n=10), *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie (n=7), *fax3-1* WT und homozygote *fax3-1* (je Linie n=10).

Unter Kältebedingungen zeigten die Pflanzen der *FAX1*-RNAi Linie #12 einen vergleichbaren Phänotyp zum Wildtyp Col-0 mit einer Gelbfärbung und einem Einrollen der äußeren, älteren Rosettenblätter und einer leichten Rotfärbung der jüngeren Rosettenblätter sowie eine dunkelrote Knospung an (siehe Abb. 5.15). Bei den Pflanzen der *FAX1* Überexpressionslinie #4 und der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie #3.1 konnten ebenfalls gelbe, äußere Blätter nachgewiesen werden sowie ein leichtes Einrollen der älteren Blätter (siehe Abb. 5.15). Die Pflanzen der homozygoten *fax3-1* Mutante Linie #13 zeigten mit andauernder Kälteperiode sowohl große, breite Rosettenblätter, als auch überwiegend eingerollte Blätter ähnlich zum rücksegregierten Wildtyp Linie #2 an (siehe Abb. 5.15).

Ebenfalls wurde die Pflanzenentwicklung der homozygoten *fax2-1* Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten unter den bereits beschriebenen Kältebedingungen untersucht und dazu die homozygote *fax2-1* Linie #9 aus der T6 Generation mit dem entsprechenden, rücksegregierten Wildtyp *fax2-1* WT #2 aus der T5 Generation und für die homozygoten *fax2/3* Doppelmutante die Linie #8 mit dem entsprechenden *fax2/3* WT #10, beide aus der F4 Generation, herangezogen (siehe Abb. 5.16).

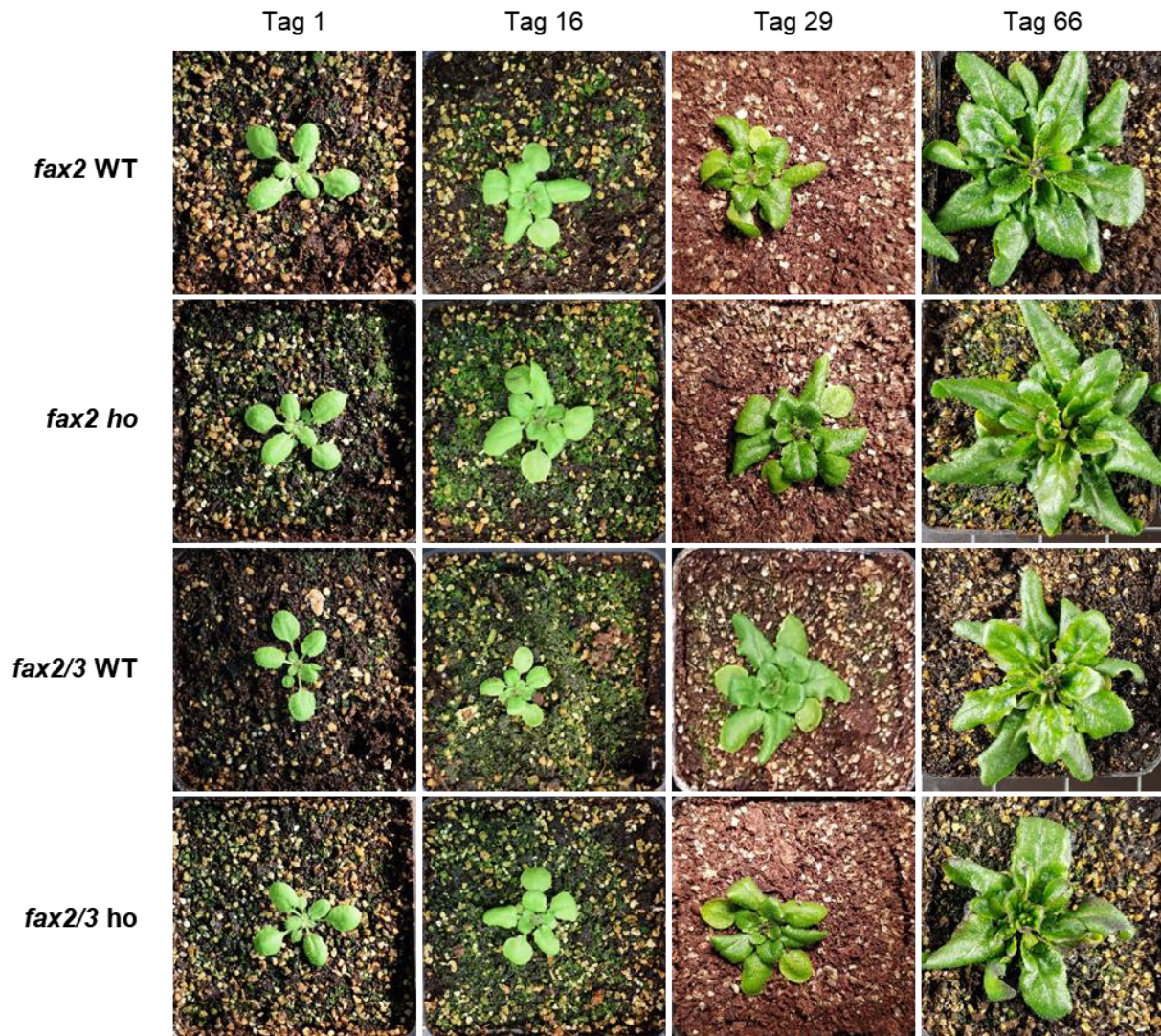


Abb. 5.16: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten *fax2* und *fax2/3* Mutanten unter Kälte. Gezeigt ist die Rosette von jeweils einer Pflanze nach 1, 16, 29 und 66 Tagen auf Erde bei 4°C, die den Mittelwert des Erscheinungsbildes aller Pflanzen einer Linie repräsentiert. Untersucht wurden homozygote *fax2-1 knockout* Mutanten und, durch Kreuzung von homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmantanten, generierte homozygote *fax2/3* Doppelmutanten mit dem entsprechenden, rücksegregierten Wildtypen. Dabei wurden folgende Linien untersucht: *fax2-1* WT und homozygote *fax2-1* (je Linie n=12), der rücksegregierte *fax2/3* WT (n=11) und die homozygote *fax2/3* Doppelmutante (n=10). Der Vergleich der homozygoten *fax2-1* und *fax2/3* Linien erfolgte zum entsprechenden rücksegregierten Wildtyp.

Der Vergleich der Pflanzen der homozygoten *fax2-1 knockout* Mutanten der Linie #9 mit den entsprechenden rücksegregierten Wildtyp #2 zeigten kaum phänotypische Unterschiede. In beiden Mutanten waren große, grüne Rosettenblätter zu erkennen, die in der homozygoten *fax2-1* Mutanten nach einer längeren Kälteperiode etwas stärker eingerollt waren (siehe Abb. 5.16). Bei der homozygoten *fax2/3* Doppelmutante Linie #8 und dem entsprechenden Wildtyp #10 konnten ebenfalls keine ersichtlichen phänotypischen Unterschiede während der Pflanzenentwicklung festgestellt werden. Sowohl die älteren, als auch die jüngeren Rosettenblätter zeigten keine Anzeichen von Kälteschäden (siehe Abb. 5.16).

Zum besseren Vergleich der Pflanzen wurde nach 42 Tagen unter der Anzucht bei 4°C der Rosettendurchmesser der Pflanzen jeder Linie bestimmt und graphisch gegenübergestellt (siehe Abb. 5.17).

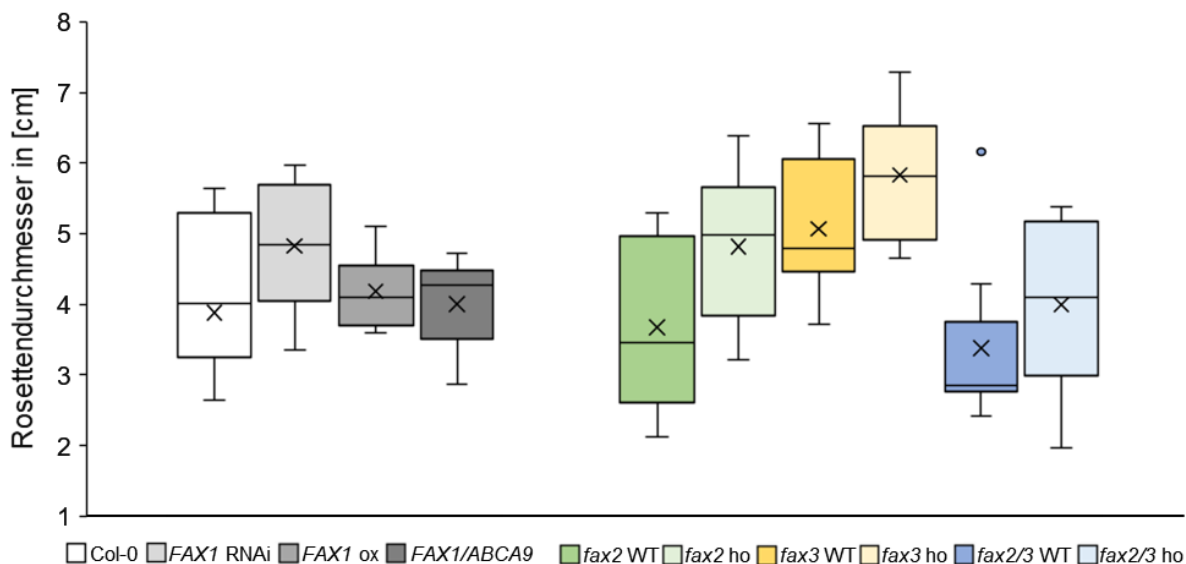


Abb. 5.17: Graphische Darstellung des Rosettendurchmessers der untersuchten Mutanten nach 42 Tagen unter Kälte. Dargestellt ist die mediane Verteilung der Rosettendurchmesser in cm (Messgenauigkeit der Schieblehre 0,1 mm) unter der Anzucht bei 4°C. Der Kasten gibt die mittleren 50% der Messwerte und der Balken den jeweiligen Minimal- und Maximalwert mit Ausreißern (Punkte) an. Der arithmetische Mittelwert ist als Kreuz dargestellt und der mediane Mittelwert als Strich angezeigt. Es wurden folgenden Linien untersucht: Col-0 (n=8), FAX1-RNAi (n=10), FAX1 Überexpressionslinie (n=10), FAX1/ABCA9 Doppel-Überexpressionslinie (n=7), fax2-1 WT und homozygote fax2-1 (je Linie n=12), fax3-1 WT und homozygote fax3-1 (je Linie n=10), der rücksegregierte fax2/3 WT (n=11) und die homozygote fax2/3 Doppelmutante (n=10). Der Vergleich der FAX1 Linien erfolgte zum Wildtyp Col-0, bei den homozygoten fax2-1, fax3-1 und fax2/3 Linien zum entsprechenden rücksegregierten Wildtyp.

Nach 42 Tagen bei Kälte war im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem arithmetischen Mittelwert von 3,9 cm die Rosettengröße der FAX1-RNAi Pflanzen mit einem Mittelwert von 4,8 cm etwas größer. Dagegen waren die Pflanzen der FAX1 Überexpressionslinie mit 4,2 cm und die Pflanzen der FAX1/ABCA9 Doppel-Überexpressionslinie (4,0 cm) im Mittel etwas kleiner in ihrem Rosettendurchmesser (siehe Abb. 5.17). Dabei wich der mediane Mittelwert bei Col-0 (4,0 cm) und den FAX1/ABCA9 Pflanzen (4,2 cm) gering nach oben ab, bei der FAX1 Überexpressionslinie (4,1 cm) lag er etwas tiefer. Die Wildtyp Col-0 Pflanzen zeigten einen Varianzbereich von 2,6 bis 5,6 cm und deckten damit den Varianzbereich der FAX1 Überexpressionslinie und der FAX1/ABCA9 Linie ab. Die FAX1-RNAi Pflanzen waren tendenziell größer als die Col-0 Pflanzen, lagen jedoch noch im Varianzbereich von Col-0 (siehe Abb. 5.17). Die Pflanzen der homozygoten fax2-1 Mutanten waren mit einem arithmetischen Mittelwert von 4,8 cm tendenziell größer als die Pflanzen des rücksegregierten fax2-1 Wildtyps mit einem Mittelwert von 3,7 cm, genauso wie die homozygoten fax3-1

knockout Mutante mit einem Mittelwert von 5,8 cm im Vergleich zum rücksegregierten *fax3-1* Wildtyps mit 5,1 cm. Auch die homozygoten *fax2/3* Doppelmutanten zeigten mit einem Mittelwert von 4,0 cm im Vergleich zum rücksegregierten *fax2/3* Wildtyp mit 3,4 cm ein tendenziell größeres Rosettenwachstum auf (siehe Abb. 5.17). Die graphische Gegenüberstellung zeigt eine Tendenz der homozygoten *fax2-1*, *fax3-1* und *fax2/3* Pflanzen zu einem größeren Rosettendurchmesser, jedoch liegt diese noch im Varianzbereich der rücksegregierten Wildtypen.

Um die Pflanzenentwicklung der untersuchten Mutanten einheitlich zu vergleichen, wurde zum Zeitpunkt der Knospenbildung nicht nur das Alter der Pflanzen ermittelt, sondern auch die Anzahl der Rosettenblätter sowie der Rosettendurchmesser bestimmt. Diese wurden graphisch gegenübergestellt, um einen Unterschied im Blühverhalten bei Kälte zu untersuchen (siehe Abb. 5.18).

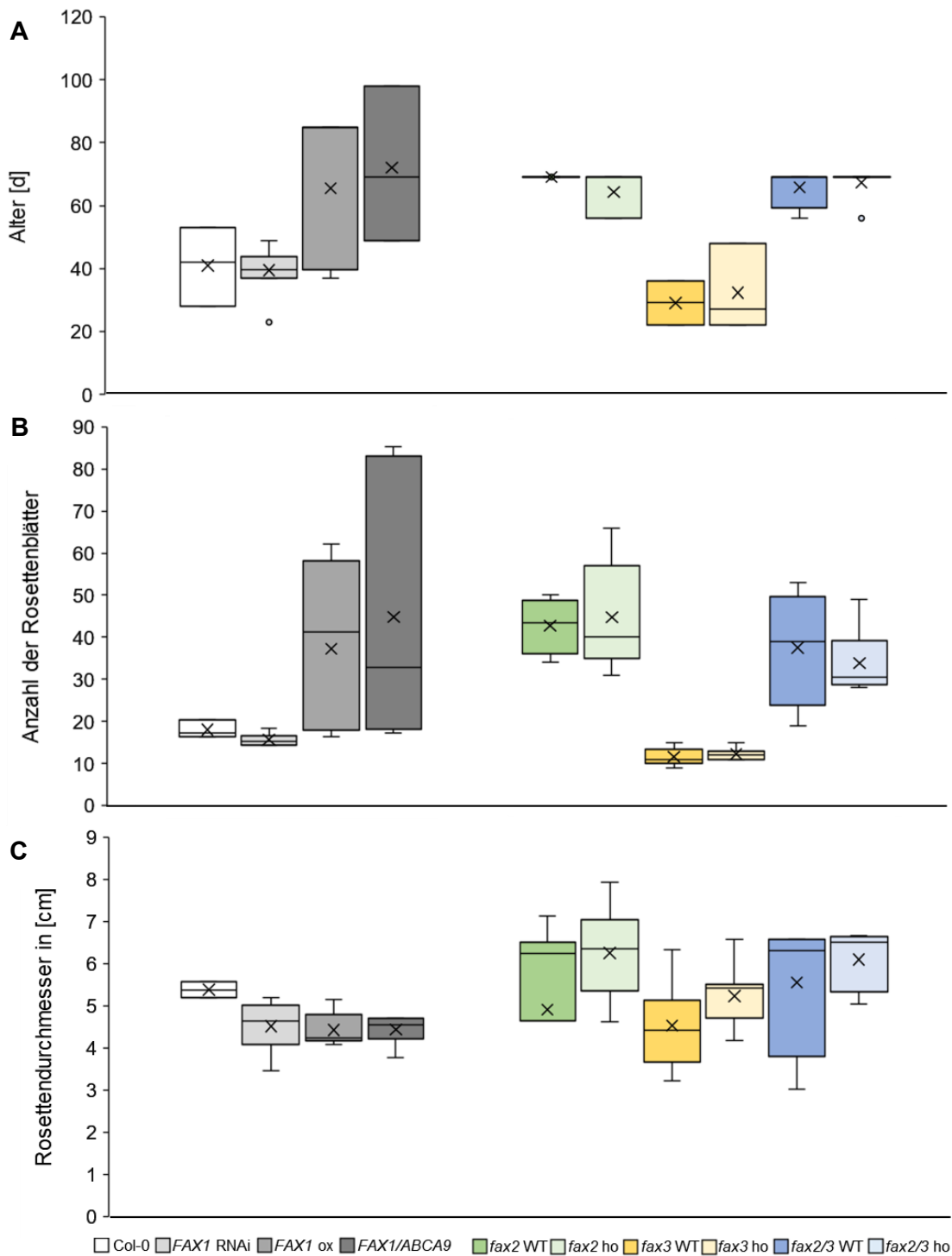


Abb. 5.18: Graphische Darstellung des Alters, der Anzahl der Rosettenblätter und des Rosettendurchmessers der untersuchten Mutanten zum Zeitpunkt der Knospenbildung bei 4°C. Dargestellt ist die mediane Verteilung (A) des Alters der untersuchten Pflanzen in Tagen, (B) die Anzahl der Rosettenblätter und (C) der Rosettendurchmesser in Zentimetern (Messgenauigkeit der Schiebellehre 0,1 mm) zum Zeitpunkt der Knospenbildung bei einer Kultivierung bei 4°C. Der Kasten gibt die mittleren 50% der Messwerte und der Balken den jeweiligen Minimal- und Maximalwert mit Ausreißern (Punkte) an. Der arithmetische Mittelwert ist als Kreuz dargestellt und der mediane Mittelwert als Strich angezeigt. Es wurden nur Pflanzen mit einer Knospenbildung ausgewertet. Für Col-0 (n=3), FAX1-RNAi (n=10), FAX1 Überexpressionslinie (n=9), FAX1/ABCA9 Doppel-Überexpressionslinie (n=6), fax2-1 WT (n=4), homozygote fax2-1 (n=11), fax3-1 WT (n=10), homozygote fax3-1 (n=10), fax2/3 WT (n=4) und homozygote fax2/3 Doppelmutanten (n=7). Der Vergleich der FAX1 Linien erfolgte zum Wildtyp Col-0, bei den homozygoten fax2, fax3 und fax2/3 Linien zum entsprechenden rücksegregierten Wildtyp.

Die Pflanzen der *FAX1*-RNAi Linie bildeten bei durchschnittlich 40 Tagen unter Kälte eine Knospe aus und unterscheiden sich nicht vom Wildtyp Col-0 mit 41 Tagen. Dagegen setzte bei der *FAX1* Überexpressionslinie bei durchschnittlich 66 Tagen und der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie (nach 72 Tagen) die Knospenbildung deutlich später ein (siehe Abb. 5.18 A). Bei der homozygoten *fax2-1* Mutante wurde eine Knospenbildung nach durchschnittlich 65 Tagen festgestellt, vergleichbar mit dem entsprechenden, rücksegregierten *fax2-1* Wildtyp nach durchschnittlich 70 Tagen. Bei den Pflanzen der homozygoten *fax3-1* Einzelmutanten fing die Knospenbildung nach durchschnittlich 33 Tagen an und war vergleichbar mit der Knospenbildung des rücksegregierten *fax3-1* Wildtyps nach durchschnittlich 30 Tagen (siehe Abb. 5.18 A). Bei den homozygoten *fax2/3* Mutanten wurde eine Knospenbildung nach durchschnittlich 68 Tagen festgestellt, ähnlich zum entsprechenden *fax2/3* Wildtyp nach durchschnittlich 67 Tagen. Damit zeigte der Vergleich der homozygoten Linien mit dem entsprechenden, rücksegregierten Wildtyps bei den *fax2-1* Einzel- und den *fax2/3* Doppelmutanten eine späte, aber ähnliche zeitliche Entwicklung bei der Knospenbildung. Dagegen wiesen die *fax3-1* Einzelmutanten sowohl im Wildtyp als auch in den homozygoten Linien eine sehr frühe Knospenentwicklung auf. Um die Knospenbildung abhängig vom Stand der Pflanzenentwicklung zu untersuchen, wurde zum Zeitpunkt der Knospenbildung auch die Anzahl der Rosettenblätter sowie der Rosettendurchmesser bestimmt. Zum Zeitpunkt der Knospenbildung gab es nur einen geringen Unterschied zwischen dem Wildtyp Col-0 mit durchschnittlich 18 Rosettenblättern und den *FAX1*-RNAi Mutanten mit durchschnittlich 15 Rosettenblättern. Dagegen fing die Knospenbildung bei der *FAX1* Überexpressionslinie mit durchschnittlich 37 Blättern und der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie mit 33 Blättern bei einer höheren Blattanzahl an (siehe Abb. 5.18 B). Die Pflanzen der homozygoten *fax2-1* Mutante zeigten zum Zeitpunkt der Knospenbildung mit 45 Blättern keinen Unterschied zum rücksegregierten *fax2-1* Wildtyp mit durchschnittlich 43 Blättern auf. Sowohl bei den homozygoten *fax3-1* Pflanzen mit durchschnittlich 13 Blättern als auch bei dem entsprechenden *fax3-1* Wildtyp (12 Rosettenblätter) fing die Knospenbildung bereits bei einer geringen Anzahl von Rosettenblättern an. Die homozygote *fax2/3* Doppelmutanten wies mit 34 Blättern eine geringere durchschnittliche Blätteranzahl bei der Knospenbildung als der rücksegregierte *fax2/3* Wildtyp mit 38 Blättern auf, diese lag jedoch noch in dem Varianzbereich des entsprechenden *fax2/3* Wildtyps (siehe Abb. 5.18 B). Der Vergleich der Rosettendurchmesser zum Zeitpunkt der Knospenbildung zeigte bei den *FAX1* Linien (*FAX1*-RNAi 4,6 cm, *FAX1* Überexpressionslinie 4,5 cm, *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie 4,5 cm) nur geringe Unterschiede zum entsprechenden Wildtyp Col-0 mit

5,4 cm Rosettendurchmesser bei der Knospenbildung. Damit zeigt sich bei der *FAX1* Überexpressionslinie sowie der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie unter Kälte eine Tendenz zur späteren Knospenbildung bei gleichbleibender Rosettengröße mit mehr Rosettenblättern. Bei den homozygoten *fax2-1* Mutanten mit 6,3 cm Rosettendurchmesser bei der Knospenbildung konnte kein Unterschied zum rücksegregierten *fax2* Wildtyp mit durchschnittlich 6,5 cm festgestellt werden. Bei den homozygoten *fax3-1* Einzelmutanten begann die Knospenbildung bei einem tendenziell größeren Rosettendurchmesser von 5,2 cm im Vergleich zu dem entsprechenden *fax3-1* Wildtyp (4,5 cm Rosettendurchmesser), genauso wie zwischen den homozygoten *fax2/3* Doppelmutanten mit 6,1 cm und dem entsprechenden *fax2/3* Wildtyp mit 5,6 cm (siehe Abb. 5.18 C). Im Vergleich zu den homozygoten *fax2* Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten konnte bei den homozygoten *fax3* Einzelmutanten eine frühe Knospen- und damit Blütenentwicklung bei Kälte festgestellt werden, jedoch zeigte sich diese ebenfalls im entsprechenden *fax3* Wildtyp.

Nach der initialen Phänotypisierung unter Kälte, wurden einige Veränderungen an der Anzucht und der Aussaat vorgenommen. Die Aussaat erfolgte in Pikierschalen und es wurden zehn gut entwickelte Keimlinge nach ein bis zwei Wochen im vierblättrigen Stadium in Töpfe vereinzelt. Die Voranzucht erfolgte bei Kurztags-Bedingungen ohne eine Nachtabenkung konstant bei 22°C. Für den Kältestress wurden die Pflanzen bei 4°C unter Kurztags-Bedingungen überführt. Dazu wurden folgende Linien untersucht: *FAX1*-RNAi Linie #12, *FAX1ox* #2 und #4 sowie die *FAX1/ABCA9* dox Linie #3.1 zusammen mit Col-0 als entsprechendem Wildtyp. Bei den *fax2-1* und *fax3-1* Einzel- sowie der *fax2/3* Doppelmutanten wurden zu den entsprechenden homozygoten Linien die rücksegregierten Wildtypen als Kontrolle ausgesät: Homozygote *fax2-1* Linie #9 und Linie #2 des rücksegregierten Wildtyps, homozygote *fax3-1* Linie #13 und Linie #2 des rücksegregierten Wildtyps und für homozygote *fax2/3* Doppelmutanten Linie #8 und Linie #10 des rücksegregierten Wildtyps. Nach 66 Tagen unter Kälte wurde das phänotypische Erscheinungsbild der untersuchten Pflanzenlinien dokumentiert.



Abb. 5.19: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten Mutanten unter Kälte. Gezeigt ist die Rosette von jeweils einer Pflanze nach 66 Tagen bei 4°C, die den Mittelwert des Erscheinungsbildes aller Pflanzen einer Linie repräsentiert. A) Der entsprechende Wildtyp für *FAX1*-RNAi, sowie der beiden *FAX1* Überexpressions- und der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressions-Linie war dabei Col-0. B) Die homozygoten *fax2-1*, *fax3-1* und *fax2/3* Mutanten wurden mit dem jeweiligen, rücksegregierten Wildtypen verglichen.

Die phänotypische Untersuchung der Mutanten unter Kälteanzucht zeigte nach 66 Tagen einen ökotyp-abhängigen Phänotyp. Die *FAX1*-RNAi Linie, beide *FAX1* Überexpressionslinien sowie die *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie zeigten einen zu Col-0 vergleichbaren Phänotyp mit einer ähnlich entwickelten Rosette mit gelben und roten Verfärbung der äußeren, älteren Rosettenblättern (siehe Abb. 5.19 A). Die *FAX1* Überexpressionslinie #4 mit einer 200-fachen Überexpression an *FAX1* zeigte dabei eine stärkere Seneszenz der äußeren und damit älteren Rosettenblätter an, als die *FAX1* Überexpressionslinie #2 mit einer zweifachen Überexpression. Die Pflanzen der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* T-DNA Insertionslinien sowie die daraus generierten homozygoten *fax2/3* Doppelmutanten hatten eine gut ausgebildete Rosette mit mäßig eingerollten, grünen Rosettenblättern, genauso wie die jeweiligen rücksegregierten Wildtypen (siehe Abb. 5.19 B). Somit zeigten Pflanzen mit einem Col-0 wildtypischen Hintergrund eine schlechtere Anpassung an Kälte als Pflanzen des Ws-4 Wildtyps mit einer sehr guten Anpassung an Kälte.

5.6 Mögliche FAX1 Komplementation durch plastidäre FAX Proteine

Phänotypische und morphologische Untersuchungen der homozygoten *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten zeigen einen Effekt von *FAX1* bei der Ausbildung der Biomasse, der Zellwand und bei der Pollenentwicklung (Li *et al.*, 2015). Neben *FAX1* könnten auch *FAX2* bis *FAX7* als Transmembranproteine eine Funktion beim Fettsäuretransport übernehmen. Bereits in Blüten von homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten von *A. thaliana* konnte über DNA Microarray eine Hochregulierung für *FAX2* und *FAX3* (jeweils 1,13- und 1,24-fach) nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2015). Um eine mögliche Regulation der Genexpression der *FAX* Gene bei einem Verlust von *FAX1* im vegetativen Stadium der Pflanzenentwicklung zu untersuchen, wurde der Transkriptgehalt der sieben *FAX* Gene in homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten untersucht. Da es nicht möglich ist homozygote *fax1-2* Pflanzen zu vermehren, wurden heterozygoten *fax1-2* Mutanten verwendet und über eine PCR-Genotypisierung die homozygoten *fax1-2* Nachkommen identifiziert. Für die Aussaat wurden die heterozygoten *fax1-2* Linien #22, #67 und #121 aus der F1 Generation und der dazugehörige Wildtyp WT Linie #2 aus der T6 Generation verwendet. In den homozygoten *fax1-2* Mutanten wurde von jedem der sieben *FAX* Gene die Transkriptmenge mit den entsprechenden Oligonukleotiden (siehe Abb. 4.3) mit einer qRT-PCR überprüft.

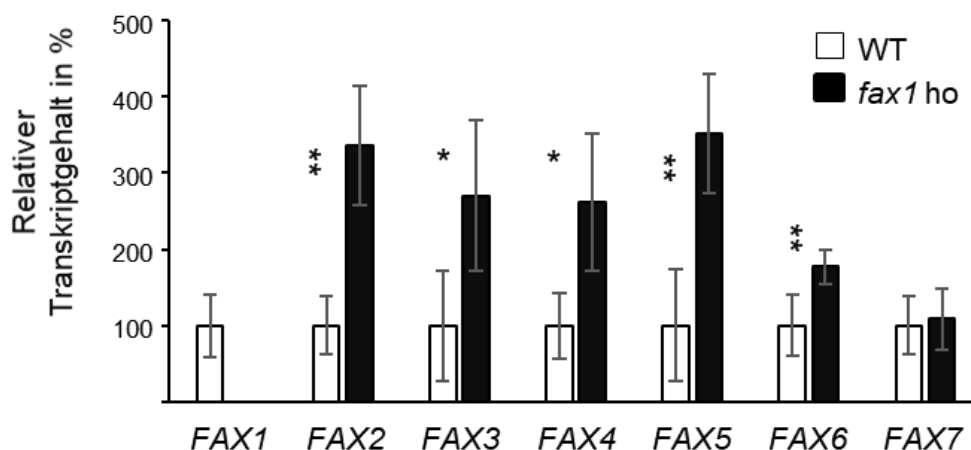


Abb. 5.20: Quantifizierung des FAX Transkriptgehaltes in der homozygoten *fax1-2* Mutante. Die Bestimmung des Transkriptgehaltes erfolgte über eine qRT-PCR aus ganzen Rosetten von fünf Wochen alten homozygoten *fax1-2* Pflanzen. In der *fax1-2* Linie #22 wurden insgesamt sechs und in der Linie #67 drei Pflanzen als homozygote *fax1-2* Pflanzen bestätigt. Dabei wurden je drei Pflanzen zu einer Probe vereinigt und von jeder Probe drei technische Replikate gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert von $n = 3 \pm \text{STABW}$). Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Col-0 normiert. Die Signifizienz ist im Vergleich zum Wildtyp Col-0 angegeben (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, nach student's t-test).

In den homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten war der *FAX2* Transkriptgehalt etwa 3,4-fach, der *FAX3* Transkriptgehalt 2,7-fach, der *FAX4* Transkriptgehalt 2,6-fach und der *FAX5* Transkriptgehalt 3,5-fach signifikant höher im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 5.20). Damit

konnte in Rosettenblättern von *A. thaliana* gezeigt werden, dass der Verlust von FAX1 zu einer stärkeren Expression der plastidären FAX Gene (*FAX2*, *FAX3* und *FAX4*) und des wahrscheinlich im ER/sekretorischem Weg lokalisierten *FAX5* führt. Um eine mögliche Komplementation von FAX1 durch FAX3 während der Pflanzenentwicklung zu überprüfen, wurden, über eine Kreuzung von homozygoten *fax3-1* mit heterozygoten *fax1-2* Pflanzen generierten, *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutanten untersucht, die homozygot für *fax3* und heterozygot für *FAX1* waren. Zur Untersuchung der *FAX1* Segregation in einem homozygoten *fax3-1* Hintergrund, wurden die Samen von zwei unabhängigen *fax1-2(he)/3-1(ho)* Linien #4 Y10 und #5 R10 auf Erde und auf Agarmedium ausgesät und der Genotyp in der Folgegeneration durch PCR-Genotypisierung überprüft (siehe Tab. 5.7). Zur Kontrolle dienten heterozygoten *fax1-2* Einzelmutanten der Linien #29, #33, #45 und #80.

Tab. 5.7: Segregationsuntersuchungen mit heterozygoten *fax1-2* Einzel- und *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutanten auf Erde und Agarmedium. Für die *fax1/3* Doppelmutante wurden zwei unabhängige Linien, Y10 und R10, untersucht. Die Segregation wurde mit einer PCR-Genotypisierung durchgeführt. Gezeigt ist die Anzahl der ausgesäten Pflanzen (Nr. Aussaat), davon die Anzahl der nicht gekeimten Samen (n. gekeimt), Pflanzen mit einem verminderten Wachstum (kl. Phänotyp), nicht funktionierender (n.f.) DNA Isolierung oder PCR und davon die Anzahl der kleinen Pflanzen in Klammern. Das Ergebnis zur Segregation bezieht sich auf alle erfolgreich genotypisierten Pflanzen mit den Genotypen: homozygot (ho) für die T-DNA Insertion auf beiden Allelen, heterozygot (he) für die T-DNA Insertion auf einem Allel und der rücksegregierte Wildtyp (wt) ohne eine T-DNA Insertion in *FAX1*. Die obere Zeile zeigt die absolute Anzahl, die untere Zeile die Prozentangaben (%) an.

Pflanzenlinien	Nr. Aussaat	n. gekeimt	kl. Phänotyp	n. f. DNA/ PCR	Nr. PCR	ho	he	wt
Agarmedium								
<i>fax1-2</i>	126	7 5,6	12 10,1	0 0,0	120 %	5 4,2	68 56,7	47 39,2
<i>fax1/3</i> Y10	147	5 3,4	7 4,9	1 (0 kl) 0,7	141 %	4 2,8	70 49,6	67 47,5
<i>fax1/3</i> R10	147	12 8,2	7 5,2	5 (0 kl) 3,6	132 %	0 0,0	79 59,8	53 40,2
Erde								
<i>fax1-2</i>	150	13 8,7	7 4,7	25 (4 kl) 18,2	112 %	6 5,4	68 60,7	38 33,9
<i>fax1/3</i> Y10	200	11 5,5	5 2,6	19 (2 kl) 15,9	170 %	1 0,6	101 59,4	68 40,0
<i>fax1/3</i> R10	150	7 4,7	3 2,0	16 (0 kl) 11,2	127 %	0 0,0	67 52,8	60 47,2

Die Untersuchung der Keimungseffizienz der Nachkommen der heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante und der *fax1(he)/fax3(ho)* Doppelmutante zeigte keine nennenswerten Unterschiede in der Keimungsrate auf Agarmedium. Auf Erde konnte bei den Nachkommen der heterozygoten *fax1/3* Doppelmutante (5,5% bei Linie Y10 und 4,7% bei R10 nicht gekeimte Samen) eine etwas bessere Keimungsrate als bei den Nachkommen der heterozygoten *fax1-2*

Einzelmutante nachgewiesen werden (siehe Tab. 5.7). Von den auf Agarplatten gekeimten Samen der heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante zeigten 10,1% der Keimlinge einen kleinen Wuchs. Von den gekeimten Samen der *fax1/3* Doppelmutante zeigten für Linie Y10 4,9% und die Linie R10 5,2% einen kleinen Wuchs (siehe Tab. 5.7). Auf Erde konnten weniger Pflanzen mit einem kleinen Phänotyp identifiziert werden (für *fax1-2*: 4,7%, für *fax1/3* dm Y10: 2,6% und R10: 2,0%). Somit fanden sich sowohl auf Agarmedium als auch auf Erde nur halb so viele Nachkommen der *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutante mit einem kleinen Phänotyp im Vergleich zur heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante. Nach der Ernte der einzelnen Keimlinge, wurde der Genotyp über eine PCR-Genotypisierung bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, ob die DNA Isolierung bei Keimlingen mit einem kleinen Phänotyp erfolgreich war, da diese aufgrund der kleinen Größe potentiell homozygot für das mutierte *FAX1* Allel sein könnten. Bei der *fax1-2* Mutante auf Erde konnten bei 18,2% der Pflanzen aufgrund einer nicht erfolgreichen DNA-Isolierung oder PCR-Genotypisierung kein Genotyp ermittelt werden, wobei es sich dabei um vier kleine Pflanzen handelte. Auf Agarmedium wurden alle Nachkommen der heterozygoten *fax1-2* Mutante erfolgreich genotypisiert (siehe Tab. 5.7). Auf Erde wurden bei der *fax1/3* Doppelmutante Linie Y10 15,9% der Pflanzen nicht erfolgreich genotypiert, wobei dazu zwei Keimlinge mit einem kleinen Phänotyp zählten. Somit gab es auf Erde sowohl bei der *fax1-2* Einzelmutante, als auch bei der *fax1/3* Doppelmutanten kleine Keimlinge, bei denen kein Genotyp bestimmt werden konnten, auf Agarmedium konnten alle untersuchten Pflanzen erfolgreich genotypisiert werden (siehe Tab. 5.7). Die Segregation der *fax1-2* Einzelmutante ergab auf Agarmedium 4,2% von homozygoten *fax1-2* Nachkommen und auf Erde 5,4% homozygote Pflanzen (siehe Tab. 5.7). Dieses Ergebnis bekräftigt die bereits veröffentlichten Daten aus Li *et al.*, 2015 mit 4% homozygoten *fax1-2* Pflanzen auf Erde. Bei der *fax1/3* Doppelmutante konnten auf Agarmedium bei der Linie Y10 2,8% homozygote Nachkommen identifiziert werden und für die Linie R10 wurden keine homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten gefunden. Auf Erde wurde für die *fax1/3* Doppelmutante Linie Y10 eine homozygote Pflanze (0,6%) bestätigt, bei der Linie R10 wurde keine homozygote *fax1/3* Doppelmutante gefunden (siehe Tab. 5.7). Die Segregationsuntersuchung zeigte eine reduzierte Anzahl an homozygoten *fax1-2* Nachkommen im homozygoten *fax3-1* Hintergrund im Vergleich zur Segregation einer heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante. Die bestätigten homozygoten *fax1/3* Doppelmutante zeigten eine verlangsamte Keimlingsentwicklung im Vergleich zum rücksegregierten *fax1/3* Wildtyp sowohl auf Erde als auch auf Agarmedium (siehe Abb. 5.21).

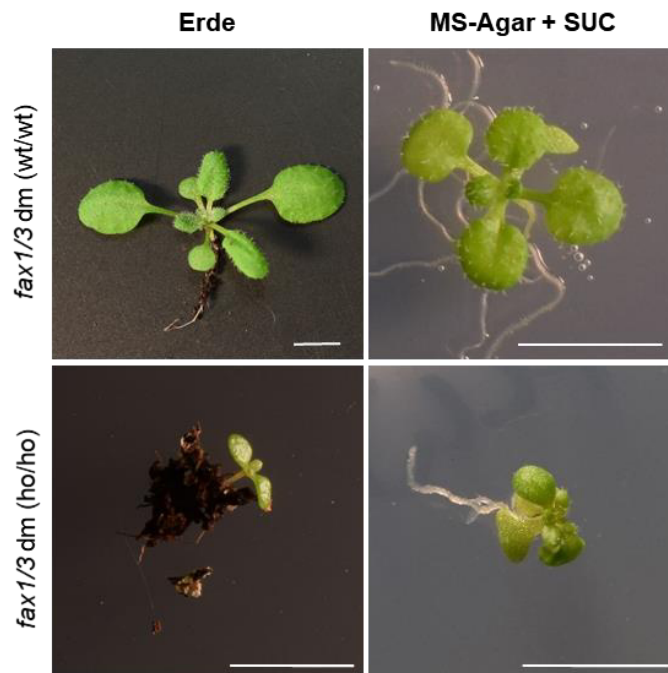


Abb. 5.21: Die Deletion von *FAX1* und *FAX3* in *A. thaliana* beeinträchtigt die Keimlingsentwicklung auf Erde stärker als auf Agarmedium. Nachkommen der *fax1-2(he)/fax3-1(ho)* Doppelmutante und der entsprechende Wildtyp wurden auf 0,5 MS-Agarmedium mit 1% SUC und auf Erde unter Langtags-Bedingungen angezogen und nach drei Wochen fotografiert. Für die Untersuchung der Segregation der *fax1-2(he)/fax3-1(ho)* Doppelmutante wurden 200 Samen auf Erde und 147 auf Agarmedium ausgesät und genotypisiert. Auf Erde konnte eine und auf Agarmedium vier homozygote *fax1/3* Doppelmutanten bestätigt werden. Als weißer Balken angegebene Maßstab beträgt 5 mm.

Auf Agarmedium zeigten die homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten im Vergleich zum entsprechenden, rücksegregierten Wildtyp eine langsamere Keimlingsentwicklung auf, jedoch keine morphologischen Auffälligkeiten (siehe Abb. 5.21). Auf Erde war das Keimlingswachstum der genotypisch bestätigten homozygoten *fax1/3* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp stark verlangsamt und es zeigten sich braune Verfärbungen am Rand der Kotyledonen (siehe Abb. 5.21). Während der Keimlingsentwicklung auf Erde kam es zum Sterben einiger Keimlinge mit einem vergleichbaren Phänotyp, sodass keine homozygoten *fax1/3* Pflanzen gewonnen werden konnten. Auch der Versuch die Keimlinge auf Agarmedium vorzuziehen und auf Erde zu pikieren, führte zum Sterben einiger Pflanzen im Keimlingstadium, sodass auch hier keine homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten sicher identifiziert werden konnten. Somit führte auf Erde der beidige Verlust von *FAX1* und *FAX3* zu einem lethalen Effekt der Keimlinge.

6 Diskussion

In Pflanzen findet die Neusynthese der Fettsäuren im Stroma der Chloroplasten statt. Dabei fließen die Fettsäuren entweder direkt über den prokaryotischen Syntheseweg in die plastidäre Lipidsynthese ein oder werden erst im ER über den eukaryotischen Syntheseweg zu Lipiden umgebaut, wozu ein Transportsystem der Fettsäuren durch die plastidären Membranen notwendig ist. Im Jahr 2015 wurde in *A. thaliana* das FAX1, ein Fettsäuren Transportprotein in der inneren Chloroplastenmembran, charakterisiert, welches eine wichtige Rolle beim Fettsäuretransport aus dem Chloroplasten und bei der Ausbildung von Lipiden spielt. Homozygote *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Mutanten zeigen eine veränderte Lipidhomöostase und damit einhergehend eine reduzierte Biomasse und einen Defekt bei der Pollenentwicklung, trotzdem sind die Mutanten überlebensfähig. Daher ist es möglich, dass andere plastidäre FAX Proteine am Fettsäuretransport beteiligt sind und den Verlust von FAX1 komplementieren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die pflanzliche FAX Proteinfamilie definiert und von den potentiellen, plastidären FAX2 und FAX3 Proteinen die subzelluläre Lokalisation bestimmt. Es wurde eine Charakterisierung der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzel- sowie der *fax1/3* und *fax2/3* Doppelmutanten durchgeführt, um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von FAX2 und FAX3 zu erhalten.

6.1 Charakteristische Proteinmotive der FAX Proteine in pflanzlichen Organismen

In *A. thaliana* sind sieben FAX Proteine (FAX1 bis FAX7) bekannt, die sich über ihre Tmem14 Domäne, bestehend aus vier α -helikalen Strukturen, ähneln und über ihre variablen N- und C-terminalen Bereiche, sowie über spezifische Motive und Vorkommen in pflanzlichen Organismen, unterscheiden. Mit ihren vier α -helikalen Membrandomänen sind die FAX Proteine wahrscheinlich in der Lipidmembran verankert und können über ihren variablen N- und C-Terminus interagieren, um eine Aufgabe bei der Bindung von Fettsäuren, einer Regulation oder einem Signalprozess zu übernehmen. Mithilfe der Alignments wurde sowohl bei FAX1 als auch FAX5/6 Proteinen am Anfang der ersten Helix der Tmemb-Domäne ein konserviertes HDFC Motiv nachgewiesen, welches Histidin als eine positiv und Asparaginsäure als eine negativ geladene Aminosäure aufweist. Ebenso wurde über Alignments bei FAX1 Proteinsequenzen eine PPPKK-Abfolge am C-Terminus und positive Aminosäuren vor der dritten Helix der Tmemb Region nachgewiesen. Die identifizierten positiven Aminosäuren zwischen den Helices ragen wahrscheinlich aufgrund ihrer Ladung aus der lipidhaltigen Membran heraus und könnten möglicherweise mit negativen Kopfgruppen von Lipiden, z.B. mit der Phosphatgruppe von Phospholipiden, interagieren. Die Untersuchung der

helikalen Bereiche der Tmemb-Domäne zeigte bei FAX1 und FAX5/6 Sequenzen eine ähnliche Anordnung der hydrophilen/hydrophoben Bereiche in den Helices, was auf eine ähnliche Funktion hindeutet, welche die FAX1 Proteine im Chloroplasten und FAX5/6 im ER/sekretorischen Weg ausüben könnten. Zudem wurden FAX1 als auch FAX5/6 Proteine in allen untersuchten Organismen gefunden, sodass diese wahrscheinlich eine notwendige Funktion übernehmen. FAX2 Proteine fanden sich in Monokotyledonen sowie in den Dikotyledonen, also in bedecktsamigen Pflanzen (Angiospermen), sodass FAX2 möglicherweise eine Funktion bei der Blüten- und Samenentwicklung ausüben könnte. Über DNA Microarray Untersuchungen (AtGenExpress 'Gene Networks' Schmid *et al.*, 2005), wurde in *A. thaliana* eine hohe Expression von FAX2 in Samen und bei der Embryonal- und Kotyledonenentwicklung nachgewiesen (Li *et al.*, 2015). Während der Samenentwicklung, werden Fettsäuren in den Plastiden hergestellt und möglicherweise von FAX Proteinen exportiert, um im ER zum Speicherlipid TAG umgebaut zu werden, welches in Ölpflanzen wie *A. thaliana* die Hauptform der Kohlenstoff- und Energiespeicherung in Samen darstellt (Li-Beisson *et al.*, 2013). Bei der Untersuchung der FAX2 Proteinsequenzen fanden sich keine konservierten, charakteristischen Aminosäuresequenzen, jedoch wurde bei FAX2 Proteinen der längste N-Terminus identifiziert, welcher ein Apolipoprotein, bestehend aus mehreren α -helikalen Strukturen, aufweist. Auch die kälterregulierten Cor15A Proteine sind in glycerolhaltigem Medium vermehrt in α -helicalen Strukturen gefaltet, während sie in Wasser eine entfaltete Struktur zeigen (Bremer *et al.*, 2017). Bei FAX3 Proteinen wurden am N-Terminus mehrere Glycine als ein charakteristisches Proteinmotiv identifiziert, welcher als flexibler Linker zum Zusammenführen von Proteinen dienen könnte. Auch TGD5 weisen Glycin-reiche Reste auf und formen eine Brücke zwischen dem TGD4 β -barrel Protein im OE und dem TDG1 bis TGD3 Komplex im IMS/IE (Fan *et al.*, 2015). Das poly-Glycin Motiv von FAX3 könnte ebenfalls ein *Sorting Signal* für den chloroplastidären Import darstellen und so wie bei dem β -barrel Transportprotein Toc75 zum Einbau des FAX3 in die Chloroplastenmembran führen. Eine Deletion oder ein Austausch der poly-Glycine in dem N-terminalen Bereich von Toc75 führt zu einem *Mistargeting* des Toc75 Proteins ins Stroma (Endow *et al.*, 2016). Die Anordnung der helikalen Bereiche der Tmemb-Domäne von FAX3 zeigte einen hydrophilen Bereich zu Beginn der ersten Helix an, ähnlich zur ersten Helix von FAX1. Eine größere Übereinstimmung der Anordnung der hydrophilen/hydrophoben Bereiche der Helices bestand jedoch zu FAX7 Proteinen. Diese könnten aufgrund von Lokalisations-Vorhersagen in Mitochondrien und/oder im ER/sekretorischen Weg lokalisiert sein und eine vergleichbare Funktion übernehmen wie FAX3 in Chloroplasten. FAX3 Proteine wurden, mit

Ausnahme von *B. vulgaris*, in allen untersuchten Organismen gefunden, sodass FAX3 wahrscheinlich an einer wichtigen Funktion bei der Pflanzenentwicklung beteiligt ist. Der Verlust von *FAX1* resultiert zwar zu einer phänotypischen Beeinträchtigung, jedoch führt der zusätzliche Verlust von *FAX3* zum lethalen Effekt im Keimlingsstadium (siehe Kap. 6.4).

6.2 Subzelluläre Lokalisation der FAX2 und FAX3 Proteine

Für FAX1 bis FAX4 wurde über die Programme ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) und TargetP1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) ein chloroplastidäres Transitpeptid cTP vorhergesagt, sodass ihre Lokalisation in Chloroplasten vermutet wird. Die Lokalisation von FAX1 konnte bereits über GFP-Untersuchungen von transformierten Tabakprotoplasten im Chloroplasten identifiziert werden und über Western Blots mit primären Antikörpern gegen *PsFAX1* in der inneren Membran von Chloroplasten nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2015). Da es sich bei *FAX2* und *FAX3* ebenfalls um potentielle, plastidäre Fettsäuretransporter handelt, wurde in dieser Arbeit deren subzelluläre Lokalisation anhand eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen *PsFAX2* und *PsFAX3* in Erbse überprüft und eine Lokalisation in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten nachgewiesen. Bei dem Nachweis mit *PsFAX2* wurde eine Doppelbande mit einer Größe in dem Bereich von 31 bis 32 kDa mit etwa 1 kDa Größenunterschied festgestellt, wobei das vorhergesagte Molekulargewicht für die mature *PsFAX2* Proteinsequenz 27 kDa beträgt. Mit den *PsFAX3* Antikörpern wurde eine Bande von etwa 21 kDa in der inneren Membran von Chloroplasten detektiert (vorhergesagtes Molekulargewicht mat-*PsFAX3* 16,6 kDa). Die Lokalisation mit *Ps-FAX1* diente als Kontrolle und zeigte eine Bande bei 25 kDa bei einem erwarteten Molekulargewicht von 20,6 kDa. Damit zeigte der Nachweis mit dem Immunoblot für FAX1, FAX2 und FAX3 ein etwa 4 bis 5 kDa größeres Molekulargewicht als erwartet an. Jedoch können Membranproteine während der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgrund einer Detergenzbindung zum Natriumdodecylsulfat ein verändertes Laufverhalten aufweisen (Rath *et al.*, 2009). Auch wurde die Größe des chloroplastidären Transitpeptids der FAX Proteine noch nicht experimentell bestimmt, weswegen die tatsächliche Größe der maturen FAX2 bis FAX3 Proteinsequenzen, z.B. über eine Massenspektrometrie, noch ermittelt werden muss. Unabhängig von der Größe, wurde mittels der durchgeführten Western Blots die Lokalisation von FAX2 und FAX3 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten nachgewiesen. Dabei ist noch unklar, ob die FAX Proteine nah beieinander lokalisiert sind und ob diese an einem Komplex beteiligt sind. Über GFP Untersuchungen mit FAX2 wurden kleine, punktförmige Signale auf der Chloroplastenhülle detektiert (Alexander Schmitt, 2015), sodass FAX2 Proteine möglicherweise an Membran-

Kontaktstellen zu anderen Organellen lokalisiert sind, um an der Umlagerung von Fettsäuren und/oder Lipiden und somit am Lipidtransfer beteiligt sein. Möglicherweise ist FAX2 ein Interaktionspartner im MTL-Komplex, bei welchem ein Lipidtransfer zwischen den Chloroplasten und Mitochondrien stattfindet (Michaud *et al.*, 2016).

6.3 Physiologische Auswirkungen beim Verlust des plastidären FAX2 in *A. thaliana*

Um eine mögliche Funktion der FAX2 Proteine während der Pflanzenentwicklung zu untersuchen, wurden dazu durch eine T-DNA Insertion hergestellte *fax2-1 knockout* Mutanten in *A. thaliana* herangezogen. Dabei zeigten die homozygoten *fax2-1* Pflanzen unter einer Standardanzucht keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp beim Wachstum, der Pollen- und Samenentwicklung, keine Beeinträchtigungen bei der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung und keine nennenswerten Abweichungen von Mendel in der Segregation. Da es für das FAX2 Gen nur eine T-DNA Insertionslinie gab, und diese den Ws-4 als wildtypischen Hintergrund trug, wurden zusätzlich über eine Agrobakterien vermittelte, stabile Transformation RNAi-Konstrukt für FAX2 generiert und in wildtypische Col-0 Pflanzen transformiert. Über eine Messung der FAX2 Transkriptmenge in den entsprechenden FAX2-RNAi Linien wurde eine deutliche Senkung von unter 15% der FAX2 Transkriptmenge in den Rosettenblättern von FAX2-RNAi Pflanzen nachgewiesen, jedoch zeigten die Mutanten keine phänotypischen Auffälligkeiten bei der Pflanzen- und Samenentwicklung. Damit scheint sowohl der Verlust, als auch eine Runterregulierung von FAX2, keine Rolle bei der phänotypischen Ausprägung zu haben. Auch andere, am Lipidmetabolismus beteiligten Enzyme, wie das LACS9, zeigen bei einem Verlust des Gens keinen Phänotyp, obwohl LACS9 an der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten wahrscheinlich an 90% der Acylierung von Fettsäuren beteiligt ist (Schnurr *et al.*, 2002). Somit zeigte die Phänotypisierung der homozygoten *fax2-1 knockout* Linien keinen Nachteil bei der phänotypischen Ausprägung, sodass der Verlust von FAX2 wahrscheinlich durch andere FAX Proteine ausgeglichen wird. In Rosetten von homozygoten *fax2-1 knockout* Pflanzen wurde über eine Messung der FAX Transkriptmenge eine erhöhte Regulation von FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 nachgewiesen. Die erhöhte Expression des plastidären FAX4 könnte auf einen komplementären Effekt zwischen FAX2 und FAX4 hindeuten. Der Verlust von FAX2 in der *fax2-1 knockout* Mutante führt vermutlich zu einer Beeinträchtigung des Fettsäuren-Exports aus den Plastiden, sodass der FAs-Export über FAX4 und der FAs-Import in das ER über eine Hochregulierung der FAX5/6 und FAX7 Gene ausgeglichen wird. Die über CRISPR/Cas9 generierten *fax2-1 knockout* Linien in Tian *et al.*, (2019) zeigten einen Nachteil bei der Lipidakkumulierung in

Samen, sodass FAX2 vermutlich eine Rolle beim Fettsäuren/Lipidmetabolismus übernimmt. Zudem wurden über einen Split Ubiquitin basierten Yeast two-hybrid System mögliche Interaktionspartner von FAX2 getestet und dabei die Proteine FATA1 und LACS9 identifiziert (Tian *et al.*, 2019). Somit könnte FAX2 am Fettsäuren Transfer aus den Chloroplasten beteiligt sein (siehe Abb. 6.1).

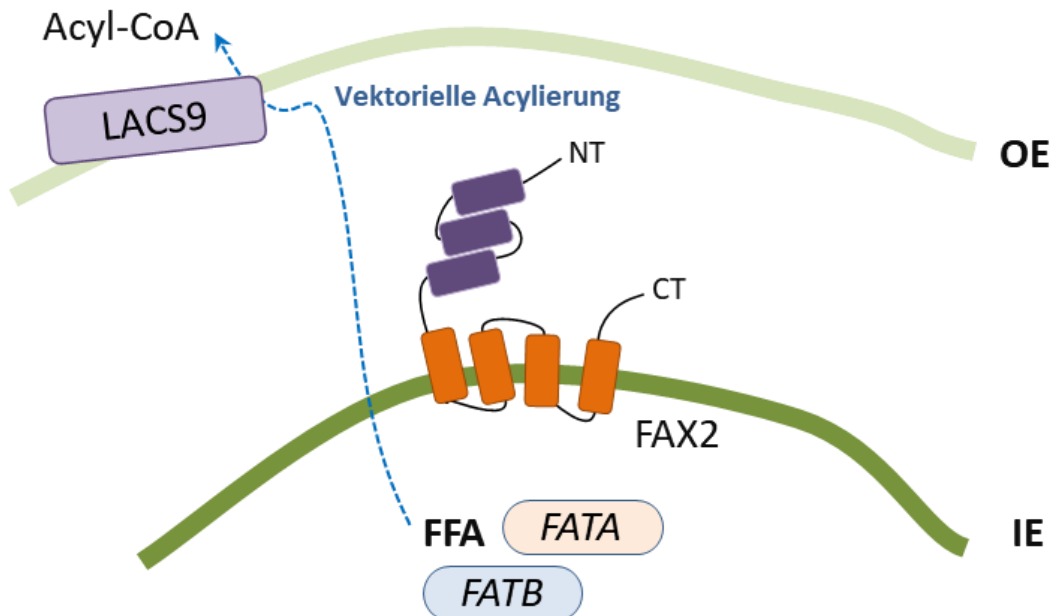


Abb. 6.1: Aktuelles Grundkonzept zum Wirkmechanismus von FAX2 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten. Die im Chloroplasten hergestellten Fettsäuren liegen nach der Fettsäuresynthese im Stroma an ACP gebunden vor und werden erst unmittelbar vor dem Export durch FATA/B Thioesterasen hydrolysiert, bevor sie mithilfe der vektoriiellen Acylierung gradientengetrieben, passiv durch die IE diffundieren. Integriert in der IE könnte FAX2 den Lipidtransfer durch die Membran begünstigen. An der OE werden die freien Fettsäuren von der LACS9 durch eine ATP-abhängige Kopplung an Coenzym A zu Acyl-CoA aktiviert. Die Orientierung von FAX2 in der IE wurde mittels eines Thermolysin Verdau von IE-Vesikeln untersucht (Janick Peter, AG Philippar, UdS, Saarbrücken). Abk: CoA: Coenzym A; CT: C-terminaler Proteinbereich, FATA, FATB: Fettsäuren Thioesterase A bzw. B, FAX: Fettsäuren Export Protein, FFA: freie Fettsäuren, IE: innere Chloroplastenhüllmembran, LACS: Long-Chain Acyl-CoA Synthetase, NT: N-terminaler Proteinbereich, OE: äußere Chloroplastenhüllmembran.

Im Chloroplasten werden, über die Fettsäuresynthese im Stroma, Fettsäuren hergestellt und an ein Acyl Carrier Protein gekoppelt, bevor sie unmittelbar vor dem Export durch FATA bzw. FATB Thioesterasen hydrolysiert werden und als freie Fettsäuren gradientengetrieben durch die Membran diffundieren (Li-Beisson *et al.*, 2013). Insetriert in der inneren Chloroplastenhüllmembran könnte FAX2 möglicherweise den Fettsäuren Transfer durch die Membran erleichtern (siehe Abb. 6.1). Ein enger Membrankontakt fördert dabei den Transfer von Fettsäuren, jedoch ist ebenfalls eine vektorielle Acylierung, für einen effizienten Fettsäuretransfer notwendig (Block und Jouhet, 2015; LaBrant *et al.*, 2018). An der OE werden freie Fettsäuren über eine ATP-abhängige Kopplung an CoA durch die LACS9 zu Acyl-CoA

umgewandelt, sodass der Export der freien Fettsäuren aus den Chloroplasten dabei vermutlich gradienten-getrieben über eine passive Diffusion stattfindet, der möglicherweise durch ATP-bindene ABC-Transporter unterstützt wird (Li-Beisson *et al.*, 2017). Zwischen den chloroplastidären Membranen, im IMS, könnten die freien Fettsäuren mit den hydrophoben Bereichen der α -helikalen Strukturen der Apolipo-Domäne von FAX2 Proteinen interagieren und durch eine Anlagerung eine Konformationsänderung der Apolipo-Struktur bewirken. Die Bindung zu lipidhaltigen Komponenten, wie den freien Fettsäuren im IMS, könnte somit die Proteinform der Apolipo-Domäne von FAX2 bestimmen.

6.3.1 Phänotypische Charakterisierung der *fax1*, *fax2* und *fax3* Mutanten bei Kälte

Um die Funktion der FAX Proteine unter Kälte zu untersuchen, wurde im Zuge dieser Arbeit zunächst die Fähigkeit zur Kälteakklimatisierung der *fax3-1* Einzel- sowie der *fax2/3* Doppelmutante überprüft. Alle untersuchten Pflanzenlinien konnten sich gut an die Kälte akklimatisieren und zeigten kleine, nicht signifikante Unterschiede bei der elektrischen Leitfähigkeit. Ohne eine vorangegangene Kälteakklimatisierung wurden die Membranen durch Frost stärker geschädigt und es diffundierten etwa 18 bis 34% mehr Ionen aus der Pflanzenzelle. Bei Kälte wird eine höhere Menge an MGDG mit einer C16- anstelle einer C18-Fettsäure an der *sn*-2 Position des DAG eingebaut, sodass mehr plastidär hergestellte DAG in die Synthese der Galaktolipide einfließen und damit der prokaryotische Lipid-Syntheseweg in den Chloroplasten begünstigt wird (Li, Zheng, *et al.*, 2015; Moellering und Benning, 2011). Somit fließt vermutlich der Großteil der im Chloroplasten synthetisierten Fettsäuren unter Kältebedingungen direkt in die Galaktolipidsynthese ein, sodass der Verlust von FAX Proteine und dem daraus resultierendem, eingeschränktem Fettsäuren-Export sich im Bezug auf die Galaktolipidsynthese nicht nachteilig bei der Kälteakklimatisierung auswirkt. Um die Funktion der FAX Proteine bei einer längeren Kälteperiode zu erforschen, wurden im Zuge dieser Arbeit das Wachstum und die Pflanzenentwicklung der *FAX1*-RNAi-Linien, der *FAX1* Überexpressionslinie und der *FAX1/ABCA9* Doppel-Überexpressionslinie sowie der homozygoten *fax2-1* und *fax3-1* Einzel- und der *fax2/3* Doppelmutante untersucht. Die Pflanzen mit einem entsprechenden Wildtyp Col-0 Hintergrund (*FAX1*-RNAi, *FAX1ox* und *FAX1/ABCA9dox*) zeigten eine vergleichbar entwickelte Rosette mit gelben und roten Verfärbungen der äußeren Rosettenblättern auf. Alle untersuchten Pflanzen zeigten beginnend ab dem dreißigsten Tag unter Kälte eine leichte Rotfärbung der Rosettenblätter und eine dunkelrote Knospung an, was auf eine stressbedingte Anthocyaneinlagerung zur Reduzierung der Photosyntheserate hinweist. Die Pflanzen mit einem Ws-4 Hintergrund (*fax2-1*, *fax3-1*

Einzel- und *fax2/3* Doppelmutanten) zeigten hingegen keine Anzeichen von Kälteschäden. Zwischen den homozygoten *fax2*, *fax3* und *fax2/3* Mutanten zeigten sich kaum Unterschiede zum entsprechenden rücksegregierten Wildtyp. Die Pflanzen zeigten mit andauernder Kälteperiode gut ausgebildete grüne Rosettenblätter, die am Rand leicht eingerollt waren. Somit konnten aufgrund einer besseren Anpassung des Ws-4 Ökotyps an Kälte diese Pflanzen nur bedingt mit den Pflanzen mit einem Col-0 wildtypischen Hintergrund verglichen werden. Um den individuellen Entwicklungsstand der untersuchten Mutanten einheitlich zu vergleichen, wurde zum Zeitpunkt der Knospenbildung das Alter der Pflanzen, die Anzahl der Rosettenblätter sowie der Rosettendurchmesser bestimmt. Die homozygoten *fax3* Mutanten und der *fax3* Wildtyp zeigten eine sehr frühe Knospenbildung mit einer geringen Anzahl an Rosettenblättern, während die *fax2* und *fax2/3* Mutanten mit jeweils dem entsprechenden Wildtyp eine späte Knospenbildung mit einer höheren Anzahl an Rosettenblättern aufwiesen. Dabei kann eine frühe Blühinduktion bei Kälte entweder durch ein schnelleres Pflanzenwachstum oder aufgrund von Faktoren wie Temperatur, Lichtdauer sowie durch Lichtintensität induziert werden. Der Verlust von OEP40 in *A. thaliana*, einem über Trehalose-6-phosphat regulierten β -Faltblatt Kanal in der OE von Chloroplasten, führte aufgrund eines eingeschränkte Exports für Glukose und dessen Phosphatderivate zu einem frühen Blühverhalten bei Kälte (Harsman *et al.*, 2016). Ob der eingeschränkte Fettsäuren Export bei einem Verlust der FAX Proteine, zu einer frühen Blühinduktion führt, konnte nicht abschließend geklärt werden, weil es nur genspezifische Tendenzen gab, die jedoch auch im entsprechenden Wildtyp beobachtet wurden. Möglicherweise übernehmen die FAX Proteine unter Kälte faltungsbedingt primär Funktionen wie z.B. den Erhalt der Stabilität und Fluidität der Membranen.

6.4 Komplementierender Effekt durch FAX3 bei Verlust von FAX1 in *A. thaliana*

Die DNA Microarray Daten (AtGenExpress 'Gene Networks' Schmid *et al.*, 2005), zeigen in *A. thaliana* eine in allen Pflanzengeweben vorkommende Expression der FAX Gene. Genauso weisen die FAX Gene auch stärkere Expression in spezifischen Pflanzengeweben auf, z.B. wird FAX3 stark in Blüten, Samen, Kotyledonen sowie in Wurzeln und Blättern exprimiert (AtGenExpress 'Gene Networks' Schmid *et al.*, 2005). Durch eine gewebespezifische Komplementation könnten die plastidären FAX Proteine FAX2, FAX3 und FAX4 eine mögliche physiologische Funktion beim Ersetzen von FAX1 übernehmen. Um eine mögliche voneinander abhängige Regulation zwischen den FAX Genen zu untersuchen, wurde die Transkriptmenge aller sieben FAX Gene in den Rosettenblättern von homozygoten *fax1-2*

knockout Mutanten untersucht. Dabei konnte in fünf Wochen alten Rosettenblättern von *A. thaliana* gezeigt werden, dass der Verlust von *FAX1* zu einer stärkeren Expression der plastidären *FAX* Gene (*FAX2*, *FAX3* und *FAX4*) und des wahrscheinlich im ER/sekretorischen Weg lokalisierten *FAX5* führt. Durch eine stärkere Expression von *FAX5* könnte über einen verstärkten Fettsäuren-Import ins ER dem reduzierten Fettsäuren-Export aus dem Chloroplasten entgegengewirkt werden. Genauso könnte die Funktion von *FAX1* durch die plastidären *FAX2*, *FAX3* und *FAX4* Proteine ersetzt werden, indem diese am Export von Fettsäuren aus dem Chloroplasten beteiligt sind, denn der Verlust von *FAX1* führt zwar zum eingeschränkten Pflanzenwachstum, jedoch sind die homozygoten *fax1-1* und *fax1-2 knockout* Pflanzen überlebensfähig (Li *et al.*, 2015). Während des vegetativen Pflanzenwachstums weist neben *FAX1*, unter den plastidären Proteinen der *FAX* Familie, ebenfalls *FAX3* hohe Expressionslevel bei der Entwicklung von Blättern auf (Supplement Li *et al.*, 2015), sodass ein möglicher Effekt von *FAX3* bei einem Verlust von *FAX1* während der Pflanzenentwicklung überprüft wurde. Dazu wurden, über eine Kreuzung generierten, *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutanten auf ihre Segregation untersucht, welche homozygot für das *fax3* Gen und heterozygot für das *FAX1* Gen waren. Als Kontrolle dienten Samen der heterozygoten *fax1-2* T-DNA Insertionslinie mit einer reduzierten und nicht mit Mendel konformen Verteilung der homozygoten Nachkommen von 5,4% auf Erde und 4,2% auf Agarmedium und bestätigen damit die bereits publizierten Ergebnisse von Li *et al.*, 2015. Bei den Segregationsuntersuchungen zeigten sowohl die Nachkommen der heterozygoten *fax1-2* Einzel- als auch der *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutante keine Auffälligkeiten bei der Keimungseffizienz, jedoch fanden sich sowohl auf Agarmedium als auch auf Erde nur halb so viele Nachkommen der *fax1-2(he)/3-1(ho)* Doppelmutante mit einem kleinen Phänotyp im Vergleich zur heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante. Damit einhergehend wurde mit 0,6% auf Erde und 2,8% auf Agarmedium nur ein geringer Prozentsatz als genotypisch bestätigte homozygote *fax1/3* Doppelmutanten identifiziert. Als Ergebnis zeigte die Segregationsuntersuchung somit eine reduzierte Anzahl an homozygoten *fax1-2* Nachkommen im homozygoten *FAX3* Hintergrund im Vergleich zur Segregation einer heterozygoten *fax1-2* Einzelmutante. Zudem zeigten die bestätigten homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten sowohl auf Erde als auch auf Agarmedium einen stark beeinträchtigten Keimlingsphänotyp verursacht durch einen gleichzeitigen Verlust von *FAX1* und *FAX3*. Die vier bestätigten homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten auf Agarmedium zeigten eine deutlich beeinträchtigte Keimlingsentwicklung im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp Col-0 auf und wiesen zum Zeitpunkt der Ernte für die Genotypisierung gelbbraune Verfärbungen am äußeren Rand der Rosettenblättern auf, was auf eine bereits

eingeleitete Seneszenz hindeutet. Auf Erde konnte nur eine einzige Pflanze als homozygot für *fax1* und *fax3* bestätigt werden und zeigte zum Zeitpunkt der Ernte ein noch stärker stagnierendes Keimlingswachstum als die vier homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten auf Agarmedium. Nach dem Austreiben der ersten Rosettenblätter kam es zum Sterben der Keimlinge auf Erde, sodass es nicht möglich war, homozygote *fax1/3* Pflanzen über das Keimlingsstadium hinaus anzuziehen. Auch der Versuch die Keimlinge auf Agarmedium vorzuziehen und auf Erde zu pikieren, führte zum Sterben einiger Pflanzen im Keimlingstadium, sodass auch hier keine homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten sicher identifiziert werden konnten. Somit führte der Verlust von beiden Genen, *FAX1* und *FAX3*, zu einem lethalen Effekt der Keimlinge nach dem Austreiben der Rosettenblätter und zeigt damit eine mögliche Komplementation von *FAX1* durch *FAX3* in Rosettenblättern während der Keimlingsentwicklung. Durch den Verlust von *FAX1* und *FAX3* in den homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten kommt es vermutlich zu einem eingeschränkten Fettsäuren-Export aus den Chloroplasten, sodass weniger Fettsäuren-Vorstufen für den Lipidaufbau im ER zur Verfügung stehen und die Keimlingsentwicklung deutlich verlangsamt wird. Nach dem Austreiben der ersten Rosettenblätter erweist sich der Verlust von *FAX1* und *FAX3* zu einer starken Beeinträchtigung bei der Pflanzenentwicklung, da während dem fortlaufenden Keimlingswachstum mehr Lipide zum Aufbau der wachsenden Membranen benötigt werden. Mit fortschreitender Keimlingsentwicklung reichen die generierten Lipide zum Wachstum nicht aus, sodass langsam der Seneszenzprozess eingeleitet wird und sich braune Verfärbungen am äußeren Rand der Rosettenblätter bilden und es schließlich zum Sterben des Keimlings kommt. Aufgrund eines eingeschränkten Fettsäuren-Export aus den Chloroplasten in den homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten kommt es zu einem verminderten Aufbau von Lipiden im ER, jedoch wird der Bedarf an Lipidkomponenten zum Aufbau der Membranen während dem fortlaufenden Pflanzenwachstum höher, sodass die Keimlingsentwicklung stagniert. Auf Agarmedium wachsen die homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zwar immer noch langsamer, jedoch weisen sie im Vergleich zum Wachstum auf Erde eine bessere Pflanzenentwicklung auf und hatten zum Zeitpunkt der Ernte mehrere kleine, aber vollständig entwickelte Rosettenblätter. Die über die Wurzel aus dem Agarmedium aufgenommene Saccharose kann im Cytosol zu Glukose gespalten und diese anschließend über die Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt werden und steht zu Beginn der Keimlingsentwicklung als eine zusätzliche Energiequelle zur Verfügung. Ebenfalls kann das Pyruvat im plastidären Stroma zu Acetyl-CoA metabolisiert werden und in die Fettsäuresynthese einfließen (Xu und Shanklin, 2016). Dabei wird in Samen von *A. thaliana* das Pyruvat über den Natrium-

abhängigen Pyruvattransporter BASS2 (*bile acid sodium symporter family protein 2*) über die innere plastidäre Hüllmembran importiert (Furumoto *et al.*, 2011; Xu und Shanklin, 2016). In *A. thaliana* wurde mit einer Überexpression von BASS2, unter dem Samen-spezifischen Promotor (*glycinin-1 promoter*) aus *G. max*, der Lipidgehalt in Samen erhöht (Lee *et al.*, 2017).

Die Charakterisierung der homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten zeigen, dass der gleichzeitige Verlust von *FAX1* und *FAX3* zu einem lethalen Effekt im Keimlingsstadium führt. Der alleinige Verlust von *FAX3* in den homozygoten *fax3-1 knockout* Mutanten bewirkt dabei keine phänotypischen Beeinträchtigungen beim Pflanzenwachstum und es zeigt sich keine Regulation der restlichen *FAX* Gene. Somit übernimmt *FAX3* eine notwendige Funktion bei der Komplementation von *FAX1* in Rosettenblättern. Eine fehlende Komplementation durch *FAX3* in den homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten führt zu einem lethalen Effekt während der Keimlingsentwicklung. Auf welche Weise die Komplementation dabei stattfindet, muss noch geklärt werden, denn aufgrund der Verteilung der Ladungen in den α -helikalen Domänen der Tmemb Region, kann *FAX3* vermutlich nicht die Membran beugen (siehe Abb. 6.2).

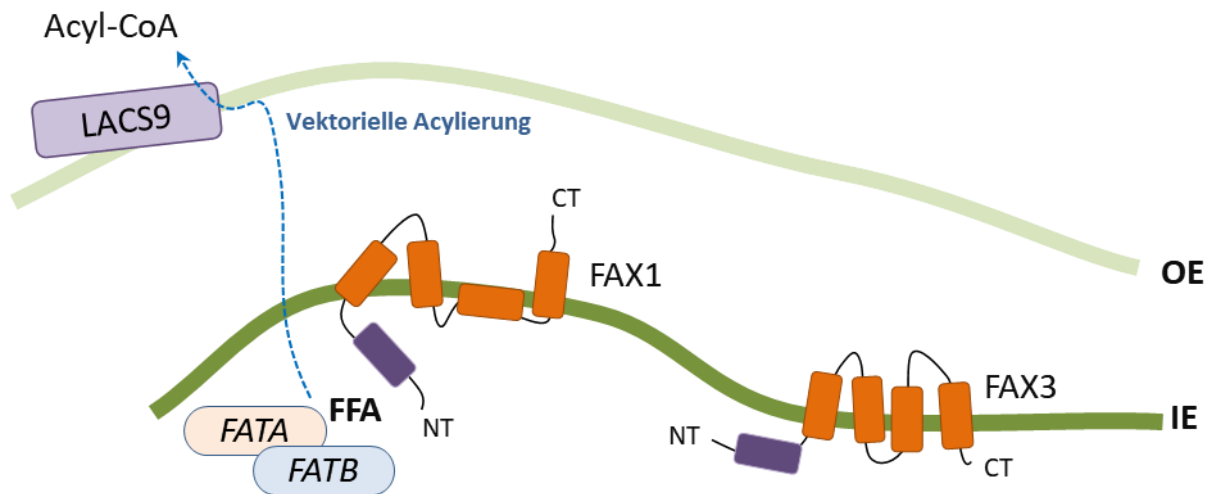


Abb. 6.2: Aktuelles Grundkonzept zum Wirkmechanismus von FAX1 und FAX3 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten. Die im Chloroplasten hergestellten Fettsäuren liegen nach der Fettsäuresynthese im Stroma an ACP gebunden vor und werden erst unmittelbar vor dem Export durch FATA/B Thioesterasen hydrolysiert. Möglichweise interagieren die FFAs mit dem NT von FAX1, bevor sie mithilfe der vektoriiellen Acylierung gradientengetrieben, passiv durch die IE diffundieren. Lokalisiert in der IE könnte FAX1 durch eine asymmetrische Insertion der dritten α -Helix der TmemB Domäne, die IE Membran in Richtung der OE beugen und den Lipidtransfer durch die IE begünstigen. An der OE werden die freien Fettsäuren von der LACS9 durch eine ATP-abhängige Kopplung an Coenzym A zu Acyl-CoA aktiviert. Das ebenfalls in der IE lokalisierte FAX3 besitzt einen flexiblen Glycin-Linker am NT, mit welchem es möglicherweise Homo- und/oder Oligomere ausbildet. Durch die Gemeinsamkeit der TMEM14C Proteine in ihrer Struktur aus vier α -helikalen Domänen, von denen drei die Membran durchspannen und eine amphiphile Domäne mit ihrem hydrophilen Bereich aus der Membran ragt (Klammt *et al.*, 2012), ergibt sich die strukturelle Anordnung der FAX Proteine in der Membran. Die Orientierung der FAX1 und FAX3 Proteine in der IE wurde mittels eines Thermolysin Verdau von IE-Vesikeln untersucht (Janick Peter, AG Philippa, UdS, Saarbrücken). Abk: CoA: Coenzym A; CT: C-terminaler Proteinbereich, FATA, FATB: Fettsäuren Thioesterase A bzw. B, FAX: Fettsäuren Export Protein, FFA: freie Fettsäuren, IE: innere Chloroplastenhüllmembran, LACS: Long-Chain Acyl-CoA Synthetase, NT: N-terminaler Proteinbereich, OE: äußere Chloroplastenhüllmembran.

Über die Fettsäuresynthese werden im Stroma der Chloroplasten Fettsäuren hergestellt und an ein Acyl Carrier Protein gekoppelt, bevor sie unmittelbar vor dem Export durch FATA bzw. FATB Thioesterasen hydrolysiert werden und als freie Fettsäuren vorliegen (Li-Beisson *et al.*, 2013). In der Membran verankert könnte FAX1 über den N-Terminus mit den im wässrigen Milieu befindlichen freien Fettsäuren im Stroma interagieren und möglicherweise den Umlagerungsprozess durch die Membran erleichtern (siehe Abb. 6.2). Der Fettsäuretransfer aus dem Chloroplasten wird durch die vektorielle Acylierung angetrieben, indem an der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten über die LACS9 die freien Fettsäuren über eine ATP-abhängige Kopplung an das CoA zu Acyl-CoA aktiviert werden (Li-Beisson *et al.*, 2017). Die in der IE inserierten FAX1 und FAX3 Proteine fördern vermutlich den gerichteten Fettsäuren Export aus dem Chloroplasten. Durch die Insertion der amphiphilen, dritten α -Helix der TmemB Domäne von FAX1 in die IE, könnte FAX1 eine membran-beugende Funktion übernehmen und über eine Beugung der Membranstruktur die Durchlässigkeit der Lipidbarriere erhöhen

(Madsen und Herlo, 2017). FAX3 ist ebenfalls mit der Tmemb-Domäne in der inneren chloroplastidären Membran verankert und könnte, über den am N-terminalen Bereich ständigen flexiblen, glycinreichen Linker, an der Ausbildung von Homo- und/oder Oligomeren beteiligt sein und möglicherweise eine Membranbeugung stabilisieren (siehe Abb. 6.2). Bei Mic10 Proteinen in der inneren Mitochondrienmembran in Hefe wurden Glycin-reiche Motive in membran-ständigen Helices gefunden, welche zur Ausbildung von Oligomeren beitragen (Barbot *et al.*, 2015; Rampelt und van der Laan, 2017). Mit funktionellen Untersuchungen in Hefe wurde bereits gezeigt, dass sowohl FAX1, FAX2 als auch FAX3 den hefeeigenen Fettsäuren Transporter *fat1p* ersetzen und C18:3 Fettsäuren durch die Membran transportieren können (Li *et al.*, 2015; Anne Könnel, AG Philippar, UdS, Saarbrücken). Unter den plastidären FAX Proteinen übernimmt FAX1 vermutlich die wichtigste Funktion beim Fettsäuren/Lipid Transport im Chloroplasten, denn nach der phänotypischen Untersuchung der homozygoten *fax1-1*, *fax1-2*, *fax2-1* und *fax3-1* Einzelmutanten sowie der homozygoten *fax1/3* und *fax2/3* Doppelmutanten, führt unter den Einzelmutanten nur der Verlust von *FAX1* zu einer starken Beeinträchtigung bei der Pflanzenentwicklung und erst über den zusätzlichen Verlust von *FAX3* in homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten wird die notwendige Funktion von FAX3 beim Komplementieren von FAX1 in Blättern ersichtlich, denn ohne FAX1 und FAX3 stagniert die Keimlingsentwicklung und führt schließlich zum lethalen Effekt der Keimlinge. Bei der Pollenentwicklung scheint FAX3 nur einen geringen Effekt auszuüben, da in Blüten von homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten zwar über DNA Microarrays eine Hochregulierung der *FAX2* und *FAX3* Gene (jeweils 1,13- und 1,24-fach) nachgewiesen wurde (Supplement Li, *et al.*, 2015), der sterile Phänotyp der homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten jedoch nicht komplementiert wird.

6.5 Ausblick

Aufgrund einer wachsenden Bevölkerung, aber gleichzeitig limitierten, landwirtschaftlich nutzbaren Flächen, müssen Pflanzen im Wachstum, der Ertragsproduktion und der Stresstoleranz optimiert werden. Auch Pflanzenlipide, wie die TAGs, sind von biotechnologischem Interesse, da es sowohl für die menschliche Ernährung als auch zur Herstellung von Biodiesel genutzt wird (Xu und Shanklin, 2016). Im Raps *B. napus* wurden über Transkriptomanalysen in Samen und dem Schotenperikarp mit einem hohen und niedrigem Ölgehalt die Expression der am Lipidmetabolismus beteiligten Gene untersucht und die Transkriptlevel der an der TAG Biosynthese beteiligten Gene gemessen. Über die Transkriptmessung wurde in den Samen eine grundsätzlich stärkere TAG Biosynthese als im

Schotenperikarp nachgewiesen und eine stärkere Regulation von *FAX1* während der TAG Lipidsynthese identifiziert (Xiao *et al.*, 2019). In *A. thaliana* konnte der Gehalt an TAG-Öl in Samen mithilfe einer Überexpression von *AtFAX1* unter einem samen-spezifischen Promotor, um etwa 21% bis 33% im Vergleich zum entsprechendem Wildtyp erhöht werden (Tian *et al.*, 2018). Auch in der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* konnte ein *CmFAX1* identifiziert werden, welches bei einer Überexpression zu einem 0,4-fach niedrigeren intrazellulären FA-Gehalt und einem 2,4-fach höheren, intrazellulären Lipidgehalt an TAG führte (Takemura *et al.*, 2019). Über eine Überexpression der am Lipidmetabolismus involvierten Gene *FAX1* und *ABCA9* in *Camelina sativa*, konnte das Samengewicht und die –größe erhöht und mehr Lipide in Samen nachgewiesen werden (Cai *et al.*, 2021). In Samen von *A. thaliana* konnte über eine Überexpression von *FAX2* der TAG Gehalt um 30% gesteigert werden, sodass auch *FAX2* als Zielgen zur kontrollierten Produktion von Biodiesel verwendet werden kann (Tian *et al.*, 2019). Über durchgeführte Lokalisations-Untersuchungen von *FAX2* und *FAX3* in Erbse mittels eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen *PsFAX2* und *PsFAX3*, wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine in der inneren Chloroplastenmembran nachgewiesen. Über die Lokalisation der weiteren FAX Proteine (*FAX4*, *FAX5/6*, *FAX7*) gibt es sequenzbedingte Vorhersagen und GFP-Untersuchungen, jedoch sollte die subzelluläre Lokalisation mit spezifischen Antikörpern untersucht werden. Ebenfalls ist noch unklar, ob die FAX Proteine unter- und/oder miteinander Interaktionen eingehen und Homo- und/oder Oligostrukturen formen. Möglicherweise sind die FAX Proteine als Interaktionspartner im Komplex assoziiert, so dass im Zuge dieser Arbeit Überexpressionslinien von *FAX2* und *FAX3* jeweils mit einem gekoppelten GFP hergestellt wurden, sodass man über einen GFP *pulldown* nach möglichen Interaktionspartnern suchen könnte. Mit ihren vier α -helicalen Domänen sind die FAX Proteine vermutlich in der Membran verankert und werden aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten der Proteinsequenz zu der *Tmemb14* Familie zugeordnet (Klammt *et al.*, 2012). In Menschen sind die *TMEM14A* und *C* Proteine (InterPro|UPF0136) in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Dabei sind die *TMEM14A* Proteine am apoptotischen Signalweg beteiligt und inhibieren die Apoptose durch eine negative Regulierung der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (Woo *et al.*, 2011). Die *TMEM14C* Proteine übernehmen vermutlich als ein putativer, mitochondrialer Transporter eine Rolle bei der Häm Biosynthese (Nilsson *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu Pflanzen, findet in tierischen Zellen die β -Oxidation der Fettsäuren zur Energiegewinnung in den Mitochondrien statt, sodass ein mitochondrialer FAs-Import notwendig ist und die *TMEM14* Proteine am Import von Fettsäuren in die Mitochondrien beteiligt sein könnten. Bisher ist noch wenig über den tatsächlichen

Transportmechanismus der TMEM14 und der FAX Proteine bekannt. FAX1 könnte durch das Inserieren der dritten, amphiphilen α -helikalen Domäne der Tmemb Region die Membran beugen und den durch vektorielle Acylierung getriebenen Fettsäuren Transport durch die Membran erleichtern (Könnel *et al.*, 2019). Um eine mögliche Beugung der inneren Chloroplasten-Hüllmembran durch die FAX Proteine zu überprüfen, könnten über *liposom leakage assays*, ähnlich wie bei Mic60 aus Mitochondrien (Hessenberger *et al.*, 2017), die Durchlässigkeit der Membran durch das Inserieren von FAX1 überprüft werden. Über Sequenzanalysen in unterschiedlichen Pflanzenspezies, von der Grünalge *C. reinhardtii* bis zu den Dikotyledonen, konnten spezifische Motive für jedes FAX Protein identifiziert werden. Um zu überprüfen, ob diese Proteinmotive eine Funktion beim Lipidtransport ausüben, könnten die entsprechenden Motive mutiert und die Fähigkeit zum FAs-Transport über funktionelle Untersuchungen in Hefe überprüft werden. Zur Charakterisierung der plastidären FAX Proteine wurden *FAX1*-, *FAX2*-, *FAX3*- und *FAX4*-RNAi Linien in einem Col-0 wildtypischen Hintergrund generiert, sodass diese Linien für weitere Untersuchungen herangezogen werden können. Der Hinweis einer Komplementation von FAX1 durch plastidäre FAX Proteine wurde durch die Untersuchung von homozygoten *fax1/3* Doppelmutanten bestätigt und ein lethaler Effekt bei einem Verlust von beiden Genen, *FAX1* und *FAX3*, nachgewiesen. Um genauere Aussagen über eine mögliche Komplementation von *FAX1* durch weitere *FAX* Gene zu treffen, sollte die *FAX1* bis *FAX7* Transkriptmenge in Blüten, Spross und Wurzeln sowie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der homozygoten *fax1-2* Mutanten nachgeprüft werden. Um zu untersuchen, welche Funktion FAX1 ohne die Komplementation durch weitere FAX Proteine im Chloroplasten ausübt, könnten über eine Kreuzung der homozygoten *fax2/3* Doppelmutante mit einer homozygoten *fax4 knockout* Mutante und anschließender Selektion und PCR-Genotypisierung homozygote *fax2/3/4* Tripelmutanten generiert und anschließend deren Pflanzenentwicklung untersucht werden.

7 Zusammenfassung

In *A. thaliana* gibt es sieben FAX Proteine (FAX1 bis FAX7), die sich über ihre Struktur, bestehend aus vier alpha-helikalen Transmembrandomänen ähneln und sich über ihre charakteristischen Proteinmotive, konservierten Ladungen und ihre subzelluläre Lokalisation unterscheiden. Das in der inneren Chloroplastenmembran lokalisierte FAX1 wurde 2015 charakterisiert und übernimmt eine Funktion beim plastidären Fettsäuretransfer durch die innere Hüllmembran der Chloroplasten. Die Lokalisation der FAX2 und FAX3 Proteine wurde ebenfalls in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten mittels eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen *PsFAX2* und *PsFAX3* nachgewiesen. In den Rosettenblättern von homozygoten *fax1-2 knockout* Mutanten führt der Verlust von *FAX1* zu einem Anstieg der *FAX2* und *FAX3* Transkriptmenge, was auf eine mögliche komplementierende Funktion von FAX1 durch FAX2 und FAX3 hindeutet. Durchgeführte Segregationsuntersuchungen von *fax1/fax3* (heterozygot/homozygot) Doppelmutanten zeigten eine stark reduzierte Anzahl an homozygoten *fax1/3* Nachkommen sowohl auf Erde als auch auf Agarmedium. Der Verlust beider Gene, *FAX1* und *FAX3*, führt zu einer stark beeinträchtigten Entwicklung der Keimlinge und schließlich zum lethalen Effekt im Keimlingsstadium, vermutlich aufgrund einer fehlenden Komplementation von FAX1 durch FAX3 in Rosettenblättern.

8 Summary

In *A.thaliana* there are seven FAX proteins (FAX1 to FAX7), which are similar in structure, consisting of four alpha-helical transmembrane domains, but are different in their characteristic protein motifs, conserved charges, as well as their subcellular localization. FAX1, which is localized in the inner chloroplast membrane, was characterized in 2015 and presumably plays a role in the fatty acid transfer across the inner plastid membrane. The localization of the FAX2 and FAX3 proteins was also detected in the inner envelope of chloroplasts using a Western blot with specific antibodies against *PsFAX2* and *PsFAX3*. In rosette leaves of homozygous *fax1-2 knockout* mutants the loss of *FAX1* leads to an increased amount of *FAX2* and *FAX3* transcripts compared to wildtype, suggesting a possible complementary function of FAX1 through FAX2 and FAX3 proteins. Performed segregation analysis with *fax1/fax3* (heterozygous/homozygous) double mutants showed a strong reduced number of homozygous *fax1/3* progeny both on soil and on agar medium. The loss of both genes, *FAX1* and *FAX3*, leads to a severely impaired development of seedlings and finally to a lethal effect in seedling stage, presumably due to the absence of complementation of FAX1 by FAX3 in rosette leaves.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Fettsäuren- und Lipidtransports innerhalb einer mesophyllischen Pflanzenzelle.	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Lipidumwandlung während der Kälteakklimatisierung in <i>A. thaliana</i> zum Kälte- und Frostschutz.....	8
Abb. 4.1: Vektorkarte des binären Pflanzenvektors pH7GWIWG2 (I) zur Herstellung von <i>knockdown</i> Mutanten mit einem RNAi-Konstrukt.....	21
Abb. 4.2: <i>Xba</i> I Restriktionsverdau zur Überprüfung der RNAi-Konstrukte.	21
Abb. 4.3: Primerbindestellen der <i>FAX1</i> bis <i>FAX4</i> RNAi Konstrukte und qRT-PCR.....	23
Abb. 5.1: Charakteristika der sieben FAX Proteine.....	28
Abb. 5.2: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX1 in Grünalgen und höheren Pflanzen.	31
Abb. 5.3: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX2 in Pflanzen.	33
Abb. 5.4: Alignment der Aminosäuren Sequenz von FAX3 in Grünalgen und höheren Pflanzen.	35
Abb. 5.5: Aminosäuren-Sequenz zur Synthese von FAX2 und FAX3 Peptidantikörper.	37
Abb. 5.6: Subzelluläre Lokalisation von FAX2 und FAX3 in <i>P.sativum</i>	38
Abb. 5.7: Relativer <i>FAX1</i> Transkriptgehalt von Pflanzenlinien mit einem <i>FAX1</i> -RNAi Konstrukt.....	40
Abb. 5.8: Relativer <i>FAX2</i> Transkriptgehalt von Pflanzenlinien mit einem <i>FAX2</i> -RNAi Konstrukt.....	41
Abb. 5.9: Schematische Darstellung der T-DNA Insertion in <i>FAX2</i> und <i>FAX3</i> und Verifikation der Insertion über PCR-Genotypisierung.....	45
Abb. 5.10: Quantifizierung der <i>FAX</i> Transkriptgehalte in der homozygoten <i>fax2-1</i> Mutante.	47
Abb. 5.11: Quantifizierung der <i>FAX</i> Transkriptgehalte in der homozygoten <i>fax3-1</i> Mutante.	48
Abb. 5.12: Phänotypisches Erscheinungsbild einiger Pflanzen der homozygoten <i>fax2-1</i> Mutanten nach acht Wochen unter Kurztag.....	50
Abb. 5.13: Überprüfung einer T-DNA Insertion mittels einer PCR-Amplifizierung.....	53
Abb. 5.14: Elektrische Leitfähigkeit bei kälteakklimatisierten <i>fax2/3</i> Doppelmutanten.....	54
Abb. 5.15: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten Mutanten unter Kälte.....	56
Abb. 5.16: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten <i>fax2</i> und <i>fax2/3</i> Mutanten unter Kälte.	58
Abb. 5.17: Graphische Darstellung des Rosettendurchmessers der untersuchten Mutanten nach 42 Tagen unter Kälte.....	59

Abb. 5.18: Graphische Darstellung des Alters, der Anzahl der Rosettenblätter und des Rosettendurchmessers der untersuchten Mutanten zum Zeitpunkt der Knospenbildung bei 4°C.	61
Abb. 5.19: Repräsentativer Phänotyp der untersuchten Mutanten unter Kälte.	64
Abb. 5.20: Quantifizierung des <i>FAX</i> Transkriptgehaltes in der homozygoten <i>fax1-2</i> Mutante.	65
Abb. 5.21: Die Deletion von <i>FAX1</i> und <i>FAX3</i> in <i>A. thaliana</i> beeinträchtigt die Keimlingsentwicklung auf Erde stärker als auf Agarmedium.	68
Abb. 6.1: Aktuelles Grundkonzept zum Wirkmechanismus von FAX2 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten.	73
Abb. 6.2: Aktuelles Grundkonzept zum Wirkmechanismus von FAX1 und FAX3 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten.	79
Abb. 13.1: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX1 Proteinen unterschiedlicher Organismen.	97
Abb. 13.2: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX2 Proteinen unterschiedlicher Organismen.	98
Abb. 13.3: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX3 Proteinen unterschiedlicher Organismen.	99
Abb. 13.4: Primerbindestellen auf der cDNA Sequenz von <i>Ps-FAX2</i> und <i>Ps-FAX3</i>	100
Abb. 13.5: Quantifizierung der <i>FAX</i> Transkriptgehalte in der homozygoten <i>fax2/3</i> Doppelmutante.	101

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	12
Tab. 3.2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmid Vektoren.	13
Tab. 3.3: In dieser Arbeit hergestellten Plasmid-Konstrukte.	13
Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendeten Antikörper.	14
Tab. 5.1: FAX1 bis FAX3 Proteine in <i>A. thaliana</i>	36
Tab. 5.2: FAX1 bis FAX3 Proteine in <i>P. sativum</i>	37
Tab. 5.3: Übersicht der hergestellten <i>FAX1</i> - bis <i>FAX4</i> -RNAi Linien.	42
Tab. 5.4: Messung der Transkriptgehalte in den <i>FAX1</i> - und <i>FAX2</i> -RNAi Linien.	43
Tab. 5.5: Segregation von heterozygoten <i>fax2-1</i> und <i>fax3-1</i> Einzelmutanten.	46
Tab. 5.6: Überprüfung der Pflanzenlinien auf eine mögliche T-DNA Hintergrundinsertion. .	51
Tab. 5.7: Segregationsuntersuchungen mit heterozygoten <i>fax1-2</i> Einzel- und <i>fax1-2(he)/3-1(ho)</i> Doppelmutanten auf Erde und Agarmedium.	66

11 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ABC	<i>ATP binding cassette</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
ACBP	Acyl-CoA Bindeproteine	EtOH	Ethanol
ACCase	Acetyl-CoA Carboxylase	FA, FAs	Fettsäure (<i>fatty acid</i>), pl.
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>	Faa1/4p	Protein für Fettsäuren-aktivierung (<i>fatty acid activation</i>)
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FACS	Fatty Acyl-CoA Synthetase
ATP	Adenosintriphosphat	FAD2	Fettsäuren Desaturase 2
bp	Basenpaar	FAS	Fettsäuresynthese (<i>fatty acid synthesis</i>)
Bn	<i>Brassica napus</i>	Fat1p	Protein für Fettsäuretransport (<i>fatty acid transport</i>)
Br	<i>Brassica rapa</i>	FATA/B	Acyl-ACP Thioesterase A/B
Bv	<i>Beta vulgaris</i>	FAX	Fettsäuren Exporter (<i>fatty acid exporter</i>)
C16:0	Palmitinsäure	FFA	Freie Fettsäuren (<i>free fatty acids</i>)
C18:0	Stearinsäure	FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
C18:1	Ölsäure (<i>oleic acid</i>)	G3P	Glycerol-3-Phosphat
C18:3	Linolensäure	gDNA	genomische DNA
cDNA	komplementäre (copy-) DNA	GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
CoA	Coenzym A	GGGT	Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase
Col-0	Columbia-0 (<i>Arabidopsis</i> Ökotyp)	Gm	<i>Glycine max</i>
COR	kälte regulierten Proteine (<i>cold-regulated</i>)	GPAT	Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase
Cr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	HCl	Chlorwasserstoff
CT	C-Terminus	he	heterozygot
cTP	chloroplastidäres Transidpeptid	ho	homozygot
DAG	Diacylglycerol	IE	innere Chloroplastenhüllmembran (<i>inner envelope</i>)
DGD1	DGDG Synthetase 1	IgG	Immunglobulin G
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol	IM	Innere Mitochondrienmembran
dm	Doppelmutante		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)		
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat		

IMS	Intermembranraum (<i>inter membrane space</i>)	PDHC	Pyruvat-Dehydrogenase Komplex
Kap.	Kapitel	PE	Phosphatidylethanolamine
kDa	Kilodalton	PG	Phosphatidylglycerol
LACS	Long-Acyl-CoA-Synthetase	PI	Phosphatidylinositol
LB	Left Border der T-DNA Insertion	Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
LPA	Lysophosphatidsäure	Ps	<i>Pisum sativum</i>
LPAAT	Lyso Phosphatidsäure Acyltransferase	RB	Right Border der T-DNA Insertion
mat	mature Proteinsequenz	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
MCS	Membrankontaktstelle (<i>membrane contact sites</i>)	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
MeOH	Methanol	RT	Raumtemperatur
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure	SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
MGD1	MGDG Synthetase 1	Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
MGDG	Monogalaktosyl-Diacyl-Glycerol	SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
MICOS	<i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>	SUC	Saccharose
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)	Tab.	Tabelle
Mt	<i>Medicago truncatula</i>	TAG	Triacylglycerol
MTL	<i>mitochondrial transmembrane lipoprotein</i>	T-DNA	Transfer-DNA
NT	N-Terminus	TGD	Trigalactosyldiacylglycerol
OE	äußere Hüllmembran (<i>outer envelope</i>)	TGDG	Trigalaktosyldiacylglycerol
Os	<i>Oryza sativa</i>	TeGDG	Tetragalactosyldiacylglycerol
PA	Phosphatidsäure (<i>phosphatidic acid</i>)	Tmemb	Transmembrandomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
PAP	Phosphatidsäure Phosphatase	Ws-4	Wassilewskija (<i>Arabidopsis</i> Ökotyp)
PC	Phosphatidylcholin	WT	Wildtyp
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
		Zm	<i>Zea mays</i>

12 Literaturverzeichnis

- Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellström, H. et al. (2005).** Phosphate-limited oat: The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280, 27578–27586. doi.10.1074/jbc.M503273200.
- Andre, C., Haslam, R. P. und Shanklin, J. (2012).** Feedback regulation of plastidic acetyl-CoA carboxylase by 18:1-acyl carrier protein in *Brassica napus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109. doi.10.1073/pnas.1204604109.
- Ariizumi, T. und Toriyama, K. (2011).** Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* 62, 437–460. doi.10.1146/annurev-arplant-042809-112312.
- Barbot, M., Jans, D. C., Schulz, C. et al. (2015).** Mic10 Oligomerizes to Bend Mitochondrial Inner Membranes at Cristae Junctions. *Cell Metab* 21, 756–763. doi.10.1016/j.cmet.2015.04.006.
- Bates, P. D., Stymne, S. und Ohlrogge, J. (2013).** Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr Opin Plant Biol* 16. doi.10.1016/j.pbi.2013.02.015.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993).** In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III* 316
- Benning, C. (2008).** A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res* 47, 381–389. doi.10.1016/j.plipres.2008.04.001.
- Benning, C. (2009).** Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25. doi.10.1146/annurev.cellbio.042308.113414.
- Von Berlepsch, S., Kunz, H. H., Brodesser, S. et al. (2012).** The acyl-acyl carrier protein synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediates fatty acid import. *Plant Physiol* 159. doi.10.1104/pp.112.195263.
- Black, P. N. und DiRusso, C. C. (2003).** Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 454–472. doi.10.1128/membr.67.3.454-472.2003.
- Block, M. A. und Jouhet, J. (2015).** Lipid trafficking at endoplasmic reticulum-chloroplast membrane contact sites. *Curr Opin Cell Biol* 35. doi.10.1016/j.ceb.2015.03.004.
- Botella, C., Jouhet, J. und Block, M. A. (2017).** Importance of phosphatidylcholine on the chloroplast surface. *Prog Lipid Res* 65. doi.10.1016/j.plipres.2016.11.001.
- Botella, C., Sautron, E., Boudiere, L. et al. (2016).** ALA10, a phospholipid flippase, controls FAD2/FAD3 desaturation of phosphatidylcholine in the ER and affects chloroplast lipid composition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 170. doi.10.1104/pp.15.01557.
- Bouchez, D., Camilleri, C. und Caboche, M. (1993).** A binary vector based on *Basta* resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Comptes Rendus l'Academie des Sci* 316: 1188-1193
- Bremer, A., Kent, B., Hauß, T. et al. (2017).** Intrinsically Disordered Stress Protein COR15A Resides at the Membrane Surface during Dehydration. *Biophys J* 113, 572–579. doi.10.1016/j.bpj.2017.06.027.

- Breuers, F. K. H., Bräutigam, A. und Weber, A. P. M. (2011).** The plastid outer envelope - A highly dynamic interface between plastid and cytoplasm. *Front Plant Sci* 2, 1–20. doi.10.3389/fpls.2011.00097.
- Bruley, C., Dupierris, V., Salvi, D. et al. (2012).** AT_CHLORO: A chloroplast protein database dedicated to sub-plastidial localization. *Front Plant Sci* 3. doi.10.3389/fpls.2012.00205.
- Cai, G., Wang, G., Kim, S.-C. et al. (2021).** Increased expression of fatty acid and ABC transporters enhances seed oil production in camelina. *Biotechnol Biofuels* 14, 49. doi.10.1186/s13068-021-01899-w.
- Chris, S. und John, B. (1991).** Plant Lipids: Metabolism, Mutants, and Membranes. *Science* (80-) 252, 80–87. doi.10.1126/science.252.5002.80.
- Degenkolbe, T., Giavalisco, P., Zuther, E. et al. (2012).** Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 72. doi.10.1111/tpj.12007.
- Dörmann, P. und Benning, C. (2002).** Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* 7. doi.10.1016/S1360-1385(01)02216-6.
- Du, Z. Y., Arias, T., Meng, W. et al. (2016).** Plant acyl-CoA-binding proteins: An emerging family involved in plant development and stress responses. *Prog Lipid Res* 63, 165–181. doi.10.1016/j.plipres.2016.06.002.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. et al. (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300. doi.10.1006/jmbi.2000.3903.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und Heijne, G. Von (1999).** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8. doi.10.1110/ps.8.5.978.
- Endow, J. K., Rocha, A. G., Baldwin, A. J. et al. (2016).** Polyglycine acts as a rejection signal for protein transport at the chloroplast envelope. *PLoS One* 11. doi.10.1371/journal.pone.0167802.
- Fan, J., Zhai, Z., Yan, C. et al. (2015).** *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell* 27, 2941–2955. doi.10.1105/tpc.15.00394.
- Finn, R. D., Cogill, P., Eberhardt, R. Y. et al. (2016).** The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44. doi.10.1093/nar/gkv1344.
- Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E. et al. (2008).** A role for SENSITIVE to FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in *Arabidopsis*. *Plant J* 55. doi.10.1111/j.1365-313X.2008.03549.x.
- Franssen, S. U., Shrestha, R. P., Bräutigam, A. et al. (2011).** Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC Genomics* 12, 227. doi.10.1186/1471-2164-12-227.
- Furumoto, T., Yamaguchi, T., Ohshima-Ichie, Y. et al. (2011).** A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476, 472–475. doi.10.1038/nature10250.

- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C. et al. (2009).** The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 38. doi.10.1093/nar/gkp858.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580. doi.10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Harsman, A., Schock, A., Hemmis, B. et al. (2016).** OEP40, a regulated glucose-permeable β -barrel solute channel in the chloroplast outer envelope membrane. *J Biol Chem* 291. doi.10.1074/jbc.M115.712398.
- Hauser, P. S., Narayanaswami, V. und Ryan, R. O. (2011).** Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 50. doi.10.1016/j.plipres.2010.09.001.
- Hessenberger, M., Zerbes, R. M., Rampelt, H. et al. (2017).** Regulated membrane remodeling by Mic60 controls formation of mitochondrial crista junctions. *Nat Commun* 8. doi.10.1038/ncomms15258.
- Ischebeck, T. (2016).** Lipids in pollen — They are different. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1861. doi.10.1016/j.bbalip.2016.03.023.
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B. et al. (2004).** Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167, 863–874. doi.10.1083/jcb.200407022.
- Kang, J., Park, J., Choi, H. et al. (2011).** Plant ABC Transporters. *Arab B* 9. doi.10.1199/tab.0153.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M. et al. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10. doi.10.1038/nprot.2015.053.
- Kelly, A. A. und Dörmann, P. (2002).** DGD2, an Arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* 277. doi.10.1074/jbc.M110066200.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H. et al. (2013).** AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 110. doi.10.1073/pnas.1214159110.
- Klammt, C., Maslennikov, I., Bayrhuber, M. et al. (2012).** Facile backbone structure determination of human membrane proteins by NMR spectroscopy. *Nat Methods* 9, 834–839. doi.10.1038/nmeth.2033.
- Klaus, D., Härtel, H., Fitzpatrick, L. M. et al. (2002).** Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the Arabidopsis *dgd1* mutant. *Plant Physiol* 128. doi.10.1104/pp.010780.
- Kobayashi, K. (2016).** Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129. doi.10.1007/s10265-016-0827-y.
- Koncz, C. und Schell, J. (1986).** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet MGG* 204, 383–396. doi.10.1007/BF00331014.
- Könnel, A., Bugaeva, W., Gügel, I. L. et al. (2019).** BANFF: Bending of bilayer membranes by amphiphilic α -helices is necessary for form and function of organelles. *Biochem Cell Biol* 97. doi.10.1139/bcb-2018-0150.

- Koo, A. J. K., Ohlrogge, J. B. und Pollard, M. (2004).** On the Export of Fatty Acids from the Chloroplast. *J Biol Chem* 279. doi.10.1074/jbc.M311305200.
- LaBrant, E., Barnes, A. C. und Roston, R. L. (2018).** Lipid transport required to make lipids of photosynthetic membranes. *Photosynth Res* 138. doi.10.1007/s11120-018-0545-5.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. doi.10.1038/227680a0.
- Lavell, A. A. und Benning, C. (2019).** Cellular organization and regulation of plant glycerolipid metabolism. *Plant Cell Physiol* 60. doi.10.1093/pcp/pcz016.
- Lee, E.-J., Oh, M., Hwang, J.-U. et al. (2017).** Seed-Specific Overexpression of the Pyruvate Transporter BASS2 Increases Oil Content in Arabidopsis Seeds . *Front Plant Sci* 8, 194. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00194>.
- Li-Beisson, Y., Neunzig, J., Lee, Y. et al. (2017).** Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. *Curr Opin Plant Biol* 40, 138–146. doi.10.1016/j.pbi.2017.09.006.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F. et al. (2013).** Acyl-Lipid Metabolism. *Arab B* 11. doi.10.1199/tab.0161.
- Li, N., Gügel, I. L., Giavalisco, P. et al. (2015).** FAX1, a Novel Membrane Protein Mediating Plastid Fatty Acid Export. *PLoS Biol* 13. doi.10.1371/journal.pbio.1002053.
- Li, N., Xu, C., Li-Beisson, Y. et al. (2016).** Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends Plant Sci* 21. doi.10.1016/j.tplants.2015.10.011.
- Li, Q., Zheng, Q., Shen, W. et al. (2015).** Understanding the biochemical basis of temperature-induced lipid pathway adjustments in plants. *Plant Cell* 27. doi.10.1105/tpc.114.134338.
- Lu, B. und Benning, C. (2009).** A 25-amino acid sequence of the Arabidopsis TGD2 protein is sufficient for specific binding of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 284. doi.10.1074/jbc.M109.016014.
- Lu, B., Xu, C., Awai, K. et al. (2007).** A small ATPase protein of Arabidopsis, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J Biol Chem* 282, 35945–35953. doi.10.1074/jbc.M704063200.
- Madsen, K. L. und Herlo, R. (2017).** Recursive alterations of the relationship between simple membrane geometry and insertion of amphiphilic motifs. *Membranes (Basel)* 7. doi.10.3390/membranes7010006.
- Manan, S., Chen, B., She, G. et al. (2017).** Transport and transcriptional regulation of oil production in plants. *Crit Rev Biotechnol* 37, 641–655. doi.10.1080/07388551.2016.1212185.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press.
- Michaud, M., Gros, V., Tardif, M. et al. (2016).** AtMic60 is Involved in Plant Mitochondria Lipid Trafficking and is Part of a Large Complex. *Curr Biol* 26. doi.10.1016/j.cub.2016.01.011.
- Michaud, M., Prinz, W. A. und Jouhet, J. (2017).** Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria. *FEBS J* 284. doi.10.1111/febs.13812.

- Moellering, E. R. und Benning, C. (2011).** Galactoglycerolipid metabolism under stress: A time for remodeling. *Trends Plant Sci* 16, 98–107. doi.10.1016/j.tplants.2010.11.004.
- Moellering, E. R., Muthan, B. und Benning, C. (2010).** Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 80- 330. doi.10.1126/science.1191803.
- Mól, A. R., Castro, M. S. und Fontes, W. (2018).** NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *bioRxiv*. doi.10.1101/416347.
- Möller, S., Croning, M. D. R. und Apweiler, R. (2001).** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17. doi.10.1093/bioinformatics/17.7.646.
- Nakamura, Y. (2013).** Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* 52. doi.10.1016/j.plipres.2012.07.002.
- Nakamura, Y. (2017).** Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein–Lipid Interactions. *Trends Plant Sci* 22. doi.10.1016/j.tplants.2017.09.002.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T. et al. (2007).** Arabidopsis Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol* 144. doi.10.1104/pp.106.094581.
- Navarro-Retamal, C., Bremer, A., Ingólfsson, H. I. et al. (2018).** Folding and Lipid Composition Determine Membrane Interaction of the Disordered Protein COR15A. *Biophys J* 115. doi.10.1016/j.bpj.2018.08.014.
- Nilsson, R., Schultz, I. J., Pierce, E. L. et al. (2009).** Discovery of Genes Essential for Heme Biosynthesis through Large-Scale Gene Expression Analysis. *Cell Metab* 10. doi.10.1016/j.cmet.2009.06.012.
- Pfanner, N., van der Laan, M., Amati, P. et al. (2014).** Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol* 204. doi.10.1083/jcb.201401006.
- Quilichini, T. D., Douglas, C. J. und Lacey Samuels, A. (2014).** New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 114. doi.10.1093/aob/mcu042.
- Quilichini, T. D., Grienenberger, E. und Douglas, C. J. (2015).** The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* 113, 170–182. doi.10.1016/j.phytochem.2014.05.002.
- Rampelt, H. und van der Laan, M. (2017).** The Yin & Yang of mitochondrial architecture-interplay of MICOS and F1Fo-ATP synthase in cristae formation. *Microb Cell* 4. doi.10.15698/mic2017.08.583.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G. et al. (2009).** Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106. doi.10.1073/pnas.0813167106.
- Roberts, R. G. (2015).** Flagging the Fatty Acid Ferryman. *PLoS Biol* 13, 1–3. doi.10.1371/journal.pbio.1002054.

- Rocha, J., Sarkis, J., Thomas, A. et al. (2016).** Structural insights and membrane binding properties of MGD1, the major galactolipid synthase in plants. *Plant J* 85. doi.10.1111/tpj.13129.
- Roston, R., Gao, J., Xu, C. et al. (2011).** Arabidopsis chloroplast lipid transport protein TGD2 disrupts membranes and is part of a large complex. *Plant J* 66. doi.10.1111/j.1365-313X.2011.04536.x.
- Roston, R. L., Wang, K., Kuhn, L. A. et al. (2014).** Structural determinants allowing transferase activity in sensitive to freezing 2, classified as a family i lycosyl hydrolase. *J Biol Chem* 289. doi.10.1074/jbc.M114.576694.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239. doi.10.1126/science.2448875.
- Salas, J. J. und Ohlrogge, J. B. (2002).** Characterization of substrate specificity of plant Fata and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch Biochem Biophys* 403, 25–34. doi.10.1016/S0003-9861(02)00017-6.
- Schmidt, A. (2015).** Plastid-predicted FAX proteins: subcellular localization and test for protein-protein interaction (Masterarbeit, LMU München, Deutschland)
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R. et al. (2005).** A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* 37. doi.10.1038/ng1543.
- Schnurr, J. A., Shockey, J. M., De Boer, G. J. et al. (2002).** Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 129. doi.10.1104/pp.003251.
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E. et al. (2003).** ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol* 131. doi.10.1104/pp.011577.
- Shi, J., Cui, M., Yang, L. et al. (2015).** Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. *Trends Plant Sci* 20. doi.10.1016/j.tplants.2015.07.010.
- Takemura, T., Imamura, S. und Tanaka, K. (2019).** Identification of a chloroplast fatty acid exporter protein, CmFAX1, and triacylglycerol accumulation by its overexpression in the unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae. *Algal Res* 38. doi.10.1016/j.algal.2018.101396.
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M. et al. (2012).** Predalgo: A new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae. In *Molecular Biology and Evolution*. doi.10.1093/molbev/mss178.
- Thalhammer, A., Bryant, G., Sulpice, R. et al. (2014).** Disordered cold regulated15 proteins protect chloroplast membranes during freezing through binding and folding, But do not stabilize chloroplast enzymes in vivo. *Plant Physiol* 166. doi.10.1104/pp.114.245399.
- Thalhammer, A. und Hinch, D. K. (2014).** A mechanistic model of COR15 protein function in plant freezing tolerance: Integration of structural and functional characteristics. *Plant Signal Behav* 9. doi.10.4161/15592324.2014.977722.
- Tian, Y., Lv, X., Xie, G. et al. (2019).** FAX2 Mediates Fatty Acid Export from Plastids in Developing Arabidopsis Seeds. *Plant Cell Physiol* 60. doi.10.1093/pcp/pcz117.

- Tian, Y., Lv, X., Xie, G. et al. (2018).** Seed-specific overexpression of AtFAX1 increases seed oil content in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* 500. doi.10.1016/j.bbrc.2018.04.081.
- Trentmann, O., Mühlhaus, T., Zimmer, D. et al. (2020).** Identification of chloroplast envelope proteins with critical importance for cold acclimation. *Plant Physiol* 182. doi.10.1104/PP.19.00947.
- Troncoso-Ponce, M. A., Nikovics, K., Marchive, C. et al. (2016).** New insights on the organization and regulation of the fatty acid biosynthetic network in the model higher plant Arabidopsis thaliana. *Biochimie* 120, 3–8. doi.10.1016/j.biochi.2015.05.013.
- Waegemann, K., Eichacker, S. und Soll, J. (1992).** Outer envelope membranes from chloroplasts are isolated as right-side-out vesicles. *Planta* 187. doi.10.1007/BF00201628.
- Wang, Z., Anderson, N. S. und Benning, C. (2013).** The phosphatidic acid binding site of the Arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *J Biol Chem* 288. doi.10.1074/jbc.M112.438986.
- Wang, Z. und Benning, C. (2012).** Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites. *Biochem Soc Trans* 40. doi.10.1042/BST20110752.
- Xiao, Z., Zhang, C., Tang, F. et al. (2019).** Identification of candidate genes controlling oil content by combination of genome-wide association and transcriptome analysis in the oilseed crop Brassica napus. *Biotechnol Biofuels* 12. doi.10.1186/s13068-019-1557-x.
- Xu, C., Fan, J., Cornish, A. J. et al. (2008).** Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell* 20. doi.10.1105/tpc.108.061176.
- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J. E. et al. (2005).** Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell* 17. doi.10.1105/tpc.105.035592.
- Xu, C. und Shanklin, J. (2016).** Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues*. *Annu Rev Plant Biol* 67. doi.10.1146/annurev-arplant-043015-111641.
- Zerbes, R. M., Der Klei, I. J. V., Veenhuis, M. et al. (2012).** Mitofilin complexes: Conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol Chem* 393. doi.10.1515/hsz-2012-0239.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A. Y. (1990).** Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8. doi.10.1038/nbt0390-172.
- Zhu, L., He, S., Liu, Y. Y. et al. (2020).** Arabidopsis FAX1 mediated fatty acid export is required for the transcriptional regulation of anther development and pollen wall formation. *Plant Mol Biol* 104. doi.10.1007/s11103-020-01036-5.
- Zou, Z., Dirusso, C. C., Ctrnacta, V. et al. (2002).** Fatty acid transport in Saccharomyces cerevisiae: Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem* 277, 31062–31071. doi.10.1074/jbc.M205034200.

13 Anhang

	At	Br389	Br405	Br859	Sl	Mt	Ps	Bv	Gm	Os421	Os690	Zm081	Zm990	Pp022	Pp899	Pp988	Cr
At	100%																
Br389	89%	100%															
Br405	94%		100%														
Br859	88%	94%		100%													
Sl	94%	98%			100%												
Mt	77%	78%	81%			100%											
Ps	93%	96%	96%				100%										
Bv	54%	53%	52%	50%				100%									
Gm	67%	66%	65%	67%	58%				100%								
Os421	63%	66%	64%	64%	74%	90%				100%							
Os690	48%	49%	50%	52%	54%	50%	52%				100%						
Zm081	66%	67%	66%	67%	75%	66%	66%	100%									
Zm990	47%	47%	46%	44%	58%	79%	81%	48%									
Pp022	61%	64%	62%	64%	53%	90%	94%	68%	100%								
Pp899	41%	41%	42%	46%	38%	37%	38%	37%		36%							
Pp988	55%	56%	56%	54%	57%	51%	56%	49%			100%						
Cr	38%	38%	39%	42%	38%	37%	40%	39%	37%	50%		100%					
	57%	58%	58%	56%	59%	54%	57%	54%	56%	67%			100%				
	37%	38%	39%	43%	37%	35%	38%	40%	37%	39%	56%						
	56%	57%	57%	55%	51%	54%	58%	54%	57%	63%	87%	100%					
	37%	38%	39%	42%	36%	34%	36%	37%	34%	72%	48%		40%				
	53%	54%	54%	52%	44%	47%	52%	49%	49%	86%	67%	65%		100%			
	33%	32%	32%	32%	34%	32%	33%	32%	33%	31%	28%	32%					
	47%	46%	46%	46%	42%	46%	47%	47%	45%	46%	44%	43%		100%			
	31%	34%	34%	33%	33%	32%	33%	32%	33%	30%	29%	27%	30%		86%		100%
	49%	49%	49%	49%	40%	45%	46%	48%	45%	43%	41%	40%	43%		85%		
	31%	30%	30%	29%	30%	30%	31%	29%	31%	28%	29%	25%	28%		68%		70%
	45%	43%	43%	43%	40%	43%	45%	46%	44%	41%	44%	41%	44%		72%		100%
	24%	23%	28%	27%	20%	20%	20%	22%	19%	26%	27%	20%	26%		21%		16%
	31%	30%	29%	30%	25%	28%	28%	28%	28%	28%	32%	28%	27%		31%		24%
																	100%

Abb. 13.1: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX1 Proteinen unterschiedlicher Organismen. Die erste Zeile in schwarz gibt dabei die Übereinstimmung zwischen den maturen Proteinsequenzen an, die zweite Zeile in grün zwischen der jeweiligen Tmemb Region der FAX1 Sequenzen. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At3g57280, NP_567046.1), Br386 (*Brassica rapa*, LR031574.1, VDC99386.1), Br405 (*Brassica rapa*, CM010634.1, RID54405.1), Br859 (*Brassica rapa*, LR031568.1, VDC62859.1), Sl (*Solanum lycopersicum*, NM_001320224., NP_001307153.1), Mt (*Medicago truncatula*, XM_003625049.3, XP_003625097), Ps (*Pisum sativum*, AIX87540.1, KF981436.1), Bv (*Beta vulgaris*, XM_010674623.2, XP_010672925.1), Gm (*Glycine max*, XM_003554106.4, XP_003554154), Os421 (*Oryza sativa*, XM_015779935.2, XP_015635421), Os690 (*Oryza sativa*, Os06g0301100, LOC_Os06g19690.1), Zm081 (*Zea mays*, XM_008653859.2, XP_008652081), Zm990 (*Zea mays*, NCVQ01000002.1, PWZ45990.1), Pp022 (*Physcomitrella patens*, XM_024503254.1, XP_024359022), Pp899 (*Physcomitrella patens*, XM_024546131.1, XP_024401899), Pp988 (*Physcomitrella patens*, XM_024548220.1, XP_024403988) and Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*, CHLRE-DRAFT_160683, A8ICM7).

	At	Br	Sl	Mt	Ps	Bv	Gm	Os	Zm353	Zm441
At	100%									
Br	74% 83%	100%								
Sl	50% 57%	48% 57%	100%							
Mt	48% 60%	48% 60%	59% 65%	100%						
Ps	49% 59%	47% 59%	58% 64%	86% 91%	100%					
Bv	43% 60%	41% 55%	53% 63%	51% 65%	50% 65%	100%				
Gm	42% 55%	39% 54%	47% 61%	65% 81%	65% 83%	46% 61%	100%			
Os	37% 48%	35% 48%	41% 50%	40% 51%	41% 52%	38% 53%	38% 53%	100%		
Zm353	38% 49%	35% 46%	47% 57%	44% 53%	43% 50%	38% 51%	38% 50%	67% 76%	100%	
Zm441	36% 50%	33% 48%	44% 56%	43% 53%	41% 51%	36% 52%	37% 51%	65% 79%	85% 91%	100%

Abb. 13.2: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX2 Proteinen unterschiedlicher Organismen. Die erste Zeile in schwarz gibt dabei die Übereinstimmung zwischen den maturen Proteinsequenzen an, die zweite Zeile in grün zwischen der jeweiligen Tmemb Region der FAX2 Sequenzen. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At2g38550, NP_565892.1), Br (*Brassica rapa*, XM_009145127.1, XP_009143375), Sl (*Solanum lycopersicum*, XM_004246239.4, XP_004246287), Mt (*Medicago truncatula*, XM_003623582.3, XP_003623630), Ps (*Pisum sativum*, MN737494), Bv (*Beta vulgaris*, XM_010685179.2, XP_010683481), Gm (*Glycine max*, XM_003552266.3, XP_003552314.1), Os (*Oryza sativa*, XM_015765746.2, XP_015621232), Zm353 (*Zea mays*, GRMZM2G059353.01, NP_001132377.1), Zm441 (*Zea mays*, GRMZM2G166441.01, ACG49146.1) and Zm947 (*Zea mays*, Zm00001d012504, A0A1D6G947).

	At	Br	Sl	Mt	Ps	Gm	Os	Zm	Pp701	Pp764	Cr
At	100%										
Br	84% 91%	100%									
Sl	51% 67%	50% 69%	100%								
Mt	57% 71%	55% 69%	50% 73%	100%							
Ps	56% 70%	55% 68%	50% 73%	90% 94%	100%						
Gm	51% 67%	50% 65%	52% 74%	74% 85%	76% 87%	100%					
Os	53% 64%	54% 65%	50% 69%	59% 75%	60% 76%	59% 79%	100%				
Zm	51% 64%	52% 64%	50% 72%	60% 79%	61% 80%	58% 80%	84% 93%	100%			
Pp701	54% 64%	51% 64%	47% 66%	52% 68%	53% 68%	57% 72%	57% 70%	58% 71%	100%		
Pp764	53% 63%	51% 63%	43% 61%	51% 65%	53% 68%	54% 69%	54% 69%	56% 70%	70% 82%	100%	
Cr	24% 37%	25% 39%	25% 39%	25% 40%	25% 39%	28% 41%	28% 40%	25% 37%	25% 40%	27% 41%	100%

Abb. 13.3: Prozentangaben der identischen Aminosäuren zwischen den FAX3 Proteinen unterschiedlicher Organismen. Die erste Zeile in schwarz gibt dabei die Übereinstimmung zwischen den maturen Proteinsequenzen an, die zweite Zeile in grün zwischen der jeweiligen Tmemb Region der FAX3 Sequenzen. Die verschiedenen Organismen, Gennummern und Proteinnummern aus der NCBI Datenbank sind in Klammern aufgelistet. At (*Arabidopsis thaliana*, At3g43520, NP_566866.1), Br (*Brassica rapa*, RID58705.1, CM010633.1), Sl (*Solanum lycopersicum*, XM_004251268.4, XP_004251316), Mt (*Medicago truncatula*, XM_013602920.2, XP_013458374), Ps (*Pisum sativum*, MN737495), Gm (*Glycine max*, XM_003542343.3, XP_003542391), Os (*Oryza sativa*, XM_015780205.2, XP_015635691), Zm (*Zea mays*, NM_001143430.1, NP_001136902.1), Pp701 (*Physcomitrella patens*, XM_024506933.1, XP_024362701.1), Pp764 (*Physcomitrella patens*, XM_024506996.1, XP_024362764.1) and Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*, CHLRE_08g383300v5, A0A2K3DI83).

A*Ps*-FAX2

5' ATTCACATTACTTCATTTTCATAAACCCCTTCTTTGATTTTCGGTTCCATTATTCTTTCCCTTTACTTTGATTCTTACTCCTTCTT
 CCAACCCCTCACAAAATTCTCGTTCCCTTCGCCCTTTCAATATCTGAACCTAATGGCCTCCATGAGTTTCACAATGGATTCA
 GTTTCTGTTTTAAACCCTAAACTTAACCATCCCGTCCCTCTCTCCCAACCTTTCACCCTTTACTCAAAAACCGCACTTTCAAA
 CTCTCCCTTCCCGTTATGCTCTCCATCAACCCAAACCCTTAACCGTCACTTTCGCCGCGCCGGAACACGACTCCGATCATGG
 TCAAGTTGAAGTGGAGAAGGGGAATGACGATGTTGATGTTGATGTTGGTCCGAGGAGGAATCACAGGAAGCATGGAAG
 CAGGCTTTGGATACATTCAAGGAACAGGCTTTGAAGGTTCAAGGGGTTTCTCAAGAGGCTTATGAATTGACTCGAAGAA
 GGCGGTTGTTATTTGAAGGATACTTCGGAGCAGTTGAAGATACATGCTGATAAGGCCAAACATGATTTGAGTGTGG
 CGAAGGAAATTACGGAAGAAGGGAAAGAGATTTGCTTCTGCTGCGGAGAATTCGCCTGATGTGAAGGAGATTGTGGA
 GACTTTTACTTCCCGGAGGATGATCTTAGCAATGTTTCTGGAGTGAGGGATTTTTATGTTGGGATACCCTATGGTTTGCTA
 CTATCTCTGGGTGGCTTCTTTCTTTATGGTAACCGGAAGCCTTGCAGCAATAAGGTTTGGGGTGATTTTAGCGGTGGT
 CTGTTGGCTCTAAGCATTTCAAGTTTGAATCATATAAAAAAGGACAGCCTTCTTCTAGCTTTGAAGGGCCAGACAGCA
 ATAGCAAGTATCTGTTTCTGCGGGAGATTAAGTTCAGTTGGCAGAGGATCAACTTATTTCACTGCCTTGATCAGTGGTGCG
 GTAGCGGCGTTTTACGTCTATAGACTGGTTTTGGAAGGTAAACCACAAAAA **GGTTCAAACCTTGAAGGTGAAGCAGGA**-3'

B*Ps*-FAX3

5' ATGGCGGTTTTAGGCCTTTCGACTTCCACTCTCCCTCCTTCTATCTTCGCTCTACAACCATTACCGATCCAACCCCTCCA
 CTATCCCTCGCTCCTTCTCGCCCACCCTCCTTCTTTCCCTACCTTCACTCTTTCCAATCCACACTCTCAAATCGCAGTTGTCTC
 TTCTGATTCCAAGGCCACTTCATTTGACCTAAGTGCCCCAGATTTGGACAACAGCGGCGGGCGGGAAGTATCAAAGGTA
 ACGGAGACGATTTTGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGTGGAGGAGGAGCGGAGACGATAGTAACAAGGGAGAGGAAGG
 ATCGAACGGAGATAAAAAGGAAAATGGCTTTGTCAATGTCTCAGAAATTGACTCTAGGTTATGCTATTCTCGTCGGAGCGG
 GTGGTGAATGGGCTATCTGAAGAGTGGCAGCAATAAGTCACTTTTGGCTGGTGGTTTGTCTTCTGCACTGCTGTTTTATG
 TTTTACCGAACACTACCGGAAGACCTGTTCTTGCATCATCTGTGGGCCTTGGTATATCTGCCGCACTTCTTTCCGGTGATGG
 TTCTCGTTTTCAGGAAATCAGGGAAGGTCTTTCCAGCAGGTGTTGTGTCCCTTGTGTCACTCATAATGACAGGTGGTACTTG
 CA **CGGAATTATGCGTAGTAGTTCGCACTAG**-3'

Abb. 13.4: Primerbindestellen auf der cDNA Sequenz von *Ps*-FAX2 und *Ps*-FAX3. (A) Der codierende Bereich der *Ps*-FAX2 mRNA (schwarze Buchstaben) beträgt 918 bp (GenBank Nr. MN737494). Die Bindestelle des forward *Ps* FAX2 fw0 Primers (in blau markiert) liegt im 5'-UTR (untranslatierte Region, orangene Buchstaben). Die Bindestelle des reversen *Ps*-FAX2 rev Primers ist grün hinterlegt. (B) Der codierende Bereich der *Ps*-FAX3 mRNA (schwarze Buchstaben) beträgt 678 bp (GenBank Nr. MN737495). Die Bindestelle des forward *Ps*-FAX3 fw Primers ist in blau markiert und des reversen *Ps*-FAX3 rev Primers ist grün hinterlegt.

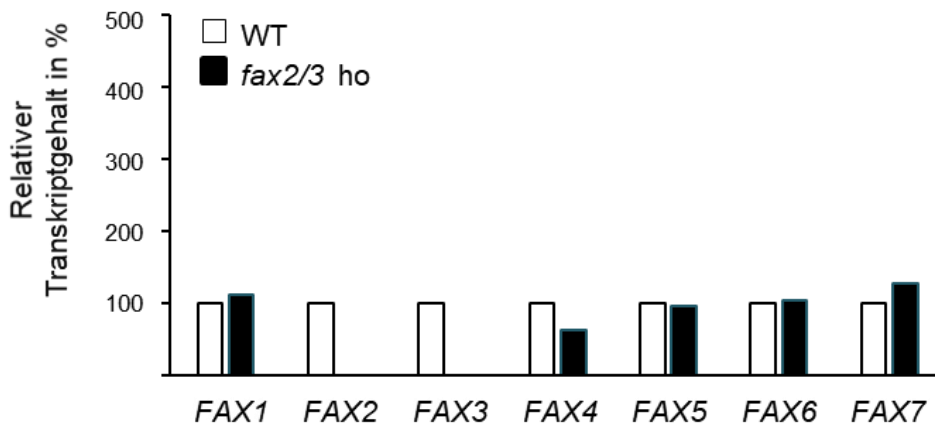


Abb. 13.5: Quantifizierung der FAX Transkriptgehalte in der homozygoten *fax2/3* Doppelmutante. Die Bestimmung der Transkriptgehalte erfolgte über eine qRT-PCR aus vier Wochen alten Rosettenblättern von homozygoten *fax2-1/3-1* Doppelmutanten Linie #8 und dem entsprechenden rücksegregierten Wildtyp #10. Dabei wurden drei Pflanzen zu einer Probe vereinigt ($n = 1$) und diese gemessen. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt und auf Wildtyp Col-0 normiert.

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei Prof. Katrin Philippar für die Möglichkeit am interessanten Thema der plastidären Membranproteine mitzuforschen. Wir haben gemeinsam den Umzug aus München gemeistert und eine hervorragend laufende Arbeitsgruppe aufgebaut. Vielen Dank für die Zusammenarbeit und die wertvolle, wissenschaftliche Kompetenz, sowohl bei persönlichen Gesprächen, als auch auf zahlreichen Tagungen.

Ein großes Danke geht an Prof. Uli Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Unterstützung während meiner Promotionszeit in Saarbrücken.

Auch danke ich Prof. Jürgen Soll für die Möglichkeit meine Arbeit, integriert in seine Arbeitsgruppe an der LMU München, zu beginnen. Ein besonderes Dankeschön an Pit, Karl, Tina, Valentin, Cordula und Johanna für die Hilfsbereitschaft und eine sehr spannende Zeit.

Ich bedanke mich für die Teilnahme bei der *Life Science Munich* und ein liebes Danke an Franziska für das tolle Management.

Genauso möchte ich mich für die Aufnahme im *IRTG1830* bedanken. Mit einem herzlichen Dankeschön an Gabi für einfach alles und den IRTG-Mitgliedern für die familiäre Atmosphäre und die konstruktiven Forschungsgespräche während einer prägenden, gemeinsamen Zeit.

Als nächstes gilt mein Dank der Prof. Neuhaus Arbeitsgruppe an der TU Kaiserslautern, zum einen für die Möglichkeit eine Messung zur elektrischen Leitfähigkeit durchzuführen und danke besonders Cristina für die tolle Unterstützung während dem Ablauf, und zum anderen für den wissenschaftlichen Austausch zu pflanzenbiologischen Forschungsthemen mit guten, neuen Ideen.

Ich danke Anne und Janick für eine angenehme Arbeitsatmosphäre mit vielen, tollen Lachmomenten, und genauso für die bereichernden Diskussionen während einer schönen, gemeinsamen Zeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Angelika für ihre Mitarbeit bei der Genotypisierung mit ihrer umfassenden Laborerfahrung und genauso für ihre herzliche, lebensfrohe Art sowie ihren kostbaren Teamgeist.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für den Zusammenhalt und insbesondere Andrea für die Versorgung der Pflanzen. Ich danke Maja aus dem Prüfungssekretariat für die erfahrungsreichen und netten Gespräche bei Kaffee.

Ganz besonders danke ich Melanie, Moritz und Maja für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor, für ihre Zuverlässigkeit und ihren Einsatz. Es war mir eine Freude mit euch zusammen zu arbeiten.

Auch bedanke ich mich bei der AG Neurobiologie für die Nutzung des LC und der Spülküche und danke ganz besonders Michael für seinen Einsatz bei technisch herausfordernden Situationen.

Zum Schluss bedanke ich mich herzlichst bei meiner Familie und meinen Freunden für eure großartige Liebe und Fürsorge und die wertvollen, lehrreichen Momente