

**Analyse und funktionelle Komplementation  
von GABA-Stoffwechselmutanten in  
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Annemarie Reichel**  
aus Halberstadt

Mai 2013

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Marcel Bucher

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der GABA-Stoffwechsel in Pflanzen .....	1
1.1.1	GABA-Transaminase (GABA-T).....	3
1.1.2	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) .....	3
1.1.3	GABA in Pflanzen.....	4
1.2	Der Citratzyklus (Krebs-Zyklus) in Pflanzen.....	5
1.2.1	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex) .....	7
1.2.2	Succinat/Fumarat Transporter.....	9
1.3	Zielsetzung .....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1	Chemikalien .....	12
2.2	Enzyme.....	12
2.3	Antibiotika .....	12
2.4	Verwendete Geräte .....	12
2.5	Kommerzielle Kits.....	13
2.6	Oligonukleotide.....	13
2.7	Bakterien .....	18
2.8	Wasserqualität.....	18
2.9	Pflanzenmaterial.....	19
2.10	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
2.10.1	Screening von T-DNA-Insertionslinien .....	19
2.10.2	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen .....	20
2.10.3	Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen .....	20
2.10.4	Herstellung von MS (Murashige & Skoog)-Platten .....	21
2.10.5	Auslegen von Arabidopsis-Samen auf Sterilmедien.....	21
2.10.6	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
2.10.7	Anzucht- und Wachstumsbedingungen .....	22
2.10.8	Dokumentation des Pflanzenwachstums .....	23
2.11	Transiente Expression von Proteinen in <i>N. benthamiana</i> .....	23
2.12	Mikrobiologische Methoden.....	24
2.12.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	24
2.12.2	Arbeiten mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
2.13	Molekularbiologische Methoden .....	28
2.13.1	Plasmid-Präparationen im Minimaßstab .....	28
2.13.2	Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
2.13.3	Isolierung von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29

2.13.4	Verdau von DNA .....	29
2.13.5	Reverse Transkription .....	30
2.13.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	30
2.13.7	Agarosegelelektrophorese (DNA-Gel) .....	30
2.13.8	PCR.....	31
2.13.9	Restriktion von Nukleinsäuren .....	32
2.13.10	Elution von DNA-Fragmenten .....	32
2.13.11	Sequenzierung .....	32
2.13.12	Artificial micro RNA (amiRNA) .....	33
2.13.13	Gateway <sup>®</sup> -Klonierung.....	34
2.13.14	Vector-Karten .....	35
2.13.15	DAB-Färbung .....	38
2.14	Biochemisches Arbeiten .....	38
2.14.1	GC/MS-Analyse .....	38
2.14.2	HPLC- Analyse.....	42
2.15	Signifikanztest .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Analyse der Doppelmutante <i>gaba-t x ssadh</i> .....	45
3.2	Rettung des Kurztagphänotyps der <i>gs</i> Doppelmutante .....	53
3.2.1	Überexpression von GABA-Shunt Genen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> im Hintergrund der <i>gs</i> Doppelmutante .....	53
3.2.2	Kreuzung <i>bcat x gs</i> .....	59
3.2.3	EMS- Mutagenese im <i>gs</i> Hintergrund .....	60
3.3	Rettung des <i>ssadh</i> Phänotyps .....	73
3.3.1	Kreuzung <i>pdk x ssadh x NADme1 x NADme2</i> .....	73
3.3.2	Überexpression von GABA-Stoffwechsel Genen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> im Hintergrund der <i>ssadh</i> Mutante.....	74
3.3.3	Herstellung von <i>SSADH</i> MikroRNA Linien (amiSSADH) .....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
4.1	Analyse der Doppelmutante <i>gaba-t x ssadh</i> .....	82
4.2	Rettung des Kurztagphänotyps der <i>gs</i> Doppelmutante .....	85
4.3	Rettung des <i>ssadh</i> Phänotyps .....	90
4.4	<i>SSADH</i> MikroRNA Linien (amiSSADH) .....	91
<b>5</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>

<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der GABA-Stoffwechsel in Pflanzen

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und besitzt ein Kohlenstoffgerüst aus vier Kohlenstoffatomen (siehe Abbildung 1). Die Aminogruppe befindet sich am dritten Kohlenstoffatom nach dem Carboxyl-Kohlenstoffatom. Bei Pflanzen wird im Zytosol durch eine Decarboxylierung der Carboxylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom die Aminosäure Glutamat zu GABA synthetisiert (siehe Abbildung 2). Diese Reaktion wird durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15) katalysiert. GABA wird von einer GABA Permease (GABP) und vermutlich weiteren Transportern über die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix transportiert (Michaeli *et al.*, 2011). Hier wird durch die GABA-Transaminase (GABA-T) GABA und Pyruvat zu Succinat-Semialdehyd (SSA) und Alanin. Das entstandene SSA ist eine sehr reaktive Substanz und kann sowohl durch Oxidation als auch durch Reduktion abgebaut werden. Die Oxidation wird in der Mitochondrienmatrix durch eine Dehydrogenase (SSADH) katalysiert, und das entstandene Succinat kann anschließend im Citratzyklus weiter metabolisiert werden. Bei dieser Reaktion entsteht NADH für die Atmungskette, um ATP herzustellen. Dagegen findet die Reduktion von SSA im Zytosol statt. Hierbei entsteht durch das Enzym  $\gamma$ -Hydroxybutyratdehydrogenase (GHBDH, EC 1.1.1.61) in einer NADH-abhängigen Reaktion  $\gamma$ -Hydroxybutyrat (GHB) (Breitkreuz *et al.*, 2003).

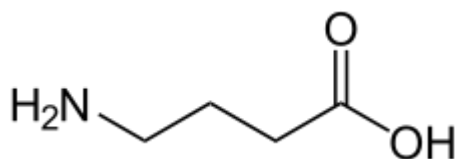


Abbildung 1: Strukturformel von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA).

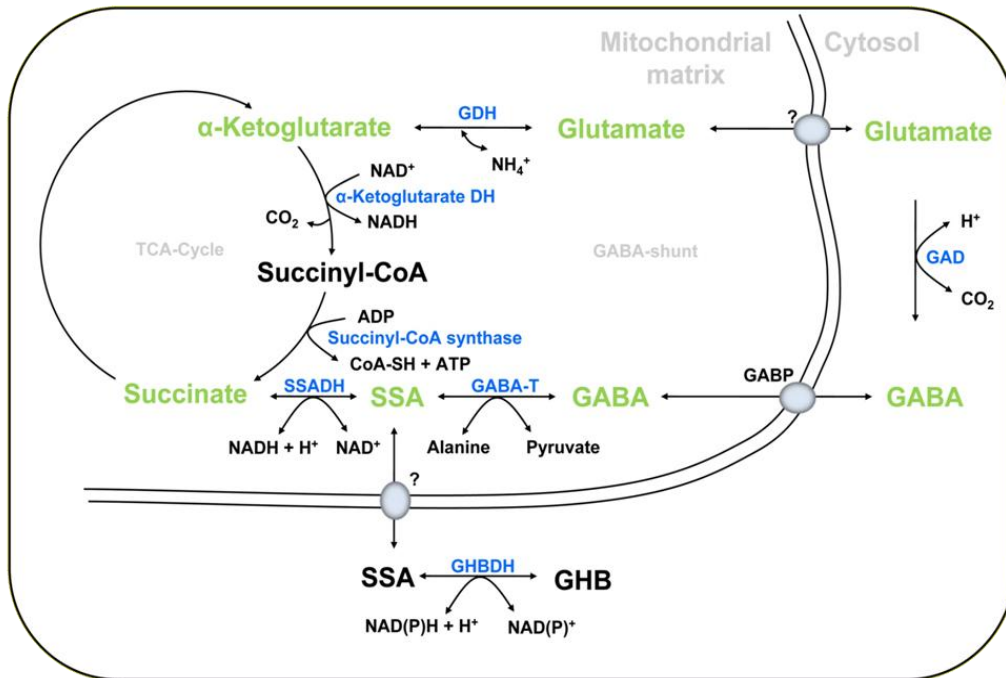


Abbildung 2: Darstellung des GABA-Stoffwechselwegs in Pflanzen.

Es ist bekannt, dass GABA in Pflanzen sehr schnell als Reaktion auf verschiedene Stressbedingungen zu hohen Konzentrationen akkumuliert (Kinnersley *et al.*, 2000;Wallace *et al.*, 1984). Diese Akkumulation wurde in Zusammenhang mit einem niedrigen zytosolischen pH-Wert gebracht, da bei der GABA-Synthese Protonen benötigt werden (Crawford *et al.*, 1994). Es konnte auch gezeigt werden, dass der erhöhten GABA-Synthese ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vorausgeht (Cholewa *et al.*, 1997). Dies geschieht, da die GAD eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Calmodulin (CaM)-Bindedomäne besitzt. Unter Stressbedingung wird  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle ausgeschüttet und bindet an CaM. Diese Verbindung bindet an die Domäne der GAD und aktiviert diese (Arazi *et al.*, 1995;Snedden *et al.*, 1995;Zik *et al.*, 1998). GABA dient ebenfalls als Osmoregulator (Shelp *et al.*, 1999) und ist ein Nebenweg des Citratzyklus, der bei einer Blockade der Citratzyklus Kohlenstoffe über den GABA-Shunt bereitstellen kann (Studart-Guimaraes *et al.*, 2007). Hierbei konnte in Tomate gezeigt werden, dass bei einer verringerten Aktivität der Succinyl-CoA Ligase (ein Enzym des Citratzyklus) die Enzyme des GABA-Stoffwechselwegs hochreguliert werden. Somit wird Succinat als Kohlenstoffquelle über den GABA-Stoffwechsel hergestellt und wieder in den Citratzyklus eingeschleust.

### 1.1.1 GABA-Transaminase (GABA-T)

Die GABA-Transaminase (GABA-T, EC 2.6.1.19) katalysiert in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion die Übertragung einer Aminogruppe von GABA auf Pyruvat, wobei Alanin und SSA gebildet werden. In Säugetieren, Hefen und *E.coli* wird ausschließlich  $\alpha$ -Ketoglutarat als Aminoakzeptor für die Reaktion verwendet (Bartsch *et al.*, 1990; De Biase *et al.*, 1995), wobei die pflanzlichen GABA-Transaminasen sowohl  $\alpha$ -Ketoglutarat als auch Pyruvat verwenden (Shelp *et al.*, 1999; Van Cauwenberghe *et al.*, 1999). Die GABA-T aus *Arabidopsis* besitzt nur wenig Homologie zu nicht-pflanzlichen GABA-Transaminasen. Hier konnte gezeigt werden, dass nur eine GABA-Transaminase, die ausschließlich Pyruvat als Cosubstrat verwendet, in *Arabidopsis* vorkommt (Van Cauwenberghe *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte beim aufgereinigten Protein gezeigt werden, dass auch Glyoxylat als Aminoakzeptor für die GABA-T Reaktion verwendet werden kann, diese Reaktion ist jedoch irreversibel (Clark *et al.*, 2009).

Nach Zellaufschluss konnte die Enzymaktivität der GABA-T in der die Mitochondrien enthaltenden Fraktion nachgewiesen werden und somit eine Lokalisation der GABA-T in den Mitochondrien gezeigt werden (Breitkreuz *et al.*, 1995; Van Cauwenberghe *et al.*, 2002).

Pflanzen, bei denen die GABA-T durch Mutation oder Insertion einer T-DNA ausgeschaltet wurde, besitzen eine reduzierte Fertilität (Palanivelu *et al.*, 2003). Zudem ist GABA für das Wachstum des Pollenschlauchs verantwortlich, da dieser entlang eines GABA-Gradienten (zur Mikropyle steigend) zur Mikropyle wächst (Palanivelu *et al.*, 2003). In der *gaba-t* Mutante wird GABA angestaut, was zu einem Verlust dieses Gradienten führt. Der Pollenschlauch kann den Weg zur Mikropyle nicht mehr gezielt finden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der GABA-Stoffwechselweg durch Salzstreß mit NaCl hochreguliert wird und die *gaba-t* Mutante sensitiv gegenüber ionischem Streß ist (Renault *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH)

Die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH, EC 1.2.1.16) katalysiert den letzten Schritt des GABA-Stoffwechsels in Pflanzen. Die Oxidation von Succinat-



Semialdehyd (SSA) zu Succinat ist NAD<sup>+</sup>-abhängig. Die SSADH ist ebenso wie die GABA-T in den Mitochondrien lokalisiert (Breitkreuz *et al.*, 1995). Für Homologe aus tierischen Systemen konnte eine direkte Interaktion von GABA-T und SSADH *in vitro* nachgewiesen werden (Hearl *et al.*, 1984). In Hefen findet diese Reaktion, wie die der GABA-Transaminase, im Zytosol statt (Coleman *et al.*, 2001). Das entstandene Succinat und NADH wird bei der Atmungskette zur Produktion von ATP und somit zu Energiegewinnung der Zelle benötigt (Stryer *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Enzym in seiner aktiven Form als Homotetramer vorliegt (Busch *et al.*, 1999) und durch Adeninnukleotide (Busch *et al.*, 2000) und NADH (Bouché *et al.*, 2004) inhibiert wird.

Das Ausschalten der SSADH durch Insertion einer T-DNA führte zu zwergwüchsigen Pflanzen, die bereits unter Standardbedingungen Nekrosen entwickelten (Bouché *et al.*, 2003). Diese *ssadh* Mutanten sind sensitiv gegenüber UV-Licht und Hitzestress, da bei diesen Bedingungen die Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigt und dies zum Zelltod und der Bildung von weiteren Blattnekrosen führt (Bouché *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp wird durch die Akkumulation von ROS (reactive oxygen species) hervorgerufen und kann durch *knock-out* des GABA-T Gens gerettet werden (Ludewig *et al.*, 2008). Die zusätzliche Mutation der GABA-T in der Doppelmutante *gs* verhindert die Produktion von SSA, und somit muss SSA und/oder GHB sowie ROS akkumulieren, bevor der Phänotyp hervorgerufen wird.

### 1.1.3 GABA in Pflanzen

Bei Säugetieren ist GABA der wichtigste hemmende Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Er bindet an Rezeptoren, führt zur Öffnung von Ionenkanälen und ist an der Ausschüttung von Hormonen beteiligt.

In Pflanzen ist die Rolle von GABA noch sehr ungeklärt. Hierzu gibt es viele Hypothesen. Sicher ist, dass GABA unter verschiedenen Arten von abiotischem und biotischem Stress anstaut (Shelp *et al.*, 1999).

Zum Beispiel soll GABA den zytosolischen pH-Wert regulieren, indem bei der Synthese von GABA durch die GAD Protonen verbraucht werden (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Dies konnte jedoch nur in *E.coli* gezeigt werden. Eine weitere Vermutung ist, dass GABA zur Insektenabwehr genutzt wird. In Tabak konnte

gezeigt werden, dass Pflanzen mit einer erhöhten GABA- Konzentration resistenter gegenüber Wurzelknollen-Nematoden und Larven des Tabak-Knospenwurms sind (MacGregor *et al.*, 2003).

## 1.2 Der Citratzyklus (Krebs-Zyklus) in Pflanzen

Der Citratzyklus (siehe Abbildung 3), auch als Tricarbonsäure-Zyklus oder Krebs-Zyklus bekannt, ist ein wichtiger Bestandteil der Energiegewinnung in der Zelle. Er liefert energiereiche Elektronen aus Pyruvat zur Herstellung von ATP und ist eine wichtige Quelle für Zwischenprodukte und Bausteine von Aminosäuren, Nukleotidbasen und Porphyrin. Alle Enzyme, die die Reaktionen des Citratzyklus katalysieren, sind in den Mitochondrien lokalisiert (Stryer *et al.*, 2007).

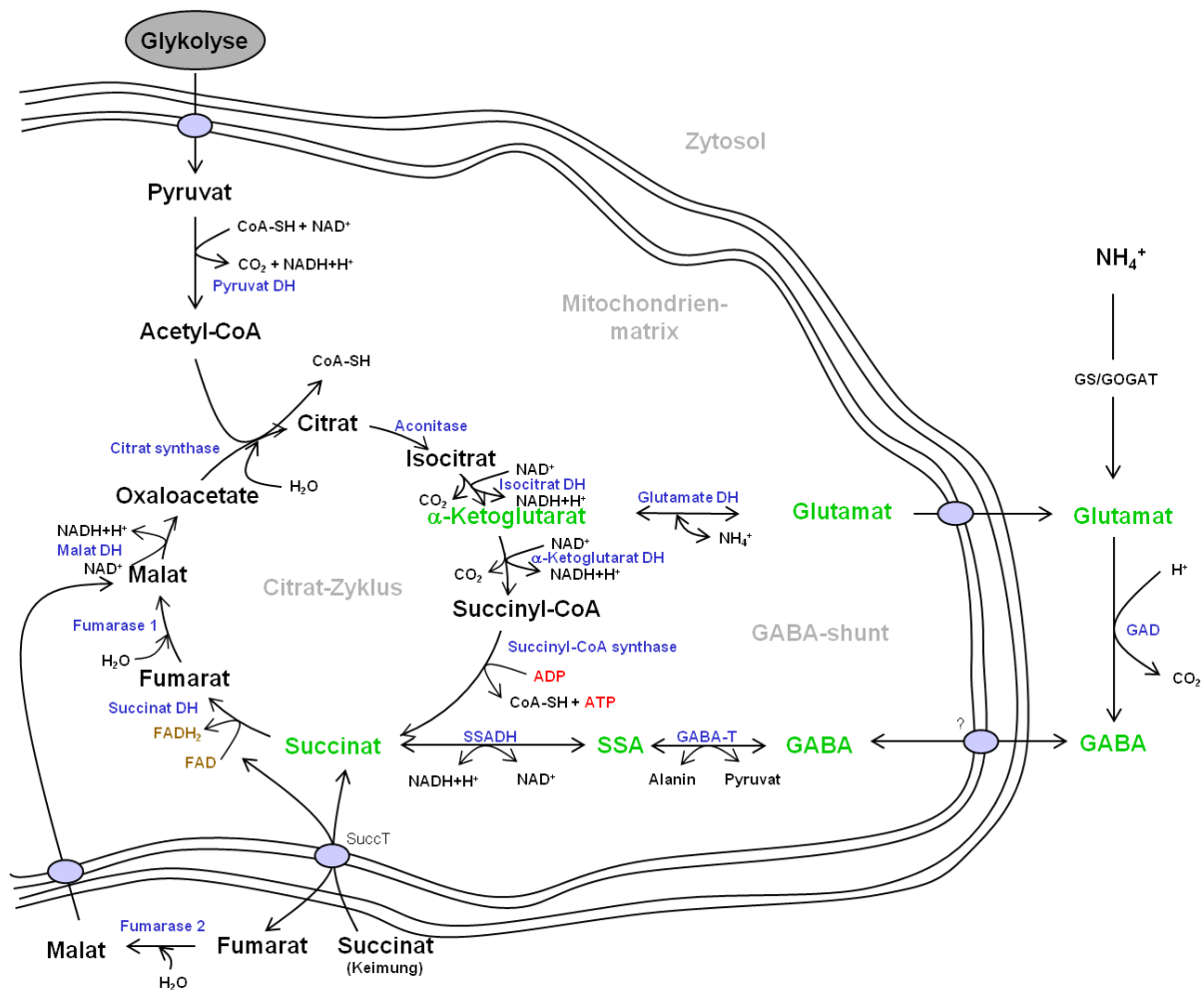


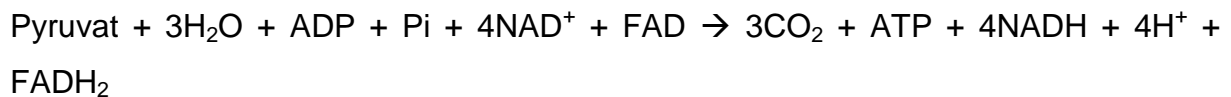
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Citratzyklus mit angeschlossenem GABA-Shunt.

Um die aus der Glykolyse gewonnenen Pyruvat-Moleküle zur Energiegewinnung umzusetzen, werden diese durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex) in Acetyl-CoA umgewandelt. Dabei wird das Pyruvat zunächst oxidativ decarboxyliert und das entstandene Acetat kovalent an Coenzym A (CoA) gebunden (siehe 1.2.1). Das daraus resultierende Acetyl-CoA tritt nun in den eigentlichen Citratzyklus ein und reagiert mit Oxalacetat unter Hydrolyse zu Citrat, wobei das Coenzym A wieder abgespalten wird. Diese irreversible Reaktion wird durch die Citrat-Synthase katalysiert. Bei der reversiblen Isomerisierung durch die Aconitase wird Citrat zu Isocitrat. Eine anschließende Oxidation und Decarboxylierung führt zur Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat. Bei dieser Reaktion wird durch die NAD-Isocitrat-Dehydrogenase NADH (aus  $\text{NAD}^+$ ) gebildet und ein  $\text{CO}_2$ -Molekül abgespalten. Das  $\alpha$ -Ketoglutarat wird, ähnlich wie Pyruvat (siehe 1.2.1), durch einen Multienzymkomplex, den  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, zu Succinyl-CoA oxidiert. Dabei wird das Molekül auf Coenzym A übertragen, ein Molekül  $\text{CO}_2$  abgespalten und aus  $\text{NAD}^+$  NADH synthetisiert. Durch die Succinyl-CoA-Synthase (SCS) (auch Succinat-Thiokinase genannt) wird die energiereiche Thioesterbindung des Succinyl-CoAs gespalten und zur Bildung von ATP genutzt. Das gebildete Succinat wird durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert. Dies ist das einzige Enzym des Citratzyklus, das nicht in der Matrix, sondern in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Außerdem wird bei dieser Reaktion FAD zu  $\text{FADH}_2$  und die dabei gewonnenen Elektronen auf das Ubichinon der Atmungskette übertragen. Die Fumarase setzt anschließend Fumarat durch Wasseranlagerung zu Malat um. Der letzte Schritt wird von der Malat-Dehydrogenase katalysiert. Hierbei wird, unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$ , Oxalacetat vollständig regeneriert.

Damit es nicht zum Erliegen des Citratzyklus kommt, werden durch anaplerotische Reaktionen Zwischenprodukte nachgeliefert (Stryer *et al.*, 2007). Aus Phosphoenolpyruvat (PEP) wird im Zytosol durch die PEP-Carboxylase Oxalacetat gebildet. Pflanzen können dieses durch einen Oxalacetat-Translokator über die innere Mitochondrienmembran transportieren. Dort kann es dann dem Citratzyklus zugeführt werden. Auch Malat kann über einen Translokator aus dem Zytosol in die Matrix transportiert werden und dort direkt in den Citratzyklus eingeschleust oder durch das NAD-Malat-Enzym unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu Pyruvat und  $\text{CO}_2$

umgesetzt werden. Dieses Enzym kommt nur in Pflanzenmitochondrien vor. Des Weiteren kann Glutamat als Hauptprodukt der Nitratassimilation in die Mitochondrien transportiert werden und unter Bildung von NADH zu  $\alpha$ -Ketoglutarat oxidiert werden. Diese Reaktion, bei der Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) abgespalten wird, wird durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert.

Zusammenfassend wird die Bilanz des Citratzyklus in Gleichung 1 dargestellt. Die aus Pyruvat gewonnenen Elektronen wurden auf  $\text{NAD}^+$  und FAD übertragen.



**Gleichung 1: Bilanz des Citratzyklus nach einem Umlauf unter Verbrauch von einem Molekül Pyruvat zu drei Molekülen  $\text{CO}_2$ .**

Um zu vermeiden, dass es zum Erliegen des Citratzyklus oder zu einer unnötigen Überproduktion an NADH und ATP kommt, muss der Citratzyklus streng reguliert werden. Zunächst wird die Produktion von Acetyl-CoA durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex reguliert (siehe 1.2.1). Hierbei ist es wichtig, dass genügend Coenzym A,  $\text{NAD}^+$  und FAD für die Reaktionen zur Verfügung stehen. Ebenso werden die Citrat-Synthase, Isocitrat-Dehydrogenase und die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase durch Produktinhibition, Nukleotide oder Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert.

Im Folgenden wird näher auf den mitochondriale PDH-Komplex und dessen Regulation eingegangen.

### 1.2.1 Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex)

Die Reaktionen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in den Mitochondrien verbindet die Glykolyse mit dem Citratzyklus. Hierbei handelt es sich um einen Multienzymkomplex, der in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist. Der Komplex besteht aus drei verschiedenen katalytischen Untereinheiten, die als Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente (PDH, EC 1.2.4.1), Dihydrolipoyl-Transacetylase (EC 2.3.1.12) und Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (EC 1.8.1.4) bezeichnet werden. Zudem werden noch fünf Coenzyme benötigt. Die Coenzyme Thiaminpyrophosphat (TPP),

Liponsäure und FAD dienen als katalytische und CoA und  $\text{NAD}^+$  als stöchiometrische Cofaktoren. Der Komplex bewirkt, dass die Reaktionspartner zwischen den miteinander fest verbundenen katalytischen Zentren wandern können. Durch die enge Nachbarschaft der einzelnen Enzyme wird die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit erhöht und das Auftreten von Nebenreaktionen vermindert. Trotz der relativ einfachen Stöchiometrie ist der Mechanismus sehr komplex.

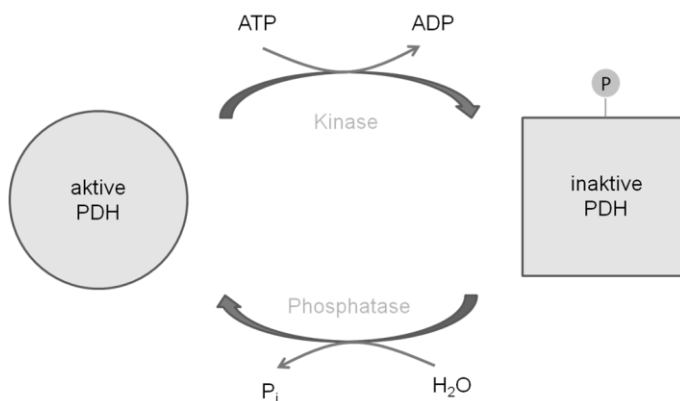
In Pflanzen gibt es zwei Isoformen des PDH-Komplexes, eine in der mitochondrialen Matrix, worauf im Folgenden eingegangen wird, und eine im Plastidenstroma (Lernmark and Gardeström, 1994).

Die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA erfolgt in drei Reaktionsschritten: Decarboxylierung, Oxidation und Übertragung der Acetylgruppe auf Coenzym A. Bei der Decarboxylierung bindet Pyruvat an TPP und wird zu Hydroxyethyl-TPP. Diese Reaktion wird von der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente katalysiert. Bei der anschließenden Oxidation der an das TPP gebundenen Hydroxyethylgruppe entsteht eine Acetylgruppe, die gleichzeitig auf Liponamid übertragen wird. Hierbei entsteht eine energiereiche Thioesterbindung. Diese Reaktion, die ebenfalls von der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente katalysiert wird, liefert Acetyl liponamid. Die anschließende Bildung von Acetyl-CoA katalysiert die Dihydrolipoyl-Transacetylase. Hierbei bleibt die energiereiche Thioesterbindung bei der Übertragung auf CoA erhalten. Zur Regeneration des Komplexes muss durch die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase das entstandene Dihydrolipoylamid zu Liponamid oxidiert werden. Dabei werden zwei Elektronen auf eine prosthetische FAD-Gruppe des Enzyms und anschließend auf  $\text{NAD}^+$  übertragen.

### **Regulation des PDH-Komplexes**

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex unterliegt einer starken Regulation. Dabei hemmt Acetyl-CoA die Transacetylase-Komponente durch direkte Bindung, NADH inhibiert dagegen die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, somit signalisieren hohe Konzentrationen an Acetyl-CoA und NADH der Zelle, dass der Energiebedarf gedeckt ist. Ebenso hemmen hohe Konzentrationen an ATP den Komplex. Das wichtigste Mittel zur Regulation ist jedoch die kovalente Modifikation der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente (PDH) (siehe Abbildung 4). Hierbei wird mittels

Phosphorylierung der PDH an einem Serin-Rest durch die mit dem Enzym assoziierte Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK, EC 2.7.11.2) die PDH abgeschaltet und der erste Schritt der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion gehemmt. Aktiviert wird die PDK durch hohe Konzentrationen an NADH und Acetyl-CoA. Die gehemmte PDH wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase (PDP) reaktiviert. Die PDP bindet an den PDH-Komplex und hydrolysiert das phosphorylierte Serin. Nach dieser Reaktion löst sich die PDP wieder vom Komplex. Durch hohe Konzentrationen an  $\text{NAD}^+$  und Coenzym A wird die Hydrolyse-Reaktion aktiviert (Stryer *et al.*, 2007).



**Abbildung 4: Regulation des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mittels kovalenter Modifikation durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase.**

### 1.2.2 Succinat/Fumarat Transporter

Zwischenprodukte des Citratzyklus werden über Transporter in verschiedene Kompartimente transportiert. Der Glyoxylat-Zyklus ist ein Stoffwechselweg für die Synthese von Succinat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. In Pflanzen kommt es zur Kompartimentierung der Reaktionen (siehe Abbildung 5). Die Hauptreaktionen finden in den Glyoxysomen statt. Nur das gebildete Citrat wird im Zytosol zu Isocitrat umgewandelt und wieder in die Glyoxysomen transportiert. Das Gebildete Succinat wird in die Mitochondrien transportiert und kann dort in den Citratzyklus einfließen.

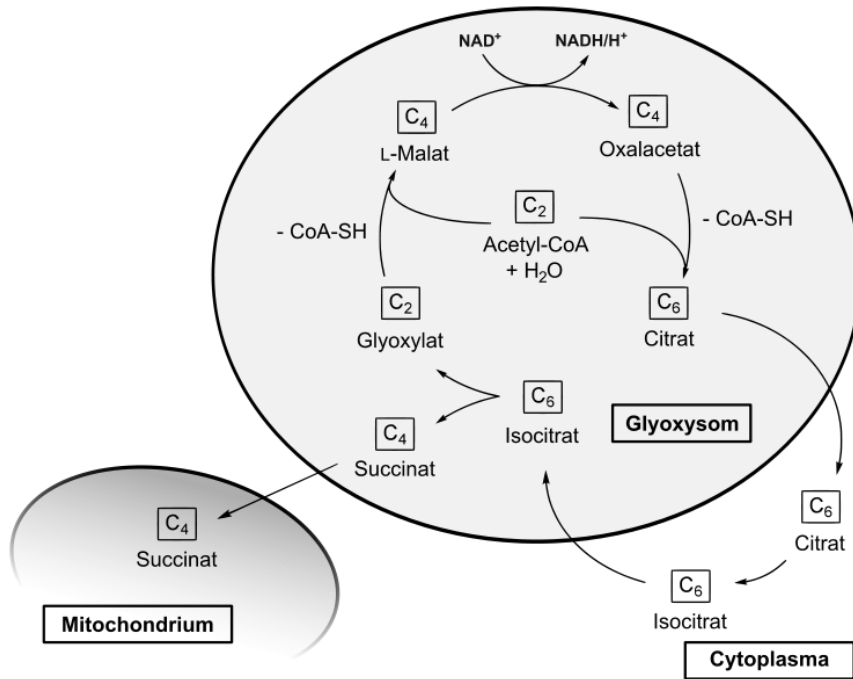


Abbildung 5: Glyoxylat-Zyklus in Pflanzen. <http://de.wikipedia.org/wiki/Glyoxylat-Zyklus>

Bei Pflanzen nutzt der Keimling den Stoffwechselweg, um Energie aus in Oleosomen gespeicherten Triglyceriden zu generieren, indem diese in Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert werden. Glycerin wird zu Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt. Die Fettsäuren gelangen in die Glyoxysomen und werden dort bei der  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut.

Bedeutsam ist dieser Weg bei ölspeichernden Samen, um aus den Speicherfetten wasserlösliche Kohlenhydrate bei der Keimung zu generieren.

Zusätzlich scheint der Glyoxylat-Zyklus eine Rolle bei der Mobilisierung von Lipiden aus der Tylakoidmembran während der Seneszenz und Pollenentwicklung zu spielen (Zhang *et al.*, 1994).

In Hefe ist der Glyoxylat-Zyklus für das Wachstum auf Acetat oder Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle essenziell. Acetat und Ethanol werden zu Acetyl-CoA umgewandelt, und anschließend im Zytosol zu Succinat.

Spezifische Transporter in der inneren Mitochondrienmembran regulieren den Austausch mit dem Zytosol. In Hefe gibt es einen Succinat / Fumarat Transporter, ACR1, der das im Glyoxylat-Zyklus entstandene Succinat aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert. Im Austausch wird Fumarat aus den Mitochondrien ins Zytosol gebracht (Palmieri *et al.*, 1997). Die Mutante *acr1* kann auf Ethanol nicht

wachsen, da sie Ethanol zwar in Succinat umwandeln, jedoch anschließend nicht in die Mitochondrien transportieren kann. Datenbankanalysen ergaben, dass das Gen At5g01340 aus Arabidopsis 35% Identität zum Hefegen *ACR1* aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass das Gen die Hefemutante *acr1* komplementieren kann und somit ein Wachstum auf Platten mit Ethanol möglich war (Catoni *et al.*, 2003). Expressionsanalysen zeigten, dass der Succinat / Fumarat Transporter (AtmSFC1, SuccT, siehe Abbildung 3) in allen Pflanzenorganen vorhanden ist und dass die Expression mit Glyoxylat-Zyklusgenen während der Keimung korreliert (Catoni *et al.*, 2003). Mutanten aus Arabidopsis sind bis jetzt nicht beschrieben.

### 1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen Mutanten des GABA-Stoffwechsels analysiert und funktionell komplementiert werden. Dazu soll die Doppelmutante *gaba-t x ssadh (gs)* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen werden und auf ihre Aminosäuregehalte hin untersucht werden. Ebenfalls soll versucht werden, den *gs* Kurztagphänotyp sowie den *ssadh* Phänotyp zu komplementieren. Hierbei sollen GABA-Stoffwechselfgene aus Arabidopsis und Hefe überexprimiert werden, um herauszufinden, ob die Expression dieser Gene und die Produktion von SSA in unterschiedlichen Kompartimenten ausschlaggebend für den jeweiligen Phänotyp ist. Es soll untersucht werden, ob eine Komplementation des Kurztagphänotyps der *gs* Doppelmutante durch Aminotransferasen, die entweder strukturell ähnliche Substrate verwenden (OAT- Ornithin Aminotransferase) oder unter Kurztagbedingungen hochreguliert sind (BCAT-2- branched-chain amino acid aminotransferase), möglich ist.

Durch EMS-Mutagenese der *gs* Doppelmutante sollen weitere Gene, die in den GABA-Stoffwechselweg eingebunden sind, identifiziert und analysiert werden.

Des Weiteren soll gezeigt werden, dass *amiSSADH* Linien, die unter Normalbedingungen keinen Phänotyp aufweisen, ein funktionstüchtiges *amiSSADH* Konstrukt tragen und die Transkriptmenge an *SSADH* durch dieses herabgesetzt wird.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg, D), Difco (Hamburg, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka AG (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) bezogen. Der Reinheitsgrad war „research grade“ oder der höchstmöglich verfügbare.

### 2.2 Enzyme

Enzyme für die Molekularbiologie wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, D), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D), Promega (Mannheim, D), Qiagen (Hilden, D), Roche (Mannheim, D) und Sigma (Deisenhofen, D) verwendet.

### 2.3 Antibiotika

In dieser Arbeit wurden folgende Antibiotika verwendet:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Gentamycin	25 mg/ml	25 µg/ml
Hygromycin	50 mg/ml	30 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicin (in DMSO)	30 mg/ml	50 µg/ml
Carbenecillin	50mg/ml	50µg/ml
Sulfonamid	7,5mg/ml	50µg/ml

### 2.4 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte stammten von folgenden Firmen:

Zentrifugen: Centrifuge 5417, 5417 R, 5417 C und 5402, Firma Eppendorf, Wesseling (D)

Heizblöcke: Thermomixer 5436, Thermostat 5320, Firma Eppendorf, Wesseling (D); HTM 130L, Firma HLC, Bovenden (D)

Wasserbad: Typ 1003, Firma GFL, Burgwedel (D)

Pipetten:	Typ Research, Firma Eppendorf, Wesseling (D), Typ Pipetman, Firma Gilson, Lewis Center (USA), Typ Labmate, Firma Abimed, Langenfeld (D)
pH – Meter:	Firma WTW, Weilheim
Magnetrührer:	IKAMAG REO, IKA – Werke, Staufen (D)
Bohrer:	RW 16, IKA – Werke, Staufen (D); RZR 50, Heidolph, Vertrieb: Hartenstein, Würzburg (D)
Photometer:	Novaspec II – Pharmacia LKB Spectrafluor Plus – TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim (D)
PCR – Maschinen:	PTC 100 und PTC 200, Firma MJ Research, Vertrieb durch Biozym, Hess. Oldendorf (D)

### 2.5 Kommerzielle Kits

Folgende Kits wurden eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

Super Script™ II -Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, D)

Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D)

Big Dye® Terminator v1.3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Midiprep Kit® Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

### 2.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, D) und Sigma Aldrich (Taufkirchen, D) bezogen. Angegeben sind die Bezeichnung und die Nukleotidsequenz in 5' → 3' Orientierung.

## Material und Methoden

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
LB(SALK)	gtccgcaatgtgtattaagttgtc
LB(Gabi-Kat)	atattgaccatcatactcattgc
35S F	gcaagacccttctctatataag
SSADH F1	cctccgaatctgtctgatcgc
SSADH R1	cccaactgctgttgatcccg
GABA-T F	ctttcccttttggtgcatttta
GABA-T R	ggctaactctggtgagaactcc
PDK F1	gcagtgaagaaagcctgcg
PDK R1	ccatcagcaactataatgcgg
PDK F2	caccaatccgcattatagttgc
PDK R2	ctcttgcaatctccaaggcg
PDK F3	cgaatcgggatccggatgc
PDK R3	ccctgaaagattccaaatacc
SSADH_I miRNA	gataaactatagaggcgtctctctttgtattcc
SSADH_II miRNA	gagacgcaccctctatagattatcaaagagaatcaatga
SSADH_III miRNA	gagaagcaccctctaaagtattttcacaggctcgtgatatg
SSADH_IV miRNA	gaaaatactttagagggtgcttctctacatatattcct
A topo	caccctgcaaggcgattaagttgggtaac
B topo	gcggataacaatttcacacaggaacag
1AF	ctcgggccccaaataatgat
1AR	ctggatggcaaataatga
cGTPase (trafo) F	aagtcgacatggcgctacgaacactctc
cGTPase F1	tggtagcaaaagagcgggaaac
cGTPase F2	tcctggagaaccaacgagctc
cGTPase F3	gcttttagctcgtgttcgtgatt
cGTPase F4	gggtgctgcttagcctgatcttagta
cGTPase F5	caagtagtcccaagggtgagagct
cGTPase F7	ccttctgtaacctgacctctgtatccct
cGTPase F8	cggttacttcaaatcgaaatcaacg
cGTPase (trafo) R	aagcggccgctcaaaagtaccatttgggtctt
cGTPase R1	caagctgtgtattgggtgggc
cGTPase R2	ttctgatggacatccgagaaaatt
cGTPase R3	tgatcgtggtcatctactggtgat
cGTPase R4	cgacgaaagcgttgatctga
gaba-t F(Trafo)-TP	atgcacagtaagtatgccacttgc
gaba-t F (trafo)	caccatggtcgttatcaacagtctcc

## Material und Methoden

---

Name	Sequenz (5' → 3')
gaba-t R (trafo)	tcacttcttgctgagcc
gaba-t R1	gccacttctggctcataag
M13 F	gtaaaacgacggccag
M13 R	ccaggaaacagctatgacc
NAD-ME1.2 F	atctctcagccgaatctcc
NAD-ME1.2 R	ccatgaacacctagatctcc
NAD-ME2.3 F	cctggtccttgcatctcc
NAD-ME2.3 R	ggagctttcattattgtgcc
OAT F (trafo)	aagtcgacatggcagccaccagagacg
OAT R (trafo)	aagcggccgctcaagcatagaggttctcc
OAT F1	ggaattattcgaataacctagattgtaagc
OAT F2	cggtctgccacaatcgaattccaa
OAT F3	cgcggaatggctcaactatat
OAT F4	tcccaaagacgaggtacaacttt
OAT F5	tgctaaatgtgaaatgactttggtt
OAT F6	ggtcaacacggaaggttcgtattc
OAT F7	tgaaccggttggtttatttagtagc
OAT R1	acacatgccaacacgtgtacgt
OAT R2	tggctcaagctcaaacttaatctc
OAT R3	ggttagccaagactcctctctct
SSADH F (trafo)	atggtaataggagcagcagcgc
SSADH R (trafo)	gggagatatgaatagacactga
SSADH-TP (trafo)	agtatggacgcacaaagcg
UGA1 90 F	ggatgggaacacatatttgatttg
UGA1 91 R	gattaaggcagcaactggaatagacc
UGA1 F1	cctgggattgcctactgg
UGA1 R1	gcttctgggattcaggacc
UGA2 86 F	ctccggcgaaatcatagcaagag
UGA2 87 R	agattttaccgacgtttgtagaaccag
UGA2 F2	ctgcacagtagtcatcaagc
UGA2 R1	cgaacctctctccaaatcc
UGA2 R2	gcttctcaaccacggaga

## Mappingprimer

Bei den verwendeten Mappingprimern wurde sich das Vorhandensein von SSLP (Simple sequence length polymorphisms) in Arabidopsis zu Nutze gemacht. Hierbei handelt es sich um kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden. Da die Anzahl der Wiederholungen sich bei verschiedenen Ökotypen unterscheidet, können diese Bereiche zur Genanalyse verwendet werden. Primer, die den Bereich von SSLPs flankieren, ergeben bei einer PCR unterschiedlich große Fragmente bei unterschiedlichen Ökotypen.

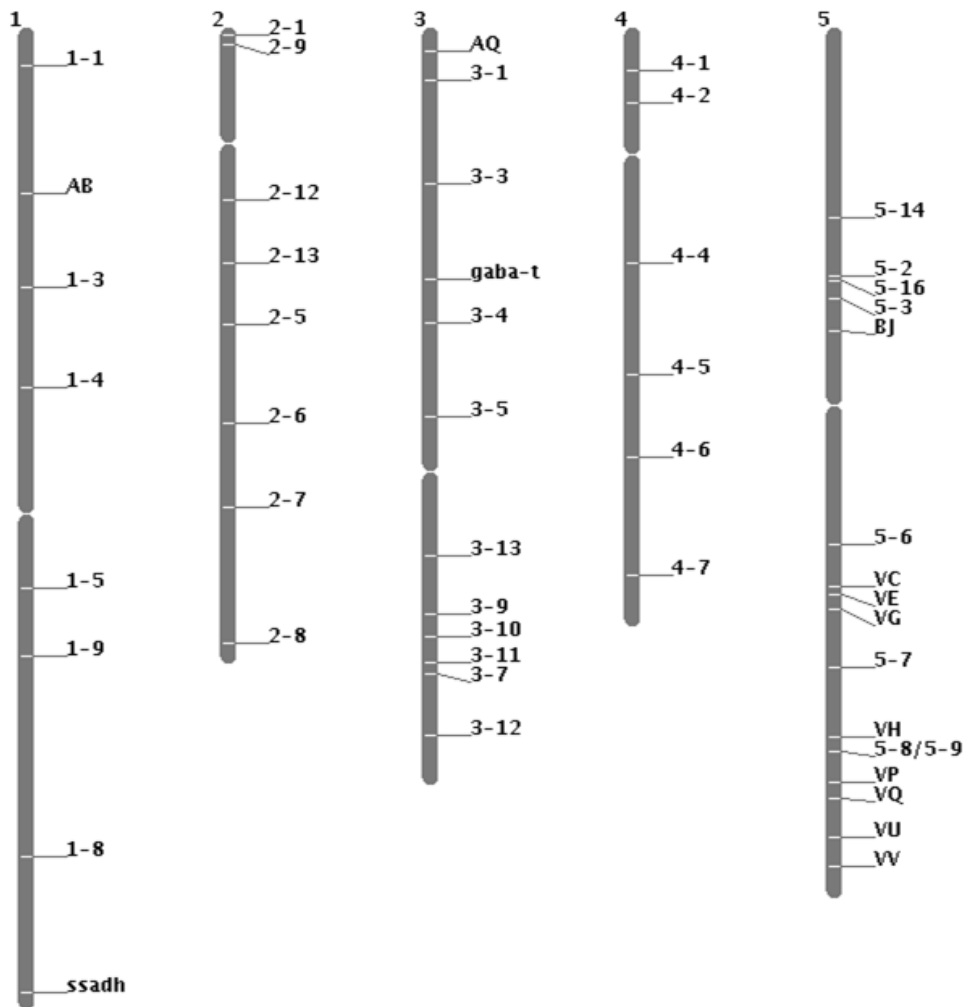


Abbildung 6: Mappingprimerverteilung auf den fünf Chromosomen von Arabidopsis.

## Material und Methoden

Chr.	Name	F-Primer	R-Primer	Größe [bp] (Col-0/Ler)
1	1-1	aacatccaacggctctgaacc	Cgtgtccggtgaaaaagagt	499/325
1	1-3	tggttatcttttcgctaagg	Ccaagtttaaagtttagttcttta	369/197
1	1-4	aacagaaaaccctctgtagc	Ggtacaagttgaattaatatt	406/187
1	1-5	cacttccgaatcacgatgtcc	Ggtttagcgcactttgtttgt	511/259
1	1-7	aaaaccctgttgttctgagc	Ggttgagactggtacaagg	671/391
1	1-8	atcgtatagaagacagaaacg	Ggtccgactaccagtc	643/375
2	2-1	cccatgcttctctattgc	Ggaggctctgaactcacac	514/188
2	2-5	ccatcaccgtgtgagttgg	Gctagggtttttgtgaagttc	355/188
2	2-6	tgtcactgaagaaccctagc	Gcagcttcgagtggattcta	604/268
2	2-7	cttcttcaaggatctctgc	Ccatgaattcacctctattc	582/336
2	2-8	attagattaaagactgtacgg	Ccaactcgagaagactggg	762/229
3	3-1	cacatttcagttatctaatgc	Ggaatgagacattgacttc	856/273
3	3-3	cgtagcatcttctgttcg	Cggttttattgtagacgcctt	317/179
3	3-4	agtttgtgagttaagttgagc	Gctcattggacagttgcca	342/186
3	3-5	acaactcactgtgtttcacc	Gctgagcacgaagaactga	341/220
3	3-7	tgggaacaaaggtgtcatcc	Gcaagttaaaacctgaaactaag	322/221
4	4-1	gattttgcaatgttattgatgg	Ccaaggaactattgtgcgtaa	515/286
4	4-2	gcttttaaccagctaactagg	Ggtctctcacctaaggagat	636/285
4	4-4	ttccgtacatggatccatcg	Cgaatgtccgctcatataaac	521/141
4	4-5	ttcttctaatgtttgagttcc	Cgaaaaggtaatgttttaagtatt	549/194
4	4-6	cccctcccactataatgc	Ccacattgaaatcaataaaattatc	657/201
4	4-7	ccaatgattggcactactgc	Ggtcatcaattcatttctaagc	431/288
5	5-2	tatccaatcgtcacaagatcc	Ggattggatcctaattatataaaa	726/184
5	5-3	cagctgcctcaagtattcc	Gctgtgtttttgtagagagcg	564/249
5	5-6	cgcaaaagacgacacatgg	Gctcatgcttctccattg	556/230
5	5-7	ataagataggttggcaaatgg	Cctactattcaaattgttaagaa	469/181
5	5-8	caaaaattgatcgatcgatagg	Cgttattgagtcggttgag	305/189

Die nachfolgenden Primer wurden von der folgenden Internetseite oder aus dem folgenden PDF verwendet. (<http://amp.genomics.org.cn/> und Molecular Mapping of Auxin-Resistant 4 Enhancer Mutants - Velizar Petrov)

Chr.	Name	F-Primer	R-Primer	Größe [bp] (Col-0/Ler)
5	5-9	ctctcgctaacgctcttgg	Gcacgagttaacgttattgag	422/306
5	5-11	gaataaatgggccttataac	Tattattgtgccagatattg	154/139
5	5-12	tcgaagtaacttactttcta	Aatgtcgcaaagacttcc	179/151
5	5-13	cagtctaaaagcgagagatgatg	Gtttgggaagtttgctgg	150/120
5	5-14	ccatgaacaatgaacctaga	Aaaattgcaaataggatcaaa	197/110
5	5-15	tagtgaacctttctcagat	Ttatgttttctcaatcagtt	100/135
5	5-16	aaacattatgctgtaaaac	Accccaatattagcaag	180/142
5	BJ	Aattgtgggaaggacaacaacaaa	gagagagcacgtgagatgtcacaga	
5	VC	tcggaaaaagtatgttgggagt	Tgttcaacaatagctgcaaaa	
5	VH	tcacctacttaattcaactgcaaa	Ccagattcgatgtacttcacttc	
5	VP	aaaaggttctgtctaggtactgctc	Aatatatgctgtatttctgcaagc	
5	VE	ccgatataactaaaggtgcagaga	Aaaattcctaccaaacgaagca	
5	VG	gatttcgctctctgcaaaaa	Aaaaatgacgggacgaaagt	
5	VQ	caaaaccaacaaggacgtg	Gcttgactctcctattaacaaa	
5	VU	tgtgagaggtcaaaatatagatgaaaa	Gcaccgcctaaagatttcac	
5	VV	ggatcatatgactgatggaacttct	aggaagtacaatctgaagtgaaaac	
3	3-11	ttggagttctacgaagaagt	Ttagaggaaggaagcgaata	141/111
3	3-12	tatgtggcaaatcagagctt	Tttgaaatgttgccaattta	182/145
3	3-13	caaaagaaatgcaacgagac	Tttgatcatgaatggtagtg	143/124

## 2.7 Bakterien

Es wurde folgender *Escherichia coli*-Stamm verwendet:

DH5 $\alpha$  (zur Plasmidamplifikation) supE44,  $\Delta$ lacU169, ( $\emptyset$ 80, lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde der Stamm GV3101 oder GV3101PMP90RK verwendet. Für die transiente Expression von Tabakblättern wurden GV3101PMP90RK oder SV0 Zellen verwendet.

## 2.8 Wasserqualität

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde destilliertes H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) verwendet.

Bei Ribonukleinsäure(RNA)-Analysen wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  angesetzt, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde. Dazu wurde 1l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  mit 100 $\mu\text{l}$  DEPC über Nacht inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

## 2.9 Pflanzenmaterial

Die für diese Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen waren Ökotyp Col-0. In der folgenden Tabelle sind die T-DNA-Insertionslinien, im Fall der SALK-Linien bei SIGnAL (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>) und im Fall der GABI-Kat-Linien an der Universität Bielefeld (<http://www.gabi-kat.de>) bestellt, aufgelistet.

Gen	At-Nummer	Linie
SSADH	At1g79440	SALK_003223
GABA-T	At3g22200	Gabi-Kat 157D10
PDK	At3g06483	SALK_014790
		SALK_046833
		SALK_018663
ME1.2	At2g13560	SAIL_374_A02
ME2.3	At4g00570	SAIL_291_C05
cGTPase	At3g47450	SALK_047882
OAT	At5g46180	SALK_033541
BCAT-2	At1g10070	SALK_037854

## 2.10 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

### 2.10.1 Screening von T-DNA-Insertionslinien

Der Genotyp der T-DNA-Insertionslinien wurde mit einem PCR-basierten Verfahren bestimmt. Hierfür wurde zunächst genomische DNA der einzelnen Pflanzen isoliert (siehe 2.13.2) und mit dieser DNA als Matrize eine PCR mit einem zur flankierenden Sequenz der T-DNA komplementären Primer (Left Border (LB)-Primer) und einem genspezifischen Primer (Forward- oder Reverse-Primer) durchgeführt. Aus dem erhaltenen Fragment konnte auf das Vorhandensein der Insertion in einer oder in



beiden Kopien des Gens geschlossen werden. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden die Proben, bei denen eine Insertion gefunden wurde, für eine weitere PCR eingesetzt. Hierbei wurden die genspezifischen Forward- und Reverse-Primer miteinander kombiniert. Bei Erhalt eines Fragments handelt es sich um heterozygote T-DNA-Insertionslinien. Als Kontrolle wurde jeweils H<sub>2</sub>O und genomische Wildtyp-DNA verwendet.

### **2.10.2 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen**

Zum Kreuzen wurden im Allgemeinen homozygote Pflanzen im Alter von 5-6 Wochen eingesetzt. Als Ausnahme wurden heterozygote *ssadh*-Pflanzen verwendet, da die homozygoten Pflanzen ein stark verlangsamtes Wachstum zeigten.

Alle bereits offenen Blüten und bereits entwickelte Schoten wurden von den zu befruchtenden Pflanzen entfernt. Die drei am weitesten entwickelten Blüten wurden unter dem Binokular vorsichtig geöffnet und alle Blütenorgane außer den Carpellen (Fruchtblätter) entfernt. Von Blüten pollenspendender Pflanzen wurden die beiden äußeren Blütenorgane (Kelch- und Kronblätter), sowie die Carpellen von gerade geöffneten Blüten entfernt, damit besser bestäubt werden konnte und die Pollen besser an der Narbe hängen blieben. Dann wurde der Pollen auf den Fruchtknoten der zu befruchtenden Pflanze übertragen. Die zum Kreuzen verwendeten Blüten wurden markiert und kurz vor dem Abreifen einzeln eingesammelt und getrocknet. Diese Samen wurden anschließend ausgesät, die Pflanzen nach Abreifen eingetütet und der Genotyp der folgenden Generation (F<sub>2</sub>) mittels PCR bestimmt (siehe 2.13.8).

### **2.10.3 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen**

Zur Sterilisation wurden Samen einer Linie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und dieses geöffnet in einen Exsikkator gestellt. Dazu wurde ein Becherglas mit 100ml Natriumhypochlorid gestellt und 3ml HCl<sub>konz.</sub> zugegeben. Der Deckel des Exsikkators wurde schnell geschlossen, da die Entwicklung von Chlorgas sofort einsetzte. Nach ca. 4 Stunden wurde der Exsikkator geöffnet und die Eppendorf-Gefäße verschlossen. Diese wurden für etwa 1 Stunde unter der Sterilbank zum Abdampfen geöffnet oder direkt auf MS-Platten (siehe 2.10.4) ausgesät.

#### 2.10.4 Herstellung von MS (Murashige & Skoog)-Platten

Um das Wachstum von Pflanzen unter kontrollierten Nährstoffbedingungen *in vitro* zu beobachten, wurde halbkonzentriertes MS-Medium (Murashige & Skoog) mit modifizierten Vitaminen (Duchefa, M0245.0050) eingesetzt.

Für 1l ½MS-Medium wurden 2,4g MS eingewogen und in bidest H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1M KOH auf 5,6 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde 0,8%<sub>(w/v)</sub> Gelrite (Duchefa) oder 8g Pflanzenagar eingewogen. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und nach Abkühlen und optimaler Zugabe von Antibiotika, Metaboliten oder Herbiziden in Gewebekulturschalen (Greiner) gegossen.

Um Stickstofffreies MS herzustellen wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

Macro I:	KCl	20mM
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,5mM
	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,249mM
Macro II:	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,979mM
FeNaEDTA:	FeNaEDTA	0,1mM
Micros:	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100µM
	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	70,4µM
	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	29µM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,033µM
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	1µM
	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,154µM
	KI	5µM
Vitamine:	Duchefa	1g in 9,62ml
	C0401	

#### 2.10.5 Auslegen von Arabidopsis-Samen auf Sterilmedien

Für die Aussaat auf MS-Medien wurden oberflächensterilisierte Arabidopsis-Samen (siehe 2.10.3) verwendet. Einige Samen wurden auf ein autoklaviertes Blatt Papier gestreut und einzeln mit einem sterilen Zahnstocher auf die Platten gelegt. Diese

wurden mit gasdurchlässigem Klebeband abgedichtet und für mindestens 48 Stunden im Dunkeln bei 4°C vernalisiert. Danach wurden die Platten zur Samenkeimung und zum Pflanzenwachstum in einen Klimaschrank gestellt.

### **2.10.6 Transformation von *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* wurde mit *Agrobacterium tumefaciens* durch die Blüten-Tauch-Methode („floral dip“, Clough *et al.*, 1998; Desfeux *et al.*, 2000; Bent, 2000) transformiert. Samen des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps Col-0 oder die jeweiligen Mutanten wurden ausgesät und je 2 Pflanzen pro Topf (Ø 6cm) pikiert. Wenn die Infloreszenz eine Länge von ~ 5- 15cm erreicht hatte, konnte mit der Transformation begonnen werden. 200-300ml YEB-Medium (siehe 2.12.2) einschließlich der zur Selektion notwendigen Antibiotika wurden mit 5ml Übernachtskultur der positiv getesteten Agrobakterien-Klone beimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Nachdem eine OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 erreicht war, folgte die Sedimentation der Zellen für 15min bei 3500rpm. Anschließend wurde das Pellet in 600ml Leitungswasser mit 30g Saccharose resuspendiert. Kurz vor der Transformation wurden 300µl Silwet L-77 zugegeben. Der ganze Ansatz wurde in einen 500ml Messkolben auf einem Magnetrührer stehend, damit die Agrobakterien nicht absanken, gegeben und der Topf mit den Pflanzen kopfüber für ~ 15-20s hineingetaucht. Die auf diese Weise behandelten Pflanzen wurden über Nacht zunächst waagrecht gelagert, so dass überschüssige Flüssigkeit abtropfen und Schimmelbildung entgegengewirkt werden konnte. Um ein zu frühes Abtrocknen der Agrobakteriensuspension zu vermeiden, erfolgte in den ersten Tagen nach der Transformation eine Abdeckung der Pflanzen mit einer Haube. Nach ca. 2Wochen konnten die abgereiften Samen geerntet werden.

### **2.10.7 Anzucht- und Wachstumsbedingungen**

#### **Gewächshaus**

*Arabidopsis*-Samen wurden in 6cm-Plastiktöpfen (Pöppelmann, Lohne (D)) auf ein Substratgemisch aus drei Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal - Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgestreut. Um die Samenruhe zu brechen, wurden die Töpfe für mindestens 48 Stunden bei 4°C ins

Dunkel gestellt, anschließend wurden sie zur Keimung ins Gewächshaus gebracht. Nach etwa 2 Wochen wurden die Pflanzen in 77er Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal), in 6cm- oder 9cm-Plastiktöpfe mit identischem Substrat pikiert.

Im Gewächshaus herrschten Langtagbedingungen, mit einem Licht/Dunkelrhythmus von 16:8 Stunden und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40%. Die Temperatur betrug in der Lichtperiode 21°C und wurde während der Dunkelperiode auf 18°C abgesenkt.

### **Klimaschrank**

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Gewebekulturplatten erfolgte in Klimaschränken (Percival Scientific, Modell CU-36L5 bzw. AR-66L\_S). Die Pflanzen unterlagen dabei einem Tag/Nachtrhythmus von 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit bei einer Temperatur von 22°C/18°C, 40PAR und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%.

Um das Wachstum unter Kurztagbedingungen (8h Licht und 16h Dunkelheit, 20PAR) zu analysieren, wurden die Pflanzen zunächst im Gewächshaus (siehe 0) angezogen und anschließend in eine Klimakammer gestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60%.

### **2.10.8 Dokumentation des Pflanzenwachstums**

Die Gewebekulturplatten wurden mit einer Nikon Coolpix und die auf Erde gewachsenen Pflanzen mit einer Canon Eos10D (Macro Objectiv 100mm) fotografiert. Die Pflanzen wurden unter vergleichbaren Beleuchtungsverhältnissen fotografiert.

### **2.11 Transiente Expression von Proteinen in *N. benthamiana***

Für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde die Agrobakterieninfiltration angewendet (Romeis, 2001).

Die Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus auf Erde 4-6 Wochen angezogen bevor sie für die Transformation verwendet wurden.

Die Agrobakterien mit den jeweiligen GFP-Konstrukten, sowie der 19K-Agrobakterienstamm (Gen codiert für einen Suppressor des posttranskriptionalen „Gensilencing“, Liu *et al.*, 2002) wurden 2 Tage in jeweils 2ml YEB mit den jeweiligen

Antibiotika bei 28°C angezogen. Nach 2 Tagen wurden 4ml frisches Medium mit Antibiotika jeweils mit 10µl der Vorkultur angeimpft und erneut für 24-48h bei 28°C geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen für 15min bei 4.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 4-8ml 1x Agro Mix resuspendiert bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,8. Die Bakterienkulturen der GFP-Konstrukte wurden 1:1 mit dem 19K-Stamm vermischt und für 2-6h bei RT stehen gelassen.

Danach wurde die Bakteriensuspension in eine Einmalspritze ohne Nadel aufgezogen und in die Tabakblätter infiltriert. Die Pflanzen wurden dann über Nacht verdunkelt und anschließend ins Gewächshaus transferiert.

Nach 4-6 Tagen wurde die Expression von GFP mittels eines Confocal-Mikroskops bildlich festgehalten.

10x Agro Mix:

100mM	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O
100mM	MES
ad 100ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

auf pH 5,6 einstellen

1x Agro Mix:

900µl	10x Agro Mix
100µl	Acetosyringon (3mg/ml in EtOH)
ad 10ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

## 2.12 Mikrobiologische Methoden

### 2.12.1 Arbeiten mit *E. coli*

#### Medien

LB-Medium:

10g	Trypton
5g	Hefeextrakt
10g	NaCl
ad 1l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

LB-Agarplatten:

2g	Trypton
1g	Hefeextrakt
2g	NaCl
3g	Agar
ad 200ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Die Medien wurden autoklaviert, nach Abkühlen wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

### **Anzucht von *E. coli***

Zur Anzucht von *E.coli* wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Platte gepickt, in 3ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (200 bis 250rpm, Bodenschüttler G25, Fa. New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D) über Nacht inkubiert.

Die Bakterien konnten für einige Wochen bei 4°C auf LB-Platten oder bei -20°C als Glycerinstammkultur (500µl Kultur und 500µl 50% Glycerin) gelagert werden.

### **Herstellung kompetenter Zellen (*E. coli*)**

Mit einer Einzelkolonie *E.coli* wurde eine Vorkultur in 5ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit 1ml dieser Vorkultur eine 100ml-Kultur in LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,48 bei 37°C wachsen gelassen. Um sicherzugehen, dass das Medium der 100ml-Kultur steril war, wurde es im Erlenmeyerkolben über Nacht auf 37°C gestellt, Kontaminationen konnten durch Trübung des Mediums erkannt werden.

Die Kultur wurde in gekühlte 50ml-Röhrchen überführt, für 15min auf Eis inkubiert und bei 2.000rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml TfB1 resuspendiert. Nach Auffüllen mit TfB1 auf 15ml wurde für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 2.000rpm bei 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4ml TfB2 resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in vorgekühlten 1,5ml-Reaktionsgefäßen in einem Volumen von 100µl aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Jeweils 100µl Zellen wurden auf einer LB-Platte ohne Antibiotika, einer Platte mit Kanamycin und einer mit Ampicillin ausgestrichen. Auf den antibiotikahaltigen Platten durften nach Inkubation bei 37°C über Nacht keine Kolonien auftreten, da die Bakterien untransformiert keine Resistenz gegen diese Antibiotika besitzen. Auf der Kontrollplatte sollte nach Inkubation bei 37°C über Nacht ein dichter Bakterienrasen vorhanden sein.

Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden die Zellen mit 10pg pUC 19-DNA transformiert und am nächsten Morgen die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt.

TfB1:

100mM	RbCl <sub>2</sub>
50mM	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
30mM	KOAc
10mM	CaCl <sub>2</sub>
15% <sub>(v/v)</sub>	Glycerin

auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

TfB2:

10mM	RbCl <sub>2</sub>
75mM	CaCl <sub>2</sub>
10mM	MOPS
15% <sub>(v/v)</sub>	Glycerin

auf pH 7,0 einstellen und sterilfiltrieren

### **Transformation von *E. coli***

Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Ein kompletter LR-Reaktionsansatz (2µl) wurde zu 50µl Zellen gegeben, mit den Zellen vermischt und zusammen 5min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 90sec in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42°C überführt. Durch diesen Hitzeschock nahmen die Zellen die DNA auf. Dem Ansatz wurde 750µl LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben, die Bakterien wurden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach etwa einer Stunde wurden die Zellen durch 1min bei 2.500rpm Zentrifugieren pelletiert, der Überstand wurde zum größten Teil abgegossen und das

Pellet in wenigen  $\mu\text{l}$  Medium resuspendiert. Dies wurde auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und die Platten über Nacht im 37°C-Schrank inkubiert.

### 2.12.2 Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

#### Medien

MGL-Medium:

5g	Bacto-Trypton
2,5g	Hefeextrakt
5g	NaCl
5g	Mannit
1,16g	Na-Glutamat
0,25g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,1g	$\text{MgSO}_4$
1mg	Biotin (Stock: 10mg/ml)
ad 1l	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

YEB-Medium:

5g	Bacto-Pepton
1g	Hefeextrakt
5g	Fleischextrakt
5g	Saccharose
0,5g	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
ad 1l	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

YEB-Platten:

1g	Bacto-Pepton
0,2g	Hefeextrakt
1g	Fleischextrakt
1g	Saccharose
0,1g	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
3g	Agar
ad 200ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Alle Medien wurden autoklaviert.

#### Herstellung chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5ml MGL-Medium angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen stationären Phase gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100ml



MGL-Medium verdünnt, so dass die  $OD_{600}$  ca. 0,04–0,08 betrug. Es folgte eine Vermehrung der Bakterien bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5min, 4°C, 5.000rpm) und in 40ml eisgekühltem 1mM HEPES/10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min, 4°C, 5.000rpm) wurden die Zellen in 2ml 1mM HEPES/10% (v/v) Glycerin aufgenommen, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, kurz sedimentiert und in 200–400µl HEPES/10% (v/v) Glycerin resuspendiert. 50µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden bei –80°C gelagert.

### **Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

2µl Plasmid-DNA (~200ng) wurden zu 50µl aufgetauten Zellen gegeben. Nach Wiedereinfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen erneut aufgetaut und 90sec bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde sofort 750µl YEB ohne Antibiotika hinzugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 28°C unter Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf wenige µl verworfen. Es folgte das Ausplattieren der resuspendierten Zellen auf entsprechenden Selektionsplatten, die anschließend 2 Tage bei 28°C inkubiert wurden.

## **2.13 Molekularbiologische Methoden**

### **2.13.1 Plasmid-Präparationen im Minimaßstab**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das Plasmid Miniprep Kit® der Firma BIO-RAD nach Herstellerangaben verwendet. Ein Teil der Übernachtskultur wurde zurückbehalten, um die Bakterien als Glycerinstämme bei -80°C aufheben zu können.

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

Um einfach und schnell den Genotyp von T-DNA-Insertionslinien zu bestimmen, wurde ein PCR-basiertes Verfahren eingesetzt. Die untersuchte genomische DNA wurde aus Blattmaterial der einzelnen Pflanzen gewonnen. 1-2 Blätter von 2-3 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Metallkugel (ø 0,5cm) transferiert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und wenn nötig, bis zur Präparation bei –80°C eingefroren. Die

Proben wurden mit Hilfe eines Tissue-Lysers pulverisiert und 250µl DNA-Präparations-Puffer hinzugegeben, geschüttelt und 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die gelöste DNA enthält, wurde in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und zur Fällung der DNA mit 500µl Isopropanol versetzt. Anschließend wurden die Proben geschüttelt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und weitere 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet bei Raumtemperatur ca. 20min getrocknet und anschließend in 50-100µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Die DNA-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer:

200mM	Tris/HCL pH 7,5
250mM	NaCL
25mM	EDTA pH 8,0
0,5%	SDS

### **2.13.3 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana***

50 – 100mg Blattmaterial wurden mit einem Mörser zerkleinert und mit 1ml Z6-Puffer versetzt. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 0,5ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugegeben und geschüttelt. Nach der Zentrifugation (12.000rpm, 15min, 4°C) wurde der Überstand (wässrige Phase) in ein neues Reaktionsgefäß mit 35µl 1M Essigsäure und 490µl Ethanol überführt und geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (12.000rpm, 10min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das zurückgebliebene Pellet mit 500µl 3M Natriumacetat pH 5,0 gewaschen. Nach erneutem Waschen mit 70% Ethanol wurde wiederholt zentrifugiert (7.500rpm, 5min, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 40µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Um reine RNA zu erhalten wurde die noch vorhandene DNA verdaut (siehe 2.13.4).

### **2.13.4 Verdau von DNA**

Um die noch vorhandene DNA aus der RNA-Lösung (siehe 2.13.3) zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit dem Kit von Ambion<sup>®</sup> durchgeführt.

Reaktionsansatz:

5µg	RNA
1,5µl	10x Puffer
0,8µl	DNase
ad 15µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2µl Inactivation Reagenz hinzugegeben und 2min bei RT inkubiert.

Der Ansatz wurde zentrifugiert (14.000rpm, 2min, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß für die anschließende Reverse Transkription (siehe 2.13.5) überführt.

### 2.13.5 Reverse Transkription

Zum Überstand aus 2.13.4 wurde 1µl Oligo-dT-Primer zugegeben und der Ansatz 5min bei 70°C inkubiert. Zur Inaktivierung wird der Ansatz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 14µl Mastermix zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung fand für 10min bei 70°C im Heizblock statt.

Mastermix:

1µl	10mM dNTPs
5µl	50x Puffer (Bioline®)
0,5µl	BioScript (Bioline®)
ad 14µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 2.13.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1µl der Probe mit dem Nano Drop<sup>®</sup> (ND 1000-Spektralphotometer) gemessen. Das Gerät misst die Absorption von Licht ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) durch die aufgetragene Lösung. Licht mit dieser Wellenlänge wird von den zyklischen Basen der Nukleinsäuren absorbiert. Durch einen Vergleich von  $A_{260}$  der Proben mit der Absorption von Wasser, wurde die DNA-Konzentration in ng/µl bestimmt.

### 2.13.7 Agarosegelelektrophorese (DNA-Gel)

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden unterschiedlich große DNA-Fragmente getrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen den Nukleotiden

der DNA interkaliert, unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254nm sichtbar gemacht. Je nach Größe der gesuchten Fragmente wurde ein 1-2%<sub>(w/v)</sub> Gel hergestellt, wobei für kleinere Fragmente ein höherprozentiges Gel gewählt wurde.

Die eingewogene Agarose wurde in 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

Das erstarrte Gel wurde danach in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Proben sowie ein Größenstandard (1kb-Marker, Invitrogen) aufgetragen. Der Lauf der Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von etwa 150mA durchgeführt. Das Gel wurde mit einem Geldokumentationssystem (Video-Bildverarbeitungsgerät, Fa. Intas, Göttingen, D) fotografiert. Um ein DNA-Fragment aus dem Gel zu eluieren, wurde die entsprechende Bande mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und eluiert (siehe 2.13.10).

50x TAE-Puffer :

2M	Tris/ Essigsäure pH 7,5
1M	NaAc
50mM	EDTA

Ethidiumbromidlösung: 0,5%<sub>(w/v)</sub> Ethidiumbromid in Methanol

### 2.13.8 PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode, um eine bestimmte Nucleotidsequenz durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide, so genannter Primer, zu amplifizieren. Dafür wurde folgender Mastermix angefertigt:

PCR-Mastermix:

2µl	10x Dream- <i>Taq</i> -Puffer (Fermentas)
0,4µl	10mM dNTPs
0,04µl	Dream- <i>Taq</i> -DNA Polymerase (Fermentas)
je 0,4µl	10mM Primer
1µl	DNA
ad 20µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Das PCR-Programm für eine PCR umfasste einen 2min Initialdenaturierungsschritt bei 95°C und anschließend 28-35 Zyklen mit folgenden Schritten: 30s Denaturierung

bei einer Temperatur von 95°C, 30sec Primerannealing bei 55°C und 1min pro 1000bp DNA Elongation bei 72°C. Anschließend wurden die Proben durch Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.13.7).

### **Colony-PCR**

Um eine erste einfache Überprüfung eines transformierten Konstruktes durchführen zu können, wurde eine Colony-PCR durchgeführt. Dabei wurde eine PCR-Reaktion in einem Volumen von 20µl angesetzt. Von den nach der Transformation gewachsenen Klonen wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf eine neue LB-Platte übertragen. Mit dieser Spitze wurden einige Zellen als Matrize in den PCR-Ansatz gegeben und eine Reaktion mit 30 Zyklen durchgeführt.

### **2.13.9 Restriktion von Nukleinsäuren**

Bei einem Restriktionsverdau werden Bereiche von 4 oder mehr Desoxynukleotiden meist mit einer Palindromsequenz von Enzymen erkannt, die selektiv an diesen Stellen Doppelstrangbrüche einführen.

In einem Ansatz wurden DNA, Restriktionsenzym, der entsprechende 10x konzentrierte Restriktionspuffer und steriles Wasser in einem Volumen von 20µl eingesetzt. Dabei wurden zwischen 1 und 10U Enzym pro µg DNA verwendet, wobei gilt, dass 1 Unit Enzym 1µg DNA in einer Stunde schneidet. Die Inkubationstemperatur des Ansatzes wurde nach dem Temperaturoptimum des Enzyms gewählt. Die Reaktionszeit betrug etwa 2h für einen Testverdau.

### **2.13.10 Elution von DNA-Fragmenten**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.13.11 Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden mittels der Kettenabbruchmethode (modifiziert nach Sanger) durchgeführt (Sanger *et al.*, 1975). Hierfür wurde das Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosciences eingesetzt. Für eine Standardreaktion wurden je nach Größe der aufgereinigten DNA 20 bis 50ng eines

PCR-Produktes sowie 0,25µl 10mM Primer und 2µl Big Dye Mix eingesetzt und zu einem Gesamtvolumen von 10µl mit HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das PCR-Programm für Sequenzreaktionen umfasste einen 2min Initialdenaturierungsschritt bei 95°C und anschließend 34 Zyklen mit folgenden Schritten: 30sec Denaturierung bei einer Temperatur von 95°C, 30sec Primerannealing bei 55°C und 1:45min Elongation bei 72°C.

Die Auftrennung durch Gelelektrophorese wurde am Genetischen Institut der Universität zu Köln durchgeführt, die Sequenzen wurden über ein Netzwerk zugänglich gemacht.

### **2.13.12 Artificial micro RNA (amiRNA)**

amiRNAs sind einzelsträngige RNAs, die in natürlich vorkommenden Pflanzen nicht vorhanden sind und aus endogenen miRNA-Vorläufern gebildet werden (Schwab *et al.*, 2006). Hierbei wird die Transkriptmenge der Ziel-mRNA herabgesetzt.

#### **Konstruktion eines amiRNA-Konstrukt**

Nach dem Protokoll von Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology, Tübingen, 2005 (<http://wmd3.weigelworld.org>) wurde ein amiRNA-Konstrukt von *SSADH* hergestellt.

Hierfür wurden 4 verschiedene Primer hergestellt (siehe 2.6), die jeweils eine spezifische Sequenz für den Vektor pRS300 und für das *SSADH*-Gen beinhalten. Eine anschließende PCR mit den Primerkombinationen A-IV, III-II und I-B wurde durchgeführt. Hierbei sind A und B Vektor-spezifische Primer. 3 Fragmente mit den Größen 272bp(A-IV), 172bp(III-II) und 298bp(I-B) wurden dabei amplifiziert. Anschließend wurden diese aus dem Gel in 16µl H<sub>2</sub>O eluiert und mittels einer weiteren PCR zu einem ~700bp großen amiRNA-Konstrukt ligiert. Das Konstrukt wurde ebenfalls eluiert, in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend die Konzentration bestimmt (siehe 2.13.4). Das amiRNA-Konstrukt wurde mittels Gateway<sup>®</sup>-Klonierung (siehe 2.13.13) durch eine TOPO-Reaktion in den pENTRY-D-TOPO-Vektor und über anschließende LR-Reaktion in den pGWB2-Vektor kloniert. Elektrokompente Agrobakterien wurden mit dem Vektor transformiert (siehe 2.12.2), und anschließend haben diese Agrobakterien *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen mit dem amiSSADH-Konstrukt transformiert (siehe 2.10.6).

### 2.13.13 Gateway<sup>®</sup>-Klonierung

Beim Gateway<sup>®</sup>-Klonierungssystem handelt es sich um ein Rekombinase-Klonierungssystem, welches auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$  basiert. Dieses verwendet insgesamt 4 Erkennungssequenzen, sogenannte *att-sites*, die auf spezifische Weise miteinander rekombiniert werden. Zunächst erfolgt die direkte und gerichtete Klonierung des gewünschten PCR-Produkts in den Eingangs- bzw. *entry*-Vektor (z.B. pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>, Invitrogen) zwischen die *att*-Sequenzen. Nun folgt der Rekombinationsschritt in den gewünschten Expressions- oder *destination*-Vektor, der ebenfalls über korrespondierende *att-sites* verfügt. Während der Reaktion, die von der jeweiligen Rekombinase (je nach Art der *att-sites* BP- oder LR clonase<sup>™</sup> Enzyme Mix, Invitrogen) ausgeführt wird, werden die DNA-Abschnitte, die zwischen den *att*-Sequenzen liegen, zwischen *entry*- und *destination*-Vektor ausgetauscht. Unerwünschte Rekombinationsprodukte werden durch das toxische *ccdB*-Gen, das vom *destination*-Vektor in den *entry*-Vektor rekombiniert wird, ausselektiert. Auf diese Weise ist es möglich, durch Rekombination ausgehend von einem *entry*-Klon eine ganze Kollektion von möglichen *destination*-Vektoren einfach herzustellen und so schnell eine Vielzahl von Fragestellungen zu beantworten. Zur Klonierung der verwendeten Konstrukte wurde mit Hilfe des Gateway<sup>®</sup>-Klonierungssystems nach Herstellerangaben (Invitrogen) vorgegangen.

TOPO-Reaktion:

0,2 $\mu$ l	Salt-Solution
0,2 $\mu$ l	pENTR-D-TOPO
0,2 $\mu$ l	DNA (~2-3ng/1kb)
0,6 $\mu$ l	HPLC-H <sub>2</sub> O

Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Vektor in *E.coli* transformiert (siehe 2.12.1) und über die Antibiotika-Resistenz selektioniert. Zur Überprüfung, ob der gewünschte Vektor enthalten ist, wurde eine Colony-PCR (siehe 2.13.8) durchgeführt.

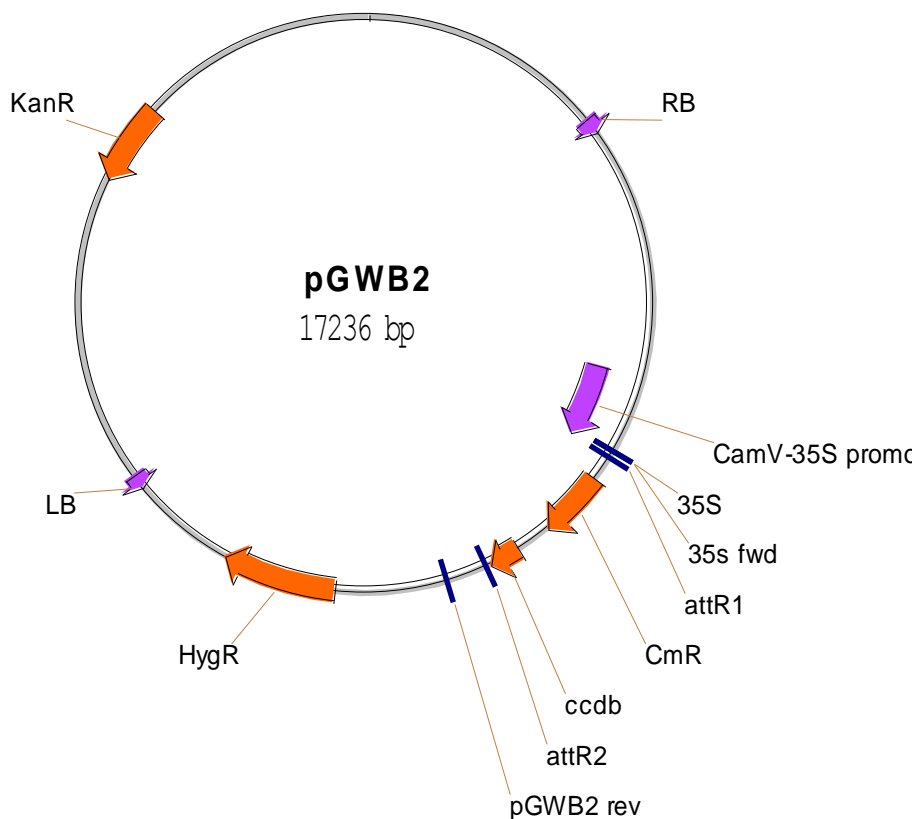
LR-Reaktion:

0,4µl	<i>entry</i> -Vektor
0,1µl	<i>destination</i> -Vektor (30ng)
0,4µl	LR-Clonase Enzym-Mix
0,4µl	HPLC-H <sub>2</sub> O

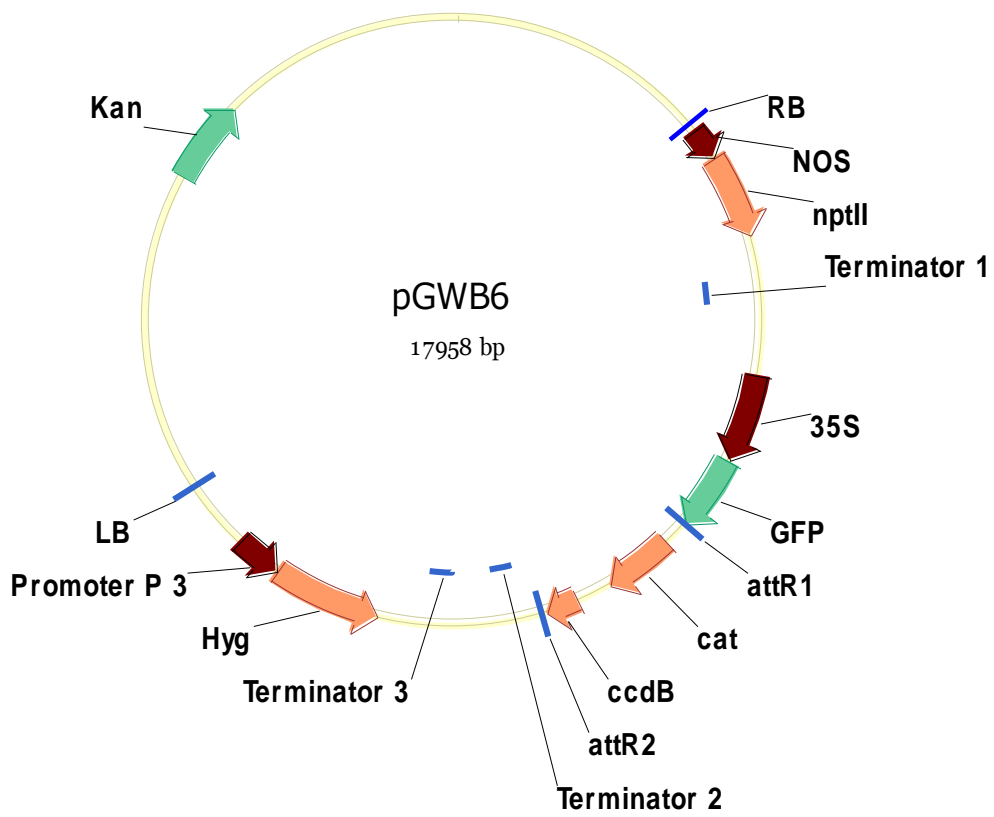
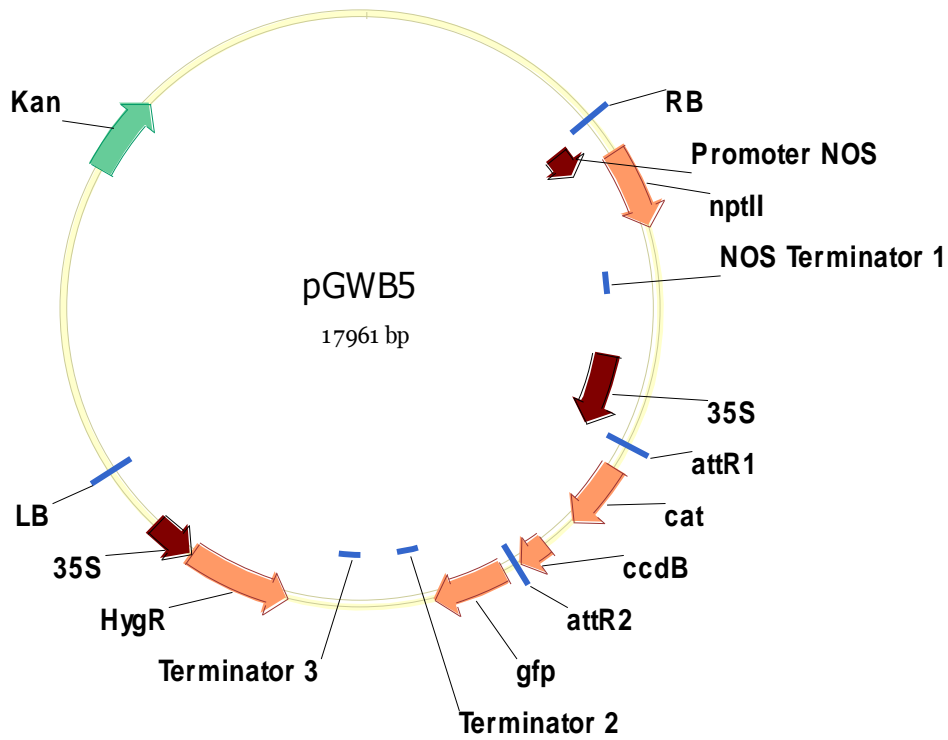
Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur und anschließende Transformation in *E.coli* (siehe 2.12.1), Selektion über die Kanamycin / Hygromycin-Resistenz. Auch hier wurde mittels Colony-PCR (siehe 2.13.8) überprüft, ob das Konstrukt vorhanden war.

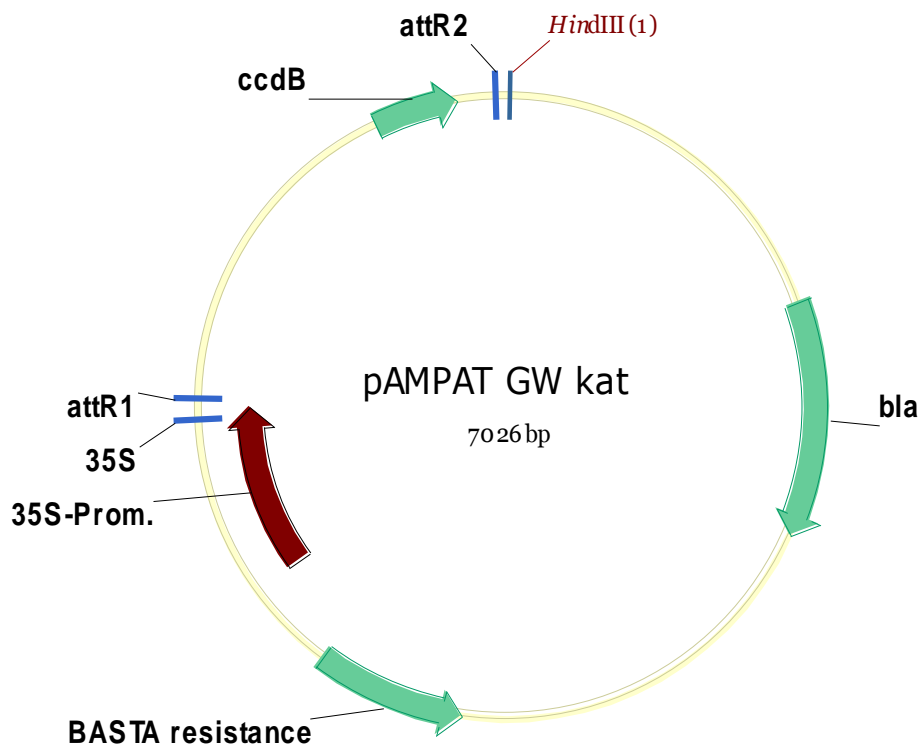
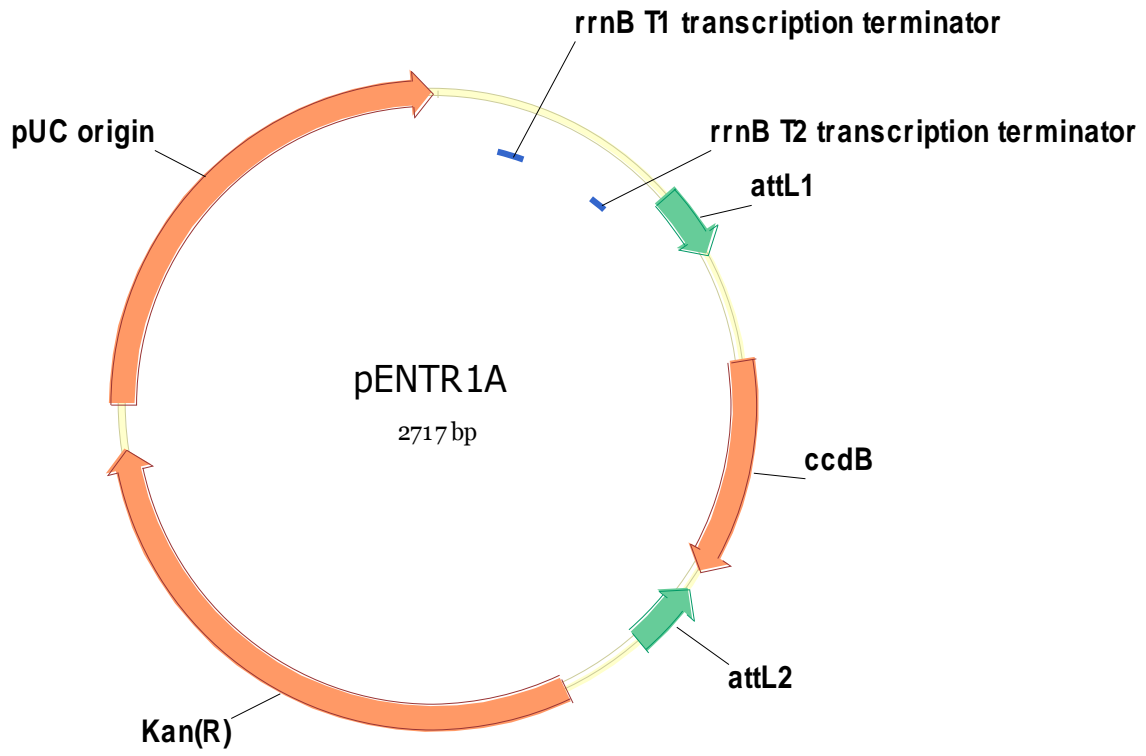
### 2.13.14 Vector-Karten

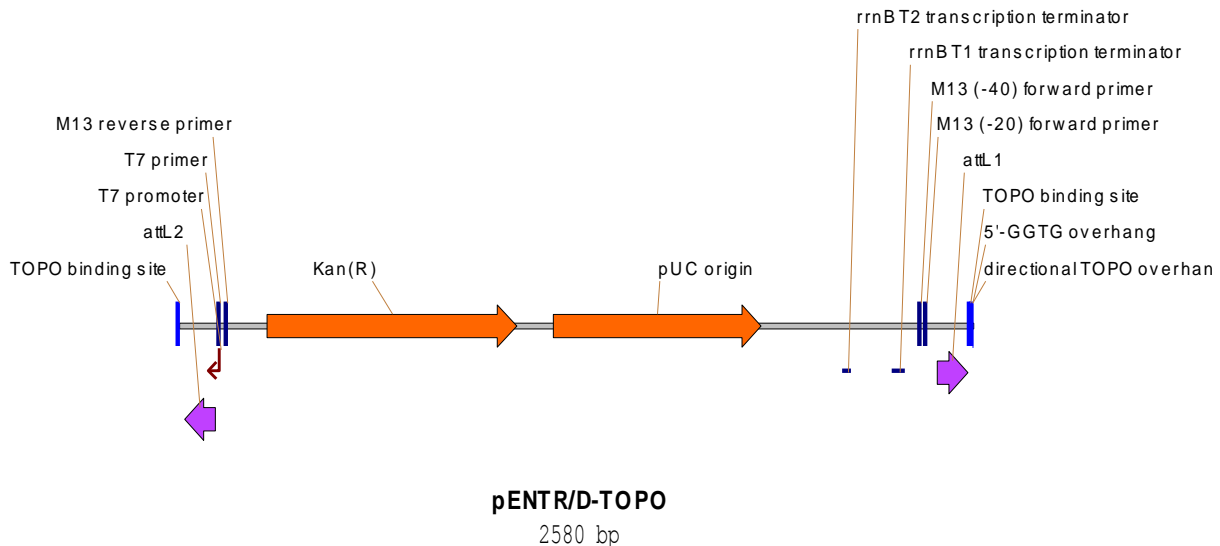
In den folgenden Abbildungen sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren gezeigt.











### 2.13.15 DAB-Färbung

3,3'-Diaminobenzidine (DAB) wird zum Nachweis endogener Peroxidase verwendet. DAB und  $H_2O_2$  werden durch Peroxidasen oxidiert und bildet ein in wässrigen und organischen Lösungsmitteln einen unlöslichen braunen Farbstoff, das im normalen Licht detektiert werden kann und nicht ausbleicht. Somit handelt es sich bei dieser Farbreaktion um einen Nachweis von  $H_2O_2$ .

- 1mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)- HCL, pH7,5
- Blätter 8h inkubieren
- Entfärbung der Blätter mit 80% EtOH

Nach Thordal-Christensen *et al.*, 1997.

## 2.14 Biochemisches Arbeiten

### 2.14.1 GC/MS-Analyse

#### Ernte und Lagerung der Pflanzenproben

Drei bis sechs Wochen alte Blattrosetten wurden in vorher beschriftete und gewogene 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung geschah bei  $-80^{\circ}C$ . Die Ernte wurde während der Lichtperiode durchgeführt. Da für die GC/MS-Messung das

Pflanzenmaterial etwa 100mg wiegen sollte, wurden bei geringem Probengewicht auch mehrere Pflanzen in ein Gefäß geerntet.

### **Extraktionsmethode**

Um Metabolite aus Arabidopsis-Pflanzen zu extrahieren, wurden die Proben in gefrorenem Zustand gewogen und dann mit einem durch flüssigen Stickstoff vorgekühlten Bohrer pulverisiert. Es wurden 300µl von auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühltem Methanol, sowie 30µl interner Standard (0,3mg/ml Ribitol-Lösung in Methanol gelöst,  $-20^{\circ}\text{C}$ ) dazupipettiert. Die Proben wurden auf Eis gelagert und anschließend für 15min bei  $70^{\circ}\text{C}$  auf einem Heizblock geschüttelt. Es folgte eine Zugabe von 200µl Chloroform, kurzes vortexen und ein erneutes Schütteln, diesmal bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5min. Als letztes wurden 400µl HPLC-Wasser dazugegeben, woraufhin sich eine polare durchsichtige Phase und eine apolare grüne Phase bildeten. Es wurde erneut gevortext und danach für 5min bei 14000rpm zentrifugiert. Von der oberen polaren Phase wurden drei Mal 160µl abgenommen und in verschraubbare GC-Fläschchen überführt, worin später auch die Derivatisierung stattfand. Die Fläschchen wurden für ca. 90min im Vakuumkonzentrator ohne Heizung einrotiert. Nach dieser Zeit waren die Extrakte getrocknet und bereit zur Derivatisierung.

Falls die einrotierten Proben nicht sofort derivatisiert und gemessen werden konnten, wurden sie in dicht verschließbaren Plastiktütchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. So konnte ein Eindringen von Wasser während der Lagerung verhindert werden.

### **Derivatisierung**

Zu jeder getrockneten Probe wurden 40µl Methoxyamin Hydrochlorid (20mg/ml gelöst in Pyridin abs.) gegeben. Die Fläschchen wurden kurz gevortext, wobei darauf geachtet wurde, dass sich das Pellet weiterhin im Derivatisierungsmittel befand. Daraufhin wurden die Proben für 90min bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden 70µl MSTFA dazugegeben, erneut gevortext und für 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach der Derivatisierung wurden 100µl der Proben in Bördeldeckelfläschchen, die Mikroeinsätze enthielten, überführt und mit einem Deckel fest verschlossen. Die Mikroeinsätze dienen dazu, die Füllhöhe zu erhöhen, da mit sehr geringem Volumen gearbeitet wurde und die Spritze des Injektionsapparates sonst nicht in der Lage war,

die Proben aufzunehmen. Nach der Überführung in die Bördeldeckelfläschchen waren die Proben bereit zur Messung.

Da die Proben nach 20h nicht mehr stabil waren, sollten für jede Messreihe höchstens 20 Proben derivatisiert werden.

### Messmethode

Zur Messung wurden die Proben in einen Autosampler gestellt. Daraufhin wurden 2µl der Probe für den Lauf auf die Säule injiziert. Ein GC/MS-Lauf lief nach folgendem Schema ab:

Zunächst befand sich die Säule für 5min bei 70°C. Danach wurde die Temperatur mit 5°C/min auf 280°C erhöht und diese für 7min beibehalten. Anschließend wurde die Säule wieder auf 70°C abgekühlt und war daraufhin bereit für den nächsten Lauf.

Als Trägergas wurde Helium 5.0 verwendet.

Im Massenspektrometer (Analysator) wurden die zu einer bestimmten Retentionszeit eluierten Derivate durch Elektronenbeschuss (Electron Impact) ionisiert, wodurch charakteristische einfach geladene Massenfragmente entstanden. Die aufgezeichneten Daten wurden an den Computer weiterleitet. Gemessen wurde erst 7min nach Laufstart, da während dieser Zeit das Lösungsmittel eluierte.

Zur Messung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Um qualitative Informationen zu erhalten wurde ein Scan-Lauf durchgeführt. Hier wurden alle Massen von 50-600amu in 0,1 Schritten gemessen. Der Analysator konnte dabei 2,69 Scans pro sec durchführen. Für quantitative Analysen wurde ein SIM- (*selected ion monitoring*) Lauf durchgeführt. Dafür wurden von den zu analysierenden Metaboliten 2-3 charakteristische Massenfragmente ausgesucht und in der SIM-Methode eingestellt. Ausgewählt wurden die Molekülionen, die charakteristisch für die gesuchten Metabolite waren und eine hohe Abundanz aufwiesen.

Ionen mit 73 (TMS) und 147amu (TMS-O-DMS) wurden nicht ausgewählt, da sie zum Hintergrund gehören und nicht charakteristisch sind (Fiehn *et al.*, 2000), obwohl sie im Scan-Lauf eine recht hohe Abundanz aufwiesen.

Metabolit	RT	Q-Ion	Ionen
Ribitol	28,40- 28,51	217	319, 307
Pyruvat- 1TMS/1-MeOx	9,15- 9,35	174	115, 89

## Material und Methoden

Alanin- 2TMS	10,80- 11,00	116	218, 190
Valin- 2TMS	14,48- 14,60	144	218, 176
GHB- 2TMS	15,05- 15,35	233	218, 100
Leucin- 2TMS	16,20- 16,35	158	204, 117
Isoleucin- 2TMS	16,85- 17,00	158	232, 218
Prolin-2TMS	16,85- 17,00	142	216
Glycin- 3TMS	17,15- 17,30	174	276, 248
Succinat- 2TMS	17,35- 17,50	247	172, 129
Fumarat- 2TMS	18,25- 18,40	245	133, 83
Alanin- 3TMS	18,60- 18,80	188	262, 100
Serin- 3TMS	18,90- 19,05	204	218, 188
Threonin- 3TMS	19,65- 19,80	218	291, 117
beta- Alanine (N,N-BIS-TMS)	20,55- 20,75	174	290, 248
Malat- 3TMS	22,35- 22,55	233	335, 245
Glutamat(Oxo- Prolin)	23,12- 23,17	156	258, 230
Aspartat- 3TMS	23,17- 23,31	232	218, 202
GABA- 3TMS	23,25- 23,37	174	304, 216
Glutamat- 3TMS	25,58- 25,69	246	348, 128
Asparagin- 3TMS	26,83- 26,93	231	266, 218
Citrat- 4TMS/Isocitrat	28,40- 28,51	273	258, 116
Lysin- 3TMS	30,35- 30,48	174	258, 200
Lysin- 4TMS	32,30- 32,42	174	434, 317
Saccharose- 8TMS	45,70- 45,90	361	437, 217

**Tabelle 1: Ausgewählte SIM-Ionen. Gezeigt sind die im SIM-Lauf gemessenen Metabolite, ihre Retentionszeit (RT) in min, das Quantifizierungs-Ion und die zur genauen Bestimmung verwendeten Ionen in amu.**

### Auswertung

Für die Auswertung der GC/MS-Messungen wurde die Chem Station-Software verwendet. Hiermit konnten sowohl qualitative als auch quantitative Analysen durchgeführt werden. Zur Quantifizierung der Peakflächen wurden die Standardeinstellungen des RTE-Integrators der Chem Station-Software verwendet. Quantifiziert wurden alle Peaks, die mehr als 500 Flächeneinheiten besaßen. Die

Peakflächen wurden den einzelnen Metaboliten zugeordnet und mit Hilfe von Excel auf den internen Standard und auf gFG normiert.

### **Herstellung von Standards**

Um Standards für die Massenspektrenbibliothek herzustellen, wurde etwa 1mg der Substanz in 1ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Davon wurden 5-15µl in ein GC-Fläschchen überführt und für eine halbe Stunde in der Speedvac getrocknet. Es folgte die Derivatisierung und Messung. Falls die Substanz sehr labil war, wurde eine Spatelspitze (weniger als 1mg) der Substanz direkt in ein GC-Fläschchen gegeben und derivatisiert. Die derivatisierte Lösung wurde entweder direkt oder 1:10 mit Pyridin verdünnt gemessen. Im Idealfall sollte die Messung einen großen Peak in Form einer Glockenkurve ergeben.

## **2.14.2 HPLC- Analyse**

### **Extraktionsmethode**

Für die Extraktion wurden 50-100mg Pflanzenmaterial in 2ml Eppis mit Metallkugel in flüssigem Stickstoff geerntet. Die Proben wurden entweder bei -80°C gelagert oder mit Hilfe eines tissue lyzers der Firma Qiagen für 1min, 25Hz zerkleinert. Anschließend wurde 1ml kalter (-15°C) Extraktionspuffer zugegeben und die Proben 10min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Extraktionsschritt wurden die Proben für 10min in mit Eis gekühltem Wasser sonifiziert. Um die polare von der unpolaren Phase zu trennen, wurden 650µl eines Wasser:Methanol (3:1) - Gemisches zu jeder Probe gegeben und diese für 1min gevortext. Um die Phasen zu trennen wurde 5min zentrifugiert und untere weiß bis gelbliche Phase (Methanol:Wasser) mit den extrahierten Aminosäuren in eine neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Für die anschließende Messung wurden 200µl Probe mit 800µl HPLC-Wasser verdünnt und in Glasfläschchen gefüllt.

Extraktionspuffer:

25%	Methanol
75%	Methyl-Tert-Butyl-Ether

### Derivatisierung

Die Aminosäuren wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs ortho-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert. Hierfür wurden die Proben mit 0,8M Boratpuffer (pH 10,4) und der Derivatisierungsreagenz im Verhältnis 5:1:6 versetzt und 5µl in die Säule injiziert.

Derivatisierungsreagenz:

1ml	50mg/ml OPA (in 100% ETOH)
9ml	0,8M Boratpuffer pH 10,4
100µl	β-Mercaptopropionsäure

### Messmethode

Zur Messung wurde die HPLC von Dionex (UltiMate3000) verwendet. Die Proben wurden über einen nicht linearen Lösungsmittelgradienten über eine Säule (Phenomenex, HyperClone 3u ODS (C18)) aufgetrennt und anschließend mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert.

Laufpuffer A:

22ml	0,4M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5
2ml	Tetrahydrofuran (THF)
ad 1l	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Laufpuffer B:

25ml	0,4M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5
175ml	Methanol
110ml	Acetonitril
225ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Gradient:

Zeit t (min)	B (%)	Fluß (ml/min)	Temp (°C)
0	0	0,8 (konstant)	30
5	0		
16	15		
26	50		
42	60		
46	100		
52	100		
53	0		
62	0		



## **Auswertung**

Anhand der Peakfläche der einzelnen Standardverdünnungen wurde eine Eichgerade erstellt. Aus dieser konnte die genaue Konzentration jeder einzelnen Aminosäure im Blattextrakt berechnet und auf gFG bezogen werden.

## **Herstellung von Aminosäure-Standards**

Jeweils 10 $\mu$ l einer 2mM Aminosäure-Standardlösung wurde in ein 1,5ml Reagiergefäß gegeben und auf 800 $\mu$ l mit HPLC-Wasser aufgefüllt (25 $\mu$ M jede Aminosäure). Von diesem Aminosäure-Standardmix wurden folgende fünf Verdünnungen hergestellt und in Glasfläschchen gefüllt:

1.	40 $\mu$ l Mix + 960 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	1,0 $\mu$ M
2.	100 $\mu$ l Mix + 900 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ M
3.	200 $\mu$ l Mix + 800 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	5,0 $\mu$ M
4.	400 $\mu$ l Mix + 600 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ M
5.	800 $\mu$ l Mix + 200 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ M

Für die Messung wurden je 5 $\mu$ l eingespritzt.

## **2.15 Signifikanztest**

Es wurde ein „Student's t-test“ durchgeführt, um signifikante Abweichungen von Messwerten von Kontrollpflanzen zu erfassen.

Als signifikant unterschiedlich zu Kontrollen wurden alle Werte von  $p < 0,05$  angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der Doppelmutante *gaba-t x ssadh*

2008 wurde von Ludewig *et al.* beschrieben, dass eine zusätzliche Mutation der GABA-Transaminase in der *ssadh* Mutante den starken Phänotyp der *ssadh* Mutante unterdrückt.

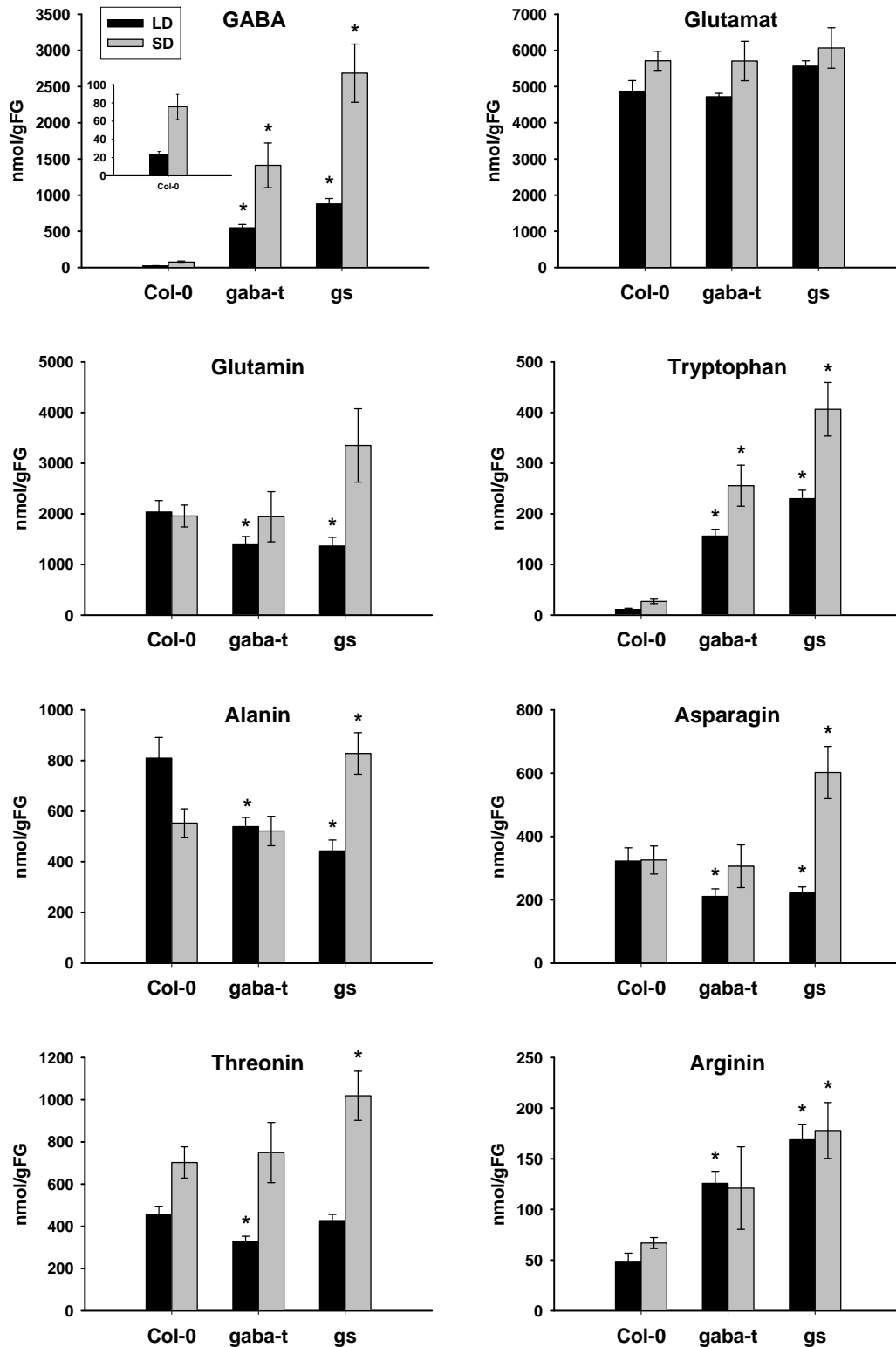
Unter Kurztagbedingungen zeigen diese Doppelmutanten *gaba-t x ssadh* (*gs*) dennoch einen Phänotyp, der dem der *ssadh* Mutante ähnelt, jedoch im Vergleich viel schwächer ist. Die Rosettenblätter sind gekräuselt und können Nekrosen bilden. Durch die DAB-Färbung (braune Färbung) ist deutlich zu erkennen, dass die Doppelmutante unter Kurztagbedingungen  $H_2O_2$  akkumuliert (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Vergleich von Wildtyp, *ssadh* und *gs* unter Langtag- (a) und Kurztagbedingungen (b) SD-short day, von zwei (a) bzw. drei Wochen (b) alten Pflanzen. Abbildung c zeigt DAB-staining vom Wildtyp und der *gs* Doppelmutante. Pflanzen sind 3 Wochen unter Kurztagbedingungen gewachsen. Markierung entspricht 0,22cm.**

Um den Unterschied zwischen Langtag und Kurztag weiter zu untersuchen und die mögliche Ursache für diesen Phänotyp herauszufinden, wurden Blattproben von *gaba-t* Mutanten und *gs* Doppelmutanten auf ihre unterschiedlichen Aminosäuregehalte mittels HPLC-Messung im Vergleich zum Wildtyp (Col-0) untersucht (siehe Abbildung 8).

## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Darstellung der HPLC-Daten des Aminosäuregehalts von *gaba-t* und *gs* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Col-0). Die Pflanzen wurden unter Langtag- (LD-long day, schwarze Säulen) oder Kurztagbedingungen (SD-short day, graue Säulen) zwei (LD) bzw. drei Wochen (SD) angezogen. Die Säulen entsprechen Mittelwerten von  $n = 10$  Pflanzen  $\pm$  Standardfehler. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind signifikant verändert zum Wildtyp der gleichen Anzucht.

Mit Hilfe der HPLC-Messung von *gaba-t* und *gs* Mutanten konnte festgestellt werden, dass unter Langtagbedingungen der GABA Gehalt in der *gaba-t* Mutante im Vergleich zum Wildtyp um das 24-fache erhöht ist und in der Doppelmutante *gs* sogar um das 38-fache. Unter Kurztagbedingungen staut GABA in der Einzelmutante um das 19-fache an, jedoch liegt der Gesamtgehalt deutlich über dem Gehalt der unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Bei der Doppelmutante konnte unter Kurztagbedingungen ein 36-mal höherer Wert an GABA gemessen werden. Dies ist im Verhältnis Mutante zu Wildtyp zwar nicht erhöht, jedoch liegt der Gesamtgehalt deutlich über den Werten der unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen.

In den Mutanten wurde jeweils ein erhöhter GABA Gehalt gemessen, dies hat jedoch keinen Einfluß auf den in der Pflanze vorkommenden Pool an Glutamat, obwohl Glutamat durch die GAD in GABA umgewandelt wird.

Glutamin ist im Gegensatz zu GABA und Glutamat in den Mutanten unter Langtagbedingungen in geringeren Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp vorhanden. In den Blattextrakten aus Kurztag konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

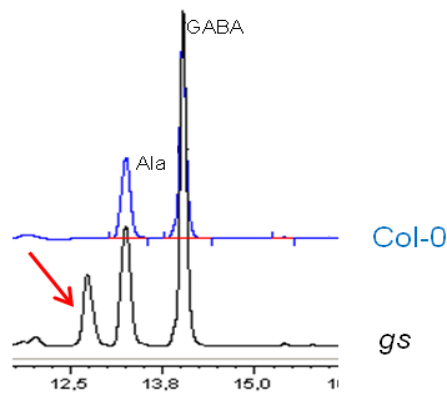
Das Verhältnis von Tryptophan in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ähnelt dem von GABA. Sowohl unter Kurztag- als auch unter Langtagbedingungen staut in den Mutanten Tryptophan an, ebenfalls mehr in der *gs* Doppelmutante. Im Vergleich zum Wildtyp hat die *gaba-t* Mutante unter Langtagbedingungen 14-mal und unter Kurztagbedingungen 9-mal mehr Tryptophan, in der Doppelmutante konnte 20-mal (LD) bzw. 15-mal mehr Tryptophan gemessen werden.

Die Gehalte von Alanin und Asparagin sind in der *gaba-t* und *gs* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt. Der Alaningehalt ist um ~40% reduziert, Asparagin um ~30%. Unter Kurztagbedingungen ist die Konzentration von Alanin und Asparagin in der *gaba-t* Mutante unverändert gegenüber dem Wildtyp, die Doppelmutante *gs* staut jedoch beide Aminosäuren an. Alanin ist unter diesen Bedingungen um ~45% und Asparagin um ~87% erhöht. Der Alaningehalt ist jedoch in der Doppelmutante unter Kurztagbedingungen genauso hoch wie im Wildtyp unter Langtagbedingungen. Asparagin ist dagegen unter Kurztagbedingungen in der Doppelmutante im Vergleich zur Einzelmutante oder dem Wildtyp unter beiden Bedingungen deutlich erhöht.

Unter Langtagbedingungen ist der Aminosäuregehalt von Threonin in beiden Mutanten beinahe unverändert zum Wildtyp. Die Doppelmutante ist unter Kurztagbedingungen signifikant um ~45% erhöht, wohingegen die *gaba-t* Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist.

Arginin staut sowohl unter Langtagbedingungen als auch unter Kurztagbedingungen in beiden Mutanten an. Die *gaba-t* Mutante hat unter beiden Bedingungen etwa doppelt so viel Arginin und die *gs* Doppelmutante besitzt etwa das Dreifache an Arginin im Vergleich zum Wildtyp.

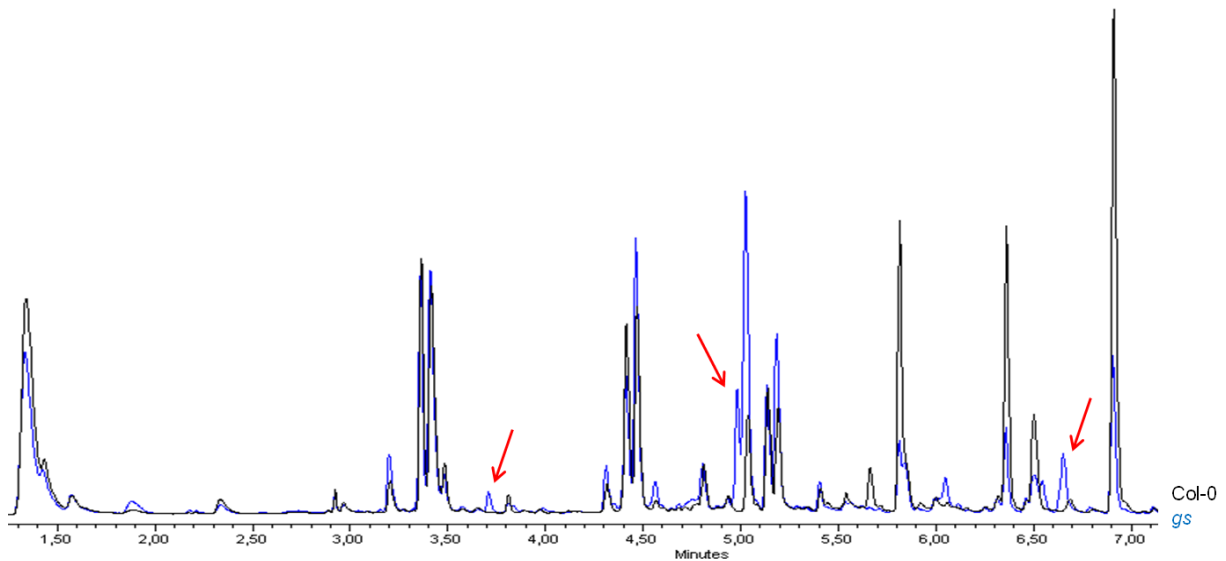
Bei der HPLC-Messung ist ein weiterer Peak aufgefallen, der nicht mit den verwendeten Aminosäurestandards abgeglichen werden konnte (siehe Abbildung 9). Da es sich um eine Derivatisierung an Aminogruppen handelt, musste diese Substanz eine oder mehrere Aminogruppen beinhalten. Verschiedene Substanzen mit einer oder mehreren Aminogruppen wurden als Standard gemessen (Spermidin, Spermin,  $\beta$ -Alanin). Jedoch konnte bis jetzt keine zur gleichen Retentionszeit laufende Substanz ermittelt werden wie die Unbekannte.



**Abbildung 9:** HPLC-Chromatographieausschnitt eines Overlays von Wildtyp (blau) und *gs* Doppelmutante (schwarz). Mit Pfeil ist die unbekannte Substanz in der Doppelmutante *gs* markiert.

Um mögliche neue und unbekannte Substanzen zu ermitteln, wurde eine andere Derivatisierungsmethode verwendet. Im UPLC-Chromatogramm konnten ebenfalls Unterschiede zwischen Wildtyp und *gs* Doppelmutante im Chromatogramm gezeigt werden (siehe Abbildung 10). Dabei konnten drei Peaks identifiziert werden, die im

Wildtyp nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind (gekennzeichnet mit rotem Pfeil).



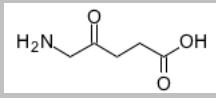
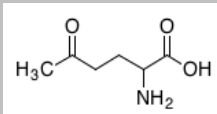
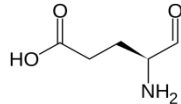
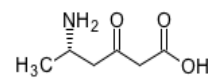
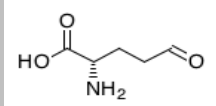
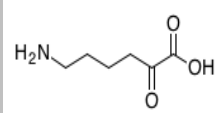
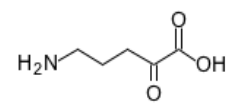
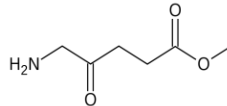
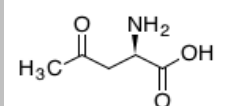
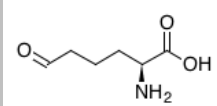
**Abbildung 10: UPLC-Chromatogrammausschnitt der *gs* Doppelmutante (blau) im Vergleich zum Wildtyp (schwarz). Die mit Pfeil gekennzeichneten Peaks sind im Wildtyp nur in geringen Mengen oder nicht vorhanden.**

Die anschließende Massenspektrometrie ergab folgende Summenformeln für die markierten Substanzen:

- $C_5H_9NO_3$
- $C_6H_{11}NO_3$
- $C_7H_{13}NO_3$

In verschiedenen Datenbanken konnten keine Substanzen für  $C_7H_{13}NO_3$  gefunden werden (Chemspider, metlin.scripps.edu, massbank.jp, PlantCyc, Knapsack).

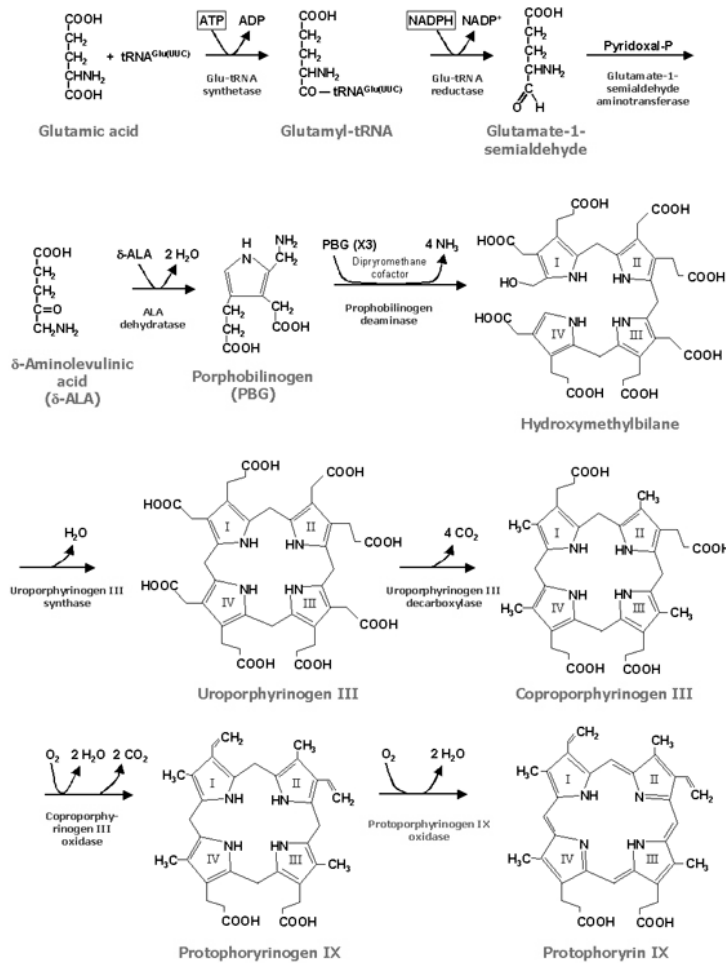
Kandidaten für  $C_5H_9NO_3$  und  $C_6H_{11}NO_3$  sind in Tabelle 2 aufgelistet.

$C_5H_9NO_3$	$C_6H_{11}NO_3$
<b>5-Aminolävulinsäure</b> 	<b>5-Oxo-2-Aminohexansäure</b> 
<b>Glutamat-1-Semialdehyd</b> 	<b>3-Oxo-5-Aminohexansäure</b> 
<b>Glutamat-5-Semialdehyd</b> 	<b>2-Oxo-6-Aminocapronsäure</b> 
<b>2-Oxo-5-Aminopentansäure</b> 	<b>Methylaminolävulinsäure</b> 
<b>4-Oxo-2-Aminopentansäure</b> 	<b>Allysin</b> 

**Tabelle 2: Mittels UPLC/MS- Analyse ermittelte Kandidatensubstanzen mit den Summenformeln  $C_5H_9NO_3$  und  $C_6H_{11}NO_3$ .**

5-Aminolävulinsäure und Glutamat-1-Semialdehyd sind Vorstufen der Porphyrinsynthese. Glutamat-1-Semialdehyd entsteht aus Glutamat und wird durch die Glutamat-1-Semialdehydaminotransferase zu 5-Aminolävulinsäure umgesetzt. Anhand dieser Synthese wird die Geschwindigkeit der Chlorophyllbildung festgelegt, welches aus Porphyrin gebildet wird (siehe Abbildung 11).

## Ergebnisse



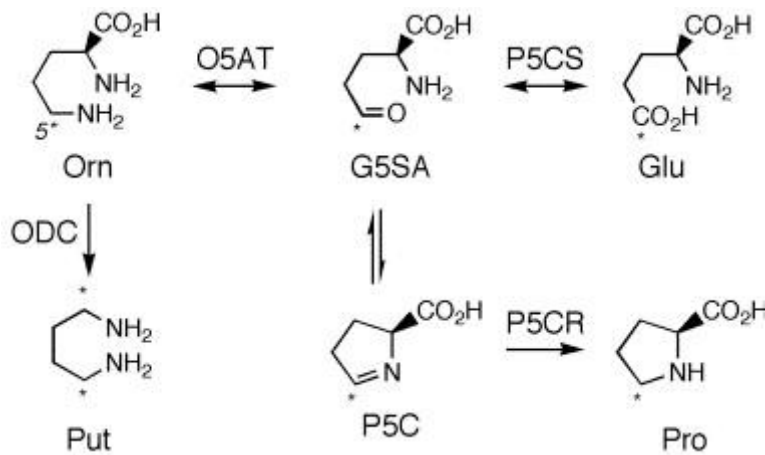
**Abbildung 11: Porphyrinbiosynthese mit den Vorstufen 5-Aminolävulinsäure (δ-ALA) und Glutamat-1-Semialdehyd verändert nach:**

[www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/Images/Protoporphyrinogen\\_synthesis.jpg](http://www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/Images/Protoporphyrinogen_synthesis.jpg)

Bei Methylaminolävulinsäure handelt es sich um den Methylester von 5-Aminolävulinsäure. Methylaminolävulinsäure wird als synthetische Substanz zur Behandlung von Hautkrebs verwendet. Somit konnte dieser Kandidat ausgeschlossen werden.

Glutamat-5-Semialdehyd wird aus Glutamat gebildet und ist eine Vorstufe von Ornithin oder Prolin (siehe Abbildung 12).





**Abbildung 12: Synthese von Ornithin, Putrescin und Prolin. Metabolite: Orn - Ornithin, G5SA - Glutamat-5-Semialdehyd, Glu - Glutamat, Put - Putrescin, P5C - 1-Pyrrolin-5-Carboxylat, Pro - Prolin. Enzyme: O5AT -  $\delta$ Ornithinaminotransferase, P5CS - P5CSynthetase, ODC - Ornithindecaboxylase, P5CR - P5CReductase (verändert nach Schardl *et al.*, 2007).**

5-Oxo-2-Aminohexansäure, 3-Oxo-5-Aminohexansäure, 2-Oxo-6-Aminocapronsäure und Allysin sind Produkte des Abbaus von Lysin, jedoch ist bis jetzt kein Enzym in Arabidopsis bekannt, das an diesen Reaktionen beteiligt ist (siehe <http://www.genome.jp/kegg/>, Lysine degradation).

Die letzten beiden Kandidaten 2-Oxo-5-Aminopentanonsäure und 4-Oxo-2-Aminopentanonsäure sind Abbauprodukte von Arginin und Ornithin. 2-Oxo-5-aminopentanonsäure ist gleichzeitig auch ein Abbauprodukt von Prolin (siehe <http://www.genome.jp/kegg/>, Arginine and proline metabolism, D-Arginine and D-ornithine metabolism). Hier sind ebenfalls keine Enzyme aus Arabidopsis bekannt.

Von diesen zehn Kandidaten konnten lediglich 5-Aminolävulinsäure und Methylaminolävulinsäure käuflich erworben werden, um diese als Standardlösungen zu messen. Jedoch stimmten die Retentionszeiten beider Substrate nicht mit dem unbekanntem Peak überein.

Weitere Analysemethoden sind nötig, um die unbekanntem Substanz zu ermitteln.

### 3.2 Rettung des Kurztagphänotyps der *gs* Doppelmutante

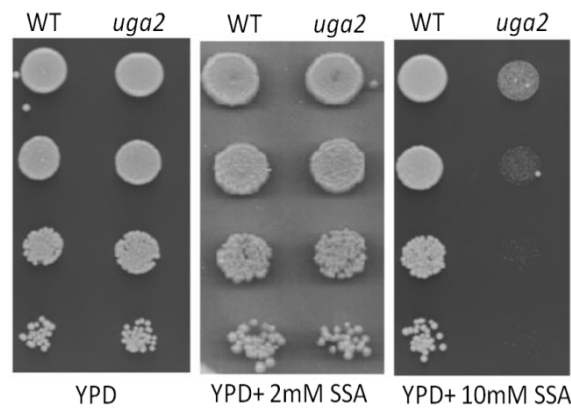
Zur Rettung des *gs* Kurztagphänotyps (siehe Abbildung 7) wurden verschiedene Ansätze verwendet, um unbekannte Gene und Substrate, die für diesen Phänotyp verantwortlich sind, zu identifizieren. Dies sollte durch Überexpression von Genen des GABA-Stoffwechsels aus Hefe und Arabidopsis, sowie durch die Kreuzung von Mutanten mit einer Aminotransferase, die unter Kurztagbedingungen hochreguliert ist, und mittels EMS-Mutagenese untersucht werden.

#### 3.2.1 Überexpression von GABA-Shunt Genen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* im Hintergrund der *gs* Doppelmutante

Um herauszufinden, ob SSA für den Phänotyp der *gs* Doppelmutante unter Kurztagbedingungen verantwortlich ist und ob es einen Unterschied macht, in welchem Kompartiment SSA produziert wird, wurden Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* im Hintergrund der Doppelmutante überexprimiert.

Der GABA-Stoffwechsel läuft in Hefen im Zytosol ab und nicht, wie in Pflanzen oder beim Menschen, in den Mitochondrien. Die GABA-Transaminase aus Hefe verwendet, im Unterschied zu der aus Arabidopsis, GABA und  $\alpha$ -Ketoglutarat anstelle von GABA und Pyruvat, um SSA und Glutamat statt SSA und Alanin herzustellen (Coleman *et al.*, 2001).

Dereje Mekonnen hat während seiner Doktorarbeit Hefe *uga2* Mutanten, welche eine Mutation im *SSADH* Gen besitzen, im Vergleich zum Wildtyp auf YPD Medium ohne und mit SSA ausgebracht (siehe Abbildung 13, Mekonnen, 2012). Bei einer Konzentration von 2mM SSA konnte im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied festgestellt werden. Erst bei einer Konzentration von 10mM SSA trat ein verringertes Wachstum der *uga2* Hefezellen auf.

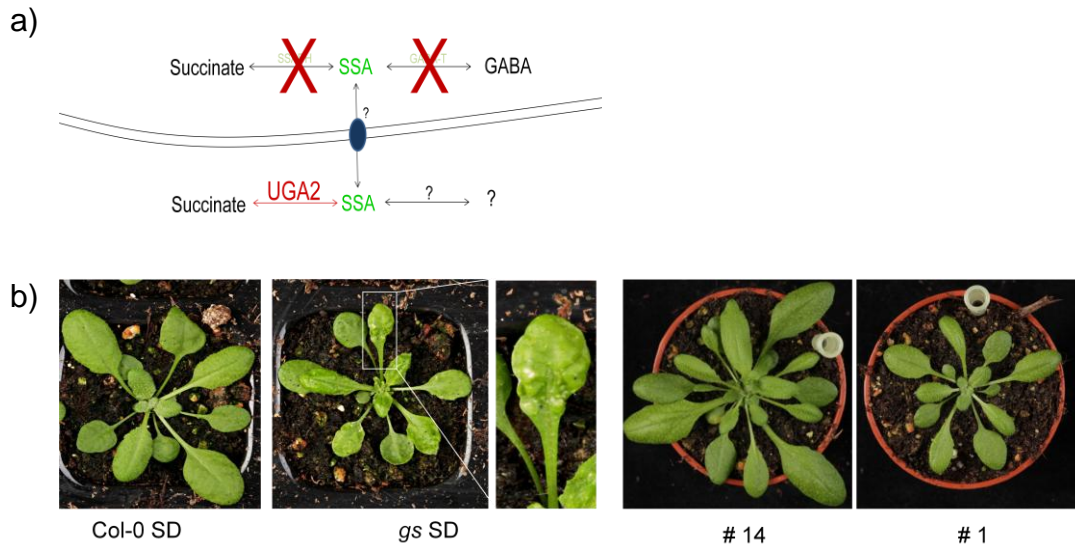


**Abbildung 13: *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp und *uga2* (SSADH) Mutante auf YPD Medium mit und ohne 2mM bzw. 10mM SSA (Mekonnen, 2012).**

Hingegen zeigen *Arabidopsis ssadh* Mutanten schon einen starken Phänotyp unter Normalbedingungen (siehe Abbildung 7) und sterben schon bei geringen Konzentrationen von 0,4mM SSA. Die Doppelmutante *gaba-t x ssadh* zeigt unter Normalbedingungen keinen aberranten Phänotyp, ist jedoch ebenfalls sensitiv gegenüber SSA (Ludewig *et al.*, 2008). Bei einer Konzentration von 0,8mM SSA sterben im Gegensatz zum Wildtyp oder der *gaba-t* Einzelmutante bereits die meisten Pflanzen der *gs* Doppelmutante.

Um herauszufinden, ob die Lokalisation von GABA-Stoffwechsel Enzymen eine Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber SSA hat, wurden die Gene *SSADH* (*UGA2*) und *GABA-T* (*UGA1*) aus Hefe in der Doppelmutante *gs* überexprimiert. Zur Kontrolle wurden die *Arabidopsis* Gene, mit und ohne Transitpeptid-Kodierung im 5'-Bereich, in die Doppelmutante transformiert. Alle Gene wurden in den pAMPAT Vector kloniert und anschließend in die jeweilige *Arabidopsis* Pflanze transformiert. Zur Analyse der Lokalisation von GABA-Stoffwechsel Enzymen wurden die jeweiligen Gene in den pGWB5 Vector (enthält zusätzlich eine Sequenz für GFP) kloniert und anschließend in *Arabidopsis Col-0* Pflanzen transformiert. Die jeweilige T<sub>2</sub>-Generation wurde analysiert.

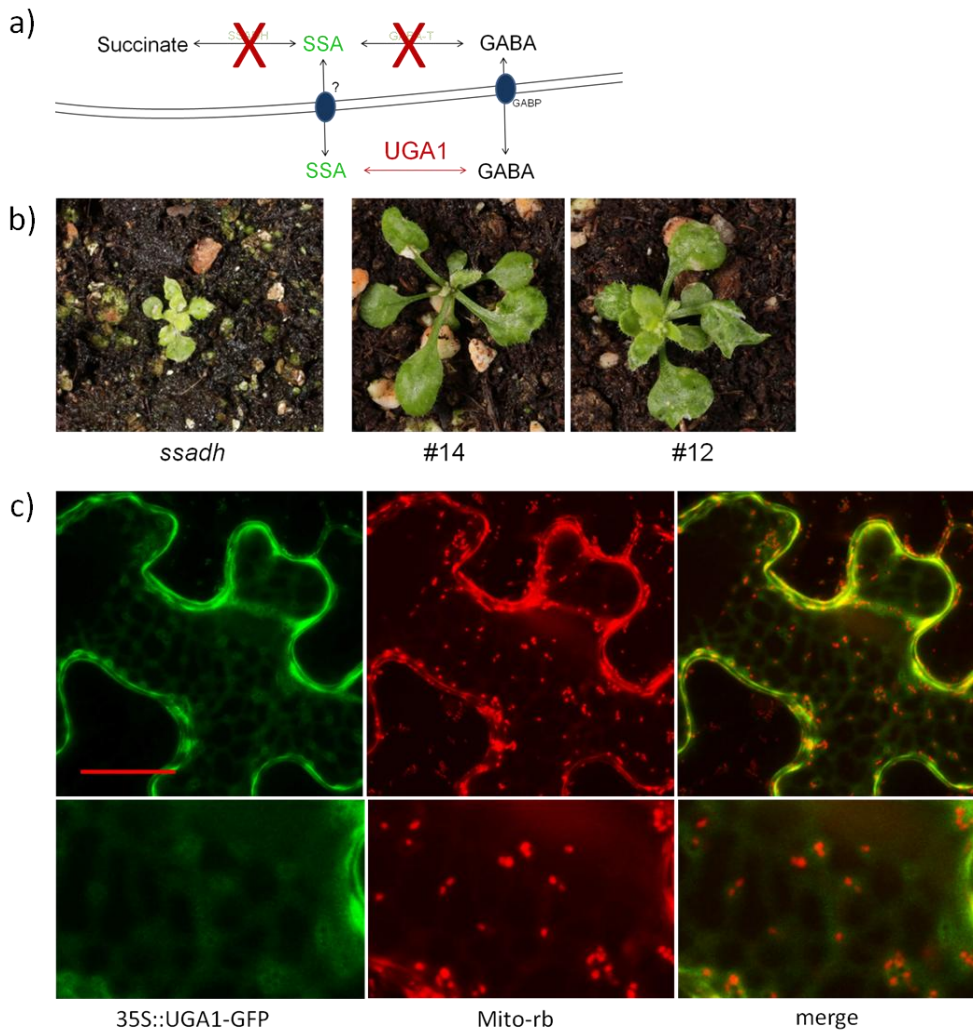
Eine Überexpression von *UGA2* in der Doppelmutante *gs* führt zu einer Rettung des Phänotyps unter Kurztagbedingungen (#14 und #1, siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: a) Schematische Darstellung der zytosolischen Überexpression von UGA2 (SSADH) aus Hefe im Hintergrund der *gs* Doppelmutante. b) Abbildung von Wildtyp (Col-0), *gs* Doppelmutante und den Überexpressionslinien UGA2 im *gs* Hintergrund (#14, #1) unter Kurztagbedingungen (drei Wochen alt).**

Es konnte hiermit eine Beteiligung von SSA am Phänotyp der Doppelmutante gezeigt werden. Möglicherweise werden in der *gs* Doppelmutante nur geringe Konzentrationen an SSA hergestellt, die möglicherweise im Zytosol produziert werden und nicht in den Mitochondrien. Ebenfalls könnten nur geringe Mengen SSA in den Mitochondrien hergestellt werden, die dann über den SSA Transporter ins Zytosol transportiert werden müssten. Das sich im Zytosol befindene SSA kann dann von UGA2 zu Succinat abgebaut werden, und der aberrante Phänotyp wird nicht ausgeprägt. Das entstandene Succinat kann über einen Succinat/Fumarat Transporter wieder in die Mitochondrien gelangen (Catoni *et al.*, 2003) und dort für den Citratzyklus zur Verfügung stehen.

Um herauszufinden, ob eine Überexpression der zytosolischen GABA-Transaminase (UGA1) aus Hefe im Hintergrund der *gs* Doppelmutante zu einem *ssadh* Phänotyp führt, wurde UGA1 in *gs* überexprimiert (siehe Abbildung 15).



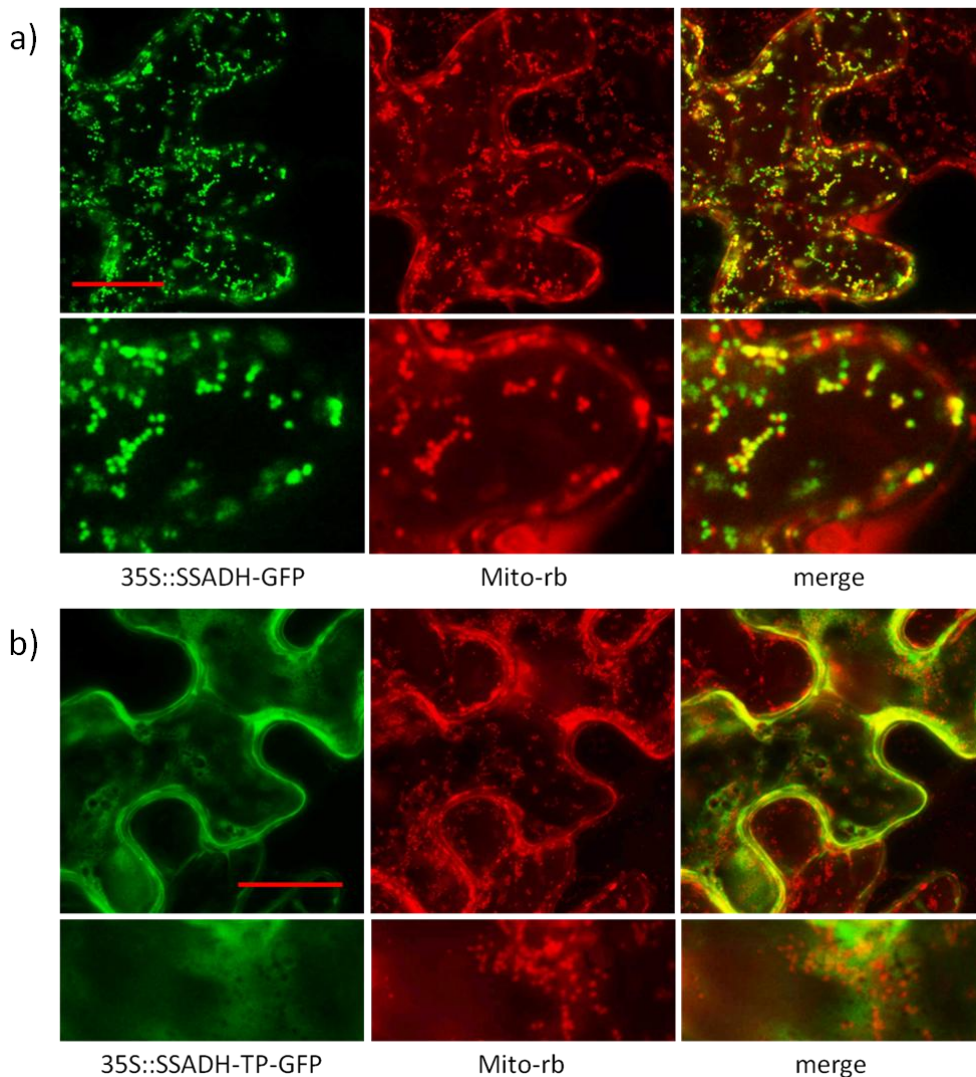
**Abbildung 15: a) Schematische Darstellung der Überexpression von UGA1 (GABA-T) aus Hefe im Hintergrund der *gs* Doppelmutante. b) Abbildung der *ssadh* Mutante und der Überexpressionslinien UGA1 im *gs* Hintergrund (#14, #12) unter Langtagbedingungen (drei Wochen im Gewächshaus gewachsen). c) Transiente Expression von 35S::UGA1-GFP, dem Mitochondrienmarker Mito-rb und der Überlagerung beider Expressionen (merge) in *Nicotiana benthamiana*. Obere Abbildung zeigt eine ganze Zelle (Markierung entspricht 20µm) und untere Abbildung einen Vergrößerungsausschnitt aus der oberen Abbildung.**

Abbildung 15 b) zeigt, dass eine Überexpression der zytosolischen GABA-Transaminase im Hintergrund der Doppelmutante *gs* zu einem Phänotyp ähnlich dem der *ssadh* Mutante führt, welcher im Vergleich jedoch deutlich schwächer ist. Dies liegt möglicherweise an einer Expression der GABA-Transaminase im Zytosol. Somit wird SSA im Zytosol hergestellt und möglicherweise nur geringe Konzentrationen über einen bisher unbekanntem SSA Transporter in die

Mitochondrien transportiert. Ein wesentlich schwächerer Phänotyp lässt sich auch durch die unterschiedlichen Substrate der GABA-Transaminasen aus Hefe und Arabidopsis erklären. Wie bereits beschrieben, benutzt die GABA-Transaminase aus Arabidopsis Pyruvat als Cosubstrat für die Reaktion, hingegen benutzt die Hefe GABA-Transaminase  $\alpha$ -Ketoglutarat als Cosubstrat.

Abbildung 15 c) zeigt, dass UGA1 nicht in den Mitochondrien, sondern im Zytosol lokalisiert ist. In der Vergrößerung ist deutlich zu erkennen, dass es keine Colokalisation mit dem Mitochondrienmarker gibt, da die Mitochondrien bei der Überlagerung weiterhin eine rote Färbung aufweisen. Die gelbe Färbung an den Zellwänden ist auf eine Ansammlung von Mitochondrien zurückzuführen, die sich mit der Fluoreszenz des GFPs von UGA1 im Zytosol in Zellwandnähe überlagern.

Das *SSADH* Gen aus Arabidopsis konnte, wie bereits beschrieben (Breitkreuz *et al.*, 1995), in den Mitochondrien lokalisiert werden. In der Vergrößerung zeigten sich deutliche Überlagerungen von GFP und RFP als gelbe Färbung in den Mitochondrien (siehe Abbildung 16). Das gleiche Gen ohne Transitpeptidkodierung im 5'-Bereich (das Transitpeptid besteht aus den ersten 33 Aminosäuren) zeigte keine Lokalisation in den Mitochondrien, sondern im Zytosol (siehe Abbildung 16). Hier wiesen in der Überlagerung (merge) von GFP und RFP die Mitochondrien keine gelbe Färbung und somit keine Colokalisation auf.



**Abbildung 16: Transiente Expression von 35S::SSADH-GFP mit Transitpeptid a) und ohne Transitpeptid b) aus Arabidopsis, dem Mitochondrienmarker Mito-rb und der Überlagerung beider Expressionen (merge) in *Nicotiana benthamiana*. Obere Abbildung zeigt eine ganze Zelle (Markierung entspricht 20µm) und untere Abbildung einen Vergrößerungsausschnitt aus der oberen Abbildung.**

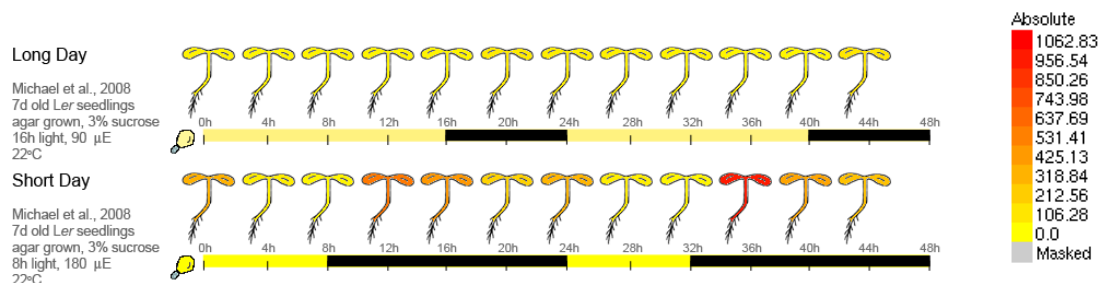
Als Kontrollen wurden sowohl Überexpressionen von SSADH als auch GABA-Transaminase aus Arabidopsis mit und ohne Transitpeptid in Arabidopsis Col-0, *ssadh* und *gs* Mutanten Pflanzen transformiert. Möglicherweise zeigt sich hier ein Unterschied zwischen Genen, die im Zytosol oder in den Mitochondrien lokalisiert sind. Zudem könnte mit Hilfe des Vergleichs der GABA-Transaminase Überexpressionen aus Hefe und Arabidopsis gezeigt werden, ob das Cosubstrat der GABA-Transaminase entscheidend für die Menge an gebildetem SSA ist.

Die Klonierung von SSADH und GABA-Transaminase aus Arabidopsis mit und ohne Transitpeptid wurden fertiggestellt, Pflanzen konnten bis jetzt jedoch nicht analysiert werden.

### 3.2.2 Kreuzung *bcat* x *gs*

Um mögliche Aminotransferasen, die für den Kurztagphänotyp verantwortlich sein könnten, zu identifizieren wurde nach Aminotransferasen gesucht, die unter Kurztagbedingungen hochreguliert werden und möglicherweise GABA als Substrat verwenden könnten.

Ein möglicher Kandidat hierfür war das Gen At1g10070. Dieses Gen kodiert BCAT-2 (branched-chain amino acid aminotransferase) und katalysiert die Transaminierung von Leucin, Isoleucin und Valin zu ihren jeweiligen  $\alpha$ -Keto-Säuren. Sie ist sowohl an der Synthese als auch am Abbau dieser Aminosäuren beteiligt. Bei BCAT-2 konnte eine Lokalisation in den Chloroplasten gezeigt werden (Diebold *et al.*, 2002), jedoch könnte es auch in den Mitochondrien oder dem Zytosol lokalisiert sein (siehe Aramemnon) und wird unter Kurztagbedingungen transkriptionell hochreguliert (Schaffer, 2001; siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: Vergleich der Genexpression des Gens *BCAT-2* unter Langtag- (Long Day) und Kurztagbedingungen (Short Day). Intensitätsskala von gelb bis rot, wobei gelb am geringsten und rot am stärksten exprimiert bedeutet (Arabidopsis eFP browser).**

Die Mutante *bcat-2*, die einen *knock-out* des *BCAT-2* Gens hat, zeigt unter Normalbedingungen keinen Phänotyp. Diese Mutante wurde mit der *gs* Doppelmutante gekreuzt. Die Dreifachmutante *bcat-2* x *gs* zeigte unter Kurztagbedingungen jedoch noch immer den Kurztagphänotyp der *gs*

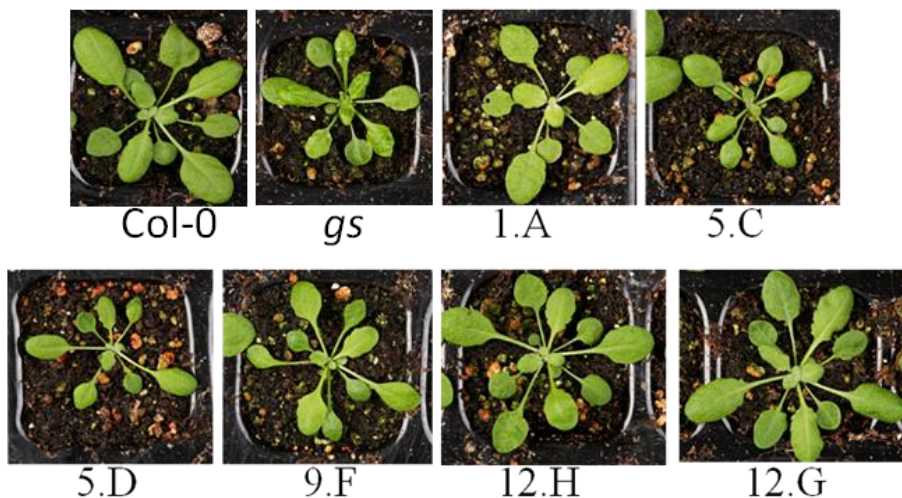


Doppelmutante. Somit konnte diese Genfunktion als Ursache für den Phänotyp ausgeschlossen werden.

### 3.2.3 EMS- Mutagenese im *gs* Hintergrund

Um weitere Gene zu finden, die für den Kurztagphänotyp verantwortlich sind, wurde eine EMS-Mutagenese im Hintergrund der *gs* Doppelmutante durchgeführt. Diese führte zu willkürlichen Mutationen im Arabidopsis Genom und stellt somit eine ungerichtete Untersuchungsmethode dar. Durch mehrmaliges Zurückkreuzen mit dem Wildtyp Col-0 sollte sichergestellt werden, dass nur noch eine EMS-Mutation im Genom vorhanden ist. Dies ist der Fall, außer die Mutationen liegen sehr nah beieinander, da dann die Wahrscheinlichkeit einer Segregation sehr niedrig ist. Zudem wurde mittels PCR das Vorhandensein der *ssadh* sowie der *gaba-t* Mutation getestet und bestätigt.

Es konnten sechs Linien (*gsEMS*) ohne Kurztagphänotyp gefunden werden (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** *gsEMS*- Linien ohne Kurztagphänotyp im Vergleich zum Wildtyp Col-0 und der *gs* Doppelmutante wurden drei Wochen unter Kurztagbedingungen auf Erde angezogen.

Um den jeweiligen Bereich des Chromosoms herauszufinden, auf dem die EMS-Mutation liegt, wurden für die Mappingpopulation etwa 50-100 Pflanzen benötigt. Dabei wurde die *gsEMS*-Linie, die den Ökotyp Col-0 hat, mit einem anderen Ökotyp, hier Ler, gekreuzt und anschließend geselbstet. Nach dem Selbsten gehörte nur jede

64. Pflanze zur Mappingpopulation, da nur diese homozygot für alle drei Mutationen (*gaba-t*, *ssadh* und EMS) war. Um eine größere Ausbeute an Pflanzen für die Mappingpopulation zu erhalten, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Zunächst wurde versucht, eine near isogenic line (NIL) herzustellen. Hierfür muss der Hintergrund der *gs* Doppelmutante vom Ökotyp Col-0 in den von Ler umgewandelt werden, damit anschließend die NIL mit den *gs*EMS-Linien gekreuzt werden kann. Nach dem Kreuzen sind die Mutationen *gaba-t* und *ssadh* homozygot und alle Pflanzen, die keinen Phänotyp unter Kurztagbedingungen zeigen, gehören zur Mappingpopulation.

Zu diesem Zweck wurde die Doppelmutante *gs* 8-mal mit Ler gekreuzt und das Vorhandensein der *ssadh* und *gaba-t* Mutation bestätigt. Danach wurde mit Hilfe von Mappingprimern festgestellt, dass einige Bereiche nicht Ler homozygot sind (siehe Abbildung 19). Dies sind alle Bereiche, die rot und blau markiert sind. Somit müsste weiter mit Ler gekreuzt werden, um eine NIL der *gs* Doppelmutante zu erhalten.

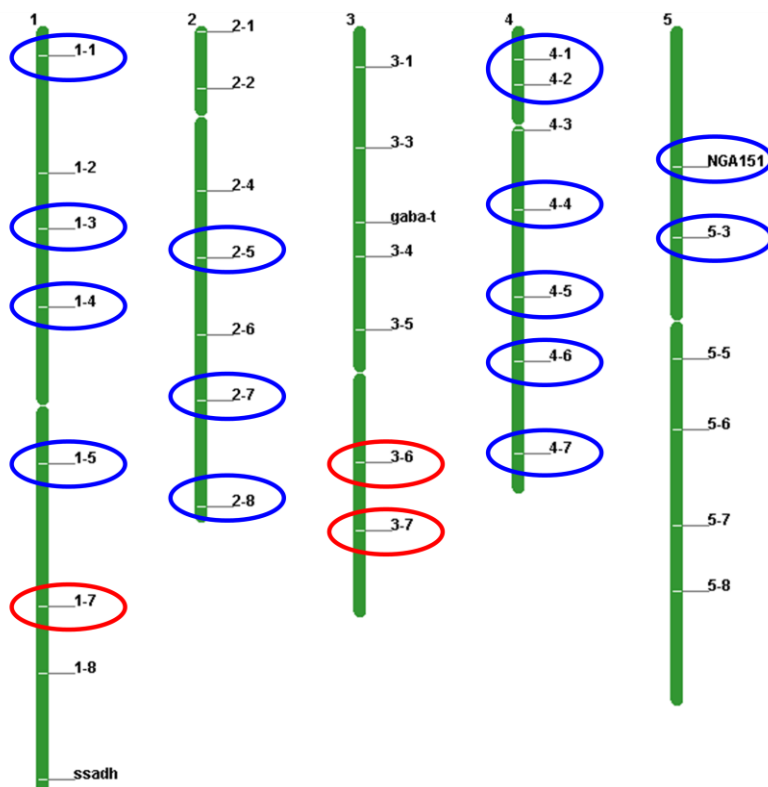


Abbildung 19: Arabidopsis Genom mit Darstellung der Bereiche, die noch nicht Ler homozygot sind. Blau - heterozygot für Ler/Col-0, rot - homozygot für Col-0, die restlichen Bereiche sind homozygot für Ler.

Eine weitere Methode, um eine höhere Anzahl an Pflanzen für die Mappingpopulation zu erhalten, war eine Vorselektion. Hierfür wurde die *gsEMS*-Linie mit *Ler* gekreuzt, geselbstet und anschließend auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten mit 0,4mM SSA ausgesät. Die *gs* Doppelmutanten sind im Vergleich zum Wildtyp sensitiv gegenüber SSA und zeigen nach wenigen Tagen eine gelbe Färbung der Keimblätter. Alle gelblichen Keimlinge wurden anschließend zur Regenerierung auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium umgesetzt. Nach weiteren fünf Tagen wurden alle regenerierten, grünlichen Pflanzen in Töpfe umgesetzt und in eine Kurztagekammer gestellt. Alle Pflanzen, die keinen Phänotyp aufwiesen, wurden mittels PCR auf *knock-out* für *ssadh* und *gaba-t* überprüft und anschließend für die Mappingpopulation verwendet. Alle drei Mutationen befinden sich im Col-0 Hintergrund. Dort, wo sich keine der drei Mutationen befindet, liegt die Wahrscheinlichkeit von Col-0- zu *Ler*-Sequenz bei 50%. An diesen Stellen kann ohne Weiteres ein crossing-over stattfinden, und die Pflanzen sind für diese Bereiche entweder Col-0 homozygot, *Ler* homozygot oder für beides heterozygot. In der Nähe einer Mutation finden weniger bis keine crossing-over statt, weil auf das Vorhandensein der Mutation selektioniert wurde. In diesen Bereichen steigt die Wahrscheinlichkeit für homozygot Col-0. Somit kann man anhand einer Mappingpopulation von *n* Pflanzen (*n* = 50-100) mit Hilfe von Mappingprimern die Lage der Mutation auf den fünf Chromosomen eingrenzen. Verschiedene Ökotypen unterscheiden sich in ihrer Genomgröße. Mappingprimer machen sich diese Unterschiede zu Nutze und befinden sich in Bereichen des Genoms, die sich bei beiden Ökotypen unterscheiden. Dadurch erhält man bei einer PCR für beide Ökotypen unterschiedlich große Fragmente (bei SSLP- Markern (Simple sequence length polymorphisms)). Pflanzen der Mappingpopulation zeigen nur in den Bereichen der *gs* Mutationen und im Bereich der phänotyp- vermittelnden EMS-Mutationen einen höheren Anteil an Col-0 Hintergrund. Demnach kann man anhand mehrerer Pflanzen die EMS-Mutation auf den Chromosomen eingrenzen.

### **Mapping der *gsEMS*-Linien 5.C und 12.H**

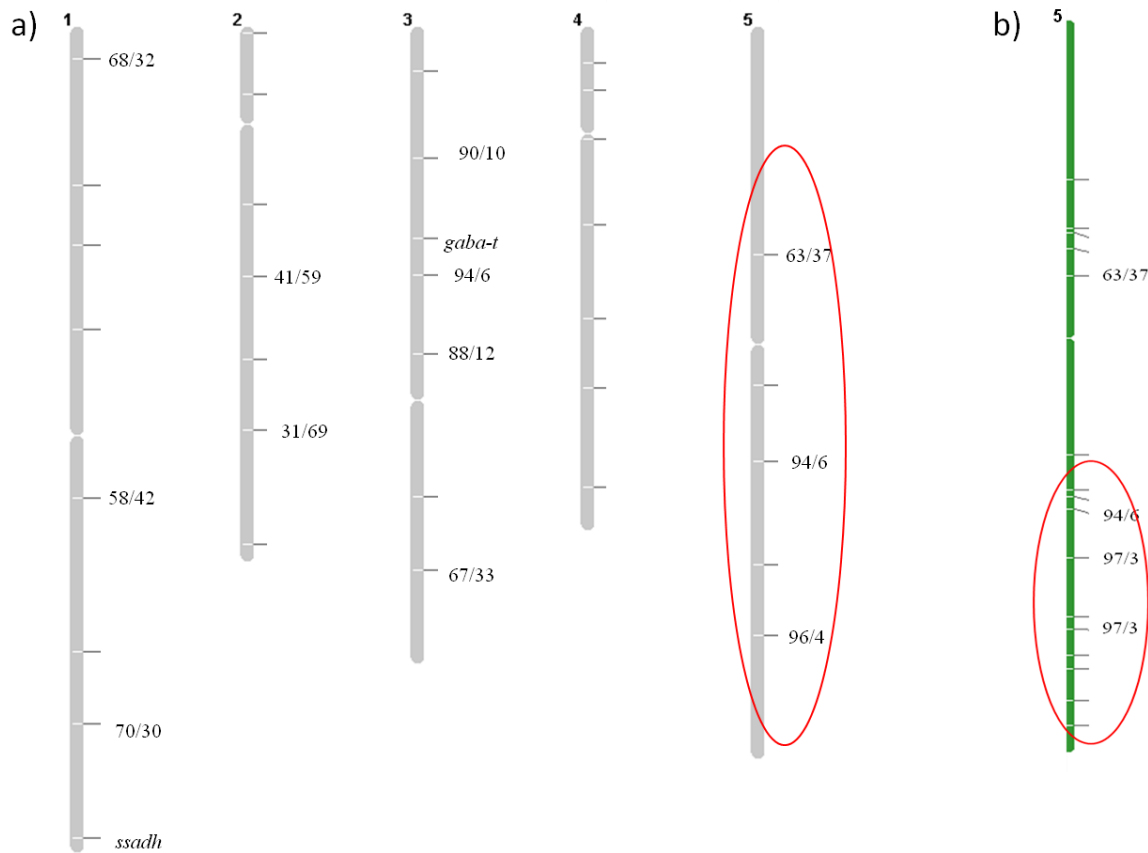
Die phänotypfreien *gsEMS*-Linien 5.C und 12.H wurden mit einem anderen Ökotyp (*Ler*) gekreuzt. Anschließend wurden diese Pflanzen geselbstet und zur Selektion auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 0,4mM SSA ausgelegt. Pflanzen, die eine Mutation im *SSADH* Gen

besitzen, weisen eine gelbliche Färbung der Blätter auf. Zur Regenerierung wurden diese Pflanzen auf  $\frac{1}{2}$  MS umgesetzt und nach einer Woche alle regenerierten Pflanzen auf Erde in eine Kurztagekammer überführt. Pflanzen die nach dem Umsetzen in die Kurztagekammer keinen Phänotyp zeigten, wurde auf ihre *ssadh* und *gaba-t* Mutationen überprüft und im positiven Fall für die Mappingpopulation verwendet. Verschiedene Mappingprimer wurden für das Grobmapping verwendet. Ein Bereich mit einem höheren Anteil an Col-0 Hintergrund der gsEMS-Linie 5.C konnte auf Chromosom 5 lokalisiert werden (siehe Abbildung 20 a), roter Bereich). Hierfür wurden 15 Pflanzen analysiert. Weitere Primer für Chromosom 5 sowie eine erhöhte Anzahl an Mappingpopulationspflanzen wurden verwendet, um die Lage der EMS-Mutation weiter einzugrenzen (siehe Abbildung 20 b), roter Bereich). Somit konnte die EMS-Mutation auf den unteren Arm von Chromosom 5 eingegrenzt werden.



**Abbildung 20: a) Arabidopsis Genom mit Darstellung der getesteten Primer und ihr Verhältnis von Col-0- zu Ler- spezifischen PCR- Fragmenten in der gsEMS-Linie 5.C. Beispiel: 20/80 bedeutet 20% der gestesteten Allele waren Col-0-spezifisch und 80% Ler-spezifischen. Der rot markierte Bereich ist der Bereich, in dem die EMS-Mutation liegt (n = 15). b) Test weiterer Mappingprimer auf Chromosom 5 zur weiteren Eingrenzung der EMS-Mutation. Mit rot markierter Bereich ist der Bereich der EMS-Mutation. (n = 47).**

Das bisherige Mapping der gsEMS-Linie 12.H hat ebenfalls einen Bereich der EMS-Mutation auf dem unteren Arm von Chromosom 5 ergeben (siehe Abbildung 21). Zum Mappen wurden 15 Pflanzen verwendet.



**Abbildung 21: a) Arabidopsis Genom mit Darstellung der getesteten Primer und ihr Verhältnis von Col-0- zu Ler-spezifisch PCR-Fragmenten in der gsEMS-Linie 12.H. Der rot markierte Bereich ist der Bereich in dem die EMS-Mutation liegt (n = 15). b) Test weiterer Mappingprimer auf Chromosom 5. Mit rot markierter Bereich ist der Bereich der EMS-Mutation (n = 15).**

Beide EMS-Mutationen konnten auf dem unteren Arm von Chromosom 5 lokalisiert werden. Da vermutet wird, dass eine Aminotransferase für den Kurztagphänotyp verantwortlich ist, wurde nach Aminotransferasen in diesem Bereich gesucht. Mögliche Kandidaten auf Chromosom 5 sind:

- At5g46180 Ornithine- $\delta$ -Aminotransferase
- At5g51690 broad spectrum AT (e.g. Asp, Tyr, Phe)
- At5g53460 Gln-2-oxoglutarate AT (GOGAT)
- At5g53970 Tyrosin AT
- At5g57590 7,8-diaminopelargonic acid AT (Biotin)
- At5g63570 Glu-1-semialdehyde AT
- At5g65780 BCAT5

Ein guter Kandidat erschien das Gen At5g46180, welches für eine Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase (OAT) kodiert. Ornithin ist strukturell GABA sehr ähnlich (siehe Abbildung 22). Beide Substanzen besitzen eine endständige Aminogruppe, die bei der jeweiligen Reaktion in eine Aldehydgruppe umgewandelt wird. Zudem laufen beide Reaktionen sehr ähnlich ab, verwenden jedoch unterschiedliche Cosubstrate. Bei der GABA-Transaminase Reaktion wird aus GABA und Pyruvat Alanin und SSA und bei der Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase Reaktion wird Ornithin zusammen mit  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamate-5-Semialdehyde (GSA) und Glutamat umgesetzt.

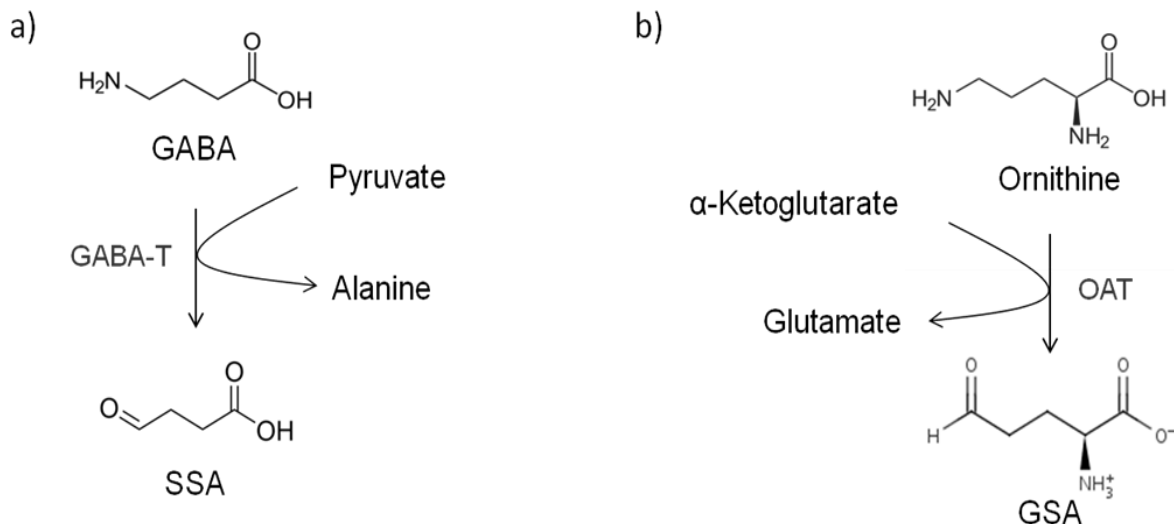


Abbildung 22: a) Darstellung der GABA-Transaminase (GABA-T) Reaktion in Arabidopsis im Vergleich zur Reaktion der Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase (OAT) aus Arabidopsis.

Beide Reaktionen laufen in den Mitochondrien ab und können durch Gabaculin gehemmt werden. Gabaculin (O=C(O)c1ccc(N)cc1) besitzt zu beiden Substraten strukturelle Ähnlichkeit. Somit könnte bei einer hohen GABA-Konzentration auch der  $K_m$ -Wert für

GABA von der Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase erreicht werden, um GABA als Substrat zu verwenden und SSA herzustellen. Daraufhin wurde das Gen der *OAT* sequenziert, um eine mögliche Mutation zu finden. Es konnte jedoch keine Mutation im genomischen Bereich der beiden *gsEMS* Linien (5.C und 12.H) gefunden werden. Auch auf Transkriptionsebene konnte kein Unterschied in der Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp oder der *gs* Doppelmutante entdeckt werden.

Eine Mutante der Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase, *oat1*, (Funck *et al.*, 2008) wurde bestellt und mit der *gs* Doppelmutante gekreuzt. Die Dreifachmutante zeigte unter Kurztagbedingungen den *gs* Kurztagphänotyp. Somit handelt es sich bei *OAT* nicht um das Gen, das für den Kurztagphänotyp verantwortlich ist.

Weitere Gene wie die Tyrosin Aminotransferase und Glu-1-semialdehyde Aminotransferase wurden sequenziert. Dort konnten ebenfalls auf genomischer Ebene keine Mutationen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Weitere Gene müssen untersucht werden, um die EMS-Mutation zu lokalisieren. Möglicherweise könnten zusätzliche Marker helfen die Lage der EMS-Mutation weiter einzugrenzen. Es könnten jedoch auch andere Gene, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, für den Kurztagphänotyp verantwortlich sein.

### **Mapping *gsEMS*-Linie 1.A**

Die *gsEMS* Linie 1.A zeigte im Vergleich zu allen anderen *gsEMS* Linien eine gelbliche Färbung aller Blätter, die nach den Keimblättern gebildet wurden. Je älter die Blätter, desto grüner werden diese. Somit scheint dieser Phänotyp nur in jungen Blatteilen vorzukommen.

Da die *gs* Doppelmutante keinen Phänotyp unter Langtagbedingungen hat und aussieht wie der Wildtyp, konnte darauf geschlossen werden, dass die gelbliche Farbe der Blätter durch die EMS-Mutation hervorgerufen wird. Somit wurden nach der Kreuzung der *gsEMS* Linie 1.A mit Ler und anschließendem Selbsten dieser Pflanzen alle Pflanzen mit gelblichen Blättern für die Mappingpopulation verwendet (siehe Abbildung 23).

## Ergebnisse

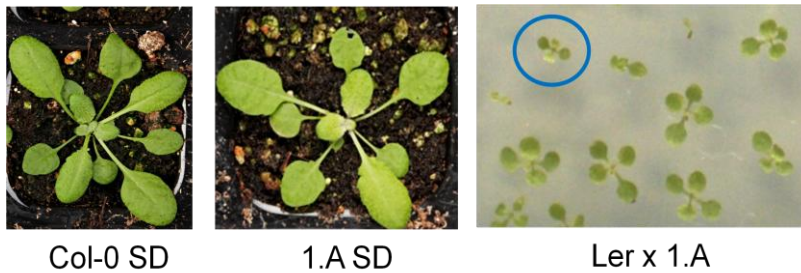


Abbildung 23: gsEMS Linie 1.A zeigt im Vergleich zum Wildtyp unter Kurztagbedingungen sowie unter Normalbedingungen eine gelbe Blattfärbung. Die Pflanzen sind drei Wochen alt. Aus der Kreuzung Ler x 1.A wurden alle Pflanzen mit gelblichen Blättern für die Mappingpopulation verwendet (blauer Kreis, Keimblätter sind grün, alle folgenden Blätter gelblich). Pflanzen sind eine Woche auf ½ MS gewachsen.

Die EMS-Mutation konnte anhand von 20 Pflanzen und mit Hilfe von Mappingprimern auf Chromosom 3 lokalisiert werden (siehe Abbildung 24 a).

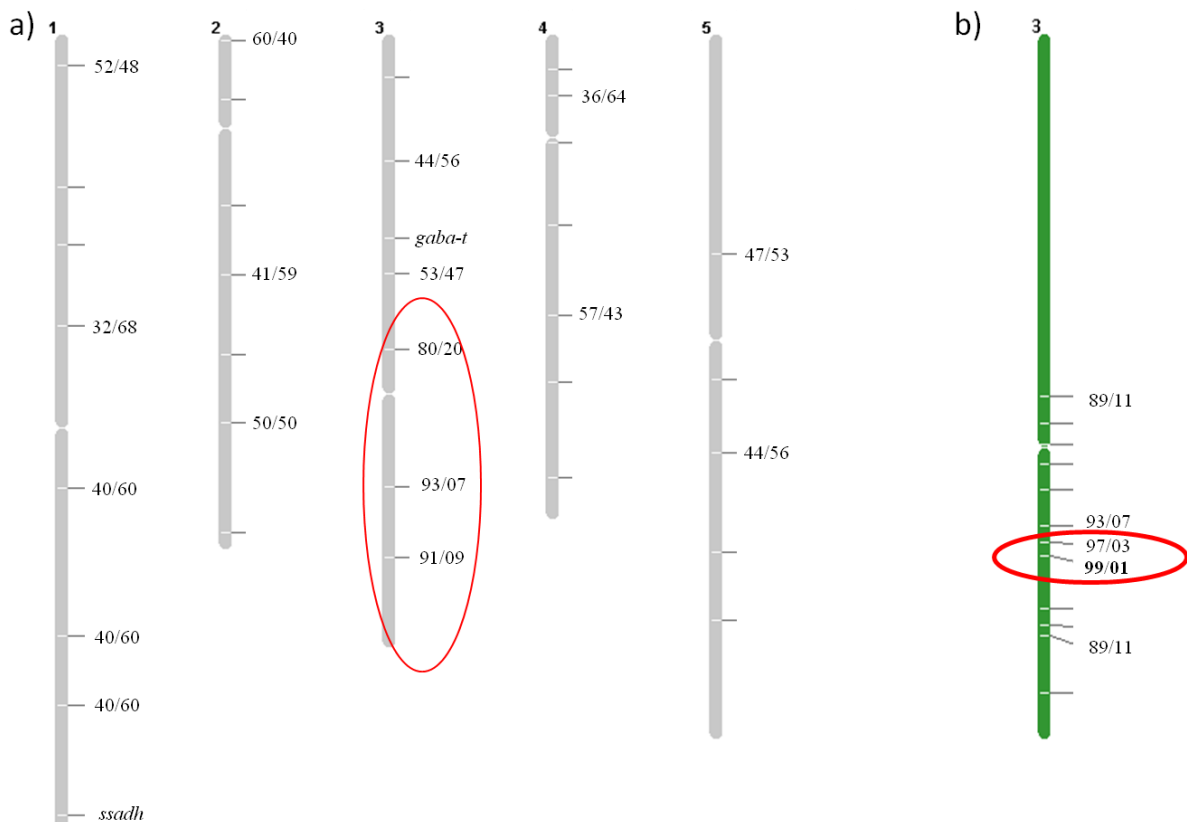


Abbildung 24: a) Arabidopsis Genom mit Darstellung der getesteten Primer und ihr Verhältnis von Col-0- zu Ler-spezifischen PCR-Fragmenten in der gsEMS Linie 1.A. Der rot markierte Bereich ist der Bereich der EMS-Mutation (n = 20). b) Test weiterer Mappingprimer auf Chromosom 3. Mit rot markierter Bereich ist der Bereich der EMS-Mutation (n = 92).



Zusätzliche Mappingprimer und eine größere Mappingpopulation (n = 92) konnten die Lage der EMS-Mutation weiter eingegrenzen. Auf diesem Bereich von Chromosom 3 liegen 73 Gene. Da die Blätter der gsEMS Linie 1.A im Vergleich zum Wildtyp ausgebleichen aussehen, ist es möglich, dass die EMS-Mutation etwas mit Chlorophyll im weitesten Sinne zu tun hat. Deshalb wurde zunächst nach Genen gesucht, die in den Chlorophyll-Metabolismus involviert sind. Mögliche Kandidaten dafür waren:

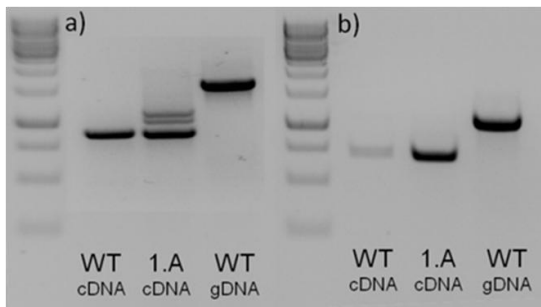
- At3g46900 copper transporter 2
- At3g47070 unknown (thylakoid)
- At3g47390 PHOTOSENSITIVE 1
- At3g47450 nitric oxide synthase 1 (NOS1)
- At3g47470 LHCA4

Veröffentlichungen zu den genannten Kandidaten ergaben, dass die Mutante des Gens At3g47450 (nitric oxide synthase 1), *nos1/cGTPase*, einen ähnlichen Phänotyp zeigt wie die gsEMS Linie 1.A (Flores-Perez *et al.*, 2008). Um eine mögliche Mutation in diesem Gen zu identifizieren, wurde das ganze Gen sequenziert und eine Mutation der ersten Base des 6. Introns gefunden (siehe Abbildung 25). Hierbei wurde ein Guanin gegen ein Adenosin ausgetauscht.

	Exon6		Intron6
Col-0	...CTACATTCTG	↓	gtatgtgcattcgtaatttgtcaccaacaaaatagagtttagt...
1.A	...CTACATTCTG	a	tatgtgtgcattcgtaatttgtcaccaacaaaatagagtttagt...

**Abbildung 25: Sequenzierergebnis der genomischen DNA des Gens At3g47450 nitric oxide synthase 1 (NOS1/cGTPase) von gsEMS Linie 1.A im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt ist nur ein Ausschnitt des Übergangs von Exon 6 zu Intron 6. In rot ist die mutierte Base markiert.**

Diese Mutation führt zu unterschiedlichen Splicing-Varianten, da offenbar die Erkennungssequenz zum Splicen mutiert wurde (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: PCR-Gelbild von a) cGTPase F-R, b) Actin F-R**

In Abbildung 26 a) sind bei der gsEMS-Linie 1.A mehrere Banden zu erkennen, die größer sind als die erwartete Bande von 750 bp. Als Kontrolle dienten Aktinprimer, die bei genomischer und cDNA unterschiedliche Fragmentgrößen erzeugen und zeigen, dass die cDNA nicht mit gDNA verunreinigt war.

Die Sequenzierung der PCR Banden der gsEMS-Linie 1.A aus Abbildung 26 a) hat ergeben, dass es sich um verschiedene Splicingvarianten der genomischen DNA des Gens *NOS1/cGTPase* handelt (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Hierbei konnten die beiden oberen Banden bei der Elution aus dem Gel nicht voneinander getrennt werden. Jedoch konnte eine der Banden sequenziert werden (Abbildung 27).

## Ergebnisse

ATGGCGCTACGAACACTCTCAACGTTTCCTTCTCTTCTCGTTCGCCACACAACGACGAGACGTGAACCCAATCTC  
ACCGTCATTTACCGTAATCCGACGACATCAATCGTCTGTAAATCAATAGCTAATTCAGAACCACCAGTTTCACTC  
TCGGAACGAGATGGATTTGCGGGCGGCTGCTCCAACCCCTGGAGAAAAGGTTCTGGAGAACCAACGAGCTCATGAA  
GCTCAGAAAGTAGTGAAGAAAGAGATCAAAAaggagaagaagaaaaagaaagaggagattattgcacggaaagt  
gttgatacctcagtcctcatgttggttacgggtgctggagctccggtacaaaacttccgacgtcgattctccgggatt  
gtcgatttgggttacttatgaattggtatgaattcgagcttgagaatctcaatgttgagttagttgattgatgaat  
tagagatgggttcttctgtgtttattgtagAAGAAGAAGCATCACAGTAAAGAACTATGATATGTGGAAGATGT  
CAGCTATTGTCACATGGACATATGATTACAGCAGTTGGTGGTAATGGAGGTTATCCAGGTGGGAAACAATTTGTA  
TCAGCTGATGAATTCGTGAGAAACTTTCTCATTTACGCCATGAGAAAGCTTTGATTGTTAAATTTGgtgagtaga  
tattgttagaatgaacttctcttttctgtttttatggttccaagagatcgtcaacttgttgggtgcagTTGATAT  
AGTGGATTTTAAATGGAAGCTTTTTAGCTCGTGTTCGTGATTTAGTTGGAGCTAATCCGATTATACTTGTATAAC  
TAAGGtaagggttttataacatggctacttcttcaattcttctaactatggtaataattgtgtttgtattgtt  
agATTGATCTTCTTCCAAAAGGAACGGATATGAATTTGTATCGGGGATTGGGTTGTGGAAGTGACCATGAGGAAAA  
AGCTTAAgtaggtatcaagtacttatctactatggttgttgcagaaagtgatgtaattgttctggagctagtg  
ttgatttgggtgtgatataacttttccagTGTCTTGAGTGTCCATCTCACAAGTTCAAAGTCCCTGGATGGAGTTA  
GCGGAGTTGCATCAGAGATCCAGAAGGAGAAAAAGgttagcgttttttttatatattgcaccaccttaagctgtt  
ttctttagcgtacattttgtttccattatggctcagtgctggacaataaaccttctctttatttaccttctgta  
acctgacctctgtatccctgtttttgtttcagGGACGAGATGTCTACATTCTGtatgtgcattcgtaattttgt  
caccacaaaatagagttttagtttgtaaacctattgctaactgatgaggttcttactatttacttaatagctt  
aacacactttaaatgatagagggcagtgcttagtgaaaatcaattttctcggatgtccatcagaacaacaaactcg  
acacaacactgctcgatgatccactaattcataaattcgtttactggagatagaggctatgcatttataaaga  
aacttctttgacgggttagaaaatattcatttattttcttcaactttcacagGGTGCAGCTAACGTAGGGAA  
GTCAGCATTCAATGCTTTGCTGAGtaagtcatttgttctccattgtgtttgtgtcacttgttgttgaagttt  
gtatctgcttgaatggtctgggtgctgcttttagcctgatctctagtatggccaatttctccacaatttataaa  
gagagtttgaatgattgtatatagtacttaccatacagAAACGATGGCCGAAAGGGATCTGTGTCAGCAGCGGC  
ACAAAAGTACAAACCAATTCATCTGCTGCTCCCTGGAACCACTTGGGTCCAATTCAGATCAACGCTTTCGTGCGG  
AGGAGAGgtataaaacttaaaccaagatcagattctagaactttccaaaaattgcaatagtagacattctgctaaa  
agaatacattattaccacagAAGTTGTATGACACACCGGGTGTGCACCTACACCACAGGCAAGCAGCTGTCTTC  
ATTCAGATGATTTACCCGCCCTTGCTCCTCAAAATCGTCTCAGAGGCCAATCTTTCGATgtaagtctgctttatt  
acggccaggtaaagattattttaccgtaacaccagtggtgatgatcttctctgtgctttttgttcttaccagATTTTC  
AACTTTGCCAACTCAATCGTCAAGTAGTCCCAAGGGTGAGAGCTTAAACGGTTATACATTTTTCTGGGGAGGTCT  
CGTTAGGATTGACATCTTGAAGgtaataactattattactagaattatgtttcagtttccacagtggatcagaaa  
ttttttaaatacatttgacatattgcagGCTCTACCGGAAACATGTTTCACATTCTATGGACCAAAAAGCTCTTGAG  
ATTCATGCAGTACCAACCAAAACAGCGACTGCCTTTTACGAGGCAAgttccggttccccatcattttcaacttctg  
tacttattcaaggacaagttaaatcttcttattaccatttacttgatactcatttgttctgcagaaagAACTGGG  
TGTGCTTCTAACACCTCCATCAGGGAAAAATCAGATGCAGGAGTGGAAAGGGTTACAATCTCACCGTTACTTCA  
AATCGAAATCAACGATGCAAAAAGgtgaaatataatcttccattcccacatctatgttttagtaaaacaaatgatcc  
tcacctaacgttaacacacctcttgatcagACCGGCTAGTGATGTGGCAATATCAGGGTTAGGATGGATTTCAAT  
TGAACCAATCCGCAAAACACGAGGAACTGAACCGAGAGATCTCAATGAAGCAGAGCATGAGATACATATTTGTGT  
CAGTGTGCCAAAACAGTTGAAGTTTTTCTTCGACCAACATTGCCAATTTGGTACTTCAGGTAATGGTATCA  
GTATCGTGAGTTAACCGATAAGGAAGAAGAAGTAAGACCCAAATGGTACTTTTGA

**Abbildung 27: Sequenzierung der obere oder mittleren PCR Bande von Abbildung 26 a) mit den Primern cGTPase F2 und R4. Unterstrichen sind die sequenzierten Bereiche, in Großbuchstaben sind alle Exons und in Kleinbuchstaben alle Introns dargestellt. Die rot markierte Base ist die Mutation beim Übergang von Exon 6 zu Intron 6.**

## Ergebnisse

ATGGCGCTACGAACACTCTCAACGTTTCCTTCTCTTCTCGTTCGCCACACAACGACGAGACGTGAACCCAATCTC  
ACCGTCATTTACCGTAATCCGACGACATCAATCGTCTGTAAATCAATAGCTAATTCAGAACCACCAGTTTCACTC  
TCGGAACGAGATGGATTTGCGGGCGGCTGCTCCAACCCCTGGAGAAAAGGTTCTGGAGAACCAACGAGCTCATGAA  
GCTCAGAAAAGTAGTGAAGAAAGAGATCAAAAaggagaagaagaaaaagaaagaggagattattgacggaagt  
gttgatacctcagtcctcatgttggttacgggtgctggagctccggtacaaacttccgacgtcgattctccgggatt  
gtcgatttgggtacttatgaattggtatgaattcgagcttgagaatctcaatgttgagttagttgattgatgaat  
tagagatgggttcttctgtgtttattgttagAAGAAGAAGCATCACAGTTAAGAACTATGATATGTGGAAGATGT  
CAGCTATTGTCACATGGACATATGATTACAGCAGTTGGTGGTAATGGAGGTTATCCAGGTGGGAAACAATTTGTA  
TCAGCTGATGAACCTTCGTGAGAACTTTCTCATTTACGCCATGAGAAAAGCTTTGATTGTTAAATTTGgtgagtaga  
tattggttagaatgaacttctcttttctgtttttagttccaagagatcgtaacttgttgtgagGTTGATAT  
AGTGGATTTTAAATGGAAGCTTTTTAGCTCGTGTTCGTGATTTAGTTGGAGCTAATCCGATTATACTGTTATAAC  
TAAGgtaagggttttataaacatggctacttcttcaattcttctaactatggtaataaattgtgtttgtattgtt  
agATTGATCTTCTTCCAAAAGGAACGGATATGAATTTGTATCGGGGATTGGGTTGTGGAAGTGACCATGAGGAAAA  
AGCTTAAgtaggtatcaagtaacttatctactatggttgttgctagaaaagtgatgtaattgttctggagctagtg  
ttgatttgggtgtgatataacttttcagTGTCTTGAGTGTCCATCTCACAAGTTCAAAGTCCCTGGATGGAGTTA  
GCGGAGTTGCATCAGAGATCCAGAAGGAGAAAAAGgttagcgttttttttatatattgcaccaccttaagctgtt  
ttctttagcgtacattttgtttccattatggctcagtgctggacaataaaccttctctttatattaccttctgta  
acctgacctctgtatccctgtttttgtttcagGGACGAGATGTCTACATTCTGtatgtgcattcgtaattttgt  
caccacaaaaatagagtttttagtttgtaaacctattgctaactgatgaggttcttactatttacttaatagctt  
aacacactttaaatgatagagggcagtgcttagtgaaaatcaattttctcggatgtccatcagaacaacaaactcg  
acacaacactgctcgatgatccactaattcataaattcgtttactggagatagaggctatgcatttataaaga  
aacttctttgacggttttagaaaatattcatttatttcttctcactttcacagGGTGCAGCTAACGTAGGGAA  
GTCAGCATTCAATGCTTTGCTGAGtaagtcatttgttctccattgtgtttgtgtcacttgttgttgaagttt  
gtatctgcttgaatatggtctgggtgctgcttttagcctgatctctagtatggccaatttctccacaatttataaa  
gagagtttgaatgattgtatatagtacttaccatacagAAACGATGGCCGAAAGGGATCCTGTTGCAGCAGCGGC  
ACAAAAGTACAAAACCAATCTGCTGTCCCTGGAACCACTTGGGTCCAATTCAGATCAACGCTTTCGTGCGG  
AGGAGAGgtataaaactaaaccaagatcagattctagaactttccaaaaattgcaatagtagacattctgctaaa  
agaatacattattaccacagAAGTTGTATGACACACCCGGTGTGCACCTACACCACAGGCAAGCAGCTGTCTTC  
ATTCAGATGATTTACCCGCCCTTGCTCCTCAAAAATCGTCTCAGAGGCCAATCTTTCGATgtaagctcgtttatt  
acggccaggtaagattattttaccgtaacaccagtggtgatgatcttctcgtgctttttgttcttaccagATTTTC  
AACTTTGCCAACTCAATCGTCAAGTAGTCCCAAGGGTGAGAGCTTAAACGGTTATACATTTTTCTGGGGAGGCTC  
CGTTAGGATTGACATCTTGAAGgtaataactattattactagaattatgtttcagtttccagtggtatcagaa  
ttttttaacatacttgacatattgcagGCTCTACCGGAAACATGTTTCACATTCTATGGACCAAAAAGCTCTTGAG  
ATTCATGCAGTACCAACCAAAACAGCGACTGCCTTTTACGAGGCAAgttccggttccccatcattttcaacttctg  
tacttattcaaggacaagttaaatcttcttattaccatttacttgatactcatttgttctgcagaaagAACTGGG  
TGTGCTTCTAACACCTCCATCAGGGAAAAATCAGATGCAGGAGTGGAAAGGGTTACAATCTCACCGTTACTTCA  
AATCGAAATCAACGATGCAAAAAGgtgaaatataatcttccattcccacatctatgttttagtaaaacaaatgatcc  
tcacctaacgttaacacacctcttgatcagACCGGCTAGTGATGTGGCAATATCAGGGTTAGGATGGATTTCAAT  
TGAACCAATCCGCAAAACACGAGGAACCTGAACCGAGAGATCTCAATGAAGCAGAGCATGAGATACATATTTGTGT  
CAGTGTGCCAAAACAGTTGAAGTTTTTCTTCGACCAACATTGCCAATTGGTACTTCAGGTAATGGTATCA  
GTATCGTGAGTTAACCGATAAGGAAGAAGAAGTAAGACCCAAATGGTACTTTTGA

**Abbildung 28: Sequenzierung der unteren PCR Bande von Abbildung 26 a) mit den Primern cGTPase F3 und R2. Unterstrichen sind die sequenzierten Bereiche, in Großbuchstaben sind alle Exons und in Kleinbuchstaben alle Introns dargestellt. Die rot markierte Base ist die Mutation beim Übergang von Exon 6 zu Intron 6.**

Beide Sequenzierungen zeigen, dass jeweils Intron 6 nicht herausgespliced wurde. Die obere/mittlere Bande besitzt zusätzlich zu Intron 6 auch Teile von Intron 1, was ebenfalls auf ein Problem beim Splicing hindeutet.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich das Gen der nitric oxide synthase 1 (NOS1/cGTPase) für den Kurztagphänotyp verantwortlich ist, wurde eine *knock-out*

Mutante bestellt und charakterisiert (*nos1/rif1-2/cgtpase*, SALK\_047882). Die homozygote *knock-out* Mutante zeigte den erwarteten „gelbherzigen“ Phänotyp. Sie wurde mit der *gs* Doppelmutante gekreuzt, um eine Dreifachmutante *cgtpase* x *gs* herzustellen. Diese sollte unter Kurztagbedingungen keinen Phänotyp zeigen. Dies würde bestätigen, dass tatsächlich eine Mutation im Gen der nitric oxide synthase 1 den Kurztagphänotyp retten würde. Die Dreifachmutante weist unter Kurztagbedingungen keinen *gs* Kurztagphänotyp auf.

Um herauszufinden, ob die *nos1/cgtpase* Mutante auch den *ssadh* Phänotyp retten kann, wurde die *cgtpase* mit *ssadh* gekreuzt und nach Doppelmutanten gesucht, die keinen *ssadh* Phänotyp mehr aufweisen. Die Doppelmutante *cgtpase* x *ssadh* zeigt unter Normalbedingungen keinen *ssadh* Phänotyp mehr, sondern nur den der *cgtpase* Mutante (siehe Abbildung 29).



*ssadh*



*cGTPase* x *ssadh*

**Abbildung 29: *ssadh* Mutante im Vergleich zur geretteten *cgtpase* x *ssadh* Doppelmutante. Pflanzen sind zwei Wochen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus gewachsen.**

Somit scheint eine Mutation im Gen *NOS1/cGTPase* und möglicherweise der geringere Gehalt an Chlorophyll in der Mutante (Van Ree *et al.*, 2011) ausschlaggebend für die Rettung zu sein. Um dies zu bestätigen, wurden die Doppelmutante *cgtpase* x *ssadh* im Vergleich zur Einzelmutante *cgtpase* auf  $\frac{1}{2}$  MS mit und ohne Saccharose ausgesät, da durch Saccharose der Chlorophyllphänotyp gerettet wird (Van Ree *et al.*, 2011) und der Chlorophyllgehalt der Mutante dem des Wildtyps entspricht. Wenn ein normaler Chlorophyllgehalt wesentlich für die Ausprägung des *ssadh* Phänotyps und der verringerte Chlorophyllgehalt der Grund für die Rettung des *ssadh* Phänotyps ist, sollte die Doppelmutante auf Saccharosehaltigem Medium einen *ssadh* Phänotyp zeigen. Dies konnte bis jetzt nicht bestätigt werden, da auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 1% Saccharose keine Rettung des *cgtpase* Phänotyps

gezeigt werden konnte. Möglicherweise war die Konzentration zu gering und das Experiment sollte wiederholt werden.

Umgekehrt wurde das Gen *NOS1/cGTPase* in der gsEMS Linie 1.A überexprimiert. Unter Kurztagbedingungen sollten diese Pflanzen den *gs* Phänotyp aufweisen, jedoch den gelblichen Phänotyp der *cgtpase* Mutante nicht mehr zeigen. Die Überexpressionskonstrukte wurden fertiggestellt und in die jeweiligen Pflanzen transformiert, konnten jedoch noch nicht analysiert werden.

### 3.3 Rettung des *ssadh* Phänotyps

Die Succinic Semialdehyd Dehydrogenase Mutante (*ssadh*) zeigt unter Normalbedingungen einen starken Phänotyp. Sie ist kleinwüchsig, akkumuliert Auxin, GHB und möglicherweise SSA (SSA kann nicht gemessen werden) und bildet auf Grund von ROS (reactive oxygen species) Nekrosen (Bouché *et al.*, 2003; Ludewig *et al.*, 2008). Ältere Pflanzen zeigen einen buschigen Phänotyp, d.h. die Triebe sind kurz und mehrfach verzweigt. Ein Generationszyklus dauert etwa acht bis 12 Wochen und ist somit doppelt bis dreimal so lang wie der vom Wildtyp. Um den *ssadh* Phänotyp zu retten und weitere Gene, die möglicherweise im GABA-Stoffwechselweg noch unbekannt sind, herauszufinden, wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Zunächst wurde versucht mittels Reduktion des Pyruvatpools in den Mitochondrien die Aktivität der GABA-T herabzusetzen. Desweiteren wurde durch Überexpression der SSADH aus Arabidopsis und Hefe versucht die *ssadh* Mutante zu retten. Unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen der *ssadh* Mutante sollte durch MicroRNA Linien (*amiSSADH*) gezeigt werden.

#### 3.3.1 Kreuzung *pdk* x *ssadh* x *NADme1* x *NADme2*

Um den *ssadh* Phänotyp zu retten, wurde versucht, den Pool an Pyruvat in den Mitochondrien soweit zu verringern, dass nicht mehr genug Pyruvat für die GABA-T Reaktion vorhanden ist, um SSA herstellen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass in der *pdk* Mutante das Level an Pyruvat um ~60% erniedrigt ist (Reichel,

2009). Das restliche Pyruvat scheint jedoch ausreichend für die GABA-T Reaktion zu sein, da die Doppelmutante *pdk x ssadh* noch immer den *ssadh* Phänotyp zeigt.

Um den Pool an Pyruvat weiter zu verringern, wurde in die Doppelmutante *pdk x ssadh* mit der Doppelmutante *NADme1 x NADme2* gekreuzt. Das Malatenzym (ME) katalysiert die Reaktion von Malat zu Pyruvat unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und Herstellung von NADH aus NAD<sup>+</sup>. In Arabidopsis gibt es zwei Isoenzyme des NAD Malatenzyms (NAD-ME, EC 1.1.1.39 oder 1.1.1.38), die in den Mitochondrien lokalisiert sind (Winning *et al.*, 1994). Weder die Einzelmutanten *NADme1* (At2g13560) und *NADme2* (At4g00570), noch die Doppelmutante *NADme1 x NADme2* zeigen einen vom Wildtyp unterschiedlichen Phänotyp, somit scheinen beide Enzyme nicht essentiell für autotrophes Wachstum zu sein (Tronconi *et al.*, 2008). Zudem gibt es zwei weitere Malatenzyme, von denen eines in den Chloroplasten und eines im Zytosol lokalisiert ist (Drincovich *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 2005).

Die Vierfachmutante *pdk x ssadh x NADme1 x NADme2* zeigte, wie die Doppelmutante, noch immer den *ssadh* Phänotyp. Somit konnte eine weitere Verringerung des Pyruvatpools in den Mitochondrien nicht ausreichen, um die GABA-Transaminase Reaktion zu reduzieren. Möglicherweise kann der Pyruvatpool in den Mitochondrien nicht soweit verringert werden, dass nur wenig Pyruvat für die GABA-Transaminase Reaktion zur Verfügung steht, um geringe Konzentrationen an SSA zu produzieren. Um dies zu prüfen, müsste der Gehalt an Pyruvat in der Vierfachmutante gemessen werden.

### **3.3.2 Überexpression von GABA-Stoffwechsel Genen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* im Hintergrund der *ssadh* Mutante**

Analog zum in 3.2.1 beschriebenen Vorgehen wurden Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* in der *ssadh* Mutante überexprimiert, um herauszufinden, ob diese die *ssadh* Mutante retten können und ob es einen Unterschied macht, in welchem Kompartiment das *SSADH* Gen überexprimiert wird. Der GABA-Stoffwechsel läuft in Hefen im Zytosol ab, und nicht, wie in Pflanzen oder beim Menschen, in den Mitochondrien.

Eine Überexpression des *SSADH* Gens aus Hefe (*UGA2*), lokalisiert im Zytosol, konnte den starken Phänotyp der *ssadh* Mutante teilweise retten (siehe Abbildung 30). Es konnte gezeigt werden, dass *UGA2* nur in den Überexpressionslinien exprimiert wird, jedoch nicht im Wildtyp. Hingegen wird Aktin in allen Proben gleich stark exprimiert.

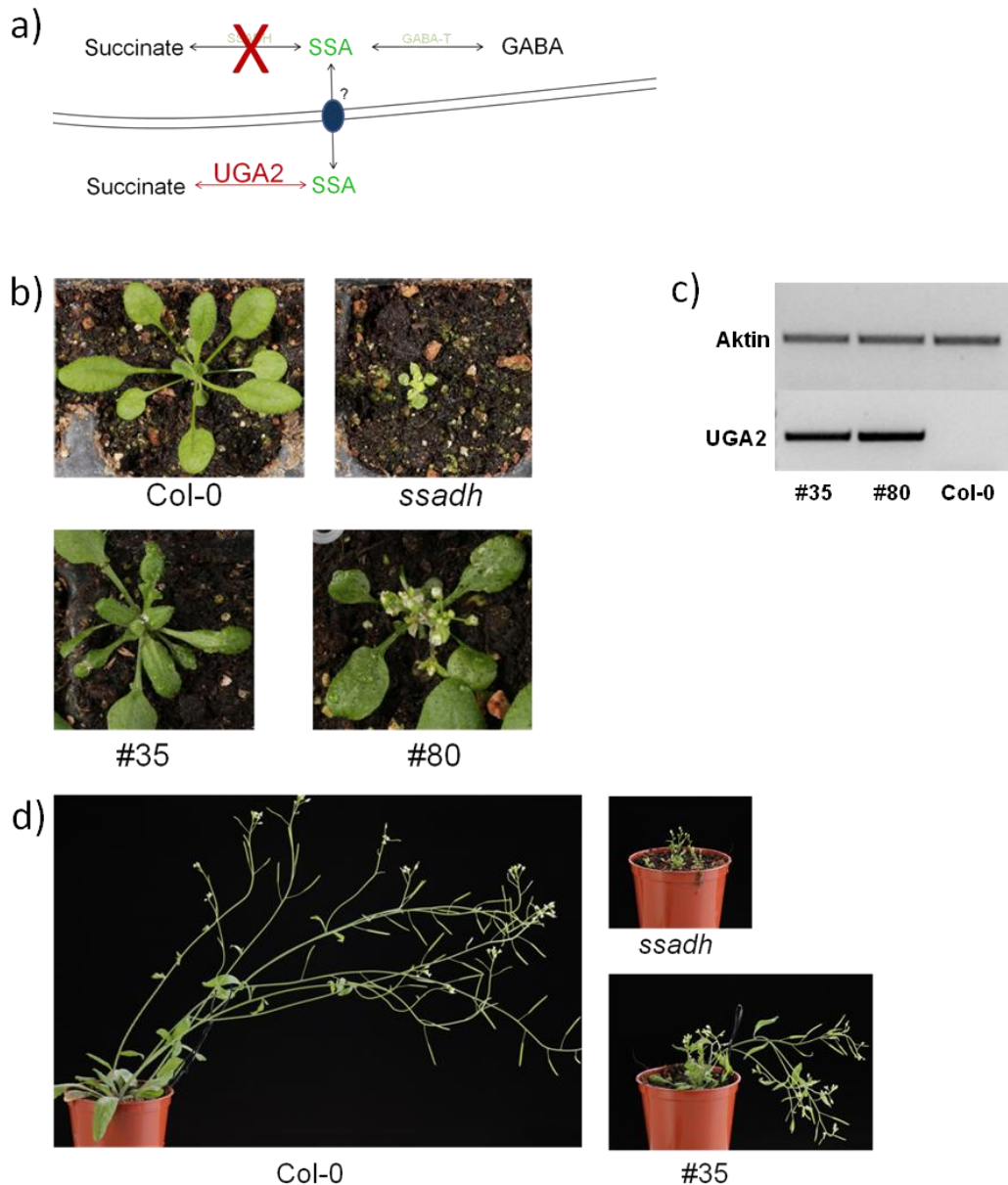


Abbildung 30: a) Schematische Darstellung der zytosolischen Überexpression von *UGA2* (*SSADH*) aus Hefe im Hintergrund der *ssadh* Mutante. b) Wildtyp, *ssadh* und Überexpressionslinien im *ssadh* Hintergrund (#35, #80) nach drei Wochen und d) nach fünf Wochen im Gewächshaus. c) Darstellung der Expression von *UGA2* in den Überexpressionslinien im *ssadh* Hintergrund (#35, #80) im Vergleich zum Wildtyp mittels semiquantitativer RT-PCR, 28 Zyklen. Als Kontrolle diente Aktin, 28 Zyklen.



Eine partielle Rettung des Phänotyps der *ssadh* Mutante, jedoch keine vollständige Rettung, konnte durch die Expression des *SSADH* Gens aus Hefe (*UGA2*) im Zytosol erreicht werden. Möglicherweise kommt es zu keiner vollständigen Rettung des Phänotyps, da SSA durch die GABA-T in den Mitochondrien gebildet wird und über einen noch unbekanntem Transporter ins Zytosol transportiert werden muss. Dieser Transporter ist möglicherweise nicht effizient genug, um das gebildete toxische SSA aus den Mitochondrien zu transportieren, wo es dann von *UGA2* in Succinat umgewandelt werden kann. Das entstandene Succinat kann über einen Succinat/Fumarat Transporter in die Mitochondrien transportiert werden, um dort den Citratzyklus mit Succinat zu versorgen (Catoni *et al.*, 2003).

Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Überexpression an sich sein, die möglicherweise nicht genügend *UGA2* bildet, um genügend Enzym für die Reaktion zum Entgiften von SSA bereitzustellen.

Als Kontrolle für dieses Experiment dient die Überexpression des *SSADH* Gens aus *Arabidopsis*. Dieses wurde zum Vergleich mit und ohne mitochondriales Transitpeptid in der *ssadh* Mutante überexprimiert. Sollte es einen Unterschied machen, in welchem Kompartiment das *SSADH* Gen exprimiert ist, so sollte dieser Versuch dies zeigen.

Zunächst wurde das *SSADH* Gen mit und ohne Transitpeptid mit GFP fusioniert, um die Lokalisation beider Enzyme zu zeigen (siehe Abschnitt 3.2.1; Abbildung 16). *SSADH* wird in den Mitochondrien exprimiert. Ohne Transitpeptid besitzt das Protein jedoch keine mitochondriale Lokalisation mehr und konnte im Zytosol lokalisiert werden.

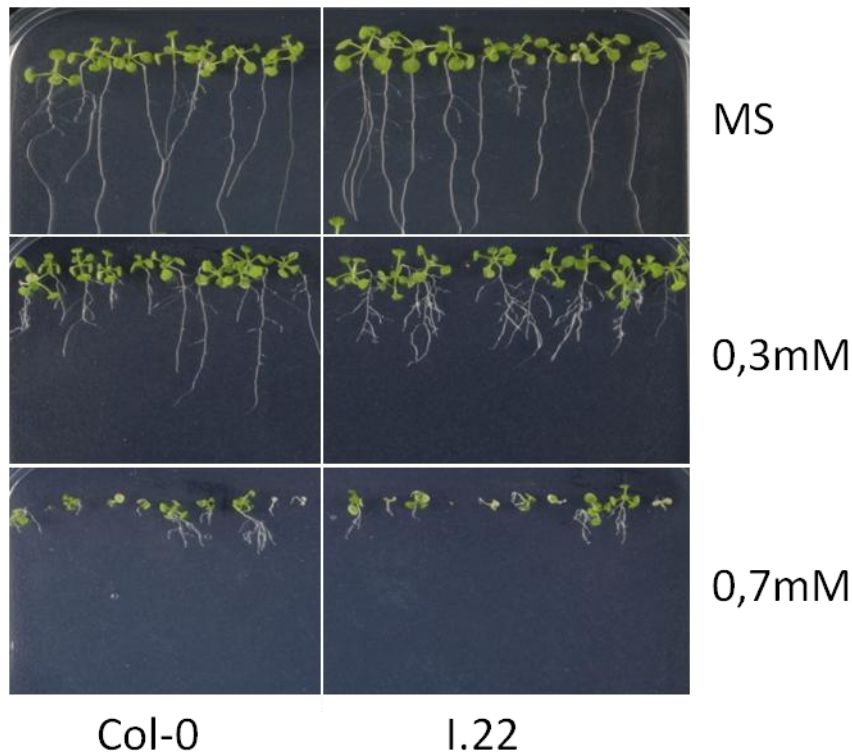
Die Transformation des Überexpressionskonstrukts der *SSADH* mit und ohne Transitpeptid im Hintergrund der *ssadh* Mutante wurde durchgeführt, jedoch konnten diese Pflanzen bis jetzt nicht analysiert werden.

### **3.3.3 Herstellung von *SSADH* MikroRNA Linien (*amiSSADH*)**

Um einen weniger starken Phänotyp ohne pleiotropen Effekt der *ssadh* Mutante zu erhalten, wurde ein *amiSSADH*-Konstrukt hergestellt und in Wildtyp *Arabidopsis* Pflanzen transformiert. Diese Linien sollten Aufschluss über Metabolite, die in der *ssadh* Mutante anstauen bzw. noch unbekannt sind, geben. Es konnten 54

unabhängige Linien mit amiSSADH-Konstrukt identifiziert werden. Unter Normalbedingungen zeigte keine der Linien einen Phänotyp.

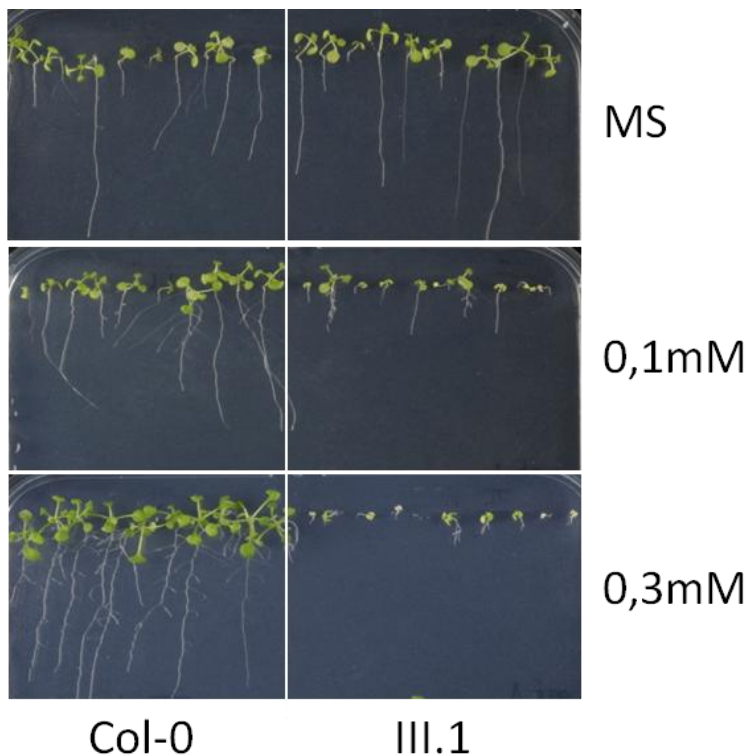
Um herauszufinden, ob das amiSSADH-Konstrukt funktionstüchtig ist, wurden einige Linien auf unterschiedlichen Konzentrationen von SSA ausgesät. SSA ist toxisch, jedoch zeigt der Wildtyp gegenüber geringen Konzentrationen an SSA (bis 0,4mM) nur eine geringe Wachstumsverzögerung. Die Doppelmutante *gs* zeigt hingegen schon bei geringen SSA Konzentrationen ein deutlich verringertes Wachstum bis hin zum Absterben der Pflanzen (Ludewig *et al.*, 2008). Somit müsste eine verringerte SSADH Aktivität durch das amiSSADH-Konstrukt ebenfalls zu einer Wachstumsverzögerung führen.



**Abbildung 31: Vergleich des Wildtyps mit der amiSSADH Linie I.22 auf ½ MS Platten ohne und mit 0,3 bzw. 0,7mM SSA. Die Pflanzen sind zwei Wochen im Klimaschrank unter Langtagbedingungen gewachsen.**

In Abbildung 31 ist gezeigt, dass die amiSSADH Linie I.22 keinen Unterschied im Wachstum gegenüber dem Wildtyp zeigt. Beide wachsen auch auf höheren Konzentrationen an SSA (0,7mM) gleich schlecht.

In Abbildung 32 zeigt die amiSSADH Linie III.1 schon bei sehr geringen SSA Konzentrationen von 0,1mM eine deutliche Verzögerung des Wachstums im Vergleich zum Wildtyp. Die Wurzellänge ist verkürzt und auch die Rosettengröße ist deutlich verringert. Schon bei einer Konzentration von 0,3mM SSA wächst die amiSSADH Linie III.1 im Vergleich zum Wildtyp kaum noch. Somit konnte gezeigt werden, dass das amiSSADH Konstrukt funktionstüchtig ist, jedoch unter Normalbedingungen genügend *SSADH*-Transkripte in allen Linien vorhanden sind, um das entstandene SSA der GABA-Transaminase zu Succinat umzusetzen. Jedoch tritt nur unter Normalbedingungen kein Phänotyp auf. Denn wenn der Druck auf die *SSADH*-Aktivität durch Zugabe von SSA erhöht wird, zeigen diese Linien einen Phänotyp (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Vergleich des Wildtyps mit der amiSSADH Linie III.1 auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten ohne und mit 0,1 bzw. 0,3mM SSA. Die Pflanzen sind zwei Wochen im Klimaschrank unter Langtagbedingungen gewachsen.**

Auch durch Wässern mit GABA konnte im Vergleich zu mit Wasser gegossenen Pflanzen ein Phänotyp hervorgerufen werden. Dieser ist ebenfalls abhängig von der noch vorhandenen Transkriptmenge an *SSADH*.

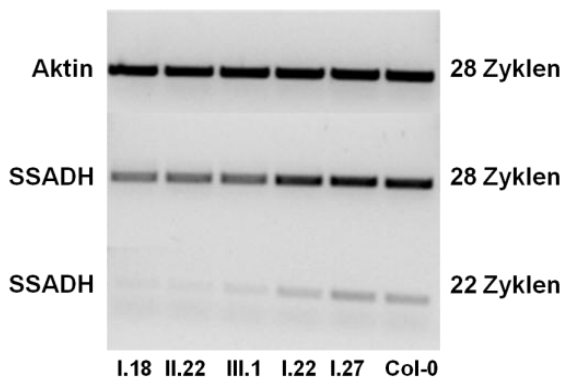
Bei diesem Versuch wurden Wildtyp- Pflanzen und fünf Linien amiSSADH für zwei Wochen im Gewächshaus angezogen und anschließend mit Wasser oder 50mM GABA eine Woche lang alle zwei Tage gegossen. Auch hier konnte bei einigen amiSSADH Linien ein Phänotyp nach Gießen mit 50mM GABA festgestellt werden, wobei die Kontrollpflanzen (mit Wasser gegossen) keinen Phänotyp aufwiesen. Die Blätter der amiSSADH Linien I.18, II.22 und III.1 wiesen nach dem Gießen eine hellgrüne Färbung und Blattnekrosen auf. Die Linien I.22 und I.27 zeigten nach einer Woche gießen mit GABA keinen Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Wildtyp und fünf amiSSADH Linien (I.18, II.22, III.1, I.27, I.22) nach einer Woche Gießen mit 50mM GABA oder Wasser als Kontrolle. Die Pflanzen sind drei Wochen im Gewächshaus gewachsen.**

Die Unterschiede zwischen den Linien mit Phänotyp (I.18, II.22 und III.1) und den Phänotyp-freien Linien (I.22 und I.27) sind möglicherweise mit einer

unterschiedlichen Transkriptmenge an *SSADH* in den einzelnen Linien zu erklären. Um dies zu untersuchen, wurde RNA von den einzelnen Linien und dem Wildtyp isoliert. Die daraus hergestellte cDNA wurde auf ihre Transkriptmenge an *SSADH* getestet (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34: Gelbild einer semiquantitativen RT-PCR. Transkriptmenge an *SSADH* (Primer *SSADH F2-SSADH R2*) in den *amiSSADH* Linien I.18, II.22, III.1, I.22, I.27 und Wildtyp nach 28 und 22 Zyklen. Als Kontrolle diente Aktin, welches in allen Proben gleich stark exprimiert wurde.**

Hierbei zeigten die Linien I.18, II.22 und III.1 eine deutlich geringere Expression des *SSADH* Gens im Vergleich zu den Linien I.22 und I.27, die sich im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Transkriptmenge nicht unterschieden. Jedoch waren in den Linien I.18, II.22 und III.1 noch *SSADH* Transkripte vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass die *SSADH*-Aktivität in diesen Linien herunterreguliert wurde, jedoch noch immer genug Aktivität vorhanden ist, um SSA unter Normalbedingungen zu Succinat abzubauen, was dazu führte, dass sie *amiSSADH*-Pflanzen unter Normalbedingungen keinen vom Wildtyp unterschiedlichen Phänotyp zeigten. Erst durch Zugabe von SSA oder GABA konnte ein aberranter Phänotyp hervorgerufen werden, da dann größere Mengen an SSA in den Pflanzen anstauen und durch die verringerte Aktivität der *SSADH* nicht vollständig abgebaut werden können. Die Linien I.22 und I.27 haben zwar ein *amiSSADH* Konstrukt (bestätigt durch PCR), welches die Transkriptmenge an *SSADH* jedoch nicht beeinflusst.

## 4 Diskussion

### 4.1 Analyse der Doppelmutante *gaba-t x ssadh*

Die Doppelmutante *gaba-t x ssadh* (*gs*) komplementiert durch die zusätzliche *gaba-t* Mutation den starken Phänotyp der *ssadh* Mutante, indem kein SSA und/oder GHB, sowie ROS (reactive oxygen species) in der Doppelmutante mehr anstauen (Ludewig *et al.*, 2008). Jedoch zeigt die Doppelmutante unter Kurztagbedingungen einen Phänotyp, der dem der *ssadh* Mutante sehr ähnlich, aber schwächer ist. Die Blätter sind gekräuselt und können bedingt, durch einen Anstau von SSA/GHB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nekrosen bilden (siehe Abbildung 7).

In diesen Pflanzen wurde ein erhöhter GABA Gehalt gemessen. In Abbildung 8 ist zu sehen, dass GABA im Wildtyp, der *gaba-t* Mutante und in der Doppelmutante *gs* im Vergleich zu den gleichen Pflanzen unter Langtagbedingungen, unter Kurztagbedingungen anstaut. Der höchste GABA Gehalt wurde in der Doppelmutante unter Kurztagbedingungen gemessen. Diese Konzentration könnte ausreichen, die K<sub>m</sub>-Werte anderer Aminotransferasen für GABA zu erreichen, die dann GABA als Substrat für ihre Transaminasereaktion verwenden könnten. So würden dann geringe Mengen an SSA hergestellt werden, die den im Vergleich zur *ssadh* Mutante schwächeren Phänotyp der Doppelmutante *gs* unter Kurztagbedingungen erklären würden. Andererseits könnte durch ein Gen, das unter Kurztagbedingungen transkriptionell hochreguliert ist, für den Phänotyp verantwortlich sein.

Glutamat scheint keinen Einfluß auf den Phänotyp der *gs* Doppelmutante zu haben (siehe Abbildung 8), da in allen untersuchten Pflanzen ein ähnlicher Gehalt an Glutamat zu finden ist. Glutamat ist für viele Stoffwechselprozesse in der Pflanze wichtig und in großen Mengen vorzufinden. Glutamat ist eine wichtige Aminosäure, die Vorstufe anderer Aminosäuren wie Prolin und Arginin, und Bestandteil vieler Proteine. GABA wird aus Glutamat durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) gebildet, jedoch scheint der hohe Gehalt an GABA in den Mutanten *gaba-t* und *gs* keinen Einfluß auf den Glutamatgehalt in der Pflanze zu haben. Es scheint somit zu keiner effizienten Feedback-Hemmung der GAD durch GABA zu kommen.

Glutamin wird unter Verbrauch von ATP aus Glutamat hergestellt, dabei wird eine weitere Aminogruppe an Glutamat gebunden. Beide Aminosäuren spielen somit eine bedeutende Rolle bei der Stickstofffixierung und -freigabe. Unter Langtagbedingungen besitzen sowohl die Doppelmutante *gs* als auch die *gaba-t* Mutante einen geringeren Gehalt an Glutamin als der Wildtyp. Unter Kurztagbedingungen kann in der *gaba-t* Mutante jedoch kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Die Menge an Glutamin ist in der Doppelmutante unter Kurztagbedingungen erhöht. Eventuell staut unter Kurztagbedingungen in der Doppelmutante durch den höheren Gehalt an GABA Glutamat an, woraus direkt Glutamin hergestellt wird.

Alanin ist ein Nebenprodukt der GABA-T Reaktion und unter Langtagbedingungen in beiden Mutanten geringer vorhanden als im Wildtyp. Dies könnte auf das Fehlen der GABA-T in beiden Mutanten zurückzuführen sein, da bei der Umsetzung von GABA als Produkt auch Alanin entsteht. Im Vergleich dazu steigt der Gehalt an Alanin in der Doppelmutante unter Kurztagbedingungen an. Möglicherweise bildet durch den erhöhten Gehalt an GABA eine weitere Aminotransferase aus GABA SSA und benutzt, wie die GABA-T, Pyruvat als Cosubstrat, um Alanin herzustellen.

Der Gehalt an Tryptophan verhält sich ähnlich wie der von GABA. Der höchste Gehalt konnte in der *gs* Doppelmutante unter Kurztagbedingungen gemessen werden. Es scheint, dass der Gehalt von GABA mit dem von Tryptophan korreliert. Generell höhere Gehalte an proteinogenen Aminosäuren konnten in Reis (*Oryza sativa*) mit erhöhtem GABA Gehalt gezeigt werden (Akama *et al.*, 2009). Diese Pflanzen besaßen ein verkürztes GAD Protein, das keine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calmodulin (CaM)-Bindedomäne mehr besitzt. Dies führte zu einem Verlust der Autoinhibition des GAD Enzyms (Baum *et al.*, 1996). Möglicherweise induziert GABA die Biosynthese einiger Aminosäuren. Eine weitere Hypothese ist, dass ein erhöhter GABA-Gehalt den Proteinabbau induziert und demzufolge mehr proteinogene Aminosäuren vorhanden sind (Roberts, 2007; Fait *et al.*, 2011). Dies könnte auch der Grund dafür sein, warum Arginin in den Mutanten erhöht ist. Hier zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen Pflanzen, die unter Lang- bzw. Kurztagbedingungen angezogen wurden.

Asparagin wird aus Aspartat und Glutamin unter Verbrauch von ATP hergestellt. Diese Reaktion wird von der Asparaginsynthetase (ASN) katalysiert. *asn* Mutanten



zeigten geringe Mengen an Asparagin und einen erhöhten Gehalt an GABA, Alanin, Pyruvat und Ammonium. Eine mögliche Hypothese ist, dass die überschüssige Menge an Ammonium in Abwesenheit der ASN über GABA und Alanin aufgefangen wird (Gaufichon *et al.*, 2013). Somit könnte auch in der Doppelmutante *gs* ein erhöhter Gehalt an GABA zu mehr Glutamin und damit zu mehr Asparagin führen. Threonin wird aus Aspartat über die Zwischenstufe Homoserin gebildet. Möglicherweise staut Threonin an, da auch Asparagin und Glutamin in der Doppelmutante in höheren Mengen vorhanden sind.

Bei der HPLC-Messung wurde ein zusätzlicher Peak in der Doppelmutante *gs* gefunden (siehe Abbildung 9). Die unbekannte Substanz besitzt eine oder mehrere Aminogruppen. Wäre dies nicht so, könnte sie nicht erfasst werden, da Aminogruppen für die Derivatisierung notwendig sind, um sie später in der HPLC auftrennen und detektieren zu können. Die UPLC/MS Analyse ergab drei Substanzen, die im Wildtyp nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorkommen, aber in der *gs* Doppelmutante anstauen (siehe Abbildung 10). Datenbankanalysen ergaben mögliche Kandidaten, die in Tabelle 2 aufgelistet sind. Bei einigen Kandidaten handelt es sich um Moleküle, die synthetisch hergestellt werden (Methylaminolävulinsäure) oder mögliche Synthese- oder Abbauwege, die in Arabidopsis bzw. Pflanzen nicht bekannt sind (5-Oxo-2-Aminohexansäure, 3-Oxo-5-Aminohexansäure, 2-Oxo-6-Aminocaprinsäure, Allysin, 2-Oxo-5-Aminopentanonsäure und 4-Oxo-2-Aminopentanonsäure). Dies ist jedoch kein Ausschlußkriterium, da diese Substanzen möglicherweise auch in Pflanzen über noch unbekannte Synthese- oder Abbauwege hergestellt werden könnten.

Hingegen werden 5-Aminolävulinsäure, Glutamat-1-Semialdehyd und Glutamat-5-Semialdehyd aus Glutamat synthetisiert und zählen somit zu den aussichtsreichsten Kandidaten für die unbekannte Substanz. 5-Aminolävulinsäure konnte als Substanz käuflich erworben werden, zeigte aber keinen übereinstimmenden Peak mit der unbekanntem Substanz bei der HPLC-Analyse. Somit sind weitere Analysen und Analysemethoden nötig, um die unbekannte Substanz zu identifizieren.

## 4.2 Rettung des Kurztagphänotyps der *gs* Doppelmutante

In der Doppelmutante *gs* wird unter Kurztagbedingungen ein vom Wildtyp unterschiedlicher Phänotyp hervorgerufen. Möglicherweise stauen nur geringe Mengen an SSA unter Kurztagbedingungen an, weshalb der Phänotyp im Vergleich zur *ssadh* Mutante abgeschwächt ist.

Zunächst wurden GABA-Shunt Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* in der Doppelmutante überexprimiert. SSADH und GABA-T aus Hefe sind im Zytosol lokalisiert (Coleman *et al.*, 2001), hingegen besitzen beide Enzyme aus *Arabidopsis* ein mitochondriales Transitpeptid und sind dort aktiv (Breitkreuz *et al.*, 1995; Van Cauwenberghe *et al.*, 2002). UGA1 konnte im Zytosol lokalisiert werden (siehe Abbildung 15). Hier konnte keine Colokalisation in den Mitochondrien festgestellt werden. Hingegen konnte für SSADH aus *Arabidopsis* eine eindeutige Lokalisation in den Mitochondrien gezeigt werden (Abbildung 16). Wird das mitochondriale Transitpeptid entfernt, kann SSADH nicht mehr in die Mitochondrien transportiert werden und weist eine Lokalisation im Zytosol auf.

Wird in der Doppelmutante *gs* die GABA-Transaminase aus Hefe (UGA1) überexprimiert, so weisen diese Pflanzen unter Langtagbedingungen einen Phänotyp auf (siehe Abbildung 15). Dieser fällt jedoch deutlich schwächer aus als bei der *ssadh* Mutante. Eine Erklärung hierfür ist, dass UGA1 im Zytosol und nicht in den Mitochondrien exprimiert wird. Hefen sind deutlich resistenter gegenüber hohen Konzentrationen an SSA. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefe *ssadh* Mutante bei einer Konzentration von 2mM SSA keine Wachstumsverzögerung im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Abbildung 13). Erst bei einer Konzentration von 10mM SSA ist das Wachstum dieser Mutante deutlich eingeschränkt. Hingegen zeigt die *Arabidopsis ssadh* Mutante schon unter Normalbedingungen einen starken Phänotyp, und die *gs* Doppelmutante verträgt nur Konzentrationen bis 0,8mM SSA. Somit könnte die Produktion von SSA im Zytosol für den milden Phänotyp verantwortlich sein. Die Überexpression im Wildtyp zeigte trotz einer zusätzlichen Produktion von SSA keinen aberranten Phänotyp. Somit muss SSA aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert werden können, um dort durch die SSADH zu Succinat umgewandelt werden zu können. Folglich werden entweder nur geringe Mengen an SSA durch UGA1 hergestellt oder nur geringe Mengen über den noch

unbekannten SSA Transporter in die Mitochondrien transportiert, um dann in der *ssadh* Mutante anzustauen. Eine andere Erklärung für den abgeschwächten Phänotyp könnten die verschiedenen Cosubstrate der beiden GABA-Transaminasen sein. UGA1 verwendet im Gegensatz zur pflanzlichen GABA-T  $\alpha$ -Ketoglutarat anstelle von Pyruvat als Cosubstrat. Dies könnte zu einer unterschiedlichen Aktivität beider Enzyme in Arabidopsis führen und somit zu einer unterschiedlichen Umsetzung von GABA zu SSA.

Die Überexpression von UGA2 führte zur Rettung des *gs* Phänotyps unter Kurztagbedingungen. Die in Abbildung 14 gezeigten Linien hatten unter Kurztagbedingungen keinen aberranten Phänotyp mehr, besitzen jedoch noch die Mutationen von *ssadh* und *gaba-t*. Da UGA2 SSA zu Succinat umwandelt und dieses so detoxifiziert, muss SSA verantwortlich für den Kurztagphänotyp der *gs* Doppelmutante unter Kurztagbedingungen sein. Das im Zytosol entstandene Succinat kann über den Succinat/Fumarat Transporter in die Mitochondrien transportiert werden und dort dem Citratzyklus zur Verfügung stehen (Catoni *et al.*, 2003).

Ungewiss ist, woher das SSA in der Doppelmutante stammt. Möglicherweise produziert eine Aminotransferase bei hohem GABA-Gehalt, wie er in der Doppelmutante unter Kurztagbedingungen zu finden ist, SSA, da erst dann der  $K_m$ -Wert für GABA erreicht wird. Das entstandene SSA kann dann durch die Mutation des SSADH Gens nicht zu Succinat abgebaut werden und staut unter Kurztagbedingungen in der Doppelmutante *gs* an.

Der Phänotyp tritt nur unter Kurztagbedingungen auf. Dies spricht eventuell für ein Gen, das unter Kurztagbedingungen verstärkt exprimiert wird. Das Gen der *BCAT-2* ist unter Kurztagbedingungen transkriptionell hochreguliert (siehe Abbildung 17), kann jedoch den Kurztagphänotyp der *gs* Doppelmutante nicht retten.

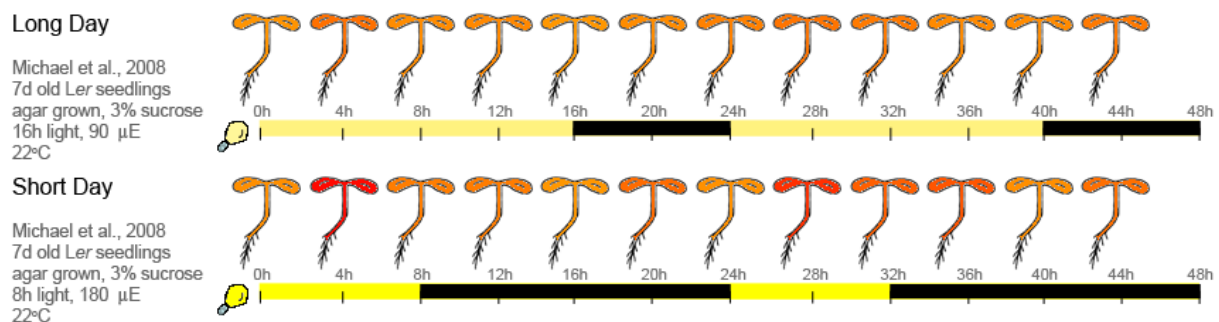
Um mögliche Gene, die für den Kurztagphänotyp verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde eine EMS-Mutagenese der Doppelmutante *gs* durchgeführt. Die sechs identifizierten Linien zeigten unter Kurztagbedingungen keinen Phänotyp mehr (siehe Abbildung 18). Bei den Linien 5.C und 12.H konnte die Mutation auf einen Bereich des unteren Arms von Chromosom 5 eingegrenzt werden (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). In diesem Bereich befinden sich mehrere Aminotransferasen, die möglicherweise durch die EMS-Mutagenese mutiert wurden. Ein guter Kandidat

erschien eine Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase (OAT, At5g46180). Da Ornithin strukturell GABA sehr ähnlich ist und sowohl die OAT als auch die GABA-T durch Gabaculin gehemmt werden kann, könnte bei hohen GABA-Konzentrationen auch GABA durch die OAT zu SSA umgesetzt werden. Jedoch wies die Sequenzierung der genomischen DNA der OAT keine Mutation auf, und auch die Dreifachmutante *oat x gs* zeigte unter Kurztagbedingungen den *gs* Phänotyp.

Weitere Gene wie die Tyrosin Aminotransferase (At5g53970), Glutamat-1-Semialdehyd Aminotransferase (At5g63570) und „broad spectrum“ Aminotransferase (At5g51690) wurden auf mögliche Mutationen sequenziert, jedoch konnte in diesen Genen keine Mutation gefunden werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderes Gen, das nicht für eine Aminotransferase kodiert, für den Phänotyp verantwortlich ist. In einer Veröffentlichung über die menschliche Glutamatdecarboxylase (GAD; Langendorf *et al.*, 2013) wird beschrieben, dass diese in ihrer Hauptreaktion Glutamat zu GABA umsetzt. Dieses Enzym verwendet als Cosubstrat PLP (Pyridoxal 5'-phosphat). Die beiden Isoformen GAD65 und GAD67 haben verschiedene biologische Rollen. GAD67 ist konstitutiv aktiv und hat den Cofaktor PLP gebunden, GAD65 hingegen liegt in einer inaktiven Apo-Form vor, die jedoch schnell durch Bindung von PLP aktiviert werden kann. GAD65 kann in seiner inaktiven Form als Nebenreaktion auch Glutamat und PLP zu SSA und PMP (Pyridoxamin 5'-phosphat) umsetzen (Porter *et al.*, 1985). Hierbei wird die Aminogruppe von Glutamat auf PLP übertragen und es entsteht PMP. Möglicherweise könnte auch eins der fünf GAD-Enzyme aus Arabidopsis anstelle von GABA direkt SSA herstellen. Das entstandene PMP müsste anschließend wieder zu PLP umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch eine Pyridoxaminphosphat Oxidase (PPOX) katalysiert. PMP reagiert mit H<sub>2</sub>O, FMN und O<sub>2</sub> zu PLP, Ammonium, FMNH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In Arabidopsis sind zwei Gene bekannt, von denen eines auf Chromosom 2 (At2g46580, Sang Y. *et al.*, 2011) und eines auf Chromosom 5 lokalisiert ist (At5g49970, PPOX, Sang Y *et al.*, 2007). Beide komplementieren die Hefemutante *pdx3*, welche keine Aktivität der PPOX zeigt. Möglicherweise könnte eine Mutation im Gen At5g49970 verhindern, dass ausreichend PMP zu PLP umgewandelt wird und weiterhin für die Nebenreaktion der GAD bereitgestellt wird. Somit würde von der GAD kein SSA mehr hergestellt werden. Es ist auch denkbar, dass statt PMP GABA als Substrat für die Reaktion

verwendet wird. Hierbei würde SSA direkt durch die Aktivität der PPOX entstehen. Eine Mutation im Gen der *PPOX* würde die Produktion von SSA verhindern. Der Arabidopsis eFP-Browser zeigt, dass die *PPOX* unter Kurztagbedingungen etwas stärker exprimiert wird als unter Langtagbedingungen (Abbildung 35). Möglicherweise ist dies ausreichend, um unter Langtagbedingungen mehr SSA herzustellen, welches in der Doppelmutante anstaut und zum bereits beschriebenen Kurztagphänotyp führt.



**Abbildung 35: Vergleich der Genexpression des Gens *PPOX* unter Langtag- (Long Day) und Kurztagbedingungen (Short Day). Intensitätsskala von gelb bis rot, wobei gelb am geringsten und rot am stärksten exprimiert bedeutet.**

Die Sequenzierung der genomischen DNA dieses Gens konnte bis jetzt keine Mutation aufweisen. Möglicherweise befindet sich diese aber auch in der Promotorregion des Gens. Dies wurde bis jetzt nicht überprüft.

Aus der EMS-Mutagenese der *gs* Doppelmutante wurden sechs Linien erhalten, die unter Kurztagbedingungen den Phänotyp der *gs* Doppelmutante retten. Eine dieser Linien, *gsEMS*-Linie 1.A, ist in Abbildung 23 dargestellt und weist im Vergleich zum Wildtyp eine gelbliche Färbung der jungen, neugebildeten Blätter auf. Abbildung 24 zeigt, dass in der *gsEMS*-Linie 1.A mittels SSLP Markern die Mutation auf den unteren Arm von Chromosom 3 eingegrenzt werden konnte. Da die Blätter eine gelbliche Färbung zeigten, wurde über einen Zusammenhang zur Chlorophyllsynthese spekuliert. In vorangegangenen Veröffentlichungen zeigte die Mutante der NO Synthase (*nos1 / rif1-1 / cGTPase*) einen identischen Phänotyp (Flores-Perez *et al.*, 2008). Die Sequenzierung der genomischen DNA ergab eine Punktmutation der ersten Base von Intron 6. Dies führt zu einem Problem beim

Spleißen in die korrekte mRNA (Abbildung 26 bis Abbildung 28). Demzufolge scheint eine Mutation des Gens NOS1/cGTPase den Kurztagphänotyp der *gs* Doppelmutante zu retten.

Bei der *nos1/rif1-1/cgtpase* Mutante konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen die Akkumulation von NO (Stickstoffmonoxid) gestört ist. Zudem besitzt sie weniger Chlorophyll und ist resistent gegen Fosmidomycin (FSM) (Flores-Perez *et al.*, 2008). FSM hemmt das erste Enzym des MEP-Stoffwechselwegs (Methylethanolphosphatweg), die DXR (Desoxyxylulosephosphat-Synthase). Die Resistenz der *nos1/rif1-1/cgtpase* Mutante gegenüber FSM kommt zustande, indem sie mehr DXR Protein im Vergleich zum Wildtyp besitzt. Somit wird ein Teil des Proteins durch FSM gehemmt, jedoch kann durch die erhöhte Menge an Protein noch immer Substrat von DXR umgesetzt werden und es kommt nicht zur Hemmung des Stoffwechselwegs.

Werden diese Mutanten auf  $\frac{1}{2}$  MS mit Saccharose ausgebracht, so kann der Chlorophyllphänotyp gerettet werden, und die Mutanten besitzen den gleichen Chlorophyllgehalt sowie den gleichen Gehalt an NO wie der Wildtyp (Van Ree *et al.*, 2011). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass durch externe Zugabe von Saccharose ein Defekt des MEP-Stoffwechselwegs nicht gerettet werden kann. Da NOS1/cGTPase keine NO Synthase Aktivität zeigt (Moreau *et al.*, 2008; Sudhamsu *et al.*, 2008), wurde spekuliert, dass wegen der defekten Chloroplasten eine geringere Kohlenstoffmenge in den Pflanze akkumuliert und somit indirekt die Akkumulation von NO beeinflusst wird. Durch eine geringere Photosyntheserate werden weniger Kohlenstoffe hergestellt. Möglicherweise ist für die Synthese von Chlorophyll nicht genügend Glutamat in den Mutanten vorhanden. Durch Zugabe von Saccharose könnte Glutamat für die Chlorophyllsynthese bereitgestellt werden und somit den Phänotyp retten. Demnach würde eine geringe Menge Glutamat zu einer geringen Chlorophyllbiosynthese, sowie einer geringeren Menge an GABA und SSA führen, da Glutamat durch GAD zu GABA umgesetzt wird.

Die *ssadh* Mutante besitzt unter Normalbedingungen einen starken Phänotyp, der jedoch durch eine geringere Menge an Licht ( $10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  statt  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) gerettet werden kann (Fait *et al.*, 2005). Eine geringere Lichtintensität führte zu einer geringeren Bildung von ROS und folglich zu einem abgeschwächten Phänotyp. Somit könnten sowohl der *ssadh*-, als auch der *gs*-Phänotyp durch geringere

„Wahrnehmung“ von Licht bei einem Defekt der Chlorophyllsynthese, gerettet werden.

Die Doppelmutante *gs* wurde mit der *nos1/rif1-1/cgtpase* Mutante gekreuzt. Die Dreifachmutante zeigte unter Kurztagbedingungen keinen Phänotyp mehr und bestätigt die *gsEMS*-Linie 1.A.

Die Doppelmutante *cgtpase* x *ssadh* zeigt unter Normalbedingungen keinen *ssadh* Phänotyp mehr (siehe Abbildung 29). Somit scheint eine Mutation im Gen *NOS1/cGTPase* und möglicherweise der geringere Gehalt an Chlorophyll ausschlaggebend für die Rettung zu sein. Um dies zu bestätigen, wurde die Doppelmutante *cgtpase* x *ssadh* im Vergleich zur Einzelmutante *cgtpase* auf Agarplatten mit ½ MS mit und ohne Saccharose ausgesät. Die Doppelmutante sollte auf ½ MS mit Saccharose, da der Chlorophyllgehalt dann dem des Wildtyps entspricht, wieder einen *ssadh* Phänotyp aufweisen. Dies konnte jedoch bis jetzt nicht überprüft werden, da die *cgtpase* Mutanten auf ½ MS mit 1% Saccharose im Vergleich zu denen auf ½ MS ohne Saccharose keinen unterschied in der Färbung der Blätter zeigten und somit keine Rettung des *cgtpase* Phänotyps. Möglicherweise war bei den vorherrschenden Anzuchtbedingungen die Konzentration an Saccharose zu gering und sollte in einem weiteren Experiment erneut untersucht werden.

### 4.3 Rettung des *ssadh* Phänotyps

Der *ssadh* Phänotyp wird durch einen Anstau an SSA/GHB, ROS und Auxin hervorgerufen. Die Mutante ist kleinwüchsig, bildet Nekrosen und hat einen deutlich verlängerten Generationszyklus (Bouché *et al.*, 2003).

Pyruvat wird als Cosubstrat für die GABA-Transaminase Reaktion gebraucht, um aus GABA SSA und Alanin herzustellen. Eine Inhibierung der PDK führte zu einer ~40%igen Verringerung der Pyruvatmenge in den *pdk* Mutanten (Reichel, 2009). Somit wird mehr Pyruvat zu Acetyl-Co durch die PDH umgesetzt, da diese nicht mehr durch die PDK inhibiert werden kann. Eine weitere Verringerung der Pyruvatmenge sollte durch die Mutationen der in den Mitochondrien vorkommenden NAD-abhängigen Malatenzyme (Winning *et al.*, 1994) erreicht werden. Diese setzen Malat, unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> zu Pyruvat um. Die Vierfachmutante konnte keine Rettung des *ssadh* Phänotyps hervorrufen, somit scheint ausreichend Pyruvat für die GABA-

T Reaktion zur Verfügung zu stehen, um SSA herzustellen. Möglicherweise wird bei einem geringen Gehalt an Pyruvat in den Mitochondrien Pyruvat aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert, damit es nicht zu einem Mangel kommt.

Eine partielle Rettung des *ssadh* Phänotyps konnte durch die Überexpression des *SSADH* Gens aus Hefe (*UGA2*) erreicht werden (siehe Abbildung 30). Die GABA-shunt Gene sind in Hefen im Zytosol lokalisiert (Coleman *et al.*, 2001), und nicht, wie bei Pflanzen, in den Mitochondrien. Das in der Mutante angestaute SSA wurde möglicherweise über einen bis jetzt unbekanntem SSA Transporter aus den Mitochondrien transportiert, um anschließend im Zytosol durch *UGA2* zu Succinat umgewandelt zu werden. Succinat kann dann über einen Succinat/Fumarat Transporter in die Mitochondrien transportiert werden, um im Citratzyklus verstoffwechselt zu werden (Catoni *et al.*, 2003). Somit führte eine Überexpression des *SSADH* Gens im Zytosol nicht zu einer vollständigen Rettung. Dies könnte möglicherweise am Transporter liegen, der SSA nicht vollständig aus den Mitochondrien ins Zytosol transportiert. Geringe Mengen SSA könnten weiterhin in den Mitochondrien anstauen und für einen abgeschwächten *ssadh* Phänotyp sorgen. Eine Expression von Arabidopsis *SSADH* Genen mit und ohne Transitpeptid im Mutantenhintergrund könnte dies aufklären. Die Überexpression von *SSADH* sollte zu einer vollständigen Rettung führen, und die Überexpression von *SSADH* ohne Transitpeptid sollte ähnliche Ergebnisse zeigen wie die Überexpression von *UGA2* in der *ssadh* Mutante.

Da es sich um ein Gen aus einem anderen Organismus handelt, könnte dies eine Rolle bei der Umsetzung von SSA zu Succinat spielen. Möglicherweise haben beide Enzyme unterschiedliche  $K_m$ -Werte für SSA. Auch diese Frage könnte durch das oben geschilderte Experiment mit Arabidopsis Genen mit und ohne Transitpeptid aufgeklärt werden.

#### **4.4 *SSADH* MikroRNA Linien (ami*SSADH*)**

Es wurden 54 Linien mit ami*SSADH*-Konstrukt identifiziert. Diese zeigten keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp. Jedoch konnte bei einigen Linien ein vom



Wildtyp unterschiedlicher Phänotyp erzielt werden, indem sie auf Agarplatten, die mit SSA versetzt wurden, angezogen wurden. Einige Linien zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp beim Wachstum auf SSA (siehe Abbildung 31), andere zeigten auf  $\frac{1}{2}$  MS kein verändertes Wachstum, jedoch konnte bei geringen Konzentrationen an SSA in den  $\frac{1}{2}$  MS Platten (0,1mM) ein deutlich verringertes Wachstum der Wurzeln und der Rosettenblätter festgestellt werden (siehe Abbildung 32). Das verringerte Wachstum der Rosettenblätter konnte auch anhand eines Experiments auf Erde festgestellt werden. Hier wurden die unterschiedlichen Linien eine Woche lang weiterhin mit Wasser oder mit 50mM GABA gegossen. Dabei zeigte keine Linie einen Unterschied zum Wildtyp, wenn mit Wasser gegossen wurden. Ein deutlicher aberranter Phänotyp konnte durch Gießen mit GABA-haltigem Wasser erzielt werden. Der Wildtyp kann GABA durch die GABA-T und SSADH zu Succinat abbauen. Ein ähnliches Verhalten zeigten die amiSSADH Linien I.27 und I.22, somit können auch diese Linien trotz amiSSADH Konstrukt SSA zu Succinat umwandeln. Die Linien I.18, II.22 und III.1 hingegen zeigten einen deutlichen Phänotyp. Sie sind kleiner, heller und bilden Nekrosen. Dies spricht dafür, dass bei einer externen Zugabe von GABA SSA in den amiSSADH Linien anstaut. GABA wird zu SSA durch die GABA-T umgewandelt und das entstandene SSA akkumuliert in den amiSSADH Pflanzen, da vermutlich die Aktivität der SSADH durch das amiSSADH-Konstrukt herabgesetzt wurde.

## 5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über den GABA-Stoffwechselweg in Pflanzen gesammelt werden.

Die, durch eine zusätzliche Mutation des *GABA-T* Gens gerettete, *ssadh* Mutante zeigte unter Kurztagbedingungen einen Phänotyp, der dem der *ssadh* Mutante ähnelt. Bei einer Aminosäuremessung mittels HPLC konnte ein zusätzlicher Peak entdeckt werden. Um die unbekannte Substanz zu identifizieren, müssen weitere Analysemethoden verwendet werden. Möglicherweise könnten Mutanten von Genen, die in die Synthese bzw. den Abbau der möglichen Kandidaten eingebunden sind, Aufschluß über die unbekannte Substanz, die in der Doppelmutante *gs* anstaut, geben. Diese Mutanten müssten den gleichen Peak bei der HPLC-Analyse zeigen wie die *gs* Doppelmutante und würden somit die gleiche unbekannte Substanz anstauen.

Nähere Untersuchungen zum Thema Toxizität von SSA in den verschiedenen Kompartimenten sollten zeigen, ob die Synthese von SSA in den Mitochondrien oder im Zytosol ausschlaggebend für den *ssadh* Phänotyp ist. Aufklärung darüber könnte eine Überexpression von SSADH und GABA-T mit und ohne Transitpeptid geben. Hierbei sollte deutlich werden, ob es einen Unterschied macht, wo das jeweilige Gen exprimiert wird und ob unterschiedliche Cosubstrate der GABA-T aus Arabidopsis und Hefe einen Einfluß auf die Expression haben. Durch die Überexpression des Hefe *SSADH* Gens (*UGA2*) konnte keine vollständige Rettung der *ssadh* Mutante hervorgerufen werden. Auch hier sollte die Expression von SSADH mit und ohne Transitpeptid zeigen, ob es einen Unterschied macht, wenn SSADH in den Mitochondrien oder im Zytosol exprimiert wird. Die Überexpression von SSADH in den Mitochondrien sollte zu einer vollständigen Rettung der *ssadh* Mutante führen. Bei der Überexpression ohne Transitpeptid sollte entweder eine vollständige Rettung zu sehen sein, dann würde wichtig sein, aus welchem Organismus die SSADH stammt, oder zu einer Teilrettung, wie bei der Überexpression des Hefe Gens. Demnach wäre ausschlaggebend, in welchem Kompartiment SSADH exprimiert wird, um die gebildete Menge an SSA zu detoxifizieren.

Zudem müssten nähere Untersuchungen der EMS-Linien durchgeführt werden. In der Linie 1.A konnte eine EMS-Mutation im Gen *NOS1/cGTPase* gezeigt werden,

jedoch ist unklar, wieso diese Mutation sowohl den *gs*-, als auch den *ssadh* Phänotyp retten kann. Zur Chlorophyllhypothese müssten weitere Versuche durchgeführt werden, um zu analysieren, ob der geringe Gehalt an Chlorophyll tatsächlich ausschlaggebend für die Rettung sein kann. Andere Mutanten, die einen geringeren Chlorophyllgehalt aufweisen, müssten mit der Doppelmutante gekreuzt werden, um eine Rettung des Kurztagphänotyps hervorzurufen.

Die EMS-induzierten Mutationen in den Linien 5.C und 12.H konnten bis jetzt nur auf einen Bereich auf dem unteren Arm von Chromosom 5 eingegrenzt werden. Um die jeweilige Mutation zu identifizieren, müsste der Bereich weiter eingegrenzt werden. Hierfür wird eine größere Mappingpopulation der jeweiligen Linien sowie eine größere Kollektion an Mappingprimern in diesem Abschnitt von Chromosom 5 benötigt. Ein guter Kandidat scheint die PPOX zu sein, jedoch konnte bis jetzt keine Mutation in diesem Gen mittels Sequenzierung der genomischen DNA der Mutanten-Linien gefunden werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine bisher nicht entdeckte Mutation im Bereich des Promotors sein, der bis jetzt nicht auf eine mögliche Mutation hin untersucht wurde. Zudem müsste auch die Transkriptmenge von PPOX in den *gsEMS*-Linien im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. In der Linie 5.C konnte kein Unterschied der Transkriptmenge der PPOX durch semiquantitative PCR gezeigt werden. Somit sind weitere Sequenzierungen sowie die Kreuzung der *ppox* Mutante mit *gs* nötig, um festzustellen, ob dieses Gen für den Kurztagphänotyp verantwortlich ist. Ebenfalls weiterhelfen könnte die Überexpression von PPOX in der *gsEMS*-Linie 5.C und 12.H, da dann der Kurztagphänotyp wieder hervorgerufen werden sollte, wenn eine Mutation im *PPOX* Gen für die Rettung des Phänotyps verantwortlich ist.

## 6 Zusammenfassung

GABA ist ein inhibierender Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren. In Pflanzen ist die Rolle von GABA noch immer weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des GABA-Stoffwechselwegs bei Pflanzen und insbesondere in *Arabidopsis* weiter analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutante *gs* unter Kurztagbedingungen einen aberranten Phänotyp aufweist. Zusätzlich konnte eine bis jetzt unbekannt Substanz entdeckt werden, die in der Doppelmutante akkumuliert, deren Identität bis jetzt nicht bekannt ist. Möglicherweise wird der Phänotyp der *gs* Doppelmutante durch ein unter Kurztagbedingungen hochreguliertes Gen hervorgerufen. Dieses Gen könnte für eine Aminotransferase codieren. Bei einem hohen Gehalt an GABA könnte der  $K_m$ -Wert des Enzyms für GABA erreicht werden und dieses zu SSA umsetzen, was in der Doppelmutante anstauen und den Phänotyp hervorrufen könnte. Mögliche Kandidaten wie die OAT oder BCAT-2 konnten ausgeschlossen werden, da die Dreifachmutanten keine Rettung des Kurztagphänotyps zeigten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass SSA in der Doppelmutante *gs* anstaut und für den Phänotyp verantwortlich ist. Die Überexpression von UGA2 (SSADH) in der *gs* Doppelmutante zeigte keinen Phänotyp unter Kurztagbedingungen. Demnach können geringe SSA Mengen UGA2 abgebaut werden. Ebenfalls konnte ein der Doppelmutante ähnlicher Phänotyp unter Langtagbedingungen erzeugt werden, indem UGA1 (GABA-T) in der *gs* Doppelmutante überexprimiert wurde. Hierbei wird SSA im Zytosol hergestellt und akkumuliert in diesen Pflanzen.

Mit Hilfe der EMS-Mutagenese der *gs* Doppelmutante konnte gezeigt werden, dass das Gen der NOS1/cGTPase den Kurztagphänotyp retten kann. Möglicherweise ist der geringe Chlorophyllgehalt in der *nos1/rif1-1/cgtpase* Mutante ausschlaggebend für die Rettung der *gs* Doppelmutante, als auch der *ssadh* Mutante. Geringere Menge Glutamat in den *nos1/rif1-1/cgtpase* Mutante könnten zu einer geringen Chlorophyllbiosynthese, sowie einer geringeren Menge an GABA und SSA führen, da Glutamat durch GAD zu GABA umgesetzt wird.

Weitere *gs*EMS-Linien zeigten eine Mutation auf Chromosom 5. Ein guter Kandidat erscheint die PPOX. Dieses Enzym regeneriert PLP, welches für die Nebenreaktion der GAD, Umsetzung von Glutamat zu SSA, notwendig ist. Eine Mutation würde zu

geringen Konzentrationen an PLP führen und somit zu einer geringeren Umsetzung von Glutamat zu SSA. Ebenfalls könnte dieses Enzym aus GABA direkt SSA herstellen. Somit würde eine Mutation dazu führen, dass durch dieses Enzym unter Kurztagbedingungen und hohen Konzentrationen an GABA kein SSA hergestellt werden kann.

## 7 Abstract

GABA is an inhibiting neurotransmitter in the central nervous system of mammals. In plants the role of GABA is still mostly unknown. The aim of this work is to further analyse the role of GABA synthesis in plants and especially in Arabidopsis. We were able to show that under short day condition the double mutant *gs* displays an aberrant phenotype. Furthermore we discovered an until now unknown substrate which accumulates in the double mutant and is still unidentified. It is possible that the phenotype of the double mutant *gs* is due to a gene upregulated under short day condition. This gene could be an aminotransferase. Assumingly in case of high GABA level the  $K_m$  of this enzyme for GABA is reached and it can be converted into SSA. SSA would accumulate in the plant and cause the aberrant phenotype. Candidate aminotransferases OAT or BCAT could be excluded as there was no phenotype rescued of the triple mutants. Still we were able to show that SSA accumulates in the double mutant and is responsible for the phenotype. The overexpression of UGA2 (SSADH) did not lead to an aberration of the *gs* double mutant phenotype under short day condition. A similar phenotype was produced in case of an overexpression of UGA1 (GABA-T) in the double mutant *gs* under long day condition.

Recovering the short day phenotype was possible by mutating the gene of the NOS1/cGTPase. This was shown with the help of an EMS mutagenesis. The rescue of the *gs* double mutant as well as the *ssadh* mutant by *nos1/rif1-1/cgtpase* mutant is probably due to a low concentration of chlorophyll. The crucial factor could be glutamate. Glutamate is needed for chlorophyll biosynthesis as well as for GABA synthesis. A low concentration of glutamate may lead to a low concentration of chlorophyll and GABA which in turn would affect the level of SSA.

Other *gs*EMS mutants showed a mutation on chromosome 5. A good candidate seems to be the PPOX. This enzyme regenerates PLP which is necessary for the side reaction of the GAD, the transformation of glutamate to SSA. A mutation would lead to a lower concentration of PLP and thus a lower conversion of glutamate to SSA. This enzyme could also transform GABA directly into SSA. A mutation would thus cause an accumulation of GABA under short day condition because it can not be transformed to SSA.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -C-Atom	erster Kohlenstoff nach der höchstwertigen funktionellen Gruppe
$\mu$	Mikro-
$\frac{1}{2}$ MS	halbkonzentriertes MS-Medium
amiRNA	Artificial micro RNA
ATP	Adenosintriphosphat
BASTA	ein systemisch wirksames Herbizid auf Basis von Glufosinat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
CaM	Calmodulin
cDNA	copyDNA
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DATP	2-Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$F_2$	zweite Tochtergeneration einer Kreuzung
$\text{FAD}^+$	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
$\text{FADH}_2$	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FG	Frischgewicht
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABA-T	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Transaminase
GAD	Glutamat-Decarboxylase

## Abkürzungsverzeichnis

---

GC	Gaschromatographie
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GHB	$\gamma$ -Hydroxybutyrat
GHBDH	$\gamma$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogenphosphat
Hac	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HPLC-H <sub>2</sub> O	Hochreines Wasser
KNO <sub>3</sub>	Kaliumnitrat
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	Konzentrierte
LB	Left Border
LB	Luria/Bertani (Medium für Bakterienkultur)
M	Molar (mol/l)
m	milli-
mA	Milliampere
MES	4-Morpholinoethan-sulfonsäure
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MOPS	4-morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
n	Nano-
N	Stickstoff
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
OD	Optische Dichte (Koeffizient gibt die Wellenlänge des Lichtes an)
OH-	Hydroxyl-



## Abkürzungsverzeichnis

---

p	Piko
PAM	Puls amplituden fluorometrie
Pi	Organisches Phosphat
PCR	polymerase-chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pfu	DNA-Polymerase
RB	Right Border
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Retentiontime – Retentionszeit
RT	Reverse Transkription
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
Taq	DNA-Polymerase
TCA	Citratzyklus
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volumen
W/V	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x-Gal	5-bromo-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## 9 Literaturverzeichnis

**Akama K, et al., 2009**

Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Transgenic research **18**: 865-876.

**Arazi T, et al., 1995**

Molecular and Biochemical Analysis of Calmodulin Interactions with the Calmodulin-Binding Domain of Plant Glutamate Decarboxylase. Plant Physiol. **108**: 551-561.

**Bartsch K, et al., 1990**

Molecular analysis of two genes of the Escherichia coli gab cluster: nucleotide sequence of the glutamate:succinic semialdehyde transaminase gene (gabT) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (gabD). J Bacteriol **172**: 7035-7042.

**Baum G, et al., 1996**

Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. Embo J **15**: 2988-2996.

**Bent AF, 2000**

Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. Plant Physiol. **124**: 1540-1547.

**Bouché N, et al., 2003**

Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the Î³-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 6843-6848.

**Bouché N, et al., 2004**

GABA in plants: just a metabolite? Trends in Plant Science **9**: 110-115.

**Bouché N, et al., 2003**

GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. Trends Cell Biol **13**: 607-610.

**Breitkreuz KE, et al., 2003**

A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. J Biol Chem **278**: 41552-41556.

**Breitkreuz KE, et al., 1995**

Subcellular Compartmentation of the 4-Aminobutyrate Shunt in Protoplasts from Developing Soybean Cotyledons. Plant Physiol **108**: 99-103.

**Busch K, et al., 1999**

Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. Plant Physiol **121**: 589-597.

**Busch K, et al., 2000**

Plant succinic semialdehyde dehydrogenase: dissection of nucleotide binding by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. Biochemistry **39**: 10110-10117.

**Castanie-Cornet MP, et al., 1999**

Control of acid resistance in Escherichia coli. Journal of bacteriology **181**: 3525-3535.

**Catoni E, et al., 2003**

Identification of an Arabidopsis mitochondrial succinate–fumarate translocator. FEBS letters **534**: 87-92.

**Cholewa E, et al., 1997**

Cold-shock-stimulated  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , not by an increase in cytosolic  $\text{H}^+$ . Can. J. Bot. **75**: 375-382.

**Clark SM, et al., 2009**

Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis  $\gamma$ -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. J. Exp. Bot.: erp044.

**Clough SJ, et al., 1998**

Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J **16**: 735 - 743.

**Coleman ST, et al., 2001**

Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem **276**: 244-250.

**Crawford LA, et al., 1994**

The Synthesis of [gamma]-Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. Plant Physiol **104**: 865-871.

**De Biase D, et al., 1995**

Primary Structure and Tissue Distribution of Human 4-Aminobutyrate Aminotransferase. European Journal of Biochemistry **227**: 476-480.

**Desfeux C, et al., 2000**

Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of Agrobacterium-Mediated Transformation by the Arabidopsis Floral-Dip Method. Plant Physiol. **123**: 895-904.

**Diebold R, et al., 2002**

The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. Plant physiology **129**: 540-550.

**Drincovich MF, et al., 2001**

NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. FEBS Letters **490**: 1-6.

**Fait A, et al., 2011**

Targeted enhancement of glutamate-to-g-aminobutyrate conversion in Arabidopsis seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. Plant physiology **157**: 1026-1042.

**Fait A, et al., 2005**

GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants. FEBS Lett **579**: 415-420.

**Fiehn O, et al., 2000**

Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. Analytical Chemistry **72**: 3573-3580.

**Flores-Perez U, et al., 2008**

- A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in Arabidopsis Plastids. THE PLANT CELL ONLINE **20**: 1303-1315.
- Funck D, et al., 2008**  
Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. BMC Plant Biology **8**: 1-14.
- Gaufichon L, et al., 2013**  
Arabidopsis thaliana ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. Plant, cell & environment **36**: 328-342.
- Hearl WG, et al., 1984**  
Interactions between 4-aminobutyrate aminotransferase and succinic semialdehyde dehydrogenase, two mitochondrial enzymes. J Biol Chem **259**: 11459-11463.
- Kinnersley AM, et al., 2000**  
Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. Crit.Rev.Plant.Sci. **19**: 479-509.
- Langendorf CG, et al., 2013**  
Structural characterization of the mechanism through which human glutamic acid decarboxylase auto-activates. Bioscience reports **33**: 137-144.
- Liu H, et al., 2002**  
Functional Replacement of the Tobacco rattle virus Cysteine-rich Protein by Pathogenicity Proteins from Unrelated Plant Viruses. Virology **298**: 232-239.
- Ludewig F, et al., 2008**  
Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in arabidopsis. PLoS ONE **3**: e3383.
- MacGregor KB, et al., 2003**  
Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants deters feeding by phytophagous insect larvae. J Chem Ecol **29**: 2177-2182.
- Mekonnen D, 2012**  
Phenotypic and chemotypic characterization of GABA-shunt mutants in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation.
- Michaeli S, et al., 2011**  
A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. The Plant Journal **67**: 485-498.
- Moreau M, et al., 2008**  
AtNOS/AtNOA1 Is a Functional Arabidopsis thaliana cGTPase and Not a Nitric-oxide Synthase. Journal of Biological Chemistry **283**: 32957-32967.
- Palanivelu R, et al., 2003**  
Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell **114**: 47-59.
- Palmieri L, et al., 1997**  
Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. FEBS letters **417**: 114-118.
- Porter TG, et al., 1985**

- Transaminations catalysed by brain glutamate decarboxylase. The Biochemical journal **231**: 705-712.
- Reichel A, 2009**  
Wechselwirkung von GABA- und Primärmetabolismus: Analyse von GABA-Stoffwechsel- und Citrat- Zyklus- Mutanten in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit.
- Renault H, et al., 2010**  
The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. BMC Plant Biology.
- Roberts MR, 2007**  
Does GABA Act as a Signal in Plants?: Hints from Molecular Studies. Plant signaling & behavior **2**: 408-409.
- Romeis T, 2001**  
Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. The EMBO Journal **20**: 5556-5567.
- Sang Y, et al., 2007**  
Identification of a pyridoxine (pyridoxamine) 5-phosphate oxidase from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters **581**: 344-348.
- Sang Y, et al., 2011**  
Identification of a second pyridoxine (pyridoxamine) 5-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana*. Acta physiologiae plantarum / **33**: 559-566.
- Sanger F, et al., 1975**  
A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol **94**: 441-448.
- Schaffer R, 2001**  
Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in *Arabidopsis*. THE PLANT CELL ONLINE **13**: 113-123.
- Schardl CL, et al., 2007**  
Loline alkaloids: Currencies of mutualism. Phytochemistry **68**: 980-996.
- Schwab R, et al., 2006**  
Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell **18**: 1121-1133.
- Shelp BJ, et al., 1999**  
Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci **4**: 446-452.
- Snedden WA, et al., 1995**  
Calcium/Calmodulin Activation of Soybean Glutamate Decarboxylase. Plant Physiol. **108**: 543-549.
- Stryer L, et al., 2007.**  
Biochemie. München; [Heidelberg]: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- Studart-Guimaraes C, et al., 2007**  
Reduced Expression of Succinyl-Coenzyme A Ligase Can Be Compensated for by Up-Regulation of the {gamma}-Aminobutyrate Shunt in Illuminated Tomato Leaves. Plant Physiol. **145**: 626-639.
- Sudhamsu J, et al., 2008**  
The structure of YqeH. An AtNOS1/AtNOA1 ortholog that couples GTP hydrolysis to molecular recognition. The Journal of biological chemistry **283**: 32968-32976.
- Thordal-Christensen H, et al., 1997**

Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. The Plant Journal **11**: 1187.

**Tronconi MA, et al., 2008**

Arabidopsis NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism. Plant physiology **146**: 1540-1552.

**Van Cauwenberghe OR, et al., 2002**

Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an *Arabidopsis* cDNA and its expression in *Escherichia coli*. Can. J. Bot. **80**: 933-941.

**Van Cauwenberghe OR, et al., 1999**

Biochemical characterization of partially purified gaba:pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry **52**: 575-581.

**Van Ree K, et al., 2011**

Nitric oxide accumulation in *Arabidopsis* is independent of NOA1 in the presence of sucrose. The Plant journal : for cell and molecular biology **68**: 225-233.

**Wallace W, et al., 1984**

Rapid Accumulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid and Alanine in Soybean Leaves in Response to an Abrupt Transfer to Lower Temperature, Darkness or Mechanical Manipulation. Plant Physiol **75**: 170-175.

**Wheeler MC, et al., 2005**

A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. Plant physiology **139**: 39-51.

**Winning BM, et al., 1994**

Plant mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. cDNA cloning, deduced primary structure of the 59- and 62-kDa subunits, import, gene complexity and expression analysis. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **269**: 4780.

**Zhang JZ, et al., 1994**

Isocitrate lyase and malate synthase genes from *Brassica napus* L. are active in pollen. Plant physiology **104**: 857-864.

**Zik M, et al., 1998**

Two isoforms of glutamate decarboxylase in shape *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. Plant Molecular Biology **37**: 967-975.

## **Ich danke...**

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für die interessante Themenstellung und hervorragende Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Unterstützung in den letzten Jahren,

Herrn Prof. Dr. M. Bucher für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens,

Frau Prof. Dr. K. Schnetz für ihren Vorsitz bei der mündlichen Prüfung,

Herrn Dr. Frank Ludewig für die jederzeit geduldige Begleitung, Beratung und die außerordentliche Betreuung nicht nur während dieser Arbeit,

Frau Dr. Katja Ludewig für ihre Hilfe bei den Aufnahmen der Fluoreszenzbilder,

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Flügge für die freundliche Zusammenarbeit, sowie die Unterstützung und Hilfsbereitschaft vor und besonders während meiner Schwangerschaft,

Meinen studentischen Hilfskräften Andrea Pütz und Esther Engelhardt, die mir immer fleißig zur Seite standen,

Meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, obwohl einige bis heute nicht wissen, was ich genau mache,

Pia Staehr, Iris Zahalka und meiner Schwester Katja fürs Korrekturlesen,

Meiner Familie, die mir immer zur Seite gestanden hat und mich während der ganzen Zeit unterstützt hat,

Meinem Freund Johannes für seine Geduld die er immer wieder aufgebracht hat mir bei allem zur Hand zu gehen, sowie unserem ungeborenen Kind für die noch ruhige Begleitung und ohne das es sicherlich noch kein Ende gegeben hätte.

## **Erklärung**

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

Annemarie Reichel