

Die PRAT2-Proteine der Chloroplasten

*Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München*

**vorgelegt von
Sabrina Maria Kraus**

München
2010



Dissertation eingereicht am: 16.12.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Zweitgutachter: PD Dr. Cordelia Bolle

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Präprotein- und Aminosäure-Transport in Mitochondrien und Chloroplasten	1
1.2	Die PRAT Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.3	Die PRAT2-Proteine des Chloroplasten	7
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	7
2	MATERIAL	8
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	8
2.2	Oligonukleotide	8
2.3	Vektoren und Konstrukte.....	9
2.4	Molekulargewichts- und Größenstandards	11
3	METHODEN.....	12
3.1	Pflanzenphysiologische Methoden.....	12
3.1.1	Saatgut und Anzuchtbedingungen	12
3.1.2	Kreuzungen	12
3.1.3	DAB-Färbung	13
3.1.4	Transfektion von <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
3.2	Mikrobiologische Methoden	14
3.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	14
3.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	18
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategien	18
3.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA	18
3.3.3	Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	18
3.3.5	PCR-Genotypisierung.....	19
3.3.6	Sequenzierung von DNA.....	19
3.3.7	RNA-Präparation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.3.8	<i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	20
3.3.9	DNA Microarray-Analyse	20
3.4	Biochemische Methoden.....	21
3.4.1	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Gewebe	21
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21

3.4.3	Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	22
3.4.4	Die Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot).....	23
3.4.5	Immunodetektion von Proteinen.....	23
3.4.6	Antiseren	24
3.4.7	Proteolytischer Verdau von chloroplastidären inneren Hüllmembranen	24
3.4.8	Überexpression von PRAT2-Proteinen.....	24
3.4.9	Hydrophobe Interaktionschromatographie mit der SAM-Domäne	25
3.4.10	Protein-Identifikation durch Masensspektrometrie	25
3.4.11	Isolierung von Hüllmembranen aus <i>Arabidopsis</i> - und Erbsenchloroplasten	26
3.5	Metaboliten-Analyse	26
3.5.1	Aminosäuren, Organische Säuren und Zucker	26
3.5.2	Auxin und Auxinkonjugate	27
3.5.3	Ammonium.....	27
3.6	Chlorophyll-Analysen	27
3.6.1	Extraktion der Prophyryne aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.6.2	Extraktion der Chlorophylle aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
3.7	Mikroskopie	28
3.8	Computer-Analysen.....	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Die PRAT2-Familie.....	30
4.2	Subzelluläre Lokalisation der PRAT2-Proteine	32
4.3	Die Orientierung der PRAT2-Proteine in den inneren Hüllmembranen von Chloroplasten	33
4.4	Oligomerbildung von PRAT2-Proteinen in der nativen Gelelektrophorese	35
4.5	Interaktionsanalysen im <i>Split Ubiquitin</i> -System	37
4.6	Interaktions-Chromatographie mit der SAM-Domäne	39
4.7	Die <i>PRAT2</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.8	Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien <i>prat2.1</i> und <i>prat2.2</i>	41
4.9	Die <i>prat2</i> -Doppelmutanten in <i>Arabidopsis</i>	44
4.9.1	Phänotypische Analyse	44
4.9.2	Phänotyp unter Auxin-Gabe	50
4.9.3	Phänotyp unter Dauerlichtbedingungen.....	51
4.9.4	Pigmentanalyse	54
4.9.5	DNA-Microarray-Analyse.....	56
4.9.6	2D-BN/SDS-PAGE der Chloroplastenproteine	59
4.9.7	Metaboliten-Analyse	61
4.9.8	Auxin-Analyse	64

4.10	Untersuchungen zur Funktion der PRAT2-Proteine.....	66
4.10.1	Elektrophysiologische Untersuchungen	66
4.10.2	Komplementation von Hefemutanten mit deletierten Aminosäurepermeasen.....	67
4.10.3	Komplementation von TIM Hefemutanten mit PRAT2-Proteinen	68
4.10.4	Transportfunktion von PRAT2-Proteinen in Hefe.....	70
5	DISKUSSION	71
5.1	Die PRAT2-Proteine bilden eine Pore in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten .	71
5.2	Die PRAT2-Proteine besitzen eine SAM-Domäne im Intermembranraum	75
5.3	Die PRAT2-Proteine sind essentiell für die Pflanzenentwicklung	76
5.4	Der Phänotyp der <i>prat2</i> -Doppelmutante wird durch Dauerlicht unterdrückt.....	78
5.5	Spielen die PRAT2-Proteine eine Rolle in der Auxin-Homöostase ?	81
5.6	Das Fehlen der PRAT2-Proteine induziert erhöhte Stoffwechselflüsse in Aminosäuren	83
5.7	Ausblick	88
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
7	ABKÜRZUNGEN.....	91
8	ABBILDUNGEN	93
9	TABELLEN	94
10	LITERATUR.....	95
11	ANHANG	102
12	DANKSAGUNG	115
13	LEBENS LAUF	116
14	EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG.....	117
15	ERKLÄRUNG	118

1 EINLEITUNG

Pflanzen vermögen durch die Photosynthese die Energie des Sonnenlichts in chemisch gebundene Energie umzuwandeln. Die Photosynthese geschieht in den Chloroplasten der Mesophyllzellen grüner Blätter. Der Chloroplast erfüllt neben der photosynthetischen Fixierung von Kohlenstoff noch eine Anzahl anderer biochemischer Funktionen. Dazu gehören die Synthese von Fettsäuren, Aminosäuren und Porphyrinen sowie die Sulfat- und Nitratreduktion. Dabei müssen Stoffwechselintermediate über das Membransystem des Chloroplasten ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck sind die äußeren und inneren Hüllmembranen des Chloroplasten mit spezifischen Transportern und Ionenkanälen versehen (Philippart und Soll, 2007; Weber und Fischer, 2007).

1.1 Der Präprotein- und Aminosäure-Transport in Mitochondrien und Chloroplasten

Mitochondrien und Plastiden sind semi-autonome Organellen eukaryontischer Zellen, die auf die Endosymbiose eines Vorläufers der heutigen α -Proteobakterien bzw. Cyanobakterien mit einer ursprünglichen eukaryotischen Zelle zurückgehen. Während der Evolution wurde ein Großteil der Gene beider Endosymbionten auf das Genom der Wirtszelle übertragen (Gross und Bhattacharya, 2009; Gould et al., 2008). Heute werden über 95% des chloroplastidären und ca. 99% des mitochondriellen Proteoms im Zellkern kodiert. Als Konsequenz müssen Chloroplasten und Mitochondrien Proteine, die kernkodiert sind und im Zytosol translatiert werden, über ihr Membransystem ins Innere des Organells transportieren. Für den Import von Präproteinen in den Chloroplasten und die Mitochondrien existiert daher eine Vielzahl von Transportproteinen (Benz et al., 2009; Wagner, 2000; Wiedemann et al., 2004).

In Mitochondrien werden die Vorstufenproteine zunächst durch den TOM-Komplex über die äußere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum transportiert. Im Weiteren erfolgt die Proteintranslokation über die innere Mitochondrienmembran mithilfe von zwei funktionell verschiedenen Komplexen: a) dem TIM17/TIM23-Komplex und b) dem TIM22-Komplex. Der TIM17/TIM23-Komplex übernimmt den Import von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Matrix, die eine Zielsteuerungssequenz besitzen (Mokranjac und Neupert, 2009). TIM17 steht in engem Kontakt zu TIM23 und beeinflusst wahrscheinlich

die Kanalaktivität, wobei die genaue Funktion noch nicht geklärt ist. Voraussetzung für die Translokation der Proteine ist das Membranpotential, da es zum einen das Kanalprotein TIM23 aktiviert und zum anderen eine Kraft auf die positiv geladene Zielsteuerungssequenz ausübt. Zusätzlich werden die Vorstufenproteine durch die Hydrolyse von ATP energetisiert (Neupert und Herrmann, 2007).

Der TIM22-Komplex, der in Bezug auf seine typischen Substrate auch Carrier-Translokase genannt wird, vermittelt den Einbau von hydrophoben Vorstufenproteinen in die innere Mitochondrienmembran (Wagner et al., 2009). Vorstufenproteine, deren Ziel die innere Membran ist, besitzen meist keine abspaltbare Zielsteuerungssequenz. Sie binden nach dem Passieren des TOM-Komplexes an die Proteine TIM9 und TIM10, die die hydrophoben Vorstufenproteine durch den wässrigen Intermembranraum zum TIM22-Komplex geleiten. TIM22 bildet die Membranpore, die ähnlich wie bei TIM23 vom Membranpotential aktiviert wird. Im Fall der Carrier-Translokase ist das Membranpotential allerdings die einzige Energiequelle, die für die Insertion der Vorstufenproteine in die innere Mitochondrienmembran benötigt wird. Weitere Bestandteile des TIM22-Komplexes sind TIM54 und TIM18, deren Funktionen allerdings noch nicht bekannt sind.

TIM17, TIM22 und TIM23 sind strukturell verwandt: Sie bestehen aus vier α -helicalen Transmembransegmenten und konservierten terminalen Bereichen. TIM23 besitzt einen hydrophoben N-Terminus, der in der äußeren Membran verankert ist (Donzeau et al., 2000). Die Sequenzhomologie von TIM17, TIM22, TIM23 ist besonders ausgeprägt in Bereich der zweiten und dritten Transmembranhelix einschließlich der dazwischen liegenden Peptidschleife. Diese in ihrer Sequenz und Funktion ähnlichen Proteine werden in der Überfamilie der PRAT (*preprotein and amino acid transporters*) Proteine zusammengefasst (Rassow et al., 1999).

Chloroplasten besitzen eine Proteinimportmaschinerie, die sich in ihren Komponenten und im Mechanismus von der Proteinimportmaschinerie der Mitochondrien unterscheidet. Die meisten der untersuchten Vorstufenproteine nehmen den Weg über zwei Proteinkomplexe, nämlich die Translokase der äußeren Chloroplastenmembran, genannt TOC-Komplex und die Translokase der inneren Chloroplastenmembran, genannt TIC-Komplex. Der TOC - Komplex besteht im Kern aus dem GTP-abhängigen Rezeptor TOC34, der Vorstufenproteine anhand einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz erkennt, dem Importkanal TOC75 und dem GTP-getriebenen Motorprotein TOC159 (Soll und Schleiff, 2004). In loser Verbindung zum Kernkomplex steht TOC64, das wahrscheinlich mit HSP90 interagiert. Nach dem Transport über die äußere Membran werden die Vorstufenproteine

unmittelbar an den TIC-Komplex weitergeleitet. An der Translokation über die innere Hüllmembran sind TIC110, TIC40, TIC55, TIC62, TIC32, TIC22 und TIC20 beteiligt (Benz et al., 2009). TIC110 bildet das zentrale Protein des Translokationsapparates, und TIC20 ein möglicherweise alternatives Kanalprotein (Reumann et al., 2005). Bei den Komponenten TIC55, TIC62 und TIC32 handelt es sich um das sogenannte „Redox-Regulon“ des Komplexes, da diese Proteine Redoxpotential-abhängig den Proteinimport regulieren (Stengel et al., 2008).

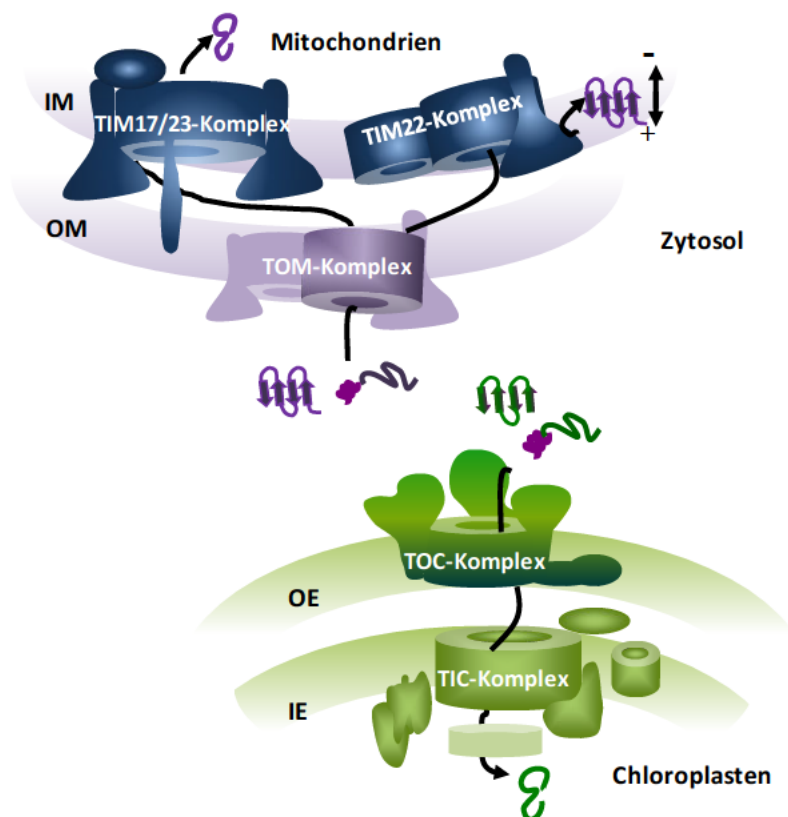


Abbildung 1: Übersicht über die Proteinimportmaschinerie in Chloroplasten und Mitochondrien.

Die Vorstufenproteine aus dem Zytosol werden durch die Proteinimportmaschinerien in die Zielorganellen transportiert. Chloroplast: Komponenten der Proteinimportmaschinerie (TOC- und TIC-Komplex) in der äußeren (OE) und inneren (IE) Hüllmembran sind in grün dargestellt. Mitochondrien: Der TIM17/TIM23-Komplex in der inneren Mitochondrienmembran (IM) ist in blau dargestellt und der TOM-Komplex der äußeren Mitochondrienmembran (OM) in lila.

Während die meisten der im Zytosol translatierten Proteine über die TIC/TOC-Komplexe importiert werden, muss man davon ausgehen, dass weitere Importwege in den Chloroplasten existieren. Es wurde gezeigt, dass eine weitere Importroute via sekretorisches System in den Chloroplasten existiert (Villarejo et al., 2005). Das von den Autoren untersuchte Protein, eine α -carbonische Anhydrase, besitzt ein ER-targeting Signal und wird im ER glykosiliert, bevor es durch vesikulären Transport in den Chloroplasten gelangt. Ein weiteres Indiz liefern Importstudien mit dem Protein TIC32. Das

Protein besitzt kein klassisches N-terminales Transitpeptid und wird auch importiert, wenn der TOC-Komplex vorher blockiert wurde (Nada und Soll, 2004). Zudem wurden im Proteom von Plastiden viele Proteine gefunden, von denen eine plastidäre Lokalisierung nicht vorhergesagt wurde, da keine klassischen N-terminalen Zielsteuerungssequenzen vorhanden war. Bei den Proteinen der Hüllmembran war dieser Anteil besonders hoch (Kleffmann et al., 2004).

Für den Aufbau von Aminosäuren nehmen Pflanzen Stickstoff in Form von Nitrat oder Ammonium aus dem Boden auf und assimilieren diesen im Chloroplast durch die Glutaminsynthetase (GS) und die Glutamat-Synthase (GOGAT) zu Aminosäuren (Weber and Flügge, 2002). Insgesamt enthält das *Arabidopsis* Genom 53 Aminosäuretransporter in 9 Proteinfamilien (Wipf et al., 2002). Die Aminosäuretransporter lassen sich in zwei Überfamilien gliedern, die APC-Familie (*amino acid-polyaminecholine transporter*), die nochmals in drei Unterfamilien gegliedert ist, und die ATF-Familie (*amino acid transporter family*), die sechs Unterfamilien besitzt (Rentsch et al., 2007; Wipf et al., 2002).

Interessanterweise besitzen auch andere Genfamilien Aminosäuretransporter, die speziell in den Membranen der Organellen lokalisiert sind. In der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten wurde OEP16 gefunden. OEP16 ist ein Mitglied der PRAT-Familie und ist ein kationenselektiver Kanal mit einer Spezifität für Aminosäuren und Amine (Pohlmeyer et al., 1997; Steinkamp et al., 2000; Philippar et al., 2007; Pudelski et al., 2009). In der inneren Chloroplastenhüllmembran wurde bis jetzt nur ein Aminosäuretransporter identifiziert. Der Dicarboxylat-Transporter DiT2.1 gehört zur DASS- Familie (*divalent anion:Na⁺ symporter*) und vermittelt während der Photorespiration den Austausch von Glutamat mit cytosolischem Malat (Renne et al., 2003). In den Mitochondrien von *Arabidopsis* wurden die Aminosäuretransporter AtmBAC1 und AtmBAC2 (*mitochondrial basic amino acid carriers*) beschrieben. Diese gehören zur MCF Familie (*mitochondrial carrier family*) und transportieren Arginin, Lysin, Ornithin und Histidin (Catoni et al., 2003; Hoyos et al., 2003; Palmieri et al., 2006).

In höheren Pflanzen werden die Aminosäuren nicht nur für die Synthese von Proteinen benötigt, sondern sind auch Bausteine für Sekundärmetabolite. So nimmt Glutamat eine zentrale Stellung als Reaktionspartner in Transaminase-Reaktionen und als Ausgangssubstanz für die Synthese von Tetrapyrrolen ein. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin dienen als Ausgangsstoffe der Sekundärmetabolite, wie z.B. des Hormons Auxin, der Alkaloide, der Glucosinolate und des Lignins. Die

schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein sind von Bedeutung, da der Schwefel in andere Verbindungen eingebaut werden kann z.B. in Acetyl-Coenzym A und S-Adenosyl-Methionin (zur Übersicht Buchanan, 2000).

1.2 Die PRAT Proteine von *Arabidopsis thaliana*

Die Familie der Präprotein- und Aminosäure-Transporter (PRAT Proteine) wurde erstmals von Rassow et al., 1999 definiert. Im Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind 17 verschiedene PRAT Proteine annotiert. Diesen ist gemeinsam, dass sie keine abspaltbare Transitsequenz besitzen und dass sie aus vier hydrophoben Transmembrandomänen, die durch drei hydrophile Schleifen verbunden sind, einen membrandurchspannenden Kanal bilden (Murcha et al., 2007; Pudelski et al., 2010). Die Familienmitglieder unterscheiden sich im N- und C-Terminus, zeigen jedoch Sequenzhomologien im Bereich der zweiten und dritten Transmembranhelix, so dass hier das für die PRAT-Familie typische Sequenzmotiv definiert wurde: $[G/A]_{x2}[F/Y]_{x10}R_{x3}D_{x6}[G/A/S]G_{x3}G$ (Rassow et al., 1999). Die phylogenetische Analyse teilt die Familie in 8 Gruppen auf, von denen 4 Gruppen bereits charakterisiert sind (Abbildung 2). Zu diesen zählen die 1) TIM17 und TIM23 Proteine, 2) die TIM22 Proteine und 3) die OEP16 Proteine. Des Weiteren gibt es vier Unterfamilien in der PRAT-Familie, die noch nicht im Detail untersucht wurden. Sie wurden als PRAT1, PRAT2, PRAT3 und PRAT4 Proteine bezeichnet (Pudelski et al., 2010).

Die TIM17, TIM23 sowie die TIM22 Proteine bilden die Proteintranslokasne in der inneren Membran von Mitochondrien (Abbildung 1). Während im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* jeweils nur ein Gen für TIM17 und TIM23 kodiert, existieren in *Arabidopsis* drei Isoformen für die Proteine TIM17 und TIM23. Die TIM17-Proteine aus *Arabidopsis* besitzen gegenüber den Hefeproteinen eine C-terminale Extension, wohingegen den TIM23 Proteinen eine N-terminale Domäne gegenüber den Hefeproteinen fehlt (Murcha et al., 2003). Diese C-terminale Domäne von TIM17-2 ist essentiell für die Funktionalität des TIM17/TIM23-Komplexes in *Arabidopsis* und verankert diesen in der äußeren Membran (Murcha et al., 2005), eine Aufgabe die in Hefe die N-terminale Domäne von TIM23 übernimmt (Donzeau et al., 2000). Weiterhin besitzt *Arabidopsis* zwei Isoformen der Carrier-Translokase TIM22.

Dahingegen ist OEP16 ein abundantes Protein der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten (*outer envelope protein* 16kDa). Kanäle aus rekombinant erzeugtem OEP16

Protein sind selektiv für Aminosäuren und Amine und schließen Triphosphate oder ungeladenen Zucker aus (Pohlmeyer et al., 1997). In *Arabidopsis* existieren drei Isoformen mit unterschiedlichen Expressionsprofilen. OEP16.1 repräsentiert das abundanteste Protein und ist in der äußeren Chloroplastenmembran in maturen Blättern lokalisiert. OEP16.2 wird nur in Samen, Kotyledonen und in Pollen exprimiert (Drea et al., 2006; Philippar et al., 2007). Transkripte von At-OEP16.4 sind ubiquitär exprimiert mit einem Maximum in Samen und Pollen (Duy et al., 2007; Pudelski et al., 2010).

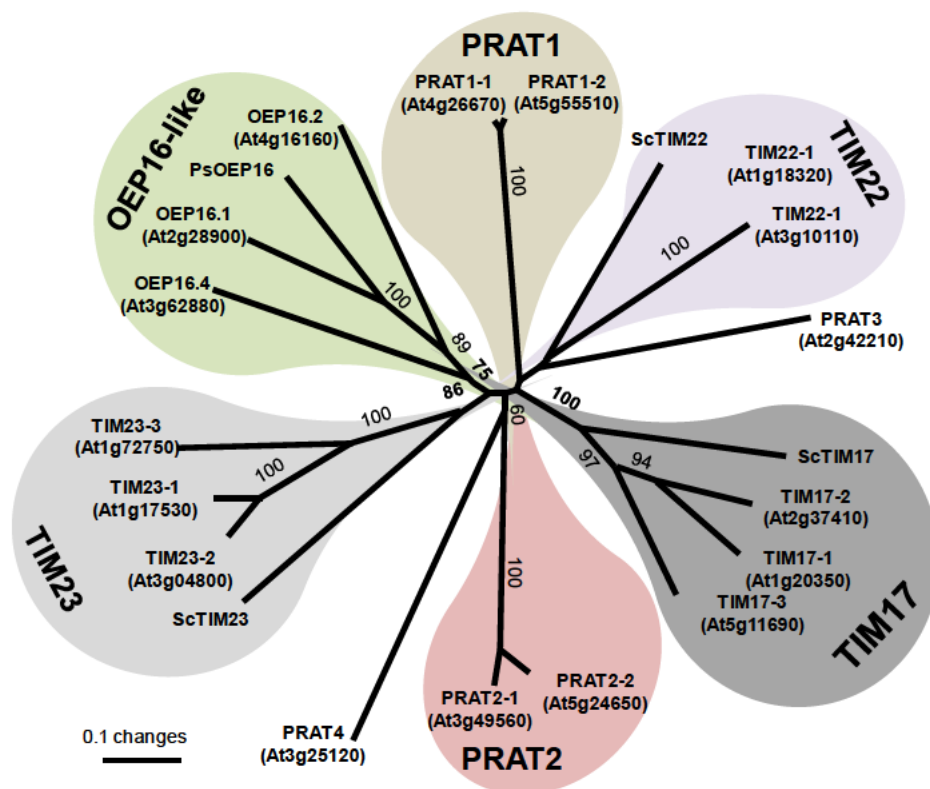


Abbildung 2: Die PRAT-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (modifiziert nach Murcha et al., 2007)

Die Proteine TIM17, TIM22, TIM23 aus Hefe (Sc) und OEP16 aus Erbse (Ps) wurden zum Vergleich miteinbezogen. 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 (Pudelski et al., 2010).

Die Proteine PRAT1 bilden eine eigenständige Unterfamilie in der PRAT-Familie. Sie wurden in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert und vorläufige Versuche einer Hefekomplementation mit TIM17 Mutanten zeigten, dass PRAT1 Proteine an einem alternativen Importweg in die Plastiden involviert sein könnten (Murcha et al., 2007).

Des Weiteren gehören zur PRAT-Familie die Proteine PRAT3 und PRAT4, die jeweils als eigenständige Unterfamilie definiert wurden (Pudelski et al., 2010). Beide Proteine wurden in den Mitochondrien lokalisiert, sind aber darüber hinaus noch nicht näher charakterisiert (Murcha et al., 2007; Philippar et al., 2007).

1.3 Die PRAT2-Proteine des Chloroplasten

Die PRAT2-Proteine wurden im Rahmen von Proteomanalysen entdeckt (Ferro et al., 2002; Ferro et al., 2003; Froehlich et al., 2003). Wie alle Familienmitglieder der PRAT-Familie sind die PRAT2-Proteine charakterisiert durch vier hydrophobe Transmembrandomänen, die durch hydrophile Schleifen verbunden sind, und sie besitzen kein N-terminales Transitpeptid. Die *Arabidopsis* Isoformen PRAT2.1 und PRAT2.2 sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 82% identisch und bilden eine eigenständige Unterfamilie (Murcha et al., 2007). Beide Proteine konnten durch *in vitro* Importexperimente, Immunodetektion und GFP-Fusionskonstrukte im Chloroplasten nachgewiesen werden. Für PRAT2.2 wurde zusätzlich eine Lokalisierung in den Mitochondrien vorhergesagt (Murcha et al., 2007). Um zu untersuchen, ob es sich bei den PRAT2-Proteinen am Proteinimport in den Chloroplasten beteiligte Komponenten handeln könnte, wurden zahlreiche Importstudien mit PRAT2 Funktionsverlustmutanten von Dr. Manuela Baumgartner durchgeführt. Letztlich gab es jedoch keine Hinweise darauf, dass die PRAT2-Proteine am Proteinimport beteiligt sind.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem geschilderten Hintergrund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

- (i) Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation der PRAT2-Proteine;
- (ii) Die Identifikation möglicher Interaktionspartner von PRAT2 im Chloroplasten;
- (iii) Die Beschreibung der Membrantopologie der PRAT2-Proteine;
- (iv) Die Herstellung von PRAT2 Funktionsverlustmutanten;
- (v) Die Einbindung von PRAT2-Proteinen in den pflanzlichen Stoffwechsel;

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GibcoBRL (Paisley, UK), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen: Restriktionsenzyme von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), T4-Ligase von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Taq-Polymerasen von Diagonal (Münster, Deutschland), Eppendorf, MBI Fermentas und Finnzymes (Espoo, Finnland), Reverse Transkriptase von Promega (Madison, USA), RNase von Roche (Mannheim, Deutschland), Thermolysin von Merck.

2.2 Oligonukleotide

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden Oligonukleotide der Firmen Qiagen/Operon (Köln, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Metabion (München, Deutschland) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Name	Sequenz (5'→3' Orientierung)	Verwendung
Act2/8fw	GGTGATGGTGTGTGTCT	RT-PCR
Act2/8rev	ACTGAGCACAATGTTAC	
PRATC2.1 LC fw	GCAGCGTTAGGATCTGG	
PRATC2.1 Lcrev	CCCTTTATCTCCGGGTC	
PRATC2.2GWFH4	CACC ATG GGA CAG CCT ATG AAT GCA ATC A	
PRATC2.2 GWRstop	TCA ACC ACG ACT TCC CCG CT	
oligo-dT-Primer	T ₂₅ V[NQ]	Reverse Transkription
Salk031707 LP	AGTTTGCAGAGTGGTGGCAGC	Genotypisierung von SALK Mutantenlinien
Salk031707 RP	TTGGCCAATTGTATGAACCAAAA	
Salk136525 LP	CATGGTGTGGCAACGGTAAAC	
Salk136525 RP	CAGAAAAATGACAATTGCAAAAACA	
SALK_149871LP2	AAAGTTCCCATTAACACCCG	
SALK_149871RP2	AATAACATGGTGTGGCAACG	
SALK_1365252LP2	CAAAACAGAAGTTACCGGTGG	
SALK_136525RP2	CCAGGAAACAACAATTCACAC	
SALK_112126LP2	TATCATAAGTCTTGGCCCTGG	
SALK_112126RP2	CTGCTGGTTTTGCTGTTTTTC	
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Genotypisierung von SALK Mutantenlinien
M13fw	GTAAACGACGGCCAG	

M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
KompC2.1fw/ 35S	GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGG	<i>in vivo</i> Komplementation
KompC2.1fw/ 35S	TCCACCGGAATCGACTGTTTC	
C2.1noSAMSt	TCAAGTACTCGGTTTAGAGAATCTTTC	
Gh3.9fw	CACCATGGATGTAATGAAGCTTGATCACGACAG	GFP Analyse
Gh3.9R	TGGAACCCAAGTCGGGTCACG	
Gh3.14fw	CACCATGTTGCCAAAGTTCGATCCAACAG	
Gh3.14R	TCGGCTGGAATGCAGCTCATG	
Cyp79B2fw	CACCATGAACACTTTTACCTCAAACCTCTTCG	
Cyp79B2R	CTTCACCGTCGGGTAGAGATGC	
PratC2.1Sfi fw	GCC GGC CAT TAC GGC CAT GGT GGT AGG C	<i>Split Ubiquitin</i>
PratC2.1SfirevohneStopcorr	GCC GGC CGA GGC GGC CAT CTT TCG TTT G	
PratC2.1Sfi +stop	GGCGGCCGAGGCGGCCATCTACTTTTCGTTTG	
PratC2.2Sfi fw	GCC GGC CAT TAC GGC CAT GGG GAA AGA CG	
PratC2.2Sfi +stop	GGCCGAGGCGGCCATTCAACCACGA	
PratC2.2Sfi fw ohne Stop	GAC GGC CGA GGC GGC CAC CAC GA	
PratC21-SAM+stoprev	GGCGGCCGAGGCGGCCATTCAAGTACTCAA	
PratC21-SAMohnestoprev	GGCGGCCGAGGCGGCCATAGTACTCAA	
Prat C2.1fwmit Not	GCA GCG GCC GCA TGG TGG TAG GCG G	Subklonierung in pNEV Hefevektor
SucPromfwmit Not	GCC GCG GCC GCA TGA TGC TTT TGC AAG GTT	
Prat C2.1revmitstopmitNot	GGC GCG GCC GCC TAC TTT CGT TTG CCC TTT AT	
p-Nev Sequenzierprimer	GTG TGT GTG TGT GTG AAG CTA AGA G	
Prat C22mitNotfw	GCA GCG GCC GCA TGG GGA AAG ACG GAG AAG	
Prat C22revstopmit Not	TGC GCG GCC GCT CAA CCA CGA CTT CCC C	

2.3 Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierung wurden folgende Plasmid-Vektoren verwendet und Konstrukte hergestellt:

Tabelle 2: Verwendete Plasmid-Vektoren.

Plasmid-Vektor	Verwendung	Herkunft
pCR2.1	Subklonierung	Invitrogen
pJET1.2	Subklonierung	Fermentas
pSP65	Subklonierung	Promega
pENTR/D/TOPO	Entry-Vektor für GATEWAY-Klonierung	Invitrogen
pET21	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	Novagene/Merck (Darmstadt)
pPROExHTa	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	
pBT3-C	Köder-Vektor für <i>Split Ubiquitin</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich)
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>	"
PVTU102	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i>	
pH2GW7	GATEWAY-Klonierung	"

Tabelle 3: In dieser Arbeit hergestellte Plasmid-Konstrukte.

Protein	Plasmid-Vektor	Verwendung
At-PRAT21	pBT3-C/ Köder-Vektor (C-terminal)	Interaktionsanalyse im <i>Split Ubiquitin</i>
At-PRAT21	pBT3-SUC/ Köder-Vektor (C-terminal + SUC)	
At-PRAT22	pPR3-C/ Beute Vektor (C-terminal)	
At-PRAT22	pPR3-SUC/ Beute Vektor (C-terminal +SUC)	
At-PRAT21	pBT3-N/ Köder-Vektor (N-terminal)	
At-PRAT22	pPR3-N/ Beute-Vektor (N-terminal)	
At-PRAT21	pPR3-N/ Beute-Vektor (N-terminal)	
At-PRAT22	pPR3-N/ Beute-Vektor (N-terminal)	
At-PRAT21-SAM	pBT3-SUC/ Köder-Vektor (C-terminal +SUC)	
At-PRAT21	pH2GW7	Komplementation prat2-Doppelmutante/ Überexpressionslinien
At-PRAT21-SAM	gH2GW7	
At-PRAT21	pProEx Hta	Expression in <i>E. coli</i>
At-PRAT22	pProEx Hta	
At-PRAT21-SAM	pProEx Hta	
pisum C2SAM	pProEx Hta	
Prat C2.1non stop	pENTRY/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
CypB2 no stop	pENTRY/D/TOPO	
GH3.9	pENTRY/D/TOPO	
GH3.14	pENTRY/D/TOPO	
GH3.9	PH2GWF7	GFP Analyse
GH3.14	PH2GWF8	
CypB2	PH2GWF9	
C21+stop	pNEV/Not	Auxin-Messung in Hefe
SucProm/ C21+stop	pNEV/Not	
C22+stop	pNEV/Not	
SucProm/ C22+stop	pNEV/Not	
At-PRAT21+stop	pCRII	Subklonierung
SucProm/ C21+stop	pCRII	
At-PRAT22+stop	pCRII	
SucProm/ C22+stop	pCRII	
C21 –SAM+stop	pCRII	
C21-stop sfi	pCRII	
C22-stop sfi	pCRII	
PRAT2.1-SAM	PVT-U102	Hefekomplementation

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte.

Protein	Plasmid-Vektor	Verwendung
PRAT2.1	psP65	Subklonierung/ <i>in vitro</i> Translation
PRAT2.2	psP65	
psC2	psP65	
psC2-SAM	psP65	
PRAT2.1	PVT-U102	Hefekomplementation
PRAT2.2	PVT-U102	
pSP64	pSSU	<i>in vitro</i> Translation

2.4 Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE diene ein „Low Molecular Weight Marker“ bestehend aus α -Lactalbumin (14,2kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1kDa), Trypsinogen (24kDa), Carboanhydrase (29kDa), Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (36kDa), Ovalbumin (45kDa) und Rinderserumalbumin (66kDa) von Sigma-Aldrich. Für die BN-PAGE wurde ein „High Molecular Weight native Marker“ bestehend aus Albumin (66kDa), Lactat-Dehydrogenase (140kDa), Catalase (232kDa), Ferritin (440kDa) und Thyroglobulin (669kD) von Amersham Pharmacia verwendet. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit *Pst*I geschnittene DNA des Phagen λ (MBI Fermentas) als Größenstandard genutzt.

3 METHODEN

3.1 Pflanzenphysiologische Methoden

3.1.1 Saatgut und Anzuchtbedingungen

Samen von *Arabidopsis* (L.) Heynh., Ecotyp Col-0 wurden bei Lehle Seeds (Round Rock, USA) bezogen. Die T-DNA-Insertionslinien SALK_031707, SALK_112126, SALK_136525 und SALK_149871 wurden bei NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, Nottingham, UK) erworben. Es wurden Erbsen (*Pisum sativum* L.) der Sorte "Arvica" (Prag, Tschechien) verwendet.

Vor der Aussaat wurden die *Arabidopsis* Samen mit 70% EtOH und 5% Hypochlorit Oberflächen-sterilisiert. 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). Um den Einfluss von Auxin auf das Wachstum der Pflanzen zu testen wurde dem Medium steril filtriertes Auxin (IES: Indol-3-essigsäure) zugefügt. Zur Selektion transformierter Pflanzen wurde dem MS-Agar entsprechendes Antibiotikum (30-50µg/ml Hygromycin oder 100µg/ml Kanamycin) zugegeben. Nach 2-3 Wochen wurden die Pflanzen zur weiteren Anzucht in Erde (A210, Stender, Schermbeck, Deutschland) gepflanzt. Das Wachstum erfolgte in einem Zyklus von 16h Licht bei 21°C und einer Lichtintensität von 100µmol/m²s sowie 8h Dunkelheit bei 16°C oder unter Dauerlichtbedingungen mit 24h Licht (Lichtintensität 100µmol/m²s) und 21°C.

3.1.2 Kreuzungen

Es wurden zwei unabhängige *prat2*-Doppelmutanten aus den jeweiligen Einzelmутanten hergestellt. Für die erste *prat2*-Doppelmutante (c2dm1) wurden die homozygoten Linien SALK_031707 und SALK_136525 und für die zweite *prat2*-Doppelmutante (c2dm2) die homozygoten Linien SALK_149871 und SALK_136525 gekreuzt. Von den Mutterpflanzen wurden Schoten sowie Blütenknospen, die nicht mehr vollständig geschlossen sind, abgeschnitten. Mithilfe einer Pinzette wurden auch die an den Blütenständen innen liegenden, sehr kleinen Knospen entfernt, und jeweils der Fruchtknoten mit geeigneter Größe freipräpariert. Für die Bestäubung wurden den Vaterpflanzen die bereits geöffneten

Blüten entnommen, und ihre Antheren über die Fruchtknoten der Mutterpflanze gestrichen.

Tabelle 16: Herstellung unabhängiger *prat2*-Doppelmutanten aus vier SALK-Linien.

Die *prat2*-Doppelmutante c2dm1 wurde durch Kreuzung der Linien *prat2.1-1* und *prat2.2-1* erzeugt, die zweite unabhängige Linie c2dm2 aus den Linien *prat2.1-2* und *prat2.2-2*. Der Ort der T-DNA-Insertion in den *PRAT2* Genen ist angegeben.

	Protein	Salk-Linie	Name	T- Insertion
Doppelmutante c2dm1	PRAT2.1	Salk 031707	prat2.1-1	Exon 4
	PRAT2.2	Salk 136525	prat2.2-1	Exon 2
Doppelmutante c2dm2	PRAT2.1	Salk 112126	prat2.1-2	Exon 4
	PRAT2.2	Salk 149871	prat2.2-2	Promotor

3.1.3 DAB-Färbung

Zur Untersuchung der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte der Nachweis von H_2O_2 durch Färbung mit dem Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (modifiziert nach Thordal-Christensen et al., 1997). Hierfür wurden Rosettenblätter in einer frisch hergestellten DAB-Färbelösung (0,2% [w/v] 3,3'-Diaminobenzidin; pH 3,8 (HCl)) für 2h bei RT inkubiert, danach mit H_2O gewaschen und mit 70 % EtOH entfärbt.

3.1.4 Transfektion von *Arabidopsis thaliana*

Die Transfektion von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen bzw. homozygoten *c2dm* Mutanten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bechtold et al., (1993) über Vakuuminfiltration der Infloreszenzen. Die Pflanzen wurden nach der Anzucht in Sterilkultur zu viert in Töpfe auf Erde pikiert und bis zur Blüte angezogen. Nach der Resektion der Primärinfloreszenzen wurden die Pflanzen nach der Ausbildung zahlreicherer Sekundärinfloreszenzen für die Transfektion eingesetzt. Am Tag vor der geplanten Transformation wurden die zu transformierenden Pflanzen luftdicht abgedeckt. Für die Pflanzentransfektion wurden die Agrobakterienkolonien, die die entsprechenden Vektoren zur Pflanzentransformation enthielten, in 5ml LB-Medium (1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl und für Platten 1.5% Agar) überimpft und bei 28°C ca. 26h im Kulturschüttler inkubiert. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Dann wurden 500ml LB-Medium mit den Vorkulturen angeimpft und 2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden bei 6000xg für 10min sedimentiert und in 400ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose; 0,215% MS; 0,02% Tween 20) resuspendiert. Die zu transformierenden Pflanzen wurden kopfüber in das

Infiltrationsmedium getaucht und unter Vakuum für etwa 1 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 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transfektion von *Arabidopsis* Pflanzen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986; erhalten von Dr. J. Meurer, Department Biologie 1, Botanik, LMU München) eingesetzt. Die Anzucht erfolgte standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln bzw. auf LB-Agarplatten. Dem Medium wurden folgende Antibiotika zugesetzt: 50µg/ml Kanamycin (Resistenz Stamm GV3101), 100µg/ml Rifampicin (Resistenz Ti-Plasmid), 100µg/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmid-Vektor).

Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien wurde 10ml 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 1ml-Aliquots durch Zentrifugation für 5 min bei 16000xg und 4°C. Die Pellets wurden in 100µl 4°C-kaltem CaCl₂ (10mM) resuspendiert und anschließend für 5 min zentrifugiert (16000xg, 4°C). Danach wurden die Zellen in 50µl 4°C-kaltem CaCl₂ (10mM) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 50µl gefrorene, kompetente Agrobakterien mit 0,5µg Plasmid- DNA versetzt und 2min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für 5min bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400µl LB-Flüssigmedium wurde der Transformationsansatz für 3h unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10sec bei 16000xg. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgebracht und für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert.

3.2.2 *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurden die *E. coli* Stämme DH5α (Invitrogen), TOP10 (Invitrogen), JM109 (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Anzucht erfolgte 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 (100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin, 100µg/ml Spectinomycin) zugegeben. Die Blau/Weiß-Selektion bei Vektoren mit *lacZα*-Fragment zur Expression der β -Galactosidase (pCR2.1 und pCRII) erfolgte durch die Zugabe von 60µg/ml X-Gal (Sambrook et al., 1989). 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).

3.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.3.1 Transformation

Die Transformation der Hefestämme (NMY51, MATa his3D200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop) 4-HIS3 ura3::(lexAop) 8-lacZ ade2::(lexAop) 8-ADE2 GAL4) wurde in Anlehnung an die Li-Acetat-Methode von Gietz und Schiestl (1991) durchgeführt. Das Wachstum erfolgte in Flüssigmedium (YPD 2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 1% Glukose). Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden zu einer optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 0,15 angeimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 durch Zentrifugation für 3min bei 1000xg. Die Zellen wurden in 1 Volumenanteil H₂O sowie in 1/4 Volumenanteil LiSorb (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 1M Sorbitol) gewaschen und pro 50ml Kultur in 300µl LiSorb resuspendiert. Danach wurden pro 50µl Hefesuspension 7µl einzelsträngige „Carrier-DNA“ (Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type III from Salmon Testes, Sigma-Aldrich, 2mg/ml) zugeben. Die Zellen wurden aliquotiert und für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde zu 50µl kompetenten Zellen 1-2µg Plasmid-DNA und 300µl LiPEG (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 40% PEG3500) gegeben, vermischt und 20min inkubiert. Danach wurden 35µl DMSO zugefügt und es erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden pelletiert (2min bei 1500xg), in 200µl Selektionsmedium (SC-ura) aufgenommen und auf Selektions-Platten ausgebracht. Das Selektionsmedium enthielt 67% YNB [Yeast Nitrogene Base, ohne Aminosäuren]; 0,2% Dropout-Mix; 2% Glukose), dem kein Uracil zugesetzt wurde (SC-ura). Der Dropout-Mix (-ura) enthielt jeweils 4,3% der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Myo-Inositol, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin

sowie 1% Adenin, 8,5% Leucin und 0,4% para-Aminobenzoesäure in Gewichtsprozent. Für die Anzucht auf Agarplatten wurde dem Medium entweder 2% Agar (YPD) oder 2% Agarose (SC-ura) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für mehrere Tage bei 30°C bis Einzelkolonien sichtbar waren.

3.2.3.2 Auxin-Transportstudien in Hefe.

Für die funktionellen Untersuchungen der PRAT2-Proteine wurden Aufnahmeexperimente mit [3H]Indole-3-Essigsäure im heterologen Hefesystem durchgeführt. Die cDNA von PRAT2.1 und PRAT2.2 wurde dazu über die Not-Schnittstelle in den Hefevektor pNEV kloniert. Für beide Varianten wurde zusätzlich das Signalpeptid SUC2 vor die Proteine fusioniert. SUC2 beinhaltet die Signalsequenz der extrazellulären Invertase aus Hefe (PBT3-Suc Vektor des *Split Ubiquitin* Systems) und ermöglicht so das Plasmamembran-Targeting chloroplastidärer Proteine. Die Konstrukte wurden in Hefezellen transformiert und von Dr. Markus Geisler, am Basel-Zürich Plant Science Center/ Universität Zürich im Hefesystem wie unter Geisler et al., 2005 beschrieben, analysiert.

3.2.3.3 Aminosäure-Transportstudien in Hefe.

In dieser Arbeit wurden folgende Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt: 22Δ8AA (Mata α , ura3-1, gap1-1, put4-1,uag4-1, can1::hisG, lyp1/alp1::his G, hip1::his G , dip5::his G) beschrieben bei Fischer et al., 2002 und JT16 (Mata,hip1-614, his4-401,can1, ino1, ura3-52) beschrieben bei Tanaka & Fink 1985. Beide Hefestämme stammen von Prof. Doris Rentsch am Institute of Plant Science, Universität Bern.

Die cDNA von PRAT2.1 und PRAT2.2 wurde dazu in den Hefevektor pNEV kloniert. Für beide Varianten wurde zusätzlich das Signalpeptid SUC2 vor die Proteine fusioniert. SUC2 beinhaltet die Signalsequenz der extrazellulären Invertase aus Hefe (PBT3-Suc Vektor des *Split Ubiquitin* Systems) und ermöglicht so das Plasmamembran-Targeting chloroplastidärer Proteine. Die Konstrukte wurden in Hefezellen transformiert und als Negativkontrolle wurde der Leervektor genutzt.

Für die Kultivierung der JT16-Hefe-Mutanten wurde dem YPD-Medium (2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 1% Glukose) zusätzlich 5mM Histidin zugesetzt. Nach Transformation der JT16-Hefe-Mutanten erfolgte die Selektion auf „synthetic complete“ (SC) Minimalmedium (0,67% YNB [Yeast Nitrogene Base, ohne Aminosäuren]; 0,2% Dropout-Mix; 2% Glukose), dem kein Uracil zugesetzt wurde (SC-ura). Der Dropout-Mix (-ura) enthielt jeweils 4,3% der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin,

Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Myo-Inositol, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin sowie 1% Adenin, 8,5% Leucin und 0,4% para-Aminobenzoesäure in Gewichtsprozent. Für die Anzucht auf Agarplatten wurde dem Medium entweder 2% Agar (YPD) oder 2% Agarose (SC-ura) zugesetzt. Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte bei 30°C für 3-5 Tage im Brutschrank. Der Komplementationsversuch erfolgte auf Agarplatten mit SC-ura, 6mM Arginin und jeweiligen Histidinkonzentrationen vom 6mM, 3mM, 1,5mM, 0,3 und 0mM Histidin.

Der Hefestamm 22Δ8AA ist mutiert in den Aminosäurepermeasen für Arginin, Aspartat, Citrullin, GABA, Glutamate und Proline (Fischer et al., 2002). Unter nicht-selektiven Bedingungen wurden das Medium mit 0,5g/l Ammoniumsulfate versetzt. Der Komplementationsversuch erfolgte auf Agarplatten mit SC-ura (Yeast Nitrogene Base, ohne Aminosäuren und ohne Stickstoffquelle) und den jeweiligen Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle in den Konzentrationen 3mM, 2mM 1mM, 0,5mM, 0,25mM, 0,1mM und 0,05mM. Erfolgreich transformierte Hefe wurden auf 1mM der jeweiligen Aminosäure für die Versuche genutzt, um zu verhindern, dass interne Stickstoffquellen genutzt werden können.

3.2.3.4 Das Split-Ubiquitin System

Mit dem dem *Split-Ubiquitin System* ist es möglich, Protein-Protein Wechselwirkungen von Membran- bzw. Membran-assoziierte Proteine darzustellen. Für die Untersuchung von Interaktionen der PRAT2-Proteinen wurde das *Split Ubiquitin System Dual Membrane Kit3* der Firma Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz) genutzt. Dazu wurden die Proteine an den C- („Cub“-Hälfte bzw. „Köderprotein“, Vektor pBT3-C bzw pBT3-SUC) bzw. an den N-terminalen Teil („Nub“-Hälfte bzw. „Beuteprotein“ Vektor pPR3-C bzw. pPR3-SUC) des Ubiquitins fusioniert. Beide Kontrukte wurden in Hefe (NMY51, MATa his3D200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop) 4-HIS3 ura3::(lexAop) 8-lacZ ade2::(lexAop) 8-ADE2 GAL4)) transformiert und auf Selektionsmedium nach Herstellerangaben (Dualsystems Biotech AG) ausgetrichen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategien

DNA-Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren wurden mittels PCR generiert (Saiki et al., 1988). Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, die Ligation, die Dephosphorylierung 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® II von Qiagen (Hilden, Deutschland). Für die Durchführung der LR-Rekombination mit dem GATEWAY System (Invitrogen) wurde ebenso nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

3.3.3 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Identifizierung und Genotypisierung von *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien wurden zwei Blätter mit 450µl Extraktionspuffer (0,2M Tris-HCl, pH7,5; 0,25M NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 100µg/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 300µl Isopropanol präzipitiert und für 5 min inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (16000xg, 4°C) wurde das Pellet in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH8; 0,1mM EDTA) resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (25µl) wurden 5µl DNA eingesetzt.

3.3.4 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 260nm und 320nm gemessen. Die Konzentration wurde in µg/µl nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{DNA:} \quad c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,05 \times f_{\text{verd}}$$

$$\text{RNA:} \quad c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,04 \times f_{\text{verd}}$$

E bezeichnet die Absorption bei der angegebenen Wellenlänge, f_{verd} den Verdünnungsfaktor. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280nm gemessen, um eine

eventuelle Verunreinigung mit Proteinen festzustellen. Bei hochreinen Nukleinsäuren beträgt das Verhältnis E_{260}/E_{280} 1,8-2,0..

3.3.5 PCR-Genotypisierung

Die genomische DNA der heterozygoten T-DNA-Insertionslinien *prat2.1-1* (Salk031707), *prat2.1-2* (Salk 112126) sowie *prat2.2-1* (Salk136525), *prat2.21-2* (Salk149871) wurden in den T2- und T3-Generation mittels PCR genotypisiert. Die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für die Linien erzeugen Produkte von 924bp (Salk031707), 389bp (Salk 112126), 912bp bzw. 457bp (Salk13652) und 418bp (Salk149871) mit den jeweiligen Primern. Die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für der *PRAT2*-Gene amplifizierten auf heterozygoten und homozygoten Pflanzen in Kombination mit dem jeweiligen T-DNA spezifischen „left border“ Oligonukleotid-Primer (SALK LB1a) für *prat2.1* und *prat2.1-2* ein 650bp langes, für *prat2.2-1* ein 780bp langes und für *prat2.2-2* ein 519bp langes Produkt.

Tabelle 5: PCR-Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien.

Es sind jeweils die Oligonukleotid-Primer Kombinationen sowie die Größe des zu erwartenden Produkts angegeben.

Gen	Salk Linie	t-DNA-Primer	Genspezifische Primer
<i>prat2.1-1</i>	Salk 031707	LB1a+LP (650bp)	Salk 031707 LP+RP (924bp)
<i>prat2.1-2</i>	Salk 112126	LB1a+LP (650bp)	Salk112126 LP+RP (924bp)
<i>prat2.2-1</i>	Salk 136525	LB1a+LP (780bp)	Salk 136525 LP+RP (912bp)
<i>prat2.2-2</i>	Salk149871	LB1a+LP (510bp)	Salk 149871 LP+RP (912bp)

Die Insertion des 35S::PRAT2cDNA-Konstrukts in *prat2*-Dopplemutaten wurde in der T3-Generation mittels PCR-Analyse auf genomischer DNA der transgenen Pflanzenlinien mit dem genspezifischen Oligonukleotid-Primer (KompC21fw) und einem für den Plasmid-Vektor spezifischen Oligonukleotid-Primer (KompC21fw=35S), überprüft. Nachkommen, bei denen das 35S::cDNA-PRAT2-Konstrukt zumindest in einem Allel inserierte, konnten durch ein spezifischen PCR-Produkt von 350bp identifiziert werden.

3.3.6 Sequenzierung von DNA

Alle Plasmidkonstrukte und Produkte der PCR-Genotypisierung wurden zur Überprüfung sequenziert. Die Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice des Departments Biologie der LMU München durchgeführt.

3.3.7 RNA-Präparation aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung der RNA aus *Arabidopsis*-Blättern erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die gereinigte RNA wurde im Photometer quantifiziert und durch Gelelektrophorese auf einem 1%igem Agarosegel auf eventuellen Abbau hin überprüft.

3.3.8 *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription des linearisierten Plasmids (psP65/PRAT2.1) erfolgte nach Firlej-Kwoka et al., (2008). Zur radioaktiven Markierung wurden zunächst 2µg mRNA in einem Volumen von 25µl mit dem „Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate“ System (Promega) nach Herstellerangaben *in vitro* translatiert. Anschließend wurden jeweils 2µl der ³⁵S-markierten Proteine in einem 10µl-Ansatz unter Verwendung von 1/10 Volumenanteil Ladepuffer (0,1% Ponceau S; 50% Glycerin) sowie 10mM Cystein und 10mM Methionin in der BN-PAGE eingesetzt.

3.3.9 DNA Microarray-Analyse

Für die DNA Microarray-Analyse wurden 5µg RNA aus 23 Tage (Dauerlicht) und 30 Tage alten Rosettenblättern (Langtagbedingungen) von Wildtyp- und beiden homozygoten *prat2*-Doppelmutanten verwendet. Dazu wurden je drei Col-0 Wildtyp und drei *prat2*-Doppelmutanten im Abstand von einer Woche jeweils unter Langtagbedingungen und Dauerlicht ausgesät (n=3, biologische Replikate). Zur Ernte wurden 2h nach Belichtung jeweils die zwei jüngsten und vollentwickelten Rosettenblätter von je 15 Pflanzen pro biologischem Replika in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung der RNA aus *Arabidopsis*-Blättern erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die gereinigte RNA wurde im Photometer quantifiziert und durch Gelelektrophorese auf einem 1%igem Agarosegel auf eventuellen Abbau hin überprüft.

Die RNA wurde “ unter Verwendung des Affymetrix „One-Cycle Labeling and Control“ (Target) Kits nach Herstellerangaben (Affymetrix UK, High Wycombe, UK) gelabelt und auf den Affymetrix „GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Arrays hybridisiert. Die Experimente wurden von Julia Neumann und Dr. Katrin Philippa am Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Department I der LMU München durchgeführt.

Die Rohdaten der Microarrayexperimente (CEL-Dateien) wurden mit der Robin Software (Lohse et al., 2010) auf ihre Qualität kontrolliert und normalisiert. Die Kontraste wurden als logarithmischer Fold-Change (FCH) aller Gene des ATH1 Chips dargestellt. Der

Hintergrund wurde mittels RMA Algorithmus normalisiert (Irizarry et al., 2003). Die FCH und P-Werte selbst wurden mittels des LIMMA Pakets (Smyth, 2004) berechnet; zur Korrektur der P-Werte kam der Algorithmus „nested F“ mit einem Signifikanzschwellenwert von 0,05 nach der Methode von Benjamini and Hochberg zur Anwendung (Benjamini and Hochberg, 2000). Gene mit einer Signaldifferenz von mehr als 30 zwischen Wildtyp und *prat2*-Doppelmutanten und einem FCH>2 wurden als differentiell exprimiert in Betracht gezogen.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*-Gewebe

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörstert und mit 400µl Ureapuffer (50M Tris (pH 8.0), 0.2M EDTA, 6M Harnstoff) gemischt. Nach einer Inkubation von 10min bei RT wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 15min bei 13000xg, RT sedimentiert. Der Überstand enthielt alle löslichen Proteine. Um die Membranproteine zu extrahieren, wurde das Pellet in 200µl SDS-Puffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM EDTA, 1% SDS) für 15min bei RT inkubiert und zentrifugiert, sodass dieser Überstand letztlich die Membranproteine enthielt. Für die Extraktion von löslichen und Membranproteinen in einem Schritt wurde das Pflanzenmaterial mit 750µl SDS Puffer (50mM Tris (pH 8,0), 0.2mM EDTA, 1% SDS) extrahiert, bei RT inkubiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) oder nach Bradford (Bradford, 1976).

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte 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 (6,5%) wurde 0,5M Tris-HCl, pH6,8 und für das Trenngel 1,5M Tris-HCl, pH8,8 verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 3-5min bei 95°C in Solubilisierungspuffer (250mM Tris-HCl, pH6,8; 40% Glycerin; 9%SDS; 20% β-Mercaptoethanol; 1 Spatelspitze Bromphenolblau) denaturiert. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue-R250 (Sambrook et al., 1989) oder mit Silbernitrat gefärbt. Für die Coomassie-Blaufärbung wurden die Proteine 15min mit Coomassie-Färbelösung (50% MeOH; 7% HAc; 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit Entfärbe-Lösung (40% MeOH; 7% HAc; 3%

Glycerin). Die Gele wurden gewässert und unter Vakuum getrocknet. Für die Silberfärbung wurden die Proteingele für 1h in Fixierlösung (40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure und 3% (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Blum, 1987). Dazu wurde das Gel 3x für 20min in 50% Ethanol und danach für 1min in Vorbehandlerlösung (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in ddH_2O für jeweils 20sec wurde das Gel für 20min mit der Silberlösung (0,2% (w/v) AgNO_3 , 0,028% (v/v) Formaldehyd) gefärbt und noch zweimal in ddH_2O für je 20sec gewaschen. Abschließend erfolgte die Behandlung in Entwicklerlösung (37,5% (w/v) Na_2CO_3 , 0,028% Formaldehyd und 0,0075% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) bis Banden zu sehen waren. Die Reaktion wurde mit Fixierlösung gestoppt, die Gele in ddH_2O gewaschen und getrocknet.

3.4.3 Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Trennung nativer Membranproteinkomplexe erfolgte in der 1. Dimension mittels BN-PAGE mit anschließender SDS-PAGE basierend auf der Originalmethode von Schagger und Jagow, (1991) und Wittig et al., (2006) mit folgenden Modifikationen: Chloroplasten (10 μg Chlorophyll) wurden in 50mM Bis-Tris/HCl, (pH 7.0), 750 mM 6-Aminocaprinsäure, 1% *n*-Dodecyl-D-Maltoside solubilisiert, 15min auf Eis inkubiert und danach mit 50.000g für 20min bei 4°C zentrifugiert. Proteine der inneren Hüllmembranen (200 μg) wurden mit 3% Digitonin solubilisiert, 30min auf Eis inkubiert und danach mit 50.000g für 20min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.1 Volumen Coomassie Blue Lösung (5% Coomassie Brilliant Blue G-250, 750mM 6-Aminocaprinsäure) versetzt und auf ein 5-12% (w/v) bzw. 8-18% (w/v) Polyacrylamid Gradientengel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15mA im Sammelgel und bei 8mA im Trenngel in 6x8 cm großen Gelen bei 4°C. Zu Beginn der Elektrophorese wurde ein mit Coomassie-G-250 gefärbter (0.02%) Kathodenpuffer verwendet, der bei Erreichen des ersten Drittels des Gradientengels durch einen farblosen Kathodenpuffer ohne Coomassie-G ersetzt wurde.

Für die zweite Dimension (2D BN/SDS-PAGE) wurden die Banden ausgeschnitten und in 1% SDS, 1mM β -Mercaptoethanol für 15min inkubiert, danach mit in 1% SDS 15min und zum Abschluss 15min in SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS) bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die einzelnen Banden wurden im Sammelgel der SDS-PAGE (12,5% Polyacrylamide) platziert und die individuellen Komplexe in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Danach wurden die Gele Silbergefärbt oder geblottet und immunodetektiert.

3.4.4 Die Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry-Blot“-Apparatur (Amersham Biosciences) auf Nitrozellulose-Membranen (PROTRAN BA83, 0,2µm, Whatman/ Schleicher&Schüll) oder PVDF (Immobilon-P; Zefa, Harthausen) nach Kyhse-Andersen (1984) transferiert. Ausgehend von der Kathode wurde in Kathodenpuffer (25mM Tris; 40mM Aminocapronsäure; 20% MeOH; pH7,6) getränkte Filterpapiere (0,2mm), das in Anodenpuffer2 (30mM Tris; 20% MeOH; pH10,4) inkubierte Gel und dann die ebenfalls in Anodenpuffer 2 inkubierte Membran gestapelt. Darauf wurden in Anodenpuffer 2 sowie in Anodenpuffer1 (300mM Tris; 20% MeOH; pH10,4) getränkte Filterpapiere gelegt, gefolgt von der Anode. Die Dauer des Transfers betrug etwa 1h bei einer Stromstärke von 0,8mA pro cm² Membranfläche.

3.4.5 Immunodetektion von Proteinen

Die spezifische Antigenidentifizierung erfolgte durch Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern und anschließender Detektion mittels enzymgekoppelter Sekundär-Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Die Nitrozellulose-Membran wurde 3x für 10min in Magermilch-Puffer (1% Magermilch; 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl) abgesättigt und mit dem Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 in TTBS (100mM Tris-HCl, pH7,5; 0,2% Tween 20; 150mM NaCl) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für 10min im Magermilch-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG, 1:10000 in TBS) für 1h inkubiert. Ungebundene Phosphatase-Konjugat-Antikörper wurden durch Waschen für 10min in Magermilch-Puffer entfernt. Nach Waschen für 1min in H₂O wurde die Färbereaktion durch die Zugabe der Färbelösung (100mM Tris-HCl, pH9,5; 100mM NaCl; 5mM MgCl₂) 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 Waschen in H₂O mit 50mM EDTA gestoppt.

Die Detektion mit dem ECL-System (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) erfolgte mit HRP-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörpers (1:8000) und mit dem Pierce ECL Substrat nach Herstellerangaben. Die Lumineszenz wurde mit einem Film (Kodak Biomax MR; PerkinElmer, Rodgau, Germany) detektiert.

3.4.6 Antiseren

Primäre Antikörper gegen das heterolog in *E. coli* überexprimierte und aufgereinigte At-PRAT2 Protein wurden in Kaninchen erzeugt (Pineda, Berlin, Deutschland). Die Überexpression und Aufreinigung des Proteins wurde von Dr. Manuela Baumgartner (Department Biologie 1, Biochemie & Physiologie der Pflanzen, LMU München) durchgeführt. Die primären Antikörper gegen TIC110, LSU und LHCP aus *Pisum sativum*, OEP16.1 aus *Arabidopsis* waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die Antikörper gegen Fd-GOGAT und GS wurden bei AgriSera (Vänäs, Schweden) bezogen.

3.4.7 Proteolytischer Verdau von chloroplastidären inneren Hüllmembranen

Durch Inkubation von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran mit der Protease Thermolysin wurde die Orientierung von PRAT2-Proteinen untersucht. Die Vesikel wurden dazu in 25mM Hepes/KOH pH 7,6, 5mM MgCl₂; 0,5mM CaCl₂ mit 1µg Thermolysin pro 1µg Protein für 5 und 10min auf Eis inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 10mM EDTA beendet. Anschließend wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern immunodetektiert.

3.4.8 Überexpression von PRAT2-Proteinen

Die Expression der PRAT2-Proteine fand heterolog in *Escherichia coli* Zellen des Stammes BL21(DE3) statt. Die cDNA der Gene At-PRAT2.1, At-PRAT2.1ΔSAM und At-PRAT2.2 wurden über die Restriktionsschnittstellen NcoI und SalI in das Plasmid pPROExHT kloniert, sodass das rekombinant exprimierte Protein über einen um 25 Aminosäuren erweiterten N-Terminus verfügte. Um die Proteine heterolog zu exprimieren, wurden die BL21 Zellen transformiert und zunächst als Vorkulturen über Nacht angezogen und dann in frischem LB-Medium überführt. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Die Zellen wurden 180 min, bei 30 °C kultiviert und danach durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 3.000g geerntet. Die Zellen wurden in Lysispuffer (50mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA pH8, 25% Sucrose) durch dreimaliges (30sec) Sonifizieren auf Eis aufgebrochen und die isolierten inclusion bodies 30min bei 12.000rpm (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS34) sedimentiert. Die isolierten inclusion bodies wurden einmal in Detergentspuffer1 (200mM NaCl, 20mM Tris/HCl pH7.5, 1mM EDTA pH8, 10mM β-Mercaptoethanol, 0.84% Mega 9) und jeweils 3mal in Detergentspuffer 2 (20mM Tris/HCl pH7.5, 1mM EDTA pH8, 0.42% Mega 9) und Trispuffer (50mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA pH8, 10mM DTT) gewaschen. Die inclusion bodies

wurden in Puffer A (20mM Tris HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 8M Harnstoff, 2mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert, 20min auf Eis inkubiert und 10min zentrifugiert (12.000rpm (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS34)). Die Proteine im Überstand wurden anhand der Hexa-Histidinsequenz über Metall-Affinitätschromatographie (Nickel-NTA Superflow, Qiagen) aufgereinigt. Die Elution erfolgt in Puffer A mit 60mM Imidazol.

3.4.9 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit der SAM-Domäne

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde die psSAM-Domäne in den Vektor pProEXHT α kloniert und in BL21 Zellen überexprimiert. Die Kultur wurde in 400ml Aliquots geteilt und das Pellet bei -20°C eingefroren. Für die Aufreinigung wurde das Pellet in 30ml Tris-Puffer (150mM NaCl, 10mM Tris, 5mM PMSF) suspendiert, 30min auf Eis inkubiert und die Zellen mit der French Press aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde mit 0,1% *n*-Dodecyl-D-maltosid solubilisiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 9000rpm (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS34) bei 4°C, wurde die Proteinkonzentration im Überstand, inder sich die SAM-Domäne befand, bestimmt und 1h bei RT an die Nickelsepharose angebunden. Die Nickesepharose wurde in 30 ml Tris-Puffer, in Trispuffer mit 30/40/50mM Imidazol und abschließend in 500mM KCl gewaschen und jeder Waschschrift wurde über SDS-PAGE auf Verunreinigungen überprüft. Für die Interaktionsanalysen wurden danach 500 μ g Proteine der inneren Hüllmembran aus Erbsenchloroplasten mit 1% *n*-Dodecyl-D-maltoside solubilisiert und mit der ps SAM-Domäne an der Nickelsepharose in 800mM KCl 1,5h bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Nickelsepharose ohne angebundene SAM-Domäne genutzt. Nichtgebundene Proteine wurden durch Waschen in 800mM KCl entfernt. Für die Elution der gebundenen Proteine wurden je 2ml Tris-Puffer mit absteigenden Salzkonzentrationen von 600, 400, 200 und 0mM KCl verwendet und zum Schluss wurde ein Gesamtelution mit 500mM Imidazol durchgeführt. Die Elutionen wurden mit TCA präzipitiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl silbergefärbt bzw immunodetektiert.

3.4.10 Protein-Identifikation durch Masensspektrometrie

Die silbergefärbten Proteinbanden wurden aus den SDS-PAGE Gelen ausgeschnitten und im "Zentrallabor für Proteinanalytik" (ZfP, Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) von Dr. Lars Israel analysiert. Die mit Trypsin verdauten Peptide wurden entweder per Peptide Mass Fingerprint (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) oder LC-MS/MS (Liquid Chromatography/ Massspectroscopy) analysiert. Die Identifikation erfolgte mit der Mascot Software und anschließender Datenbankanalyse des „National Center for

Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Nur Proteine mit einem Schwellenwert ≥ 100 wurden in Betracht gezogen.

3.4.11 Isolierung von Hüllmembranen aus *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten

Die Isolierung von *Arabidopsis* Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kunst (1998). Die Isolierung von äußeren und inneren Hüllmembranen aus Chloroplasten von Erbse (*Pisum sativum*) erfolgte 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 Metaboliten-Analyse

3.5.1 Aminosäuren, Organische Säuren und Zucker

Die Sprosse der Pflanzen (für den Wildtyp 9 Pflanzen/Replikat und für die prat2-Doppelmutanten 24 Pflanzen/Replikat) wurde schockgefroren, in flüssigem Stickstoff zermörsert und in gefrorenen Zustand in 50mg Portionen aliquotiert. Das Pflanzenmaterial mit insgesamt n=3 Replikaten für Wildtyp, prat2-Doppelmutante c2dm1 und c2dm2 wurde mit 1,5ml eines H₂O/Methanol/Chloroform-Gemischs (1:2.5:1) extrahiert. Als interner Standard wurde dem Lösungsmittelgemisch 50mM Ribitol zugesetzt (50µl/50ml). Die Proben wurden 20sec gevortext und danach 6min bei 4°C gemischt. Nachdem das Pellet durch 2min Zentrifugation bei 20000xg bei RT abgetrennt wurde, konnte der Überstand zur Analyse verschickt werden. Die Metabolitmessungen wurden mittels Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie durchgeführt. Die Analysen führte Katrin Weber in der AG Prof. Weber/Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf/Institut für Biochemie der Pflanzen nach der Methode von Oliver Fiehn, (2088) durch. Die GC/MS-TOF-Analytik (GCT Premier von Waters) erlaubte die Detektion von Aminosäuren (α -Alanine, Asparaginsäure, Cystein, Methionin, Ornithin, Asparagin, β -Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Valin, Tyrosin), organischen Säuren (Apfelsäure, Bersteinsäure, Fumarsäure, Glycerinsäure, Gluconsäure, Hydroxybuttersäure, Chinasäure, (Iso)-Zitronensäure, Glykolsäure, Malonsäure, Apfelsäure, Glutaminsäure, α -Ketoglutarat, und γ -Aminobuttersäure GABA, Laktat, Oxalat, Shikimat, D- α -Hydroxyglutarat) und Zuckern (Glukose, Fruktose, Saccharose, Maltose, Laktose, Xylose, Sorbitol, Mannitol, Raffinose, Mannose, Myoinositol).

3.5.2 Auxin und Auxinkonjugate

Das Pflanzenmaterial (30 Tage alt) wurde geerntet (für den Wildtyp 9 junge und vollentwickelte Blätter und für die *prat2*-Doppelmutante 50 junge und vollentwickelte Blätter), gefriergetrocknet und in 50mg Aliquots eingeteilt. Die Analyse wurde via HPLC-ESI-MS/MS vom National Research Council Canada, Institute of Plant Biotechnology (<http://www.pbi.nrc.ca>) durchgeführt

3.5.3 Ammonium

Die Ammoniumgehalte n=3 biologischen Replika im Wildtyp Col-0 (10 Blätter pro Replikat) und in beiden *prat2*-Doppelmutanten (40 Blätter pro Replikat) wurden kolorimetrisch in den jüngsten und vollentwickelten Blättern sowohl unter Langtag- (30 Tage alt) als auch unter Dauerlichtbedingungen (23 Tage alt) nach der Methode von Bräutigam et al., (2007) bestimmt.

3.6 Chlorophyll-Analysen

3.6.1 Extraktion der Prophyrine aus *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzensprosse wurde 48h vor der Ernte mit Aminolävulinsäure (10mM Aminolävulinsäure, 15mM Hepes (pH8); 5mM $MgCl_2$) besprüht, um den Aufbau der Prophyringerüste anzureichern. Danach wurden die Pflanzen 48h in Dunkelheit gehalten und für die folgenden Schritte stets mit Aluminiumfolie abgedeckt. Nach der Ernte (für den Wildtyp pro Replikat 3g Frischgewicht und für die *prat2*-doppelmutante pro Replikat 5g Frischgewicht) wurde das Pflanzenmaterial schockgefroren in flüssigem Stickstoff, zu feinem Pulver zermörsert und gefriergetrocknet. Es wurden jeweils drei Aliquots a 30mg mit 3ml 90%igem Aceton (v/v) mit dem Sonifiers für 30sec extrahiert. Dem Aceton wurde 1‰ konz. Ammoniak zur Stabilisierung des Mg^{2+} Zentralatoms der Pigmente zugesetzt. Nach 5min Zentrifugation bei 5.000rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 3x mit je 3ml 90% igem Aceton nachextrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit dem halben Gesamtvolumen Hexan gemischt und zentrifugiert. Die Acetonphase wurde abgenommen, 1:1 mit Methylenchlorid versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert. Die wässrige Phase wurde entfernt und die Methylenchloridphase im Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt. Für die HPLC-Analyse wurden die Pigmente in 100µl 100%igem Aceton gelöst und mittels reverse-phase HPLC (GROM-SIL 120 ODS-5 ST C18 Säule (2,1mm iD, 150mm Länge; Alltech Grom, Rottenburg Hailfingen, Germany) detektiert. Die Porphyrine

wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität getrennt und anhand ihrer spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen unterschieden (Anregung: 405nm für PPIX, 415nm für MgPPIX und MgPPIXMoMe, Emission: 625nm für PPIX, 595nm für MgPPIX und den MgPPIXMoMe). Für die Auftrennung wurde das Gradientenprogramm, wie bei Oster et al., (1991) beschrieben, verwendet. Die Peaks wurden mit den Retentionszeiten eines Standards verglichen und über ihr Spektrum identifiziert. Die HPLC-Analysen wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ulrike Oster am Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Department I der LMU München durchgeführt.

3.6.2 Extraktion der Chlorophylle aus *Arabidopsis thaliana*

Die jüngsten, jedoch vollentwickelten Blätter wurden geerntet (etwas 50mg), das Frischgewicht bestimmt, schockgefroren und in 1,6ml 80% Aceton homogenisiert. Danach wurde 5min mit 16000xg zentrifugiert und der Überstand mittels reverse-phase HPLC modifiziert nach der Methode von Rüdiger et al., (2005) detektiert, wobei die Säule wie unter 3.6.1 eingesetzt wurde. Die HPLC-Analyse wurde mit Unterstützung von Dr. Ulrike Oster am Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Department I der LMU München durchgeführt.

3.7 Mikroskopie

Die Blattmorphologie und der Phänotyp der Pflanzen wurden mit einem Lichtmikroskop von LeicaDM 1000 (Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht und fotografiert.

Für die Untersuchung der Protochlorophyllid Akkumulation wurden Keimlinge für 2,5 Tage in Dunkelheit 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) mithilfe eines Lumar 05 Filters (Excitation: 395-440 nm, Emission: 470-750 nm) erfasst.

3.8 Computer-Analysen

Folgende Programme und Datenbanken wurden verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Programme und Datenbanken.

Name	Referenz	Internet-Adresse
Für den Sequenzvergleich wurden folgende Datenbanken bzw. Programme verwendet:		
BLAST (Datenbank GenBank)	Altschul et al., 1997	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
ClustalX	Thompson et al., 1997	
Genedoc	Nicholas und Nicholas, 1997	http://www.psc.edu/biomed/genedoc
Vector NTI	Invitrogen	
ExPASy	Gasteiger et al., 2003	http://www.expasy.org/
Die Analyse der subzellulären Lokalisation erfolgte mit folgenden Datenbanken:		
ARAMEMNON version 3.2	Schwacke et al., 2003	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de
SUBA	Heazlewood et al., 2007	http://www.plantenergy.uwa.edu.au/applications/suba/flatfile.php
ChloroP 1.1	Reese, 2001	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte mit folgenden Programmen:		
PHYRE	Kelley und Sternberg, 2009	http://www.Sbg.bio.ic.ac.uk/phyre
Zur Expressionsanalyse wurde folgende Datenbank verwendet:		
NASC Arrays		http://affymetrix.Arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.p
Microarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums	Schmid et al., 2005	http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi
TAIR (The Arabidopsis Information Resource)	Swarbreck et al., 2008	http://www.arabidopsis.org
Darstellung der Metabolite:		
Vanted		http://vanted.ipk-gatersleben.de

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die physiologische Bedeutung der PRAT2-Proteine in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht. Es konnte ein Strukturmodell erarbeitet und die subzelluläre Lokalisation der PRAT2-Proteine aufgeklärt werden. Durch native Gelelektrophorese, Interkationstests in Hefe und durch Affinitätschromatographie wurden die Homo- und Hetero-Oligomerbildung von PRAT2 gezeigt und die Rolle der C-terminalen SAM-Domäne charakterisiert. Außerdem wurden Funktionsverlustmutanten molekular charakterisiert und komplementiert. Zur Untersuchung der Einbindung der PRAT2-Proteine in den Stoffwechsel wurden das Wachstum und die Entwicklung der Mutanten unter verschiedenen biotischen Einflüssen analysiert und dabei Metabolite wie Chlorophylle, Porphyrine, Auxin, Aminosäuren, Kohlenhydrate und organische Säuren bestimmt.

4.1 Die PRAT2-Familie

Um die Abstammung und die Verbreitung der im Chloroplasten von *Arabidopsis* nachgewiesenen PRAT2-Proteine und ihr verwandtschaftliches Verhältnis aufzuklären, wurden Genomsequenzen von Pflanzen, Algen, Moosen und Farnen nach Verwandten der *At-PRAT2*-Gene durchsucht. Über eine BLAST-Suche in der Datenbank GenBank (Altschul et al., 1998) konnten orthologe Proteine in den Monokotyledonen *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* und *Zea mays* sowie in Dikotyledonen (z.B. *Pisum sativum*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max*, *Ricinus communis*) gefunden werden. Neben der PRAT2 Familie in Landpflanzen wurden weitere Orthologe in den Genomen der Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Ostreococcus lucimarinus*, im Moos *Physcomitrella patens* und im Farn *Ceratopteris richardii* identifiziert. Allerdings konnte mittels Sequenzabgleich mit der Datenbank für Cyanobakterien kein verwandtes Protein in den evolutionären Vorgängern der Chloroplasten gefunden werden. In *Arabidopsis* gibt es zwei PRAT2-Proteine, die als At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2 bezeichnet werden. Das Protein At-PRAT2.1 (At3g49560) ist 296 Aminosäuren lang und At-PRAT2.2 (At5g24650) besteht aus 256 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen beider *Arabidopsis* PRAT2-Isoformen sind sich mit einer Identität von 82% sehr ähnlich. Das einzige Orthologe aus Erbse (Ps-PRAT2) besteht aus 271 Aminosäuren.

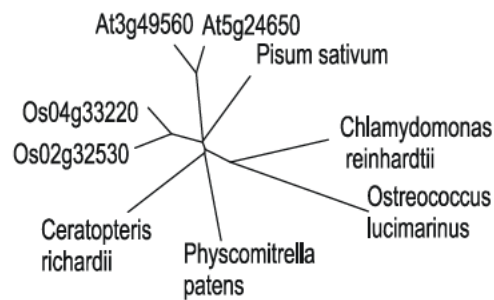


Abbildung 3: Die PRAT2 Familie in photosynthetisch aktiven Eukaryoten.

PRAT2-Proteine gibt es in Dikotyledonen (als Beispiel *Pisum sativum* und *Arabidopsis*) und in Monokotyledonen. In *Arabidopsis* (At3g49560/At5g24650) und Reis (Os04g33220/Os02g32530) existieren zwei Isoformen. Proteine kommen zudem in den einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Ostreococcus lucimarinus*, im Moos *Physcomitrella patens* und im Farn *Ceratopteris richardii* vor. Alle Proteine wurden durch eine BLAST-Suche der At-PRAT2.1 Aminosäuresequenz gegen die Datenbank GenBank identifiziert. Der Stammbaum wurde mit dem Programm PAUP Version4.0b10 (Swofford, 2002) erstellt.

Die Programme zur Vorhersage α -helikaler Transmembrandomänen (ARAMEMNON Datenbank; Schwacke et al., 2003) deuten die Existenz von vier hydrophoben Transmembranhelices in den PRAT2-Proteinen an. Weiterhin wurde anhand des Vorhersageprogramms Phyre (ProteinHomology/analogYRecognitionEngine; Kelley und Sternberg, 2009) im C-Terminus der beiden PRAT2-Proteine eine SAM-Domäne (*sterile alpha motif*) identifiziert.

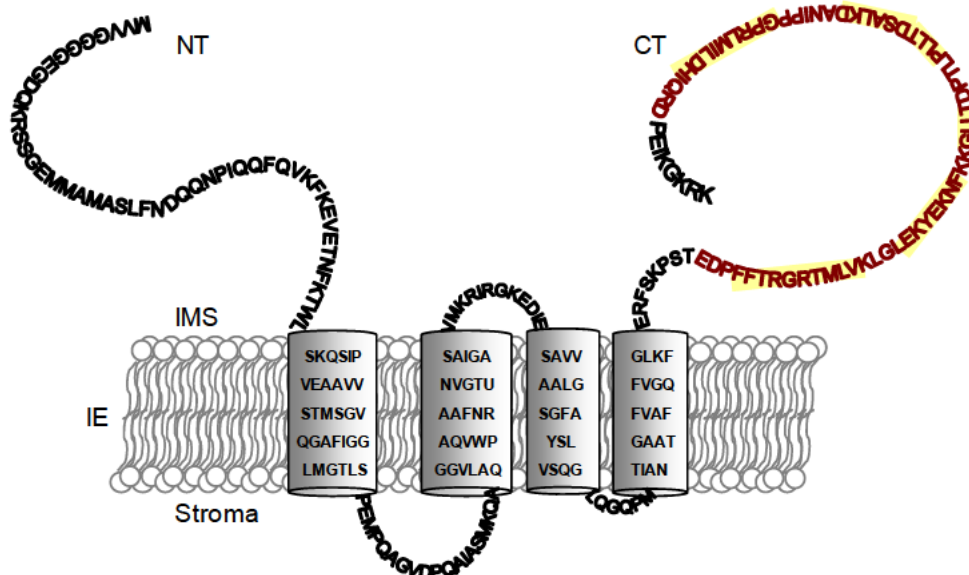


Abbildung 4: Strukturmodell der PRAT2-Proteine.

Das Strukturmodell der PRAT2-Proteine ist am Beispiel At-PRAT2.1 dargestellt. Die vier Transmembrandomänen in der inneren Hüllmembran (IE) von Chloroplasten sind als graue Zylinder gezeichnet. Der C-Terminus (CT) und der N-Terminus (NT) erstrecken sich in den Intermembranraum (IMS). Die SAM-Domäne (rote Buchstaben) von At-PRAT2.1 besteht laut Vorhersage aus vier kurzen α -Helices (gelb unterlegt).

Die SAM-Domäne ist eine etwa 70 Aminosäuren lange und evolutionär hoch konservierte Proteinbindedomäne, die in einer Vielzahl von Eukaryoten zu finden ist (Schultz et al., 1997). Bis heute wurden 2984 Proteine beschrieben, die eine SAM-Domäne tragen. Davon sind aber nur acht Proteine in der Modellpflanze *Arabidopsis* bekannt (Tabelle 6). Die SAM-Domänen sind bekannt für ihre Fähigkeit Homo- und Hetero-Oligomere zu bilden und Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Kim und Bowie, 2003; Qiao und Bowie, 2005). Die Sekundärstruktur der SAM-Domäne wird durch die Bildung von α -Helices definiert, welche ein globuläres Bündel mit hydrophobem Kern bilden. Für die SAM-Domäne von PRAT2 aus Erbse werden fünf α -Helices und für die PRAT2-Proteine aus *Arabidopsis* werden vier α -helicale Peptidabschnitte vorhergesagt.

Tabelle 6: Proteine aus *Arabidopsis* mit vorhergesagter SAM-Domäne.

Die Proteine wurden mit dem Simple Modular Architecture Research Tool identifiziert a) Die subzelluläre Lokalisation wurde mit der ARAMEMNON Datenbank vorhergesagt (Schwacke et al., 2003).

AGI	Annotation	Lokalisation ^{a)}
At3g49560	PRAT2.1	Chloroplast
At5g24650	PRAT2.2	Chloroplast
At3g48800	Unbekannt, löslich	Chloroplast
At2g45700	Unbekannt, löslich	Chloroplast
At5g23680	Unbekannt, löslich	unbekannt
At3g07760	Unbekannt, löslich	unbekannt
At5g48680	Unbekannt, löslich	Sekretorischer Weg
At3g07170	Unbekannt, löslich	Sekretorischer Weg
At1g70180	Unbekannt, löslich	Mitochondrien
At3g11890	Unbekannt, löslich	Mitochondrien

4.2 Subzelluläre Lokalisation der PRAT2-Proteine

Die Lokalisation der PRAT2-Proteine wurde mithilfe einer Fraktionierung von *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten in Stroma, Hüllmembranen und Thylakoidmembranen sowie anschließender Immunoblotanalyse untersucht (Abbildung 5). Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper gegen das Protein At-PRAT2.1 detektiert. Das errechnete Molekulargewicht von At-PRAT2.1 liegt bei 28kDa, für At-PRAT2.2 bei 27,8kDa und für Ps-PRAT2 bei 28,6kDa. Als Kontrollen für die Reinheit der einzelnen Fraktionen dienten die Markerproteine LSU (große Untereinheit der RuBisCO im Stroma) und LHCP (Lichtsammelkomplex der Thylakoidmembran). Die PRAT2-Proteine wurden damit in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert. Der Antikörper erkannte eine intensive Bande bei ca. 28kDa in der Hüllmembran-Fraktion von *Arabidopsis*

Chloroplasten (Abbildung 5A). Da beide PRAT2-Isoformen über einen alternativen Translationsstart verfügen, ist anzunehmen, dass es sich bei der unteren Bande um das verkürzte Protein handelt. At-PRAT2.1 besitzt nach dem ersten Translationsstart an Position 18 und 19 zwei weitere Methionine. At-PRAT2.2 besitzt nach 17 Aminosäuren ein zweites Methionin, das als Translationsstart dienen könnte (Abbildung 2). Durch einen alternativen Translationsstart würde für At-PRAT2.2 eine Doppelbande von 28kDa und 26,3 kDa entstehen. In der Immunoblotanalyse fraktionierter Erbsenchloroplasten erschien in der inneren Hüllmembran eine Doppelbande bei ca. 28kDa (Abbildung 5B). Da auch das PRAT2-Protein aus Erbse über ein zweites Methionin im N-Terminus verfügt, ist die Doppelbande auch hier wahrscheinlich ein Produkt eines alternativen Translationsstarts.

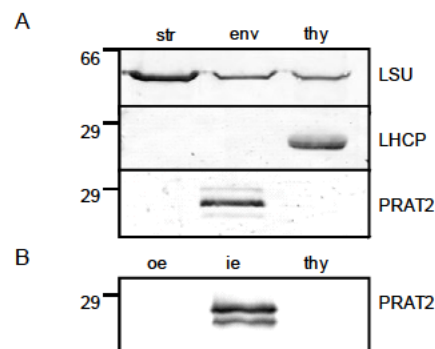


Abbildung 5: Immunoblot von At-PRAT2-Proteinen in *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten.

(A) Chloroplasten von sechs Wochen alten *Arabidopsis* Rosettenblättern wurden in Stroma (str), gemischte Hüllmembranen (env) und Thylakoidmembranen (thy) fraktioniert. **(B)** Hüllmembranen aus zehn Tage alten Erbsenchloroplasten wurden in innere (ie) und in äußere (oe) Hüllmembranen separiert. Gleiche Proteinmengen (10µg) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Antiseren gegen die Markerproteine LSU (große Untereinheit von RuBisCo im Stroma) und LHCP (Lichtsammelkomplex der Thylakoidmembran) wurden als Kontrollen benutzt. Die molekulare Masse des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

4.3 Die Orientierung der PRAT2-Proteine in den inneren Hüllmembranen von Chloroplasten

Da die PRAT2-Proteine erfolgreich in den inneren Hüllmembranen von Chloroplasten detektiert werden konnten, sollte im Folgenden die Orientierung der Proteine untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob der N-Terminus und die charakteristische SAM-Domäne am C-Terminus in den Intermembranraum oder in das Stroma ragen. Hierzu wurden Fraktionen der inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten mit der Protease Thermolysin behandelt. Thermolysin ist unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht membranpermeabel und spaltet nur Peptide ab, die auf der Außenseite der

Membranvesikel sitzen. Die entstandenen Peptidfragmente wurden über Immunoblots analysiert.

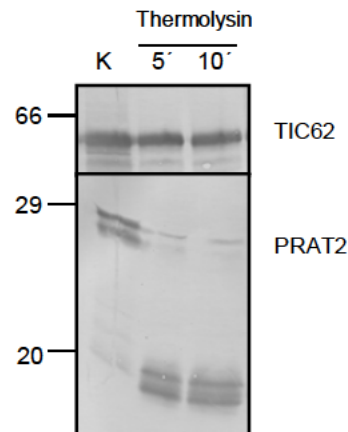


Abbildung 6: Proteolytischer Verdau von PRAT2 in der inneren Chloroplastenhüllmembranen.

Zur Überprüfung der Orientierung der PRAT2-Proteine wurden Membranvesikel der inneren Hüllmembran aus Erbsenchloroplasten (20µg) mit Thermolysin behandelt. Spur 1 zeigt die unbehandelte Kontrolle (K). Die Vesikel wurden für 5min und 10min mit Themolysin inkubiert (Spur 2 und 3) und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Degradation wurde über Immunodetektion mit Antikörpern gegen At-PRAT2.1 und TIC62 kontrolliert. Die molekulare Masse des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Thermolysin war nicht in der Lage das Kontrollprotein TIC62, ein membrangebundenes Protein, das *in vivo* dem Stroma zugewandt ist, zu verdauen. Damit wurde die Unversehrtheit der Membranvesikel, die nach der Isolierung aus Chloroplasten mit der Intermembranraum-Seite nach außen orientiert sind („right-side out“, Waegemann und Soll, 1995) belegt. Das Ps-PRAT2-Protein mit einer Größe von 28kDa war in der unbehandelten Kontrolle als Doppelbande detektierbar, während es mit Thermolysin zu zwei nur noch ca. 20kDa großen Fragmenten verkürzt wurde (Abbildung 6, Spur 2 und 3). Dies bedeutet, dass ein Großteil von PRAT2 geschützt in der Membran verblieb, während die exponierten Peptidabschnitte degradiert wurden. An der schematischen Darstellung der spezifischen Thermolysinschnittstellen (Abbildung 7) ist erkennbar, dass ein solches Muster nur möglich ist, wenn der N- und C-Terminus von PRAT2 abgespalten werden. *In vivo* wären somit der N- und C-Terminus von PRAT2 im Intermembranraum lokalisiert.

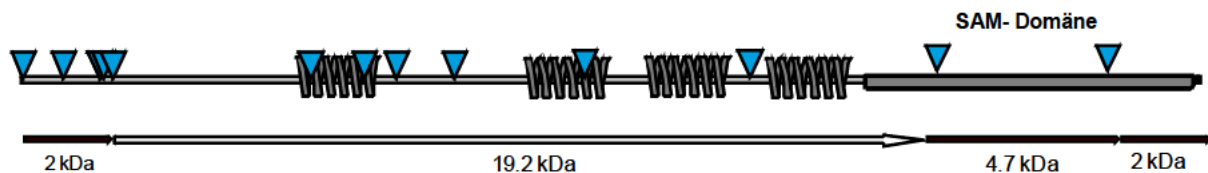


Abbildung 7: Theoretische Spaltung der Ps-PRAT2 Proteinsequenz durch Thermolysin.

Die schematische Darstellung der Membrantopologie (α -Helices) und die vorhergesagten Schnittstellen für Thermolysin wurden mit dem „Peptide Cutter“-Programm erstellt. Die Transmembrandomänen sind als graue Helices dargestellt, die SAM-Domäne als grauer Balken und die Thermolysin-Schnittstellen als blaue Dreiecke. Mit einer Orientierung des N- und C-Terminus in den Intermembranraum würden ein 2 kDa großes Peptid am N-Terminus und die C-terminale SAM-Domäne abgespalten werden, während die Peptidschleife zwischen der 1. und 2. Helix geschützt im Stroma läge. Es sollte somit ein Fragment von ca. 19,2 kDa entstehen.

4.4 Oligomerbildung von PRAT2-Proteinen in der nativen Gelelektrophorese

Die Native Gelelektrophorese erlaubt es, Proteinkomplexe in ihrer nativen Form aufzutrennen und anschließend über Immunoblot oder radioaktive Markierung zu identifizieren. Um die Bildung multimerer PRAT2 Proteinkomplexe nachzuweisen, wurde At-PRAT2.1 mRNA mit dem Reticulozyten-Lysatsystem *in vitro* translatiert, ^{35}S -markiert und mittels eines Gradienten-Gels nativ aufgetrennt. Die Größen der Translationsprodukte wurden zunächst über SDS-PAGE überprüft. Als Kontrollen wurden das Vorstufenprotein pSSU (kleine Untereinheit der RuBisCo; 21 kDa) und das Reticulozyten-Lysatsystem ohne mRNA Zugabe verwendet. Die *in vitro* Translation von At-PRAT2.1 ergab eine Doppelbande der erwarteten Größe von ca. 28 kDa. Auch pSSU, welches als Translationskontrolle eingesetzt wurde, konnte detektiert werden, während der Ansatz ohne mRNA Zugabe kein Translationsprodukt zeigte (Abbildung 8A).

Die Analyse des nativen Gels zeigte neben dem monomeren PRAT2.1 Translationsprodukt noch drei Komplexe (Abbildung 8B). Der kleinste und relativ schwach zu sehende Komplex von ca. 60 kDa befand sich auf der erwarteten Höhe eines dimeren PRAT2-Proteins. Ein weiterer Komplex lief bei etwa 140 kDa entsprechend eines Tetramers und zusätzlich konnte eine Oligomerbildung im Bereich von ca. 325-300 kDa gezeigt werden.

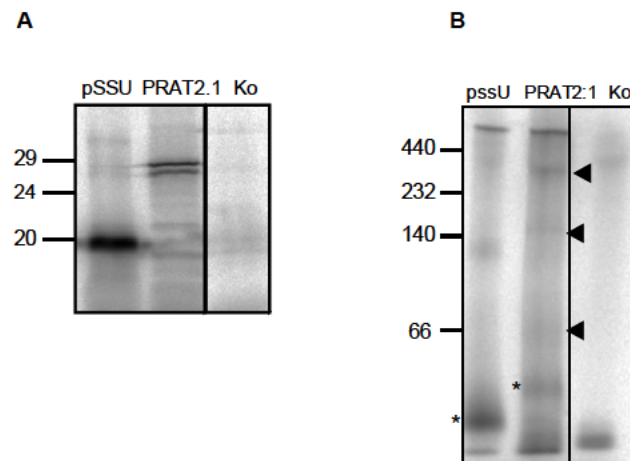


Abbildung 8: Homooligomerbildung von *in vitro* translatiertem At-PRAT2.1.

(A) SDS-PAGE zur Überprüfung der Translationsprodukte. Es wurden jeweils 1µl des Translationsprodukts des At-PRAT2.1-Proteins (Doppelbande bei 28kDa) bzw. als Kontrollen das Vorstufenprotein pSSU, (19kDa) und das Reticulocytenlysate ohne mRNA (Ko) aufgetragen und über Autoradiographie analysiert. **(B)** Gradientengel (8-16%) mit 2µl des jeweiligen Translationsprodukts aus (A). Die Sterne zeigen die Translationsprodukte an und die Pfeilspitzen zeigen die multimeren Komplexe von At-PRAT2.1. Die molekulare Masse des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Da die Signalintensität der *in vitro* radioaktiv markierten, oligomeren Translationsprodukte relativ schwach war, sollte die Bildung von PRAT2-Oligomeren mit einer weiteren Methode überprüft werden. Hierzu wurden Proteine der inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten mit Digitonin solubilisiert, via 2D-BN-PAGE aufgetrennt und immunodetektiert. Dabei war zu sehen, dass das native Migrationsverhalten der PRAT2-Proteine aus der inneren Hüllmembran von Chloroplasten dem der *in vitro* translatierten Proteine ähnelte. Die PRAT2-Proteine konnten mit der charakteristischen Doppelbande in drei Komplexen von unterschiedlicher Größe detektiert werden (Abbildung 9). Der kleinste Komplex mit dem intensivsten Signal lief bei etwa 60 kDa. Der zweite Komplex lief wie im *in vitro* Experiment bei etwas 140 kDa und der größte Komplex konnte bei ca. 400 kDa nachgewiesen werden. Folglich scheint das PRAT2-Protein sowohl Dimere und Tetramere, als auch hochmolekulare Oligomere zu bilden.

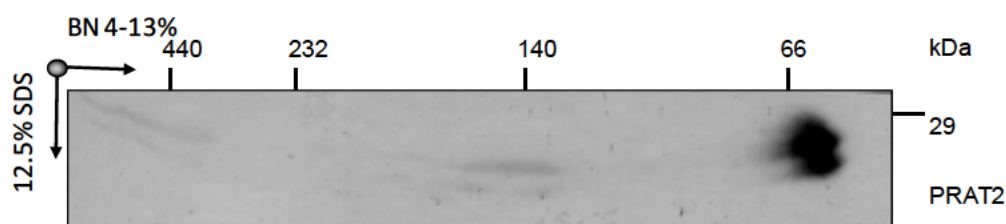


Abbildung 9: Immunoblot der 2D-BN-PAGE inneren Hüllmembranen aus Chloroplasten.

Proteine der inneren Hüllmembran (200µg) wurden mit 3% Digitonin solubilisiert, per BN-PAGE (1.Dimension) und SDS-PAGE (2.Dimension) aufgetrennt und über At-PRAT2.1 Antikörper immunodetektiert. Die molekulare Masse des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

4.5 Interaktionsanalysen im *Split Ubiquitin*-System

Für die PRAT2-Proteine wurde eine Oligomerisierung über BN-PAGE Analysen gezeigt. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich untersucht werden, ob auch im heterologen Hefesystem die Bildung von PRAT2-Oligomeren möglich ist. Ebenfalls sollte die Rolle der C-terminalen SAM-Domäne geklärt werden, die für ihre Eigenschaft Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln bekannt ist. Die Interaktionen der At-PRAT2-Isoformen wurde mit dem *Split-Ubiquitin* System in Hefezellen analysiert (DUALmembrane Kit, Dualsystems Biotech, Zürich). Dazu wurden die Proteine an den C- („Cub“-Hälfte bzw. „Köderprotein“) bzw. an den N-terminalen Teil („Nub“-Hälfte bzw. „Beuteprotein“) des Ubiquitins fusioniert. Interagieren die „Köder“- und „Beute“-Proteine miteinander, so fördert die räumliche Nähe die Wiederherstellung des Ubiquitins aus den „Cub“- und „Nub“-Hälften. Dieses wird durch eine Ubiquitin-spezifische Protease erkannt und abgespalten. Damit kommt es zur Freisetzung eines Transkriptionsfaktors, der folglich in den Zellkern wandert, um dort Reportergene zu aktivieren, die für die Aminosäuresynthese von Histidin und Adenin zuständig sind. Bei einer positiven Interaktion sind die Hefen daher in der Lage auf Histidin und Adenin-Mangelmedien zu wachsen.

Im Folgenden wurden mögliche Interaktionen zwischen den Proteinen At-PRAT2.1, At-PRAT2.2 und At-PRAT2.1 ohne die SAM-Domäne (At-PRAT2.1 Δ SAM) getestet. Dazu wurden At-PRAT2.1, At-PRAT2.2 und At-PRAT2.1 Δ SAM an die „Cub“-Hälfte fusioniert („Köder“-Protein) und At-PRAT2.1, At-PRAT2.2 an die „Nub“-Hälfte („Beute“-Protein) und in Hefe transformiert. Dabei zeigte At-PRAT2.1 eine starke Interaktion sowohl mit sich selbst, als auch mit At-PRAT2.2. Diese Interaktion konnte auch gezeigt werden, wenn umgekehrt At-PRAT2.2 als „Köder“ agierte und At-PRAT2.1 als „Beute-Protein“. Dahingegen war keine Interaktion möglich, wenn das Deletionskonstrukt At-PRAT2.1 Δ SAM genutzt wurde (Abbildung 10). Damit wurde gezeigt, dass die PRAT2-Proteine sowohl Homodimere, als auch Heterodimere ausbilden und die SAM-Domäne für diese Interaktion eine entscheidende Rolle spielt.

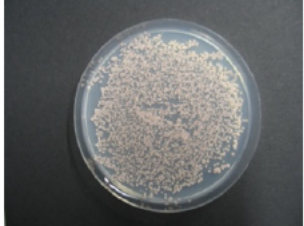
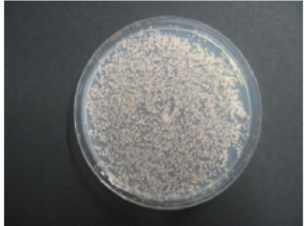
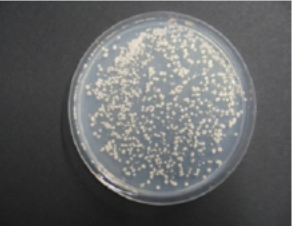
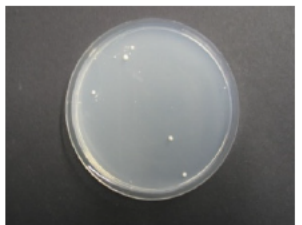
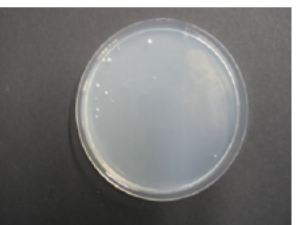
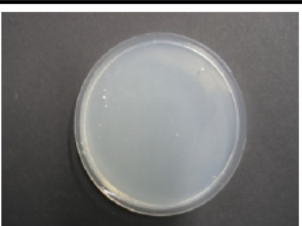
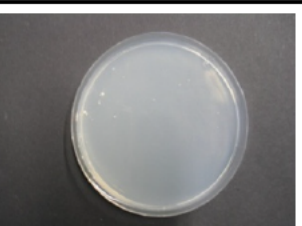
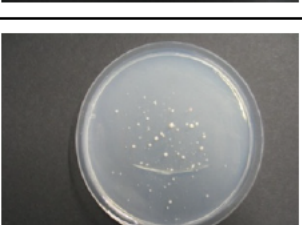
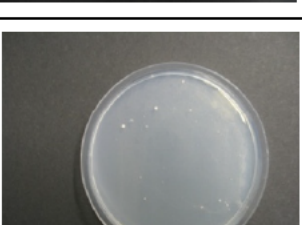
	SD -trp -leu	SD -trp -leu - his	SD-trp -leu - his - ade
PRAT2.1 + PRAT2.1			
PRAT2.1 + PRAT2.2			
PRAT2.1 Δ SAM + PRAT2.1			
PRAT2.1 Δ SAM + PRAT2.2			
PRAT2.1 + Positivkontrolle			
PRAT2.1 + Negativkontrolle			

Abbildung 10: Interaktionsanalyse der At-PRAT2-Proteine im *Split-Ubiquitin*-System.

Es wurden alle PRAT2-Isoformen aus *Arabidopsis* sowohl als „Köder“ als auch als „Beute“-Protein untersucht. Das Selektionsmedium ohne Tryptophan und ohne Leucin (SD-trp, -leu) diente zur Kontrolle der Hefe-Transformation mit den Plasmidvektoren. Ein Wachstum der transformierten Hefen auf Histidinfreiem Medium (SD-trp-leu-his) bzw. auf Histidin- und Adeninfreiem (SD-trp-leu-his-ade) deutet auf eine Interaktion hin. Als Vergleich diente die Interaktion von PRAT2.1 mit einer Positiv-bzw. Negativkontrolle.

4.6 Interaktions-Chromatographie mit der SAM-Domäne

Die Möglichkeit einer Hetero- oder Homo-Oligomerisierung der SAM-Domäne wurde mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie untersucht, da SAM-Domänen für ihre hydrophoben Oberflächen bekannt sind. Dazu wurde die SAM-Domäne von Ps-PRAT2 N-terminal mit einer Hexa-Histidinsequenz versehen und über Nickel-Sepharose aufgereinigt. Die Experimente zeigten, dass Waschungen mit Konzentrationen von bis zu 50mM Imidazol geeignet waren, das meiste unspezifisch gebundene Protein zu entfernen, ohne die heterolog exprimierte SAM-Domäne zu eluieren. Es wurden Interaktionen zwischen der an die Nickelsepharose gekoppelten SAM-Domäne und Proteinen den inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten untersucht. Nach dem Waschen der ungebundenen Proteine vom Säulenmaterial wurden die Proteine, die an die SAM-Domäne gebunden hatten, mit absteigender Salzkonzentration eluiert, präzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 11A). Als Kontrollexperiment wurden Proteine der inneren Hüllmembran mit der Nickelsepharose jedoch ohne die SAM-Domäne inkubiert. Dabei konnten keine Interaktionen der Proteine mit dem Säulenmaterial detektiert werden (Abbildung 11B). Durch die Interaktionschromatographie zwischen den Proteinen der inneren Hüllmembranen von Chloroplasten und der Ps-SAM-Domäne konnten im Eluat 1 zwei Banden erkannt werden. Sie wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert. In beiden Banden wurde PRAT2-Proteine gefunden. Dies war ebenso der Fall für die Banden, die mit den Pfeilen 3-5 markiert wurden und in der Waschung mit 500mM Imidazol zu finden waren. In dieser Fraktion wurden sowohl die SAM-Domäne, als auch die an die SAM-Domäne assoziierten Proteine eluiert. Alle weiteren sequenzierten Proteine waren nicht signifikant repräsentiert (Score von < 100) und wurden deshalb nicht in Betracht gezogen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die PRAT2-Proteine über ihre SAM-Domäne Oligomere bilden. Die Oligomerbildung konnte mit der nativen Gelelektrophorese dokumentiert werden, und in den Interaktionsanalysen im *Split Ubiquitin* System und der Interaktionschromatographie wurde gezeigt, dass für diese Wechselwirkungen die SAM-Domäne verantwortlich war.

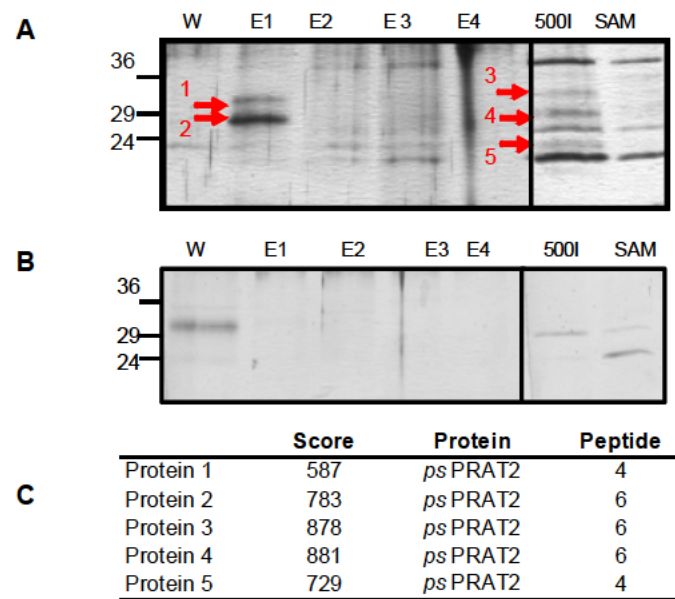


Abbildung 11: Hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit der Ps-PRAT2 SAM-Domäne.

(A) Analyse der eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Die SAM-Domäne wurde an das Säulenmaterial gebunden und mit Proteinen der inneren Hüllmembran aus Erbsenchloroplasten (500µg) inkubiert. Ungebundene Proteine wurden weggewaschen (W) und gebundene Proteine mit absteigender Salzkonzentration eluiert (E1-4), E1: Elution mit 500mMKCl, E2:300mM KCl, E3:100mM KCl, E4: 0mM KCl, 500I: Elution der SAM-Domäne mit 500mM Imidazol, SAM: Unspezifische Proteine, die nicht durch die Elution vom Säulenmaterial getrennt werden konnten. Die molekulare Masse des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben. **(B)** Analyse der eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Silberfärbung in der Negativkontrolle (Nickelsepharose ohne Ps-SAM-Domäne). **(C)** Identifikation der Ps-SAM-Interaktionspartner in der Massenspektrometrie. Sowohl im Eluat 1, als auch in der abschließenden Gesamtelution konnten Proteine detektiert werden, die spezifisch an die SAM-Domäne gebunden hatten. Banden in (A), die mit rotem Pfeil markiert sind, wurden sequenziert. Der Score, der Proteinname und die Anzahl der Peptide wurde für jede Probe identifiziert.

4.7 Die PRAT2-Gene in *Arabidopsis thaliana*

Um einen Überblick über das Expressionsmuster der At-PRAT2 Gene in verschiedenen Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien zu erhalten, wurden die Microarray Daten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005) herangezogen (Abbildung 12). In *Arabidopsis* sind beide Gene ubiquitär und moderat in allen Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert.

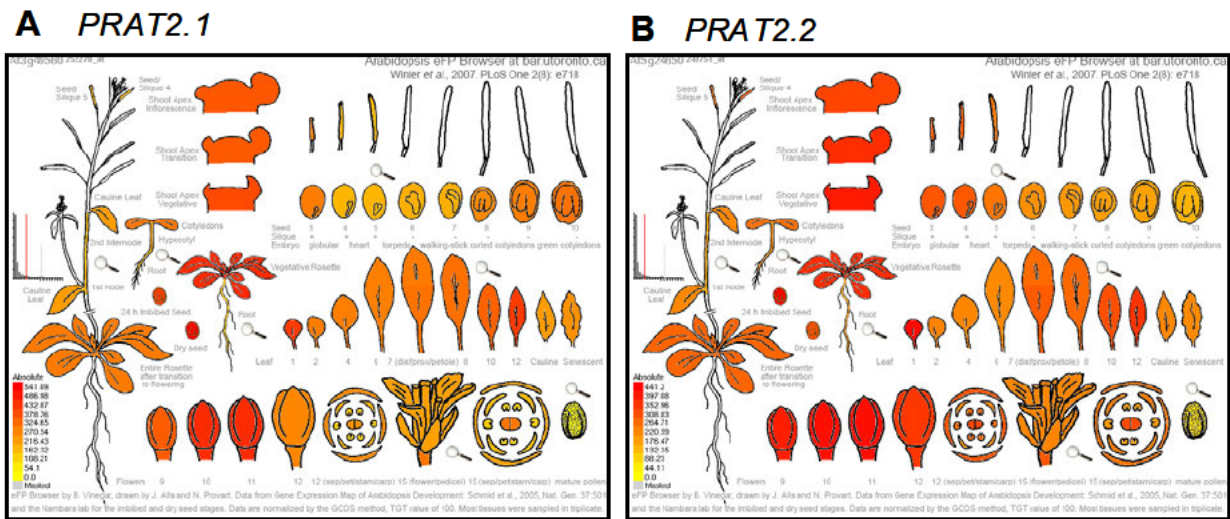


Abbildung 12: Expressionsmuster der PRAT2-Isoformen in Arabidopsis

Übersicht über die Expression von At-PRAT2.1 und (B) At-PRAT2.2 während der Pflanzenentwicklung. Die Daten stammen aus Experimenten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005) und wurden mittels des eFP Browse Programms visualisiert.

4.8 Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien *prat2.1* und *prat2.2*

Das Gen *PRAT2.1* ist 1607 Basenpaare (bp) lang, wohingegen *PRAT2.2* 2325 bp misst. Beide *PRAT2*-Gene umfassen sechs Exons (Abbildung 13). Die Analyse des Promotorbereichs ergab für beide eine pflanzliche TATA-Box sowie einen daraus resultierenden Transkriptionsstart, der für *PRAT2.1* 100bp und für *PRAT2.2* 116bp vom Translationsbeginn in 5'-Richtung liegt. Der 3'-untranslatierte Bereich (3'-UTR) von *PRAT2.1* umfasst 254bp und der für *PRAT2.2* 245bp.

Für die Gene *At-PRAT2.1* und *At-PRAT2.2* standen jeweils zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien zur Erzeugung von Funktionsverlustmutanten zur Verfügung. Die genomische DNA aller Insertionslinien wurde mittels PCR genotypisiert, so dass homozygote Allele identifiziert und die Linien vermehrt werden konnten. Die PCR-Produkte zwischen der T-DNA und den jeweiligen genspezifischen Oligonukleotid-Primern wurden sequenziert. Für die Linien *prat2.1-1* und *prat2.1-2* (SALK031707/SALK112126) wurde somit eine T-DNA-Insertion nach Aminosäure 214 im vierten Exon identifiziert (Abbildung 13). Für *PRAT2.2* stand eine T-DNA Insertionslinie zur Verfügung (Salk 136525, *prat2.2-1*), in der die T-DNA in Exon 2 inseriert und an beiden Seiten von der LB- T-DNA flankiert wurde. Das offene Leseraster wurde dadurch an Aminosäure 83 unterbrochen. In der zweiten Insertionslinie (Salk149871, *prat2.2-2*) war die T-DNA in den Promotor inseriert.

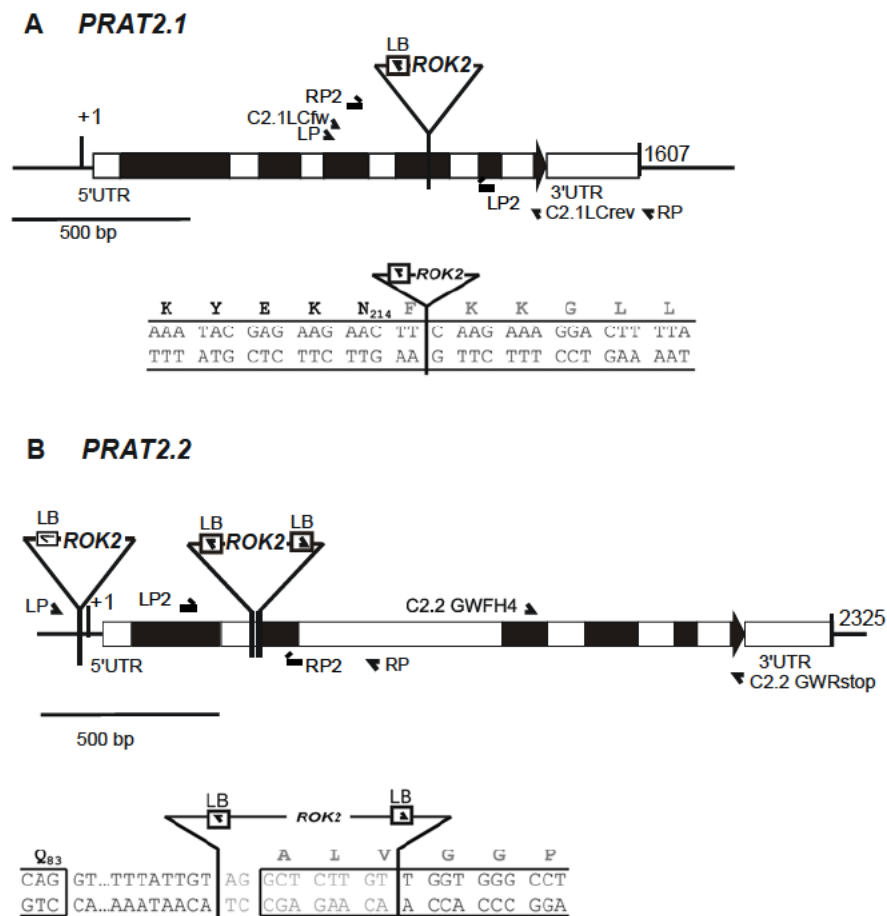


Abbildung 13: Genomische Organisation von At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2.

(A) Die PRAT2.1- und PRAT2.2-Gene schließen je sechs Exons ein (schwarze Balken). In beiden unabhängigen T-DNA Insertionslinien von PRAT2.1 (SALK031707 und SALK112126) ist die T-DNA in der Mitte des Exons 4 nach Aminosäure 214 inseriert. (B) In der Insertionslinie SALK136525 wurde die T-DNA in Exon 2 von PRAT2.2 inseriert und ist an beiden Seiten von der LB T-DNA flankiert. In der Insertionslinie SALK149871 ist die T-DNA in den Promotor inseriert. ROK2 repräsentiert die T-DNA in der SALK Kollektion. Die Positionen und die Richtung der left border T-DNA Sequenz (LB) sowie die verwendeten Oligonukleotid-Primer für die Genotypisierung (LP, RP) der *prat*-Mutanten und für die RT-PCR (22-2LCfw, 22-2LCrev, 22-3LCfw2, 22-3LCfw3, C2.1LCfw, C2.1LCrev, C2.2 GWFH4, C2.2GWRstop) sind markiert.

Das Vorhandensein einer T-DNA Insertion innerhalb eines Gens führt zum Abbruch der Transkription in diesem Bereich und dadurch zum Funktionsverlust des entsprechenden Proteins. Um die Deletion der PRAT2-Gene in den T-DNA Insertionsmutanten zu bestätigen, wurden die Transkriptgehalte mittels RT-PCR ermittelt. Diese Analysen wurden von Dr. Manuela Baumgartner am Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Department Biologie I LMU München durchgeführt. Hierfür wurden Primer verwendet, die um den Insertionsort der T-DNA im Protein-kodierenden Bereich des Gens liegen (Abbildung 13). Sowohl in homozygoten *prat2.1-1* und *prat2.1-2* Pflanzen, als auch in der T-DNA Insertionsmutante *prat2.2-1* konnte im Vergleich zum Wildtyp keine mRNA detektiert

werden (Abbildung 14A). Um die Mutanten auf Proteinebene zu charakterisieren, wurden Immunoblots mit dem At-PRAT2.1 Antikörper auf isolierten Hüllmembranen der Chloroplasten der Mutanten durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, detektierte der Antikörper in beiden Einzelmутanten die für die PRAT2-Proteine charakteristische Doppelbande. Da die mRNA von *PRAT2.1* und *PRAT2.2* in der jeweiligen anderen *Knockout*-Linie exprimiert wird, scheint der Antikörper beide Homologe zu erkennen. Dementsprechend detektierte der Antikörper in der *prat2.1* Linie noch das Signal für das Protein PRAT2.2 und vice versa (Abbildung 14B).

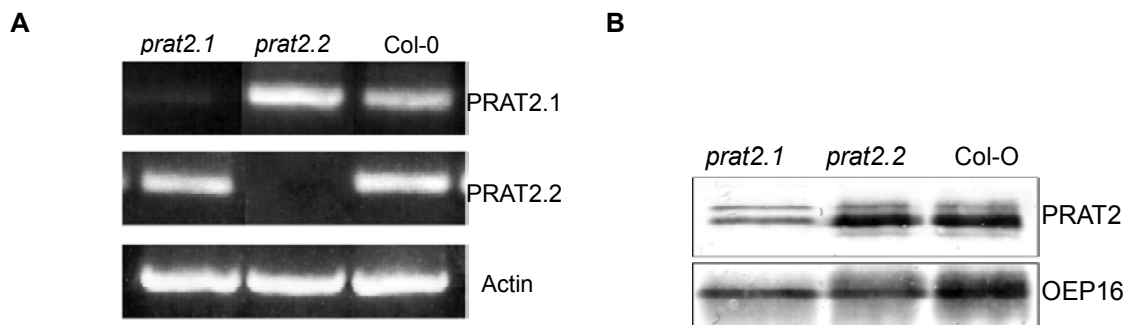


Abbildung 14: Transkript- und Proteingehalte der T-DNA-Insertionslinien *prat2.1-2* und *prat2.2-1*.

(A) RT-PCR auf cDNA aus sieben Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und homozygoten *prat2.1-2* und *prat2.2-1* Mutanten. Da sich in keiner der SALK-Linien *PRAT2* mRNA nachweisen ließ, ist jeweils nur eine Linie dargestellt. **(B)** Immunodetektion der At-PRAT2-Proteine in Chloroplasten-Hüllmembranen der homozygoten Einzelmутanten. Gemischte Chloroplasten-Hüllmembranen wurden aus fünf Wochen alten Pflanzen isoliert und (10µg Protein) per SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente das OEP16 Protein.

Die phänotypische Analyse der Insertionslinien zeigte, dass homozygote *prat2.1* und *prat2.2* Mutanten keinen sichtbaren Phänotyp haben (Abbildung 15). Unter normalen Kulturbedingungen reichte offenbar jeweils eines der At-PRAT2-Proteine aus, um grüne Pflanzen zu erhalten. Um Aufschlüsse über die physiologische Funktion der PRAT2-Proteine in *Arabidopsis* zu erhalten, wurde eine *prat2*-Doppelmutante erzeugt, in der die Expression beider At-PRAT2-Gene ausgeschaltet ist.

4.9 Die *prat2*-Doppelmutanten in *Arabidopsis*

4.9.1 Phänotypische Analyse

Durch die Kreuzung der *prat2*-Einzelmутanten wurden zwei unabhängige, homozygote *prat2*-Doppelmutanten (c2dm1 und c2dm2) hergestellt, denen jeweils beide At-PRAT2-Proteine fehlten. Parallel wurde auch der ausgekreuzte Wildtyp identifiziert. Um die *prat2*-Doppelmutanten und den damit verbundenen Funktionsverlust der entsprechenden Proteine zu charakterisieren, wurden diese hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten und Veränderungen untersucht. Dazu wurde der Phänotyp der Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen im Langtag (16h Licht/8h Dunkelheit) analysiert. Die erste *prat2*-Doppelmutante c2dm1 wurde von Dr. Manuela Baumgartner hergestellt und zeigte einen chlorotischen Phänotyp. Die zweite Doppelmutante wurde im Rahmen dieser Arbeit mit zwei weiteren unabhängigen Einzellinien generiert und entwickelte denselben chlorotischen Phänotyp (Abbildung 15). Beide *prat2*-Doppelmutanten waren im Keimlingsstadium auf Erde nicht lebensfähig und wurden deshalb stets heterotroph unter Zugabe von 1% Saccharose auf MS-Agarmedium angezogen. Erst nach etwa 20 Tagen wurden die Pflanzen auf Erde transferiert.

Die *prat2*-Doppelmutanten bildeten sehr hell gefärbte Kotyledonen aus, die im Laufe der Entwicklung ausbleichen. Während die Kotyledonen in ihrer Form dem Wildtyp glichen, entwickelten die Rosettenblätter lanzettförmige Formen. Das Sprossmeristem und die sehr jungen Blätter der Mutanten erschienen gelblich-grün, wurden dann aber im Rosettenblatt-Stadium chlorotisch. Eine schwache Grünfärbung konnte lediglich im Bereich der primären und sekundären Venen beobachtet werden (Abbildung 15). Grundsätzlich zeigten die maturen Blätter der *prat2*-Doppelmutanten ein reduziertes Größenwachstum im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Wurzeln waren im Vergleich zum Wildtyp kürzer, was aber dem gesamten Erscheinungsbild der c2dm Pflanzen entsprach. Nach etwa acht Wochen bildeten die Doppelmutanten Blüten, die sich auch zu einem Fruchtstand entwickelten und keimfähigen Samen produzierten. Allerdings war die Anzahl der Infloreszenzen im Vergleich zum Wildtyp verringert und es wurde eine geringere Anzahl an Schoten ausgebildet. Der Phänotyp wirkte buschig, woraus man auf das Fehlen einer Apikaldominanz schließen konnte. Die Triebe erreichten maximal 1/3 der Länge des Wildtyps und waren nicht standfest. Insgesamt waren das Wachstum und die Entwicklung der *prat2*-Doppelmutante im Vergleich zu Wildtyppflanzen erheblich verlangsamt.

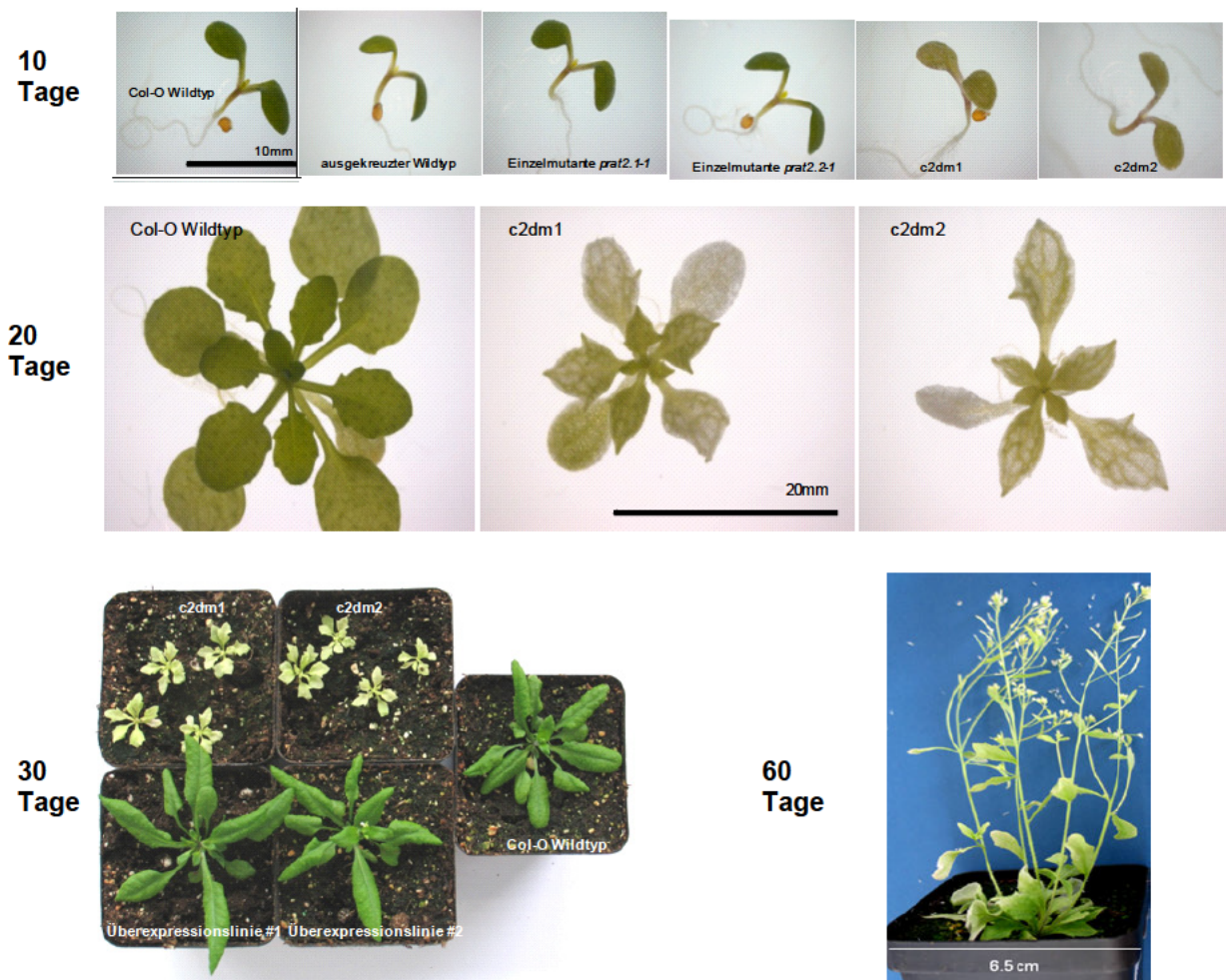


Abbildung 15: Phänotyp der homozygoten *prat2*-Doppelmutanten *c2dm1* und *c2dm2*.

Im 10 Tage alten Kotyledonenstadium und in der weiteren Entwicklung zeigten die *PRAT2*-Einzellinien keine Unterschiede zum Wildtyp. Die *prat2*-Doppelmutanten bildeten hingegen chlorotische Kotyledonen aus. Im Alter von 20 Tagen war für beide homozygoten *prat2*-Doppelmutanten ein chlorotischer Phänotyp ausgeprägt. Nach dem Transfer auf Erde (30 Tage) waren die Unterschiede zum Wildtyp sehr deutlich. Im Alter von etwa 60 Tagen bildet die *prat2*-Doppelmutante Triebe und Blüten aus.

Obwohl beide *prat2*-Doppelmutanten unabhängige Linien darstellen und somit der chlorotische Phänotyp eindeutig auf das Fehlen von *At-PRAT2.1* und *At-PRAT2.2* zurückgeführt werden konnte, wurde die *prat2*-Doppelmutante *c2dm1* mit *At-PRAT2.1* und *At-PRAT2.1ΔSAM* komplementiert. Dazu wurde die cDNA von *PRAT2.1* in voller Länge und ohne die SAM-Domäne mithilfe von *A. tumefaciens* stabil in die Linie *c2dm1* transformiert. Nach der Komplementation der *prat2*-Doppelmutante konnten elf unabhängige T1-Linien, die *PRAT2.1* unter dem 35S Promotor tragen, durch Antibiotika-Selektion und PCR-Genotypisierung identifiziert werden. Alle Nachkommen dieser Linien zeigten einen vermindert starken Phänotyp, wobei dieser bezüglich der Grünfärbung, Blattform und Entwicklung variierte (Abbildung 16A). Eine Vielzahl der Linien waren wieder grün und zeigten eine normale Entwicklung. Zudem wurden die homozygoten T-DNA-Insertionen in

beiden *PRAT2*-Genen überprüft und das Protein durch Immunoblotanalysen nachgewiesen (Abbildung 16B). Dies belegte, dass der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten durch *PRAT2.1* komplementiert werden konnte. Das gelang auch für die Komplementation der *prat2*-Doppelmutante *c2dm1* mit dem deletierten *PRAT2.1* Konstrukt, dem die SAM-Domäne fehlte. Allerdings konnte hier der Phänotyp nicht in vollem Ausmaß wieder hergestellt werden, denn alle getesteten Linien zeigten immer noch einen chlorotischen Phänotyp, der allerdings einen Wachstumsvorteil gegenüber der *prat2*-Doppelmutante zeigte.

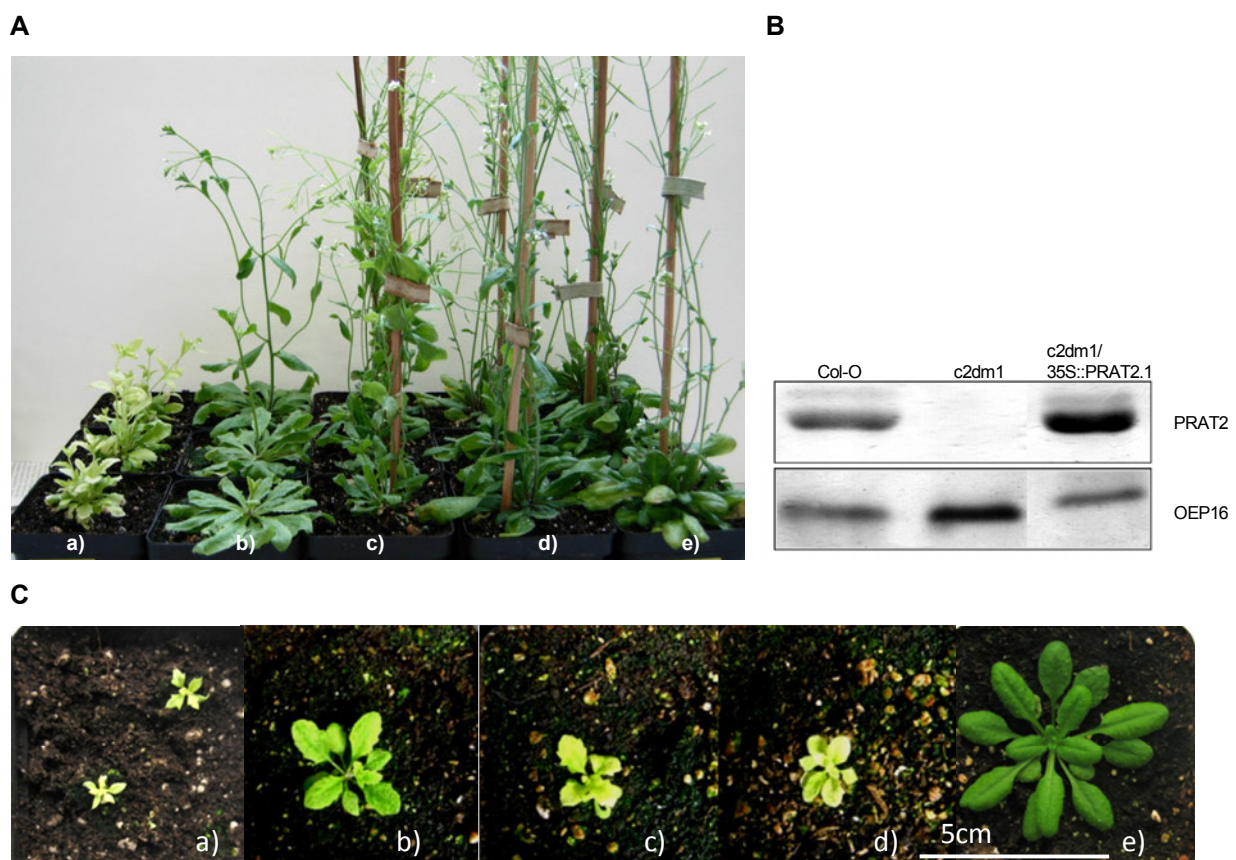


Abbildung 16: Komplementation des chlorotischen Phänotyps von *c2dm1* Mutanten.

(A) 60 Tage alte *c2dm1/35S::PRAT2.1* Pflanzen (T2-Generation) nach der Komplementation a) untransformierte *prat2*-Doppelmutante, b-d) transformierte *c2dm1 35S::prat2.1* Pflanzen verschiedener Linien, e) Wildtyp. **(B)** Immunoblot der Membranproteine aus Wildtyppflanzen (Col-0, 10µg Protein), der Doppelmutante *c2dm1* (20µg Protein) und der komplementierten *prat2*-Doppelmutante *c2dm1 (c2dm1/35S::PRAT2.1, 10µg Protein)*. Als Ladekontrolle diente das OEP16 Protein. **(C)** 30 Tage alte *c2dm1/35S::PRAT2.1ΔSAM* Pflanzen (T2-Generation) nach der Komplementation a) untransformierte *prat2*-Doppelmutante, b-d) transformierte *c2dm1 35S::prat2.1ΔSAM* Pflanzen verschiedener Linien, e) Wildtyp.

Die komplementierte Linie b) zeigte Auffälligkeiten, weil sie einen sogenannten PIN-Phänotyp entwickelte (Abbildung 17A). Die sogenannte PIN-Mutante, bei der der Auxin-Efflux-Transporter PIN1 in der Plasmamembran deletiert ist, zeigt einen nadelförmigen (engl. pin) Blütenstand, der keinerlei seitliche Organe trägt (Gälweiler, 1998). Die

komplementierte Linie *c2dm1/35S::PRAT2.1* mit aufspaltendem PIN-Phänotyp bildete allerdings am Haupttrieb wenige Seitentriebe mit Blütenständen. Die Blüten zeigten eine abnorme Anzahl von Sepalen, die zudem verwachsen waren (Abbildung 17B). Außerdem war die Anzahl der Petalen vermindert und die Blütenstände waren steril. Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp auch im Wildtyphintergrund auftritt, wurden zusätzlich der Col-0 Wildtyp mit *At-PRAT2.1* unter dem 35S-Promotor komplementiert. Allerdings zeigten elf dieser PRAT2 Überexpressionslinien keinen sichtbaren Phänotyp.

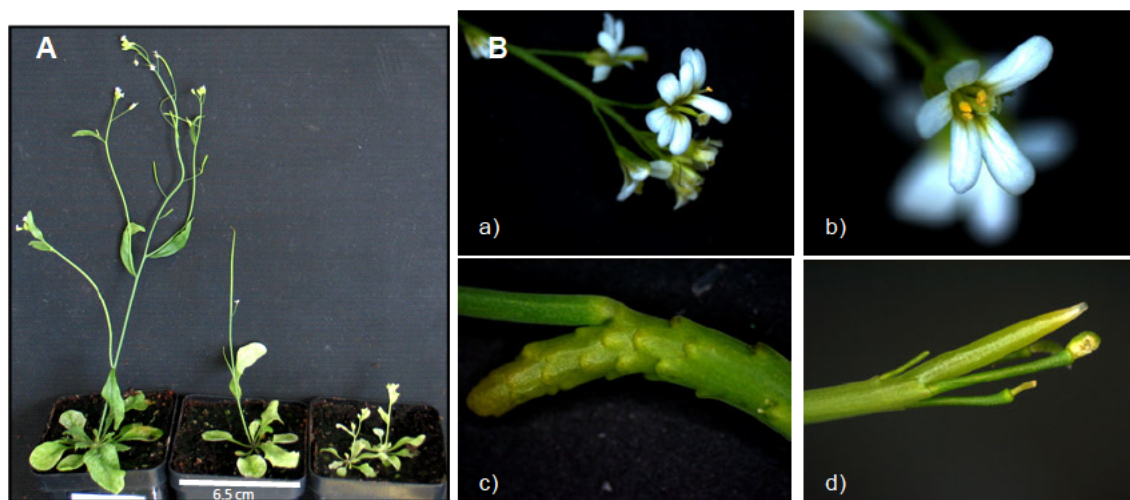


Abbildung 17: Komplementierte *prat2*-Doppelmutante mit PIN Phänotyp in der F2-Generation.

(A) Die komplementierte Linie *b*) spaltete auf und bildete sowohl normal entwickelte grüne Pflanzen (links), als auch Pflanzen mit einem PIN-Phänotyp (Mitte). Zum Vergleich ist rechts die *prat2*-Doppelmutante im gleichen Alter dargestellt. **(B)** Der PIN Phänotyp von Linie *b*) mit Seitentrieben, die Blüten mit abnormer Anzahl von Sepalen (a) und (b) und den nadelförmigen Haupttrieb (c und d) aufweisen.

Da der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten auf eine wichtige Funktion von PRAT2-Proteinen in allen grünen Geweben der Pflanze hindeutete, wurde im Folgenden die Blattmorphologie charakterisiert (Abbildung 18). Die Blattquerschnitte zeigten im Lichtmikroskop, dass in den *prat2*-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp die Unterteilung des Mesophylls in Palisaden- und Schwammparenchym nicht mehr ausgeprägt war. Außerdem war die Blattoberfläche extrem wellig und deformiert. Grundsätzlich waren in den Blättern der *prat2*-Doppelmutante sehr viele luftgefüllte Räume sichtbar. Im Gegensatz dazu waren im Bereich der Leitbündel sehr viele Zellen ausgebildet, die zudem mehr Chloroplasten enthielten. Die wenigen vorhandenen Zellen des Palisaden- und Schwammparenchyms erschienen verformt. Während der Wildtyp auf Erde, relativ zur Anzucht auf Agarmedium, verstärkt Palisadenparenchym ausbildete, schien das Blattgewebe in der *prat2*-Doppelmutante auf Erde weniger Zellen auszubilden (Abbildung 18). In den Zellen der Blätter war zudem eine stark reduzierte Anzahl an

Chloroplasten zu erkennen. Diese Beobachtung wurde durch Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop bestätigt (Abbildung 18).

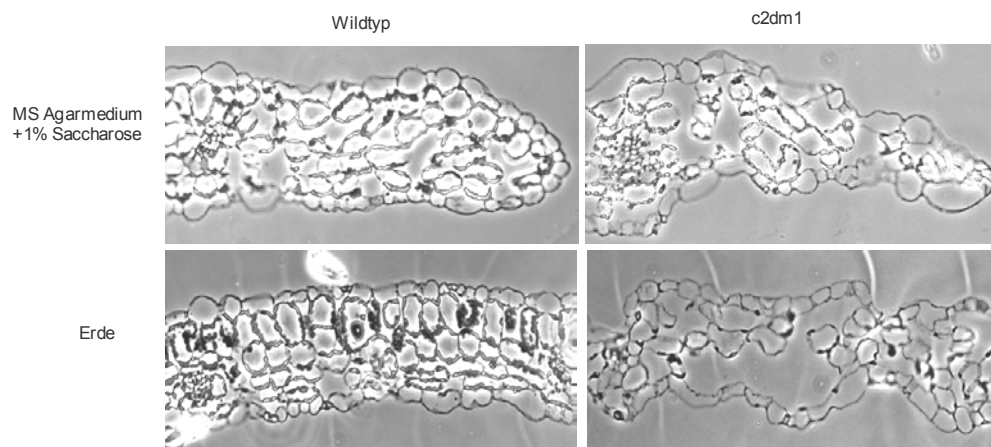


Abbildung 18: Blattmorphologie von *prat2*-Doppelmutanten.

„Semi-dünn“-Querschnitte von 17 Tage alten Rosettenblättern von Wildtyp-Pflanzen und der *prat2*-Doppelmutante *c2dm1*. Die *prat2*-Doppelmutante bildete ein undifferenziertes Palisaden- und Schwammparenchym aus, enthielt luftgefüllte Interzellularen und die Zellen besaßen eine reduzierte Anzahl an Chloroplasten. Dieser Phänotyp wurde durch die Anzucht auf Erde verstärkt.

Um die Blattmorphologie in homozygoten *prat2*-Doppelmutanten genauer zu charakterisieren, wurde die Ultrastruktur der Rosettenblätter (Wildtyp 22 Tage alt, und *c2dm1* 44 Tage alt) mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Diese Arbeiten wurden von Dr. Irene Gügel am Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, LMU München durchgeführt.

Der Verlust der PRAT2-Proteine hatte drastische Auswirkungen auf die Biogenese der Chloroplasten und insbesondere auf die Ausbildung des Thylakoidmembransystems. Auffällig war, dass die Zellen der *prat2*-Doppelmutanten im Allgemeinen eine geringere Anzahl an Chloroplasten enthielten, die zudem im Vergleich zum Wildtyp kleiner waren (Abbildung 19A-D). Zusätzlich konnte die Beobachtung aus dem Lichtmikroskop bestätigt werden, dass in der *prat2*-Doppelmutante weniger und deformierte Zellen ausgebildet wurden. Da im Sprossmersitem und in jungen Blättern eine Grünfärbung erkennbar war, wurde die Morphologie dieser Blätter untersucht. Vergleich man die jungen Blätter der *prat2*-Doppelmutante mit denen des Wildtyps, so war in diesem Stadium noch eine relativ geordnete Gewebearordnung zu erkennen und die Chloroplastenanzahl und Größe unterschieden sich nicht drastsich vom Wildtyp (Abbildung 19C-D). Besonders auffällig schien das Thylakoidmembransystem betroffen zu sein, denn es waren kaum Verbindung zwischen den einzelnen Granastapel durch Stroma-Thylakoide entwickelt (Abbildung 19E-

F). Zum anderen waren in den Chloroplasten der *prat2*-Doppelmutanten auffallend viele Plastoglobuli-Ansammlungen zu erkennen (Abbildung 19F).

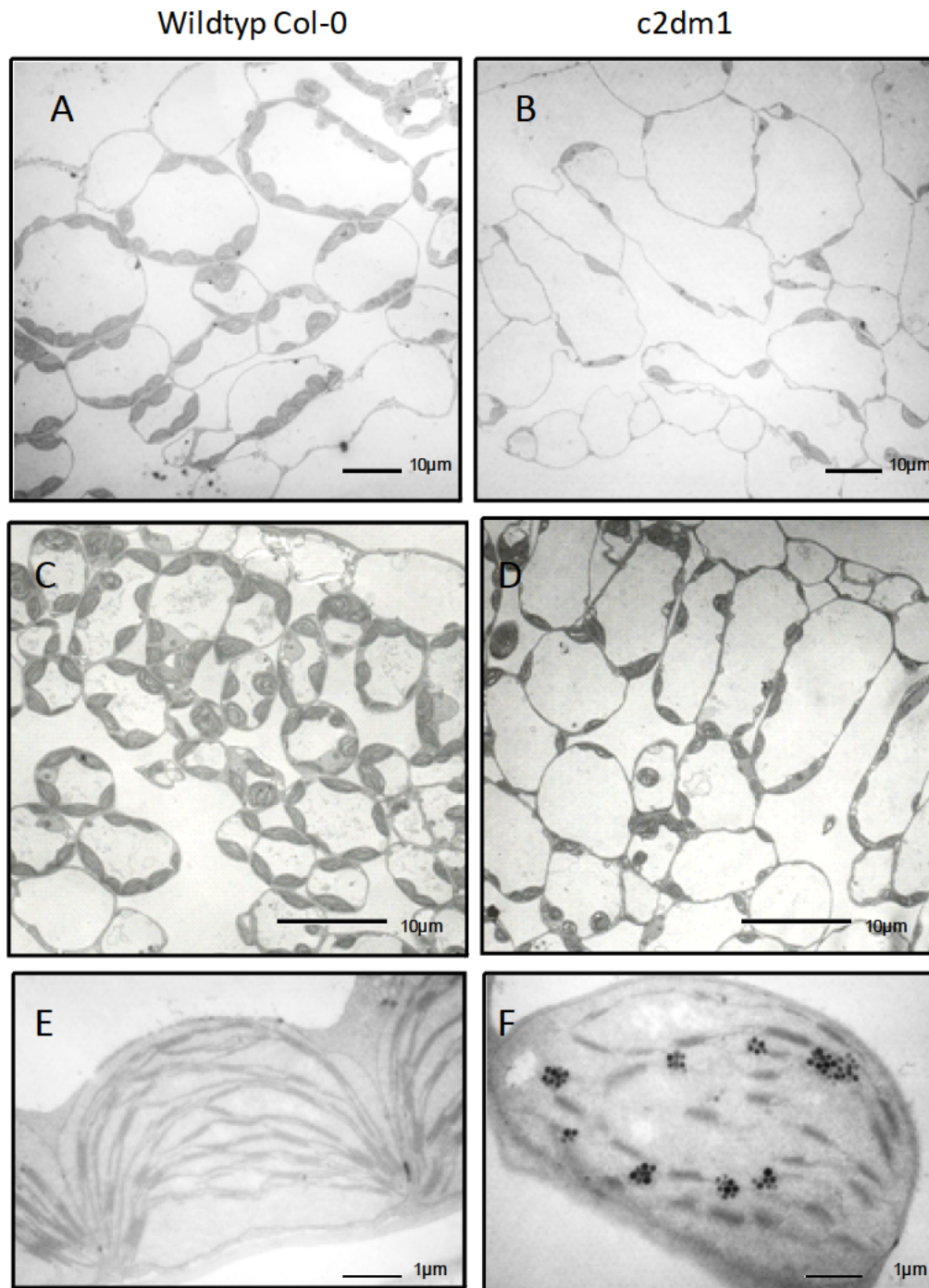


Abbildung 19: Ultrastruktur der Plastiden in der *prat2*-Doppelmutante.

(A), (B) Zellen von maturen Blattgewebe. Die Anzahl der Chloroplasten in der *c2dm1* Mutante war drastisch reduziert. (C) und (D) Zellen von jungen, relativ grün gefärbten Blättern 44 Tage alter Pflanzen. (E) und (F) Plastiden aus maturen Blattgewebe. In Plastiden der *prat2*-Doppelmutante waren die Thylakoide nicht vollständig ausgebildet und es akkumulierten Plastoglobuli.

4.9.2 Phänotyp unter Auxin-Gabe

Da der Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten sehr drastisch war, war anzunehmen, dass die PRAT2-Proteine eine essentielle Rolle für den gesamten Stoffwechsel der Pflanze innehaben. Außerdem schienen die *prat2*-Doppelmutanten einen buschigen Phänotyp mit geringer apikaler Dominanz zu entwickeln. Diese Beobachtungen und der PIN-Phänotyp der komplementierten Linie b) führten zur der Hypothese einer gestörten Auxinhomöostase in den *prat2*-Doppelmutanten.

Indol-3-Essigsäure (IES) ist die am häufigsten natürlich vorkommende Substanz aus der Klasse der Auxine. IES ist chemisch mit der Aminosäure Tryptophan verwandt und es wird angenommen, dass IES vornehmlich auf einem Tryptophan-abhängigen Weg synthetisiert wird (Bartel, 1997). Der Export von Tryptophan aus dem Plastid über die Chloroplastenmembran ist deshalb von Bedeutung für die IES-Homöostase und nahezu aller pflanzlichen Entwicklungsprozesse. Zur Analyse eines möglichen Einflusses von IES auf die Entwicklung der *prat2*-Doppelmutanten wurde das Saatgut auf IES- und Tryptophan-supplementiertem Agarmedium ausgesät.

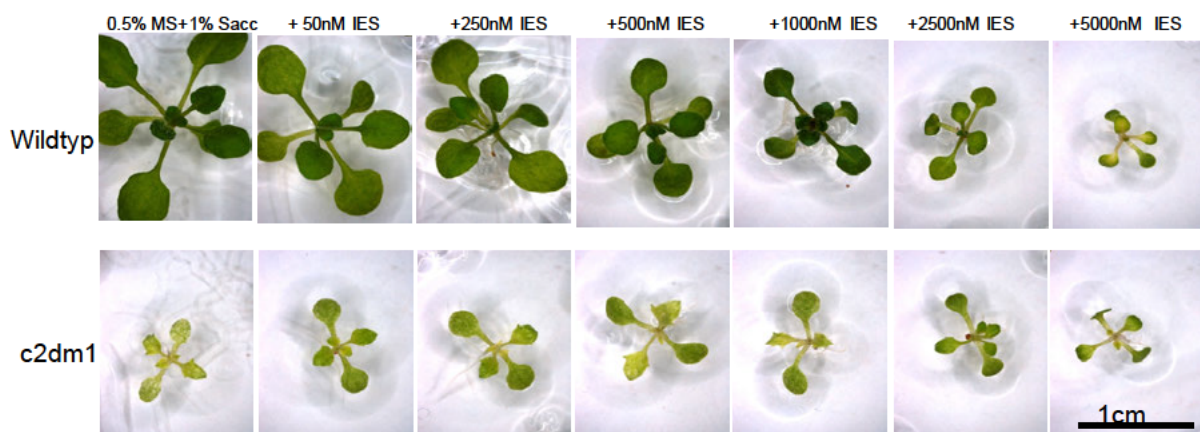


Abbildung 20: Einfluss ansteigender IES Konzentrationen auf die *prat2*-Doppelmutante.

Steriles Saatgut wurde heterotroph unter Zugabe von 1% Saccharose auf MS-Agarmedium angezogen, das mit steigenden Konzentrationen von IES supplementiert wurde. Die Abbildung zeigt 2 Wochen alte Keimlinge von Wildtyp Col-0 (obere Reihe) und der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 (untere Reihe). Die Konzentrationen von IES sind angegeben.

Es zeigte sich, dass der Phänotyp durch Tryptophan nicht verändert wurde, während die IES-Gabe die chlorotischen Doppelmutanten etwas grüner erscheinen ließ. Während der Wildtyp ab einer Konzentration von 500nM IES unter einer Wachstumsdepression litt, schien die *prat2*-Doppelmutante zu ergrünen. Unter einer Konzentration von 250nM IES

war der chlorotische Phänotyp am wenigsten ausgeprägt, während Konzentrationen ab 500nM IES für den Wildtyp toxisch waren. Um das ergrünte Erscheinungsbild der *prat2*-Doppelmutante zu verifizieren, wurden die Chlorophyll *a* und *b* Gehalte mittels HPLC analysiert. Durch diese Analyse konnte bestätigt werden, dass durch die IES-Gabe die Chlorophyllmengen der *prat2*-Doppelmutante stiegen (Abbildung 21). Bei einer Konzentration von 250nM IES verdoppelten sich die Chlorophyll *a* und *b* Gehalte bis auf 30 % der Wildtypgehalte (Abbildung 21).

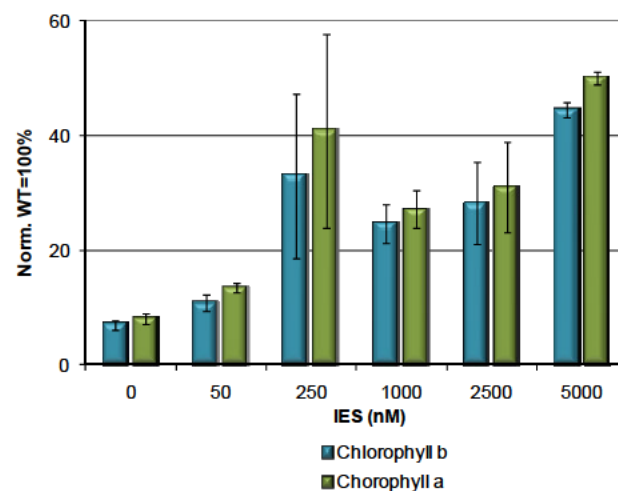


Abbildung 21: Chlorophyllgehalte der *prat2*-Doppelmutante unter dem Einfluss von IES.

Die Keimlinge wurden 2 Wochen auf Agarmedium angezogen, welches mit steigenden IES Konzentrationen supplementiert war und die Chlorophyllgehalte der Sprosse wurden analysiert. Dabei wurden die Werte des Wildtyps auf 100% normalisiert. Es wurden je 3mal 10 Col-0 Wildtyp und je 3mal 10 *prat2*-Doppelmutanten Proben gepoolt (n=3 biologische Replikate) und analysiert. Die Standardabweichung ist eingezeichnet.

4.9.3 Phänotyp unter Dauerlichtbedingungen

Da Licht einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze und insbesondere auf die Chlorophyllbiosynthese ausübt, wurde der Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen beobachtet. Dabei war zu erkennen, dass die *prat2*-Doppelmutanten unter kontinuierlichem Licht unabhängig von der Lichtintensität sowohl grüne Kotyledonen, als auch grüne Rosettenblätter entwickelten, so dass sie kaum noch von den Pflanzen des Wildtyps zu unterscheiden waren (Abbildung 22). Neben der Ergrünung der Pflanzen konnte auch beobachtet werden, dass die Form der Rosettenblätter wieder dem Wildtyp entsprach und sich keine lanzettähnlichen Strukturen mehr ausbildeten.



Abbildung 22: Komplementation des chlorotischen Phänotyps durch Dauerlicht.

Unter Langtag (16h Licht) und Kurztagbedingungen (8h Licht) entwickelte die *prat2*-Doppelmutante *c2dm1* chlorotische Kotyledonen und Rosettenblätter. Unter kontinuierlichem Licht (24h) ergrünten die Blätter unabhängig der Lichtintensität (86 bzw. 6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

Die Beobachtung, dass das kontinuierliche Licht unabhängig von der Intensität den Phänotyp zu komplementieren vermochte, warf die Frage auf, ob sich im Langtag toxische Metabolite, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) anhäufte und die Mutanten durch ein höheres Maß an photooxidativem Stress gekennzeichnet waren. In Pflanzen werden ROS wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Antwort auf abiotischen und biotischen Stress, durch hohe Lichtintensität oder UV-Licht, Ozon, extreme Temperaturen und Pathogene generiert (Dat et al., 2000). Der histochemische Nachweis von H_2O_2 erfolgte mithilfe von Diaminobenzidin (DAB), das in Anwesenheit von H_2O_2 zu einem braunroten, unlöslichen Komplex polymerisiert (Thordal-Christensen et al., 1997).

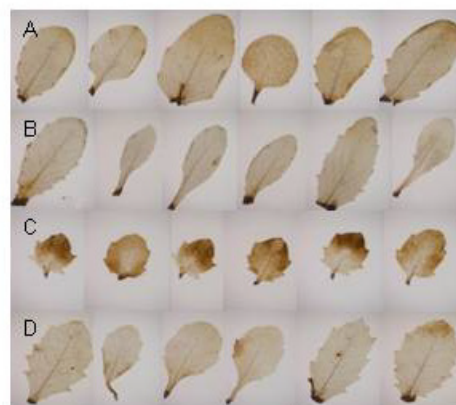


Abbildung 23: Wasserstoffperoxid-Färbung von *prat2*-Doppelmutanten

Die Akkumulation von H_2O_2 in Rosettenblättern wurde mit 3,3-Diaminobenzidine detektiert, das als braune Färbung zu sehen war. (A) Mutante *c2dm1* im Dauerlicht, (B) Wildtyp im Dauerlicht; (C) Mutante *c2dm1* im Langtag; (D) Wildtyp im Langtag.

Unter Dauerlichtbedingungen konnte weder im Wildtyp-Blattgewebe, noch in der *prat2*-Doppelmutante eine DAB-Färbung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen Blätter der *prat2*-Doppelmutante, die unter Langtagbedingungen wuchsen, also eine Dunkelphase von 8h durchliefen, braune Verfärbungen auf, die sich in der Größe und Intensität unterschieden und unregelmäßig im Blatt verteilt waren (Abbildung 23).

Eine weitere Möglichkeit für den phototoxischen Stress der *prat2*-Doppelmutante könnte in der Akkumulation von Protochlorophyllid, einer Zwischenstufe in der Chlorophyll-Biosynthese, liegen. Normalerweise wird das im Protochlorophyllid-Holochrom (ein Komplex aus NADPH, Protochlorophyllidoxidoreduktase (POR) und Protochlorophyllid), gebundene Protochlorophyllid bei Belichtung zu Chlorophyllid reduziert. Dahingegen wirkt akkumuliertes, freies Protochlorophyllid, phototoxisch, da es bei Belichtung toxischen Singulett-Sauerstoff freisetzt (Runge et al., 1996). Da Protochlorophyllid unter Blaulicht rot fluoresziert, wurde eine mögliche Akkumulation in etiolierten Keimlingen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Etiolierte, gesunde Pflanzen akkumulieren nur in geringem Maße Protochlorophyllid, da dieses seine eigene Biosynthese hemmt. Die *flu*-Mutante, bei der diese feedback Regulation ausgeschaltet ist (Kim und Apel, 2004), diente als Kontrolle. Die *flu*-Mutante zeigt unter Dauerlicht keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp, wird sie allerdings im Wechsel von Dunkelheit und Licht angezogen, so zeigt sie charakteristische Stressreaktionen und die Keimlinge bleichen aus. In den Ergrünungsversuchen zeigte die *prat2*-Doppelmutante keine rote Fluoreszenz, was bei einer Akkumulation von Protochlorophyllid der Fall wäre (Abbildung 24). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in den *prat2*-Doppelmutanten keine Protochlorophyllidakkumulation die Ursache für den phototoxischen Stress ist.

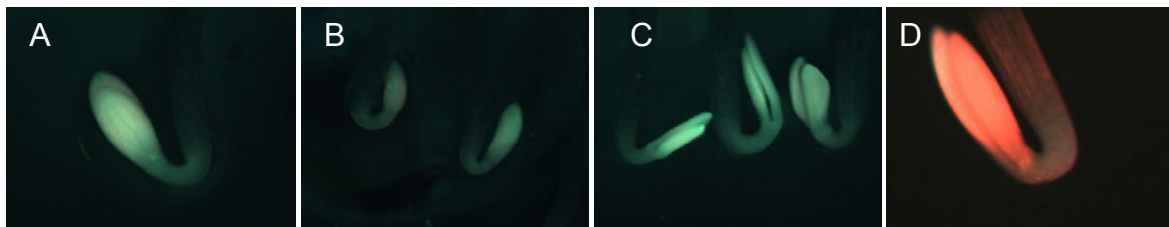


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopie von etiolierten Keimlingen.

Alle dargestellten Keimlinge (3 Tage alt) der verschiedenen Linien (A) Wildtyp Col-0, (B) ausgekreuzter Wildtyp, (C) *prat2*-Doppelmutante c2dm1, (D) *flu*-Mutante sind repräsentativ für jeweils 50 Keimlinge. Bei einer starken Akkumulation von Protochlorophyllid wie in den *flu*-Mutanten (positive Kontrolle) kam es zu einer deutlichen, tief roten Färbung der Kotyledonen. Wenn keine Akkumulation vorlag, fluoreszierten die Keimlinge grün-gelb, wie bei der Wildtypkontrolle Col-0. (Excitation: 395-440 nm, Emission: 470-750 nm).

4.9.4 Pigmentanalyse

Aufgrund des auffälligen Blattphänotyps und dessen Komplementation durch Dauerlicht, wurden die Chlorophyllgehalte und die Mengen mehrere Porphyrine unter Langtagbedingungen und unter Dauerlicht bestimmt. Alle Analysen wurden mit beiden *prat2*-Doppelmutanten und dem ausgekreuzten Wildtyp durchgeführt. Da sich sowohl beide *prat2*-Doppelmutanten untereinander gleich verhielten, als auch der Wildtyp Col-0 und der ausgekreuzte Wildtyp sich entsprachen, wurden jeweils nur Daten einer repräsentativen Linie dargestellt (Abbildung 25).

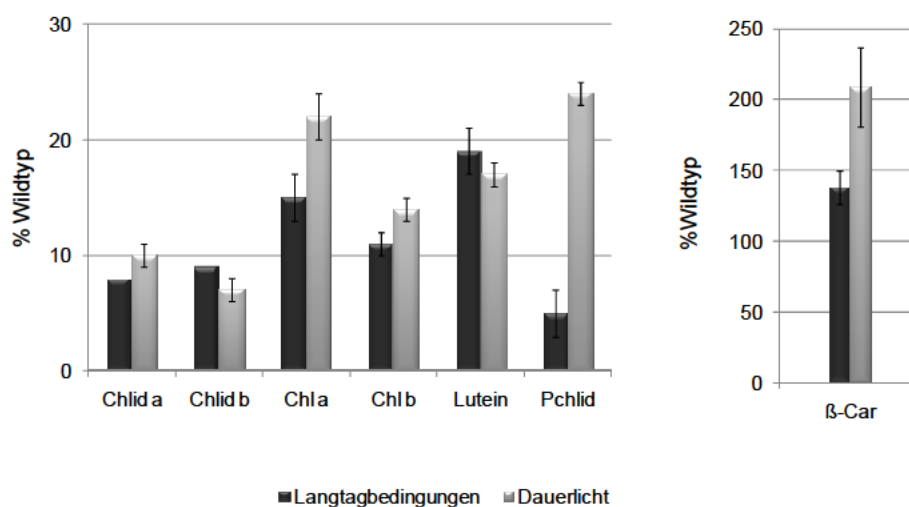


Abbildung 25: Pigmentgehalte der *prat2*-Doppelmutante *c2dm1*.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16h, schwarze Balken) bzw. unter kontinuierlichem Licht angezogen (24h, graue Balken). Für die Analyse des Protochlorophyllids wurden die Pflanzen 48h Stunden vor der Ernte im Dunkeln gehalten. Alle Gehalte wurden auf WT=100% normalisiert. Chl *a*: Chlorophyll *a*; Chl *b*: Chlorophyll *b*; Pchl *d*: Protochlorophyllid. Die Standardabweichung (n=3 biologische Replikate) ist eingezeichnet.

Wie der chlorotische Phänotyp der Mutanten schon andeutete, waren die Chlorophyll *a* und *b*-Gehalte reduziert. Allerdings reduzierte sich im Vergleich zum Wildtyp der Gehalt an Chlorophyll *a* stärker als Chlorophyll *b*, sodass es zu einer Verschiebung des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses kam. Während der Wildtyp Col-0 ein Chlorophyll *a/b*-Verhältnis von 2,5 im Langtag und 2,7 im Dauerlicht aufwies, war in der *prat2*-Doppelmutante das Verhältnis auf 1,2 im Langtag und 1,9 im Dauerlicht vermindert.

Die Chlorophyllidmengen betrugen maximal 10 % des Wildtyps. Die auffälligsten Veränderungen waren in den Gehalten des β -Carotins auszumachen. Die *prat2*-Doppelmutante akkumulierte unter Langtagbedingungen 138% im Vergleich zum Wildtyp und unter kontinuierlichem Licht 209%.

Tabelle 7: Chlorophyll *a* und *b* Gehalte unter Langtag- und Dauerlichtbedingungen

Die Chlorophyll *a* und *b* Gehalte wurden im Wildtyp und in der *prat2*-Doppelmutante *c2dm1* unter Langtag- und Dauerlichtbedingungen bestimmt und das Verhältnis gebildet.

		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a/b</i>
Langtag	Wildtyp Col-0	456 ± 39	181 ± 25	2,5
	<i>c2dm1</i>	26 ± 4	22 ± 1	1,2
Dauerlicht	Wildtyp Col-0	532 ± 71	199 ± 29	2,7
	<i>c2dm1</i>	63 ± 26	32 ± 8	1,9

Da eine Dunkelphase für die *prat2*-Doppelmutante eine Stresssituation darzustellen scheint, sollte untersucht werden, ob andere phytotoxische Intermediate der Chlorophyll Synthese während der Dunkelphase akkumulieren. Freie photoaktive Tetrapyrrole werden für die Assemblierung des Photosyntheseapparates mit pigmentbindenden Proteinen assoziiert. Da die gesamte Chlorophyllbiosynthese bis zum Protochlorophyllid im Dunkeln abläuft, wurden die Pflanzen 48h vor der Ernte im Dunkeln gehalten und mit der Chlorophyllvorstufe Aminolävulinsäure (10mM) besprüht, um den Aufbau der Porphyringerüste aus Aminolävulinsäure anzureichern. Die Gehalte an ProtoporphyrinIX (PPIX), Magnesium- PPIX (MgPPIX) und dem MgPPIX -Monomethylester (MgPPIXMoMe) wurden mittels HPLC Analyse bestimmt.

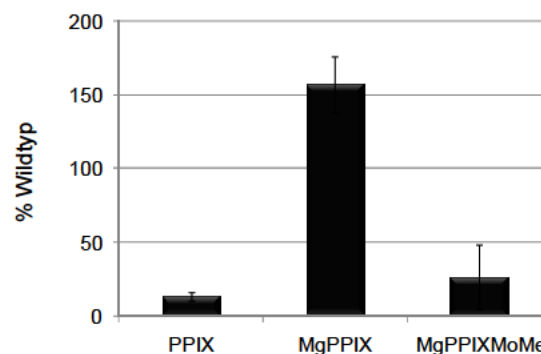


Abbildung 26: Porphyringehalte der *prat2*-Doppelmutante nach Behandlung mit Aminolävulinsäure.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen (30Tage) und mit Aminolävulinsäure (10mM) besprüht, um die Intermediate der Chlorophyllbiosynthese anzureichern. Mittels HPLC-Analyse wurden die Gehalte pro g Trockengewicht an PPIX: ProtoporphyrinIX, MgPPIX: MagnesiumProtoporphyrinIX und MgPPIXMoMe: Magnesium-ProtoporphyrinIXMonomethylester bestimmt. Die Werte wurden normalisiert auf Wildtyp=100%. Die Standardabweichung (n=3 biologische Replikate) ist eingezeichnet.

Unter diesen Versuchsbedingungen reicherte die *prat2*-Doppelmutanten nur etwa 10% der PPIX Menge des Wildtyps an (Abbildung 26). PPIX kommt eine zentrale Bedeutung während der Chlorophyllbiosynthese zu, da es das letzte gemeinsame Intermediat vor der Verzweigung der Pophyrinsynthese darstellt. In dieses Porphyringerüst wird in der

weiteren Synthesekette entweder Fe^{2+} eingeführt, wodurch Protohäm entsteht, oder es wird durch die Insertion von Mg^{2+} über weitere Zwischenstufen Chlorophyll synthetisiert. Auffallend in der Analyse war die Akkumulation von MgPPIX auf 129% des Wildtypniveaus. Interessanterweise waren aber die Gehalte an MgPPIXMoMe reduziert. MgPPIXMoMe entsteht aus MgPPIX und S-Adenosyl-L-Methionin durch MgPPIX Methyltransferase (vgl. Abbildung 43).

4.9.5 DNA-Microarray-Analyse

Der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten weist auf eine Vielzahl von regulierten Genen hin. Um Informationen zu erhalten, um welche Gene es sich dabei handelt, wurde eine DNA Microarray Analyse (Affymetrix ATH1 Gene Chip) beider *prat2*-Doppelmutanten unter Langtag- und Dauerlichtbedingungen durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass unter beiden Bedingungen eine ganze Reihe von Genen reguliert wurden. Unter Langtagbedingungen wurde die Expression von 1128 Genen hoch- und 942 Genen herabreguliert, während unter Dauerlichtbedingungen nur 253 Gene induziert und 218 Gene reprimiert wurden.

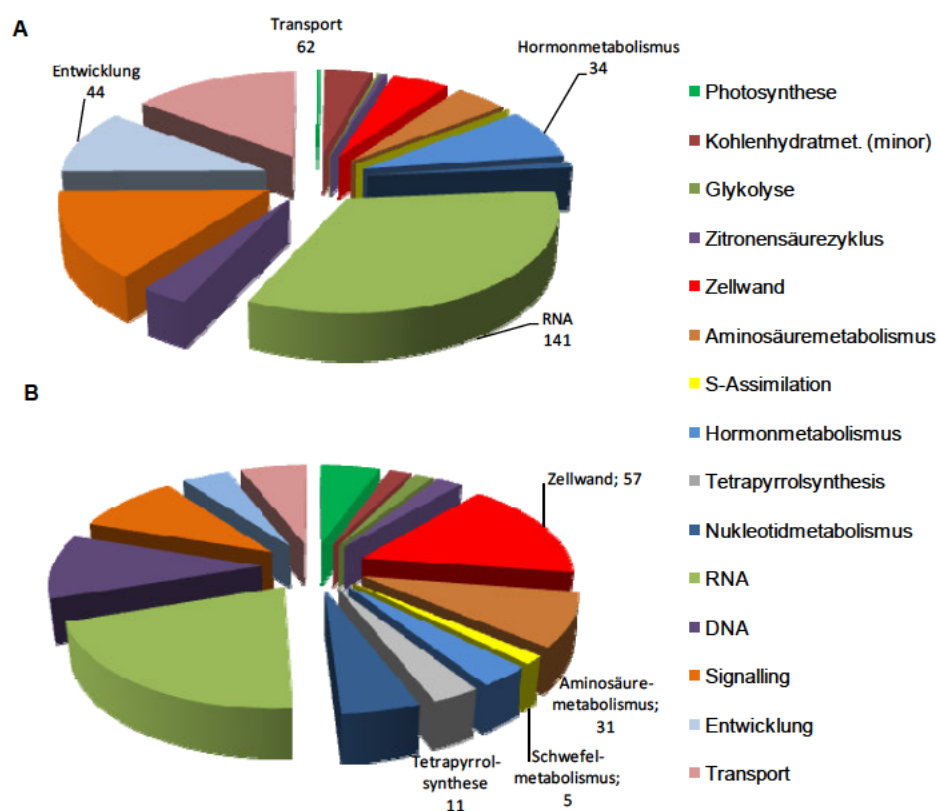


Abbildung 27: Regulierte Gene in der *prat2*-Doppelmutante unter Langtagbedingungen.
(A) Funktionelle Kategorien und die Anzahl der induzierten Gene und **(B)** der reprimierten Gene.

Für die Analyse dieser Gene wurden jeweils nur die Schnittmenge aus der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 und der *prat2*-Doppelmutante c2dm2 berücksichtigt. Grundsätzlich waren unter Langtagbedingungen die Transkripte von Genen des Hormonhaushalts (12 Auxin-regulierte Gene), der Entwicklung, des RNA-Metabolismus und des Transports erhöht und von der Tetrapyrrolsynthese, des Zellwand- und Aminosäuremetabolismus und der Schwefel-Assimilation erniedrigt (Abbildung 27). Es fielen unter den stark hochregulierten Genen solche des Auxin-Metabolismus auf. Unter den am stärksten herabregulierten Genen in der *prat2*-Doppelmutante waren sowohl *PRAT2.1* und *PRAT2.2*, als auch ein Gen der Tetrapyrrolsynthese (Protochlorophyllidoxoreduktase B, PORB; siehe Tabelle 9 im Anhang)

Unter Dauerlichtbedingungen wurden Transkripte von Genen des RNA-Metabolismus, der Entwicklung und des Redox-Stoffwechsels erhöht, während Transkripte von Genen des Zellwandstoffwechsels, der Schwefel-Assimilation, des Sekundärmetabolismus und des Hormonhaushalts erniedrigt wurden (Abbildung 28). Insgesamt wurden sehr viele Gene aus unterschiedlichsten Biosynthesewegen reguliert, so dass man keinen direkten Rückschluß auf die Funktion der PRAT2-Proteine hätte schließen können.

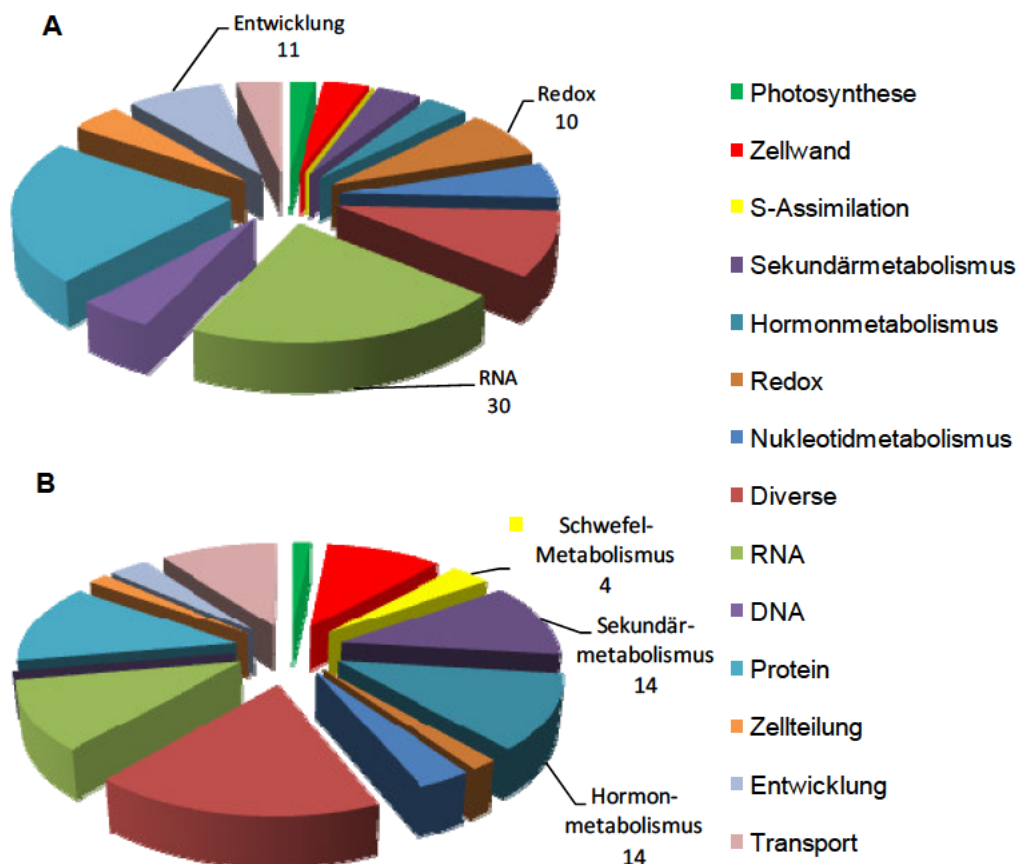


Abbildung 28: Regulierte Gene in der *prat2*-Doppelmutante unter Dauerlichtbedingungen. (A) Funktionelle Kategorien und die Anzahl der induzierten Gene und (B) der reprimierten Gene.

Da die Expression einer Vielzahl von Genen in der *prat2*-Doppelmutante wahrscheinlich stark durch Sekundäreffekte reguliert wurde, sollte ein Schnittmengenvergleich die Gene identifizieren, die unabhängig von den Wachstumsbedingungen reguliert wurden. Die Schnittmenge umfasste 75 induzierte und 90 reprimierte Gene, die jeweils unter beiden Bedingungen (Langtag und Dauerlicht) verändert waren. Dabei waren wiederum zahlreiche Stoffwechselwege betroffen. Auffällig unterschiedlich reguliert erschienen Gene der Photosynthese (0 induziert/2 reprimiert), der Zellwand-Biosynthese (3 induziert/8 reprimiert), der Tetrapyrrolsynthese (0 induziert/3 reprimiert; PORA, B, C), Stress assoziierten Gene (1 induziert/4 reprimiert), Gene der Redox-Homeöostase (7 induziert/1 reprimiert), des Protein-Stoffwechsel (13 induziert/4 reprimiert), und besonders Gene, die im Transport (4 induziert/0 reprimiert), und in der Schwefel-Assimilation (0 induziert/4 reprimiert), eine Rolle spielen (Abbildung 28).

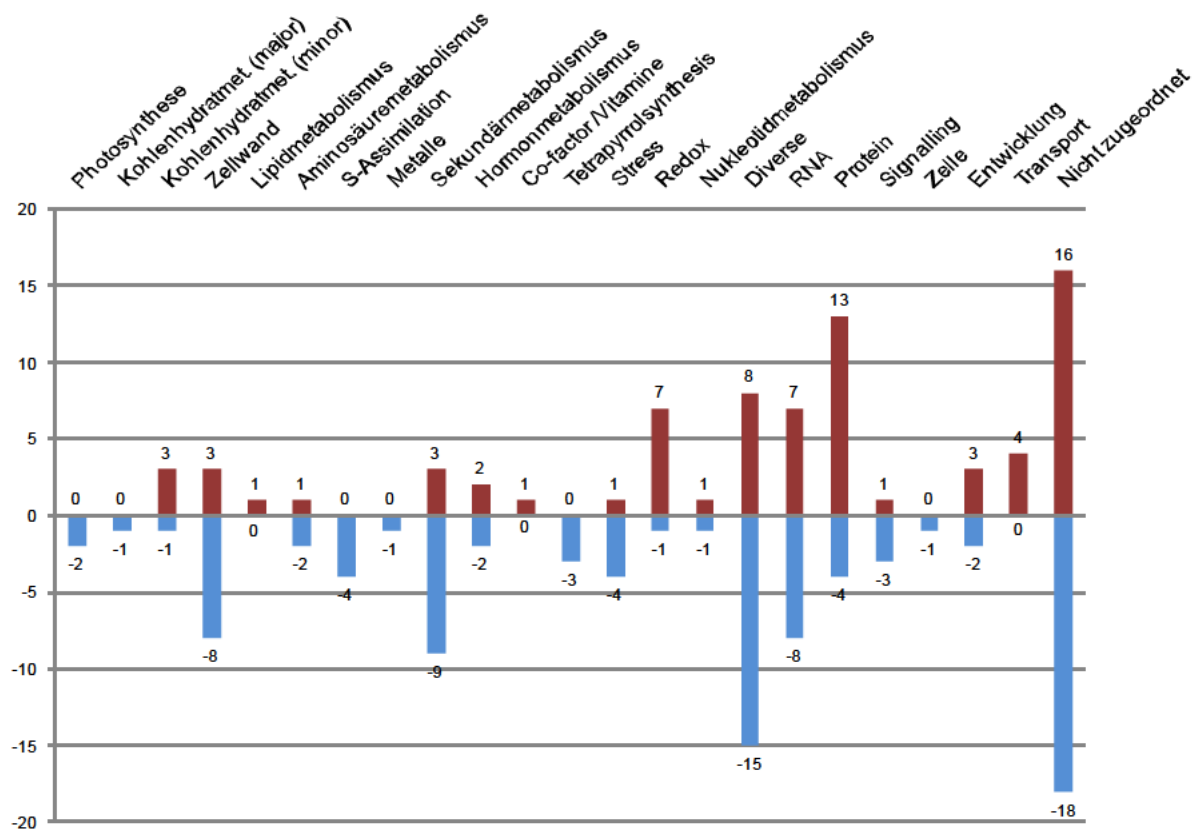


Abbildung 29: Schnittmengen der regulierten Gene aus Dauerlicht- und Langtagbedingungen.

Anzahl der hochregulierten Gene sowohl unter Dauerlichtbedingungen, als auch unter Langtagbedingungen (rote Balken) und Anzahl der herabregulierten Gene (blaue Balken). Die Schnittmengen wurden mit dem Venn Selector erstellt.

4.9.6 2D-BN/SDS-PAGE der Chloroplastenproteine

Aufgrund des chlorotischen Phänotyps der *prat2*-Doppelmutante und des Verlusts von ordentlichen Thylakoidstrukturen sollten Unterschiede in den Photosynthesekomplexen und in der Proteinzusammensetzung der Chloroplasten analysiert werden. Dazu wurden Chloroplasten isoliert, in 1% Dodecylmaltosid solubilisiert und via 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt. Die erste Dimension nach BN-PAGE zeigte in der Migration der makromolekularen Photosynthesekomplexe keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *prat2*-Doppelmutante (Abbildung 30A). Allerdings waren Unterschiede in der zweiten Dimension zu beobachten (Abbildung 30B). Im Wildtyp waren Proteinbanden zu erkennen, die in der *prat2*-Doppelmutante fehlten. Des Weiteren wurde in der *prat2*-Doppelmutante ein Protein sichtbar, das im Wildtyp nicht erkennbar war. Die Proteinbanden, die sich sichtlich unterschieden, wurden durch Massenspektrometrie im „Zentrallabor für Proteinanalytik“ (ZfP, Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) von Dr. Lars Israel identifiziert.

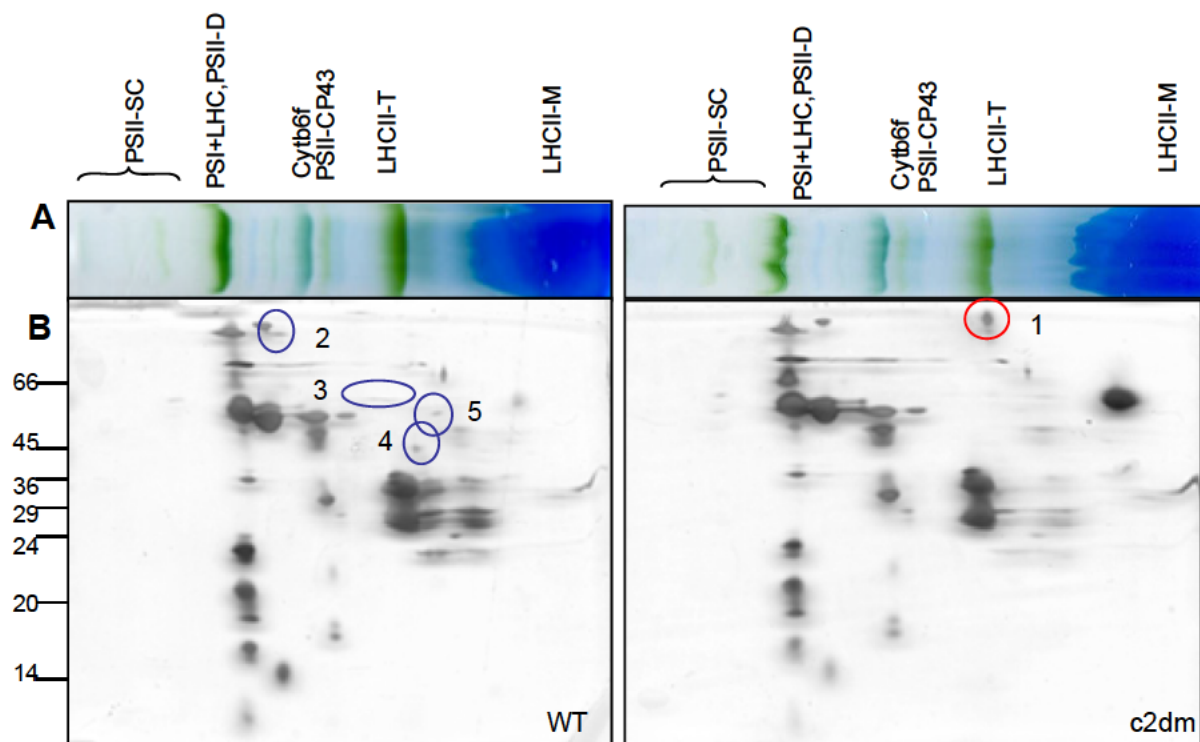


Abbildung 30: 2D-BN-PAGE Analyse von Chloroplasten der *prat2*-Doppelmutante.

(A) Erste Dimension der 2D BN/SDS-PAGE der Chloroplasten (10ug Chlorophyll) von 3 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen und *prat2*-Doppelmutanten c2dm1. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen. (B) Die zweite Dimension (SDS-PAGE) zeigt die Proteinkomplexe nach der Silberfärbung. Die Unterschiede sind gekennzeichnet und die markierten Proteine wurden per Massenspektroskopie identifiziert. Die blauen Kreise kennzeichnen Proteine, die nur im Wildtyp auftauchten, während der rote Kreis das Protein kennzeichnet, das in der Mutante erhöht war. Die molekulare Masse von Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben. M, Monomere; SC, Super-komplexe; D, Dimere; T, Trimere.

Das in der *prat2*-Doppelmutante induzierte Protein (Protein1 in Abbildung 30) wurde als Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase (Fd-GOGAT) identifiziert. Die Proteine, die nur im Wildtyp zu sehen waren, wurden als Photosystem I P700 Chlorophyll a Apoprotein A2 (Protein 2), als Hydroxyprolin-reiches Glycoprotein (Protein 3), als Glycerinaldehyd 3-Phosphatdehydrogenase B Untereinheit (Protein 4) und als Photosystem II, 47 kDa Protein (Protein 5) identifiziert (siehe Tabelle im Anhang).

GOGAT stellt zusammen mit der Glutamin-Synthetase (GS) ein Schlüsselenzym bei der Assimilation von Ammonium dar. Von der GOGAT sind in höheren Pflanzen zwei Isoformen bekannt. Zum ersten die Ferredoxin-abhängige Fd-GOGAT im Chloroplasten und zweitens eine NADH-abhängige GOGAT, die im Cytoplasma lokalisiert ist. Um die Erhöhung von Fd-GOGAT in der *prat2*-Doppelmutante abzusichern, wurden die Proteinmengen der Fd-GOGAT und der GS mit einer Immunodekoration bestimmt. Dafür wurden Chloroplastenproteine von 3 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen und *prat2*-Doppelmutanten isoliert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion bestätigte die erhöhte Proteinmenge an GOGAT in den Chloroplasten der *prat2*-Doppelmutante (Abbildung 31).

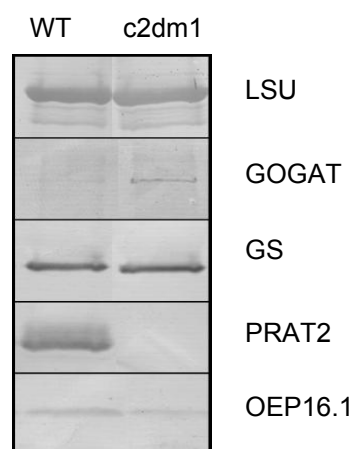


Abbildung 31: Immunoblot von Chloroplastenproteinen der *prat2*-Doppelmutante.

Chloroplasten von 3 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen (WT) und *prat2*-Doppelmutanten (c2dm1) wurden isoliert. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen. Die Proteine (je 38 µg) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und über Immunodetektion kontrolliert. Antikörper gegen die Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase (GOGAT), die Glutamin-Synthetase (GS), die PRAT2-Proteine und OEP16.1 wurden genutzt. Als Ladekontrolle diente das Amido-Schwarz (AS) gefärbte SDS Gel in der Größe der großen Untereinheit der Rubisco (obere Reihe LSU).

Während im Wildtyp nur ein sehr schwaches Signal für die Fd-GOGAT zu detektieren war, war das Signal in der *prat2*-Doppelmutante deutlich sichtbar. Die Proteinmengen der GS waren nicht verändert. Die Ladekontrolle des Amido-Schwarz gefärbten SDS-Gels zeigte gleiche Mengen der großen Untereinheit der Rubisco. Als weitere Kontrolle sollte auch

OEP16.1 dienen, ein Aminosäuretransportprotein in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten. Doch interessanterweise erschien in der *prat2*-Doppelmutante die Proteinmenge an OEP16.1 reduziert. Die Immunodetektion gegen PRAT2-Proteine zeigte deutlich, dass in der Doppelmutante kein PRAT2-Protein mehr nachgewiesen werden konnte.

4.9.7 Metaboliten-Analyse

Aufgrund des dramatischen Phänotyps der *prat2*-Doppelmutante im Langtag wurden die Pflanzen einer umfassenden Metabolit-Bestimmung unterzogen. Da der Phänotyp durch die Anzucht im Dauerlicht komplementiert werden konnte, sollte ein Vergleich der Metabolitgehalte unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen Hinweise auf die Ursachen des Phänotyps bzw. die Funktion der PRAT2-Proteine liefern. Dazu wurden Aminosäuren, Kohlenhydrate und die organischen Säuren des primären Stoffwechsels bestimmt. Die Analysen wurden mittels GC/MS-TOF von Katrin Weber, am Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die Bestimmung der Metabolite wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16h Licht/8h Dunkelheit) und unter Dauerlicht angezogen. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte 1h nach Einsetzen der Belichtung im späten Rosettenstadium, bevor die Pflanzen Triebe ausbildeten. Dies entsprach unter Langtagbedingungen einem Alter von 30 Tagen und unter Dauerlichtbedingungen einem Alter von 23 Tagen. Da die beiden *prat2*-Doppelmutanten ähnliche Ergebnisse lieferten, wurde im Folgenden nur jeweils die *prat2*-Doppelmutante *c2dm1* dargestellt. Die Analyse zeigte im Vergleich zum Wildtyp Änderungen in den Aminosäuren Glycin, Serin, Cystein, Leucin, Methionin, Asparagin, Lysin und Prolin, während die anderen gemessenen Aminosäuren nicht signifikant verändert waren. Unter Langtagbedingungen (16h/8h) stiegen die Gehalte an Aminosäuren bis auf Glycin (auf 25% erniedrigt) an, während sich die Mutante unter Dauerlichtbedingungen in ihrem Stoffwechsel dem Wildtyp anglich. Besonders deutliche Unterschiede zwischen Langtagbedingungen und Dauerlichtbedingungen wurden für Cystein gemessen. Die Cysteingehalte stiegen unter Langtagbedingungen der *prat2*-Doppelmutante um das 15fache an (Abbildung 32).

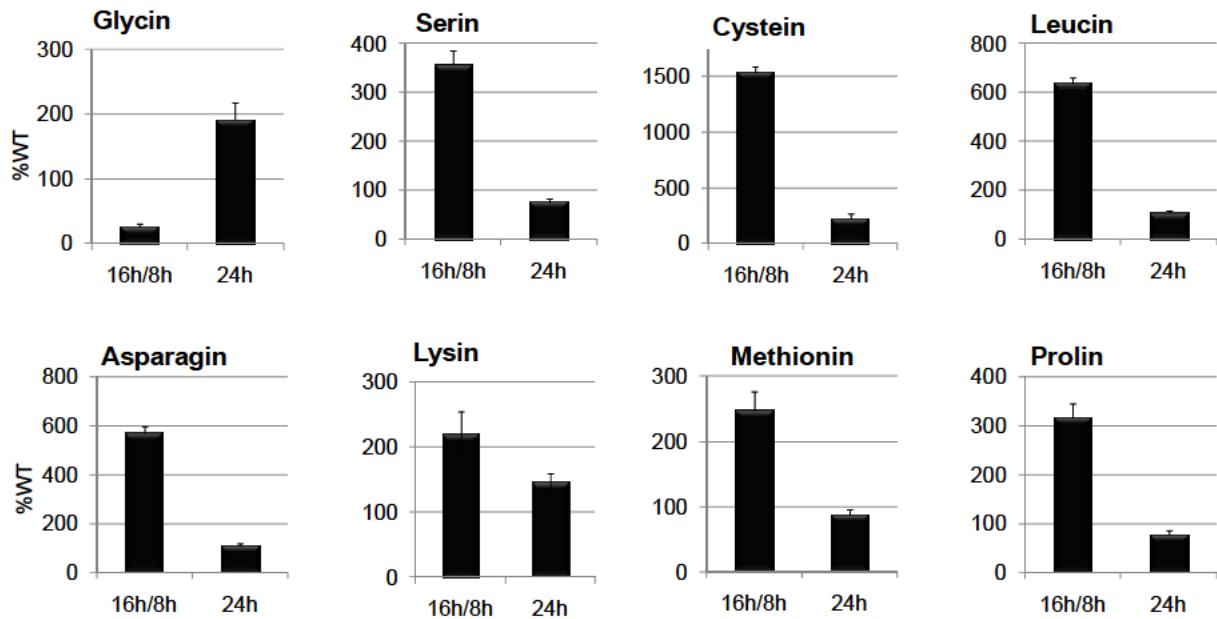


Abbildung 32: Veränderte Gehalte an Aminosäuren in der *prat2*-Doppelmutante.

Die *prat2*-Doppelmutanten und der Wildtyp wurden im Langtag (16h/8h) und im Dauerlicht (24h) angezogen. Die Gehalte sind relativ zu den Werten des Wildtyps=100% dargestellt. Der Standardfehler (n=3, biologische Replikate) ist eingezeichnet.

Die Bestimmung der verschiedenen Zucker unter Langtagbedingungen zeigte um das 8-fache reduzierte Gehalte an Glucose, Fruktose und dem Zuckeralkohol Myoinositol und um die Hälfte reduzierte Gehalte an Xylose (Abbildung 33). Durch Dauerlicht konnten die Gehalte an Myoinositol auf Wildtypniveau, während die Gehalte an Glucose, Fruktose und Xylose nur auf maximal 50% bzw. 75% des Wildtypniveaus angehoben wurden.

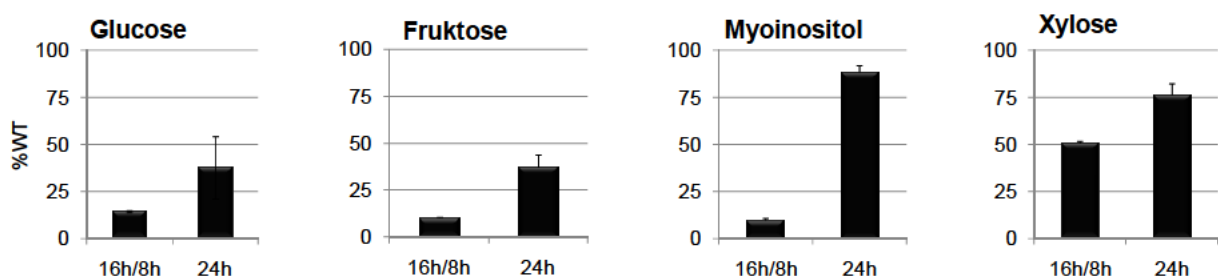


Abbildung 33: Veränderte Gehalte an Kohlenhydraten in der *prat2*-Doppelmutante.

Die *prat2*-Doppelmutanten und der Wildtyp wurden im Langtag (16h/8h) und im Dauerlicht (24h) angezogen. Die Gehalte sind relativ zu den Werten des Wildtyps=100% dargestellt. Der Standardfehler (n=3, biologische Replikate) ist eingezeichnet.

Die Analyse der organischen Säuren Zitronensäure/Isozitronensäure, Fumarsäure und Apfelsäure zeigte, dass diese in der *prat2*-Doppelmutante unter Langtagbedingungen sehr niedrig sind. Jedoch konnten sie durch das Dauerlicht annähernd auf Wildtypniveau angehoben werden (Abbildung 34). Die Gehalte der Fumarsäure waren dramatisch

reduziert (2%) und konnten durch Dauerlicht nur auf 50% des Wildtypniveaus angehoben werden. Bersteinsäure, Shikimat und Glycerinsäure waren unter Langtagbedingungen ebenfalls reduziert. Während das Dauerlicht die Glycerinsäuregehalte wieder auf Wildtypniveau anheben konnte, blieben Shikimat und Bersteinsäure unter beiden Wachstumsbedingungen um 50% reduziert. Auffallend hoch waren dagegen die Gehalte an α -Ketoglutarat und γ -Aminobuttersäure (GABA) unter Langtagbedingungen. Beide konnten durch das Dauerlicht wieder auf Wildtypniveau herabreguliert werden.

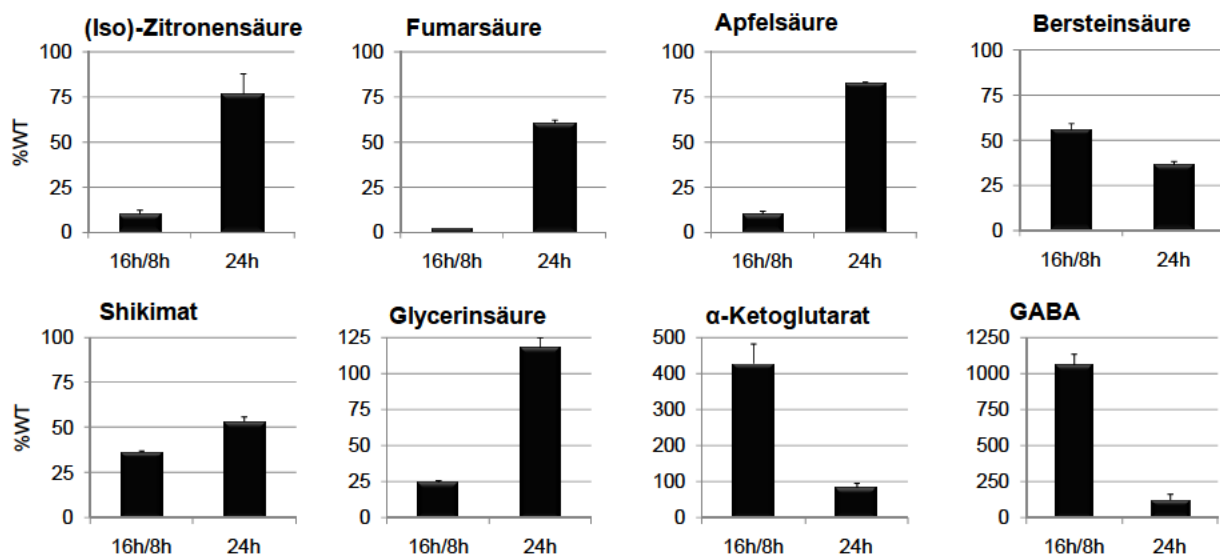


Abbildung 34: Gehalte an organischen Säuren in der *prat2*-Doppelmutante.

Die *prat2*-Doppelmutanten und der Wildtyp wurden im Langtag (16h/8h) und im Dauerlicht (24h) angezogen. Die Gehalte sind relativ zu den Werten des Wildtyps=100% dargestellt. Der Standardfehler (n=3, biologische Replikate) ist eingezeichnet.

Da die *prat2*-Doppelmutante erhöhte Proteingehalte an GOGAT aufwies, sollte überprüft werden, ob diese mit einer erhöhten Konzentration von Ammonium einhergehen. Ammonium entsteht in der Pflanze während der Stickstoffassimilation, während des Proteinabbaus oder der Photorespiration und ist für diese Stoffwechselwege ein charakteristischer Metabolit. Ammonium selbst wirkt in höheren Konzentrationen zytotoxisch. Die Refixierung von Ammonium findet über das GS/GOGAT-System im Chloroplasten statt (Stitt, 1999). Durch einen kolorimetrischen Test wurde untersucht, ob sich in den *prat2*-Doppelmutanten Ammonium anhäufte und ob sich die Gehalte unter Langtagbedingungen und Dauerlichtbedingungen unterschieden. Die Ammoniumgehalte wurden von den jüngsten, vollentwickelten Blätter nach der Methode von Bräutigam et al., 2007 bestimmt (Langtag 23 Tage alt, Dauerlicht 30 Tage alt). Beide *prat2*-Doppelmutanten produzierten jedoch unter Langtagbedingungen nur etwas mehr Ammonium als der

Wildtyp und die Reduktion war nur für die Doppelmutante c2dm1 signifikant. Unter Dauerlichtbedingungen blieben die Konzentrationen bei beiden *prat2*-Doppelmutanten bei 75% für c2m1 und 25% für c2dm2.

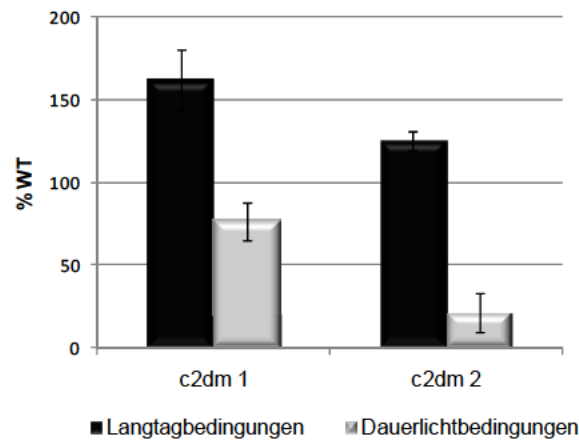


Abbildung 35: Ammoniumgehalte in den *prat2*-Doppelmutanten.

Die Ammoniumgehalte wurden von den jüngsten, vollentwickelten Blätter (Langtag 23 Tage alt, Dauerlicht 30 Tage alt) nach der Methode von Bräutigam et al., 2007 unter Langtagbedingungen (schwarze Balken) und unter Dauerlichtbedingungen (graue Balken) bestimmt. Der Standardfehler (n=3, biologische Replikate) ist eingezeichnet.

4.9.8 Auxin-Analyse

Das Phytohormon Auxin (IES) und seine Konjugate wurden via HPLC ESI-MS/MS im Pflanzenmaterial des Wildtyps, des ausgekreuzten Wildtyps und der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 unter Langtagbedingungen bestimmt. Die Analysen wurden vom National Research Council Canada, Institute of Plant Biotechnology in Montreal, Canada durchgeführt.

Freies IES wurde in allen Pflanzenproben detektiert, wobei die Gehalte des Wildtyps und des ausgekreuzten Wildtyps bei 80 bzw. 74ng/g Trockengewicht lagen, während in der *prat2*-Doppelmutante etwas höhere Mengen (124ng/gTG) festgestellt wurden (Abbildung 36). Das Amid-konjugierte IES-Glutamat (IES-Glu) wies in den Wildtypen etwa 9ng/gTG auf, während die Gehalte in der *prat2*-Doppelmutante 77ng/gTG betrugen und damit stark erhöht waren. Diesen Ergebnissen entsprechend war die Expression des Gens für GH3.14 in der *prat2*-Doppelmutante induziert. Es wird davon ausgegangen, dass GH3-Proteine die Konjugation von Aminosäuren mit Auxin katalysieren (Staswick et al., 2005).

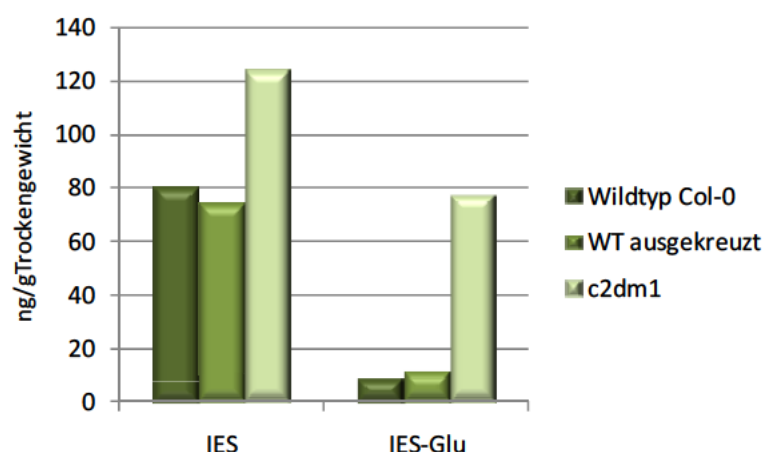


Abbildung 36: Konzentrationen an freiem Auxin und konjugiertem Auxin.

Die Konzentrationen an freiem Auxin (IES) und Glutamat-konjugiertem Auxin (IES-Glu) sind in ng/g Trockengewicht angegeben. Es wurden die Konzentrationen in Rosettenblätter des Wildtyps Col-0, des ausgekreuzten Wildtyps und der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 unter Langtagbedingungen (n=1) untersucht.

Für die Tryptophan-abhängige IES Biosynthese wird in Brassicaceen ein IES-Biosyntheseweg über Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) postuliert (Woodward und Bartel, 2005). Der Umsatz von Tryptophan zu IAOx wird dabei von Cytochrom P450-Enzymen der Unterfamilie 79B katalysiert. In *Arabidopsis* sind die chloroplastidären P450 Monooxygenasen, CYP79B2 und CYP79B3 beschrieben, die *in vitro* Tryptophan zu IAOx oxidieren können (Hull et al., 2000). Von IAOx zweigt außerdem die Glucosinolat-Biosynthese von der IES-Synthese ab. Interessanterweise war die Expression von CYP79B2 in der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 reduziert und darüber hinaus einige Gene der Glucosinolatbiosynthese reguliert (siehe Tabelle im Anhang).

Tabelle 8: DNA Microarray Parameter Auxin-regulierter Gene in der *prat2*-Doppelmutante.

Die gemittelten Signal-Werte (n=3), die Signalunterschiede sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) sind angegeben. Der AGI-Code (Arabidopsis Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet.

ATG	NAME	Signaldifferenz	FCH	P-Wert
At4g39950	Cyp79B2	425,6	0,27	3,2E-05
At1g16410	Cyp79F1	86	0,42	9,6E-03
At2g47750	GH3.9	18,1	0,43	2,8E-06
At5g13360	GH3.14	291,7	2,59	1,7E-06

4.10 Untersuchungen zur Funktion der PRAT2-Proteine

4.10.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

Um die Fähigkeit einer Kanalaktivität der PRAT2-Proteine zu prüfen, wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Dafür wurden beide PRAT2-Isoformen aus *Arabidopsis* in *E.coli* Zellen überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die aufgereinigten, rekombinanten Proteine wurden anschließend von Dr. Alexander Götze in der AG Prof. Wagner am Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück elektrophysiologisch im „Black Lipid Bilayer“-System untersucht.

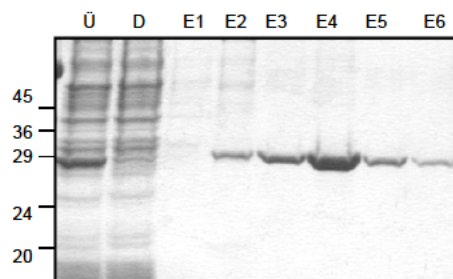


Abbildung 37: Überexpression und Aufreinigung von rekombinatem At-PRAT2.1.

At-PRAT2 wurde in *E.coli* Zellen überexprimiert und mit einer Nickel-NTA Säule aufgereinigt. Ü: Überstand nach Zellaufschluss; D: Durchlauf der Ni-NTA Säule. E1-E6: Eluate mit steigender Imidazol-Konzentration (E1: 10mM; E2: 20mM; E3: 40mM; E4: 60mM-1; E5: 60mM-2; E6: 100mM). Die Fraktion E4 (Proteinkonzentration: 0.5 mg/ml, aufgetragen: 10µg) wurde für die elektrophysiologischen Messungen verwendet. Für At-PRAT2.2 wurde gleich verfahren. Das Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben.

Die Proteine wurden dazu in Liposomen rekonstituiert, das heißt die rekombinant exprimierten Membranproteine wurden funktionell in die Membran von Lipidvesikeln zurückgefaltet. Bringt man daraufhin in einen sogenannten „Black Lipid Bilayer“ ein membranständiges Kanalprotein ein, so kann die Kanalpore eine elektrische Verbindung zwischen zwei elektrolytgefüllten Halbkammern herstellen. Nach der Fusion von At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2 Proteoliposomen mit dem planaren Bilayer wurde eine Kanalaktivität beobachtet. Da die beiden Proteine identisch auf die untersuchten Parameter reagierten, werden sie nicht getrennt aufgeführt.

Durch das Anlegen einer Spannung von $\pm 160\text{mV}$ bildete sich eine Stromspur, die auf eine trimere Porenorganisation schließen lässt (Abbildung 38). Wenn die Spannung über einen längeren Zeitraum angelegt wurde, fand in einigen Fällen ein komplettes Schließen der Kanäle statt, wobei in drei gleichgroßen Stufen geschaltet wurde. Von jedem dieser Offenzustände sind Schaltereignisse aller drei Leitwertklassen möglich. Der Leitwert, ermittelt aus einzelnen Schaltereignissen des Kanals, beschreibt die Differenz zwischen

zwei Stromniveaus vor und nach einem Schaltereignis für die PRAT2-Proteine. Es treten häufig unterschiedliche Leitwertklassen auf, die durch partielles oder komplettes Schließen der Pore zu erklären sind. Die Selektivitätsbestimmungen zeigten, dass die PRAT2-Proteine kationenselektive Kanäle bilden (Dissertation T. Götze, 2009).

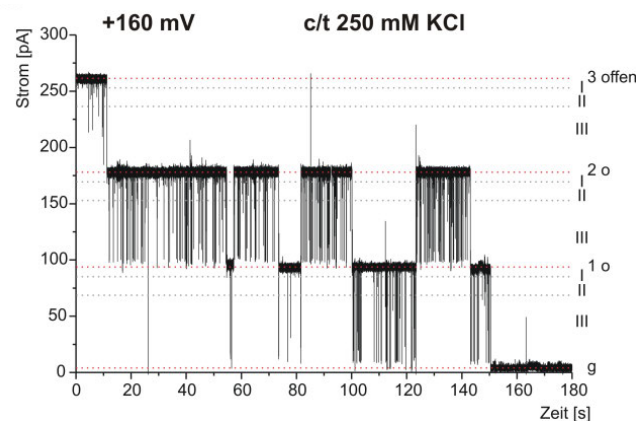


Abbildung 38: Leitwert und Schaltverhalten von PRAT2 im Lipid Bilayer.

Stromspur des Bilayers nach einem Fusionsereignis der Probe PRAT2.2 bei +160 mV in 250 mM KCl in beiden cis/trans Halbkammern. Über einen längeren Zeitraum (180sec) nimmt die Offenwahrscheinlichkeit ab. Eine trimere Organisation der Poren ist zu erkennen. Für jede Pore sind Schaltereignisse der drei Leitwertklassen möglich; o: Kanäle offen; g: geschlossen (aus Dissertation Dr.Götze, 2009).

4.10.2 Komplementation von Hefemutanten mit deletierten Aminosäurepermeasen

Der Hefestamm JT16 ist im Histintransport beeinträchtigt, da er eine Deletion im Histidinpermeasegen *hip1* trägt, und zusätzlich eine Deletion im Gen für die Argininpermease *can1* (Tanaka und Fink, 1985). Dieser Hefestamm zeigt somit nur ein Wachstum, wenn das Medium mit ausreichend Histidin supplementiert ist. Es wurde untersucht, ob die Proteine At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2 die Unfähigkeit dieses Hefestammes auf Medium mit limitierten Histidinkonzentrationen zu wachsen, komplementieren können. Für die Untersuchungen wurde zusätzlich auch das Signalpeptid SUC2 vor die At-PRAT2-Proteine fusioniert. SUC2 beinhaltet die Signalsequenz der extrazellulären Invertase aus Hefe und kann ein Plasmamembran-Targeting chloroplastidärer Proteine in Hefe erleichtern. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte jedoch keines der Konstrukte die Histidintransportunfähigkeit in JT16 komplementieren. Desweiteren wurde der Hefestamm 22Δ8AA genutzt, der in den Aminosäurepermeasen für Arginin, Aspartat, Citrullin, GABA, Glutamate und Proline (Fischer et al., 2002) mutiert ist. Unter nicht-selektiven Bedingungen wird das Medium mit einer Stickstoffquelle angereichert, während für den Komplementationsversuch jeweils die Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Citrullin, Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Arginin

als einzige Stickstoffquelle zur Verfügung stand. Auch hier konnte keines der Kontrukte im Vergleich zum Leervektor ein schnelleres Wachstum verursachen.

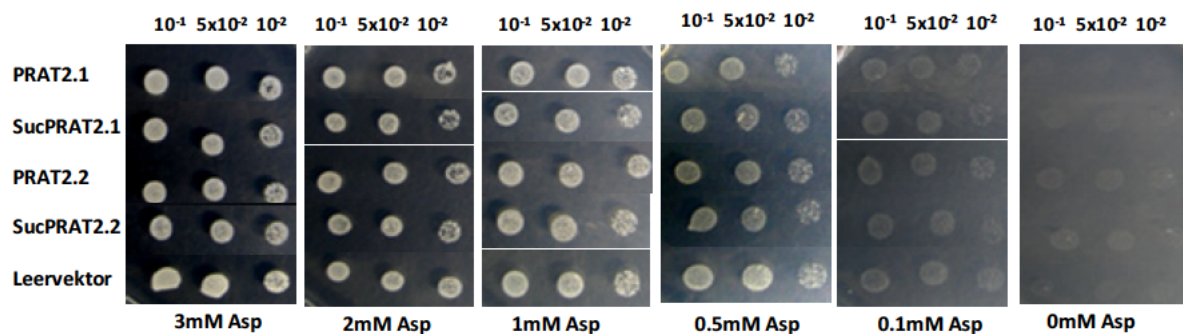


Abbildung 39: Wachstum des Hefestamms 22Δ8AA auf Medium mit Aspartat.

Es wurden sowohl der Leervektor (Kontrolle) als auch die cDNA von *At-PRAT2.1* und *At-PRAT2.2* mit und ohne SUC-Signal in die Hefe-Mutante 22Δ8AA transformiert. Verdünnungen der exponentiell wachsenden Hefezellen auf eine OD₆₀₀ von 1, 0,5 und 0,1 wurden auf Medium mit Aspartat als einzige Stickstoffquelle ausgebracht. Das Wachstum der Hefezellen wurde nach zwei Tagen fotografisch dokumentiert.

4.10.3 Komplementation von TIM Hefemutanten mit PRAT2-Proteinen

Die endosymbiotischen Organellen Mitochondrien und Chloroplasten haben den Großteil ihrer Gene auf den Zellkern übertragen und müssen deshalb Proteine aus dem Zytol importieren. Beide Organellen besitzen dafür verschiedene Proteintranslokasen. Da die PRAT2-Proteine Sequenzhomologien zu den Translokasen TIM22/TIM17/TIM23 der Mitochondrien aufweisen, sollte durch eine Komplementation von diversen TIM Hefemutanten untersucht werden, ob PRAT2-Proteine des Chloroplasten eine mögliche Aufgabe als Proteintranslokase erfüllen. Hierfür wurden Hefestämme benutzt, die die TIM-Proteine nur unter Galaktoseinduktion exprimierten; das heißt unter Galaktoseentzug wuchsen nur erfolgreich komplementierte Zellen. Als Positivekontrolle diente ein Plasmid mit dem jeweiligen endogenen TIM-Gen unter Kontrolle des konstitutiven ADH-Promotors. Die PRAT2-Proteine wurden jeweils in voller Länge und als deletierte Form ohne die SAM-Domäne überprüft. Die Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Dejana Mokranjac in der AG Prof. Neupert, Institut für Physiologische Chemie, LMU München. Unter Galactosentzug war jedoch, außer für das jeweilige Kontrollplasmid, für keines der PRAT2-Konstrukte ein Wachstum der Hefezellen zu beobachten (Abbildung 40). Es gab daher unter diesen experimentellen Voraussetzungen keinen Hinweis darauf, dass die PRAT2-Proteine eine Rolle im Proteintransport spielen.

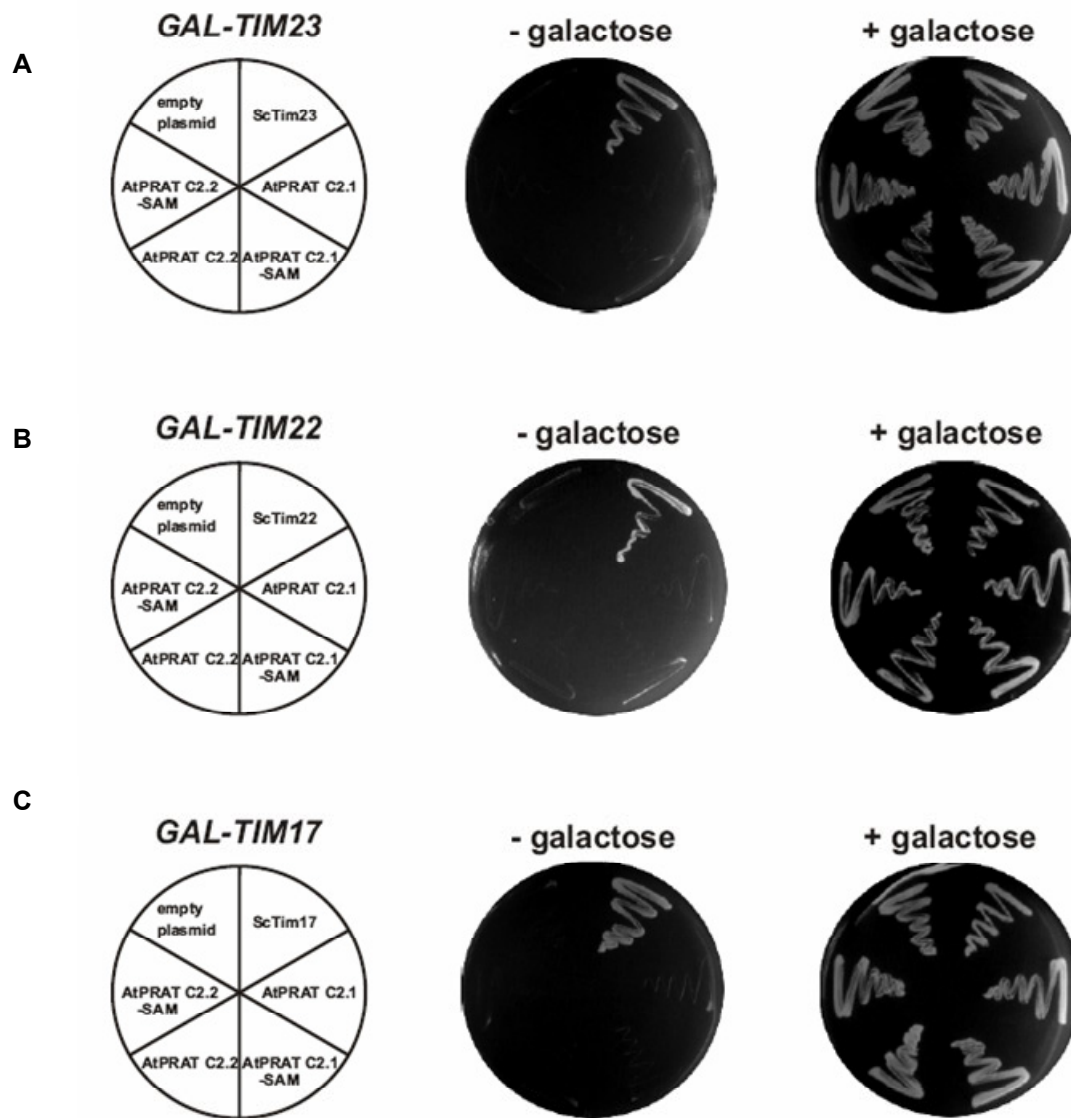


Abbildung 40: Komplementation von TIM Hefemutanten mit PRAT2-Proteinen.

Es wurden die drei Hefemutanten (A) GAL-TIM23, (B) GAL-TIM22 und (C) GAL-TIM17 mit folgenden Konstrukten komplementiert: Die endogenen Hefegene (ScTIM23; ScTIM22; ScTIM17) fungierten jeweils als Positivkontrolle, der Leervektor (empty plasmid) als Negativkontrolle. Die Proteine At-PRAT2.1, At-PRAT2.1-SAM, At-PRAT2.2 und At-PRAT2.2-SAM wurden auf ihre Fähigkeit, die Hefemutanten zu komplementieren getestet. Ein Hefewachstum war nur möglich, wenn Galactose im Medium vorhanden war. Die Hefekultur auf Galactose-freiem Medium zeigte, dass keines der Konstrukte in der Lage war, die Hefetranslokasen zu ersetzen.

4.10.4 Transportfunktion von PRAT2-Proteinen in Hefe

Da der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante durch Auxingabe vermindert werden konnte, sollte eine mögliche Funktion der PRAT2-Proteine im Auxintransport im heterologen Hefessystem getestet werden. Für die Untersuchungen wurde jeweils das Signalpeptid SUC2 vor die At-PRAT2-Proteine fusioniert. SUC2 beinhaltet die Signalsequenz der extrazellulären Invertase aus Hefe und kann ein Plasmamembran-Targeting chloroplastidärer Proteine in Hefe erleichtern. Die Konstrukte wurden in Hefezellen transformiert und auf ihre Lokalisation in der Plasmamembran mit Antikörpern gegen die PRAT2-Proteine untersucht (nicht gezeigt). Die Hefestudien wurden in der Gruppe von Dr. Markus Geisler, Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich durchgeführt. Die Hefezellen wurden mit radioaktivem [3 H]IES inkubiert und behandelt wie unter Geisler et al. (2005) beschrieben.

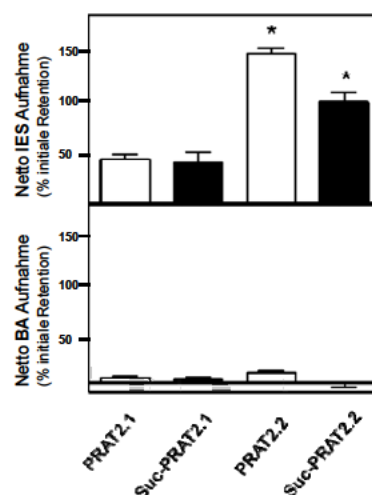


Abbildung 41: PRAT2-Proteine transportieren Auxin im heterologen Hefesystem.

Transportaktivität für radioaktiv markiertes Auxin (IES) in mit At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2 transformierten Hefezellen. Die Messung erfolgte nach 10min. SUC: Signalsequenz der extrazellulären Invertase aus Hefe. Radioaktiv markierte Benzoessäure (BA) diente als Negativkontrolle. Die leere Vektorkontrolle wurde auf 0% festgesetzt. Die Standardabweichung (n=3) ist eingezeichnet.

Beide Proteine PRAT2.1 und PRAT2.2 zeigten Transportaktivität für IES. Es konnte ein Netto-Import von IES, jedoch nicht für Benzoessäure (BA) gemessen werden. Die Transportaktivität für die beiden Varianten der PRAT2.2 Konstrukte war um 150% (PRAT2.2) bzw. 100% (Suc-PRAT2.2) gegenüber dem leeren Vektor erhöht. Die Unterschiede für die beiden PRAT2.1 Varianten in Bezug auf die Kontrolle lagen bei etwa 50% (Abbildung 41).

5 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung der PRAT2-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Durch biochemische und zellbiologische Studien konnte ein Strukturmodell von PRAT2-Proteinen in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten erarbeitet werden. Des Weiteren konnte eine Protein-Interaktions-Domäne identifiziert und die Orientierung dieser Domäne in den Intermembranraum nachgewiesen werden. Die Herstellung und Isolierung von rekombinantem PRAT2-Protein ermöglichte eine erste funktionelle elektrophysiologische Charakterisierung. Ein weiterer Fokus der Arbeit lag in der Einbindung der PRAT2-Proteine in den Stoffwechsel der Pflanze und ihrer Funktion in der Pflanze. Dazu wurden zwei *Arabidopsis prat2*-Doppelmutanten bezüglich beider PRAT2-Proteine hergestellt. Zur Untersuchung der Rolle der At-PRAT2-Proteine wurden das Wachstum und die Entwicklung von Funktionsverlustmutanten unter verschiedenen biotischen Einflüssen analysiert.

5.1 Die PRAT2-Proteine bilden eine Pore in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten

Der Stammbaum der PRAT2-Familie zeigt, dass sich die Orthologe der PRAT2-Proteine sowohl in Monokotyledonen, als auch in Dikotyledonen, ebenso im Moos *Physcomitrella patens*, in Farnen und in Grünalgen finden. Da die Proteine jedoch nicht in Rotalgen existieren, entstanden sie vermutlich während der Evolution erst nach der Trennung von Grünalgen und Rotalgen. Da die PRAT2-Proteine keine Sequenzähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen aufweisen, ist zu vermuten, dass ihnen eine von der primären Photosynthese unterschiedliche Funktion zukommt. In Landpflanzen und Grünalgen sind die PRAT2-Proteine aber essentiell, was sich auch in der ubiquitären Expression der *PRAT2* Gene zeigt. Die PRAT2-Proteine wurden ursprünglich im Rahmen einer Proteomanalyse in den Chloroplastenhüllmembranen von *Arabidopsis* identifiziert (Ferro et al., 2002; Ferro et al., 2003; Fröhlich et al., 2003). In Vorarbeiten von Dr. Manuela Baumgartner konnten Ähnlichkeiten in der Sequenz und der Sekundärstruktur zur Tim17/22/23 Proteinfamilie gezeigt werden. Durch eine phylogenetische Analyse wurden die Proteine demnach der

PRAT (*preprotein and amino acid transporter*) Proteinfamilie zugeordnet (Murcha et al., 2007).

In Versuchen zur Lokalisierung wurden *in vitro* Importstudien in Mitochondrien und Chloroplasten mit allen 17 PRAT-Proteinen von *Arabidopsis* durchgeführt (Murcha et al., 2007). Obwohl die Importsysteme von Chloroplasten und Mitochondrien generell sehr spezifisch sind, ist die Proteinsortierung nicht immer nur auf ein Organell beschränkt (Millar und Small, 2006). So ließen auch die Importstudien für die PRAT2-Proteine keine entgeltigen Aussagen zu, denn beide Proteine importierten in Chloroplasten, jedoch konnte PRAT2.2 zusätzlich auch in Mitochondrien importiert werden (Murcha et al., 2007). Die Lokalisierung von PRAT2.2 in Mitochondrien konnte durch *in vivo* GFP-Analysen bestätigt werden und es wurde für PRAT2.2 eine duale Lokalisierung in Chloroplasten und Mitochondrien postuliert. Dabei sollte erwähnt werden, dass diese Studien mit biolistischer Transformation durchgeführt wurde, wo eine eindeutige morphologische Zuordnung des Signals in Mitochondrien oder Chloroplasten schwer möglich ist. Die Sortierung von Proteinen mit einer dualen Lokalisierung wird als „Dual Targeting“ bezeichnet (Small et al., 1998). Dabei nutzen Proteine, die in beide Organellen importiert werden, hintereinandergeschaltete chloroplastidäre und mitochondriale Präsequenzen, so dass durch einen alternativen Start der Transkription oder Translation zwei Proteine generiert werden, die jeweils in den Chloroplasten und in die Mitochondrien transloziert werden (Pujol et al., 2007). Da die PRAT2-Proteine beide über einen möglichen zweiten Translationsstart verfügen, wäre dies ein weiterer Hinweis für eine duale Lokalisierung.

Um die subzelluläre Lokalisierung der PRAT-Proteine zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mitochondrien und Chloroplasten aus *Arabidopsis* Keimlingen isoliert, die Proteine mittels PAGE aufgetrennt und die PRAT-Proteine durch Antikörperfärbung detektiert. Dabei konnte allerdings kein Signal in Mitochondrien detektiert werden. Die Lokalisation der PRAT2-Proteine in der inneren Chloroplastenhüllmembran konnte durch eine Fraktionierung der Hüllmembran von Erbsenchloroplasten bestätigt werden. In einem dualen Import-Experiment in Chloroplasten und Mitochondrien wäre in zukünftigen Experimenten zu prüfen, in welches Organell die Proteine importieren. Dazu könnten N-terminale Deletionskonstrukte verwendet werden, die um ein Startmethionin verkürzt wurden.

In der ARAMEMNON Datenbank für *Arabidopsis* Membranproteine (Schwacke et al., 2003) sind auf verschiedenen Programmen basierende Vorhersagen über Transmembran-segmente zusammengefasst. Für beide PRAT2-Proteine werden hier vier hydrophobe

Membrandomänen vorhergesagt. Sowohl durch Immunoblotanalysen, BN-PAGE Experimente, als auch durch Studien in Hefezellen konnte die Bildung von Homodi- und Tetrameren und hoch molekularen Oligomeren gezeigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die PRAT2-Proteine einen homotetrameren Komplex in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran ausbilden (Abbildung 42). Mit der Fähigkeit eine Pore in der Membran zu bilden, wäre damit eine Voraussetzung für einen potentiellen Transportkanal gegeben. Die Zusammenlagerung von homooligomeren, aber auch heterooligomeren Untereinheiten einer Membranproteinfamilie zur Ausbildung einer Kanalpore ist beschrieben und oft für die Funktion eines Kanals von Bedeutung (Jeanguenin et al., 2008). Für andere Mitglieder der PRAT Überfamilie liegen bisher verschiedene Angaben zur Oligomerisierung vor. Für den rekombinant exprimierten Tim22 Kanal (innere Membran in Hefemitochondrien) wurden einfache und dreifache Poreneinheiten beobachtet (Kovermann, 2002). Die Porenstöchiometrie von rekombinantem Tim23 wird als ein Vielfaches von drei beschrieben (Truscott, 2001). Für OEP16 (äußere Hüllmembran von Chloroplasten) wurde eine Dimerisierung nachgewiesen (Pohlmeyer, 1997). Die elektrophysiologischen Daten verweisen jedoch auf eine Kanalaktivität mit drei oder sechs Poren (Steinkamp, 2000).

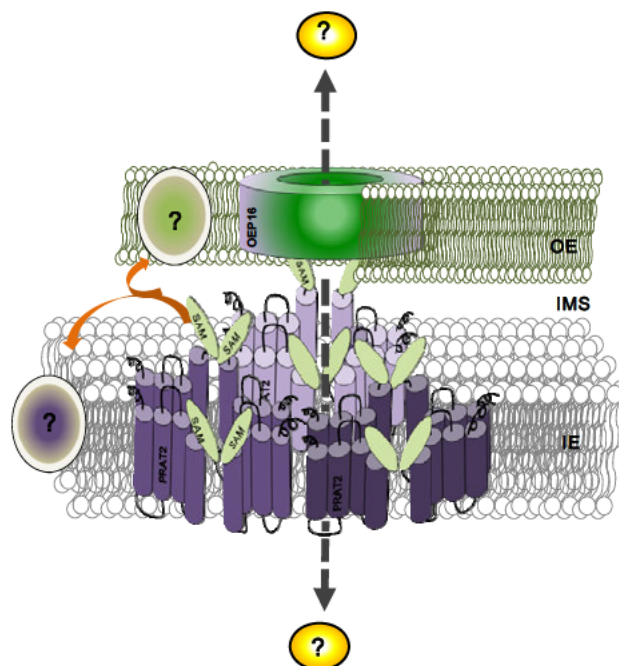


Abbildung 42: Modell zur Porenbildung der PRAT2-Proteine.

Die vier membrandurchspannenden α -Helices der PRAT2-Proteine sind als lila Zylinder dargestellt. Die PRAT2-Proteine lagern sich wahrscheinlich über die SAM-Domäne (hellgrünes Oval) zusammen. Die trimere Struktur der Pore ist durch verschiedene Lilatöne dargestellt. Die SAM-Domäne erstreckt sich weiterhin zur äußeren Hüllmembran und interagiert dort möglicherweise mit OEP16 Proteinen. Es sind jedoch weitere Interaktionspartner sowohl in der äußeren, als auch in der inneren Hüllmembran vorstellbar (dargestellt als Ovale mit Fragezeichen). OE: Äußere Hüllmembran des Chloroplasten; IMS: Intermembranraum; IE: Innere Hüllmembran.

Aufgrund der erfolgreichen Isolierung von rekombinanten PRAT2-Proteinen konnten elektrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Diese zeigten, dass die PRAT2-Proteine fähig sind Poren zu bilden. In Fusionsexperimenten mit aufgereinigten, heterolog exprimierten Proteinen im „Black Lipid Bilayer“ konnten reproduzierbare Kanalaktivitäten detektiert werden. Dabei besteht der PRAT2-Kanal mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer trimeren Pore (Abbildung 42). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PRAT2-Proteine eine Selektivität für Kationen besitzen. Diese Selektivität könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen von geladenen Aminosäureresten im Inneren der Pore und den beteiligten Ionen entstehen. Allerdings sollten diese Ergebnisse weiterhin abgesichert werden, um auszuschließen, dass bakterielle Kontaminationen die Lipid Bilayer-Experimente beeinträchtigt haben. Dies wäre z.B. möglich, indem die Experimente mit Deletionskonstrukten durchgeführt würden, die nur über zwei Transmembransegmente verfügen und somit wahrscheinlich nicht in der Lage wären, einen Kanal auszubilden.

Aufgrund ihrer Familienzugehörigkeit zu der PRAT-Familie und ihrer Lokalisation in den inneren Chloroplasten-Hüllmembran könnten die PRAT2-Proteine einerseits ein chloroplastidäres Äquivalent zu den mitochondriellen TIM-Translokasen darstellen und somit eine zum TIC-Komplex (Benz et al., 2009) alternative Importfunktion für Proteine aufzeigen. Auf der anderen Seite wäre auch denkbar, dass sie, wie die OEP16 Proteine (Pohlmeyer et al., 1997), eine Rolle im Transport von Aminosäuren und Aminosäurederivaten spielen. Beide Hypothesen wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand von Versuchen zur Funktionskomplementationen von Hefemutanten überprüft:

i) Es konnte nicht gezeigt werden, dass die PRAT2-Proteine aus *Arabidopsis* TIM-Deletionsstämme in Hefe komplementieren können. Dabei ist zu bedenken, dass für diese Experimente die PRAT2-Proteine in Mitochondrien importiert werden müssen. Da weder die TIM-Proteine, noch die PRAT2-Proteine eine klassische N-terminale Zielsteuerungssequenz besitzen, musste zudem auf die Ähnlichkeit mitochondrieller und plastidärer proteininterner Zielsteuerungsinformationen vertraut werden. Darüber hinaus sind alle drei TIM-Proteine Teil eines multimeren Komplexes (Mokranjac et al., 2009) und sollte nur eine Interaktion nicht durch die PRAT2-Proteine bewerkstelligt werden können, gäbe das Experiment auch ein negatives Resultat. Letztlich gab es unter den gewählten Voraussetzungen keinen Hinweis darauf, dass die PRAT2-Proteine eine Rolle im Proteintransport spielen.

ii) Da die Chloroplasten das primäre Kompartiment der Aminosäurebiosynthese darstellen (Lam et al., 1996), wurde zudem geprüft, ob die PRAT2-Proteine eine Rolle im

Aminosäuretransport übernehmen können. Dafür wurden zwei Hefe-Deletionsmutanten für die Aminosäureaufnahme mit den PRAT2-Proteinen transformiert (nicht gezeigt). Die Deletionsmutante JT16 war in den Permeasen für Histidin und Arginin mutiert (Tanaka und Fink, 1985) und die Deletionsmutante 22 Δ 8AA in den Permeasen für Aspartat, Glutamat, Arginine, Lysine, Prolin und Citrullin (Fischer et al., 2002). Für die funktionelle Komplementation wurden die transformierten Hefestämme auf Medium ausgestrichen, welches je nach Stamm die entsprechenden nicht transportierbaren Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle enthielten. Auch in diesen Experimenten waren die PRAT2-Proteine nicht in der Lage, die Mutationen der Hefestämme zu komplementieren. Dabei ist zu bedenken, dass auch hier die Insertion und Orientierung der Proteine in der Hefe-Plasmamembran von Bedeutung ist und für Proteine aus Chloroplasten möglicherweise nicht korrekt funktionieren.

5.2 Die PRAT2-Proteine besitzen eine SAM-Domäne im Intermembranraum

Die SAM-Domäne wurde erstmals im Jahr 1995 von Ponting (Ponting et al., 1995) in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Sie wurde als "sterile alpha motif" benannt, weil sie essentiell für die sexuelle Differenzierung ist. In *Arabidopsis* sind 8 Proteine mit SAM-Domäne bekannt, allerdings ist bis jetzt keines der Proteine charakterisiert. Die PRAT2-Proteine repräsentieren dabei die einzigen Membranproteine mit SAM-Domäne und nehmen damit eine Sonderstellung ein. Die SAM-Domäne ist fast ausschließlich in Eukaryoten vorhanden und findet sich in funktionell unterschiedlichen Proteinen wie etwa Transkriptions- und Translationsregulatoren oder Kinasen (Kim und Bowie, 2003; Schultz et al., 1997). Vor allem aber ist die SAM-Domäne für ihre Fähigkeit bekannt, Protein-Interaktionen mit sowohl SAM-besitzenden Proteinen, als auch mit Proteinen ohne SAM-Domäne zu ermöglichen (Kim und Bowie, 2003). Dabei ist die SAM-Domäne in der Lage Homodimere, Heterodimere und Oligomere zu bilden.

Die Sekundärstruktur der SAM-Domäne faltet sich in vier bis fünf α -Helices, welche ein globuläres Bündel mit hydrophobem Kern bilden und die Protein-Protein-Interaktion erleichtern (Ponting, 1995). Für die SAM-Domäne von PRAT2 aus Erbse werden vier α -Helices und für die PRAT2-Proteine aus *Arabidopsis* werden fünf α -helicale Peptidabschnitte vorhergesagt. Durch den proteolytischen Verdau der Proteine der inneren Hüllmembran von Chloroplasten konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die SAM-Domäne der PRAT2-Proteine in den Intermembranraum weist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung der PRAT2-Proteine über die SAM-Domäne gelingt (Abbildung 42). Zudem ist denkbar, dass die SAM-Domänen der PRAT2-Proteine mit Proteinen der äußeren Hüllmembran interagieren. Erste Ergebnisse der hydrophoben Interaktionschromatographie mit der rekombinant aufgereinigten SAM-Domäne und Proteinen der äußeren Hüllmembran weisen auf OEP16.1 als Interaktionspartner hin (nicht gezeigt). Allerdings war diese Interaktion im *Spilt-Ubiquitin* System in Hefe nicht zu beobachten. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion ist hier allerdings sehr gering, wenn beide Proteine in ihrer natürlichen Orientierung in die Plasmamembran der Hefen inserieren. In diesem Fall wären die *in vivo* im Intermembranraum befindlichen Domänen (die SAM-Domäne der PRAT2-Proteine und Peptidschleifen von OEP16.1) auf unterschiedlichen Seiten der Hefemembran lokalisiert und eine Zusammenführung des „Split-Ubiquitins“ unmöglich. Weitere Hinweise auf eine Interaktion von PRAT2-Proteinen und OEP16.1 liefern die Immunoblotanalysen, wo eine Reduktion von OEP16.1 Proteinen in der *prat2*-Doppelmutante zu detektieren war und weiterhin quantitative Proteomstudien von Plastidenmembranen, in denen beide Proteine zu gleichen Mengen nachgewiesen werden konnten (Bräutigam and Weber, 2009). In weiterführenden Experimenten könnte versucht werden diese vorläufigen Versuche zur Interaktion z.B. durch Koimmunoprecipitation zu bestätigen.

5.3 Die PRAT2-Proteine sind essentiell für die Pflanzenentwicklung

Zur Untersuchung der physiologischen Einbindung der PRAT2-Proteine wurden zwei unabhängig erzeugte *prat2*-Doppelmutanten untersucht. Dabei führte das Ausschalten der PRAT2-Proteine zu entwicklungsbiologischen Defekten, was sich in einem reduzierten Wachstum und einem stark chlorotischen Phänotyp widerspiegelte. Beide Mutanten wiesen einen identischen Blattphänotyp auf, bei dem die Bereiche um das Leitgewebe grün und der Rest der Rosettenblätter chlorotisch waren. Die erfolgreiche Komplementation der *prat2*-Doppelmutante zeigte zudem, dass dieser Phänotyp eindeutig auf das Fehlen der PRAT2-Proteine zurückzuführen ist. Weiterhin bestätigte die Chlorophyllbestimmung, dass die *prat2*-Doppelmutanten einen um ungefähr 85% reduzierten Chlorophyllgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Während in gesunden Pflanzen das Verhältnis von Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *b* etwa drei zu eins beträgt (Heldt, 1999), lag dies in der *prat2*-Doppelmutante bei 1,2 im Langtag und 1,9 im Dauerlicht. In den Thylakoidmembranen grüner Pflanzen sind die Kern-Komplexe von PhotosystemII (Chlb)

und PhotosystemI (Chl a) normalerweise deutlich heterogen verteilt. So wird PSII hauptsächlich in den Granathylakoiden gefunden, während PSI überwiegend in den Stromathylakoiden lokalisiert ist (Dekker und Boekema, 2005). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *prat2*-Doppelmutante war damit einhergehend zu beobachten, dass die Stromathylakoide nicht ordentlich ausgebildet waren, in denen vornehmlich die Chlorophyll a Moleküle angesiedelt sind. Demgemäß gehen die gemessenen Chlorophyllverhältnisse von Chl a /Chl b einher mit der veränderten Ultrastruktur der Chloroplasten.

Pflanzen, deren zelluläre Funktionen durch Stressfaktoren beeinträchtigt sind, leiden oft unter oxidativer Schädigung durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), z. B. Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$) und Hydroxylradikale. ROS sind starke Oxidationsmittel, d. h. sie entreißen anderen Molekülen Elektronen. Diese oxidative Schädigung betrifft verschiedene Zellkompartimente und Moleküle wie Lipide, Proteine und Aminosäuren, sowie die DNA (Ślesak et al., 2007), wodurch es zur Störung der normalen Zellfunktionen kommen kann. ROS werden jedoch auch als Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels, z.B. während der Photosynthese gebildet. Solange die zellulären Mechanismen in der Lage sind diese Verbindungen zu entgiften, befindet sich der Organismus nicht im Stresszustand. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *prat2*-Doppelmutante unter Langtagbedingungen H $_2$ O $_2$ anreichert und demnach unter oxidativem Stress leidet. Die erhöhten Gehalte an Carotinoiden in der *prat2*-Doppelmutante könnten hiernach als Schutz vor ROS gedeutet werden. Desweiteren werden auch vermehrt Plastoglobuli gebildet (Abbildung 19), wenn Pflanzen unter oxidativen Streß, der auf den Photosyntheseapparat einwirkt, leiden (Austin et al., 2006).)

Weitherhin waren unter Langtagbedingungen in der *prat2*-Doppelmutante sowohl die Ammoniumgehalte, als auch die Fd-GOGAT-Gehalte (Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase) erhöht. Ammonium wird beim Abbau biologischer Makromoleküle während der Seneszenz, während der Photorespiration und während dem Aminosäurekatabolismus freigesetzt (Lam et al., 1996). Es ist bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch, weil es im Gleichgewicht mit freiem Ammoniak (NH $_3$) steht, der als Entkoppler von Protonengradienten an Membranen wirkt (Kleiner, 1981). Innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels wird die toxische Wirkung durch den Einbau von Ammonium in Aminosäuren vermieden. Dies geschieht über den GS/GOGAT (Glutamin-Synthetase/ Glutamat-Synthase) Zyklus im Chloroplasten. Die GS synthetisiert unter ATP-Verbrauch Glutamin aus Ammonium und Glutamat. Glutamat wird in der GOGAT-katalysierten

Reaktion durch Übertragung einer Aminogruppe von Glutamin auf α -Ketoglutarat regeneriert. So ist es möglich, dass die *prat2*-Doppelmutante im Langtag erhöhte Mengen an Fd-GOGAT bildete, um Ammonium zu entgiften. Bei der Refixierung des freigesetzten Ammoniums durch das GS/GOGAT-System werden zusätzlich Reduktionsäquivalente aus den Photosystemen abgegriffen. Unter Dauerlichtbedingungen wurden die Ammoniumgehalte reduziert, weil sich womöglich unter Einfluss von Licht die Aktivität der Fd-GOGAT erhöht (Avila et al., 1994). Der Verlust der PRAT2-Proteine bedeutete, dass sich in den Pflanzen toxische Substanzen wie Wasserstoffperoxid sowie Ammonium anhäuferten und es scheint, als trete diese Anhäufung besonders in der Dunkelphase auf.

5.4 Der Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante wird durch Dauerlicht unterdrückt

Da die *prat2*-Doppelmutante unter Dauerlichtbedingungen auch unter einer sehr niedrigen Lichtintensität ergrünte, scheint es, als übernehme die Transportaktivität der PRAT2-Proteine im Dunkeln eine wichtige Funktion. Es wäre zum einen möglich, dass durch den Verlust der PRAT2-Proteine Metabolite in der Nacht nicht transportiert werden und dies zu einem unbalancierten Stoffwechsel führt. Zum anderen wäre denkbar, dass sich im Dunkeln toxische Metabolite anhäufen. Zu solchen Metaboliten zählen die Porphyrin-Vorstufen der Chlorophyllbiosynthese. Dies gilt insbesondere für Protochlorophyllid (Runge et al., 1996), das in einer strikt lichtabhängigen Reaktion durch das chloroplastidäre Enzym Protochlorophyllidoxoreduktase (POR) zu Chlorophyllid umgewandelt wird (Abbildung 43). Allerdings konnte für die *prat2*-Doppelmutante keine Anreicherung sondern eine Verringerung von Protochlorophyllid festgestellt werden. Es ist aber zu bedenken, dass auch die natürlichen Gehalte an freiem Protochlorophyllid, solange sie nicht im Holochrom des POR-Komplexes (NADPH, POR und Protochlorophyllid) gebunden sind, bei Belichtung einen phototoxischen Effekt verursachen (Runge et al., 1996). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse der DNA-Microarray-Analyse, in der zu sehen ist, dass in den Mutanten die Expression der Protochlorophyllidoxoreduktasen stark reprimiert ist.

Da auch weitere Porphyrine phototoxisch wirken können, wenn sie als photosynthetisch aktive Pigmente die absorbierte Energie nicht adäquat nutzen, wurden in den *prat2*-Doppelmutanten die Konzentrationen an ProtoporphyrinIX (PPIX), Magnesium-PPIX (MgPPIX) und MgPPIX-Monomethylester (MgPPIXMoMe) bestimmt (Abbildung 43). Die Bestimmung zeigte, dass die Konzentrationen für ProtoIX und MgPPIXMoMe im Vergleich

zum Wildtyp erniedrigt waren und somit der Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante nicht durch eine Akkumulation dieser Porphyrine verursacht werden kann. Allerdings konnten für MgPPIX leicht erhöhte Mengen (150%) gegenüber dem Wildtyp bestimmt werden. MgPPIX wird durch die Insertion von Mg^{2+} in PPIX durch das Enzym Magnesiumchelatase gebildet. Die Magnesiumchelatase benötigt für ihre Aktivität ATP und ist somit indirekt über Licht reguliert (Hihara et al., 2001). Zudem könnte man spekulieren, dass der Anstieg der MgPPIX Gehalte in der *prat2*-Doppelmutante induziert wird, weil das nachfolgende Enzym der Chlorophyllbiosynthese, nämlich die S-Adenosyl-Methionin abhängige MgPPIXMethyl-Transferase (MgPIXMT, At4g25080) welche MgPPIX zu MgPPIXMoMe umsetzt, nicht funktionstüchtig ist. Dieses Enzym ist in den Chloroplasten in der inneren Hüllmembran und in den Thylakoiden lokalisiert (Block et al., 2002). So sind auch in Tabakmutanten mit beeinträchtigter Umwandlung von MgPPIX in MgPPIXMoMe ein chlorotischer Phänotyp und ein reduziertes Wachstum zu beobachten (Alawady und Grimm, 2005). Es wäre also denkbar, dass durch das Ausschalten der PRAT2-Proteine in der inneren Hüllmembran die Aktivität der MgPIXMT beeinträchtigt ist. Eine zweite Überlegung bezieht die Abhängigkeit der MgPIXMT vom Vorhandensein des Kofaktors S-Adenosyl-Methionin in Betracht. S-Adenosyl-Methionin ist nach ATP das am häufigsten verwendete Enzymsubstrat in Pflanzen und wird von MgPIXMT als Kosubstrat benötigt (Schubert et al., 2003). Die Synthese von S-Adenosyl-Methionin erfolgt im Zytosol aus Methionin und ATP und folglich wird S-Adenosyl-Methionin durch das Transportprotein SAMT1 (At4g39460) in den Chloroplasten transportiert (Bouvier et al., 2003). Durch das Fehlen der PRAT2-Proteine in der inneren Hüllmembran wäre auch eine Beeinträchtigung dieses Transportproteins denkbar, so dass im Chloroplasten nicht genügend S-Adenosyl-Methionin zur Verfügung stünde.

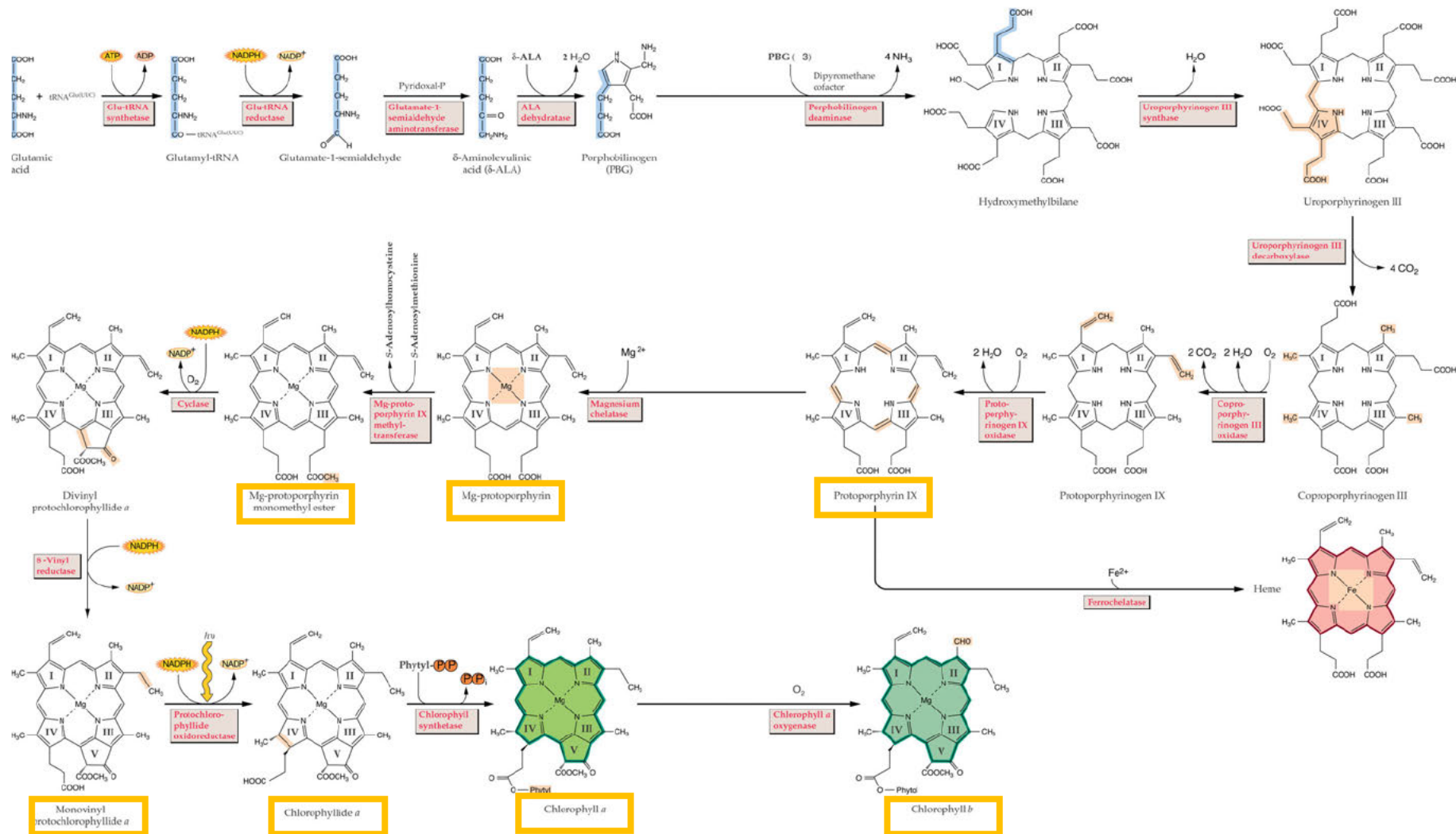


Abbildung 43: Biosynthese von Chlorophyll und Häm (aus Buchanan, 2000).

Die Biosynthese beginnt mit der Synthese von Aminolävulinsäure (ALA) aus Glutamat. Über Zwischenschritte wird die Ringstruktur von ProtoporphyrinIX gebildet, welche den Knotenpunkt zwischen der Synthese von Chlorophyll bzw. Häm darstellt. Für die Synthese von Chlorophyll wird Mg^{2+} in den ProtoporphyrinIX Ring inseriert, das Ringsystem modifiziert und ein Phytolrest angehängt. In Angiospermen wird daraufhin Protochlorophyllid lichtabhängig zu Chlorophyllid a umgesetzt. Die in dieser Arbeit bestimmten Chlorophyllvorstufen und Chlorophylle sind gekennzeichnet.

5.5 Spielen die PRAT2-Proteine eine Rolle in der Auxin-Homöostase ?

Eine Erklärungsmöglichkeit für den drastischen Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante könnte in einer beeinträchtigten Auxinhomöostase liegen. Auxine sind an der Regulation von nahezu allen pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt. Sie wirken bei der Zelldifferenzierung, koordinieren die Entwicklung des vaskulären Systems sowie die Zellteilung und Zellstreckung, regulieren die Apikaldominanz und steuern den Photo- und Gravitropismus (Davies, 1995). So zeigt z.B. die *yucca*-Vierfachmutante (Mutationen in den Enzymen der Auxinsynthese über Tryptamin) mit verminderter Auxinkonzentration einen ähnlichen Phänotyp wie die *prat2*-Doppelmutante, nämlich eine verlangsamte Entwicklung, reduzierte Größe, fehlende Apikaldominanz und Chlorose (Cheng et al., 2006; 2007). Mehrere Beobachtungen führten zur Hypothese einer gestörten Auxinhomöostase in der *prat2*-Doppelmutante: 1) der Phänotyp ohne ausgeprägte Apikaldominanz, 2) ein grün gefärbtes Meristem und Vaskulärgewebe, 3) der PIN-Phänotyp der komplementierten *prat2*-Doppelmutante, 4) die erhöhte Gehalte an Glutamat-konjugiertem Auxin, und 5) die differentielle Genregulation Auxin-regulierter Gene. Aus diesen Gründen wurden die phänotypischen Entwicklungen der *prat2*-Doppelmutanten unter Indol-3-Essigsäure-Gabe untersucht. Dabei konnte der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante durch Auxingabe vermindert werden. Der stimulierende Effekt von Auxin auf die Chlorophyllbiosynthese (Czerpak et al., 2002) wurde auch für andere Spezies beschrieben. Unter hohen Auxingaben waren dagegen die herbizide Wirkung des Auxins sowohl in der *prat2*-Doppelmutante, als auch im Wildtyp zu beobachten.

Bei der Auxinbiosynthese werden ein Tryptophan-abhängiger und einen Tryptophan-unabhängiger Reaktionsweg diskutiert (Woodward und Bartel, 2005). Der Weg über das vom Tryptophan abgeleiteten Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) ist physiologisch interessant, da von IAOx die Glucosinolat-Biosynthese von der IES-Synthese abzweigt. Der Export von ausschließlich in Plastiden synthetisiertem Tryptophan über das Membransystem ist deshalb von Bedeutung für die Auxin-Homöostase und die Glucosinolat-Biosynthese. In *Arabidopsis* setzen die Cytochrome P450 Monooxygenasen, CYP79B2 und CYP79B3 das Tryptophan zu IAOx um (Hull et al., 2000). Die Überexpression des Gens Cyp79B2 führt daher zu erhöhten Gehalten an Auxinen und Glucosinolaten und das Ausschalten zu einem gegenteiligen Effekt (Zhao et al., 2002). Die Expression von CYP79B2 und CYP79F1 Genen der Glucosinolatbiosynthese waren in der *prat2*-Doppelmutante c2dm1 reduziert (siehe

Tabelle im Anhang). Dies weist darauf hin, dass die PRAT2-Proteine möglicherweise eine Rolle im Transport von Tryptophan spielen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch radioaktive Aufnahmestudien im heterologen Hefesystem gezeigt werden, dass beide PRAT2-Proteine Transportaktivität für IES besitzen. Da Auxin, Tryptophan und IAOx strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, könnte es möglich sein, dass ein potentielles Transportprotein sowohl Tryptophan, als auch IAOx und Auxin transportiert (Abbildung 44).

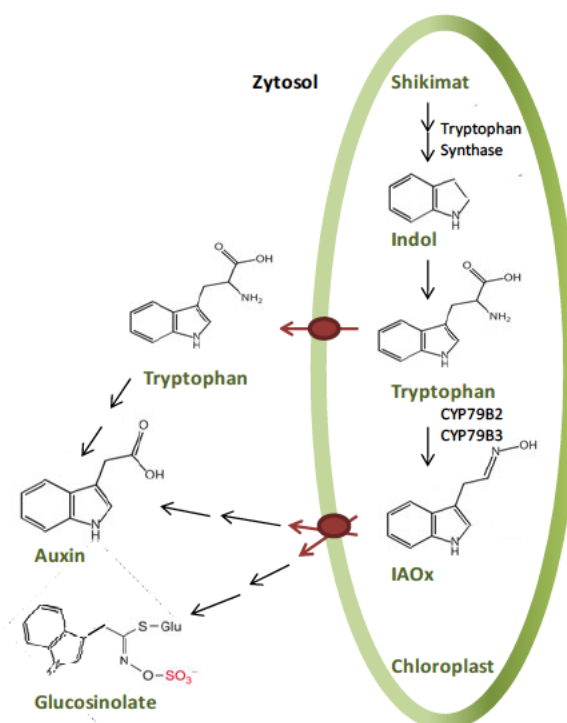


Abbildung 44: Modell zu einer potentiellen Rolle der PRAT2-Proteine in der Auxinhomöostase.

Während der Tryptophan-abhängigen Synthese von Auxin muss neben Tryptophan auch IAOx (Indol-3-Acetaldoxim) sowohl für die Auxinsynthese, als auch für die Glucosinolatsynthese aus dem Chloroplast transportiert werden. Für beide Intermediate kann ein Transportprotein im Membransystem der Chloroplasten postuliert werden. CYP: Cytochrome P450 Monooxygenasen, IAOx: Indol-3-Acetaldoxim.

In *Arabidopsis* sind für den polaren Auxintransport die sogenannten PIN-Proteine beschrieben. Diese Proteine sind Auxineffluxcarrier und liegen entlang der Strecke des postulierten Auxinflusses (Geldner et al., 2001). Interessant dabei ist, dass PIN Proteine identifiziert wurden, die nicht in der Plasmamembran lokalisiert sind, sondern im Endomembransystem (Mravec et al., 2008). So impliziert die Lokalisation von PIN5 im ER eine Rolle im intrazellulären Transport und somit eine kontrollierte Kompartimentierung des Auxins. Somit ist auch denkbar, dass die PRAT2-Proteine eine solche Kompartimentierung in Chloroplasten bewerkstelligen können. Die erhöhten Mengen an konjugiertem Auxin in der *prat2*-Doppelmutante weisen ebenso darauf hin, dass wahrscheinlich freies Auxin den Geweben nicht ausreichend zur Verfügung steht. Ebenso

waren in der *prat2*-Doppelmutante die Gehalte des an Aminosäure-konjugierten Auxins erhöht. Den konjugierten Auxinen wird eine Funktion für Speicherung, Transport und zur Aufrechterhaltung der Auxin-Homöostase zugeordnet (Staswick, 1995).

Es ist nicht ausgeschlossen, dass schon geringe Auxinkonzentrationsänderungen einen weitreichenden Einfluss auf das Stoffwechselgeschehen der *prat2*-Doppelmutante ausüben vermögen.

5.6 Das Fehlen der PRAT2-Proteine induziert erhöhte Stoffwechsel Flüsse in Aminosäuren

Neben den Analysen der Protein- und Genexpression wurde die Stoffwechselebene mittels Metabolitenbestimmung in der *prat2*-Doppelmutante untersucht. Dabei war zu beobachten, dass sich die Mutanten unter Dauerlichtbedingungen in ihrem Stoffwechsel dem Wildtyp angleichen, was sich in der „Normalisierung“ der Metabolitgehalte und einer fast vollständigen Ergrünung widerspiegelte. Neben den Aminosäuren und organischen Säuren wurden auch die Gehalte an verschiedenen Kohlenhydraten bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass in der *prat2*-Doppelmutante die Balance zwischen kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Verbindungen zugunsten des Stickstoffs verschoben ist.

Die kohlenstoffhaltigen Verbindungen stellen ein zentrales Element im Stoffwechsel aller lebenden Organismen dar, denn sie unterliegen weiteren Abbauprozessen zur Gewinnung von Energie- und Reduktionsäquivalenten. Während die *prat2*-Doppelmutante unter Langtagbedingungen reduzierte Gehalte an Glucose, Xylose, Fructose und Myoinositol aufwies, stiegen diese durch das Dauerlicht auf Wildtypniveau an (Abbildung 45).

Für das Stoffwechselgeschehen kommt den Aminosäuren eine herausragende Bedeutung zu, da sie sowohl die Bausteine der Proteine sind, als auch Ausgangsstoffe für Sekundärmetabolite. Die Bestimmung der Aminosäuregehalte zeigte, dass die Deletion der *PRAT2* Gene den Aminosäurestoffwechsel stark beeinträchtigt. Im Metabolitprofil waren die Gehalte der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein als auch die stickstoffreichen Aminosäuren Lysin und Asparagin und die nicht proteinogene Aminosäure GABA (Abbildung 45) erhöht. Eine Ausnahme bildeten Glycin und die aromatischen Aminosäuren. Während die Gehalte an Glycin in der *prat2*-Doppelmutante erniedrigt waren, blieben die Gehalte der aromatischen Aminosäuren unverändert.



Das metabolische Netzwerk wurde mit dem Programm VANTED generiert. Jeder Knoten repräsentiert einen Metabolit und ist durch Pfeile, die enzymatische Reaktionen darstellen, im Netzwerk verknüpft. Die Daten sind Mittelwerte (n=3 biologische Replikate) und der Standardfehler ist eingezeichnet. Schwarze Balken: Wildtyp unter Langtagbedingungen, blaue Balken: Doppelmutante c2dm1 unter Langtagbedingungen; graue Balken: Wildtyp unter Dauerlichtbedingungen; rote Balken: Doppelmutante c2dm1 unter Dauerlichtbedingungen.

Methionin ist eine essentielle, schwefelhaltige Aminosäure, die wichtig für den Aufbau von Proteinen und zur Initiation der Proteinsynthese als Methyl-tRNA ist. Methionin dient als Vorstufe für S-Adenosyl-Methionin, dem Hauptdonor in vielen Methylierungsreaktionen (Hesse et al., 2001). In *Arabidopsis* existieren 3 Isoformen der Methioninsynthase, wovon eine Isoform im Chloroplasten vorkommt und somit den Chloroplast autonom für die *de novo* Methionin Synthese macht (Ravanel et al., 2004). Wäre durch das Fehlen von PRAT2-Proteinen der Methioninexport aus dem Chloroplasten beeinträchtigt, würde dies zum einen die erhöhten Gehalte an Methionin erklären und zum anderen möglicherweise den Gehalt an S-Adenosyl-Methionin reduzieren. Diese Hypothese geht einher mit den Beobachtungen aus der Analyse der Chlorophylle, wo MgPPIX im Chloroplasten der *prat2*-Doppelmutanten akkumuliert, weil es vermutlich durch das Fehlen von S-Adenosyl-Methionin nicht methyliert werden kann (siehe 5.4). Darüber hinaus zeigt S-Adenosyl-Methionin eine Endproduktkontrolle auf die vom Aspartat abgeleiteten Aminosäuren Methionin, Lysin und Threonin (Ravanel et al., 2004). So könnte auch die Erhöhung dieser Aminosäuren auf das Fehlen von S-Adenosyl-Methionin zurückgeführt werden.

Cystein wird in Pflanzen durch die Sulfatassimilation bereitgestellt. Die komplette Reaktionsfolge der Sulfatassimilation findet dabei nur in Plastiden statt. Allerdings ist die Bildung von Cystein aus Sulfid auch in den Mitochondrien und im Cytosol möglich (Leustek et al., 2000). Cystein dient als Vorprodukt für die Synthese von Methionin und Glutathion (GSH). GSH ist ein Tripeptid (γ -Glutamylcysteinylglycin) und fungiert als zelluläres Antioxidans, als Transportform von reduziertem Schwefel und ist für die Regulation des Pflanzenwachstums von Bedeutung (Foyer et al., 2001; Maughan et al., 2009). Bei der Beseitigung von ROS agiert GSH als Reduktionsmittel, wobei es selbst zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Sinkt der Quotient zwischen GSH/GSSG unter einen bestimmten Wert, kommt es zu einer akuten Schädigung der Zelle durch oxidativen Stress (Foyer et al., 2005). In der *prat2*-Doppelmutante könnte die Bereitstellung großer Mengen der GSH-Vorstufe Cystein in der Notwendigkeit für die Biosynthese von GSH liegen. In *Arabidopsis* ist eine Kompartimentierung der GSH-Synthese nachgewiesen (Wachter et al., 2005). Während das ATP-abhängige Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase zur Bildung des Dipeptids γ -Glutamylcystein ausschließlich im Plastid lokalisiert ist, findet die endgültige Bildung von GSH sowohl im Plastid, als auch im Cytosol statt. Dies bedingt den Export von γ -Glutamylcystein aus den Plastiden. Käme dieser Export zum Erliegen, wäre das GSH-Gleichgewicht gestört. Die daraus resultierende Störung der Redox-Homöostase würde die beobachtete Erhöhung der Konzentration von ROS verursachen

(siehe 5.3). In *Arabidopsis* wurde bereits eine Familie von GSH Transportern im Chloroplasten charakterisiert (Maughan et al., 2009). Allerdings waren alle 3 Isoformen nicht fähig, das Dipeptid γ -Glutamylcystein oder Cystein zu transportieren. Deshalb wäre denkbar, dass die PRAT2-Proteine in diese Prozesse involviert sind (Abbildung 46).

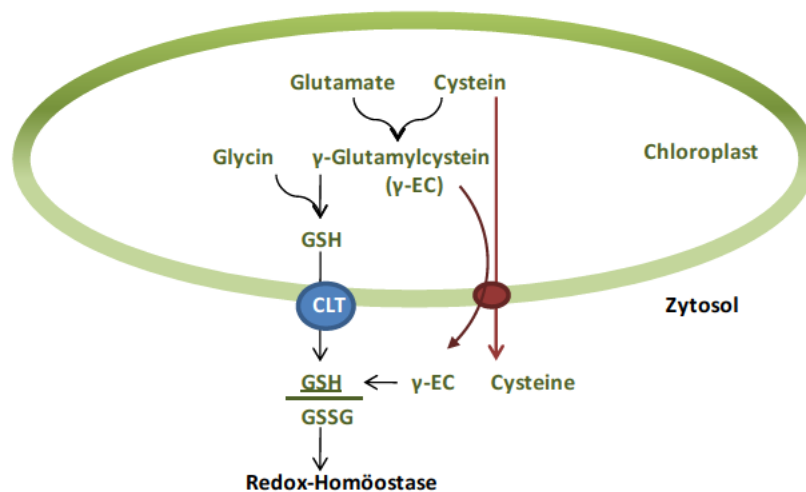


Abbildung 46: Modell zu einer potentiellen Rolle der PRAT2-Proteine in der Glutathion-Homöostase. Die Glutathion-Synthese ist im Zytosol und im Chloroplast kompartimentiert. Die Synthese im Zytosol bedingt einen Transport des Dipeptids γ -Glutamylcystein. Der Transporter CLT wurde als Glutathion-Transporter in der inneren Chloroplastenmembran charakterisiert (Maughan et al., 2009).

Asparagin ist aufgrund seines hohen N:C-Verhältnisses eine Schlüsselaminosäure für die Speicherung von Stickstoff und akkumuliert in vielfältigen Situationen. Die erhöhten Asparagingehalte in der *prat2*-Doppelmutante stellen wahrscheinlich eine Reaktion der Pflanzen auf ihre Stresssituation dar (siehe 5.3). So werden die Asparagingehalte z.B. erhöht, wenn die Kohlenhydratverfügbarkeit erniedrigt ist, während des Proteinabbaus, bei Mineralnährstoffmangel und während der Dunkelheit (Lea et al., 2007).

Glycin entsteht während der Photorespiration, bei der die Oxygenasefunktion der RubisCO zur Bildung von Phosphoglycerat und Phosphoglykolat führt. Phosphoglykolat wird in die Peroxisomen transportiert und in Glycin umgewandelt (Foyer et al., 2009). Da die *prat2*-Doppelmutante im Langtag nur sehr begrenzte Mengen an Glycin enthielt, könnte man zum einen spekulieren, dass der Transportprozess des Glykolats aus den Chloroplasten beeinträchtigt ist, andererseits, dass die Photorespiration unterdrückt wird. Denn die Umwandlung des Phosphoglykolat erfordert neben einem hohen energetischen Aufwand zahlreiche intrazelluläre Transportprozesse, in denen spezifische Translokatoren beteiligt sind (Weber und Flüge, 2002). Hinzukommend entsteht NH_3 , und H_2O_2 , das detoxifiziert werden muss. Durch die Unterdrückung, wie sie wahrscheinlich unter Dauerlicht

stattfindet, würden ATP und NADPH für andere Stoffwechselwege verfügbar sein, was sich in der Erhöhung der Kohlenhydratgehalte widerspiegelt.

Die erhöhten Stoffwechsel Flüsse in Aminosäure der *prat2*-Doppelmutante unter Langtagbedingungen deutet darauf hin, dass die primäre Ursache nicht in der regulatorischen Rolle des Lichts liegt, sondern, dass die Veränderungen der Aminosäuregehalte eine Reaktion auf steigende bzw. fallende Konzentrationen der Kohlenhydrate sind. Denn für die Aminosäuresynthese werden Intermediate aus dem Citrat-Zyklus und Assimilate aus der Photosynthese verwendet (Abbildung 45). In der *prat2*-Doppelmutante wurden reduzierte Mengen von organischen Säuren des Citrat-Zyklus gemessen. Während allerdings die Intermediate an Isocitrat, Fumarat, Succinat und Malat unter Langtagbedingungen reduziert wurden, kam es bei α -Ketoglutarat zu einem Anstieg. Dies könnte zum einen durch einen Rückstau des Stoffwechsels oder durch einen erhöhten Bedarf verursacht werden. Für einen erhöhten Bedarf spricht auch der Anstieg von γ -Aminobuttersäure (GABA). GABA wird durch die Decarboxylierung von Glutamat gebildet und im sogenannten GABA-*shunt* über Succinat-Semialdehyd zu Succinat metabolisiert (Bouché und Fromm, 2004). Man kann davon ausgehen, dass die erhöhten Mengen an GABA in der *prat2*-Doppelmutante der Regulation des Citrat-Zyklus oder dem Schutz vor oxidativem Stress dienen. Durch den GABA-*shunt* würden auch die reduzierten Gehalte an Succinat überbrückt und die Mitochondrien mit Succinat beliefert, um die Atmungsprozesse zu sichern.

Insgesamt deutet die Erhöhung der Gehalte an Aminosäuren wie Cystein, Methionin und Asparagin sowie die Erniedrigung von Zuckern und organischen Säuren in der *prat2*-Doppelmutante daraufhin hin, dass im Langtag ein Überangebot an Reduktionsäquivalenten aus den primären Photosynthesereaktionen besteht. Daher ist denkbar, dass die CO₂-Assimilation gestört ist und die produzierten Reduktionsäquivalente nicht für die Kohlenhydratfixierung genutzt werden können, sondern in die Synthese von Aminosäuren einfließen. Für diese Hypothese spricht auch der erhöhte Gehalt an Fd-GOGAT und die vermehrt produzierte GABA. Demnach müssten die *prat2*-Doppelmutanten im Tag/Nacht Rhythmus unter einer gestörten oder verzögerten Öffnung der Stomata leiden. Unter Dauerlicht werden die Schließzellen dagegen beständig zur Öffnung stimuliert und so könnte unter diesen Bedingungen genügend CO₂ fixiert werden und die Metabolitspiegel würden sich nivellieren.

5.7 Ausblick

Durch die ausgeprägte Kompartimentierung der Stoffwechselwege in der pflanzlichen Zelle sind die Veränderungen der Metabolite in der *prat2*-Doppelmutante ohne weiterführende Analysen schwer zu interpretieren. Um die innerhalb eines Tagesganges, insbesondere am Ende der Dunkelperiode, auftretenden metabolischen Veränderungen aufzudecken, sollten weiterführende Metabolitanalysen in Erwägung gezogen werden. Hier könnte der Metabolitstatus am Ende der Dunkelperiode weitere Aufschlüsse über die Funktion der PRAT2-Proteine liefern. Weiterhin können Gaswechselanalysen Aufschluß über die CO₂-Fixierungsrate und die Öffnung der Stomata unter den verschiedenen Bedingungen geben. Die Bestimmung der Metabolite und die hohe Anzahl der differentiell regulierten Gene zeigten, dass der dramatische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutante durch pleiotrope Effekte zustande kommt und dadurch einen stark veränderten Stoffwechsel bewirkt. Um die Balance von zellulären Prozessen gewährleisten zu können, müssen die photosynthetische Lichtabsorption, die Kohlenstoffassimilation und die Bildung von Reduktionsäquivalenten im Gleichgewicht gehalten werden. Dazu müssen Chloroplasten und Mitochondrien als Hauptorte der Photosynthese, der Photorespiration und des Aminosäuremetabolismus interagieren (Foyer und Noctor, 2002). Somit sind Transportproteine wie die PRAT2-Proteine in den Membranen der Organellen von entscheidender Bedeutung. Bislang wurden jedoch neben OEP16.1 (Aminosäuren und Amine, Pohlmeier et al., 1997) in der äußeren Membran der Plastiden und DiT2.1 (Glutamat und Malat; Renne et al., 2003) in der inneren Membran der Plastiden kein Aminosäuretransporter beschrieben. Die bisher charakterisierten pflanzlichen Aminosäuretransporter in der Plasmamembran transportieren meist mehrere Aminosäuren, die durch Größe, Ladung oder Struktur der Seitenketten selektiert werden (Fischer et al., 2002). So ist auch für die PRAT2-Proteine denkbar, dass sie mehrere Metabolite mit ähnlichen Eigenschaften transportieren wie z.B. Auxin-Derivate, Aminosäuren und kurze Peptide. Kommen diese Transportprozesse durch das Ausschalten der Transporter zum Erliegen, hat dies im Falle der PRAT2-Proteine schwerwiegende Folgen für den gesamten Metabolismus der Pflanze. Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass noch weitere Analysen an den PRAT2-Proteinen und den Funktionsverlustmutanten notwendig sind, um die komplexen Effekte, die durch das Ausschalten der PRAT2-Proteine herbeigeführt werden, im Detail zu verstehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle ermöglicht das simultane Ablaufen verschiedener Stoffwechselwege in den Zellorganellen. Um einen Austausch von Metaboliten und gelösten Stoffe zwischen den Organellen und dem Zytosol zu gewährleisten, existieren in den Membransystemen spezifische Transportproteine und Ionenkanäle, die die metabolischen Netzwerke miteinander verknüpfen. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Unterfamilie der PRAT-Familie (*preprotein and aminoacid transporter*), nämlich die PRAT2-Proteine in der inneren Chloroplastenhüllmembran, charakterisiert.

Neben einem Strukturmodell konnte die Protein-Interaktions-Domäne SAM (*sterile alpha motif*) identifiziert und die Orientierung dieser Domäne in den Intermembranraum nachgewiesen werden. Die SAM-Domäne stellt innerhalb der PRAT-Familie ein einzigartiges Motiv dar, deren Funktion allgemein im Zusammenhang mit Protein-Protein-Wechselwirkungen steht. Durch Interaktionsstudien in Hefe konnte auch für die PRAT2-Proteine eine Abhängigkeit der Dimerisierung von der SAM-Domäne verifiziert werden. Die Bildung von Dimeren und Tetrameren, sowie von hochmolekularen Oligomeren der PRAT2-Proteine konnte durch Immunoblotanalysen und nativer Gelelektrophorese gezeigt werden. Die heterologe Expression der PRAT2-Proteine in *E.coli* erlaubte elektrophysiologische Experimente, die eine trimere Porenorganisation erkennen ließen.

Ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit lag in der Einbindung der PRAT2-Proteine in den Stoffwechsel der Pflanze. Dazu wurden zwei unabhängige *Arabidopsis prat2*-Doppelmutanten hergestellt, in denen die Funktion beider PRAT2-Proteine ausgeschaltet wurde. Die Chloroplasten dieser *prat2*-Doppelmutanten waren im Vergleich zum Wildtyp kleiner und bildeten ein nur unterentwickeltes Thylakoid-Membransystem aus. Es konnte auf Expressions-, Protein- und Metabolitenebene gezeigt werden, dass das verlangsamte Wachstum, sowie der chlorotische Phänotyp der *prat2*-Doppelmutanten mit einer beträchtlichen Veränderung des gesamten Stoffwechsels einhergeht. Metabolit-Analysen zeigten, dass die Deletion der PRAT2-Proteine erhebliche Effekte auf den Aminosäurestoffwechsel bewirken. Insgesamt induzierte das Fehlen der PRAT2-Proteine erhöhte Stoffwechsel Flüsse in Aminosäuren. Unter Dauerlichtbedingungen glichen sich die *prat2*-Doppelmutanten in ihrem Stoffwechsel dem Wildtyp an, was sich in einer „Normalisierung“ der Metabolitgehalte auf das Wildtypniveau und einer fast vollständigen Ergrünung

widerspiegelte. Deshalb ist anzunehmen, dass die PRAT2-Proteine während Dunkelphasen von Bedeutung sind und ein Fehlen der PRAT2-Proteine oder des transportierten Metabolits bei Belichtung photooxidativen Streß erzeugt. Weiterhin lieferten sowohl die Analysen im heterologen Hefesystem, in dem beide PRAT2-Proteine Transportaktivität für Auxin aufwiesen, als auch die Ergrünung der Pflanzen unter Auxingabe, Hinweise auf eine Rolle der PRAT2-Proteine in der Auxin-Homöostase.

Zusammenfassend indizieren die gewonnen Daten, dass die PRAT2-Proteine höchstwahrscheinlich als Transportproteine agieren und Metabolite mit ähnlichen Eigenschaften wie z.B. Auxin-Derivate, Aminosäuren oder kurze Peptide transportieren. Gleichwohl besitzen die PRAT2-Proteine in der inneren Chloroplastenhüllmembran eine fundamentale Bedeutung für die Biogenese der Chloroplasten und die Entwicklung der Pflanzen.

7 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AGI	<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative
ALA	Aminolävulinsäure
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BN-PAGE	Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
Chlid <i>a</i>	Chlorophyllid <i>a</i>
Chlid <i>b</i>	Chlorophyllid <i>b</i>
Col-0	Columbia
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
Cytb ₆ f	Cytochrome b ₆ f (complex)
2D	Zweidimensional
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GFP	Grün-Fluorezierendes-Protein (green fluorescent protein)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GH3	Gretchen Hagen Proteine
GS	Glutaminsynthetase
GOGAT	Glutamin-2-oxoglutarat-Aminotransferase
h	Stunde
IES	Indol-3-Essigsäure
HAc	Essigsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LB	left border
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
IE	innere Chloroplastenhüllmembran (inner envelope)
IgG	Immunglobulin G
kDa	kiloDalton
MeOH	Methanol

MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
MgPPIX	MagnesiumProtoporphyrinIX
MgPPIXMoMe	MagnesiumProtoporphyrinIXMonomethylester
MS	Massenspektrometrie
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Murashige-Skoog Salz
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OE/OEM	Äußere Chloroplastenhüllmembran/ Äußere Membran (outer envelope / outer envelope membrane)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIX	ProtoporphyrinIX
Ps	<i>Pisum sativum</i>
PSI, PSII	PhotosystemI und II
PRAT	Präprotein und Aminosäure Transporter
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR an revers-transkribierter RNA
SA	Standardabweichung
SC	„synthetic complete“ Minimalmedium
SAM	sterile alpha motif
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSU	Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase, kleine Untereinheit (small subunit)
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T-DNA	Transfer-DNA
TIC	Translokation an der inneren Chloroplastenhüllmembran
TL	Translations-Produkt
TM	Transmembran-Domäne
TOC	Translokation an der äußeren Chloroplastenhüllmembran
Tricine	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
UTR	untranslatierter Bereich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

8 ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Übersicht über die Proteinimportmaschinerie in Chloroplasten und Mitochondrien.	3
Abbildung 2: Die PRAT-Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (modifiziert nach Murcha et al., 2007)	6
Abbildung 3: Die PRAT2 Familie in photosynthetisch aktiven Eukaryoten.	31
Abbildung 4: Strukturmodell der PRAT2-Proteine.	31
Abbildung 5: Immunoblot von At-PRAT2-Proteinen in <i>Arabidopsis</i> - und Erbsenchloroplasten.	33
Abbildung 6: Proteolytischer Verdau von PRAT2 in der inneren Chloroplastenhüllmembranen.	34
Abbildung 7: Theoretische Spaltung der Ps-PRAT2 Proteinsequenz durch Thermolysin.	35
Abbildung 8: Homooligomerbildung von <i>in vitro</i> translatiertem At-PRAT2.1.	36
Abbildung 9: Immunoblot der 2D-BN-PAGE inneren Hüllmembranen aus Chloroplasten.	36
Abbildung 10: Interaktionsanalyse der At-PRAT2-Proteine im <i>Split-Ubiquitin</i> -System.	38
Abbildung 11: Hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit der Ps-PRAT2 SAM-Domäne.	40
Abbildung 12: Expressionsmuster der PRAT2-Isoformen in <i>Arabidopsis</i>	41
Abbildung 13: Genomische Organisation von At-PRAT2.1 und At-PRAT2.2.	42
Abbildung 14: Transkript- und Proteingehalte der T-DNA-Insertionslinien <i>prat2.1-2</i> & <i>prat2.2-1</i>	43
Abbildung 15: Phänotyp der homozygoten <i>prat2</i> -Doppelmutanten <i>c2dm1</i> und <i>c2dm2</i>	45
Abbildung 16: Komplementation des chlorotischen Phänotyps von <i>c2dm1</i> Mutanten.	46
Abbildung 17: Komplementierte <i>prat2</i> -Doppelmutante mit PIN Phänotyp in der F ₂ -Generation.	47
Abbildung 18: Blattmorphologie von <i>prat2</i> -Doppelmutanten.	48
Abbildung 19: Ultrastruktur der Plastiden in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	49
Abbildung 20: Einfluss ansteigender IES Konzentrationen auf die <i>prat2</i> -Doppelmutante.	50
Abbildung 21: Chlorophyllgehalte der <i>prat2</i> -Doppelmutante unter dem Einfluss von IES.	51
Abbildung 22: Komplementation des chlorotischen Phänotyps durch Dauerlicht.	52
Abbildung 23: Wasserstoffperoxid-Färbung von <i>prat2</i> -Doppelmutanten	52
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopie von etiolierten Keimlingen.	53
Abbildung 25: Pigmentgehalte der <i>prat2</i> -Doppelmutante <i>c2dm1</i>	54
Abbildung 26: Porphyringehalte der <i>prat2</i> -Doppelmutante nach Behandlung mit ALA.	55
Abbildung 27: Regulierte Gene in der <i>prat2</i> -Doppelmutante unter Langtagbedingungen.	56
Abbildung 28: Regulierte Gene in der <i>prat2</i> -Doppelmutante unter Dauerlichtbedingungen.	57
Abbildung 29: Schnittmengen der regulierten Gene aus Dauerlicht- und Langtagbedingungen.	58
Abbildung 30: 2D-BN-PAGE Analyse von Chloroplasten der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	59
Abbildung 31: Immunoblot von Chloroplastenproteinen der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	60
Abbildung 32: Veränderte Gehalte an Aminosäuren in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	62
Abbildung 33: Veränderte Gehalte an Kohlenhydraten in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	62
Abbildung 34: Gehalte an organischen Säuren in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	63
Abbildung 35: Ammoniumgehalte in den <i>prat2</i> -Doppelmutanten.	64
Abbildung 36: Konzentrationen an freiem Auxin und konjugiertem Auxin.	65
Abbildung 37: Überexpression und Aufreinigung von rekombinatem At-PRAT2.1.	66
Abbildung 38: Leitwert und Schaltverhalten von PRAT2 im Lipid Bilayer.	67
Abbildung 39: Wachstum des Hefestamms 22Δ8AA auf Medium mit Aspartate.	68
Abbildung 40: Komplementation von TIM Hefemutanten mit PRAT2-Proteinen.	69
Abbildung 41: PRAT2-Proteine transportieren Auxin im heterologen Hefesystem.	70
Abbildung 42: Modell zur Porenbildung der PRAT2-Proteine.	73
Abbildung 43: Biosynthese von Chlorophyll und Häm (aus Buchanan, 2000).	80
Abbildung 44: Modell zu einer potentiellen Rolle der PRAT2-Proteine in der Auxinhomöostase.	82
Abbildung 45: Metabolisches Netzwerk des zentralen Stoffwechsels in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.	84
Abbildung 46: Modell einer potentiellen Rolle der PRAT2-Proteine in der Glutathionhomöostase.	86

9 TABELLEN

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer.	8
Tabelle 2: Verwendete Plasmid-Vektoren.....	9
Tabelle 3: In dieser Arbeit hergestellte Plasmid-Konstrukte.	10
Tabelle 4: Verwendete Konstrukte.....	10
Tabelle 5: PCR-Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien.	19
Tabelle 6: Proteine aus <i>Arabidopsis</i> mit vorhergesagter SAM-Domäne.....	32
Tabelle 7: Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i> Gehalte unter Langtag- und Dauerlichtbedingungen.....	55
Tabelle 8: DNA Microarray Parameter Auxin-regulierter Gene in der <i>prat2</i> -Doppelmutante.....	65
Tabelle 9: Regulation der Genexpression (TOP10) in der <i>prat2</i> -Doppelmutante im Langtag.	104
Tabelle 10: Regulation der Genexpression (TOP10) in der <i>prat2</i> -Doppelmutante im Dauerlicht. ..	105

10 LITERATUR

- Abdel-Ghany S.E., Muller-Moule P., Niyogi K.K., Pilon M. und Shikanai T.** (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 17, 1233-1251.
- Alawady, A.E., Grimm, B.** (2005) Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *The Plant Journal*, 41, 282-290.
- Austin II J. R., Frost E., Vidi P.-A., Kessler F., Staehelin L.A.,** (2006) Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. *Plant Cell* 18, 1693–1703
- Avila C., Marquez A.J., Pajuelo P., Canell M.E., Wallsgrove R.M., Forde B.G.** (1994) Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxindependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta*, 189, 475-483.
- Bartel, B.** (1997) Auxin biosynthesis. Jones, R. L.: Ed. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 48, 51-66.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.** (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris/Life Science*, 316, 1194-1199.
- Benjamini Y., Hochberg Y.** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal R Stat Soc, B* 57, 289–300
- 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. *FEBS Journal*, 276, 5, 1166-76.
- Block M.A., Tewari A.K., Albrieux C., Maréchal E., Joyard J.** (2002) The plant *S*-adenosyl-l-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *European Journal of Biochemistry* 269, 240-248.
- Blum H., Beier H., Gross H.J.** (1987) Improved Silver Staining of Plant-Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bouche' N., Fromm H.** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *TRENDS in Plant Science*, 9, 110-115.
- Bouvier F., Linka N., Isner J.-C., Mutterer J., Weber A. P. M., Camara B.** (2006) *Arabidopsis* SAMT1 Defines a Plastid Transporter Regulating Plastid Biogenesis and Plant Development, *Plant Cell*, 11, 3088–3105.
- 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. Biochemical.*, 72, 248-254.
- Bräutigam A. , Gagneul D. , Weber A. P. M.** (2007) High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract, *Analytical Biochemistry*, 362, 151–153.
- 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. *Molecular Plant*, 2(6), 1247–1261.

- Buchanan, B., Gruissem, W., Russel, J.L.** (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plants Physiologists, Rockville, Maryland, West Sussex, U.K.: John Wiley & Sons, Ltd.
- Catoni, E., Desimone, M., Hilpert, M., Wipf, D., Kunze, R., Schneider, A., Flügge, U.I., Schumacher, K. and Frommer, W.B.** (2003) Expression pattern of a nuclear encoded mitochondrial arginine–ornithine translocator gene from *Arabidopsis*. BMC Plant Biology, 3, 1.
- Czerpak R., Dobrzyń P., Krotke A., Kicińska E.** (2002) The Effect of Auxins and Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents in *Wolffia Arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae) Growing on Media of Various Trophicities. Polish Journal of Environmental Studies 11, 231-235
- Cheng Y., Dai X., Zhao Y.,** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. Genes Development, 20, 1790–99.
- Cheng Y., Dai X., Zhao Y.** (2007) Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. Plant Cell 19, 2, 430–39.
- Davies P.J.,** (2004) Plant Hormones. Biosynthesis, Signal transduction, Action, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Dekker J.P., Boekema E.J.** (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. 1706(1-2), 12-39.
- Donzeau M., Kaldi K., Adam A., Paschen S., Wanner G., Guiard B., Bauer M., Neupert W., Brunner M.** (2000) Tim23 Links the Inner and Outer Mitochondrial Membranes. Cell, 101, 401–412.
- 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 Journal, 46, 723–735.
- Duy D., Soll J. and Philippar K.** (2007) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. Biological Chemistry, 388, 879-889.
- Duy D.** (2009) PIC1, eine Eisen-Permease in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten. Dissertation
- Ferro M., Salvi D., Brugiére S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin J., Joyard J., Rolland N.** (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. Molecular and Cellular Proteomics, 2, 325–345.
- Ferro M., Salvi D., Riviere-Rolland H., Vermaat T., Seigneurin-Berny D., Grunwald D., Garin J., Joyard J., Rolland N.** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. Proc Natl Acad Science USA, 99:11487-11492.
- Fischer, W.N., Loo, D.D.F., Koch, W., Ludewig, U., Boorer, K.J., Tegeder, M., Rentsch, D., Wright, E.M. and Frommer, W.B.** (2002) Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. Plant Journal, 29, 717–731.
- Foyer C.H., Bloom A., Queval G., Noctor G.** (2009) Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling, Annu. Rev. Plant Biology, 60, 455–84.
- Foyer C.H., Noctor G.** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell, 17, 1866–1875.
- Foyer C.H., Theodoulou .F. L., Delrot S.** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. Trends Plant Science, 6, 486–492.

- 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. *Journal Proteome Research*, 2, 413-425.
- Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K.** (1998) Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular Tissue. *Science* 282, 2226-2230
- Geisler M., Blakeslee J., Bouchard R., Lee O., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A. Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bailly A., Richards E. L. , Ejendal E.K., Smith A. P., Baroux C, Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C. A., Dudler R., Murphy A. S., Martinoia E.** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1, *The Plant Journal* , 44, 179–194.
- Geldner, N.** (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425–8.
- Gietz R.D. und Schiestl R.H.** (1991) Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7, 253-263.
- Götze T. A.** (2009) Identifikation und Charakterisierung von porenbildenden Proteinen der inneren Chloroplastenmembran, Dissertation
- Gould S. B., Waller R. F., Mc Fadden G. I.** (2008) Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 491–517.
- Gross J., Bhattacharya D.** (2009) Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective. *Nature Reviews Genetics*, 10, 495–505.
- Hagen, G. Kleinschmidt, Guilfoyle T.** (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections, *Planta*, 162, 147-153,
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal Molecular Biology*, 166, 557-580.
- Heldt H.** (1999) Pflanzenbiochemie. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin
- Hesse H., Kreft O., Maimann S., Zeh M., Willmitzer L., Höfgen R.** (2001) Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants, *Amino Acids*, 20, 281–289.
- Hoyos, M.E., Palmieri, L., Wertin, T., Arrigoni, R., Polacco, J.C. and Palmieri, F.** (2003) Identification of a mitochondrial transporter for basic amino acids in *Arabidopsis thaliana* by functional reconstitution into liposomes and complementation in yeast. *Plant Journal*, 33, 1027–1035.
- Hull, A.K., Vij, R., Celenza, J.L.** (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the firststep of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2379-2384,
- Irizarry R.A., Hobbs B., Collin .F, Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K., Scherf U., Speed .TP.** (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)* 4: 249-264.
- Jeanguenin L., Lebaudy A., Xicluna J., Alcon C., Hosy E., Duby G., Michard E., Lacombe B., Dreyer I., Thibaud J.-B.** (2008) Heteromerization of *Arabidopsis* Kv channel α -subunits. *Plant Signaling & Behavior*, 3(9), 622-625.
- 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 Journal*, 42, 329–340.
- Kim C.A., Bowie J.U.** (2003) SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 12, 625-628.

- Kleffmann T., Russenberger D., von Zychlinski A., Christopher W., Sjölander K., Gruissem W., Baginsky S. (2004) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel functions, *Current Biology*, 14, 354-362.
- Kleiner D. (1981) The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim. Biophysica Acta* 639: 41-52.
- 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. *Molecular Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kouranov A., Wang H., Schnell D.J. (1999) Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *Journal Biological Chemistry*, 274, 25181-25186.
- Kovermann, P., Truscott, K. N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N. B., Muller, H., Jensen, R. E., Wagner, R. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular Cell*, 9, 363-373.
- Kunst L. (1998) Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Molecular Biology*, 82, 43-48.
- Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal Biochemical Biophysical Methods*, 10, 203-209.
- Lam H.-M., Coschigano K. T., Oliveira I. C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G. M. (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review Plant Physiology*, 47, 569-93.
- Lee D.Y. und Fiehn O. (2008) High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods* 4:7, 1-17
- Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R., Halford N.G. (2007) Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150, 1-26.
- Leustek T., Martin M. N., Bick J. A., Davies J. P. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review. Plant Physiology. Plant Mol. Biol*, 51, 141-65
- Lohse M., Nunes-Nesi A., Krüger P., Nagel A., Hannemann J., Giorgi F.M., Childs L., Osorio S., Walther D., Selbig J., Sreenivasulu N., Stitt M., Fernie A. R., Usadel B. (2010) Robin: An Intuitive Wizard Application for R-Based Expression Microarray Quality Assessment and Analysis. *Plant Physiology*, 153, 642-651.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maughan S. C., Pasternak M., Cairns N., Kiddle G., Brach T., Jarvis R., Haas F., Nieuwland J., Lim B., Müller C., Salcedo-Sora E., Kruse C., Orsel M., Hell R., Miller A. J., Bray P., Foyer C.H., Murray J.A.H., Meyer A. J., Cobbett C.S. (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *PNAS*, 107, 5, 23311-2336
- 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.
- Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.D., Dobrev P.I., Schwarzerová K., Rolčík J., Seifertová D., Luschnig C., Benková E., Zažímalová E., Geisler M., Friml J. (2009)

- Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459, 1136-1140.
- 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 Physiology*, 131, 1737–1747.
- Murcha M. W., Elhafez D., Millar A. H., Whelan J.** (2005) The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in *Arabidopsis* and is essential for protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 16476–16483.
- 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 Physiology*, 134, 199–212.
- Nada A., Soll J.** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *Journal Cell Science*, 117, 3975-3982.
- Neupert W., Herrmann J.M.** (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 723-749.
- Osmond C.B., Badger M., Maxwell K., Björkman O. and Leegood R.C.** (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Science*, 2, 119–121.
- Oster, U., Bloss, I., Rüdiger, W.** (1991) The greening process in cress seedlings. III. Age-dependent changes in the capacity of tetrapyrrole pathway. *Z. Naturforsch.* 46c, 1052 – 1058.
- Palmieri, L., Todd, C.D., Arrigoni, R., Hoyos, M.E., Santoro, A., Polacco, J.C. and Palmieri, F.** (2006) *Arabidopsis* mitochondria have two basic amino acid transporters with partially overlapping specificities and differential expression in seedling development. *Biochimica Biophysica Acta*, 1757, 1277–1283.
- 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.
- Philippar K., Geis T., Ilkavets I., Oster U., Schwenkert S., Meurer J. and Soll J.** (2007) Chloroplast biogenesis: The use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 678-683.
- Pohlmeyer K.** (1997) Porenbildende Proteine in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum*). Dissertation.
- 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. *Proceedings National Academy Science USA*, 94, 9504–9509.
- Ponting C.P.** (1995) A novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Science*, 4, 9, 1928.
- Pudelski B., Soll J. and Philippar K.** (2009) A search for factors influencing etioplast-chloroplast transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences 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 Biology*, 12, 42-55.
- Pujol, C., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A.M.** (2007) How can organ-ellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *Journal Molecular Biology*, 369, 356-367.

- Qiao F., Bowie J. U.** (2005) The Many Faces of SAM, *Sci. STKE* 2005, 286.
- Rassow J., Dekker P. J., van Wilpe S., Meijer M., Soll J.** (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *Journal of Molecular Biology*, 286, 105–120.
- Ravanel S., Block M. A., Rippert P., Jabrin S., Curien G., Rebeille F., Douce R.** (2004) Methionine Metabolism in Plants, *The Journal of biological Chemistry*, 279, 21, 22548–22557.
- Renne P., Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Fluügge, U.I., Westhoff, P. and Weber, A.P.M.** (2003) The *Arabidopsis* mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *Plant Journal*, 35, 316–331.
- Rentsch D. Schmidt S., Tegeder M.** (2007) Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* 581, 2281–2289.
- Reumann S., Inoue K., Keegstra K.** (2005) Evolution of the general protein import pathway of plastids (Review). *Molecular Membrane Biology*, 22, 73–86.
- Runge S., Sperling U., Frick G., Apel K., Armstrong G. A.** (1996) Distinct roles for lightdependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *Plant Journal*, 9, 513–523.
- Rüdiger W., Böhm S., Helfrich M., Schulz S., Schoch S.** (2005) Enzymes of the Last Steps of Chlorophyll Biosynthesis: Modification of the Substrate Structure Helps To Understand the Topology of the Active Centers. *Biochemistry* 44, 10864–10872
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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 Genetics*, 37, 501–506.
- Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X.** (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochemical Science*, 28, 329–335.
- Schultz J., Ponting C.P., Hofman K., Bork P.** (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Science*, 6, 249.
- 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 Physiology*, 131, 16–26.
- Ślesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Misalski Z.** (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochemica Polonica*, 54 No. 1, 39–50.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H.** (1998) Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology*, 38, 265–277.
- Smyth G.K.** (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Molecular Biology* 3
- Soll, J., and Schleiff, E.** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Molecular Cellular Biology*, 5, 198–208.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C., Suza W.** (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 17, 616–627.
- Steinkamp, T., Hill, K., Hinnah, S. C., Wagner, R., Rohl, T., Pohlmeier, K. & Soll, J.** (2000) Identification of the pore-forming region of the outer chloroplast envelope protein OEP16. *Journal Biological. Chemistry*, 275, 11758–11764.
- Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B** (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *Journal Biological Chemistry*, 283, 6656–6667.

- Steinkamp, T., Hill, K., Hinnah, S. C., Wagner, R., Rohl, T., Pohlmeier, K. & Soll, J.** (2000) Identification of the pore-forming region of the outer chloroplast envelope protein OEP16. *Journal Biological Chemistry*, 275, 11758-11764.
- Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B** (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *Journal Biological Chemistry*, 283, 6656-6667.
- Stitt M., Krapp A.** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant Cell & Environment*, 22, 583 – 621.
- Tanaka J., Fink G. R.** (1985) The histidine permease gene (HIPI) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 38, 205-214.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H2O2 in plants. H2O2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11, 1187-1194.
- Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N.** (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Structural Biology*, 8, 1074-1082.
- Villarejo A., Buren S., Larsson S., Dejardin A., Monne M., Rudhe C., Karlsson J., Jansson S., Lerouge P., Rolland N., von Heijne G., Grebe M., Bako L., Samuelsson G.** (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *National Cell Biology*, 7, 1124-1131.
- Wachter A., Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T** (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant Journal*, 41, 15–30.
- Waegemann K., Soll J.** (1995) Characterization and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods in Cell Biology*, 50, 255-267.
- 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.
- Weber A. und Flügge U.I.** (2002), Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 370.
- Weber A.P., Fischer K.** (2007) Making the connections--the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Letter*, 25, 2215-22
- Wiedemann N., Frazier A.E .** (2004) The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 14473-14476.
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. and Frommer, W.B.** (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochemical Science*, 27, 139–147.
- Woodward AW & Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* (London) 95, 707–735.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J.** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Development*, 16:3100–12.
- Zhou, C., Yang, Y.J. und Jong, A.Y.** (1990) Mini-Prep in 10 minutes. *Biotechniques*, 8, 172-173.

2 Identifikation der Proteine der 2D BN/SDS-PAGE mit Massenspektrometrie.

Die silbergefärbten Proteinbanden aus der 2D-BN/SDS-PAGE (Abbildung 30) wurden ausgeschnitten und analysiert per Massenspektroskopie identifiziert. In der ersten Spalte sind die ausgeschnittenen Proteinbanden gelistet. Die zweite Spalte listet die geschätzte Proteingröße in kDa. Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse sind in der Spalte drei und vier dargestellt. Nur Proteine mit einem Score > 100 und einer identifizierten Peptidanzahl >3 wurden in Betracht gezogen.

Spot	Score	Size [kDa]	Protein
1	678	176	GLS1/GLU1/GLUS (Ferredoxin-dependant glutamate synthase)
2	1567	82	photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
	415	83	photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
	113	177	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 2, chloroplastic
	105	47	GS2 (Glutamine Synthetase 2); glutamate-ammonia ligase
3	1130	49	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
	795	54	PTAC16 (plastic transcriptionally active 18)
	702	29	CA1 (carbonic anhydrase 1)
	663	60	TIC55 (translocon in the inner envelope of chloroplast 55)
	612	57	glucose-1-phosphate adenyltransferase
	458	61	zeta-carotene desaturase precursor
	448	55	ATP synthase CF1 alpha subunit
	282	25	LHCP AB 180 (chlorophyll a/b binding protein)
	224	63	EDA9 (embryo sac development arrest 9)
	227	58	PPO (protoporphyrinogen oxidase precursor)
	204	54	ATP synthase CF1 beta subunit
	187	43	putative fructose biphosphate aldolase
	161	52	geranylgeranyl reductase
	140	28	Lhcb2 protein
	112	112	TIC110 (translocon in the inner envelope of chloroplast 110)
4	2153	42	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit
	687	37	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit
	678	42	GAPA-2; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	615	52	photosystem II 44 kDa protein
	494	44	2-oxoglutarate/malate translocator precursor-like protein
	494	59	DIT1 (dicarboxylate transporter 1) oxoglutarate:malate antiporter
	316	25	LHCP AB 180 (chlorophyll a/b binding protein)
	315	42	putative RNA binding protein
	291	49	PDE120 (pigment defective embryo)
	284	49	aspartate aminotransferase
	276	43	AT103
	168	28	LHCB2.2 (Photosystem II light harvesting complex gene 2.2)
	134	44	PRK (phosphoribulokinase)
5	1997	56	photosystem II 47 kDa protein
	1022	54	PTAC16 (plastic transcriptionally active 18)
	765	54	ATP synthase CF1 beta subunit
	470	52	photosystem II 44 kDa protein
	467	52	At2g39730/T5I7.3
	429	58	putative acetyl-CoA carboxylase
	339	53	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein

	325	60	dihydrolipoamide dehydrogenase 2, plastidic
	284	52	geranylgeranyl reductase
	267	53	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein
	253	51	AtRABE1b/AtRab8D
	224	63	ketol-acid reductoisomerase

3 DNA-Microarray -Analyse

Tabelle 9: Regulation der Genexpression (TOP10) in der *prat2*-Doppelmutante im Langtag.

Die gemittelten Signal-Werte (n=3), die Signalunterschiede sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) sind angegeben. Der AGI-Code (*Arabidopsis* Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens erhöht ist bzw. negativ, wenn die Transkription eines Gens gegenüber dem Wildtyp erniedrigt ist.

NAME	AGI	WT	C2DM	FCH	P-WERT
Hoch					
SEN1; senescence-associated protein	At4g35770	55	5578	102,18	2,5E-08
Glycine-reiches Protein	At2g05540	91	3724	40,98	2,9E-11
ASN1; glutamine-abhängige Asparaginsynthetase	At3g47340	57	2134	37,22	4,3E-07
HFR1; putative bHLH-type transcription factor	At1g02340	16	462	28,63	4,1E-11
BXL1; extracellular matrix-localized beta-xylosidase	At5g49360	245	6972	28,46	9,1E-11
uncharakterisiert	At4g27450	101	2270	22,58	5,4E-10
BT2; BTB und TAZ Domain Protein 2	At3g48360	140	2958	21,20	2,8E-04
ERD5; proline oxidase	At3g30775	267	5325	19,94	1,6E-08
Alkoholdehydrogenase	At1g09500	12	219	18,87	8,8E-11
ATBCAT-2; branched-chain amino acid aminotransferase	At1g10070	21	360	17,03	1,1E-09
SAG13; putative tropinone dehydrogenase-type oxidoreductase	At2g29350	26	435	16,77	1,2E-04
Herab					
<i>PRAT2.2</i>	At5g24650	1808	27	0,01	2,3E-13
putative lipid-transfer protein	At5g48490	5591	219	0,04	8,9E-09
CPuORF32 ; phosphoethanolamine N-methyltransferase	At1g73600	3207	162	0,05	3,8E-11
MES18; methyl esterase	At5g58310	301	19	0,06	6,3E-11
Trypsin inhibitor	At2g43550	535	37	0,07	8,9E-11
PORB; NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	At4g27440	2137	150	0,07	1,6E-09
unbekanntes Protein	At1g59930	304	23	0,08	1,0E-07
nicht benannt	At1g13650	270	26	0,10	3,7E-09
nicht benannt	At5g22580	920	95	0,10	1,3E-09
MEE3	At2g21650	1175	125	0,11	3,5E-07
<i>PRAT2.1</i>	At3g49560	979	106	0,11	6,2E-10

Tabelle 10: Regulation der Genexpression (TOP10) in der *prat2*-Doppelmutante im Dauerlicht.

Die gemittelten Signal-Werte (n=3), die Signalunterschiede sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) sind angegeben. Der AGI-Code (*Arabidopsis* Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens erhöht ist bzw. negativ, wenn die Transkription eines Gens gegenüber dem Wildtyp erniedrigt ist.

NAME	AGI	WT	C2DM	FCH	P-WERT
Hoch					
BT2; BTB und TAZ Domain Protein2	At3g48360	172	2290	13,31	3,8E-04
AlG1; Avrrpt2-induced Gene1	At1g33960	14	168	12,26	6,4E-04
NIA1; Nitrate reduktase1	At1g77760	512	5119	10,00	1,6E-05
unbekanntes Protein	At5g57785	68	598	8,80	1,1E-07
BE1; putative glycoside hydrolase	At3g20440	34	232	6,89	1,7E-06
ATNUDT6; ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase	At2g04450	66	424	6,43	5,0E-05
C3HC4-type RING finger	At5g60250	20	127	6,28	2,5E-07
unbekanntes Protein	At2g21640	84	466	5,54	5,0E-07
Glutaredoxin Familie	At4g15680	121	648	5,37	1,7E-03
putative PfkB-type carbohydrate or pyrimidine kinase	At1g69200	160	858	5,37	4,7E-08
2-OG-Fe(II) Oxygenase	At4g10500	44	231	5,21	6,2E-03
Herab					
PRAT2.1	At5g24650	1036	29	0,03	4,1E-15
COR414-TM1; cold-regulated protein	At1g29395	1140	85	0,07	3,2E-07
Aspartylprotease	At1g62290	155	17	0,11	5,1E-12
AtMYB47; putativ Myb-typ Transkriptionsfaktor	At1g18710	194	23	0,12	2,3E-06
ASN1, glutamine-abhängige Asparaginsynthetase	At3g47340	529	68	0,13	2,4E-03
unbekanntes Protein	At4g19430	227	30	0,13	1,3E-04
COR15A; cold-regulated protein	At2g42540	3589	477	0,13	5,6E-06
uncharakterisiert	At4g01390	676	90	0,13	3,1E-05
LHCB2.4; ight-harvesting chlorophyll a/b binding protein	At3g27690	8926	1203	0,13	4,7E-05
AHP4; histidine phosphotransfer protein	At3g16360	121	16	0,14	3,2E-04
GCN5; putative GNAT-type N-acetyltransferase	At2g39030	456	69	0,15	4,0E-04

Tabelle: Schnittmenge aus den hochregulierten Genen im Langtag und im Dauerlicht

Der AGI Code, der Mapman –Bin und der Proteinname sind gelistet.

AGI	MapMan Bin-Code	Gen-NAME
At1g54740	[29.2.1.99.99] protein.synthesis.ribosomal protein	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown
At1g76720	[29.2.3] protein.synthesis.initiation	GTP binding / GTPase/ translation initiation factor
At4g03320	[29.3.3] protein.targeting.chloroplast	tic20-IV (TRANSLOCON AT THE INNER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 20-IV)
At4g11890	[29.4.1] protein.postranslational modification.kinase	protein kinase family protein
At2g26980	[29.4] protein.postranslational modification	SnRK3.17__CIPK3 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 3)
At4g02390	[29.4] protein.postranslational modification	ATPARP1__PARP1__APP (ARABIDOPSIS POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE)
At1g67520	[29.4] protein.postranslational modification	lectin protein kinase family protein
At5g22920	[29.5.11.4.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At5g60250	[29.5.11.4.2] protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At4g25835	[29.5.9] protein.degradation.AAA type	AAA-type ATPase family protein
At1g23390	[29.5.11.4.3.2] protein.degradation.ubiquitin	kelch repeat-containing F-box family protein
At3g48360	[29.5.11.4.5.2] protein.degradation.ubiquitin.	ATBT2__BT2 (BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 2); protein binding
At4g37610	[29.5.11.4.5.2] protein.degradation.ubiquitin.	BT5 (BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 5); protein binding / transcription regulator
At5g42830	[16.2] secondary metabolism.phenylpropanoids	transferase family protein
At1g72680	[16.2.1.10] secondary metabolism.phenylpropanoids	ATCAD1__CAD1__cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative
At5g39050	[16.8.1.21] secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.	transferase/ transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
At1g28330	[33.99] development.unspecified	DRM1__DYL1 (DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN-LIKE 1)
At5g14120	[33.99] development.unspecified	nodulin family protein
At5g13180	[33.99] development.unspecified	ANAC083 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 83); transcription factor
At1g36180	[11.1.1] lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation	ACC2 (ACETYL-COA CARBOXYLASE 2); acetyl-CoA carboxylase
At1g63180	[10.1.2] cell wall.precursor synthesis.UGE	UGE3 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 3);
At5g49360	[10.6.2] cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	ATBXL1__BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
At5g64570	[10.6.2] cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	ATBXL4__XYL4; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xylan 1,4-beta-xylosidase
At1g33720	[26.10] misc.cytochrome P450	CYP76C6; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
At1g09500	[26.11.1] misc.alcohol dehydrogenases	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family / CAD family
At4g34138	[26.2] misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	UGT73B1 (UDP-glucosyl transferase 73B1);
At4g34135	[26.2] misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	UGT73B2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 73B2);
At5g56870	[26.3.2] misc..beta-galactosidase	BGAL4 (beta-galactosidase 4); beta-galactosidase
At5g16980	[26.7] misc.oxidases - copper, flavone etc.	NADP-dependent oxidoreductase, putative
At1g23010	[26.7] misc.oxidases - copper, flavone etc.	LPR1 (Low Phosphate Root1); copper ion binding / oxidoreductase

At3g09270	[26.9] misc.glutathione S transferases	ATGSTU8 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 8); glutathione transferase
At5g37500	[34.15] transport.potassium	GORK (GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K ⁺ CHANNEL);
At4g28390	[34.9] transport. transportes at mitochondrial m.	ATAAC3__AAC3 (ADP/ATP CARRIER 3); ATP:ADP antiporter/ binding
At2g04040	[34.99] transport.misc	ATDTX1__TX1; antiporter/ multidrug efflux pump/ multidrug transporter/ transporter
At2g04050	[34.99] transport.misc	MATE efflux family protein
At2g39570	[35.1.1023] not assigned.no ontology	ACT domain-containing protein
At5g65660	[35.1.41] not assigned.no ontology.	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At2g25590	[35.1.2] not assigned.no ontology.	agenet domain-containing protein
At2g05540	[35.1.40] not assigned.no ontology	glycine-rich protein
At3g49790	[35.2.1001] not assigned.unknown	ATP binding
At3g29180	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g15790	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g24280	[35.2.1001] not assigned.unknown	BEST protein match is: DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) (TAIR:AT3G49250.1);
At1g30160	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g13340	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g57785	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g52900	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g49500	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At2g31945	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g21520	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g60260	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At3g57520	[3.1.2.2] minor CHO metabolism..raffinose synthases	AtSIP2 (Arabidopsis thaliana seed imbibition 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
At5g20250	[3.1.2.2] minor CHO metabolism..raffinose synthases	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
At1g23870	[3.2.3] minor CHO metabolism.trehalose	TPS9__ATPS9; transferase, transferring glycosyl groups / trehalose-phosphatase
At5g61440	[21.1] redox.thioredoxin	ACHT5 (ATYPICAL CYS HIS RICH THIOREDOXIN 5)
At4g15660	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At1g03020	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At4g15680	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At4g15700	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At1g03850	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At4g15690	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At4g11890	[30.2.17] signalling.receptor kinases.DUF 26	protein kinase family protein
At5g23330	[18.3] Co-factor and vitamine metabolism.riboflavin	riboflavin biosynthesis protein-related

At1g33960	[20.1.3] stress.biotic.signalling	AIG1 (AVRRPT2-INDUCED GENE 1); GTP binding
At1g30820	[23.1.1.10] nucleotide metabolism.synthesis.pyrimidine	CTP synthase, putative / UTP--ammonia ligase, putative
At5g08350	[17.1.3] hormone metabolism.abscisic acid.	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related
At4g27450	[17.2.3] hormone metabolism.auxin.	unknown protein
At3g30775	[13.2.2.2] amino acid metabolism.degradation	AT-POX, ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5); proline dehydrogenase
At5g49450	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	AtbZIP1 (Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 1)
At1g09415	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	NIMIN-3 (NIM1-INTERACTING 3)
At4g37540	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	LBD39 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 39)
At4g22950	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	GL19__AGL19 (AGAMOUS-LIKE 19); transcription factor
At2g25000	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	ATWRKY60__WRKY60; transcription factor
At3g53310	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	transcriptional factor B3 family protein
At1g79700	[27.3.35] RNA.regulation of transcription	ovule development protein, putative

Tabelle: Schnittmenge aus den herabregulierten Gene im Langtag und im Dauerlicht

Der AGI Code, der Mapman –Bin und der Proteinname sind gelistet.

AGI	MapMan Bin-Code	Gen-NAME
At3g27690	[1.1.1.1] PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LHCB2.4__LHCB2.3; chlorophyll binding
At2g30790	[1.1.1.2] PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	PSBP-2 (photosystem II subunit P-2); calcium ion binding
At3g49560	[29.3.2] protein.targeting.mitochondria	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein
At5g24650	[29.3.2] protein.targeting.mitochondria	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein
At5g44530	[29.5.1] protein.degradation.subtilases	subtilase family protein
At4g33490	[29.5] protein.degradation	aspartic-type endopeptidase
At5g52570	[16.1.4] secondary metabolism.isoprenoids.carotenoids	B2_BCH2_CHY2__BETA-OHASE 2 (BETA-CAROTENE HYDROXYLASE 2
At4g23600	[16.4.1.1007] secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	JR2__CORI3 (CORONATINE INDUCED 1); cystathionine beta-lyase
At1g65860	[16.5.1.1.1.10] secondary metabolism.sulfur-containing	FMO GS-OX1 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 1
At1g62560	[16.5.1.1.1.10] secondary metabolism.sulfur-containing	FMO GS-OX3 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 3
At1g18590	[16.5.1.1.1.9] secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates	ATSOT17_ATST5C__SOT17 (SULFOTRANSFERASE 17
At4g39950	[16.5.1.1.3.1] secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates	CYP79B2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
At4g03060	[16.5.1.1.1.11] secondary metabolism.sulfur-containing	
At3g58990	[16.5.1.1.1.4] secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates	IPMI1__aconitase C-terminal domain-containing protein
At4g27570	[16.8.1.1001] secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins	glycosyltransferase family protein
At4g13560	[33.99] development.unspecified	UNE15 (unfertilized embryo sac 15)
At1g44800	[33.99] development.unspecified	nodulin MtN21 family protein
At5g03760	[10.2] cell wall.cellulose synthesis	ATCSLA9_CSLA09_CSLA9_RAT4__ATCSLA09; mannan synthase
At1g67750	[10.6.3] cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	pectate lyase family protein
At5g48900	[10.6.3] cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	pectate lyase family protein
At2g32990	[10.6.1] cell wall.degradation.cellulases and beta -1,4-glucanases	AtGH9B8 (Arabidopsis thaliana glycosyl hydrolase 9B8
At2g20750	[10.7] cell wall.modification	ATHEXP BETA 1.5_EXPB1__ATEXPB1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B1)
At1g20190	[10.7] cell wall.modification	ATEXP11_ATHEXP ALPHA 1.14_EXP11 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN 11)
At4g28250	[10.7] cell wall.modification	ATHEXP BETA 1.6_EXPB3__ATEXPB3 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B3)
At3g44990	[10.7] cell wall.modification	ATXTR8_XTH31__XTR8 (XYLOGLUCAN ENDO-TRANSGLYCOSYLASE-RELATED 8
At1g13080	[26.10] misc.cytochrome P450	CYP71B2 (CYTOCHROME P450 71B2); electron carrier/ heme binding
At4g39950	[26.10] misc.cytochrome P450	CYP79B2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
At5g52320	[26.10] misc.cytochrome P450	CYP96A4; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding

At4g39510	[26.10] misc.cytochrome P450	CYP96A12; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
At3g01510	[26.13] misc.acid and other phosphatases	LSF1__5'-AMP-activated protein kinase beta-1 subunit-related
At3g17130	[26.18] misc.invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
At4g12880	[26.19] misc.plastocyanin-like	plastocyanin-like domain-containing protein
At5g48490	[26.21] misc.protease inhibitor	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At5g05960	[26.21] misc.protease inhibitor	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At1g18590	[26.25] misc.sulfotransferase	ATSOT17_ATST5C__SOT17 (SULFOTRANSFERASE 17);
At1g64390	[26.3.4] misc.gluco-, galacto- and mannosidases.endoglucanase	AtGH9C2 (Arabidopsis thaliana glycosyl hydrolase 9C2); carbohydrate binding
At1g65860	[26.7] misc.oxidases - copper, flavone etc.	FMO GS-OX1 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 1
At1g62560	[26.7] misc.oxidases - copper, flavone etc.	FMO GS-OX3 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 3
At5g17220	[26.9] misc.glutathione S transferases	GST26_TT19__ATGSTF12 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 12
At3g03190	[26.9] misc.glutathione S transferases	ATGSTF6__ATGSTF11 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F11); glutathione transferase
At3g23080	[35.1.1023] not assigned.no ontology	BEST protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G14500.1
At4g01390	[35.1.1023] not assigned.no ontology	; BEST protein match is: meprin and TRAF homology domain-containing protein
At1g80280	[35.1.1023] not assigned.no ontology	hydrolase, alpha/beta fold family protein
At3g46490	[35.1.1023] not assigned.no ontology	iron ion binding / oxidoreductase/ oxidoreductase,
At4g15620	[35.1.1023] not assigned.no ontology	integral membrane family protein
At2g22170	[35.1.1023] not assigned.no ontology	lipid-associated family protein
At1g29395	[35.1.1023] not assigned.no ontology	COR413-TM1_COR413IM1__COR414-TM1
At5g22460	[35.1.1023] not assigned.no ontology	esterase/lipase/thioesterase family protein
At3g21190	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g27030	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At3g17120	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At3g06035	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g24660	[35.2.1001] not assigned.unknown	LSU2 (RESPONSE TO LOW SULFUR 2)
At3g57780	[35.2.1001] not assigned.unknown	BEST protein match is: nucleolar protein gar2-related (TAIR:AT2G42320.2);
At4g01080	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At5g12050	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At2g42610	[35.2.1001] not assigned.unknown	LSH10 (LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 10)
At3g26960	[35.2.1001] not assigned.unknown	unknown protein
At1g75780	[31.1] cell.organisation	TUB1; GTP binding / GTPase/ structural molecule
At4g27440	[19.14] tetrapyrrole synthesis.protochlorophyllide reductase	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B
At5g54190	[19.14] tetrapyrrole synthesis.protochlorophyllide reductase	PORA; oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase

At1g69720	[19.21] tetrapyrrole synthesis.heme oxygenase	ho3 (HEME OXYGENASE 3); heme oxygenase (decyclizing)
At4g39210	[2.1.2.1] major CHO metabolism.synthesis	APL3; glucose-1-phosphate adenyllyltransferase
At1g55120	[3.5] minor CHO metabolism.others	AtcwINV3__ATFRUCT5 (BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 5
At2g47880	[21.4] redox.glutaredoxins	glutaredoxin family protein
At5g12940	[30.2.11] signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	leucine-rich repeat family protein
At1g29720	[30.2.8.2] signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII-2	protein kinase family protein
At1g34760	[30.7] signalling.14-3-3 proteins	GF14 OMICRON_RHS5__GRF11 (GENERAL REGULATORY FACTOR 11
At4g23600	[15.2] metal handling.binding, chelation and storage	JR2__CORI3 (CORONATINE INDUCED 1); cystathionine beta-lyase/ transaminase
At2g42540	[20.2.2] stress.abiotic.cold	COR15A (COLD-REGULATED 15A)
At2g42530	[20.2.2] stress.abiotic.cold	COR15B (COLD REGULATED 15B)
At3g25760	[20.2.3] stress.abiotic.drought/salt	ERD12__AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1); allene-oxide cyclase
At3g14200	[20.2.1] stress.abiotic.heat	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
At4g18440	[23.1.2.8] nucleotide metabolism	adenylosuccinate lyase, putative / adenylosuccinase, putative
At4g03060	[17.6.1.1001] hormone metabolism.gibberelin	
At5g42650	[17.7.1.3] hormone metabolism.jasmonate	CYP74A_DDE2__AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE
At3g02020	[13.1.3.6.1.1] amino acid metabolism.synthesis.aspartate	AK3 (ASPARTATE KINASE 3); aspartate kinase
At4g23600	[13.2.6.2] amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	JR2__CORI3 (CORONATINE INDUCED 1); cystathionine beta-lyase/ transaminase
At2g20570	[27.3.20] RNA.regulation of transcription	ATGLK1_GLK1__GPRI1 (GBF'S PRO-RICH REGION-INTERACTING FACTOR 1
At1g73870	[27.3.7] RNA.regulation of transcription	zinc finger (B-box type) family protein
At2g34620	[27.3.99] RNA.regulation of transcription	mitochondrial transcription termination factor-related / mTERF-related
At1g59930	[27.3.24] RNA.regulation of transcription	unknown protein
At5g53200	[27.3.24] RNA.regulation of transcription	TRY (TRIPTYCHON); DNA binding / transcription factor
At2g21650	[27.3.24] RNA.regulation of transcription	ATRL2_RSM1__MEE3 (MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 3
At5g07030	[27.3.24] RNA.regulation of transcription	aspartic-type endopeptidase
At4g04830	[27.3.24] RNA.regulation of transcription	ATMSRB5__methionine sulfoxide reductase domain-containing protein
At4g14680	[14.1] S-assimilation.APS	APS3; sulfate adenyllyltransferase (ATP)
At2g14750	[14.15] S-assimilation.AKN	AKN1__APK1__ATAKN1__APK (APS KINASE
At4g39940	[14.15] S-assimilation.AKN	APK2__AKN2 (APS-kinase 2
At4g04610	[14.2] S-assimilation.APR	ATAPR1_PRH19__APR1 (APS REDUCTASE 1); adenylyl-sulfate reductase

Tabelle: Herab regulierte Gene der Tetrapyrrolsynthese im Langtag und im

Dauerlicht

Die gemittelten Signal-Werte (n=3), die Signalunterschiede sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) sind angegeben. Der AGI-Code (*Arabidopsis* Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens erhöht ist bzw. negativ, wenn die Transkription eines Gens gegenüber dem Wildtyp erniedrigt ist.

Langtag				
AGI	Name	Signaldifferenz	FCH	P-Vaue
At4g27440	PORB	1986	0,07	1,6E-09
At5g54190	PORA	59	0,24	2,7E-08
At1g03630	POR C	2023	0,29	4,8E-09
At1g03475	Coproporphyrinogen oxidase	789	0,38	1,0E-07
At5g40850	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	748	0,39	5,0E-06
At5g45930	CHLI2 magnesium chelatase l2	622	0,41	1,0E-05
At1g69720	Heme oxygenase	58	0,41	7,5E-05
At2g40490	Uroporphyrinogen decarboxylase	691	0,41	1,0E-03
At3g14930	Uroporphyrinogen decarboxylase	832	0,46	3,8E-08
At5g08280	Hydroxymethylbilane synthase	1797	0,48	4,8E-06
At5g18660	3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase	624	0,48	1,2E-05
Dauerlicht				
At4g27440	PORB	3233	0,40	1,8E-02
At5g54190	PORA	94	0,34	3,2E-04
At1g69720	Hämoxygenase	37	0,50	9,4E-03

Tabelle: Herab regulierte Gene der Glucosinolatbiosynthese im Langtag und im Dauerlicht

Die gemittelten Signal-Werte (n=3), die Signalunterschiede sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) sind angegeben. Der AGI-Code (*Arabidopsis* Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens erhöht ist bzw. negativ, wenn die Transkription eines Gens gegenüber dem Wildtyp erniedrigt ist.

Langtag				
AGI	Name	Signaldifferenz	FCH	P-Waue
At1g62560	Glucosinolate S-oxygenase	516	0,21	2,8E-06
At1g65860	3-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase	331	0,28	2,9E-05
At4g03060	AOP2 oxidoreductase	206	0,20	6,8E-06
At3g58990	Aconitase	324	0,27	1,8E-03
At2g43100	Aconitase	286	0,34	7,1E-04
At1g16410	CYP79F1 Cytochrome P450 79F1 oxidoreductase	86	0,42	9,6E-03
At1g18590	SOT17 desulfoglucosinolate sulfotransferase	372	0,21	3,2E-05
At1g74090	SOT18 , 3-methylthiopropyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase	728	0,49	7,4E-04
At4g39950	CYP79B2; electron carrier/ heme binding	426	0,27	3,2E-05
At5g07690	MYB29 Transkriptionsfaktor	284	0,17	2,9E-09
At5g61420	MYB28 Transkriptionsfaktor	539	0,45	1,4E-05
At3g14210	ESM1 carboxylesterase	5834	0,47	1,1E-04
At4g12030	Bile acid:sodium symporter family protein	317	0,38	9,7E-04
Dauerlicht				
At1g62560	Glucosinolate S-oxygenase	427	0,45	2,8E-02
At1g65860	3-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase	205	0,48	2,8E-02
At4g03060	AOP2 oxidoreductase	160	0,42	3,8E-02
At3g58990	Aconitase	508	0,41	1,2E-02
At1g18590	SOT17 desulfoglucosinolate sulfotransferase	432	0,39	3,2E-03
At4g39950	CYP79B2; electron carrier/ heme binding	501	0,42	1,6E-02
At5g60890	MYB Domain Protein 34	144	0,47	2,2E-02

Tabelle: Schnittmenge der hochregulierten Gene im Langtag (1178 Gene) und der herabregulierten Gene im Dauerlicht (220 Gene).

Der AGI Code und der Proteinname sind gelistet.

AGI	Genname
At5g56980	expressed protein, non-consensus CG donor splice site at exon 1, GA donor splice site at exon 3
At5g59780	MYB59-myb family transcription factor (MYB59)
At4g15530	similar to pyruvate,orthophosphate dikinase [Flaveria brownii]
At5g09220	AAP2-amino acid permease 2 (AAP2), identical to amine acid permease AAP2 (Arabidopsis thaliana)
At5g13200	ABA-responsive protein-related, similar to ABA-responsive protein (Hordeum vulgare)
At4g24450	ATGWD2-GWD3-PWD-similar to starch excess protein (SEX1) [Arabidopsis thaliana]
At3g47340	Asparagine synthetase (Glutamine- dependent asparagine synthetase)
At1g73480	hydrolase, alpha/beta fold family protein
At1g61890	MATE efflux family protein, similar to ripening regulated protein DDTFR18 (Lycopersicon esculentum)

12 DANKSAGUNG

Mein allererster und besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Soll für die Überlassung und Finanzierung eines ausgesprochen interessanten Forschungsthemas und für die Unterstützung während der letzten vier Jahre.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch PD Dr. Cordelia Bolle sowie den weiteren Prüfern Prof. Dr. Mascher, Prof. Dr. Straka, Prof. Dr. Geigenberger und Prof. Dr. Lahaye für die Bereitschaft diese Arbeit ebenfalls zu begutachten.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Katrin Philippar und Dr. Manuela Baumgartner für die einmalig gute Betreuung und die Zeit, die sich jederzeit für mich genommen haben.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im und außerhalb des Labors danken. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Kollege Mayer für die Dienste an den Zentrifugen während den Aufarbeitungen und die Mitfahrgelegenheiten bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung von Dr. Ulrike Oster bei den HPLC-Analysen, Katrin Weber für die Durchführung der Metabolitenanalysen, Dr. Irene Gügel für die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen, Dr. Lars Israel für die Proteinidentifikation per Massenspektroskopie, Benjamin Faix und Andreas Jungfer für die Unterstützung mit den Computerprogrammen Vanted und Word, Dr. Alexander Götze für die elektrophysiologischen Messungen, Angela Dietzmann für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops und dem Gewächshausteam für die Pflege der Pflanzen. Eure Kooperationsbereitschaft, eure Hilfsbereitschaft und die bereichernden Diskussionen haben in maßgebendem Umfang zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Anna Stengel, Penelope Strittmatter, Dr. Elisabeth Ankele, Dr. Daniela Duy und meiner Schwester, die sich Zeit für das Korrekturlesen genommen haben.

Meinen Eltern, meiner Schwester und Jan danke ich für die Unterstützung und den Rückhalt, auf den ich mein ganzes Leben jederzeit zählen konnte.

13 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sabrina Maria Kraus

PUBLIKATIONEN

Mathias Blum, Martine Boehler, Eva Randall, Vanessa Young, Michael Csukai, **Sabrina Kraus**, Florence Moulin, Gabriel Scalliet, Anna Avrova, Stephen Whisson, Raymonde Fonne-Pfister (2010); Mandipropamid, a novel carboxylic acid amide, inhibits cellulose cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*; Molecular Plant Pathology , Volume 11, Issue 2, 227-243.

Reinhardt, C.F., **Kraus, S.**, Walker, F., Foxcroft, L., Robbertse, P., Hurle, K., 2004; The allelochemical parthenin is sequestered at high level in capitate-sessile trichomes on leaf surfaces of *Parthenium hysterophorus* L.; Journal Plant Disease 19; 253-261

IM RAHMEN DIESER DISSERTATION ENTSTANDENER ÜBERSICHTSARTIKEL

Birgit Pudelski, **Sabrina Kraus**, Katrin Philippar (2010); The preprotein and amino acid transporters in chloroplasts and mitochondria of plants; Plant Biology. Volume 12, 42-55, Supplement 1.

14 EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

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

München, den

Sabrina Kraus

15 ERKLÄRUNG

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

München, den

Sabrina Kraus