

# **Die Familie der OEP16-Kanalproteine in der äußeren Hüllmembran von Plastiden**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades**  
**der Fakultät für Biologie**  
**der Ludwig-Maximilians-Universität**  
**München**

Vorgelegt von  
**Birgit Simone Pudelski**

München  
2010

Dissertation eingereicht am: 21.06.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2010

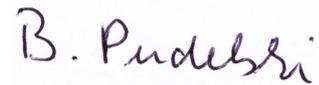
Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Stainz, den 13.08.2010

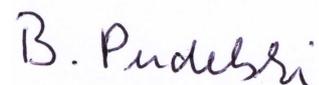


Birgit Pudelski

## **Erklärung**

Ich habe zuvor nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

Stainz, den 13.08.2010



Birgit Pudelski

## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN .....	IV
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Die PRAT Familie .....	2
1.2 OEP16.....	5
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
2 MATERIAL .....	9
2.1 Chemikalien und Medien.....	9
2.2 Enzyme .....	9
2.3 Oligonukleotide .....	9
2.4 Vektoren und Konstrukte.....	11
2.5 Molekulargewichts- und Größenstandards .....	12
3 METHODEN .....	13
3.1 Pflanzenphysiologische Methoden .....	13
3.1.1 Saatgut und Anzuchtsbedingungen .....	13
3.1.2 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	14
3.2.1 Medien und Anzucht .....	14
3.2.2 Transformation .....	15
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	15
3.3.1 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	15
3.3.2 Klonierungsstrategien.....	16
3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.3.4 Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	17
3.3.6 PCR-Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien, OEP16 Komplementations- und Überexpressionslinien .....	17
3.3.7 Sequenzierung von DNA .....	19
3.3.8 RNA-Präparation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
3.3.9 Reverse Transkription .....	19
3.3.10 Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	20
3.3.11 Microarray-Analyse .....	21
3.3.12 GUS Färbung.....	21

3.4	Biochemische Methoden .....	22
3.4.1	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen und Blattgeweben .....	22
3.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	22
3.4.3	Immunodetektion von Proteinen .....	23
3.5	Mikroskopie.....	26
3.5.1	Lichtmikroskopie .....	26
3.5.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	26
3.6	Computer-Analysen.....	27
4	ERGEBNISSE.....	28
4.1	Die Proteine der OEP16 Familie in <i>Arabidopsis</i> und Erbse.....	28
4.1.1	Isolierung von OEP16.2 aus Erbse.....	28
4.2	Lokalisation der OEP16 Proteine in der Pflanze .....	30
4.2.1	Expression aller OEP16 Isoformen auf RNA Ebene.....	31
4.2.2	Generierung eines Antikörpers gegen Ps-OEP16.2 .....	34
4.2.3	Immunolokalisation der OEP16 Isoformen in Samen- und Keimlingsgeweben	35
4.2.4	Immunodetektion von OEP16.1 und OEP16.2 in Hüllmembran-Fractionen von <i>Arabidopsis</i> und Erbsen-Chloroplasten.....	37
4.3	Membrantopologie und Interaktion der OEP16 Isoformen.....	38
4.3.1	Orientierung von OEP16.1 und OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran .....	38
4.3.2	Interaktionsanalysen im <i>Split Ubiquitin</i> System .....	41
4.4	Mutation aller OEP16 Isoformen in <i>Arabidopsis</i> .....	44
4.4.1	Phänotypische Charakterisierung der OEP16 Mutanten.....	45
4.5	Die Funktion von OEP16.1 .....	46
4.5.1	Detaillierte Charakterisierung der <i>oep16.1-1 knockout</i> Mutante .....	47
4.6	Die Rolle von OEP16.2 in der Samenentwicklung .....	57
4.6.1	Embryonal- und Samenentwicklung in <i>oep16.2-1 knockout</i> Linien .....	58
4.6.2	Samen-Keimung von OEP16.2 Mutanten unter ABA Zugabe .....	60
4.6.3	ABA-Induktion der Genexpression von OEP16.2 in Erbsensamen.....	62
5	DISKUSSION.....	65
5.1	Subzelluläre Lokalisation und Gewebe-spezifische Expression der OEP16 Proteine in Pflanzen.....	65
5.1.1	Die Membrantopologie der OEP16 Isoformen .....	66
5.1.2	Die Expression der OEP16 Isoformen .....	68
5.2	Die Funktion von OEP16.1 <i>in vivo</i> .....	69

5.2.1	OEP16.1 hat keine Funktion im Protein-Import von PORA.....	71
5.2.2	Eine Funktion von OEP16.1 im Aminosäuretransport.....	72
5.2.3	Zwei weitere Mutationen in der Linie SALK_024018 .....	72
5.3	Die Funktion von OEP16.2 <i>in vivo</i> .....	73
5.3.1	OEP16.2 spielt eine Rolle bei der Dormanz von Samen.....	74
5.3.2	Zusammenspiel von OEP16.1 und OEP16.2 in der Samenentwicklung.....	77
5.4	Ausblicke zur Funktionsanalyse .....	78
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	80
	LITERATUR.....	82

**ABKÜRZUNGEN**

AGI	<i>Arabidopsis</i> Gene Identifier
Ap	Alkalische Phosphatase
AS/AA	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	Komplementäre (copy-) DNA
Col-0	Columbia-0 ( <i>Arabidopsis</i> Ökotyp)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destiliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Verstärkte Chemiluminescence ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GUS	β-Glukuronidase
HAc	Essigsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
IE	Innere Chloroplastenhüllmembran ( <i>inner envelope</i> )
IgG	Immunglobulin G
IMS	Intermembranraum von Chloroplasten/Mitochondrien ( <i>inter membrane space</i> )
kDa	Kilodalton
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure

---

MS	Massenspektrometrie
MS	Murashige-Skoog Salz
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OE	Äußere Chloroplastenhüllmembran ( <i>outer envelope</i> )
OEP	Protein der äußeren Chloroplastenhüllmembran ( <i>outer envelope protein of chloroplasts</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
Ps	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR an revers-transkribierter RNA
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SA/SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
T-DNA	Transfer-DNA
TIC	Translokon der inneren Chloroplasten-Hüllmembran
TM	Transmembran-Domäne
TOC	Translokon der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran
Tricine	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
UTR	Untranslatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 EINLEITUNG

Während der Evolution entstanden Mitochondrien und Plastiden durch zwei unabhängige und einmalige endosymbiotische Ereignisse. Mitochondrien entstanden ungefähr vor 2-3 Milliarden Jahren aus einem  $\alpha$ -Proteobakterium (van der Giezen und Tovar 2005, Gross und Bhattacharya 2009a), wohingegen Chloroplasten zu einem späteren Zeitpunkt durch die Endosymbiose eines ursprünglichen, frei lebenden, Cyanobakterium-ähnlichen Prokaryoten mit einer Wirtszelle, die bereits Mitochondrien enthielt, hervorgebracht wurden (Gould et al. 2008). In den heutigen höheren Pflanzen findet in den Chloroplasten die Photosynthese statt. Chloroplasten bilden damit die Basis für alles Leben, das von der Zufuhr von atmosphärischem Sauerstoff und der Verfügbarkeit von Kohlehydraten abhängig ist. Deshalb sind die von einer äußeren und inneren Hüllmembran umgebenen Chloroplasten in allen Zellen von Pflanzen und Grünalgen, also in allen Chloroplastida, einzigartige und essenzielle Organellen.

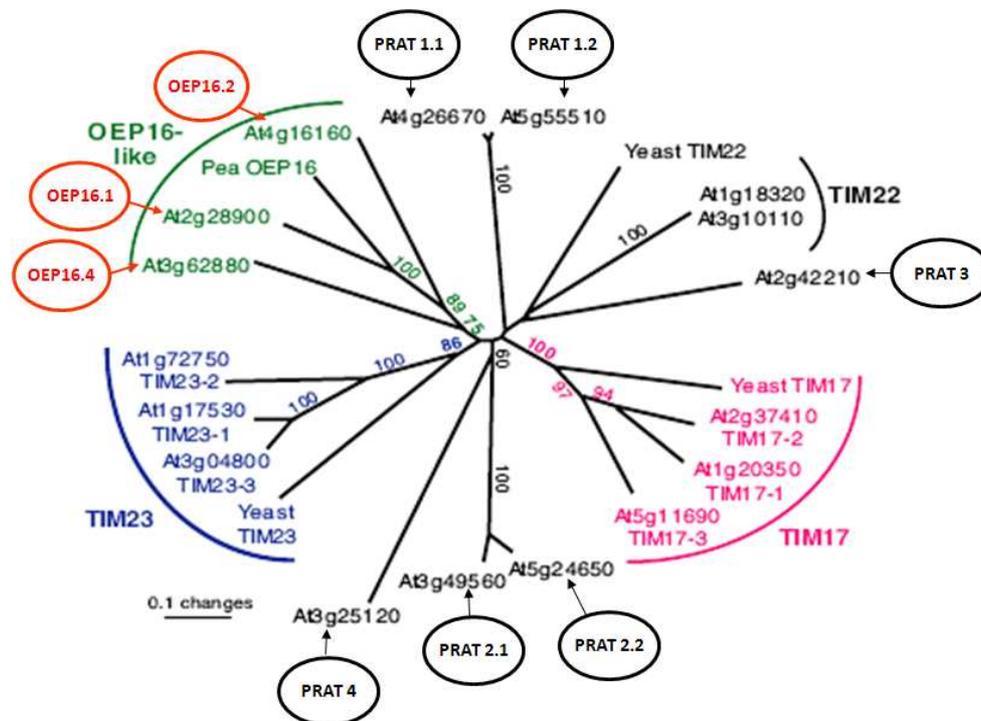
Obwohl Chloroplasten und Mitochondrien immer noch einen Teil ihres eigenen Genoms besitzen, machten es während der Evolution einerseits der massive Transfer von genetischer Information zum Zellkern und andererseits die Ansprüche komplexer biochemischer Funktionen in beiden Organellen erforderlich, mit dem umgebenden Zytosol zu kommunizieren. Somit müssen Proteine und Metaboliten über die Doppelmembranen beider Organellen transportiert werden: (i) Proteine, die im Zytosol synthetisiert werden benötigen ein Importsystem in Chloroplasten und Mitochondrien. Der plastidäre Importapparat ist einzig in Pflanzen und Grünalgen zu finden, während die Translokationsmaschinerie in pflanzliche Mitochondrien zu großen Teilen mit den sehr gut untersuchten Systemen in Pilzen verglichen werden kann (zur Übersicht siehe: Lister et al. 2005, Stengel et al. 2007, Inaba und Schnell 2008, Benz et al. 2009, Balsera et al. 2009). Jedoch führten die Aufgaben von Mitochondrien in höheren Pflanzen, mit ihren unterschiedlichen Gewebeformen, Organen und Entwicklungsstadien, sowie der notwendigen Anpassung an andauernd wechselnde Umweltbedingungen dazu, dass sich Genfamilien bildeten. So gibt es z.B. drei Isoformen der pflanzlichen TIM17:23 Translokationskanäle in der inneren Mitochondrien-Membran, verglichen mit nur einer Isoform in Hefe. (ii) Als Konsequenz der Zellkompartimentierung in der pflanzlichen Zelle müssen Metabolite und Stoffe zwischen den Organellen und dem Zytosol ausgetauscht werden. Somit sind Membrantransporter, die den Austausch von Metaboliten und Ionen vermitteln und regulieren, der Schlüssel zu einem ordentlich funktionierenden Pflanzenmetabolismus (Philippar und Soll 2007).

Lange Zeit wurde die äußere Hüllmembran des Chloroplasten in der Metabolitransportforschung vernachlässigt, da sie lediglich als ein Sieb galt, das gelöste Stoffe aufgrund ihrer Größe selektiert. Es wurde angenommen, dass es in der plastidären äußeren Hüllmembran eine Diffusionspore ähnlich dem VDAC-Porin (*voltage dependent anion channel*) der äußeren Membran von Mitochondrien gibt und sie somit frei durchlässig für alle niedermolekularen Metaboliten mit einem Molekulargewicht bis zu 10 kDa sei. (zur Diskussion siehe: Fischer et al. 1994; Soll et al. 2000; Flüge 2000, Clausen et al. 2004). Dementsprechend wurde angenommen, dass die osmotische Barriere zum Zytosol einzig von der inneren Hüllmembran des Chloroplasten gebildet werde. Allerdings haben Studien zur subzellulären Lokalisation der VDAC Proteine in grünen und nicht grünen Geweben in Plastiden und Mitochondrien gezeigt, dass VDAC ausschließlich in Mitochondrien vorkommt (Clausen et al. 2004). Die Transportkapazität und Selektivität der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten konnte mehreren Proteinen, den OEPs (*Outer Envelope Proteins of Chloroplasts*), zugeschrieben werden. Bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts konnten diese spezifisch regulierten und für einzelne Metaboliten selektiven Kanalproteine aus äußeren Hüllmembranfraktionen von Erbsenchloroplasten isoliert werden (Pohlmeyer et al. 1997, Steinkamp et al. 2000, Linke et al. 2004, Bölder et al. 1999, Bölder und Soll 2001, Hemmler et al. 2006, Pohlemeyer et al. 1998, Röhl et al. 1999, Schleiff et al. 2003, Götze et al. 2006). Dazu gehören unter anderem die relativ unselektiven, jedoch gewebespezifisch exprimierten, Porin-ähnlichen OEP24-Proteine, die durch Substrat und ATP regulierten OEP21-Kanäle und die gering affinen, jedoch sehr spezifischen Aminosäurekanäle OEP16 (zur Übersicht siehe Philippar und Soll 2007; Duy et al. 2007). Neuere Proteomanalysen (Ferro et al. 2010, Friso et al. 2010) sowie die vielfältigen Funktionen, die Plastiden bei der Biosynthese von Primär- und Sekundärmetaboliten erfüllen, legen jedoch nahe, dass noch sehr viele Metabolitkanäle in der äußeren Hüllmembran unentdeckt sind (Duy et al. 2007, Philippar und Soll 2007). Die OEP16 Proteine, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, gehören zur Überfamilie der PRAT-Proteine (Präprotein- und Aminosäuretransporter).

## 1.1 Die PRAT Familie

Die pflanzlichen Präprotein und Aminosäure Transporter bilden eine Überfamilie, die zuerst von Rassow et al. (1999) beschrieben wurde. Sie kann in sechs Unterfamilien aufgeteilt werden: die pflanzlichen Orthologe der mitochondriellen TIM17, TIM23 und TIM22 Proteintranslokasen, die chloroplastidären OEP16-Aminosäurekanäle, plastidäre TIM17-Homologe und dual lokalisierte Membranproteine, mit einer SAM Domäne (*sterile alpha motif*, Murcha et al. 2007, zur Übersicht siehe Pudelski et al. 2010). Die Isoformen der plastidären TIM17-

Homologe wurden PRAT1.1 und PRAT1.2 benannt, die SAM-Domänen Proteine PRAT2.1 und PRAT2.2. Zwei weitere Proteine, die sich nicht in die sechs Untergruppen einordnen lassen, wurden mit PRAT3 und PRAT4 bezeichnet (Abbildung 1, Pudelski et al. 2010).



**Abbildung 1: PRAT Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (modifiziert nach Murcha et al. 2007)**

TIM17, 22, 23 aus Hefe (yeast) und OEP16 aus Erbse (pea) wurden zum Vergleich mit einbezogen. Für die phylogenetische Analyse wurden jeweils 82 Aminosäuren zwischen der zweiten und der vierten Helix der Membranproteine miteinander verglichen (Murcha et al. 2007). Angegeben sind die AGI Codes der Proteine aus *Arabidopsis*, sowie die Bezeichnungen der Unterfamilien aus Pudelski et al. (2010).

Rassow und seine Mitarbeiter konnten 1999 ein PRAT Konsensus Motiv definieren, indem sie die Aminosäuresequenzen von TIM23, 17 und 22 aus Hefe mit OEP16 aus Erbse und dem bakteriellen Aminosäuretransporter LivH verglichen:



Allerdings zeigten neuere Studien, dass dieses Motiv nicht in allen pflanzlichen PRAT Proteinen konserviert ist (Murcha et al. 2007). Zwischen den einzelnen Unterfamilien der PRAT Proteine besteht nur eine geringe Sequenzähnlichkeit, jedoch eine sehr ähnliche Sekundärstruktur. Alle PRAT Proteine haben vier Membran-durchspannende  $\alpha$ -Helices, kein, für in Plastiden oder Mitochondrien lokalisierte Proteine klassisches, abspaltbares Signalpeptid, jedoch eine TIM17-Domäne (Pfam Datenbank für Proteinfamilien PF02466; Finn et al. 2008). Diese evolutionär stark konservierte TIM17-Domäne wurde ursprünglich in einer Studie von Bömer et al. (1996) analysiert, die Aminosäuresequenzen von TIM17 in Tieren, Pilzen und Pflanzen vergleicht.

**Tabelle 1: Eigenschaften der pflanzlichen PRAT-Proteine (modifiziert nach Pudelski et al. 2010)**

Name	AGI / Acc. No.	Lokalisation <sup>a</sup>	stärkste Expression <sup>b</sup>	Nr. As	MW [kDa]
At-TIM23.1	At1g17530	IM	Späte Samenentw., Pollen	187	19
At-TIM23.2	At1g72750	IM	Ubiquitär (hoch)	188	20
At-TIM23.3	At3g04800	IM	Ubiquitär (sehr gering)	188	20
Sc-Tim23	P32897	IM	-	222	23
At-TIM17.1	At1g20350	IM	Kotyledonen, Blätter, Samen	218	23
At-TIM17.2	At2g37410	IM	Ubiquitär (hoch)	243	25
At-TIM17.3	At5g11690	IM	Ubiquitär (gering)	133	14
Sc-Tim17	AAS56178	IM	-	158	17
At-TIM22.1	At1g18320	IM	Sprossapex, Samen	129	14
At-TIM22.2	At3g10110	IM		173	18
Sc-Tim22	NP_010064	IM	-	207	22
At-PRAT3	At2g42210	MM	Ubiquitär (hoch)	173/159	18/17
At-PRAT4	At3g25120	IM	Ubiquitär (gering)	189	20
At-OEP16.1	At2g28900	OE	Blätter	148	16
Ps-OEP16.1	CAA97910	OE	Blätter	147	16
At-OEP16.2	At4g16160	OE	nur: Kotyl., Samen, Pollen	176	20
Ps-OEP16.2	-	OE	-	183	19
At-OEP16.4	At3g62880	CE	Samen	136	16
At-PRAT1.1	At4g26670	CE	Blätter, Sprossapex	210	22
At-PRAT1.2	At5g55510	CE	Blüten, Keimlinge, Sprossapex <sup>c</sup>	214	20
At-PRAT2.1	At3g49560	IE/IM	Blätter	261	28
At-PRAT2.2	At5g24650	IE/IM	Spross, Blätter	259	28

Die Lokalisations- (a) und Expressionsdaten (b) basieren auf Pohlmeier et al. (1997), Philippar et al. (2007), Murcha et al. (2007), und auf gesammelten Microarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), sowie (c) auf *Arabidopsis* Tilingarrays (Laubinger et al. 2008). At: *Arabidopsis thaliana*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ps: *Pisum sativum*, AGI: *Arabidopsis gene identifier*, Acc. Nr: GenBank Zugangsnummer, IM: innere Mitochondrienmembran, OE: äußere Hüllmembran des Chloroplasten, CE: Hüllmembranen des Chloroplasten, IE: innere Hüllmembran des Chloroplasten, No. As: Anzahl der Aminosäuren, MW: Molekulargewicht, -: keine Daten verfügbar.

Die subzelluläre Lokalisation ist für die Mitglieder der PRAT Überfamilie sehr divers (Tabelle 1). Die OEP16 Proteine sind in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert, während TIM23, TIM17 und TIM22 Bestandteil der Proteintranslokase der inneren Mitochondrienmembran sind. Für die zwei PRAT1 Proteine wird eine Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt, die PRAT2 Proteine scheinen dagegen dual in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert zu sein und sowohl PRAT3 als auch PRAT4 integrieren in die Mitochondrienmembranen (Murcha et al. 2007, Philippar et al. 2007).

## 1.2 OEP16

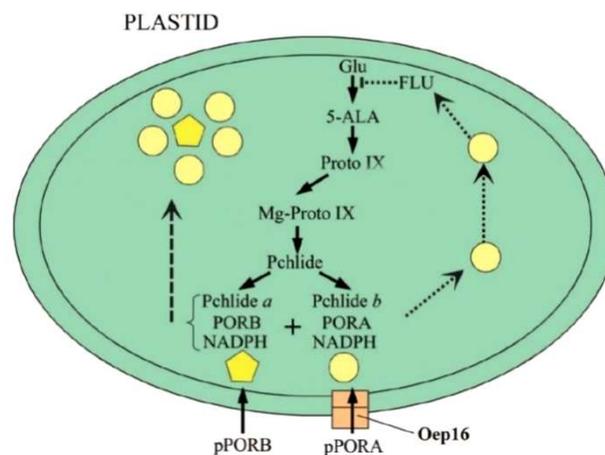
Nahezu alle bisher bekannten OEPs (OEP21, OEP24, OEP37) bilden  $\beta$ -Faltblatt Poren in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten, ähnlich wie ihre Porin-ähnlichen Vorfahren in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Duy et al. 2007). Im Gegensatz dazu formt OEP16, wie alle PRAT Proteine, Kanäle aus vier transmembranen  $\alpha$ -Helices. Dies deutet darauf hin, dass OEP16 evolutionär aus der Plasmamembran des cyanobakteriellen Endosymbioten oder der eukaryotischen Empfängerzelle hervorgegangen ist. Eine Abstammung von einem Chlamydien-ähnlichen Gram-negativen Bakterium, das eventuell als möglicher Ko-Symbiont in frühen Pflanzenzellen auftrat, ist ebenfalls denkbar (Tyra et al. 2007, Moustafa et al. 2008). Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass OEP16 bei einem post-endosymbiotischen Ereignis in die äußere Hüllmembran der frühen Plastiden inseriert wurde (Gross und Bhattacharya 2009b).

Ursprünglich wurde OEP16 aus der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aus Erbse als 16 kDa großes Protein isoliert und von Pohlmeier et al. (1997) charakterisiert. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gibt es drei Isoformen, At-OEP16.1, At-OEP16.2 und At-OEP16.4 (Tabelle 1, Abbildung 1). At-OEP16.1 hat die höchste Sequenzähnlichkeit mit dem ursprünglichen, aus Erbse isolierten OEP16, im Folgenden Ps-OEP16.1 genannt. Rekombinantes Ps-OEP16.1 bildet, wenn es in Liposomen rekonstituiert wird, einen leicht Kationen-selektiven, stark leitfähigen (1,2 nS in 1 M KCl) Kanal (Pohlmeier et al. 1997). In Schwellungsversuchen mit OEP16-Proteoliposomen zeigte sich eine hohe Selektivität für Aminosäuren (Glycin, Valin, Arginin, Lysin, Glutamat, Glutamin, Cadaverin). Die vorhergesagte Pore hat einen Durchmesser von ca. 1,0 nm und ist undurchlässig für 3-Phosphoglycerat und ungeladene Zucker wie Fruktose, Glukose, Saccharose oder Sorbitol. Ps-OEP16.1 gibt es in verschiedenen Typen von Plastiden (Etioplasten, Proplastiden, Amyloplasten und Chloroplasten) in Wurzeln, Sprossen und Blättern. Wahrscheinlich wird der funktionelle Kanal von Homo- oder Heterooligomeren gebildet, in denen Helix 1 in Kombination mit Helix 2 von Ps-OEP16.1 die Pore bildet (Pohlmeier et al. 1997, Steinkamp et al. 2000, Linke et al. 2004). Ähnlich wie es auch für Porine und den spezifischen Kanal LamB in *E. coli* beschrieben wird, hat OEP16 eine längere Peptidschleife, zwischen erster und zweiter Helix, die in die Pore gefaltet sein könnte und somit einen Selektionsfilter bilden oder der Substraterkennung dienen könnte (zur Übersicht siehe Duy et al. 2007, Pudelski et al. 2010). OEP16.1 und OEP16.2 aus Erbse, *Arabidopsis* und Reis enden mit der aromatischen Aminosäure Tyrosin oder Phenylalanin an ihrem C-Terminus, wie es auch für Porine aus der äußeren Hüllmembran von Gram-negativen Bakterien beschrieben wird.

Die drei OEP16-Isoformen in *Arabidopsis* (At-OEP16.1, At-OEP16.2 und At-OEP16.4) zeigen ein stark reguliertes Expressionsmuster (Tabelle 1, Pudelski et al. 2010). At-OEP16.1 ist die Hauptform in der Hüllmembran aus maturen, photosynthetisch aktiven Chloroplasten von Blättern. At-OEP16.2 ist dagegen ausschließlich in reifen Samen, Kotyledonen und frühen Stadien der Pollenentwicklung zu finden (Drea et al. 2006, Philippar et al. 2007, Pudelski et al. 2010). Transkripte von At-OEP16.4 sind auf einem geringen Niveau, dafür gleichmäßig während der gesamten Pflanzenentwicklung exprimiert, mit dem höchsten Level in Pollen und Samen (Tabelle 1). Die Bedeutung von OEP16 zeigte sich auch in der Abundanz und dem Vorkommen der Proteine in mehreren Proteomanalysen von isolierten *Arabidopsis*-Chloroplasten, Blumenkohl-Proplastiden und aufgereinigten Hüllmembranen aus *Arabidopsis*, Erbse und Mais (Ferro et al. 2003, Froehlich et al. 2003, Kleffmann et al. 2004, Bräutigam et al. 2008a,b, Zybailov et al. 2008, Bräutigam und Weber 2009).

Allerdings wurde die Funktion der OEP16 Proteine in der Pflanze in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert. Da At-OEP16.1 die stärkste Sequenzähnlichkeit zu Ps-OEP16.1 zeigt, liegt eine Funktion als Aminosäure-selektiver Kanal in der äußeren Hüllmembran von *Arabidopsis* Chloroplasten nahe. Im Gegensatz dazu wiesen Untersuchungen an Gerste und *Arabidopsis* auf eine Funktion als Translokase für den Import der Vorstufe der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A (prePORA) in Chloroplasten hin (Reinbothe et al. 2004a, 2004b, 2005, Pollmann et al. 2007). POR spielt eine zentrale Rolle in der Chlorophyll Biosynthese. Es katalysiert die lichtabhängige Umwandlung von Protochlorophyllid in Chlorophyllid und ist somit entscheidend für die Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten (Griffith 1978, Apel et al. 1980). In *Arabidopsis* sind mit PORA, B und C drei Isoformen bekannt (Su et al. 2001). PORA und PORB sind beide während der frühen Keimlingsentwicklung exprimiert, PORA ist jedoch ausschließlich in etiolierten Geweben zu finden und wird bei Belichtung sehr schnell abgebaut. Die Etioplasten von Angiospermen haben große Prolammelarkörper, die zum großen Teil aus Lipiden und dem sogenannten Protochlorophyllid Holochrom bestehen. Letzteres wird von Protochlorophyllid selbst, PORA und NADPH gebildet (Gunning 2001, Santel und Apel 1981). Somit katalysiert PORA den entscheidenden Schritt bei der Ergrünung von etiolierten Keimlingen bei Belichtung, der De-Etiolierung (vgl. Abbildung 35, Diskussion). PORB dagegen ist im Licht stabil und wird vom Tagesrhythmus reguliert exprimiert (Sue et al. 2001, Armstrong et al. 1995) und PORC ist in den Blättern von Pflanzen, die im Licht gewachsen sind zu finden (Oosawa et al. 2000). Beide spielen also eine Rolle in der Chlorophyll-Biosynthese in Pflanzen unter Licht.

Nach den Ergebnissen von Reinbothe und Mitarbeitern wird das Vorstufenprotein von PORB über den allgemeinen TOC-TIC Weg in den Chloroplasten importiert. PORA dagegen sollte von einem sogenannten Protochlorophyllid-abhängigen Translokationskomplex importiert werden (Reinbothe et al. 1997, 2000, 2004a, 2004b, 2005, 2006). Dieser Weg ist jedoch organspezifisch, da prePORA sein Substrat Protochlorophyllid nur in Kotyledonen benötigt um importiert zu werden (Kim und Apel 2004, Kim et al. 2005). In Blättern geht die Substratabhängigkeit verloren und scheint somit von der Biogenese der Plastiden und der Entwicklung der Pflanze reguliert zu werden. OEP16.1 wurde über chemische *Crosslinks* und Ko-Immunopräzipitation in Plastiden aus Blättern von Gerstenkeimlingen als Teil des Protochlorophyllid-abhängigen Translokationskomplexes für die PORA Vorstufe identifiziert (Reinbothe et al. 2004a, 2004b, 2005). Nachfolgende Untersuchungen in OEP16 *knockout* Mutanten in *Arabidopsis* ergaben, dass OEP16.1 die Translokationspore bilden sollte (Abbildung 2, Pollmann et al. 2007).



**Abbildung 2: Bildliche Darstellung der Hypothese von Reinbothe und Mitarbeitern zum prePORA Import via OEP16 (modifiziert nach Pollmann et al. 2007).**

Die gelben Kreise und Fünfecke stehen für die PORA-Protochlorophyllid-NADPH bzw. PORB-Protochlorophyllida-NADPH Komplexe. Die orange Box soll OEP16 als Teil des Importapparates von prePORA darstellen. FLU: FLU Gen (*fluorescence gene*), Glu: Glutamat, ALA: Aminolevolinsäure, ProtoIX: Protoporphyrin IX, MgProtoIX: Magnesium- Protoporphyrin IX, Pchlide: Protochlorophyllid, Chlide: Chlorophyllid, POR: Protochlorophyllid Oxidoreduktase.

Zur gleichen Zeit kam unsere Arbeitsgruppe zu einem absolut gegensätzlichen Ergebnis (Philippar et al. 2007). Bei der Untersuchung der gleichen Mutantenlinie *oep16.1-1* (Nachkommen der SALK\_024018 Linie), sowie von OEP16.2, OEP16.4, OEP16.1/4 *knockout*-Linien konnte ohne Zweifel gezeigt werden, dass keine der OEP16-Isoformen in *Arabidopsis* am Import von prePORA in Chloroplasten und Etioplasten aus Kotyledonen *in vivo* und *in vitro* beteiligt ist. Eine Charakterisierung des Phänotyps von Einzel- und Doppelmutanten aller Isoformen von OEP16 konnte die Funktion beim Import von prePORA nicht bestätigen (Philippar et al. 2007). Zudem wird die Expression von OEP16.1 durch Licht induziert, wäh-

rend die PORA Transkripte und Proteine bei Belichtung verschwinden (Su et al. 2001; Philippar et al. 2007). Studien über die Kälteinduktion von OEP16.1 in Gerste (Baldi et al. 1999) deuten wiederum auf eine Funktion beim Aminosäuretransport hin, da die Anpassung an Kälte, besonders in Getreiden, eine verstärkte *de novo* Synthese von Aminosäuren voraussetzt und somit auch der Kanäle, die diese zwischen Zytosol und Chloroplast transportieren.

Im Gegensatz zu OEP16.1 wird OEP16.2 spezifisch in nicht photosynthetisch aktiven Plastiden der späten Samen- und frühen Pollenentwicklung exprimiert (Drea et al. 2006, Philippar et al. 2007). Während dieser Phasen der Pflanzenentwicklung, besonders in den Speicherkotyledonen des sich entwickelnden Embryos, haben die Plastiden vor allem eine Funktion bei der Biosynthese von Aminosäuren und Fettsäuren, die für die Samenkeimung und das Pollenschlauchwachstum benötigt werden. Die Expression von OEP16.2 wird zusätzlich von dem Phytohormon Abszinsinsäure das die Samendormanz steuert induziert (Drea et al. 2006).

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

Diese Arbeit befasst sich mit der physiologischen und der funktionellen Charakterisierung der drei OEP16 Kanalproteine in der äußeren Hüllmembran von Plastiden.

Vor dem geschilderten Kenntnisstand der Forschung sollten folgende Ziele erreicht werden:

- (i) Verifizierung der vorliegenden Expressionsanalysen für alle OEP16 Isoformen in *Arabidopsis* und Erbse auf Proteinebene
- (ii) Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OEP16.2 und OEP16.4
- (iii) Aufklärung der Membrantopologie von OEP16.1 und OEP16.2
- (iv) Klärung der Diskussion über die Funktion von OEP16.1 *in vivo*
- (v) Einblicke in die Rolle von OEP16.2 in der Samenentwicklung

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und Medien

Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Biomol (Hamburg, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GibcoBRL (Paisley, UK), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Der MitoTracker (Orange CMTMRos) wurde von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Die in dieser Arbeit benutzten Detergenzien Natrium-Dodecyl Sulfat (SDS), Lithium Dodecyl Sulfat (LDS) und Triton X-100 (TX-100) wurden von Roth erworben.

### 2.2 Enzyme

Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen: Restriktionsenzyme von MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) T4-Ligase von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und MBI Fermentas, Taq-Polymerasen von Diagonal (Münster, Deutschland), Eppendorf, MBI Fermentas, Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und Finnzymes (Espoo, Finnland), Reverse Transkriptase von Promega (Madison, USA), RNase freie DNase I von Roche (Mannheim, Deutschland), RNase von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden). Die Proteasen Thermolysin und Trypsin wurden von Merck und von Sigma-Aldrich bezogen.

### 2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Qiagen/Operon (Köln, Deutschland), Invitrogen und von Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert (Tabelle 2). Sie wurden für quantitative Echtzeit RT-PCR, iPCR, TAIL PCR, RACE PCR und zur Genotypisierung und Verifizierung von Mutantenlinien benutzt.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.**

I: Inosin; Wobbles: M: A/C, R: A/G, W: A/T, S: C/G, Y: C/T, N: A/C/G/T,

Name	Sequenz (5'>3' Orientierung)	Verwendung
Act2/8fw	GGTGATGGTGTGTCT	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
Act2/8rev	ACTGAGCACAATGTTAC	"
OEP16.1LCfw	TGTTAGCAGCCGAAG	"
OEP16.1LCrev	CTTACCAACCGCTGAG	"
OEP16.2LCfw	CTTAACCGTATCGCAGA	"
OEP16.2LCrev	AGAGCAGACTGAACCAC	"
OEP16.4LCfw	GTCGAGTCAGTTCTCCG	"
OEP16.4LCrev	CCTGGTGCAATTAGCC	"
PORALCfw	GTTACGTCTCCGAGTCAG	"
PORALCrev	GCCAAAACACAATACTAAATC	"
PORBLCfw	TTCACAGGCGTTTCCA	"
PORBLCrev	GTACCGAGAGGTGTCAT	"
oligo-dT-Primer	T <sub>25</sub> V[INQ]	Reverse Transkription
RBkp1fw	AGTCATTAAACTCCAGAAACCCGCG	Genotypisierung von SALK Mutantenlinien
RBkp1rev	GCTCCACTGACGTTCATAAATTCCC	"

RBkp0fw	ACGTTGCGGTTCTGTCAAGTCCAAAC	“
RBkp0rev	ATCTGCACCGGATCTGGATCGTTTC	“
LBkp0.5fw	ACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGG	“
LBkp0.5rev	TAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCC	“
LBkp0fw	CGATTTTCGGAACCCATCAAAACAGG	“
LBkp0rev	TGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGC	“
LBa1	TGGTTCACGTAAGTGGCCATCG	Genotypisierung von SALK Mutantenlinien
LBb1	GCCTGGACCGCTTGCTGCAACT	“
M13fw	GTAAAACGACGGCCAG	“
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	“
LB1SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	Genotypisierung von SAIL Mutantenlinien
LB3SAIL	TAGCATCTGAATTTCAACCAATCTCGATACAC	“
AD1	NTCGASTWTSWGTT	TAIL-PCR
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	“
AD3	WGTGNAGWANCANAGA	“
AD4	WGGWANCWGAWANGCA	“
AD5	WCGWWGAWCANGNCGA	“
AD6	WGCNAGTNAGWANAAG	“
AD7	AWGCANGNCWGANATA	“
AD8	SSTGGSTANATWATWCT	“
AD9	CGSATSTCSAANAAT	“
LBT0a	GGTTCGATTTAGTGCCTTACG	“
LBT0b	AACTTGATTTGGGTGATGGTTC	“
LBT0c	CCCTATCTCGGGCTATTCCTTT	“
16.1_T-DNAfw	GCCTTCAAGCACATTCTCCGGGACTGTTA	Genotypisierung von <i>oep16.1-1</i>
16.1_T-DNArev	CCAATCTCTGCTGCCACGGATAC	“
16.1-4018fw	GACTGTTAGCACGCCGAAGCTG	“
16.1-4018rev	CCGCATGCTCCAAAGTGCTC	“
GP1_T-DNAfw	ACACAATCCGCTCTCAAACCCAAAC	“
GP1_T-DNArev	GCTGAGTCTACGGCGTTGAGTGGTG	“
CM1_T-DNAfw	GTTTGATTGTTTCTATGTATCGACC	“
CM1_T-DNArev	GAAGAGAACAACGAACAGAGAAAG	“
CM1fw	ATGGAAGCGTCATTGTTGATGAGATCGTC	“
CM1rev	TCAGTCCAGTCTTCTGAGCAAGTACTCCAC	“
COR15arev	CTACTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTC	“
COR15as1fw	ATGGCGATGTCTTTCTCAGGAGC	“
COR15as2fw	ATGGCTTCTTCTTTCCACAGCG	“
GPR11ffw	ATGTTAGCTCTGTCTCCGGCGACAAG	“
GPR11frev	TCAGGCACAAGACGCGGTCGG	“
LTPfw	ATGGCTTCAAGAACCCACAAAATCTTTAG	“
LTPrev	TTAGCATTGGAAGCCACGAGGAAC	“
PGSIP5fw	ATGGGGGCCAAAAGCAAAGTTC	“
PGSIP5rev	TCATTGACTTAGACGGTCTTCTCCTAGG	“
SDRfw	ATGATTGAGACGGTTAAACACCTGATCG	“
SDRrev	TTAAAAGGAGGTATGAGAAAGATTGGTAGTGG	“
SEN1fw	ATGGAACCACTGCTTTTAAACACAACATC	“
SEN1s1rev	TTACACACATACAGCAGTGAGAAGATCAGTTG	“
SEN1s2rev	TCATTCTCTGTCCAAGCGACGTATCC	“
SEN1s3rev	TCACTTCTTACCAGGCGAGCTCATT	“
SAUL1fw (StHo)	ATGATCCATACACCAACCGGGTCCG	“
SAUL1rev (StHo)	TCACCAGGCGTGGACAAACCC	“
ThiRDx1ffw	ATGACGGAAGTGATTAGCAAACGAGTTTG	“
ThiRDx1frev	TCATCTCCCTGCGGAGACCAATGTT	“
ukCHL1ffw	ATGGAAACAATAGCAGTTCAAATGACCC	“
ukCHL1frev	TCACCGGAGCTGTAAAACCTCGCCG	“
ukSmallfw	ATGAAGACCAATAGAGAGCAGGAAATTTAC	“
ukSmallrev	TCAGTAGTTGTAGAAGTGAAGCCCGAC	“
ukThyfw	ATGACGATCGCACCGGCATT	“
ukThyrev	CAAATCCTGCTCCGTACATTCC	“
At2gN	GCCTTCAAGCACATTCTCCGGGACTGTTA	“
62880SF	ATAGGTTTAAAGCGGCGTTTCTCAGGC	“
28900SR	CCAATCTCTGCTGCCACGGATAC	“
OEP16.2(672)fw	GGAGCTTTACAAGCCGTGTC	Genotypisierung von <i>oep16.2-1</i>
OEP16.2(672)rev	ACACTAGCACACTAGCACAGAAAT	Genotypisierung von <i>oep16.2-1</i>
at4gN	GTAAATGGATGAGATAAGAAGCTTTGAGAA	Genotypisierung von <i>oep16.2-1</i>
at4gC	CTAGAAAGGAGATTAGCAGCGGTGGAAAT	Genotypisierung von <i>oep16.2-1</i>
at3gC	CTGTCTGGTGCAATTAGCCAAAACACTA	Genotypisierung von <i>oep16.4-2</i>
62880R	TTAATTAGTGTTGTTGGGTTTTTC	Genotypisierung von <i>oep16.4-2</i>
62880SR	ATATCGTTGAAGCCACAATGTGTC	Genotypisierung von <i>oep16.4-2</i>
3'-RACE CDS Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30 V N	3'RACE PCR
5'-RACE CDS Primer	(T)25V N	5'RACE PCR
Kurz-UP (smart)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	RACE PCR
Lang-UP (smart)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACG CAGAGT	“
Geschachtelt-UP (smart)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	“
Ps-OEP16.2(RACE)fw	AGCCGTTTCTCGTGATGCTTATTCTCAG	“
Ps-OEP16.2(RACE)rev	ATATGGGCTGAAGGAAGCTCGTGGA	“
Ps-OEP16.2fw a	TGATCTGGICAYCCTCTICTIAAYMG	“
Ps-OEP16.2fw b	AGCTGTITCTMGIGARGCTTATTTYAC	“
Ps-OEP16.2rev a	TAAATICTGCAGCIACICCCCATG	“
Ps-OEP16.2rev b	ACGIACCTGCAGARTTYTTCCAATCATG	“
Gateway Forward (attB1)	GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCTNN	Klonierung in pENTR/D/TOPO
Gateway Reverse (attB2)	GGGGACCACTTTGTACAAAAGCTGGGTN	Klonierung in pENTR/D/TOPO
OEP16.1GFPfw	CACCATGCCCTTCAAGCACATTCTCCGGG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
OEP16.1GFPprev	GTAGAAAATATGATTGTTAACGAACTGAGAAGCG	“
OEP16.1GFP+stop rev	TCAGTAGAAAATATGATTGTTAACGAACTGAGAAGCG	“
OEP16.2GFPfw	CACCATGGAGAAGAGTGGAGGAAGAATTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
OEP16.2GFPrev	GAAAACGCTAGAAAAGGAGATTAGCAC	“

OEP16.2GFP+stop rev	CTAGAAAACGCTAGAAAGGAGATTAGCAG	“
OEP16.4GFPfw	CACCATGGAGGAAGAATTGCTCTCCGC	“
OEP16.4GFPrev	ATTAGTGTGTTTGGGTTTTCTGTCCCTG	“
OEP16.4GFP+stop rev	TTAATTAGTGTGTTTGGGTTTTCTGTCCCTG	“
OEP16.1-Sfi fw	GGCGGCCATTACGGCCATGCCTTCAAG	Klonierung in <i>Split Ubiquitin</i>
OEP16.1-Sfi rev	GTCGGCCGAGGCGGCCCTGTAGAAATAATGATTG	“
OEP16.1-Sfi rev(+stop)	GTCGGCCGAGGCGGCCCTAGTAGAAATAATGATTG	“
OEP16.2-Sfi fw	ACCGGCCATTACGGCCATGGAGAAGAGTGGAG	“
OEP16.2-Sfi rev	CTTGGCCGAGGCGGCCATGAAAACGCTAGAAAAGGAG	“
OEP16.2-Sfi rev(+stop)	CTTGGCCGAGGCGGCCCTAGAAAACGCTAGAAAAGG	“
OEP16.4-Sfi fw	ACCGGCCATTACGGCCATGGAGAAGAAATTGC	“
OEP16.4-Sfi rev	CTTGGCCGAGGCGGCCATATTAGTGTGTTTGGG	“
OEP16.4-Sfi rev(+stop)	CTTGGCCGAGGCGGCCCTAATTAGTGTGTTTGGG	“
OEP16.1kompl.fw	CGCAAACAATCGGGTGCATAGTAG	Klonierung zur <i>in vivo</i> Komplementation
OEP16.1kompl.rev	GGTCCCTAAAGGAAGATGGAGAATCAG	“
OEP16.2kompl.fw	AAGAGGAAGAAAAGAGGACCTTCTCG	“
OEP16.2kompl.rev	GCTTCTAATAACAATCATCTAGAAAACGCTAG	“
OEP16.4kompl.fw	TCCCTGTTTTGGCATAGACGTTAG	“
OEP16.4kompl.rev	CAGTGTCTAAATATCACCTTAATTAGTGTG	“
35S::fw	GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGG	Genotypisierung von OEP16-Überexpressionslinien

## 2.4 Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierung der jeweiligen Konstrukte wurden in dieser Arbeit folgende Plasmid-Vektoren verwendet (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verwendete Plasmid-Vektoren.**

Plasmid-Vektor	Verwendung	Herkunft
pCR2.1 und pCRblunt	Subklonierung	Invitrogen
pJET1.2	Subklonierung	Fermentas
pENTR/D/TOPO	Entry-Vektor für GATEWAY-Klonierung	Invitrogen
pET21	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	Novagene/Merck (Darmstadt, Deutschland)
pBT3-C	Köder-Vektor für <i>Split Ubiquitin</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz)
pBT3-SUC	Köder-Vektor für <i>Split Ubiquitin</i>	“
pPR3-C	Beute-Vektor für <i>Split Ubiquitin</i>	“
pPR3-SUC	Beute-Vektor für <i>Split Ubiquitin</i>	“
pH2GW7	GATEWAY-Klonierung	“
pHGW	GATEWAY-Klonierung	“

In Tabelle 4 sind Konstrukte aufgeführt, die von der AG Soll zur Verfügung gestellt wurden.

**Tabelle 4: Verwendete Konstrukte.**

Protein	Plasmid-Vektor	Verwendung
At-OEP16.1	pET21b	Expression in <i>E. coli</i>
At-OEP16.2	pET21d	“
At-OEP16.4	pET21d	“
At-OEP16.4	pPROExHTa	“

In Tabelle 5 sind die Konstrukte für das *Split Ubiquitin* System aufgeführt.

**Tabelle 5: Plasmid-Konstrukte für das Split-Ubiquitin System**

Protein	Plasmid-Vektor	Verwendung
At-OEP16.1	pBT3-C	Köder-Vektor (C-terminal)
At-OEP16.1	pBT3-SUC	Köder-Vektor (C-terminal mit SUC Signal)
At-OEP16.1	pPR3-C	Beute-Vektor (C-terminal)
At-OEP16.1	pPR3-SUC	Beute-Vektor (C-terminal mit SUC Signal)
At-OEP16.1+stop	pBT3-N	Köder-Vektor (N-terminal)
At-OEP16.1+stop	pPR3-N	Beute-Vektor (N-terminal)
At-OEP16.2+stop	pPR3-N	Beute-Vektor (N-terminal)
At-OEP16.4+stop	pPR3-N	Beute-Vektor (N-terminal)
At-OEP16.2	pBT3-SUC	Köder-Vektor (C-terminal mit SUC Signal)
At-OEP16.4	pBT3-SUC	Köder-Vektor (C-terminal mit SUC Signal)

In Tabelle 6 sind in dieser Arbeit hergestellte Plasmid-Konstrukte aufgeführt.

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Plasmid-Konstrukte.

Protein	Plasmid-Vektor	Verwendung
Ps-OEP16.2-1a-a	pCR2.1	Subklonierung für Ps-OEP16.2 Sequenzierung
Ps-OEP16.2-1a-b	pCR2.1	"
Ps-OEP16.2-1b-a	pCR2.1	"
Ps-OEP16.2-1b-b	pCR2.1	"
At-OEP16.1+stop	pET21d	Expression in <i>E. coli</i>
At-OEP16.1-stop	pET21d	"
At-OEP16.2+stop	pET21d	"
At-OEP16.2-stop	pET21d	"
Ps-OEP16.2+stop	pET21a	"
Ps-OEP16.2-stop	pET21a	"
OEP 16.1 fl+tag	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
OEP 16.2 fl+tag	pENTR/D/TOPO	"
OEP 16.4 fl+tag	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.1 fl+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.2 fl+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.4 fl+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.1 ll+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.2 ll+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.4 ll+stop	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.1 fl	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.2 fl	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.4 fl	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.1 fl+stop	pH2GW7	OEP16.1-Überexpressionspflanzen
OEP16.2 fl+stop	pH2GW7	"
OEP16.4 fl+stop	pH2GW7	"
OEP16.1 kompl.	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination für Komplementation
OEP16.2 kompl.	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.4 kompl.	pENTR/D/TOPO	"
OEP16.1 kompl.	pHGW	Komplementationspflanzen OEP16.1
OEP16.2 kompl.	pHGW	"
OEP16.4 kompl.	pHGW	"

## 2.5 Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE diente ein „*Low Molecular Weight Marker*“ bestehend aus  $\alpha$ -Lactalbumin (14 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (36 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa) von Sigma-Aldrich (Laemmli, 1970). Zur Ergänzung wurde in einigen Fällen ein *Prestained* Marker der Firma BioRad (München, Deutschland) bestehend aus  $\beta$ -Galaktosidase (104 kDa), Bovine Albuminserum (95 kDa), Ovalbumin (52 kDa), Carboanhydrase (37 kDa), Sojabohnen Trypsin Inhibitor (29kDa), Lysozyme (20 kDa), genutzt. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit *PstI* geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  (MBI Fermentas) als Größenstandard verwendet.

## 3 METHODEN

### 3.1 Pflanzenphysiologische Methoden

#### 3.1.1 Saatgut und Anzuchsbedingungen

Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ecotyp Col-0 wurden bei Lehle Seeds (Round Rock, USA) bezogen. Die T-DNA-Insertionslinien SALK\_024018, SALK\_109275 und SAIL#1377\_1225\_B03 wurden bei NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, Nottingham, UK) bzw. bei ABRC/SBI (*Arabidopsis Biological Resource Centre/Syngenta Biotechnology, Inc.*, Syngenta, North Carolina, USA) erworben. Es wurden Erbsen (*Pisum sativum* L.) der Sorte "Arvica" (Prag, Tschechien) verwendet.

Vor der Aussaat wurden *Arabidopsis* Samen mit 70% EtOH und 5% Hypochlorit oberflächensterilisiert. Um die Keimung zu synchronisieren, wurden alle Samen für drei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Aussaat erfolgte auf MS-Agarmedium (1% Saccharose; 0,215% MS; 0,05% MES; 0,3-0,5% Gelrite; pH5,8 mit KOH). Zur Selektion transformierter Pflanzen wurde dem MS-Agar entsprechendes Antibiotikum (30-50 µg/ml Hygromycin oder 100 µg/ml Kanamycin) zugegeben. Nach 2-3 Wochen wurden die *Arabidopsis* Pflänzchen zur weiteren Anzucht in Erde transferiert. Das Wachstum der Pflanzen unter normalen Bedingungen erfolgte in einem Zyklus von 16 h Licht bei 21°C und einer durchschnittlichen Lichtintensität von 60-100 µmol/m<sup>2</sup>s sowie von 8 h Dunkelheit bei 16°C.

#### 3.1.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen bzw. homozygoten *oep16.1-1*, *oep16.2-1* und *oep16.4-2* Mutanten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bechtold et al. (1993). Dafür wurde drei Tage vor der Transformation eine 10 ml Vorkultur der mit dem jeweiligen Konstrukt transformierten Agrobakterien unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika angesetzt und bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Tagen wurde eine 500 ml Hauptkultur mit 5 ml der jeweiligen Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Am Tag vor der geplanten Transformation wurden die zu transformierenden Pflanzen luftdicht abgedeckt, um eine maximale Öffnung der Stomata zu erreichen. Für die Transformation wurde die Übernachtskultur der transformierten Agrobakterien bei 6000 xg für 10 min pelletiert, in 400 ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose; 0,215% MS; 0,02% Tween 20) resuspendiert und in einen Exsikkator gestellt. Anschließend wurden jeweils vier der zu transformierenden Pflanzen kopfüber in das Infiltrationsmedium getaucht und unter Vakuum für etwa 5 min infiltriert. Danach wurden die Pflanzen horizontal auf ein feuchtes

Papiertuch ausgebreitet und wiederum luftdicht abgedeckt. Am nächsten Tag wurden die Reste des Infiltrationsmediums abgewaschen und die Pflanzen aufgerichtet. Die Selektion der T1-Samen der transformierten Pflanzen erfolgte auf MS-Agar unter Zugabe des jeweiligen Antibiotikums.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Medien und Anzucht

#### 3.2.1.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

In dieser Arbeit wurden die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  (Invitrogen), TOP10 (Invitrogen), JM109 (New England Biolabs), BL21(DE3) und BL21(DE3)lys (Stratagene/Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte standardmäßig bei 37°C unter Schütteln in LB-Flüssigmedium (1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl). Bei Kultivierung auf Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5% Agar zugesetzt. Je nach Resistenz der transformierten Plasmid-Vektoren wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 100  $\mu$ g/ml Spectinomycin) zugegeben. Die Blau/Weiß-Selektion bei Vektoren mit *lacZ $\alpha$* -Fragment zur Expression der  $\beta$ -Galactosidase (pCR2.1 und pCRblunt, Tabelle 3) erfolgte durch die Zugabe von 60  $\mu$ g/ml X-Gal (Sambrook et al., 1989). Für die Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986; erhalten von Dr. J. Meurer [Department Biologie 1, Botanik, Ludwig-Maximilians-Universität München]) eingesetzt. Die Anzucht der Agrobakterien wurde standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten durchgeführt. Dem Medium wurden folgende Antibiotika zugesetzt: 50  $\mu$ g/ml Kanamycin (Resistenz Stamm GV3101), 100  $\mu$ g/ml Rifampicin (Resistenz Ti-Plasmid), 100  $\mu$ g/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmid-Vektor).

#### 3.2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* (*Split Ubiquitin System*)

Für die Anzucht der Hefezellen und die Durchführung aller Protein Interaktions Untersuchungen im *Split Ubiquitin System* wurde der Dual Membrane Kit3 der Firma Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz) genutzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Dualsystems Biotech AG) und in Anlehnung an Johnsson und Varshavsky (1994).

Die Klonierung der Konstrukte (Tabelle 5), Transformation der Hefen und Auswertung der Versuche mittels des *Split Ubiquitin Systems* wurde von Karl Mayer (Technische Assistenz, Department Biologie 1, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

### 3.2.2 Transformation

#### 3.2.2.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan (1983). Die Bakterien wurden durch Hitzeschock zur Aufnahme der Plasmid-DNA veranlasst (Sambrook et al., 1989).

Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien wurde zunächst 10 ml Flüssigmedium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in 1 ml-Aliquots durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 xg und 4°C. Die Pellets wurden in 100 µl 4°C-kaltem CaCl<sub>2</sub> (10 mM) resuspendiert und anschließend für 5 min zentrifugiert (16000 xg, 4°C). Danach wurden die Pellets in 50 µl 4°C-kaltem CaCl<sub>2</sub> (10 mM) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation kompetenter Agrobakterien wurde zu 50 µl Zellen 0,5 µg Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für 5 min bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400 µl LB- oder 250 µl SOC Flüssigmedium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) wurde der Transformationsansatz für 2-4 h unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 sec bei 16000 xg. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgebracht und für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren wurden mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) generiert (Saiki et al., 1988). Die PCR-Ansätze wurden nach den Empfehlungen der Enzym-Hersteller durchgeführt. Es wurden folgende DNA-Polymerasen verwendet: BioTherm *Taq*-Polymerase (Diagonal) zur PCR-Genotypisierung und Triple Master *Taq*-Polymerase (Eppendorf), *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas) bzw. Phusion™-Polymerase (Finnzymes) zur Subklonierung von PCR-Fragmenten. BioTherm *Taq*-Polymerase (Diagonal), NEB *Taq*-Polymerase (New England Biolabs) und Advantage®2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories) wurden für inverse PCR und TAIL PCR verwendet.

### 3.3.2 Klonierungsstrategien

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, die Ligation von DNA, die Dephosphorylierung von DNA sowie die DNA-Gelelektrophorese erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) sowie den Angaben der Hersteller der Enzyme. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel-Extraktion Kit QIAEX<sup>®</sup> II von Qiagen (Hilden, Deutschland). Für die Durchführung der LR-Rekombination mit dem GATEWAY System (Invitrogen) wurde ebenso nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### 3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Zellen erfolgte durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 3-5 ml Übernachtskulturen in Anlehnung an das Protokoll von Zhou et al. (1990). Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden die „Nucleobond<sup>®</sup> AX“ Plasmid Purification Midi („AX 100“) und Maxi („AX 500“) Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.3.4 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Identifizierung und Genotypisierung von *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien wurden 2-3 Blätter mit 450 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 100 µg/ml RNase) in einer Kugelmühle („Tissue Lyser“, Retsch/Qiagen) für 3 min zerkleinert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde mit 300 µl Isopropanol präzipitiert und anschließend für 5 min inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (16000 xg, 4°C) wurde das Pellet in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8; 0,1 mM EDTA) resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (25 µl) wurden 3 µl DNA eingesetzt. Für die saubere Isolierung großer genomischer Fragmente wurden 200 mg Blätter in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 750 µl DNA-Extraktionspuffer (1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 0,1 M Tris-HCl, pH 8; 3% (w/v) CTAB) und 8 µl 10% DTT versetzt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 15 min bei 16000 xg und 4°C zentrifugiert. Die DNA in der oberen Phase wurde danach mit 1 Volumenanteil Isopropanol präzipitiert (Zentrifugation für 15 min bei 16000 xg und 4°C). Das Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 400 µl TE-Puffer, pH 8 aufgenommen. Restliche RNA wurde durch 100 µg/ml RNase für 30 min bei 37°C verdaut und es wurde erneut mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die DNA wurde mit 1/10 Volumenanteil 3 M NaOAc, pH 5,6 und 2,5 Volumenanteilen EtOH für 2 h bei -20°C präzipitiert und anschließend für 10 min (16000xg, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50-

100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8 resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (50 µl) wurden 1-2µl DNA verwendet.

### 3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Dafür wurde die Absorption einer verdünnten Probe bei 260 nm und 320 nm gemessen. Anschließend wurde die Konzentration in µg/µl nach folgenden Formeln berechnet:

$$\begin{array}{ll} \text{DNA:} & c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,05 \times f_{\text{verd}} \\ \text{RNA:} & c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,04 \times f_{\text{verd}} \end{array}$$

E bezeichnet die Absorption der Probe bei der angegebenen Wellenlänge,  $f_{\text{verd}}$  den Verdünnungsfaktor der Probe. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen festzustellen. Bei hochreinen Nukleinsäuren beträgt das Verhältnis  $E_{260}/E_{280}$  1,8.

### 3.3.6 PCR-Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien, OEP16 Komplementations- und Überexpressionslinien

#### 3.3.6.1 Genotypisierung

Die PCR-Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien *oep16.1-1*, *oep16.2-1* und *oep16.4-2* erfolgte wie in Philippar et al. (2007 suppl.) beschrieben. Alle dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Um die Insertion der T-DNA pROK2 in verschiedenen Nachkommen der SALK\_024018 Linie zu überprüfen wurde wie in Pudelski et al. (2009 suppl.) beschrieben vorgegangen. Alle Primer für die PCR-Genotypisierung und Segregationsanalysen der T-DNA Insertionen *oep16.1-1*, *arogp1-1* und *cml-1* sind ebenfalls in Tabelle 2 aufgeführt.

Um die T-DNA-Insertionslinien *oep16.1-1*, *oep16.2-1* und *oep16.4-2* zu komplementieren wurden homozygote Pflanzen dieser Linien stabil mit den genomischen Vollängensequenzen der entsprechenden Gene inklusive der Promotorregionen transformiert. Überprüft wurde die stabile Insertion in der T3 und T4 Generation mittels PCR-Analyse auf genomischer DNA der transgenen Pflanzenlinien mit den genspezifischen Oligonukleotid-Primern At2gN, OEP16.2GFPfw, OEP16.4GFPfw und einem Primer attB2 der an die attB Klonierungsstelle des binären Vektors bindet (Tabelle 2). Spezifische PCR-Produkte mit 1098 bp, 1252 bp und 959 bp zeigten die Komplementationskonstrukte an.

Die stabile Insertion der 35S::OEP16.1, 35S::OEP16.2 und 35S::OEP16.4 Konstrukte in OEP16-Überexpressionslinien wurde in der T3-Generation mittels PCR-Analyse auf genomischer DNA der transgenen Pflanzenlinien mit den genspezifischen Oligonukleotid-Primern OEP16.1GFP+stop rev, OEP16.2GFP+stop rev, OEP16.4GFP+stop rev und einem

Primer 35S::fw, der an den 35S::Promotor des binären Vektors bindet, überprüft (Tabelle 2). Nachkommen, bei denen das jeweilige 35S::OEP16-Konstrukt zumindest in einem Allel inserierte, konnten durch spezifische PCR-Produkte von 690 bp, 780 bp und 645 bp identifiziert werden.

### 3.3.6.2 *Inverse PCR*

Für die inverse PCR (Meurer et al. 1998) wurden 5 µg genomischer DNA mit 8 verschiedenen Enzymen verdaut: Hpy99I, NciI, BfaI, BanII, NspI, CviQI, BstYI and BsiHKAI (New England Biolabs). Anschließend an die Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die DNA Fragmente für 20 min mit NH<sub>4</sub>Ac/EtOH bei -20°C gefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Ligation der Fragmente mit T<sub>4</sub> Ligase erfolgte bei 16°C über Nacht. Anschließend wurden die DNA Fragmente ein zweites Mal mit Phenol/Chloroform gereinigt. Zwei T-DNA spezifische, geschachtelte Primer-Paare für die *Right Border* (RBkp1fw, rev, RBkp0fw, rev) und die *Left Border* (LBkp0.5fw, rev, LBkp0fw, rev, Tabelle 2) der pROK2 (Alonso et al., 2003) wurden für die Amplifikation mit dem Advantage® 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories) der unbekanntes *Arabidopsis* DNA an den T-DNA Rändern benutzt. Alle Produkte der inversen PCR wurden purifiziert und sequenziert.

### 3.3.6.3 *TAIL PCR*

Die *Thermal Asymmetric Interlaced* (TAIL) PCR wurde nach dem Protokoll von Liu et al. (2005) auf 1 µg genomischer DNA mit 9 degenerierten Zufallsprimern AD1-9 (Tabelle 2) durchgeführt. Jeder der AD-Primer wurde in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit geschachtelten, T-DNA spezifischen Primern LBT0a-c benützt (Tabelle 2; 1. PCR: AD1-9 und LBT0a; 2. PCR: AD1-9 und LBT0b; 3. PCR: AD1-9 und LBT0c). In der ersten PCR wurden zunächst fünf Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 60°C durchlaufen, gefolgt von einem Zyklus bei 25°C und 16 Zyklen von jeweils 2 mal 60°C und 1 mal 44°C Primerannealing. Die zweite PCR wurde mit 13 Zyklen von jeweils 2 mal 62°C und 1 mal 44°C durchgeführt, während in der dritten PCR 31 Zyklen mit 54°C Primer-Annealing-Temperatur durchlaufen wurden. Alle TAIL PCR-Reaktionen wurden bei jedem Zyklus von einer Taq-Polymerase (New England Biolabs) für 2,5 min bei 68°C katalysiert. Alle geschachtelten PCR Produkte, die in der zweiten und dritten TAIL PCR Reaktion amplifiziert wurden, konnten aufgereinigt und sequenziert werden.

### 3.3.6.4 *RACE PCR*

Um Antikörper gegen OEP16.2 aus *Pisum sativum* zu generieren wurden zuerst zwei Paare degenerierte Oligonukleotid-Primer (Ps-OEP16.2fw a und b, Ps-OEP16.2rev a und b (Tabelle

2), auf stark konservierten Regionen der Sequenz von OEP16.2 aus *Medicago truncatula* (Drea et al. 2006) entworfen, welche an die *Codon Usage* von Erbse angepasst wurden. Anschließend wurde das entsprechende Fragment auf einer cDNA aus Erbsen mittels PCR amplifiziert (Abbildung 3) das eine hohe Ähnlichkeit zu At-OEP16.2 aufwies. Daher wurden anhand dieses Stücks zwei genspezifische Oligonukleotid-Primer (Ps-OEP16.2(RACE)fw und rev, Tabelle 2) für eine folgende Isolierung der 5'- und 3'-Bereiche der Ps-OEP16.2 cDNA über RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) konstruiert. Für die PCR wurde der Smart-RACE-cDNA-Amplification Kit (Clontech) benutzt. Es wurde nach Herstellerangaben, basierend auf Sambrook und Russell (2001) vorgegangen. Die benötigten, degenerierten Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 2 zu finden. Die in den PCRs amplifizierten DNA Fragmente wurden aufgereinigt und sequenziert. Der Translationsstart von Ps-OEP16.2 konnte aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu *Medicago truncatula* (86%) trotz eines langen 5' Endes des offenen Leserasters festgelegt werden.

### 3.3.7 Sequenzierung von DNA

Alle klonierten Konstrukte und Produkte der PCR-Genotypisierung wurden zur Überprüfung sequenziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde vom Sequenzierservice des Departments Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

### 3.3.8 RNA-Präparation aus *Arabidopsis thaliana*

Für jeden Gewebetyp wurden drei Proben von jeweils zehn (für mature Pflanzen) bis 500 (für Keimlinge) Einzelpflanzen geerntet, um die biologische Variation zu minimieren. Das Pflanzengewebe wurde nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die Isolierung von RNA aus den entsprechenden Pflanzengeweben erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Es wurde ein DNA-Verdau auf der Säule mit RNase-freier DNase I (Qiagen) durchgeführt.

### 3.3.9 Reverse Transkription

RNA wurde mit der Reversen Transkriptase (MMLV, Promega) in einem Volumen von 10 µl unter Verwendung von 0,5-1,0 µg RNA, 4 µM oligo-dT-Primer, 0,5 mM dNTP in cDNA umgeschrieben (Clausen et al. 2004). Der Ansatz wurde für 2 min bei 70°C inkubiert, anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die Reaktion erfolgte nach der Zugabe von 2 Units reverser Transkriptase für 1,5 h bei 42°C.

### 3.3.10 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Um die Transkriptionsstärke zu erfassen wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben mit dem RNeasy Plant Mini Extraktionskit mit anschließendem DNase Verdau (Qiagen) isoliert. Für die Überprüfung der Einzel- und Doppelmutantenlinien *oepl6.1-1*, *oepl6.2-1*, *oepl6.1.1/oepl6.4-2* und der Wildtyplinie Col-0 wurde die RNA aus 8 Tage alten, unter Normalbedingungen gewachsenen Keimlingen isoliert (Philippar et al. 2007, suppl.). Zur Überprüfung aller Doppelmutantenlinien *oepl6.1-1/oepl6.2-1*, *oepl6.1-1/oepl6.4-2*, *oepl6.2-1/oepl6.4-2*, der Triple-Mutantenline *oepl6.1-1/oepl6.2-1/oepl6.4-2* und der korrespondierenden Wildtyplinie wurde RNA aus Schoten mit noch grünen, nicht vollständig ausgereiften Samen von unter Normalbedingungen gewachsenen Mutterpflanzen isoliert. Zur Überprüfung der Expression von OEP16.1, PORA und PORB in etiolierten Kotyledonen verschiedener SALK\_024018 Nachkommen und einer Col-0 Wildtypkontrolle wurde RNA aus 300 etiolierten 7-Tage alten Keimlingen isoliert.

Die cDNA wurde in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt. Die PCR wurde mit dem „FastStart DNA Master SYBR-Green Plus“ Kit von Roche nach Herstellerangaben angesetzt, in Glaskapillaren (Roche) überführt und in einem LightCycler (Roche) durchgeführt. Es wurden 45 Zyklen durchlaufen, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 sec bei 95°C (Denaturierung), 7 sec bei 49°C (Annealing), 19 sec bei 72°C (Elongation) und 5 sec bei 79°C (Detektion) (Philippar et al. 2004). Das durch die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für *OEP16.1* (OEP16.1LCfw, rev), *OEP16.2* (OEP16.2LCfw, rev), *OEP16.4* (OEP16.4LCfw, rev), *PORA* (PORA-LCfw, rev), and *PORB* (PORB-LCfw, rev) (Tabelle 2) amplifizierte Produkt umfasste ein Intronbereich des Gens, um eine Amplifikation durch Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Zur Quantifizierung der Daten wurden die genspezifischen Signale auf die in den Proben enthaltene Ausgangsmenge an Aktin bezogen. Hierfür wurden in jede PCR mit genspezifischen Oligonukleotid-Primern zusätzlich Fragmente der Aktine AtAct2 (At3g18780) und AtAct8 (At1g49240) amplifiziert. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer untersuchten Probe konnte daher anhand folgender Beziehung berechnet werden:

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

wobei n die Anzahl der Zyklen bezeichnet, bei der die Menge des jeweiligen Amplifikats einen festgelegten Schwellenwert überstieg. Dieser Schwellenwert war identisch für das genspezifische und das Aktinsignal und wurde in jeder PCR so bestimmt, dass die Messpunkte innerhalb der exponentiellen Phase der PCR lagen. Der Transkriptgehalt wurde jeweils in mindestens drei biologischen Wiederholungen bestimmt.

### 3.3.11 Microarray-Analyse

Zur Überprüfung der Transkriptlevel von OEP16.1, AroGP1 und CM1 in verschiedenen SALK\_024018 Linien wurden Microarray-Analysen (Affymetrix ATH1 Genechip) durchgeführt. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten wurden Keimlinge bei einem Tag-/Nachtzyklus mit einer Photonenfluss Dichte von  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  während des Tages angezogen. Bei allen getesteten Linien lagen Keimungsraten und ein Wachstum von 95% vor.

Für die Microarray-Analyse wurde Gesamt-RNA aus 20 individuellen, 8 Tage alten Keimlingen mit dem RNeasy Plant Mini Extraktionskit (Qiagen) isoliert, prozessiert und auf Affymetrix „GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Arrays“ unter Verwendung des Affymetrix „One-Cycle Labeling and Control“ (Target) Kits nach Herstellerangaben (Affymetrix UK, High Wycombe, UK) hybridisiert. Es wurden je drei Proben für jede Linie ( $n=3$ ) im Abstand von einer Woche ausgesät und geerntet um die biologische Variabilität einzuschränken. Die Signal-Daten wurden mittels Affymetrix „Data Mining Tool“ und „GeneChip Operating Software“ (Clausen et al., 2004) ausgewertet. Die statistische Signifikanz der Signal-Differenzen wurde mit Hilfe der SAM Software (Tusher et al. 2001) wie in Pudelski et al. (2009) beschrieben, ermittelt. Die Isolation der RNA, sowie die Hybridisierung der Microarrays wurden von D. Eder und J. Neumann durchgeführt. Die Evaluierung und Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. U. Oster und Dr. K. Philipp (alle Department Biologie 1, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München).

### 3.3.12 GUS Färbung

Zum Nachweis der Transkription *in vivo* waren bereits transgene *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen, die stabil mit mehreren Promotor-Reportergen Konstrukten transformiert wurden, in dieser Arbeitsgruppe vorhanden. Dabei wurde zur Überprüfung der Promotoraktivität an den endogenen Promoter von OEP16.1, OEP16.2 und OEP16.4, die kodierende Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) aus *E. coli* fusioniert (Dissertation Iryna Ilkavets, 2005). Gewebe verschiedener, bereits vorhandener, stabiler Linien mit *At-OEP16.1p::GUS*, *At-OEP16.2p::GUS* und *At-OEP16.4p::GUS* Konstrukten wurden zum Nachweis der GUS- und damit der Promoter-Aktivität basierend auf Jefferson et al. (1987) zuerst mit Fixierlösung (0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0, 2% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd) fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Phosphatpuffer (0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) wurden die Gewebe mit X-Gluc-Lösung (0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0, 0,1% Triton X-100, 0,5 mM K-Ferricyanid, 0,5 mM K-Ferrocyanid, 10 mM EDTA, 1 mM 5-Brom-4-

Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glukuronsäure (X-Gluc)) gefärbt und fotografiert. Die Stärke der Färbung ist dabei ein Indikator für die Promotoraktivität des jeweiligen endogenen Promotors.

### **3.4 Biochemische Methoden**

#### **3.4.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana* Samen und Blattgeweben**

Für die Extraktion von Proteinen aus Samen wurden ca. 50 mg Samen in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver in 600-1000  $\mu$ l sterilisiertem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und unter mehrfachen Mischen 5 min inkubiert. 200  $\mu$ l der Lösung wurden mit 4 Volumenanteilen Methanol (99,9%), 1 Volumenanteil Chloroform (99,9%) und 3 Volumenanteilen sterilisiertem ddH<sub>2</sub>O versetzt und unter mehrfachen Invertieren 10 min inkubiert, bis eine klare Phasentrennung sichtbar wurde. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13500 rpm und 4°C wurden die Proteine an der Interphase akkumuliert. Nach der Entfernung der wässrigen Phase wurden die Proteine in weiteren 3 Volumenanteilen Methanol aufgenommen, wiederholt gemischt und durch Zentrifugation für 5 min bei 13500 rpm und 4°C pelletiert. Nach vollständiger Trocknung konnten die Proteine in Solubilisationspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% Glycerin; 9% SDS; 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 Spatelspitze Bromphenolblau) oder Proteinextraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 50 mM EDTA; 2% LDS; 10 mM DTT; 0,1 mM PMSF) resuspendiert werden.

Für die Extraktion von Proteinen aus Blattgeweben wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 1 Volumenanteil Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 50 mM EDTA; 2% LDS; 10 mM DTT; 0,1 mM PMSF) versetzt und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 16000 xg und 4°C sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) oder Bradford (Bradford, 1976).

#### **3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

##### **3.4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in denaturierenden Gelen nach Laemmli (1970) mit Acrylamid-Konzentrationen (Verhältnis Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid 30:0,8) von 12,5-15% im Trenngel. Für das Sammelgel wurde 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 und für das Trenngel 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 3-5 min bei 95°C in Solubilisierungspuffer (Kapitel 3.4.1) denaturiert.

Für eine bessere Auftrennung der Proteine wurden zusätzlich Gele nach Schägger und von Jagow (1987) benutzt. Dabei wurden für Trenn- und Sammelgel 3 M Tris-HCl, pH 8,45 und 0,3% SDS verwendet. Es wurden zusätzlich entweder 4 M Harnstoff in beide Gele oder 13%

Glycerin in das Trenngel zugegeben. Die Probenbehandlung erfolgte wie bereits beschrieben. Für die Auftrennung der Proteine im glycerinhaltigen Trenngel wurde ein Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9) sowie ein Kathodenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 8,25, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS) benötigt.

### **3.4.2.2 Coomassie-Blaufärbung**

Die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Gel 15 min mit Coomassie-Färbelösung (50% MeOH; 7% HAc; 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit Entfärbelösung (40% MeOH; 7% HAc; 3% Glycerin). Anschließend wurden die Gele gewässert und unter Vakuum getrocknet.

### **3.4.3 Immunodetektion von Proteinen**

#### **3.4.3.1 Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)**

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry-Blot“-Apparatur (Amersham Biosciences) auf Nitrozellulose-Membranen (PROTRAN BA83, 0,2  $\mu\text{m}$ , Whatman/Schleicher & Schüll) oder auf PVDF-Membranen (Zefa Transfermembran Immobilon-P, 0,45  $\mu\text{m}$ , Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland) nach Kyhse-Andersen (1984) transferiert. Ausgehend von der Kathode wurde auf sechs in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM Aminocaprinsäure; 20% MeOH; pH 7,6) getränkte Filterpapiere (0,2 mm) zunächst das in Anodenpuffer 2 (30 mM Tris; 20% MeOH; pH 10,4) inkubierte Gel und dann die ebenfalls in Anodenpuffer 2 inkubierte Membran gelegt. Die PVDF Membran wurde für kurze Zeit zuerst in 95% MeOH aktiviert und anschließend ebenfalls in Anodenpuffer 2 inkubiert. Darauf wurden drei in Anodenpuffer 2 sowie sechs in Anodenpuffer 1 (300 mM Tris; 20% MeOH; pH 10,4) getränkte Filterpapiere gelegt, gefolgt von der Anode. Die Dauer des Transfers betrug etwa 1,5 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S (0,5% Ponceau S; 1% HAc) gefärbt und die Proteine des Größenstandards markiert oder die Größenstandards wurden abgetrennt und die Proteine mit Amidoschwarz (0,1% in  $\text{ddH}_2\text{O}$ , Moser/Roth) gefärbt.

#### **3.4.3.2 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper**

Die spezifische Antigenidentifizierung erfolgte durch Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern und anschließender Detektion mittels eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpers (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG (AP-Färbung) und Meerrettich Peroxidase (ECL-Färbung) ebenfalls gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG). Die

Membran wurde dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer abgesättigt und zusammen mit dem Antiserum in einer Verdünnung, abhängig vom Antikörper, von 1:200 bis 1:2000 in TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Tween 20; 0,1% BSA; 150 mM NaCl) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:30000 in TTBS bzw. 1:8000 in TTBS) für 1 h inkubiert.

Ungebundene Phosphatase-Konjugat-Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 10 min in Magermilch-Puffer entfernt. Nach zweimaligem Waschen für 1 min in H<sub>2</sub>O wurde die Färbereaktion durch die Zugabe der Färbelösung (100mM Tris-HCl, pH9,5; 100mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>) mit 66µl/10ml NBT (4-Nitrotetrazoliumchloridblau, 50mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 133µl/10ml BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, 12,5mg/ml in 100% Dimethylformamid) gestartet. Die Farbentwicklung wurde durch das Waschen in H<sub>2</sub>O mit 50mM EDTA gestoppt.

Für die *enhanced chemoluminescent* (ECL) Methode zur Proteindetektion wurde statt der Färbelösung entweder der Pierce ECL Western Blotting Substrat Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) nach Herstellerangaben verwendet oder es wurde folgendermaßen vorgegangen: Lösung 1 (100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1% (w/v) Luminol, 0.44% (w/v) Coomarsäure) wurde in einem 1:1 Verhältnis mit Lösung 2 (100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.018% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gemischt und auf die Membran aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 s bis 30 min wurde die Lumineszenz mittels Film (Kodak Biomax MR; PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) detektiert.

### 3.4.3.3 Antiseren

Durch eine RACE PCR konnte die kodierende Sequenz von Ps-OEP16.2 aus Erbse isoliert und anschließend in einen Plasmidvektor pET21a (Novagen/Merck) subkloniert werden. Das so generierte Plasmid Ps-OEP16.2/pET21a wurde für die Proteinüberexpression nach der Transformation in *E.coli* BL21(DE3) (Novagen) Zellen benützt. Schnell wachsenden Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit 1 mM Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranoside für 3 h bei 37°C induziert. Anschließend wurden die pelletierten Zellen in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% [w/v] Saccharose, 1 mM EDTA, 100 mg/mL DNase) resuspendiert und 3-mal für 30 s sonifiziert. Die *Inclusionbodies* wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C, 20.000 xg abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Puffer A (50 mM NaPP, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 8 M Urea) resuspendiert und erneut sonifiziert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (4°C, 20.000xg, 30 min) pelletiert. Der größte Teil des überexprimierten Ps-OEP16.2 Proteins war im harnstofflöslichen Überstand

(Ü3) zu finden. Die Proteine wurden kovalent mittels des 6-fach-Histidin Tags an eine NiNTA-Säule (Qiagen) gebunden. Nach Reinigung der Säule mit Puffer A konnte das saubere, konzentrierte Protein mit einer steigenden Imidazolkonzentration von 20-100 mM gelöst werden. Die primären Antikörper gegen dieses heterolog in *E. coli* überexprimierte und aufgereinigte Ps-OEP16.2 Protein aus Erbse wurde anschließend in Kaninchen erzeugt (Pineda, Berlin, Deutschland).

**Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper**

Antikörper	Verdünnung in TTBS	Puffer
Ps-OEP16.1	1:1000	5% Magermilch, 0,12% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Ps-OEP16.2	1:500/1:1000	5% Magermilch, 0,12% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Ps-VDAC	1:500	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Ps-TIC62	1:1000	2% Magermilch, 0,06% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Ps-TOC34	1:1000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-OEP16.1	1:250d	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-OEP16.2	1:200	2% Magermilch, 0,06% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-OEP16.4	1:250	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-OEP37	1:300	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-LSU	1:1000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-PORB	1:2000	2% Magermilch, 0,06% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-NDPK	1:500	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-Lhcb1	1:1000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-TIC110	1:1000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl

#### 3.4.3.4 Proteinidentifikation durch Massenspektroskopie (MS)

Coomassie gefärbte Proteinbanden wurden aus SDS-PAGE Gelen ausgeschnitten und zur Identifikation ans “Zentrallabor für Proteinanalytik” (ZfP, Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) geschickt. Dort wurden durch Trypsinverdau entstandene Peptide entweder mit Peptidmassen Fingerabdruck (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) oder LC-MS/MS (*Liquid Chromatography with MS*) Läufe detektiert. Die Protein Identifizierung erfolgte anschließend mittels einer Datenbanksuche, unter Verwendung der Mascot Software (Perkins et al. 1999).

#### 3.4.3.5 Isolierung von Hüllmembranen aus Arabidopsis- und Erbsenchloroplasten

Die Isolierung von *Arabidopsis* Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kunst (1998). Zu Beginn wurden vier kontinuierliche Percoll-Gradienten gegossen. Pro Gradient wurden 15 ml Percoll und 15 ml 2x Puffer B (600 mM Sorbitol; 40 mM Tricine/KOH, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM EDTA) gemischt und anschließend bei 12000 rpm für 20 min zentrifugiert (JA 20, Beckman Coulter). Danach wurde zunächst die Hälfte von 150-200 g Blättern vier Wochen alter Pflanzen in 1400 ml Puffer A (450 mM Sorbitol; 20 mM Tricine/KOH, pH 8,4; 10 mM EDTA; 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,1% BSA) in einem Küchenmixer von Braun homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch eine Lage Gaze gefiltert. Die restlichen Blätter wurden zusammen mit dem bereits zerkleinerten Pflanzenmaterial nochmals mit

1400ml Puffer A homogenisiert. Danach wurde das Filtrat auf sechs 500 ml-Becher aufgeteilt und für 5 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert (JA 10, Beckman Coulter). Die Pellets wurden vorsichtig mit einem Pinsel in 20 ml 1x Puffer B (300 mM Sorbitol; 20 mM Tricine/KOH, pH 7,6; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM EDTA) resuspendiert und auf die vorbereiteten Percoll-Gradienten geschichtet. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 7200 rpm und 4°C im Ausschwing-Rotor (HB 6, Sorvall) ohne Bremse wurde zunächst die obere dunkelgrüne Bande abgesaugt, bevor die untere grüne Bande abgenommen wurde. Die intakten Chloroplasten wurden in 1x Puffer B gewaschen und bei 3000 rpm für 5 min im Ausschwing-Rotor mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die Chloroplasten osmotisch in 4 ml TE-Puffer lysiert und basierend auf Li et al. (1991) fraktioniert. Je 2 ml Chloroplasten-Suspension wurde auf einen Saccharose-Stufengradienten (1,2 M, 1,0 M und 0,46 M Saccharose in TE-Puffer) geschichtet und für 2 h bei 18000 rpm bei 4°C im Ausschwing-Rotor (TST41.14, Kontron) zentrifugiert. Die gemischten Hüllmembranen wurden an der Grenzschicht zwischen 0,46 M und 1,0 M Saccharose abgenommen, mit TE-Puffer aufgefüllt und nochmals für 1 h bei 18000 rpm und 4°C im Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in möglichst wenig TE-Puffer (ca. 100 µl) aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Isolierung von getrennten äußeren und inneren Hüllmembranen aus intakten Chloroplasten von Erbse erfolgte standardmäßig nach der Methode von Waegemann et al. (1992). Als Ausgangsmaterial dienten ca. zehn Tage alte Erbsen, die im Gewächshaus auf Sand kultiviert wurden.

### **3.5 Mikroskopie**

#### **3.5.1 Lichtmikroskopie**

Zur Untersuchung der Samenentwicklung wurden Samen aller Entwicklungsstufen (Abbildung 24) aus Schoten von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen und *oep16.2-1* Mutantpflanzen entnommen. Die Mutterpflanzen wurden dazu zeitgleich unter Standardbedingungen (Langtag, 16h Licht 21°C, 8h Dunkel 16°C) angezogen. Direkt im Anschluss an die Entnahme wurden die Samen mit Hoyers-Lösung (Liu und Meinke 1998) entfärbt. Nach einer Inkubationszeit in Abhängigkeit vom Reifegrad der Samen wurden sie unter einem Stereomikroskop, Stemi 2000-C (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einem Lichtmikroskop, Leica DM 1000, (Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht und fotografiert.

#### **3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Untersuchung des De-Etiolierungs-Phänotyps, wurden Keimlinge für 2,5 Tage in Dunkelheit und anschließend 3 Tage in weißem Dauerlicht (350 µmol/m<sup>2</sup>) auf Platten mit

0,3% Gelrite (Serva, Deutschland) und 0,5% MS-Salze, pH 5,8 kultiviert. Die spezifische Fluoreszenz für Protochlorophyllid wurde im Dunkeln mit einem SteREO Lumar.V12 Mikroskop (Zeiss) mit Hilfe eines Lumar 05 Filters (Exikation: 395-440 nm, Emission: 470-750 nm) untersucht und erfasst.

### 3.6 Computer-Analysen

Folgende Programme und Datenbanken wurden in dieser Arbeit verwendet:

**Tabelle 8: Verwendete Programme und Datenbanken:**

Name	Referenz/Lizenz	Internet-Adresse
<b>Für den Sequenzvergleich wurden folgende Datenbanken bzw. Programme verwendet:</b>		
BLAST (Datenbank GenBank)	Altschul et al., 1998	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
ClustalX	Thompson et al., 1997	
Genedoc	Nicholas und Nicholas 1997	<a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc">http://www.psc.edu/biomed/genedoc</a>
Chromaslite	Technelysium Pty Ltd.	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html">http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html</a>
Vector NTI	Invitrogen	
ExpASy	Gasteiger et al., 2003	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
<b>Die Analyse der subzellulären Lokalisation erfolgte mit folgenden Datenbanken bzw. Programmen:</b>		
ARAMEMNON version 3.2	Schwacke et al., 2003	<a href="http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de">http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de</a>
Leica LA SAFLite	Leica Microsystems CMS GmbH (Wetzlar, Deutschland)	<a href="http://www.acronis.de">http://www.acronis.de</a>
<b>Zur Expressionsanalyse wurden folgende Datenbanken verwendet:</b>		
NASC Arrays		<a href="http://affymetrix.Arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl">http://affymetrix.Arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl</a>
Microarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums	Schmid et al., 2005	<a href="http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi">http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi</a>
TAIR (The Arabidopsis Information Resource)	Swarbreck et al., 2008	<a href="http://www.arabidopsis.org">http://www.arabidopsis.org</a>
<b>Zur Quantifizierung von Signalstärken auf Immunoblots wurde folgendes Programm verwendet:</b>		
AIDA Image Data Analyzer version V.3.25.001	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, Deutschland)	<a href="http://www.raytest.de">http://www.raytest.de</a>

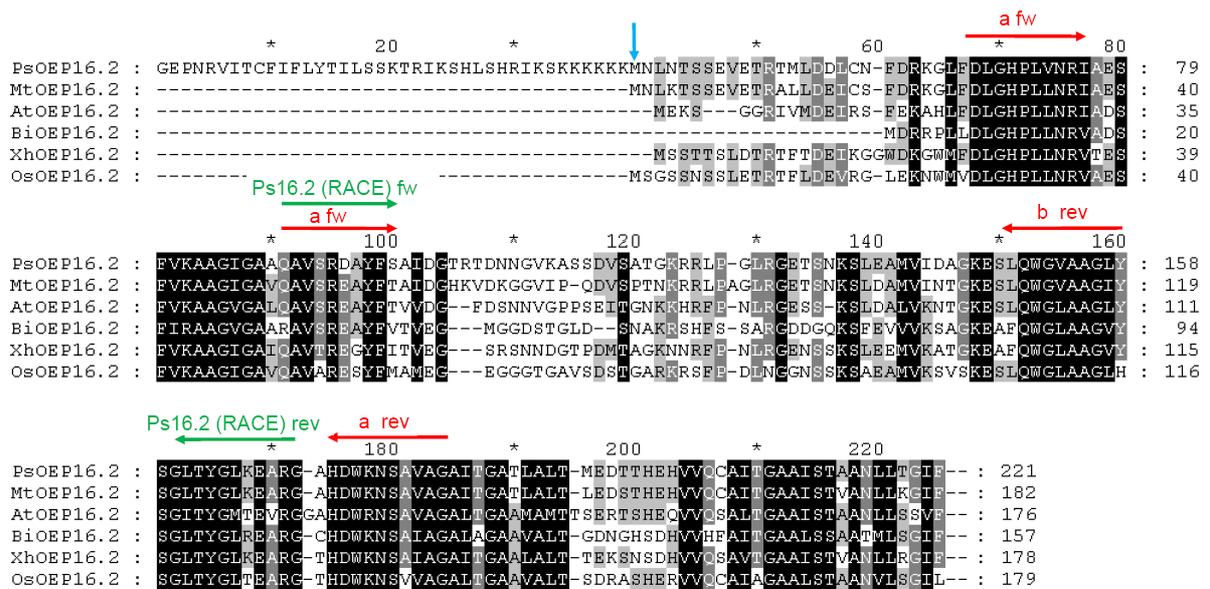
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Die Proteine der OEP16 Familie in *Arabidopsis* und Erbse

In *Arabidopsis thaliana* existieren mit At-OEP16.1, At-OEP16.2 und At-OEP16.4 drei OEP16 Isoformen. Ein weiteres Protein, At-OEP16.3 war längere Zeit irrtümlich dieser Unterfamilie zugeordnet (Reinbothe et al. 2004b, Drea et al. 2006). Es wurde allerdings in Mitochondrien lokalisiert und bildet nach phylogenetischen Analysen eine eigene PRAT Unterform (Abbildung 1), die im Folgenden als PRAT3 bezeichnet wird (Philippar et al. 2007, Murcha et al. 2007, Pudelski et al. 2010). In Erbse (*Pisum sativum*) war bis zu Beginn dieser Arbeit nur die Isoform Ps-OEP16.1 bekannt (Pohlmeyer et al. 1997, Linke et al. 2004, Drea et al. 2006).

#### 4.1.1 Isolierung von OEP16.2 aus Erbse

OEP16.1 wurde ursprünglich aus der äußeren Hüllmembran von Erbsen-Chloroplasten isoliert (Pohlmeyer et al. 1997). Für OEP16.2 lag zu Beginn dieser Arbeit keine Sequenzinformation aus Erbse vor. Deshalb sollte geklärt werden, ob in *Pisum sativum* ein OEP16.2 Protein existiert. Es wurden daher zuerst zwei Paare degenerierter Oligonukleotidprimer auf stark konservierten Regionen der Sequenz von OEP16.2 aus *Medicago truncatula* (Drea et al. 2006) entworfen, um, angepasst an die *Codon Usage* von Erbse, ein Fragment auf einer cDNA aus Erbsen mittels PCR zu amplifizieren (Abbildung 3). Das amplifizierte Fragment wies eine hohe Ähnlichkeit zu At-OEP16.2 auf, daher wurden anhand dieses Stücks zwei genspezifische Oligonukleotidprimer für eine folgende Isolierung der 5'- und 3'-Bereiche der Ps-OEP16.2 cDNA über RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) konstruiert. Hierdurch konnte die gesamte kodierende Sequenz von OEP16.2 aus Erbse isoliert werden (Abbildung 3).

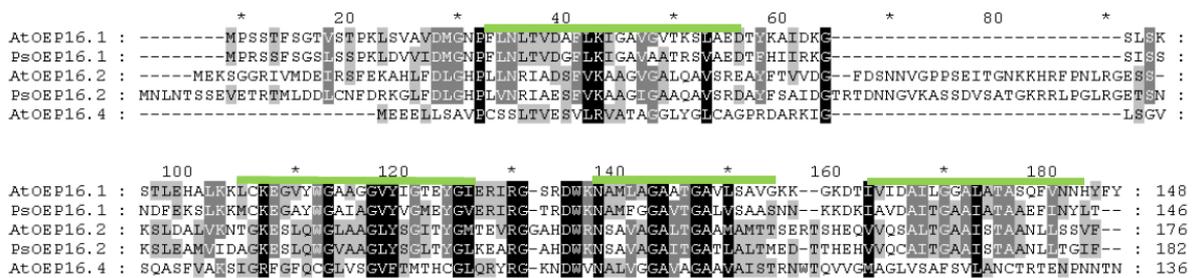


**Abbildung 3: Aminosäuresequenz von OEP16.2 aus Erbse.**

Die roten Pfeile markieren die Positionen der degenerierten Oligonukleotidprimer die konstruiert wurden um ein cDNA Fragment von Ps-OEP16.2 zu amplifizieren; die grünen Pfeile zeigen die Lage der spezifischen Primer, die für die RACE-PCR konstruiert wurden (Sequenzen siehe Tabelle 2). Der blaue Pfeil markiert den Translationsstart der kodierenden Sequenz von Ps-OEP16.2. Ps: *Pisum sativum* (Erbse), Mt: *Medicago truncatula* (Schneckenklee), At: *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), Bi: *Bromus inermis* (wehrlöse Trespe), Xh: *Xerophyta humilis* (Wiederauferstehungspflanze). Sequenzen aus Drea et al. (2006) und der Datenbank GenBank.

Obwohl das offene Leseraster der Ps-OEP16.2 cDNA über ein recht langes 5'-Ende verfügte, konnte aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu den Proteinen aus anderen Pflanzen (z.B. 86% Sequenzidentität zu OEP16.2 aus *Medicago truncatula*) der Translationsstart von Ps-OEP16.2 festgelegt werden (Abbildung 3).

Abbildung 4 zeigt die Aminosäuresequenzen aller OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* und Erbse. Durch Circular dichroismus-Analysen konnte die Sekundärstruktur von OEP16.1 aus Erbse ermittelt werden (Linke et al. 2004). Hier zeigte sich eine für OEPs ungewöhnliche Topologie von vier Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices (Abbildung 4). Anhand dieser Daten und phylogenetischen Analysen (Murcha et al. 2007) wurde die Sekundärstruktur aller OEP16 Isoformen angepasst.



**Abbildung 4: Aminosäuresequenzen und Topologie aller OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* und *Erbse*.**

Die grünen Regionen markieren die vier Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices, welche charakteristisch für OEP16 sind (Linke et al. 2004, Murcha et al. 2007).

Für die OEP16-Isoformen sind, wie für alle PRAT-Proteine, keine klassischen, abspaltbaren, plastidären Signalpeptide bekannt. Ps-OEP16.2 und At-OEP16.2 haben eine Sequenzidentität von 58%, wobei Ps-OEP16.2 vor allem im Amino-terminalen Bereich um insgesamt acht Aminosäuren länger ist. Trotz einer Sequenzähnlichkeit von 42% zwischen den Isoformen OEP16.1 und OEP16.2 (Tabelle 9) gibt es einen auffälligen Unterschied. OEP16.2 hat sowohl in *Arabidopsis* als auch in *Erbse* eine deutlich längere Peptidschleife zwischen der ersten und zweiten  $\alpha$ -Helix als OEP16.1 und OEP16.4. At-OEP16.4 ist die kürzeste Isoform und hat nur eine Sequenzähnlichkeit von 34% zu At-OEP16.1 bzw. von 30% zu At-OEP16.2 (Tabelle 9). Die Polypeptidkette von At-OEP16.4 beginnt erst kurz vor der ersten  $\alpha$ -Helix, hat nur sehr kurze Peptidschleifen zwischen den Helices und endet, wie alle OEP16 Isoformen, direkt nach der vierten  $\alpha$ -Helix. Eine OEP16.4-Isoform aus *Erbse* konnte bisher nicht isoliert werden. PCR Experimente mit Primern auf Basis der At-OEP16.4 Sequenz zeigten keine positiven Ergebnisse.

**Tabelle 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen von OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* und *Pisum sativum*.**

Angaben der identischen (I) und ähnlichen (Ä) Aminosäuren in Prozent.

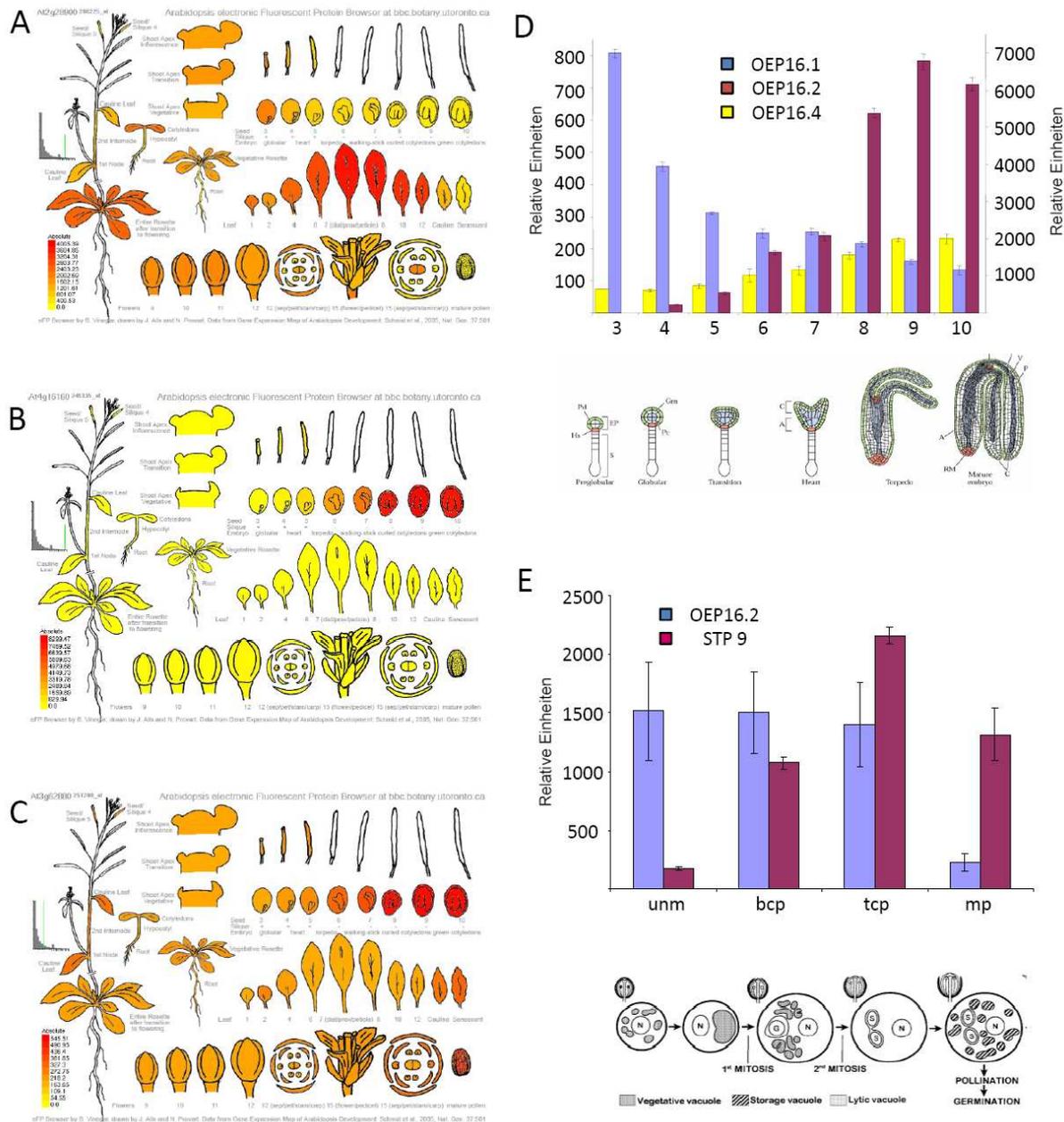
		At-OEP16.1	Ps-OEP16.1	At-OEP16.2	Ps-OEP16.2	At-OEP16.4
<b>At-OEP16.1</b>	I		62	23	23	20
	Ä		78	45	42	34
<b>Ps-OEP16.1</b>	I			24	24	20
	Ä			45	42	36
<b>At-OEP16.2</b>	I				58	15
	Ä				78	30
<b>Ps-OEP16.2</b>	I					12
	Ä					28

## 4.2 Lokalisation der OEP16 Proteine in der Pflanze

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war sowohl die genaue subzelluläre als auch die gewebespezifische Lokalisation der OEP16 Isoformen.

### 4.2.1 Expression aller OEP16 Isoformen auf RNA Ebene

Um einen Überblick über das Expressionsmuster von OEP16 in verschiedenen Pflanzengeweben zu erhalten, wurden *Arabidopsis* Microarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al. 2005) herangezogen (Abbildung 5).

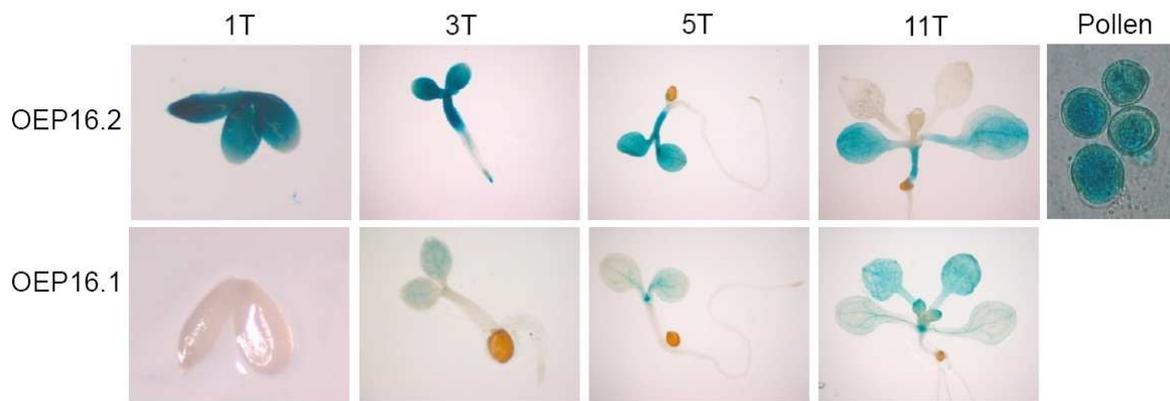


Cartoon). Die Stadien 1-3 wurden jeweils mit Schotengewebe isoliert, die Stadien 4-10 beziehen sich auf reines Samengewebe.

**(E)** Expression von OEP16.2 während der Pollenreifung (Honys und Twell, 2003). unm: unizellulärer; bcp: bizellulärer; tcp: trizellulärer; m: maturer Pollen (vgl. Cartoon). STP: Pollen-spezifisch exprimierter Zuckertransporter (Schneidereit et al., 2003).

*At-OEP16.1* wird vor allem im grünen, adulten Blattgewebe, schwach in der Wurzel und in den ersten Stadien der Samenentwicklung transkribiert. Im Gegensatz dazu ist die höchste und ausschließliche Expression von *At-OEP16.2* in den maturen Samenanlagen und in sich entwickelnden Pollenkörnern zu finden. In maturen Pollen konnten Honys und Twell (2003) kaum noch Transkript nachweisen. In den ersten Entwicklungsstadien (Abbildung 5) ist in Samen mit Schoten noch keine mRNA von *At-OEP16.2* messbar. Während der Entwicklung der Samen steigt diese sprunghaft auf einen maximalen Wert von ca. 8000 (relative Einheiten) an. Dies entspricht dem Doppelten des höchsten Transkriptlevels von OEP16.1 in den adulten Blättern (4000, relative Einheiten) und damit einem sehr hohen mRNA Gehalt für *At-OEP16.2*. Einen generell geringen Transkriptlevel zeigt *At-OEP16.4*. Der höchste Wert von 550 relativen Einheiten wurde ähnlich wie bei *At-OEP16.2* in den maturen Samen festgestellt. *OEP16.4* wird nach diesen Daten schwach, jedoch konstant während des gesamten Lebenszyklus von *Arabidopsis* exprimiert (Abbildung 5).

Um diese Daten zu verifizieren wurden *Arabidopsis* Wildtyppflanzen stabil mit mehreren Promoter-Reportergen Konstrukten transformiert. Dabei wurde zur Überprüfung der Promotoraktivität an den endogenen Promoter des betreffenden *OEP16* Gens, die kodierende Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) aus *Escherichia coli* fusioniert (Dissertation Iryna Ilkavets, 2005). Gewebe verschiedener, stabiler Linien mit *At-OEP16.1p::GUS*, *At-OEP16.2p::GUS* und *At-OEP16.4p::GUS* Konstrukten wurden zum Nachweis der GUS- und damit der Promoter-Aktivität mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glukuronsäure (X-Gluc) gefärbt und fotografiert.



**Abbildung 6: Färbung von *At-OEP16.1p::GUS* und *At-OEP16.2p::GUS* Linien.**

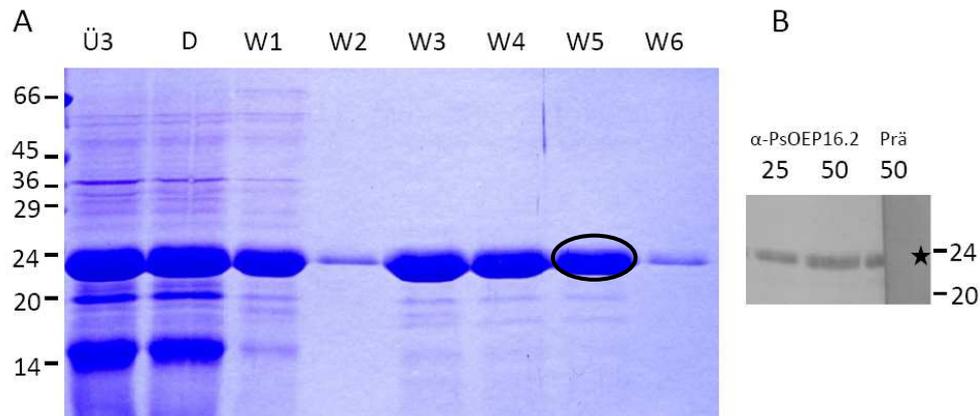
Keimlinge im Alter von einem Tag (1T), drei Tagen (3T), fünf Tagen (5T) und 11 Tagen (11T), sowie Pollen der Linie *oep16.2::GUS* (Pollenabbildung aus Dissertation Iryna Ilkavets, 2005). Die Stärke der blauen Färbung ist ein Indikator für die Promotoraktivität des endogenen OEP16-Promotors. Das gleiche Expressionsmuster wurde jeweils in mehreren, unabhängigen Linien nachgewiesen.

Es ist eindeutig zu sehen, dass OEP16.2 vor allem im Embryo, in ganz jungen Keimlingen und in den Kotyledonen exprimiert wird. Die Blaufärbung trat in diesen Geweben sehr schnell und sehr intensiv auf, was den extrem hohen RNA-Gehalt von OEP16.2 unterstreicht (vgl. Abbildung 3) Weiterhin ist bis zum Alter von 3 Tagen ein Signal in der Wurzel (Leitbündel und Wurzelspitze) zu erkennen. In den ersten echten Blättern ist keinerlei Färbung, die auf eine Expression hindeutet mehr zu detektieren. Gegenteilig dazu verhält sich OEP16.1, welches im einen Tag alten Keimling überhaupt nicht und nach drei Tagen Keimung nur ganz schwach in den Kotyledonen zu sehen ist. Eine deutliche Blaufärbung der ersten Blätter in den 11 Tage alten Keimlingen weist anschließend auf eine starke Expression im Blatt hin. Die Daten der Microarray-Analysen (Abbildung 3) konnten damit bestätigt werden. Obwohl der RNA Level von OEP16.2 im maturen Pollen im Vergleich zu frühen Pollenstadien niedrig ist konnte ein Promoter-Gus-Signal von OEP16.2 in maturen Pollen festgestellt werden (Drea et al. 2006, Dissertation Iryna Ilkavets, 2005, Abbildung 6). Leider konnte die Expression von *At-OEP16.4* mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, da in den entsprechenden Linien keine GUS Färbung beobachtet wurde.

Da der Nachweis von Transkripten noch nicht zwangsläufig bedeutet, dass auch eine Expression auf Proteinebene erfolgt, wurden im Folgenden verschiedene Stadien der Samen- und Keimlingsentwicklung mittels Immunfärbung (Western Blot) untersucht. Für die Proteine *At-OEP16.1*, *At-OEP16.2*, *At-OEP16.4* und *Ps-OEP16.1* lagen zu Beginn der Arbeit bereits spezifische Antiseren vor. Für *Ps-OEP16.2* wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Antikörper generiert und getestet.

#### 4.2.2 Generierung eines Antikörpers gegen Ps-OEP16.2

Die isolierte kodierende Sequenz von Ps-OEP16.2 wurde zur Überexpression und Generierung eines Antigens in den Expressionsvektor pET21a subkloniert. In diesem Plasmidvektor wird ein 6-fach-Histidin-Tag an den Carboxy-Terminus des Proteins fusioniert. Dieses Konstrukt wurde in BL21 *E. coli* Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden in mehreren Schritten aufgeschlossen (Abbildung 7) und das rekombinante Ps-OEP16.2 Protein mittels Bindung des His-Tags über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt.

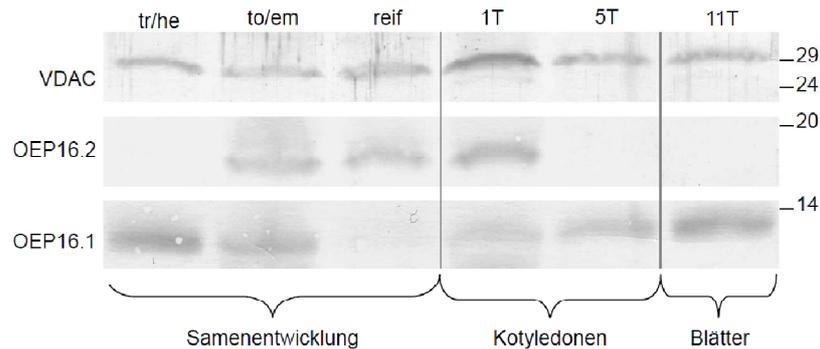


**Abbildung 7: Überexpression, Aufreinigung von rekombinatem Ps-OEP16.2 und Antikörpertest.**

**(A)** Ps-OEP16.2 in pET21a wurde in BL21 Zellen überexprimiert und mit einer Ni-NTA Säule (Qiagen) aufgereinigt. Ü3: Überstand nach Zellaufschluß aus der Überexpression (Kapitel 3.4.3.3: Antiseren); D: Durchlauf der Ni-NTA Säule. W1-W6: Waschfraktionen 1-6 der Ni-NTA Säule. Mit steigender Imidazol-Konzentration (W1, W2: 0 mM; W3: 20 mM; W4: 50 mM; W5: 100 mM; W6: 200 mM) wurde das Protein nach der Reinigung von der Säule gelöst. Die Fraktion W5 (Proteinkonzentration: 2 µg/µl, aufgetragen: 6 µg) wurde für die Antikörpergeneration verwendet. **(B)** Immunoblot von 25 und 50 ng rekombinatem Ps-OEP16.2 Protein (20,0 kDa) mit dem Antiserum α-Ps-OEP16.2 (Blutung nach 120 Tagen, Tier 2). Letzte Spur: 50 ng Protein wurden zur Hälfte mit Antiserum und zur Hälfte mit Präimmunsereum inkubiert (Stern). Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben.

Das so gewonnene rekombinante Ps-OEP16.2 Protein wurde anschließend zur Antikörpergeneration verwendet (Pineda Antikörperservice, Berlin). Die Antikörper, die aus einer Blutung 120 Tage nach Immunisierung zweier Kaninchen gewonnen wurden, waren spezifisch und zeigten keinerlei Kreuzreaktionen (Abbildung 7). Mit diesen Antikörpern waren eine Immunolokalisation und eine Analyse der Membrantopologie von Ps-OEP16.2 möglich.

### 4.2.3 Immunolokalisation der OEP16 Isoformen in Samen- und Keimlingsgeweben

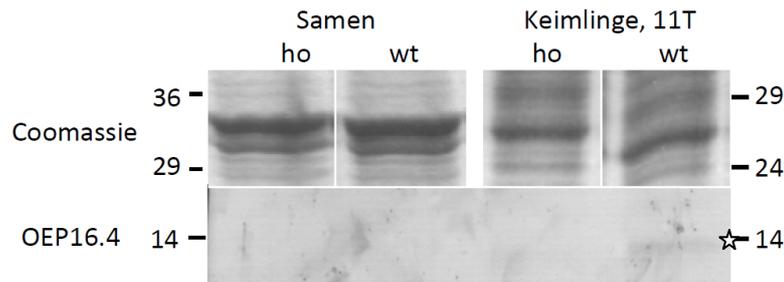


**Abbildung 8: Proteingehalt von At-OEP16.1 und At-OEP16.2 in Samen und Keimlingen.**

Immunoblot von At-OEP16.1 und At-OEP16.2 Antiseren gegen Proteinextrakte aus *Arabidopsis* Samen- und Keimlingsgewebe (je 10 µg Samenproteinextrakt, je 20 µg Keimlingsproteinextrakt) unterschiedlicher Entwicklungsstadien (siehe auch Abbildung 24). Ein Antiserum gegen das mitochondrielle Porin VDAC wurde als Auftragsmarker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. Tr/he: „Transition“-/Herzstadium; to/em: Torpedo-/maturer Embryo; reif: reife, trockene Samen; 1T: ein Tag; 5T: 5Tage; 11T: 11Tage alte Keimlinge.

Auch die Immunolokalisation bestätigte das komplementäre Transkriptmuster von OEP16.1 und OEP16.2 in *Arabidopsis* Samen und Keimlingen (vgl. Abbildungen 3 und 4). OEP16.1 (16 kDa) verschwindet, wenn OEP16.2 (ca. 19 kDa) exprimiert wird und anders herum. Erst ab dem Torpedo- und maturem Embryostadium kann OEP16.2 in Samen detektiert werden. Bereits nach fünf Tagen Keimung ist kein OEP16.2 Protein mehr nachweisbar. Dagegen ist OEP16.1 noch in der frühen Embryonalentwicklung bis zum Torpedostadium erkennbar und wird dann erst nach einem Tag im Keimling wieder exprimiert.

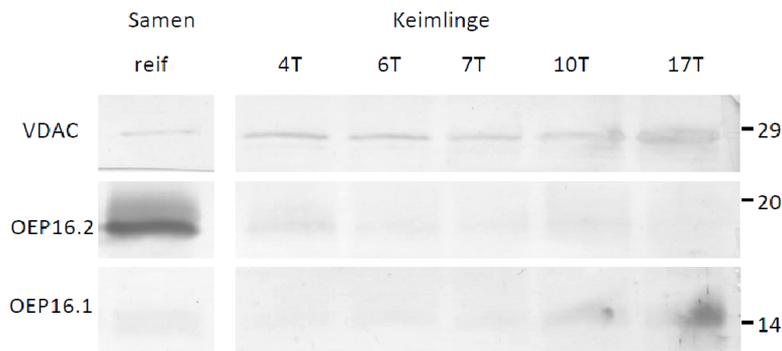
Bisher konnte die Isoform At-OEP16.4 auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Immunoblots zwischen Wildtyp und OEP16.4 *knockout* Mutanten (*oep16.4-2*, Philippar et al. 2007) durchgeführt. Entgegen den publizierten Transkript Daten (Abbildung 5) konnte At-OEP16.4 auf Proteinebene aber nicht in den Samen (höchster mRNA Level) sondern in 11 Tage alten Keimlingen nachgewiesen werden (Abbildung 9). Das sehr schwache Signal des Antikörpers deutet allerdings auf eine generell sehr niedrige Expression von At-OEP16.4 hin.



**Abbildung 9: Immunoblot von At-OEP16.4.**

Immunoblot von At-OEP16.4 Antiserum gegen Protein aus reifen *Arabidopsis* Samen (ca. 20 µg Gesamtprotein) und 11 Tage alten Keimlingen (ca. 10 µg Gesamtprotein). Es wurde Gewebe aus Wildtyp (wt) und *oep16.4-2 knockout* Mutanten (ho; vgl. Philippar et al. 2007) verglichen. Stern: Spezifische Bande für OEP16.4 bei etwa 14 kDa. Als Ladekontrolle ist eine Coomassiefärbung der gleichen Proteinextrakte gezeigt. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben.

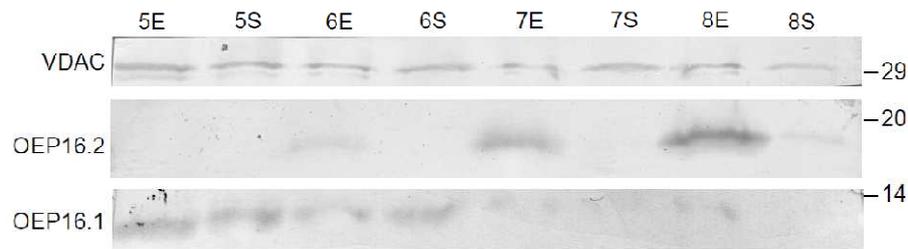
Der im Laufe dieser Arbeit generierte Antikörper gegen OEP16.2 aus Erbse (Kapitel 4.2.2), ermöglichte eine Analyse auf Proteinebene in *Pisum sativum*.



**Abbildung 10: Proteingehalt von Ps-OEP16.1 und Ps-OEP16.2 in Samen und Keimlingen**

Immunoblot von Ps-OEP16.1 und Ps-OEP16.2 Antiseren gegen Proteinextrakte aus reifen Erbsensamen (reif) und Keimlingsgeweben (je 4 µg Samenprotein, je 10 µg Keimlingsprotein) unterschiedlicher Entwicklungsstadien (4T: vier Tage bis 17T: 17 Tage). Ein Antiserum gegen das mitochondrielle Porin VDAC wurde als Auftragsmarker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. 4T: vier Tage; 6T: sechs Tage; 7T: sieben Tage; 10T: zehn Tage; 17T: siebzehn Tage gekeimt.

In Abbildung 10 ist deutlich zu sehen, dass sich die Proteinexpression von OEP16.1 und OEP16.2 in Samen und Keimlingen aus Erbse genauso komplementär verhält wie in *Arabidopsis*. Erneut ist OEP16.2 ausschließlich in den murenen, reifen Samen und ganz frühen Keimlingsstadien detektierbar, wohingegen OEP16.1 erst ab 10 Tagen Keimung nachweisbar ist. Ein weiterer Unterschied in der Expression der beiden Isoformen wird bei der getrennten Untersuchung von Samenschalen und sich entwickelnden Embryonen deutlich (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Proteingehalt von Ps-OEP16.1 und Ps-OEP16.2 in Samenschalen und Embryonen aus Erbse.**

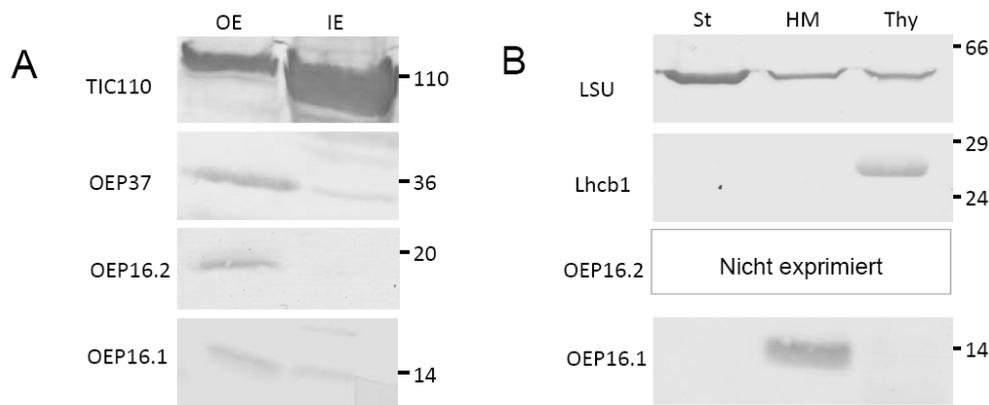
Immunoblot von Ps-OEP16.1 und Ps-OEP16.2 Antiseren gegen Proteinextrakte aus Wildtyp-Erbesenembryonen (E: je ca. 4 µg Protein) und Erbsensamenschalen (S: je ca. 4 µg Protein) während der Samenentwicklung. Ein Antiserum gegen das mitochondrielle Porin VDAC wurde als Auftragsmarker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. Stadium 5: 15 DAP (Tage nach Bestäubung), Stadium 6: 20 DAP, Stadium 7: 25 DAP, Stadium 8: 30 DAP

Ps-OEP16.1 ist sowohl in der Samenschale als auch im jungen Embryo nachweisbar. Ps-OEP16.2 dagegen ist ausschließlich in den Embryonen exprimiert und weist einen hohen Proteingehalt in den späteren Entwicklungsstadien auf.

#### **4.2.4 Immunodetektion von OEP16.1 und OEP16.2 in Hüllmembran-Fractionen von *Arabidopsis* und Erbsen-Chloroplasten**

Der funktionelle, spezifische Ps-OEP16.2 Antikörper ermöglichte auch eine subzelluläre Lokalisation von OEP16.2 in den Hüllmembranen von Chloroplasten (Abbildung 12). Die Lokalisation von OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran ist eindeutig erkennbar. Da die Isoform OEP16.1 ursprünglich aus der äußeren Hüllmembranfraktion von Erbsen-Chloroplasten isoliert wurde (Pohlmeyer et al. 1997), ist diese Lokalisation bereits ausreichend verifiziert und durch Proteomanalysen von isolierten *Arabidopsis*-Chloroplasten, Blumenkohl-Proplastiden und isolierten Chloroplasten-Hüllmembranen aus *Arabidopsis*, Mais und Erbse wiederholt unterstrichen (Ferro et al. 2003; Froehlich et al. 2003; Kleffmann et al. 2004; Bräutigam et al. 2008a,b; Zybailov et al. 2008; Bräutigam und Weber 2009).

In *Arabidopsis* können Chloroplasten erst aus ca. drei Wochen alten Keimlingen isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Nachweis von OEP16.2 Protein nicht mehr möglich (Abbildung 12). Die Lokalisation von At-OEP16.1 in der gemischten Hüllmembranfraktion (äußere und innere Membran) konnte jedoch nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: Lokalisation von OEP16.1 und OEP16.2 in Chloroplasten Hüllmembranen.**

**(A)** Immunoblot von Ps-OEP16.1, Ps-OEP16.2, Ps-OEP37 und Ps-TIC110 Antiseren gegen Proteine der Äußeren- (OE) und Inneren- (IE) Hüllmembranfraktion von Chloroplasten aus 10 Tage alten Erbsenkeimlingen. Für TIC110, OEP37, OEP16.1 wurden 180  $\mu$ g OE/IE zur Trennung auf ein großes SDS Gel, für OEP16.2 50  $\mu$ g auf ein kleines SDS Gel mit 4 M Harnstoff geladen. **(B)** Stroma (St), gemischte Hüllmembran (HM) und Thylakoidfraktion (Thy) aus Chloroplasten drei Wochen alter *Arabidopsis*-Keimlinge. Es wurden ca. 5  $\mu$ g Protein pro Fraktion auf ein kleines SDS Gel geladen. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. LSU: Große Untereinheit der Rubisco, Lhcb1: Licht-Sammelkomplex Untereinheit b1; TIC110: Translokase der inneren Hüllmembran von Chloroplasten. Antiseren gegen LSU und Lhcb1 dienen als Stroma- bzw. als Thylakoidmarker. Verunreinigungen der Fraktionen (siehe z.B. Tic110 in (A)) konnten aufgrund der großen Abundanz der Proteine und der großen Auftragsmenge nicht vermieden werden.

### 4.3 Membrantopologie und Interaktion der OEP16 Isoformen

#### 4.3.1 Orientierung von OEP16.1 und OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran

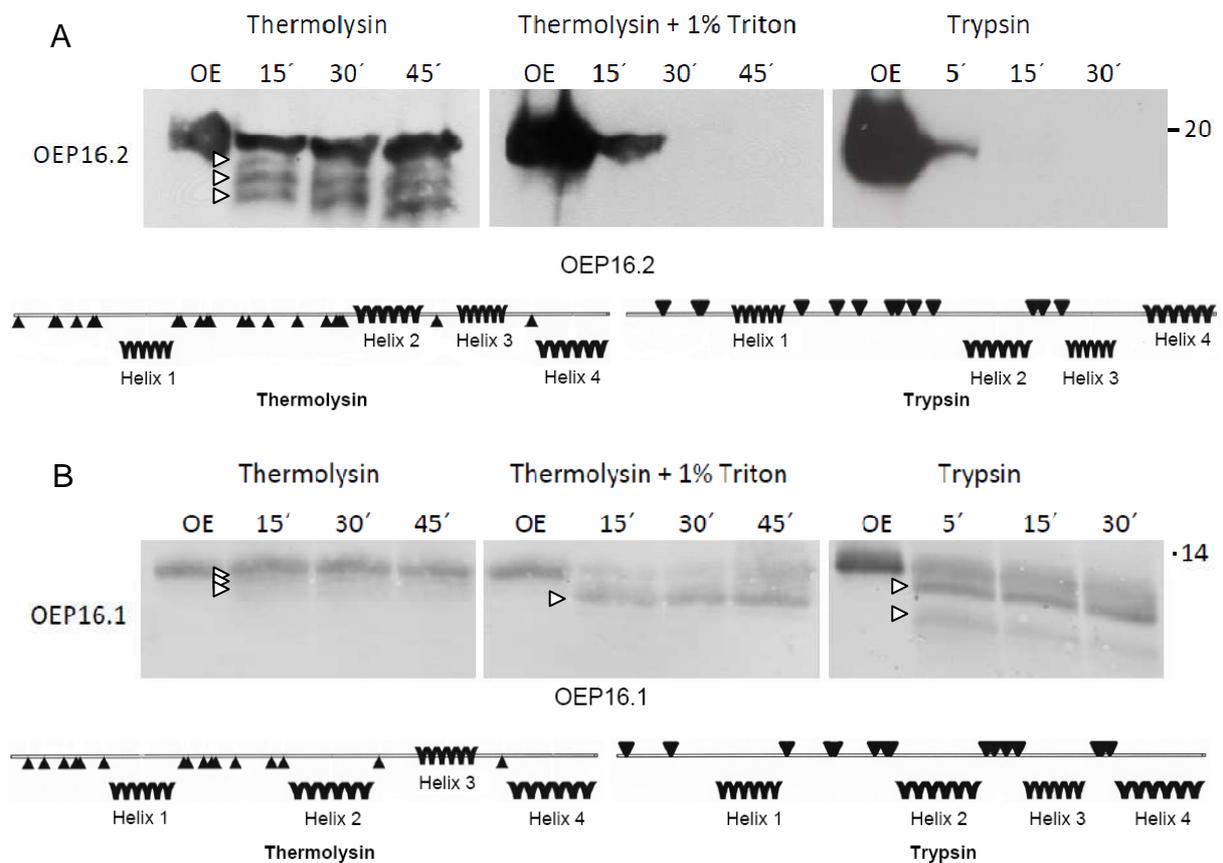
Da erstmals die subzelluläre Lokalisation von OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden die Membrantopologie des Proteins untersucht werden. Die Isoform Ps-OEP16.1 diente hier als Kontrolle, da sowohl die Topologie mit vier Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices bekannt war (Linke et al. 2004) als auch erste Hinweise zur Orientierung des Proteins vorlagen (Dissertation Kai Pohlmeier, 1997). Hier wurde gezeigt, dass Ps-OEP16.1 höchstwahrscheinlich mit N- und C-Terminus ins Zytosol orientiert ist. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und um die Orientierung von Ps-OEP16.2 festzustellen wurden Fraktionen der äußeren Hüllmembran aus Erbsen-Chloroplasten mit den Proteasen Thermolysin und Trypsin behandelt und die entstandenen Peptidfragmente über Immunoblots analysiert (Abbildung 13).

Für OEP16.2 waren nach dem Verdau mit Thermolysin drei Banden, die nur geringfügig (ca. 1-2 kDa) kleiner waren als das unverdaute Protein selbst, detektierbar (Abbildung 13). Ein Großteil des Proteins blieb weiterhin unverdaut. Wurde dagegen das Protein durch Zugabe von Detergenz aus der Lipidumgebung herausgelöst, so wurde das Protein nach 30 Minuten so abgebaut, dass es nicht mehr durch den spezifischen Antikörper detektierbar war. Ein ganz

---

ähnliches Muster zeigte die Behandlung mit Trypsin. Im Gegensatz zu Thermolysin, das unter den gegebenen Bedingungen nur Peptidfragmente an der Oberfläche von Membranvesikeln angreift, dringt Trypsin in der eingesetzten Menge durch die Lipiddoppelschicht (vgl. Balsera et al. 2009). Auch in diesem Fall war nach 15 Minuten das Ps-OEP16.2 Protein soweit abgebaut, dass durch den Antikörper nichts mehr erkannt wurde.

Wie an der schematischen Darstellung der spezifischen Schnittstellen erkennbar, ist ein solches Muster an Peptidfragmenten nur möglich, wenn N- und C-Terminus von Ps-OEP16.2 in den Membranvesikeln der isolierten äußeren Hüllmembran nach außen, d.h. *in vivo* im Zytosol lokalisiert sind (vgl. Keegstra und Youssif 1986, Waegemann et al. 1992). Nur in dieser Orientierung ist der N-Terminus mit mehreren Schnittstellen zugänglich für Thermolysin, während das restliche Protein in der Membran für die Protease unzugänglich ist (Abbildung 13 A). Ist jedoch bei Zugabe von Triton oder der Verwendung von Trypsin die Proteinschleife zwischen der ersten und der zweiten Helix für die Protease zugänglich, wird das Protein in deutlich kleinere Stücke verdaut, die nicht mehr vom Antikörper erkannt werden. Die Schnittstellen in der nach außen weisenden Peptidschleife zwischen zweiter und dritter Helix sind wahrscheinlich durch eine tiefe Einbettung in die Lipiddoppelschicht vor dem Abbau durch die Proteasen geschützt.



**Abbildung 13: Proteaseabbau von Ps-OEP16.1 und Ps-OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten.**

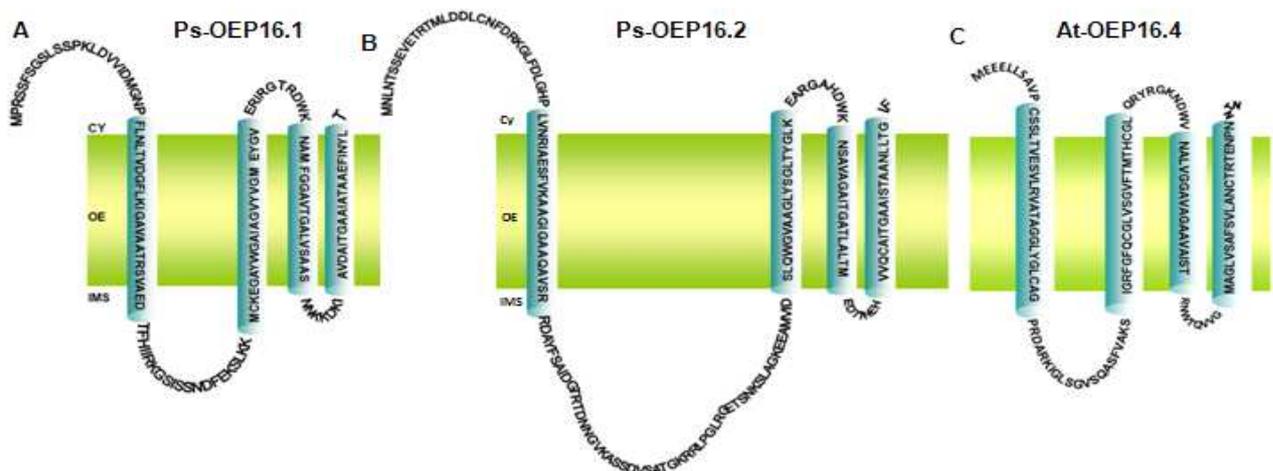
Proteasebehandlung isolierter äußerer Hüllmembranfraktionen von Chloroplasten aus 10 Tage alten Erbsenkeimlingen mit Thermolysin bzw. Trypsin und anschließende Immunlokalisation spezifischer Peptidfragmente von OEP16.2 (A) sowie OEP16.1 (B).

(A) 90 µg Protein der äußeren Hüllmembran wurden mit 180 µg Thermolysin für 15, 30 und 45 Minuten mit und ohne 1% Triton und mit 180 µg Trypsin für 5, 15, und 30 Minuten verdaut und in einem großen SDS-Gel nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt. (B) 30 µg Protein der äußeren Hüllmembran wurden mit 60 µg Thermolysin für 15, 30 und 45 Minuten mit und ohne 1% Triton und mit 60 µg Trypsin für 5, 15, und 30 Minuten verdaut und in einem kleinen SDS-Gel mit 4 M Harnstoff getrennt. OE: unbehandelte Kontrollen. Untere Zeilen: Schematische Darstellung der Membrantopologie ( $\alpha$ -Helices) und vorhergesagte Thermolysin bzw. Trypsin Schnittstellen für Ps-OEP16.2 und Ps-OEP16.1.

Von Ps-OEP16.1 wurde unter Zugabe von Thermolysin nur ein geringer Teil des Proteins verdaut. Ähnlich wie bei Ps-OEP16.2 waren die resultierenden drei Banden nur geringfügig kleiner als das Protein selbst (etwa 1-2 kDa, Abbildung 13 B). Dieses Muster kann nur durch den Abbau des N-Terminus entstanden sein. Wurde 1% Triton als Detergenz zugegeben, wurde der N-Terminus von OEP16.1 nahezu vollständig abgespalten (Verschiebung der stärksten Bande um etwa 2-3 kDa) Alle anderen nach außen exponierten Thermolysin Schnittstellen sind so nah an den Membran-durchspannenden Helices lokalisiert, das sie für die Protease höchstwahrscheinlich nicht zugänglich waren. Lediglich der Verdau mit Trypsin

zeigte eine weitere Bande mit geringerem Molekulargewicht (Abspaltung eines Fragments von ca. 4-5 kDa, Abbildung 13B). Das deutet darauf hin, dass hier die Peptidschleife zwischen der ersten und der zweiten Helix für die Protease zugänglich war. Sowohl Ps-OEP16.2 als auch Ps-OEP16.1 sind nach diesen Ergebnissen mit Amino- und Carboxy-Terminus zum Zytosol orientiert (Abbildung 13). Für OEP16.1 stimmt dies mit den Daten aus der Dissertation von Kai Pohlmeier (1997) überein.

Aufgrund der Aufklärung der Membrantopologie von Ps-OEP16.1 (Linke et al. 2004) und den vorangegangenen Untersuchungen (Proteasebehandlung äußerer Hüllmembranen) wurden Strukturmodelle für alle OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* und Erbse erstellt (Abbildung 14). Da eine Immunodetektion von OEP16.4 nicht in ausreichender Stärke möglich war, konnte die Orientierung für diese Isoform nicht experimentell ermittelt werden. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit (Abbildung 4) ist jedoch davon auszugehen, dass sich N- und C-Terminus ebenfalls im Cytosol befinden.



**Abbildung 14: Strukturmodelle der OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* und Erbse.**

(A) Ps-OEP16.1, (B) Ps-OEP16.2, (C) At-OEP16.4. Die Topologie von Ps-OEP16.1 wurde von Linke et al. (2004) ermittelt, die Strukturen und Orientierung von Ps-OEP16.2 sowie At-OEP16.4 sind nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit angepasst. Die Sekundärstrukturen von At-OEP16.1 und At-OEP16.2 entsprechen den jeweiligen Isoformen aus Erbse (nicht gezeigt). Cy: Zytosol; OE: äußere Hüllmembran des Chloroplasten; IMS: Intermembranraum

#### 4.3.2 Interaktionsanalysen im *Split Ubiquitin* System

Für Ps-OEP16.1 wurde bereits eine Dimerisierung des Kanalproteins *in vivo* postuliert (Pohlmeier et al. 1997; Steinkamp et al. 2000; Linke et al. 2004). Eine interessante Frage war in diesem Zusammenhang, ob auch in *Arabidopsis* und für die anderen beiden Isoformen eine Bildung von Oligomeren vorliegen könnte. Die Ausbildung einer Kanalpore durch die Zusammenlagerung von homooligomeren aber auch heterooligomeren Untereinheiten einer Membranproteinfamilie ist vielfach beschrieben und oft für die Funktionsweise eines Kanals

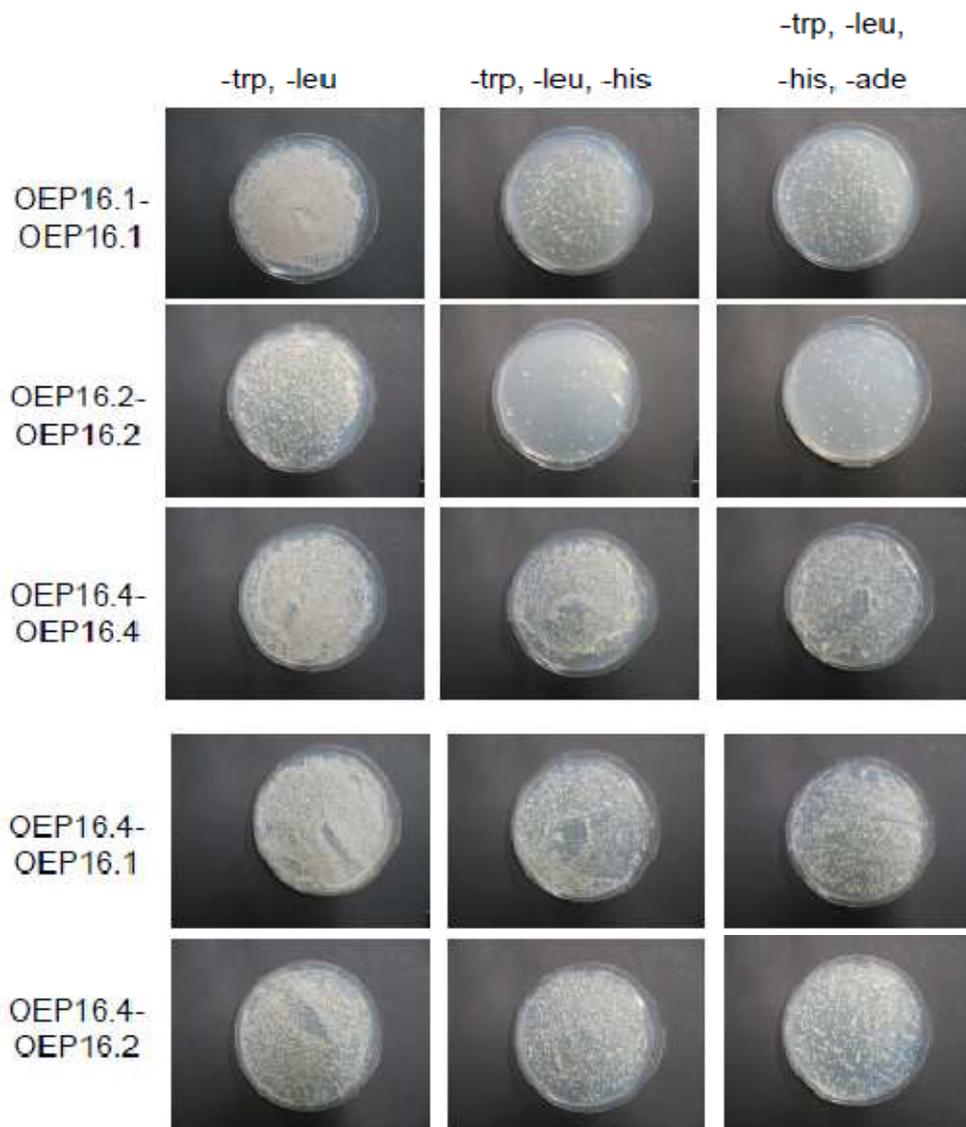
von entscheidender Bedeutung (z.B. für bakterielle Porine: Duy et al. 2007; K<sup>+</sup>-Kanäle: Jeanguenin et al., 2008).

Um für die OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* Interaktionen *in vitro* untersuchen zu können, wurde ein *Split Ubiquitin* System in Hefezellen genutzt (DUALmembrane Kit, Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz). Zuerst wurde auf eine Homooligomerisierung, danach auf Interaktion aller OEP16 Isoformen untereinander getestet (Abbildung 15). Die auf den entsprechenden Selektionsmedien gewachsenen Hefekolonien wurden zur Quantifizierung ausgezählt (Tabelle 10). Die Experimente zum *Split Ubiquitin* System wurden von Karl Mayer (technische Assistenz, Biochemie und Physiologie der Pflanzen) am Department Biologie 1 der LMU München durchgeführt.

**Tabelle 10: Quantifizierung der OEP16 Interaktion im *Split Ubiquitin* System.**

Getestet wurde auf Selektionsmedium ohne Trypsin und ohne Leucin (-trp, -leu; Kontrolle der Hefe-Transformation). Die Interaktion der Proteine wurde auf Medien, die zusätzlich kein Histidin (-his) oder weder Histidin noch Adenin (-his, -ade; starke Interaktion) enthielten untersucht.

Interaktionspartner	Koloniewachstum in %		
	-trp, -leu	-trp, -leu, -his	-trp, -leu, -his, -ade
At-OEP16.1-At-OEP16.1	100	47,2	46,0
At-OEP16.2-At-OEP16.2	100	10,8	13,0
At-OEP16.4-At-OEP16.4	100	100	100
At-OEP16.4-At-OEP16.1	100	100	100
At-OEP16.4-At-OEP16.2	100	100	100



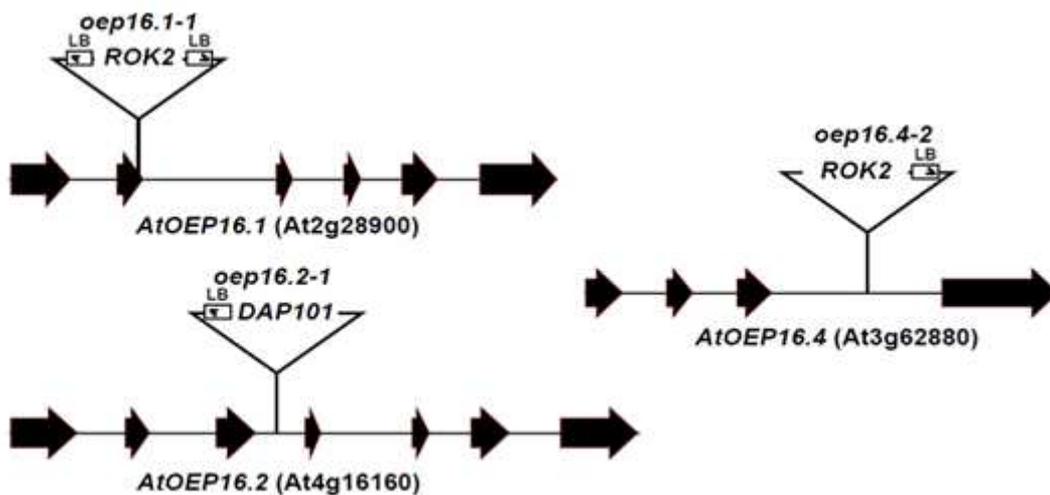
**Abbildung 15: OEP16 Interaktion im Split Ubiquitin System.**

Es wurden alle OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* sowohl als „Köder“- (Name an erster Stelle) als auch als „Beute“-Protein (Name an zweiter Stelle) untersucht. Selektionsmedium ohne Trypsin und ohne Leucin (-trp, -leu) dient zur Kontrolle der Hefe-Transformation. Auf Medien, die zudem kein Histidin (-his) enthielten wurde auf eine schwache, auf Platten, die auch kein Adenin (-ade) enthielten auf eine starke Interaktion getestet.

At-OEP16.1 und insbesondere At-OEP16.4 zeigten eine starke Interaktion und damit eine große Wahrscheinlichkeit der Homooligomerbildung *in vivo*. Die Interaktion von OEP16.2 mit sich selbst war dagegen nur recht schwach ausgeprägt. Bezüglich einer Bildung von Heterooligomeren konnten nur positive Ergebnisse mit der Isoform OEP16.4 (genutzt als „Köder“-Protein) erzielt werden. Hier fand sowohl eine starke Interaktion mit OEP16.1 als auch mit OEP16.2 statt.

#### 4.4 Mutation aller OEP16 Isoformen in Arabidopsis

Zur näheren Untersuchung der Funktion eines bestimmten Proteins ist es hilfreich, den Phänotyp von *knockout* Mutationen, d.h. den Verlust des zugehörigen Gens zu charakterisieren. Für alle OEP16 Isoformen in *Arabidopsis* lagen *knockout* Mutationen in Form von T-DNA Insertionslinien vor, die bereits 2007 von Philippar et al. isoliert und beschrieben wurden. Es wurde gezeigt, dass in homozygoten Nachkommen aller Linien, weder Transkript noch Protein der jeweiligen mutierten OEP16 Isoform vorhanden waren. Für OEP16.1 war eine T-DNA Linie des Salk Instituts (SALK\_024018) verfügbar. Diese Linie zeigt mindestens zwei T-DNA Fragmente die „Rücken an Rücken“ inseriert sind und so Conkatemere bilden (Abbildung 16). Die Insertion ist im zweiten Exon von OEP16.1 lokalisiert und unterbricht somit das offene Leseraster nach der Aminosäure 52.



**Abbildung 16: Molekulare Charakterisierung der OEP16 Mutanten (aus Philippar et al. 2007).**

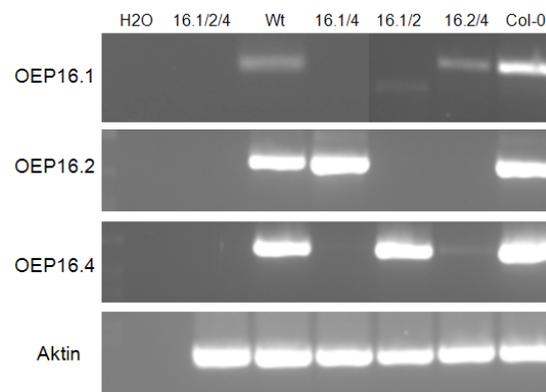
T-DNA Insertionen in allen drei OEP16 Isoformen, Exons sind als schwarze Pfeile eingezeichnet, Introns als Striche.

Für OEP16.2 ist eine T-DNA Linie der Firma Syngenta verfügbar (SAIL#1377\_1225\_B03). Die T-DNA Insertion befindet sich hier im dritten Intron. Auch für OEP16.4 gibt es eine T-DNA Insertionslinie des SALK Instituts (SALK\_109275). In dieser Linie unterbricht die Insertion ebenfalls das dritte Intron (Abbildung 16). Während der Studien von Philippar und Mitarbeitern (Philippar et al. 2007) wurden bereits die Doppelmutanten *oep16.1/16.4* (*oep16.1-1xoe16.4-2*) und *oep16.2/16.4* (*oep16.2-1xoe16.4-2*) durch Kreuzung der jeweiligen homozygoten Einzelmutanten erzeugt.

Für weitere phänotypische Untersuchungen war es unabdingbar alle Doppel- und auch die Triple-Mutante aller drei homozygoten Linien zur Verfügung zu haben. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Linien mit den internen Bezeichnungen *oep16.1-1/oep16.4-2* #30 ho T6 mit *oep16.2-1* #62 ho T6 gekreuzt. In der T3, der dritten Generation nach der Kreu-

zung, lagen damit alle Kombinationen von Doppel- und Triple-Mutanten, auch die noch fehlende Doppelmutante *oep16.1-1/oep16.2-1*, sowie eine gekreuzte Linie mit allen Wildtypallelen (möglicher „T-DNA Hintergrund“) der drei OEP16 Isoformen vor. Die Mutationen wurden mit spezifischen Oligonukleotidprimern für die betreffenden Gene und T-DNA Insertionen durch PCR auf DNA Ebene überprüft (nicht gezeigt, verwendete Oligonukleotidprimer siehe Tabelle 2).

Zur Überprüfung des Verlusts der Transkripte wurde eine Transkript-spezifische RT-PCR mit RNA aus grünen Schoten inklusive noch nicht ganz reifer Samen durchgeführt (Abbildung 17). Diese Pflanzenorgane wurden gewählt, da in diesem Stadium laut vorhandener Expressionsdaten alle drei OEP16 Isoformen exprimiert werden (vgl. Abbildung 5). Bei allen Linien handelte es sich um *knockout* Mutanten, bei denen für das jeweilige OEP16 Gen keine Transkripte detektierbar waren.



**Abbildung 17: RT-PCR von allen OEP16 Doppel- und Triple-Mutanten.**

Als Proben wurde RNA grüner Schoten mit noch nicht ganz reifen Samen verwendet (Oligonukleotidprimer siehe Tabelle 2). Fragmentgrößen der spezifischen PCR-Produkte: OEP16.1: 331 bp; OEP16.2: 401 bp; OEP16.4: 339 bp; Aktin: 435 bp; Wt: gekreuzte Linie mit allen OEP16 Wildtypallelen (möglicher „T-DNA Hintergrund“); Col-0: Wildtyplinie aus Samen der Firma „Lehle“; Aktin: Positivkontrolle, amplifizierte Fragmente des Gens Aktin (*At-Act8*), H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle ohne DNA

#### 4.4.1 Phänotypische Charakterisierung der OEP16 Mutanten

Unter Standard Wachstumsbedingungen („Langtag“), also in einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 21°C für 16 h bei ca. 100 µmol/m<sup>2</sup>s und 16°C für 8 h bei Dunkelheit konnten keinerlei phänotypische Veränderungen der OEP16 Doppel- und Triple-Mutanten festgestellt werden. Auch unter Kurztagsbedingungen (8h Licht, 16h Dunkelheit) konnte im Vergleich zum Wildtyp kein Phänotyp beobachtet werden. Weiterhin ergab sich kein Unterschied im Erscheinungsbild, ob die Pflanzen auf Saccharose-haltigem oder –freiem Medium angezogen wurden.

Die stärkste Expression aller OEP16 Isoformen zeigt OEP16.2 in reifen Samen und in sich entwickelnden Pollen (vgl. Abbildung 5). Um zu testen, ob die *knockout* Mutation von

OEP16.2 einen Einfluss auf die Pollenkeimung und das Wachstum der Pollenschläuche hat, wurden Samen der homozygoten *oep16.2-1* Linie, der *oep16.2/16.4* Doppelmutante, der jeweiligen korrespondierenden Wildtypallele sowie Col-0 Samen als Kontrolle in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Sheila McCormick am Plant Gene Expression Center, Albany, Kalifornien, USA untersucht. Nach zwei unabhängigen Wiederholungen mit je 200-400 ausgezählten gekeimten Pollen und 15-20 in der Länge gemessenen Pollenschläuchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den OEP16.2 Mutantenlinien und den zugehörigen Wildtypen festgestellt werden.

Auch eine Untersuchung der Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefelgehalte in Samen aller OEP16 Einzelmutanten und der zugehörigen Wildtypen im Forschungszentrum Jülich (durchgeführt von Herrn M. Michulitz und Frau S. Frauenrath, Zentralabteilung für chemische Analysen, Forschungszentrum Jülich, Deutschland) ergab keine Unterschiede zwischen den Mutanten und den Wildtyplinien.

#### 4.5 Die Funktion von OEP16.1

Die Funktion von OEP16.1 wurde in den vergangenen Jahren wiederholt sehr kontrovers diskutiert. So veröffentlichten Prof. Steffen Reinbothe und seine Mitarbeiter, dass OEP16.1 ein Teil eines komplexen, Protochlorophyllid-abhängigen Translokonskomplexes für den Import des Vorstufenproteins der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A, im Folgenden prePORA genannt, in Etioplasten sei (Reinbothe et al. 2004a, 2005; Pollmann et al. 2007). Dies wurde anhand von chemischen *Crosslinks* und Ko-Immunopräzipitationen bei *in vitro* Imports in isolierten Plastiden aus Gerstenblättern und *Arabidopsis* Kotyledonen gezeigt. Das mature Protein PORA ist ein Teil des sogenannten Protochlorophyllid-Holochroms, ein Komplex aus NADPH, PORA und Protochlorophyllid, der Protochlorophyllid unter Einfluss von Licht in Chlorophyllid umwandelt (Santel und Apel, 1981). Dies ist einer der entscheidenden Schritte in der Chlorophyll-Biosynthese bei der Ergrünung von etiolierten Pflanzen. Freies Protochlorophyllid, das nicht im Holochrom gebunden ist, wirkt als starker *Photosensitizer*, der bei Belichtung Zell-toxischen Singulett-Sauerstoff freisetzt (Runge et al. 1996). Bereits 2007 konnten Philippar et al. die von Reinbothe postulierte Proteinimportfunktion von OEP16.1 jedoch widerlegen, indem sie die beschriebenen Einzel- und Doppelmutantenlinien (Abbildung 16) für *in vitro* Proteinimport-Studien von prePORA benützten. Sie konnten damit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass OEP16.1 weder in den prePORA Import in Chloroplasten noch in Etioplasten involviert ist. Zeitgleich kamen Pollmann et al. 2007 jedoch zu der genau gegensätzlichen Ansicht, obwohl sie Nachkommen derselben *knockout*

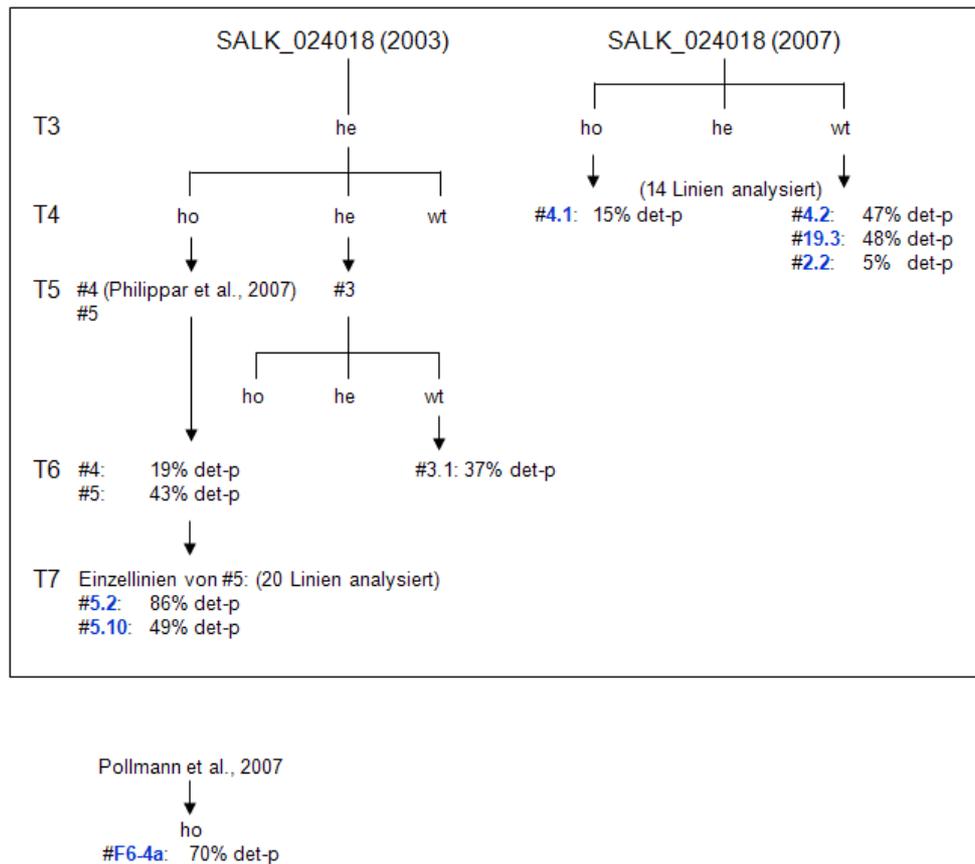
Mutante SALK\_024018 benützten, die auch Philippar et al. 2007 zur Verfügung stand. Ein großes Anliegen dieser Arbeit war also, diese Kontroverse zu klären.

#### **4.5.1 Detaillierte Charakterisierung der *oep16.1-1 knockout* Mutante**

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Erkenntnissen, dass die Mutation aller OEP16 Isoformen in *Arabidopsis* keinen Phänotyp der Pflanzen verursacht, schilderten Pollmann et al. 2007 einen starken De-Etiolierungs-Phänotyp der *oep16.1-1* Mutante (SALK\_024018). Wenn Keimlinge zuerst im Dunkeln angezogen wurden, und dann ins Dauerlicht gebracht wurden, ergrünten die Mutanten nicht sondern bleichten aus und starben. Dies wurde dem phototoxischen Effekt des freien Protochlorophyllids, welches nicht in Chlorophyllid umgebaut werden konnte, zugeschrieben. Mutanten, die unter Dauerlicht angezogen wurden, zeigten dagegen keine Wachstumsänderung im Vergleich zum Wildtyp, da hier durch den stetigen Umsatz kein Protochlorophyllid akkumuliert werden kann. Ein ganz ähnlicher Phänotyp wurde bereits von Mesaukiene et al. 2001 und von Camp et al. 2003 für die *flu* (*fluorescence*) Mutante beschrieben.

##### **4.5.1.1 Phänotypische Untersuchung homozygoter *oep16.1-1* Linien**

Um diesen Phänotyp, d.h. einen Defekt in der Ergrünung der Keimlinge und die damit zusammenhängende postulierte Funktion von OEP16.1 zu überprüfen, wurden mehrere Nachkommen der originalen SALK\_024018 Linie getestet. Zur besseren Übersicht sind alle Linien, sowohl die Nachkommen der 2003 als auch die Nachkommen der 2007 bestellten Samen in Abbildung 18 aufgezeichnet.



**Abbildung 18: Untersuchte Nachkommen der SALK\_024018 Linie.**

Aufgezeigt sind alle homozygoten Mutanten und die korrespondierenden Wildtypen, die für die Phänotypanalysen benützt wurden. Es wurden zwei unabhängige Chargen untersucht, die 2003 und 2007 vom SALK-Institut bestellt wurden, sowie eine Charge der Gruppe von Prof. Steffen Reinbothe (#F6-4a, blau, Pollmann et al. 2007), ebenfalls Nachkommen der Linie SALK\_024018. Ho: homozygote Mutation von OEP16.1, he: heterozygote Mutation von OEP16.1, wt: Wildtypallel für OEP16.1. T3: Es wurde davon ausgegangen, dass sich alle vom SALK-Institut bezogenen Linien in der 3. Vermehrungsgeneration befanden; T4, T5, T6 und T7 bezeichnet die jeweilige Vermehrungsgeneration der direkten Nachkommen der SALK\_024018 Linie. Linie #4 T5, homozygot für *oep16.1-1*, der SALK\_024018 Linie, die 2003 bestellt wurde, diente bereits bei Philipp et al. (2007) für Analysen. Die Linie #5 T5, homozygot für *oep16.1-1* ist dazu eine Schwesterlinie und Linie #3.1 T6 ist der korrespondierende Wildtyp. Die Linien #5.2 T7 und #5.10 T7 (beide in blau) sind direkte Nachkommen der Linie #5. Die Linien #4.1, #4.2, #19.3 und #2.2 alle T4 sind direkte Nachkommen der 2007 bestellten Charge von SALK\_024018. det-p: De-Etiolierungs-Phänotyp. Die Abbildung (modifiziert) wurde bereits in Pudelski et al. (2009, suppl.) veröffentlicht.

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Pollmann et al. (2007), wurde der beschriebene De-Etiolierungs-Phänotyp (Defekt in der Ergrünung von Keimlingen) im Rahmen dieser Arbeit quantifiziert. Dazu wurden in drei unabhängigen Experimenten mindestens 130 Keimlinge 2,5 Tage im Dunkeln und anschließend 3 Tage im Licht angezogen. Anschließend wurden Keimlinge, die nicht ergrünt waren und deren Kotyledonen sich nicht geöffnet hatten, ausgezählt (vgl. Kapitel 3.3.6). Zuerst wurden die Linien *oep16.1-1* #4 T6 und die korrespondierende Wildtypelinie #3.1, die bereits in Philipp et al. 2007 beschrieben wurden, untersucht. Die homozygote Linie #4 zeigte den beschriebenen Ergrünungsphänotyp nicht, überraschender-

weise jedoch 37% der Wildtypkeimlinge von Linie #3.1 (Abbildung 18). Deshalb wurden in der Generation T6 eine weitere homozygote OEP16.1 *knockout* Linie #5 und deren Nachkommen (T7), sowie Nachkommen der im Jahr 2007 erhaltenen, originalen SALK\_024018 Linie für weitere Untersuchungen benutzt. Außerdem wurde die Linie F6-4a aus Pollmann et al. (2007) in die phänotypische Charakterisierung mit einbezogen (zur Verfügung gestellt von Diter von Wettstein (Washington State University, Pullman, WA). Zusätzlich dienten der Wildtyp Col-0 und Samen einer heterozygoten *flu* Mutante (zur Verfügung gestellt von Klaus Apel (Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY) als Kontrollen (Tabelle 11, Abbildung 18).

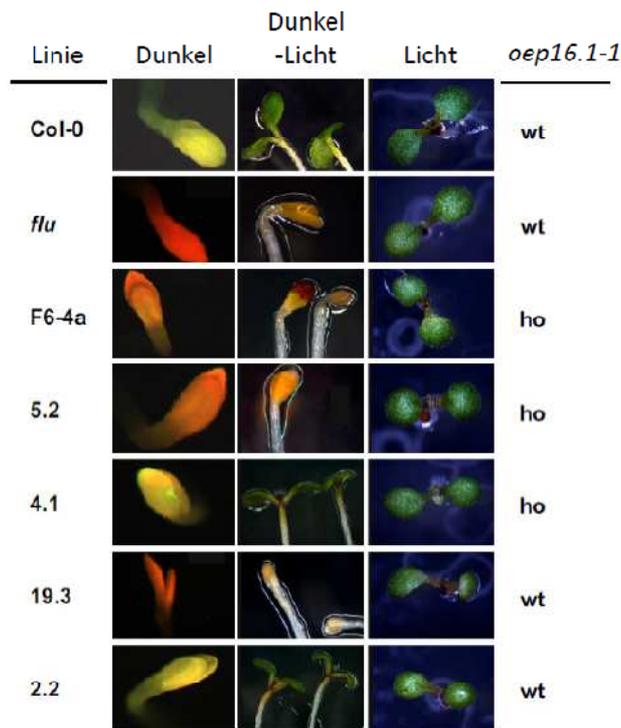
**Tabelle 11: Untersuchung des De-Etiolierungs-Phänotyps in der SALK\_024018 Linie.**

Es wurden 3 unabhängige Experimente quantifiziert. Det-p (%): % der Keimlinge, die den Ergrünungsphänotyp zeigen (Mittelwert aus drei unabhängigen Wiederholungen), n: Anzahl der ausgezählten Keimlinge. ho: homozygote Mutation von OEP16.1, wt: Wildtypallele für OEP16.1. Nummerierung Linien: siehe Abbildung 18. Die Tabelle wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

	<b><i>oep16.1-1</i></b>	<b>det-p in %</b>	<b>n</b>
Col-0	wt	14.7	265
<i>flu</i>	wt	31.6	196
F6-4a	ho	70.7	215
5.2	ho	85.8	190
5.10	ho	49.2	130
4.1	ho	15.0	233
4.2	wt	46.9	177
19.3	wt	48.4	182
2.2	wt	5.1	217

In allen Linien ergrünteten etwa 5-15% der Keimling nicht, bleichten nach der Belichtung aus und starben. Tatsächlich zeigten 70,7% der homozygoten F6-4a Linie und sogar 85,8% der homozygoten Linie #5.2 den Phänotyp. Überraschenderweise gab es aber auch eine homozygote Linie #4.1 die keinen Phänotyp zeigte und gleich zwei Wildtyplinien #4.2 und #19.3 bei denen 46,9% bzw. 48,4% Keimlinge starben. Der De-Etiolierungs-Phänotyp war daher also nicht auf die Mutation von OEP16.1 zurückzuführen.

Da Protochlorophyllid unter Blaulicht rot fluoresziert, wurde die Akkumulation in dunkel angezogenen Keimlingen (vgl. Kapitel 3.5.2) mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.



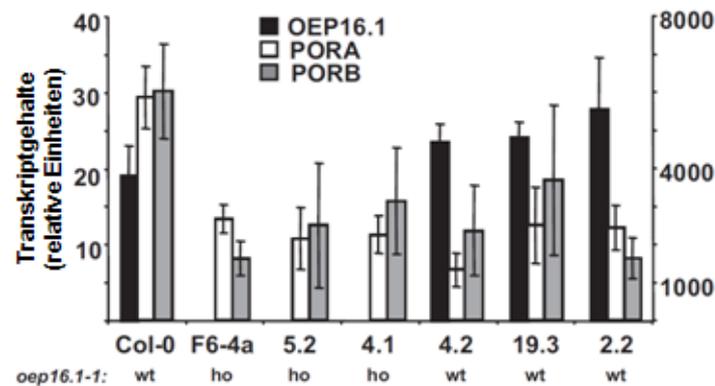
**Abbildung 19: De-Etiolierungs-Phänotyp in verschiedenen Nachkommen der SALK\_024018 Linie.**

Alle dargestellten Keimlinge der verschiedenen Linien sind repräsentativ für jeweils 50 Keimlinge in drei unabhängigen Versuchen. Links: Fluoreszenzmikroskopie von 2,5 Tage alten, etiolierten Keimlingen (Dunkel). Mitte: Keimlinge, die nach 2,5 Tagen Dunkelheit für 3 Tage im Licht ( $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) wuchsen (Dunkel-Licht). Rechts: Zur Kontrolle, Keimlinge, die 3 Tage im Dauerlicht ( $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) wuchsen (Licht). Die Nummern der verschiedenen Linien (vgl. Abbildung 18, Tabelle 11) sind links, die Mutation des *oep16.1-1* Allels rechts angegeben. Die Abbildung (modifiziert) wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

Bei einer starken Akkumulation von Protochlorophyllid wie in den *flu* Mutanten (positive Kontrolle) kam es zu einer deutlichen, tief roten Färbung der Kotyledonen (Abbildung 19). Wenn keine Akkumulation vorlag, fluoreszierten die Keimlinge gelb, wie bei der negativen Wildtypkontrolle Col-0. Die gleiche Gelbfärbung konnte auch bei der OEP16.1 Wildtyplinie #2.2 und bei der homozygoten *oep16.1-1* Linie #4.1 beobachtet werden. Die homozygoten Linien *oep16.1-1* #F6-4a und #5.2 sowie die Wildtyplinie #19.3 zeigten eine eher orange Färbung der Kotyledonen. Diese Linien zeigten auch den De-Etiolierungs-Phänotyp, wie von Pollmann et al. 2007 beschrieben (vgl. Tabelle 11). Wurden die Pflanzen unter Dauerlicht angezogen, hatten sie wie der Wildtyp keinerlei Ergrünungs- und Wachstumsdefizite. Die orange Fluoreszenz beweist, dass es in den Linien, die einen De-Etiolierungs-Phänotyp zeigen, tatsächlich zu einer schwachen Akkumulation von Protochlorophyllid kommt. Jedoch ist dies, wie auch der Ergrünungsdefekt unabhängig von der OEP16.1 Mutation (vgl. Tabelle 11).

#### 4.5.1.2 Expression von PORA in homozygoten *oep16.1-1* Linien

Eine Grundlage der Diskussion um die Funktion von OEP16.1 *in vivo* war unter anderem die These, das *oep16.1-1 knockout* Mutanten kein prePORA in Etioplasten importieren könnten. Um dies zu überprüfen wurden verschiedene homozygote Mutanten und Wildtyplinien mittels quantitativer RT-PCR auf den RNA-Gehalt von PORA in etiolierten Kotyledonen untersucht. Die Isoform PORB (nicht von OEP16.1 importiert, vgl. Reinbothe et al., 2004; Pollmann et al., 2007) sowie OEP16.1 selbst dienten als Kontrollen.

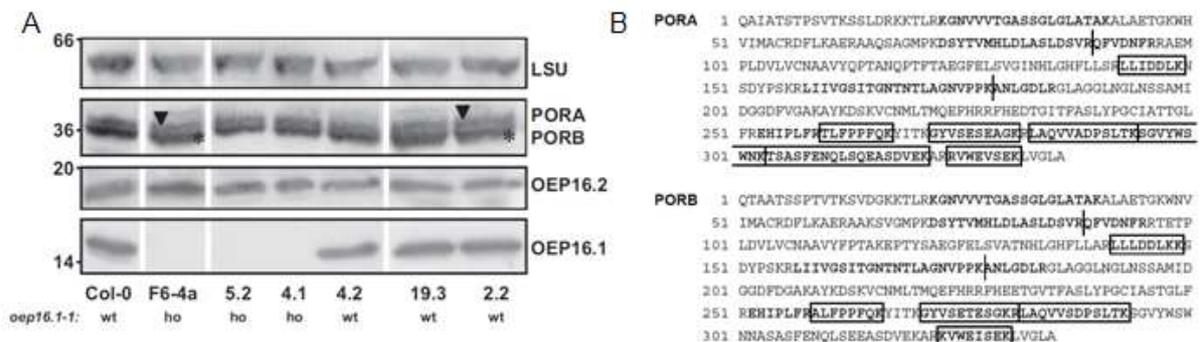


**Abbildung 20: Transkriptgehalt von PORA, PORB und OEP16.1 in etiolierten Kotyledonen verschiedener SALK\_024018 Nachkommen und der Col-0 Wildtypkontrolle.**

Quantifizierung der OEP16.1 (schwarz), PORA (weiß) und PORB (grau) mRNA (relative Einheiten) durch quantitative RT-PCR (siehe Kapitel 3.3.10, verwendete Oligonukleotidprimer Tabelle 2). Die Werte sind das Mittel aus drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung ist eingezeichnet. Der Transkriptgehalt wurde relativ zu 10.000 Aktin 2/8 Molekülen bestimmt. Links wurde die y-Achse für OEP16.1, rechts für PORA und PORB skaliert. ho: homozygote Mutation von OEP16.1, wt: Wildtypallel für OEP16.1. Nummerierung Linien: siehe Abbildung 18. Die Abbildung (modifiziert) wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

Abbildung 20 zeigt deutlich, dass der Transkriptgehalt von PORA in den *oep16.1-1* Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp auf gleichem Niveau ist. Auch die Linien die unabhängig von der OEP16.1 Mutation einen De-Etiolierungs-Phänotyp zeigten (#F6-4a, #5.2, #4.2, #19.3) waren nicht im PORA-Transkriptgehalt beeinflusst.

Desweiteren wurde die Anwesenheit von maturem PORA Protein, d.h. der korrekte Proteinimport, in etiolierten Keimlingen verschiedener homozygoter *oep16.1-1* und Wildtyplinien mittels Immunoblot und Massenspektroskopie untersucht.



**Abbildung 21: Nachweis von maturem PORA Protein in etiolierten Keimlingen verschiedener homozygoter *oep16.1-1* Mutanten und Wildtypelinien.**

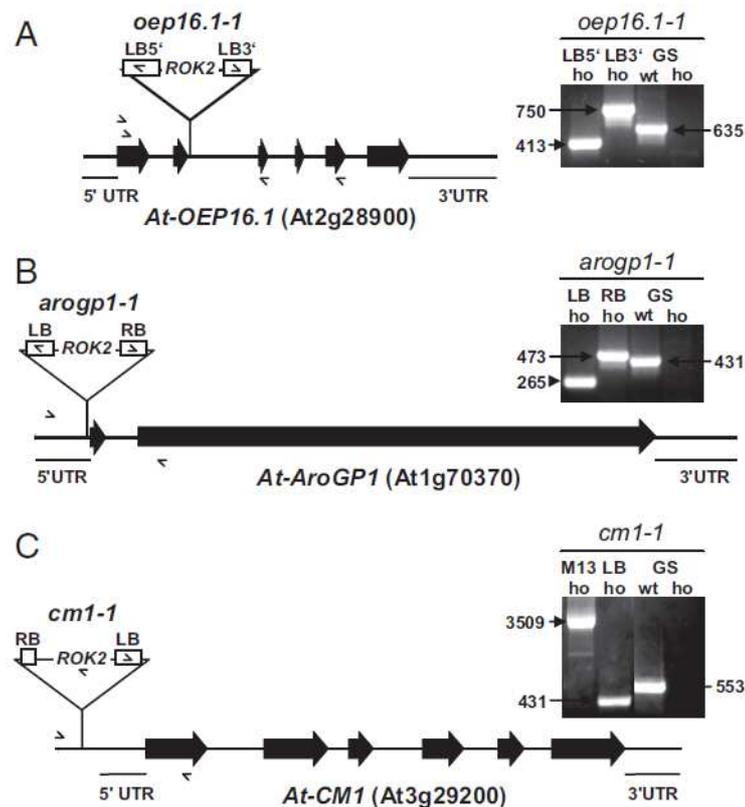
(A) Immunoblot auf Proteinextrakt aus 7 Tage alten etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen. Pro Linie wurden je 30 µg Protein für die Detektion von PORA/PORB und LSU aufgetragen. Für OEP16.1 und OEP16.2 wurden 90-100 µg Protein aufgetragen. OEP16.2 und LSU (Große Untereinheit der Rubisco) wurden als Auftragsmarker benutzt. Der Antikörper gegen PORA erkennt auch PORB, deshalb sind beide Banden sichtbar (Pfeil: PORA, Stern: PORB). Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. ho: homozygote Mutation von OEP16.1, wt: Wildtypallel für OEP16.1. Nummerierung Linien: siehe Abbildung 18. (B) Proteinbanden auf der Höhe von maturem POR (36 kDa, siehe (A)) wurden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie untersucht (LC-MS/MS; Zentrallabor für Proteinanalytik, Adolf-Butenandt Institut, LMU München). Spezifisch detektierte Peptidfragmente für PORA und PORB sind umrahmt. Die Abbildung (modifiziert) wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

In allen Linien, unabhängig von der OEP16.1 Mutation, konnten im Gegensatz zu den Untersuchungen von Pollmann et al., (2007) die maturen Proteine von sowohl PORA als auch PORB detektiert werden. Somit kann OEP16.1 unmöglich die Importpore für prePORA sein.

#### 4.5.1.3 Weitere T-DNA Insertionen in der Linie SALK\_024018

Der leichte De-Etiolierungs-Phänotyp in der Linie SALK\_024018 ist damit also unabhängig von der OEP16.1 Mutation. Allerdings konnte er auch in einigen gekreuzten OEP16.1 Wildtypallelen beobachtet werden (vgl. Linie #19.3 in Abbildung 19). Deshalb wurde untersucht ob weitere T-DNA Insertionen in der Linie SALK\_024018 vorliegen. Die T-DNA „pROK2“, die vom SALK Institut für solche Mutationen verwendet wird, trägt eine Kanamycin Resistenzkassette. Alle für *oep16.1-1* homozygoten Linien hatten, wie zu erwarten war, eine 100%ige Kanamycinresistenz. Überraschenderweise zeigten aber auch die OEP16.1-Wildtypelinien #2.2 und #4.2 eine 100%ige Kanamycinresistenz, die auf weitere T-DNA Insertionen hindeutet. Eine PCR mit M13 Primern, die auf der pROK2 DNA aufsetzen, ergab zudem mehrere Banden, die ebenfalls auf weitere Insertionen schließen ließen (nicht gezeigt). Deshalb wurde von einigen OEP16.1 Wildtypallelen der SALK\_024018 Linie, die den Ergrünungs-Phänotyp zeigten, DNA extrahiert und mittels inverser PCR und TAIL- (*thermal asymmetric interlaced*) PCR nach weiteren T-DNA Insertionen gesucht (vgl. Kapitel 3.3.6.3 und Kapitel 3.3.6.4).

In der Linie #3.1 mit einem De-Etiolierungs-Phänotyp von 37% (vgl. Abbildung 18) wurde durch inverse PCR eine zweite pROK2 T-DNA Insertion identifiziert. Diese Insertion sitzt demnach im 5' UTR (*untranslated region*), 4 Basenpaare vor der kodierenden Sequenz des Gens At1g70370 (Abbildung 22). Das korrespondierende Protein ist AroGP1, der nicht katalytischen  $\beta$ -Untereinheit des Polygalacturonase Isoenzym 1 (PG1) aus Tomate, sehr ähnlich (57% Aminosäuregleichheit). Bis jetzt ist allerdings weder die Funktion, noch ein Phänotyp bei Funktionsverlust dieses Proteins in *Arabidopsis* bekannt.



**Abbildung 22: Molekulare Charakterisierung aller bekannten T-DNA Insertionen der Linie SALK\_024018.**

Insertionsorte und Segregation wurden mittels genspezifischer (GS) und T-DNA spezifischer (LB, RB) Primerkombinationen untersucht (siehe Tabelle 2). **(A)** Bereits beschriebene und bekannte Insertion in OEP16.1 (vgl. Philippar et al., 2007). **(B)** Mittels inverser PCR entdeckte T-DNA Insertion im 5' UTR des Gens AroGP1 ( $\beta$ -Untereinheit der Polygalakturonase). Die Insertion bewirkt eine Deletion von 13 bp. **(C)** Mittels TAIL-PCR identifizierte dritte Insertion in der Promotorregion der Chorismat Mutase 1 (CM1). Die „right border“ (RB) der inserierten T-DNA ist verkürzt, die „left border“ (LB) ist am 3' Ende der T-DNA zu finden. Diese pROK2 Insertion führt zudem noch zu einer Deletion von 179 bp. Exons sind als schwarze Pfeile eingezeichnet, Introns als Striche. Rechts: Ergebnisse der genspezifischen und T-DNA spezifischen PCR auf genomischer DNA; die Größen der amplifizierten DNA Stücke sind angegeben. ho: homozygote Mutation des betroffenen Gens, wt: Wildtypallel für das betroffene Gen. Die Insertionsorte wurden durch Sequenzierung der jeweiligen PCR-Produkte identifiziert. Die Abbildung wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

Bei der Untersuchung der Linie #2.2, die das Wildtypallel für OEP16.1 und für AroGP1 beinhaltet (Tabelle 12), wurde mittels TAIL-PCR zudem noch eine dritte T-DNA Insertion gefun-

den (Abbildung 22). Hier war die Insertion in der Promotor-Region des Gens At3g29200 lokalisiert. Dieses Gen kodiert für die in Plastiden lokalisierte Chorismat Mutase 1 (CM1) in *Arabidopsis*. Um festzustellen, ob einer der Mutationen in AroGP1 oder CM1 den Ergrünungsphänotyp in SALK\_024018 verursacht, wurde die Genotypisierung alle drei T-DNA Insertionen in die Quantifizierung des De-Etiolierungs-Phänotyps mit einbezogen. Die entsprechenden Linien wurden in einer PCR mit Gen- und T-DNA –spezifischen Primern untersucht (Tabelle 12; Oligonukleotidprimer siehe Tabelle 2)

**Tabelle 12: T-DNA Insertionen im Zusammenhang mit dem De-Etiolierungs-Phänotyp in verschiedenen Nachkommen der SALK\_024018 Linie.**

Es wurden 3 unabhängige Experimente quantifiziert. Det-p (%): % der Keimlinge, die den Ergrünungsphänotyp zeigen (Mittelwert aus drei unabhängigen Wiederholungen), n: Anzahl der ausgezählten Keimlinge. ho: homozygote Mutation des jeweiligen Gens, wt: Wildtypallel für das jeweilige Gen. Nummerierung Linien: siehe Abbildung 18. Die Tabelle wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

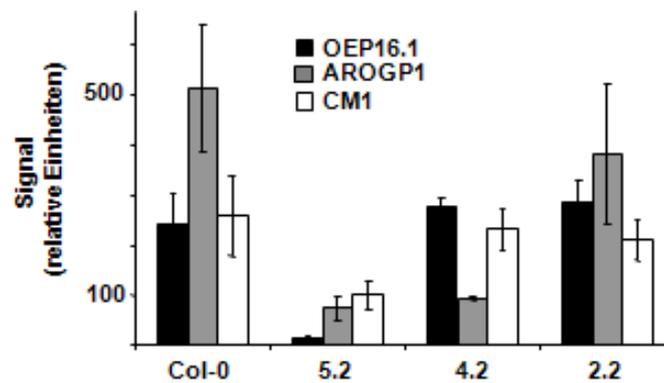
	<i>oep16.1-1</i>	<i>arogp1-1</i>	<i>cm1-1</i>	det-p in %	n
Col-0	wt	wt	wt	14.7	265
<i>flu</i>	wt	wt	wt	31.6	196
F6-4a	ho	wt	wt	70.7	215
5.2	ho	ho	ho	85.8	190
5.10	ho	ho	ho	49.2	130
4.1	ho	ho	wt	15.0	233
4.2	wt	ho	wt	46.9	177
19.3	wt	wt	wt	48.4	182
2.2	wt	wt	ho	5.1	217

Leider konnte auch keine der beiden zusätzlichen T-DNA Insertionen direkt mit dem Auftreten des Ergrünungsphänotyps in Zusammenhang gebracht werden. So ist Linie #2.2 nur für *cm1-1* homozygot, hat aber keinen Phänotyp. Zwar hat die Linie #4.2 46,9% sterbende Keimlinge und ist nur für *arogp1-1* homozygot, jedoch zeigt sich das gleiche Ausmaß an Phänotyp (48,4%) auch in der Linie #19.3, die für alle drei Insertionen Wildtyp ist. Somit kann auch ein additiver Effekt der Mutationen ausgeschlossen werden. Da die Wildtyplinie #19.3 fast 50% Phänotyp hat, jedoch weder Kanamycin resistent war (nicht gezeigt), noch ein PCR Produkt bei einer M13 PCR ergab, konnte eine weitere T-DNA Insertion nahezu sicher ausgeschlossen werden.

#### 4.5.1.4 Analysen auf DNA- und RNA-Ebene unter Berücksichtigung aller T-DNA Insertionen in SALK\_024018

Da keine der identifizierten T-DNA Insertionen in der Linie SALK\_024018 direkt mit dem Auftreten des beobachteten Ergrünungsphänotyps korrelierte, wurde im Folgenden auf möglicherweise durch Punktmutationen und/oder „T-DNA footprint“ Mutationen verursachte Defekte im Genom untersucht. Zuerst wurde überprüft, ob der Ergrünungsphänotyp nicht auf eine Mutation des *FLU* Gens zurückzuführen ist, da hier ein solcher Phänotyp bereits beschrieben wurde (Meskauskiene et al. 2001, op den Camp et al. 2003). Mehr als 10 PCR Produkte des *FLU* Gens wurden sequenziert. Als Matrize diente dabei genomische DNA, die von den Linien #F6-4a und #19.3 isoliert wurde (Genotyp und Phänotyp siehe Tabelle 12). Dabei konnten jedoch keinerlei Mutationen von *FLU* oder andere Auffälligkeiten festgestellt werden.

Um durch Punkt- und/oder „T-DNA footprint“ Mutationen verursachte Expressionsunterschiede auf Transkript-Ebene aufzuspüren, wurden des weiteren DNA Microarray-Analysen (Affymetrix ATH1 Genechip) an RNA aus *Arabidopsis* Keimlingen verschiedener Nachkommen der SALK\_024018 Linie durchgeführt. Hierzu wurden die Linien #5.2 und #4.2 mit 85,8% bzw. 46,9% De-Etiolierungs-Phänotyp (vgl. Tabelle 12) sowie die Linie #2.2 und der Wildtyp Col-0 (jeweils kein Phänotyp) verglichen. Zunächst wurde der mRNA Level der durch T-DNA Insertion mutierten Gene *AroPG1*, *CM1* und *OEP16.1* ermittelt (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Transkriptlevel von OEP16.1, AroGP1 und CM1 in verschiedenen SALK\_024018 Linien.**

Die Transkriptlevel (relative Einheiten) wurden mittels Microarray-Analyse (Affymetrix ATH1 Genechip) ermittelt. Die aufgeführten Werte sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, außer für AroGP1 in Linie #4.2 (n=2), die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Der mRNA-Gehalt aus 8 Tage alten Keimlingen der Linie #5.2 (ho für OEP16.1, für AroGP1 und CM1) wurde mit den der Linien #4.2 (wt für OEP16.1 und CM1, ho für AroGP1) und #2.2 (wt für OEP16.1 und AroGP1, ho für CM1) verglichen. Nummerierung Linien: siehe Abbildung 18. Zu Genotyp und Phänotyp der Linien siehe auch Tabelle 12. ho: homozygote Mutation des jeweiligen Gens, wt: Wildtypallel für das jeweilige Gen. Die Abbildung (modifiziert) wurde bereits in Pudelski et al. (2009) veröffentlicht.

Die T-DNA Insertion im 5' UTR von AroGP1 führte zu einer Reduktion der Transkripte auf, im Vergleich zum Wildtyp Col-0, 14,8% in Linie #5.2 bzw. 18,4% in Linie #4.2. Die pROK2 Insertion in die Promotorregion von CM1 bewirkte, dass nur 19,4% mRNA in Linie #5.2, verglichen zum Transkriptgehalt in Col-0, detektierbar waren. Überraschenderweise war jedoch in Linie #2.2, die ebenfalls homozygot für die Mutation von CM1 ist, keine Reduktion der CM1 Transkripte nachzuweisen.

Anhand der Analyse der Microarray-Daten wurden weitere Gene mit einem in den Phänotyp Linien #5.2 und #4.2 reduzierten Transkriptgehalt überprüft. Zum Vergleich wurde jeweils der Transkriptlevel des Wildtyps Col-0 sowie der Phänotyp-losen Linie #2.2 (vgl. Tabelle 5) herangezogen. Insgesamt ergab dieser Vergleich der Transkriptlevel auf der Ebene des gesamten Genoms keinerlei signifikant regulierten Gene (Dr. Katrin Philipp, persönliche Mitteilung). 11 im Transkriptgehalt leicht veränderte Gene hatten jedoch entweder eine mögliche Funktion im pflanzlichen Ergrünungsprozess oder waren in Plastiden lokalisiert (Tabelle 13) und wurden daher auch auf genomischer Ebene untersucht.

**Tabelle 13: Liste der überprüften, potentiellen Kandidaten für den De-Etiolierungs-Phänotyp in Linie #5.2 und #4.2**

Soweit nicht anderweitig angegeben beziehen sich alle Angaben auf TAIR (*the Arabidopsis information resource*, Swarbreck et al., 2008).

Gene mit reduzierter Expression (Affymetrix-daten)	AGI-code	Funktion
GPRI1	At2g20570	Gold2-ähnliches Protein (Positive Regulierung von Transkription, Tamai et al. 2002)
ThioRDX	At1g08570	Thioredoxin-Familien-Protein (Redox Homöostase in Zellen, Dangoor et al. 2009)
ukCHL	At1g20070	Protein mit einer hypothetischen Funktion in Chloroplasten
ukSmall	At3g30720	Protein mit einer hypothetischen Funktion in Zellkomponenten
SEN1	At4g35770	Seneszenz assoziiertes Gen 1; Dunkel induziert (Reaktion auf Alterung, Jasmonatsäure, oxydativen Stress und Verwundung; in Chloroplasten, Oh et al. 1996)
LTP	At1g62510	Lipid Transfer Protein (Protease Inhibitor, Lipidbindung bei der Nährstoffeinlagerung in Samen, Rueckert und Schmidt, 1990)
SDR	At1g64590	Dehydrogenase/Reduktase kurzer Ketten(Oxidoreduktase-Aktivität bei metabolischen Prozessen, Cheng et al. 2002)
SAUL1	At1g60190	Seneszenz- assoziierte E3 Ubiquitin Ligase 1 (Proteinbindung, Ubiquitin-Protein Ligase Aktivität, Zinkionen Bindung, Raab et al. 2009)
ukThy	At5g02160	Protein mit einer hypothetischen Funktion an der chloroplastidären Thylakoidmembran
COR15a	At2g42540	Kälte reguliert 15a (Kälteanpassung, Rot- oder Hellrotes Licht Signalpfad; Kälte und Frostantwort. Antwort auf Trockenstress, im Stroma der Chloroplasten, Nakayama et al. 2007)
PGSIP5	At1g08990	Pflanzen Glycogenin-ähnliches Stärke Initiations Protein 5 (Transferase, Transfer von Glycosylgruppen, Chatterjee et al. 2005)

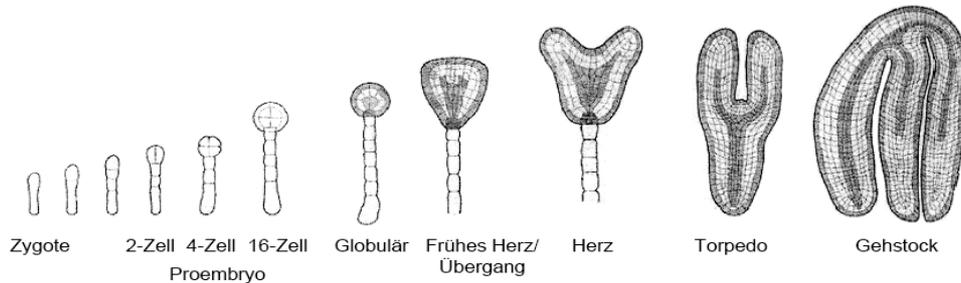
Von diesen Genen wurde ebenfalls die genomische DNA mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Leider konnte für keines dieser Gene eine weitere Mutation nachgewiesen werden. Auch korrelierte der reduzierte Transkriptgehalt nicht mit dem Auftreten des Phänotyps. Somit konnte die Ursache des Ergrünungsphänotyps in einigen Nachkommen der Linie SALK\_024018 nicht alleine auf eine Mutation zurückgeführt werden bzw. nicht 100%ig geklärt werden (siehe dazu auch Kapitel 5.2.3).

#### 4.6 Die Rolle von OEP16.2 in der Samenentwicklung

Die Expressionsmuster von OEP16.1 und OEP16.2 sind, wie bereits gezeigt wurde (vgl. Abbildung 5) absolut konträr. Während OEP16.1 offensichtlich seine Hauptfunktion in den grünen Geweben adulter Pflanzen hat, ist es naheliegend zu vermuten, dass OEP16.2 eine Funktion in der Samenreifung, der Samenruhe und der Keimung hat. Da die Expression dieser Isoform sehr spezifisch nur in den Samen und in maturen Pollen auftritt und zudem sehr hoch ist, nimmt OEP16.2 in diesen pflanzlichen Entwicklungsstadien möglicherweise eine äußerst wichtige Schlüsselfunktion ein. Während der Pollenkeimung zeigten OEP16.2 *knockout* Mutanten keinen auffälligen Phänotyp (siehe Kapitel 4.4.1), daher wurden im Folgenden

OEP16.2 *knockout* Linien in *Arabidopsis* auf einen Phänotyp in der Samenentwicklung und Keimung untersucht.

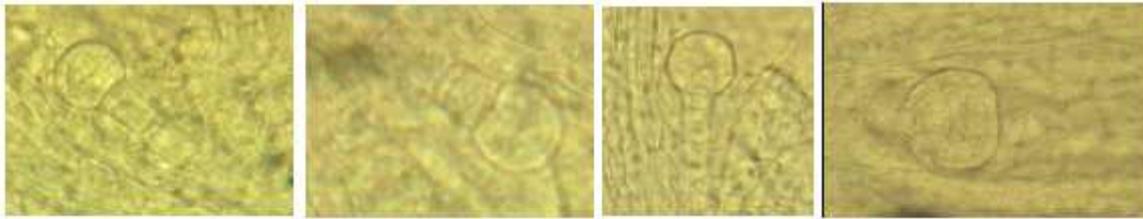
#### 4.6.1 Embryonal- und Samenentwicklung in *oep16.2-1 knockout* Linien



**Abbildung 24: Entwicklungsstadien der Embryogenese in *Arabidopsis thaliana***

In den Proembryostadien findet zuerst ausschließlich die Zellteilung statt. Während des Globulär- und Übergangsstadiums kommt es zu ersten gewebespezifischen Ausdifferenzierungen. Das Protoderm, Grundmeristem und das Prokambium werden gebildet. Im Herzstadium werden die Kotyledonen angelegt und es bilden sich Spross- und Wurzelmeristem aus. Im Torpedostadium findet das Streckungswachstum der Achse statt und die Kotyledonen werden zu Vorratsorganen weiterentwickelt. Sie lagern Proteine, Stärke und Lipide ein und beginnen sich zu beugen. Noch im Gehstockstadium ist der fast schon mature Embryo grün gefärbt. Erst bei der weiteren Reifung trocknet der Samen aus und bekommt die typische Braunfärbung. In diesem Zustand ist er trockenstolerant und vorerst in der so genannten Samenruhe. Diese kann durch Vernalisation, die Behandlung mit Feuchte und Kälte, gebrochen werden. Nach ca. zwei Wochen lässt sie nach und die Samen sind bereit zur Keimung (zur Übersicht siehe Bentsink und Koornneef 2002).

In *Arabidopsis* gibt es während der Embryogenese mehrere Entwicklungsstadien (Abbildung 24). Wie bereits in Abbildung 8 gezeigt wird OEP16.2 erst im Übergangs- und Herzstadium exprimiert. Zur gleichen Zeit wird OEP16.1 nicht mehr exprimiert. Dies sind die Stadien, in denen die tatsächliche gewebespezifische Ausdifferenzierung im Samen beginnt. Alle Entwicklungsstadien von Samen der homozygoten *oep16.2-1* Linie wurden mittels Hoyers-Lösung (Liu und Meinke 1998) für die Mikroskopie entfärbt und mit Wildtypsamen verglichen. Besondere Aufmerksamkeit galt vor allem dem Globulär- und Übergangsstadium, in dem die Kontrolle der Samenentwicklung von maternal auf filial wechselt (Abbildung 25, zur Übersicht siehe Weber et al. 2005).



**Abbildung 25: Embryonen aus *oep16.2-1* Mutanten im Globulär- und Übergangsstadium.**

Die Pflanzen der Mutantenlinie waren unter den üblichen Standardbedingungen (Langtag, 16h Licht 21°C, 8h Dunkel 16°C) gewachsen. Die Samen wurden aus den Schoten entnommen, sofort präpariert, mittels Hoyerslösung entfärbt und mikroskopiert (vgl. Kapitel 3.5.1).

Da in diesem Stadium keine Anomalien oder Wachstumsdefizite erkennbar waren, wurden auch die weiteren Embryonalstadien bis hin zum Gehstockstadium untersucht (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Embryonen aus *oep16.2-1* Mutanten im Globulär-, Übergangs-, Herz-, Torpedo- und Gehstockstadium.**

Die Mutterpflanzen waren unter den üblichen Standardbedingungen (Langtag, 16h Licht 21°C, 8h Dunkel 16°C) gewachsen. Die Samen wurden aus den Schoten entnommen, sofort präpariert, mittels Hoyerslösung entfärbt und mikroskopiert.

Unter den Standard-Wachstumsbedingungen konnte in keinem der Embryonalstadien ein Entwicklungsdefizit in *oep16.2* Mutanten festgestellt werden.

Die Anzahl der Schoten, das Frischgewicht der Schoten mit und ohne Samen, sowie die Anzahl und das Frischgewicht der Samen pro Schote jedes Entwicklungsstadiums wurde ebenfalls untersucht. In 10 unabhängigen Wiederholungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den *oep16.2-1* Mutanten und den zugehörigen Wildtypen festgestellt werden.

Für Keimungstests unter Standardbedingungen wurden je 50 Samen auf Medium mit 1% Saccharose ausgebracht, zwei Tage bei 8°C stratifiziert und anschließend bei 21°C, 16 h Licht und 16°C, 8 h Dunkel gekeimt. Dabei wurde die homozygote Einzelmutante *oep16.2-1* sowie die homozygote Doppelmutante *oep16.2/16.4* mit den korrespondierenden Wildtypen verglichen. In vier unabhängigen Versuchen konnte erneut kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

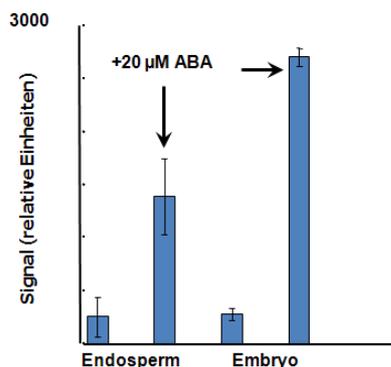
Ein Dormanztest wurde ebenfalls durchgeführt. Dazu wurden Samen aus Schoten, die gerade gelb geworden waren, geerntet und direkt ausgesät. Je ca. 80 Samen der *oep16.2-1* Einzel-,

der *oep16* Triple-Mutante und der zugehörigen Wildtypen wurden auf Medium mit und ohne Zugabe von 1% Saccharose ausgelegt. Die Samen wurden anschließend ohne Kältebehandlung direkt bei Standardbedingungen (21°C, 16 h Licht und 16°C, 8 h Dunkel) inkubiert. Die Keimung wurde alle zwei Tage überprüft. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen OEP16.2 Mutantenlinien und Wildtypen festgestellt werden. Da der Ökotyp Col-0 generell dafür bekannt ist, nur eine sehr geringe Samenruhe zu zeigen (Dr. Stefan Hoth, Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen-Nürnberg, persönliche Mitteilung) und alle Mutationen im Col-0 Hintergrund geschaffen worden waren, wurde dieser Versuch nach nur einer Wiederholung eingestellt.

#### 4.6.2 Samen-Keimung von OEP16.2 Mutanten unter ABA Zugabe

Da unter Standard-Wachstumsbedingungen keine Wachstumsdefizite in den Mutanten nachgewiesen werden konnten, wurden andere Bedingungen getestet.

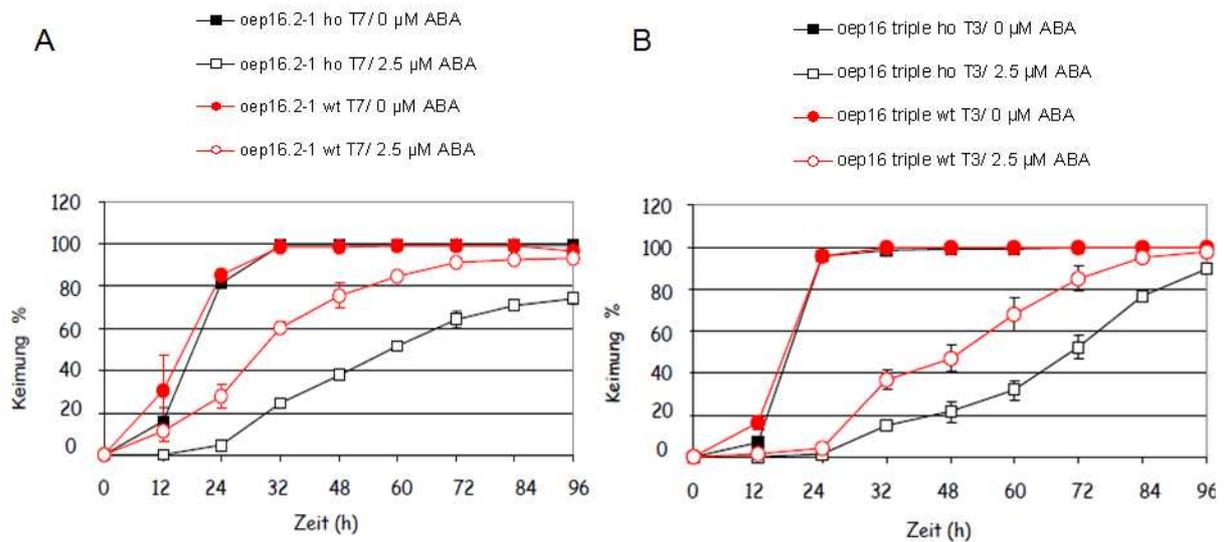
Penfield et al. konnten 2004 durch Microarray-Analysen von Samengewebe und Drea et al. (2006) anhand von ABA-Signalmutanten zeigen, dass die Genexpression von OEP16.2 durch das Phytohormon Abszisionsäure (ABA) induziert wird (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Induktion von OEP16.2 durch 20  $\mu$ M ABA in Endosperm und Embryo von *Arabidopsis* Samen (Penfield et al. 2004).**

Der OEP16.2 Transkriptgehalt ist in relativen Einheiten (normiertes Microarray-Signal) angegeben, die Standardabweichung ist eingezeichnet.

Daher wurde die Keimung von Samen der OEP16.2 Mutanten unter Einfluss von ABA im Vergleich mit Wildtypsamens getestet. Durchgeführt wurden die Versuche in der Gruppe von Dr. Stefan Hoth.

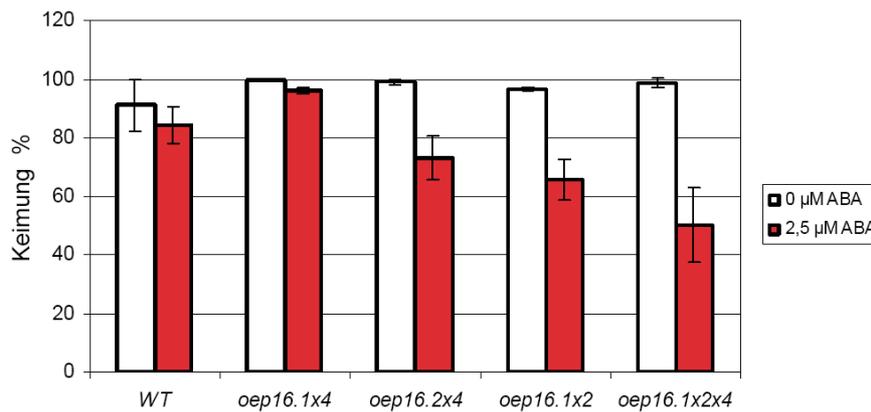


**Abbildung 28: Keimungstest der *oep16.2-1* Einzel- und *oep16.1/16.2/16.4* Triple-Mutanten unter ABA-Einfluss (Dr. Stefan Hoth, Erlangen)**

Der Keimungsverlauf von jeweils ca. 100 Samen wurde über 96 Stunden im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypsamen auf Medium mit 2,5 µM ABA (ABA, offene Kreise und Rechtecke) und ohne ABA aufgezeichnet (geschlossene Kreise und Rechtecken). Die Keimungsrate (in %) wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte ( $n=3$ ,  $\pm$  SA). **(A)** Einzelmutante *oep16.2-1*, ho: homozygote Mutation von OEP16.2, wt: Wildtypallel für OEP16.2. **(B)** Triple-Mutante *oep16.1-1/oep16.2-1/oep16.4-2*, ho: homozygote Mutation von OEP16 *triple*, wt: Wildtypallel für OEP16.1/2/4.

Dabei wurden Samen auf Medium mit 2,5 µM ABA ausgesät. Getestet wurden jeweils zwei aufeinander folgende Generationen. Alle Pflanzen von denen Samen geerntet wurden wuchsen unter den exakt gleichen Bedingungen. Unter ABA-Einfluss keimten die Samen der OEP16.2 Mutanten signifikant langsamer als die der korrespondierenden Wildtypen und erreichten auch nach 96 Stunden keine 100% Keimungsrate (Abbildung 28). Dieses Ergebnis ließ sich auch in der 2. Generation reproduzieren und ist somit unabhängig von den Erntebedingungen zu sehen.

Um des weitern einen Einfluss durch den Verlust von OEP16.1 und OEP16.4 ausschließen zu können, wurden in einem weiteren Experiment alle verfügbaren *oep16* Doppel- und Triple-Mutanten im Vergleich zu ihren jeweiligen Wildtypelinien getestet (Abbildung 29).



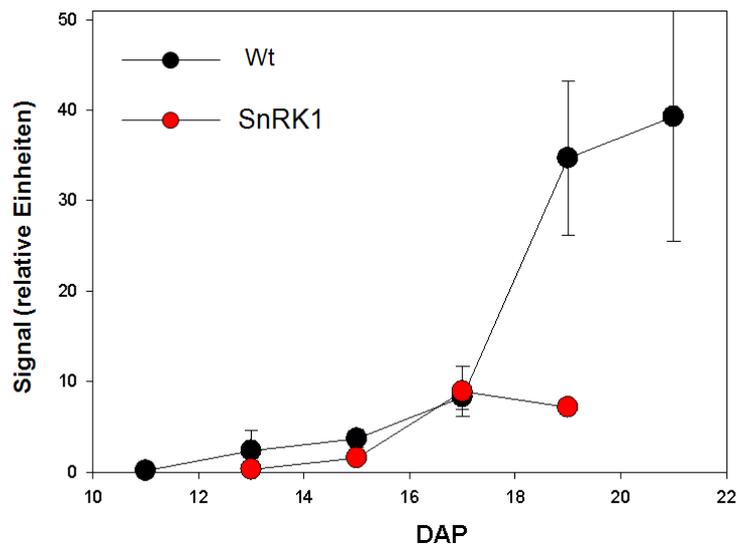
**Abbildung 29: Keimungstest der *oep16* Doppel und Triple-Mutanten unter ABA-Einfluss** (Dr. Stefan Hoth, Erlangen).

Die Keimungsrate (in %) von je ca. 100 Samen wurde in drei unabhängigen Experimenten nach 72 h Inkubation auf Medium mit 2,5 μM ABA (rot) und ohne ABA (weiß) ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=3, ± SA). wt: Wildtypallel für OEP16.1/2/4.

Sowohl die Samen der *oep16* Triple-Mutantenlinie als auch die Samen der *oep16.1x2* und *oep16.2x4* Doppelmутantenlinien zeigten nach 72 h Belichtung unter ABA Einfluss eine signifikant geringere Keimungsrate. Im Vergleich dazu war die Keimungsrate bei den Wildtyplinien und der *oep16.1x4* Doppelmутante nur unwesentlich beeinträchtigt. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die verringerte Keimfähigkeit der Mutanten auf den Verlust von OEP16.2 zurückzuführen ist. Um ganz sicher zu gehen wurden alle Linien mit der genomischen Sequenz von OEP16.2 transformiert. Die Ergebnisse zu Versuchen mit Samen dieser komplementierten Linien stehen noch aus.

#### 4.6.3 ABA-Induktion der Genexpression von OEP16.2 in Erbsensamen

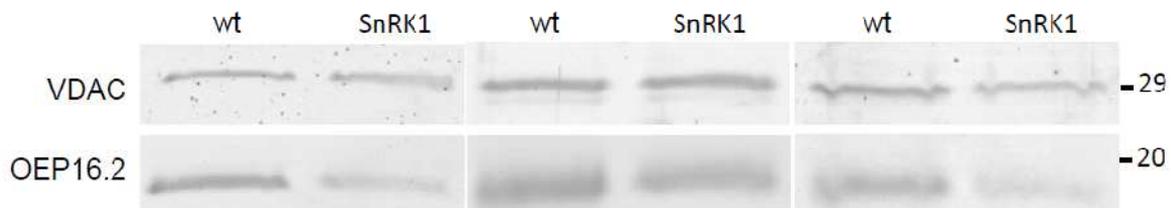
SnRK1, die *Sucrose-non-fermenting-like* Kinase in Erbse ist ein Mediator für die Funktion von ABA während der Samenreifung (Radchuk et al. 2006). *snrk1* Mutantenlinien in denen die Expression von SnRK1 unterdrückt wurde (*knockdown*), reagieren wie ABA-insensitive Mutanten und weisen pleiotrope Defekte während der Samenreifung auf (Radchuk et al., 2006). In Zusammenarbeit mit Dr. Hans Weber (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK–Gatersleben) wurde festgestellt, dass der Transkriptgehalt der OEP16.2 Isoform aus Erbse in *snrk1 knockdown* Samen während der Entwicklung im Vergleich zu den Wildtypsamen stark verringert war (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Expression von OEP16.2 während der Samenentwicklung in Erbse.**

RNA-Gehalt von Ps-OEP16.2 (relative Einheiten) in Wildtyp (schwarze Kreise) und *snrk1* (rote Kreise) Samen (Dr. Hans Weber, unveröffentlichte Daten). Datenpunkte sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ( $n=2$ ,  $\pm$ SD). DAP: *Days after pollination* = Alter der Erbsensamen in Tagen nach Bestäubung.

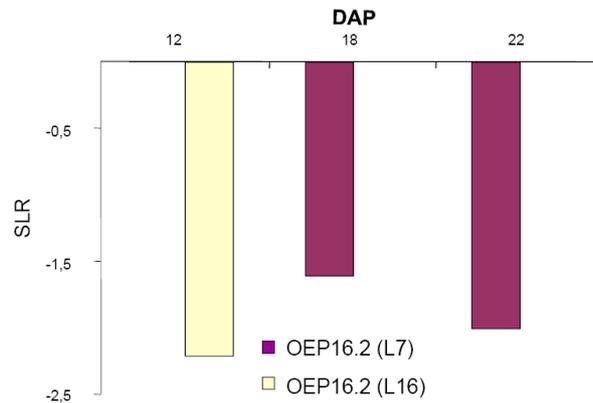
Auch auf Proteinebene konnte in drei unabhängigen Wiederholungen eine ca. 35%ige Reduktion von Ps-OEP16.2 in den *snrk1 knockdown* Samen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Proteingehalt von Ps-OEP16.2 in Wildtyp und *snrk1* Samen 20 Tage nach Bestäubung.**

Immunoblots vom Ps-OEP16.2 Antiserum gegen Proteinextrakte aus Wildtyp- und *snrk1*-Erbsensamen (aufgetragen: je ca. 4  $\mu$ g Samenprotein) aus drei unabhängigen biologischen Wiederholungen. Ein Antiserum gegen das mitochondrielle Porin VDAC wurde als Auftragsmarker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. *snrk1* Samen wurden von Dr. Hans Weber zur Verfügung gestellt.

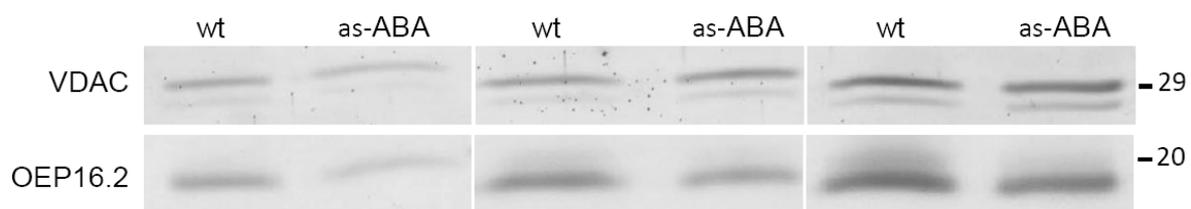
In Erbsensamen, die durch eine Mutation im ABA Biosyntheseweg (*as-ABA*) einen reduzierten ABA-Gehalt im Samen aufweisen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hans Weber mittels Array-Analysen ebenfalls eine Reduktion des Ps-OEP16.2 mRNA Gehalts im Vergleich zu Wildtypsamen festgestellt (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Regulation des Transkriptgehaltes von Ps-OEP16.2 in *as-ABA* Samen im Vergleich zum Wildtyp. (Dr. Hans Weber, unveröffentlichte Daten)**

Dargestellt ist der logarithmierte Quotient des Transkriptgehaltes von Ps-OEP16.2 in *as-ABA* versus Wildtypsamen (SLR: *signal log ratio*). Es wurden zwei unabhängige *as-ABA* Mutantenlinien (L7 und L16) untersucht. DAP: *Days after pollination* = Alter der Erbsensamen in Tagen nach Bestäubung.

Die Reduktion der OEP16.2 Transkripte in den *as-ABA* Samen auf ca. 20-30% des Wildtyp-levels konnte auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Proteingehalt von Ps-OEP16.2 in Wildtyp und *as-ABA* Samen 22 Tage nach Bestäubung.**

Immunoblots vom Ps-OEP16.2 Antiserum gegen Proteinextrakte aus Wildtyp- und *as-ABA* (L7)-Erbsensamen (aufgetragen von links nach rechts: ca. 4 µg, 6 µg und 8 µg Samenprotein) aus drei technischen Wiederholungen. Ein Antiserum gegen das mitochondrielle Porin VDAC wurde als Auftragsmarker verwendet. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. *as-ABA* Samen wurden von Dr. Hans Weber zur Verfügung gestellt.

Eine Induktion der Expression von OEP16.2 durch das Trockenstress- und Dormanzhormon ABA (zur Übersicht siehe Weber et al. 2005) konnte somit sowohl in Samen von *Arabidopsis* als auch von Erbse gezeigt werden. Im Zusammenhang mit dem ABA-abhängigen Keimungsphänotyp der *oep16.2* Mutanten ist damit eine essentielle Rolle des Proteins während der Samenreifung und der Dormanz wahrscheinlich.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Subzelluläre Lokalisation und Gewebe-spezifische Expression der OEP16 Proteine in Pflanzen

Die PRAT Überfamilie zeichnet sich besonders durch ihre Diversität bezüglich der Proteinfunktion in Aminosäure- und Präproteintransport, sowie der unterschiedlichen Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien aus (zur Übersicht Pudelski et al. 2010, Abbildung 1). Alle Mitglieder dieser Überfamilie haben vier Membran-durchspannende  $\alpha$ -Helices, eine Tim17 Domäne (Pfam protein family database PF02466; Finn et al. 2008) und keine klassischen, abspaltbaren Signalpeptide für das Targeting zu den Organellen. Das sogenannte PRAT-Motif, das für TIM22, TIM23, TIM17 und OEP16 beschrieben wurde (Rassow et al. 1999), ist nicht in allen Sequenzen der PRAT Proteine zu finden (Murtha et al. 2007, Pudelski et al. 2010).

Die subzelluläre Lokalisation der PRAT Proteine ist divers. Alle pflanzlichen Isoformen von TIM17, TIM23 und TIM22 sind aller Wahrscheinlichkeit nach in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die beiden PRAT1 Proteine befinden sich in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten und die beiden PRAT2 Isoformen sind sogar höchstwahrscheinlich dual in Chloroplasten (innere Hüllmembran) und Mitochondrien (äußere Membran) lokalisiert. Die bis jetzt kaum analysierten PRAT4 und PRAT3 sind wiederum in mitochondrialen Membranen zu finden (Murtha et al. 2007, Philippar et al. 2007, zur Übersicht: Pudelski et al. 2010).

OEP16.1 dagegen wurde von Pohlmeier et al. bereits 1997 aus der äußeren Hüllmembranfraktion von Erbsenchloroplasten isoliert. Diverse Proteomanalysen seither haben die Lokalisation von OEP16.1 in *Arabidopsis*-Chloroplasten, Blumenkohl-Proplastiden und Chloroplasten-Membranfraktionen von *Arabidopsis*, Erbse und Mais bestätigt und die große Abundanz des Proteins gezeigt (Ferro et al. 2003; Froehlich et al. 2003; Kleffmann et al. 2004; Bräutigam et al. 2008a, b; Zybaylov et al. 2008; Bräutigam und Weber 2009). Murtha et al. (2007) konnten mit *in vitro* Protein-Importstudien in Erbsenchloroplasten bereits zeigen, dass sowohl At-OEP16.1 als auch At-OEP16.2 ausschließlich im Chloroplasten und nicht im Mitochondrium lokalisiert sind. Erschwert durch das besondere Expressionsverhalten von OEP16.2, in ausschließlich den Samen, Pollen und Kotyledonen, war bis dato die Lokalisation von OEP16.2 *in vivo* nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Isolierung der cDNA Sequenz für OEP16.2 aus Erbse erstmalig den eindeutigen Nachweis der

Insertion von Ps-OEP16.2 in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten (Abbildung 12). Aufgrund der sehr geringen Expression von OEP16.2 zum Zeitpunkt der Isolation der Hüllmembranen aus jungen Erbsen-Pflanzen (10 Tage alt) musste sehr viel Proteinextrakt verwendet werden, weshalb jeweils Kreuzreaktionen in der inneren und äußeren Hüllmembran detektiert wurden. Das Signal von OEP16.2 in der äußeren Membran war jedoch eindeutig. Ein Nachweis für OEP16.2 in Hüllmembranen aus *Arabidopsis* Chloroplasten war nicht möglich, da diese erst aus Blättern isoliert werden können, in denen At-OEP16.2 nicht exprimiert wird (3 Wochen alte Pflanzen, vgl. Abbildung 8). Importstudien und Untersuchungen der Expressionsmuster von Murcha et al. 2007 beweisen allerdings auch hier die Lokalisation in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten. Aufgrund der generell niedrigen Expression von At-OEP16.4 und eines fehlenden spezifischen Antikörpers für ein mögliches orthologes Protein in Erbse, war eine genaue subzelluläre Lokalisation nicht möglich. Eine Isolierung der OEP16.4 Isoform aus Erbse parallel zum erfolgreichen Ansatz für Ps-OEP16.2 war im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich. Murcha et al. (2007) konnten mittels eines N-terminalen OEP16.4 GFP Konstrukts in *Arabidopsis* Zellkulturen und der Untersuchung von Expressionsprofilen eine eindeutige Lokalisation in den Plastiden zeigen. Außerdem deutet die Sequenzähnlichkeit zu den anderen OEP16 Isoformen (Abbildung 4, Tabelle 9) auf eine Lokalisation in Chloroplasten hin. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Expression in 11 Tage alten Keimlingen gezeigt werden (Abbildung 9), jedoch nicht in den Samen. Microarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) zeigen dagegen den höchsten Transkriptlevel von OEP16.4 in murenen Samen (Abbildung 5).

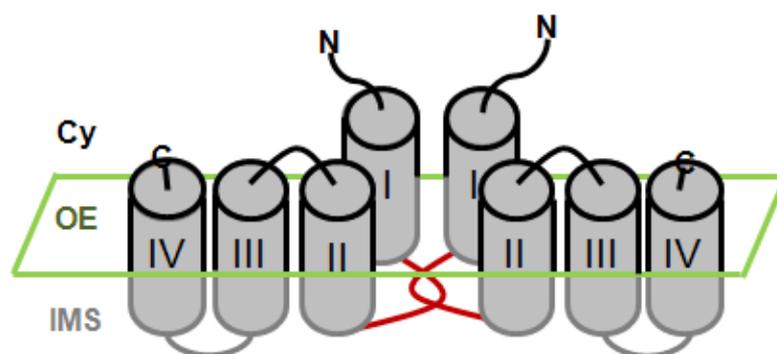
OEP16.4 war im *Split Ubiquitin* System die einzige Isoform, die sowohl Homooligomere bildete als auch mit OEP16.1 und OEP16.2 interagierte. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass OEP16.4 auch aufgrund seines ubiquitären Expressionsprofils in *Arabidopsis* als quasi „backup“ Untereinheit in heterooligomeren Kanalporen mit OEP16.1 oder OEP16.2 fungiert. Diese Heterooligomerisierung ist beispielsweise für pflanzliche K<sup>+</sup>-Kanäle beschrieben (Jeanguenin et al. 2008). Genaue *in vivo* Untersuchungen zur Heterooligomerbildung der OEP16 Kanäle stehen allerdings noch aus.

### 5.1.1 Die Membrantopologie der OEP16 Isoformen

Sowohl OEP16.1 als auch OEP16.2 sind mit vier hydrophoben, Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices tief in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Eine Untersuchung der Orientierung war deshalb aufwendig. Trotzdem zeigten beide Proteine bei Behandlung der äußeren Hüllmemb-

ran mit den Proteasen Thermolysin und Trypsin charakteristische Muster (Abbildung 13), die nur entstehen können, wenn N- und C-Terminus für die Proteasen zugänglich, d.h. *in vivo* im Zytosol, bzw. in äußeren Hüllmembran-Vesikeln nach außen lokalisiert sind (Keegstra und Youssif 1986, Waegemann et al. 1992). Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Schlussfolgerungen überein, die bereits Pohlmeier 1997 in seiner Dissertation zog.

OEP16.1, das zwischen der ersten und der zweiten Helix eine deutlich kürzere Aminosäureschleife als OEP16.2 hat, ist relativ stark vor Proteasen geschützt. Daher war mit der gleichen Proteasekonzentration kein vollständiger Verdau wie bei OEP16.2 möglich. Auf jeden Fall zeigten beide Proteine bei einem Verdau mit Thermolysin von der äußeren Seite der Hüllmembranen das gleiche Muster. Drei, nur unwesentlich kleinere Banden erschienen, die auf einen Verdau des frei nach außen ragenden N-Terminus schließen lassen. Beide Proteine haben demzufolge die gleiche Orientierung mit N- und C-Terminus im Zytosol. Dieselbe Orientierung, lässt wiederum vermuten, dass auch der Transport durch den gebildeten Kanal in die gleiche Richtung verläuft und somit beide Proteine eine ähnliche Funktion zu erfüllen haben. Die längere Aminosäureschleife des OEP16.2 Proteins zwischen der ersten und zweiten Helix, könnte in die Pore gefaltet sein und einen Selektionsfilter bilden oder der Substraterkennung dienen wie es auch für *E. coli* Porine und den spezifischen Kanal LamB beschrieben wird (Abbildung 34, zur Übersicht siehe Duy et al. 2007, Pudelski et al. 2010). Damit wäre eine andere Funktion von OEP16.2 im Vergleich zu OEP16.1 oder einfach nur eine andere Porenbildung in den Plastiden denkbar.



**Abbildung 34: Hypothetisches Modell zur Porenbildung der OEP16 Proteine.**

Die vier membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices sind mit I-IV gekennzeichnet. Die längere Peptidschleife zwischen erster und zweiter Helix ist rot markiert. N: N-Terminus; C: C-Terminus; Cy: Zytosol; OE: äußere Hüllmembran des Chloroplasten; IMS: Intermembranraum.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass OEP16.1 aus Erbse Homooligomere formt bei denen möglicherweise die ersten beiden Helices die Kanalpore ausbilden (Pohlmeier et al. 1997, Steinkamp et al. 2000, Linke et al. 2004). Diese Oligomerisierung konnte *in vitro* im *Split Ubiquitin* System auch für alle OEP16 Isoformen aus *Arabidopsis* gezeigt werden (Abbildung

15). Die größten Unterschiede zwischen OEP16.1 und OEP16.2 liegen zum einen in der sehr unterschiedlichen Expression (siehe Kapitel 4.2.1) und zum anderen in der längeren Aminosäuresequenz zwischen der ersten und der zweiten Helix. Beide Gene sollen durch eine Genduplikation zeitlich noch vor der Aufspaltung in Moose und Landpflanzen entstanden sein (Drea et al. 2006). Sie konnten in allen Arten von Landpflanzen identifiziert werden und sind damit hoch konserviert. Allerdings hat OEP16.2 in Angiospermen ein zusätzliches Exon zwischen den transmembranen Helices 1 und 2. Diese abweichende Exon-Intron Organisation und die Existenz von mehreren ABA regulierten G-Box Elementen in der Promotorregion wird von Drea et al. (2006) für die unterschiedliche Expression und Funktion von OEP16.2 im Vergleich zu OEP16.1 verantwortlich gemacht.

### 5.1.2 Die Expression der OEP16 Isoformen

Die verschiedenen Isoformen aller PRAT Proteine zeigen typischerweise ganz unterschiedliche Expressionsverhalten (Tabelle 1). Die Translokasen der inneren Hüllmembran von Mitochondrien (TIM Proteine) sind Teile der Protein-Translokations-Maschinerie in der inneren Hüllmembran von Mitochondrien. At-TIM23 und At-TIM17 bilden einen Komplex des generellen Importweges für Proteine mit einer abspaltbaren Signalsequenz. TIM22 ist am Einbau von Membran-integralen *Carrier* Proteinen mit einer internen Signalsequenz beteiligt. At-TIM23.1 ist vor allem in späten Samenentwicklungsstadien und Pollen zu finden, At-TIM23.2 ist dagegen ubiquitär auf sehr hohem Niveau exprimiert, während At-TIM23.3 ubiquitär aber auf niedrigem Niveau exprimiert wird (zur Übersicht siehe Pudelski et al. 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ähnliches auch für die Isoformen von OEP16 in *Arabidopsis* und in Erbse gilt. DNA-Microarray-Daten aus *Arabidopsis* (Abbildung 5) konnten sowohl auf RNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR (Philippar et al. 2007) und GUS-Färbung (Abbildung 6) als auch auf Proteinebene (Abbildung 8) bestätigt werden. OEP16.1 und OEP16.2 zeigen ein absolut konträres Expressionsverhalten. Folglich wären im Zusammenhang mit der längeren Peptidschleife von OEP16.2 im Intermembranraum zwei Schlussfolgerungen möglich: (i) Beide Isoformen erfüllen die gleiche Funktion nur zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Pflanzenentwicklung mit OEP16.4 als möglichem Backupsystem (siehe Kapitel 5.1, Anfang) oder (ii) beide Isoformen haben trotz hoher Sequenzähnlichkeit unterschiedliche Funktionen bzw. Substratspezifitäten.

Zum Vergleich: AtTIM23.2 ist die Hauptform der drei TIM23 Isoformen in *Arabidopsis*. Nur mit dieser Isoform war eine funktionelle Komplementation von TIM23 aus Hefe möglich (Murtha et al. 2003). Die Funktion der beiden anderen Isoformen konnte bislang nicht geklärt werden. Für Tim17, das ebenfalls drei Isoformen in *Arabidopsis* hat, ist TIM17.2 die

Hauptisoform. Unter normalen Bedingungen ist TIM17.2 essentiell für die Präproteintranslokation durch den generellen Importweg, die Bindung der Vorstufenproteine und den Transfer der Proteine zum TIM23:17 Kanal (Murcha et al. 2003, 2005a, b). Hier konnte allerdings gezeigt werden, dass sich unter Stressbedingungen die Importkapazität der Pore ändern kann (Taylor et al. 2003) und dass somit die zwei zusätzlichen Isoformen als Backup in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien fungieren könnten.

Das alles deutet auf die erste Schlussfolgerung hin, dass auch die OEP16 Isoformen ähnliche Funktionen unter verschiedenen Bedingungen erfüllen und die längere Peptidschleife von OEP16.2 möglicherweise eine Anpassung an Samen-spezifische Metabolitflüsse repräsentiert.

## 5.2 Die Funktion von OEP16.1 *in vivo*

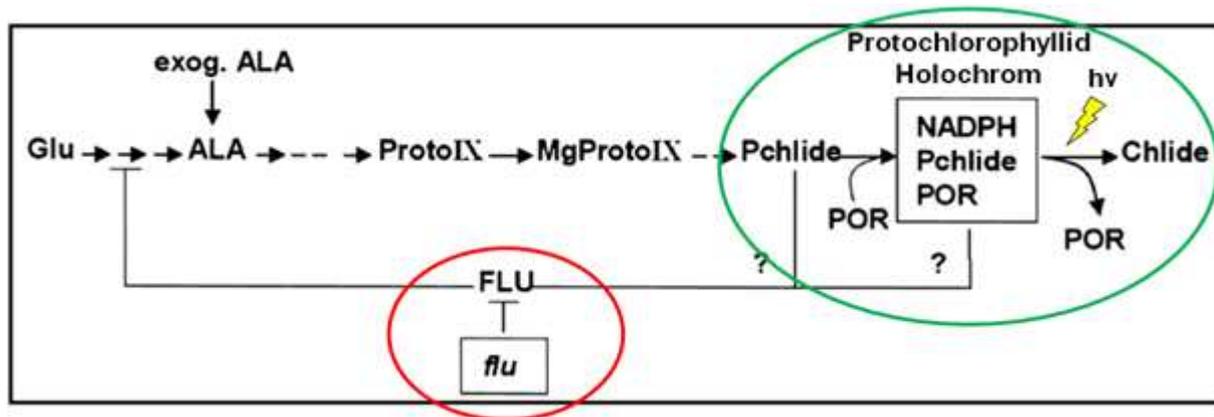
Die Funktion von OEP16.1 *in vivo* war lange Zeit ein sehr kontrovers diskutiertes Thema. Rekombinantes Ps-OEP16.1 Protein, das *in vitro* in ein Lipid Bilayer System rekonstituiert wurde, bildete einen sehr leitfähigen, leicht Kationen-selektiven Kanal. Dieser Kanal mit einem Durchmesser von ca. 1,0 nm war stark selektiv für Aminosäuren und Amine und undurchlässig für 3-Phosphoglycerat und ungeladene Zucker (Pohlmeyer et al. 1997). Der Kanal wird wahrscheinlich von einem OEP16.1 Homooligomer gebildet. Die Pore wird dabei von der ersten und zweiten Helix geformt, wobei die verbindende Peptidschleife möglicherweise als Selektionsfilter fungiert (Steinkamp et al. 2000, Linke et al. 2004). Ähnliches ist für Porine und spezifische Kanäle aus *E. coli* bekannt (zur Übersicht. Duy et al. 2007).

Eine ganz andere Funktion von OEP16.1 als Vorstufen-Translokase beim Proteinimport der Protochlorophyllid Oxidoreduktase A (PORA) wurde ebenfalls diskutiert (siehe Kapitel 1.2 und Reinbothe et al. 2004a, 2004b, Pollmann et al. 2007, Philippar et al. 2007).

Für die OEP16.1 *knockout*-Mutantenlinie #F6-4a, die direkt von der T-DNA Insertionslinie SALK\_024018 abstammt, wurde ein De-Etiolierungs-Phänotyp beschrieben (Pollmann et al. 2007). Im Dunkeln gewachsene Keimlinge dieser Linie ergrünten bei Belichtung nicht, die Kotyledonen öffneten sich nicht und die Pflanzen starben. Dieser Effekt wurde auf eine Akkumulation des phototoxischen Protochlorophyllids, welches durch das fehlende PORA in den *oep16.1* Mutanten nicht in Chlorophyllid umgewandelt werden konnte, zurückgeführt. Dieser Phänotyp ähnelt stark dem so genannten FLU-Phänotyp. In der *flu*-Mutante fehlt die negative Feedbackkontrolle der Chlorophyll-Biosynthese und damit auch von Protochlorophyllid, das akkumuliert und so einen stark phototoxischen Effekt verursacht (Abbildung 35, Kim und Apel 2004). Leider wurden in der Untersuchung von Pollmann et al. (2007) weder der korrespondierende Wildtyp, ein unabhängig mutiertes OEP16.1 Allel noch eine mit OEP16.1 komplementierte Linie mit einbezogen. Zudem fehlte jede Form von Quan-

tifizierung und statistischer Auswertung des Ergrünungsphänotyps, da weder Replikas der Untersuchung gemacht, noch mehrere Linien untersucht wurden. In unseren Händen, sowie auch in anderen Laboratorien (Prof. K. Apel, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY, persönliche Mitteilung) konnte zudem kein FLU-artiger De-Etiolierungs-Phänotyp von Nachkommen der gleichen OEP16.1 Mutantenlinie (SALK\_024018) gezeigt werden (Philippar et al. 2007).

Bei einer quantitativen Überprüfung mehrerer unabhängiger Nachkommen der *oep16.1-1* Linie (Abbildung 18) konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit tatsächlich ein deutlich schwächerer Phänotyp festgestellt werden (Tabelle 11). Dieser Phänotyp segregierte allerdings nicht mit dem Verlust von OEP16.1. Auch in einer OEP16.1-Wildtyplinie (#19.3) konnte er nachgewiesen werden. In einer homozygoten OEP16.1-Mutante (#4.1) konnte wiederum kein Phänotyp festgestellt werden. Bei einer Überprüfung der Fluoreszenz von Protochlorophyllid unter Blaulicht wurde zudem eine deutlich geringere Akkumulation des phototoxischen Protochlorophyllids festgestellt, als in der *flu*-Mutante (Abbildung 19). Auch hier zeigte die OEP16.1-Wildtyplinie #19.3 die gleiche Orangefärbung, wie einige homozygote *oep16.1*-Mutanten (#5.2, F6-4a). In einer weiteren homozygot mutierten OEP16.1-Linie (#4.1) konnte wiederum keinerlei Protochlorophyllid Akkumulation festgestellt werden. Da eine Akkumulation von Protochlorophyllid im toxischen Maße nur möglich ist, wenn die negative Feedbackkontrolle des FLU Gens zumindest eingeschränkt ist (Kim und Apel 2004), wurde zusätzlich noch überprüft, ob ein Defekt des FLU-Gens in der SALK\_024018 Linie vorlag. Wenn das mature PORA sein Substrat Protochlorophyllid nicht im Protochlorophyllid-Holochrom des Prolamellarkörpers im Etioplasten binden kann (Santel und Apel 1981), dann sollte eine verstärkte Expression, bzw. Aktivität von FLU die Akkumulation von Protochlorophyllid verhindern. In diesem Fall wird die Biosynthese des Protochlorophyllid gehemmt (Kim und Apel 2004, Abbildung 35). Da in allen getesteten Nachkommen von SALK\_024018 keine Mutation des FLU Gens nachgewiesen wurde ist der leichte De-Etiolierungs-Phänotyp höchstwahrscheinlich nicht auf eine veränderte Feedbackkontrolle durch FLU zurückzuführen.



**Abbildung 35: Vereinfachtes Schema der FLU-abhängigen Kontrolle der Chlorophyll-Biosynthese in höhere Pflanzen (modifiziert nach Kim und Apel (2004)).**

Die negative Feedbackregulation der Protochlorophyllidanhäufung durch das FLU-Gen ist rot markiert. Die Umwandlung von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid unter Lichteinfluss (hv), ist grün markiert. Glu: Glutamat, ALA: Aminolevulinsäure, ProtoIX: Protoporphyrin IX, MgProtoIX: Magnesium- Protoporphyrin IX, Pchlide: Protochlorophyllid, Chlide: Chlorophyllid, POR: Protochlorophyllid Oxidoreduktase.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein *in vitro* Proteinimport von PORA in alle OEP16 Einzelmutanten und diverse Doppelmutanten möglich war (Philippar et al. 2007) und alle Doppel-, sowie die Triple-Mutante aller OEP16 Isoformen ein normales Wachstumsverhalten unter Beleuchtung zeigen. Daher wurde durch diese Arbeit bewiesen, dass keines der OEP16 Proteine in *Arabidopsis* in den Proteinimport von PORA und die Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten involviert ist.

### 5.2.1 OEP16.1 hat keine Funktion im Protein-Import von PORA

Indem sie mit Harnstoff denaturierte Proteine benutzten, konnten Reinbothe und seine Mitarbeiter zeigen, dass kein prePORA in ihre OEP16.1 Mutante (#F6-4a, Abbildung 18) importiert wird (Pollmann et al. 2007). Im Gegensatz dazu konnten bereits Philippar et al. (2007) zeigen, dass der Import von nicht denaturiertem PORA *in vitro* in Chloroplasten aus verschiedenen Nachkommen der *oep16.1* Einzel- und auch der *oep16.1/16.4* Doppelmutante nicht beeinflusst ist.

Des Weiteren wurde postuliert, dass matures PORA in den Etioplasten der *oep16.1-1* Mutanten nicht nachzuweisen sei (Pollmann et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch, unabhängig von einer Mutation des OEP16.1 Gens, sowohl ähnliche Transkriptgehalte, als auch PORA Protein in sechs verschiedenen SALK\_024018 Linien nachgewiesen werden, (Abbildung 20, Abbildung 21). In keiner der *oep16.1-1* homozygoten Linien war der PORA-Transkript- und Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. Zudem konnten bei einer Massenspektroskopie der ausgeschnittenen Banden zweifelsfrei spezifische Peptide, sowohl für PORA als auch für PORB, nachgewiesen werden (Abbildung 21). Zusammen-

menfassend kann gesagt werden, dass in allen analysierten Linien die PORA Expression weder durch die Mutation des OEP16.1 Gens noch durch den De-Etiolierungs-Phänotyp beeinflusst war. Daraus kann geschlossen werden, dass weder der Verlust von OEP16.1, noch der leichte Ergrünungsphänotyp, der im Hintergrund der SALK\_024018 T-DNA Linie beobachtet werden konnte, einen Einfluss auf den Gehalt von maturem PORA-Protein in Plastiden etiolierter Keimlinge hat. Folglich ist der Proteinimport von PORA in diesen Pflanzen nicht gestört und OEP16.1 ist nicht die Proteintranslokase für PORA.

Auch aus physiologischer Sicht spricht einiges gegen eine Funktion von OEP16.1 als Proteintranslokase von PORA. Die Genexpressionsmuster von OEP16.1 und PORA sind absolut gegensätzlich. Da in Angiospermen die Hauptfunktion von PORA die lichtabhängige Umwandlung von Protochlorophyllid in Chlorophyllid ist, sind Transkripte und Protein von PORA in *Arabidopsis* ausschließlich in etiolierten Geweben zu finden. Bei Beleuchtung werden sie zügig abgebaut und verschwinden (Su et al. 2001). OEP16.1 ist dagegen die Hauptisoform von OEP16 in grünen Rosettenblättern. Die Expression wird erst während der Keimung gesteigert (Philippar et al. 2007). Es ist daher unwahrscheinlich, dass OEP16.1 die Proteintranslokase für ein Substrat bildet, das sowohl in anderen Organen als auch unter abweichenden physiologischen Bedingungen exprimiert wird.

### **5.2.2 Eine Funktion von OEP16.1 im Aminosäuretransport**

Erst kürzlich konnte erneut die Funktion von OEP16.1 in einen Zusammenhang mit dem Transport von Aminosäuren in Pflanzen gebracht werden. Die samenspezifische Aminosäurepermease (PsAAP1) in Erbse ist in der Plasmamembran lokalisiert. In zwei Feldversuchen wurde festgestellt dass Erbsensamen mit höherem AAP1-Gehalt einen höheren Aminosäuregehalt und eine höhere Expression von Genen in Verbindung mit der Synthese von Lagerproteinen, Reifung, Entsorgung und Vesikeltransport haben (Weigelt et al. 2008). Die Überproduktion von AAP1 führte nicht nur zu einem erhöhten Aminosäure Angebot sondern auch zu erhöhten OEP16.1 Transkriptgehalten in Embryonen. Da *in vitro* Experimente bereits auf eine Funktion von OEP16.1 als Aminosäure selektivem Kanal in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten hinwiesen (Pohlmeyer et al. 1997) ist somit eine Funktion im Transport von Aminosäuren auch *in vivo* wahrscheinlich.

### **5.2.3 Zwei weitere Mutationen in der Linie SALK\_024018**

Obwohl OEP16 keine Funktion bei der Ergrünung hat, zeigt die T-DNA Insertionslinie SALK\_024018 einen leichten De-Etiolierungs-Phänotyp. Neben der T-DNA Mutation von OEP16.1 wurden in Nachkommen dieser Linie zwei weitere Insertionen in den Genen *At-AroGPI* (At1g70370) und *At-CMI* (At3g29200) gefunden (Abbildung 22). Die Mutationen

der Gene *At-AroGP1* und *At-CM1* korrelierten allerdings ebenfalls nicht mit dem De-Etiolierungs-Phänotyp (Tabelle 12). *AroGP1* ist eine nicht katalytische Untereinheit des Polygalacturonase-Enzyms, das in den Apoplasten abgesondert wird und eine Rolle in der Regulation der Pektinbiosynthese während der Fruchtreife von Tomaten spielt (Moore und Bennett 1994, Watson et al. 1994). Daher ist es unwahrscheinlich, dass *AroGP1* in *Arabidopsis* eine Rolle in der Plastid-Biogenese und Ergrünung spielt. Die Chorismat Mutase (*CM1*) katalysiert einen Schritt in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Da aromatische Aminosäuren nicht nur klassische Komponenten von Proteinen sind, sondern auch wichtige Vorstufen von sekundären Pflanzenmetaboliten, könnte ein Funktionsverlust von *CM1* schwere Schäden in der Pflanze hervorrufen. In *Arabidopsis* ist die *CM1* Isoform in den Plastiden lokalisiert (Eberhard et al. 1996, Mobley et al. 1999) und könnte somit eine Rolle in der Chloroplasten-Biogenese spielen. Allerdings führte die T-DNA Insertion in *cm1-1* in der SALK\_024018 Linie nicht unbedingt zu einem reduzierten mRNA Gehalt. In der Linie #5.2, welche einen starken De-Etiolierungs-Phänotyp zeigte, war der Transkriptgehalt reduziert, in der Linie #2.2, die keinerlei Phänotyp hatte, jedoch nicht. Deshalb kann ein indirekter Einfluss der *CM1* Expression auf die lichtinduzierte Umwandlung von Etioplasten in Chloroplasten nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise verändert eine noch unbekannt Mutation im Genom der Linie #5.2 (Abbildung 18) die Expression von *CM1* derart, dass es zu einem De-Etiolierungs-Phänotyp kommt.

### 5.3 Die Funktion von *OEP16.2 in vivo*

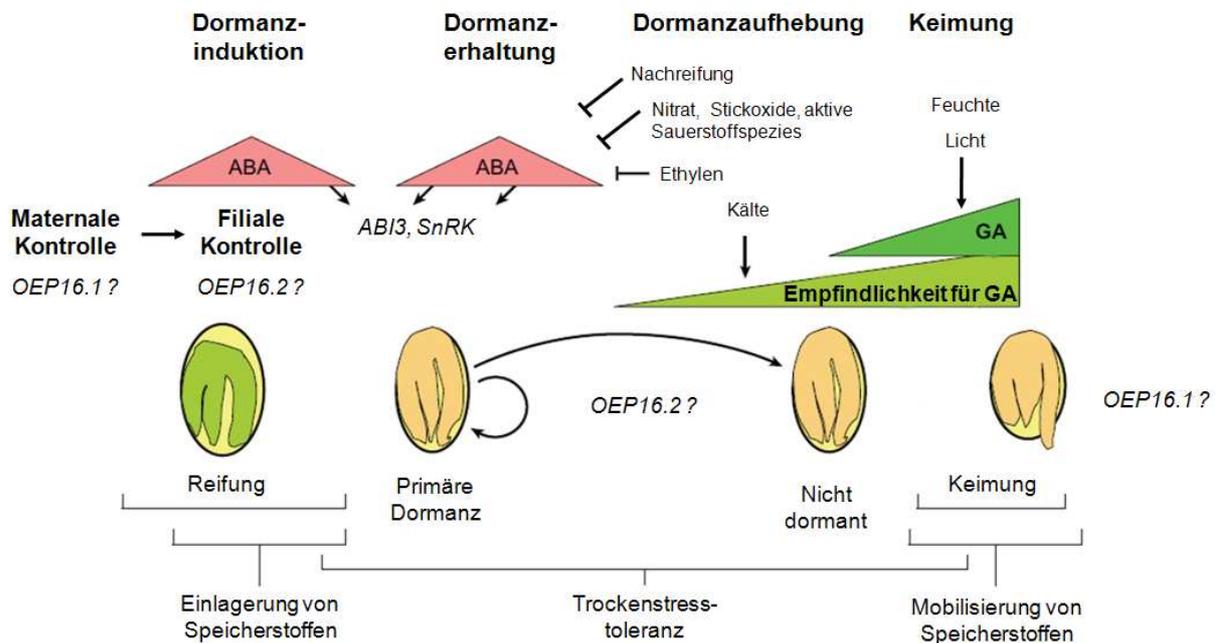
*OEP16.2* zeichnet sich durch zwei besondere Merkmale aus: (i) Zum einen die längere Peptidschleife zwischen erster und zweiter transmembraner Helix im Vergleich zu *OEP16.1* und *OEP16.4* (Abbildung 4, Abbildung 14). (ii) Zum anderen die spezifische und ausschließliche Expression in Pollen und reifen Samen (Abbildung 5, Abbildung 6). Die ausgedehnte Peptidschleife zwischen Helix 1 und Helix 2 könnte für die Substratspezifität von *OEP16.2* verantwortlich sein. Somit ist eine leicht abweichende Funktion von *OEP16.2 in vivo* im Vergleich zu *OEP16.1* denkbar (vgl. Kapitel 5.1.1). Aufgrund der Expressionsanalyse ist mit Sicherheit zu sagen, dass beide Isoformen von *OEP16* ihre Hauptfunktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Pflanzenentwicklung haben. Die Samenentwicklung in höheren Pflanzen kann in zwei Phasen unterteilt werden: die Morphogenese, bei der sich Embryo und Endosperm entwickeln und die Samenreifung. Das frühe Embryowachstum beginnt mit der einzelligen Zygote und endet mit dem Herzstadium, in dem alle embryonalen Strukturen bereits angelegt sind (Abbildung 24). Diese Phase ist hauptsächlich maternal kontrolliert. Mit

der Übergangsphase zur Samenreifung, in der der Embryo weiter wächst, beginnt auch die filiale Kontrolle (zur Übersicht siehe Weber et al. 2005, Borisjuk et al. 2004, Holdsworth et al. 2008). Die spätere, primäre Samenruhe wird früh während der Samenreifungsphase initiiert, d.h. ab diesem Zeitpunkt ist eine Keimung, abhängig vom Genotyp, nur möglich wenn die üblichen Dormanz-brechenden oder Keimungs-einleitenden Faktoren wie Nachreife, Licht, Kältebehandlung oder Behandlung mit Gibberelinsäure oder  $\text{KNO}_3$  vorliegen (Abbildung 36). Die Dormanz steigt an und wird immer schwerer zu brechen bis der Samen völlig ausgereift ist (zur Übersicht siehe Bentsink und Koornneef, 2002, Raz et al. 2001). Parallel dazu beginnt auch die Expression von OEP16.2 im Embryo und steigt ab diesem Zeitpunkt stark auf ihr Maximum im reifen Samen an (Abbildung 5, Abbildung 6). Die Samenreifung ist abgeschlossen, wenn sich Nährstoffe angehäuft und eingelagert haben, der Wassergehalt im Samen zurück gegangen ist, der Abszisinsäure (ABA) Gehalt angestiegen ist und die Trockenstresstoleranz sowie die primäre Dormanz etabliert wurden (Abbildung 36).

### 5.3.1 OEP16.2 spielt eine Rolle bei der Dormanz von Samen

Die besonders starke Expression von OEP16.2 in Samengewebe wird durch ABA induziert. Microarray Analysen an reifen Samen zeigten, dass sowohl im Endosperm als auch im Embryo durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  ABA die Expression von OEP16.2 stark induziert wurde (Abbildung 27, Penfield et al. 2004). Zudem sind in der Promotorregion von *OEP16.2* einige ABA-regulierte Elemente zu finden (Drea et al. 2006). ABA reguliert in *Arabidopsis*-Samen die Zelldifferenzierung, unterdrückt Zellteilungsaktivitäten und ist für Trockenstresstoleranz verantwortlich (Weber et al. 2005, Borisjuk et al. 2004). Dieser ABA Signalweg ist wiederum eng mit dem Zuckerhaushalt verknüpft. Zudem ist ABA ein wichtiger Regulator der Induktion der Dormanz während der Samenreifung, sowie des Erhalts bzw. der Aufhebung der Dormanz in gequollenen Samen zu Beginn der Keimung (Abbildung 36, zur Übersicht siehe Holdsworth et al. 2008). Die Samendormanz wurde definiert, als die Unmöglichkeit eines intakten, lebenden Samens die Keimung unter günstigen Bedingungen zu vollenden (Bewley 1997, zur Übersicht siehe Bentsink und Koornneef, 2002). Ein geringer ABA-Gehalt während der Samenentwicklung wird mit der Abwesenheit von primärer Dormanz in reifen Samen assoziiert, während bei Überexpression von Genen der ABA Biosynthese der ABA-Gehalt gesteigert und damit die Samendormanz verstärkt oder die Keimung verzögert werden kann (Abbildung 36, zur Übersicht siehe Finkelstein et al. 2002, 2008, Nambara und Marion-Poll, 2003, Holdsworth et al. 2008). Von außen auf Samen appliziertes ABA löst keine Dormanz-ähnlichen Phänotypen aus (Penfield et al. 2004). Trotzdem kann eine ABA-Behandlung von

gequollenen, keimungsbereiten Samen Informationen über die Sensitivität gegen ABA und deren Entfernung nach der Samenreifung liefern.



**Abbildung 36: Entwicklungsabhängige Dormanzinduktion und -aufhebung (modifiziert nach Finkelstein et al. 2008)**

Zeitlicher Ablauf der Dormanzinduktion und -aufhebung in Abhängigkeit einiger regulatorischer Faktoren. Die Größen der Abszinsäure (ABA) und Gibberelinsäure (GA) Symbole repräsentieren die relativen Hormongehalte. Die Induktion ist von ABA unabhängigen, maternalen und filialen Faktoren, sowie von ABA-Signalen abhängig. Die Aufhebung wird durch viele Umweltfaktoren, die auf das ABA:GA Gleichgewicht einwirken, unterstützt. Ein GA Überschuss bewirkt eine Zellwandlockerung, die das Erscheinen der Radikula und somit den Beginn der Keimung ermöglicht. Induktion und Hemmung sind durch Pfeile bzw. Balken gekennzeichnet (zur Übersicht siehe Finkelstein et al. 2008). Eine mögliche Rolle von OEP16.1 und OEP16.2 ist angedeutet. ABI3: *ABA Insensitiver Faktor 3*, SnRK: *Sucrose nonfermenting related protein kinases*.

Genetische Analysen wurden dazu benutzt Komponenten der ABA Signalkette, die bei der Keimung eine Rolle spielen zu identifizieren. Es wurden dabei einige Loci entdeckt, die bei der Aufhebung der Sensitivität für ABA eine Funktion erfüllen. Wurden diese Gene mutiert, kam es bei gequollenen oder feucht-kühl behandelten Samen zu einer ABA Hypersensitivität (zur Übersicht siehe Holdsworth et al. 2008 und dort genannte Referenzen).

Ähnlich dieses beschriebenen Phänotyps haben in dieser Arbeit *Arabidopsis* Samen mit einer *knockout* Mutation von *OEP16.2* unter ABA Zugabe eine verzögerte Keimung im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypsamens gezeigt. Diese Samen hatten auch nach 96 h keine 100% Keimungsrate erreicht (Abbildung 28). Um Einflüsse durch die Anzucht der Mutterpflanzen zu eliminieren, wurde der Versuch in einer weiteren Generation wiederholt. Da sich auch hier das Ergebnis bestätigt hat, ist der Unterschied in der Keimfähigkeit nicht auf die Samenanzuchts- und Erntebedingungen zurückzuführen. Diese Unterschiede konnten bei Ver-

suchen mit der *oep16.1/16.2/16.4* Triple-Mutante nicht nur bestätigt werden, sondern waren hier sogar noch signifikanter (Abbildung 28). Um einen großen Einfluss der beiden anderen Isoformen, OEP16.1 und OEP16.4 auszuschließen wurden auch alle Doppelmutanten *oep16.1/16.4*, *oep16.2/16.* und *oep16.1/16.2* überprüft (Abbildung 29). Ausschließlich wenn OEP16.2 nicht mehr vorhanden war, konnte eine Reduktion der Keimungsrate unter ABA Einfluss festgestellt werden. Diese Hypersensitivität auf ABA bei der Keimung und die daraus resultierende Verzögerung der Keimung ist somit einzig auf die Funktion von OEP16.2 zurückzuführen. Eine unterstützende Funktion von OEP16.1 oder auch vor allem von OEP16.4 beispielsweise in heterooligomeren Kanälen (vgl. Kapitel 4.3.2) ist allerdings durch die Tatsache, dass die Triple-Mutante den stärksten Phänotyp zeigt, nicht auszuschließen. Versuche zur Verifizierung dieser Ergebnisse mit *Arabidopsis*-Samen in denen der Verlust von OEP16.2 durch Transformation des Wildtypgens komplementiert werden soll sind bereits im Gange.

Gene deren Mutation eine solche Hypersensitivität auf ABA hervorgerufen hat, haben unterschiedlichste Funktionen in der Samenkeimung, z.B. spielen einige eine Rolle bei der RNA Translation und in der ABA Signaltransduktion (zur Übersicht siehe Holdsworth et al. 2008). Die Reduktion der Expression der *Sucrose nonfermenting-1-related protein kinases* (SnRK1) in Erbse führte zu einem Phänotyp, der dem ABA-insensitiven Erscheinungsbild von *abi-3* Mutanten ähnelt (Radchuk et al. 2006). SnRK1 ist ein Vermittler der Saccharose-spezifischen Signale und steuert die metabolischen und hormonellen Signale während des Wachstums und der Differenzierung von Kotyledonen, den hauptsächlichen Speicherorganen in Erbsensamen. Die *snrk1* Samen haben unter anderem zahlreiche Defekte in der Samenreifung, in Kotyledonendifferenzierung und -wachstum, einen verringerten Umbau von Saccharose in Speicherprodukte, einen geringeren Globulingehalt und zeigen gelegentlich vorzeitige Samenkeimung (Borisjuk et al. 2004, Weber et al. 2005, Radchuk et al. 2006, 2010). Geringere ABA-Gehalte und eine reduzierte Genexpression, von Genen die in die ABA vermittelte Samenreifung und in die Reaktion auf Zucker involviert waren, deuten darauf hin, dass SnRK1 für die ABA-Synthese und/oder die Signaltransduktion in einer frühen Phase der Samenentwicklung verantwortlich ist. Untersuchungen des metabolischen Profils von Embryonen aus antisense-unterdrückten SnRK1-Samen ergaben einen geringeren Gehalt an organischen Säuren und Aminosäuren. Es wird angenommen, dass SnRK1 die Reaktion auf Zuckersignale vermittelt, die für die frühe Kotyledonenausbildung benötigt werden. Spätere Reifungsvorgänge und Speicheraktivitäten wären durch eine Repression von *SnRK1* stark eingeschränkt (Radchuk et al. 2006, 2010). Transkript-Analysen der Gruppe von Dr. H. Weber (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK–Gatersleben) zeigten 20 Tage

nach der Befruchtung eine signifikante Reduktion der Transkription von OEP16.2 in den *snrk1*-antisense Mutantensamen (unveröffentlichte Daten, Abbildung 30). In dieser Arbeit konnte zusätzlich eine ca. 35%ige Reduktion des Proteingehalts in diesen Samen festgestellt werden. Geht man davon aus, dass OEP16.2 eine ähnliche Funktion wie OEP16.1 hat und die vorrangige Funktion von OEP16.1 der Aminosäuretransport ist, dann wäre die Folge der Reduktion von OEP16.2 ein geringerer Aminosäuregehalt in den *snrk1*-antisense Mutantensamen. Auch die eingeschränkten Speicheraktivitäten könnten durch eine Reduktion des Metabolitransporters, in diesem Falle OEP16.2 ausgelöst worden sein. Auf jeden Fall hat eine Reduktion von endogenem ABA auch in Erbse zu einer Reduktion von OEP16.2 sowohl auf RNA-Ebene, wie auch auf Proteinebene geführt.

Einen ähnlichen Hinweis geben Erbsensamen, mit einer reprimierten ABA-Biosynthese. Die Transkription von OEP16.2 war in diesen Samen 22 Tage nach der Befruchtung signifikant reduziert (Gruppe Dr. H. Weber, unveröffentlichte Daten, Abbildung 32). Auch auf Proteinebene konnte hier eine ca. 30%ige Reduktion von OEP16.2 gezeigt werden (Abbildung 33). Die Expression von OEP16.2 ist damit erwiesenermaßen stark vom ABA Gehalt in Erbsensamen abhängig und somit ein weiterer Faktor in der Regulation der Samenreifung.

### 5.3.2 Zusammenspiel von OEP16.1 und OEP16.2 in der Samenentwicklung

Während der Samenentwicklung spielt die räumliche Verteilung von Metaboliten eine essentielle Rolle (Borisjuk et al. 2004). OEP16.1 wird zu Beginn der Samenentwicklung sowohl im Endosperm, als auch im sich entwickelnden Embryo exprimiert. Die Expression von OEP16.2 steigt in der Samenreifung sehr stark an und ist vor allem im maturen Embryo nachweisbar. In der Übergangsphase, in der auch der Übergang von der maternalen Kontrolle auf die filiale Kontrolle der Embryonalentwicklung stattfindet, werden beide Proteine exprimiert (Abbildung 8). Einen funktionellen Zusammenhang zwischen beiden OEP16 Isoformen verdeutlichen Analysen an Erbsensamen mit Mutationen von zwei weiteren essentiell an der Samenreifung beteiligten Genen: (i) Erbsensamen, die die Aminosäurepermease (AAP1) überexprimieren, haben einen erhöhten Gehalt an Aminosäuren und unter anderem eine verstärkte Expression von Genen die mit Speicherproteinsynthese und Samenreifung zusammenhängen (Weigelt et al. 2008). In diesen Samen ist der ABA Gehalt ebenfalls erhöht, vermutlich aufgrund der gesteigerten Aktivität von Genen, die für die Speicheraktivität zuständig sind. Sowohl die Transkription von OEP16.1 als auch von OEP16.2 ist 26 Tage nach der Befruchtung induziert (Weigelt et al. 2008, nicht publizierte Daten). (ii) Der 2-Oxoglutarat/Malat Translokator (OMT) reguliert die Aminosäure- und Speicherproteinsynthese in Erbsenembryonen. Eine Unterdrückung der OMT Expression beeinflusst den Abbau von

Kohlehydraten, d.h. den Umbau von Saccharose in Aminosäuren und Proteine, reduziert das Samengewicht und verzögert die Samenkeimung (Riebeseel et al. 2010). Die Expression von Speicherproteinen ist verzögert und die reifen Samen haben einen reduzierten Proteingehalt. Es besteht die Vermutung, dass OMT unter anderem für die Biosynthese von Aminosäuren in Erbsensamen notwendig ist. In diesen Samen mit reduzierter OMT Funktion waren die Transkriptgehalte von OEP16.1 und OEP16.2 17 und 22 Tage nach der Befruchtung signifikant reduziert (Riebeseel et al. 2010). Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass OEP16.1 und OEP16.2 eine wichtige Funktion beim Aminosäuretransport in Plastiden der Erbsensamen zu erfüllen haben. Die Expressionsdaten zeigen, dass OEP16.1 in der Morphogenese, dem ersten Stadium der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt. In der zweiten Phase, der Samenreifung steigt dagegen die Expression von OEP16.2 stark auf ihr Maximum an. Auch Proteomanalysen an Proplastiden in meristematischen Geweben von Blumenkohl weisen OEP16.1 nach (Bräutigam und Weber 2009). Proplastiden sind undifferenzierte Plastiden mit hoher biosynthetischer Aktivität in meristematischen Geweben. Synthetisiert werden vor allem Aminosäuren, Fettsäuren, Purine und Pyrimidine. Die Proplastidenmembran ist vor allem für den Import von Metabolitvorstufen und den Export von Metabolitprodukten für die sich schnell teilende Zelle gerüstet. Die Vermutung, dass beide OEP16 Isoformen für den Transport von Aminosäuren aus den Plastiden für ein optimiertes Embryonalwachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Samenentwicklung zuständig sind liegt also nahe.

#### **5.4 Ausblicke zur Funktionsanalyse**

Um die Funktion der OEP16 Isoformen weiter zu untersuchen, wurden erste, vielversprechende Messungen mit in Proteoliposomen rekonstituierten, rekombinanten OEP16.1 und OEP16.2 Proteinen im Lipid Bilayersystem (Ionovation, AG Soll in Zusammenarbeit mit Dr. Roland Hemmler, Osnabrück, Deutschland) gestartet. Des Weiteren werden Transportmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren an, in Proteoliposomen rekonstituierten, rekombinanten OEP16.1 und OEP16.2 in der Gruppe von Dr. Ilka Haferkamp (Fachbereich Biologie, Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) durchgeführt. In dieser Gruppe werden zudem 18 unterschiedliche *E. coli* Bakterienstämme mit verschiedenen Mutationen im Aminosäuretransport, die mit OEP16.1 und OEP16.2 komplementiert wurden, untersucht. Hier soll die Aufnahmefähigkeit für radioaktiv markierte Aminosäuren der komplementierten im Vergleich zu den nicht komplementierten Mutanten festgestellt werden. Ergänzend wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Untersuchungen von Hefemutanten, die ein Wachstumsdefizit durch eine gestörte Aufnahme von verschiedenen Aminosäuren aufweisen, begonnen. Diese Experimente werden zeigen, ob durch OEP16.1, OEP16.2 und OEP16.4 eine

Wachstumskomplementation erreicht werden kann. Generelle Untersuchungen zum Metabolitgehalt, insbesondere von Aminosäuren, in Samen von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen und *oep16.2-1 knockout* Mutanten unter ABA-Einfluss werden derzeit in Erlangen in der Gruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald (Department Biologie, Lehrstuhl für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt.

Die Funktion der OEP16 Proteine bleibt also auch in Zukunft ein interessantes und spannendes Gebiet.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellkompartimentierung im Laufe der Evolution machte einen Austausch von Metaboliten und anderen gelösten Stoffen zwischen den Organellen und dem Zytosol unabdingbar. In der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten konnten in diesem Zusammenhang einige sehr spezifisch regulierte, abundante Proteine, die OEPs (*outer envelope proteins*) charakterisiert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden die OEP16 Proteine, eine Unterfamilie der PRAT Proteine (*preprotein and aminoacid transporters*) physiologisch und funktionell näher charakterisiert. Bekannte *in vitro* Expressionsdaten der drei Isoformen At-OEP16.1, At-OEP16.2 und At-OEP16.4 in *Arabidopsis* konnten *in vivo* verifiziert werden. So wurde in Samen und Keimlingen die äußerst konträre Expression von OEP16.1 (in Blättern) und OEP16.2 (in Samen) sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene gezeigt. In Erbse konnte OEP16.2 zum ersten Mal nachgewiesen und isoliert werden. Auch die subzelluläre Lokalisation und Orientierung in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aller drei Isoformen wurde weitestgehend aufgeklärt. OEP16.1 und OEP16.2 sind demnach mit dem N- und C- Terminus im Zytosol lokalisiert.

Erste funktionelle Analysen der OEP16 Proteine ergaben eine mögliche Homooligomerisierung, sowie eine Heterooligomerisierung in *Arabidopsis* und somit eine wahrscheinliche Kanalbildung. Dabei ist eine Funktion von At-OEP16.4 als Backupsystem für die beiden anderen Isoformen in *Arabidopsis* denkbar. Analysen von Einzel- Doppel- und Triple-*knockout* Mutanten unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen konnten die Diskussion über die tatsächliche Funktion von OEP16.1 endgültig bereinigen. Der publizierte De-Etiolierungs-Phänotyp für Nachkommen der SALK\_024018 Linie (*oep16.1-1*), der auf eine Funktion in der Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten schließen ließ, ist eindeutig nicht auf eine T-DNA Insertion in *OEP16.1* zurückzuführen. Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene zeigten weiterhin, dass OEP16.1 nicht die Importpore für PORA sein kann. Stattdessen konnten zwei weitere T-DNA Insertionen in den Nachkommen der SALK\_024018 Linie in den Genen At-AroGP1 (At1g70370), der nicht katalytischen  $\beta$ -Untereinheit des Polygalacturonase Isoenzym 1 (PG1), und At-CM1 (At3g29200), der Chorismat Mutase 1, nachgewiesen werden wobei festgestellt wurde, dass der Phänotyp eventuell auf eine Transkriptionsregelung von CM1 in *Arabidopsis* zurückzuführen ist. Untersuchungen an Überexpressionsmutanten für die samenspezifische Aminosäurepermease Ps-AAP1, sowie an antisense reprimierten Ps-OMT (2-oxoglutarate/malate Translokator) Erbsensamen bestätigte dagegen die bereits publizierte These, OEP16.1 sei ein spezifischer

Aminosäuretransporter in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten. Aufgrund der spezifischen, ausschließlichen Expression in jungen Pollen, reifen Samen und sehr jungen Keimlingen ist eine Funktion von OEP16.2 als Aminosäuretransporter bei der Samenentwicklung, Dormanz und anschließenden Keimung naheliegend. Untermuert wird diese These durch Untersuchungen an Samen von mehreren *oep16.2-1 knockout* Mutanten, die eine eingeschränkte Keimfähigkeit unter ABA Einfluss zeigten. Des Weiteren zeigten Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene eine Reduktion von Ps-OEP16.2 bei verringertem ABA Gehalt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Familie der OEP16-Kanalproteine mit großer Wahrscheinlichkeit eine essentielle Rolle im Aminosäuretransport über die äußere Hüllmembran von Plastiden in unterschiedlichen Phasen der Samen- und Pflanzenentwicklung spielt.

## LITERATUR

- Altschul S. F., Koonin E. V. (1998) Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 444-447.
- Apel K., Santel H. J., Redlinger T. E., Falk H. (1980) The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase. *FEBS J.*, 111, 251-258.
- Armstrong G. A., Runge S., Frick G., Sperling U., Apel K. (1995) Identification of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases A and B: A branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 108, 1505-1517.
- Baldi P., Grossi M., Pecchioni N., Vale G., Cattivelli L. (1999) High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. *Plant Mol. Biol.*, 41, 233-243.
- Balsera M., Soll J., Bölter B. (2009) Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell. and Mol. Life Sci.*, 66, 1903-1923.
- Bentsink L. und Koornneef M. (2002) Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book*: doi: 10.1199/tab.0050
- Benz J. P., Soll J., Bölter B. (2009) Protein transport in organelles: the composition, function and regulation of the Tic complex in chloroplast protein import. *Europ. J. Biochem.*, 276, 1166-1176.
- Bewley J. D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- Bölter B. und Soll J. (2001) Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors of regulated gates? *EMBO J.*, 20, 935-940.
- Bölter B., Soll J., Hill K., Hemmler R., Wagner R. (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *EMBO J.*, 18, 5505-5516.
- Bömer U., Rassow J., Zufall N., Pfanner N., Meijer M., Maarse A.C. (1996) The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17. *J. Mol. Biol.*, 262, 389-395.
- Borisjuk L., Rolletschek H., Radchuk R., Weschke E., Wobus U., et al. (2004) Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biol.*, 6, 375-86
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bräutigam A., Hofmann-Benning S., Weber A. P. M. (2008a) Comparative proteomics of chloroplast envelopes from C-3 and C-4 plants reveals specific adaptations of the plastid envelope to C-4 photosynthesis and candidate proteins required for maintaining C-4 metabolite fluxes. *Plant Physiol.*, 148, 568-579.
- Bräutigam A., Shrestha R. P., Whitten D., Wilkerson C. G., Carr K. M., Froehlich J. E., Weber A. P. M. (2008b) Low-coverage massively parallel pyrosequencing of cDNAs enables proteomics in non-model species: comparison of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes. *J. Biotechnology*, 136, 44-53.

- Bräutigam A. und Weber A. P. M. (2009) Proteomic analysis of the proplastid envelope membrane provides novel insights into small molecule and protein transport across proplastid membranes. *Mol. Plant*, 2(6), 1247–1261.
- Chatterjee M., Berbezy P., Vyas D., Coates S., Barsby T (2005) Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in *Arabidopsis* leaves. *Plant Science*, 168 (2), 501-509.
- Cheng W-H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H.-C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T., Sheen J. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*, 14 (11), 2723-2743.
- Clausen C., Ilkavets I., Thomson R., Philippar K., Vojta A., Möhlmann T., Neuhaus E., Fulgosi H., Soll J. (2004) Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta*, 220, 30–37.
- Dangoor I., Peled-Zehavi H., Levitan A., Pasand O., Danon A. (2009) A small family of chloroplast atypical thioredoxins1. *Plant Physiol.*, 149, 1240–1250.
- Drea S. C., Lao N. T., Wolfe K. H., Kavanagh T. A. (2006) Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of OEP16-related genes in land plants. *Plant J.*, 46, 723–735.
- Duy D., Soll J., Philippar K. (2007) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol. Chem.*, 388, 879–889.
- Eberhard J, et al. (1996) Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: Molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J.*, 10, 815–821.
- Ferro M., Salvi D., Brugière S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin J., Joyard J., Rolland N. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. & Cell. Proteomics*, 2, 325–345.
- Ferro M., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Court M., Moyet L., Ramus C., Miras S., Mellal M., Le Gall S., Kieffer-Jaquinod S., Bruley C., Garin J., Joyard J., Masselon C., Rolland N. (2010) AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. & Cell. Proteomics*, 9, 1063-1084.
- Finkelstein R. R., Gampala S.S.L., Rock C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14, 15–45.
- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol*, 59, 387–415.
- Finn R. D., Tate J., Mistry J., Coghill P. C., Sammut S. J., Hotz H. R., Ceric G., Forslund K., Eddy S. R., Sonnhammer E. L. L., Bateman A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 36, 281–288.
- Fischer K., Weber A., Brink S., Arbinger B., Schünemann D., Borchert S., Heldt H.W., Popp B., Benz R., Link T.A., Eckerskorn C., Flügge U. I. (1994) Porins from plants. Molecular cloning and functional characterization of two new members of the porin family. *J. Biol. Chem.*, 269, 25754–25760.
- Flügge U. I. (2000) Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends in Plant Sci.*, 5, 135–137.

- Friso G., Majeran W., Huang M., Sun Q., van Wijk K. J. (2010) Reconstruction of metabolic pathways, protein expression and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts; large scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiol.*, DOI:10.1104/pp.109.152694.
- Froehlich J. E., Wilkerson C. G., Ray W. K., McAndrew R. S., Osteryoung K. W., Gage D. A., Phinney B. S. (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Research*, 2, 413–425.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D., Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784–3788.
- Götze T. A., Philippar K., Ilkavets I., Soll J., Wagner R. (2006) OEP37 is a new member of the chloroplast outer membrane ion channels. *J. Biol. Chem.*, 281 (26), 17989–17998.
- Gould S. B., Waller R. F., McFadden G. I. (2008) Plastid evolution. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59, 491–517.
- Griffiths W. T. (1978) Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J.*, 174, 681–692.
- Gross J., Bhattacharya D. (2009a) Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective. *Nature Reviews Genetics*, 10, 495–505.
- Gross J., Bhattacharya D. (2009b) Reevaluating the evolution of the Toc and Tic protein translocons. *Trends in Plant Sci.*, 14, 13–20.
- Gunning B. E. (2001) Membrane geometry of “open” prolamellar bodies. *Protoplasma*, 215, 4–15.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557–580.
- Hemmler R., Becker T., Schleiff E., et al. (2006) Molecular properties of Oep21, an ATP-regulated anion-selective solute channel from the outer chloroplast membrane. *J. Biol. Chem.*, 281, 12020–12029.
- Holdsworth M., Bentsink L., Soppe W. J. J. (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179, 33–54.
- Hony D. und Twell D. (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol.*, 132, 640–652.
- Ilkavets I. (2005) Membrane proteins in the outer membrane of plastids and mitochondria. Dissertation.
- Inaba T. und Schnell D.J. (2008) Protein trafficking to plastids: one theme, many variations. *Biochem. J.*, 413, 15–28.
- Jeanguenin L., Lebaudy A., Xicluna J., Alcon C., Hosal E., Duby G., Michard E., Lacombe B., Dreyer I., Thibaud J.-B. (2008) Heteromerization of *Arabidopsis* Kv channel  $\alpha$ -subunits. *Plant Signaling & Behavior*, 3(9), 622–625.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker, in higher plants. *EMBO J.*, 6 (13), 3901–3907.

- Johnsson N. und Varshavsky A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10340-10344.
- Keegstra K. und Youssif A.E. (1986) Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Methods Enzymol.*, 118, 316-325.
- Kim C. und Apel K. (2004) Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta. *Plant Cell*, 16, 88–98.
- Kim C., Ham H., Apel K. (2005) Multiplicity of different cell- and organ-specific import routes for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in plastids of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, 42, 329–340.
- Kleffmann T., Russenberger D., von Zychlinski A., Christopher W., Sjolander K., Grussem W., Baginsky S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biol.*, 14, 354–362.
- Koncz C. und Schell J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kozjak-Pavlovic V., Ross K., Götz M., Goosmann C., Rudel T. (2010) A tag at the carboxy terminus prevents membrane integration of VDAC1 in mammalian mitochondria. *J. Mol. Biol.*, 397 (1), 219-232.
- Kunst L. (1998) Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol.*, 82, 43-48.
- Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels—a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, 203-209.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-&
- Li H. M., Moore T., Keegstra K. (1991) Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *Plant Cell*, 3, 709-717.
- Linka M., Weber A. P. M. (2005) Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. *Trends in Plant Sci.*, 10, 461–465.
- Linke D., Frank J., Pope M. S., Soll J., Ilkavets I., Fromme P., Burstein E. A., Reshetnyak Y. K., Emelyanenko V. I. (2004) Folding kinetics and structure of OEP16. *Biophys. J.*, 86, 1479–1487.
- Lister R., Hulett J. M., Lithgow T., Whelan J. (2005) Protein import into mitochondria: origins and functions today. *Mol. Membrane Biol.*, 22, 87–100.
- Liu C. M. und Meinke D. W. (1998) The titan mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *Plant J.*, 16, 21-31.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Meskauskiene R., et al. (2001) FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 12826–12831.
- Meurer J., Plücker H., Kowallik K. V., Westhoff P. (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, 17(18), 5286-97.

- Mobley E. M., Kunkel B. N., Keith B. (1999) Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 240, 115–123.
- Mokranjac D. und Neupert W. (2009) Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793, 33–41.
- Moore T. und Bennett A. B. (1994) Tomato fruit polygalacturonase isozyme 1 (characterization of the subunit and its state of assembly in vivo). *Plant Physiol.*, 106, 1461–1469.
- Moustafa A., Reyes-Prieto A., Bhattacharya D. (2008) *Chlamydiae* has contributed at least 55 genes to plantae with predominantly plastid functions. *PLoS ONE*, 3, 2205.
- Murcha M. W., Lister R., Ho A. Y. Y., Whelan J. (2003) Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 131, 1737–1747.
- Murcha M. W., Elhafez D., Millar A. H., Whelan J. (2005a) The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in *Arabidopsis* and is essential for protein import. *J. Biol. Chem.*, 280, 16476–16483.
- Murcha M. W., Millar A. H., Whelan J. (2005b) The N-terminal cleavable extension of plant carrier proteins is responsible for efficient insertion into the inner mitochondrial membrane. *J. Mol. Biol.*, 351, 16–25.
- Murcha M. W., Elhafez D., Lister R., Tonti-Filippini J., Baumgartner M., Philippar K., Carrie C., Mokranjac D., Soll J., Whelan J. (2007) Characterisation of the preprotein and amino acid transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 134, 199–212.
- Nakayama K., Okawa K., Kakizaki T., Honma T., Itoh H., Inaba T. (2007) *Arabidopsis* Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol.*, 144, 513–523
- Nambara E. und Marion-Poll A. (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Sci.*, 8, 213–217.
- Neupert W. und Herrmann J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Ann. Rev. of Biochem.*, 76, 723–749.
- Nicholas K. B und Nicholas H. B. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the authors.
- Oh S. A., Lee S. Y., Chung I. K., Lee C-H., Nam H. G. (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol. Biol.*, 30(4), 739-754
- Oosawa N., Masuda T., Awai K., Fusada N., Shimada H., Ohta H., Takamiya K. (2000) Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 474, 133–136.
- op den Camp R. G. L., et al. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15, 2320–2332.
- Penfield S., Rylott E. L., Gilday A. D., Graham S., Larson T. R., Graham I. A. (2004) Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase 1. *Plant Cell*, 16, 2705–2718.

- Perkins D. N., Pappin D. J. C., Creasy D. M., Cottrell J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20 (18), 3551-3567.
- Philippar K., Ivashikina N., Ache P., Christian M., Lüthen H., Palme K., Hedrich R. (2004). Auxin activates KAT1 and KAT2, two K<sup>+</sup> channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 37, 815-827.
- Philippar K., Geis T., Ilkavets I., Oster U., Schwenkert S., Meurer J., Soll J. (2007) Chloroplast biogenesis: the use of mutants to study the etioplast–chloroplast transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 678–683.
- Philippar K. und Soll J. (2007) Intracellular transport: solute transport in chloroplasts, mitochondria, peroxisomes and vacuoles, and between organelles. In: Yeo A.R., Flowers T.J. (Eds), *Plant solute transport*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 133–192.
- Pohlmeyer K., Soll J., Steinkamp T., Hinnah S., Wagner R. (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 9504–9509.
- Pohlmeyer K. (1997) Porenbildende Proteine in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum*). Dissertation.
- Pohlmeyer K., Soll J., Grimm R., Hill K., Wagner R. (1998) A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Plant Cell*, 10, 1207–1216.
- Pollmann S., Springer A., Buhr F., Lahroussi A., Samol I., Bonneville J.M., Tichtinsky G., von Wettstein D., Reinbothe C., Reinbothe S. (2007) A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2019–2023.
- Pudelski B., Soll J., Philippar K. (2009) A search for factors influencing etioplast–chloroplast transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12201–12206.
- Pudelski B., Kraus S., Soll J., Philippar K. (2010), The plant PRAT proteins – preprotein and amino acid transport in mitochondria and chloroplasts. *Plant Biol.*, Im Druck.
- Raab S., Drechsel G., Zarepour M., Hartung W., Koshiha T., Bittner F., Hoth S. (2009) Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 60(5), 929.
- Radchuk R., Radchuk V., Weschke W., Borisjuk L., Weber H. (2006) Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.*, 140, 263–278.
- Radchuk R., Emery N. R. J., Weier D., Vigeolas H., Geigenberger P., Lunn J. E., Feil R., Weschke W., Weber H. (2010) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J.*, 61, 324–338.
- Rassow J., Dekker P. J., van Wilpe S., Meijer M., Soll J. (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.*, 286, 105–120.
- Raz V., Bergervoet J. H. W., Koornneef M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128, 243–252.

- Reinbothe C., Lebedev N., Apel K., Reinbothe S. (1997) Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8890–8894.
- Reinbothe S., Mache R., Reinbothe C. (2000) A second, substrate-dependent site of protein import into chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9795–9800.
- Reinbothe S., Quigley F., Gray J., Schemenewitz A., Reinbothe C. (2004a) Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2197–2202.
- Reinbothe S., Quigley F., Springer A., Schemenewitz A., Reinbothe C. (2004b) The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2203–2208.
- Reinbothe S., Pollmann S., Springer A., James R. J., Tichtinsky G., Reinbothe C. (2005) A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR)A. *Plant J.*, 42, 1–12.
- Reinbothe C., Bartsch S., Eggink L. L., Hooper J. K., Brusslan J., Andrade-Paz R., Monnet J., Reinbothe S. (2006) A pentapeptide motif related to a pigment binding site in the major light-harvesting protein of photosystem II, LHCII, governs substrate-dependent plastid import of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Plant Physiol.*, 148, 694–703.
- Riebeseel E., Häusler R. E., Radchuk R., Meitzel T., Hajirezaei M.-R., Emery R. J. N., Küster H., Nunes-Nesi A., Fernie A. R., Weschke W., Weber H. (2010) The 2-oxoglutarate/malate translocator mediates amino acid and storage protein biosynthesis in pea embryos. *Plant J.*, 61, 350–363.
- Röhl T., Motzkus M., Soll J. (1999) The outer envelope protein OEP24 from pea chloroplasts can functionally replace the mitochondrial VDAC in yeast. *FEBS Letters*, 460, 491–494.
- Rueckert D. G. und Schmidt K. (1990) Lipid transfer proteins. *Chem. and Physics of Lipids*, 56 (1), 1-20.
- Runge S., Sperling U., Frick G., Apel K., Armstrong G. A. (1996) Distinct roles for light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *Plant J.*, 9, 513–523.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sambrook J. und Russell D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santel H. J. und Apel K. (1981) The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). The effect of light on the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *FEBS J.*, 120, 95–103.
- Schägger H. und von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*, 166, 368–379

- Schleiff E., Eichacker L. A., Eckart K., et al. (2003) Prediction of the plant beta-barrel proteome: a case study of the chloroplast outer envelope. *Protein Sci.*, 12, 748–759.
- Schmid M., Davison T. S., Henz S. R., Pape U. J., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J. U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Gen.*, 37, 501–506.
- Schneidereit A., Scholz-Starke J., Büttner M. (2003) Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 133, 182–198.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.I., Kunze R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.*, 131, 16–26.
- Soll J., Bölter B., Wagner R., Hinnah S. C. (2000) ...response: the chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends in Plant Sci.*, 5, 137–138.
- Steinkamp T., Hill K., Hinnah S. C., Wagner R., Röhl T., Pohlmeier K., Soll J. (2000) Identification of the pore-forming region of the outer chloroplast envelope protein OEP16. *J. Biol. Chem.*, 275, 11758–11764.
- Stengel A., Soll J., Bölter B. (2007) Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol. Chem.*, 388, 765–772.
- Su Q., Frick G., Armstrong G., Apel K. (2001) POR C of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Mol. Biol.*, 47, 805–813.
- Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T. Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2008) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, 36, doi:10.1093/nar/gkm965
- Tamai H., Iwabuchi M., Meshi T. (2002) *Arabidopsis* GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors. *Plant Cell Physiol.*, 43(1), 99–107.
- Taylor N. L., Rudhe C., Hulett J. M., Lithgow T., Glaser E., Daya D. A., Millar A. H., Whelan J. (2003) Environmental stresses inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Letters*, 547, 125–130.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876–4882.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. und Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 98, 5116–5121.
- Tyra H., Linka M., Weber A., Bhattacharya D. (2007) Host origin of plastid solute transporters in the first photosynthetic eukaryotes. *Genome Biol.*, 8, R212.
- van der Giezen M. und Tovar J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO Reports*, 6, 525–530.
- Waegemann K., Eichacker S., Soll J. (1992) Outer envelope membranes from chloroplasts are isolated as right-side-out vesicles. *Planta*, 187, 89–94.

- 
- Wagner K., Mick D. U., Rehling P. (2009) Protein transport machineries for precursor translocation across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793, 52–59.
- Watson C. F., Zheng L., DellaPenna D. (1994) Reduction of tomato polygalacturonase - subunit expression affects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. *Plant Cell*, 6, 1623–1634.
- Weber A. P. M., Schwacke R., Flügge U. I. (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 56, 133–164.
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 56, 253–279.
- Weigelt K., Küster H., Radchuk R., Müller M., Weichert H., Fait A., Fernie A. R., Saalbach I., Weber H. (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism, and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *Plant J.*, 55, 909–926.
- Zybilov B., Rutschow H., Friso G., Rudella A., Emanuelsson O., Sun Q., van Wijk K. J. (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE*, 3, 1994.
- Zhou C., Yang Y.J., Jong A.Y. (1990) Mini-Prep in 10 minutes. *Biotechniques*, 8, 172-173.

---

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Birgit Simone Pudelski, geb. Hofmann  
Geburtsdatum: 21.08.1979  
Geburtsort: Augsburg  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### STUDIUM UND SCHULBILDUNG

---

08/06 – 03/10 **Promotion am Department Biologie 1, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, LMU München**  
(AG Prof. Dr. J. Soll, AK PD Dr. K. Philippar)  
11/00 – 09/05 **Studium der Gartenbauwissenschaften, TU München, Weihenstphan**  
Abschluss: **Diplom-Agraringenieurin** (Univ.); Note: 1,4  
09/90 – 07/99 **Justus-von-Liebig-Gymnasium, Neusäß**  
Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**; Note: 1,9

### ARBEITEN

---

Diplomarbeit: „Physiologische Reaktion von Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) auf hohe Temperaturen“; Note: 1,2  
**Lehrstuhl für Gemüsebau**  
Seminararbeit: „Botanik und Anbau von Perilla Red (*Perilla frutescens* L. Britton) unter besonderer Berücksichtigung der Keimfähigkeit“; Note: 1,7  
**Lehrstuhl für Gemüsebau**  
Veröffentlichung: Habegger, R., **Hofmann, B. S.** und Schnitzler, W.H. (2004), *Perilla frutescens* L. – eine wertvolle Heil- und Gemüsepflanze aus Asien. Zeitschrift für Arznei und Gewürzpflanzen 9 (4). 155 – 158.  
Projektarbeit: „Verwundungsreaktionen bei Obstgehölzen“  
**Fachgebiet Obstbau**

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

**AUS DIESER ARBEIT ENTSTANDENE ORIGINALVERÖFFENTLICHUNG**

---

**Pudelski, B.**, Soll, J. und Philippar, K. (2009), A search for factors influencing etioplast – chloroplast transition. PNAS 106 (29). 12201-12206

---

**REVIEW**

---

**Pudelski, B.**, Kraus, S., Soll, J. und Philippar, K. (2010), The plant PRAT proteins – preprotein and amino acid transport in mitochondria and chloroplasts. Plant Biology. Im Druck.

---

**POSTER**

---

OEP16: Aminosäuretransport über die äußere Hüllmembran der Chloroplasten – Neue Einblicke in ein Mysterium. **Pudelski, B.**, Soll, J. und Philippar, K. 21. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Deutschland (2008).

---

## DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Jürgen Soll bedanken, für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Herausforderung haben einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Nickelsen für seine spontane Bereitschaft diese Arbeit ebenfalls zu begutachten und zu bewerten, sowie allen weiteren Prüfern und Gutachtern für ihre Flexibilität.

Der größte Dank gilt meiner Betreuerin, PD Dr. Katrin Philippar für die konstante Hilfe und Unterstützung, das Vertrauen in einen Laborneuling und die schönen Abende und netten Feiern auch außerhalb des Labors. Für all die durchkorrigierten Wochenenden stehe ich für immer in Deiner Schuld.

Ich danke allen Kooperationspartnern, für eine problemlose und erfolgreiche Zusammenarbeit, vor allem Dr. Stefan Hoth aus Erlangen und Dr. Hans Weber aus Gatersleben, nicht zuletzt für die Bereitstellung noch nicht veröffentlichter Daten für diese Arbeit. Für eine lustige, lehrreiche und unvergessliche Woche in Kaiserslautern danke ich Jun. Prof. Dr. Ilka Haferkamp, Dr. Michelle Ast und dem ganzen Rest der Mädelsgruppe. Vielen Dank auch Prof. Dr. Leister und Angela Dietzmann für die Bereitstellung und die Erklärung des Fluoreszenzmikroskops und Dr. Meurer für die Einführung in die inverse PCR.

Ein ganz spezieller Dank gilt dem gesamten Labor „003“, allen voran Daniela E., Karl und Julia, die unzählige Samenernten, Aussaaten und Pflanzenscreenings für mich gemacht haben und Olga für die „last minute“ Proteinexperimente. Für eine nette, lustige Arbeits-Atmosphäre danke ich auch Nannan, Cecilia, Roland und den „ehemaligen“: Andreas, Bea, Isabell und Manu. Last but not least danke ich den Mädels: Daniela, die von Anfang an für mich da war und mir jahrelang bis zuletzt bei dieser Arbeit mit Engelsgeduld geholfen hat, Sabrina, Monique und Ingrid. Ihr seid die besten Kolleginnen und Freundinnen, in guten wie in schlechten Zeiten... Was hätte ich nur ohne Euch gemacht?

Vielen Dank allen, die mich beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt haben, besonders Katrin für die zügige und sehr hilfreiche Korrektur, Daniela für die ergänzenden Verbesserungen und Monique, die trotz 9. Monat und weiter Entfernung, für den anderen Blickwinkel gesorgt hat.

Bei allen Postdocs der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die oft dringend benötigten, täglichen Unterstützungen und Hilfeleistungen bedanken, besonders bei Elisabeth, Betti-

na und Serena. Danke, Ulrike für die Aminosäure-Analysen und Irene für die Hilfe an allen Mikroskopen. Des Weiteren geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Soll, vor allem an Philipp und Carsten, für einen tollen Zusammenhalt und viel Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt ein ganz besonderer Dank, allen voran meinen Eltern, die alles erst möglich gemacht haben und meiner Schwester, meiner Hilfe in allen Lebenslagen. Meinem Mann Dominik kann ich nur sagen: Du bist mein Unimog mit Seilwinde und Schnorchel im schweren Gelände - ohne Dich wäre ich schon tausende Male stecken geblieben und hätte aufgegeben. Jetzt haben wir es geschafft!