

**Die Funktion der Glukose 6-Phosphat/Phosphat  
Translokatoren während der Pflanzenentwicklung  
insbesondere im Hinblick auf die Gametogenese**

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

**vorgelegt von**

**Patrycja Niewiadomski  
aus Piekary Sl  
(Polen)**

**Mai 2005**

**Berichtersteller:**

**Prof. Dr. U.-I. Flügge  
Prof. Dr. M. Hülskamp**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**12.07.2005**

**Wissenschaft bedeutet nicht mehrfach wiederholte Laborexperimente von Leuten im weißen Kittel, sondern kommt von Wissen.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Plastidäre Phosphattranslokatoren .....	1
1.2.	Metabolismus in heterotrophen Plastiden .....	6
1.3.	Der Glukose 6-phosphat/Phosphat Translokator aus <i>Arabidopsis</i> (AtGPT).....	10
1.4.	Die Plastidäre Phosphoglukose Isomerase aus <i>Arabidopsis</i> (AtPGI1).....	12
1.5.	Die Phosphoglukonat Dehydrogenasen aus <i>Arabidopsis</i> (At6PGDH) .....	14
1.6.	Pflanzenentwicklung in <i>Arabidopsis</i> .....	15
1.6.1.	Mikrogametogenese .....	15
1.6.2.	Megagametogenese.....	18
1.6.3.	Embryogenese in <i>Arabidopsis</i> .....	20
1.6.4.	Samenruhe und Keimung.....	21
1.7.	Zielsetzung der Arbeit.....	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1.	<b>Material</b> .....	<b>24</b>
2.1.1.	Bezugsquellen der Chemikalien und Geräte .....	24
2.1.2.	Kommerzielle Kits.....	24
2.1.3.	Bakterienstämme .....	25
2.1.3.1.	Escherichia coli .....	25
2.1.3.2.	Agrobacterium tumefaciens .....	26
2.1.4.	Vektoren .....	26
2.2.	<b>Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.2.1.	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
2.2.1.1.	Pflanzenmaterial .....	27
2.2.1.2.	Anzucht von <i>Arabidopsis</i> auf Erde .....	28
2.2.1.3.	Schädlingsbekämpfung.....	29
2.2.1.4.	Anzucht von <i>Arabidopsis</i> auf Agar .....	29
2.2.1.5.	Sterilisieren von <i>Arabidopsis</i> Samen.....	31
2.2.1.5.1.	Flüssige Oberflächensterilisation von Samen.....	31
2.2.1.5.2.	Trockene Oberflächensterilisation von Samen .....	31
2.2.1.6.	Probennahme .....	31
2.2.1.7.	Genetische Analyse von gpt1-1 und gpt1-2 .....	32
2.2.1.8.	Genetische Komplementation .....	32
2.2.1.8.1.	Durchmusterung einer genomischer Bank .....	32
2.2.1.8.2.	Herstellung der Komplementationslinie gpt1-2gGPT1 .....	36
2.2.1.8.3.	Herstellung der Komplementationslinie pgi1-2gPGI1 .....	36

2.2.1.9.	Phänotypische Analyse.....	37
2.2.1.9.1.	Alexander's Färbung .....	37
2.2.1.9.2.	DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) Färbung .....	38
2.2.1.9.3.	„whole mount“ Präparation von Samenanlagen .....	38
2.2.1.9.4.	Samenentwicklung .....	39
2.2.2.	Arbeiten mit Bakterienstämmen .....	39
2.2.2.1.	Wachstumsmedien.....	39
2.2.2.2.	Lagerung und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	40
2.2.2.3.	Herstellung von TSS- kompetenten Zellen.....	41
2.2.2.4.	Transformation von TSS-kompetenten Bakterien .....	42
2.2.2.5.	Herstellung von elektrokompenten Agrobakterien .....	42
2.2.2.6.	Transformation elektrokompenter Agrobakterien .....	43
2.2.3.	Extraktion und Präparation von DNA.....	44
2.2.3.1.	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien .....	44
2.2.4.	Präparation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
2.2.4.1.	Präparation genomischer Pflanzen-DNA nach der CTAB-Methoden 46	
2.2.4.2.	Schnellpräparation .....	47
2.2.4.3.	Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	48
2.2.4.4.	Agarose-Gelelektrophorese .....	49
2.2.4.5.	Elution von DNA-Fragmenten .....	50
2.2.4.6.	Quantifizierung und Lagerung .....	51
2.2.4.7.	Kapillartransfer von DNA auf Nylonmembran (Southern Blot) .....	52
2.2.4.8.	Blotten mit alkalischem Puffer .....	52
2.2.4.9.	Blotten mit Hochsalzpuffer .....	53
2.2.4.10.	Hybridisierung .....	54
2.2.5.	Enzymatische Modifikation von DNA.....	55
2.2.5.1.	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	55
2.2.5.2.	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen an DNA-Enden .....	56
2.2.5.3.	Phosphorylierung von PCR-Produkten .....	56
2.2.5.4.	Erzeugung glatter DNA-Enden durch Fill in .....	56
2.2.5.5.	Ligation von DNA-Enden.....	57
2.2.5.6.	Gateway® Klonierung .....	57
2.2.5.7.	Radioaktive Markierung von DNA .....	58
2.2.6.	PCR.....	60
2.2.7.	DNA-Sequenzierung .....	60
2.2.8.	Extraktion und Präparation von RNA.....	61
2.2.8.1.	RNA-Isolierung mit Trizol .....	61
2.2.8.2.	Quantifizierung und Lagerung von RNA.....	62
2.2.8.3.	Agarose-Gelelektrophorese von RNA .....	62
2.2.8.3.1.	Zur Kontrolle der RNA-Qualität.....	62
2.2.8.3.2.	Für Northern Blot .....	63
2.2.8.4.	Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran .....	63
2.2.8.5.	Northern-Hybridisierung .....	64
2.2.9.	RT-PCR.....	65
2.2.10.	Physiologische Methoden .....	65
2.2.10.1.	Stärkefärbung .....	65
2.2.10.2.	Bestimmung von Stärke und löslichen Zuckern .....	66

2.2.10.3.	Bestimmung von PGI-Aktivitäten in Arabidopsis Extrakten .....	67
2.2.11.	Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie .....	68
2.2.12.	Transformation von Protoplasten .....	69
2.2.12.1.	Anzucht einer Tabak-BY2-Zellsuspension .....	69
2.2.12.2.	Protoplastierung einer Tabak-BY2 Zellsuspension .....	69
2.2.12.3.	PEG-vermittelte Transfektion von BY2-Tabakprotoplasten .....	70
2.2.13.	Mikroskopie und Dokumentation .....	74
2.2.14.	Internetadressen .....	75
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1.</b>	<b>Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien, die im Glukose 6-Phosphat/Phosphat Transporter defekt sind .....</b>	<b>76</b>
3.1.1.	Isolierung von insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien am <i>AtGPT1</i> Locus .....	76
3.1.2.	Molekularbiologische und genetische Charakterisierung der heterozygoten Linien <i>GPT1/gpt1-1</i> und <i>GPT1/gpt1-2</i> .....	78
3.1.3.	Charakterisierung der Auswirkung des Defektes in <i>AtGPT1</i> auf die Megagametogenese .....	80
3.1.4.	Charakterisierung der Auswirkung des Defektes in <i>AtGPT1</i> auf die Mikrogametogenese .....	83
3.1.5.	Embryonale Entwicklung in den <i>gpt1</i> Mutanten .....	90
3.1.6.	Genetische Komplementation von <i>GPT1/gp1-2</i> .....	91
3.1.7.	Charakterisierung der insertionsmutagenisierten <i>gpt2-1</i> Pflanzenlinie .....	93
3.1.8.	Physiologische Charakterisierung von <i>gpt1-3</i> .....	95
3.1.9.	Herstellung chimärer Konstrukte für die Komplementation von heterozygoten <i>gpt1</i> Allelen .....	97
<b>3.2.</b>	<b>Charakterisierung von insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien, die in der plastidärer Phosphoglukose Isomerase (<i>AtPGI1</i>) defekt sind .....</b>	<b>99</b>
3.2.1.	Expressionsmuster des <i>AtPGI1</i> -Gens .....	99
3.2.2.	Isolierung und Charakterisierung der <i>pgi1-2</i> Mutantenlinie .....	101
3.2.3.	Phänotyp und genetische Komplementation .....	103
3.2.4.	Keimungsverhalten von <i>pgi1-2</i> .....	107
3.2.5.	Physiologische Charakterisierung von <i>pgi1-2</i> .....	109
<b>3.3.</b>	<b>Charakterisierung der Gene für 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>114</b>
3.3.1.	Expression der <i>6PGDH</i> Gene .....	116
3.3.2.	Lokalisierung der <i>6PGDH</i> Gene .....	118
3.3.3.	Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien .....	120
3.3.3.1.	At6PGDH1 (At1g64190) .....	120
3.3.3.2.	At6PGDH2 (At3g02360) .....	122
3.3.3.3.	At6PGDH3 (At5g41670) .....	125

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>126</b>
4.1.	AtGPT1 ist wesentlich für eine normale Mikrogametogenese .....	126
4.2.	Die Rolle von AtGPT1 während der Megagametogenese .....	134
4.3.	Die Funktion von GPT im diploiden Sporophyten .....	136
4.3.1.	Die Funktion von GPT1 während der Samenentwicklung .....	136
4.3.2.	Die Funktion von GPT1 in Blättern .....	138
4.4.	Die Bedeutung des OPPPs während der Pflanzenentwicklung .....	141
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>150</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>152</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>169</b>
8.1.	Primer Sequenzen verwendeter Oligonukleotide .....	169
8.2.	Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte .....	174
8.2.1.	Chimäre Konstrukte.....	174
8.2.2.	EtOH induzierbares System .....	176
8.3.	Zusammenfassung der Klonierungsschritte .....	177

# 1. Einleitung

## 1.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren

Plastiden, die typischen Organellen in pflanzlichen Zellen, sind das biosynthetische Kraftwerk der Pflanze. In Blättern sind sie für die reduktive Assimilierung von CO<sub>2</sub> zuständig, für welche die Energie aus der Photosynthese verwendet wird. Außerdem sind alle Plastiden dazu befähigt, anorganischen Stickstoff und Schwefel zu assimilieren, Aminosäuren, Fettsäuren und Stärke zu synthetisieren, sowie Sekundärmetabolite und Pigmente zu produzieren. Nach der Endosymbiontentheorie stammen die Plastiden von einer cyanobakterienähnlichen prokaryotischen Zelle ab, welche durch Endozytose in die Urpflanzenzelle hineingelangt ist und dann eine stabile endosymbiontische Beziehung eingegangen ist (Schimper, 1883; McFadden, 1999). Die Einverleibung der Plastiden resultierte in einer doppelten Hüllmembran, welche sie umgibt und eine physiologische Barriere zwischen dem Metabolismus des Symbionten und der Wirtszelle darstellt. Um diese beiden Metabolismen zu verknüpfen, wurden Transportproteine in die Hüllmembranen inseriert. Diese haben die Funktion, den Austausch von Metaboliten zwischen den Symbionten und der Wirtszelle zu gewährleisten. Außerdem fand ein reger Gentransfer zwischen den endosymbiotischen Partnern im Verlaufe der Eukaryonten-Evolution statt, wobei mehr als 95% der cyanobakteriellen Gene verloren gegangen sind oder in den Kern der Wirtszelle transferiert wurden (Martin und Herrmann, 1998; Martin et al., 1998). Diese kernkodierte plastidären Proteine evolvierten eine N-terminale Präsequenz (Transitpeptid), die sie in die Plastiden dirigiert und gelangen in die Plastiden mittels eines Proteinimport-Apparatus der äußeren und inneren plastidären Hüllmembran.

In der äußeren Hüllmembran der Plastiden wurden mehrere Porin-ähnliche Proteine identifiziert, welche eine ausgeprägte Substratspezifität besitzen und reguliert werden (Flügge, 2000; Soll et al., 2000). Zusätzlich beinhaltet die äußere Hüllmembran eine Erkennungs- und Importmaschinerie, welche die gezielte Direktion von Proteinen in die Plastiden ermöglicht.

Transportproteine in der inneren Hüllmembran sind ausführlich charakterisiert worden. Für die untersuchten Glukose- und Maltosetransportvorgänge (Schäfer

et al., 1977; Herold et al., 1981, Rost et al., 1996) in Spinatblättern wurden die entsprechenden Transporter in *Arabidopsis* kloniert und molekular charakterisiert. Glukose und Maltose sind die Produkte des Stärkeabbaus in *Arabidopsis* Chloroplasten und repräsentieren zwei parallele Wege für den Export von Stärkeabbauprodukten. Das Hauptprodukt Maltose wird durch den vor kurzen identifizierten Maltosetransporter (MEX1) aus den Chloroplasten exportiert (Niittylä et al., 2004). Die physiologische Funktion des Glukosetransporters ist der Transport von Glukose in das Cytosol (Weber et al., 2000). Dieser Transporter funktioniert als Monomer mit 12 Transmembrandomänen, ein Merkmal, das auch andere Transporter in der inneren Hüllmembran aufweisen. In diesem Zusammenhang sollten folgende Transporter erwähnt werden. Die chloroplastidäre Hüllmembran enthält zwei verschiedene Dicarboxylattransporter mit zum Teil überlappenden Substratspezifitäten, nämlich der 2-Oxoglutarat/Malattranslokator (DiT1) und der Glutamat/Malattranslokator (DiT2) (Weber und Flügge, 2002). Sie vermitteln den Import von 2-Oxoglutarat für die Glutamatsynthese und den Export von Glutamat aus den Chloroplasten (Weber et al., 1995). Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält drei Gene mit signifikanter Homologie zu dem Dicarboxylattransporter aus Spinat. Das DiT1 Homolog wird durch ein einziges Gen kodiert, wohingegen die zwei anderen Gene zu der DiT2-Untergruppe gehören (Weber und Flügge, 2002). Alle drei Gene sind in Wurzeln, Blättern und Blüten exprimiert (Renné, 2003). Die Analyse von *Arabidopsis* Mutanten in den Dicarboxylattransportern offenbarte eine essentielle Bedeutung von *AtDiT2.1* in der Photorespiration (Renné, 2003), da nur die photorespiratorische *dct* Mutante einen photorespiratorischen Phänotyp zeigte (Sommerville und Sommerville, 1985). Die *dct* Mutante ist unter ambienten CO<sub>2</sub> Bedingungen nicht lebensfähig, wächst aber unter erhöhten CO<sub>2</sub> Konzentrationen, die Photorespiration unterdrücken. Die Insertionsmutanten in *AtDiT1* und *AtDiT2.2* wiesen keinen offensichtlichen Phänotyp unter Gewächshausbedingungen (Renné, 2003). Außerdem spielen beide DiT eine wichtige Rolle in der Ammoniumassimilation während der Nitratreduktion (Woo et al., 1987). Der plastidäre ATP/ADP-Transporter tauscht cytosolisches ATP gegen stromales ADP und energetisiert so anabolische Reaktionen wie Stärke- und Fettsäurensynthese in heterotrophen Plastiden (Neuhaus et al., 1997).

*Arabidopsis* besitzt zwei Isoforme für den plastidären ATP/ADP-Transporter (AtNTT1 und AtNTT2), die ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen. AtNTT1 repräsentiert ein durch Zucker induzierbares Gen, das hauptsächlich in Stängel und Wurzeln exprimiert ist. Dagegen ist AtNTT2 in verschiedenen Geweben mit der höchsten Akkumulierung in sich entwickelnden Wurzeln und jungen Keimblättern exprimiert. Das Fehlen eines funktionellen AtNTT1 Gens hatte kaum eine Auswirkung auf die Pflanzenentwicklung, wobei Insertionsmutanten in AtNTT2 ein retardiertes Pflanzenwachstum zeigten. Hauptsächlich war die Fähigkeit beeinträchtigt, Primärwurzeln zu bilden, und es fand eine verspätete Chlorophyllakkumulierung im Keimling statt.

Für die  $P_i$ -Verteilung zwischen Chloroplasten und Cytosol ist vermutlich eine plastidäre Phosphatpermease, PHT2;1, (Daram et al., 1999; Versaw und Harrison, 2002) verantwortlich.

Außerdem ist es für die metabolische Funktionalität der Plastiden wichtig, dass der Austausch von anorganischem Phosphat gegen verschiedene phosphorylierte Metabolite kontrolliert wird. Dafür sind die Phosphattranslokatoren (pPT) der inneren Hüllmembran verantwortlich. Die Proteine dieser Gruppe funktionieren in einem Antiport-Mechanismus, das anorganische Phosphat und phosphorylierte Verbindungen gegeneinander austauscht. Unter physiologischen Bedingungen werden die Substrate im strengen 1:1 Gegentausch nach einem Ping-Pong-Mechanismus befördert (Flügge, 1992), d.h. das erste Substrat wird über die Membran transportiert, bevor das zweite Substrat gebunden und transportiert wird. Im funktionellen Zustand liegen die Phosphattranslokatoren als Homodimere vor (Wagner et al., 1989). Insoweit unterscheiden sie sich von den anderen Transportern, die als Monomere mit 12 Transmembrandomänen funktionieren.

Die pPT Proteine können aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Unterfamilien eingeteilt werden. Die Mitglieder der verschiedenen Unterfamilien besitzen eine Aminosäuren-Identität von 75-85 % innerhalb einer Klasse, während die Homologie zwischen den einzelnen Klassen 30-40 % beträgt (Kammerer et al., 1998; Eicks et al., 2002; Knappe et al., 2003). Für die pPT werden sechs bis acht Transmembrandomänen vorhergesagt (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; Schwacke et al., 2003).

Alle Phosphattranslokatoren sind kernkodierte Proteine mit einer N-terminalen Transitsequenz für Plastiden (Flügge, 1999).

Nachfolgend sollen die einzelnen plastidären Phosphattranslokatoren kurz besprochen werden:

Der Triosephosphat/Phosphat Translokator (**TPT**) wurde als erster plastidärer Phosphattranslokator molekular charakterisiert (Flügge et al., 1989). Der TPT vermittelt den Export von fixierten Kohlenhydraten in Form von Triosephosphaten (TP) und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) aus den Chloroplasten in das Cytosol (Flügge et al., 1978; Flügge et al., 1989; Flügge, 1999) und repräsentiert damit den Kohlenhydratfluss während des Tages. Im Cytosol werden Triosephosphate für die Biosynthese von Saccharose und anderer Metabolite verbraucht. Die Analyse von transgenen Pflanzen mit reduzierter TPT Aktivität zeigte, dass ein Fehlen von Triosephosphattransport durch erhöhten Stärkeumsatz und durch den Export von neutralen Zuckern aus dem Stroma kompensiert werden konnte (*Arabidopsis*: Schneider et al., 2002; Tabak: Häusler et al., 1998, 2000; Kartoffel: Heineke et al., 1994; Riesmeier et al., 1993).

Der Phosphoenolpyruvat/Phosphattranslokator (**PPT**) akzeptiert Phosphoenolpyruvat (PEP) und 2-PGA als Substrate (Fischer et al., 1997). Die physiologische Funktion des PPT liegt in der Versorgung von Plastiden mit PEP für die Fettsäuresynthese und vor allem aber für den Shikimatweg (Fischer et al., 1997), der zur Synthese von aromatischen Aminosäuren und einer großen Anzahl an Sekundärmetaboliten führt (Herrmann und Weaver, 1999). Das *Arabidopsis* Genom enthält zwei Gene für PPT, nämlich *AtPPT1* und *AtPPT2*. Die Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen beträgt nur 50%. Beide PPTs sind in den Plastiden lokalisiert und besitzen ähnliche Substratspezifitäten, jedoch sind sie in verschiedenen Geweben exprimiert. *AtPPT1* ist in den Leitgeweben von Blättern und Wurzeln exprimiert. Innerhalb der Blüte wurde die Expression von *AtPPT1* in Kelch- und Kronenblättern sowie Fruchtknoten, Antheren und sich entwickelnden Samen detektiert. Dagegen ist *AtPPT2* ubiquitär in den Blättern während aller Entwicklungsphasen und in einigen Blütengeweben exprimiert. In Wurzeln und sich entwickelnden Samen konnte keine Expression von *AtPPT2*

beobachtet werden (Knappe et al., 2003). Die *Arabidopsis cue1*-Mutante ist in *AtPPT1* defekt und weist einen retikulierten Blattphänotyp auf. Dieser ist mit einer verzögerten Entwicklung von Chloroplasten und einer veränderten Form von Palisadenparenchymzellen kombiniert. Außerdem ist *cue1* nicht in der Lage, Anthocyane als Produkte des Sekundärmetabolismus zu synthetisieren (Streatfield et al., 1999; Voll et al., 2003).

Der Glukose 6-phosphat/Phosphattranslokator (**GPT**) repräsentiert die dritte Unterfamilie der pPTs und wird in einem späteren Abschnitt detailliert besprochen.

Der Xylulose 5-phosphat/Phosphattranslokator (**XPT**) wurde als letzter isolierter Phosphattranslokator durch Eicks et al. (2002) charakterisiert. Dieses Protein zeigt eine 50%ige Ähnlichkeit zum GPT auf Aminosäureebene und ähnliche Substratspezifitäten wie der GPT mit dem Unterschied, dass der XPT Xylulose 5-phosphate (Xu5P) und nicht Glk6P unter physiologischen Bedingungen transportiert. Als Funktion für den XPT ist postuliert worden, dass das Protein cytosolische Kohlenstoffgerüste in Form von Pentosephosphaten dem plastidären oxidativen Pentosephosphatweg zu Verfügung stellt, vor allem unter der Bedingung eines erhöhten Bedarfs für die Intermediate dieses Zyklus. Die Analyse der *Arabidopsis knock-out*-Mutante des Translokators *xpt-1* zeigte keine wesentlichen Einschränkungen der pflanzlichen Funktionen (Eicks, 2004).

Die Analyse des *Arabidopsis* Genoms (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) offenbarte den gesamten Satz an Genen für plastidäre Phosphattranslokatoren. Zusätzlich zu den schon beschriebenen Genen für *AtTPT*, *AtPPT1*, *AtPPT2*, *AtXPT* und den später erwähnten *AtGPT1* und *AtGPT2* wurden weitere zehn Gene als pPTs identifiziert. Dabei handelte es sich um sechs Pseudogene für *AtGPT* und vier Pseudogene für *AtPPT* (Knappe et al., 2003). Außerdem wurden verschiedene PT-homologe (PTh) Gene in *Arabidopsis* und anderen Organismen bestimmt. Diese gehören zur DMT (*Drug/Metabolite Transporter*) Superfamilie (Jack et al., 2001) mit signifikanten Ähnlichkeiten zur NST-Genfamilie (*Nucleotide Sugar Transporter*). Wie auch die pPT besitzen PTh und NST Proteine sechs bis acht Membranspannen und weisen eine gemeinsame

Substratbindestelle mit zwei konservierten Lys-Resten auf (Knappe et al., 2003; Abeijon et al., 1997; Kawakita et al., 1998).

## 1.2. Metabolismus in heterotrophen Plastiden

Während der Pflanzenentwicklung, sowie auch innerhalb einer Pflanze, gibt es verschiedene Plastidentypen, die alle aus den undifferenzierten Proplastiden meristematischer Gewebe hervorgehen und zum Teil ineinander umwandelbar sind. Die bekanntesten Plastiden sind die Chloroplasten grüner Gewebe. Diese enthalten Chlorophyll und sind der Ort der Photosynthese. Weitere wichtige Plastiden sind die Leukoplasten. Sie dienen der Stoffspeicherung in nicht grünen Geweben wie Wurzeln, Knollen oder Samenkörnern und umfassen eine Vielfalt von ausdifferenzierten, ungefärbten Plastiden. Man unterscheidet stärke-speichernde Amyloplasten, ölspeichernde Elaioplasten und proteinspeichernde Proteinoplasten. Für die Farbgebung von Früchten und Blüten sind oft Chromoplasten verantwortlich, die durch ihren Gehalt an Carotinoiden rot, orange oder gelb gefärbt sind. Im Dunkeln gewachsene Blätter enthalten Etioplasten. Es handelt sich um eine Zwischenstufe der Chloroplastenentwicklung, da sie viele, aber nicht alle Chloroplastenproteine enthalten.

Diese Plastidentypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Pigmentzusammensetzung, sondern auch in ihrem Metabolismus. Chloroplasten sind, bioenergetisch gesehen, autonom. Sie erbringen die photochemische Energie für die Herstellung von Reduktionsäquivalenten und ATP während des Tages, um Kohlenstoff zu fixieren und Stärke zu synthetisieren. Während der Nacht wird die Stärke abgebaut. Dagegen ist der Metabolismus in nicht-photosynthetischen Plastiden von der Versorgung mit Metaboliten und Energie aus dem Cytosol abhängig. Die heterotrophen Plastiden weisen den kompletten oder teilweisen Satz an Enzymen der Glykolyse und des oxidativen Pentosephosphatweges (OPPP) auf (Dennis and Miernyk, 1982). Diese Stoffwechselwege spielen eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von ATP, Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffgerüsten für anabolische Prozesse, wie Stärkesynthese und Fettsäuresynthese.

Der oxidative Pentosephosphatweg (**OPPP**) kann in zwei Abschnitte unterteilt werden, nämlich den irreversiblen oxidativen und reversiblen nicht-oxidativen

Teil. Der oxidative Teil des OPPP, bestehend aus zwei NADPH-produzierenden Reaktionen, liefert Reduktionsäquivalente für biosynthetische Prozesse, wie Fettsäuresynthese, Assimilation von anorganischem Stickstoff und die Aufrechterhaltung des Redoxpotentials als Schutz gegen oxidativen Stress. Die entsprechenden Enzyme Glukose 6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) und 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (6PGDH) wurden jeweils aus dem Cytosol und aus den Plastiden von verschiedenen photosynthetischen wie auch nicht-photosynthetischen Geweben isoliert (Graeve et al., 1994; Knight et al., 2001; Wakao und Benning, 2005). Folglich kann man annehmen, dass die cytosolische und plastidäre Lokalisierung des oxidativen Abschnitts des OPPP ubiquitär innerhalb der Pflanzen ist. Der reversible nicht-oxidative Teil dieses Zyklus bildet die Quelle an Kohlenstoffgerüsten für die Synthese von Nukleotiden, aromatischen Aminosäure und sekundären Metaboliten wie Phenylpropanoide (Kruger und von Schaewen, 2003). Im Gegensatz zu dem oxidativen Teil scheint die Kompartimentierung dieses Abschnitts nicht geregelt. Die Ausstattung des Cytosols und der Plastiden mit den Enzymen des nicht oxidativen Teils von OPPP kann zwischen Spezien, Geweben, Entwicklungsphasen variieren (Kruger und von Schaewen, 2003). Es gibt widersprüchliche Berichte über die Lokalisierung der Enzyme des nicht oxidativen Teils von OPPP. Schnarrenberger et al. (1995) schlagen vor, dass diese Reaktionen nur auf Plastiden beschränkt sind. Dagegen wurde die cytosolische Aktivität einiger oder aller an diesem OPPP-Abschnitt beteiligten Enzyme in Endosperm von Rizinussamen (Nishimura und Beevers, 1979), in Wurzeln von Sojabohnen (Hong und Copeland, 1990) und in Blumenkohlröschen (Journet und Douce, 1985) beobachtet. Die Verfügbarkeit an vollständig sequenzierten Genomen könnte eine Klärung dieses Sachverhalts erleichtern, indem das metabolische Potential innerhalb eines Genoms analysiert wird. Als Beispiel soll *Arabidopsis thaliana* vorgestellt werden. Im Genom von *Arabidopsis* konnten mehrere mögliche Gene für die Enzyme des OPPPs identifiziert werden (Arabidopsis Genome Initiative, 2001). Auffällig ist die Vervielfachung der Gene, die die Enzyme des OPPPs kodieren. So wurden z.B. sechs Gene für G6PDH identifiziert (Kruger und von Schaewen, 2003; Wakao und Benning, 2005). Die Proteinlokalisierung der OPPP Enzyme wurde mit Hilfe von Vorhersageprogrammen analysiert und ergab, dass im

Cytosol von *Arabidopsis* der OPPP bis zur Stufe der Pentosephosphate Ru5P, Rib5P und Xu5P ablaufen kann, aber die weitere Umgestaltung der Kohlenstoffgerüste zur Regenerierung von Fruktose 6-Phosphat und Triosephosphaten innerhalb der Plastiden stattfinden muss (Kruger und von Schaewen, 2003).

OPPP und Glykolyse sind an der Bildung von Hexosephosphaten beteiligt, die aber in heterotrophen Plastiden nicht synthetisiert werden können, da ihnen die Aktivität von Fruktose 1,6-bisphosphat Phosphatase (FBPase) fehlt (Entwistle und ap Rees, 1990). Dieses Enzym ist für die Umwandlung von Triosephosphaten in Hexosephosphate erforderlich, und das Fehlen dieses Enzyms hat zu Folge, dass nicht-grüne Plastiden auf die Zufuhr von Hexosephosphaten angewiesen sind.

Untersuchungen in verschiedenen Pflanzenspezies zeigten, dass heterotrophe Plastiden verschiedene Hexosephosphate als Vorstufen für **Stärkesynthese** importieren können. Widersprüchliche Ergebnisse wurden in Hinblick auf den Glk1P Transport von nicht grünen Plastiden veröffentlicht (Büker et al., 1998; Naeem et al., 1997; Wischmann et al., 1999), die andeuteten, dass Glk1P ausschließlich in die nicht grünen Plastiden transportiert wird oder zusätzlich zu Glukose 6-phosphat (Glk6P). Überzeugenden Hinweis lieferten Untersuchungen mit Amyloplasten aus Weizenendosperm, die Glk1P an Stelle von Glk6P transportierten (Tetlow et al., 1996). Jedoch ist die molekulare Natur dieses Transporters unbekannt. In den stärkefreien Mutanten aus Erbse (Harrison et al., 2000), Tabak (Hanson und Mchlae, 1988) und *Arabidopsis* (Casper et al., 1986), die in der plastidären Phosphoglukomutase (PGM) defekte sind, konnte Glk6P als Vorstufe für die Stärkesynthese in nicht grünen Plastiden gezeigt werden. Im Falle eines Glk1P Transports in diesen Pflanzen, könnte die PGM Aktivität umgangen werden und eine Stärkesynthese stattfinden. Tatsächlich wurde ein Glk6P/P<sub>i</sub> Transporter in *Arabidopsis*, Maizendosperm, Erbsenwurzel und Kartoffelknollen isoliert und kloniert (Kammerer et al., 1998). Das Endosperm in Gräsern (z.B. Gerste, Mais) zeichnet sich durch eine hohe cytosolische, aber niedrige plastidäre ATP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase) Aktivität aus (Beckles et al., 2001). Die AGPase katalysiert im Rahmen der Stärkesynthese die Bildung von ADP-Glukose (ADP-Glk) aus ATP und Glk1P. Eine cytosolische Aktivität dieses

Enzyms in heterotrophen Geweben impliziert einen ADP-Glk Transport in die Plastiden dieser Gewebe. Für Endosperm-Amyloplasten aus Mais wurde die Aufnahme von ADP-Glk als Vorstufe für die Stärkebiosynthese nachgewiesen (Möhlmann et al., 1997) und das Brittle 1 Protein als ADP-Glk Transporter identifiziert (Shannon et al., 1998).

Chloroplasten und heterotrophe Plastiden sind die Hauptorte der **Fettsäuresynthese** in pflanzlichen Zellen. Insbesondere wurden hohe Umsätze der Fettsäuresynthese in Leukoplasten von Öl-speichernden Samen beobachtet. Alle Kohlenstoffatome, die in Fettsäuren gefunden worden sind, stammen von Acetyl-CoA ab. Dieser Metabolit kann die plastidäre Membran nicht passieren und muss deshalb innerhalb der Plastiden synthetisiert werden. Verschiedene Intermediate (Pyruvat, Citrat, Acetat) können in die Plastiden transportiert werden und in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Dies ist vom Entwicklungsstadium wie auch von der Pflanzenart abhängig (Ohlrogge und Browse, 1995). Pyruvat kann die Hüllmembran mittels Diffusion durchqueren (Eastmond et al., 1997) oder wird durch einen noch nicht bekannten Translokator transportiert. Dagegen wird Malat wahrscheinlich durch einen Malat-Phosphat-Antiporter befördert (Eastmond et al., 1997). Jedoch ist dieser Transporter noch nicht isolierte worden. In Mitochondrien wird Citrat durch die Fusion von Oxalacetat und Acetyl-CoA synthetisiert und durch einen mitochondrialen Tricarboxylat-Carrier in das Cytosol exportiert. Anschließend könnte das nun cytosolische Citrat von den Plastiden aufgenommen werden. Allerdings wurde der Transport von Citrat über die plastidären Membrane bis jetzt nicht charakterisiert. Die phosphorylierten Intermediate der Glykolyse können mittels zweier Transporter transloziert werden, welche der Familie der plastidären Phosphattranslokatoren angehören. PPT versorgt die Plastiden mit PEP, welches in die Fettsäuresynthese und in den Shikimatweg einfließen kann. Die Aufnahme von Glk6P wird durch den GPT vermittelt. Im Stroma kann Glk6P durch glykolytische Reaktionen zu Pyruvat umgewandelt werden. Außerdem kann Glk6P in den OPPP für die Produktion von Reduktionsäquivalenten einfließen. Diese Reduktionsäquivalente sind für Reduktionsschritte während der Fettsäuresynthese essentiell. Zwei Untereinheiten des Fettsäuresynthase-Komplexes, 3-Ketoacyl Reduktase und Enoyl-ACP Reduktase, katalysieren die Reduktion von 3-Ketoacyl-ACP zu Acyl-

ACP und verbrauchen NADPH. Der Fettsäuresynthase-Komplex synthetisiert gesättigte 16:0 und 18:0 Fettsäuren, welche für die Herstellung von verschiedenen Glycerolipiden wie Phospholipiden und Triacylglycerol, dienen (Ohlrogge und Browse, 1995).

Chemische Energie wird in Form von ATP mittels ATP/ADP Translokator in die Plastiden importiert (Neuhaus et al., 1997).

### 1.3. Der Glukose 6-phosphat/Phosphat Translokator aus *Arabidopsis* (AtGPT)

Der GPT repräsentiert die dritte Unterfamilie der plastidären Phosphattranslokatoren und wurde zuerst aus plastidären Hüllmembranen von *Maisendosperm* isoliert (Kammerer et al., 1998). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden die entsprechenden cDNAs aus verschiedenen Pflanzen (Erbsen, Kartoffel, *Arabidopsis*) kloniert und die Transporteigenschaften von GPT Proteinen aus Erbsenwurzel (PsGPT) und *Arabidopsis* (AtGPT) bestimmt. Das heterolog exprimierte und gereinigte PsGPT akzeptiert Glk6P und TrioseP als austauschbares Substrat für Pi. Als ein weiteres Substrat für GPT unter physiologischen Bedingungen wurde 3-PGA ermittelt, das eine geringere Affinität als Glk6P und TrioseP zu GPT aufweist. Andere Hexosephosphate wie Glk1P und Frk6pP werden so gut wie nicht transportiert (Kammerer et al., 1998). Außerdem wurden Pentosephosphate wie Xu5P und Ru5P als weitere mögliche Substrate bestimmt (Eicks et al., 2002).

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält zwei Gene für den GPT, nämlich *AtGPT1* und *AtGPT2*, die eine 74%ige Identität auf Aminosäure-Ebene aufweisen. Beide Translokatoren aus *Arabidopsis* können Glk6P transportieren, wie Messungen der Transporteigenschaften beider AtGPTs ergaben (Knappe, 2002). Im Allgemeinen ähnelten die Substratspezifitäten der AtGPTs denen des PsGPTs (Knappe, 2002). Um festzustellen, ob beide Transporter *in planta* funktionell sind, wurden eine *PsGPT*, *AtGPT1* und *AtGPT2* unter Kontrolle des 35S Promotors in der *pgi1-1 Arabidopsis* Mutante überexprimiert. Die *pgi1-1* Mutante, welche in der plastidären Phosphoglukose Isomerase (AtPGI1) defekt ist, zeigte eine Reduktion des Stärkegehaltes in Blättern (Yu et al., 2000). Die

ektopische Expression der GPTs aus Erbsenwurzel und aus *Arabidopsis* konnte den Niedrigstärkephänotyp von *pgi1-1* aufheben. Damit konnte gezeigt werden, dass beide *Arabidopsis* Proteine cytosolisches Glk6P in die Chloroplasten für die Stärkesynthese transportieren können (Knappe, 2002) und als funktionelle GPTs angesehen werden können.

Als Funktion für GPT wurde die Versorgung von nicht grünen Plastiden mit Hexosephosphaten für die Stärkesynthese und den OPPP postuliert (Abb. 1.1), was den biochemischen Eigenschaften des GPTs entspricht (Kammerer et al., 1998). Weiterhin wurden GPT-spezifische Transkripte hauptsächlich im heterotrophen Gewebe (z.B. Kartoffelknolle, Erbsenwurzel und Maiskörner) detektiert (Kammerer et al., 1998).

Die GPTs aus *Arabidopsis* zeigten unterschiedliche Expressionsmuster. *AtGPT1* ist in allen Pflanzenorganen exprimiert (z.B. in Samen, Blüten, Blättern und Wurzeln). Grundsätzlich ist *AtGPT2* in geringerer Menge als *AtGPT1* exprimiert und die Expression auf wenige Gewebe beschränkt. Jedoch wurden hohe Expressionswerte für *AtGPT2* in Kelchblättern und seneszenten Blättern detektiert (Knappe, 2002). Die *AtGPT1* Expression wurde anhand eines Promotor-Reportergen Konstruktes *AtGPT1:uidA* in transformierten *Arabidopsis* Pflanzen untersucht. So konnte eine *AtGPT1:uidA* Expression in Blattmesophyll und in Schließzellen beobachtet werden. In Wurzeln war die *AtGPT1:uidA* Expression auf die Wurzelspitze und sich entwickelnde Seitenwurzeln beschränkt. Innerhalb der Blütenorgane zeigten Pollen sowie Fruchtknoten und Kelchblätter eine Blaufärbung. Während der frühen Embryogenese wurde die *AtGPT1:uidA* Expression bis zum Herz-Stadium detektiert, wobei der ganze Samen gefärbt war.

## 1.4. Die Plastidäre Phosphoglukose Isomerase aus *Arabidopsis* (*AtPGI1*)

Die Phosphoglukose Isomerase (PGI) katalysiert die reversible Isomerisierung von Fruktose 6-Phosphat (Frk6pP) und Glukose 6-Phosphat (Glk6P). Die pflanzliche Zelle besitzt zwei PGI Isozyme, die jeweils in den Plastiden und im Cytosol lokalisiert sind. Die plastidäre PGI ist für einen essentiellen Schritt in der Synthese und im Abbau von Stärke bestimmend (Abb. 1.1.), während das cytosolische Isozym an der Produktion (oder Degradierung) von löslichen Zuckern beteiligt ist. Außerdem spielt das plastidäre Isozym eine Rolle in der Regenerierung von Glk6P für den OPPP (Kruger und von Schaewen, 2003). Die plastidäre PGI Aktivität macht ca. 30% der Gesamtaktivität von PGI (cytosolisch plus plastidär) in photosynthetisch aktiven Blättern aus (Gottlieb und Higgins, 1984; Schnarrenberger und Oeser, 1974).

Yu et al. (2000) berichtete über die Isolierung einer *Arabidopsis* EMS-Mutante *pgi1-1*, welche eine Restaktivität an plastidärer PGI von 6,5% aufwies. Diese Mutante zeichnete sich durch reduzierte Stärkegehalte in Blättern und durch eine Verzögerung des Blühzeitpunkts aus. Der Phänotyp von *pgi1-1* konnte durch die ektopische Expression von GPT revidiert werden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die plastidäre PGI Reaktion durch den Import von cytosolischen Glk6P für die Stärkesynthese umgangen werden kann (Knappe, 2002).

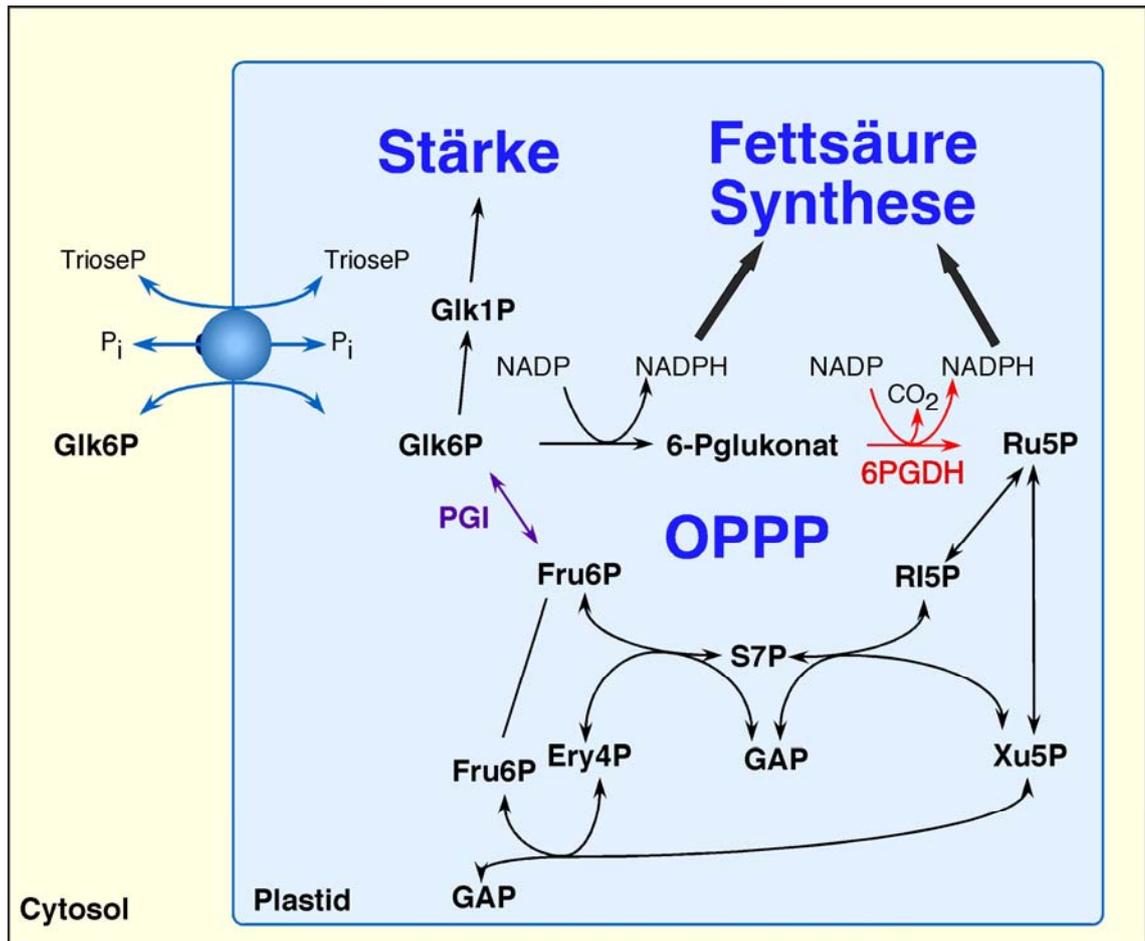


Abb.1.1. Interaktion der zu untersuchenden Genprodukte GPT, PGI1 und 6PGDH in heterotrophen Plastiden.

6-Pglukonat, 6-Phosphogluconat; Ery4P Erythrose 4-Phosphat; Frk6pP, Fruktose 6-Phosphat; GAP, Glycerinaldehyd 3-Phosphat; Glk1P, Glukose 1-Phosphat; Glk6P, Glukose 6-Phosphat; Pi, anorganischer Phosphat; Ri5P, Ribose 5-Phosphat; Ru5P, Ribulose 5-Phosphat; TrioseP, Triosephosphat; S7P, Sedoheptulose 7-Phosphat; Xu5P Xylulose 5-Phosphat

## **1.5. Die Phosphoglukonat Dehydrogenasen aus *Arabidopsis* (At6PGDH)**

Der oxidative Pentosephosphatweg (OPPP) operiert im Cytosol und in Plastiden höherer Pflanzen. Jeweils in den Plastiden und im Cytosol wird der erste Schritt durch die Glukose 6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) katalysiert, dabei wird Glk6P zu 6-Phosphoglukonat (6-PG) umgewandelt und ein Molekül NADPH hergestellt. Anschließend wird 6-PG zu Ribulose 5-Phosphat und CO<sub>2</sub> durch die 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (6PGDH) oxidativ decarboxyliert (Abb. 1.1.). Auch durch diese Reaktion wird ein Molekül NADPH freigesetzt. Beide Reaktionen sind irreversibel. Plastidäre und cytosolische Isozyme beider Dehydrogenasen wurden aus verschiedenen Pflanzen isoliert (Graeve et al., 1994; Knight et al., 2001; Wakao und Benning, 2005; Krepinsky et al., 2001; Redinbaugh und Campbell, 1998).

Das *Arabidopsis* Genom enthält drei Gene, welche für die 6PGDHs kodieren. Diese Gene zeigen eine 97%ige Ähnlichkeit auf der Nukleotid-Ebene. Sie enthalten nur ein Exon und kein Transitpeptid. Der Vergleich mit verwandten Sequenzen aus Spinat legt nahe, dass zwei Gene plastidäre Formen des Enzyms kodieren könnten (Kruger und von Schaewen, 2003). Bisher wurden keine Untersuchungen mit 6PGDH Isozymen aus *Arabidopsis* durchgeführt.

## 1.6. Pflanzenentwicklung in *Arabidopsis*

Die Pflanzen erlangten schon früh in ihrer Entwicklung einen Lebenszyklus, der zwischen einem multizellulären haploiden Organismus, dem Gametophyten, und einem multizellulären diploiden Organismus, dem Sporophyten alterniert. Gametophyten und Sporophyten unterscheiden sich in ihrer Morphologie und Funktion. Die Hauptfunktion der diploiden sporophytischen Generation ist die Produktion von haploiden Sporen. Sporen profilieren und differenzieren sich zu Gametophyten, deren Hauptfunktion in der Herstellung von haploiden Gameten liegt. Eine Fusion von Ei- und Spermazelle führt zu Bildung der Zygote, welche den Anfang der diploiden sporophytischen Generation markiert. Der Lebenszyklus wird vollendet.

Während des Lebenszyklus von Angiospermen produziert der Sporophyt zwei Sorten von Sporen, Mikrosporen und Megasporen, aus denen die männlichen und weiblichen Gametophyten entstehen. In Angiospermen entwickeln sich die Gametophyten innerhalb der sporophytischen Gewebe, welche die reproduktiven Organe der Pflanze bilden.

### 1.6.1. Mikrogametogenese

Der männliche Gametophyt oder das Pollenkorn ist ein dreizelliger Organismus, der aus einer Zellteilung hervorgegangen ist (Mascarenhas, 1989; Twell et al., 1998; McCormick, 2004). Die männliche Gametogenese beginnt mit der Teilung einer diploiden sporophytischen Zelle (Abb. 1.2.). Daraus resultieren die Ausgangszellen für das Tapetum und für die Pollenmutterzelle. Aus der Pollenmutterzelle entsteht durch Meiose eine Tetrade aus haploiden Zellen, welche von einer dicken Kalloeschicht umgeben ist (Abb. 1.2.). Diese Kalloeschicht wird durch Kallase, ein Enzym aus dem Tapetum, abgebaut und daraufhin die Mikrosporen freigelassen. Nachfolgend vergrößern sich die freien Mikrosporen und unterziehen sich einer asymmetrischen mitotischen Teilung, die zu einem Pollenkorn mit zwei unterschiedlich großen Zellen führt (Abb. 1.2.). Die größere Zelle, vegetative Zelle genannt, teilt sich nicht weiter und dient als Kraftwerk für die weitere Entwicklung des Pollenkorns und das

Wachstum des Pollenschlauchs. Hingegen ist die kleinere generative Zelle im Cytoplasma der vegetativen Zelle eingeschlossen. Sie teilt sich noch ein weiteres Mal mitotisch (die zweite Pollenmitose) und bildet so die zwei Spermazellen (Abb. 1.2.). Der Zeitpunkt dieser zweiten Mitose variiert zwischen den Pflanzenarten. In den meisten Pflanzenspezies findet sie während des Pollenschlauchwachstums statt. Bei Gräsern und Kreuzblütlern teilt sich die generative Zelle noch innerhalb der Anthere, und das Pollenkorn wird als ein dreizelliger Organismus aus den Antheren entlassen. Die reifen Pollenkörner werden in den meisten Fällen in einem teilweise dehydrierten Zustand freigesetzt. Auf der Narbe angekommen, nehmen die Pollenkörner Wasser auf, und die vegetative Zelle bildet einen Schlauch, wobei dieser sich durch Spitzenwachstum verlängert. Während der Ausdehnung des Pollenschlauchs bewegen sich der Kern der vegetativen Zelle und die zwei verknüpften Spermazellen in den Schlauch. In manchen Spezies tritt die komplette vegetative Zelle aus dem Pollenkorn aus und wandert zur Spitze des schnell wachsenden Schlauchs. Die Pollenentwicklung ist abgeschlossen, wenn die Spermazellen in den Embryosack entlassen werden.

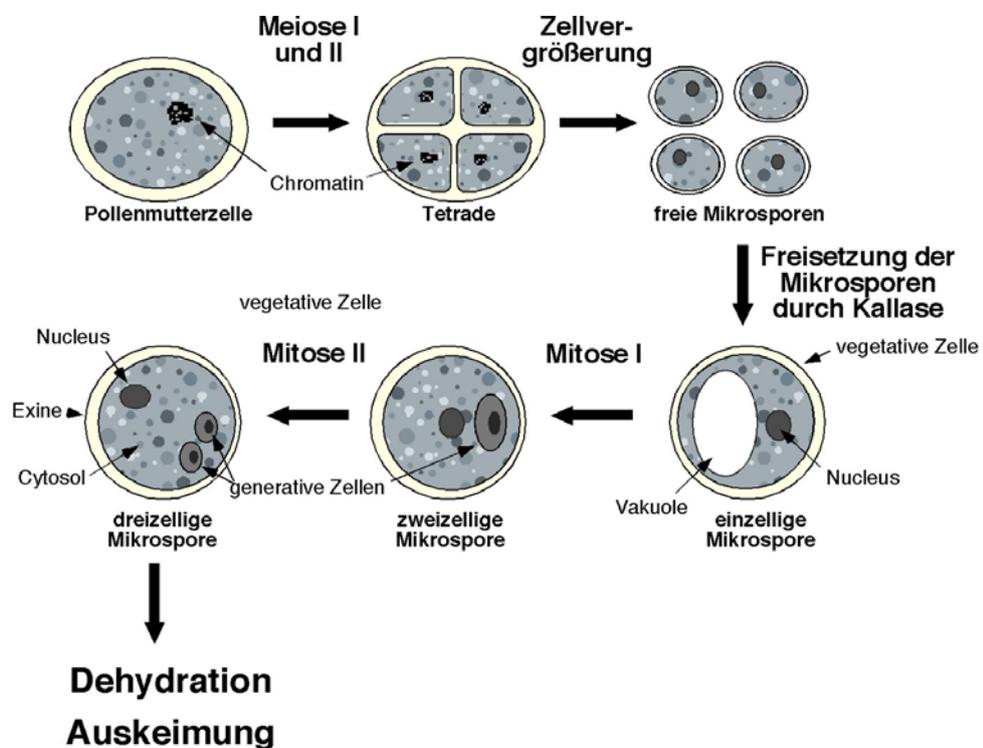


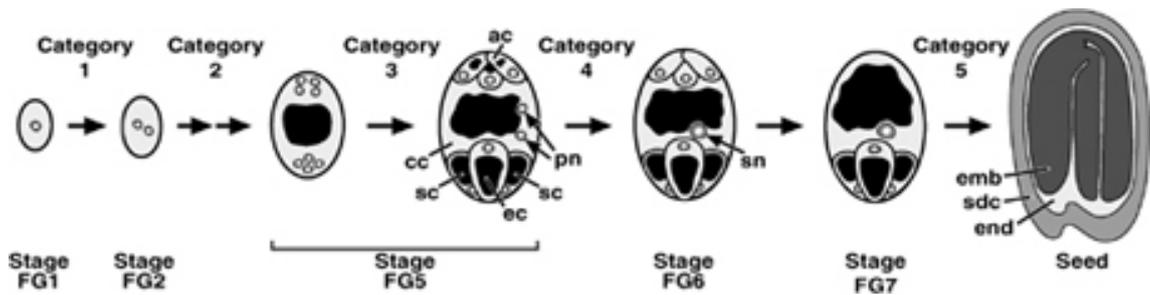
Abb.1.2. Mikrogametogenese modifiziert nach McCormick (1993).

Im Cytosol der reifen vegetativen Zelle erkennt man zusätzlich zu den Basisstrukturen wie Mitochondrien, Vakuolen, Plastiden und Nukleus ein umfangreiches intrazelluläres Membransystem, welches aus Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Membranvesikeln besteht (Piffanelli et al., 1998; Yamamoto et al., 2003). Ähnlich den Samen akkumulieren Pollenkörner häufig eine hohe Anzahl von intrazellulären Fettkörperchen in der vegetativen Zelle, die als Energiedepot für die Pollenkeimung dienen (Piffanelli et al., 1998). Dagegen enthalten die generativen Zellen nur wenige Mitochondrien, spärliches ER und kondensiertes Chromatin (Wagner et al., 1990). Diese Charakteristika suggerieren, dass die Kerne der generativen Zellen weniger transkriptionell aktiv sind als der Kern der vegetativen Zelle. Allgemein ist akzeptiert, dass Pollenkörner mRNA enthalten, die während der Pollenentwicklung synthetisiert worden sind und für die Translation während der Pollenkeimung aufbewahrt werden (Mascarenhas, 1993).

Sofort nachdem die Meiose beendet ist, wird die Pollenkornwand (Sporoderm) unter der Mitwirkung des sporophytischen und gametophytischen Genoms gebildet. Die reife Pollenkornwand ist in charakteristischer Weise geschichtet. Die innerste Sporoderm-Lage ist die Intine. Die Bildung der Intine wird durch das gametophytische Genom kontrolliert. Hemicellulosen, Cellulose oder Pektine und Kallose sind die typischen Baustoffe dieses Zellwandbereiches. Den größten Teil des Sporoderms nimmt jedoch die Exine ein, deren Bildung jedoch unter der Beteiligung vom Sporophyten stattfindet. Sie besteht aus Sporopollenin, einem hoch polymeren Material u.a. aus Lipiden und Carotinoiden, das gegen verschiedene Reagenzien, aber auch mikrobiellen Abbau resistent ist. Die Exine gliedert sich in verschiedene basale Schichtenteile. Die Bildung der Exine wird in zwei Abschnitte untergliedert und ist abhängig von der Versorgung mit Vorstufen aus dem Tapetum. Fast alle Vorstufen der Fettsäuren und Phenylpropanoide für die Exine werden im Tapetum synthetisiert. In den Zellen des Tapetums sind ein ausgeprägtes ER, Elaioplasten und Fettkörperchen erkennbar (Piffanelli et al., 1998).

### 1.6.2. Megagametogenese

Der weibliche Gametophyt in *Arabidopsis*, auch Embryosack oder Megagametophyt genannt, entwickelt sich innerhalb der Samenanlage, welche sich in den Ovarien der Fruchtblätter befindet. Die Entwicklung des Megagametophyts in *Arabidopsis* unterteilt sich in zwei Abschnitte, die als Megasporogenese und Megagametogenese bezeichnet werden (Reiser und Fischer, 1993; Drews et al., 1998; Yadegari und Drews, 2004). Während der Megasporogenese entstehen durch Meiose vier haploide Sporen aus der diploiden Megasporenmutterzelle (Abb. 1.3.). Drei der Sporen sterben durch Apoptose, so dass nur eine Spore als funktionelle Megaspore in jeder Samenanlage bestehen bleibt. Der Megasporenkern (primäre Embryosack) teilt sich innerhalb der stark wachsenden Embryosackzelle in 8 Kerne, welche an den Zellpolen zu finden sind (Abb. 1.3.). Im Verlauf der nachfolgenden Zellwandbildung migrieren zwei Kerne aus jeweils einen Embryosackende in die Mitte des weiblichen Gametophyten und fusionieren zu einem diploiden sekundären Embryosackkern in der Zentralzelle (Abb. 1.3.). In dem reifen Embryosack befindet sich am mikropylaren Ende der Samenanlage die Eizelle, von zwei Synergidzellen flankiert, während sich an dem Chalaza nahen Ende die drei Antipoden aufhalten, die sich noch vor der Befruchtung auflösen (Abb. 1.3.). Eine Fusion der Eizelle mit einem Kern der Spermazelle bildet die Zygote. Den Synergiden, welche jeweils an den Seite der Eizelle lokalisiert sind, wird eine wichtige Rolle in der Befruchtung (Russell, 1993) zugeschrieben. Vor dem Eindringen der Spermakerne in die Ei- und Zentralzelle entleert sich der Pollenschlauch in eine der Synergidzellen. In der Mitte des Embryosacks ist die Zentralzelle positioniert. Sie enthält eine große Vakuole, viele cytoplasmatische Organellen und den sekundären diploiden Embryosackkern. Während der doppelten Befruchtung fusioniert ein Spermakern mit dem Eizellenkern, das in der Zygotenbildung resultiert, und der andere Spermakern mit dem sekundären Embryosackkern und bildet einen triploiden Endospermkern. Das Endosperm versorgt den sich entwickelnden Embryo mit Nährstoffen (Lopes und Larkins, 1993). Den drei Antipoden wird keine spezifische Funktion während der Reproduktion zugeordnet. Jedoch können sie eine Rolle in der Versorgung mit Nährstoffen für den Embryosack spielen (Diboll, 1968).



**Abb.1.3. Megagametogenese entnommen aus Christensen et al. (2002).**

Die Megagametogenese wurde bereits im Text beschrieben. Christensen et al. (2002) teilte die Entwicklung der weiblichen Gameten in sieben Stadien (FG1 bis FG7) ein. Die Kategorieangaben (über den Pfeilen) beziehen sich auf Entwicklungsstadien, die in den FG Mutanten beeinträchtigt sind. In der Abbildung wird Cytoplasma in hellgrau gezeichnet, Vakuolen in schwarz gezeichnet, Kerne in dunkelgrau. Nukleoli sind durch weiße Punkte innerhalb der Kerne hervorgehoben. ac, Antipodenzellen; cc, Zentralzelle; ec, Eizelle; emb, Embryo; end, endosperm; FG, weiblicher Gametophyt; pn, Polarkern; sdc, Samenschale; sn, sekundärer Embryosackkern.

Alle Zellen des reifen Embryosacks in *Arabidopsis* weisen verschiedene Formen der strukturellen Spezialisierung aus (Mansfield et al., 1990). In den Synergidzellen wird eine große Anzahl an rER und Mitochondrien beobachtet. Die Antipoden enthalten viele Ribosomen. Um den Kern der Zentralzelle befinden sich viele Plastiden mit Stärke. Am mikropylaren Ende der Eizelle befindet sich die große Vakuole, der Kern hingegen ist am chalazalen Ende positioniert. Dadurch wird eine starke Polarisierung der Eizelle erzeugt. Diese strukturelle wie vermutlich auch funktionelle Spezialisierung steht in Beziehung zu den Aufgaben der Zellen in der frühen Gametogenese und dem Prozess der Befruchtung.

Der weibliche Gametophyt ist essentiell für viele Schritte des reproduktiven Prozesses (Yadegari und Drews, 2004). Während des Pollenschlauchwachstums beteiligt sich der weibliche Gametophyt an der Direktion des Pollenschlauchs in die Ovule (Higashiyama, 2003). Zum Zeitpunkt der Befruchtung dirigieren Komponenten des Cytoskelets innerhalb des weiblichen Gametophyten die Spermazellen zu der Eizelle und der Zentralzelle (Lord und Russell, 2002). Nach der Befruchtung wird die Initiation der Samenentwicklung durch gametophytisch exprimierte Gene kontrolliert (Chaudhury et al., 2001). Anschließend spielen gametophytisch exprimierte

Genprodukte eine Rolle in der Regulation der Entwicklung von Embryo und Endosperm (Chaudhury und Berger, 2001).

### 1.6.3. Embryogenese in *Arabidopsis*

Die Embryogenese ist ein komplexer Entwicklungsprozess, der konzeptionell in vier Phasen unterteilt werden kann. Nach der doppelten Befruchtung im Embryosack findet zuerst die frühe Morphogenese statt. Durch eine Serie von Zellteilungen, nimmt der Embryo die Basisarchitektur der Pflanze an (Phase 1). Bei der nachfolgenden Reifung des Embryos kommt es zu einer Zellexpansion und Differenzierung, die von einer Akkumulierung an Speicherstoffen begleitet wird (Goldberg et al., 1989). Diese Reifephase beinhaltet die Synthese von Proteinen und Lipiden als Speicherstoffe (Phase 2). Anschließend trocknet der Same im Verlauf der dritten Phase aus und leitet die Samenruhe ein. Bei günstigen Bedingungen kann der Same die Dormanz überwinden und auskeimen (Phase 4), dabei dienen in *Arabidopsis* die Kotyledonen als die Energiequelle (Mansfield und Briarty, 1993), dagegen in Gräsern das Endosperm.

Die embryonale Morphogenese in *Arabidopsis* zeichnet sich durch bestimmte Erscheinungsformen des Embryos aus, welche einen bestimmten Entwicklungsgrad markieren. Erst in der frühen globulären Phase ist der Embryo erkennbar, der aus einem Suspensor und einen „Köpfchen“ (*embryo proper*) besteht. Der Suspensor dient der Verbindung zum maternalen Gewebe. Den Übergang zwischen der radialen und bilateralen Organisation des Embryos markiert die trianguläre Phase. In der nachfolgenden Herz-Phase werden die Kotyledonen initiiert. Anschließend geht der Embryo in die Torpedo-Phase über, in welcher der Suspensor degeneriert und die Kotyledonen beginnen sich zu krümmen, um ein U zu bilden. Das triploide Endosperm entwickelt sich in zwei Phasen. Zuerst ist eine multinukleare Phase erkennbar, der eine Zellularisierung und Differenzierung folgt (Olsen, 2001). Während der Reifung des *Arabidopsis* Embryos wird das Endosperm vollständig resorbiert und durch den wachsenden Embryo ersetzt (Mansfield und Briarty, 1993).

Die Samenentwicklung wird von verschiedenen metabolischen Aktivitäten begleitet (Baud et al., 2002). Zuerst akkumuliert Stärke transient im jungen

Embryo. Im Embryo der Herz-Phase ist der Gehalt an Lipiden gering und der Gehalt an löslichen Zuckern und Stärke hoch. Anschließend folgt die Reifung des Embryos, welche durch die Umstellung des Metabolismus auf die Produktion von Lipiden gekennzeichnet ist. Die Stärkekonzentration sinkt deutlich und die Synthese von Lipiden und Proteinen beginnt. Lipide akkumulieren in Form von Triacylglycerolen (TAG) im wachsenden Embryo, welche für die Keimung und für das Wachstum des Keimlings benötigt werden. Sie werden in cytosolischen Fettkörperchen gespeichert, welche ca. 60% des Zellvolumens in den Kotyledonen des reifen Embryos ausmachen (Mansfield und Briarty, 1993). Durch Abbau der TAG wird der Keimling mit Kohlenstoffgerüsten und Energie versorgt. Speicherproteine (z.B. Cruciferin und Arabin) dienen als Stickstoffquelle für den Keimling (Pang et al., 1988) und werden vor allem zum Ende der Samenentwicklung produziert (Baud et al., 2002). Raffinose und Stachyose werden ebenfalls akkumuliert. Obwohl sich der Samen in einem dehydrierten Zustand befindet, werden metabolische Aktivitäten im Embryo aufrechterhalten.

#### **1.6.4. Samenruhe und Keimung**

Die Samenruhe (Dormanz) ist definiert als die Unfähigkeit intakter und lebensfähiger Samen, die Auskeimung unter günstigen Bedingungen zu vollenden (Bewley, 1997; Bentsink und Koorneef, 2002). Insofern stellt die Dormanz eine wichtige evolutionäre Strategie dar, welche die Samenkeimung auf die nachfolgende Wachstumsperiode verzögert und somit die Überlebensfähigkeit der Nachkommen erhöht (Baskin und Baskin, 1998). Obwohl keine Zellteilungen durchgeführt werden, befinden sich die Samenzellen in metabolisch aktivem Zustand (Bewley und Black, 1985). Eine Vielzahl an Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur sowie Dauer der Samenlagerung und genetische Faktoren kontrollieren die Dormanz (Abb. 1.4.; Koorneef und Karssen, 1994). Genetische Analysen von *Arabidopsis* identifizierten eine kritische Rolle von Abscisinsäure (ABA) während der Samenruhe, wie auch die Notwendigkeit von Gibberelinen (GA) für die Keimung (Hilhorst, 1995; Debeaujon und Koorneef, 2000). GA werden nur dann benötigt, wenn ABA vorhanden war oder ist und wenn die Samen umgebende Hülle die

Auskeimung verhindern kann. Sie werden *de novo* während der Imbibition synthetisiert und die Expression der an der GA-Synthese beteiligten Gene durch Licht mittels des Phytochromsystems kontrolliert.

Die Auskeimung beginnt mit der Aufnahme von Wasser durch den Samen und endet mit der Elongation der embryonalen Achse (Bewley und Black, 1985). Ein sichtbares Zeichen, dass die Auskeimung vollendet ist, ist der Durchbruch der Keimwurzel durch die Samenschale.

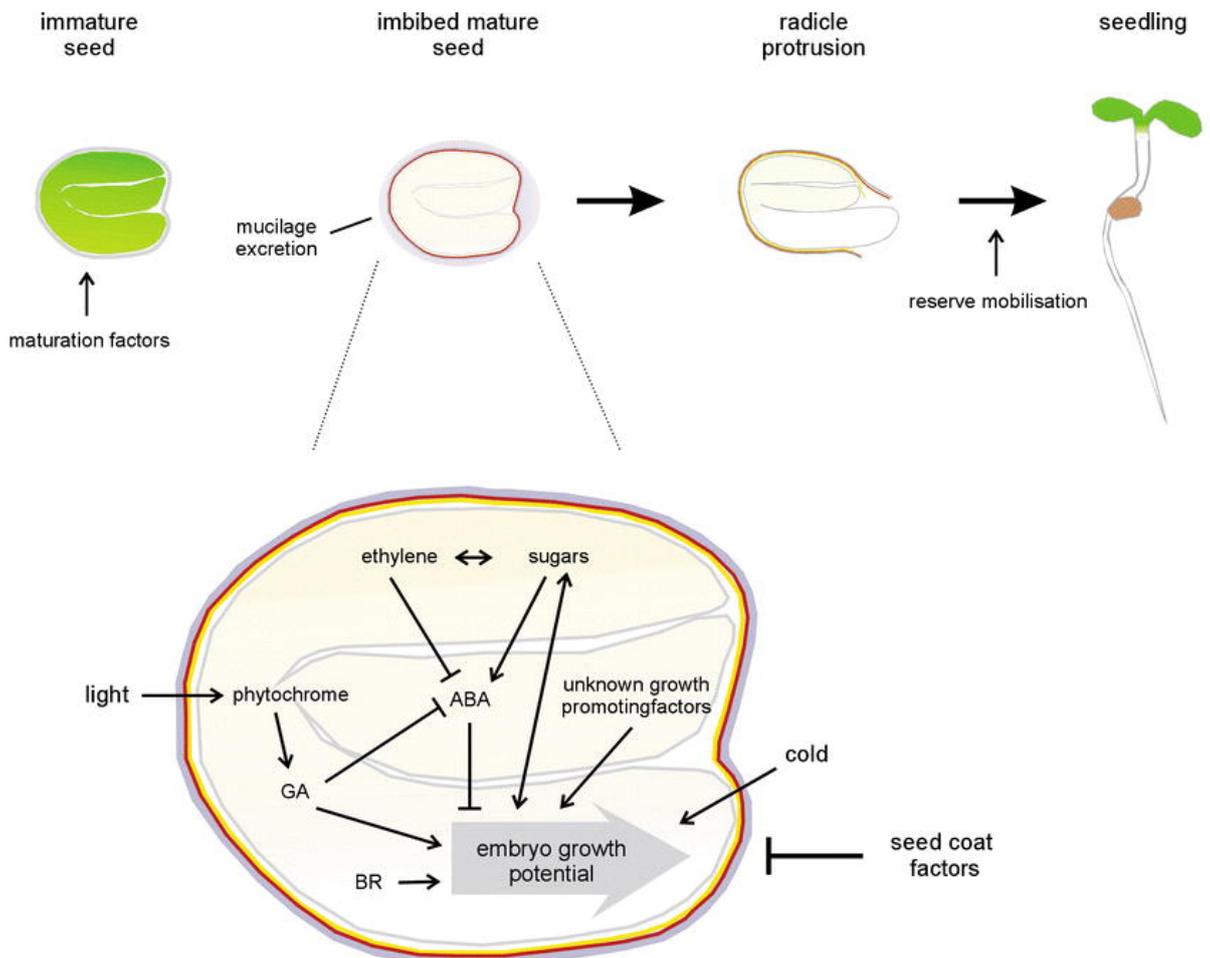


Abb.1.4. Allgemeines Schema der Faktoren, welche die Keimung in Arabidopsis kontrollieren nach Bentsink und Koorneef (2002).

## 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Das GPT Protein wurde biochemisch sehr gut charakterisiert (Kammerer et al., 1998; Eicks et al., 2002). Zudem wurden ausführliche Expressionsanalysen in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (Knappe, 2002). Jedoch ist die *in planta* Funktion der beiden GPT Proteine bisher nicht analysiert worden. Zu diesem Zweck sollten in der vorliegenden Arbeit *Arabidopsis* T-DNA Insertionsmutanten für beide GPT-Loci isoliert und charakterisiert werden. In Vordergrund stand die physiologische Rolle des Glukose 6-Phosphat/Phosphat Transporters während der frühen Pflanzenentwicklung, vor allem während der Gametogenese und Embryogenese. Zusätzlich sollten chimäre Konstrukte hergestellt werden, um die funktionelle Redundanz zwischen beiden *AtGPT* Genen aufzuklären. Als Funktion des GPTs in heterotrophen Geweben wurde die Bereitstellung von Glk6P für die Stärkesynthese und für den oxidativen Pentosephosphatweg postuliert. Der OPPP ist eine wichtige Quelle an Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffgerüsten. Durch weitere chimäre Konstrukte sollte die Auswirkung der Unterbrechung des OPPP wegen des Mangels an GPT Transportaktivität auf die Pflanzenentwicklung erschlossen werden. Zusätzlich sollte die Isolierung und Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien in *AtPG11* und *At6PGDH* die Bedeutung des OPPP für die Pflanzenentwicklung verdeutlichen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Bezugsquellen der Chemikalien und Geräte**

Die eingesetzten Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd (Buckinghamshire, England; Biorad (München, D); Biometra (Göttingen, D); Roche (Mannheim, D); Difco (Hamburg, D); Duchefa (Haarlem, Niederlande); DuPont Company (Wilmigton, GB); Ferak (Berlin, D); Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D); Fluka AG (Schweiz); GibcoBRL (Karlsruhe, D); Heraeus (Düsseldorf, D); Intas (Göttingen, D); Merck (Darmstadt, D); Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D); Molecular Dynamics (Krefeld, D); New England Biolabs (Schwalbach, D); PALL Gelman Laboratory (Dreieich, D); PE Applied Biosystems GmbH (Westerstadt, D); Promega (Mannheim, D); Qiagen GmbH (Hilden, D); Roth (Karlsruhe, D); Sarstedt (Nümbrecht, D); Schleicher & Schuell (Dassel, D); Serva (Heidelberg, D); Sigma (Taufkirchen, D); Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande), TaKaRa Biomedical Europe S.A (Gennevilliers, Frankreich)

#### **2.1.2. Kommerzielle Kits**

Folgende Kits wurden eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet:

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

MinElute Gel Extraction Kit (50) (Qiagen GmbH, Hilden, D)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

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

GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)

## 2.1.3. Bakterienstämme

### 2.1.3.1. *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$**  zur Amplifikation von Plasmiden

supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1  
relA1(Hanahan, 1983)

**Top10** zur Amplifikation von Plasmiden

F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139  
 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

**XL10 Gold** für die Klonierung der Komplementationskonstrukte

Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 ned A1 supE44 thi-1 recA1  
gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>] <sup>a</sup>

**DB3.1** für die Vermehrung von Plasmiden, die das *ccdB* Gen enthalten  
(z.B. pGWB5)

F<sup>-</sup> gyrA462 endA1  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44 ara-14 galK2  
lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>R</sup>) xyl-5  $\lambda$ - leu mtl1

**K802** zur Phagendurchmusterung

supE, hsdR, gal, metB

### 2.1.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

**GV3101** (pMP90) zur Pflanzentransformation (Koncz und Schell, 1986)

Rif<sup>R</sup>G

**GV3101** mit einem Hilfsvektor **pSoup** (Hellens et al., 2000) für den binären Vektor pGreenII

### 2.1.4. Vektoren

Tab. 2.1. Auflistung der verwendeten Vektoren.

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pBluescript® Serie	Stratagene	Amplifikation von Fragmenten in <i>E. coli</i>
pCRII™-Topo®	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pENTR™/D- Topo®	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i> für das Gateway-System
pGWB5	Tsuyoshi Nakagawa (Matsue, Japan)	Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten
pGreenII	Mark Smedley (Norwich, UK)	Pflanzentransformation

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

#### 2.2.1.1. Pflanzenmaterial

Distributor	Population	Mutantenlinie	Mutantenbezeichnung	
NASC ( <a href="http://nasc.nott.ac.uk/home.html">http://nasc.nott.ac.uk/home.html</a> )		N1601	Ökotyp Ws-2	
		N1093	Ökotyp Col-0	
	Feldmann Population	20iger N3116	Pool	<i>gpt1-1</i>
		20iger N6400	Pool	<i>gpt1-5</i>
	Salk Institut	N521762		<i>gpt1-4</i>
		N589293		<i>gpt1-3</i>
		N502712		<i>6pgdh1-1</i>
		N515224		<i>6pgdh1-2</i>
		N536751		<i>6pgdh2-2</i>
		N540050		<i>6pgdh3-1</i>
AKF ( <a href="http://www.biotech.wisc.edu/arabidopsis/">www.biotech.wisc.edu/arabidopsis/</a> )	BASTA- Population	Pools 2, D, plate 66	<i>gpt1-2</i>	
		Pools 7, F, plate 67	<i>gpt1-6</i>	
		Pools 7, B, plate 52	<i>pgi1-2</i>	
GABI-Kat ( <a href="http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GAB-Kat/">www.mpiz-koeln.mpg.de/GAB-Kat/</a> )	GABI-Kat Population	454A06	<i>gpt2-1</i>	
		762C06	<i>6pgdh1-3</i>	
		692E09	<i>6pgdh2-1</i>	

Tab. 2.2. Auflistung der verwendeten *Arabidopsis* T-DNA Insertionslinien.

### 2.2.1.2. Anzucht von *Arabidopsis* auf Erde

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf einem Gemisch aus 3 Teilen Pikiererde Typ Minitray der Fa. Einheitserde Werkverband e.V. Gebr. Patzer KG (Sinntal-Jossa) und 1 Teil Vermiculit der Fa. Basalt Feuerfest (Linz) ausgelegt. Vor der Aussaat wurde das Substrat mit Leitungswasser durchtränkt. Die Pflanzschalen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch Fremdsamen mit Pikierhauben abgedeckt. Zur Brechung der Samenruhe und zur Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat zunächst für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Keimung und Anzucht erfolgten danach in einem Gewächshaus oder einer Phytokammer. Die Pflanzen wurden bei einer Photonenflussdichte von ca. 150-200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Quantameter LI-1000 der Fa. Li-Cor) im Gewächshaus bzw. 70  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in einer Phytokammer und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden angezogen. Für die Beleuchtung in der Phytokammer wurde eine Mischung aus Tageslicht-Neonröhren verschiedener spektraler Qualitäten (Tageslicht L58W/11-860, Warmweiß L58W/30, Natura de Luxe L58W/76 und Fluora L58W/77) der Firma Osram verwendet. Die Temperatur betrug ca. 22°C während der Lichtphase und wurde in der Dunkelheit um etwa 4°C reduziert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug etwa 40%.

Sobald die Keimblätter vollständig entfaltet waren, konnte die Pikierhaube entfernt werden. Die Pflanzen wurden ein- bis zweimal pro Woche mit Leitungswasser angestaut.

In ausgewachsenem Zustand nimmt die Blattrosette einen Durchmesser von 4 bis 6 cm ein. Die Samen wurden so ausgesät, dass die ausgewachsenen Pflanzen einen Abstand von 1-2 cm zueinander hatten. Alternativ konnten die Pflanzen 11 bis 14 Tage nach der Aussaat entweder in runde Einzeltöpfe ( $\varnothing$  6 cm), zu je vier Pflanzen in TEKU-Tainer-Viereckttöpfe (L·B·H: 10·10·11 cm) oder in eine Multitray-Schale à 77 Pflanzmulden pikiert werden. Hierbei wurden die Pflanzen zur Vermeidung von Wurzelschäden mit ausreichend Erde ausgehoben und in frische Erde eingesetzt.

Nach Abschluss der Blütezeit wurden die Blütenstiele in Pergamenttüten eingehüllt, sobald sich ein Drittel der Schoten gelb gefärbt hatte. Waren alle Schoten gelb gefärbt, wurde die Bewässerung eingestellt. Die getrockneten

Blütenstiele wurden nach beendeter Samenreife abgeschnitten und auf weißem Papier von Hand zerrieben, so dass sich die Samen aus den Schoten lösten. Durch wiederholtes Abtrennen der Pflanzenreste mit einem Metallsieb (450 µm Maschenweite) konnten die Samen nahezu rein gewonnen und in 2 ml Schraubgefäßen aus Kunststoff gelagert werden. Die Samen wurden für zwei Tage unter einem Abzug getrocknet. Reste transgener Pflanzen, insbesondere Samen und reproduktive Organe, wurden bei 121°C und 1,2 bar für 40 min autoklaviert. Reste nicht transgener Pflanzen wurden dem Kompost zugeführt.

#### **2.2.1.3. Schädlingsbekämpfung**

Bei mäßigem Befall mit Trauermücken wurden zur Eindämmung der Populationsgröße Gelbtafeln (Fa. Neudorff, Emmerthal, FRG) verwendet, die etwa 10 cm über den Pflanzen in einem Abstand von einem Meter aufgehängt wurden. Zeigten routinemäßig wurden die Pflanztöpfe mit einer Nematodensuspension (Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG) besprüht oder gegossen.

Geringer Blattlausbefall wurde mit dem Einsatz von Nützlingen (*Chrysoperla*; Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG) bekämpft. Bei sehr starkem Blattlausbefall wurde Confidor als 25%ige Emulsionsspritzlösung eingesetzt. Der Cholinesterasehemmstoff ist ein Insektizid mit Berührungs- und Magengift-Wirkung (Perkow, 1983).

#### **2.2.1.4. Anzucht von *Arabidopsis* auf Agar**

Runde Petrischalen (Ø 9 cm) mit Nocken wurden unter der Sterilbank mit je 25 ml handwarmen Medium gefüllt. Dagegen wurden 40 ml Medium in quadratische Petrischalen gegossen. Je nach Bedarf wurden Antibiotika dem MS Medium hinzugefügt. Nach Erstarren des Mediums konnten die Platten direkt verwendet oder einige Tage bei 4°C gelagert werden.

Oberflächensterilisierte *Arabidopsis*-Samen wurden unter sterilen Bedingungen auf den Agarplatten einzeln mit sterilisierten Zahnstochern ausgelegt. Nach dem Trocknen des überschüssigen Wassers unter der Sterilbank wurden die Platten verschlossen und mit einem Fixierpflaster aus Vliesstoff (Omnipor der Fa. Hartmann) luftdurchlässig versiegelt. Die Platten wurden zwei bis drei Tage lang bei 4°C mit dem Deckel nach unten stratifiziert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 2-3 Wochen bei 22°C unter einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 h in dem Phytoinkubationsschrank RUMED 1200 (Fa. Rubarth Apparate GmbH, Laatzen).

MS<sup>+</sup>-Medium für *Arabidopsis*:

1% (w/v) Saccharose  
 0,8% (w/v) Agar  
 1 x Murashige & Skoog-Salze mit modifizierten  
 Vitaminen (Fa. Duchefa, Kat.-Nr. M0245)

pH 5,6 mit KOH einstellen  
 ad 1 l mit dest. Wasser  
 autoklavieren

Antibiotikum	Endkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Stocklösung ( $\text{mg/ml}$ )	Lösungsmittel
Kanamycin	50	50	Wasser
Hygromycin	30	-	-

**Tab. 2.3. Antibiotikakonzentrationen für Pflanzen-Selektionsmedien.**

Alle Antibiotika wurden von der Firma Duchefa Biochemie B.V. in Haarlem, Niederlande bezogen. Das Antibiotikum Kanamycin wurde als Feststoff eingewogen, als konzentrierte Stammlösung in Wasser eingewogen und sterilfiltriert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Hygromycin war als sterile Flüssigkeit (418,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit einer spezifischen Dichte von 1,13 g/ml erhältlich und wurde bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.1.5. Sterilisieren von *Arabidopsis* Samen**

#### **2.2.1.5.1. Flüssige Oberflächensterilisation von Samen**

Die Sterilisierung der Samen erfolgte in 1.5 ml Eppendorfgefäßen. Zunächst wurden die Samen in 1 ml 70% Ethanol für 15-30 s geschwenkt. Der Alkohol wurde gegen eine Lösung aus 1.7% NaClO und 0,2% Tween20 ausgetauscht und für 15 min geschüttelt. Die nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Samen sechsmal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Die Samen wurden in einem Rest Wasser aufgenommen und auf steriles Filterpapier zum Trocknen überführt.

#### **2.2.1.5.2. Trockene Oberflächensterilisation von Samen**

Das verwendete Protokoll stammte aus der ‚Newsgruppe‘: [bionet.genome.arabidopsis](mailto:bionet.genome.arabidopsis). Ein Becherglas mit 100 ml NaClO und ein Eppendorfständer wurden in einen Exsikkator gestellt. Die Samen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße umgefüllt und geöffnet in den Eppendorfständer gestellt. Zu dem NaClO wurden 3 ml konz. HCl zugegeben, und der Exsikkator wurde schnell geschlossen. Nach einer Inkubation von 3 bis 6 h, wurde der Exsikkator unter sterilen Bedingungen geöffnet und die Samen zum Abdampfen (2 h) herausgenommen. Nun waren die Samen zum Aussäen bereit.

### **2.2.1.6. Probennahme**

Für die DNA-Isolierung wurden vorwiegend Blüten geerntet, indem man vorsichtig mit einer Pinzette die Blüten von dem Stängel abtrennte. Für die RNA-Isolierung wurden die pflanzlichen Gewebe einzeln entnommen. Das Material wurde von Schmutz und Läusen (wenn vorhanden) befreit, in 1,5 ml Eppendorfgefäße oder 50 ml Falcon gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.1.7. Genetische Analyse von *gpt1-1* und *gpt1-2*

Für die Bestimmung der gametophytischen Transmission von *gpt1-1* und *gpt1-2* wurden reziproke Kreuzungen dieser Mutantenlinien mit dem Ökotyp *Ws-2* und *Col-0* durchgeführt. Die geernteten Samen aus der Kreuzung *gpt1-1* und *Ws-2* wurden auf ein Medium mit Kanamycin ausgesät und der Resistenzphänotyp wurde ausgezählt. Die Samen aus der Kreuzung *gpt1-2* und *Ws-2* oder *Col-0* wurden auf Erde ausgesät und zur Isolierung genomischer DNA nach der Schnellpräpmethod (s. 2.2.4.2) verwendet. Die Genotypisierung dieser Nachkommen erfolgte mittels PCR unter Verwendung folgender Primer JL-202 und GPT1-F3. Die Transmissionseffizienz für die T-DNA für jede Gamatenart (männliche TE und weibliche TE) wurden wie zuvor beschrieben (Howden et al., 1998) kalkuliert. Der Prozentsatz für die fehlentwickelten Gametophyten, die auf den Ergebnisse der TE-Berechnung basierten, wurde wie folgt berechnet:  
$$(100 - \text{Hintergrund})/2 - \text{TE} \times (100 - \text{Hintergrund})/2 = \% \text{ TE}$$

### 2.2.1.8. Genetische Komplementation

#### 2.2.1.8.1. Durchmusterung einer genomischer Bank

Es wurde folgende genomische Bank für die Isolierung der genomischen Fragmente von *AtGPT1* und *AtPGI1* verwendet:

#### ***Arabidopsis thaliana* Genomic Library (Fa. Clontech)**

Vektor EMBL3 SP6/T7

Zellen K802

Es handelt sich um eine genomische Phagenbibliothek aus Rosettenblättern und Blütenstielen viereinhalb Wochen alter, im Licht angezogener Pflanzen von *A. thaliana* (Ökotyp Columbia). Die Insertlänge variiert zwischen 8 und 22 kb.

### Ausplattierung

Die Bakterien wurden in LBM-Medium über Nacht bei 37°C angezogen, abzentrifugiert und in 1/10 Volumen SM aufgenommen.

Es wurden entweder kleine (Durchmesser 4.2 cm) oder große (12 cm x 12 cm) BBL-Agarplatten verwendet. 1 µl Phagensuspension der gewünschten Konzentration (mit SM eingestellt) wurde auf 50 µl oder 75 µl Zellen pipettiert. Für 30 Minuten wurde der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert, dann in 1.5 ml bzw. 5 ml Topagarose (45°C) überführt und nach gutem Mischen auf vorgewärmte (45°C) BBL-Platten gegossen. Nach Festwerden der Agarose wurden die Platten für zwölf Stunden bei 37°C inkubiert.

### Amplifizierung von λ -Phagen

Die Phagen wurden in einer Dichte von ca. 10 000 pro Platte ausplattiert und über Nacht angezogen, dann mit 3 ml SM überschichtet und für zwölf Stunden bei 4°C gelagert. Das SM-Medium mit den Phagen wurde abgenommen, mit 40 µl Chloroform versetzt und für 30 Sekunden kräftig gemischt. Die Lagerung der amplifizierten Phagen fand bei 4°C statt.

### Präparation von λ -Phagen

Auf 50 µl K803 Zellen wurden 125 µl amplifizierte Phagen gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einen Kolben mit 40 ml PS-Medium überführt. Für zwölf Stunden wurden die Kolben bei 37°C leicht geschüttelt. Dann wurden zum Abtöten der Zellen zu jedem Ansatz 200 µl Chloroform gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 6-8°C abzentrifugiert (10 min, 10 000 min<sup>-1</sup>, Sorvall, Rotor SS-34). Der phagenhaltige Überstand wurde in 50 ml-Greineröhrchen überführt und zur Entfernung bakterieller Nukleinsäuren mit 60 µl RNase (10 mg/ml) sowie 90 µl DNase (10 mg/ml) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von NaCl ad 2 % (w/v) und PEG 8 000 ad 8% (w/v) wurden die Phagen-DNA gefällt (2 h auf Eis) und später sedimentiert (10 min, 10 000 min<sup>-1</sup>, Sorvall, Rotor SS-34). Die Proteinhülle der in 0.5 ml SM resuspendierten Phagen wurde durch Zugabe von 50 µl 0.5 M EDTA, 31 µl SDS (20%) und 5 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) und einstündige Inkubation bei 65°C zerstört. Die freigesetzte DNA wurde zweimal phenolisiert und dann mit ½ Volumen NH<sub>4</sub>-Ac. und einem Volumen Isopropanol gefällt. Die

ausgefällene DNA wurde in 1 ml 75 %igen Ethanol überführt, zweimal gewaschen und in 100 µl Wasser (bidest) aufgenommen.

Für Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden 10 µl DNA eingesetzt. Der Ansatz enthielt zusätzlich 1 mM Spermidin und wurde für mindestens zehn Stunden bei 37°C durchgeführt. Nach Auftrennung der Fragmente auf einem Agarosegel wurde entweder ein Southern-Blot durchgeführt oder genomische DNA-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und in den pBSC-Vektor kloniert.

#### BBL-Platten

10 g	Trypton
2.5 g	NaCl
12 g	Agar
ad 1 l	mit dest. Wasser

#### SM-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 7.5	
	100 mM	NaCl
8 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	

#### Topagarose

10 g	Trypton
2.5 g	NaCl
2.0 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
6.5 g	Agarose
ad 1 l	mit dest. Wasser

#### PS-Medium

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
2 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
ad 1 l	mit dest. Wasser

#### Durchmusterung von genomischen Banken

Zur Durchmusterung der Banken wurden 200-500 Phagen aus der entsprechenden Genbank ausplattiert und über Nacht angezogen. Vor der Überführung der Phagenplaques auf eine Nylonmembran (Hybond-N) wurden

die Platten zum Härten für mehrere Stunden bei 4°C gelagert und dann für 30 Minuten unter der Sterilbank getrocknet.

Die trockenen Filter wurden vorsichtig auf die Oberfläche der Topagarose aufgelegt. Durch Ansaugen der Feuchtigkeit wurden die Phagen so aus dem Medium auf die Filter übertragen, welche durch Einstiche mit einer in Tinte getränkten Nadel mit einer eindeutigen (asymmetrischen) Markierung versehen wurden. Es wurden von jeder Platte zwei Filterabzüge angefertigt. Der erste Filter lag eine Minute, der zweite drei Minuten auf der Topagarose. Weiter wurden die Filter nacheinander mit folgenden Lösungen behandelt: der Denaturierungslösung (4 min), der Neutralisierungslösung (10 min) und 2x SSPE (10 min). Dabei wurden die Filter mit der Phagenseite nach oben auf mit der entsprechenden Lösung getränktes 3MM-Papier (Whatman) gelegt.

Die Filter wurden anschließend getrocknet und für drei Stunden bei 80°C gebacken. Sie konnten dann für die Hybridisierung (s. 2.2.4.10) mit der entsprechenden DNA-Sonde verwendet werden.

Positive Signale wurden entsprechenden Phagenplaques zugeordnet. Diese wurden mit einer abgeflammt Spatelspitze ausgestochen und in 100 µl SM-Medium überführt. Nach Zugabe von 10 µl Chloroform und kurzem Mischen wurden die Phagen bei 4°C aufbewahrt. Wenn es nicht möglich war, einzelne Plaques zu picken, z.B. beim erstmaligen Durchmustern einer Bank, wurde das Protokoll zur Sichtung der Phagen bis zur Homogenität der positiven Signale wiederholt (*Rescreening*).

#### Denaturierungslösung

0.5 M	NaOH
1.5 M	NaCl

#### Neutralisierungslösung

0.5 M	Tris/HCl pH 7.5
2 M	NaCl

#### 20x SSPE

0.2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.5
3 M	NaCl
20 mM	EDTA

#### 2.2.1.8.2. Herstellung der Komplementationslinie *gpt1-2gGPT1*

Ein genomischer DNA Klon, der den *GPT1* Locus enthielt, wurde isoliert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme Sall/BamHI in pBSC (Stratagene) subkloniert und sequenziert. Dieses Sall/BamHI Fragment setzte sich aus dem genomischen *GPT1* Fragment, dem 5' nicht-kodierenden Fragment in der Größe von 3,3 kb und den 3' nicht-kodierenden Fragment in der Größe von 5.3 kb zusammen. In derselben Weise wurde dieses Fragment in den binären Vektor pGreenII kloniert und *pGreenII-GPT1g* genannt. Anschließend wurde das Komplementationskonstrukt pGreenII-*GPT1g* in dem *A. tumefaciens* Stamm mit dem Hilfsvektor *pSoup* und anschließend in die *GPT1/gpt1-2* Pflanzen transformiert. Transgene *Arabidopsis* Pflanzen wurden auf Kanamycin Resistenz selektiert. Die Analyse des endogenen *GPT1* Locus in den komplementierten *GPT1/gpt1-2* Pflanzen wurde mittels PCR mit der Primerkombination GPT1-F6/GPT1-R7 durchgeführt. Die Anwesenheit des endogenen *GPT1* Locus wurde durch die Amplifikation eines 5 kb Fragmentes nachgewiesen.

#### 2.2.1.8.3. Herstellung der Komplementationslinie *pgi1-2gPGI1*

Ein genomischer DNA Klon mit dem *PGI1* Locus wurde isoliert und mit EcoRI/Sall in pBSC (Stratagene) subkloniert und sequenziert. Dieses EcoRI/Sall Fragment enthielt außer dem *PGI1* Locus ein 1.6 kb 3' nicht-kodierendes Fragment und wurde mit EcoRI in den pGreenII Vektor kloniert. Das *pGreenII-PGI1g* Konstrukt wurde in dem *A. tumefaciens* Stamm mit dem Hilfsvektor *pSoup* eingeführt und in die *pgi1-2* Pflanzen transformiert. Transgene *Arabidopsis* Pflanzen wurden auf Kanamycin Resistenz selektiert. Die Genotypisierung der komplementierten *pgi1-2* Pflanzen erfolgte mit Hilfe von PCR unter Verwendung der Primerkombination PGI1-F4/PGI1-R. Die Anwesenheit des endogenen *PGI1* Locus wurde durch die Amplifikation eines 4 kb Fragmentes nachgewiesen.

## 2.2.1.9. Phänotypische Analyse

### 2.2.1.9.1. Alexander's Färbung

Die Alexander's Färbung (Alexander, 1969) enthält Malachite Green und Säurefuchsin als Farbstoffe, die in unterschiedlicher Weise vitale und nicht-vitale Pollenkörner färben können. Malachite Green färbt Zellulose in den Pollenkörnern, wohingegen Säurefuchsin das Protoplasma anfärbt. Deshalb erscheinen nicht-vitale Pollenkörner grün und Pollenkörner mit Protoplasma rot. Geöffnete Blüten wurden in einem Tropfen der Alexander's Färbelösung getaucht. Die Färbelösung mit den Pollenkörnern wurde mit einem Deckglas bedeckt und über einer Flamme erwärmt. Anschließend wurde die so hergestellte Probe mit dem Mikroskop (Nikon Eclipse E800, Tokyo, Japan) untersucht.

Für die Herstellung der Färbelösung ist es wichtig, die angegebene Reihenfolge zu befolgen.

#### Alexander's Färbung:

10 ml	95% Alkohol
1 ml	1% Malachite Green Lösung (Alkohol)
50 ml	destilliertes Wasser
25 ml	Glyzerin
5 g	Phenol
5 g	Chloralhydrat
5 ml	1% Säurefuchsin Lösung (Wasser)
0,5 ml	1% Orange G Lösung (Wasser)
1-4 ml	Eisessig

### 2.2.1.9.2. DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) Färbung

Die DAPI Färbung der Pollenkörner erfolgte nach einer modifizierten Methode von Park (Park et al., 1998). Dafür wurden geöffnete Blüten mit reifen Antheren verwendet. Die Antheren wurden ohne Filamente in die DAPI Arbeitslösung auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Leichtes Klopfen auf dem Deckglas setzte die Pollen frei. Die gefärbten Pollen wurden mit dem Fluoreszenz Mikroskop analysiert (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japan).

#### DAPI Arbeitslösung:

2,5 µg/ml DAPI in 1XPBS  
mit 0,01% Tween20 oder Triton  
vor Licht schützen

### 2.2.1.9.3. „*whole mount*“ Präparation von Samenanlagen

Blüten, die sich im Entwicklungsstadium 12 befanden (Smyth et al., 1990), wurden emaskuliert. Nach zwei Tagen wurden die emaskulierten Blüten in der Cornoy's Lösung über Nacht fixiert. Am nächsten Morgen wurden sie mit einer Reihe von Alkohollösungen (80% und 70%) je eine halbe Stunde pro Lösung gewaschen. Die Alkohollösung des letzten Waschschriffs wurde durch die Klärungslösung ersetzt, und der Ansatz wurde eine bis vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ovarien in einem Tropfen der Klärungslösung gegeben und unter einem Biokular zerlegt, so dass die Samenanlagen frei von umliegenden Geweben waren. Die Samenanlagen wurden mit der differential-interference-contrast (DIC) Mikroskopie (Nikon Eclipse E800, Tokyo, Japan) analysiert.

Cornoys Lösung:

Eisessig : Ethanol im Verhältnis von 1 : 9

Klärungslösung:

Chloralhydrat : Wasser : Glycerol im Verhältnis von 8 : 2 : 1

**2.2.1.9.4. Samenentwicklung**

Die Samenentwicklung wurde in der 10ten bis 12ten Schote der Hauptinfloreszenz analysiert. Für diesen Zweck wurde ein doppelseitiges Klebeband auf einem Objektträger verwendet. Die Schoten wurden darauf geklebt und mit einer Nadel geöffnet.

**2.2.2. Arbeiten mit Bakterienstämmen****2.2.2.1. Wachstumsmedien**LB (Luria-Bertani):

10 g Trypton  
10 g NaCl  
5 g Hefeextrakt  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
autoklavieren  
[für Platten inklusive 12 g Agar]

Glycerin für Stammkulturen:

60 % (v/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>  
25 mM Tris/HCl, pH 8.0  
(autoklavieren)

Antibiotikum	Endkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Stocklösung ( $\text{mg/ml}$ )	Lösungsmittel
Ampicilin	100	100	Wasser
Gentamycin	25	25	Wasser
Kanamycin ( <i>E. coli</i> )	25	50	Wasser
Kanamycin ( <i>A. tumefaciens</i> )	100	100	Wasser
Rifampicilin	150	30	DMSO
Tetracyclin	12	12	80% Ethanol
Hygromycin	30	-	-

**Tab. 2.4. Antibiotikakonzentrationen für *E. coli* und *Agrobacterium* Selektionsmedium.**

Alle Antibiotika außer Hygromycin wurden als Feststoffe eingewogen und im entsprechenden Lösungsmittel gelöst. Aliquots von Ampicilin, Gentamycin, Kanamycin und Tetracyclin wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Rifampicilin wurde bei RT gelagert. Hygromycin war als sterile Flüssigkeit ( $418,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit einer spezifischen Dichte von  $1,13 \text{ g/ml}$  erhältlich und wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.2.2.2. Lagerung und Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht und Lagerung von *E. coli* erfolgte nach Ausubel (Ausubel, 1994). 5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie von einer Agar-Platte oder mit Zellen einer Stammkultur angeimpft. Bei Anzucht von Bakterien mit rekombinanter DNA wurde dem Medium je nach Resistenz des verwendeten Plasmids Antibiotikum hinzugefügt. Die Bakterien wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler vermehrt (G25 Incubator Shaker, New Brunswick scientific Co Inc., Edison, New Jersey, USA; 300 rpm).

Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Bacto-Agar (Difco, Hamburg, D)  $1,2\%$  (w/v) zugesetzt. Hitzelabile Stoffe wie Antibiotika, etc. wurden erst kurz vor dem Gießen der Platten zugegeben (Temp. ca.  $50^{\circ}\text{C}$ )

Bakterien aus Flüssigkulturen wurden ausplattiert, indem  $100\text{-}200 \mu\text{l}$  Zellsuspension mit der gewünschten Zelldichte auf die Platten pipettiert und mit einer Plattierangel gleichmäßig verteilt wurden.

Die Lagerung von Bakterien erfolgte auf Agarplatten für einige Wochen bei 4°C, längerfristig als Glycerin-Stammkulturen bei -70°C (500 µl Bakterien-Kultur plus 500 µl Glycerin für Stammkulturen, s. o.)

### 2.2.2.3. Herstellung von TSS- kompetenten Zellen

Zur Herstellung TSS-kompetenter Bakterien wurden nach der Methode von Chung & Miller (Chung und Miller, 1993) verfahren. Bakterien des DH5 $\alpha$ -Stammes wurden in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison/ USA) inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und 2 h bei 37°C unter Schütteln bis zum Anfang der exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD<sub>600</sub> = 0,3–0,4 E). Die Kultur wurde dann auf SS34-Becher verteilt und die Zellen im SS34-Rotor für 10 min bei 3.000 rpm sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10 ml eisgekühltem TSS-Medium aufgenommen und vereinigt, 15 min auf Eis gestellt, zu 50 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und maximal 2 Monate bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

#### LB-Medium:

##### 2.2.2.1

#### TSS:

10 % (w/v)	Polyethylenglykol 8000 in LB-Medium
5 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
20-50 mM	MgCl <sub>2</sub>
20-50 mM	MgSO <sub>4</sub>

pH 6,5/ NaOH  
autoklavieren

#### **2.2.2.4. Transformation von TSS-kompetenten Bakterien**

Zu 50 µl auf Eis auftauenden TSS-kompetenten Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz oder 50-200 ng Plasmid-DNA zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s auf 42° C erwärmt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 900 µl LB-Medium versetzt. Die Kultur wurde für 1 h bei 37°C leicht geschüttelt (ca. 150 rpm, Schüttler). Von diesem Ansatz wurden 100-1000 µl auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und ü.N. im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

#### **2.2.2.5. Herstellung von elektrokompetenten Agrobakterien**

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5 ml MGL-Medium angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen Sättigung gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100 ml MGL-Medium verdünnt, so dass die OD<sub>600</sub> ca. 0.04-0.08 E betrug. Es folgte eine Vermehrung der Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> ~0.5 E. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor GS, Sorvall RC5B) und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES, pH 7.0 resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einer nächsten Zentrifugation (5 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor SS34, Sorvall RC5B) wurden die Zellen in 2 ml 1 mM HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, für 30 sec sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. 50 µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

MGL-Medium:

0,5% (w/v)	Bacto-Trypton
0,25% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,5% (w/v)	NaCl <sub>2</sub>
0,5% (w/v)	Mannit
0,116% (w/v)	Na-Glutamat
0,025% (w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,01% (w/v)	MgSO <sub>4</sub>
1 mg	Biotin
ad 1 l	mit bidest. Wasser autoklavieren

**2.2.2.6. Transformation elektrokompenter Agrobakterien**

2 µl DNA (~200 ng DNA) wurden zu 50 µl elektrokompenten Zellen pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA-Bakterien-Mischung in eiskalte 0.2 cm Küvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω, 2.5 kV Puls bei 8-9 ms Verzögerung (Genepulser II, Fa. Biorad). Anschließend wurde sofort 1 ml YEB-Medium (bei RT) zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 28°C unter leichtem Schütteln (100-150 rpm) wurden die Zellen abzentrifugiert (30 sec, 13.500 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5417) und 800 µl Überstand vorsichtig abgenommen. In den verbleibenden 200 µl wurde das Sediment resuspendiert. Davon wurden jeweils 100 µl und zweimal 50 µl Aliquots auf YEB-Platten ausplattiert, die folgende Antibiotika enthielten: Gentamycin (Endkonzentration: 25 µg/ml) , Kanamycin (100 µg/ml) und Rifampicin (150 µg/ml). Die Platten wurden mit Parafilm (Parafilm „M“, American National Can<sup>TM</sup>, Greenwich, USA) abgedichtet und zwei Tage bei 28°C im Brutschrank inkubiert.

YEB-Medium:

- 0,5% (w/v) Bacto Peptone
- 0,5% (w/v) Beef-Extract
- 0,1% (w/v) Hefeextrakt
- 0,5% (w/v) Saccharose
- 0,05% (w/v)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
für Platten inklusive 12 g Agar  
autoklavieren

**2.2.3. Extraktion und Präparation von DNA****2.2.3.1. Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien**Mini-Präparation 1

Die Präparation nach Birnboim und Doly (Birnboim, 1979) ermöglicht es, Plasmid-DNA aus Bakterien(kulturen) mit einer geringen Kontamination an bakterieller chromosomaler DNA und Proteinen zu isolieren.

Auf LB-Platten wurden 100 µl Bakterien(stamm)kultur ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine gewachsenen Kolonien wurden dann zur Vermehrung von Biomasse und Plasmiden in autoklavierte Reagenzgläser mit 5 ml LB-Medium, inklusive dem gewünschten Antibiotikum überimpft. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttler wurden die Bakteriensuspensionen dann für 10 min bei 1.300x g (3.000 rpm) in den Kulturröhrchen abzentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Sedimente zur Äquilibrierung in je 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation (eine Minute) bei 14.000 rpm (20.800x g) in der Tischzentrifuge, wurden die Sedimente in 100 µl Mini-Lösung I (s.u.) resuspendiert und für 3-5 min bei RT inkubiert. Nach der Lyse der Bakterien wurden je 200 µl Mini-Lösung II (s.u.) zugegeben, vorsichtig gevortext und die Ansätze wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieser Schritt diente der selektiven Fällung genomischer DNA. Es wurde danach je Ansatz 150 µl 3M KOAc (pH 4,8) zugegeben und nach kurzem Vortexen erfolgte eine 5minütige Inkubation auf

Eis. Die Proben wurden bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und einem RNase-Verdau unterzogen. Hierfür wurde zunächst die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 200 µl RNase/H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> - Lösung (RNase-Konzentration: 10 µg/ml) versetzt und für mindestens 30 min. bei 37°C inkubiert. Um die RNase zu entfernen, wurden die Proben phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert, danach gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in einem adäquaten Volumen dist. Wasser aufgenommen.

#### Mini-Lösung I:

25 mM	Tris/HCl , pH 8,0
10 mM	EDTA/NaOH , pH 8,0
50 mM	Glukose

#### Mini-Lösung II:

1% (w/v)	SDS
0,2 M	NaOH

#### Mini-Präparation 2

Größtenteils wurden Plasmide mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D) isoliert, in dem die Säulchen und die Bindungsmatrix selbst hergestellt wurden. Nach jeder Präparation wurden die Säulchen mit bidest Wasser gereinigt und getrocknet. Erst kurz vor der Anwendung der Säulchen wurden diese mit der Bindungsmatrix gefüllt.

#### Bindungsmatrix:

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

### Midi-Präparation

Für die Herstellung von DNA-Präparationen, die sehr rein sein sollten und in größeren Mengen benötigt wurden, wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit oder GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

## **2.2.4. Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana***

### **2.2.4.1. Präparation genomischer Pflanzen-DNA nach der CTAB-Methoden**

Für die DNA-Isolation nach Liu (Liu et al., 1995) aus *Arabidopsis thaliana* wurden vorwiegend die Blüten verwendet, weil sich erfahrungsgemäß die daraus erhaltene DNA für die nachfolgenden Untersuchungen, z.B. Southern-Blot Analyse, am besten eignet. Folgendes Protokoll wurde angewandt:

2 bis 4 Blütenstände wurden geerntet, in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die eingefrorenen Blüten wurden mit einem Pistill homogenisiert, mit je 500 µl Extraktionspuffer versetzt und bis zum vollständigen Auftauen gemörsert. Es wurde 400 µl PCI hinzugefügt und das Gemisch vorsichtig und gründlich invertiert bis sich eine Emulsion gebildet hatte. Nachfolgend wurde das Homogenat bei 1.700x g (3.500 rpm) für 15 min in der Laborzentrifuge zentrifugiert, die wässrigen Oberphasen in frische Eppendorfgefäße überführt und mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben bei RT für 10 min inkubiert. Die DNA wurde bei 1.700x g (3.500 rpm) für 10 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen und die DNA Pellets mit 70% EtOH zwei Mal gewaschen. Nach diesen Waschsritten wurde die DNA an der Luft ca. 30 min getrocknet und in 50 µl TE/RNase gelöst. Der RNase-Verdau erfolgt 30 bis 60 min.

2x Puffer:

0,6 M	NaCl
100 mM	Tris pH 7.5
40 mM	EDTA
4% (w/v)	Sarkosyl
1% (w/v)	SDS

Extraktionspuffer:

25 ml	2x Puffer
20 ml	12 m Harnstoff
2.5 ml	Phenol
2.5 ml	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

PCI:

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol  
im Verhältnis 25 : 24 : 1

TE:

10 mM	Tris-HCl pH 8.0
1 mM	EDTA

**2.2.4.2. Schnellpräparation**

Eine einfache und schnelle Präparation genomischer Pflanzen-DNA erfolgte nach der Methode von Edwards (Edwards, 1991). Die auf diese Weise isolierte genomische DNA eignet sich in erster Linie als Matrize für PCR-Analysen, weniger für Southern-Blot-Untersuchungen, weil die DNA hierbei stark geschert und nicht gereinigt wird.

Ein bis drei Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und entweder sofort verarbeitet oder bis zur DNA-Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einem Bohrer ca. 15 s bei Raumtemperatur zerrieben. Das homogenisierte Gewebe wurde mit 400 µl Extraktionspuffer in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3-4 s gevortext. Die Proben waren stabil für mindestens 1 h. Nach der Aufarbeitung

aller Proben wurden sie für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA bei 13000 rpm in der Eppendorf 5417 Zentrifuge für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Eppendorfggefäß auf Papier abgetupft. Das Pellet wurde unter dem Abzug ca. 20-30 min getrocknet und in je 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Je PCR-Ansatz wurden 1-4 µl der Präparation eingesetzt.

#### Extraktionspuffer:

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

#### 1x TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl , pH 8,0
1 mM	EDTA
	autoklaviert

### **2.2.4.3. Phenolextraktion und Ethanol fällung**

Die Phenolextraktion dient der Reinigung der Nukleinsäuren von Proteinen. Zur Neutralisierung des sauren Phenols wurde zu wassergesättigtem Phenol 1/50 Vol. 2,5 M Tris pH 8,2 zugegeben und gut gemischt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/Tris und 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) versetzt, für einige Minuten geschüttelt und für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Oberphase wurde abgenommen, die organische Unterphase mit der proteinhaltigen Interphase verworfen.

Es folgte eine nochmalige Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol, kurzem Schütteln und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm . Zu der überführten wässrigen DNA-haltigen Oberphase wurde 1/2 Vol. 7,5 M

Ammoniumacetat oder 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 2,5 Vol. Ethanol abs. gegeben. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und anschließend für 30 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in ein adäquates Volumen dist. Wasser oder TE aufgenommen.

#### **2.2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren wurden für analytische und präparative Zwecke durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Maniatis, 1982). In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0,8-2 %ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Hierbei gilt: 0,8%ige Agarosegele für zu separierende DNA-Fragmente von 0,8-12 kb; 2,0 %ige Agarosegele für Fragmente von 0,05-2 kb. Die eingewogene Agarose wurde in dem erforderlichen Volumen 1 x Tris-Acetat-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Zu dieser Gellösung wurde 1/25000stel Vol. Ethidiumbromid-Lösung gegeben und danach die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es mit 1 x Tris-Acetat-Puffer bedeckt.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit Stopp-Puffer versetzt (finale Konzentrationen des Stop-Puffers: 3 % (w/v) Ficoll, 16,7 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 0,005 % (w/v) Xylenblau). Es wurde eine Stromstärke von 1-1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche, bis zur ausreichenden Auftrennung der DNA, angelegt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden DNA-Marker bekannter Länge aufgetragen (1 kb-Längenmarker der Firma GibcoBRL, Karlsruhe). Durch die Interkalierung von Ethidiumbromid mit der DNA wurde diese auf einer UV-Durchlichtapparatur (254 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht. Die DNA-Banden wurden mit einem Geldokumentationssystem (Video-Bildverarbeitungsgerät, Fa. Intas, Göttingen) fotografiert. Für präparative Zwecke wurde die DNA aus dem Gel eluiert.

#### Tris-Acetat-Puffer :

40mM Tris/ HAc, pH 7,5  
1mM EDTA

5 x Stopp-Puffer:

15% (w/v)	Ficoll
50 mM	EDTA
0,5% (w/v)	SDS
0,025% (w/v)	Bromphenolblau
0,025% (w/v)	Xylenblau

Ethidiumbromid-Lösung:

5 mg/ ml Ethidiumbromid

**2.2.4.5. Elution von DNA-Fragmenten**Methode 1

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstückchen wurden selbstgemachte Säulchen mit Polyesterwolle verwendet. In 0,5 ml Eppendorfgefäße wurde an der unteren Spitze ein Loch gebohrt und mit Polyesterwolle zur Hälfte gestopft. Diese Säulchen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten, auf die Säulchen gegeben und 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Volumen des Säulendurchlasses bestimmt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. abs. Ethanol für die DNA-Fällung versetzt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und im adäquaten Volumen dist. Wasser oder TE-Puffer gelöst.

Methode2

Größtenteils wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen mit Hilfe von QIAquick Gel Extraction Kit oder MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

#### 2.2.4.6. Quantifizierung und Lagerung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte entweder durch Abschätzung in einem Agarosegel oder durch Messung der Absorption der Nukleinsäurelösung im Spektralphotometer (Photometer Ultrospec III, Pharmacia).

Die Mengenabschätzung in einem Agarosegel erfolgte im optischen Vergleich mit einem Mengenstandard (1 kb-Längenmarker der Firma GibcoBRL, Eggenstein) an der Färbung mit Ethidiumbromid. Für eine genauere Abschätzung wurde die Software NIH-Image verwendet. Dafür wurde das Abbild des Agarosegels auf einer Diskette gespeichert und mit dem Programm analysiert.

Der Nukleinsäuregehalt konnte über die Absorption bei 260 nm quantifiziert werden. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Abnahme der Lichtintensität der Schichtdicke des absorbierenden Mediums proportional zu der Konzentration der absorbierenden Verbindungen. Es wurde ein Aliquot der isolierten Nukleinsäure 1 : 50 mit dem Wasser verdünnt und die Absorption (E) bei 260 nm gemessen (E = 0,05 entspricht 1 µg Oligonukleotide/ ml, E = 0,025 entspricht 1 µg RNA/ ml, bzw. 1 µg einzelsträngige DNA/ ml und E = 0,02 entspricht 1 µg doppelsträngige DNA/ ml.). Die Messung erfolgte in einer Küvette gegen das Wasser als Nullabgleich. Verunreinigungen der Lösung, beispielsweise durch Proteine, ließen sich aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm abschätzen, wobei der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  zwischen 1.6 und 1.9 liegen sollte. Zusätzlich konnte eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über Verunreinigungen durch Phenol oder Kohlenhydrate geben. Dabei sollte das Verhältnis der Werte bei 260 nm und 230 nm ungefähr zwei sein.

#### **2.2.4.7. Kapillartransfer von DNA auf Nylonmembran (Southern Blot)**

Es wurden zwei Protokolle für den Transfer von DNA auf Nylonmembran angewandt. Um PCR-Produkte nachweisen zu können, wurde der alkalische Blot angewendet. Für den genomischen Southern Blot wurde ein mit Hochsalzpuffer verwendet.

Die zu untersuchende DNA-Probe wurde bis zur ausreichenden Auftrennung in einem entsprechend prozentigen Agarosegel horizontal getrennt. Nach der Dokumentation des Bandenmusters wurde das Gel für den Blot vorbereitet.

#### **2.2.4.8. Blotten mit alkalischem Puffer**

Für den *Southern*-Blot mit alkalischem Puffer wurde die Hybond™ –N+ Nylon-Membran (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, England) verwendet. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch den Transferpuffer.

Das Gel wurde in 0,4 N NaOH eine 1/2 Stunde lang geschwenkt. Der Transferstapel wurde wie folgt aufgebaut: In eine Wanne wurde 0,4 N NaOH eingegossen, so dass der Boden gut bedeckt war. Auf diese Wanne wurde eine Glasplatte aufgelegt, die mit einem Stück Whatman-Papier bedeckt wurde. Beide Enden dieser Brücken waren im 0,4 N NaOH in der Wanne eingetaucht und das Whatman-Papier wurde mit 0,4 N NaOH benetzt. Luftblasen wurden entfernt. Auf diese Brücke wurde das Agarosegel mit der Oberseite nach unten luftblasenfrei gelegt. Die mit 0,4 N NaOH benetzte Membran wurde vorsichtig auf dem Gel positioniert. Das Gel wurde mit Parafilm rundherum abgedichtet, um einen Flüssigkeitsfluss am Gel vorbei zu verhindern. Es folgten 4 Lagen im 0,4 N NaOH getränkten Whatman-Papier, ein 5 cm großer Stapel von Küchenpapier und zum Beschweren eine Glasplatte mit zusätzlichen ca. 1 kg Gewicht. Eine derartige Anordnung ermöglichte einen optimalen, durch Diffusionskräfte getriebenen Sog des Puffers durch das Gel und damit einen guten Transfer der DNA auf die Membran. Der Transfer der DNA erfolgte 12 bis 16 h.

Anschließend wurde die DNA durch den UV Stratalinker 2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) fixiert.

Transferpuffer:

0,4 N NaOH

**2.2.4.9. Blotten mit Hochsalzpuffer**

Bei dieser Blot-Methode wird der 20 x SSC-Puffer unter Ausnutzung der Kapillarkräfte durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Die DNA wandert mit und wird an die Membran gebunden.

Nachdem das Gel für 30 min denaturiert worden war, wurde es einmal mit Leitungswasser gespült und für 20 min neutralisiert. Anschließend wurde der Transferstapel aufgebaut. In eine Wanne wurde 20 x SSC gefüllt und mit einer Glasplatte abgedeckt. Ein Stück Whatman Papier wurde über die Glasplatte gelegt, so dass es auf beiden Seiten in den Puffer eintauchte. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das mit 20 x SSC getränkte Whatman Papier gelegt und die Luftblasen mit einer 10 ml Pipette entfernt. Die Membran, die auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten worden war, wurde kurz in 20 x SSC getaucht und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Das Gel wurde mit Parafilm abgedichtet. Die Membran (Hybond<sup>TM</sup> -N+ Nylon-Membran, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, England) wurde mit 4 Lagen in 20 x SSC getränkten, zurechtgeschnittenen Whatman Papier und mit einem ca. 5 cm hohen Stapel Küchenpapier bedeckt. Zur Beschwerung wurden eine Glassplatte und ein Gewicht von ca. 1 kg aufgelegt. Der Aufbau wurde 12 bis 16 h geblottet. Nach dem Blotten wurde die DNA mit dem UV Stratalinker 2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) fixiert.

Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

1 M NH<sub>4</sub>Ac  
10 mM NaOH

20 x SSC:

0,3 M Na-Citrat  
3 M NaCl

**2.2.4.10. Hybridisierung**

Zur Hybridisierung der auf Nylonmembranen (Biodyne B-Membran, PALL Gelman Laboratory, Dreieich oder Hybond™ –N Nylon-Membran, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, England)) fixierten DNA (2.2.4.7) mit der radioaktiv markierten Sonde wurden die Membranen zunächst für mindestens 2 h bei 65°C in Hybridisierungslösung mit 1/100 Volumen 0,01% denaturierten Heringssperm-DNA vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde (2.2.5.7) wurde für 10 min bei 95°C denaturiert und zur Vorhybridisierung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Rotationshybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg). Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurden Waschungen der Membranen mit ansteigender Stringenz durchgeführt: Es wurde zweimal für 30 min bei 65°C mit Waschlösung I und einmal für 10 min mit Waschlösung II gewaschen. Der noch feuchte Filter wurde in einem Gefrierbeutel eingeschweißt und auf einem frisch gelöschten Phosphorscreen (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Stärke des erwarteten Signals, i.d.R. reichte eine Exposition über Nacht.

20x SSC:

0,3 M Na-Citrat  
3 M NaCl  
pH 7,5

100x Denhardt's:

2% (w/v)	Ficoll
2% (w/v)	PVP (M <sub>r</sub> 40.000)
2% (w/v)	BSA

Hybridisierungslösung:

6x	SSC
3x	Denhardt's
0,5% (w/v)	SDS

Waschlösung I:

2x	SSC
0,1% (w/v)	SDS

Waschlösung II:

0,2x	SSC
0,1% (w/v)	SDS

## 2.2.5. Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.2.5.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den von den Herstellern mitgelieferten Puffern. Es wurde 1 – 3 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Enzymaktivität pro 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg der angegebenen Substrat-DNA in 60 min bei der korrekten Temperatur und im korrekten Puffer in einem 50 µl-Ansatz vollständig zu verdauen. Der Restriktionsansatz wurde für 1-3 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Das Endvolumen des Ansatzes entsprach etwa dem 1,5-10-fachen der Menge der eingesetzten DNA-Lösung. Es war darauf zu achten, dass das eingesetzte Restriktionsenzymvolumen nicht

größer als 1/10 des Gesamtvolumens war, da das Glycerin in der Enzymlösung sonst hemmend auf die Enzymaktivität wirkt.

#### **2.2.5.2. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen an DNA-Enden**

Zu dem linearisierten Vektor wurden 1 U SAP (alkalische Phosphatase aus Shrimps; „*shrimp alkaline phosphatase*“) und 1 x Dephosphorylierungspuffer in einem Volumen von 10 µl hinzugefügt. Der Ansatz mit glatt endenden („*blunt-ends*“) DNA-Fragmenten wurde für 60 min bei 65°C, der mit überhängend endenden („*sticky-ends*“) DNA-Fragmenten für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP für 15 min bei 65°C inaktiviert.

#### **2.2.5.3. Phosphorylierung von PCR-Produkten**

Die Phosphorylierung von DNA-Inserts wird für die Ligation von PCR-Produkten in einen Vektor benötigt. Die PCR-Produkte werden an den 5'-Enden durch die „T4 Polynucleotide Kinasen“ (Promega) phosphoryliert. Die Phosphorylierung von 250 ng DNA-Inserts wurde mit 1 x Kinase Puffer, 5 µm ATP und 15 U T4 Polynucleotide Kinase in einem Endvolumen von 40 µl durchgeführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt, mit Phenol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in ein adäquates Volumen dist. Wasser oder TE aufgenommen.

#### **2.2.5.4. Erzeugung glatter DNA-Enden durch *Fill in***

Mit Restriktionsenzymen behandelte DNA kann, je nach Schnittstelle des Enzyms, 3'- oder 5'-überhängende Enden aufweisen. Durch die *Pfu* DNA-Polymerase können überhängende Enden in glatte überführt werden. Das Enzym besitzt eine 5' → 3'-Polymeraseaktivität, welche 5'-überhängende Enden auffüllt und eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, die 3'-überhängende

Enden abbaut. Es wurden 2-10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 x *Pfu*-Puffer mit 1 mM dNTPs, und 2,5 U *Pfu* DNA-Polymerase versetzt. Die Reaktion wurde für 10 min bei 72°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA entweder phenolisiert, gefällt und in ein adäquates Volumen Wasser (bidest) aufgenommen oder über die Säulchen des Qiagen PCR Purification Kits gereinigt.

#### **2.2.5.5. Ligation von DNA-Enden**

Bei einer Ligation werden DNA-Enden verbunden. Die T4-DNA-Ligase (GibcoBRL, Karlsruhe, D) katalysiert diese Verknüpfung zwischen einem 3'-OH-Ende und einer 5'-Phosphatgruppe am anderen Ende. Die Ligase wird durch ein ATP adenyliert. Das Enzym adenyliert daraufhin das endständige 5'-Phosphat und ermöglicht so, über einen nukleophilen Angriff, eine Phosphodiesterbindung (Nicholl, 1995). Dabei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden.

Für Ligationen in einen linearisierten Vektor wurden 50-100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Das DNA-Fragment und der Vektor wurden im molaren Verhältnis 4 : 1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 x Ligationspuffer (GibcoBRL, Karlsruhe, D) gemischt und mit 1-2 U T4-DNA-Ligase (GibcoBRL, Karlsruhe, D) versetzt. Es wurde immer eine Kontroll-Ligation angesetzt, die nur linearisierte Vektor-DNA enthielt. Damit wurde die Religationsrate bestimmt. Die Reaktion wurde ü.N. bei 15°C durchgeführt. Anschließend wurde der ganze Ligationsansatz für die Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt.

#### **2.2.5.6. Gateway® Klonierung**

Die Gateway® Technologie ist eine universelle Methode, die sich der Eigenschaften der seitenspezifischen Rekombination der Bakteriophage lambda bedient. Ein bestimmtes Gen wird zuerst in den „Entry vector“ (z.B. pENTR™/D- Topo®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) kloniert. Dieser „Entry vector“ verfügt über zwei Rekombinationsstellen (*attL1* und *attL2*), welche die

zu klonierende Sequenz flankieren und einer Kanamycin Resistenz. Aus diesem „*Entry vector*“ wird das zu untersuchende Gen in einen anderen Vektor „*Destination vector*“ durch Rekombination umkloniert. Der „*Destination vector*“ enthält auch zwei Rekombinationsstellen (*attR1* und *attR2*), die an das Gen für eine negative Selektion (*ccdB*) angrenzen und Eigenschaften im Interesse der weiteren Verwendung des zu bearbeitenden Gens (z.B.: Proteinexpression, GFP-Fusion, etc.) enthält. Die Rekombination an den Rekombinationsstellen dieser beiden Vektoren wird durch die LR Clonase™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) bewerkstelligt. Sie ist gezielt und spezifisch. Durch die verschiedenen Resistenzen der Vektoren und der negativen Selektion wird nur das gewünschte Plasmid erhalten.

Die Klonierung des Gens von Interesse in dem „*Entry vector*“ (z.B. pENTR™/D-Topo®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) und die LR Reaktion mit der LR Clonase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.5.7. Radioaktive Markierung von DNA**

30 µl DNA-Insert (20-100 ng DNA) wurden mit 10 µl Labelling-Mix für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 20-30 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP, 2 µl BSA (1mg/ml) und 3 U 'Klenow-Fragment' zugegeben.

Der Ansatz wurde ü.N. bei 30°C oder 2 h bei 37°C inkubiert.

Der Einbau der Radioaktivität wurde durch eine TCA-Fällung bestimmt. 1 µl Labellingansatz wurden mit 10 % (w/v) TCA und 0.1 mg Heringssperm-DNA in einem Gesamtvolumen von ca. 400 µl 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. Das Pellet enthielt die intakte DNA. Im Überstand befanden sich Fragmente und nicht eingebaute Nukleotide, inklusive der radioaktiven dATPs. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und getrennt vom Pellet mit einem Messgerät (Berthold LB 122) die radioaktiven Zerfälle gemessen. Anschließend wurde das Verhältnis der radioaktiven Zerfälle vom Sediment

zum Überstand bestimmt. Der Einbau des jeweiligen radioaktiv markierten dNTPs sollte über 80 % betragen.

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Säule (MicroSpin S-200 HR, Amersham Pharmacia Biotech) nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie von der Sonde getrennt. Die Gelmatrix in den Säulen wurde vor Gebrauch kräftig geschüttelt. Dann wurde der Deckel der Säule gelöst, der untere Verschlussstopfen abgebrochen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Durch Zentrifugation für 1 min bei 720x g wurde die Säule äquilibriert. Der radioaktive Reaktionsansatz wurde in die Mitte der Matrix gegeben und die Säule für 2 min bei 720x g zentrifugiert, so dass die markierten DNA-Moleküle, die von den nicht eingebauten Desoxynukleotiden und Salzen getrennt wurden, in einem frischen Eppendorfgefäß gesammelt wurden. Der Ansatz konnte nach einer 10-minütigen Denaturierung bei 95°C für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

#### Lösung A :

1,25 M Tris/ HCl, pH 8,2  
0,125 M MgCl<sub>2</sub>  
2% (w/v) 2-Mercaptoethanol  
je 0,5 M dCTP, dGTP, dTTP

#### Lösung B:

2 M HEPES/ NaOH, pH 6,6

#### Lösung C:

3,6 µg/ µl Hexadesoxynukleotide (dN<sub>6</sub>)

#### 5 x Labelling-Mix:

Lsg. A : Lsg. B : Lsg. C  
100 : 250 : 100

### 2.2.6. PCR

Ein Standard-Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l 1 x PCR-Puffer (Qiagen oder Takara) 10-100 ng Matrizen-DNA, je 100 ng zweier verschiedener Desoxyoligonukleotide, sowie 0,5  $\mu$ l eines dNTP-Gemisches (je 100  $\mu$ M) und 2.5 U *Taq*-Polymerase. Für Ansätze mit kleineren oder größeren Volumina wurden die Mengen entsprechend angeglichen.

Aus allen Komponenten wurde auf Eis ein Prämix hergestellt, der zu der in PCR-Gefäßen vorgelegten DNA hinzugefügt wurde. Der Thermocycler wurde bis zur Denaturierungstemperatur aufgeheizt und die Ansätze sofort aus dem Eis in die beginnenden Zyklen der PCR-Reaktion gestellt. Ein Initialdenaturierungsschritt dauerte in der Regel max. 4 min. Es schlossen sich die Temperaturzyklen, deren Anzahl von der zu untersuchenden Probe abhängig war, zur Amplifikation der DNA an. Die Proben waren bei 4-6°C lagerbar.

Ein Aliquot der PCR-Reaktion wurde auf einem Agarosegel analysiert. Je nach Verwendung wurde der gesamte Ansatz aufgetragen und aus dem Agarosegel eluiert.

### 2.2.7. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems GmbH), einem Mikroprozessor gesteuerten Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-System, durchgeführt.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger, 1997).

Die PCR enthielt in einem Volumen von 10  $\mu$ l 0.8-3  $\mu$ l doppelsträngige DNA (ca. 100 ng), 3-10 pmol Oligonukleotid, deren komplementäre Sequenz auf der Matrizen-DNA lag und 2  $\mu$ l Sequenzierungsprämix '*BigDye*' (ABI). Die DNA durfte keine Salze, Ethanol oder Phenolrückstände enthalten. Vorwiegend wurde DNA verwendet, die mittels Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D) isoliert worden war.

Die spezifische Markierung des zu sequenzierenden DNA-Fragments fand in einer zyklischen Sequenzierung im Thermocycler (Perkin Elmer 9600) statt.

Die Temperaturzyklen waren wie folgt:

96°C	20 sec		
-----			
96°C	10 sec		
50°C	5 sec	⇒	25 Zyklen
60°C	4 min		
-----			
4°C	∞		

Nach der Amplifikation wurden die Proben in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt, welche 90 µl HPLC-Wasser, 10 µl 3 M Na-Acetat, pH 5.0 und 250 µl Ethanol (abs.) enthielten. Die Fällung erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417). Das Sediment wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann 5-10 min im Exsikkator getrocknet. Anschließend wurde es in 20 µl TSR-Puffer (Perkin Elmer) resuspendiert. Die Proben waren bei 4°C lagerfähig. Vor der Sequenzanalyse im ABI-PRISM™ 310 Diagnostics v1.0 (Macintosh) wurden die Proben für 2 min bei 95°C denaturiert und in ABI 310-geeignete Gefäße überführt.

## **2.2.8. Extraktion und Präparation von RNA**

### **2.2.8.1. RNA-Isolierung mit Trizol**

Für die RNA Extraktion mit Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 50 – 100 mg Pflanzenmaterial je Eppi abgewogen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde entweder mit einem Bohrer oder im Mörser unter Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz homogenisiert. Nach einer Inkubation (5 min bei RT) der Proben wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 sec geschüttelt. Es erfolgten eine kurze Inkubation von 2 min bei RT und eine Zentrifugation bei 4°C, 12 000g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 7500g, 5 min). Nach der Zentrifugation wurde das RNA Pellet mit Ethanol gewaschen

und an der Luft 15 bis 20 min getrocknet. Das trockene RNA Pellet wurde in H<sub>2</sub>O/DEPC resuspendiert.

### **2.2.8.2. Quantifizierung und Lagerung von RNA**

Der RNA-Gehalt konnte über die Absorption bei 260 nm quantifiziert werden (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich). Dazu wurde ein Aliquot der RNA-Präparation 1:50 mit DEPC-H<sub>2</sub>O in einem Volumen von 100 µl verdünnt und die Absorption bei 260 nm, sowie das Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm bestimmt. Hierfür wurde folgende Formel benutzt, um die RNA-Konzentration zu bestimmen:  $((E_{260}-0,0011)/0,0068)*50*0,8 = \text{ng}/\mu\text{l}$  Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gibt die Verunreinigung der Proben mit Proteinen an. Liegt der Wert zwischen 1,6 und 1,7, so ist die RNA-Präparation sehr rein. Zusätzlich konnte eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über die Verunreinigung mit Phenol oder Kohlenhydraten geben.

### **2.2.8.3. Agarose-Gelelektrophorese von RNA**

#### **2.2.8.3.1. Zur Kontrolle der RNA-Qualität**

Um die Qualität der RNA für RT-PCR zu überprüfen, wurden Agarosegele (s. 2.2.4.4) ohne Formaldehyd zur Auftrennung von RNA verwendet. Für den RNA-Probeauftrag wurden 4 µl der RNA-Probe mit 1,5 µl Ethidiumbromid (1:100) und mit 10 µl Glyoxal Loading Dye (Ambion, Austin, USA) versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde alles auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.8.3.2. Für Northern Blot

Zur Vermeidung von RNA-RNA-Heteroduplexen und Sekundärstrukturen wurde die RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt. 1,5 g Agarose wurde mit 100 ml bidest Wasser gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 8 ml einer 37 %igen (w/v) Formaldehydlösung (Endkonzentration: 2% (v/v)) und 12 ml 10 x RB hinzu gegeben. Die Gellösung wurde in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen und nach dem Erstarren in eine mit 1 x RB-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die RNA-Proben wurden, wenn es möglich war, auf gleiche RNA-Mengen (im Durchschnitt auf einen RNA-Gehalt von 20 – 40 µg) eingestellt und auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O-DEPC aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 12 µl Formaldehyd, 40 µl Formamid und 10 µl 10 x RB-Puffer. Die RNA-Proben wurden für 15 min in einem Heizblock (Eppendorf thermomixer 5436) bei 65°C denaturiert, anschließend abgekühlt und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach einer kurzen Zentrifugation (ca. 30 sec) wurden die Proben auf das denaturierende Agarosegel aufgetragen und bei konstant 180 mA in 2 – 3 h mit 1 x RB als Laufpuffer aufgetrennt.

#### 10 x RB:

200 mM	Mops , pH7.0/ NaOH)
50 mM	Na-Acetat
5 mM	EDTA

### 2.2.8.4. Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA und der Dokumentation des Gels, folgte der Transfer der RNA aus dem Gel auf eine Membran (Biodyne B Transfer Membrane, Pall Europe Limited, Portsmouth, England). Dabei wurde weitestgehend nach Abschnitt 2.2.4.7 vorgegangen. Das RNA-Gel wurde

allerdings ohne weitere Behandlung nach der Gelelektrophorese direkt für den Blotaufbau verwendet und als Transferpuffer 10 x SSC eingesetzt.

#### **2.2.8.5. Northern-Hybridisierung**

Die Hybridisierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Church (Church, 1984). Hierzu wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre für 30 min bei 68°C im Rotationshybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg) vorhybridisiert. Es wurde der sogenannte Church-Puffer als Hybridisierungslösung verwendet. Die denaturierte Sonde wurde zur Prähybridisierung zugegeben. Für die Hybridisierung sollte ein möglichst kleines Volumen (25 – 50 ml) gewählt werden (gerade so groß, dass die Membranen ausreichend benetzt wurden) und erfolgte über Nacht bei 58°C in dem Rotationshybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg). Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit steigender Stringenz gewaschen. Die Reihenfolge des Waschens war:

6x SSC, 0,5% SDS, 5 min, RT

4x SSC, 0,5% SDS, 5 min, RT

2X SSC, 0,5% SDS, 5min, RT

Das letzte Waschen erfolgte mit 2% SSC, 0,5% SDS bei 65°C im Wasserbad für maximal 15 min.

#### Hybridisierungslösung (Church-Puffer):

1 mM	EDTA
0,5 M	NaP <sub>i</sub> , pH 7.2
7% (w/v)	SDS

### 2.2.9. RT-PCR

RT-PCR besteht aus drei Schritten: DNase-Verdau, Reverse Transkription und RNase H-Verdau, wobei auf den RNase H-Verdau verzichtet wurde, weil nur kleine cDNA-Fragmente erwartet wurden.

Für den DNase Verdau wurden 1 – 2 µg RNA eingesetzt, die mit 10 U RNase-freier DNase I (Roche, Mannheim GmbH) im 1 x First Strand Buffer (FSB) für 15 min bei 37°C inkubiert wurden. Das Enzym wurde durch die Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 2,5 mM) und nachfolgender Hitze-Denaturierung inaktiviert. Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription enthielt 1 µg Oligo dT18 (BRL), jeweils 0,5 mM dNTPs, 10 mM DTT und 200 U Reverse Transkriptase (RT) in einem Endvolumen von 50 µl. Die RT, Oligo dT18, DTT und FSB sind Bestandteile von dem Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase Kit (GIBCO BRL). Nach einer Inkubation von 1 h bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15 min denaturiert. Als DNA-Vorlage in der nachfolgenden PCR wurde 1/25stel dieses Ansatzes eingesetzt.

### 2.2.10. Physiologische Methoden

#### 2.2.10.1. Stärkefärbung

Zum Ende der Lichtperiode wurden ein bis zwei Blätter einer entsprechenden Pflanze mit einem Skalpell abgetrennt und in 80% Ethanol bei 60°C gebleicht. Der ethanolische Überstand wurde dann entfernt, und die gebleichten Blätter wurden in Jod-Kaliumjodidlösung (modifiziert nach Caspar et al., 1985) gefärbt.

#### Jod-Kaliumjodidlösung

5,7 mM	doppelt sublimiertes Jod
43,4 mM	Kaliumjodid

Kaliumjodid wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, bevor das Jod zugegeben wurde.

### 2.2.10.2. Bestimmung von Stärke und löslichen Zuckern

Zur Bestimmung der Stärkegehalte (Lin, 1988) in den Blättern wurden ganze Rosetten (0,04-0,12 g) in je 1 ml 80% Ethanol zweimal für 15-30 min auf 60-80°C erhitzt, bis alle Pigmente entfernt waren.

Die ethonolischen Extrakte wurden für die Bestimmung der löslichen Zucker verwendet, indem sie vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator (Fa. Bachofer, Reutlingen) getrocknet wurden. Die Reste wurden in 0,2 ml Wasser gelöst und das unlösliche Material durch Zentrifugation (20.000g für 10 min) präzipitiert und verworfen.

Die Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose in der Wasser/Ethanol-löslichen Fraktionen wurden nach Bergmeyer (1970) bestimmt. Die enzymatische Messung löslicher Zucker erfolgte nach der Endproduktmessung mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät SpectroFlour Plus (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich) im Absorptionsmodus.

Für die quantitative Hydrolyse der Stärke wurde das gebleichte Material in 0.25 ml 0.2 M KOH homogenisiert und nach Zugabe von weiteren 0.25 ml 0.2 M KOH bei 95°C für 45 min inkubiert. Der pH-Wert des Extraktes wurde durch Zugabe von 1 M Essigsäure auf pH 5.5 eingestellt. Die Stärke wurde über Nacht zu Glukose abgebaut, indem sie mit 17 U  $\alpha$ -Amylase und 2,5 U Amyloglucosidase (in Na-Acetat-Puffer pH 4.6) inkubiert wurde. Der Ansatz wurde zur Denaturierung der Enzyme 10 min bei 90°C erhitzt und für eine Minute in der Sorvall MC 12V bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur enzymatischen Messung des Glukosegehaltes bei -20°C gelagert.

#### Bestimmung von Glukose

Reaktionsansatz:	100 mM	Hepes , pH7,5
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2 mM	ATP
	0,8 mM	NADP <sup>+</sup>
	10-30 $\mu$ l	Extrakt
	2 U	Glukose 6-P-Dehydrogenase

Die Reaktion wurde mit 0,5 U Hexokinase gestartet. Die Messung erfolgte mit dem SpectraFluor Plus Mikrotiterplatten-Lesegerät (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich) im Absorptionsmodus von 340 nm.

#### Bestimmung von Fruktose

Der Testansatz entsprach dem zur Glukosebestimmung mit dem Unterschied, dass nach Abschluss der Hexokinase-reaktion dem Testansatz 2U Phosphoglukose-Isomerase hinzugefügt wurden. Nach Beendigung dieser Reaktion ließ sich der Gehalt an Fruktose aus der Extinktionsdifferenz berechnen.

#### Bestimmung von Saccharose

Der Testansatz entsprach dem zur Fruktosebestimmung mit dem Unterschied, dass nach Abschluss der Phosphoglukose-Isomerase-Reaktion dem Testansatz 100U Invertase hinzugefügt wurde. Nach Beendigung dieser Reaktion ließ sich der Gehalt an Saccharose aus der Extinktionsdifferenz berechnen.

### **2.2.10.3. Bestimmung von PGI-Aktivitäten in *Arabidopsis* Extrakten**

Für den Enzymtest wurden Blattrosetten von Pflanzen im Alter von 6-10 Wochen eingesetzt. Das Frischgewicht der Blattrosetten wurde bestimmt, und das Material wurde sofort in 650 µl eiskaltem Extraktionsmedium im Mörser mit Pistill extrahiert. Die Extrakte wurden durch Zentrifugation von Partikeln getrennt (8000g, 5 min, 4°C). Der klare Überstand wurde zur Messung verwendet. Das Volumen jeder Probe wurde halbiert und eine Hälfte der Hitzbehandlung bei 50°C zur Inaktivierung der plastidären PGI Aktivität unterzogen.

Die PGI Aktivität wurde nach der modifizierte Methode von Jones (Jones et al., 1986) bestimmt. Zu 10 µl des Extraktes wurden 90 µl Reaktionsansatz und 100 µl Wasser zugefügt. Die Messung wurde mit dem SpectraFluor Plus

Mikrotiterplatten-Lesegerät (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich) im Absorptionsmodus von 340 nm durchgeführt.

Reaktionsansatz:

50 mM	Hepes/NaOH pH 7,4
3,3 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,85 mM	NADP
0,9 mM	EDTA
3,3 mM	Frk6pP

Die Messung wurde mit dem Extrakt gestartet.

Extraktionsmedium:

0,1 M	Hepes pH 7,5/KOH
1 mM	EDTA
5 mM	2-Mercaptoethanol
50 µg/ml	PMSF

### **2.2.11. Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie**

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden Staubblätter von Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet und mit 2% Glutaraldehyd Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Die Proben wurden in 1% Osmiumtetroxid Lösung für 8 h auf Eis nachfixiert, in abgestuften Aceton-Reihen mit einem Schritt mit 1% Uranylacetat (50% Aceton, 2 h) dehydriert, in Spurr's resin eingebettet und bei 50°C für ~72 h polymerisiert. Ultradünne Schnitte (60 bis 70 nm) wurden mit dem Diamantmesser (Micro Star, Huntsville, TX) auf einem Leica Ultracut UCT Mikrotom (Leica Microsystems, Wien, Österreich) geschnitten und auf mit Pioloform bezogenen Kupfergittern befestigt. Die Schnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat (Reynolds, 1963) gefärbt und mit Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, d) bei 80 kV betrachtet. Mikrographen wurden mit So-163 EM film (Kodak, Rochester, USA) aufgenommen.

Für die Raster-Elektronenmikroskopie wurden freigesetzte Pollenkörner auf Säulchen befestigt und Goldpartikeln überzogen (S150A; Edwards, Crawley UK). Die Proben wurden mit dem Raster-Elektronenmikroskop (XL 30 ESEM;

Philips, Eindhoven, Niederlande) bei einer beschleunigten Spannung von 15 kV untersucht.

Die Untersuchung zur Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie wurde von Stefan Geimer (Uni Bayreuth) durchgeführt.

## **2.2.12. Transformation von Protoplasten**

### **2.2.12.1. Anzucht einer Tabak-BY2-Zellsuspension**

Die verwendeten BY2-Suspensionskulturen stammen aus *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2. Die BY2-Suspensionskulturen wurden für vier Tage in 70 ml BY2-Zellkulturmedium in einem Schüttler bei 120 U/min und 22°C und unter Lichtausschluß herangezogen.

#### BY2-Zellkulturmedium:

4,3 g/l	MS-Salze
30 g/l	Saccharose
100 mg/l	myo-Inositol
1 mg/l	Thiamin-HCl
0,2 mg/l	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
255 mg/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
mit KOH auf pH 5,0 eingestellt und autoklaviert	

### **2.2.12.2. Protoplastierung einer Tabak-BY2 Zellsuspension**

Von einer vier Tage alten BY2-Zellkultur (2.2.12.1) wurden für zwei Parallelansätze jeweils 20 ml mit einer weit geöffneten Plastikpipette (Corning, New York, NY, USA) entnommen und in 50 ml Falcons (Corning, New York, NY, USA) überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei RT und 400 g schonend pelletiert. Bei allen Zentrifugationen in diesem Protokoll wurde die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml Waschlösung resuspendiert. Es folgte erneut eine wie oben beschriebene Zentrifugation und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 13 ml Verdauungslösung resuspendiert und der Ansatz in 90 mm Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt. Diese wurden mit Parafilm

(American National Can, Chicago, Illinois, USA) abgedichtet und für den Zellwandverdau über Nacht bei 26°C abgedunkelt.

Waschlösung:

0,5 % (w/v)	BSA
0,01 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
50 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	Na Acetat pH 5,8
0,25 mM	Mannitol
	steril filtriert

Verdaulösung:

Waschlösung, der folgende Enzyme hinzugefügt wurden:

1 % (w/v)	Cellulase Onozuka RS (Serva, Heidelberg, D)
0,5 % (w/v)	Macerozyme OnozukaR-10 (Serva, Heidelberg, D)
0,1 % (w/v)	Pectinase (Sigma-Aldrich, München, D) steril filtriert

### **2.2.12.3. PEG-vermittelte Transfektion von BY2-Tabakprotoplasten**

Die PEG-Lösung wurde bei 37°C aufgetaut und für einige Stunden inkubiert. Alle nachfolgend verwendeten Lösungen wurden auf RT temperiert.

Die Petrischalen mit den BY2-Tabakprotoplasten wurden nach der Inkubation über Nacht drei Mal alle 10 min vorsichtig geschwenkt, um die Zellwände von den Protoplasten zu lösen. Die Protoplasten wurden mit einer weiten geöffneten Plastikpipette vorsichtig in ein 50 ml Falcon überführt und bei RT mit 100 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein kleines Restvolumen abgenommen, langsam 25 ml Waschlösung hinzugegeben und sehr vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde wie im letzten Schritt zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder bis auf ein kleines Restvolumen abgenommen. Nun wurden in 1 ml Schritten insgesamt 10 ml W5-Lösung zugegeben und das Pellet dabei resuspendiert. Erneut wurden die Protoplasten wie beschrieben pelletiert. Nach einer möglichst vollständigen Abnahme des Überstandes

wurden zum ersten Ansatz 5 ml, zum zweiten 10 ml W5-Lösung in 1 ml-Schritten zugegeben.

Die Protoplastendichte konnte nun mit einer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D) bestimmt werden. Es wurden je Ansatz 10  $\mu$ l Protoplasten in die Neubauer Zählkammer pipettiert und ausgezählt. Von jedem Ansatz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Mit folgender Formel wurde die Zellzahl der Protoplastensuspension bestimmt:

Zellzahl = bestimmte Zellzahl x Kammerzahl ( $10^4$ ) x Volumen Zellsuspension (ml)

Die Protoplastensuspension wurde für 60 min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten wie oben beschrieben pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Protoplasten wurden in 1 ml Schritten vorsichtig in insgesamt 10 ml MMM-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde erneut wie zuletzt beschrieben zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun wurde die Konzentration der Protoplasten durch Zugabe von MMM-Lösung, unter Berücksichtigung der ermittelten Zellzahl, auf  $10^6$  Zellen pro 300  $\mu$ l Zellsuspension eingestellt. Die Protoplasten waren nun bereit für die Transformation.

In einem 50 ml Falcon-Gefäß wurden 25  $\mu$ g der zur Transfektion bestimmten Midi-Präp DNA (2.2.3.1) in einem Volumen von nicht mehr als 30  $\mu$ l vorgelegt. 300  $\mu$ l Protoplastensuspension (entspricht  $10^6$  Zellen) wurden zum vorgelegten Transformationsansatz gegeben. Es wurden 300  $\mu$ l PEG-Lösung tropfenweise sehr vorsichtig zugegeben, nach Möglichkeit nicht direkt auf die Zellen unter ständigem Drehen des Gefäßes. Danach mußte der Ansatz für 20 min bei RT inkubieren. Zum Abstoppen der Transfektion wurden 10 ml W5-Lösung, in Schritten von 1 ml, 2 ml, 3ml und 4 ml vorsichtig und unter ständigem Drehen des Falcons zugegeben. Die Protoplasten wurden erneut bei 100 g und RT für 5 min zentrifugiert und anschließend der gesamte Überstand verworfen. Es wurden in 0,2 ml, 0,5 ml und in 1 ml Schritten insgesamt 4 ml K3-Medium vorsichtig und unter ständigem Drehen hinzugegeben. Nach der ersten Zugabe wurde bis zum nächsten Schritt 2 min gewartet. Die Zellsuspension inkubierte abschließend für 2 min bei RT. Die Protoplasten wurden in 45 mm Petrischalen

überführt und mit Parafilm verschlossen. Die Protoplasten inkubierten abgedunkelt über Nacht bei 22-26°C.

An den folgenden zwei Tagen wurden die der Transfektion unterzogenen Protoplasten unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und die subzelluläre Lokalisation dokumentiert.

W5-Lösung:

154 mM	NaCl
125 mM	CaCl <sub>2</sub>
5 mM	KCl
5 mM	Glucose

mit KOH oder HCl auf pH 5,8 - 6 eingestellt

steril filtriert

MMM-Lösung:

15 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5 % (w/v)	MES-KOH pH 5,8
0,5 M	Mannitol

steril filtriert

PEG-Lösung:

40 % (w/v)	PEG 4000
0,4 M	Mannitol
0,1 M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

mit KOH auf pH 8 - 9 eingestellt

sterilfiltriert

K3-Medium (Stammlösungen):

Makroelemente:

1,5 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
9 g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
25 g	KNO <sub>3</sub>
2,5 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
1,34 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2,5 g	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
ad 1l	mit H <sub>2</sub> O

sterilfiltriert

Mikroelemente:

75 mg KI  
300 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
1 g  $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
200 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
25 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
2,5 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$   
2,5 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$   
ad 1l mit  $\text{H}_2\text{O}$   
sterilfiltriert

Vitamine:

100 mg Nicotinacid  
100 mg Pyridoxin-HCl  
1 g Thiamin-HCl  
ad 1l mit  $\text{H}_2\text{O}$   
sterilfiltriert

EDTA/Eisen:

7,46 g EDTA in 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, gekocht  
5,56 g  $\text{Fe(II)SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  in 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , gekocht  
ad 1l mit  $\text{H}_2\text{O}$   
autoklaviert

Ca-Phosphat:

1,26 g  $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst  
pH mit 25 % HCl auf pH 3 eingestellt  
autoklaviert

Naphtylessigsäure (NAA):

1 mg/ml Naphtylessigsäure in  $\text{H}_2\text{O}$   
einige Tropfen NaOH zugeben  
sterilfiltriert

Kinetin:

0,5 mg/ml Kinetin in 0,1 M HCl  
sterilfiltriert

Zusammensetzung des K3-Mediums:

100 ml	Makroelemente
1 ml	Mikroelemente
1 ml	Vitamine
5 ml	EDTA/Eisen
10 ml	Ca-Phosphat
100 mg	myo-Inositol
250 mg	D(+)-Xylose
137 g	Saccharose
	mit 1 M KOH auf pH 5,6 eingestellt
1 ml	NAA
0,4 ml	Kinetin
	sterilfiltriert

**2.2.13. Mikroskopie und Dokumentation**

Folgende Geräte wurden verwendet:

Binokulare: Nikon SMZ-U

Mikroskope: Nikon Eclipse E800

Filter:	<b>GFP (R) – BP</b>	EX 460-500
		DM 505
		BA 510-560
	<b>UV – 2A</b>	EX 330-300
		DM 400
		BA 420

Dokumentation der mikroskopischen Aufnahmen:

1-CCD Farbvideokamera (KY-F1030; JVC, Singapore) bedient durch das Software-Paket DISKUS (Technisches Büro Hilgers, Königswinter, D)

Kamera für normale Aufnahmen:

Digitale Kamera: Nikon Coolpix 995

## **2.2.14. Internetadressen**

**NCBI Homepage**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**TAIR**

<http://www.arabidopsis.org>

**Genevestigator**

<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

**Aramemnon**

<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>

**The Arabidopsis Book**

[www.aspb.org/publications/arabidopsis/](http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/)

**MIPS**

<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>

**SIGnAL (T-DNA Insertionslinien)**

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

**pGreen**

<http://www.pgreen.ac.uk>

**Primer3 (Software für Primerdesign)**

[frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3)

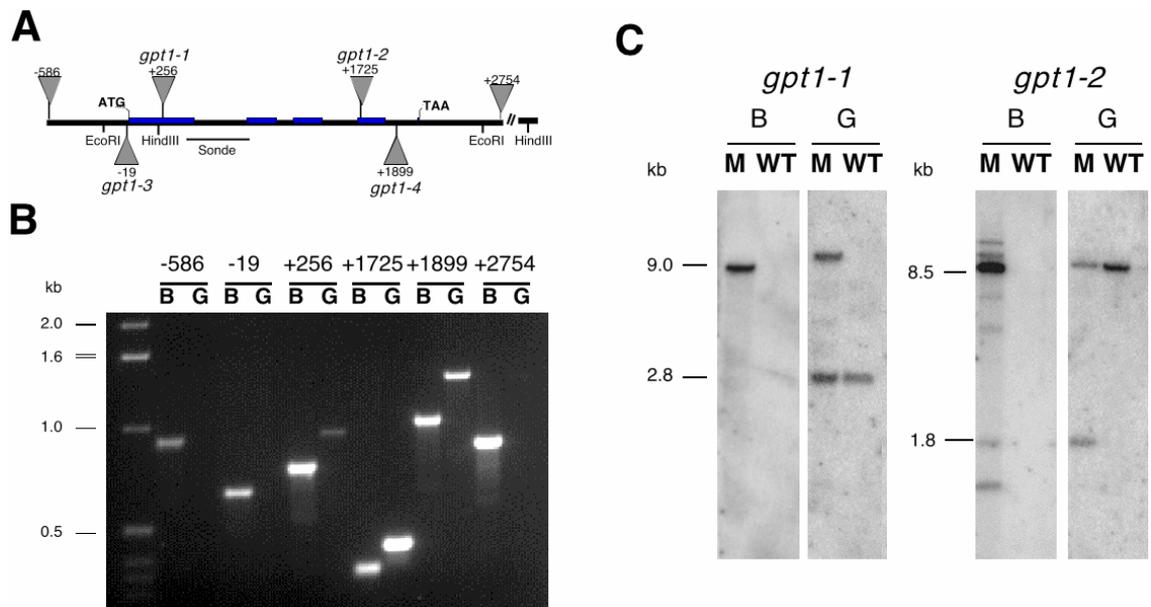
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien, die im Glukose 6-Phosphat/Phosphat Transporter defekt sind

##### 3.1.1. Isolierung von insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien am *AtGPT1* Locus

Mit Hilfe der reversen Genetik wurden drei verschiedene Populationen von den T-DNA Insertionslinien (Feldmann Linien, Arabidopsis Knockout Facility (AKF) BASTA Population und die Salk Institute Kollektion) durchsucht, um Linien mit T-DNA-Insertionen am *AtGPT1* Locus zu isolieren. Insgesamt wurden sechs Pflanzenlinien identifiziert, die T-DNA Insertionen in dem *AtGPT1* Locus enthielten. Die beiden insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien *gpt1-1* und *gpt1-5* wurden in der Feldmann Linien Kollektion gefunden. In der *gpt1-1* Linie wurde die T-DNA-Insertion 256 bp stromabwärts des Startkodons, in der *gpt1-5* dagegen 586 bp stromaufwärts vom ATG detektiert (Abb. 3.1. A). Zwei weitere Pflanzenlinien *gpt1-2* und *gpt1-6* wurden in der AKF BASTA Population identifiziert. Diese beinhalteten Insertionen 1725 bp und 2754 bp stromabwärts des Startkodons (Abb. 3.1. A). Außerdem wurden in der Salk Institute Kollektion weitere zwei Linien *gpt1-3* und *gpt1-4* mit Insertionen -19 bp und + 1899 bp relativ zum ATG bestimmt (Abb. 3.1. A).

Alle insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien wurden auf ihren Allelzustand untersucht, indem verschiedene genspezifische Primer in Kombination mit den entsprechenden T-DNA spezifischen Primern für eine PCR-Reaktion verwendet wurden. Die *gpt1-3*, *gpt1-5* und *gpt1-6* Linien wurden eindeutig als homozygote Mutantenlinien ermittelt (Abb. 3.1. B). Jedoch konnten in diesen Pflanzenlinien unveränderte Mengen an *AtGPT1* Transkripten im Vergleich zu WT mittels einer RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.2.). Dagegen konnten für die T-DNA Insertionslinien *gpt1-1*, *gpt1-2* und *gpt1-4* keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden.

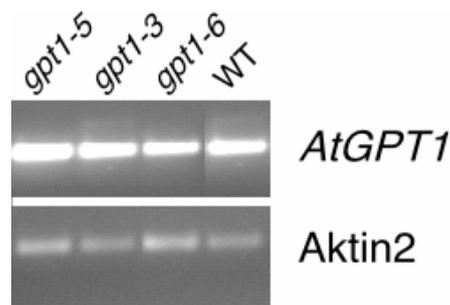


**Abb. 3.1. Isolierung und molekulare Charakterisierung der *gpt1* Allele.**

(A) Position der T-DNA Insertionen im *AtGPT1* Locus.

(B) Genotypisierung der *gpt1* Allele mittels PCR. Homozygote Allele zeigten kein PCR-Produkt mit genspezifischen Primern. Es wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet: B, T-DNA- und genspezifische Primerkombination und G, genspezifische Primerkombination.

(C) Southern Blot Analyse der Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2*. *EcoRI* verdaute DNA (10 µg) von *GPT1/gpt1-1* und *HindIII* verdaute DNA (10 µg) von *GPT1/gpt1-2* wurden zusammen mit entsprechender WT-DNA Kontrolle mit einer T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde (in (A) angedeutet) hybridisiert. M, heterozygote Mutantenlinie; B, T-DNA spezifische Sonde; G, genspezifische Sonde



**Abb. 3.2. Nachweis der *GPT1* Transkripte in den homozygoten *gpt1* Allelen mittels RT-PCR.**

Für die RNA Isolierung wurden 5 Wochen alte Blattrossetten verwendet und anschließend cDNA hergestellt. Für die RT-PCR mit *GPT1* Primern wurden 30 Zyklen und für die RT-PCR mit Aktin2 Primern 24 Zyklen durchgeführt.

### 3.1.2. Molekularbiologische und genetische Charakterisierung der heterozygoten Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2*

Für weitere Untersuchungen wurden die heterozygoten Linien *gpt1-1* und *gpt1-2* verwendet. Zuerst wurde der jeweilige heterozygote Allelzustand dieser Linien mittels einer Southern Blot Analyse mit genspezifischen Sonden bestätigt (Abb. 3.1. C). Außerdem wurde die Anzahl der Insertionen ermittelt. Für *GPT1/gpt1-1* wurde eine einzige Insertion mit der RB-spezifischen Sonde festgestellt (Abb. 3.1. C). Für *GPT1/gpt1-2* wurden außer der erwarteten Bande in der Größe von 1,8 kb zusätzliche Banden mit der LB-Sonde detektiert, was auf eine komplexe und/oder zusätzliche T-DNA Insertion hindeutet.

Genotyp	Kan <sup>R</sup> /PCR+	Kan <sup>S</sup> /PCR-	Verhältnis	$\chi^2$
<i>GPT1/gpt1-1</i>	190	222	0,9:1	2,5 (p=0,01)
<i>GPT1/gpt1-2</i>	176	217	0,8:1	4,2 (p=0,01)

**Tab. 3.1. Segregationsanalyse der Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2*.**

Die Nachkommen der Linie *GPT1/gpt1-1* wurden auf die durch die T-DNA verliehene Kanamycin Resistenz untersucht. Die Vererbung von *gpt1-2* wurde mittels PCR basierter Untersuchung bestimmt. Der  $\chi^2$  Test wurde für den Vergleich des festgestellten Verhältnisses zu vorhergesagtem Verhältnis von 1:1 verwendet. Kan<sup>R</sup>, Kanamycin resistent, Kan<sup>S</sup>, Kanamycin sensitiv

Ferner wurde das Segregationsverhalten der Nachkommen beider heterozygoten Linien *gpt1-1* und *gpt1-2* für die T-DNA erfasst. Die Nachkommen der Linie *GPT1/gpt1-1* segregierten in einem Verhältnis von 0.9:1 für die Kanamycin Resistenz, die durch die T-DNA verliehen wurde (Tab. 3.1.). Das Segregationsverhältnis für die *GPT1/gpt1-2* Linie wurde mittels einer auf PCR basierenden Untersuchung bestimmt, da Rückkreuzungen dieser Linie mit WT zeigten, dass es nicht möglich war, heterozygote Pflanzen mit einer einzigen T-DNA Insertion und Basta Resistenz zu isolieren. Die T-DNA in *AtGPT1* Locus konnte in 176 Pflanzen von insgesamt 393 untersuchten Pflanzen detektiert werden, was einem Segregationsverhältnis von 0,8:1 entsprach. Für beide Linien war das Segregationsverhältnis nicht signifikant

verschieden von einem Verhältnis von 1:1 (Tab. 3.1.), was auf eine Auswirkung der Mutation auf die Entwicklung von Gameten hindeutet. Im einfachsten Falle kann das defekte Allel durch einen der Gameten nicht weitergegeben werden. Um diesen Sachverhalt näher zu bestimmen, wurden reziproke Kreuzungen der heterozygoten Linien *gpt1-1* und *gpt1-2* mit WT durchgeführt und die Transmissionseffizienz (TE) der T-DNA für die weiblichen und männlichen Gameten ermittelt. Diese Transmissionseffizienz gibt Auskunft über den Anteil an mutierten Allelen, welche die Mutation weitergeben. Für beide *gpt1*-Linien wurde eine reduzierte TE für beide Gameten bestimmt. Im Fall des *gpt1-1* Allels betrug die TE für den weiblichen Gameten 34% und für den männlichen Gameten 20%. Ähnliche Werte wies das *gpt1-2* Allel auf. Die weibliche TE war reduziert auf 27% und die männliche TE auf 20%. Das ermittelte Segregationsverhältnis von 1:1 suggerierte, dass entweder der männliche oder der weibliche Gametophyt in den heterozygoten *gpt1* Pflanzen gestört sein könnte. Jedoch ist das ermittelte Segregationsverhältnis von 1:1 nicht einfach die Folge eines Defektes im weiblichen oder männlichen Gametophyten, sondern resultiert aus verringerter TE durch beide Gametophyten.

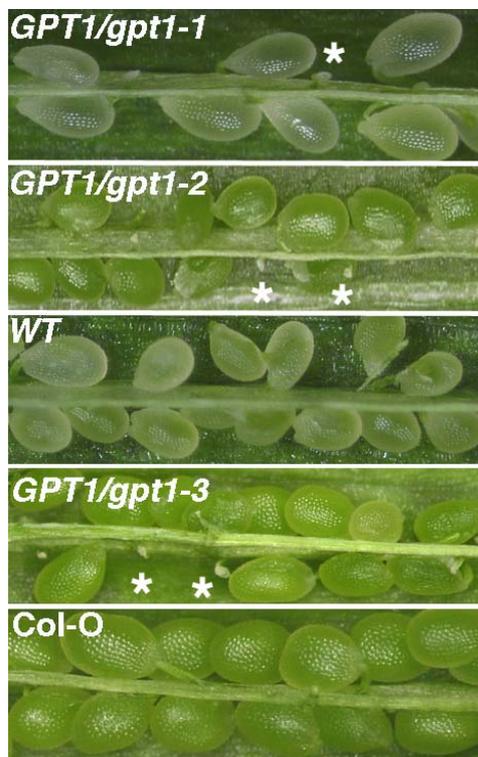
Genotyp (♀ X ♂)	Kan <sup>R</sup> /PCR+	Kan <sup>S</sup> /PCR-	TE(%)
<i>GPT1/gpt1-1</i> x <i>Ws-2</i>	47	137	34
<i>Ws-2</i> x <i>GPT1/gpt1-1</i>	26	128	20
<i>GPT1/gpt1-2</i> x <i>Ws-2</i>	30	112	27
<i>Ws-2</i> x <i>GPT1/gpt1-2</i>	28	142	20

**Tab. 3.2. Bestimmung der Transmissionseffizienz für die reziproken Kreuzungen der *gpt1-1* und *gpt1-2* Linien mit WT.**

Die Vererbung von *gpt1-1* wurde durch Auszählung von Kanamycin resistenten F1-Nachkommen in den angegebenen Kreuzungen bestimmt. Die Vererbung von *gpt1-2* wurde mittels einer auf PCR-basierter Untersuchung ermittelt. Die Transmissionseffizienz wurden nach Howden et al. (1998) berechnet. Kan<sup>R</sup>, Kanamycin resistent; Kan<sup>S</sup>, Kanamycin sensitiv; TE, Transmissionseffizienz

### 3.1.3. Charakterisierung der Auswirkung des Defektes in *AtGPT1* auf die Megagametogenese

In den Schoten der heterozygoten Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2* wurden sehr kleine und nicht grüne Samenanlagen in einer erhöhten Häufigkeit im Vergleich zum WT beobachtet (Abb. 3.3.). Diese Fraktion an Samenanlagen wurde als fehlentwickelte und unbefruchtete Samenanlagen identifiziert, da sie sich während des Reifeprozesses der Schote nicht braun verfärbten. Somit wurde eine Embryoletalität in einem sehr frühen Entwicklungsstadium nicht in Betracht gezogen ([www.seedgenes.org](http://www.seedgenes.org)). Die Auszählung ergab, dass der Anteil an fehlentwickelten Samenanlagen in den heterozygoten Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2* vier- bis fünfmal höher gegenüber dem WT war (Tab. 3.3.). Obwohl die Schoten der heterozygoten Linien kürzer waren als diejenigen des WT (1,12 cm  $\pm$  0,12 vs. 1,52  $\pm$  0,08 für WT), war die Gesamtmenge an Samen (fehlentwickelte plus normale Samen) nicht verschieden zwischen der heterozygoten *GPT1/gpt1-2* Linie und WT Pflanzen (49  $\pm$  5 vs. 50  $\pm$  7).



**Abb. 3.3. Fehlentwickelte Samenanlagen in den Schoten der *gpt1* Allele und WT.**

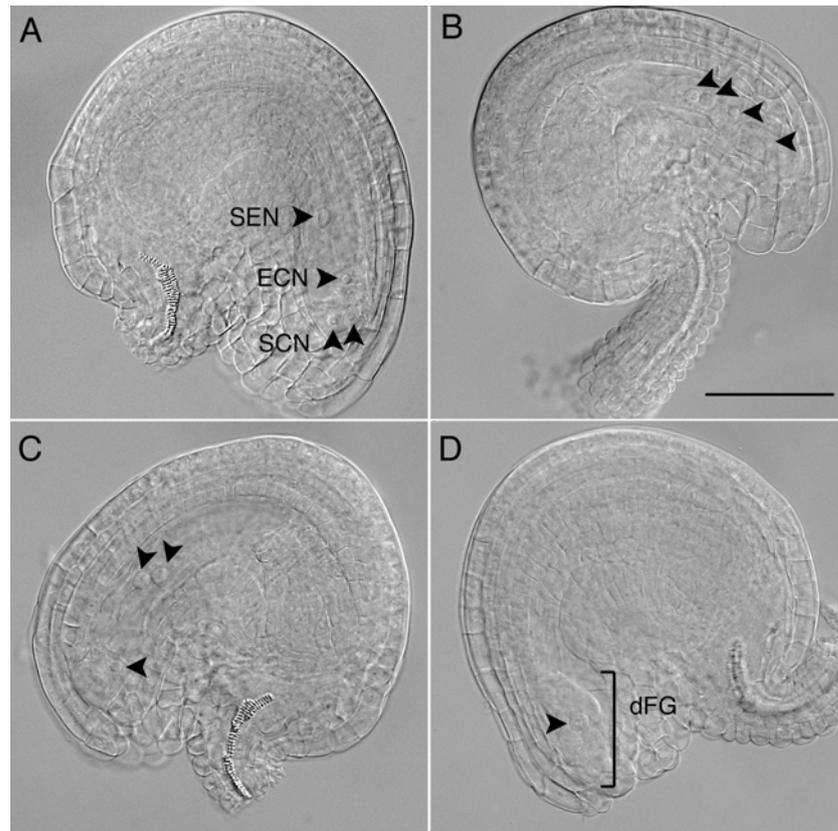
Abgebildet sind jeweils die Fragmente geöffneter Schoten der heterozygoten *gpt1* Allele und der entsprechende WT. Fehlentwickelte Samenanlagen sind mit (\*) gekennzeichnet.

Genotyp	normale Samen	fehlentwickelte Samenanlagen	Häufigkeit (%)
<i>GPT1/GPT1</i> (Ws-2)	755	53	6.6
<i>GPT1/gpt1-1</i>	507	236	32
<i>GPT1/gpt1-2</i>	1357	530	28
<i>gpt1-2gGPT1-3.10</i>	1461	104	6,6
<i>gpt1-2gGPT1-9.18</i>	1433	68	4,5

**Tab. 3.3. Häufigkeit an fehlentwickelten Samenanlagen in WT, *GPT1/gpt1-1*, *GPT1/gpt1-2* und zwei komplementierten Linien.**

Die fehlentwickelten Samenanlagen wurden in reifen Schoten (10te -12te) der Hauptinfloreszenz gezählt.

Um das Ausmaß und den Zeitpunkt des Defekts von *AtGPT1* während der Megagametogenese zu beschreiben, wurde die nukleare Komposition der weiblichen Gametophyten 48 h nach Emaskulierung der Blüten von WT und heterozygoten Linien bestimmt. Durch die Emaskulierung der Blüte erreicht man eine Synchronisation der Megagametogenese, so dass sich 48 h später alle Samenanlagen im terminalen Stadium der Ovulenenwicklung befinden. Der reife weibliche Gametophyt besteht aus 4 Kernen, dies sind der fusionierten Zentralzellkern (SEN), der Eizellenkern (ECN) und zwei Synergidzellkerne (SCN) (Abb. 4 A). In den untersuchten, emaskulierten WT Blüten erreichten fast alle Samenanlagen (97%) die terminale Entwicklungsphase (Fig. 3.4. A) im Gegensatz zu den Samenanlagen in den *GPT1/gpt1-2* Fruchtknoten (Fig. 3.4. B und D). 36 % der Samenanlagen der *gpt1-2* Allele zeigten eine unterbrochene Entwicklung des weiblichen Gametophyten (Tab. 3.4.). Die meisten fehlentwickelten Samenanlagen wiesen zwei vergrößerte Kerne auf, die Seite an Seite lagen und eine variable Anzahl an kleinen Kernen enthielten (Abb. 3.4. B und C). Eine geringe Anzahl an *gpt1* mutierten Samenanlagen enthielt nur ein Kern, was auf eine fortgeschrittene Degradierung des weiblichen Gametophyten hindeutet (Abb. 3.4. D).



**Abb. 3.4. Entwicklung der Samenanlagen in der *GPT1/gpt1-2* Linie.**

Blüten von *GPT1/gpt1-2* wurden emaskuliert. Nach 48 h wurden „whole-mount“ Präparationen angefertigt und mit differential-interference-contrast (DIC) Mikroskopie untersucht.

(A) WT Samenanlage in der terminalen Entwicklungsphase. Die Kerne der Zentralzelle, der Synergidzellen und Eizelle sind gut erkennbar. SEN, der Polarkern; ECN, Eizellenkern; SCN, Synergidzellkerne

(B) Repräsentatives Beispiel für fehlentwickelte Samenanlagen in den *GPT1/gpt1-2* Fruchtknoten. Zwei vergrößerte Zellkerne, die Seite an Seite liegen, und zwei kleinere Kerne sind erkennbar.

(C) Repräsentatives Beispiel für fehlentwickelte Samenanlagen in den *GPT1/gpt1-2* Fruchtknoten. Nur ein kleiner Kern neben den Seite an Seite liegenden, vergrößerten Kernen ist sichtbar.

(D) Beispiel für eine degenerierte Samenanlage. Die Ovule ist völlig zurückgebildet und enthält nur einen Kern. dFG, degenerierte Samenanlage; Maßstab = 50  $\mu\text{m}$

Genotyp	normal entwickelte Samenanlagen	fehlentwickelte Samenanlagen	Häufigkeit (%)
<i>GPT1/gpt1-1</i>	114	44	28
<i>GPT1/gpt1-2</i>	75	42	36
WT	62	2	3

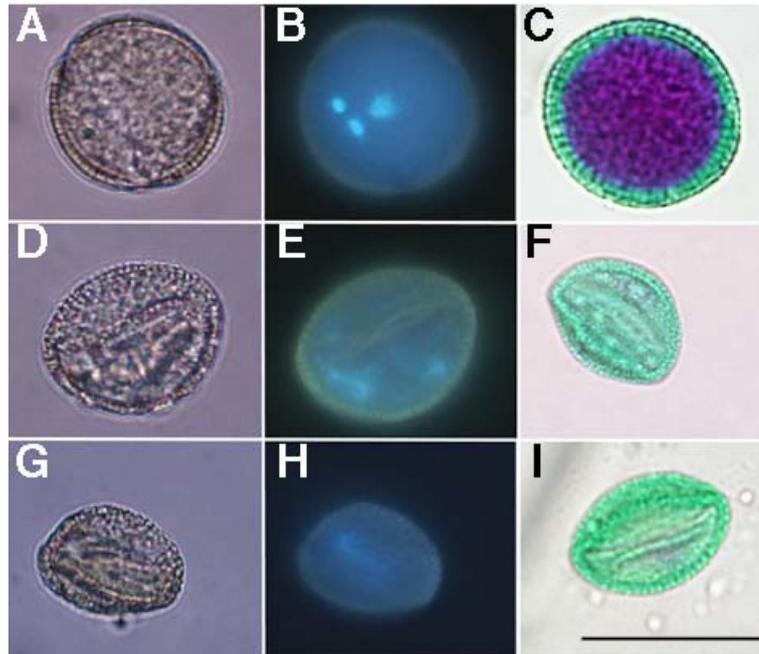
**Tab. 3.4. Häufigkeit an fehlentwickelten Samenanlagen in Fruchtknoten von WT und *gpt1* Allelen.**

Blüten von *GPT1/gpt1-2* wurden emaskuliert und 48 h später mit der differential-interference-contrast (DIC) Mikroskopie untersucht. Samenanlagen, die keine wildtypische Kernzusammensetzung enthielten, wurden als fehlentwickelte Samenanlagen gezählt.

### 3.1.4. Charakterisierung der Auswirkung des Defektes in *AtGPT1* auf die Mikrogametogenese

Die verringerte TE durch den männlichen Gametophyten deutete auch auf eine Funktion von GPT1 während der männlichen Gametogenese hin. Bereits im Lichtmikroskop konnten kleinere und abgeflachte Pollenkörner bei den heterozygoten Linien häufiger als beim WT beobachtet werden (Abb. 3.5 A, D und G). Um diesen Sachverhalt näher zu beschreiben, wurden zuerst zwei Vitalfarbstoffe (DAPI und Alexander's stain) für die Untersuchung der Pollenkörner verwendet. DAPI färbt spezifisch Nukleinsäuren, und DAPI gefärbte, reife Pollenkörner zeigen ein charakteristisches Erscheinungsbild. Der Kern der vegetativen Zelle ist als großer, diffus gefärbter Kern erkennbar, hingegen die Kerne der generativen Zellen kleiner und intensiv gefärbt erscheinen (Abb. 3.5. B). Die kleineren und abgeflachten Pollenkörner enthielten keine oder stark degradierte Nukleinsäuren (Abb. 3.5. E und H). Die Farbstoffe des Alexander's stain können nur in vitale Zellen eindringen und färben metabolisch aktives Cytosol intensiv rot an (Abb. 3.5. C). Die abgeflachten und kleineren *gpt1* Pollen zeigten nur die grüne Färbung der Zellwände auf, was auf einen Verlust der Vitalität hindeutete. In WT Pflanzen traten nicht lebensfähige Pollenkörner in einer Häufigkeit von weniger als 1% auf, wohingegen in *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2* Pflanzen in einer Häufigkeit von 9% und 15% (Tab. 3.5.). Außerdem konnte in beiden Präparationen (DAPI

und Alexander's stain) Pollenkörner mit Zwischenstadien der Degradierung in den *GPT1/gpt1* Linien beobachtet werden. In Abb. 6 sind die Zwischenstadien der DAPI Färbung exemplarisch aufgeführt.

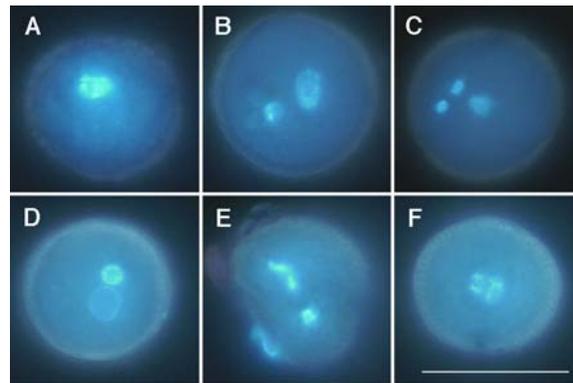


**Abb. 3.5. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Pollenkörner von WT und heterozygoten *gpt1* Allelen.**

(A), (D) und (G) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Pollenkörnern vom WT (A), *GPT1/gpt1-1* (D) und *GPT1/gpt1-2* (G).

(B), (E), und (H) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Pollenkörnern von WT (B), *GPT1/gpt1-1* (E) und *GPT1/gpt1-2* (H) gefärbt mit DAPI. Beachte die diffuse Färbung in den *gpt1* Pollen.

(C), (F) und (I) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Pollenkörnern von WT (C), *GPT1/gpt1-1* (F) und *GPT1/gpt1-2* (I) gefärbt mit Alexander's stain. Beachte das Fehlen der roten Färbung des Cytosols in *gpt1* Pollen.



**Abb. 3.6.** Darstellung von Zwischenstadien der Degradierung von Pollenkörnern der *gpt1* Allele.

Pollenkörner wurden aus den Antheren von WT und *gpt1* Allelen gelöst und mit DAPI angefärbt. (A) und (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Pollenkörner von *GPT1/gpt1-1*. In (A) ist nur eine diffuse Färbung eines vergrößerten, vegetativen Kerns erkennbar. In (B) fehlt die Färbung des zweiten generativen Kerns. Beide sichtbaren Kerne sind vergrößert gegenüber dem WT (C).

(C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines WT Pollenkorns zeigten zwei generative Kerne und einen in der Mitte platzierten, vegetativen Kern.

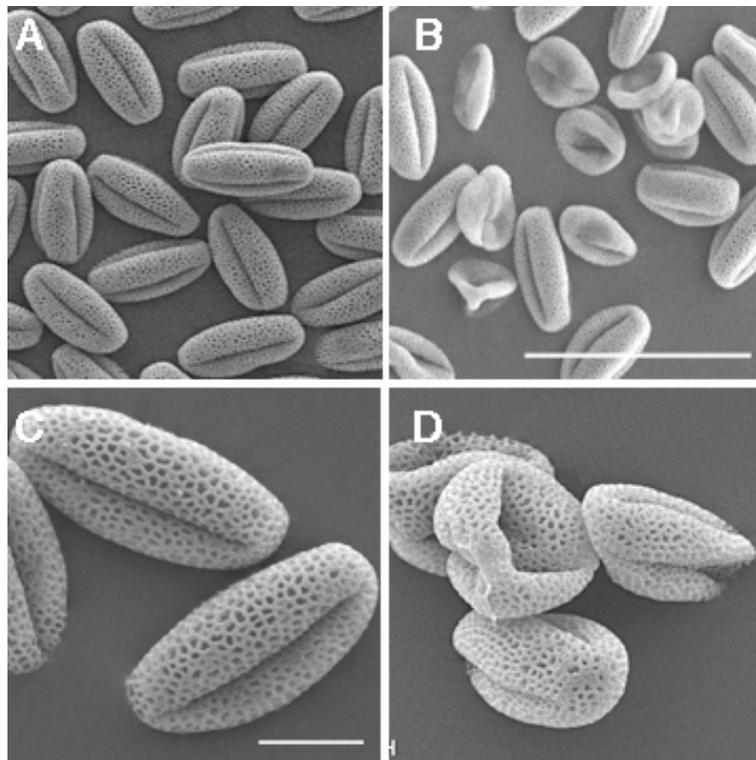
(D) bis (F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Pollenkörner von *GPT1/gpt1-2* zeigen 1 bis 2 vergrößerte Kerne. In (E) erkennt man die Abflachung des Pollenkorns und eine diffuse Färbung eines der Kerne.

Genotyp	vitale Pollen	nicht lebensfähige Pollen	Häufigkeit (%)
<i>GPT1/GPT1 (Ws-2)</i>	9343	75	0,8
<i>GPT1/gpt1-1</i>	3301	332	9
<i>GPT1/gpt1-2</i>	3242	581	15
<i>gpt1-2gGPT1-3.10</i>	10000	57	0,6
<i>gpt1-2gGPT1-9.18</i>	10000	87	0,9

**Tab. 3.5.** Häufigkeit an nicht lebensfähigen Pollen in WT, *gpt1* Allelen und zwei komplementierten Linien.

Nicht lebensfähige Pollen wurden nach der Färbung mit Alexander's stain in freigesetzten Pollen von WT, *gpt1* Allelen und in zwei komplementierten Linien ausgewertet.

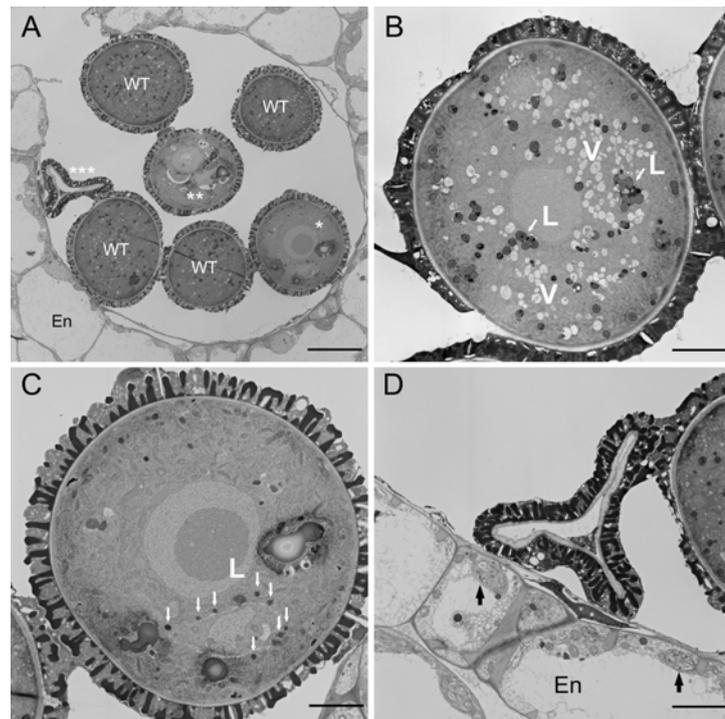
Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop bestätigten die Ergebnisse der Lichtmikroskopie, nämlich dass in den *GPT1/gpt1* Linien ungewöhnliche und eingedrückte Pollenkörner auftraten (Abb. 3.7.). Zusätzlich gab diese Methode Auskunft über die Konstitution der äußeren Pollenhülle (Exine). Obwohl die mutierten Pollenkörner kleiner und weniger stabil waren, konnte keine Veränderung der regelmäßigen Anordnung von Exine beobachtet werden (Abb. 3.7. D). Somit konnte ein Einfluss des sporophytischen Gewebes, das die Pollen umgibt und diese Exine Schicht bildet, auf die Entwicklung der *gpt1* mutierten Pollen ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.7.** Rasterelektronenmikroskopische Mikrographen von reifen Pollenkörnern aus WT (A und C) und *GPT1/gpt1-2* (B und D) Pflanzen.

Beachte bei *GPT1/gpt1-2* Aufnahmen das Vorkommen von abnormalen Pollenkörnern, die trotz der Abflachung eine intakte Struktur der Exine aufweisen.

Weiterhin wurden Querschnitte der Pollensäcke von WT und *GPT1/gpt1-2* angefertigt und mit Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass die Entwicklung des Pollensacks einschließlich der Tapetumzellen in *GPT1/gpt1-2* nicht beeinträchtigt war. Zwei sporophytische Gewebe spielen eine wichtige Rolle während der Pollenreifung. Im Tapetum werden die Vorstufen für die Exine und den Pollenkornmantel hergestellt. Das Endothecium (die innere Wand des Pollensacks) scheidet wichtige Stoffe für die Reifung der Pollen aus. Durch die Ergebnisse der transmissions-elektronenmikroskopische Analyse konnte eine Beeinträchtigung dieser sporophytischen Gewebearten in den *gpt1* Allelen ausgeschlossen werden, da die Entwicklung und Struktur des Tapetums keine Unterschiede zum WT zeigte. Auch konnten Plastiden mit Stärke und Plastoglobuli in den Endotheciumzellen beobachtet werden (Abb. 3.7. D). Erst in Pollensäcken, die reife, dreizellige Pollenkörner enthielten (Stadium 12 nach Sanders et al., 1999), konnten Unterschiede zwischen *GPT1/gpt1-2* und WT festgestellt werden. In diesem Stadium wurde in den Loculi der *GPT1/gpt1-2* Pollensäcke eine Mischung an Merkmalen aus wildtypischen und mutierten Pollenkörnern bestimmt (Abb. 3.8. A). Im Gegensatz zum WT (Abb. 3.8. B) enthielten die mutierten Pollenkörner wenige vakuoläre Strukturen und Fettkörperchen (Abb. 3.8. C) und konnten in drei Gruppen (schwach, mäßig und stark beeinträchtigte Pollenkörner) entsprechend des Degradierungsgrades eingeteilt werden (Abb. 3.8. A).



**Abb. 3.8. Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pollensäcke von WT und *GPT1/gpt1-2* Pflanzen.**

(A) Überblick über einen Pollensack. Zusätzlich zu WT-Pollen sind Pollenkörner mit verschiedenen Degradierungsstufen erkennbar. Die Schwere der Degradierung ist durch die Anzahl von (\*) angezeigt.

(B) Querschnitt durch einen WT Pollenkorn. Vakuolen und Lipidkörperchen sind gut erkennbar.

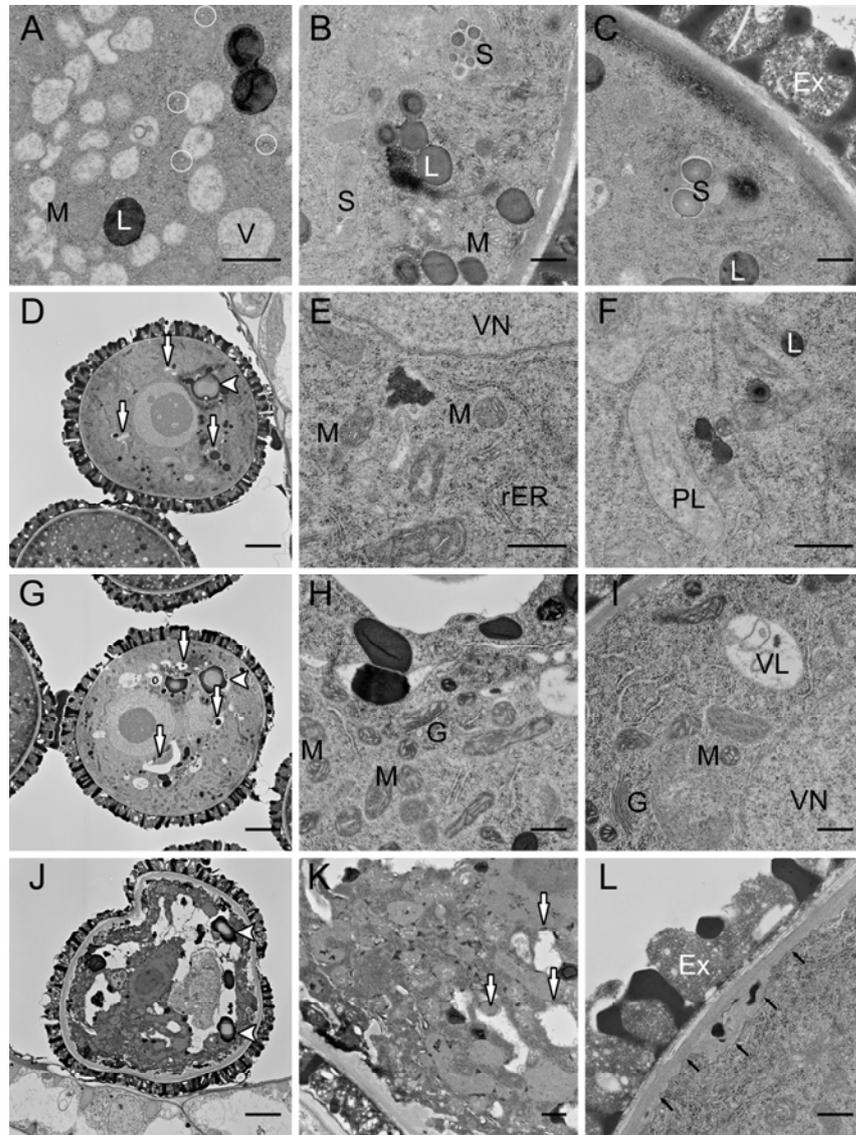
(C) Querschnitt durch ein schwach beeinträchtigt mutiertes Pollenkorn. Beachte das Fehlen von Vakuolen und geringeres Vorkommen von Lipidkörperchen.

(D) Querschnitt durch ein kollabiertes Pollenkorn. Die angrenzenden Endotheciumzellen enthalten Plastiden mit Stärke und Plastoglobuli, welche durch die Pfeile angedeutet sind.

EN, Endotheciumzelle; L, Lipidkörperchen; V, Vakuolen. Maßstab = 10  $\mu\text{m}$  in (A), 3  $\mu\text{m}$  in (B) bis (D).

WT Pollenkörner enthielten Vakuolen, Fettkörperchen und kleine Vesikel (Abb. 3.9. A). Außerdem konnten häufig Plastiden mit Stärkekörnern beobachtet werden (Abb. 3.9. B und C). Trotz einsetzender Autolyse sind Organellen wie Mitochondrien, rauhes ER und vegetativer Kern in den schwach beeinträchtigten Pollenkörnern der *GPT1/gpt1-2* Pollensäcke gut erkennbar (Abb. 3.9. D und E). Auffällig in diesen schwach beeinträchtigten Pollen waren plastidenähnliche Strukturen ohne Stärke (Abb. 3.9. F). In den mäßig beeinträchtigten Pollenkörnern war die Autolyse fortgeschritten, was zu einer Stapelung der Organellen, die immer noch gut erkennbar waren, führen konnte (Abb. 3.9. G und H). Vakuolenähnliche Strukturen konnten nur selten beobachtet werden (Abb. 3.9. I). Stark beeinträchtigte Pollenkörner wiesen eine Auflösung der Strukturen auf, die auf eine ca. 50% Autolyse des Cytosols

zurückzuführen war (Abb. 3.9. J und K). In allen Degradierungsstadien konnten große Einlagerungen festgestellt werden (Abb. 3.9. D, G, J).



**Abb. 3.9. Ultrastrukturelle Veränderungen in *gpt1* mutierten Pollenkörnern.**

Querschnitte von unterschiedlich beeinträchtigten *gpt1* Pollenkörnern wurden mit Hilfe von Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht.

(A) bis (C) Details von reifen, dreizelligen WT Pollenkörnern. Die Basisstrukturen (Vakuolen, Mitochondrien, Lipidkörperchen) sind gut erkennbar. Beachte das Vorkommen von Plastiden mit Stärke (B und C).

(D) Übersicht über ein schwach beeinträchtigtes, mutiertes Pollenkorn. Autolyse ist an wenigen Stellen erkennbar (Pfeile). Eine größere Einlagerung ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

(E) und (F) Details eines schwach beeinträchtigten mutierten Pollenkorns. Mitochondrien, rER, Lipidkörper und der vegetative Kern sind angedeutet. Beachte die plastidähnliche Struktur ohne Stärke in (F).

(G) Übersicht über ein mäßig beeinträchtigtes, mutiertes Pollenkorn. Die Bereiche der Autolyse (Pfeile) sind vergrößert. Eine größere Einlagerung ist mit einer Pfeilspitze markiert.

(H) und (I) Details eines mäßig beeinträchtigten mutierten Pollenkorns. Strukturen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und vegetativer Kern sind gut erkennbar und in den Abbildungen gekennzeichnet. Beachte die vakuolenähnliche Struktur (VL) in (I).

(J) Übersicht über ein stark beeinträchtigtes mutiertes Pollenkorn. Autolyse ist über 50 % der Zelle fortgeschritten. Zwei große Einlagerungen sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

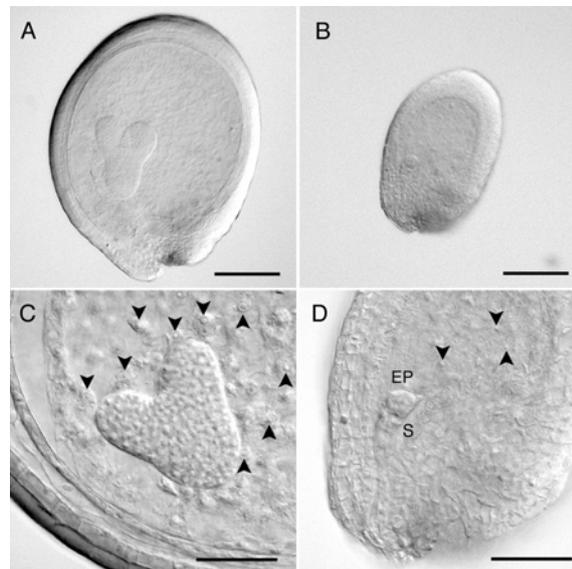
(K) bis (L) Details eines stark beeinträchtigten mutierten Pollenkorns. Innere Strukturen sind nicht mehr erkennbar. Regionen der Autolyse sind mit Pfeilen angedeutet.

M, Mitochondrium; L, Lipidkörperchen; V, Vakuole; S, Stärkekörner in Plastiden; Ex, Exin Schicht; VN, vegetativer Kern; PL, plastidähnliche Strukturen; G, Golgi-Apparat; VL, vakuolenähnliche Strukturen. Maßstab = 0.75  $\mu\text{m}$  außer in (D), (G), (J), wo der Maßstab 3  $\mu\text{m}$  beträgt

**3.1.5. Embryonale Entwicklung in den *gpt1* Mutanten**

Basierend auf dem Ergebnis der reziproken Kreuzungen zwischen WT und *gpt1* Allelen, wurde das Auftreten von homozygoten *gpt1* Pflanzen in einer Häufigkeit von 5-9% vorhergesagt. Diese Wahrscheinlichkeit für das Aufkommen von homozygoten *gpt1* Pflanzen resultiert aus der Beobachtung, dass die *gpt1* Mutation keine 100%ige Penetranz durch einen der Gameten aufweist. Jedoch konnten keine adulten, homozygoten *gpt1* Mutanten isoliert werden. Da eine Keimlingsletalität ausgeschlossen wurde, könnte angenommen werden, dass homozygote *gpt1* Mutanten in einer frühen embryonalen Entwicklungsphase gestört sind. Eine Auswertung der Schoten ergab, dass in den Schoten der beiden *gpt1* Allele kleinere und fehlentwickelte Embryos in einer Häufigkeit von 3,2% (n=317) für *GPT1/gpt1-2* und 6% (n=212) für *GPT1/gpt1-2* auftraten. Diese Embryonen hatten einen klar erkennbaren Suspensor und waren im Dermatogenstadium arretiert (Abb. 3.10. B). In WT Schoten befanden sich die meisten Samen innerhalb des späten Herz- oder Torpedostadium (Abb. 3.10. A). Nur eine geringe Anzahl an WT Embryos war arretiert (0,6%, n=162). Neben der embryonalen Entwicklung war auch die Entwicklung des Endosperms

beeinträchtigt, wie es die reduzierte Anzahl an Endospermkernen andeutet (Abb. 3.10. D).



**Abb. 3.10. Embryonale Morphologie in *GPT1/gpt1-2* Pflanzen.**

Samen wurden aus verschiedenen alten Schoten gelöst und in einer Chloralhydratlösung eingelegt. Anschließend wurden sie mit Hilfe der differential-interference-contrast (DIC) Mikroskopie analysiert.

(A) DIC Aufnahme eines normal entwickelten Samens aus einer *GPT1/gpt1-2* Schote. Der Embryo befindet sich in der späten Herz-Phase.

(B) DIC Aufnahme eines unterentwickelten Samens aus einer *GPT1/gpt1-2* Schote. Dieser Same wurde aus der gleichen Schote entnommen wie (A). Beachte den Größenunterschied.

(C) DIC Aufnahme eines normal entwickelten Embryos im Herzstadium. Die umliegenden Kerne des Endosperms wurden durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

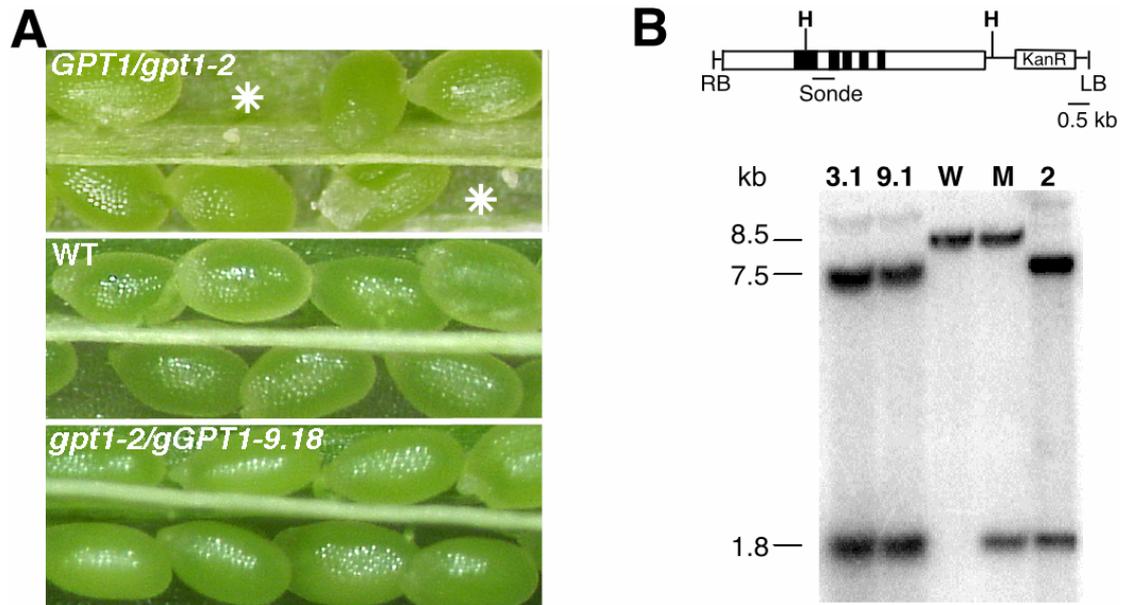
(D) Unterentwickelter Same (B) in höherer Vergrößerung. Der Embryo und der Suspensor sind gut erkennbar. Die Kerne des Endosperms wurden durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

EP, Embryo proper; S, Suspensor. Maßstab = 100  $\mu\text{m}$  in (A) und (B), 50  $\mu\text{m}$  in (C) und (D)

### 3.1.6. Genetische Komplementation von *GPT1/gp1-2*

Um die beschriebenen Phänotypen auf das Fehlen des *GPT1* Gens zurückzuführen, wurde ein 11kb großes, genomisches *GPT1* Fragmenten in die Linie *GPT1/gpt1-2* eingeführt. In der T1-Generation wurden neun Pflanzen isoliert, die das *gpt1-2* Allel vererbten. Diese Linien waren immer noch heterozygot in Hinblick auf das endogene *GPT1* Gen. Weitere Untersuchungen in der T2-Generation wurden mit zwei Linien (*GPT1/gpt1-2gGPT1-3* und *GPT1/gpt1-2gGPT1-9*) durchgeführt. Mittels einer auf PCR basierten Untersuchung wurden unter den Nachkommen beider Linien homozygote Pflanzen in Hinblick auf das *gpt1-2* Allel isoliert, was durch die Southern Blot

Analyse dieser Linien bestätigt werden konnte (Abb. 3.11. B). In den Schoten der komplementierten Linien war der Anteil an fehlentwickelten Samenanlagen (6,6% für *gpt1-2gGPT1-3.10* und 4,5% für *gpt1-2gGPT1-9.18*) mit dem des WT (6,6%) vergleichbar (Tab. 3.3.). Auch die Pollenentwicklung war in den komplementierten Linien nicht mehr beeinträchtigt. Nicht vitale Pollen traten in eine Häufigkeit von 0,6 bis 0,9 % auf, ähnlich dem WT (Tab. 3.5.).



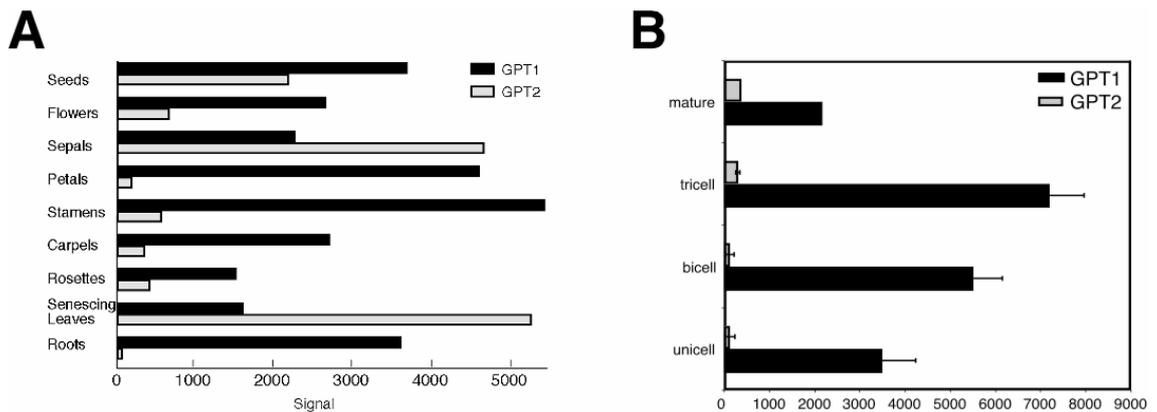
**Abb. 3.11. Genetische Komplementation von *GPT1/gpt1-2*.**

(A) Fotografien von geöffneten Schoten der angegebenen Genotypen. Fehlentwickelte Samenanlagen sind mit (\*) gekennzeichnet. Beachte das Fehlen der fehlentwickelten Samenanlagen in der komplementierten Linie.

(B) Schematische Abbildung des genomischen Fragments, das für die Komplementation verwendet worden ist. Southern Blot Analyse von HindIII verdauter DNA (10 µg) der zwei komplementierten Linien im Vergleich zum WT und der *GPT1/gpt1-2* Linie. Die verwendete Sonde ist im Schema angegeben. M, heterozygote Mutantenlinie; H, HindIII

### 3.1.7. Charakterisierung der insertionsmutagenisierten *gpt2-1* Pflanzenlinie

Das Arabidopsis Genom enthält zwei funktionelle Gene für den GPT, nämlich *AtGPT1* und *AtGPT2*. Für den GPT1 konnte eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Gametophyten nachgewiesen werden. Jedoch wurde eine geringe Anzahl an weiblichen sowie männlichen Gametophyten beobachtet, welche nicht durch die Mutation in *gpt1* beeinträchtigt worden war. In diesen Zusammenhang war es wichtig, die funktionelle Redundanz während der haploiden Entwicklungsphase beider Gene zu untersuchen. Beide Gene unterscheiden sich stark in deren Expressionsmustern. Eine starke Expression von *GPT2* konnte nur in seneszenten Blättern und Kelchblättern (Sepalen) detektiert werden. Dagegen ist *GPT1* in fast allen Geweben exprimiert. Vor allem fällt eine sehr starke Expression von *GPT1* in den Kronblättern, Staubblättern und Fruchtknoten auf. Innerhalb dieser Gewebe ist *GPT2* schwach exprimiert (Abb. 3.12. A). Eine detaillierte Expressionsanalyse während der Mikrogametogenese ergab eine Akkumulierung der *GPT1*-Transkripte. Im dreizelligen Pollenkorn erreicht die *GPT1* Expression den höchsten Wert. Für *GPT2* konnte keine signifikante Expression während der Mikrogametogenese detektiert werden (Abb. 3.12. B). Diese Expressionsdaten sprechen gegen eine funktionelle Redundanz von *GPT1* und *GPT2* während der Entwicklung der Gameten.



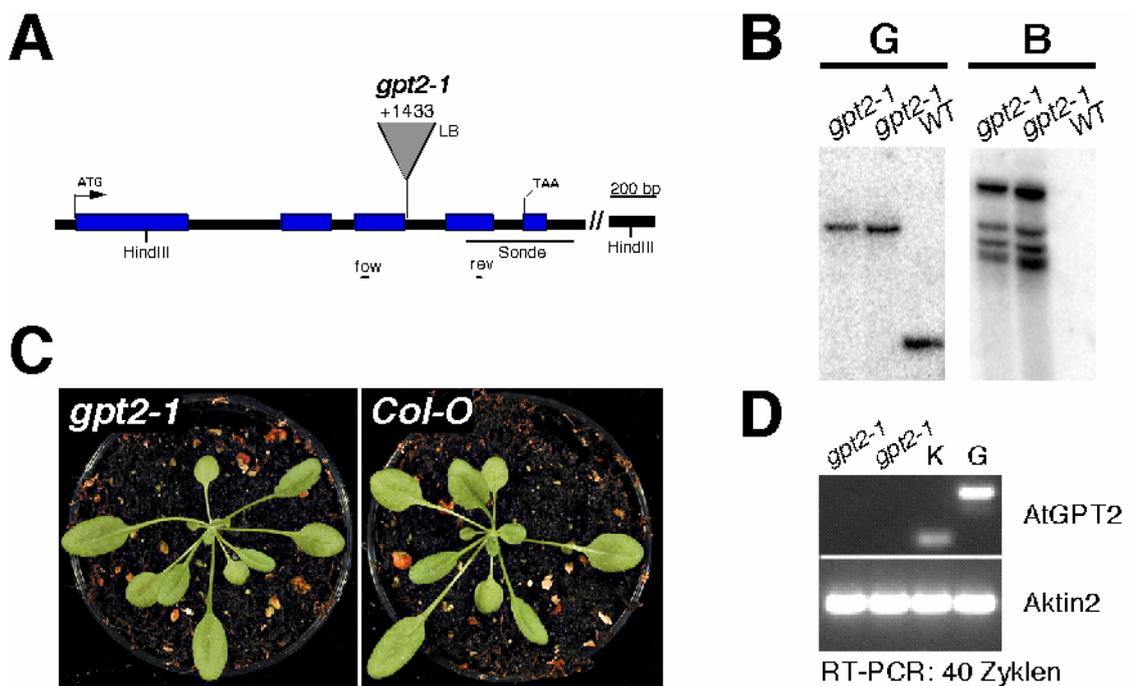
**Abb. 3.12. Digitale Northern Analyse der *AtGPT* Gene.**

Die für den Digitalen Northern verwendeten Daten stammen von AtGenExpress auf der Genevestigator Internetseite (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>).

(A) Expression der *AtGPT1* Gene in verschiedenen Pflanzengeweben. Die Signalintensitäten für Samen wurden aus den Stadien 6 bis 10 gemittelt, für Blüten aus den Stadien 9 bis 12 und 15, für Sepalen, Petalen, Staub- und Fruchtblättern aus den Stadien 12 bis 15, für Rosette Rosettenblätter 2 bis 12. Die durchschnittlichen Signalintensitäten für seneszenzente Blätter und Wurzel wurden aus den technischen Replikaten entnommen.

(B) Expression der *AtGPT1* Gene während der Mikrogametogenese. Die durchschnittlichen Signalintensitäten wurden aus den technischen Replikaten entnommen.

Zusätzlich wurde eine Pflanzenlinie isoliert, die eine Insertion im *AtGPT2* Gen trug. Die Insertion im *AtGPT2* Locus befand sich 1433 bp stromabwärts des Startkodons (Abb. 3.13. A). Es konnten homozygote *gpt2-1* Linien bestimmt werden, die mehrere Insertionen in Genom aufwiesen (Abb. 3.13. C). Es konnten keine *GPT2* Transkripte in diesen Linien mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.13. D). Die homozygote *gpt2-1* Mutante zeigte keinen offensichtlich veränderten Phänotyp unter Gewächshausbedingungen (Abb. 3.13. B). Um auszuschließen, dass nicht eine geringe Beeinträchtigung der Gameten vorliegt, wurden die Blüten von *gpt2-1* mikroskopisch analysiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen *gpt2-1* und WT in Hinblick auf die Häufigkeit des Vorkommens fehlentwickelter Samenanlagen (4% für *gpt2-1* gegenüber 7% für Col-0) und Pollen (0,4% für *gpt2-1* gegenüber 0,3% für Col-0) ermittelt werden. Anhand dieser Daten kann geschlossen werden, dass *GPT2* keine wichtige Rolle während der Entwicklung von Samenanlagen und Pollenkörnern spielt.



**Abb. 3.13. Identifizierung und molekulare Charakterisierung der *gpt2-1* Linie.**

(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von AtGPT2 mit Exons und Introns. Die T-DNA Insertionsposition ist angezeigt.

(B) Gegenüberstellung von *gpt2-1* (A) und Col-0 (B) gewachsen unter Gewächshausbedingungen.

(C) Southern Blot Analyse mit HindIII verdauter DNA (10 µg) von *gpt2-1* und Col-0 hybridisiert mit einer genspezifischen Sonde (in (A) angedeutet) und einer T-DNA spezifischen Sonde.

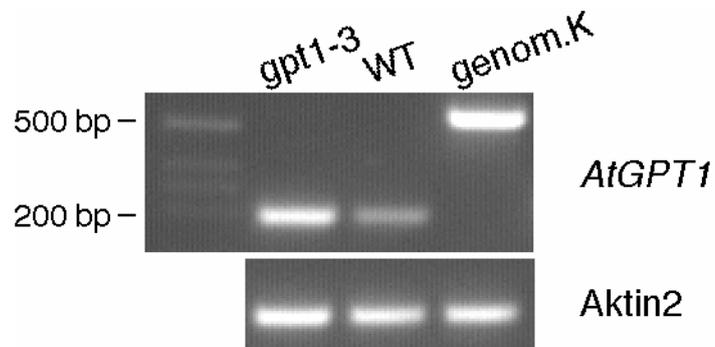
(D) Nachweis der AtGPT2 Expression in der *gpt2-1* Mutantenlinie mittels RT-PCR. Für die RT-PCR mit genspezifischen Primern (fow und rev, wie unter (A) angedeutet) wurde cDNA aus Rosettenblättern eingesetzt. Als Kontrolle wurde genomische DNA aus Blüten von WT-Pflanzen verwendet. Außerdem wurde RT-PCR mit Aktin2-Primern zur Kontrolle der RNA Gehalte durchgeführt.

LB, linke Begrenzung der T-DNA; K, WT-Kontrolle; G, genomische Kontrolle

### 3.1.8. Physiologische Charakterisierung von *gpt1-3*

Während der Durchmusterung verschiedener Populationen von *Arabidopsis* T-DNA Insertionsmutanten wurde die homozygote *gpt1-3* Linie isoliert. In dieser Linie wurde die T-DNA 19 bp vor dem ATG detektiert. Die „left border“ (LB) der T-DNA befand sich somit im 3' Bereich von *GPT1* und enthielt einen 35S Promotor, der in der Richtung der LB orientiert war. Wegen der Position (-19 bp vor ATG) und der Orientierung der T-DNA (35S am LB in der Richtung von *GPT1*) konnte angenommen werden, dass eine Überexpression des *GPT1* Gens in dieser Linie möglich war. Um dies zu verifizieren, wurde eine RT-PCR

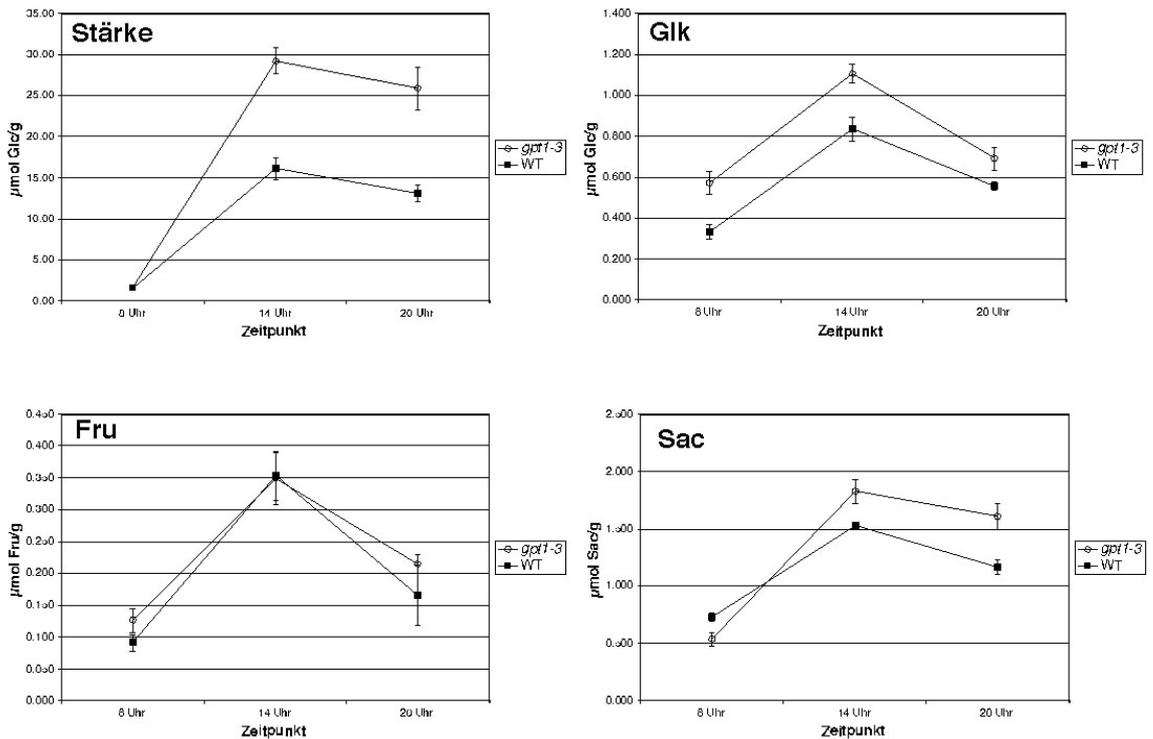
durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass eine erhöhte Menge an *GPT1* Transkripten in der *gpt1-3* Mutante detektierbar war (Abb. 3.14.). Es stellte sich die Frage, wie sich die Überexpression des *AtGPT1* Gens auf den primären Stoffwechsel in der *gpt1-3* Pflanzenlinie auswirkt.



**Abb. 3.14.** RT-PCR Analyse der *gpt1-3* Mutantenlinie.

Für die RT-PCR wurde cDNA aus Rosettenblättern von *gpt1-3* und WT eingesetzt. Als Kontrolle wurde genomische Blüten-DNA aus WT-Pflanzen verwendet. Außerdem wurde RT-PCR mit Aktin2-Primer zur Kontrolle der RNA Gehalte durchgeführt.

Zunächst wurde die *gpt1-3* Pflanzenlinie auf die Veränderung der Kohlenhydratverteilung untersucht. Pflanzen mit voll entwickelter Blattrosette der *gpt1-3* Linie wurden im Vergleich zum entsprechenden WT auf ihre löslichen Zucker- und Stärkegehalte enzymatisch getestet (s.2.2.10.2). Die *gpt1-3* Mutante wies nach einer Belichtungszeit von 6 h die doppelte Menge an Stärke gegenüber dem Columbia Wildtyp auf (Abb. 3.15.). Auch nach einem Belichtungszeitraum von 12 h betrug der Stärkegehalt in der *gpt1-3* Linie das Zweifache im Vergleich zum WT. Außerdem zeigte die *gpt1-3* Linie einen 30% höheren Glukosegehalt als der WT während der Lichtperiode (Abb. 3.15.). Dagegen konnten keine Abweichungen der Gehalte an Fruktose und Saccharose in *gpt1-3* im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 3.15.).



**Abb. 3.15.** Diurnaler Verlauf der Gehalte an löslichen Zuckern (Glk, Fru, Sac) und Stärke in *gpt1-3* und WT- Blättern.

Die Stärkegehalte sind als Einheiten an Glukosemonomeren angegeben. Angegeben sind Daten aus vier unabhängigen Messungen  $\pm$  Standardfehler.

### 3.1.9. Herstellung chimärer Konstrukte für die Komplementation von heterozygoten *gpt1* Allelen

Es wurden verschiedene chimäre Konstrukte für die Komplementation der heterozygoten *gpt1* Allele hergestellt. In erster Linie sollte die funktionelle Redundanz von *AtGPT1* und *AtGPT2* während der Pflanzenentwicklung untersucht werden. Beide Gene kodieren für funktionelle Glk6P Transporter, weisen aber verschiedene Expressionsmuster auf. Jedoch stellt sich die Frage, wieso das endogene *GPT2* die Aufgaben von *GPT1* während der Entwicklung nicht kompensieren kann. Zu diesem Zweck wurden chimäre Konstrukte erzeugt, mit deren Hilfe *AtGPT2* unter der Kontrolle des *AtGPT1* Promotors und *AtGPT1* unter Kontrolle des *AtGPT2*-Promotors im Hintergrund der heterozygoten *gpt1* Allele überexprimiert werden sollte (8.2.1.).

Zur Überprüfung der Hypothese, ob eine Unterbrechung des oxidativen Pentosephosphatweges und der folgender Mangel an Reduktionsäquivalenten

für plastidär lokalisierte Synthesen (z.B. Lipidsynthese) die beobachtete Letalität der *gpt1* Allele verursacht, wurden weitere Konstrukte hergestellt. Mit deren Hilfe sollte ein plastidär lokalisiertes NADP-Malatenzym und ein Pentosephosphat/Phosphat Transporter (XPT) unter Kontrolle des *GPT1* Promotors in die heterozygoten *gpt1* Mutanten eintransformiert werden (8.2.1.). Durch die oxidative Decarboxylierung von Malat durch das Malatenzym könnte in den Plastiden NADPH gebildet werden, unter der Voraussetzung, dass Malat zu Verfügung steht und in die Plastiden importiert wird. Zum Einsatz kam ein NADP-abhängiges Malatenzym aus Maiswurzeln, das eine nicht-photosynthetische Isoform darstellt und konstitutiv exprimiert wird (Maurino et al., 2001). XPT spielt eine wichtige Rolle in der Kooperation zwischen cytosolischem und plastidärem OPPP in Blättern, indem er Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) als Endprodukt des cytosolischen OPPP in die Plastiden transportiert. *AtXPT* Transkripte können in allen Geweben (Blüte, Blatt, Spross und Wurzel) mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Jedoch konnte keine *AtXPT:uidA* Expression in Pollensäcken und jungen Fruchtknoten, sowie während der frühen Fruchtentwicklung detektiert werden. Mikroarray Daten bestätigen, dass *XPT* kaum während der Pollenentwicklung exprimiert wird. Dies weist auf keinen Xu5P Transport durch XPT in den Pollen hin. Durch die Expression von XPT in den *gpt1* Mutantenhintergrund könnte Xu5P Transport initiiert werden, so dass die Unterbrechung des OPPP in den *gpt1* mutierten Gameten aufgehoben werden könnte.

Die Entwicklungsphasen, in denen die Gameten- und Zygotenentwicklung in der *gpt1* Mutante gestört sind, sollten durch die Überexpression von *GPT1* unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotorsystems im heterozygoten Mutantenhintergrund überbrückt werden. Hierzu stand das *alcR-alcA* System der Firma Syngenta zur Verfügung. Dieses Zweikomponentensystem basiert auf der Eigenschaft des *alcR*-Transkriptionsfaktors, in Gegenwart von Ethanol an den *alcA* Promotor zu binden. In den erzeugten Konstrukten befindet sich das transient zu exprimierende *AtGPT1* Gen unter der Kontrolle des *alcA* Promotors, während der Transkriptionsfaktor *alcR* unter der Kontrolle des *GPT1* Promotors exprimiert wird (8.2.2). Damit wird sichergestellt, dass der Transkriptionsfaktor *alcR* in den benötigten Phasen der Entwicklung exprimiert wird. Beide chimäre Sequenzen wurden in binären Vektoren mit verschiedener

Resistenz für die Selektion der transformierten Pflanzen kloniert. *GPT1Pr:alcR* wurde in pGreenII-Vektor mit Kanamycin Resistenz eingeführt, dagegen befindet sich *alcA:GPT1* in pGreenII-Vektor mit Hygromycin-Resistenz. Es wird angenommen, dass eine gleichzeitige Transformation von *GPT1/gpt1-2* mit beiden Konstrukten die Expression von GPT während der Entwicklung der *gpt1* mutierten Gameten in Gegenwart von Ethanol induziert und dadurch die Letalität überwindet. Außerdem könnte es möglich sein, die Funktion von GPT1 sowohl in vegetativen Pflanzenteilen als auch während der Samenentwicklung zu untersuchen.

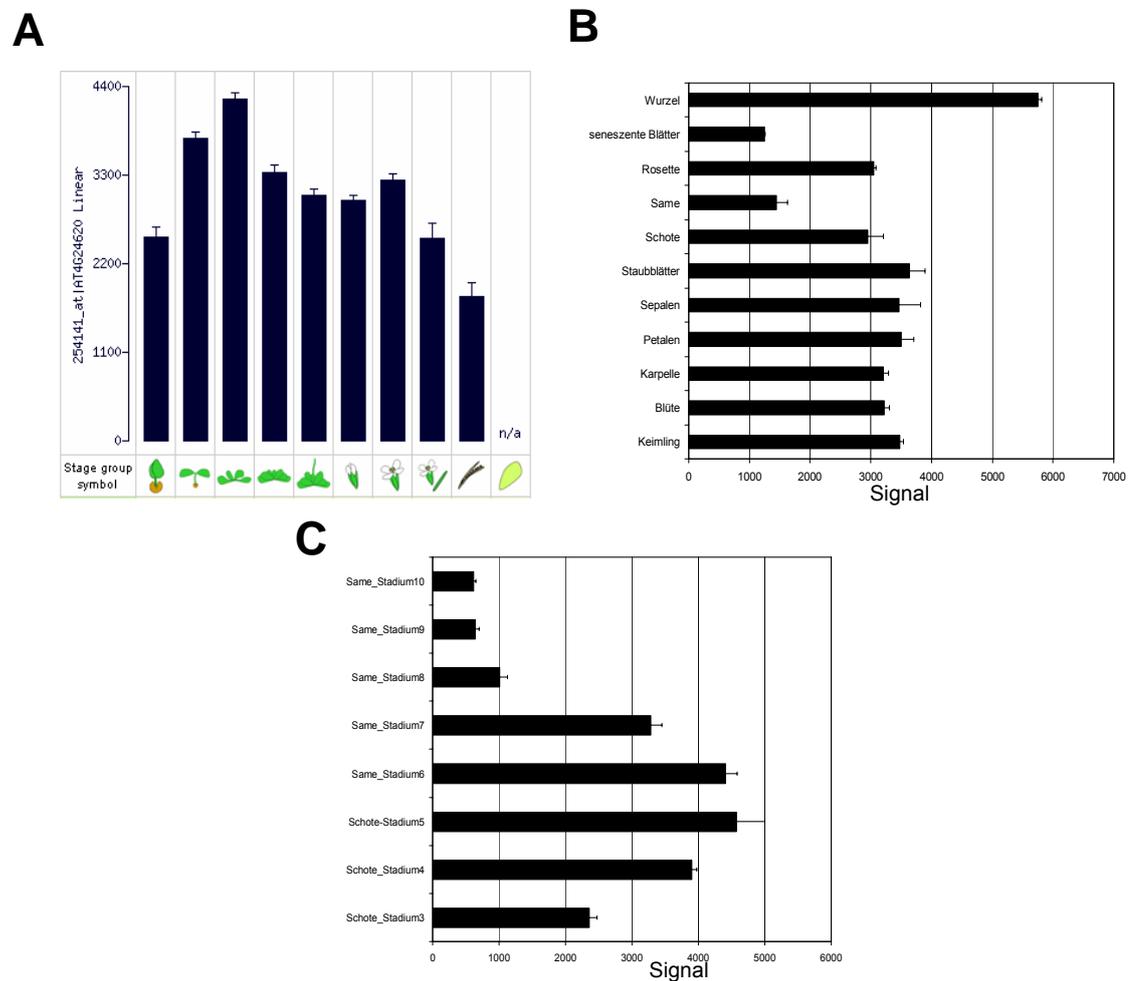
Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit wurden folgende Konstrukte in die *GPT1/gpt1-2* Linie eintransformiert: *GPT1Pr:GPT1*, *GPT2Pr:GPT2*, *GPT1Pr:XPT* und *GPT1PrME* (alle in pGreenII-Kan). Weiterhin wurden folgende Konstrukte erzeugt: *alcR/Topo*, *GPT1Pr/pGreenII-Kan* und *alcA:GPT1/pGreenII-Hyg*.

### **3.2. Charakterisierung von insertionsmutagenisierten Pflanzenlinien, die in der plastidärer Phosphoglukose Isomerase (*AtPGI1*) defekt sind**

#### **3e2e1er Expressionsmuster des *AtPGI1*-Gens**

Um die Expression von *AtPGI1* zu untersuchen, wurden öffentlich verfügbare Mikroarray Daten analysiert ([www.genevestigator.ethz.ch/](http://www.genevestigator.ethz.ch/); Zimmermann et al., 2004). *AtPGI1* ist ubiquitär während der Entwicklung und in allen Geweben exprimiert. Während der Entwicklung wurde die höchste Signalintensität von *AtPGI1* sechs bis 17 Tage nach dem Auskeimen detektiert. Dieser Zeitraum umfasst die Entwicklung des Keimlings und der Rosettenblätter und geht mit dem Einsetzen der Photosynthese und Stärkesynthese in den Blättern einher. Die Expression sinkt im Verlauf der weiteren Pflanzenentwicklung, bis die niedrigsten Expressionswerte während der Seneszenz beobachtet werden können (Abb. 3.16. A). Während der Samenentwicklung kommt es zu einer zeitlichen Veränderung der *AtPGI1* Expression. In den frühen Samenstadien (vier bis sechs) ist *AtPGI1* relativ stark exprimiert, wohingegen in reifen Samen

die Expression stark abfällt (Abb. 3.16. C). Wurzeln zeigen die höchste Expression für *AtPGI1* (Abb. 3.16. B). Bereits im Keimling kann hohe Expression von *AtPGI1* in der Keimwurzel festgestellt werden.



**Abb. 3.16. Expressionsmuster von *AtPGI1* während der Entwicklung (A), in Geweben (B) und während der Samenentwicklung (C).**

Die für den Digitalen Northern verwendeten Daten stammen von AtGenExpress auf der Genevestigator Internetseite (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>).

Für (A) wurde die Funktion „Gene Chronologer“ verwendet, wo eine Abschätzung der Expression während der Entwicklung erfolgt.

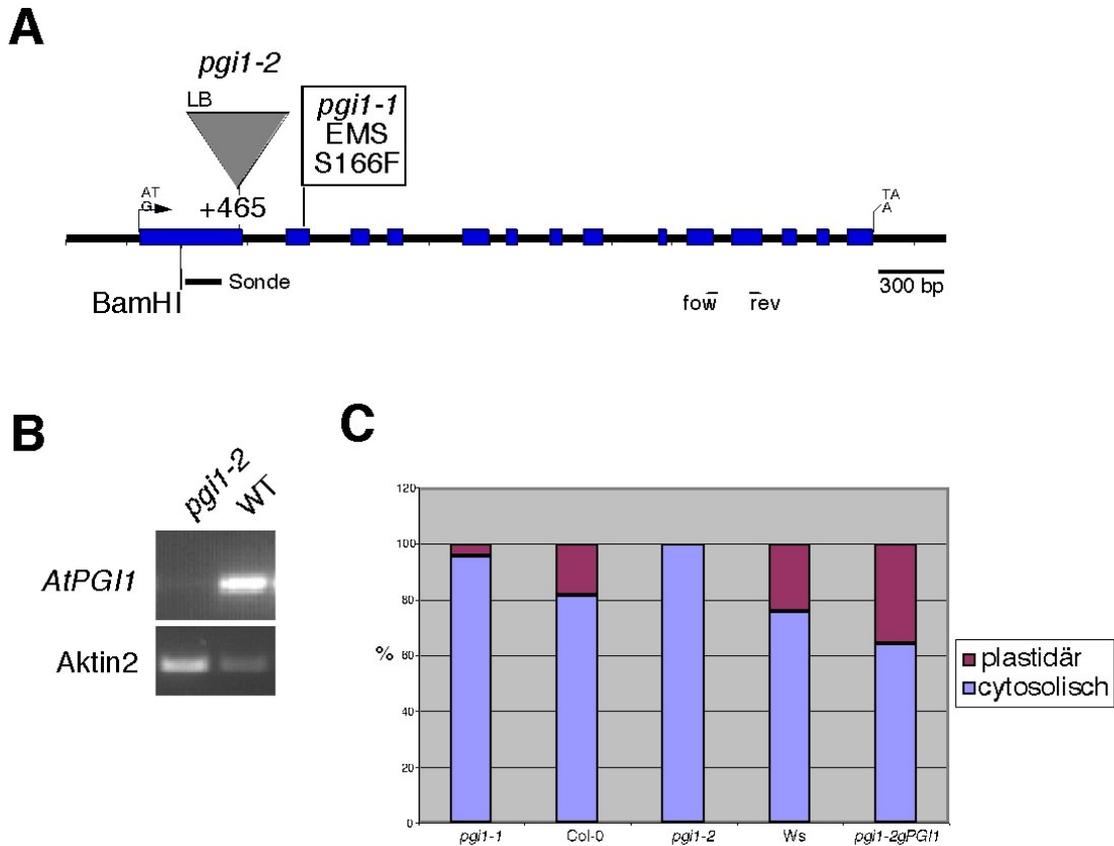
Für (B) wurden einige Daten aus der Funktion „Gene Atlas“ ausgesucht. Diese Funktion dokumentiert die Expression in verschiedenen Gewebetypen.

Für (C) wurden Daten aus dem Experiment „Development: silique&seed“ innerhalb von AtGenExpress entnommen.

### 3.2.2. Isolierung und Charakterisierung der *pgi1-2* Mutantenlinie

Yu et al. (2000) berichteten über eine EMS-Mutantenlinie *pgi1-1* mit reduzierter plastidärer Phosphoglucose Isomerase Aktivität. Die *pgi1-1* Mutante weist eine Reduktion von Stärkegehalten in Blättern auf, so dass sich die Frage stellte, ob diese Stärkegehalte auf die Restaktivität von PGI oder auf die geringe GPT1 Aktivität in Chloroplasten zurückzuführen ist. In heterotrophen Plastiden kann das durch GPT1 importierte Glk6P für die Stärkesynthese verwendet werden. Im Gegensatz dazu sind die Chloroplasten auf den Import von Hexosephosphaten nicht angewiesen, so dass ein funktionierender GPT augenscheinlich für den Metabolismus im Blatt nicht unbedingt notwendig ist. Um den Ursprung der Reststärke in *pgi1-1* zu ermitteln, wurde nach einer Nullmutante für *AtPGI1* gesucht. Es wurden *Arabidopsis* Populationen mit T-DNA Insertionslinien durchsucht, um eine insertionsmutagenisierte Pflanzenlinie in *AtPGI1* zu finden, die keine plastidäre Phosphoglucose Isomerase Aktivität mehr aufweist. In der BASTA-Kollektion von Arabidopsis Knockout Facility wurde die *pgi1-2* Pflanzenlinie mit einer Insertion 465 bp stromabwärts des Startkodons von *AtPGI1* identifiziert (Abb. 3.17. A). In der homozygoten *pgi1-2* Mutante konnten keine *AtPGI1* Transkripte mit RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.17. B). Weiterhin wurde eine spektrophotometrische Untersuchung für die PGI Aktivität durchgeführt und sich der unterschiedlichen Temperaturstabilitäten der Isozyme bedient. Das plastidäre PGI Isozym unterscheidet sich in der Temperaturstabilität von dem cytosolischen Isozym. Eine Erhitzung der Extrakte auf 50°C für 10 min inaktiviert die plastidäre PGI, ohne die cytosolische PGI Aktivität zu beeinträchtigen. In der *pgi1-2* Mutante war die Gesamtaktivität (cytosolische und plastidäre) für PGI relativ zum WT um 31% reduziert (Abb. 3.17. C). Nach der Erhitzung der Extrakte wies die *pgi1-2* Linie keine Reduktion der PGI Aktivität im Vergleich zu der Gesamtaktivität auf, die vor der Erhitzung gemessen worden war. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass *pgi1-2* keine plastidäre PGI Aktivität mehr besitzt. Im entsprechenden WT war die PGI Aktivität um 25% nach der Erhitzung erniedrigt (Abb. 3.17. C). Dies entspricht dem Anteil an der plastidären PGI Aktivität im WT. Zur Kontrolle

wurde die *pgi1-1* Mutante und der entsprechende WT (Col-0) verwendet. In dem *pgi1-1* Allel wurde eine 5% plastidäre PGI Restaktivität gemessen, welche mit den Daten von Yu et al. (2000) übereinstimmt.



**Abb. 3.17. Isolierung und Charakterisierung der *pgi1-2* Mutantenlinie.**

(A) Schematische Darstellung der *AtPGI1* Genstruktur mit der Position der T-DNA Insertion in dem *pgi1-2* Allel.

(B) Nachweis der *AtPGI1* Expression in der *pgi1-2* Mutante mittels RT-PCR. Es wurde cDNA aus Blattrosetten verwendet und 30 Zyklen für *AtPGI1* und 24 Zyklen für *Aktin2* durchgeführt.

(C) PGI Aktivität in Blattextrakten von *pgi1-1*, *pgi1-2*, Col-0, Ws und einer komplementierten *pgi1-2gPGI1* Linie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der plastidären und cytosolischen PGI Aktivität an der gesamten PGI Aktivität in den Blattextrakten der genannten Linien. Basis waren vier Messungen  $\pm$  Standardfehler.

### 3.2.3. Phänotyp und genetische Komplementation

Homozygote *pgi1-2* Pflanzen konnten erst nach der Anzucht auf MS-Medium mit 1% Saccharose isoliert werden. Bei einer Aussaat von heterozygoten *pgi1-2* Samen auf MS-Medium wurden Pflanzen mit geringerem Wachstum und veränderter Morphologie beobachtet. Diese Pflanzen zeigten verschiedenartige Phänotypen, die in fünf Klassen eingeteilt werden konnten (Abb. 3.18.). In erster Linie war aufgefallen, dass ein Teil der ausgesäten Pflanzen nicht ausgekeimt ist (Klasse 1). Ein weiterer Teil dieser Pflanzen zeigte nur eine Ausbildung der Wurzel ohne jegliches weiteres Wachstum (Abb. 3.18. A; Klasse 2). Die dritte Phänotypklasse umfasste Pflanzen, die nur weiße und verschrumpelte Keimblätter ausbildeten (Abb. 3.18. B, Klasse 3). Einige dieser Pflanzen konnten grüne Folgeblätter entwickeln (Abb. 3.18. C). Es konnten auch Pflanzen beobachtet werden die dem WT ähnelten, aber in der Größe reduziert waren (Abb. 3.18. D, Klasse 4). Eine interessante fünfte Klasse an morphologischen Defekten waren Pflanzen mit nur einem Keimblatt. Alle Phänotypklassen wurden zusammengezählt und ergaben zusammen einen Anteil von 25% (n=522) innerhalb der ausgesäten Pflanzen. Dies entspricht einem Segregationsverhältnis von 3:1. Es lag nahe, dass diese Fraktion homozygote *pgi1-2* Pflanzen enthalten könnte. Pflanzen der Klasse 4 konnten auf Erde überführt werden und zum Blühen gebracht werden. Auf Erde zeigten diese Pflanzen ein geringeres Wachstum und einen späteren Blühzeitpunkt (Abb. 3.19. C) im Vergleich zum WT (Abb. 3.19. C). Eine auf PCR basierte Untersuchung konnte diese Pflanzen als homozygote *pgi1-2* Mutanten identifizieren. Zusätzlich wurde eine Southern Blot Analyse mit einer genspezifischen Sonde durchgeführt, die den homozygoten Allelzustand von *pgi1-2* bestätigte (Abb. 19 A). Auch wurde die Anzahl an Insertionen mit der Southern Blot Analyse unter Verwendung einer T-DNA-spezifischen Sonde bestimmt. In dieser Linie konnten mehrere T-DNA Insertionen festgestellt werden.



**Abb. 3.18. Beobachtete Phänotypen von *pgi1-2* auf MS Medium.**

*pgi1-2* und WT Samen wurden auf MS Medium mit 1% Saccharose ausgesät und nach drei Wochen Wachstum fotografiert.

(A) Pflanze nur mit ausgekeimter Wurzel (Phänotyp-Klasse 2)

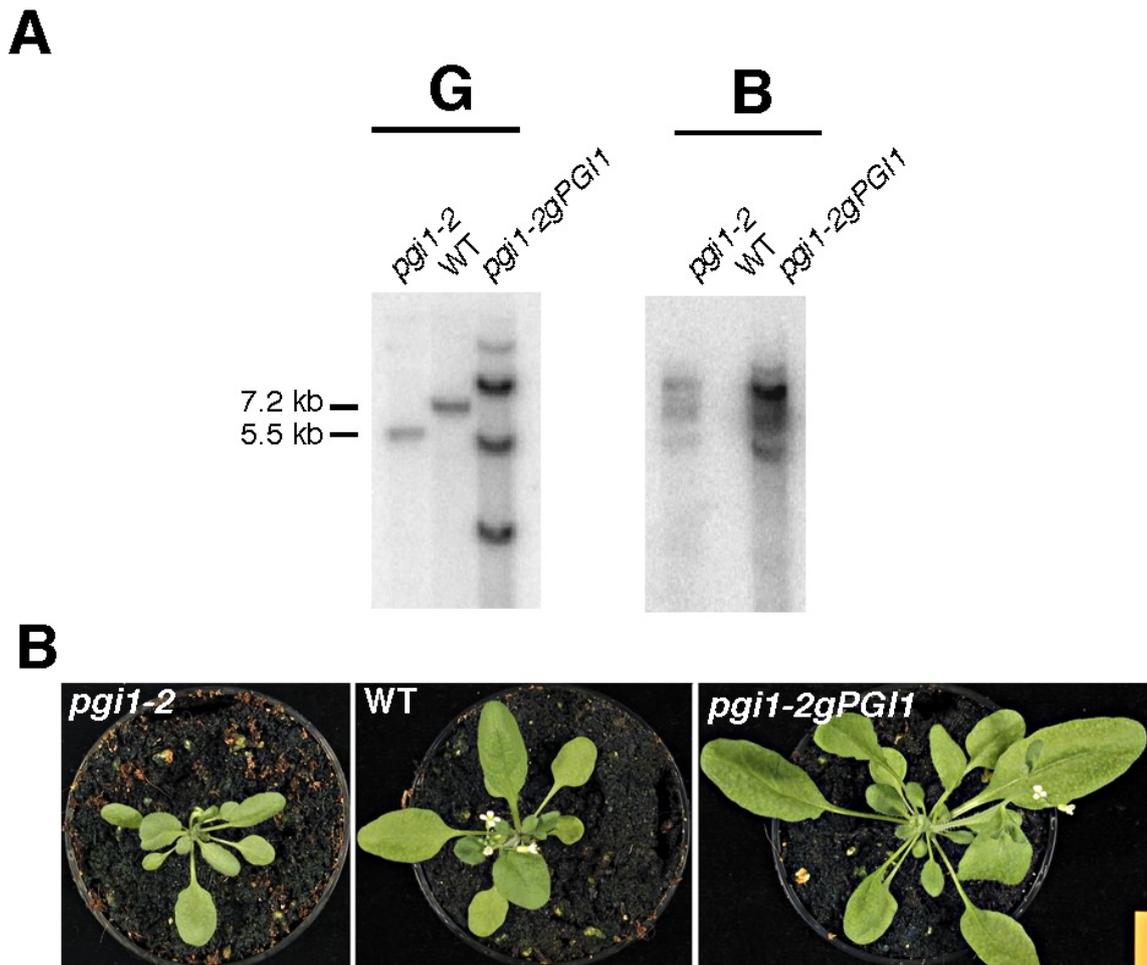
(B) Pflanze mit weißen und verschrumpelten Keimblättern (Phänotyp-Klasse 3)

(C) Pflanze mit degenerierten Keimblättern und grünen Folgeblättern (Phänotyp-Klasse 3)

(D) Pflanze mit reduziertem Wachstum (Phänotyp-Klasse 4)

(E) Pflanze mit nur einem Keimblatt (Phänotyp-Klasse 5)

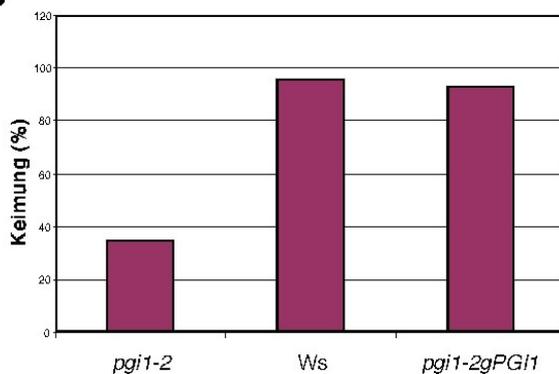
(F) WT Pflanze



**Abb. 3.19. Genetische Komplementation der *pgi1-2* Mutante.**

(A) Southern Blot Analyse mit BamHI verdauter DNA (10 µg) von *pgi1-2*, Ws und *pgi1-2gPGI1* hybridisiert mit einer genspezifischen Sonde und einer T-DNA spezifischen Sonde. G, Southern Blot mit genspezifischer Sonde; B, Southern Blot mit T-DNA spezifischen Sonde (B) Gegenüberstellung von *pgi1-2*, WT und *pgi1-2gPGI1*. Samen der genannten Linien wurden zuerst auf MS ausgesät und nach ca. 3 Wochen auf Erde überführt. Für *pgi1-2* wurden Pflanzen der Phänotyp-Klasse 4 verwendet. Nach weiteren drei Wochen folgte eine fotografische Dokumentation. Es konnte keine Korrelation zwischen der Überexpression von *PGI1* in *pgi1-2gPGI1* und größeren Pflanzen in anderen Anzuchten bestätigt werden.

Außerdem zeigte die homozygote *pgi1-2* Mutantenlinie eine erniedrigte Keimungsfähigkeit. So keimten nur 35% der ausgesäten homozygoten *pgi1-2* Pflanzen auf MS-Medium (Abb. 3.20. A).

**A****B**

**Abb. 3.20. Keimungsverhalten von *pgi1-2*.**

(A) Samen von *pgi1-2*, *Ws* und *pgi1-2gPGI1* wurden auf MS Medium mit 1 % Saccharose ausgesät und nach zwei Wochen fotografiert.

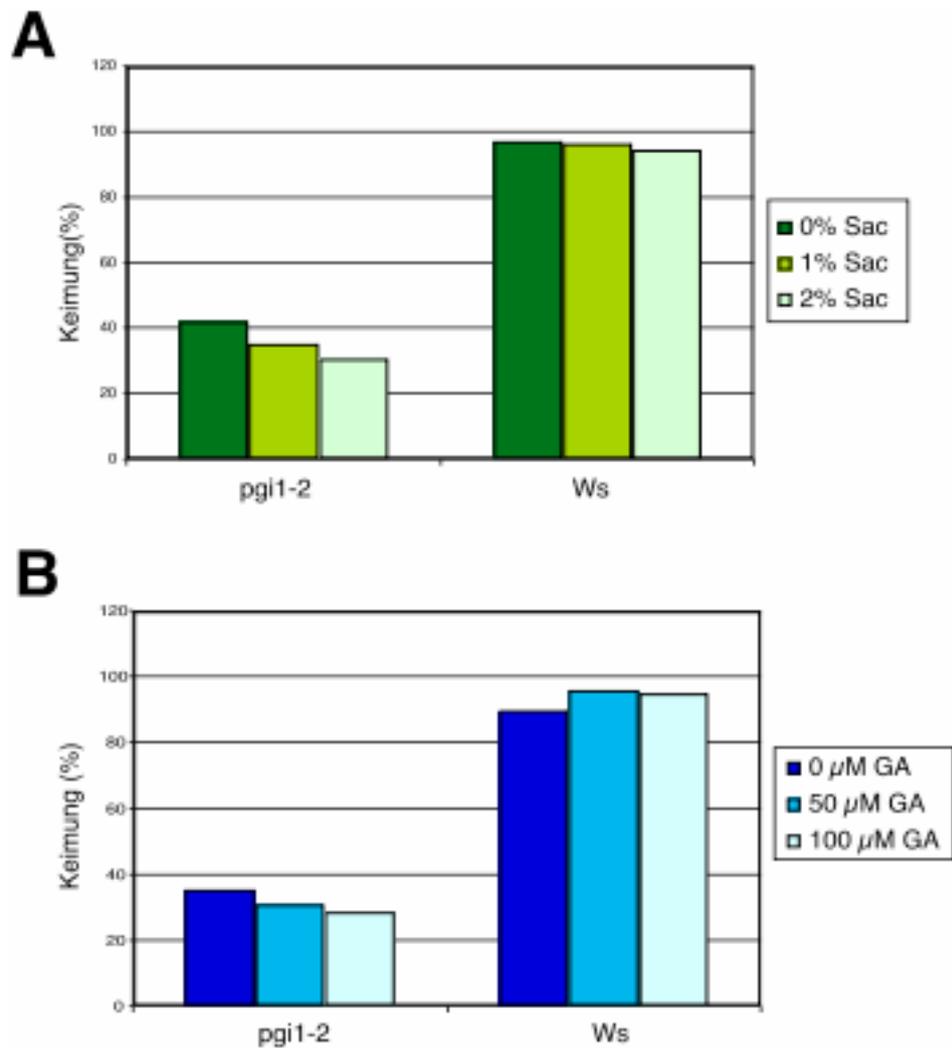
(B) Keimungspotenzial von *pgi1-2*, *Ws* und *pgi1-2gPGI1*. Für *pgi1-2* wurden insgesamt 362, für *Ws* 240 und für *pgi1-2gPGI1* 242 Pflanzen ausgezählt.

Um diese beschriebenen Phänotypen auf das Fehlen von *AtPGI1* zurückführen zu können, wurde ein genomisches *AtPGI1* Fragment von 6.3 kb aus einer genomischen Bank isoliert und in die *pgi1-2* Mutante eingeführt. In der F1-Generation wurden sieben komplementierte *pgi1-2gPGI1* Linien isoliert. Die komplementierte *pgi1-2gPGI1* Linie wies, außer dem *pgi1-2* Allel, weitere drei Insertionen des genomischen *AtPGI1*-Konstruktes in ihrem Genom auf, wie die Southern Blot Analyse mit *PGI1* spezifischen Sonde zeigt (Abb. 3.19. A). Ein dem WT ähnliches Wachstum (Abb. 3.19. B) und eine ähnliche Keimungsfähigkeit (Abb. 3.20.) konnte in den komplementierten *pgi1-2gPGI1* Linien wiederhergestellt werden. Auch wies die *pgi1-2gPGI1* Linie eine erhöhte plastidäre PGI Aktivität auf (Abb. 3.17. C), welche auf die mehrfache Kopie des genomischen Komplementationskonstruktes zurückzuführen ist.

### 3.2.4. Keimungsverhalten von *pgi1-2*

Keimungsunfähigkeit kann durch verschiedene Faktoren wie Lebensfähigkeit der Samen, Dormanz oder durch die Samenschale bedingte Hemmung verursacht werden. Um die reduzierte Keimungsfähigkeit der *pgi1-2* Mutante zu charakterisieren, wurde das Keimungspotenzial der mutierten Samen als Antwort auf verschiedene physiologische Behandlungen analysiert. Zuerst wurde die Keimungsfähigkeit der *pgi1-2* Samen in Abhängigkeit von verschiedenen exogenen Zuckerkonzentrationen ermittelt. Exogene Zucker erleichtern die Keimung durch die Bereitstellung von Energie und Nährstoffen. Dadurch heben sie den metabolischen Block auf, welcher durch Abscisinsäure (ABA) verursacht wird (Brocard-Gifford et al., 2003; Finkelstein und Gibson, 2001). Samen von *pgi1-2* und entsprechenden WT (*Wassilewskija*) wurden auf MS-Medium mit 0%, 1% und 2% Saccharosegehalt ausgesät. Die erhöhte Konzentration von Saccharose im Medium hatte annähernd keine Auswirkungen auf das Keimungspotential vom WT. Das Keimungspotential für WT betrug zwischen 95 und 97% (Abb. 3.21 A). Das Keimungspotenzial bezüglich *pgi1-2* fiel mit der Erhöhung des Saccharosegehaltes im Medium von 42% für Medium ohne Saccharose auf 31% für Medium mit 2% Saccharose (Abb. 3.21. A).

Als weiterer Faktor wurde die Auswirkung der Dormanz auf die Keimung untersucht. Die Samenruhe verhindert eine vorzeitige Keimung und wird durch Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur und Lagerungszeitraum der trockenen Samen beeinflusst. Zudem wird sie auch durch genetische Faktoren beeinflusst. Gibbereline (GA) und Kältebehandlung fördern die Auskeimung von dormanten *Arabidopsis* Samen (Koorneef und Karssen, 1994). Die Behandlungen von *pgi1-2* Samen mit GA-Konzentrationen bis 100  $\mu$ M zeigten keine Begünstigung der Auskeimung. Im Gegenteil nahm das Keimungspotenzial von 35% auf 28% mit steigenden GA-Konzentrationen ab (Abb. 3.21. B).



**Abb. 3.21. Keimungsverhalten von *pgi1-2* in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren.**

(A) Keimungspotential von *pgi1-2* und *Ws* in Abhängigkeit von verschiedenen Saccharose-Konzentrationen. Samen von *pgi1-2* und *Ws* wurden mit Chlorgas sterilisiert und auf MS-Medium mit 0%, 1% und 2 % Saccharose ausgesät. Nach zwei Wochen wurden ca. 240 Pflanzen pro Linie und pro Bedingung ausgezählt.

(B) Keimungspotenzial von *pgi1-2* und *Ws* in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von Gibberelinen (GA). Samen von *pgi1-2* und *Ws* wurden mit Chlorgas sterilisiert und auf MS-Medium mit 0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M GA ausgesät. Nach zwei Wochen wurden ca. 240 Pflanzen pro Linie und pro Bedingung ausgezählt.

Die Lebensfähigkeit der nicht ausgekeimten *pgi1-2* Samen wurde anhand eines Tertrazolium Test untersucht. Die nicht ausgekeimten *pgi1-2* Samen zeigten keine vitale Rotfärbung und wurden als nicht vital identifiziert (Abb. 3.22.). Deshalb können 65% der ausgesäten *pgi1-2* Samen nicht auskeimen.



**Abb. 3.22.** Tetrazolium-Test für die Lebensfähigkeit der Samen von *pgi1-2* und WT.

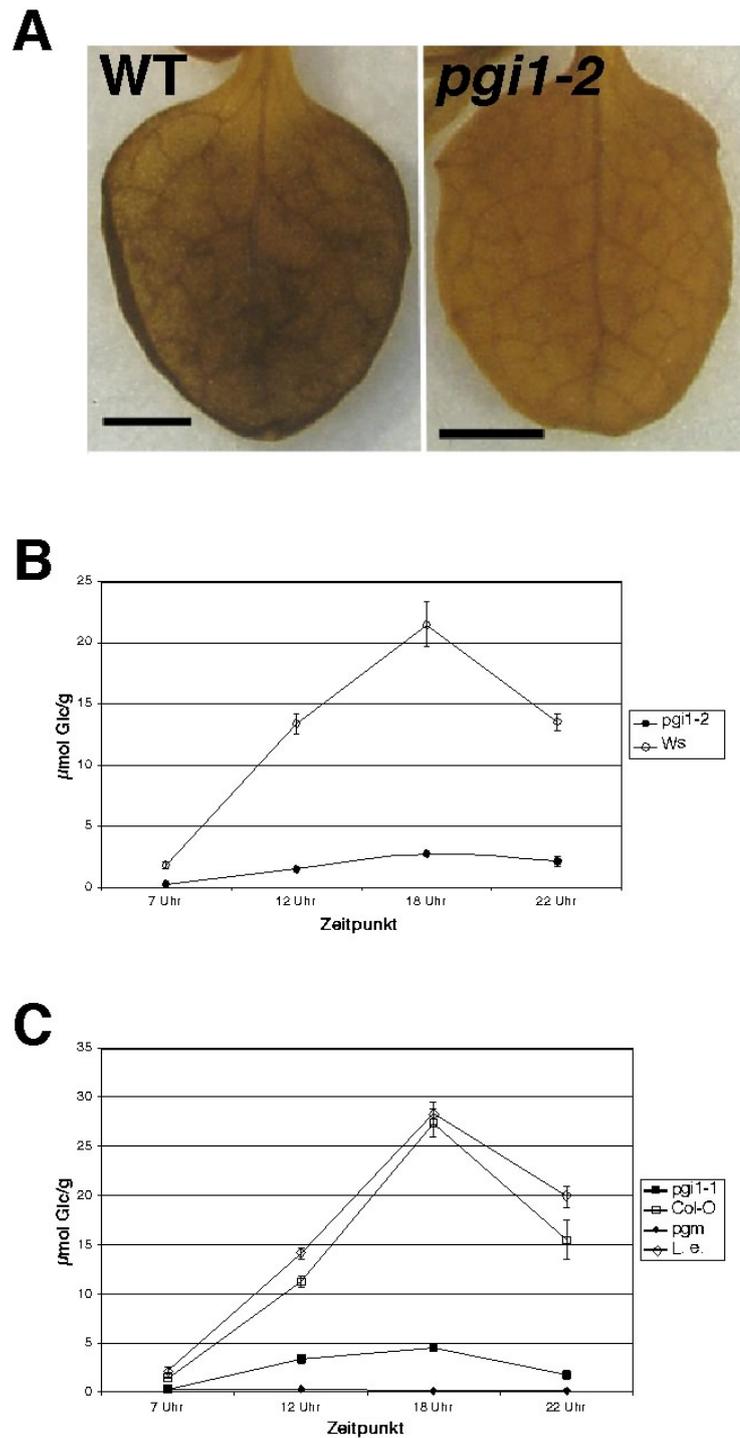
Samen von *pgi1-2* und WT wurden mit Chlorgas sterilisiert und auf MS Medium mit 1% Saccharose ausgesät. Nach einer Woche wurden nicht ausgekeimte Samen von *pgi1-2* von der Samenschale befreit und in eine 0,1% Tetrazolium-Lösung für 15 min inkubiert. WT-Samen wurden vor der Entfernung der Samenschalen zwei Tage auf MS Platten aufgequell.

### 3.2.5. Physiologische Charakterisierung von *pgi1-2*

Das plastidäre PGI Isozym katalysiert eine essentielle Reaktion in der Synthese und dem Abbau von Stärke. In der *pgi1-1* Mutante wurde zuerst kaum Stärke durch Yu und Mitarbeiter isoliert. Sie bestimmten Stärkegehalte von  $0,04 \pm 0,01$  mg Stärke /g FG für *pgi1-1* gegenüber  $2,64 \pm 0,21$  mg Stärke /g FG für den WT. Im Gegensatz dazu konnte Silke Knappe signifikante Stärkemengen in den Blättern von *pgi1-1* bestimmen. Deswegen wurde der Effekt der *pgi1-2* Mutation auf die Kohlenhydratverteilung in den Rosettenblättern der überlebendigen, homozygoten *pgi1-2* Mutanten untersucht.

Der Gehalt an Stärke und an löslichen Zuckern (Glk, Frk und Sac) wurde in der *pgi1-2* Mutante und dem entsprechendem WT (Ws) bestimmt. Zusätzlich wurde die *pgi1-1* Mutante mit dem entsprechenden WT (Col-0) und die *pgm-1* Mutante mit dem entsprechenden WT (L.e.) untersucht. Die stärkefreie Mutante *pgm-1* ist in der plastidären Isoform des Enzyms Phosphoglucomutase defekt. Entgegen den Ergebnissen von Yu et al., aber in Übereinstimmung mit den

Daten von Silke Knappe, konnte Stärke in *pgi1-1* isoliert werden. Am Ende der Lichtperiode (18 Uhr) enthielt die *pgi1-1* Line  $4,53 \pm 0,69 \mu\text{mol Glk/g}$ . Für die *pgi1-2* Mutante wurde  $2,74 \pm 0,08 \mu\text{mol Glk/g}$  (Abb. 3.23. B) bestimmt. Dies entsprach einer Reduktion des Stärkegehaltes für die *pgi1-1* Mutante von 83 % und für die *pgi1-2* Mutante von 87% im Vergleich zum WT. Diese Ergebnisse konnten auch durch eine Färbung mit Jod-Kaliumiodidlösung unterstützt werden (Abb. 3.23. A). In der *pgm-1* Mutante konnte keine Stärke detektiert werden (Abb. 3.23. C), was den Untersuchungen von Kofler et al. (2000) entsprach. Die Abnahme des Stärkegehaltes in allen untersuchten Mutanten wurde von einer Zunahme in den Gehalten an löslichen Zuckern begleitet. Die Gehalte an Saccharose, Glukose und Fruktose in der *pgi1-2* Mutante waren nach 5 h Belichtung 1,4fach, 3,9fach und 6,1fach höher als im WT (Abb. 3.24.). Ähnlich verhielt es sich auch bei den *pgi1-1* und *pgm-1* Mutanten (Abb. 3.24.). Der Gesamtzuckergehalt (lösliche Zucker + Stärke) war um 60% in der *pgi1-2* Mutante, um 62,5% in der *pgm-1* und um 67,5% in der *pgi1-1* im Vergleich zu WT am Ende der Lichtperiode verringert. Diese Tatsache spiegelt eher eine Unterbrechung der Stärkesynthese als eine Limitierung der Saccharose Synthese wider.

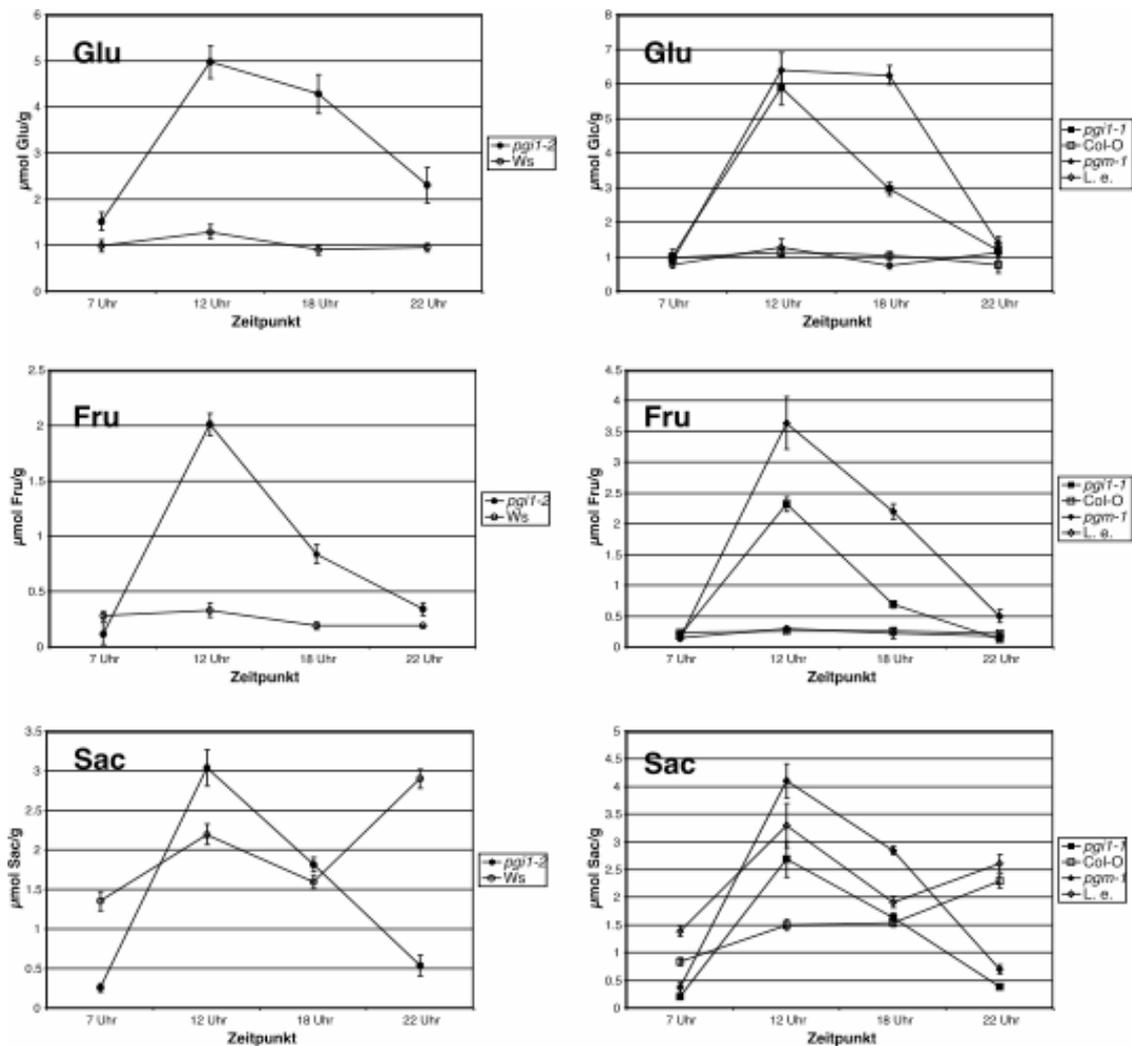


**Abb. 3.23. Stärkegehalt von *pgi1-1*, *pgi1-2*, *pgm-1* und dem entsprechendem WT.**

(A) Färbung der Blätter von *pgi1-2* und WS zum Ende der Lichtperiode mit Jod-Kaliumiodidlösung.

(B) Diurnale Stärkeakkumulierung in Blättern von *pgi1-2* und Ws. Die Stärkegehalte sind als Glukoseeinheiten an Glukosemonomeren angegeben. Daten repräsentieren 3-4 unabhängige Messungen  $\pm$  Standardfehler.

(C) Diurnale Stärkeakkumulierung in Blättern von *pgi1-1*, *pgm-1* und entsprechendem WT. Die Stärkegehalte sind als Glukoseeinheiten angegeben. Daten repräsentieren 3-4 unabhängige Messungen  $\pm$  Standardfehler.



**Abb. 3.24.** Gehalte an löslichen Zuckern (Glu, Fru, Sac) in den Blättern von *pgi1-1*, *pgi1-2*, *pgm-1* und den entsprechenden WT Pflanzen.

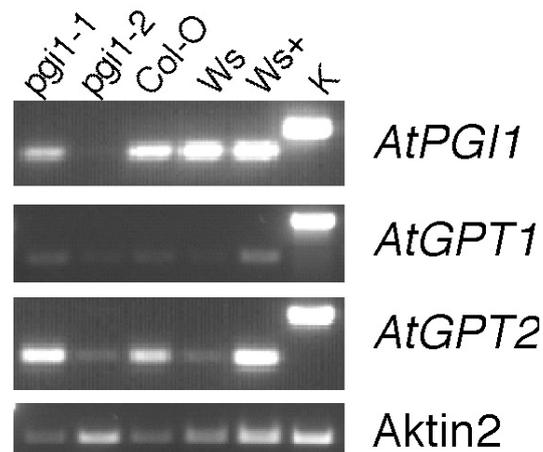
(A), (C) und (E) Diurnaler Verlauf der Gehalte an löslichen Zuckern in den Blättern von *pgi1-2* und Ws.

(B), (D) und (F) Diurnaler Verlauf der Gehalte an löslichen Zuckern in den Blättern von *pgi1-1*, *pgm-1* und den entsprechenden WT Pflanzen.

Daten aus 3-4 Messungen  $\pm$  Standardfehler.

Es konnten keine *PGI1* Transkripte (Abb. 3.17. B9 und keine plastidäre PGI Aktivität (Abb. 3.17. C) in der *pgi1-2* Linie detektiert werden, was eine Unterbrechung der Stärkesynthese durch die PGI Reaktion vermuten lässt. Als eine Erklärungsmöglichkeit für diese Reststärke könnte der Transport von Glk6P in die Chloroplasten in Betracht kommen. Silke Knappe konnte eine Expression von *AtGPT1* in den Blättern mittels RT-PCR und mit einem

*AtGPT1:uidA* Konstrukt nachweisen (Knappe, 2003). Außerdem konnte sie zeigen, dass eine ektopische Expression von GPT aus Erbsenwurzel, wie auch von *AtGPT1* und *AtGPT2* den reduzierten Stärkegehalt in der *pgi1-1* Linie komplementieren konnte. Aus diesen Gründen wurde die Expression von *AtGPT1* und *AtGPT2* in den *pgi1* Allelen untersucht. In beiden Linien konnte keine erhöhte Expression von *AtGPT1* und *AtGPT2* im Vergleich zum entsprechenden WT ermittelt werden (Abb. 3.25.).



**Abb. 3.25.** Untersuchung der Expression von *AtGPT1* und *AtGPT2* in der *pgi1-2* Mutante.

Für die RT-PCR wurde cDNA aus Blattrosetten der aufgeführten Linien verwendet. Folgende Zyklen wurde durchgeführt: für *AtPGI1* 30 Zyklen, für *AtGPT1* 28 Zyklen, für *AtGPT2* 40 Zyklen und für *Aktin2* 24 Zyklen. Als Ws+ wurde die RNA-Porbe bezeichnet, die aus Ws-Blätter nach einer Glukose Fütterung isoliert worden war.

### 3.3. Charakterisierung der Gene für 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen in *Arabidopsis thaliana*

6-Phosphogluconat Dehydrogenase (6-PGDH) ist ein Schlüsselenzym des oxidativen Pentosephosphatweges (OPPP). Als zweite Dehydrogenase des OPPPs katalysiert 6-PGDH die NADP<sup>+</sup>-abhängige oxidative Decarboxylierung von 6-Phosphogluconat zu Ribulose 5-Phosphat. In Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden drei Gene für 6-PGDHs identifiziert: *At1g64190*, *At3g02360* und *At5g41670*. Der Einfachheit halber werden diese Gene mit *At6PGDH1* bis -3 abgekürzt. Die drei Gene weisen eine 97% Nukleotidsequenzidentität auf (Abb. 3.26). Sie enthalten keine Introns. Die Sequenzen der drei Isozyme für 6-PGDH zeigten keine erkennbare Transitpeptidsequenz. Jedoch legt der Vergleich der *Arabidopsis* 6-PGDH Isozyme mit verwandten Sequenzen von Spinat nahe, dass zwei *Arabidopsis* Gene (*6PGDH1* und *6PGDH2*) plastidäre Formen des Enzyms kodieren könnten (Abb. 3.26.).

**Abb. 3.26. Aminosäuresequenzvergleich von Arabidopsis 6PGDH mit Spinat 6PGDH.**

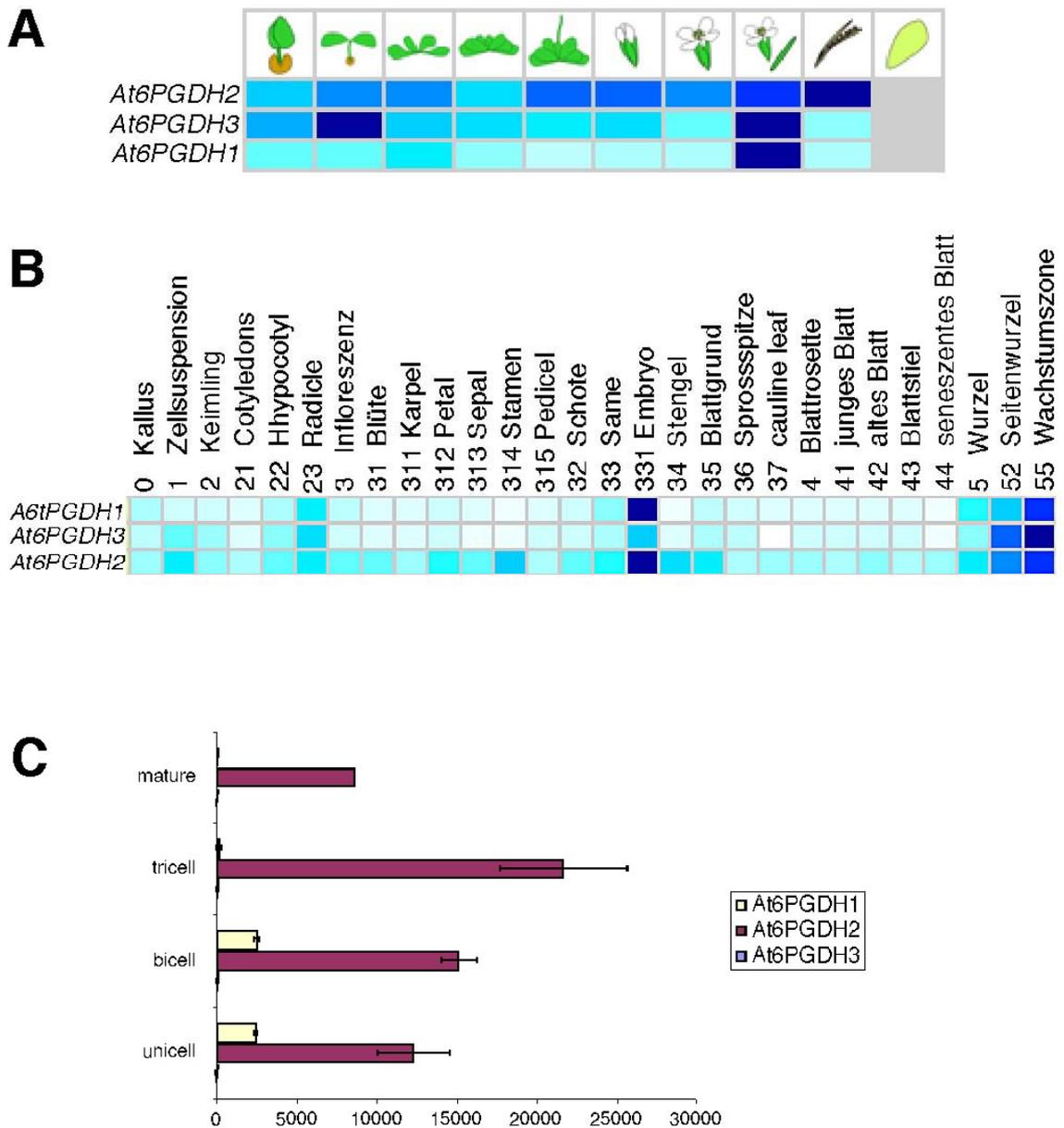
>.< bedeutet identische Aminosäuren; >-< Lücken; >\*< deutet konservative Aminosäuren an.

cp6PGDH(Spinaci	1	MRSEVPSSSTSPSFLSPPFIHLPLLSLSSPTPLPHSSSSTFSLFSTMAASQ	50
At1g64190	1	MESA.L.R	8
At3g02360	1	MAVQPTR	7
cy6PGDH(Spinaci	1	MAPPTR	6
At5g41670	1	MESV.L.R	8
		..	
cp6PGDH(Spinaci	51	IGLVGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTASKVDETLDRAKSEGDPLS	100
At1g64190	9	...A.....T.....AV..N..V	58
At3g02360	8	.....T.....VE...K..N..Y	57
cy6PGDH(Spinaci	7	.....T.....VE...Q..N..Y	56
At5g41670	9	...A.....D.....T.....N..K..VA	58
		*** *****.*****.*****.* * **	
cp6PGDH(Spinaci	101	GHYTPRDFVLSIERPRSVILVKAGSPVDQTIASLASFMPEGDTIIDGGN	150
At1g64190	59	.Q.S.....Q....LI.....A.....DAFSEY....C.....	108
At3g02360	58	.FHD.ES..K..QK..V.IM.....KT.SAYL...C.V....	107
cy6PGDH(Spinaci	57	.FHD.ES..N..QK..V.IM.....A..A..KT.SAYL.K..C.....	106
At5g41670	59	.Q.S.....QRPRSVI.....A.....SA.SEY....C.....	108
		* * ** *..** ..*****.*** ** ..* **.*.***	
cp6PGDH(Spinaci	151	EWYQNTERRLSDAHSNGLLYLGMGVSGGEEGARFGPSLMPGGDFQAYDNI	200
At1g64190	109	.....I.EAEQK.....N.....S.....	158
At3g02360	108	..E....EKAVAE..F.....N..M...SYE..K..	157
cy6PGDH(Spinaci	107	..E....EKAMEEKG.....M...S.D..K..	156
At5g41670	109	.....IVE.EKK.....N.....S..A.N..	158
		***.***** * *****.***.*** * ** *	
cp6PGDH(Spinaci	201	QHILKKVAAQVD-DGPCVTYIGEGSGNFVKMVHNGIEYGMQLISEAYD	249
At1g64190	159	KD..E.....E-.....	207
At3g02360	158	ED.VL.....RDS.....K.....A.....	207
cy6PGDH(Spinaci	157	ED..T.....-S.....K.....I.....A.....	205
At5g41670	159	KD..E.....E-.....	207
		* .***** *****.*****.*****.***	
cp6PGDH(Spinaci	250	VLKNVGLSNEELGQIFDEWNKSELESFLVEITADIFKVKDDLADGGLVD	299
At1g64190	208	.....AE..T..SG.....S...R..EFG..E..	257
At3g02360	208	..S..K.....HSV.SD..G.....GI...KG.G...	257
cy6PGDH(Spinaci	206	..S..K.....KEV.A..RG..L...I.....GI...KGE.Y...	255
At5g41670	208	.....D..AEI.T..RG.....S...R...YG..E..	257
		*** ** **.* * * ** * **.* ** * ** *	
cp6PGDH(Spinaci	300	KILDKTGMKGTGKWTVQAAELSVAAPTIAASLDCRYLSGLKEERENAAK	349
At1g64190	258	.....	307
At3g02360	258	.V.....P...ES...A.F...D..VQ...	307
cy6PGDH(Spinaci	256	.V.....S...S.F...D..VE...	305
At5g41670	258	.....D.....	307
		*.*****.*****.***.***.*.*****.* **	
cp6PGDH(Spinaci	350	ILEAAGMKEEVNAIRGGVDKRLIDDVRQALYASKICSYAQGMNLLRAKS	399
At1g64190	308	V.RE..L..IGSASSGI...V.....	357
At3g02360	308	.FK.G.FGDILTDQKVDK--.Q.V...K.....I...	355
cy6PGDH(Spinaci	306	VFK.G.VEDTLDQVVDK--.K.....A.....I...	353
At5g41670	308	V..E..L..DIGSASR.....	357
		. * .. * .*****.*****.*****.***	
cp6PGDH(Spinaci	400	AEMGWDLNLGELARIWKGCCIIRAVFLDSIKQAYQRNPNLASLVVDPEFA	449
At1g64190	358	L.KS.N..F.....R..K.....D.....	407
At3g02360	356	I.K..G.K.....I...R...D..AEA.N.L.....	405
cy6PGDH(Spinaci	354	V.KE...K.....M...R..K..D.....SN.LI...S	403
At5g41670	358	L.K.....M.....R..K.....D..	407
		* * * **.******.*** **.* * * . * .***.	
cp6PGDH(Spinaci	450	KEMVQRQAARVVGLAVSAGISTPGMCASLAYFDYRRLPANLVQAQ	499
At1g64190	408	.....	457
At3g02360	406	..IIE..S.....C..INS.....S.....S...E.....	455
cy6PGDH(Spinaci	404	..IE..S.....C..IG.....SS.....S...E.....	453
At5g41670	408	.....I.....	457
		**..**.****** ** ..*****.*****.*** *****	
cp6PGDH(Spinaci	500	RDYFGAHTYERVDLPGSYHTEWSKLARKSDPNVAAALH	537
At1g64190	458	..L.....T.R..A....T.....NH	487
At3g02360	456	.....T.VE..F...F.I..Q.KI	486
cy6PGDH(Spinaci	454	.....I..I..AF...FK..KSKI	483
At5g41670	458	..L.....T.R..A....T.....Q	487
		** ***** * * .*** * .*	

### 3.3.1. Expression der *6PGDH* Gene

Zur Analyse der Expression der drei Gene für 6-PGDH wurden öffentlich verfügbaren Mikroarray Daten auf der Internetseite [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch) verwendet. Genevestigator bietet die „Meta-Analyzer“ Funktion für den Vergleich von Expression innerhalb Genfamilien. Dabei werden die Profile der Genexpression für die Farbabstufung normalisiert, in dem für jedes Gene die höchste Signalintensität den Wert 100% (Dunkelblau) und bei Fehlen eines Signals den Wert 0% (weiß) erhält. Es wurden die absoluten Signalintensitätswerte verwendet.

Der Vergleich der Expression zwischen den drei Genen für 6-PGDH während der Pflanzenentwicklung offenbarte eine Rolle der 6-PGDH Isozyme in der letzten Entwicklungsphasen. So zeigten *6PGDH3* und *6PGDH1* die höchsten Signalintensitäten während der letzten Phase des Blühens und *6PGDH2* in Laufe der Schotenentwicklung (Abb. 3.27. A). Diese korrelierten auch mit hohen Signalintensitäten von *6PGDH2* und *6PGDH1* in Samen und Embryo (Abb. 3.27. B). Das *6PGDH3* Gen ist auch bei der Etablierung des Keimlings im Vergleich zu den anderen *6PGDH* Genen stark exprimiert. Insgesamt fällt auf, dass *6PGDH2* in allen Entwicklungsphasen hohe Expressionssignale aufweist (Abb. 3.27. A). In Geweben erreichen *6PGDH1* und *6PGDH2* eine starke Expression im Embryo. Außerdem ist *6PGDH2* überwiegend in generativen Pflanzengeweben exprimiert. Relativ hohe Expressionswerte wurden für Kron- und Staubblätter detektiert (Abb. 3.27. B). Die detaillierte Analyse der Signalintensitäten dieses Gens während der Pollenentwicklung offenbarte hohe Expression von *6PGDH2* in allen Phasen der Pollenentwicklung. *6PGDH3* zeigte keine signifikante Expression in ein-, zwei- und dreizelligen Pollenkörnern (Abb. 3.27. C), während *6PGDH1* eine geringe Expression im Vergleich zu *6PGDH2* während der Mikrogametogenese aufwies.

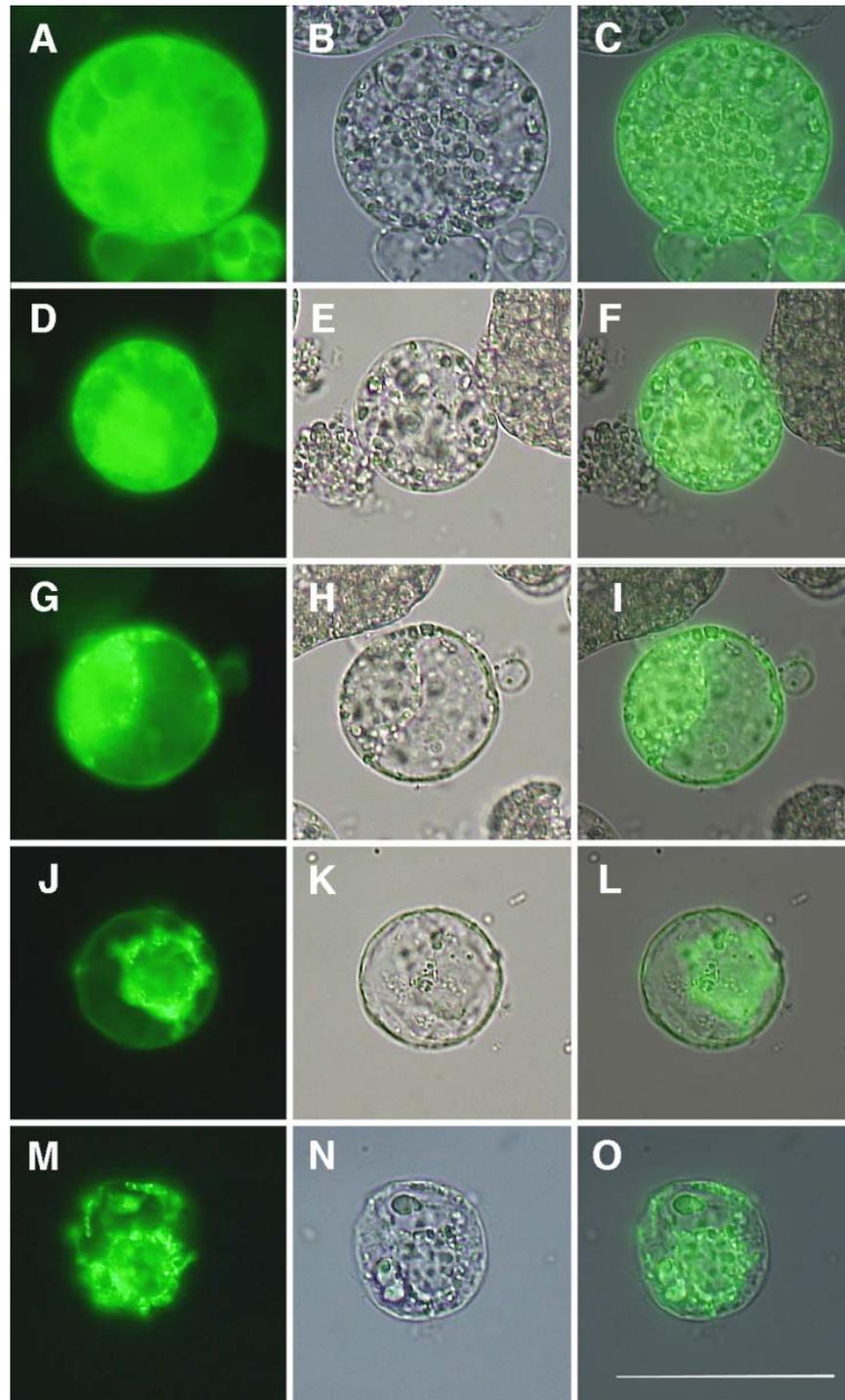


**Abb. 3.27.** Expression der Gene für 6PGDH während der Pflanzenentwicklung (A), in Pflanzengewebe (B) und während der Mikrogametogenese (C).

Die verwendeten Daten stammen von AtGenExpress und NASC auf der Genevestigator Internetseite ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)). Die *heat maps* wurden in blau-weißer Farbabstufung für die absoluten Werte der Signalintensität erstellt. Für die Expression der 6PGDH Gene in ein-, zwei- und dreizelligen Pollenkörnern wurden Signalintensitäten aus zwei technischen Wiederholungen gemittelt.

### 3.3.2. Lokalisierung der *6PGDH* Gene

Zur Lokalisierung der 6-PGDH wurde die cDNA der drei Gene mit der Sequenz des *Green Fluorescent Proteina* (GFP) translational fusioniert und in BY2-Protoplasten unter Kontrolle des 35S Promotors des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) exprimiert. Trotz der Vorhersage einer plastidären Lokalisierung von *6PGDH2* anhand von Sequenzvergleichen mit verwandten Sequenzen aus Spinat, wurde das GFP-Signal für *6PGDH2* in Cytosol der BY2-Protoplasten detektiert (Abb. 3.28. A-C). Für die Lokalisierung von *6PGDH3* brachte die Expression des Fusionsproteins mit GFP in BY2-Protoplasten keine eindeutigen Ergebnisse. Zum einen konnte eine sich regelmäßig über die ganze Zelle ausgebreitete GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.28. D-F), was einer cytosolischen Lokalisierung des Fusionsproteins entspräche. In den meisten Fällen aber konnte außer dem cytosolischen GFP-Signal zusätzliche punktförmige Fluoreszenzsignale (Abb. 3.28. E-I) detektiert werden. In Overlays überlagerten diese Fluoreszenzen Plastiden (Abb. 3.28. I). Es hatte den Anschein, dass sich das 6PGDH3-GFP Protein im Cytosol und in Plastiden befindet. Des Weiteren konnten BY2-Protoplasten mit einem plastidenähnlichen Lokalisierungssignal erkannt werden (Abb. 3.28. J-I). Ein typisches plastidäres GFP-Lokalisierungssignal ist in Abb. 3.28. M-O dargestellt. In diesem Fall wurde GFP mit der Transitpeptidsequenz von *AtPPT1* versehen. Das 6PGDH1-GFP Fusionsprotein konnte nicht in den BY2 Protoplasten exprimiert werden.



**Abb. 3.28. Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine von 6PGDH2 und 6PGDH3 in BY2-Protoplasten.**

(A) bis (C) fluoreszenzmikroskopische (A), lichtmikroskopische Aufnahmen (B) und Overlays (C) von *6PGDH2::GFP* Fusionsprotein. Beachte, dass die Plastiden keine Fluoreszenz aufweisen.

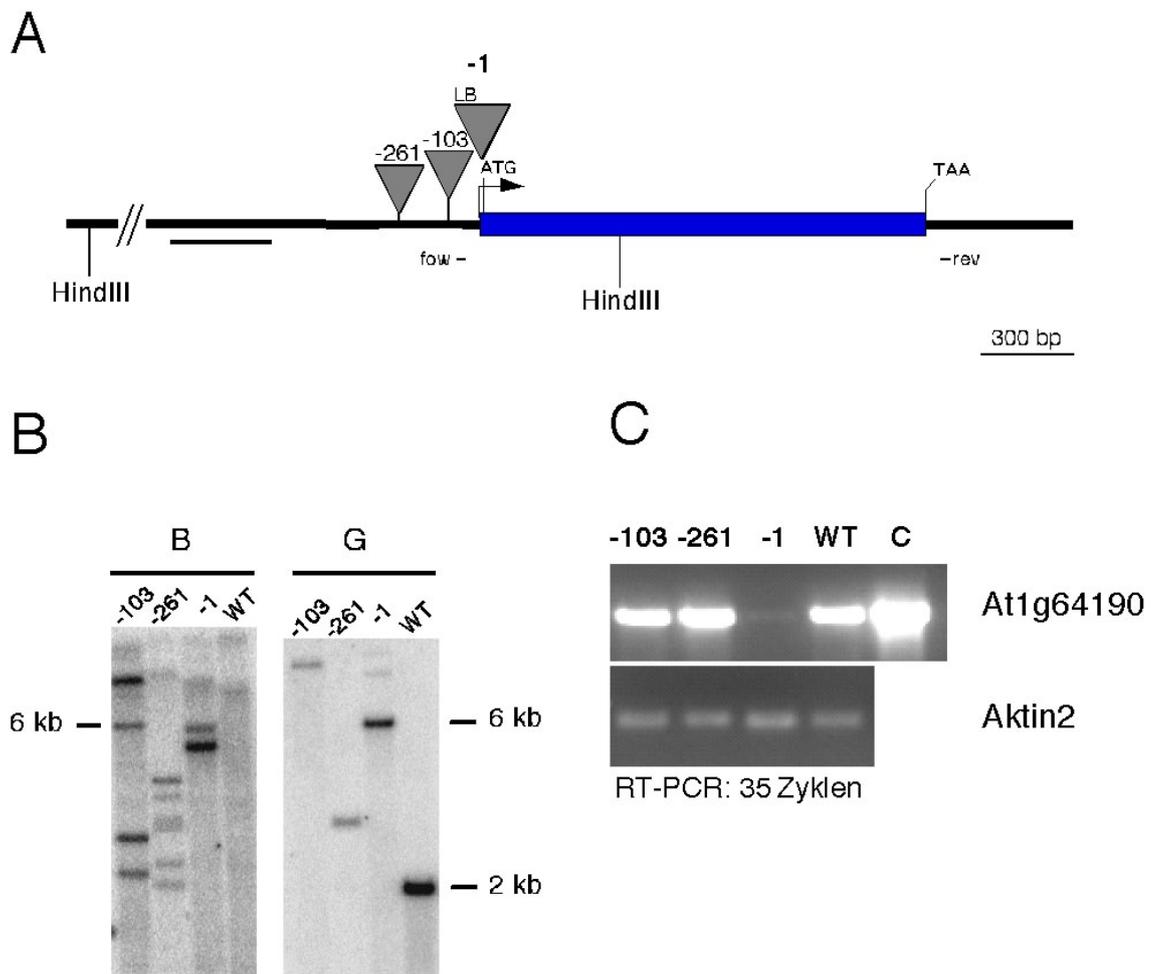
(D) bis (L) fluoreszenzmikroskopische (D, G, J), lichtmikroskopische Aufnahmen (E, H, K) und Overlays (F, I, L) von *6PGDH3::GFP* Fusionsprotein. Die GFP-Fluoreszenz konnte in Cytosol (D-F) oder gleichzeitig in Cytosol und in Plastiden (G-I) oder allein in Plastiden (J-L) beobachtet werden.

(M) bis (O) fluoreszenzmikroskopische (M), lichtmikroskopische Aufnahmen (N) und Overlays (O) von *PPT1<sub>1-300</sub>::GFP* Fusionsprotein. Beachte das typische GFP-Muster für eine plastidäre Lokalisierung.

### 3.3.3. Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien

#### 3.3.3.1. *At6PGDH1* (At1g64190)

Für das *6PGDH1* Gen wurden zwei T-DNA Insertionslinien (*6pgdh1-1* und *-2*) innerhalb der SALK Institute Kollektion und eine Linie (*6pgdh1-3*) in der GABI-KAT Population isoliert. In allen drei Linien befand sich die T-DNA Insertion oberhalb des Startkodons. Die T-DNA Insertionen wurden bei -261 für *6pgdh1-1*, -103 für *6pgdh1-2* und -1 für *6pgdh1-3* relativ zum ATG bestimmt (Abb. 3.29 A). Nur in der *6pgdh1-3* Linie konnten keine *6PGDH1* Transkripte mit RT-PCR nachgewiesen werden. Die *6PGDH1* Transkriptmenge war in den anderen Linien im Vergleich zum WT nicht verändert (Abb. 3.29. C). Southern Blot Analysen mit genspezifischen Sonden zeigten, dass alle Linien homozygot für das mutierte *6PGDH1* Allel waren (Abb. 3.29. B). In allen Linien wurden mehrere T-DNA Insertionen durch die Southern Blot Analyse mit einer T-DNA spezifischen Sonde ermittelt (Abb. 3.29. B), was auf eine zusätzliche oder komplexe Insertion hindeutet. Die homozygote Linie *6pgdh1-3* zeigte keinen auffälligen Phänotyp unter Gewächshausbedingungen.



**Abb. 3.29. Molekulare Charakterisierung der *6pgdh1* Allele.**

(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von *6PGDH1*.

(B) Southern Blot Analyse der *6PGDH1* Allele. HindIII verdaute DNA (10µg) von *6pgdh1-1* (-261), *6pgdh1-2* (-103) und *6pgdh1-3* (-1) wurden zusammen mit entsprechender WT Kontrolle mit einer T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde (in (A) angedeutet) hybridisiert.

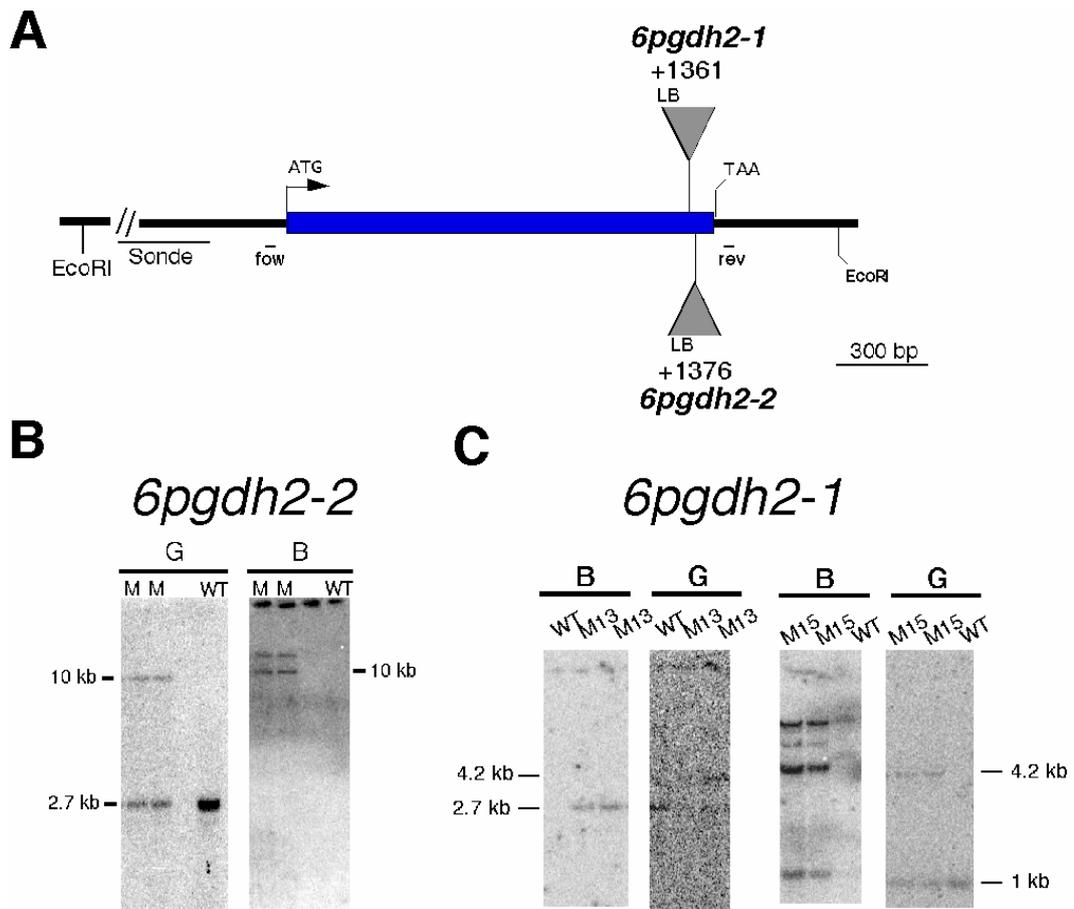
B, T-DNA spezifische Sonde; G, genspezifische Sonde

(C) Nachweis der *6PGDH1* Expression in den *6pgdh1* Allelen mittels RT-PCR. Es wurde cDNA aus Blattrosetten verwendet und 35 Zyklen für At1g64190 und 24 Zyklen für Aktin2 durchgeführt.

C, genomische WT Kontrolle

### 3.3.3.2. At6PGDH2 (At3g02360)

Sowohl in der Salk Institute Kollektion wie auch in der GABI-KAT Population wurden T-DNA Insertionslinien am *At6PGDH2* Locus identifiziert. Die *6pgdh2-1* Linie innerhalb der Salk Institute Kollektion beinhaltet die T-DNA Insertion 1376 bp unterhalb des Startkodons. Die Position der T-DNA Insertion von *6pgdh2-2* wurde bei +1361 relativ zu ATG ermittelt (Abb. 3.30. A). Die auf PCR basierte Untersuchung des Allelzustandes mit einer Kombination aus genspezifischen und T-DNA spezifischen Primern identifizierte beide Linien als heterozygot. Dies bestätigten auch Southern Blot Analysen mit genspezifischer Sonde für die *6PGDH2/6pgdh2-1* und *6PGDH2/6pgdh2-2* Linien (Abb. 3.30. B und C). Die Membranen wurden auch mit einer T-DNA spezifischen Sonde hybridisiert. In *6PGDH2/6pgdh2-1* Nr.13 wurde nur ein 3-kb Fragment detektiert, was auf eine einzige Insertion hinweist (Abb. 3.30. C). Dagegen wurden mehrere Banden für die *6PGDH2/6pgdh2-1* Nr.15 beobachtet (Abb. 3.30. C). In *6PGDH2/6pgdh2-2* wurde außer einem 10-kb Fragment eine zusätzliche Bande ermittelt, was auf eine zusätzliche oder komplexe Insertion deutet (Abb. 3.30. B).



**Abb. 3.30. Molekulare Charakterisierung der 6PGDH2 Allele.**

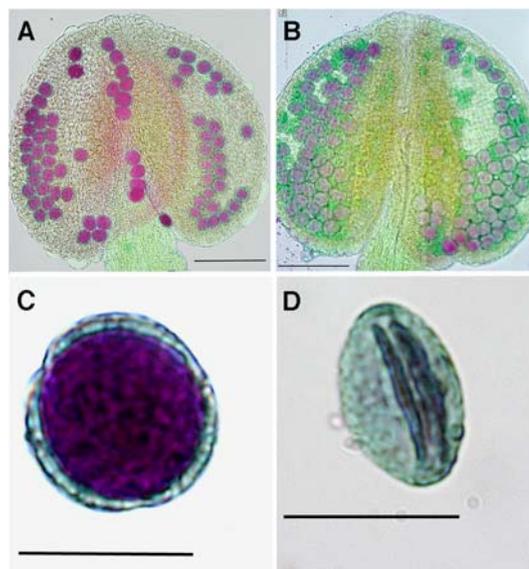
(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von 6PGDH2.

(B) Southern Blot Analyse der 6PGDH2/*6pgdh2-2* Linie. EcoRI verdaute DNA (10µg) von *6pgdh2-1* wurden zusammen mit entsprechender WT Kontrolle mit einer T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde (in (A) angedeutet) hybridisiert.

B, T-DNA spezifische Sonde; G, genspezifische Sonde

(C) Southern Blot Analyse von zwei *6pgdh2-1* Linie (M13 und M15). DNA (10µg) von 6PGDH2/*6pgdh2-1* Nr13 wurde mit EcoRI verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde hybridisiert. BamHI verdaute DNA (10µg) von 6PGDH2/*6pgdh2-1* Nr15 wurde auch mit T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde hybridisiert.

Das *6PGDH2* Gen ist sehr stark während der Pollenentwicklung exprimiert, so dass eine Beeinträchtigung der Mikrogametogenese in *6pgdh2* nicht ausgeschlossen werden kann. Es wurde eine mikroskopische Untersuchung der Pollen von beiden heterozygoten Linien mit Alexander's stain durchgeführt. Bereits in den mit Alexander's stain gefärbten und mit Pollenkörnern gefüllten Antheren von *6PGDH2/6pgdh2-2* konnten grün gefärbte, nicht vitale Pollen in erhöhter Anzahl beobachtet werden (Abb. 3.31. A-B). In der *6PGDH2/6pgdh2-2* Pflanzenlinie wurden nicht lebensfähige Pollen in einer Häufigkeit von 32% (n=11125) beobachtet. Dagegen traten nicht lebensfähige Pollen in *6PGDH2/6pgdh2-1* in einer Häufigkeit von 0,3% (n=4011) ähnlich dem WT (0,3%, n=3009) auf. Somit ist eine Beeinträchtigung der Pollenentwicklung für das Ausbleiben von homozygoten Pflanzen in den *6pgdh2* Allele fraglich.



**Abb. 3.31. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Alexander's stain gefärbten Antheren und Pollenkörner von *6PGDH2/6pgdh2-1* und WT gefärbt.**

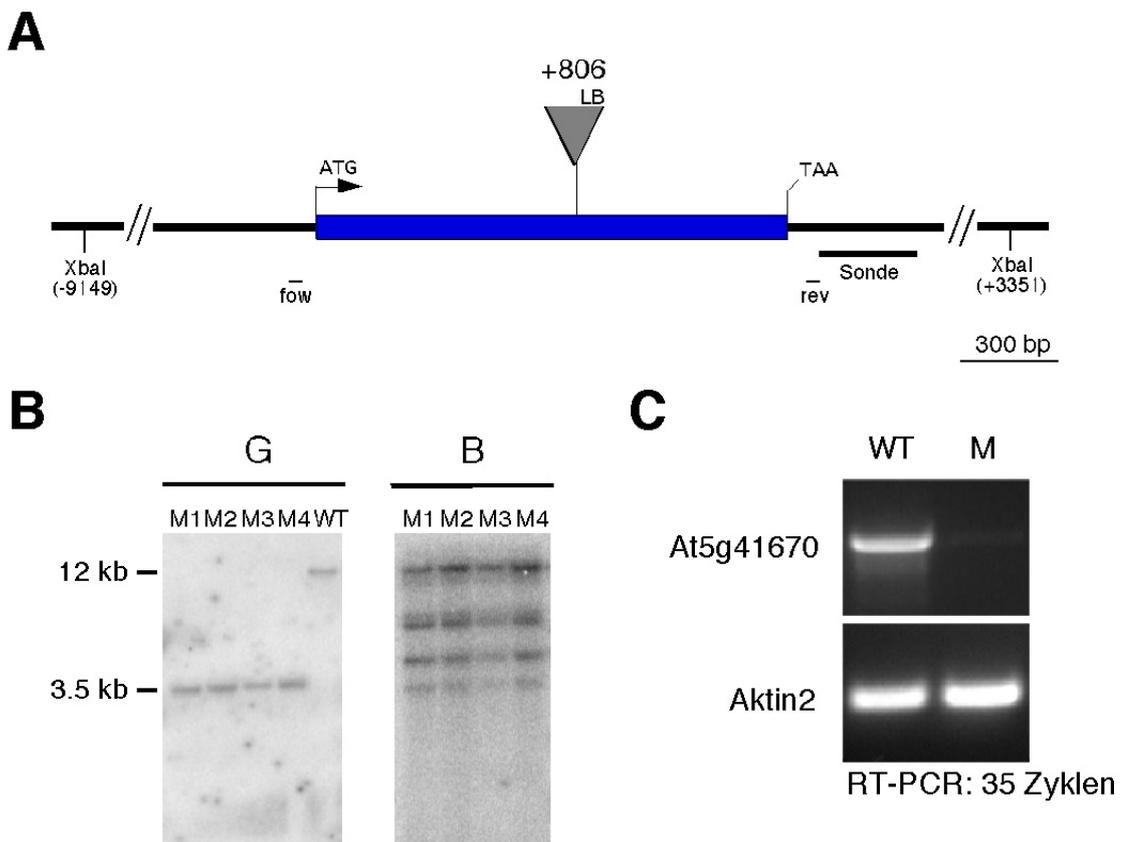
(A) und (C) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Antheren und Pollenkörnern von WT.

(B) und (D) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Antheren und Pollenkörnern von *6PGDH2/6pgdh2-1*. Beachte das häufige Auftreten von grün gefärbten Pollenkörnern in den Antheren.

Maßstab beträgt 100 µm in (A) und (B) und 20 µm in (C) und (D).

### 3.3.3.3. *At6PGDH3* (At5g41670)

Die insertionsmutagenisierte Pflanzenlinie *6pgdh3-1* mit einer T-DNA Insertion bei +806 relativ zum ATG wurde innerhalb der Salk Institute Kollektion isoliert (Abb. 3.32. A.). Eine RT-PCR Analyse mit cDNA aus Rosettenblättern von *6pgdh3-1* zeigte, dass keine *6PGDH3* Transkripte mehr in *6pgdh3-1* vorhanden waren (Abb. 3.32. C), somit handelt es sich um eine *knock-out* Mutante. Molekularbiologische Untersuchungen mittels Southern Blot Analyse ermittelten *6pgdh3-1* als homozygote Mutantenlinie mit mehreren Insertionen (Abb. 3.32. B). Unter Gewächshausbedingungen wurde kein von WT verschiedener Phänotyp beobachtet.



**Abb. 3.32. Molekulare Charakterisierung von *6pgdh3-1*.**

(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von *6PGDH3*.

(B) Southern Blot Analyse *6PGDH3-1*. *XbaI* verdaute DNA (10µg) von *6pgdh3-1* wurde zusammen mit entsprechender WT Kontrolle mit einer T-DNA spezifischen und genspezifischen Sonde (in (A) angedeutet) hybridisiert.

B, T-DNA spezifische Sonde; G, genspezifische Sonde

(C) Die *6PGDH3* Expression wurde in der *6pgdh3-1* Linie mittels RT-PCR untersucht. Es wurde cDNA aus Blattrosetten verwendet und 35 Zyklen für At5g41670 und 24 Zyklen für Aktin2 durchgeführt.

M, *6pgdh3-1* Mutante

## 4. Diskussion

Die Isolierung und die molekulare Charakterisierung von mehreren T-DNA Insertionsmutanten am GPT1 Locus wurden erfolgreich abgeschlossen und ergab, dass keine homozygoten Pflanzen für den kodierenden Bereich von GPT1 isoliert werden konnten. Segregationsanalysen von Nachkommen der Linien *GPT1/gpt1-1* und *GPT1/gpt1-2* resultierten in einem „verzerrten“ Segregationsverhältnis von  $< 1:1$ . Die reziproken Kreuzungen der heterozygoten *gpt1* Linien mit dem WT offenbarten eine verringerte Transmissions-effizienz für die T-DNA durch den männlichen wie auch durch den weiblichen Gameten. Somit konnten die heterozygoten *gpt1* Allele als gametophytische Mutanten eingestuft werden. Mutanten werden als gametophytisch bezeichnet, wenn Gene mutiert sind, die nach der Meiose, also während der haploiden Phase der Entwicklung wirken (McCormick, 2004).

### 4.1. AtGPT1 ist wesentlich für eine normale Mikrogametogenese

Die phänotypischen und genetischen Untersuchungen der heterozygoten *gpt1* Allele offenbarten eine wichtige Rolle von GPT1 während der weiblichen und männlichen Gametogenese. In den *gpt1* Allelen zeigte der männliche Gametophyt deutlich sichtbare Beeinträchtigungen, die sich in der Reduktion von vakuolären Strukturen und in der verringerten Anzahl von Fettkörperchen im reifen Pollenkorn äußerten. Diese strukturellen Veränderungen führten teilweise zur Auflösung der Pollenstruktur.

Der GPT importiert Glk6P in die Plastiden (Kammerer et al., 1998). Es stellt sich die Frage, wieso eine Unterbrechung des Glk6P Transports so eine drastische Auswirkung auf die Pollenentwicklung hat. Das importierte Glk6P kann in verschiedene Synthesewege in den Plastiden einfließen: es kann als Kohlenstoffquelle für die Stärkesynthese, als Substrat für die Fettsäuresynthese oder als Startmolekül für den oxidativen Pentosephosphatweg dienen.

Die Bedeutung von Glk6P für die Stärkesynthese in reifen Pollenkörnern geht aus der EM Studie hervor. Im Gegensatz zu den *gpt1* Pollen wurden in WT

Pollenkörnern viele Plastiden mit Stärkekörnern in der vegetativen Zelle beobachtet (Abb. 3.9. A und C). Die *gpt1* Pollenkörner wiesen lediglich plastidenähnliche Strukturen ohne Stärke (Abb. 3.9. F) auf. Jedoch sollte eine Unterbrechung der Stärkesynthese keine Auswirkung auf die Vitalität der Pollen haben, da stärkefreie Mutanten bereits isoliert und charakterisiert worden sind (Lin et al., 1988; Kofler et al., 2000). Sie zeigen keine Beeinträchtigung der Fertilität, und insbesondere konnte keine Störung der Pollenentwicklung beobachtet werden (eigene Beobachtung).

Neben einer Einspeisung in die Stärkesynthese, kann Glk6P auch in die Fettsäuresynthese einfließen. Allerdings können auch andere Metabolite (z.B. Phosphoenolpyruvat, Acetat, Malat oder Pyruvat) als Substrat für die Fettsäuresynthese dienen (Fischer und Weber, 2002). Es ist nicht bekannt, welcher Metabolit ausschlaggebend für die Fettsäuresynthese in Pollenkörnern ist. Da aber dieser Biosyntheseweg eine zentrale Rolle im Metabolismus der Zelle einnimmt, werden wahrscheinlich mehrere Substrate als Ausgangsmolekül verwendet. Somit relativiert sich möglicherweise die Bedeutung von Glk6P als Substrat für die Fettsäuresynthese. Dennoch könnte Glk6P eine konditionelle Rolle für den Metabolismus der Fettsäuren zur Zeit der Pollenentwicklung aufweisen. Die Fettsäuresynthese ist ein energie-abhängiger Prozess, der zudem für die Verlängerung der Fettsäure um zwei C-Atome Reduktionskraft in Form von zwei NADPH Molekülen erfordert. In heterotrophen Plastiden werden Reduktionsäquivalente in erster Linie durch den OPPP bereit gestellt (Kruger und von Schaewen, 2003; Ohlrogge und Brows, 1995). Durch die beiden ersten Reaktionen wird Glk6P zu Ribulose 5-Phosphat unter Bildung von zwei Molekülen NADPH und CO<sub>2</sub> oxidiert. Eine unzureichende Versorgung mit Glk6P könnte zu einer verringerten Produktion von Reduktionsäquivalenten führen und sich auf die Fettsäuresynthese auswirken.

Der Fettsäuresynthase-Komplex ist an der *de novo* Fettsäuresynthese in pflanzlichen Zellen beteiligt, welche einen wichtigen primären Biosyntheseweg in allen zellulären Organismen repräsentiert. In Pflanzenzellen werden die meisten Fettsäuren zum Aufbau von Lipiden wie Triacylglycerine, Sphingomyeline und Ceramide benötigt. Viele der Lipide funktionieren entweder als essentielle Komponenten der Zellmembranen oder als wichtige Regulatoren des Wachstums und der Differenzierung der Zelle. Dies ist eine mögliche

Erklärung, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Nullmutante für einen der Fettsäuresynthasegene isoliert werden konnte (Ohlrogge und Browse, 1995). Dadurch wird die Bedeutung der *de novo* Fettsäuresynthese für die Pflanzenentwicklung zusätzlich hervorgehoben. Es gelang aber, eine Mutante zu isolieren, die eine reduzierte Aktivität von *Enoyl-ACP* Reduktase (ENR) aufwies. ENR ist eine Komponente des Fettsäuresynthase Komplexes und katalysiert die Endreaktion des *de novo* Fettsäuresynthese-Zyklus. Diese *mod1* (*mosaic death1*) Mutante zeigte eine merkliche Abnahme der ENR-Aktivität, die aber nur zu einer Reduktion der Lipidgehalte um 10% in den *mod1* Pflanzen führte. Dies wiederum ist genug, um einen starken morphologischen Phänotyp, sowie einen verfrühten Zelltod in diesen Pflanzen zu erzeugen. Die abgestorbenen Zellen in der *mod1* Mutante wiesen ein kondensiertes Cytoplasma auf, was einem Merkmal der tierischen Apoptose ähnelt. In stark beeinträchtigten *gpt1* Pollenkörnern waren alle Organellen im Cytosol aufgelöst (Abb. 3.9 D und G), was als Zeichen für einen verfrühten Zelltod gesehen werden kann, welcher durch die fortschreitende Autolyse ausgelöst werden könnte. Unter der Annahme, dass der Mangel an Glk6P die Fettsäuresynthese unterbrechen könnte, würden somit essentielle Zellkomponenten nicht synthetisiert, was zu einem nicht physiologischen Zelltod führen könnte. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, dass die Unterbrechung von lebenswichtigen metabolischen Prozessen zu einem nicht physiologischen Zelltod führt (Vaux und Korsmeyer, 1999). Als physiologischen Zelltod werden Prozesse bezeichnet, die durch den Organismus beabsichtigt eingeleitet werden, um eigene Zellen zu töten. Der Begriff des nicht physiologischen Zelltods wird dagegen durch eine Hemmung von lebensnotwendigen, metabolischen Prozessen charakterisiert. Diese Hemmung kann entweder durch Mutationen essentieller metabolischer Komponenten oder durch Mutationen, die zu toxischen Produkten führen, hervorgerufen werden. Auch ist es möglich, durch externe Einflüsse wie Zugabe von Giften oder Mangel an Nährstoffen den nicht physiologischen Zelltod einzuleiten.

In der Entwicklung zum reifen männlichen Gametophyten spielen viele Lipidstrukturen wie Lipidkörperchen, das intrazelluläre Membransystem und die Exine eine wichtige Rolle, so dass eine Beschränkung des Lipidmetabolismus verschiedene Auswirkungen auf die Pollenentwicklung haben kann. Ähnlich den

Samen und Kotyledonen akkumulieren Pollenkörner innerhalb der vegetativen Zelle eine große Zahl an Fettkörperchen, welche eine Energiereserve zur Pollenkeimung bilden (Piffanelli et al., 1998). Tatsächlich wurde in den *gpt1* Pollenkörnern eine signifikante Reduktion in der Anzahl an Lipidkörperchen beobachtet, wobei schwach beeinträchtigte Pollenkörner immer noch Lipidkörperchen aufwiesen. Die Variabilität in der Anhäufung von Fettkörperchen wie auch in der Lebensfähigkeit von *gpt1* Pollen könnte in der unterschiedlichen Ausstattung der Plastiden mit GPT1 Protein aus der Pollenmutterzelle begründet liegen. Plastiden wie auch Mitochondrien vermehren sich durch Teilung. Wie die Verteilung der Plastiden im Verlauf der Meiose auf die Mikrosporen geschieht, ist nicht bekannt. Jedoch ist es offensichtlich, dass jede Mikrospore mit Plastiden ausgestattet sein sollten. Diese Tatsache wird zudem durch transmissions-elektronenmikroskopische Analysen bestätigt, welche zeigt, dass Mikrosporen recht große Plastiden mit wenig Stärke enthalten (Yamamoto et al., 2003). In dieser Studie wurde eine Dezimierung der Größe und der Anzahl von Plastiden im Verlauf der anschließenden Pollenentwicklungsphasen beobachtet. Reife Pollenkörner weisen wiederum größere Plastiden mit Stärke auf. Diese Reduktion der Plastiden während der Pollenentwicklung ist wahrscheinlich für die Ausprägung des *gpt1* Phänotyps ausschlaggebend, weil somit auch mögliche funktionelle GPT1 Proteine der Plastiden aus der Pollenmutterzelle verringert werden. Auch könnte die Stabilität des GPT1 Proteins aus der Pollenmutterzelle für den abgestuften Phänotyp der Pollenkörner entscheidend sein. Es liegen diesbezüglich keine Daten vor. Die Expressionsdaten und die Analyse von *gpt2-1* Mutante implizieren keine Beteiligung von GPT2 an der Pollenentwicklung. Dennoch kann eine Aktivierung von GPT2 in Abwesenheit von GPT1 nicht ausgeschlossen werden. Eine Klärung könnte eine Komplementation der *gpt1* Allele mit chimären Konstrukte bringen, bei denen *AtGPT2* unter Kontrolle des *AtGPT1* Promotors und *AtGPT1* unter Kontrolle des *AtGPT2* Promotors überexprimiert werden.

Die Bedeutung des GPT1s für die Akkumulierung von Lipiden während der Pollenentwicklung wird durch das Expressionsmuster unterstützt (Abb. 3.12.). In sich entwickelnden Pollenkörnern beginnt die Anhäufung von Lipidkörperchen nach der ersten Pollenmitose (Piffanelli et al., 1998) und korreliert mit einer

ansteigenden Expression von *GPT1* im Verlauf der Mikrogametogenese. Zu diesem Zeitpunkt ist der Bedarf an Reduktionsäquivalenten für die Fettsäuresynthese sehr hoch, so dass die starke Expression von *GPT1* in zwei- und dreizelligen Pollenkörnern diesen Anforderungen entsprechen könnte. Zusätzlich enthalten reife Pollenkörner ein extensives intrazelluläres Membransystem aus Endoplasmatischem Retikulum und Membranvesikeln, die zusammen mit den Fettkörperchen für eine rasche Expansion der Plasmamembran während des Pollenschlauchwachstums benötigt werden (Piffanelli et al., 1998). Diese intrazellulären Pollenmembranen bestehen primär aus Phospholipiden, wie Untersuchungen der Pollen von *Brassica napus* zeigten (Evans et al., 1990). Eine Beeinträchtigung der Synthese von Glycerolipiden in der *gpat1 Arabidopsis* Mutante illustrierte die Bedeutung der Membranintegrität jeweils in Pollenkörner wie auch in Tapetum (Zheng et al., 2003). In der *gpat1* Mutante ist die membrangebundene Glycerol 3-Phosphat Acyltransferase defekt, welche die Eingangsreaktion in der Glycerolipid Synthese in extraplastidären Kompartimenten katalysiert. Die Unterbrechung des *AtGPAT1* Genes führte zu einer massiven Beeinträchtigung der Pollenentwicklung, welche in Defekten des Tapetums wie auch in einer Fehlfunktion des männlichen Gametophyten resultierte. In den Zellen des Tapetums wurden strukturelle Veränderungen des ER sowie eine Reduktion der Sekretion beobachtet. Zusätzlich wurden Defekte in der Biogenese der ER-Membran und veränderte Größe von Lipidkörperchen in Pollenkörnern festgestellt. Darüber hinaus zeigten *gpat1* Pollenkörner eine erniedrigte Wettbewerbsfähigkeit während der Befruchtung. Erstaunlicherweise sind die intrazellulären Membransysteme in den schwach und mäßig beeinträchtigten *gpat1* Pollenkörnern nicht verändert (Abb. 3.9.). Das ER Membrannetzwerk und andere Membransysteme wie Kernmembran, Golgi Apparat und Mitochondrien sind gut erkennbar in diesen Pollenkörnern. Erst in stark beeinträchtigten *gpat1* Pollenkörnern konnte man eine Desorganisation des Cytosols der vegetativen Zelle erkennen, die wiederum mit einer Auflösung der Pollenwand und fortgeschrittener Autolyse einherging (Abb. 3.9.). Unter Berücksichtigung der genannten Beobachtungen können die strukturellen Veränderungen des Cytosols in stark beeinträchtigten *gpat1* Pollenkörnern als ein sekundärer Effekt der Autolyse angesehen werden.

In reifen Pollenkörnern besteht die Lipidfraktion der intrazellulären Membranen zu 65% aus Linolensäure und zu 20% aus Palmitinsäure (Piffanelli et al., 1997). Eine ähnliche Fettsäurezusammensetzung weisen auch Speicherlipide in *Brassica napus* auf. Folglich könnten Membran- und Speicherlipide einen gemeinsamen Biosyntheseweg aufweisen, welcher durch das gametophytische Genom reguliert wird (Piffanelli et al., 1998). Der Linolensäure wird eine wichtige Rolle in der Lebensfähigkeit der Pollen und in der Entwicklung von Antheren zugesprochen, da sie das Ausgangssubstrat für die Synthese von Jasmonsäure ist (Mueller, 1997). Dieser multifunktionelle Wachstumsregulator ist für viele Prozesse wie Antherdehiszenz, Fruchtreifung und Abwehr von Pathogenen während der Pflanzenentwicklung verantwortlich. Die Bedeutung von Jasmonsäure für die Pollenreifung zeigen einige *Arabidopsis* Mutanten, wie *coi1*, *dde1* und Tripelmutanten *fad3 fad7 fad8* (Xie et al., 1998; Sanders et al., 2000; McConn und Browse, 1996). In diesen Mutanten scheint die Zellorganisation und Differenzierung der Antheren normal zu sein. Jedoch kann dort keine Dehiszenz zum Zeitpunkt der Blütenöffnung stattfinden. Die sich in diesen Blüten befindlichen Pollenkörner sind nicht vital. Die *gpt1* Allele zeigen keine Defekte in der Dehiszenz, so dass eine Auswirkung der Mutation in *GPT1* auf die Produktion von Jasmonsäure während der Dehiszenz sehr unwahrscheinlich ist.

Wie die *gpat1* und auch viele andere Mutanten zeigen, spielt das sporophytische Gewebe um die Pollenkörner eine zentrale Rolle in der Mikrogametogenese (Scott et al., 2004). Allerdings konnte kein Einfluss des Tapetums und des Endothecium auf die Morphologie der *gpt1* Pollenkörner festgestellt werden (Abb. 3.8.). Die Zellen dieser sporophytischen Gewebe wiesen keine veränderten Strukturen und keine gestörte Entwicklung auf, was zudem durch die transmissions-elektronenmikroskopische Analyse bestätigt worden ist. Ferner war die Exine der kollabierten *gpt1* Pollen intakt (Abb. 3.7.), welches ebenfalls gegen eine Beteiligung des sporophytischen Gewebes an den Defekten der *gpt1* Pollen spricht.

Ein weiteres Merkmal der *gpt1* Pollenkörner war das fast völlige Fehlen von fein verteilten Vakuolen in den dreizelligen Pollenkörnern (Abb. 3.9.). Während der Mikrogametogenese verändert sich die Größe, Funktion und die Anzahl der Vakuolen (Yamamoto et al., 2003). In WT-Mikrosporen sind kleinere Vakuolen

über das ganze Cytosol verbreitet und zeigen die Merkmale einer vegetativen Vakuole. Im Laufe der Intinebildung fusionieren die kleinen Vakuolen zu einer großen Vakuole. Nach der ersten Pollenmitose sind wieder kleine Vakuolen erkennbar, die durch Invagination des Tonoplasten der großen Vakuole hervorgegangen sind. Diese Vakuolen verschwinden nach der zweiten Pollenmitose. In reifen Pollenkörnern werden neue Speichervakuolen aus rER Zisternen aufgebaut, welche sich in lytische Vakuolen nach der Dehiszenz umwandeln. Die Vakuolenentwicklung stimmt in den ersten Phasen der Pollenentwicklung zwischen *gpt1* und WT überein. In beiden Mikrosporen ist die große Vakuole erkennbar. Jedoch sind Vakuolen in reifen *gpt1* Pollen fast nicht vorhanden, so dass der Eindruck entsteht, dass *gpt1* Pollenkörner Schwierigkeiten haben, neue Vakuolen herzustellen. Das Fehlen von Vakuolen könnte somit eine direkte Konsequenz einer beeinträchtigten Fettsäuresynthese sein, so dass die *gpt1* Pollenkörner nicht in der Lage sind, genügend Lipid-Komponenten für die Bildung des Tonoplasten aufzubringen.

Interessanterweise zeigte die Mutante in der Untereinheit E Isoform 2 der vakuolären H-ATPase (VHA-E2) eine Beeinträchtigung der Pollenentwicklung. Vakuoläre H-ATPasen sind wichtig für die pH Homeostase von Komponenten des Endomembransystems. In den *vha-e2* Pollen führte der Defekt in VHA-E2 zu einer Abnormalität des Golgi-Apparates, die die Letalität der Pollen zu Folge hatte (13th Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier 2004, Poster 1-22). Dagegen ist das *AtVCL1* (*Vacuoleless1*) Gen für die Biogenese von Vakuolen im Embryo essentiell, nicht aber im Mikrogametophyten (Hicks et al., 2004). Die *vcl1* Mutante ist in die Bildung von Vakuolen im Embryo blockiert, welches zu einer veränderten Entwicklung und zur Letalität führt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine korrekte Vakuolenbiogenese für die Lebensfähigkeit von Pflanzen essentiell ist. Die Untersuchungen mit einem Tonoplast-spezifischen Marker in den *vcl1* Pollen zeigten, dass die Morphologie und die Dynamik von Vakuolen nicht beeinträchtigt waren, dennoch war die Funktion der Pollenkörner gestört. Dies impliziert, dass die Vakuolenbiogenese in Pollenkörnern unterschiedlich zu der in anderen pflanzlichen Geweben verlaufen kann.

Die Pollenschlauchkeimung ist ein essentieller Prozess während der Pflanzenentwicklung. Viele Faktoren wie z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und maternale

sowie megagametophytische Faktoren spielen dabei eine entscheidende Rolle. Aber auch die Bedeutung von Lipidkörperchen, Endomembransystem und Vakuolen für die Pollenauskeimung ist durch viele Untersuchungen belegt worden. Jeweils in *Brassica napus* (Piffanelli et al., 1997), in *Olea europaea* L. (Rodriguez-Garcia et al., 2003) sowie in *Arabidopsis* wurde eine Akkumulierung von Lipidkörpern im Verlauf der Pollenreifung beobachtet. In Olive (*Olea europaea* L.) wurde die Dynamik der Lipidkörperchen gemessen. Lipidkörperchen wurden in der Nähe des Auskeimungsapparates lokalisiert, welche zum Zeitpunkt der Pollenauskeimung in den Pollenschlauch migrierten. Im Verlauf des Pollenschlauchwachstums wurde die Anzahl der Lipidkörperchen dezimiert. Wie die Charakterisierung der *gpat1* und der *vcl1* Mutante zeigte, können Veränderungen des Endomembransystems und der Vakuolenbiogenese zu einer Störung der Pollenkeimung führen. In den *gpt1* Pollenkörnern wurde eine veränderte Anzahl der Lipidkörperchen sowie Vakuolen festgestellt, was vermuten lässt, dass vielleicht auch die Pollenkeimung beeinträchtigt ist. Diesbezüglich liegen keine Daten vor. Tatsache ist, dass stark beeinträchtigte Pollenkörner nicht auskeimen können und sie einen Anteil von ca. 9 bis 15 % ausmachen. Jedoch würde eine Transmissioneffizienz für den männlichen Gametophyten von 20% ermittelt (Tab. 3.2.). Diese Beobachtung kann entweder durch einen Effekt der *gpt1* Mutation auf die Pollenkeimung von schwach bis mäßig beeinträchtigten *gpt1* Pollenkörnern erklärt werden oder durch einen Nachteil der *gpt1* Pollen gegenüber WT Pollen während der manuellen Befruchtung, welche zur Erfassung der TE durchgeführt wurden.

Zusammengefasst kann folgende Arbeitshypothese für die Funktion von GPT1 in der Entwicklung des männlichen Gametophyten aufgestellt werden: Im Verlauf der Pollenentwicklung wurden umfassende Umstrukturierungen von Membranstrukturen von ER und Vakuolen sowie eine Akkumulierung von Lipidkörperchen beobachtet. Dies erfordert einen erhöhten Bedarf an Fettsäuren. In *gpt1* Pollen könnte der Mangel an Glk6P zu einer reduzierten Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch den OPPP zur Folge haben. Die Fettsäuresynthese könnte somit beeinträchtigt sein, und es werden nicht genügend Fettsäuren für die Membran- und Speicherlipide produziert. Dies könnte sich direkt auf die Bildung von Vakuolen und Lipidkörperchen auswirken,

was *per se* nicht letal sein muss. Aber in bestimmten Fällen könnte die vegetative Zelle die Beeinträchtigung der Fettsäure Synthese wahrnehmen und autolytische Prozesse initiieren, die zu einem nicht physiologischen Tod führen. Reduktionsäquivalente werden durch die Enzyme Glukose 6-Phosphat Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase in den beiden ersten Reaktionen des OPPP produziert. Im Falle, dass der OPPP eine kritische Rolle während der Mikrogametogenese spielt, sollten Gene, die für diese Enzyme kodieren, in diesem Gewebe exprimiert werden. Die Analyse der Expression der *AtG6PDH* und *At6PGDH* offenbarte, dass zwei Gene für *AtG6PDH* im Verlauf der Entwicklung des männlichen Gametophyten exprimiert sind. Im Gegensatz zu *AtGPT1* ist für diese beiden Gene aber die höchste Expressionsstärke im zweizelligen Pollenkorn detektiert worden. Jedoch korrelierte die Expression eines Gens für *At6PGDH* mit der Expression von *GPT1* (Abb. 3.27.). Das *At6PGDH2* Gen (*At3g02360*) ist in allen Phasen der Pollenentwicklung sehr stark exprimiert, wobei der höchste Expressionswert im dreizelligen Pollenkorn ermittelt wurde. Zudem konnten keine homozygoten Insertionsmutanten für dieses Gene isoliert werden (Abb. 3.30.). Eine erhöhte Anzahl an fehlentwickelten Pollenkörnern konnte in der *6PGDH2/6pgdh2-1* Linie beobachtet werden, was aber nicht durch ein zweites Allel bestätigt werden konnte. Weitere Untersuchungen sollten die Rolle von *At6PGDH* während der Pollenentwicklung klären. Allerdings deutet der Umstand, dass beide *6PGDH2* Allele nicht im homozygoten Allelzustand etabliert werden konnten, eine wesentliche Bedeutung von *6PGDH2* für die Pflanzenentwicklung an.

#### **4.2. Die Rolle von *AtGPT1* während der Megagametogenese**

Die TE Ergebnisse offenbarten nicht nur eine Beeinträchtigung des männlichen Gametophyten, sondern auch eine Störung der Entwicklung der weiblichen Gametophyten (Abb. 3.4.). Mikroskopische Untersuchungen bestätigten dies und zeigten eine Unterbrechung der Entwicklung des Embryosacks vor dem Zeitpunkt der Fusion der Polarkerne. Insgesamt zeigten 28 bis 32 % der weiblichen Gametophyten einen Defekt in der Entwicklung (Tab. 3.4.). Dies

stimmte mit der TE Analyse gut überein, in der eine Reduktion der TE für den weiblichen Gametophyten von 27 bis 34 % ermittelt worden war (Tab. 3.2.).

Es ist sehr wenig über die molekularen und genetischen Prozesse bekannt, welche die Entwicklung der weiblichen Gametophyten regulieren und die Funktion des Embryosacks in der Reproduktion bestimmen. Auch sind die physiologischen Prozesse im Megagametophyten nicht erforscht, so dass das Ausmaß der physiologischen Unabhängigkeit des weiblichen Gametophyten von dem sporophytischen Gewebe ungewiss ist (Christensen et al., 2002). In Folge dessen ist es sehr schwierig, die Funktion von GPT1 während der Megagametogenese einzuordnen.

Die Fusion der beiden Polarkerne ist ein komplizierter Vorgang, welcher eine starke Beteiligung des ER erfordert. Sie beginnt mit der Aufnahme des Kontakts zwischen ER und den äußeren Hüllmembranen der zwei Kerne, so dass eine kontinuierliche Membranstruktur entsteht. Anschließend werden die inneren Hüllmembranen kontaktiert und verschmelzen mit der Membranstruktur (Jensen, 1964; Schulz und Jensen, 1973; Sumner und Van Caesele, 1990; Huang und Russell, 1992). Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass in Mutanten mit Defekten in der Fusion des Polarkerns Gene für Proteine, die in den Endomembranen lokalisiert sind oder an den Elektronentransfer-Systemen beteiligt sind, geschädigt sind (Pagnussat et al., 2005). In einer weiteren Studie wurde GFA2, ein Mitglied der DnaJ Proteinfamilie, welches an der oxidativen Phosphorylierung sowie ATP Produktion in Mitochondrien beteiligt ist, für die Fusion der Polarkerne als unabdingbar identifiziert (Christensen et al., 2002). Für *gfa2* wurde vorgeschlagen, dass die Kernmembranfusion vielleicht diffusionsfähige Faktoren wie Häm, Cytochrome, Kohlenstoffgerüste und Thymidylate benötigen könnten (Christensen et al., 2002). Außerdem ist die Rolle der Zusammensetzung der Lipide beim Membranverkehr (*membrane trafficking*) innerhalb der sekretorischen Prozesse nicht außer acht zu lassen (Huijbergts et al., 2000), da sie ein wichtiger Faktor während der Membranfusion sein könnten. Eine weitere Beobachtung sollte im Hinblick auf die Funktion von GPT1 im weiblichen Gametophyten zusätzlich berücksichtigt werden. In *Zea mays* (Huang und Sheridan, 1994) und *Arabidopsis* (Schneitz et al., 1995) wurde zum Zeitpunkt der Fusion der Polarkerne eine große Vakuole gezeigt. Unter Beachtung der Ergebnisse, die mit der Untersuchung der *gpt1*

Pollenkörner erzielt worden sind, könnte eine Funktion für GPT1 in der Vakuolenbiogenese im Embryosack angenommen werden. Der Defekt in GPT1 könnte auch im Embryosack die Fettsäuresynthese beeinträchtigen, welche wiederum die Lipidzusammensetzung der Endomembranen sowie die Vakuolenbiogenese beeinflussen könnte. Dies hätte dann zu Folge, dass die Fusion der Kernmembranen arretiert wäre.

Die Bedeutung der Stärke während der Megagametogenese ist ungewiss. Zwar wurden Plastiden mit großen Stärkekörnern in der Zentralzelle beobachtet (Mansfield et al., 1990), aber ob sie eine Rolle während der Polarkernfusion spielt, ist unbekannt.

Der reife Embryosack trägt einen entscheidenden Teil zur Befruchtung bei. Die Direktion des Pollenschlauchs und der Spermazellen sowie die Initiation der Samenentwicklung hängen von einem intakten Embryosack ab. Ob ein Defekt in GPT1 auch eine Auswirkung auf diese Entwicklungsprozesse hat, ist eher unwahrscheinlich, da die Quantifizierung der beeinträchtigten Megagametophyten mit den Ergebnissen der TE gut übereinstimmt.

### **4.3. Die Funktion von GPT im diploiden Sporophyten**

#### **4.3.1. Die Funktion von GPT1 während der Samenentwicklung**

Die Charakterisierung der *gpt1* Allele zeigte klar, dass die Entwicklung der männlichen und weiblichen Gameten gestört ist. Im Fall einer Beeinträchtigung beider Gametophyten ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, homozygote Pflanzen zu erhalten. Jedoch existierten in der Literatur Beispiele, wo dies möglich war. Es wurde beschrieben, dass homozygote *sidecar pollen* Linien isoliert werden konnten, wenn auch in einer viel geringeren Frequenz als erwartet (Chen und McCormick, 1996). Die *gum* und *mud* Mutanten zeigten einen geringfügigen Transmissionsdefekt durch den männlichen Gametophyten, so dass homozygote Linien dieser Mutanten erhalten werden konnten (Lalanne und Twell, 2002). Homozygote *gpt1* Linien wurden anhand der TE Ergebnissen mit einer Wahrscheinlichkeit von fünf bis neun Prozent vorhergesagt, da die *gpt1* Mutation keine 100%ige Penetranz für beide der Gameten aufweist. Jedoch

konnten keine homozygoten *gpt1* Linien isoliert werden. Stattdessen konnten im Dermatogenstadium arretierte Embryos in einer Häufigkeit von 3 bis 6% beobachtet werden. Während der frühen Embryogenese ist die Verteilung und Differenzierung der Organellen ein wichtiger Prozess. Nach der Zygotenbildung enthält die basale Zelle (aus ihr geht der Embryo hervor) eine verlängerte Vakuole, die in der anschließenden Zellvergrößerungsphase durch mehrere kleine Vakuolen ersetzt wird. Die Anzahl der Vakuolen wird mit der gleichzeitigen Vergrößerung der Zelle verringert (Mansfield und Briarty, 1990). In der Zygote sind nur wenige Plastiden erkennbar. In den Folgestadien der Embryoentwicklung steigt die Anzahl der Plastiden kontinuierlich (Mansfield und Briarty, 1990). Der Mechanismus der Fragmentierung und Dynamik von Vakuolen ist in Pflanzen wenig verstanden. Jedoch wurde die Bedeutung der Vakuolenbiogenese für die Embryoentwicklung durch die Isolierung einiger Mutanten gezeigt, die Defekte in der Vakuolenbiogenese aufwiesen und letal sind. Als Beispiel soll die *vcl1* Mutante dienen, welche nicht in der Lage ist, Vakuolen zu bilden (Rojo et al., 2001). Das Fehlen der Vakuolen resultiert in einer Veränderung der Zellgröße und der Zellorientierung und führt zu Embryoletalität in sehr frühen Entwicklungsstadien. Ähnlich der *vcl1* Mutante sind die *gpt1* Embryos im Dermatogenstadium arretiert. Es ist nicht bekannt, ob *gpt1* Embryos Vakuolen enthalten. Folglich kann nur über die Rolle von GPT1 für die Vakuolenbildung im Verlauf der Embryogenese spekuliert werden, in dem die Ergebnisse der Analyse der Pollenentwicklung in *gpt1* Pollenkörnern berücksichtigt werden. Ähnlich wie in Pollenkörnern könnte sich die Beeinträchtigung der Fettsäuresynthese durch den Mangel an Reduktionsäquivalenten in den Plastiden direkt auf die Vakuolenbiogenese auswirken. Ein Defekt in GPT1 sollte in erster Linie den plastidären Metabolismus beeinträchtigen, da Glk6P als Substrat für die Stärkesynthese, für die Fettsäuresynthese sowie für den OPPP dienen kann. Es gibt mehrere Berichte, welche die Anwesenheit von intakten Plastiden für die Embryogenese als essentiell dokumentieren. Mutationen in Genen für ein plastidäres ATP bindendes Protein RSY3 (Apuya et al., 2002), für plastidäre Glycyl-tRNA-Synthase (Uwer et al., 1998) und für plastidäres ribosomales Protein S16 (Tsugeki et al., 1996) führen zu Unterbrechungen der Embryogenese bis zum globulären Stadium und verdeutlichen die wichtige Bedeutung einer plastidären

Funktionalität während der Embryogenese. Diese Proteine wirken zwar in verschiedenen plastidären Prozessen, sind aber innerhalb der gleichen Zeitspanne der plastidären Entwicklung erforderlich und bilden die Voraussetzungen für die Biosynthese von verschiedenen Produkten, welche entscheidend für die Embryogenese als Signalmoleküle oder Metabolite wirken. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass die Expression von GPT1 in Samen mit der Expression von Stärke metabolisierenden Enzymen korreliert. Dies zeigten Expressionsstudien mit *GPT1:uidA* (Knappe, 2003) und Mikroarray Analysen (Ruuska et al., 2002). In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung der Funktion von GPT1 in der Stärke akkumulierenden Phase im Verlauf der Embryogenese interessant. Für diesen Zweck sollte GPT1 unter Kontrolle des Ethanol induzierbare System im heterozygoten Mutantenhintergrund überexprimiert werden. Der Einsatz des induzierbaren Systems könnte die Möglichkeit eröffnen, die Funktion von GPT1 während der Samenentwicklung und in vegetativen Pflanzenteilen zu untersuchen, da die kritischen haploide Entwicklungsphase durch die Expression von GPT1 in Anwesenheit des Induktors Ethanol überbrückt werden könnte. Die Konstrukte liegen vor und können zur Transformation eingesetzt werden.

#### **4.3.2. Die Funktion von GPT1 in Blättern**

Durch Expressionsanalysen ist festgestellt worden, dass *AtGPT1* in Mesophyllzellen exprimiert wird (Knappe, 2003). Die Chloroplasten dieser Zellen sind nicht vom Import von Kohlenstoffgerüsten abhängig, da sie bioenergetisch gesehen autonom sind. Weiterhin wurde keine Glk6P Transportaktivität in diesen Zellen detektiert (Knappe, 2003). Dennoch deuteten die Untersuchungen der *pgi1-1* Mutante auf eine mögliche Funktionalität von GPT1 in Blättern hin. In der *pgi1-1* Mutante wurde eine geringe Stärkeakkumulation beobachtet, dessen Ursprung entweder auf die Restaktivität von PGI1 in dieser Mutante oder auf einen Glk6P Transport zurückgeführt werden könnte (Knappe, 2003). Zur Klärung dieser Beobachtung wurde eine Nullmutante für *AtPGI1* isoliert und charakterisiert (Abs. 3.2.). Das *pgi1-2* Allel zeigte eine Unterbrechung der *AtPGI1* Expression (Abb. 3.17. B), zudem konnte keine PGI1 Aktivität in den Chloroplasten der Blätter

nachgewiesen werden (Abb. 3.17. C). Trotzdem konnte noch ein reduzierter Stärkegehalt von 13% im Vergleich zum WT bestimmt werden, was mit den Stärkegehalten von 17% in *pgi1-1* im Vergleich zum WT vergleichbar ist (Abb. 3.23.). Daraus kann geschlossen werden, dass die noch vorhandene Stärke in den *pgi1-1* Allelen auf einer geringen GPT1 Aktivität beruht ist. Jedoch ist der endogene GPT1 nicht in der Lage, den Defekt in PGI1 vollständig zu kompensieren. Erst die Expression von AtGPT1, AtGPT2 oder PsGPT unter der Kontrolle eines 35S Promotors konnte den Niedrigstärkephänotyp der *pgi1-1* Mutante vollständig revidieren (Knappe, 2003). Es ist vorstellbar, dass die Expression von GPT1 in den Mesophyllzellen als eine „Standby“ Funktion operiert. Die Synthese oder Aktivität von GPT1 Protein wird nur nach Bedarf betrieben. Diese Annahme wird durch eine Beobachtung in Spinat (*Spinacia oleracea*) unterstützt. Nach Fütterung von Spinatblättern mit Glukose konnte ein spezifisches Glk6P Transportsystem induziert werden, so dass eine Stärkeakkumulierung in Blättern stattfand (Quick et al., 1995).

Zusätzlich produzieren Pflanzen mit einer Überexpression von AtGPT1 in Blättern vermehrt Stärke, wie die Analyse der *gpt1-3* Mutante (Abs. 3.1.8) zeigte. Erhöhte Expressionslevels der GPT1 Transkripte konnten in der *gpt1-3* Mutante (Abb. 3.14.) detektiert werden, welche zu einer Verdoppelung der Stärkegehalte in Blättern und einer geringen Saccharoseakkumulierung am Ende der Lichtperiode (Abb. 3.15.) führte. In *Arabidopsis* wird die transiente Stärkeakkumulierung von einer gleichzeitigen Saccharosesynthese während des Tages begleitet (Zeeman et al., 1998). Insgesamt deutet die Stärkeakkumulierung und die WT-ähnlichen Saccharosegehalte auf eine erhöhte CO<sub>2</sub> Fixierung hin, da im Vergleich zum WT mehr Kohlenhydrate in *gpt1-3* produziert werden. Eine Überexpression von GPT1 in Blättern führt nicht zu einer Erschöpfung von Glk6P im Cytosol, welches für die Saccharosesynthese benötigt wird. In Kartoffeln führte die Überexpression von GPT zu einer Stärkeakkumulierung und erhöhten Gehalten an phosphorylierten Zuckern wie Glk6P und Frk6P. In diesen Pflanzen konnte keine Veränderung der Photosyntheseparameter unter ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentration festgestellt werden. Jedoch wiesen diese Pflanzen eine um ca. 30% erhöhte CO<sub>2</sub>-Fixierung unter CO<sub>2</sub> gesättigten Bedingungen auf (Zhang und Ludewig, persönliche Mitteilung), was auf eine erhöhte Kapazität der Photosynthese in den GPT1

überexprimierenden Pflanzen deuten könnte. Die erhöhten Stärkegehalte könnten mit einer stetigen aber gering erhöhten Leistung des Primärstoffwechsels erklärt werden. Die Momentaufnahme der Photosynthese zeigt keine Unterschiede zum WT auf, da der erhöhte Fluss im Vergleich zum WT minimal ist. Aber diese minimale Erhöhung der Photosyntheserate und des Calvin Zyklus führt während der Entwicklung und des Wachstums der Pflanze zu einer Akkumulation von Stärke. Die Erfassung der veränderten metabolischen Prozessen, wie Photosynthese, CO<sub>2</sub>-Fixierung, Gehalte an phosphorylierten Intermediaten, sowie die Bestimmung der GPT1 Transportaktivität in der *gpt1-3* Mutante stehen noch aus.

Die Expression von *AtGPT1* im grünen Gewebe wurde mit einer „Standby“ Funktion der *GPT1* mRNA erklärt. Die Regulation dieses Mechanismus könnte posttranslational (z. B. über die RNA Stabilität), translational oder posttranslational, (z.B. über eine Phosphorylierung der Proteine oder Proteininstabilität) erfolgen. In Fall von *gpt1-3* scheint die Kontrolle des „Standby“ Systems für das GPT1 Protein nicht mehr wirksam zu sein. Durch die Überexpression von *GPT1* mRNA wird die Synthese des GPT1 Proteins angeregt, die wahrscheinlich zu einem erhöhten Glk6P Transport über die chloroplastidäre Membran führt. Das importierte Glk6P fließt in die Stärkesynthese ein.

Das *Arabidopsis* Genom enthält neben dem *GPT1* noch ein weiteres Gen *AtGPT2* für einen plastidären Glk6P Transporter. Das GPT2 Protein ist ein funktioneller Glk6P Transporter mit einem vom GPT1 verschiedenen Expressionsmuster (Knappe, 2003). Die Analysen der *gpt2-1* Mutante zeigten weder einen offensichtlichen Phänotyp unter Gewächshausbedingungen (Abb. 3.13. C) noch eine Beeinträchtigung beider Gameten. Daraus könnte geschlossen werden, dass GPT2 eine untergeordnete Rolle während der haploiden Pflanzenentwicklungsphase einnimmt. Zudem ist *GPT2* während der Seneszenz sehr stark exprimiert. Desweiteren kann die *AtGPT2* Expression durch die Behandlung mit *Pseudomonas syringae* induziert werden. Welche spezifische Funktion GPT2 während der Seneszenz wie auch während des Pathogenbefalls einnimmt, bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 4.4. Die Bedeutung des OPPPs während der Pflanzenentwicklung

Die Bedeutung des OPPP während der Pflanzenentwicklung ist wenig erforscht. Allgemein herrscht Übereinstimmung, dass der OPPP eine wichtige Quelle an Reduktionsäquivalenten sowie an Kohlenstoffgerüsten für Chloroplasten während der Nacht aber auch für nicht-photosynthetische Plastiden ist. Die meisten frühen Stadien der Pflanzenentwicklung wie die weiblichen und männlichen Gametophyten sowie sehr junge Embryonen (bis zum Herz-Stadium) sind heterotrophes Gewebe. Somit könnte der OPPP eine wichtige Rolle in deren Entwicklung spielen. Jedoch werden die Untersuchungen des OPPP durch den Umstand erschwert, dass eine Vielzahl von Genen für die Enzyme des OPPP vorhanden ist (Kruger und von Schaewen, 2003). Das *Arabidopsis* Genoms weist eine weit verbreitete Duplizierung der Gene für die Enzyme der zentralen metabolischen Prozesse auf (*Arabidopsis* Genom Initiative, 2000). Dies gilt insbesondere für den OPPP, der eine Vielzahl an Isoformen für jede seiner Reaktionen aufweist. Es gibt verschiedene Gründe für diese Vielfalt. Zum einen kodieren verschiedene Gene für Isozyme in verschiedenen Kompartimenten. Im Fall des OPPP sind einige Reaktionen jeweils in den Plastiden und im Cytosol angesiedelt (Schnarrenberger et al., 1995). Auch gibt es Hinweise auf eine Lokalisierung des oxidativen Teils des OPPPs in Peroxisomen von Erbsenblättern (Corpas et al., 1998). Weiterhin wird durch verschiedene Studien belegt, dass Gene für Isozyme mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften in verschiedenen Geweben, zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung sowie in Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen (z.B. veränderter Bedarf an NADPH) exprimiert werden (Wakao et al., 2005; Redinbaugh und Campbell, 1998; Kopriva et al., 2000). Somit wird eine vielfältige Regulation gewährleistet. Eine umfassende Untersuchung der Glukose 6-Phosphat Dehydrogenasen wurde von Wakao und Mitarbeitern (2005) durchgeführt. In *Arabidopsis* sind sechs Gene für G6PDH vorhanden. Anhand der Analyse des Transitpeptids wurden zwei cytosolische und vier plastidäre Isozyme vorhergesagt. Durch die Kombination von Daten aus Expressionstudien, biochemischen *in vitro* Untersuchungen sowie *in vivo* Enzymaktivitätsmessungen konnten *in vivo* Funktionen für die einzelnen Isozymen bestimmt werden. Dadurch wurde eine cytosolische Hauptisoform

*G6PDH6* identifiziert, welche ubiquitär exprimiert wird. Jedoch ist diese nicht in Blättern aktiv. Das andere cytosolische Isozym *G6PDH5* wird überwiegend in Blättern exprimiert und seine Aktivität ist in anderen Geweben geringer. Die Aktivitäten dieser cytosolischer Isozyme scheinen koordiniert zu sein, so dass in allen Geweben abgesehen von der Wurzel nur eine der cytosolischen Aktivitäten detektiert werden konnte. Solch eine Koordination ist wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance in der Zelle notwendig. Die plastidären Isozyme werden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die P1 Gruppe wird durch das *G6PDH1* Gen repräsentiert und ist entgegen der Charakterisierung der *G6PDH* Gene in Kartoffeln (Esposito et al., 2003; Wendt et al., 2000) vorwiegend im grünem Gewebe vertreten. Diese plastidäre Isoform kann durch NADPH inhibiert werden. Dagegen sind die Isozyme *G6PDH2* und *G6PDH3* der P2 Gruppe weniger sensitiv gegenüber einer „*feedback*“ Regulation durch NADPH und sind vor allem in der Wurzel exprimiert. T-DNA Insertionsmutanten in den cytosolischen Isozymen zeigen keinen vom WT abweichenden Phänotyp unter Gewächshausbedingungen.

Die Untersuchungen der Gene für den zweiten Schritt des oxidativen Abschnitts des OPPPs, der durch die 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (6PGDH) katalysiert wird, sind weniger weit fortgeschritten. Die cytosolischen 6PGDH Isoformen wurden in Tomaten (Tanksley und Kühn, 1985) und in Mais (Bailey-Serres et al., 1992) untersucht, aus Maiswurzeln (Bailey-Serres und Nguyen, 1992) und aus Rübeblättern (Signorini et al., 1995) aufgereinigt sowie entsprechende cDNAs aus Saat-Luzerne (Fahrendort et al., 1995) kloniert. Eine umfangreiche Studie der plastidären 6PGDH Isoform wurde in Spinat durchgeführt (Krepinsky et al., 2001). Das plastidäre Isozym wurde aus Spinatblättern gereinigt und als ein Homodimer mit Untereinheiten von 50 kDa identifiziert. Die cDNA der plastidären 6PGDH besteht aus 537 Aminosäuren und weist ein Serin-reiches Transitpeptid für den chloroplastidären Import auf. Die plastidären und cytosolischen Isoformen in Spinat hatten eine fast identische Größe von 53 kDa. Phylogenesche Analysen dieser Gene offenbarten, dass die 6PGDH Isozyme hoch konservierte Enzyme mit Sequenzähnlichkeiten von 40% und höher in einem prokaryotischen-eukaryotischen Vergleich repräsentieren. In *Arabidopsis* kodieren drei Gene für 6PGDH. Für keines dieser Gene konnte ein N-terminales spaltbares

Transitpeptid vorhergesagt werden, welches für eine Lokalisierung in Plastiden notwendig ist. Eine Vorhersage der Lokalisierung dieser Genprodukte konnte aber anhand von Sequenzvergleichen mit verwandten Sequenzen in Spinat durchgeführt werden, was in einer Identifizierung von zwei plastidären und einer cytosolischen Isoform resultierte (Krepinsky et al., 2001, Kruger und von Schaewen, 2003). Die meisten der kernkodierten plastidären Proteine werden im Cytosol mit einer N-terminalen Präsequenz synthetisiert, welche während des Imports der Proteine in die Plastiden durch eine stromale Peptidase abgespalten wird (Oblong und Lamppa, 1992). Ein N-terminales und spaltbares Transitpeptid ist notwendig und ausreichend für eine Direktion in die Organellen und für die Initiation der Translokation (Chen und Schnell, 1999; Keegstra und Froehlich, 1999; Bauer et al., 2001; Soll, 2002). Ausnahmen bilden Proteine der äußeren plastidären Hüllmembran, die im Allgemeinen durch eine interne Sequenzinformation innerhalb der Membran inseriert werden und dadurch keine abspaltbare Präsequenz aufweisen (Schleiff und Klösgen, 2001). Außerdem wurden zwei Proteine der inneren Hüllmembran ceQORH und IEP32 identifiziert, welche eine abweichende Steuerung in die Plastiden zeigten (Miras et al., 2002; Nada und Soll, 2004). Das ceQORH (Chloroplast Envelope Quinone OxidoReductase Homologue) Protein aus *Arabidopsis* benötigt kein abspaltbares N-terminales Transitpeptid für die Direktion in die innere Membran der chloroplastidären Hülle (Miras et al., 2002). Die plastidäre Lokalisierung dieses Proteins ist von einer essentiellen, aber nicht ausreichenden, internen Domäne abhängig. Dagegen zeigten die Untersuchungen am IEP32 (Inner Envelope Protein 32) aus Erbse und *Arabidopsis*, dass die sich am N-Terminalen Ende befindlichen Aminosäuren für die Steuerung und den Import von IEP32 essentiell sind. Es kommt aber zu keiner Prozessierung des Proteins während der Translokation. Zudem benötigt das Protein geringere ATP Konzentrationen für den Import, was ein Hinweis dafür ist, dass die Beteiligung von stromalen Chaperonen nicht erforderlich ist. Diese Beispiele weisen auf die Existenz von alternativen Importwegen in die Plastiden hin. Für eine Lokalisierung der 6-PGDH Proteine wurden Fusionskonstrukte jeweils aus der vollständigen cDNA der drei Gene für 6PGDH mit GFP hergestellt und ein Protoplasten-Lokalisierungsassay durchgeführt. Es konnten nur zwei Konstrukte *6PGDH2-GFP* und *6PGDH3-GFP* in den BY2 Protoplasten

exprimiert werden. Entgegen der Vorhersagen anhand von Sequenzvergleichen mit Sequenzen aus Spinat, dass es sich bei 6PGDH2 um ein plastidäres und bei 6PGDH3 um ein cytosolisches Protein handelt, wurde das GFP Signal für 6PGDH2 in Cytosol und für 6PGDH3 in Plastiden und Cytosol detektiert. Dieser Ansatz zur Lokalisierung von Proteinen wurde erfolgreich für nuklear kodierte plastidäre Proteine mit Transitpeptid etabliert, wie auch die eindeutige plastidäre Lokalisierung der Kontrolle *PPT<sub>1-300</sub>:GFP* zeigte. Auch wurde die plastidäre Lokalisierung von ceQORH durch transiente Expression von ceQORH-GFP in *Arabidopsis* und BY2 Protoplasten nachgewiesen (Miras et al., 2002). Somit scheint eine transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen zur Lokalisierung von Proteinen mit Präsequenz und mit alternativen Importwegen geeignet zu sein. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass dieser experimentelle Ansatz zur Proteinlokalisierung mit BY2 Protoplasten für die *At6PGDH* Gene nicht tauglich ist, da diese Gene ein Lokalisierungssignal enthalten könnten, das die BY2 Plastiden nicht erkennen könnten. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die *in organello* Importexperimente und eine Transfektion von *Arabidopsis* Protoplasten umfassen. Auch sollte die Lokalisierung von 6PGDH1 bestimmt werden, um zu klären, ob einer der drei Gene für ein plastidäres Isozym kodiert. Die plastidäre und cytosolische Lokalisierung der Reaktionen des oxidativen Teils von OPPP wurden in verschiedenen Pflanzenspezies nachgewiesen (Kruger und von Schaewen, 2003). Zudem sollte berücksichtigt werden, dass das *Arabidopsis* Genom möglicherweise weitere, aber bislang nicht identifizierte Gene für 6PGDH enthalten kann.

Das *At6PGDH2* Gen weist nicht nur Sequenzähnlichkeiten zu einem plastidären 6PGDH Gen aus Spinat auf, sondern besitzt auch ein mögliches peroxisomales Lokalisierungssignal PTS1 (die drei Haupttripeptide für PTS1 wurden als [SA][RK][LM]> ohne AKM> plus SRI> und PRL> definiert) am C-terminalen Ende (Reumann, 2004). Zur Zeit wird über eine Beteiligung des OPPP am Ascorbat-Glutathion Zyklus in Peroxisomen diskutiert, da sich Hinweise auf eine dortige Lokalisierung von G6PDH und 6PGDH mehreren. In Erbsenblättern konnten Aktivitäten von G6PDH und 6PGDH in Peroxisomen gezeigt werden (Corpas et al., 1998). Jedoch wurden die dafür kodierenden Gene nicht isoliert. Zusätzlich wurden G6PDH und 6PGDH Proteine in einem Proteomics Ansatz

mit *Arabidopsis* Peroxisomen identifiziert (Reumann et al., 2004). Die peroxisomale Lokalisierung mit GFP-Fusionsproteinen bedarf aber einer N-terminalen Fusion mit GFP (Brown und Baker, 2003). Bei dem verwendeten *6PGDH2-GFP* Konstrukt handelte es sich um eine C-terminale GFP-Fusion.

Für das *At6PGDH3* wurde eine duale Steuerung des GFP Fusionsproteins in die Plastiden und in das Cytosol detektiert. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele für ein duales Targeting von plastidären Proteinen. In den meisten Fällen werden solche dual gesteuerte Proteine in Mitochondrien und in Plastiden importiert (Silva-Filho, 2003). Diese Proteine, die meistens eine ähnliche Funktion in beiden Kompartimenten ausführen, werden vorwiegend durch eine spezifische Targetingsequenz posttranslational transloziert. Weiterhin gibt es Beispiele für Proteine, die außer in Plastiden entweder in extrazellulären Kompartimenten (Chen et al., 2004) oder im Cytoplasma (Kiessling et al., 2004) nachgewiesen wurden. In der Moosart *Physcomitrella patens* wurde das filamentbildende eukaryotische Protein FstZ nicht nur in Chloroplasten, sondern auch im Cytosol lokalisiert, so dass die Zell- und Organellenteilung zumindest in Moosen verknüpft werden kann (Kiessling et al., 2004). Verschiedene Mechanismen sind an der Multikompartimentierung von Proteinen beteiligt. Die transkriptionelle Kontrolle ist einer der Hauptkontrollpunkte und beruht auf der Produktion von mehreren Transkripten mit verschiedenen 5' Enden oder auf einem alternativem Splicing der Transkripte. Im Fall des FstZ Genes resultiert das duale Targeting auf der Verwendung von zwei Translationsstartpunkten innerhalb einer mRNA (ATG bei Aminosäure 1 und 108). Außer diesem posttranskriptionalen Mechanismus für die Multikompartimentierung eines Proteins können interne oder externe Signale wie Licht, metabolische Veränderungen, Prenylierung und Stress mit dem Bestimmungsort bestimmter Proteine interferieren. Die Regulierung der subzellulären Lokalisierung von Photorezeptoren durch Licht ist ein bekanntes Beispiel für diesen Mechanismus (Kircher et al., 2002). So könnte die duale Steuerung von *6PGDH3* durch den metabolischen Status der Plastiden oder des Cytosols reguliert werden, so dass der Bedarf an NADPH in den einzelnen Kompartimenten die Lokalisierung von *6PGDH3* beeinflussen könnte. Dies hätte den Vorteil, dass im Zustand eines erhöhten Bedarfs an Reduktionsäquivalenten, z.B. durch oxidativen Stress oder Nitritreduktion, die

Zelle schneller reagieren könnte. Somit könnte die duale Steuerung von *6PGDH3* das Bindestück für die Kooperation zwischen cytosolischen und plastidären OPPP darstellen, über die in *6PGDH*-defizienten Genotypen von Mais berichtet wurde (Averill et al., 1998). Keimwurzeln von Maispflanzen, die eine signifikante Reduktion der Aktivität der cytosolischen Isozyme von *6PGDH* aufwiesen, waren nicht in der Lage, den erhöhten Bedarf an NADPH, das durch externe Nitritzufuhr verursacht worden war, alleine über den plastidären OPPP zu erfüllen.

Anhand von Expressionsstudien könnte die *6PGDH2* Isoform als das in den meisten Geweben und während der Pflanzenentwicklung vorherrschendes Isozym identifiziert werden. Außerdem weist dieses Gen eine hohe Expression während der Mikrogametogenese auf, welche mit der Expression von *GPT1* in Pollenkörnern korreliert. Dies weist auf eine mögliche Rolle von *6PGDH2* und OPPP während der Pollenentwicklung hin. Zudem konnten keine homozygoten Mutantenlinien für dieses Gen isoliert werden. Jedoch bedarf die Charakterisierung der isolierten *6PGDH2* Allele weiterer Untersuchungen. Dagegen zeigte das *6PGDH3* Gen starke Expression in den Wurzeln, während der Etablierung des Keimlings und in der späten Blühphase. Die Expression des *6PGDH1* Gens, bei dem eine plastidäre Lokalisierung vorhergesagt worden ist, ist stark im Embryo und in der Blühphase. Allerdings ist dieses Gen im Vergleich zu den anderen *6PGDH* Genen weit geringer in den anderen Geweben exprimiert. Jedoch sollte die Interpretation der Expressionsdaten vorsichtig vorgenommen werden. Wie die Untersuchung von *G6PDH* ergab (Wakao et al., 2005), bestand keine Korrelation zwischen Expression und Aktivität von *G6PDH*, so dass weitere wichtige Regulationsmechanismen wie z.B. eine posttranslationale Kontrolle eine Rolle spielen könnten. Eine Beeinträchtigung der Entwicklung in den Mutantenlinien für *6PGDH1* und *6PGDH3* konnte nicht festgestellt werden. Die vorliegenden Daten über *6PGDH* Isozyme sind zu lückenhaft, um auf eine mögliche Funktion der einzelnen Isoformen innerhalb der Pflanze zu schließen. Zuerst sollte die Lokalisierung von *6PGDH* überprüft werden. Ist *6PGDH1* die plastidäre Isoform? Wird *6PGDH2* in Peroxisomen importiert? Ist *6PGDH3* *in vivo* in Cytosol und in Plastiden lokalisiert? Die Antworten auf diese Fragen sollten mehr Einblick in die Rolle der einzelnen *6PGDH* Isoformen bringen. Zudem sollten die

biochemischen Eigenschaften der Isozyme sowie die *in vivo* Enzymaktivitäten bestimmt werden, um das Bild zu vervollständigen.

Wichtige Hinweise auf die Bedeutung des OPPPs für die Entwicklung sowie für den Metabolismus der Pflanze brachten die Analysen der Enzyme des nicht oxidativen Teils von OPPP in Tabak (Henkes et al., 2001) und *Arabidopsis* (Favery et al., 1998). Die Reduktion der Aktivität von Transketolase (TK) in Tabak durch einen „Antisense“ Ansatz führte zu einer Inhibition von Metabolismus und Wachstum. Dies äußerte sich in direkter und indirekter Beeinflussung von Photosynthese, Stärke- und Saccharosesynthese sowie Shikimatweg und Phenylpropanoid Metabolismus (Henkes et al., 2001). Tabakpflanzen mit reduzierter TK Aktivität wiesen ein reduziertes Frischgewicht, weniger Blätter und kürzere Stengellängen im Vergleich zum WT auf. Diese Ergebnisse identifizierten die TK Aktivität als colimitierend oder annähernd limitierend für einige wichtige metabolische Prozesse. Es verdeutlicht die Rolle der Bereitstellung von Intermediaten durch den primären Metabolismus an den sekundären Metabolismus. Eine *Arabidopsis* Mutante in dem plastidären Gen für Ribulosephosphat-Epimerase (RPE) zeigte eine starke Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung (Favery et al., 1998). Homozygote *rpe* Pflanzen konnten nur auf Medium mit 2% Saccharosegehalt auskeimen. Trotz der exogenen Zucker im Medium hatten diese Pflanzen hellgrüne Blätter und ein reduziertes Wurzelsystem. Wenn die homozygoten *rpe* Keimlinge auf Erde transferiert wurden, starben sie ab. Die Autoren schließen aufgrund dieses Phänotyps und des Expressionsmusters im photosynthetischen Gewebe wie auch im heterotrophen jungen Gewebe, dass RPE Fehlfunktion verschiedene Konsequenzen haben könnte. Auf der einen Seite hat die Unterbrechung des *RPE* Gens Auswirkungen auf das Recycling von phosphorylierten Zuckern im Calvin Zyklus, und auf der anderen Seite könnte der Fluss durch den OPPP und somit auch viele Biosynthesewege in aktiv wachsenden Zellen beeinträchtigt werden.

Die plastidären Enzyme TK und RPE sind im Calvin Zyklus und/oder im OPPP eingebunden, dagegen katalysiert die plastidäre Phosphoglukose Isomerase eine Isomerisierung von Phosphohexosen, welche entweder zur Stärkesynthese benötigt werden oder als Substrate für den OPPP dienen. In der *pgi1-2* Nullmutante ist die Auskeimung stark beeinträchtigt. 65% der

homozygoten *pgi1-2* Samen keimen nicht aus und sind nicht vital, wie der Tetrazoliumtest zeigte (Abb. 3.22.). Die ausgekeimten *pgi1-2* Samen wiesen verschiedene Störungen der Keimlingsentwicklung auf, welche in unterschiedliche Kategorien eingestuft werden konnten. Dies ergab eine abgestufte Beeinträchtigung des Keimlings von nicht auskeimen über verschiedene Stufen bis hin zu WT ähnlichem, aber reduziertem Wachstum (Abb. 3.18.). Das Keimungspotential von *pgi1-2* Samen konnte durch die Einführung eines genomischen *PGI1* Fragments wiederhergestellt werden. Es konnten keine morphologischen Veränderungen der nicht ausgekeimten Embryonen im Vergleich zum WT (Abb. 3.22.) festgestellt werden. Im Verlauf der Samenentwicklung ist *AtPGI1* in der Entwicklungsphase von Herzstadium bis Torpedostadium stark exprimiert, was mit der Stärkeakkumulation während dieser Entwicklungsphase und der Funktion von PGI1 in der Bereitstellung von Glk6P für die Stärkesynthese korreliert. Jedoch scheint die Fehlfunktion der PGI diesen Abschnitt der Entwicklung nicht zu beeinträchtigen, so dass keine Verbindung zwischen Expression und Phänotyp angenommen werden kann. Auch sollte eine Unterbrechung der Stärkesynthese keine Auswirkung auf die Entstehung des Keimungsphänotyps haben, weil erstens die stärkefreien Mutanten *pgm-1* und *adg-1* keine Keimungsschwierigkeiten aufwiesen (eigene Beobachtung) und zweitens wahrscheinlich geringe Stärkegehalte infolge der GPT1 Aktivität in den *pgi1-2* Samen detektiert werden können. Während der gesamten Samenentwicklung kann eine signifikante Expression von *AtGPT1* und *AtGPT2* detektiert werden, so dass die Bereitstellung von Glk6P für den OPPP wie auch für die Stärkesynthese sichergestellt sein sollte. Dennoch könnte die Unterbrechung von *AtPGI1* eine Auswirkung auf den OPPP haben. Die Isomerisierung von Frk6P zu Glk6P könnte erforderlich sein, um eine Akkumulation von Frk6P zu verhindern, die in Zuge des nicht oxidativen Teils des OPPP durch die Transaldolase-Aktivität gebildet wird. Für die Ribulose 5-Phosphat Isomerase aus *E. coli* (MacElroy und Middaugh, 1982) und für die 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase aus Schaf (Silverberg und Dalziel, 1975) wurde Frk6P als Inhibitor beschrieben. Nach der Expansion des Embryos über den gesamten, durch die Integumente begrenzten Raum wird weiterhin eine Vielzahl an Biosynthesen im Embryo fortgesetzt (Baud et al., 2002), so dass der Embryo Reduktionsäquivalente und Kohlenhydratgerüste benötigt. Durch die

Anreicherung von Frk6P könnte der Fluss durch den OPPP inhibiert werden, und somit zu einer Auszehrung von Reduktionsäquivalenten und Kohlenhydratgerüsten kommen könnte, ähnlich wie in der *rpe* Mutante. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass Frk6P durch eine plastidäre Phosphofruktokinase (PFK) in Gegenwart von ATP zu Fruktose-1,6-Bisphosphat umgesetzt werden kann. Das PFK Protein wurde aus verschiedene Pflanzenspezien gereinigt und charakterisiert (Kombrink et al., 1984; Yan und Tao, 1984; Botha et al., 1986, 1987; Kruger und Dennis, 1987; Mahajan und Singh, 1989; Stitt, 1989, 1990; Wong et al., 1990; Moorhead und Plaxton, 1991; Enomoto et al., 1992; Nielsen, 1994, 1995; Podestá et al., 1994). In Kartoffel und Tabak wurde cytosolische und plastidäre PFK Aktivität gezeigt, jedoch wurden nur die cytosolische Isoformen gereinigt und kloniert (Kruger et al., 1988;). Bis jetzt konnte kein Gen für das plastidäre PFK Protein identifiziert werden. Das *Arabidopsis* Genom enthält sieben Gene für PFK, die anhand der Sequenzhomologie zu cytosolischen PFK Genen annotiert sind. Keines der Gene zeigt eine eindeutige plastidäre Sequenz (TargetP Analyse; Emanuelsson et al., 2000). Die Expression der Gene ist über alle Gewebe in unterschiedlicher Stärke verteilt (Genevestigator; Zimmermann et al., 2004). Eine Ausnahme bildet das *At5g47810* Gen, das hohe Expressionswerte nur in Samen und eine vorhergesagte Lokalisierung in Cytosol aufweist. Somit ist fraglich, ob eine plastidäre PFK Isoform während der Embryogenese in *Arabidopsis* exprimiert wird. Die Überexpression einer heterologen PFK im Hintergrund der *pgi1-2* Mutante sollte klären, ob tatsächlich eine durch Frk6P Akkumulation bewirkte Hemmung die Ursache für die Embryoletalität von *pgi1-2* ist. Die lebensfähigen homozygoten *pgi1-2* Pflanzen zeigten keine physiologischen Unterschiede zu anderen Niedrigstärkemutanten (*pgi1-1*, *pgm-1*), sondern haben ähnlich den *pgi1-1* und *pgm-1* Mutanten ein reduziertes Wachstum und einen verspäteten Blühzeitpunkt.

## 5. Zusammenfassung

Die Analyse von T-DNA Insertionsmutanten in den Genen *AtGPT1* und *AtGPT2*, die für den Glukose 6-Phosphat/Phosphat Translokator (GPT) aus *Arabidopsis thaliana* kodieren, offenbarten unterschiedliche *in planta* Funktionen der beiden Gene. Die Unterbrechung des *GPT2* Gens führte zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums und der Entwicklung der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen, wohingegen die *gpt1-1* und *gpt1-2* Mutationen letal waren. In beiden *gpt1* Allelen wurde ein verzerrtes Segregationsverhältnis und eine reduzierte Transmissioneffizienz für weibliche und männliche Gametophyten beobachtet, was auf eine Störung der gametophytischen Entwicklung hindeutet. Dies wurde durch mikroskopische Analysen der beiden Gametophyten bestätigt, die zeigten, dass die Entwicklung der Pollenkörner und Samenanlagen in *gpt1* Allelen nicht abgeschlossen werden kann. Die Entwicklung der Samenanlagen war zum Zeitpunkt der Fusion der Polarkerne arretiert. Die Beeinträchtigung der *gpt1* Pollenkörner äußerte sich durch eine geringe Bildung von Fettkörperchen und kleiner Vesikel sowie die Abwesenheit von Vakuolen, was zu einer Desintegration der Pollenstruktur führte. Zusätzlich konnten keine adulten homozygoten *gpt1* Pflanzen isoliert werden, dagegen aber konnten arretierte Embryos in einer Häufigkeit von 3-6% ermittelt werden. Diese Beobachtungen implizieren auch eine Auswirkung der *gpt1* Mutation auf die Entwicklung des Sporophyten. Insgesamt weisen alle aufgeführten Ergebnisse darauf hin, dass der durch den GPT1 vermittelte Import von Glk6P in heterotrophe Plastiden für die Pflanzenentwicklung entscheidend ist. Als Ursache für die *gpt1* Letalität wird der Mangel an GPT1 Transportaktivität vorgeschlagen, der zu einer Auszehrung des oxidativen Pentosephosphatweges führt, die wiederum die Fettsäuresynthese beeinflusst.

Eine homozygote Nullmutante *pgi1-2* wurde isoliert, die keine Expression und keine Aktivität der plastidären Phosphoglukose Isomerase (PGI1) aufwies, aber dennoch geringe Stärkegehalte enthielt. Diese Reststärke kann auf eine GPT1 Aktivität der Chloroplasten im grünen Gewebe zurückgeführt werden, was einen weiteren Hinweis auf eine Funktion von GPT1 in photosynthetischen Geweben

darstellt. Jedoch ist diese Aktivität nicht ausreichend, um den Defekt in *AtPGI1* vollständig zu kompensieren. Außerdem wies die *pgi1-2* Mutante einen Keimungsphänotyp auf, der durch die Einführung eines genomischen Fragments von *AtPGI1* kompensiert werden konnte. Nur 35% der ausgesäten *pgi1-2* Samen konnten auskeimen und zeigten zusätzlich eine Beeinträchtigung der Entwicklung in der Variationsbreite von Absterben nach der Ausbildung der Keimwurzel über die Hemmung des Keimlingswachstums nach der Bildung von Kotyledonen bis zu WT ähnlichem, aber reduziertem Wachstum. Die nicht ausgekeimten Samen waren nicht vital. Die Unterbrechung der plastidären PGI Aktivität könnte in den *pgi1-2* Samen eine Akkumulation von Frk6P bewirken, die den Fluss durch den oxidativen Pentosephosphatweg inhibieren könnte. Die Hemmung des OPPP könnte sich jeweils auf die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten wie auch von Kohlenstoffgerüsten für viele Biosynthesewege auswirken und könnte in der Letalität der Embryos wie auch in der Beeinträchtigung der Entwicklung des Keimlings in der Abhängigkeit vom Ausmaß der Frk6P Akkumulation resultieren.

Das *Arabidopsis* Genom enthält drei Gene *At6PGDH1* bis -3, die für 6-Phosphoglukonat Dehydrogenasen kodieren. Die drei Isozyme für 6PGDH, welche die zweite irreversible Reaktion des OPPP katalysiert, sind während der gesamten Pflanzenentwicklung exprimiert. Nach vorläufigen Untersuchungen konnte die Lokalisierung von *6PGDH2* im Cytosol und von *6PGDH3* im Cytosol und in Plastiden gezeigt werden. Es wurden T-DNA Insertionslinien für alle drei Gene isoliert und molekularbiologisch charakterisiert. Die *6pgdh1* und *6pgdh3* Allele zeigten keinen von WT unterschiedlichen Phänotyp unter Gewächshausbedingungen, jedoch konnten keine homozygoten Pflanzen für *6PGDH2* identifiziert werden. Das *6PGDH2* Gen zeigt hohe Expressionswerte während der Pollenentwicklung. Ob die Letalität der *6pgdh2* Allele auf eine Beeinträchtigung der Pollenentwicklung zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 6. Abkürzungen

%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	volumenbezogenes Gewichtsprozent
$\lambda$	Lambda
$\Omega$	Ohm
°C	Grad Celsius
$\mu\text{Ci}$	Mikrocurie
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
2-PGA	2-Phosphoglycolat
$^{32}\text{P}$	radioaktives Phosphorisotop mit dem Atomgewicht 32
35S	CaMV 35S-Promotor
3-PGA	3-Phosphoglycerat
A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
Abs.	absolut
ACP	Acylcarrierprotein
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-Glk	Adenosindiphosphat-Glukose
AG	Arbeitsgruppe
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
AGPase	ADP-Glukose Pyrophosphatase
AKF	Arabidopsis Knockout Facility
ATP	Adenosintriphosphat
Beq	Becquerel
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare

BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CI	Chloroform : Isoamylalkohol
CIP	<i>Calf intestine phosphatase</i>
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i> (engl.: Radioaktive Zerfälle pro Minute)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	2-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dGTP	2-Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Drug/Metabolite Transporter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2-Desoxythymidintriphosphat
E	Absorption
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Bis-(Aminoethyl)-Glycoether-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ENR	Enoyl-ACP-Reduktase
EST	expressed sequence tag
Frk	Fructose
Frk6pP	Fructose6-Phosphat
Frkbp	Fructose-1,6-bisphosphat

g	Gramm
G	Guanin
GA	Gibberelline
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glk	Glukose
Glk1P	Glukose 1-phosphat
Glk6P	Glukose 6-phosphat
GPT	Glukose 6-phosphat/Phosphat-Translokator
GUS	$\beta$ - Glucuronidase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin
K	Kalium
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
l	Liter
L · B · H	Länge · Breite · Höhe
L.e.	Landsberg (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )
LB	<i>left border</i> (engl.: linke Begrenzungssequenz der T-DNA)
m	Milli-
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (engl.: Klonierungsstelle mit mehreren Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Vektor existieren)
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat

min	Minute	
ml	Milliliter	
mM	Millimolar	
Mops	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	
mRNA	messenger (engl.: Bote) RNA	
ms	Millisekunde	
MS	Murashige-Skoog-Salz-Vitamin-Gemische Pflanzenmedien	für
Na	Natrium	
NAA	1-Naphthaleneaceticacid	
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat	
NaOH	Natriumhydroxid	
NASC	Nottigham Arabidopsis Stock Center	
ng	Nanogramm	
nm	Nanometer	
nmol	Nanomol	
Nr.	Nummer	
NST	Nucleotide Sugar Transporter	
OD	optische Dichte	
OPPP	Oxidativer Pentosephosphatweg	
pBSC	Vektor pBluescript	
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (engl.: Polymerase- Kettenreaktion)	
PEG	Polyethylenglycol	
PEP	Phosphoenolpyruvat	
PGI	Phosphoglucose-Isomerase	
pGr	Vektor pGreenII	
PHT2-1	Pi-Transporter mit geringer Pi-Affinität	
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat	
pmol	Picomol	
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	
PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator	
PT	Phosphattransporter	

PTh	Phosphattransporter Homologe
RB	<u>r</u> ight <u>b</u> order (engl.: rechte Begrenzungssequenz der T-DNA)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (engl.: Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RubP	Ribulose-1,5-bisphosphat
s.	siehe
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SB	<i>sample buffer</i> (engl.: Proben-Puffer)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Sodium Chloride/Sodium Citrate
SSPE	Sodium Chloride/Sodium Phosphate/EDTA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TE	Transmissionseffizienz
TEMED	N,N,N',N' –Teramethylendiamin
TK	Transketolase
TP	Triosephosphat
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenolpoly-(Ethylenglycolether) <sub>10</sub>

U	unit(s) (engl.: Enzymeinheit für Substratumsatz in [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ])
ü.N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glukose	Uridindiphosphat-Glucose
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-glucuronid
Xu5P	Xylulose 5-phosphat
z.B.	zum Beispiel

## 7. Literaturverzeichnis

- (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Abeijon, C., Mandon, E.C., and Hirschberg, C.B.** (1997). Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci* **22**, 203-207.
- Alexander, M.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **44**, 117-122.
- Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.J., and Goldberg, R.B.** (2002). RASPBERRY3 gene encodes a novel protein important for embryo development. *Plant Physiol* **129**, 691-705.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.** (1994). *Current Protocols in Molecular Biologie.* (New York: *Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences*).
- Averill, R.H., Bailey-Serres, J., and Kruger, N.J.** (1998). Co-operation between cytosolic and plastidic oxidative pentose phosphate pathways revealed by 6-phosphogluconate dehydrogenase-deficient genotypes of maize. *P. Journal* **14**, 449-457.
- Bailey-Serres, J., Tom, J., and Freeling, M.** (1992). Expression and distribution of cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes in maize. *Biochem Genet* **30**, 233-246.
- Baskin, C.c., Baskin, J.M.** (1998). *Seeds: ecological, biogeography and evolution of dormancy and germination.* (London: Academic Press.).
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Iepiniec, L. and Rochat, C.** (2001). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 151-160.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A., and Kessler, F.** (2001). Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**, 420-433.
- Beckles, D.M., Craig, J., and Smith, A.M.** (2001). ADP-glucose pyrophosphorylase is located in the plastid in developing tomato fruit. *Plant Physiol* **126**, 261-266.
- Bergmeyer, H.U.** (1970). *Methoden der enzymatischen Analyse.* (Weinheim: Verlag Chemie).
- Bewley, J.D.** (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Bewley, J.D., Black, M.** (1985). *Seeds: Physiology of Development and Germination.* (New York: Plenum Press).
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Botha, F.C., Small, J.G.C., and Burger A.L.** (1987). Characterisation of pyrophosphate dependent phosphofructokinase from germinating bean seeds. *Plant Sci* **51**, 151-157.
- Botha, F.C., Small, J.G.C., and de Vries, C.** (1986). Isolation and characterisation of pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-

- phosphotransferase from cucumber seeds. *Plant Cell Physiol* **27**, 1285-1295.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2003). Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiol* **131**, 78-92.
- Brown, L.A., and Baker, A.** (2003). Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med* **7**, 388-400.
- Casper, R., Huber C.C. and Sommerville C.** (1985). Alterations in growth, photosynthesis and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol* **79**, 11-17.
- Chaudhury, A.M., and Berger, F.** (2001). Maternal control of seed development. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 381-386.
- Chaudhury, A.M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M.R., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (2001). Control of early seed development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 677-699.
- Chen, M.H., Huang, L.F., Li, H.M., Chen, Y.R., and Yu, S.M.** (2004). Signal peptide-dependent targeting of a rice alpha-amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. *Plant Physiol* **135**, 1367-1377.
- Chen, X., and Schnell, D.J.** (1999). Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol* **9**, 222-227.
- Chen, Y.C., and McCormick, S.** (1996). sidecar pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development* **122**, 3243-3253.
- Christensen, C.A., Gorsich, S.W., Brown, R.H., Jones, L.G., Brown, J., Shaw, J.M., and Drews, G.N.** (2002). Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2215-2232.
- Chung, C.T., and Miller, M.H.** (1993). Preparation and Storage of Competent *Escherichia coli* Cells. *Methods in Enzymology* **218**, 621-627.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-1995.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Distefano, S., Palma, J.M., Lupianez, J.A., and Del Rio, L.A.** (1998). A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem J* **330 ( Pt 2)**, 777-784.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., and Smith, S.M.** (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J* **26**, 89-100.
- Daram, P., Brunner, S., Rausch, C., Steiner, C., Amrhein, N., and Bucher, M.** (1999). Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2153-2166.
- Debeaujon, I., and Koornneef, M.** (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol* **122**, 415-424.
- Denni, D.T., and Miernyk, J. A.** (1982). Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **33**.
- Diboll, A.G.** (1968). Fine structural development of the megagametophyte of *Zea mays* following fertilization. *Am J Bot.* **55**, 787-806.

- Drews, G.N., Lee, D., and Christensen, C.A.** (1998). Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* **10**, 5-17.
- Eastmond, P.J., Dennis, D.T., and Rawsthorne, S.** (1997). Evidence That a Malate/Inorganic Phosphate Exchange Translocator Imports Carbon across the Leucoplast Envelope for Fatty Acid Synthesis in Developing Castor Seed Endosperm. *Plant Physiol* **114**, 851-856.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res* **19**, 1349.
- Eicks, M.** (2004). Heterologe Expression und Charakterisierung pflanzlicher Transportproteine. (Köln).
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flugge, U.I., and Fischer, K.** (2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol* **128**, 512-522.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- Enomoto, T., Ohyama, H., and Kodama, M.** (1992). Purification and characterization of pyrophosphate:D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase from rice seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 251-255.
- Entwistle, G., and ap Rees, T.A.** (1990). Lack of fructose-1,6-bisphosphatase in a range of higher plants that store starch. *Biochem J* **271**, 467-472.
- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martino Rigano, V., and Carfagna, S.** (2003). Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* **216**, 639-647.
- Evans, D.E., Sang, J.P., Cominos, X., Rothnie, N.E., and Knox, R.B.** (1990). A study of phospholipids and galactolipids in pollen of two lines of *Brassica napus* L. (rapeseed) with different ratios of linoleic to linolenic acid. *Plant Physiol* **92**, 418-424.
- Fahrendorf, T., Ni, W., Shorrosh, B.S., and Dixon, R.A.** (1995). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. *Plant Mol Biol* **28**, 885-900.
- Favery, B., Lecomte, P., Gil, N., Bechtold, N., Bouchez, D., Dalmasso, A., and Abad, P.** (1998). RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *Embo J* **17**, 6799-6811.
- Finkelstein, R.R., and Gibson, S.I.** (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* **5**, 26-32.
- Fischer, K., and Weber, A.** (2002). Transport of carbon in non-green plastids. *Trends Plant Sci* **7**, 345-351.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbing, B., Weber, A., Hausler, R.E., and Flugge, U.I.** (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**, 453-462.
- Flugge, U.I.** (1992). Reaction mechanism and asymmetric orientation of the reconstituted chloroplast phosphate translocator. *Biochim Biophys Acta* **1110**, 112-118.

- Flugge, U.I.** (1999). Phosphate Translocators in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 27-45.
- Flugge, U.I.** (2000). Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends Plant Sci* **5**, 135-137.
- Flugge, U.I., and Heldt, H.W.** (1978). Specific labelling of the active site of the phosphate translocator in spinach chloroplasts by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate. *Biochem Biophys Res Commun* **84**, 37-44.
- Flugge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., and Eckerskorn, C.** (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *Embo J* **8**, 39-46.
- Goldberg, R.B., Barker, S.J., and Perez-Grau, L.** (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* **56**, 149-160.
- Gottlieb, L.D., and Higgins, R.C.** (1984). Phosphoglucose isomerase in species of *Clarkia* with and without duplication of the coding gene. *Genetics* **107**, 131-140.
- Graeve, K., von Schaewen, A., and Scheibe, R.** (1994). Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **5**, 353-361.
- Hausler, R.E., Fischer, K.L., and Flugge, U.I.** (2000a). Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by NAD(P)H fluorescence with a microtiter plate reader. *Anal Biochem* **281**, 1-8.
- Hausler, R.E., Schlieben, N.H., and Flugge, U.I.** (2000b). Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* **210**, 383-390.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., and Stitt, M.** (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**, 535-551.
- Hicks, G.R., Rojo, E., Hong, S., Carter, D.G., and Raikhel, N.V.** (2004). Germinating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires VACUOLESS1 for proper function. *Plant Physiol* **134**, 1227-1239.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T.** (2003). Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 36-41.
- Hilhorst, H.W.M.** (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci Res* **5**, 61,73.
- Howden, R., Park, S.K., Moore, J.M., Orme, J., Grossniklaus, U., and Twell, D.** (1998). Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in Arabidopsis. *Genetics* **149**, 621-631.
- Huang, B.Q., and Sheridan, W.F.** (1994). Female Gametophyte Development in Maize: Microtubular Organization and Embryo Sac Polarity. *Plant Cell* **6**, 845-861.
- Huang, B.-Q.a.R., S.D.** (1992). Female germ unit: Organization, isolation and function. *Int. Rev. Cytol.* **140**, 233-292.
- Huijbregts, R.P., Topalof, L., and Bankaitis, V.A.** (2000). Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic* **1**, 195-202.

- Jack, D.L., Yang, N.M., and Saier, M.H., Jr.** (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* **268**, 3620-3639.
- Jensen, W.A.** (1964). Observations on the fusion of nuclei in plants. *J. Cell Biol.* **23**, 669-672.
- Jones, T.W.A., Gottlieb, L. D., and Pichersky, E.** (1986). Reduced enzyme activity and starch level in an induced mutant of chloroplast phosphoglucose isomerase. *Plant Physiol* **81**, 367-371.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., and Flugge, U.I.** (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**, 105-117.
- Kawakita, M., Ishida, N., Miura, N., Sun-Wada, G.H., and Yoshioka, S.** (1998). Nucleotide sugar transporters: elucidation of their molecular identity and its implication for future studies. *J Biochem (Tokyo)* **123**, 777-785.
- Keegstra, K., and Froehlich, J.E.** (1999). Protein import into chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 471-476.
- Kiessling, J., Martin, A., Gremillon, L., Rensing, S.A., Nick, P., Sarnighausen, E., Decker, E.L., and Reski, R.** (2004). Dual targeting of plastid division protein FtsZ to chloroplasts and the cytoplasm. *EMBO Rep* **5**, 889-894.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., and Nagy, F.** (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**, 1541-1555.
- Knappe, S.** (2003). Analyse der Phosphatranslokator-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*. (Köln: Universität zu Köln).
- Knappe, S., Lottgert, T., Schneider, A., Voll, L., Flugge, U.I., and Fischer, K.** (2003). Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in *Arabidopsis*--AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J* **36**, 411-420.
- Knight, J.S., Emes, M.J., and Debnam, P.M.** (2001). Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212**, 499-507.
- Kofler, H., Hausler, R.E., Schulz, B., Groner, F., Flugge, U.I., and Weber, A.** (2000). Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet* **263**, 978-986.
- Kombrink, E., Kruger, N.J., and Beevers, H.** (1984). Properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* **74**, 395-401.
- Koorneef, M., and Karssen, C.M.** (1994). Seed dormancy and germination. In *Arabidopsis*, M.E.M.a.S. C.R., ed (New York), pp. 313-334.
- Koorneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H.** (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 33-36.
- Kopriva, S., Koprivova, A., and Suss, K.H.** (2000). Identification, cloning, and properties of cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from higher plants. *J Biol Chem* **275**, 1294-1299.

- Krepinsky, K., Plaumann, M., Martin, W., and Schnarrenberger, C.** (2001). Purification and cloning of chloroplast 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach. Cyanobacterial genes for chloroplast and cytosolic isoenzymes encoded in eukaryotic chromosomes. *Eur J Biochem* **268**, 2678-2686.
- Kruger, N.J., and von Schaewen, A.** (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 236-246.
- Kruger, N.J., and Dennis, D.T.** (1987). Molecular properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Arch. Biochem Biophys* **256**, 273-279.
- Lalanne, E., and Twell, D.** (2002). Genetic control of male germ unit organization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 865-875.
- Lin, T.-P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J.** (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131-1135.
- Liu, Y.-G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**, 457-463.
- Lopes, M.A., and Larkins, B.A.** (1993). Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* **5**, 1383-1399.
- Lord, E.M., and Russell, S.D.** (2002). The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 81-105.
- MacElroy, R.D., and Middaugh, C.R.** (1982). Bacterial ribosephosphate isomerase. *Methods Enzymol* **89 Pt D**, 571-579.
- Mahajan, R., and Singh, R.** (1989). Properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from endosperm for developing wheat grains. *Plant Physiol* **91**, 421-426.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.** (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York).
- Mansfield, S.G., and Briarty, L.G.** (1992). Cotyledon cell-development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.* **70**, 151-164.
- Mansfield, S.G., Briarty, L.G. and Erni, S.** (1990). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Can. J. Bot.* **69**, 447-460.
- Martin, W., and Herrmann, R.G.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**, 9-17.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K.V.** (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162-165.
- Mascarenhas, J.P.** (1989). The Male Gametophyte of Flowering Plants. *Plant Cell* **1**, 657-664.
- Mascarenhas, J.P.** (1993). Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* **5**, 1303-1314.
- McConn, M., and Browse, J.** (1996). The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell* **8**, 403-416.
- McCormick, S.** (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S142-153.
- McFadden, G.I.** (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 513-519.

- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N.** (2002). Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J Biol Chem* **277**, 47770-47778.
- Mohlmann, T., Tjaden, J., Henrichs, G., Quick, W.P., Hausler, R., and Neuhaus, H.E.** (1997). ADP-glucose drives starch synthesis in isolated maize endosperm amyloplasts: characterization of starch synthesis and transport properties across the amyloplast envelope. *Biochem J* **324 ( Pt 2)**, 503-509.
- Moorhead, G.B.G., and Plaxton, W.C.** (1991). High yield purification of potato tuber pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase. *Protein Expr. Purif.* **2**, 29-33.
- Mueller, M.J.** (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant.* **100**, 653-663.
- Nada, A., and Soll, J.** (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J Cell Sci* **117**, 3975-3982.
- Neuhaus, H.E., Thom, E., Mohlmann, T., Steup, M., and Kampfenkel, K.** (1997). Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant J* **11**, 73-82.
- Nielsen, T.H.** (1994). Pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from barley seedlings. Isolation, subunit composition and kinetic characterization. *Physiol. Plant.* **92**, 311-321.
- Nielsen, T.H.** (1995). Fructose-1,6-Bisphosphate Is an Allosteric Activator of Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase. *Plant Physiol* **108**, 69-73.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., and Zeeman, S.C.** (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**, 87-89.
- Nishimura, M., Beevers H.** (1979). Subcellular distribution of gluconeogenic enzymes in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiologie* **64**, 31-37.
- Oblong, J.E., and Lamppa, G.K.** (1992). Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *Embo J* **11**, 4401-4409.
- Ohlrogge, J., and Browse, J.** (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957-970.
- Olsen, O.A.** (2001). ENDOSPERM DEVELOPMENT: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 233-267.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D., and Sundaresan, V.** (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**, 603-614.
- Pang, P.P., Pruitt, R.E. and Meyerowitz M.E.** (1988). Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **11**, 805-820.
- Park, S.K., Howden, R., and Twell, D.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *geminipollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125**, 3789-3799.
- Piffanelli, P., Ross J.H.E. and Murphy D.J.** (1997). Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J* **11**, 549-562.

- Piffanelli, P., Ross J.H.E. and Murphy D.J.** (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod* **11**, 65-80.
- Podesta, F.E., Moorhead, G.B., and Plaxton, W.C.** (1994). Potato tuber pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: effect of thiols and polyalcohols on its intrinsic fluorescence, oligomeric structure, and activity in dilute solutions. *Arch Biochem Biophys* **313**, 50-57.
- Quick, W.P., Scheibe, R., and Neuhaus, H.E.** (1995). Induction of Hexose-Phosphate Translocator Activity in Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol* **109**, 113-121.
- Redinbaugh, M.G., and Campbell, W.H.** (1998). Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays* L.) root plastids: induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels. *Plant Sci* **134**, 129-140.
- Reiser, L., and Fischer, R.L.** (1993). The Ovule and the Embryo Sac. *Plant Cell* **5**, 1291-1301.
- Reumann, S.** (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* **135**, 783-800.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., and Babujee, L.** (2004). AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol* **136**, 2587-2608.
- Rodriguez-Garcia, M.I., M'Rani-Alaoui, M., and Fernandez, M.C.** (2003). Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Protoplasma* **221**, 237-244.
- Rojo, E., Gillmor, C.S., Kovaleva, V., Somerville, C.R., and Raikhel, N.V.** (2001). VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in Arabidopsis. *Dev Cell* **1**, 303-310.
- Russell, S.D.** (1993). The Egg Cell: Development and Role in Fertilization and Early Embryogenesis. *Plant Cell* **5**, 1349-1359.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., and Ohlrogge, J.B.** (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell* **14**, 1191-1206.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., and Goldberg, R.B.** (2000). The arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* **12**, 1041-1061.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1997). DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Schimper, A.** (1883). Über die Entwicklung der Chlorophylkörner und Farbkörner. *Bot Zeitung* **41**, 104-114.
- Schleiff, E., and Klosgen, R.B.** (2001). Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim Biophys Acta* **1541**, 22-33.
- Schnarrenberger, C., and Oeser, A.** (1974). Two isoenzymes of glucosephosphate isomerase from spinach leaves and their intracellular compartmentation. *Eur J Biochem* **45**, 77-82.
- Schnarrenberger, C., Flechner, A., and Martin, W.** (1995). Enzymatic Evidence for a Complete Oxidative Pentose Phosphate Pathway in Chloroplasts and an Incomplete Pathway in the Cytosol of Spinach Leaves. *Plant Physiol* **108**, 609-614.

- Schneider, A., Hausler, R.E., Kolukisaoglu, U., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., and Flugge, U.I.** (2002). An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J* **32**, 685-699.
- Schneitz, K., Hülkamp, M. and Pruitt, R.E.** (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J.* **7**, 731-749.
- Schulz, P., and Jensen, W.A.** (1973). *Capsella* embryogenesis: the central cell. *J. Cell Biol.* **12**, 741-763.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**, 16-26.
- Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G.** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell* **16 Suppl**, S46-60.
- Signorini, M., Bregoli, A.M., Caselli, L., and Bergamini, C.M.** (1995). Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from beet leaves. *Biochem Mol Biol Int* **35**, 669-675.
- Silva-Filho, M.C.** (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 589-595.
- Silverberg, M., and Dalziel, K.** (1975). 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from sheep liver. *Methods Enzymol* **41**, 214-220.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Soll, J.** (2002). Protein import into chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 529-535.
- Soll, J., Bolter, B., Wagner, R., and Hinnah, S.C.** (2000). ...response: the chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends Plant Sci* **5**, 137-138.
- Stitt, M.** (1989). Product inhibition of potato tuber pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase by phosphate and pyrophosphate. *Plant Physiol* **89**, 628-633.
- Stitt, M.** (1990). Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**, 153-185.
- Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Hausler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flugge, U.I., and Chory, J.** (1999). The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* **11**, 1609-1622.
- Sumner, M.J., and Van Caesele, L.** (1989). The ultrastructure and cytochemistry of the egg apparatus of *Brassica campestris*. *Can. J. Bot.* **67**, 177-190.
- Sun, K., Hunt, K., and Hauser, B.A.** (2004). Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. *Plant Physiol* **135**, 2358-2367.
- Tanksley, S.D., and Kuehn, G.D.** (1985). Genetics, subcellular localization, and molecular characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes in tomato. *Biochem Genet* **23**, 441-454.
- Tetlow, I.J., Bowsher, C.G., and Emes, M.J.** (1996). Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochem J* **319 ( Pt 3)**, 717-723.

- Trickett, J.I., Patel, D.D., Knight, B.L., Saggerson, E.D., Gibbons, G.F., and Pease, R.J.** (2001). Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation. *J Biol Chem* **276**, 39522-39532.
- Tsugeki, R., Kochieva, E.Z., and Fedoroff, N.V.** (1996). A transposon insertion in the Arabidopsis SSR16 gene causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant J* **10**, 479-489.
- Twell, D., Park S.K. and LaLanne E.** (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci* **3**, 305-310.
- Uwer, U., Willmitzer, L., and Altmann, T.** (1998). Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell* **10**, 1277-1294.
- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J.** (1999). Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.
- Versaw, W.K., and Harrison, M.J.** (2002). A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* **14**, 1751-1766.
- Voll, L., Hausler, R.E., Hecker, R., Weber, A., Weissenbock, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S., and Flugge, U.I.** (2003). The phenotype of the Arabidopsis cue1 mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J* **36**, 301-317.
- Wagner, R., Apley, E.C., Gross, A., and Flugge, U.I.** (1989). The rotational diffusion of chloroplast phosphate translocator and of lipid molecules in bilayer membranes. *Eur J Biochem* **182**, 165-173.
- Wagner, V.T., Crestl, M., Salvatici, P. and Tiezzi, A.** (1990). Changes in volume, surface area and frequency of nuclear pores of the vegetative nucleus of tobacco pollen in fresh, hydrated and activated conditions. *Planta* **181**, 304-309.
- Wakao, S., and Benning, C.** (2005). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant J* **41**, 243-256.
- Weber, A., Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C., and Flugge, U.I.** (1995). The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochemistry* **34**, 2621-2627.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Groner, F., Hebbeker, U., and Flugge, U.I.** (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**, 787-802.
- Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A., and Von Schaewen, A.** (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **23**, 723-733.
- Wong, J.H., Kiss, F., Wu, M.X., Buchanan, B.B.** (1990). Pyrophosphate fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from tomato fruit. Evidence for change during ripening. *Plant Physiol* **94**, 499-506.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Yadegari, R., and Drews, G.N.** (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S133-141.

- Yamamoto, Y., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., and Noguchi, T.** (2003). Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44**, 1192-1201.
- Yan, T.F., and Tao, M.** (1984). Multiple forms of pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. Regulation by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem* **259**, 5087-5092.
- Yu, T.S., Lue, W.L., Wang, S.M., and Chen, J.** (2000). Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol* **123**, 319-326.
- Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M., and Rees, T.** (1998). A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J* **15**, 357-365.
- Zheng, Z., Xia, Q., Dauk, M., Shen, W., Selvaraj, G., and Zou, J.** (2003). *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell* **15**, 1872-1887.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.

## 8. Anhang

### 8.1. Primer Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

#### 1. Primer für chimäre Konstrukte

##### nos-polyA Amplifikation

nospolyA_fow	5546	ACGTGTGAATTACAGGTGACCA
nospolyA-rev	5547	GCCAATATATCCTGTCAAACACTG

##### GPT1 Promotor Amplifikation

GPT1Pr_fow	5552	GAATTAGGATGCTAAGCCGTATCCAAC
GPT1Pr_rev	5553	AGCAAAGATAATGGATCACAGTTTGACCT

##### GPT2 Promotor Amplifikation

GPT2Pr_fow	5550	GGTCGAAGAAAAAGAGAATAGTAGCAGGA
GPT2Pr_rev	5551	AAGACTATGATCTCGAGGTGGGTTTTAAG

#### 2. Primer für das induzierbare System

##### alcR Amplifikation

pBIN-alcR-F-Not	6082	GCGGCCGCGAATTCACCATCTATACAGATA
pBIN-alcR-R2-NotI	6098	GCGGCCGCTAGCATAGTCCAACCTGACGCCTAA

#### 3. Primer für die Amplifikation von 6PGDH cDNAs

##### 6PGDH1 cDNA Amplifikation

At1g64190cdc-F	5942	CACCATGGAGTCCGCCGCACTATCCCGA
At1g64190cdc-R	5943	ATGGTTCTTCCTGGCAAGCTTAGTC

##### 6PGDH2 cDNA Amplifikation

At3g02360cdc_F	5946	CACCATGGCTGTTCAACCTACAAGAATA
At3g02360cdc_R	5947	GATCTTAGATTGTCTTGCAATCTTG

##### 6PGDH3 cDNA Amplifikation

At5g41670cdc_F	5944	CACCATGGAGTCCGTCGCTCTATCTCG
At5g41670cdc_R	5945	CTGACTCTTCCTTGCAAGCTTAGTC

#### 4. Primer für T-DNA Insertionslinien

##### *gpt1-1*

Insertion		
RB2	5253	TCCTTCAATCGTTGCGGTTCTGTGAGTTC
AS-8	5018	GTGTGTGCCACAGCAACCTATATGCA
Allel		
GPT1-5F	5448	CTAAGTTCTTTTCTCTGATCG
AS-8	5018	GTGTGTGCCACAGCAACCTATATGCA

*gpt1-2*

Insertion		
JL-202	5230	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
GPT1-F8	5451	GCATTCTTGCCTGTTCCCTAG
Allel		
GPT1-F8	5451	GCATTCTTGCCTGTTCCCTAG
GPT1-R2	5455	GGTATTTTGGTCAAGGTAAGG

*gpt1-3*

Insertion		
AE-LB1	5352	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
GPT1-R1	5454	TCCTTCACCAAACATATCTCTC
Allel		
GPT1-F8	5451	GCATTCTTGCCTGTTCCCTAG
GPT1-R1	5454	TCCTTCACCAAACATATCTCTC

*gpt1-4*

Insertion		
AE-LB1	5352	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
GPT1-F13	5462	TGCTTAATTACATTTCAAGA
Allel		
GPT1-5F	5448	CTAAGTTCTTTTCTCTGATCG
GPT1-R5	5543	ATCATCACCGATCGGATGAG

*gpt1-5*

Insertion		
LB-2	5252	GATGCACTCGAAATCAGCCAATTTAGAC
GPT1-R5	5543	ATCATCACCGATCGGATGAG
Allel		
GPT1-A-Fw	5833	TCACGCTAAAGAGAAAAATTG
GPT1-A-Rw	5834	GGTTTTGGTTTACTTTCAGTTGG

*gpt1-6*

Insertion		
JL-202	5230	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
GPT1-F9	5452	ACCCACATGATGAGACTTAAG
Allel		
GPT1-Rw	5458	ATCTGTTTGTACTTTACTTCTCTCTGGTC
GPT1-F9	5452	ACCCACATGATGAGACTTAAG

*gpt2-1*

Insertion		
GK-LB	5429	ATATTGACCATCATACTCATTGC
GPT2-R	5576	GGTCTGATCAAGAAATGACTGA
Allel		
GPT2-F2	5577	GTCGGACCAAACTTTGTCTGGT
GPT2-R	5576	GGTCTGATCAAGAAATGACTGA

*pgi1-2*

Insertion		
JL-202	5230	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
PGI-F	5465	TATACTCTTCTTCTCCATCTCTCAAAC
Allel		
PGI-F	5465	TATACTCTTCTTCTCCATCTCTCAAAC
PGI-R	5466	CTTTTAATCAGAAAAACCTAAGAGAGG

*6pgdh1-1 und 6pgdh1-2*

Insertion		
AE-LB1	5352	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
At1g64190-R2	5931	CAAATAGGGCTTTTACAAAAACAGAAAGG
Allel		
At1g64190-F2	5930	ATCACTCCCCTACCTCATTTTTCTCTCT
At1g64190-R2	5931	CAAATAGGGCTTTTACAAAAACAGAAAGG

*6pgdh1-3 (762C06)*

Insertion		
GK-LB	5429	ATATTGACCATCATACTCATTGC
At1g64190-F2	5930	ATCACTCCCCTACCTCATTTTTCTCTCT

*6pgdh2-1 (N536751)*

Insertion		
AE-LB1	5352	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
At3g02360-F2	5934	TGTTTGGCAGAGAGAAGAAGACTTAGAAA
Allel		
At3g02360-F2	5934	TGTTTGGCAGAGAGAAGAAGACTTAGAAA
At3g02360-R2	5935	TCTCACACATTGAGGAAAGAAACATACTG

*6pgdh2-2 (692E09)*

Insertion		
GK-LB	5429	ATATTGACCATCATACTCATTGC
At3g02360-F2	5934	TGTTTGGCAGAGAGAAGAAGACTTAGAAA
Allel		
At3g02360-F2	5934	TGTTTGGCAGAGAGAAGAAGACTTAGAAA
At3g02360-R2	5935	TCTCACACATTGAGGAAAGAAACATACTG

*6pgdh3-1*

Insertion		
AE-LB1	5352	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
At5g41670-R2	5933	CAGAATAAGCACAAAAACAGAGTGTGAGA

**5. Primer für die komplementierten Linien***gpt1-2gGPT1*

Insertion		
JL-202	5230	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
GPT1-F8	5451	GCATTCTTGTCCTGTTCTCTAG
Allel		
GPT1-F18	5555	AGAACAGCATCCTAGAAATCCAAAAATG
GPT1-R6	5545	TCAAGGTAAGGTTATGTTTACCTGGGAAT
Komplementationskonstrukt		
pGR_fow	5563	TCACGACGTTGTAAAACGACGG
GPT1-R5	5543	ATCATCACCGATCGGATGAG

*pgi1-2gPGI1*

Insertion		
JL-202	5230	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
PGI-F	5465	TATACTCTTCTCTCCATCTCTCAAAC
Allel		
PGI1-F4	6028	GAGCCAAGAATTTGACATGTTG
PGI-R	5466	CTTTTAATCAGAAAAACCTAAGAGAGG
Komplementationskonstrukt		
PGI1-F2	5949	AGCTTAAGCTAATCAGCAGGTTAGAG
pGR_fow	5563	TCACGACGTTGTAAAACGACGG

**6. Primer zur Herstellung von Sonden**Kanamycin Sonde

KAN-R	5688	CGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAA
KAN-F	5689	CTGCAGGCATGATTGAACAAGATG

pSKI015-LB-Sonde

LB-DW-for	5727	TCAATTGTAAATGGCTTCATGTCC
LB-DW-rev	5728	AGATCTAGATATCGATCGTGAAGTTT

pAC161-LB-Sonde

pAC161-LBfow	5708	CCACAAATTACGATCCGTCGTA
pAC161-LBrev	5709	GGCCTTCGCTGCCCATATTA

## pROK-Sonde

	5858	
	5859	

GPT2 spezifische Sonde

GPT2-F3'	5602	CATACCCCGATTCAACCGGTTAATG
GPT1-Rw	5233	TAGATGGTCTGATCAAGAAATGACTGA

## RB Sonde

RBf	5351	CTGTCTCTCGTACTTGATGGAGAAG
RBBr	5360	GAGAATTAAGGGAGTCACGTTATGA

## GPT1 spezifische Sonde

GPTfow		GGTAGTGAGATGTGAAGCTTA
GPTrev		AGACAGGCGTAGTAGTTCATC

PGI1 spezifische Sonde

PGI1-F3	5993	GATGCGTTGTGGAAGCGATACCTCG
PGI1-R3	5994	AAGTGTGTTCTCGATCAAGGTCTTT

6PGDH1 spezifische Sonde

At1g64190-F3	6084	ATCTCCTTCTCCTTTGTTCTTTG
At1g64190-R3	6085	CTTGATACATTAGCCTTTTGACG

6PGDH2 spezifische Sonde

At3g02360-F3	6054	AATTTTTACTCTCCTCCTTCACGTC
At3g02360-R4	6055	CATACACTAACAACAAGAGCGAAGA

6PGDH3 spezifische Sonde

At5g41670-F8	6052	CACTCTGTTTTTGTGCTTATTCTGA
At5g41670-R4	6053	TATGACAAATAATGGGCTCTTTCTC

**7. Primer für RT-PCR**GPT1

AtpGPTMGB8-F17	242	GAAAGTCTGTGAGCGGGATGAAC
AtpGPTMGB8-B13	241	TGCGGAAGATAATGATGGAGGAG

Aktin2

AtAKTIN2-F6	50	GGGCAAGTCATCACGATTGG
AtAKTIN2-B2	49	GAAGCAAGAATGGAACCACCG

GPT2

GPT2-179F		CTTCGAATTTCAAGCGTGAGG
GPT2-R2	5706	GAGGACCTTCCACGGCAATA

AtGPT2-F6	13	AAGGTCCTCAAATGTGGGCTG
AtGPT2-B17	14	GAAATCCGCTTCATCGTATTACCG

PGI1

At4g24620-F	P40H09	AGCCAGGTGTCACTTGTGGAGACT
At4g24620-B	P40H10	CGGGTTGGTGGTAAGCATTTATGT

6PGDH1

At1g64190-F2	5930	ATCACTCCCCTACCTCATTCTCTCTCT
At1g64190-R2	5931	CAAATAGGGCTTTTACAAAAACAGAAAGG

6PGDH3

At5g41670cdc_F	5944	CACCATGAGTCCGTCGCTCTATCTCG
At5g41670cdc_R	5945	CTGACTCTTCCTTGCAAGCTTAGTC

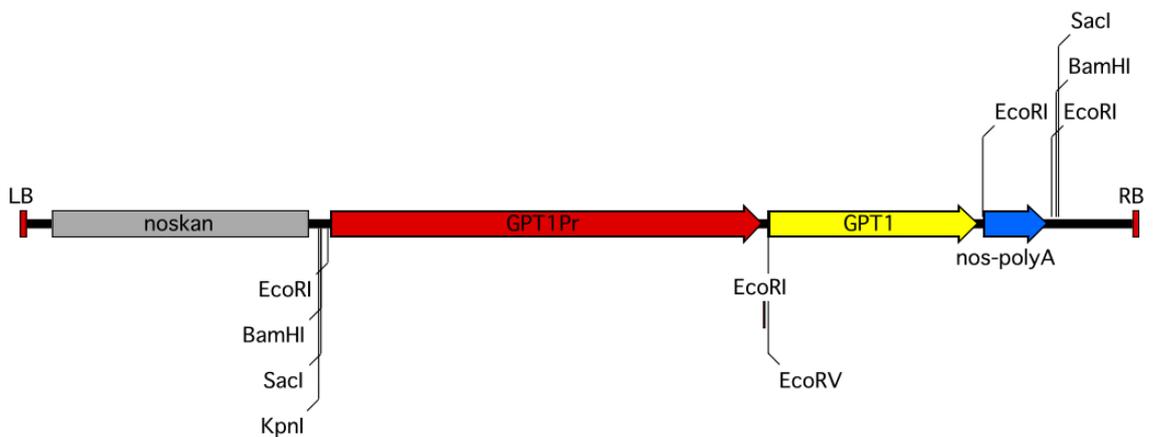
## 8.2. Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte

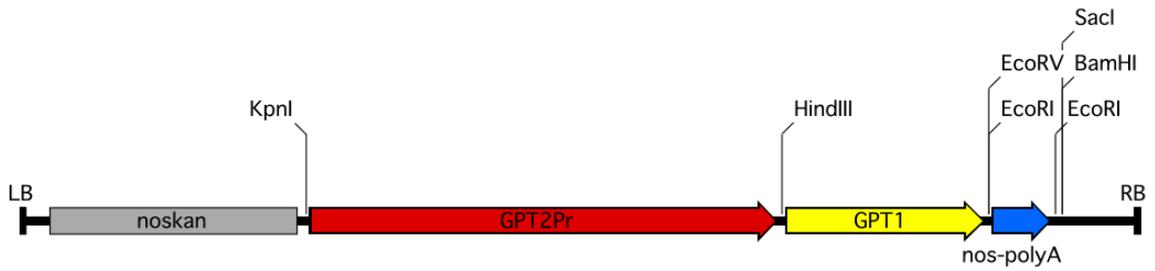
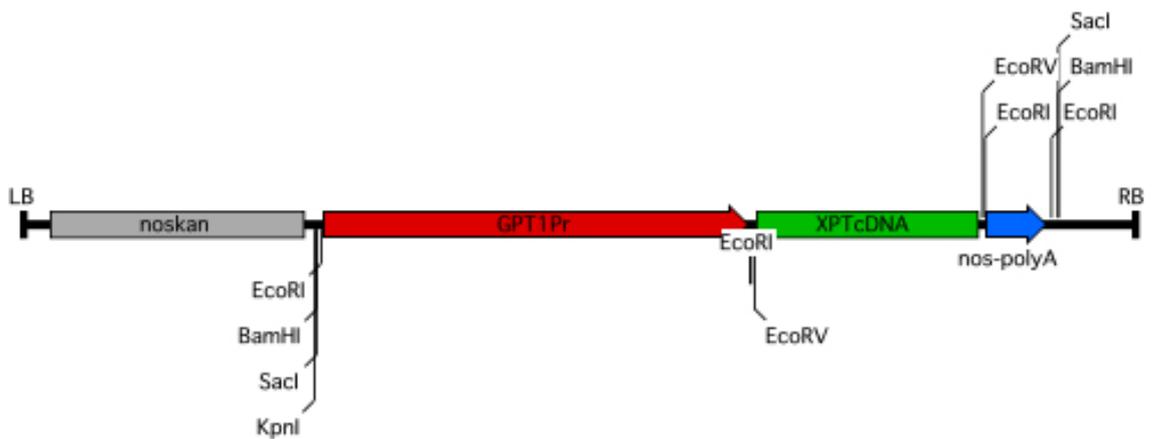
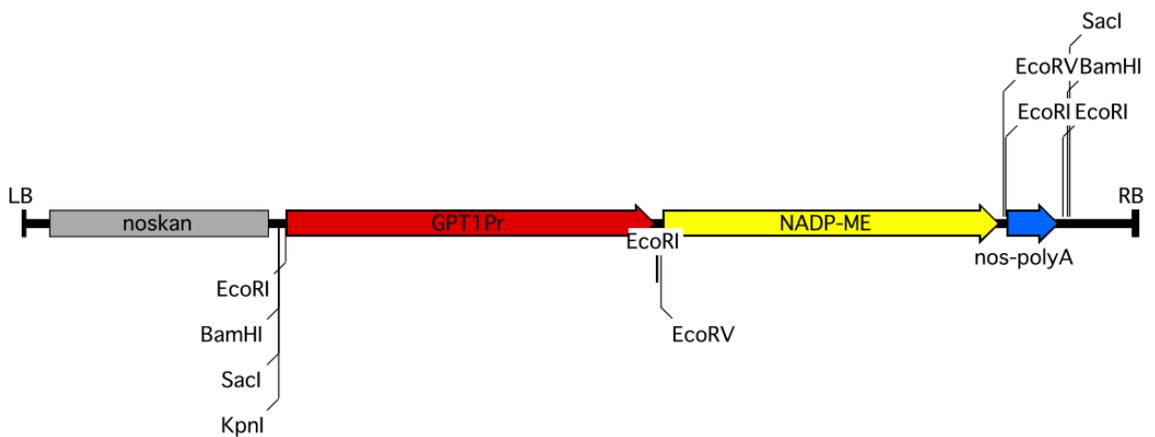
### 8.2.1. Chimäre Konstrukte

#### pGrT2



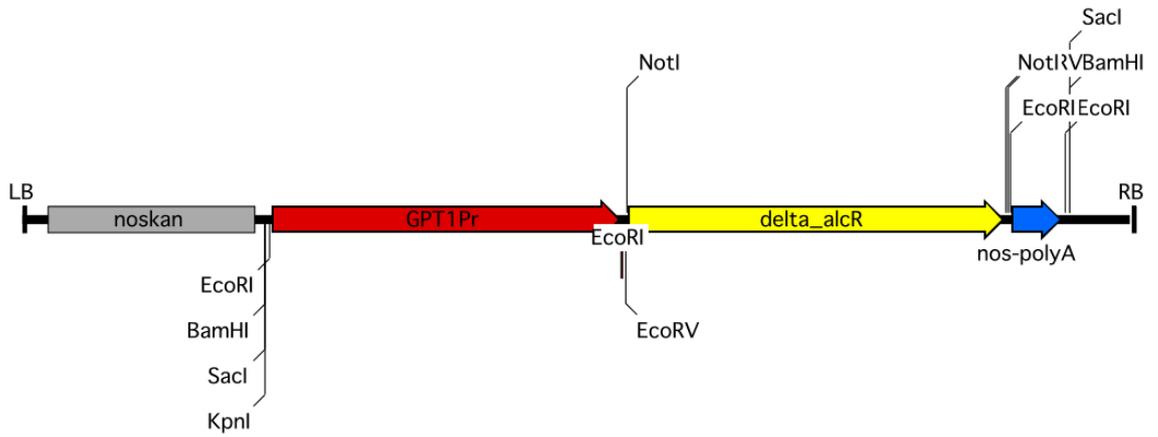
#### GPT1PrGPT1pGrT2



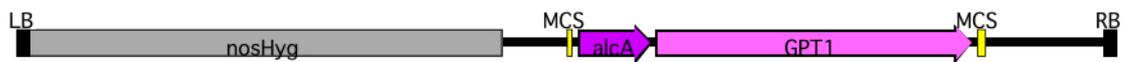
**GPT2PrGPT1pGrT2****GPT1PrXPT1pGrT2****GPT1PrMEpGrT2**

## 8.2.2. EtOH induzierbares System

### GPT1Pr $\Delta$ alcRpGrT2-noskan



### alcA::GPT1cDNApGrII-nosHyg



## Zusammenfassung der Klonierungsschritte

Fragment	Quelle	Methode	Länge + Primer	Zielvektor1	Klonierungsstrategie	Zielvektor2	Name Zielvektor2
nospolyA	pCambia1380	PCR	326 bp 5546/5547	pCRII-TOPO	Not I/Sac I	pGreenII-noskan	pGrT2
GPT1Pr	genomische DNA Col-0	PCR	2400 bp 5552/5553	pCRII-TOPO	Kpn I/Apa I	pGrT2 GPT1pGrT2	GPT1PrpGrT2 GPT1PrGPT1pGrT2
GPT2Pr	genomische DNA Col-0	PCR	2440 5550/5551	pCRII-TOPO	BamH I blunt /Apa I	GPT1pGrT2 Sallblunt/Apal GPT2pGrT2 Sallblunt/Apal	GPT2PrGPT1pGrT2 GPT2PrGPT2pGrT2
GPT1cDNA	EST Bank		1570 bp	pBSC-KS; EcoRI	EcoRI blunt	pGrT2 EcoRV	GPT1pGrT2
GPT2cDNA	cDNA Col-0	PCR	1537 bp	p-GEM-T-easy	Not I blunt	pGrT2 EcoRV GPT1PrpGrT2 NotI blunt	GPT2pGrT2 GPT1PrGPT2pGrT2
XPTcDNA	EST Bank		1481 bp	pBSC-KS; EcoRV	EcoRV	GPT1PrpGrT2 NotI blunt	GPT1PrXPTpGrT2
NADP-ME <sub>maiz</sub>	Veronica Maurino		2200 bp	pBSC-SK; SacII/XhoI fill in	Not I fill in	GPT1PrpGrT2 Not I blunt	GPT1PrMEpGrT2

Tab. 8.1. Zusammenfassung der Klonierungsschritte für chimäre Konstrukte.

Fragment	Quelle	Methode	Länge + Primer	Zielvektor1	Klonierungsstrategie	Zielvektor2	Name Zielvektor2
$\Delta$ alcR	pBin- $\Delta$ alcR	PCR	2600 bp 6082/6098	pCRII-Topo	Not I	GPT1PrpGrT2 NotI	GPT1Pr $\Delta$ alcRpGrT2
GPT1cDNA	EST Bank		1600bp	pBSC-KS	EcoRI	pUC $\Delta$ alcAN EcoRI	alcA::GPT1pUC
alcA::GPT1	alcA::GPT1pUC		2000 bp		Asc I blunt	pGreenII-noshyg EcoRV	alcA::GPT1pGrII- noshyg

Tab. 8.2. Zusammenfassung der Klonierungsschritte für das EtOH induzierbares System

Fragment	Quelle	Methode	Länge + Primer	Zielvektor1	Klonierungsstrategie	Zielvektor2	Name Zielvektor2
6PGDH1	cDNA (Vektor U22821)	PCR	1566 5942/5943	pENTR™/D-Topo	Gatewaysystem Rekombinase	pGWB5	1g64190pGWB5
6PGDH2	cDNA (Vektor U14462)	PCR	1543 bp 5946/5947	pENTR™/D-Topo	Gatewaysystem Rekombinase	pGWB5	3g02360pGWB5
6PGDH3	cDNA (Vektor U22086)	PCR	1551 bp 5944/5945	pENTR™/D-Topo	Gatewaysystem Rekombinase	pGWB5	5g41670pGWB5

Tab. 8.3. Zusammenfassung der Klonierungsschritte für GFP Fusionskonstrukte

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 der angegebenen Teilpublikation noch nicht veröffentlicht worden ist, und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

## **Ich danke...**

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung und die vielseitige Förderung.

Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen (bei Pflanzen)“ für die guten Seminare und Vorlesungen und die daraus entstandenen Ideen und Denkanstöße sowie für die angenehme internationale Atmosphäre und interessante Diskussionen.

Dr. Stefan Geimer für die Durchführung der Raster und Transmissions-Elektronenmikroskopie der *gpt1* Pollen.

Dr. Anja Schneider für die außerordentliche Betreuung, die zielorientierten Anleitungen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Dr. Frank Ludewig für die ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen Denkanstöße und Informationen, nicht nur wissenschaftlicher Art, und die exzellente Einführung in den Deutschen Wissenschaftskreis „Membranproteine“ (SPP; Hirschberg).

PD Dr. Karsten Fischer für die vielen Gespräche und Diskussionen sowie die Sorge um meine Zukunft.

Dr. Rainer Schwacke für die Fahrt nach Montpellier, die interessanten Gespräche sowie seine nordisch-freundliche Art, meinen Sorgen zu zuhören.

Diana Hille für eine tiefgründige und herzliche Freundschaft, die mir den Laboralltag erleichtert hatte, die Bereitschaft, in Krisensituationen da zu sein und die HL-Gänge in der Mittagspause.

Kerstin Kunze für die Hilfe bei den unzähligen Präps und PCRs sowie die humorvolle Art, meine Launen im Labor zu ertragen.

Sonja Hetfeld für ihre Kritik und ihre direkte aber soziale Art.

Barbara Kleinhenz für die Protoplasten Transfektion, die Hilfe bei Auswertung der GFP Bilder und so einige literarische Gespräche.

Barbara Hess für ihre Hilfe im Labor und die netten gegenseitigen privaten Besuche.

Bianca Beyer für die Klonierung des genomischen PGI1 Konstruktes und für die Freundschaft, die über das Labor hinaus besteht.

André König für das Protoplasten Protokoll und die Übernahme der GPT Konstrukte.

Dr. Eric van der Graaff für die unzähligen Tipps für die Laborarbeit, viele Denkanstöße, harte Kritik und seine kauzige, aber dennoch lebenswerte Art.

Frau S. Lorbeer für die Hilfe bei administrativen Angelegenheiten und die moralische Unterstützung.

den Mitarbeitern der Institutswerkstatt um Leo Leson für die freundliche und sofortige Lösung und Reparatur aller möglichen Sachen.

den Mitarbeitern der Versuchsgärtnerei für die unzähligen Töpfchen, die ich bestellt habe und für die sorgsame Pflege vieler *Arabidopsis* Generationen.

den ehemaligen Mitarbeitern der AG Flüge: Andreas W., Anika, Gabi, Heike, Hilli, Katrin, Lars, Micha, Petra und Silke für die nette Aufnahme in die Gruppe, die Einführung in die Laborarbeit sowie Hilfe bei Formatierungen von Word Dokumenten (Micha, ich habe sehr viel von Dir gelernt) und so einige gute Partys.

den jetzigen Mitgliedern der AG Flüge für das nicht zu übertreffende Arbeitsklima: Anke, Bettina, Christian, Claudia, Daniel, Esther, Holger, Inga, Iris, Kirsten, Lizhi, Marcella, Markus, Sharis, Tamara, Tanja, Vero,

meinen Freunden, vor allem Melanie, dass es Leben außerhalb des Labors gab.

meinen Eltern für die Unterstützung jeglicher Art und den festen Glauben in meinen Erfolg.

Wjeko für die amüsanten Ablenkungen im Labor und zu Hause, seine Geduld, als ich in den letzten Monaten seinen Rechner blockiert habe, für den Computerabsturz zwei Tag vor der Abgabe und die glücklichen gemeinsamen Momente in dem letzten Jahr.

### **Teilpublikation:**

Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte S.U., Rosso, M.G., Ache, P., Flügge, U.-I. und Schneider, A. (2005) The Arabidopsis Plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 is Essential for Pollen Maturation and Embryo Sac Development, *Plant Cell*, 17, 760-775

### **Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:**

Patrycja Niewiadomski, Anja Schneider, Ulf-Ingo Flügge (2002) Characterization of AtPHT2-1, a phosphate uniporter localized in the chloroplast, 13th International Conference on *Arabidopsis* Research, Sevilla, Spain, 28 June -2 July, 2002; Poster 12-13

Patrycja Niewiadomski, Silke Knappe, Karsten Fischer, Burkhard Schulz, Ulrike S. Unte, Nicolai Strizhov, Peter Ache, Ulf-Ingo Flügge and Anja Schneider (2004) The *Arabidopsis* plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate translocator GPT1 is essential for early plant development, 13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France; Poster P1-15

Anja Schneider, Patrycja Niewiadomski, Silke Knappe, Karsten Fischer, Ulf-Ingo Flügge (2004) The Arabidopsis plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and female gametogenesis. 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, 11-14 July 2004; Poster T07-030

Patrycja Niewiadomski, Eric van der Graaff, Karsten Fischer, Ulf-Ingo Flügge, Anja Schneider (2004) The role of the oxPPP during the development of *Arabidopsis thaliana*, 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, 11-14 July 2004; Poster T07-033

Eric van der Graaff, Anja Schneider, Rainer Schwacke, Patrycja Niewiadomski, Ulf-Ingo Flügge, Reinhard Kunze (2004) Expression profiling of membrane transporters in Arabidopsis, 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, Germany, 11-14 July 2004; Poster T08-005

P. Niewiadomski, S. Knappe, K. Fischer, R. Häusler, A. Schneider, U. I. Flügge (2004) Der plastidäre Glukose 6-phosphat/PhosphatTranslokator ist essentiell für die frühe Entwicklung von *Arabidopsis*-Pflanzen, 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen vom 09.03. – 12.03.2004 in Dabringhausen; Kurzvortrag

P. Niewiadomski, U. I. Flügge (2004) Der plastidäre Glukose 6-phosphat/Phosphat Translokator ist essentiell für die frühe Entwicklung von *Arabidopsis* Pflanzen, 21. Wallenfesler Rundgespräch zur Pflanzenbiochemie 2004 vom 14.05 – 16.05.2004; Kurzvortrag

Patrycja Niewiadomski  
Nibelungenstr. 18  
50739 Köln  
Tel.: 0221/2828667

---

## Lebenslauf

Name: Patrycja Krystyna Niewiadomski  
Geburtsdatum: 24.09.1975  
Geburtsort: Piekary Sl. (Polen)  
Vater: Czeslaw Anton Niewiadomski, Busfahrer  
Mutter: Krystyna Jadwiga Niewiadomski, Angestellte  
Schule: 1982-1987 Volksschule, Piekary Sl. (Polen)  
1987-1988 Jahnschule, Gemeinschaftshauptschule  
der Stadt Bergheim in Quadrath-Ichendorf  
1988-1996 Gutenberg-Gymnasium, Bergheim  
Abiturnote 2,2  
Studium: ab 10.1996 Studium der Biologie (Diplom) an der  
Universität zu Köln  
08.2000 Ablegung der Diplom-Prüfung mit der  
Gesamtnote 1  
08.2000-08.2001 Anfertigung einer  
molekularbiologischen Diplomarbeit mit dem Titel  
„Charakterisierung der Phosphat Permease PHT2-1  
in *Arabidopsis thaliana*“ unter der Anleitung von Prof.  
Dr. U.I. Flügge mit der Note 1  
Promotion: seit 10.2001 wissenschaftlicher Angestellter im  
Botanischen Institut der Universität zu Köln,  
Lehrstuhl II  
seit 12.2001 assoziiertes Mitglied im  
Graduiertenkolleg „Molekulare Analysen von  
Entwicklungsprozessen“ und Sprecherin der  
Kollegiaten

## Kurzzusammenfassung:

Heterotrophe Plastiden können Kohlenstoffe in Form von Glukose 6-phosphat durch den Glukose 6-phosphat/Phosphat Translokator (GPT) importieren. Das *Arabidopsis thaliana* Genom enthält zwei homologe GPT Gene, *AtGPT1* und *AtGPT2*. Beide Gene kodieren funktionelle Proteine mit Glukose 6-phosphat Transporteraktivität, aber zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. *AtGPT1* ist ubiquitär während der gesamten Pflanzenentwicklung exprimiert, wohingegen die Expression von *AtGPT2* auf wenige Gewebe, z.B. seneszente Blätter, beschränkt ist. Die Analyse der T-DNA Insertionsmutanten für beide GPT Gene offenbarte weiterhin verschiedene Funktionen *in planta*. Die Unterbrechung des *GPT2* Gens führte zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums und der Entwicklung der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen, wohingegen die *gpt1-1* und *gpt1-2* Mutationen letal waren. In beiden *gpt1* Allelen wurde ein verzerrtes Segregationsverhältnis, eine reduzierte Transmissioneffizienz für weibliche und männliche Gametophyten beobachtet, was auf eine Störung der gametophytischen Entwicklung hindeutet. Dies wurde weiterhin durch mikroskopische Analysen der beiden Gametophyten bestätigt, die zeigten, dass die Entwicklung der Pollenkörner und Samenanlagen in *gpt1* Allelen nicht abgeschlossen werden konnte. Die Entwicklung der Samenanlagen war zum Zeitpunkt der Fusion der Polarkerne arretiert. Die Beeinträchtigung der *gpt1* Pollenkörner äußerte sich durch eine geringe Bildung von Fettkörperchen und kleiner Vesikel sowie die Abwesenheit von Vakuolen, was zu einer Desintegration der Pollenstruktur führte. Insgesamt weisen die aufgeführten Ergebnisse darauf hin, dass der durch den GPT1 vermittelte Import von Glk6P in heterotrophe Plastiden für die Pflanzenentwicklung entscheidend ist. Als Ursache für die *gpt1* Letalität wird die Unterbrechung der GPT1 Funktion vorgeschlagen, die zu einer Auszehrung des oxidativen Pentosephosphatweges führt, die wiederum die Fettsäuresynthese beeinflusst.

## **Abstract:**

Non-photosynthetic plastids can import carbon in form of glucose 6-phosphate via the glucose 6-phosphate/phosphate translocator (GPT). The *Arabidopsis thaliana* genome contains two homologous GPT genes, *AtGPT1* and *AtGPT2*. Both genes code for a functional proteins with glucose 6-phosphate translocator activity but show different pattern of expression. *AtGPT1* is ubiquitously expressed during plant development, whereas *AtGPT2* expression is restricted to a few tissues, including senescing leaves. The analysis of T-DNA insertion mutants for both GPT genes revealed different function *in planta*. Disruption of *GPT2* does not affect the growth and development of plants under greenhouse conditions; however the mutations *gpt1-1* and *gpt1-2* were lethal. In both *gpt1* alleles, distorted segregation ratios and reduced transmission efficiency in male and female gametophytes were observed indicating profound defects in gametogenesis. Microscopic analyses of both gametes confirm that the development of pollen grains and ovules can not be completed in the *gpt1* lines. Embryo sac development is arrested in the *gpt1* mutants at a stage before the fusion of the polar nuclei. Mutant pollen development is associated with reduced formation of lipid bodies and small vesicles as well as the disappearance of dispersed vacuoles, which results in the disintegration of the pollen structure. This results indicate that GPT1-mediated import of glucose 6-phosphate into non-photosynthetic plastids is crucial for gametophyte development. As a reason for the *gpt1* lethality we suggest that the loss of GPT1 function results in a depletion of the oxidative pentose phosphate cycle, which in turn affects fatty acid biosynthesis.