

**Untersuchungen zur physiologischen Rolle des  
Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokators  
in *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im primären und  
sekundären Metabolismus**

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

vorgelegt von  
Elke Jana Andrea Hilgers  
aus Köln

Mai 2017

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. U.I. Flügge
2. Prof. Dr. M. Bucher

Tag der mündlichen Prüfung:

04.07.2017

„Die Frage ist weniger, ob Pflanzen intelligent sind, als vielmehr, ob wir intelligent genug sind sie zu verstehen“

Ian Baldwin, 1958

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Die Bedeutung von Plastiden und ihrer Stoffwechselwege für die Pflanze.....	1
1.2 Plastidäre Translokatoren ermöglichen einen Metabolitaustausch mit dem Cytosol. 2	
1.2.1 Plastidäre Phosphat-Translokatoren .....	3
1.2.2 Auswirkungen eines Funktionsverlusts von plastidären Phosphat- Translokatoren im Stoffwechsel von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
1.2.2.1 Ein Funktionsverlust des Triosephosphat/Phosphat-Translokators kann durch einen simultanen Stärkeaufbau und Stärkeabbau am Tag kompensiert werden .....	6
1.2.2.1.1 Die Kommunikation zwischen Plastid und Kern erfolgt über retrograde Signale.....	7
1.2.2.2 Der GPT und die Bedeutung des oxidativen Pentosephosphatwegs.....	8
1.2.2.3 Die Rolle des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators für die Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat in Plastiden.....	9
1.2.2.4 Die Rolle des XPT im Stoffwechsel von <i>Arabidopsis thaliana</i> ist unklar....	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Antibiotika.....	14
2.1.2 Chemikalien und Enzyme.....	14
2.1.3 Kommerzielle Kits .....	15
2.1.4 Software und Datenbanken.....	15
2.1.5 Statistik .....	15
2.1.6 Geräte.....	16
2.1.7 Bakterienstämme.....	17
2.1.8 Vektoren .....	17
2.1.9 Oligonukleotide .....	17
2.1.10 Pflanzen .....	19
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	20
2.2.1.1 Sterile Pflanzenanzucht .....	20
2.2.1.2 Oberflächensterilisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen.....	20
2.2.1.3 Anzucht von <i>adg1-1/tpt-2/xpt-1</i> Dreifachmutanten und <i>adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1</i> Vierfachmutanten.....	21
2.2.1.4 Sterile Anzucht von <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> Dreifachmutanten .....	21

2.2.1.5	Unsterile Pflanzenanzucht auf Erde .....	21
2.2.1.6	Anzuchtsbedingungen.....	22
2.2.1.7	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
2.2.1.8	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2.2.1.9	Pflanzen-Selektion.....	23
2.2.1.10	Durchmusterung von Pflanzen .....	24
2.2.1.11	Wachstumsanalyse .....	24
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	25
2.2.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.2.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	25
2.2.2.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Hitzeschock .....	26
2.2.2.4	Anzucht <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	26
2.2.2.5	Herstellung chemisch-kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen....	26
2.2.2.6	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
2.2.2.7	Herstellung von Glycerin-Stammkulturen .....	27
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	27
2.2.3.2	Isolierung genomischer DNA .....	28
2.2.3.3	Isolierung von RNA.....	28
2.2.3.4	DNase Verdau .....	28
2.2.3.5	cDNA-Synthese.....	29
2.2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.3.7	Semiquantitative RT-PCR .....	29
2.2.3.8	Überprüfung positiver Bakterien-Klone mithilfe der Kolonie-PCR.....	30
2.2.3.9	Primergestaltung .....	30
2.2.3.10	Restriktionsverdau.....	30
2.2.3.11	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.3.12	Agarosegelelektrophorese .....	31
2.2.3.13	Herstellung artifizierender mikroRNA (amiRNA).....	31
2.2.3.14	TOPO- und Gateway-Klonierung .....	32
2.2.3.15	Sequenzierung .....	32
2.2.4	Biochemische Methoden .....	33
2.2.4.1	Proteinextraktion aus Blättern.....	33
2.2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz .....	33
2.2.4.3	Bestimmung des spezifischen Frischgewichts.....	34
2.2.4.4	Quantifizierung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes .....	34
2.2.4.5	Bestimmung löslicher Kohlenhydrate in Blättern .....	34
2.2.4.6	Bestimmung des Stärkegehalts in Blättern.....	35

2.2.4.7	Bestimmung der Aminosäuregehalte in Blättern .....	35
2.2.4.8	Fettsäuremethylester (FAME)-Analyse von Samen.....	36
2.2.4.9	Proteinextraktion aus Samen für die SDS-PAGE.....	37
2.2.4.10	Proteinextraktion aus Blättern für die SDS-PAGE.....	37
2.2.4.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
2.2.4.12	Coomassie-Färbung von Proteinen .....	38
2.2.4.13	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot).....	38
2.2.4.14	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	39
2.2.4.15	Thylakoid-Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
2.2.5	Pflanzenphysiologische Methoden .....	40
2.2.5.1	Quantifizierung photosynthetischer Komplexe und Chl <i>a</i> Fluoreszenz- Emissions-Spektren bei 77K.....	40
2.2.5.2	Puls-Amplituden-Modulation (PAM) Fluorometrie .....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Überprüfung des <i>xpt-1</i> Phänotyps anhand neu etablierter <i>xpt</i> -Mutanten.....	43
3.2	Untersuchung von Doppelmutanten mit einem kombinierten Funktionsverlust von TPT und XPT .....	50
3.2.1	Die <i>tpt-2/xpt-1</i> Doppelmutante zeigt eine starke Wachstumsretardierung während der vegetativen und generativen Entwicklung .....	50
3.2.2	Der Wachstumsphänotyp von <i>tpt/xpt</i> ist abhängig von der Lichtintensität .....	53
3.2.3	Der Wachstumsphänotyp von <i>tpt/xpt</i> korreliert mit einem lichtintensitätsabhängigen Photosynthesephänotyp .....	56
3.2.4	Einfluss der exogenen Fütterung mit Metaboliten auf den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von <i>tpt/xpt</i> .....	58
3.2.5	Metabolitgehalte in Blattrosetten der <i>tpt/xpt</i> Doppelmutanten.....	63
3.2.5.1	Stärke- und lösliche Zuckergehalte im Tagesverlauf.....	63
3.2.5.2	Bestimmung freier Aminosäuren in <i>tpt/xpt</i> .....	66
3.2.6	Untersuchungen zum Photosynthesephänotyp in <i>tpt/xpt</i> .....	68
3.2.6.1	Die spezifische Anregung von PSI oder Zugabe von aktinischem Licht führt zu keiner Abnahme der erhöhten Grundfluoreszenz in <i>tpt/xpt</i> .....	68
3.2.6.2	In <i>tpt/xpt</i> sind die Kernkomponenten der Reaktionszentren und des Cyt <i>b<sub>6</sub>/f</i> -Komplexes deutlich dezimiert.....	69
3.3	Untersuchungen zur Rolle des XPT in der Vitalität von <i>adg1-1/tpt-2</i> und <i>cue1-6/ppt2-1</i> .....	74
3.3.1	Ein kombinierter Funktionsverlust von TPT und XPT im stärkefreien Hintergrund ist letal.....	74
3.3.2	Ein Funktionsverlust des XPT im Hintergrund von <i>cue1-6/ppt2-1</i> hat keinen zusätzlichen Effekt auf Wachstum und Reproduktion. ....	78
4	Diskussion.....	83
4.1	Ein Funktionsverlust des XPT führt zu keinem Phänotyp .....	84
4.2	Einkreuzung von Mutanten weiterer plastidärer PTs und des Stärkeanabolismus in <i>xpt-1</i> .....	85

4.3	Die <i>tpt/xpt</i> Doppelmutante.....	86
4.3.1	Mögliche Konsequenzen des kombinierten Ausfalls von XPT und TPT für den Stoffwechsel .....	87
4.3.1.1	Mögliche physiologische Konsequenz eines inhibierten Transports von Xylulose-5-Phosphat .....	88
4.3.1.2	Ein inhibierter Triosephosphat-Export aus den Chloroplasten hätte hohe Fru2,6BP Gehalte im Cytosol zur Folge.....	89
4.3.1.3	Ein inhibierter Export von TP könnte Veränderungen in Signalkaskaden bewirken .....	92
4.3.2	Untersuchungen zu gemeinsamen Grundlagen der Photosynthesephänotypen von <i>tpt/xpt</i> zu <i>adg1-1/tpt-2</i> .....	93
4.4	Rolle des XPT für die Viabilität von <i>adg1-1/tpt-2</i> .....	96
4.5	Rolle des XPT für das Überleben von <i>cue1-6/ppt2-1</i> .....	97
4.6	Fazit .....	98
5	Zusammenfassung .....	100
6	Abstract .....	102
7	Literaturverzeichnis .....	104
8	Anhang .....	117
8.1	Bestätigung der Zygotie von generierten Mehrfachmutanten.....	117
8.2	Bildliche Darstellung und Photosyntheseleistung generierter Mehrfachmutanten .	118
8.3	Übersicht zu den immunologisch nachgewiesenen Protein-Untereinheiten .....	119
8.4	Aminosäuregehalte in Blattproben.....	120
8.5	Klonierungsstrategie amiRNA: <i>XPT</i> .....	122
8.6	Signifikanztafeln.....	123
8	Danksagung .....	137
9	Erklärung.....	139

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Anzucht putativer Dreifach- und Vierfachmutanten in der Microbox.....	21
Abbildung 2.2: Stärketest .....	24
Abbildung 3.1: Pollentetraden-Phänotyp der <i>qrt1-2</i> Mutante .....	43
Abbildung 3.2: Genstruktur des <i>XPT</i> und Lage der T-DNA-Insertionen .....	44
Abbildung 3.3: Etablierung homozygoter <i>XPT</i> -Mutanten .....	45
Abbildung 3.4: Identifizierung positiver amiRNA: <i>XPT</i> Mutanten.....	45
Abbildung 3.5: Blattrosettenwachstum von Mutanten mit einem Funktionsverlust des XPT..	46
Abbildung 3.6: Fettsäurezusammensetzung in den Samen von <i>xpt</i> -Mutanten .....	48
Abbildung 3.7: Komposition der Samenspeicherproteine in <i>xpt</i> -Linien über SDS-PAGE.....	49
Abbildung 3.8: Etablierung positiver amiRNA: <i>XPT tpt-2</i> Mutanten.....	50
Abbildung 3.9: Blattrosetten- und Wurzelwachstum von <i>tpt-2/xpt-1</i> .....	51
Abbildung 3.10: Der Wachstumsphänotyp von <i>tpt/xpt</i> korreliert mit der Lichtintensität .....	54
Abbildung 3.11: Photosynthesephänotyp von <i>tpt/xpt</i> in Abhängigkeit zur Lichtintensität .....	57
Abbildung 3.12: Wachstums- und Photosynthesephänotyp bei Anzucht auf ½ MS von <i>tpt/xpt</i> .....	59
Abbildung 3.13: Wachstums- und Photosynthesephänotyp bei Anzucht auf MM von <i>tpt/xpt</i>	60
Abbildung 3.14: Einfluss der Fütterung verschiedener Metabolite auf den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von <i>tpt/xpt</i> .....	61
Abbildung 3.15: Stärke- und lösliche Zuckergehalte in Blattrosetten von <i>tpt/xpt</i> .....	65
Abbildung 3.16: Analyse der Gehalte an freien Aminosäuren.....	67
Abbildung 3.17: Einfluss von dunkelrotem (FR) bzw. aktinischem Licht (AL) auf die relative Chl <i>a</i> Fluoreszenz in <i>tpt/xpt</i> .....	69
Abbildung 3.18: Immunologischer Nachweis von Photosyntheseapparat-assoziiertes Proteine .....	71
Abbildung 3.19: Ermittelte Gehalte an PSII, Cyt <i>b<sub>6</sub>/f</i> und PSI in <i>tpt/xpt</i> über spektroskopische Analyse.....	72
Abbildung 3.20: Relative Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K.....	73
Abbildung 3.21: Durchmusterung unterschiedlich stark ausgeprägter HCF-Phänotypen über das $F_v/F_m$ - Verhältnis.....	75
Abbildung 3.22: Darstellung des letalen Phänotyps der <i>adg1-1/tpt-2/xpt-1</i> Dreifachmutante bzw. <i>adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1</i> Vierfachmutante.....	76
Abbildung 3.23: Schotenbildende Vierfachmutanten .....	77
Abbildung 3.24: Wachstumsphänotyp der <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> Dreifachmutante.....	78
Abbildung 3.25: Analyse des Blattrosettenwachstums über die Zeit der <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> Dreifachmutante.....	79
Abbildung 3.26: Pflanzengewicht und Schotenanzahl von <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> .....	82
Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Modell der Signalübertragung in der frühen HL-Antwort und mögliche Einbindung des XPT .....	93
Abbildung 8.1: Bestätigung der Stoffwechselmutanten .....	117
Abbildung 8.2: Übersicht zu den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von generierten Mehrfachmutanten und Kontroll-Pflanzen .....	118

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Antibiotika.....	14
Tabelle 2.2: Geräte.....	16
Tabelle 2.3: Bakterienstämme.....	17
Tabelle 3.1: Analyse zum generativen Wachstums von <i>xpt</i> -Mutanten .....	47
Tabelle 3.2: Daten zum generativen Wachstum bei <i>tpt-2/xpt-1</i> .....	52
Tabelle 3.3: Übersicht zu physiologischen Parametern unter HL und LL in <i>tpt/xpt</i> .....	55
Tabelle 3.4: Analyse des Wurzelwachstums von <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> .....	80
Tabelle 3.5: Analyse der Photosyntheseparameter von <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> .....	81
Tabelle 3.6: Physiologische Parameter von <i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i> .....	81
Tabelle 8.1: Übersicht zu den bestimmten Chl <i>a</i> Fluoreszenzparametern.....	119
Tabelle 8.2: Übersicht der immunologisch nachgewiesenen Protein-Untereinheiten .....	119
Tabelle 8.3: Prozentuale Aminosäuregehalte in Blattrosettenproben.....	120
Tabelle 8.4: Absolute Aminosäuregehalte in Blattrosettenproben.....	121

## Abkürzungsverzeichnis

3-PGA	3-Phosphoglycerat	F2PK	6-Phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase
2-PGA	2-Phosphoglycerat		
AcOH	Essigsäure	FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	Fd	Ferredoxin
ADPase	ADP-Glucose- Pyrophosphorylase	FG	Frischgewicht
AGI	Arabidopsis Genome Initiative	FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase
AL	Aktinisches Licht	FR	Dunkelrotes Licht
amiRNA	artifizielle mikro RNA	Fru1,6BP	Fructose-1,6-bisphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat	Fru2,6BP	Fructose-2,6-bisphosphat
AS	Aminosäure	Fru6P	Fructose-6-phosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	g	Gramm
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
bp	Basenpaare	Glc	Glucose
BSA	bovine serum albumin	GlcT	Glucose-Transporter
Bspw.	Beispielsweise	Glc1P	Glucose-1-phosphat
Bzw.	Beziehungsweise	Glc6P	Glucose-6-phosphat
Car	Carotinoide	Glc6PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
cDNA	komplementäre DNA	GPT	Glucose-6-phosphat/ Phosphat-Translokator
Chl	Chlorophyll	h	Stunde(n)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	H <sub>2</sub> O	Wasser
d	Tag(e)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid- triphosphat	HCF	Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	HCl	Salzsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	HK	Hexokinase
DNA	Desoxyribonucleinacid	HPLC	high performance liquid chromatography
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat	kDa	Kilodalton
DTT	Dithiothreitol	KOH	Kaliumhydroxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	L	Liter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LHC	Lichtsammelkomplex
Ery4P	Erythrose-4-phosphat	M	Molar (mol/Liter)
<i>et al.</i>	<i>et ali</i> (und andere)	m <sup>2</sup>	Quadratmeter
ETK	Elektronentransportkette	mA	Milliampere
ETR	Elektronentransportrate	Mal	Maltose
		MEX	Maltose-Exporter

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	RNAse	Ribonuklease
NaAc	Natriumacetat	RPE	Ribulosephosphat-Epimerase
NaCl	Natriumchlorid	RPI	Ribosephosphat-Isomerase
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid	RPK	Phosphoribulokinase
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid- phosphat	rpm	revolutions per minute
NaOH	Natriumhydroxid	RPPP	reduktiver Pentosephosphat- weg
NDH	NAD(P)H-Plastochinon- Dehydrogenase-Komplex	RT	Raumtemperatur
NPQ	Nichtphotochemisches Quenching	Ru1,5BP	Ribulose-1,5-bisphosphat
OCE	Wasserspaltender Komplex	Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
OD	optische Dichte	RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
OPPP	oxidativer Pentosephosphatweg	s	Sekunde
P <sub>a</sub>	anorganisches Phosphat	SBP	Sedoheptulose-1,7- bisphosphat
PC	Plastocyanin	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PCR	polymerase chain reaction	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- elektrophorese
PEG	Polyethylenglycol	SPS	Saccharosephosphat- Synthase
PEP	Phosphoenolpyruvat	Suc6P	Saccharose-6-Phosphat
PFD	Photonenflussdichte	SUT	Saccharosetransporter
PGI	Phosphoglucoisomerase	Taq	Thermus aquaticus
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	T-DNA	Transfer-DNA
PGM	Phosphoglucomutase	TP	Triosephosphat
pH	pontia hydrogenii	TPT	Triosephosphat/Phosphat- Translokator
PHS	Glucanphosphorylase	Tre6P	Trehalose-6-phosphat
PFD	Photonenflussdichte	Tricine	N-Tris(hydroxymethyl)- methylglycin
PK	Pyruvatkinase	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid	U	Unit
PP <sub>a</sub>	Pyrophosphat	UV	Ultraviolett
PPDK	Pyruvatorthophosphatdikinase	WT	Wildtyp
PPT	Phosphoenolpyruvat/ Phosphat-Translokator	XPT	Xylulose-5-phosphat/ Phosphat-Translokator
PQ	Plastchinon	Xu5P	Xylulose-5-phosphat
PRK	Phosphoribulokinase	z.B.	zum Beispiel
PRRP	Phosphoribosylpyrophosphat		
PS	Photosystem		
PT	Phosphat-Translokator		
qP	Photochemisches Quenching		
r	Wachstumsrate		
Ri5P	Ribose-5-phosphat		

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung von Plastiden und ihrer Stoffwechselwege für die Pflanze

Plastiden sind evolutiv aus Cyanobakterien entstanden, die durch Phagozytose aufgenommen wurden und eine symbiontische Beziehung mit ihrer Wirtszelle eingegangen sind (Endosymbionten-Theorie; C. Mereschkowsky, 1905; Cavalier-Smith, 2000; Raven und Allen, 2003). Die Plastiden höherer Pflanzen sind von zwei Membranen umgeben, die das Stroma umschließen und sie gegenüber dem Cytosol abgrenzen. Im Laufe der Zeit haben sie sich zu einzigartigen und essentiellen Zellorganellen entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer metabolischen Aufgaben voneinander unterscheiden (McFadden, 1999 und 2001). Die grünen Chloroplasten sind exklusiver Ort der pflanzlichen Photosynthese und befähigen die Pflanze sich photoautotroph zu ernähren. Im Gegensatz zu den anderen Plastidentypen liegt im Stroma der Chloroplasten ein weiteres hohlräumiges Membransystem, die Thylakoide (Heldt und Piechulla, 2008). Der flüssigkeitsgefüllte Hohlraum der Thylakoide wird als Lumen bezeichnet und stellt zusammen mit Stroma und der abgrenzenden Thylakoidmembran die Grundvoraussetzung für die Photosynthese dar (Nelson und Yocum, 2006; Heldt und Piechulla, 2008). Die Thylakoide liegen im Stroma zum Teil einschichtig als Thylakoidlamellen und teilweise zu Grana gestapelt vor (Danielsson *et al.*, 2004). Die auf diese Weise erzeugte große Membranfläche beinhaltet die Komponenten der Photosynthesemaschinerie. Im Rahmen der Photosynthese wird zunächst Lichtenergie in Redoxenergie (NADPH, Reduktionsäquivalente) sowie chemische Energie (ATP) überführt und im Folgenden für die Fixierung von CO<sub>2</sub> und dem damit verbundenen Aufbau von „Zuckerphosphaten“ (Triosephosphaten [TP] sowie weiteren Zuckermono- und Zuckerdiphosphaten) über den reduktiven Pentosephosphatweg (RPPP) genutzt (Heldt und Piechulla, 2008). Dadurch besteht ihre Aufgabe insbesondere darin, in Form von „Zuckerphosphaten“, energiereiche Kohlenstoffgrundgerüste für den gesamten pflanzlichen Metabolismus bereit zu stellen. Farblose Leukoplasten dienen hingegen in erster Linie der Speicheraufgabe und finden sich hauptsächlich in nicht-grünen Geweben, wie Samen und Wurzeln (Heldt und Piechulla, 2008). Sie werden in stärke-speichernde Amyloplasten, protein-speichernde Proteinoplasten und öl-speichernde Elaioplasten unterteilt. Desweiteren gibt es Chromoplasten, die durch ihren Pigmentgehalt Blüten und Früchten Farbe verleihen, sowie die farblosen Etioplasten, die sich erst bei Belichtung in Chloroplasten verwandeln (Thomson und Whatley, 1980; Schopfer und Brennicke, 2006). Alle Plastidentypen gehen

aus den Proplastiden meristematischer Gewebe hervor und können sich bei bestimmten Bedingungen sogar ineinander umwandeln. Außer der Photosynthese befindet sich eine Vielzahl weiterer, vor allem anabolischer, Stoffwechselwege ausschließlich in den Chloroplasten und zum Teil auch in anderen Plastidentypen. Plastiden sind exklusiver Ort der Stickstoff- und Schwefel-Assimilation (N- und S-Assimilation), der Synthese von Stärke, Fettsäuren, Pigmenten, aromatischen und verzweigten Aminosäuren sowie des Shikimatwegs und der damit verbundenen Bildung von Chorismat, dem Vorläufer einer Vielzahl von sekundären Pflanzenstoffen (Schopfer und Brennicke, 2006; Heldt und Piechulla, 2008; Tzin und Galili, 2010). Daneben verfügen Plastiden über einen zum cytosolischen Mevalonatweg nicht redundanten Isoprenoidsyntheseweg, den 2-Methylerythriol-4-phosphat-Weg (MEP-Weg), über den ein Großteil der pflanzlichen Isoprenoide (z.B. Carotinoide, Phytolketten, Gibberelline) synthetisiert wird (Kleinig, 1989; Lichtenthaler, 1998; McGarvey und Croteau, 1995; Philipps *et al.*, 2008). Trotz ähnlicher Stoffwechselwege unterscheiden sich die Plastiden im Vorkommen von Enzymen und damit in den Sequenzen von Stoffwechselwegen. So besitzen weder Chloroplasten noch andere Plastidentypen in *Arabidopsis* einen vollständigen Satz glycolytischer Enzyme (Prabhaker *et al.*, 2010). Den Chloroplasten fehlt bspw. die Enolase, wodurch sie nicht in der Lage sind, Phosphoenolpyruvat (PEP) aus 2-Phosphoglycerat (2-PGA) zu synthetisieren (Prabhaker *et al.*, 2009). Die heterotrophen Plastiden hingegen verfügen zum Teil über die Enolase, können aber keine Triosephosphate (TP) aus Fructose-6-Phosphat (Fru6P) generieren, da ihnen wiederum die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) fehlt (Entwistle und ap Rees, 1990; Prabhaker *et al.*, 2009). Auf diese Weise ist eine Feinabstimmung von Stoffwechselwegen innerhalb und auch zwischen Stoffwechselkompartimenten möglich. Um einen Stoffaustausch zwischen den Plastiden und dem umgebenden Cytosol zu ermöglichen sind Metabolitransporter erforderlich, die einen spezifischen Transport von Metaboliten vermitteln (Flügge, 1998).

## **1.2 Plastidäre Translokatoren ermöglichen einen Metabolit-austausch mit dem Cytosol**

Eine Trennung von Reaktionsabläufen in unterschiedliche Zellkompartimente ermöglicht eine effiziente Anpassung von Teilreaktion oder ganzer Stoffwechselwege auf die speziellen Bedürfnisse der Zelle. Für eine Verknüpfung dieser Stoffwechselwege und damit der metabolischen Flüsse zwischen den Zellkompartimenten bedarf es regulierbarer Metabolitransporter, die einen spezifischen Austausch von Intermediaten zwischen den einzelnen Zellkompartimenten ermöglichen (Flügge, 1998). Während die äußere

Plastidenmembran über verschiedene selektive Porine verfügt und für Metaboliten bis zu einer Größe von 10 kDa durchlässig ist, stellt die innere Plastidenmembran eine Barriere für den Metabolitaustausch der Plastiden mit ihrer Umgebung dar (Flügge und Heldt, 1991; Fischer *et al.*, 1994). Um einen geregelten Stoffaustausch zu ermöglichen, sitzen in der inneren Plastidenmembran zahlreiche Transporter, die unterschiedliche Substratspezifitäten und verschiedene Transportmechanismen aufweisen (Weber und Fischer, 2007). Die Abundanz der verschiedenen Transporter in der Plastidenhüllmembran variiert je nach Plastidentyp, Gewebe und Entwicklungsstatus (eFP Browser - Winter *et al.*, 2007). So gehören bspw. der Glucose-Transporter (GlcT) und Maltose-Exporter (MEX) (Weber *et al.*, 2000; Niittylä *et al.*, 2004), die beide im Export der Abbauprodukte von Stärke involviert sind, zu Transportern die eine erleichterte Diffusion katalysieren. Der Transport von Pyruvat über die Plastidenmembran erfolgt über den *Bile Acid:Sodium Symporter2* (BASS2-Transporter) im Symport mit Natrium, während Natrium im Gegentauch mit einem Proton über den Natrium:Proton Antiporter (NHD1) in die Plastiden gelangt (Furumoto *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2014). Eine ebenfalls nach dem Prinzip des Antiports funktionierende Transporter-Familie ist die der plastidären Phosphat-Translokatoren (Flügge, 1999). Die plastidären Phosphat-Translokatoren bilden zusammen mit den Nukleotidzucker-Transportern (NST – *Nucleotid sugar transporter*) die TPT/NST-Familie und gehören zu der Superfamilie der *Drug/Metabolite-Transporter* (DMT) (Ward *et al.*, 2001; Knappe *et al.*, 2003).

### 1.2.1 Plastidäre Phosphat-Translokatoren

Die plastidären Phosphat-Translokatoren (pPT) sind kernkodierte integrale Membranproteine die durch eine N-terminale Transitsequenz in die innere Plastidenhüllmembran dirigiert werden (Flügge, 1999; McFadden, 1999). Laut *in silico*-Vorhersage besitzen sie sechs bis acht Transmembrandomänen (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; Schwacke *et al.*, 1989) und liegen funktionell als Homodimere vor (Flügge, 1985; Wagner *et al.*, 1989). Sie katalysieren den strikten Gegentauch phosphorylierter Intermediate mit anorganischem Phosphat ( $P_a$ ) oder anderen phosphorylierten Intermediaten nach einem Ping-Pong-Mechanismus (Flügge, 1992; Flügge 1999). Die Transportrichtung wird über den Konzentrationsgradienten bestimmt, der zu gleich auch die treibende Kraft für den Metabolittransport darstellt. In Hinblick auf ihre teilweise überschneidende Substratspezifität werden pPT nach ihren Hauptsubstraten in vier Klassen unterteilt und weisen untereinander eine Sequenzhomologie von etwa 30-40 % auf. Innerhalb einer Klasse liegt die Sequenzhomologie bei 75-85 % (Kammerer *et al.*, 1998). Hochkonserviert in allen Klassen ist der in der mutmaßlichen Substratbindestelle lokalisierte Lysin- und Argininrest (Flügge

und Heldt, 1979; Fischer *et al.*, 1994). Eine Mutagenese dieses Lysinrestes hat einen vollständigen Verlust der Transportaktivität zur Folge (Flügge, 1999; Knappe *et al.*, 2003). Die vor und hinter diesem Dipeptid liegenden Aminosäuren sind charakteristisch für die jeweilige Klasse der pPT (Eicks *et al.*, 2002).

Der (1) Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT), ist insbesondere in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert und ist mengenmäßig das häufigste Transportprotein in Pflanzen (Schulz *et al.*, 1993; Flügge, 1995; Fischer *et al.*, 1997). Er fungiert in erster Linie als Exporter von TP für die cytosolische Saccharosesynthese während der Lichtperiode (Fliege *et al.*, 1978). TP bestehen im Gleichgewicht zu etwa 96 % aus Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und 4 % aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) (Heldt und Piechulla, 2008). Neben  $P_a$  und TP gehört auch 3-Phosphoglycerat (3-PGA) zu seinen Substraten (Fliege *et al.*, 1978; Flügge *et al.*, 1989; Flügge, 1999). Mit der Oxidation der in das Cytosol gelieferten TP zu 3-PGA durch die Enzyme der Glykolyse kann auch indirekt chemische Energie (ATP) und Redoxenergie (NADH) über den TPT (3-PGA-TP-Shuttle) exportiert werden (Flügge, 1999).

Über den (2) Glucose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT) wird hauptsächlich Glucose-6-Phosphat (Glc6P) in die Plastiden heterotropher Gewebe importiert (Kammerer *et al.*, 1998). Plastiden, mit Ausnahme der Chloroplasten, fehlt die FBPase die in der Überführung von TP in Glc6P eingebunden ist (Entwistle und ap Rees, 1990). Die im Mesophyll der Blätter gebildete Saccharose (Suc) wird über das Phloem in die heterotrophen Gewebe transportiert. Dort wird Suc über die Saccharose-Synthase oder aber die Invertase unter Bildung von UDP-Glucose und Fructose (Fru) bzw. Glucose (Glc) und Fru gespalten und kann, nach Überführung dieser Spaltungsprodukte in Glc6P, über den GPT in den Plastiden importiert werden (Winter und Huber, 2000). Im Plastid wird Glc6P entweder für den Aufbau von Depotstärke (Amyloplast) oder als Ausgangsmetabolit für den oxidativen Pentosephosphatweg (OPPP) genutzt (Bowsher *et al.*, 1992; Emes und Neuhaus, 1997). Neben Glc6P transportiert der GPT auch  $P_a$ , TP und Pentosephosphate (Kammerer *et al.*, 1998; Eicks *et al.*, 2002). Unter physiologischen Bedingungen ist der Transport von Pentosephosphaten über den GPT jedoch aufgrund der hohen Glc6P Konzentrationen eher unwahrscheinlich (Glc6P-Konzentrationen: Stroma <1 mM, Cytosol ~6 mM; alle Pentosephosphate im Stroma <0,1 mM [Flügge *et al.*, 1980; Heldt *et al.*, 1980; Winter *et al.*, 1994; Vosloh, Dissertation 2011; Szecowka *et al.*, 2013]). Glucose-1-Phosphat (Glc1P), Fru6P und PEP werden hingegen nicht über den GPT transportiert (Kammerer *et al.*, 1998). In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gibt es zwei Gene die für jeweils einen GPT kodieren. Der *GPT1* ist generell ubiquitär in *A. thaliana* exprimiert, insbesondere jedoch in Schließzellen (Overlach *et al.*, 1993) und während der Pollen- und Embryosackentwicklung (Niewiadomski *et al.*, 2005). Der *GPT2* ist in der Embryonalentwicklung involviert und zeigt

eine Expression in Blüten, Schoten und Samen. Daneben kann seine Expression durch hohe Konzentrationen löslicher Zucker, wie in stärkefreien Mutanten, induziert werden (Bläsing *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2010).

Der (3) Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) kann das energiereiche und unentbehrliche Stoffwechselintermediat PEP transportieren (Fischer *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum Cytosol fehlt Chloroplasten und den meisten anderen Plastiden die Enolase (ENO1), die PEP aus 2-PGA synthetisiert (Stitt und ap Rees, 1979; Borchert *et al.*, 1993; Prabhaker *et al.*, 2009 und 2010). Da der Ablauf des Shikimatwegs auf die Verfügbarkeit von PEP angewiesen ist und die damit verbundene Synthese aromatischer Aminosäuren sowie von Chorismat abgeleiteter sekundärer Pflanzenstoffe für die Pflanze essentiell ist, sind Plastiden auf einen Import von PEP angewiesen (Schmidt und Amrhein, 1995; Tzin und Galili, 2010). Auch Pyruvat, welches in den Plastiden als Ausgangsmetabolit für die Synthese von verzweigten Aminosäuren, Fettsäuren und Isoprenoiden über den MEP-Weg essentiell ist, wird zum Großteil durch die Überführung von importierten PEP in Pyruvat durch die plastidäre Pyruvat-Kinase (PK) bereitgestellt (Ohlrogge und Jaworski, 1997; Schulze-Siebert, 1984; Lichtenthaler, 1998; Prabhaker *et al.*, 2010). Im Cytosol kann PEP ebenfalls durch die Pyruvatkinase (PK) zu Pyruvat umgesetzt werden (Plaxton, 1996). Pyruvat wird dann in den Citratzyklus der Mitochondrien eingespeist, wodurch NADH für die respiratorische ATP-Synthese entsteht (Fernie *et al.*, 2004). Durch den Citratzyklus werden auch verschiedene Kohlenstoffgerüste bereitgestellt, wie bspw. 2-Oxoglutarat (2-OG) für die N-Assimilation (Coruzzi, 2003). Neben PEP zählen ebenfalls 2-PGA und  $P_a$  zu den Substraten des PPT (Fischer *et al.*, 1997). Auch beim PPT konnten in *A. thaliana* zwei Vertreter identifiziert werden. Der *PPT1* ist insbesondere im Xylemparenchym von Blättern, Blüten und Wurzeln exprimiert (Knappe *et al.*, 2003). Der *PPT2* hingegen wird nur im Blattmesophyll und Blüten exprimiert (Knappe *et al.*, 2003).

Der letzte Vertreter der pPT ist der (4) Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (XPT). Der *XPT* ist als *single-copy* Gen mit Ausnahme von Blütenkronblättern, Pollensäcken und jungen Fruchtknoten ubiquitär in *A. thaliana* exprimiert (Eicks *et al.*, 2002). Analysen seiner Substratspezifität offenbarten hohe Transportraten für Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) und TP. Des Weiteren konnten auch geringe Transportraten für 3-PGA, Ribulose-5-Phosphat (Ru5P), Erytrose-4-Phosphat (Ery4P) und PEP sowie ein Transportausschluss für Hexosephosphaten, Ribose-5-Phosphat (Ri5P) sowie für Trehalose-6-Phosphat (Tre6P) nachgewiesen werden (Eicks *et al.*, 2002, Hilgers, Diplomarbeit 2011).

## 1.2.2 Auswirkungen eines Funktionsverlusts von plastidären Phosphat-Translokatoren im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*

Durch *knockout* und *knockdown* Mutanten kann die Funktion eines Gens, das z.B. für einen Transporter kodiert, *in vivo* untersucht werden. Bedingt durch die Mutation und der damit verbundenen Inaktivität, Verringerung oder eines kompletten Verlustes des Genprodukts, können entweder redundante bzw. kompensatorische Mechanismen greifen oder aber zur Entstehung eines Phänotyps führen. Mit Hilfe von Mutanten kann daher der Ablauf von Stoffwechselwegen sowie eine Kopplung von metabolischen Flüssen untersucht werden (Fischer, 2011). Im Folgenden werden Mutanten plastidärer PT sowie die damit verbundenen Auswirkungen auf den Stoffwechsel vorgestellt.

### 1.2.2.1 Ein Funktionsverlust des Triosephosphat/Phosphat-Translokators kann durch einen simultanen Stärkeaufbau und Stärkeabbau am Tag kompensiert werden

Während der Lichtperiode werden über die Photosynthese TP generiert, die in erster Linie entweder über den TPT für den Aufbau von Suc und der damit verbundenen Versorgung heterotropher Gewebe mit Kohlenstoff exportiert werden oder aber im Chloroplasten für die Synthese transitorischer Stärke als Kohlenstoff- und Energiespeicher für die Dunkelperiode genutzt werden (Heldt und Piechulla, 2008). Bei einem Ausfall des TPT können die Photoassimilate nicht über den TPT exportiert werden, wodurch es zu einer vermehrten Stärkesynthese im Chloroplasten kommt (Riesmeier *et al.*, 1993; Heineke *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 2002). Durch einen simultanen Stärkeaufbau und -abbau bereits während der Lichtperiode (Walters *et al.*, 2004) und dem damit verbundenen Export von Maltose und Glc über den MEX (Niittyä *et al.*, 2004) und GlcT (Weber *et al.*, 2000) kann der Verlust des TPT kompensiert werden (Häusler *et al.*, 1998). Daher zeigen *tpt*-Mutanten (*tpt-1*, *tpt-2*) keinen auffälligen Phänotyp (Schneider *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2012). Wird zusätzlich der alternative Weg der Stärkesynthese bspw. durch Mutation der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) inhibiert, wie in den *adg1-1/tpt-1* (Schneider *et al.*, 2002; Häusler *et al.*, 2009) und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten (Schmitz *et al.*, 2012) zeigen die Pflanzen einen drastischen Phänotyp. Beide Doppelmutanten weisen neben einem stark retardierten Wachstum einen Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz (HCF)-Phänotyp sowie eine damit verbundene stark erniedrigte photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) auf (Schneider *et al.*, 2002; Häusler *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2012; siehe hierzu auch

Abschnitt 2.2.5.2). Unter Niedriglichtbedingungen (*low light*, LL = 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) fehlen diese Phänotypen vollständig (Schmitz *et al.*, 2012). Untersuchungen zu Konzentrationen löslicher Zucker (Glc, Fru und Suc) in Blättern unter Hochlichtbedingungen (*high light*, HL = 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) offenbarten einen enormen Mangel dieser Metaboliten während des gesamten Tagesverlaufs. Immunologische Analysen zur Abundanz von Proteinen des Photosyntheseapparats zeigten reduzierte Gehalte der Plastom-kodierten Proteine (z.B. Kernkomponenten der Reaktionszentren der Photosysteme wie D1, D2, etc.), weniger aber der Kern-kodierten Photosyntheseproteine (z.B. Lichtsammelkomplexe, LHCs). Als eine Ursache für den HCF-Phänotyp konnten freie LHCs, die weder an PSI noch PSII gebunden sind, identifiziert werden (Schmitz *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Befunde wurde eine Störung in der Plastid-Kern Kommunikation in *adg1-1/tpt-2* vermutet. Obwohl die bekannten Exportwege von Photoassimilaten in *adg1-1/tpt-2* vollständig inhibiert sind, ist sie weiterhin lebens- und reproduktionsfähig. Dies lässt auf mindestens einen weiteren kompensatorischen Mechanismus schließen, über den Photoassimilate aus den Chloroplasten exportiert werden können.

#### **1.2.2.1.1 Die Kommunikation zwischen Plastid und Kern erfolgt über retrograde Signale**

Während der Evolution sind mehr als 95 % der einstigen Cyanobakteriumgene verloren gegangen oder in den Kern der Wirtszelle transferiert worden (Martin *et al.*, 1998 und 2002; Timmis *et al.*, 2004; Keeling und Palmer, 2008). Viele plastidäre Proteine oder auch nur bestimmte Proteinuntereinheiten werden daher nicht vom Plastom, sondern vom Kern kodiert und müssen in die Plastiden importiert werden. So werden bspw. die Komponenten des Photosyntheseapparats oder auch des RPPP sowohl vom Plastom (z.B. Kernkomponenten der Reaktionszentren, große katalytische Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase [RuBisCO]) als auch vom Kern (z.B. LHC, kleine regulatorische Untereinheit der RuBisCO) kodiert (Race *et al.*, 1999). Für die Koordination der Genexpression ist daher eine Kommunikation zwischen Plastid und Kern erforderlich. Die Art der Signalgebung zwischen Plastid und Kern (sogenannte retrograde Signale) ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Da durch exogene Fütterung mit Suc oder Glc sowohl der Wachstums- als auch HCF-Phänotyp von *adg1-1/tpt-2* gerettet werden konnte (Schmitz *et al.*, 2012; Heinrichs *et al.*, 2012), wurde auch eine Beteiligung von Kohlenhydraten bei der Plastid-Kern Kommunikation anhand der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante untersucht (Heinrichs *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2012 und 2014). Als „klassische“ retrograde Signale werden Komponenten des Tetrapyrrolstoffwechsels, der Redoxzustand der Chloroplasten bzw. der Thylakoidmembran

(Surpin *et al.*, 2002, Baier und Dietz, 2005, Pfalz *et al.*, 2012), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Kim *et al.*, 2008), Balazadeh *et al.*, 2012), Abscisinsäure (ABA) (Baier *et al.*, 2004; Czarnecki *et al.*, 2012), die plastidäre Genexpression und weiterer Metabolite, insbesondere auch Kohlenhydrate (Smeekens 1998 und 2000; Schmitz *et al.*, 2014; Häusler *et al.*, 2014), diskutiert.

### 1.2.2.2 Der GPT und die Bedeutung des oxidativen Pentosephosphatwegs

Für den GPT konnten zwei Vertreter identifiziert werden, die sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters deutlich unterscheiden. Während ein *knockout* des *GPT1* letal ist, führt ein *knockdown* zu verringerten Transkripten der Enzyme des OPPP (Kruger und von Schaewen, 2003; Niewiadomski *et al.*, 2005; Andriotis *et al.*, 2010). Dies deutet darauf hin, dass die Expression dieser Enzyme an den Fluss über den GPT1 gekoppelt ist (Andriotis *et al.*, 2010). Der OPPP dient in erster Linie der Gewinnung von Reduktionsäquivalenten durch sukzessive Oxidation von Glc6P zu Ru5P. Über den OPPP können Glc6P, ähnlich wie beim RPPP aber auch verschiedene C<sub>7</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>3</sub>-Kohlenhydrate generiert und in weitere Stoffwechselwege eingespeist werden (Kruger und von Schaewen, 2003). Im Gegensatz zum RPPP ist der OPPP nicht auf die Chloroplasten beschränkt, sondern läuft in allen Plastidentypen ab. Der OPPP lässt sich in einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Abschnitt unterteilen. Während die Reaktionssequenzen des nicht-oxidativen Abschnitts auf die Plastiden beschränkt sind, konnten die oxidativen Sequenzen auch im Cytosol und in Peroxisomen nachgewiesen werden (Scharrenberger *et al.*, 1995; Eicks *et al.*, 2002; Kruger und von Schaewen 2003; Meyer *et al.*, 2011).

Ein Funktionsverlust von GPT2 scheint hingegen keinen Einfluss auf die Pflanzenfitness zu haben (Niewiadomski *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2010; Hilgers, Diplomarbeit 2011). Neuerdings wird jedoch auch eine Einbindung des GPT2 in Akklimatisierungsprozessen der Photosynthese diskutiert (Dyson *et al.*, 2015). Die Expression des GPT2 kann durch hohe Konzentrationen löslicher Zucker, wie in stärkefreien Mutanten, auch induziert werden (Bläsing *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2010). Dadurch könnte der GPT2 den Ausfall des TPT in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei Anzucht mit Zuckern kompensieren und in der Zucker-abhängigen Rettung der Phänotypen von *adg1-1/tpt-2* involviert sein. Ein zusätzlicher Funktionsverlust des GPT2 im Hintergrund der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (*adg1-1/tpt-2/gpt2-1*) führte jedoch weiterhin zu einer Rettung des Wachstums- und HCF-Phänotyps (Schmitz *et al.*, 2012). Die Rettung der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutante durch

exogene Fütterung mit Zuckern weist daher auf einen zur Zucker-gesteuerten Induktion des GPT2 unabhängigen Mechanismus hin (Schmitz *et al.*, 2012).

### 1.2.2.3 Die Rolle des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators für die Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat in Plastiden

Die Verfügbarkeit von PEP in den Plastiden ist für den Ablauf des Shikimatwegs und der damit verbundenen Bereitstellung von aromatischen Aminosäuren und abgeleiteter Metabolite für den pflanzlichen Stoffwechsel essentiell (Herrmann und Weaver, 1999). Ein Ausfall von PPT1 resultiert in einem retikulierten Blattphänotyp und verkürzten Wurzeln (*cue1*-Mutante – *chlorophyll a/b binding protein underexpressed*) (Li *et al.*, 1995; Streatfield *et al.*, 1999; Voll *et al.*, 2003; Staehr *et al.*, 2014). Der Blattphänotyp von *cue1* lässt sich durch Fütterung von *trans*-Zeatin, Dehydrodiconiferylalkohol-Glucosid, sowie einer Kombination der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin retten (Staehr *et al.*, 2014). Auch eine Überexpression, unter dem Blumenkohl Mosaikvirus (CaMV) 35S Promotor, der ENO1 führt zu einer Rettung des *cue1*-Phänotyps (Prabhaker *et al.*, 2010). Ein kombinierter Funktionsverlust von PPT1 und ENO1 hingegen führt zu letalen Gametophyten (Prabhaker *et al.*, 2010). Da ENO1 im Chloroplasten nicht vorkommt, wurde angenommen, dass der PPT2 den Ausfall des PPT1 teilweise kompensiert. Ein einfacher *knockout* des *PPT2* führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp in *A. thaliana* (Staehr, Dissertation 2010; Hilgers persönliche Beobachtungen). Da aber auch der kombinierte Ausfall beider PPTs nicht letal wirkt (Staehr, Dissertation 2010) wird angenommen, dass es einen weiteren Weg gibt, über den die Plastiden mit PEP versorgt werden. Ein Großteil des für die Synthese von Fettsäuren, verzweigter Aminosäuren sowie Isoprenoiden über den plastidären MEP-Weg benötigten Pyruvat wird aus PEP durch die Pyruvatkinase (PK) bereitgestellt. Pyruvat kann aber auch über den BASS2- („*BILE ACID: SODIUM SYMPORTER2*“) Transporter (Furumoto *et al.*, 2011) in den Plastiden importiert werden. Eine mögliche Alternative der Bereitstellung von PEP in den Plastiden könnte daher durch die Pyruvatorthosphosphatdikinase (PPDK) erfolgen, die PEP aus Pyruvat synthetisieren kann (Parsley und Hibberd, 2006). Allerdings ist die PPDK in Chloroplasten der vegetativen Gewebe nur sehr schwach exprimiert (Prabhaker *et al.*, 2010).

Transportstudien mit dem XPT zeigten einen pH-Wert- bzw. ladungsabhängigen Transport von PEP über den XPT (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Bei einem pH-Wert von 6 liegt PEP zum Großteil zweifach negativ geladen vor und kann sehr gut über den XPT transportiert werden. Mit zunehmenden pH-Wert ( $\text{pH} > 6,4$ ) nimmt der Anteil an  $\text{PEP}^{3-}$  zu und somit die

Transportrate für PEP über den XPT ab (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Möglicherweise ist daher auch der XPT in der Lebensfähigkeit der *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante involviert.

#### **1.2.2.4 Die Rolle des XPT im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* ist unklar**

Das Expressionsmuster des XPT weist auf eine grundsätzliche Funktion im Pflanzenmetabolismus dieses Transporters hin. Ein Verlust des XPT hat jedoch keinen sichtbaren Effekt auf die vegetative Entwicklung der Pflanze (Eicks, Dissertation 2004; Hilgers, Diplomarbeit 2011). Aufgrund seiner Substratspezifität wird für den XPT eine Rolle in der Verknüpfung von cytosolischen OPPP mit dem plastidären OPPP bzw. RPPP angenommen (Eicks *et al.*, 2002).

Im Stroma der Chloroplasten gibt es zum einen die Enzyme des RPPP und zum anderen die des OPPP. Da ein gleichzeitiger Ablauf dieser trotz ähnlicher Intermediate recht gegensätzlicher Stoffwechselwege neben einem unnötigem ATP-Verbrauch zu einem unnützen Kreislauf von CO<sub>2</sub> und Kohlenhydraten führen würde, ist deren Ablauf streng reguliert (Schopfer und Brennicke, 2006; Heldt und Piechulla, 2008). Die Aktivität einiger Enzyme des RPPP und auch des OPPP ist lichtreguliert und erfolgt unter anderem über reduziertes Thioredoxin. Zur Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzymen reduziert Thioredoxin einzelne Disulfidbrücken in spezifischen Zielproteinen und wirkt somit als Proteindisulfid-Oxidoreduktase (Heldt und Piechulla, 2008). Im RPPP werden die Phosphoribulokinase (PRK), NADPH-GAP-Dehydrogenase, Fructose-1,6-bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase über reduziertes Thioredoxin aktiviert (Wolosiuk *et al.*, 1993; Geiger und Servaites, 1994). Das Eingangsenzym des OPPP, die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc6PDH), wird hingegen durch Reduktion inaktiviert (Scheibe, 1990). Neben Thioredoxin spielt auch die lichtabhängige Änderung des pH-Wertes (H<sup>+</sup>-Konzentration), die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration sowie der Metabolitspiegel im Stroma eine wichtige Rolle bei der Aktivitätsregulierung chloroplastidärer Enzyme. Beispielsweise werden die chloroplastidäre Fructose-1,6-bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase durch reduziertes Thioredoxin, Mg<sup>2+</sup>, einen erhöhten pH-Wert und durch ihre Ausgangsmetabolite in ihrer Aktivität gefördert, wohingegen 3-PGA sowie ihre jeweiligen Produkte zu einer Hemmung ihrer Enzymaktivität führen (Wolosiuk *et al.*, 1993; Geiger und Servaites, 1994; Heldt und Piechulla, 2008). Die Hauptfunktionen des OPPP liegen im Cytosol und im Plastid in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und der Umwandlung von Hexosephosphaten in Pentosephosphate. Pentosephosphate in Form von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) sind sowohl essentiell für den Purin- und

Pyrimidinmetabolismus als auch für die plastidäre Histidinsynthese (Zrenner *et al.*, 2006; Ingle, 2011). Daneben sind RPPP und OPPP in den Plastiden bedeutend für die Bereitstellung von Ery4P für den Shikimatweg (Herrmann und Weaver, 1999). Der XPT könnte unter Bedingungen, bei denen dem RPPP größere Mengen an Intermediaten entzogen werden, dem Chloroplast Kohlenstoffgerüste in Form von Xu5P aus dem Cytosol nachliefern. Dies könnte bspw. bei einem hohen Fluss von Ery4P in den Shikimatweg bedeutend sein. Desweiteren könnten über den XPT in anderen Plastidentypen, denen die FBPase fehlt TP exportiert, im Cytosol über die Enzyme der Gluconeogenese in Glu6P umgewandelt und über den GPT wieder re-importiert werden.

Untersuchungen einer *XPT* knockout Mutante (*xpt-1*) unter NL (*normal light*,  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) offenbarten im Rahmen einer Doktorarbeit keine Unterschiede in spezifischen Frischgewicht, den Chlorophyll- und Anthocyangehalt (Eicks, Dissertation 2004). Weitere physiologische Untersuchungen zeigten eine verminderte ETR nach Induktion der Photosynthese und eine massive Akkumulation löslicher Zucker (Suc, Glc, Fru) am Ende der Licht- sowie am Ende der Dunkelperiode (Eicks, Dissertation, 2004). Der Stärkegehalt war im Vergleich zum Wildtyp (WT) am Ende der Lichtperiode deutlich verringert und stieg zum Ende der Dunkelperiode an (Eicks, Dissertation 2004). Erneute Untersuchungen zu *xpt-1* lieferten während der vegetativen Entwicklung keine physiologischen oder biochemischen Unterschiede verglichen mit ihrem WT, wohl aber während der generativen Entwicklung (Hilgers, Diplomarbeit 2011). So war die Schotenanzahl in der Mutante erhöht, die Samen pro Schote, sowie die berechnete Samenanzahl pro Pflanze hingegen verringert. Das Samengewicht pro Pflanze unterschied sich jedoch nicht zwischen WT und *xpt-1*, was auf die stark vergrößerten Samen der *XPT*-Mutante zurückgeführt werden konnte (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Eine eindeutige Funktion des XPT ist basierend auf den bisherigen Untersuchungen weiterhin unklar.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Einbindung des XPT in Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse von *A. thaliana*. Der XPT ist als *single-copy* Gen in *A. thaliana* mit Ausnahme von Kronblättern, Pollen und jungen Fruchtknoten ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Aufgrund seiner Substratspezifität wird dem XPT eine Rolle in der Verknüpfung von cytosolischem OPPP und plastidärem OPPP bzw. RPPP zugesprochen (Eicks *et al.*, 2002). Da die Funktionen des OPPP vor allem in der Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten sowie Redoxenergie für weitere Syntheseprozesse liegen, könnte ein Ausfall des XPT Auswirkungen auf eine Vielzahl an Stoffwechselwegen haben. Eine *knockout* Mutante (*xpt-1*) zeigte allerdings keinen expliziten Phänotyp während der vegetativen Entwicklung. Nur während der generativen Entwicklung konnten Unterschiede in der Schoten- und Samenanzahl sowie der Samengröße zum WT festgestellt werden (Hilgers, Diplomarbeit 2011).

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte anhand unabhängiger XPT Mutanten der beobachtete Phänotyp von *xpt-1* über Analysen des Wachstums sowie physiologischer Charakteristika verifiziert werden. Hierzu sollte, neben der Etablierung einer weiteren XPT *knockout* Mutante (*xpt-2*), ein amiRNA-Konstrukt gegen den XPT erstellt und in die Wildtypen Ws-2 und Col-0 transferriert werden. Insbesondere die Untersuchung der vergrößerten Samen von *xpt-1* könnte interessante biotechnologische Ansätze für die Ertragssteigerung liefern. Aus diesem Grund sollte der Protein- und Fettsäuregehalt, sowie deren Zusammensetzung in den Samen der XPT-Mutanten überprüft werden.

Da sich die Substratspezifität des XPT teilweise mit der anderer pPT überschneidet (Eicks *et al.*, 2002), könnten redundante Funktionen anderer pPT die Entstehung eines klaren Phänotyps verhindern. Aus diesem Grund sollten durch Kreuzung von *xpt-1* mit Mutanten anderer pPT (*tpt-2*, *gpt2-1*, *cue1-6*) und, basierend auf den Beobachtungen von Eicks (Dissertation, 2004), des Stärkeanabolismus (*adg1-1*, *pgm1*), Mehrfachmutanten generiert werden, um die Konsequenzen eines gemeinsamen Ausfalls zu untersuchen. Von den generierten Mehrfachmutanten zeigte insbesondere die *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante einen starken Wachstums- und Photosynthesephänotyp, die im zweiten Abschnitt dieser Arbeit untersucht wurden. Da die Phänotypen von *tpt-2/xpt-1* an die von *adg1-1/tpt-2* erinnern, sollte des Weiteren durch Untersuchung von Photosyntheseparametern, sowie des Kohlenhydratmetabolismus geklärt werden, ob die Ursachen zur Entstehung der Phänotypen in *adg1-1/tpt-2* und *tpt-2/xpt-1* identisch sind. Um die Phänotypen an unabhängigen *tpt/xpt* Doppelmutanten verifizieren zu können, sollte *xpt-1* mit der *knockdown* Mutante *tpt-1* gekreuzt und des Weiteren das erstellte amiRNA-Konstrukt gegen den XPT auch in *tpt-2* transformiert werden.

Die *adg1-1/tp2-2* als auch die *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante sind trotz schwerwiegender Störungen im Stoffwechsel weiterhin lebensfähig. Aufgrund der Substratspezifitäten des XPT sollte im letzten Teil der vorliegenden Arbeit durch Einkreuzen von *xpt-1* überprüft werden, ob der XPT in diesen Doppelmutanten redundante Funktionen als Hilfstransportprotein übernimmt und so deren Überleben bewirkt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antibiotika

Zur Selektion transformierter Bakterien bzw. Pflanzen wurden den Wachstumsmedien Antibiotika zugefügt. Die Wahl des eingesetzten Antibiotikums richtete sich nach dem im transformierten Vektor enthaltenen Antibiotika-Resistenzmarker. Die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 2.1 aufgeführt und wurden von den unter 2.1.2 aufgeführten Firmen bezogen.

**Tabelle 2.1: Antibiotika.** Die in der Tabelle aufgeführten Antibiotika wurden, soweit nicht schon gelöst erworben, in den angegebenen Lösungsmitteln angesetzt. Die Endkonzentration bezeichnet die Konzentration des Antibiotikums in den jeweiligen Wachstumsmedien. Im Fall von Kanamycin wurden je nach Organismus verschiedene Endkonzentrationen in den Medien verwendet. DMSO = Dimethylsulfoxid.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 µg/ml
Carbenicillin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 µg/ml
Gentamycin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	25 µg/ml
Hygromycin	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 µg/ml
Kanamycin ( <i>A. tumefaciens</i> )	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 µg/ml
Kanamycin ( <i>E. coli</i> , <i>A. thaliana</i> )	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 µg/ml
Rifampicillin	DMSO	50 - 150 µg/ml

#### 2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Anitkörper, Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden hauptsächlich von den Firmen Agrisera (Vännäs, Schweden), AppliChem (Darmstadt, D), Biolabs (Frankfurt am Main, D), Bioline (Luckenwalde, D), Biomol (Hamburg, D), BioRad (München, D), Difco (Hamburg, D), Duchefa (Haarlem, NL), Invitrogen (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Perkin Elmer (Rodgau, D), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D), Promega (Mannheim, D), Quiagen (Hilden, D), Roche (Mannheim, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Sarstedt (Nümbrecht, D), Schleicher & Schuell (Dassel, D) und VWR (Darmstadt, D) bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Millipore-Anlage (TKA GenPure, D) angesetzt.

### 2.1.3 Kommerzielle Kits

Folgende Kits wurden gemäß den Herstellerangaben genutzt:

Für die Isolierung von Plasmiden wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das OMEGA bio-tek DNA Probe Purification Kit von VWR (Darmstadt, D) genutzt. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde mit dem Big Dye Reaction Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

### 2.1.4 Software und Datenbanken

Die Digitalisierung von Pflanzen und Pflanzenteilen erfolgte neben digitaler Photographie, mit den Programmen DISKUS (Carl H. Hilgers, Königswinter, D) und Leica Application Suite 2.1.0 (Leica Microsystems, Schweiz). Die Vermessung digitalisierter Pflanzenteile wurde entweder direkt mit dem Programm DISKUS oder im Nachhinein mit ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) vorgenommen. Für Bildbearbeitungen wurden die Programme Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, Kalifornien), Paint (Microsoft, Redmond, Washington) und PowerPoint (Microsoft, Redmont, Washington) verwendet. Die Bestimmung und Bearbeitung von Photosynthese Parametern erfolgte mit den Programmen ImagingWin sowie PamWin (Heinz Walz GmbH, Effeltrich). HPLC-Chromatogramme wurden mit dem Programm Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, Kalifornien) ausgewertet. Klonierungsstrategien und Primer wurden mit dem Programm VectorNTI (Thermo Fisher Scientific, Hennef, D) entworfen. Gestaltete Primer wurden anschließend mit Hilfe der Webseite „Oligo Calc: *Oligonucleotide Properties Calculator*“ (Kibbe WA, 2007) überprüft. Für Datenbankrecherchen wurden die Webseiten ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003), TAIR (Swarbreck *et al.*, 2008), NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland), SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, Kalifornien), KEGG (Kanehisa Laboratories, Japan), eFP Browser (Winter *et al.*, 2007), ATTED-II (Obayashi *et al.*, 2007, 2009) und AGRIS (Davuluri RV *et al.*, 2003) verwendet.

### 2.1.5 Statistik

Die in dieser Arbeit angegebenen Daten zeigen den Mittelwert (MW)  $\pm$  den Standardfehler (SF). Eine statistische Analyse von Daten erfolgte beim Vergleich von zwei Datensätzen über den Welch T-Test (Welch, 1947). Bei einem Vergleich von mehr als zwei Datensätzen wurde eine *oneway* ANOVA mit anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test durchgeführt. Als signifikant verschieden galten Daten, die sich mindestens bei einem Signifikanzniveau

von  $p < 0,05$  voneinander unterschieden. Signifikanztafeln zu den Ergebnissen finden sich im Anhang (8.6 A-S).

## 2.1.6 Geräte

Die in Tabelle 2.2 gelisteten Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 2.2: Angegeben sind die genutzten Geräte sowie deren Bezugsquelle.**

Gerät	Bezugsquelle
Bohrer:	RW 16, IKA-Werke, Staufen (D); RZR 50, Heidolph, Vertrieb: Hartenstein, Würzburg (D)
Binokular:	SM2-U 200M, JVC Digitalkamera KY-F1030, Nikon; Leica S6 E Stereomikroskop Model/PN:MDG33/10450123, Leica EC3 Kamera
Heizblöcke:	TH 26, HLC Biotech, Bovenden (D); Thermomixer 5436, Thermostat 5320, Eppendorf, Wesseling
HPLC	UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex, Schwerte
Magnetrührer mit Heizplatte:	IKAMAG RET, IKA-Werke, Staufen (D)
Mikroskop:	Nikon Eclipse E800, Nikon GmbH, Düsseldorf (D)
PAM	ImagingPAM <i>M-Series</i> und PAM2100 Heinz Walz GmbH, Effeltrich
PCR-Maschinen:	PTC 100™ und PTC 200, MJ Research, Vertrieb: Biozym, Hess. Oldendorf (D); DNA Engine®PTC, BioRAD, München (D)
pH-Meter:	SevenEasy™pH-Meter, Mettler Toledo GmbH, Gießen (D)
Photometer:	DR 5000, Hach Company, Loveland (USA) Infinite M200, TECAN Deutschland GmbH (D) Nano Drop, ND 1000 Spektralphotometer, Thermo Scientific (USA)
Pipetten:	Typ Research®, Eppendorf, Wesseling (D)
Schüttler:	Multitron, INFORS HT, Bottmingen (CH)
Speedvac:	Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling (D)
Tissue Lyser:	Tissue Lyser, Qiagen, Vertrieb: Retsch®, Haan (D)
Vortexer:	VORTEX-GENIE®2, Scientific Industries, Bohemia, (USA)
Wasserbad:	Typ 1003, GFL mbH, Burgwedel (D)
Zentrifugen:	Zentrifuge 5417, 5417 R, 5417 C und 5402, Eppendorf, Wesseling (D); Sorval RC5C Plus, Thermo Scientific (Waltham, USA)

### 2.1.7 Bakterienstämme

Für Klonierungsarbeiten sowie zur Amplifikation von Plasmiden wurden die *Escherichia coli*- (*E. coli*) Stämme DH5 $\alpha$  und dB3.1 genutzt. Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) Stämme GV3101 pMP90. In Tabelle 2.3 sind die eingesetzten Bakterienstämme einschließlich Genotyp und Anwendung tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2.3: Aufführung der eingesetzte Bakterienstämme sowie deren Genotyp und Anwendung.

Stamm	Genotyp	Anwendung
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80, lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Amplifikation und Klonierung von Plasmiden, die kein <i>ccdB</i> Operon tragen
<i>E. coli</i> dB3.1	<i>F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1</i>	Amplifikation und Klonierung von Plasmiden, die ein <i>ccdB</i> Operon tragen
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 (pMP90)	<i>pTiC58 Rif<sup>r</sup> Gm<sup>r</sup></i>	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit pGWB2

### 2.1.8 Vektoren

Für Klonierungsarbeiten wurden die in Tabelle 2.4 angegebenen Vektoren genutzt.

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren im Rahmen dieser Arbeit.

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pRS300	Schwab <i>et al.</i> , 2006	Matrize für das miR319a-Rückrat
pENTR/D-TOPO	Invitrogen	Herstellung von pEntry-Vektoren für Klonierungsarbeiten
pGWB2	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007	Gateway-Klonierung; Herstellung konstitutiver <i>xpt</i> -Mutantenlinien; Pflanzentransformation

### 2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden mit Hilfe des Programms VectorNTI gestaltet und nach Überprüfung auf der Webseite <http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> über die Firma Sigma-Aldrich (Hamburg) bezogen. In Tabelle 2.5 sind alle verwendeten Primer in 5' → 3' Orientierung gelistet.

**Tabelle 2.5: Namentliche Auflistung der genutzten Oligonukleotide sowie ihrer Sequenz. Die Abkürzungen forw. (forward) bzw. rev. (reverse) geben Auskunft über die Leserichtung der Nukleotidsequenzen von 5' nach 3' bzw. 3' nach 5'-Ende. Die Abkürzung „g“ vor der Genbezeichnung bedeutet, dass der Primer an die unveränderte genomische DNA bindet und nicht an eine vorhandene Insertion. Kursiv geschriebene Primer binden an die Insertion der jeweiligen Mutante und wurden auch nach der jeweiligen Mutante benannt. PM steht für Punktmutation.**

Oligoname	Sequenz (5'-3')
gGPT2-1 forw.	GTC GGA CCA AAC TTT GTC TGG T
gGPT2-1 rev.	GGT CTG ATC AAG AAA TGA CAC TGA
<i>gpt2-1</i> forw.	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC
gTPT-1 forw.	GTA ACT TAC GAG TAA ACT GGC TAC
gTPT-1 rev.	AGC AGC CGC ATT GAA GAA TGG CTC AA
<i>tpt-1</i> forw.	GAT GCA CTC GAA ATC AGC CAA TTT TAG AC
gTPT-2 forw.	GTA ACT TAC GAG TAA ACT GGC TAC
gTPT-2 rev.	TGA CTA GCC ATG GAT ACT TGG CGA GGA
<i>tpt-2</i> forw.	GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C
gTPT-2 forw. B	GAC CAT TAA CCC TAC CAT AAC TCC
gXPT-1 forw.	GGC TTT CAC CGA TTC CCA A
gXPT-1 rev.	ATC AAG TAG ACG AGG TCA AGA ACT AAG TA
<i>xpt-1</i> forw.	CAT TTT ATA ATA ACG CTG CGG ACA TCT AC
PPT2 forw	GCC AAG TCT ACT CCT GAA
PPT2 rev.	CTA AAG AGA CTC GAG CGA
SAIL_378_C01 LP <i>xpt-2</i>	AAA AGA CAA ATG ATG GCA TCG
SAIL_378_C01 RP <i>xpt-2</i>	TAA CGG ATA CGA ATC ACC GAG
SAIL_810_D09 LP <i>xpt-3</i>	CTT TTT CTC ATC TCC TGC GTG
SAIL_810_D09 RP <i>xpt-3</i>	TCT GGA TTT GAA TCC GAT GAG
LB3 (pCSA110)	TAG CAT CTG AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C
<i>qrt1-2</i> 1.PM forw (P8)	GAT GAT GGT AAT GTT TAT GTT TGA GG
<i>qrt1-2</i> rev (P9)	CAA ACA CGG TTT ATG TCT TAA ATC
<i>qrt1-2</i> 2.PM forw (P10)	TTT CCT TGT GCA GGA GAC ATC ATT CCC CAT GAA AGT CGA AGA ATT
Aktin I forw.	TGC GAC AAT GGA ACT GGA ATG
Aktin I rev.	GGA TAG CAT GTG GAA GTG CAT AC
pRS300B, rev. (OligoB)	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G
XPT, miR-s I	GAT AAT GGC TTT ATG GTA ACC TCT CTC TCT TTT GTA TTC C
XPT, miR-a II	GAG AGG TTA CCA TAA AGC CAT TAT CAA AGA GAA TCA ATG A
XPT, miR*s III	GAG AAG TTA CCA TAA TGC CAT TTT CAC AGG TCG TGA TAT G
XPT, miR*a IV	GAA AAT GGC ATT ATG GTA ACT TCT CTA CAT ATA TAT TCC T
pRS300A TOPO forw.	CAC CCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA AC
pRS300B rev. (OligoB)	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G
35S forw.	GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AG
M13 forw.	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 rev.	CAG GAA ACA GCT ATG AC
cXPT TOPO forw.	CAC CAT GAT CTC CCT GAA TCT ATC TCC T
cXPT inkl. STOP rev.	TTA GTT CTT CTT ATC ACC TCC CAC TTC AAT C

## 2.1.10 Pflanzen

Als Versuchspflanze wurde der Modellorganismus *A. thaliana* verwendet. Zur Kontrolle dienten die *A. thaliana* L. Heyn cv. Columbia-0 (Col-0), Columbia-3 (Col-3) und Wassilewskija-2 (Ws-2) Wildtypen (WT).

**Tabelle 2.6:** Auflistung der untersuchten *A. thaliana* - Linien inklusive der AGI, dem ökologischen Hintergrund, der Mutageneseart und durch wen diese bereits beschrieben wurde. Die Doppel- und Dreifachmutanten wurden im botanischen Institut zu Köln durch Kreuzung oder Transformation mit artificial micro RNA Konstrukten gegen den *XPT* aus den jeweiligen Mutanten hergestellt.

Linie	AGI Kode	Ökotyp	Mutagenese	Publiziert
<i>xpt-1</i>	At5g17630	Ws-2	T-DNA-Insertion	Eicks <i>et al.</i> , 2002
<i>tpt-1</i>	At5g46110	Ws-2	T-DNA-Insertion	Schneider <i>et al.</i> , 2002
<i>tpt-2</i>	At5g46110	Col-0	T-DNA-Insertion	Niittylä <i>et al.</i> , 2004
<i>adg1-1</i>	At5g48300	Col-0	EMS	Lin <i>et al.</i> , 1988
<i>pgm1</i>	At5g51820	Col-0	AC/DS	Kofler <i>et al.</i> , 2000
<i>gpt2-1</i>	At1g61800	Col-0	T-DNA-Insertion	Niewiadomski <i>et al.</i> , 2005
<i>cue1-6</i>	At5g33320	Col-0	EMS	Streatfield <i>et al.</i> , 1999
<i>ppt2-1</i>	At3g01550	Col-0	EMS	Staehr, 2010
<i>qrt1-2</i>	At5g55590	Col-3	EMS	Francis <i>et al.</i> , 2006
<i>dov1</i>	At4g34740	En-2	EMS	Rosar <i>et al.</i> , 2012
<i>tpt-1/xpt-1</i>		Ws-2	Kreuzung	
<i>tpt-2/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>adg1-1/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>xpt-1/pgm1</i>		Ws-2/Col-0	Kreuzung	
<i>xpt-1/gpt2-1</i>		Ws-2/Col-0	Kreuzung	
<i>qrt1-2/xpt-2</i>		Col-3	T-DNA-Insertion	
<i>adg1-1/tpt-2</i>		Col-0	Kreuzung	
<i>adg1-1/gpt2-1/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>gpt2-1/tpt-2/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>adg1-1/tpt-2/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1</i>			Kreuzung	
<i>cue1-6/ppt2-1</i>		Col-0	Kreuzung	
<i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
<i>cue1-6/xpt-1</i>		Col-0/Ws-2	Kreuzung	
amiRNA: <i>XPT</i> Col-0		Col-0	Transformation	
amiRNA: <i>XPT</i> Ws-2		Ws-2	Transformation	
amiRNA: <i>XPT tpt-2</i>		Col-0	Transformation	
amiRNA: <i>XPT adg1-1/tpt-2</i>		Col-0	Transformation	
amiRNA: <i>XPT cue1-6/ppt2-1</i>		Col-0	Transformation	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

#### 2.2.1.1 Sterile Pflanzenanzucht

Zur Pflanzenselektion, der Analyse des Blattrosetten- bzw. Wurzelwachstums oder der gezielten Fütterung von Metaboliten wurden *A. thaliana* Pflanzen auf halbkonzentrierten MS- (Murashige & Skoog) Medium ( $\frac{1}{2}$  MS-Medium: 0,23% [w/v] MS-Medium – ohne oder mit modifizierten Vitaminen [Fa. Duchefa, Kat-Nr. M0222 oder M0245], 0,7% – 0,8% [w/v] Pflanzenagar bei Anzucht auf Festmedium, pH 5,6-5,8 mit KOH) in sterilen Petrischalen, Weckgläsern oder Magentaboxen angezogen. Im Falle einer Pflanzenselektion wurde dem MS-Medium nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C entweder ein entsprechendes sterilfiltriertes Antibiotikum oder Glufosinat-Ammonium (10 mg/ml) beigefügt. Nach Auslegen der sterilisierten Samen wurden die Gefäße mit luftdurchlässigem Vliesklebeband (Omnipor, Fa. Hartman) verschlossen und zur Brechung der Dormanz und Synchronisierung der Keimung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Nach 2 Tagen wurden sie in die Phytokammer oder den Phytoschrank transferiert.

Da der Photosynthesephänotyp von *tpt/xpt* bei Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten mit der Zeit nahezu vollständig verschwand wurde ein weiteres Medium (Minimal-Medium [MM]: 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,02 mM  $\text{FeNaEDTA}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , pH 5,6 mit Methylglucamin, 0,7% Pflanzenagar) getestet.

#### 2.2.1.2 Oberflächensterilisierung von *Arabidopsis thaliana* Samen

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Mikroorganismen auf MS-Platten wurden die Samen sterilisiert und unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten ausgebracht. Für die Samensterilisation wurde eine stecknadelkopfgroße Menge Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten in 1 ml 70 %igen Ethanol auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Abnehmen des 70 %igen Ethanols wurde 1 ml 100 %iges Ethanol zu den Samen gegeben und für 1 Minute unter invertieren inkubiert. Im Anschluss wurde das Ethanol mit der Pipette abgenommen und die Samen im offenen Reaktionsgefäß zum Abdampfen unter der Sterilbank belassen.

### 2.2.1.3 Anzucht von *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifachmutanten und *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten

Die Anzucht putativer *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifach- bzw. *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten erfolgte unter sterilen Bedingungen auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten mit 50 mM Saccharose. Um zu überprüfen, ob die Mutanten in der Lage sind sich bei Saccharosefütterung zu reproduzieren wurden sie in  $\frac{1}{2}$  MS mit 50 mM Saccharose haltige Weckgläser transferiert. Zur Vermeidung von Kondenswasser wurden die bestückten Weckgläser offen in Plastikboxen (Microbox Model type: TP4000+TPD4000, Combiness Europe, Nevele, Belgium) mit integriertem Luftfilter (XXL+: *green filter*) im Deckel gestellt und mit luftdurchlässigem Vliesklebeband (Omnipor, Fa. Hartman) verschlossen (Abb. 1). Die Pflanzen wurden in der Phytokammer unter Langtag-Bedingungen bei einer PFD von  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen und regelmäßig umgesetzt..



Abbildung 2.1: Anzucht putativer Dreifach- und Vierfachmutanten in der Microbox

### 2.2.1.4 Sterile Anzucht von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutanten

Die sterile Anzucht von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutanten sowie der zugehörigen WTs, Einzel- und Doppelmутanten erfolgte auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit einem Zusatz von 1% Saccharose. Nach Inkubation bei 4 °C für 48 h wurden die Platten in den Phytoschrank transferiert. Die PFD betrug  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die Pflanzen wurden alle 7-10 Tage auf frische Platten umgesetzt.

### 2.2.1.5 Unsterile Pflanzenanzucht auf Erde

*Arabidopsis*-Saatgut wurde auf einem feuchten Substratgemisch aus  $\frac{2}{3}$  Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und  $\frac{1}{3}$  Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) in Töpfen (Pöppelmann, Lohne (D)) oder kleinen Aussaatschalen ausgebracht. Nach

Stratifizierung für 2-3 Tage bei 4 °C wurden die Töpfe in die Phytokammer oder in das Gewächshaus gestellt. Nach 6-10 Tagen wurden die Keimlinge in runde Töpfe (Ø 6 cm oder Ø 9 cm), kleine Aussaatschalen oder 77iger Multiplatten pikiert. Der Wasserbedarf wurde durch regelmäßiges Anstauen der Pflanzen mit Leitungswasser gedeckt. Als Lichtquelle dienten kalt-weiß Neonröhren (Lumilux, 18W/840, Osram, München).

### 2.2.1.6 Anzuchtsbedingungen

Anzuchtsbedingungen im Gewächshaus: Langtag: 16/8 Stunden 16 h Licht (21 °C)/8 h Dunkel (18 °C), relative Luftfeuchtigkeit: ~ 40 %, Photonenflussdichte: 70-100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Angezogen wurden hier frisch-transformierte Pflanzen und neu gekreuzte Linien.

Anzuchtbedingungen in der Langtag-Phytokammer: Langtag: 16/8 Stunden 16 h Licht (21 °C)/8 h Dunkel (18 °C), relative Luftfeuchtigkeit: ~ 60 %, Photonenflussdichte: Niedriglicht (LL) = 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Normallicht (NL) = 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Hochlicht (HL) = 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . In der Langtag-Phytokammer wurden Pflanzen für biochemische Untersuchungen, Wachstumsanalysen und photosynthetische Messungen angezogen.

Anzuchtbedingungen in der Kurztag-Phytokammer: Kurztag: 8/16 Stunden 8 h Licht (21 °C)/16 h Dunkel (18 °C), relative Luftfeuchtigkeit: ~ 60 %, Photonenflussdichte: Normallicht (NL) = 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . In der Kurztag-Phytokammer wurden Pflanzen für biochemische Untersuchungen, Wachstumsanalysen und photosynthetischen Messungen angezogen

Anzucht im Phytoschrank (Percival Scientific, Perry Iowa): Die Anzucht von auf ½ MS-Platten ausgebrachten Pflanzen erfolgte in der Regel im Phytoschrank unter Langtag- oder Kurztagbedingungen (s.o.) bei einer Temperatur von 22 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit. Für die Analyse der Wurzel wurden die Platten vertikal aufgestellt, sonst horizontal ausgelegt.

Schädlingsbekämpfung: Bei Anzucht im Gewächshaus wurden wöchentlich Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbuch) gegen einen Befall mit Trauermückenlarven ausgebracht. Um Trauermücken in der Phytokammer entgegenzuwirken wurden Gelbtafeln aufgehängt oder Stechmückenfrei (W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal) eingesetzt. Bei Blattlausbefall wurden Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbuch) eingesetzt oder die Pflanzen wurden mit einer 25 %igen Confidor-Emulsion (Bayer CropScience, Langenfeld) behandelt.

### 2.2.1.7 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Für die Kreuzung von *A. thaliana* Pflanzen wurden zunächst offene Blüten und bereits vorhandene Schoten entfernt. Mit Hilfe eines Binokulars wurden von der Akzeptorpflanze (Mutterpflanze) 1-3 Blütenknospen vorsichtig geöffnet und alle Blütenorgane bis auf die Fruchtblätter (Carpellen) beseitigt. Weitere geschlossene Blütenknospen wurden anschließend entfernt. Von der Donorpflanze (Vaterpflanze) wurden die Staubblätter freigelegt und die Pollen auf die Narbe der Akzeptorpflanze übertragen. Die so bestäubten Blüten wurden, um austrocknen und Fremdbestäubung vorzubeugen, vorsichtig für 2 Tage in Klarsichtfolie eingepackt und markiert. Die resultierenden Schoten wurden dann separat geerntet.

### 2.2.1.8 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen mit *A. tumefaciens* wurde die Blüten-Tauch-Methode („floral dip“ Clough und Bent, 1998; Desfeux *et al.*, 2000; Bent, 2000) angewendet. Dazu wurde ein positiv getesteter Agrobakterienklon in einem 100 ml Schikanenkolben in 10 ml YEB-Medium inklusive den entsprechenden Antibiotika angezogen und bei 28 °C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die 10 ml Vorkultur in 400 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika überführt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die 400 ml auf zwei GS3-Becher aufgeteilt und für 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 ml Infiltrationsmedium (0,23 % (w/v) MS [mit modifizierten Vitaminen, Fa. Duchefa, Kat-Nr. M0245], 5 % (w/v) Saccharose, 0.05 % (v/v), pH 5,8 mit KOH) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Silwet L-77 wurden die Blüten der zu transformierenden *Arabidopsis* Pflanzen jeweils für 20 Sekunden in die Agrobaktériensuspension getaucht. Die transformierten Pflanzen wurden in einen mit feuchtem Papier ausgekleideten Tray gelegt und mit einer Pikierhaube zur Feuchthaltung abgedeckt. Nach 2 Tagen wurden die Pflanzen in das Gewächshaus transferiert.

### 2.2.1.9 Pflanzen-Selektion

Samen transformierter Pflanzen die durch das *bar*-Gen resistent gegen das Herbizid Phosphinotricin (BASTA) sind, wurden in der Regel auf Erde ausgebracht und 4 Tage nach Keimung mit einer BASTA-Lösung (0.025 % [w/v] BASTA, 0,1 % [v/v] Tween-20) besprüht. Diese Behandlung wurde noch zweimal im Abstand von 2-3 Tagen wiederholt.

Zur Selektion von transgenen *A. thaliana* Pflanzen in Sterilkultur wurden sterilisierte Samen auf ½ MS-Agarplatten ausgebracht, denen je nach Selektionsmarker das entsprechende Antibiotika oder Phosphinotricin (10 mg/ml) zugefügt worden war.

### 2.2.1.10 Durchmusterung von Pflanzen

Pflanzen mit einem Defekt im Stärkemetabolismus, wie der *adg1-1* Mutante, wurden über einen Stärketest auf Homozygotie getestet. T-DNA-Insertionsmutanten wurden mittels DNA-Extraktion und anschließender PCR mit entsprechenden Primern für die Insertion beziehungsweise das Allel auf Homozygotie überprüft. Bei den EMS-Mutanten *ppt2-1* und *qrt1-2* verschwindet bzw. entsteht durch Punktmutation eine Enzymschnittstelle. Bei diesen Mutanten wurde das PCR-Produkt zur Genotypisierung mit dem entsprechenden Enzym (BsrI bzw. AatII) über Nacht bei 37 °C inkubiert und nach Gelelektrophorese analysiert.

**Stärke-Test:** Am Nachmittag wurde eine Blattprobe in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 500-1000 µl 80 %igem Ethanol gegeben und für 15 Minuten bei 75 °C im Schüttel-Heizblock zum entfärben inkubiert. Der Ethanol wurde abgenommen und 500-1000 µl 1 %ige Lugolsche-Lösung zu der Blattprobe geben. Nach 5-10 Minuten wurde die Lugolsche Lösung durch Wasser ersetzt. Beim Vorhandensein von Stärke in den Blättern verfärbt sich das Blatt durch diese dunkelgrau-blau.



Abbildung 2.2: Stärketest. Stärkefärbung bei einem Col-0 Wildtyp-Blatt und einem Blatt einer stärkefreien Mutante (*adg1-1*). Das Blatt des Wildtyps erscheint durch die Anfärbung der Stärke grau-schwarz, das Blatt der stärkefreien Mutante färbte sich nicht an.

### 2.2.1.11 Wachstumsanalyse

Bei Wachstumsanalysen auf Erde wurden die Pflanzen in der Phytokammer unter Langtag-Bedingungen bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen. Dazu wurden die Keimlinge im Alter von 6-7 Tagen in 6er Töpfe vereinzelt. 9, 13, 17 und 21 Tage nach der Keimung wurde die Blattrosettenfläche bestimmt. Nach 7 oder 8 Wochen wurden die Blütenstielhöhe, das Pflanzengewicht sowie die Schotenanzahl ermittelt. Im Anschluss wurden die Pflanzen mit Pergamentpapiertüten umhüllt, die Schoten zum Abreifen gebracht und im Folgenden das Samengewicht pro Pflanze bestimmt.

Die Analyse des Blattrosettenwachstums bei gezielter Fütterung von Metaboliten sowie des Wurzelwachstums erfolgte unter sterilen Bedingungen auf ½ MS Platten. Für die Wurzelanalyse wurden Platten vertikal in den Phytoschrank gestellt. Die Wurzellänge wurde ermittelt und nach etwa einer Woche erneut ermittelt. Aus der Differenz der beiden Messungen wurde dann das durchschnittliche Wurzelwachstum pro Tag berechnet.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen wurde eine einzelne Zell-Kolonie von einer LB-Platte gepickt, in 5 ml LB-Medium (10 % Trypton, 10 % NaCl, 5 % Hefe-Extrakt, 1,2 % Bacto-Agar bei Anzucht auf Platten) angeimpft und im 37 °C Schüttler bei 220 rpm über Nacht inkubiert. Zur Selektion transgener *E. coli* DH5α-Zellen wurden dem LB-Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Die Ausplattierung flüssiger Bakterienkulturen erfolgte durch Ausstreichen auf LB-Agarplatten. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurden die Platten mit ParafilmM verschlossen und bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung wurden Glycerin-Stammkulturen angefertigt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte nach der Calcium- und Rubidiumchlorid-Methode (Chung and Miller, 1989). Dazu wurde eine Kolonie von LB-Platte gepickt und in 10 ml Ψb-Medium (2 % [w/v] Bacto Trypton, 0,5 % [w/v] Bacto Hefeextrakt, 0,4 % [w/v] MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,075 % [w/v], KCL [10 mM], pH 7,6 mit 1 M KOH) über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (220 rpm) angezogen. Am nächsten Tag wurden 4 ml der Übernachtskultur in 400 ml Ψb-Medium überführt und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 37 °C im Schüttler belassen. Die Kultur wurde in eiskalte 50 ml Falcons aufgeteilt und dann für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 g, 4 °C, 5 min) wurde das Pellet im Kühlraum in 1 ml TFB1 (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15 % (v/v) Glycerol, pH 5,8 mit 0,2 M HOAc) gelöst und im Anschluss auf 15 ml mit TFB1 aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 2 h auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wurde in 2 ml TFB2 (10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mM MOPS, 15 % [v/v] Glycerol, pH 7 mit NaOH) gelöst, 100 µl Aliquots in eiskalte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.2.3 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Ein 100 µl Aliquot chemisch-kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und dieser nach Zugabe des Vektors bzw. Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte ein Hitzeschock im Heizblock bei 42 °C für 90 Sekunden und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zum Reaktionsansatz wurden die Bakterien für 60 Minuten bei 37 °C bei 220 rpm geschüttelt. Und im Anschluss auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.2.2.4 Anzucht *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurde eine einzelne Zell-Kolonie von einer YEB-Platte gepickt, in 5 ml YEB-Medium (0,5 % (w/v) Bacto-Peptide, 0,5 % (w/v) Fleisch-Extrakt, 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,2 % Bacto-Agar für Platten) angezogen und im 28 °C Schüttler bei 220 rpm über Nacht inkubiert. Zur Selektion transgener *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurden dem YEB-Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Die Ausplattierung flüssiger Bakterienkulturen erfolgte durch Ausstreichen auf YEB-Agarplatten. Nach der Inkubation dieser Platten über Nacht bei 28 °C im Brutschrank wurden die Platten mit ParafilmM verschlossen und bei 4 °C gelagert. Für eine längere Lagerung wurden Glycerin Stammkulturen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

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

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurde eine Kolonie von einer YEB-Platte gepickt und in 4 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 28 °C im Schüttelinkubator (220 rpm) angezogen. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskultur in 400 ml YEB inklusive Antibiotika überführt und bis zur OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer 5 minütigen Ruhephase auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (7800 g, 4 °C, 10 min) und das Zellpellet in 25 ml einer eiskalten 0,15 M NaCl-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation (7800 g, 4 °C, 5 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskalter 0,2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach Aliquotierung der Suspension zu 100 µl in eiskalte 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

Zur Transformation wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut und die zu transformierende Plasmid-DNA (1-3 µg) zugegeben. Das Gemisch wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Zellen für 2 h bei 28 °C im Schüttler inkubiert und im Anschluss auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 28 °C für 2 Tage bebrütet.

### **2.2.2.7 Herstellung von Glycerin-Stammkulturen**

Zur Herstellung von Glycerin-Kulturen wurden 500 µl 100 %igen Glycerins in cryogene 2 ml Falcons (Firma Corning Incorporated, New York, USA) vorgelegt und 500 µl einer Über-Nacht-Bakterienkultur hinzugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurde das Glycerin-Bakteriengemisch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly 1979. Dafür wurde zur Amplifikation von Plasmid-DNA ein positiv getesteter Klon in 5 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion über Nacht im Schüttler (220 rpm) bei 37 °C angezogen. Am nächsten Tag wurden 2-4 ml dieser Bakterienkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 90 Sekunden bei 6800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen und das Pellet in 250 µl Lösung 1 (1 M Tris /HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8, 10 mg/ml RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung 2 (10 % [w/v] SDS, 1 M NaOH) und mehrmaligem Invertieren wurde das Reaktionsgemisch für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 3 (3 M NaAc pH 5) und wiederum mehrmaligem Invertieren folgte eine Zentrifugation bei 18.000 g für 15 Minuten. Im Anschluss wurden 600 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl Isopropanol aufgefüllt und das Reaktionsgefäß danach mehrmals invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 18.000 g für 15 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 18.000 g für 5 Minuten. Nach abnehmen des Überstandes wurde das Pellet zunächst unter einem Abzug getrocknet und dann in

40 µl DNase und RNase freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Nach 30 Minütiger Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA (Edwards *et al.*, 1991) aus *Arabidopsis thaliana* wurden 1-2 Blättchen in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Hilfe einer Eisenkugel in 400 µl Extraktionsmedium (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0,5 % [w/v] SDS) homogenisiert. Nach abzentrifugieren (18.000 g, 1 min) des Blattmaterials wurden 250 µl des Überstandes zur Fällung der DNA mit 250 µl Isopropanol versetzt und nach mehrmaligen invertieren erneut zentrifugiert (18.000 g, 5 min). Das Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, nach erneuter Zentrifugation getrocknet und in 15-50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.3.3 Isolierung von RNA**

Für die Isolierung von RNA wurde ein Gemisch aus 500 µl saurem Phenol und 500 µl Extraktionspuffer (100 mM NaAc pH 4,80, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA pH 8, 1 % [w/v] SDS) auf 80 °C vorgeheizt und zu gefrorenem homogenisiertem Pflanzenmaterial gegeben. Nach Inkubation bei 80 °C für 10 min wurde der Extrakt gemixt, 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und erneut gemixt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1850 g, 4 °C für 15 min. Im Anschluss wurden 500 µl der wässrigen Phase zur Fällung der RNA mit 500 µl 4 M LiCl<sub>2</sub> versetzt und nach mehrmaligen invertieren für 1 h bei -80 °C inkubiert. Nach auftauen und Zentrifugation (9400 g, 4 °C, 15 min) wurde das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation 9400 g, 4 °C, 15 min) und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 25 µl H<sub>2</sub>O (Ultra Pure, RNase free) gelöst, die Konzentration bestimmt (Nano Drop: ND 1000-Spektralphotometer) und über Agarosegelelektrophorese der Degradierungszustand der RNA überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.3.4 DNase Verdau**

Der DNase-Verdau wurde mit dem Ambion DNA-free Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.3.5 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA („complementary“ DNA) aus RNA wurde mit dem SuperScript II Reverse Transkriptase Bioscript Kit durchgeführt. Dabei wurden 5 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT - Primer zusammen pipettiert und die Proben bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden dem Ansatz 5 µl 5 x RT-Puffer (Bioline), 1 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl Bioskript (Bioline) sowie 3,5 µl RNase freies Wasser zugefügt. Zur Synthese der cDNA wurden die Proben anschließend für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Durch Erhitzen der Proben auf 70 °C für 10 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt. Die cDNA wurde entweder direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* [PCR]; Mullis *et al.*, 1986) dient der Amplifikation von bestimmten Genfragmenten. Sie wurde für Klonierungsarbeiten, bzw. der Überprüfung von Klonierungsarbeiten, zur Durchmusterung von Mutanten und zur Analyse von Transkriptmengen eingesetzt (10 % [v/v] Dream Taq-Buffer [10-fach konzentriert], 0,1 mM dNTPs [10 mM], 0,5 µM Primer forward [10 pM/µl], 0,5 µM Primer reverse [10 pM/µl], 0,25 U Dream Taq-Polymerase, 5 % [v/v] genomische DNA). Zunächst wurde die als Matrize dienende DNA für 3 Minuten bei 94 °C denaturiert. Danach folgten drei bis vier für 26-34 Zyklen wiederholende Schritte. Bei jedem dieser Zyklen wurde die DNA zunächst bei 94 °C für 30 Sekunden zu Einzelsträngen denaturiert, dann für 30 Sekunden zur Primerhybridisierung auf eine primerspezifische Annealingtemperatur abgekühlt und im Anschluss auf eine Temperatur von 72 °C (Aktivitätsoptimum der verwendeten Taq-Polymerasen) gebracht zur Elongation des Genfragments durch die Taq-Polymerase. Die Elongationszeit richtet sich nach der Gesamtlänge des zu amplifizierenden Fragments und den Eigenschaften der verwendeten Taq-Polymerase. Nach dem Durchlaufen aller Zyklen erfolgte eine fünf minütige Phase bei Elongationstemperatur, zur Vervollständigung von unvollendeten Fragmentstücken durch die Taq-Polymerase. Nach Abkühlen auf 4 °C wurde das Produkt entweder bei 4 °C gelagert oder direkt zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.3.7 Semiquantitative RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zur semiquantitativen Bestimmung der Expression des *XPTs* in mit amiRNA:*XPT*-Konstrukten transformierten Pflanzen und putativen *knockout* Mutanten genutzt. Zur Einschätzung des Reinheitsgrades der synthetisierten cDNA wurde auf diese zunächst eine Kontroll-PCR auf

das Haushaltsgen *Aktin2* mit entsprechenden Primern durchgeführt. Anhand der Amplifikatgröße konnte unterschieden werden, ob reine cDNA vorlag (Fragmentgröße: 476 Bp) oder diese mit genomischer DNA (Fragmentgröße: 714 Bp) kontaminiert war. Über die Intensität der erhaltenen Banden durch die Kontroll-PCR konnten die cDNA-Proben normalisiert werden und dementsprechend für die RT-PCR eingesetzt werden. Zur Untersuchung der Expressionsstärke des *XPT* in den cDNA-Proben, wurde die RT-PCR mit spezifischen Primern für den *XPT* über 26-30 Zyklen durchgeführt. Nach Gelelektrophorese der erhaltenen PCR-Produkte konnte über die Intensität der erhaltenen Banden auf die Expressionsstärke des *XPT* in den Pflanzen geschlossen werden.

### **2.2.3.8 Überprüfung positiver Bakterien-Klone mithilfe der Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR diente zur Überprüfung vermeintlich positiv transformierter Bakterien-Klone. Dazu wurden auf den Selektionsplatten gewachsene Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt, auf einer weiteren Selektionsplatte erneut ausgestrichen und die Pipettenspitze zur Überführung einiger Klone einer Kolonie in ein PCR-Tube mit vorgelegten 7 µl Wasser gestellt. Nach kurzer Inkubation wurde die Pipettenspitze aus den PCR-Tubes entfernt und 1 µl der Bakteriensuspension als PCR-Template eingesetzt.

### **2.2.3.9 Primergestaltung**

Primer wurden mit Hilfe des Programms Vektor NTI gestaltet. Dazu wurde zunächst die Sequenz des zu amplifizierenden Genfragmentes von der Internetseite <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/> (Schwacke *et al.*, 2003) in Vektor NTI kopiert und die Primer unter Berücksichtigung der G/C-Verhältnisse und der damit verbundenen Schmelztemperatur virtuell erstellt. Für TOPO-Klonierungsarbeiten wurde dem Primer die notwendige CACC-Sequenz vorangestellt. Nach Überprüfung, ob die Primer an weiteren Stellen im *Arabidopsis*-Genom binden oder Sekundärstrukturen mit sich selbst eingehen (Haarnadelstruktur, Dimerisierung), wurde die Synthese der Primer bei Metabion (Planegg-Martinsried, D) in Auftrag gegeben.

### **2.2.3.10 Restriktionsverdau**

Zur Durchmusterung von Mutanten und zur Überprüfung von Klonierungsarbeiten wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Der Verdau erfolgte im vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffer, wobei 0,3-1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt wurde. Im Falle der Durchmusterung von Mutanten wurde der Restriktionsverdau im Anschluss an die

Vervielfältigung des mutierten Gens über PCR auf das entstandene PCR-Produkt durchgeführt. Zur Überprüfung von Klonierungsarbeiten wurde der Restriktionsverdau auf die isolierte Plasmid-DNA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 3-4 h oder über Nacht bei 37 °C. Nach auftragen auf ein Agarosegel und elektrophoretischer Auftrennung konnte über die entstandenen Bandengrößen Rückschlüsse auf die Zygotie bei Mutanten oder den Erfolg der Klonierung geschlossen werden.

### **2.2.3.11 Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Im Anschluss wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers die DNA aus dem Agarosegel isoliert.

### **2.2.3.12 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe erfolgte über die horizontale Agarosegelelektrophorese (Maniatis 1982). Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/AcOH pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) aufgekocht und nach Zugabe von Etidiumbromid in eine Schale gegossen in die dann ein Gelkamm gesteckt wurde. Die durch Vernetzung der Agarosepolymere entstandenen Poren variieren in ihrer Größe je nach prozentuaem Agarosezusatz. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden daher 0,6-2 %ige Agarosegele gegossen. Nach Auftragen der Proben wurden die Fragmente bei 70-120 mA in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und anschließend auf einem UV-Tisch ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) begutachtet. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein Marker (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) mitlaufen gelassen. Die Digitalisierung erfolgte mit dem Geldokumentationsprogramm der Firma Intas (Göttingen, D).

### **2.2.3.13 Herstellung artifizieller mikroRNA (amiRNA)**

In eukaryotischen Zellen spielen mikroRNAs (miRNA) eine wichtige Rolle bei der Genregulation, durch post-transkriptionelles Gen-Silencing. Die um die 20-23 Nukleotide lange, einzelsträngige, nicht codierende miRNA bindet höchst spezifisch an komplementäre mRNA-Sequenzen und behindert so die Translation transkribierter mRNA bzw. führt zu deren Degradation. Dieser natürlich vorkommende Mechanismus der Genregulation, kann durch Synthese und anschließender Transformation künstlicher miRNA-Konstrukte (artifizielle microRNA, amiRNA) genutzt werden, um die Expression von Genen in Organismen gezielt herunter zu regulieren.

Da bisherige Untersuchungen des XPT ausschließlich auf der *xpt-1* T-DNA-Insertionsmutante beruhen, und noch keine weiteren Mutantenallele vorlagen, wurde ein amiRNA:XPT-Konstrukt unter dem CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) 35S Promotor gegen den XPT erzeugt und in *tpt-2*, Ws-2 und Col-0 transformiert. Der amiRNA-Konstrukt wurde, nach dem Protokoll von Rebecca Schwab (MPI für Entwicklungsbiologie Tübingen; Schwab *et al.*, 2005 und 2010) für den XPT angefertigt. Dazu wurden zwei vektorspezifische Primer (pRS300A und pRS300B), sowie vier (I-IV) mit einer spezifischen Sequenz sowohl für den Vektor, als auch für die amiRNA-Sequenz für das entsprechende herunter zu regulierende Gen durch die Firma Metabion synthetisiert. Der vektorspezifische pRS300A-Primer wurde, für die Herstellung eines pENTRY-Vektors durch TOPO-Klonierung, mit der TOPO-Cloning-Site CACC am 5'-Ende versehen. Nach Durchlaufen der im Protokoll von Rebecca Schwab angegebenen PCRs mit den angefertigten Primern auf den pRS300 Vektor und anschließender Fusions-PCR, wurde mit dem erhaltene PCR-Produkt die TOPO-Reaktion zur Erzeugung des Entry-Vektors durchgeführt. Anschließend wurde über das Gateway-L/R-System der Destination-Vektor erzeugt und mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* transformiert.

#### **2.2.3.14 TOPO- und Gateway-Klonierung**

Der für die Gateway-Klonierung erforderliche Entry-Vektor wurde mit Hilfe des TOPO-Klonierungssystems von Invitrogen, nach Angaben des Herstellers, erzeugt. Dazu wurden zunächst Primer, zur Amplifikation des für die Klonierung interessanten Gens mit der für die TOPO-Reaktion (0,2 µl Salt-Solution, 0,2 µl pENTR/D-TOPO-Vektor, 0,2-0,4 µl PCR-Produkt [2-3 ng/kb], 0,6-0,4 µl HPLC-H<sub>2</sub>O) erforderlichen CACC-Sequenz für den forward Primer, gestaltet. Nach Ligation des Genfragmentes in den vom Hersteller mitgelieferten linearisierten D-TOPO-Vektor erfolgte die Transformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen. Nach Selektion und Isolierung der Plasmid-DNA folgte die LR-Rekombinasereaktion (1-2 µl Entry-Vektor (~30 ng), 0,2-1 µl Destination-Vektor (~30 ng), 0,5 µl LR-Puffer, auf 4 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt) in den Gatewaykompartiblen-Destination-Vektor pGWB2. Die LR-Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Siehe auch Anhang 8.4.

#### **2.2.3.15 Sequenzierung**

Sequenzanalysen erfolgten über die Kettenabbruchmethode (Dideoxyverfahren) nach Sanger *et al.*, 1977. Die Sequenzierungs-PCR (0,25 µl Big Dye, 2,25 µl, 5x Big Dye-Puffer, 0,25 µl Primer [10 mM], 2-10 ng PCR-Template, auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt) wurde mit dem Big Dye Reaction Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems,

Weiterstadt, D) durchgeführt und vom Cologne Center for Genomics ([www.ccg.uni-koeln.de](http://www.ccg.uni-koeln.de)) analysiert. Der Sequenzabgleich erfolgte mit dem Programm VektorNTI.

## 2.2.4 Biochemische Methoden

### 2.2.4.1 Proteinextraktion aus Blättern

Gefrorenes Blattmaterial wurde mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Bohrer kurz homogenisiert, 200-500 µl vorgekühlter Extraktionspuffer (50mM Hepes/KOH pH 7,5, 0,1 % Triton-X) zugegeben und erneut homogenisiert. Der Extrakt wurde bei 4 °C und 21.000 g zentrifugiert und der, die Proteine enthaltene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss nach Bradford (Bradford, 1979) mit dem 5x RotiQuant Reagenz von Roth nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz (Schaffner und Weissmann, 1973, Wieczorek *et al.*, 1990) beruht auf einer Ausfällung der Proteine in einem Methanol/Essigsäuregemisch in Anwesenheit des Farbstoffes Amidoschwarz. Im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Bradford ist die hochsensitive Proteinbestimmung mit Amidoschwarz wenig störanfällig gegen Detergenzien und Reduktionsmittel. Bei diesem Verfahren kann die Proteinextraktion direkt im Laemmli-SDS-Probenpuffer erfolgen und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt werden, da durch die Säurefällung der Proteine die meisten säurelöslichen Störsubstanzen entfernt werden.

Es wurden 5-25 µl Proteinextrakt mit 175-195 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 800 µl Amidoschwarz (10 % [v/v] 100 %ige Essigsäure, 90 % [v/v] Methanol, 1 Spatelspitze Amidoschwarz) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vereinigt und nach mehrmaligem Inventieren der Proben bei 18.000 g für 12 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Waschlösung (10 % [v/v] 100 %ige Essigsäure, 90 % [v/v] Methanol) gewaschen und es folgte eine erneute Zentrifugation bei 18.000 g für 12 Minuten. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in 1 ml 0,2 M Natriumhydroxid gelöst. Für die Nullwertbestimmung wurde die Prozedur anstelle von Proteinextrakt mit Extraktionspuffer durchgeführt. Die Extinktion der Proben wurde dann gegen den Nullwert dieser Kontrolle bei einer Wellenlänge von 615 nm gemessen. Über die zusätzlich bestimmten Extinktionswerte einer BSA-Eichreihe mit bekannten Konzentrationen wurde dann die Proteinkonzentration berechnet.

### 2.2.4.3 Bestimmung des spezifischen Frischgewichts

Als Bezugsgröße für physiologische Parameter, wie Chlorophyllgehalt, Proteingehalt, etc. wurde vor der Extraktion dieser Metaboliten aus Blättern die Blattfläche und das Blattgewicht bestimmt. Die Blätter wurden zusammen mit einem Flächenstandard digitalisiert, mit dem Programm ImageJ vermessen und die ermittelte Fläche auf das zugehörige Gewicht bezogen.

### 2.2.4.4 Quantifizierung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes

Nach Entfernen der Kotyledonen wurden komplette Blattrosetten in Reaktionsgefäße überführt und ausgewogen. Nach Zugabe von 200-2000 µl eiskalten Methanol erfolgte die Extraktion der Pigmente unter Schütteln bei 4 °C im Dunkeln. Für die photometrische Messung wurden die Proben 1:5 verdünnt und die Extinktion bei 470 nm, 653 nm und 666 nm gegen reines Methanol bestimmt. Die Quantifizierung der Pigmente erfolgte nach den im Folgenden aufgeführten Formeln von Wellburn und Lichtenthaler (1984):

$$\text{Chl } a \text{ } \mu\text{g/ml} = 15,65 \cdot E_{666} - 7,34 \cdot E_{653},$$

$$\text{Chl } b \text{ } \mu\text{g/ml} = 27,05 \cdot E_{653} - 11,21 \cdot E_{666},$$

$$\text{Chl (gesamt) } \mu\text{g/ml} = \text{Chl } a + \text{Chl } b,$$

$$\text{Car } \mu\text{g/ml} = (1000 \cdot E_{470} - 2,86 \cdot \text{Chl } a - 129,2 \cdot \text{Chl } b) / 245.$$

### 2.2.4.5 Bestimmung löslicher Kohlenhydrate in Blättern

Für die Extraktion löslicher Zucker aus Blattmaterial wurden diese mit Hilfe einer Eisenkugel im Tissue Lyser bei 23 Hz für 30 Sekunden homogenisiert. Nach Zugabe von 300 µl 80 % EtOH wurden die Proben für 1 h bei 4 °C im Orbitalschüttler bei 500 rpm inkubiert und anschließend bei 21.000 g, 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, und dem Zellpellet 200 µl 96 % EtOH zugeführt. Es folgte eine Inkubation der Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 500 rpm im Orbitalschüttler. Nach Zentrifugation (21.000 g, 4 °C, 5 Minuten) wurde der Überstand mit dem vorherigen Überstand im 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Der ethanolische Extrakt wurde in der SpeedVac über Nacht eingedunstet. Zum Lösen der eingedunsteten Zucker wurden 3 kleine Glaskugeln sowie 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in das Reaktionsgefäß gegeben, für 1 h bei 60 °C inkubiert und anschließend im Tissue Lyser bei 20 Hz für 5 Minuten geschüttelt. Zur Abtrennung von Schwebeteilchen wurden die Proben für 5 Minuten bei 21.000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurde mit 90 µl Prämix (50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM ATP, 0,8 mM NAD<sup>+</sup>, 0,2 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) sowie 100 µl Wasser in einer 96-Well-Multititerplatte (Costar, Cambridge, Mass) vereinigt und dann einem enzymatisch

gekoppelten Test unterzogen (Bergmeyer, 1970). Bei diesem Test nutzt man die Änderung der Extinktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$ .  $\text{NAD}^+$  besitzt sein Absorptionsmaximum bei 260 nm und  $\text{NADH}$  noch ein zweites bei 340 nm. Durch enzymatische,  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Reaktionen, kann so über die Änderung der Extinktion auf die Menge des Substrates geschlossen werden, sofern diese sich direkt proportional sind. Bei der Quantifizierung der löslichen Zucker wird zunächst Glc6P, durch die im Prämix enthaltene Glc6PDH in Phosphogluconat unter Bildung von  $\text{NADH}$  überführt. Durch Messung der Extinktion der Proben in einem Multititerplatten-Photometer (TEKAN) bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde in der Probe zunächst der Nullwert bestimmt. Durch die zeitlich abgegrenzte Zugabe von Hexokinase (7 U), Phosphoglucoisomerase (0,2 U) und zu Letzt der Invertase (120 U) konnte über die Extinktion in Bezug auf die vergangene Zeit die Konzentrationen an Glucose, Fructose und Saccharose wie folgt berechnet werden:  $\Delta c = (\Delta E \cdot \pi \cdot r^2) / (\epsilon_{340\text{nm}}(\text{NADH}) \cdot V_E)$ . Dabei ist die Konzentrationsänderung  $\Delta c$ ,  $\Delta E$  die Extinktionsänderung,  $\epsilon_{340\text{nm}}(\text{NADH})$  der Extinktionskoeffizient von  $\text{NADH}$  bei einer Wellenlänge von 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}}(\text{NADH}) = 6,22 \text{ cm}^{-2} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ) und  $V_E$  das eingesetzte Probenvolumen.

#### 2.2.4.6 Bestimmung des Stärkegehalts in Blättern

Das nach der Extraktion löslicher Kohlenhydrate zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 1 ml 80 %igem Ethanol gewaschen und anschließend 400  $\mu\text{l}$  0,2 M KOH und 5 Glaskugeln zu dem Zellpellet gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 90 °C im Wasserbad; zwischendurch wurden die Proben geschüttelt. Nach Abkühlen der Proben wurde der pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf pH 5-6 eingestellt. Für die enzymatische Hydrolyse der Stärke wurden jeder Probe 7 U  $\alpha$ -Amylase und 6 U Amyloglucosidase zugefügt und die Proben bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Quantifizierung der Stärke wurden nach Zentrifugation (5 Minuten, 21.000g) 10  $\mu\text{l}$  Probenvolumen eingesetzt in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  (90  $\mu\text{l}$  Prämix, 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Quantifizierung der Stärke erfolgte wie die der löslichen Zucker durch einen enzymatischen Test (Bergmeyer, 1970). Da Stärke jedoch ausschließlich aus Glukoseeinheiten aufgebaut ist wurde hier, neben der im Prämix enthaltenden Glc6PDH, nur die Hexokinase eingesetzt.

#### 2.2.4.7 Bestimmung der Aminosäuregehalte in Blättern

Mit Hilfe einer Eisenkugel wurden die Proben im Tissue Lyser bei 23 Hz für 30 Sekunden homogenisiert. Es folgte die Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  80 %igem EtOH und eine Inkubation auf dem Orbitalschüttler für 1 h bei 4 °C und 500 rpm. Nach Zentrifugation (21.000 g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet

in 200 µl 96 %igem EtOH für 20 Minuten bei 4 °C und 500 rpm erneut auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (21.000 g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand mit dem vorherigem Überstand im 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Für die Aminosäuremessung wurden 100 µl Extrakt mit 900 µl H<sub>2</sub>O in einem HPLC-Vial vermischt und davon 10 µl in die RP-HPLC (*reversed phase high performance liquid chromatography*) via Autosampler (Dionex Ultimate 3000) auf eine temperierte Trennsäule (30 °C, Gynkotek Säulentermostat STH 585, Säulenmaterial: Octadecylsilicat, Knauer Hypersil ODS C<sub>18</sub>, 200 x 4,6 mm ID, 3 µm Korngröße mit 10 mm Vorsäulenkartusche) injiziert. Zur Detektion und Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte eine Vorsäulenderivatisierung (50 mg OPA, 1 ml 100 % EtOH, 9 ml Boratpuffer (0,8 M, pH 10,4), 100 µl β-Mercaptopropionsäure) mit dem Fluoreszenzfarbstoff ortho-Phthaldialdehyd (OPA) automatisch durch die RP-HPLC. In Anwesenheit von β-Mercaptoverbindungen reagiert OPA unter alkalischen Bedingungen mit primären Aminen zu fluoreszierenden Isoindolderivaten. Durch Fluoreszenzdetektion (Lindroth und Mopper, 1979) können so die meisten proteinogenen Aminosäuren qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die chromatographische Trennung der Proben erfolgte durch steigende Hydrophobizität eines nicht-linearen Lösungsmittelgradienten aus zwei Laufmitteln (Laufmittel A: 22 ml Stammlösung, 2 ml Tetrahydrofuran auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auffüllen. Laufmittel B: 25 ml Stammlösung, 175 ml Methanol, 110 ml Acetonitril, 225 ml H<sub>2</sub>O. Stammlösung: 0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5). Die Laufmittelflussrate lag konstant bei 0,8 ml/min, der Anteil an Laufmittel B betrug: 0-5 min 0 %, 5-16 min 15 %, 16-26 min 50 %, 26-42 min 60 %, 42-46 min 100 %, 46-52 min 100 %, 52-53 min 0 % und 53-62 min 0 %. Durch Integration der Peaks einer 5-Punkt-Kalibrierlösung aus Aminosäurestandards (1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM je Aminosäure) konnten die Aminosäuregehalte der Proben quantifiziert werden. Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erfolgte dabei durch das Programm Chromeleon 6.30 (Dionex).

#### 2.2.4.8 Fettsäuremethylester (FAME)-Analyse von Samen

Die Analyse von FAME wurde modifiziert nach Browse *et al.* (1986) durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Samen in ein Glasröhrchen abgezählt und 100 µl eines internen Standards zugegeben (Pentadecansäure (15:0) 50 µg/ml in Methanol). Nach Zugabe von 1 ml 1N HCl in Methanol und Mischen der Probe erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 80 °C. Nach dem Abkühlen wurden 600 µl 0,9 % NaCl und 600 µl Hexan in das Röhrchen zugegeben. Die Proben wurden gut durchmischt und anschließend für 3 Minuten bei 670 g zentrifugiert. 200 µl der oberen Hexanphase wurden in GC-Vials überführt und im Anschluss 2 µl zur FAME-Messung via Autosampler in den Gaschromatograph (Agilent Technologies 7890A Gas Chromatograph with Flame ionizatic detection (GC-FID) mit Autosampler;

Säule: Supelco SP-2380, 30 m, Durchmesser 0,53 mm, Manteldicke 0,2 µm; Trägergas: Helium, Flussgeschwindigkeit: 7 ml/min) injiziert.

#### **2.2.4.9 Proteinextraktion aus Samen für die SDS-PAGE**

Für den visuellen Nachweis der Proteingehalte in Samen über SDS-PAGE wurden 10 bzw. 25 Samen abgezählt und zusammen mit einer Eisenkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Tissue Lyser für 2 Minuten bei 20 Hz pulverisiert. Nach Zugabe von 20 bzw. 60 µl 2x Laemmli-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0.02 % Bromphenolblau, 100 mM DTT) wurden die Proben erneut im Tissue Lyser für 2 Minuten homogenisiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert (20.000 g, 1 Minuten) und für 7 Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach kurzem vortexen wurden die Proben zentrifugiert (20.000 g, 5 Minuten) und konnten im Anschluss direkt auf das Proteingel aufgetragen werden. Es wurden jeweils 10 µl Proteinextrakt für die SDS-PAGE geladen.

#### **2.2.4.10 Proteinextraktion aus Blättern für die SDS-PAGE**

Zu 100-200 mg gefrorenes Blattmaterial in ein 2 ml Reaktionsgefäß wurde eine Eisenkugel gegeben. Die Proben wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Tissue Lyser für 1 Minute bei 20 Hz pulverisiert. Nach Zugabe von 300-600 µl 2x Laemmli-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0.02 % Bromphenolblau, 100 mM DTT) wurden die Proben erneut im Tissue Lyser für 1 Minuten homogenisiert. Nach Inkubation der Proben bei 60 °C für 10 Minuten folgte eine Zentrifugation bei 20.000 g für 3 Minuten bei RT. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20 °C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden insgesamt 10 µg Protein geladen.

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

Proteingemische können durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Färbung sichtbar gemacht werden. Unter denaturierenden Bedingungen wie bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine hauptsächlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, da die SDS-Anionen an die Hauptkette des Proteins binden und so die Eigenladung des Proteins überlagern. Dies führt zu einer konstanten Ladungsverteilung und somit der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die für Proteinauftrennung hergestellten Polyacrylamidgele bestehen aus zwei

Phasen, die sich in ihrem pH-Wert, der Ionenkonzentration, sowie des Polyacrylvernetzungsgrades unterscheiden. Das stärker vernetzte Trenngel dient der Auftrennung der Proteine, während das darüber liegende weniger stark vernetzte Sammelgel zur Konzentrierung der Proben im Gel dient. Die Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe des Minigel Apparatur Systems 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Die Lösung für das Trenngel (10 ml bzw. 7,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, 7,5 ml Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 12,5 ml bzw. 15 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1), 150 µl Ammoniumperoxodisulfat (100 mg/ml), 15 µl Tetramethylethyldiamid) wurde in einem 50 ml Falcon zusammen pipettiert, vorsichtig invertiert und mit Hilfe einer 5 ml Pipette in die Gelkammern gefüllt. Zur Vermeidung der Bildung von Luftblasen wurden die Gele mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Gels wurde das Isopropanol abgenommen und jeweils 1,5 ml der ebenfalls in einem 50 ml Falcon angesetzte Sammelgel-Lösung (4,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, 2 ml Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 1,2 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1), 50 µl Ammoniumpersulfat (100 mg/ml), 20 µl Tetramethylethyldiamid) mit Hilfe einer 1 ml Pipette in die Gelkammern über das Trenngel gegeben. Nach Positionierung der Gelkämme in die Gelkammern erfolgte die Auspolymerisation der Gele bei RT. Die Gele wurden sofort verwendet. Für die Elektrophorese wurden die Gele mit Klammern in der Gellaufkammer eingespannt und die Laufkammer mit 1x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) befüllt. Anschließend wurden die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteinproben, sowie 2 µl eines Größenstandards (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) auf das Gel aufgetragen.

#### **2.2.4.12 Coomassie-Färbung von Proteinen**

Eine Anfärbung von Proteingelen erfolgte modifiziert nach Kang 2002. Die nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhaltenen Gele wurden jeweils dreimal für 1 Minute in VE-Wasser zur Entfernung von SDS erhitzt (Mikrowelle). Anschließend wurden sie mit Coomassie-Färbelösung (8 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 0,3 % 37 %ige HCL) überdeckt, erneut in der Mikrowelle erhitzt und für 15 Minuten unter Schwenken inkubiert. Nach Abschütten der Färbelösung wurden die Gele in VE-Wasser entfärbt.

#### **2.2.4.13 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)**

Der Transfer von Proteinen nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran (BioRad, München) erfolgte über Elektroblothing, in Anlehnung an die Methode von Jungblut *et al.* (1990) mittels einer „Semi-dry“-Apparatur (Carboglass, Firma Schleicher und Schüll). Dafür wurden vier 2 mm dicke, 8 x 6 cm große Filterpapiere (Whatman-3MM-Papier, Whatman Ltd., Maidstone,

GB) und die PVDF-Membran in gleicher Größe zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere wurden in Anoden- bzw. Kathodenpuffer (RotiBlot-System, Roth) nach Herstellerangaben durchtränkt und die Membran durch Eintauchen in Methanol aktiviert. Nach Positionierung der Filter, der Membran und des Gels in der Blot-Apparatur, wurde die Apparatur mit 2 kg beschwert und ein Stromfluß von 1 mA/cm<sup>2</sup> (entspricht 48 mA pro Gel) eingestellt. Die Durchführung des Elektrotransfers erfolgte für 2 Stunden.

#### **2.2.4.14 Immunologischer Nachweis von Proteinen**

Nach Abbau des Blots wurde die Membran unter leichtem Schütteln für mindestens 1 Stunde in Blockierungslösung (3% Milchpulver in 1x TBS), zur Vermeidung unspezifischer Bindung der Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der blockierten Membran für 10 Minuten in TBST-T (10 % 10x TBS, 0,2 % Triton X-100, 0,05 % Tween 20) und anschließendem zweimaligen Waschen für je 10 Minuten in TBS (0,01 M Tris/HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl), folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht. Nach zweimaligem Waschen mit TBST-T für jeweils 10 Minuten und einmaligen für 10 Minuten mit TBS folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 1-2 Stunden. Nach viermaligen Waschen der Membran für je 10 Minuten in TBST-T folgte die Entwicklung der Membran unter Verwendung des SuperSignal West Pico bzw. Femto Maximum Sensitivity Substrate-Kit (Thermo Scientific) und die Detektion der Proteine mithilfe des Las4000 (Fujifilm, Life Science). Für den immunologischen Nachweis von Proteinen verwendete Antikörper wurden von der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden) bezogen. Die Antikörperlösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und bei -20 °C gelagert und mehrmals verwendet.

#### **2.2.4.15 Thylakoid-Isolation aus *Arabidopsis thaliana***

Die Isolierung der Thylakoide erfolgte nach Schöttler *et al.*, 2004. Vor der Thylakoid-Isolation wurden die Pflanzen für 24 h verdunkelt, so dass die Stärke zum Isolationszeitpunkt zum größten Teil abgebaut war. Keimblätter sowie senescente Blätter wurden entfernt. Die Pflanzenernte sowie alle Isolationsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) unter Schwachlicht durchgeführt. Dem geernteten Pflanzenmaterial wurde im zehnfachen Überschuss zum Frischgewicht Aufschlussmedium (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 50 mM MES, 350 mM Sorbit, pH 6,1 mit KOH) zugefügt und dann homogenisiert (Ultra-Turrax Typ TP18/2, Jahnke und Kunkel KG, Staufen, D). Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Verbandsmull und eine Lage Miracloth filtriert und anschließend zentrifugiert (2500 g, 2 Min, 4 °C). Das Sediment wurde in je 1 ml Aufschlussmedium resuspendiert und 20 ml Schockmedium (5 mM MgCl<sub>2</sub>,

30 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,6 mit KOH) zugefügt. Nach 30 Sekunden wurden 20 ml Doppelmedium (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 50 mM HEPES, 700 Sorbit, pH 7,6 mit KOH) zu gegeben und erneut zentrifugiert (200 g, 2 Min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und zur Pelletierung der Thylakoide zentrifugiert (2000 g, 2 Min, 4 °C). Die Thylakoide wurden in 1 ml Aufbewahrungsmedium (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 50 mM HEPES, 330 mM Sorbit, pH 7,6 mit KOH) resuspendiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der isolierten Thylakoide erfolgte bei -80 °C.

## 2.2.5 Pflanzenphysiologische Methoden

### 2.2.5.1 Quantifizierung photosynthetischer Komplexe und Chl *a* Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77K

In Zusammenarbeit mit Dr. Schöttler am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm wurden über spektroskopische Analyse die Gehalte der photosynthetischen Komplexe PSII, Cyt *b<sub>6</sub>/f* und PSI bestimmt sowie die isolierten Thylakoide über Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K analysiert. Die spektroskopische Quantifizierung erfolgte nach Kichhoff *et al.*, 2002. Die Chl *a* Fluoreszenz-Emissions-Spektren nach Schöttler *et al.*, 2004. Hierbei wurden die Komponenten der Photosysteme in den Thylakoidproben bei 430 nm und 77 K angeregt und die Emission zwischen 655-800 nm mit Hilfe eines Fluorometers (F-6500, Jasco GmbH, Groß-Umstadt) gemessen (Schöttler *et al.*, 2004). Über diese Methode kann u.a. die energetische Kopplung der LHCs an die Reaktionszentren überprüft werden.

### 2.2.5.2 Puls-Amplituden-Modulation (PAM) Fluorometrie

Über die Puls-Amplituden-Modulations (PAM) Fluorometrie ist es möglich *in vivo* Rückschlüsse auf die Photosyntheseleistung von Pflanzen zu treffen. Die Messung der Photosystem II Aktivität über die Chl *a* Fluoreszenz an intakten Pflanzen (Schreiber *et al.*, 1986) erfolgte mittels einer Imaging-PAM der Maxi-Serie (Heinz-Walz-Instrumente) und der PAM2100 (Heinz-Walz-Instrumente). Durch einen Pulsgenerator, der über einen LED-Treiber Leuchtdioden anregt, wird im Analysegerät ein sehr schwacher modulierter Messstrahl erzeugt, dessen Energie ausreicht, um die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) des Chl *a* in den Lichtsammelkomplexen anzuregen, nicht aber zum Elektronentransport. Durch Zugabe von aktinischem Licht im dunkeladaptierten Zustand kann die Fluoreszenzausbeute transient

stark erhöht werden. Diese zusätzliche Ausbeute wird als variable Fluoreszenz ( $F_v$ ) bezeichnet und ist auf das Reaktionszentrumspigment des PS II zurückzuführen.

In einem dunkeladaptierten Blatt ist der Plastochinonpool (PQ-Pool) vollständig oxidiert. Durch Zugabe eines kurzen gesättigten Lichtpulses kann die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ), vor der Induktion der Photosynthese bestimmt werden. Im Licht fällt  $F_v$  und die durch den Sättigungspuls induzierte maximale Fluoreszenz mit der Zeit langsam auf einen minimalen Wert ( $F_m'$ ) ab (Induktionskurve). Die Verringerung der Fluoreszenzausbeute wird als Fluoreszenz-Löschung (Englisch *Quenching*) bezeichnet. Dabei wird zwischen photochemischer Löschung (qP) und nicht-photochemischer Löschung (NPQ) der Fluoreszenz unterschieden. Die photochemische Löschung entspricht dem Anteil der absorbierten Energie, die in photochemische Arbeit eingeht. Die nicht-photochemische Löschung (NPQ) setzt sich aus drei Parametern zusammen, (1) der elektrochemischen Löschung  $q_{Ne}$ , welches proportional dem Protonengradient über die Thylakoidmembran ist und Maß für die gerichtete Wärmeabgabe über den Xanthophyllzyklus ist, (2)  $q_{Nt}$ , welches auf nicht-photochemische Löschung durch *state transition* zurückgeführt wird und (3)  $q_{Ni}$ , dessen Anteil Aussagen über die Photoinhibition, bei hohen Belichtungsstärken zulässt.

Berechnung zur Photosystem II Effizienz nach Genty *et al.*, (1989) über die Chl *a* Fluoreszenz an intakten Pflanzen:

$F_v/F_m$ -Verhältnis: gibt die maximale Quanteneffizienz des photosynthetischen Elektronentransports in PSII dunkeladaptierter Blätter an und berechnet sich wie folgt:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$\Phi_{PSII}$ : gibt die tatsächliche Quanteneffizienz des Elektronentransports in PSII lichtadaptierter Blätter an und berechnet sich wie folgt:  $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_v')/F_m'$ .

Daneben wurde an lichtadaptierten Blättern eine Lichtsättigungskurve erstellt, für die die Photonenflussdichte sukzessive erhöht und gegen die zugehörigen Werte der ETR aufgetragen wurde.

### 3 Ergebnisse

Mutanten mit einer Defizienz im XPT zeigten mit Ausnahme von Veränderungen während der generativen Entwicklung keinen Phänotyp im Vergleich zum WT (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Da der XPT wahrscheinlich auch im primären Kohlenhydratmetabolismus eingebunden ist und seine Substratspezifität sich teilweise mit der anderer plastidärer Phosphat-Translokatoren (pPT) überschneidet, wurde *xpt-1* mit stärkefreien Mutanten (*adg1-1* und *pgm1*) und Mutanten anderer pPT (*tpt-2*, *gpt2-1*, *cue1-6*) gekreuzt und die Konsequenz eines Doppel- oder Mehrfachausfalls untersucht (siehe auch 8.1 und 8.2). Hier resultierte insbesondere der gemeinsame Funktionsverlust von XPT und TPT in einem starken Wachstums- und Photosynthesephänotyp und lieferte so neue Ansatzpunkte die Rolle des XPT im Primär- und Sekundärstoffwechsel zu untersuchen.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der bereits beobachtete Phänotyp von *xpt-1* während der generativen Entwicklung mit Hilfe unabhängiger XPT Mutanten überprüft. Im zweiten Abschnitt wurden Untersuchungen zum Wachstums- und Photosynthesephänotyp von *tpt-2/xpt-1* vorgenommen. Aufgrund der ähnlichen Phänotypen von *tpt-2/xpt-1* und *adg1-1/tpt-2* wurde zudem überprüft, ob die Grundlage zu deren Entstehung in *tpt-2/xpt-1* identisch zu *adg1-1/tpt-2* ist. In den meisten Experimenten wurde *adg1-1/tpt-2* daher als Kontrolle und für den direkten Vergleich mit analysiert. Im letzten Abschnitt wurde durch Einkreuzen von *xpt-1* die Rolle des XPT für die Lebensfähigkeit von *adg1-1/tpt-2* und *cue1-6/ppt2-1* untersucht.

### 3.1 Überprüfung des *xpt-1* Phänotyps anhand neu etablierter *xpt*-Mutanten

Der *XPT* ist als *single-copy* Gen nahezu ubiquitär in *A. thaliana* exprimiert. Der Genlokus des *XPT* befindet sich auf Chromosom 5 (AGI: At5g17630), besitzt keine Introns und weist eine Länge von 1254 Bp auf (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; Schwacke *et al.*, 1989). Die Insertion in *xpt-1* liegt 471 Bp stromaufwärts vom Startkodon (ATG) des *XPT* (Eicks, Dissertation 2004). Um unabhängige *XPT knockout* Allele zu etablieren wurden zwei T-DNA Insertions-Linien, SAIL\_378\_C01 und SAIL\_810\_D09, vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) bestellt und die jeweilige Insertionsstelle bestimmt. Die SAIL\_378\_C01 (*xpt-2*) Linie befindet sich im Hintergrund vom Col-3 WT in der *qrt1-2* Mutante (Francis *et al.*, 2006). Die *qrt1-2* Mutante weist zwei Punktmutationen in At5g55590 auf, wodurch es zu einem Defekt der Pektinmethylesterase kommt. Dadurch bleiben die äußeren Zellwände der Pollen verschmolzen und zeigen einen Pollentetraden-Phänotyp (Abb. 3.1). Die Pollen sind jedoch lebensfähig sowie fruchtbar und die Bestäubung mit einer Pollentetrade führt in der Regel zu vier keimungsfähigen Samen (Francis *et al.*, 2006, Preuss *et al.*, 1994).

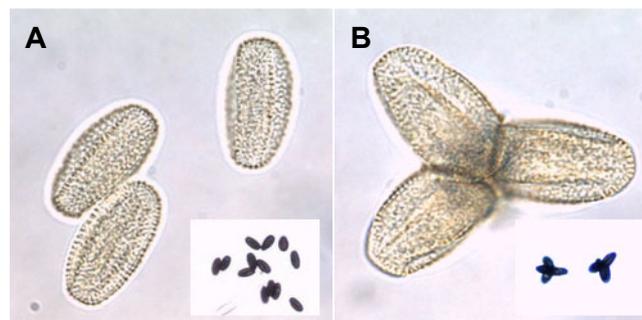
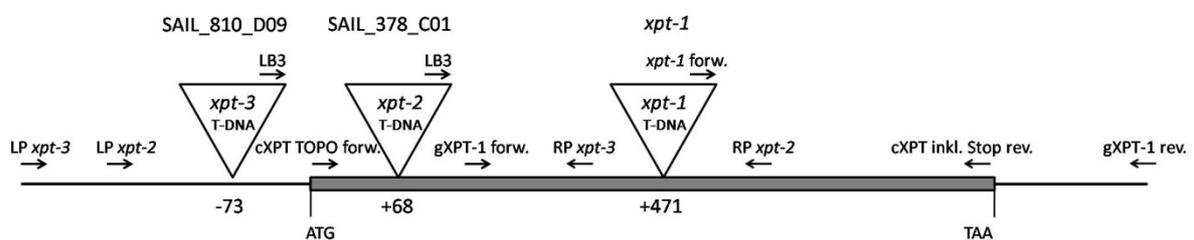


Abbildung 3.1: Pollentetraden-Phänotyp der *qrt1-2* Mutante im Hintergrund der *xpt-2* Mutante. A: Pollen vom Col-3 WT; B: Pollen der *qrt1-2* Mutante im Hintergrund der *xpt-2* Mutante. Vergrößerung große Bilder: 60x; Vergrößerung kleines Bild im großen Bild: 10x.

Die T-DNA-Insertion im *XPT* liegt bei der *xpt-2* Mutante 68 Basenpaare hinter dem Startkodon ATG (Abb. 3.2) und somit in der vorhergesagten Präsequenz des *XPT* (Eicks *et al.*, 2002). Durch Rückkreuzung von *xpt-2* mit dem Col-3 WT wurde versucht, die Mutationen im At5g55590 Gen durch homologe Rekombination heraus zu kreuzen. Da jedoch keine Pflanze isoliert werden konnte die wildtypisch in At5g55590 und hetero- oder homozygot auf die *xpt-2* T-DNA-Insertion war, wurde aus Zeitgründen die mehrfach rückgekreuzte *xpt-2* Mutante im Hintergrund der *qrt1-2* Mutante analysiert. Wie bereits erwähnt, liegt die Insertion in der vorhergesagten Präsequenz des *XPT*, daher wird das Protein wahrscheinlich, auch wenn es translatiert werden sollte, nicht in die innere Hüllmembran der Chloroplasten eingelagert werden können. Daneben ergeben sich im Leseraster durch die Insertion mehrere Stopcodons. Allerdings gibt es ein weiteres Startkodon im Leseraster 463 Bp hinter

dem eigentlichen Startkodon des *XPT*. Eine Analyse, ob dieses Restprotein weiterhin in Plastiden dirigiert werden würde, konnte über verschiedene Prediction-Programme (TargetP, Wolf PSORT, ChloroP, Predotar, SignalP) mehrheitlich ausgeschlossen werden. Zudem würden diesem *XPT*-Protein die ersten drei Transmembrandomänen fehlen, wodurch es fraglich ist, ob dieses Restprotein überhaupt funktionell sein könnte.

Die SAIL\_810\_D09 Linie (*xpt-3*) ist im Col-0 Hintergrund und die T-DNA-Insertion befindet sich in der Promotorregion 73 Basenpaare vor dem ATG des *XPT* (Abb. 3.2). Beide SAIL-Linien wurden im Rahmen des Syngenta-Projekts zur Identifizierung von Genen mit essentieller Funktion während der Samenentwicklung in Arabidopsis generiert (McElver et al., 2001).



**Abbildung 3.2:** Genstruktur des *XPT* und Lage der T-DNA-Insertionen. Die Pfeile zeigen die Position der für die Durchmusterung der *xpt*-Mutanten verwendeten Primer an. Der graue Balken steht für das *XPT*-Gen, welches 1254 Bp lang ist und über keine Introns verfügt.

Nach zweimaliger Rückkreuzung mit dem Wildtyp und anschließender Etablierung homozygoter *xpt-2* und *xpt-3* Mutanten (Abb. 3.3 A) wurden die Transkripte des *XPT* auf cDNA Ebene überprüft (Abb. 3.3 B). Während für die *xpt-2* Mutante kein volllänges Amplifikat des *XPT* auf cDNA Ebene erhalten werden konnte, zeigte die *xpt-3* Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung in der Transkriptabundanz des *XPT* (Abb. 3.3 B) und wurde nicht für weitere Analysen verwendet.

Des Weiteren wurde ein *artificial micro RNA* (amiRNA) Konstrukt unter dem CaMV 35S Promotor gegen den *XPT* generiert (amiRNA:*XPT*) und in die Wildtypen Ws-2 und Col-0 transformiert (siehe auch 2.2.3.13 und 8.5). Hier konnten vier amiRNA:*XPT* Linien mit geringer *XPT*-Transkriptabundanz im Ws-2 (#38, #41, #53, #64) und eine im Col-0 (#50) Hintergrund identifiziert werden (Abb. 3.4), die im Folgenden auf Veränderungen im vegetativen und generativen Wachstum mit analysiert wurden.

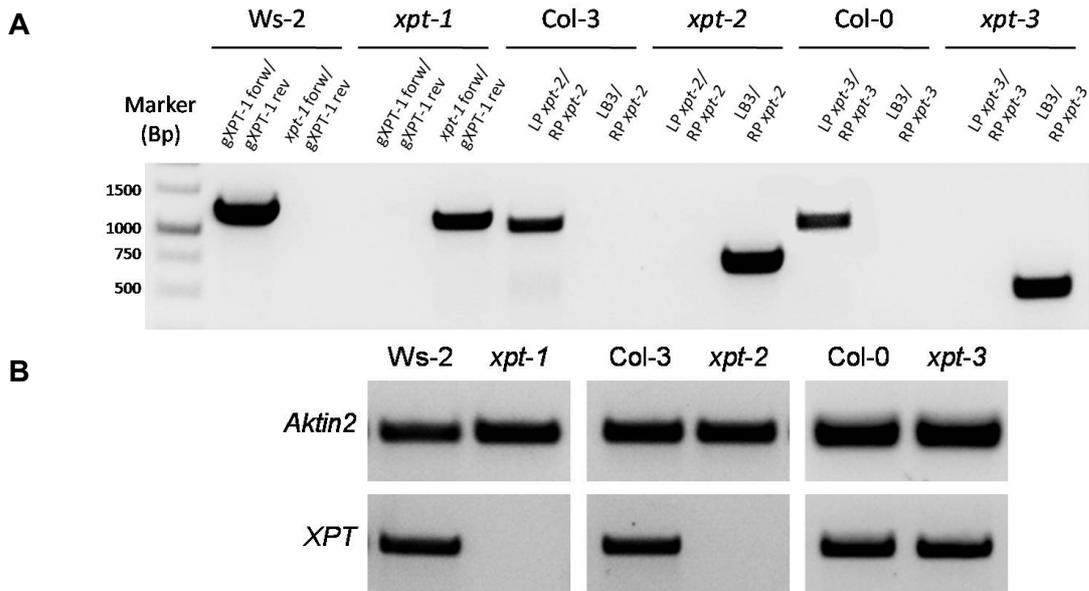


Abbildung 3.3: Etablierung homozygoter *XPT*-Mutanten. A: Überprüfung der Homozygotie auf die jeweilige T-DNA-Insertion bzw. das *XPT*-Allel. Unterhalb der Bezeichnung zur Pflanzenlinie sind die verwendeten Primerkombinationen aufgeführt. Die Lage der Primer kann Abb. 3.2 entnommen werden. B: Überprüfung der *XPT*-Transkriptabundanz über semiquantitative RT-PCR. Als endogenes Kontrollgen wurde *Aktin2* verwendet. *Aktin2* 26 Zyklen, *XPT* 32 Zyklen.

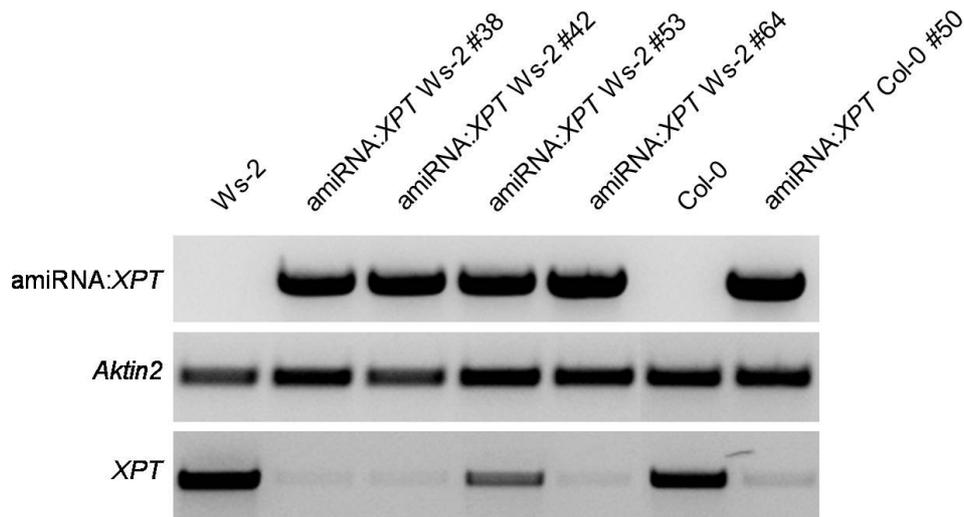
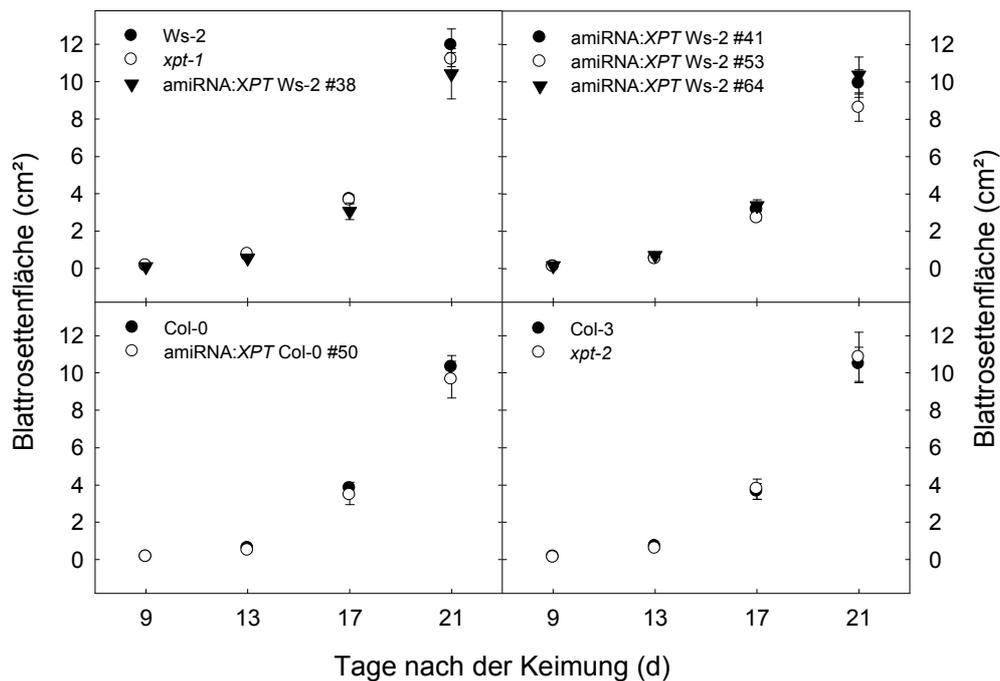


Abbildung 3.4: Identifizierung positiver amiRNA:*XPT* Mutanten. Oben: Durchmusterung transformierter Pflanzen über PCR auf genomische DNA nach dem amiRNA:*XPT*-Konstrukt. Mitte/Unten: Überprüfung der *XPT* Transkriptabundanz im Vergleich zum WT und dem endogenen Kontrollgen *Aktin2*. *Aktin2* 26 Zyklen, *XPT* 32 Zyklen.

Untersuchungen zur vegetativen Pflanzenentwicklung, wie dem Blattrosetten- (Abb. 3.5) und Wurzelwachstum (Daten nicht gezeigt) der *xpt*-Mutanten offenbarten keine einheitlich signifikanten Unterschiede zum jeweiligen WT. Auch die Analyse von Chl *a/b*, Chlorophyll-, Carotinoid- sowie Proteingehalt und der Photosyntheseleistung (Daten nicht gezeigt) war in den Wildtypen und Mutanten sehr ähnlich und lieferte daher keine neuen Hinweise auf die Funktion des *XPT* in der vegetativen Entwicklung.



**Abbildung 3.5:** Blattrosettenwachstum von Mutanten mit einem Funktionsverlust des XPT. Die Pflanzen wurden im LT unter einer Photonenflussdichte (PFD) von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen und alle 4 Tage deren Blattrosettenfläche bestimmt. Die zugehörige Signifikanztafel findet sich im Anhang unter 8.6 A. MW  $\pm$  SF; n = 4-6.

Zur Verifizierung der Einbindung des XPT während der generativen Entwicklung wurden die *xpt* Mutanten und zugehörigen Wildtypen in der LT-Phytokammer bei einer Photonenflussdichte (PFD) von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen und nach acht Wochen die Schoten und Samen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Bei der Schotenanzahl pro Pflanze zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Signifikanztafel im Anhang 8.6 A) zwischen WTs und Mutanten. Während die Schotenlänge nur in *xpt-1* signifikant verkürzt war, konnte eine signifikant verringerte Anzahl an Samen/Schote zusätzlich auch für amiRNA:XPT Col-0 #50 nachgewiesen werden. Die Samenfläche war in *xpt-1* um 5,3 % und in amiRNA:XPT Col-0 #50 um 2,7 % vergrößert, das Samengewicht war jedoch nur in *xpt-1* signifikant erhöht. In den amiRNA:XPT Ws-2-Linien hingegen war die Samenfläche im Vergleich zum WT signifikant verringert, das Samengewicht jedoch nur in *xpt-2* signifikant erniedrigt.

Tabelle 3.1: Analyse zum generativen Wachstum von *xpt*-Mutanten im Vergleich zum WT. Die Pflanzen wurden bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in der Langtag-Phytokammer angezogen und nach acht Woche die Anzahl an Schoten pro Pflanze, die Schotenlänge und die Anzahl an Samen pro Schote ermittelt. Im Anschluss wurde die Samenfläche sowie das Gewicht von 100 Samen bestimmt. Signifikante Abweichungen ( $p < 0,05$ ) zum jeweiligen WT sind fettgedruckt. Der Signifikanztest erfolgte über Welsh T-Test. Die zugehörige Signifikanztafel findet sich im Anhang unter 8.6 A; n = Anzahl der pro Linie untersuchten Replikate.

Pflanzenlinie	Schotenlänge (mm)		Samen/Schote		Schoten/Pflanze		Samenfläche (mm <sup>2</sup> )		Gewicht 100 Samen (mg)		
	MW ± SF	n	MW ± SF	n	MW ± SF	n	MW ± SF	%	n	MW ± SF	n
Ws-2	14,70 ± 0,32	15	59,07 ± 2,96	15	503,2 ± 25,5	5	0,1048 ± 0,0005	-	472	1,913 ± 0,047	4
<i>xpt-1</i>	<b>13,30 ± 0,31</b>	15	<b>43,73 ± 2,96</b>	15	555,0 ± 51,7	5	<b>0,1104 ± 0,0009</b>	+5,3	434	<b>2,510 ± 0,037</b>	4
amiXPT Ws-2 #38	13,87 ± 0,39	15	59,00 ± 2,68	15	487,4 ± 32,7	5	<b>0,1006 ± 0,0005</b>	-4,0	530	1,830 ± 0,004	4
amiXPT Ws-2 #41	14,33 ± 0,32	15	62,40 ± 2,29	15	472,8 ± 31,7	5	<b>0,1007 ± 0,0005</b>	-3,9	524	1,815 ± 0,042	4
amiXPT Ws-2 #53	14,50 ± 0,36	15	61,00 ± 2,96	15	499,4 ± 31,4	5	<b>0,1017 ± 0,0005</b>	-3,0	529	1,900 ± 0,021	4
amiXPT Ws-2 #64	14,40 ± 0,32	15	61,27 ± 2,54	15	487,8 ± 24,4	5	<b>0,0961 ± 0,0004</b>	-8,3	566	1,890 ± 0,025	4
Col-0	14,70 ± 0,24	15	61,47 ± 1,64	15	326,0 ± 17,1	5	0,1082 ± 0,0004	-	489	1,943 ± 0,072	4
amiXPT Col-0 #50	13,73 ± 0,43	15	<b>48,67 ± 4,41</b>	15	349,8 ± 23,8	5	<b>0,1111 ± 0,0006</b>	+2,7	449	2,143 ± 0,042	4
Col-3	15,03 ± 0,25	15	59,80 ± 1,25	15	303,8 ± 23,9	5	0,1111 ± 0,0007	-	668	2,018 ± 0,031	4
<i>xpt-2</i>	14,80 ± 0,32	15	61,00 ± 1,74	15	286,0 ± 13,7	5	0,1098 ± 0,0005	-1,2	658	<b>1,903 ± 0,025</b>	4

Eine Untersuchung der Hauptspeicherverbindungen in den Samen lieferte höhere Fettsäure- und Proteingehalte für *xpt-1*, nicht aber für die weiteren *xpt*-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Die prozentuale Fettsäurezusammensetzung (Abb. 3.6) war bis auf wenige Ausnahmen in den untersuchten Samen zwischen WTs und korrespondierenden Mutanten nahezu identisch. So war in *xpt-1* der Gehalt an 16:1 Fettsäuren erhöht im Vergleich zum WT, in *xpt-2* der an 18:2 Fettsäuren und in *amiRNA:XPT Ws-2 #38* die Menge an 18:3 Fettsäuren wohingegen hier die 18:2 Fettsäuren erniedrigt waren (siehe Signifikanztafel: Anhang 8.6 A).

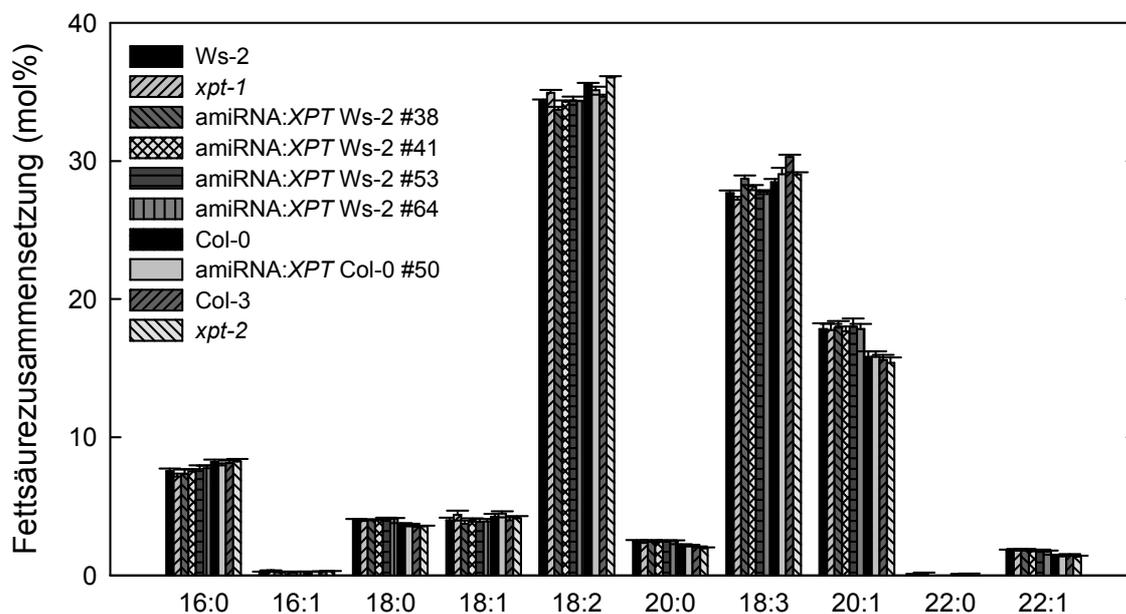


Abbildung 3.6: Fettsäurezusammensetzung in den Samen von *xpt*-Mutanten und den zugehörigen Wildtypen. Gezeigt ist die prozentuale Fettsäurezusammensetzung in mol% pro Same. Der Signifikanztest erfolgte über Welch T-Test und die zugehörige Signifikanztafel findet sich im Anhang unter 8.6 A. MW  $\pm$  SF; n = 5.

Über SDS-PAGE wurden die Speicherproteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, um mögliche Veränderungen in ihrer Abundanz erkennen zu können. Der erhöhte Proteingehalt in *xpt-1* im Vergleich zu den anderen Linien ist auf dem Gelbild (Abb. 3.7) deutlich erkennbar, die Komposition der Samenspeicherproteine scheint anhand der Bandenintensitäten jedoch in allen *xpt*-Linien im Vergleich zu den WTs nicht verändert zu sein.

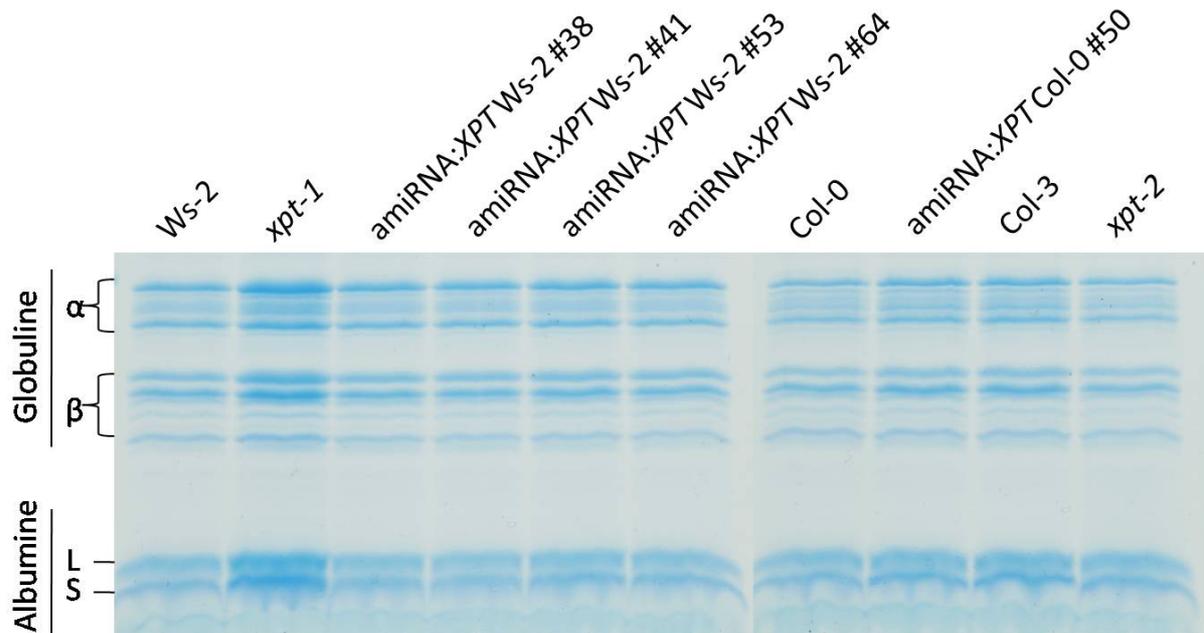


Abbildung 3.7: Komposition der Samenspeicherproteine in *xpt*-Linien über SDS-PAGE. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l eines Proteinextrakts von 10 Samen pro Geltasche aufgetragen, um mögliche Veränderungen in der Proteinkomposition anhand der Bandenintensität aufdecken zu können. Gut zu erkennen sind im oberen Bildteil die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der 12S Globuline (Cruciferine) und im unteren Bildteil die große (L) und kleine (S) Untereinheit der 2S Albumine (Napine).

Zusammenfassend konnten die Phänotypen von *xpt-1* während des generativen Wachstums anhand der unabhängigen *xpt*-Mutanten nicht verifiziert werden. Ein einfacher Ausfall des XPT führt somit zu keinem ersichtlichen Phänotyp in *A. thaliana*.

### 3.2 Untersuchung von Doppelmutanten mit einem kombinierten Funktionsverlust von TPT und XPT

Bei der *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante handelt es sich um eine Kreuzung der beiden Ökotypen Col-0 und Ws-2, die entwicklungspezifische Unterschiede aufweisen. Da noch kein weiteres *knockout* Allel für den XPT vorlag, wurde das generierte amiRNA:*XPT*-Konstrukt (siehe auch 3.1 und 8.5) auch in *tpt-2* transferiert, um auf diese Weise eine unabhängige *XPT knockdown* Linie im einheitlichen ökologischen Hintergrund des Col-0 WT untersuchen zu können (Abb. 3.8). Des Weiteren wurde im Verlauf dieser Arbeit *xpt-1* mit der *knockdown* Mutante *tpt-1* gekreuzt, die beide im Ws-2 Hintergrund sind und ebenfalls analysiert wurde.

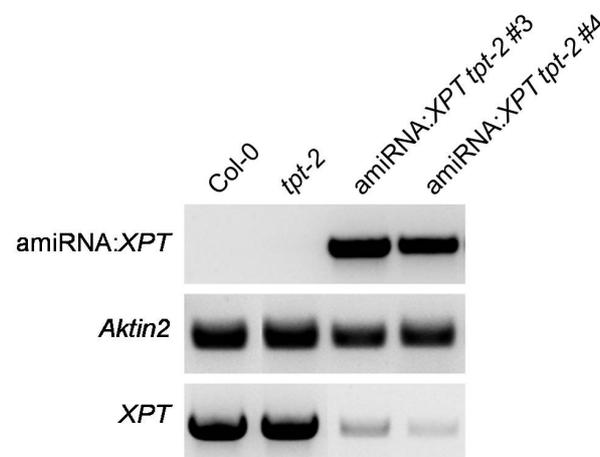


Abbildung 3.8: Etablierung positiver amiRNA:*XPT tpt-2* Mutanten. Oben: Durchmusterung transformierter Pflanzen über PCR auf genomische DNA nach dem amiRNA:*XPT*-Konstrukt. Mitte/Unten: Überprüfung der *XPT* Transkriptabundanz im Vergleich zum WT und dem endogenen Kontrollgen *Aktin2*. *Aktin2* 26 Zyklen, *XPT* 32 Zyklen.

#### 3.2.1 Die *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante zeigt eine starke Wachstumsretardierung während der vegetativen und generativen Entwicklung

Im Vergleich zu den Wildtypen und Einzelmutanten weist die *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante einen starken Wachstumsphänotyp unter Lang- und Kurztagbedingungen auf (Abb. 3.10). Unter Langtag-Bedingungen und bei einer Photonenflussdichte (PFD) von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (*normal light*, NL) war die Blattrosettenfläche 9 bzw. 21 Tage nach der Keimung signifikant (Signifikanztafel Anhang 8.5 B) um bis zu 26 % bzw. 88 % bei *tpt-2/xpt-1* und den amiRNA:*XPT tpt-2* Linien im Vergleich zu *tpt-2* verringert (Abb. 3.9). Im Vergleich zu Ws-2 (34 % nach 9 Tagen und 91 % nach 21 Tagen) und *xpt-1* war diese Verringerung der Blattrosettenfläche noch drastischer.

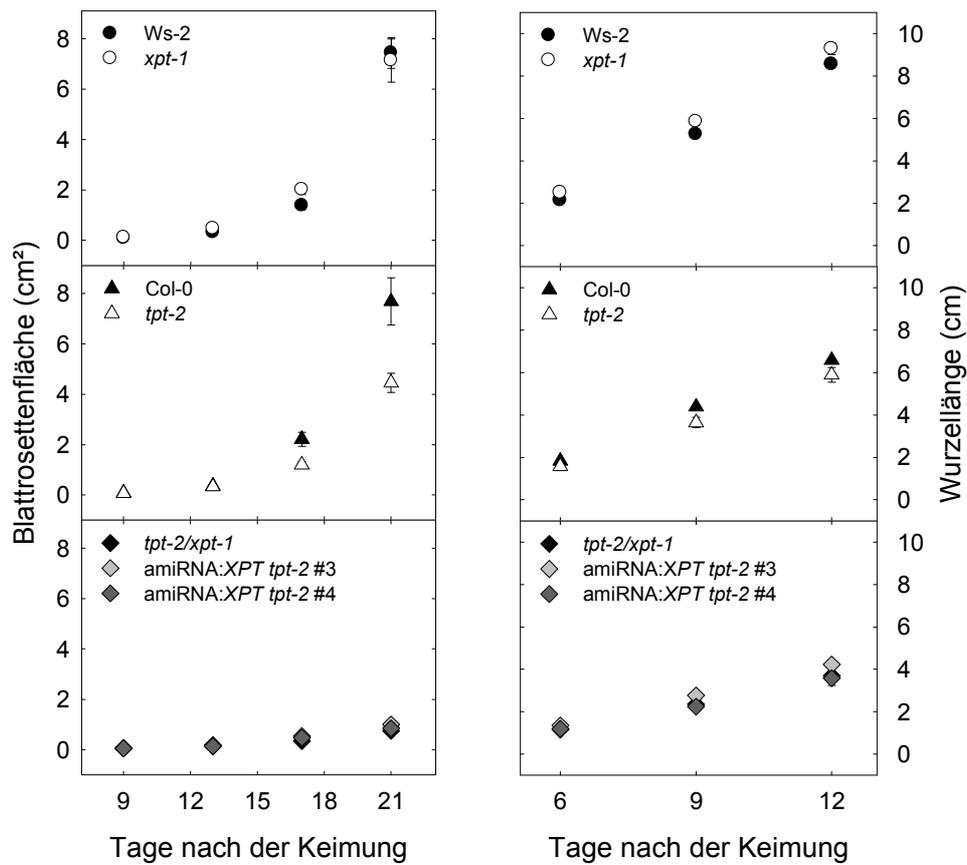


Abbildung 3.9: Blattrosetten- und Wurzelwachstum von *tpt-2/xpt-1*. Zur Analyse des Blattrosettenwachstums wurden die Pflanzen bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf Erde angezogen und die Blattrosettenfläche alle 4 Tage bestimmt. Für die Bestimmung der Wurzellänge wurde alle 3 Tage die Wurzellänge von Pflanzen die auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  wuchsen gemessen. Die zugehörige Signifikanztafel findet sich unter 8.6 B. MW  $\pm$  SF; n = 4-15.

Eine Analyse der generativen Entwicklung ergab, dass die Anzahl der Schoten in *tpt-2/xpt-1* im Vergleich zu den anderen Linien nach 56 Tagen mindestens halbiert war (Tab. 3.2). Der Samenertrag, berechnet aus dem Gesamtsamengewicht pro Pflanze und dem Gewicht von 100 mg Samen, war um 64-84 % reduziert (Tab. 3.2; Signifikanztafel Anhang 8.6 B). Während die Samengröße in *tpt-2/xpt-1* verringert war, konnte im Einzelsamengewicht keine Veränderung im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt werden (Tab. 3.2). Die amiRNA:XPT *tpt-2* Linien verhielten sich ähnlich wie *tpt-2/xpt-1*, der Wachstumsphänotyp schwächte bei ihnen allerdings mit fortschreitendem Pflanzenalter ab. Neben den oberirdischen, grünen Teilen von *tpt-2/xpt-1* zeigte auch die Wurzel 12 Tage nach der Keimung eine Längenreduktion um mindestens 37 % (Abb. 3.9). Mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate ( $r$ ) von  $0,4 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$  liegt das Wurzelwachstum von *tpt-2/xpt-1* deutlich unter der von Wildtypen und Einzelmutanten ( $r = 0,7$  bis  $1,1 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Die amiRNA:XPT *tpt-2* #4 Linie zeigte hier ein nahezu identisches Ergebnis. In amiRNA:XPT *tpt-2* #3 waren die Messwerte tendenziell ähnlich, aber leicht abgeschwächt.

Tabelle 3.2: Daten zum generativen Wachstum bei *tpt-2/xpt-1*. Die Pflanzen wurden bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen und 56 Tage nach der Keimung die Schotenanzahl bestimmt. Nach dem Abreifen wurde das Samengewicht pro Pflanze und das Gewicht von 100 Samen ermittelt und daraus die Samenanzahl pro Pflanze berechnet. Zusätzlich wurde noch die Samengröße bestimmt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum korrespondierenden Wildtyp sind fett hervorgehoben. Signifikanztest über *oneway ANOVA* und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test, die zugehörige Signifikanztafel findet sich im Anhang unter 8.6 B. n = Replikanzahl.

	Schotenanzahl		Samengewicht/ Pflanze (g)		Gewicht 100 Samen (mg)		Samenanzahl/ Pflanze (berechnet)		Samengröße (mm <sup>2</sup> )	
	MW ± SF	n	MW ± SF	n	MW ± SF	n	MW ± SF	n	MW ± SF	n
Ws-2	322,8 ± 15,6	5	0,194 ± 0,016	5	1,63 ± 0,02	5	11822 ± 986	5	0,0954 ± 0,0003	894
xpt-1	<b>408,4 ± 31,0</b>	5	0,165 ± 0,014	5	<b>2,82 ± 0,09</b>	5	<b>5873 ± 556</b>	5	<b>0,1416 ± 0,0006</b>	740
<i>tpt-2/xpt-1</i>	<b>94,8 ± 7,2</b>	4	<b>0,034 ± 0,006</b>	5	1,58 ± 0,03	5	<b>2140 ± 382</b>	5	<b>0,0936 ± 0,0004</b>	952
<i>tpt-2</i>	206,2 ± 9,3	5	0,117 ± 0,004	5	1,74 ± 0,02	5	6715 ± 161	5	<b>0,1007 ± 0,0003</b>	1035
Col-0	223,8 ± 16,4	5	0,131 ± 0,018	5	1,63 ± 0,05	5	7959 ± 1035	5	0,0959 ± 0,0004	1082
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #3	194,6 ± 8,3	5	0,101 ± 0,007	5	1,74 ± 0,02	5	5814 ± 414	5	0,0985 ± 0,0003	1037
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #4	182,2 ± 9,6	5	<b>0,060 ± 0,009</b>	5	1,79 ± 0,15	5	<b>3356 ± 446</b>	5	<b>0,1035 ± 0,0006</b>	773

### 3.2.2 Der Wachstumsphänotyp von *tpt/xpt* ist abhängig von der Lichtintensität

Die Hemmung des Wachstums korreliert deutlich mit der Lichtintensität. Während der Pflanzenanzucht unter Hochlicht (*high light*, HL = PFD  $\sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) wurde die Wachstumretardierung verstärkt, wohingegen sie bei niedrigerer Lichtintensität (*normal light*, NL = PFD  $\sim 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) abnahm (Abb. 3.10). Bei einer PFD von etwa  $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (*low light*, LL) war die *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante von den Wildtypen anhand der Blattrosettengröße nahezu nicht mehr zu unterscheiden (Abb. 3.10). Auch die amiRNA:*XPT tpt-2* Linien sowie die generierte *tpt-1/xpt-1* zeigten diesen deutlichen Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Wachstum. Aufgrund des verstärkten Phänotyps bei hohen Lichtintensitäten und um die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante vergleichen zu können, wurden weitere Experimente zum Großteil im Langtag (LT) unter HL durchgeführt.

Der beobachtete Unterschied des Wachstumsphänotyps unter HL zu LL Bedingungen spiegelt sich in physiologischen Parametern, wie Pigment- und Proteingehalt sowie des spezifischen Frischgewichts wider (Tabelle 3.3). Im HL zeigten sich für *tpt-2/xpt-1* signifikant verringerte Gehalte an Chlorophyll (Chl) und Protein von über 30 % im Vergleich zu Wildtypen und Einzelmutanten, nicht aber für den Carotinoidgehalt (Car) (Signifikanztafel 8.6 C). Das Chl *a/b* Verhältnis wies eine Verringerung um 11-15 % in *tpt-2/xpt-1* auf und das spezifische Frischgewicht (FG) um mindestens 44 % verglichen mit Wildtypen und Einzelmutanten. Bei Anzucht im LL gab es im Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteingehalt sowie spezifischen FG keine Unterschiede der Doppelmutante mit den weiteren Linien. Allerdings war das Chl *a/b* Verhältnis im Vergleich in *tpt-2/xpt-1* signifikant um 2,5-9 % erhöht (Signifikanztafel 8.6 C). Die amiRNA:*XPT tpt-2* Linien sowie *tpt-1/xpt-1* zeigten im Chlorophyllgehalt sowie spezifischen FG ebenfalls signifikante Abnahmen im HL (Signifikanztafel 8.6 C und E). Für den Carotinoid-, Proteingehalt und das Chl *a/b* Verhältnis konnten vorwiegend zu *tpt-2/xpt-1* ähnliche aber nicht signifikante Tendenzen ausgemacht werden (Signifikanztafel 8.6 C und E). Die bestimmten Werte für *adg1-1/tpt-2* gleichen den bereits veröffentlichten (Schmitz, Dissertation 2011). In *adg1-1/tpt-2* sind der Chlorophyllgehalt sowie das Chl *a/b* Verhältnis im HL verglichen mit *tpt-2/xpt-1* jedoch stärker reduziert.

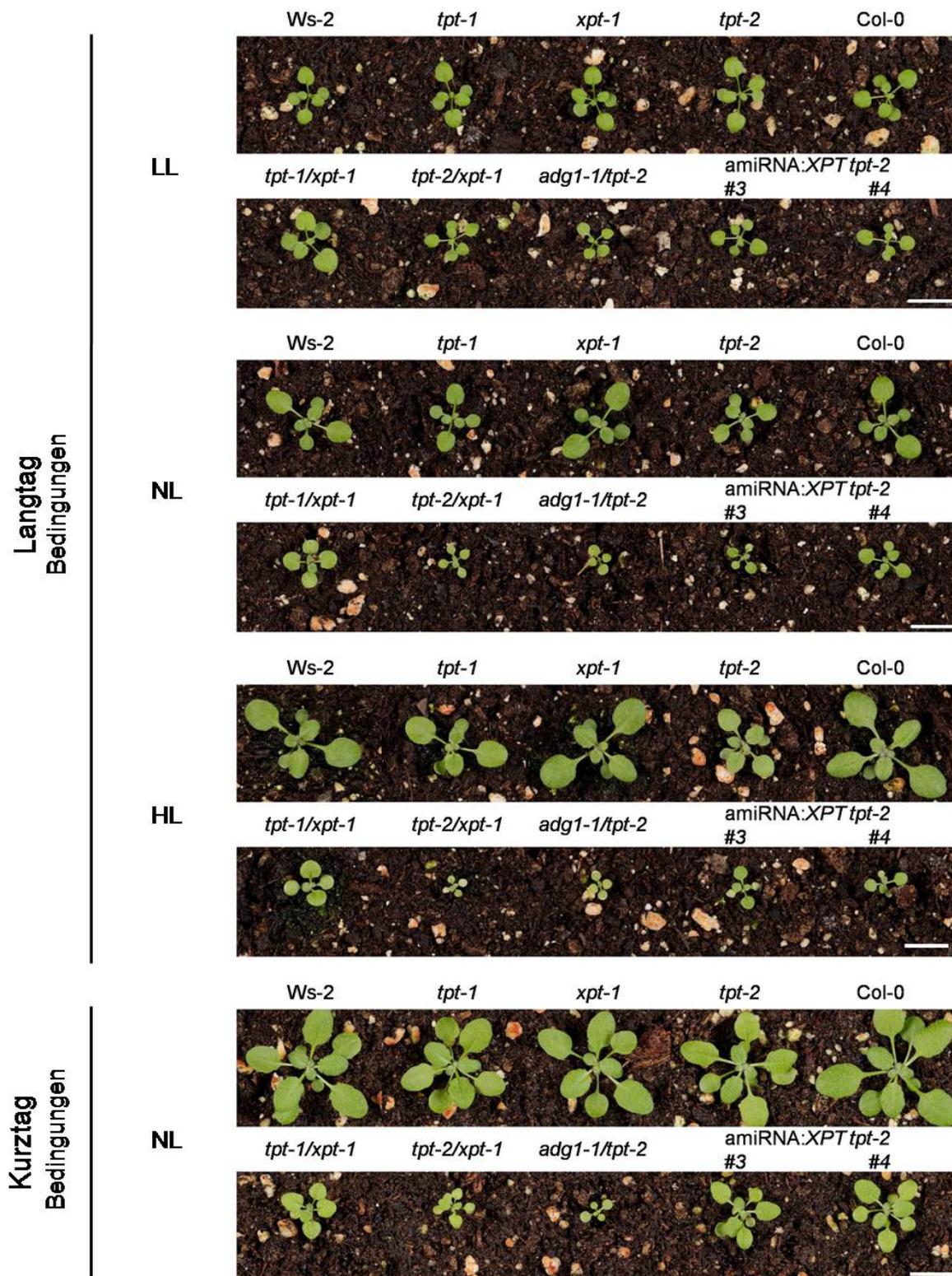


Abbildung 3.10: Der Wachstumsphänotyp von *tpt/xpt* korreliert mit der Lichtintensität. Das Pflanzenalter betrug bei Anzucht im LT für LL 20 Tage, NL 14 Tage und HL 13 Tage. Im Kurztag waren die Pflanzen 28 Tage alt. Der weiße Balken dient als Größenstandard und entspricht 1 cm.

Tabelle 3.3: Übersicht zu physiologischen Parametern unter HL und LL in *tpt/xpt*, den Wildtypen und Einzelmutanten. Es wurden die Gehalte von Chlorophyll (Chl), Carotinoiden (Car), Protein und das spezifische Frischgewicht von Blattrosetten bestimmt. Die ermittelten Gehalte wurden auf die Blattrosettenfläche (m<sup>2</sup>) bezogen. Aus den bestimmten Chl a und Chl b Gehalten wurde ein Chl a/b-Verhältnis berechnet. Bei HL Anzucht betrug das Pflanzenalter 15 Tage, bei LL 33 Tage. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden über *oneway ANOVA* und anschließendem *Tukey Kramer post hoc Test* ermittelt. Signifikante Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp sind fett hervorgehoben, die zugehörige Signifikanztafel findet sich unter 8.6 C und E. MW  $\pm$  SF; n = 2-20.

HL	Chl (mg/m <sup>2</sup> )	Car (mg/m <sup>2</sup> )	Chl a/b	Protein (g/m <sup>2</sup> )	Spez. FG (g/m <sup>2</sup> )
Ws-2	223,96 $\pm$ 09,61	33,73 $\pm$ 1,44	3,48 $\pm$ 0,05	3,47 $\pm$ 0,13	210,69 $\pm$ 04,86
<i>xpt-1</i>	244,83 $\pm$ 08,10	32,99 $\pm$ 1,29	3,32 $\pm$ 0,05	3,51 $\pm$ 0,14	<b>251,02 <math>\pm</math> 10,70</b>
<i>tpt-1</i>	<b>187,29 <math>\pm</math> 06,82</b>	31,50 $\pm$ 0,40	3,38 $\pm$ 0,06	3,22 $\pm$ 0,14	<b>179,76 <math>\pm</math> 03,87</b>
<i>tpt-1/xpt-1</i>	<b>147,87 <math>\pm</math> 05,32</b>	32,27 $\pm$ 0,62	3,27 $\pm$ 0,17	<b>2,76 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>168,18 <math>\pm</math> 02,85</b>
Col-0	238,08 $\pm$ 07,51	32,18 $\pm$ 1,54	3,42 $\pm$ 0,05	3,05 $\pm$ 0,16	232,10 $\pm$ 05,29
<i>tpt-2</i>	<b>206,32 <math>\pm</math> 04,34</b>	34,41 $\pm$ 0,89	3,45 $\pm$ 0,09	2,88 $\pm$ 0,14	<b>203,03 <math>\pm</math> 03,53</b>
<i>tpt-2/xpt-1</i>	<b>134,04 <math>\pm</math> 02,80</b>	<b>27,66 <math>\pm</math> 0,80</b>	<b>2,95 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>1,95 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>112,77 <math>\pm</math> 05,46</b>
<i>adg1-1/tpt-2</i>	108,37 $\pm$ 04,94	25,35 $\pm$ 0,73	2,54 $\pm$ 0,07	1,92 $\pm$ 0,10	135,51 $\pm$ 03,21
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #3	<b>161,07 <math>\pm</math> 17,70</b>	28,31 $\pm$ 1,82	<b>3,01 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>2,24 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>128,35 <math>\pm</math> 12,14</b>
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #4	<b>163,65 <math>\pm</math> 14,80</b>	31,00 $\pm$ 1,37	3,25 $\pm$ 0,06	2,56 $\pm$ 0,17	<b>131,36 <math>\pm</math> 07,04</b>

LL	Chl (mg/m <sup>2</sup> )	Car (mg/m <sup>2</sup> )	Chl a/b	Protein (g/m <sup>2</sup> )	Spez. FG (g/m <sup>2</sup> )
Ws-2	137,82 $\pm$ 4,60	20,28 $\pm$ 1,38	3,38 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,10	98,98 $\pm$ 2,22
<i>xpt-1</i>	139,24 $\pm$ 5,18	20,13 $\pm$ 1,47	3,31 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,13	<b>115,15 <math>\pm</math> 3,33</b>
<i>tpt-1</i>	131,08 $\pm$ 5,48	20,41 $\pm$ 1,44	3,40 $\pm$ 0,06	1,61 $\pm$ 0,08	99,96 $\pm$ 3,10
<i>tpt-1/xpt-1</i>	127,12 $\pm$ 6,13	20,48 $\pm$ 1,55	3,47 $\pm$ 0,09	1,28 $\pm$ 0,21	107,23 $\pm$ 4,09
Col-0	136,60 $\pm$ 1,19	18,49 $\pm$ 0,72	3,40 $\pm$ 0,08	1,61 $\pm$ 0,16	120,81 $\pm$ 5,02
<i>tpt-2</i>	134,48 $\pm$ 4,36	20,50 $\pm$ 0,78	3,52 $\pm$ 0,03	1,54 $\pm$ 0,29	118,90 $\pm$ 12,76
<i>tpt-2/xpt-1</i>	127,84 $\pm$ 1,15	21,26 $\pm$ 0,35	<b>3,62 <math>\pm</math> 0,03</b>	1,54 $\pm$ 0,07	114,58 $\pm$ 16,23
<i>adg1-1/tpt-2</i>	110,58 $\pm$ 4,96	19,97 $\pm$ 0,82	2,96 $\pm$ 0,12	1,31 $\pm$ 0,10	101,44 $\pm$ 3,87
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #3	136,65 $\pm$ 5,12	19,50 $\pm$ 1,40	3,35 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,11	106,45 $\pm$ 2,34
amiRNA:XPT <i>tpt-2</i> #4	132,26 $\pm$ 4,59	20,46 $\pm$ 1,30	3,36 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,16	107,64 $\pm$ 3,58

### 3.2.3 Der Wachstumsphänotyp von *tpt/xpt* korreliert mit einem lichtintensitätsabhängigen Photosynthesephänotyp

Da der Wachstumsphänotyp einen Zusammenhang mit der Lichtintensität aufwies wurde angenommen, dass möglicherweise die Photosyntheseeffizienz ebenfalls einen Bezug zur Lichtintensität besitzt. Photosynthesemessungen über PAM-Fluorometrie (siehe auch 2.2.5.2) zeigten, dass die dunkeladaptierte *tpt-2/xpt-1* als auch *tpt-1/xpt-1* (*tpt/xpt*) Doppelmutanten bei Anzucht unter NL oder HL eine signifikant erhöhte Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) und eine signifikant erniedrigtes  $F_v/F_m$ -Verhältnis aufwiesen (Abb. 3.11) (Signifikanztafel 8.6 D und F). Die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) war unter Langtag-Bedingungen (LT) im HL in *tpt/xpt* verglichen mit WT und Einzelmutanten nahezu verdoppelt. Während das  $F_v/F_m$ -Verhältnis dunkeladaptierter Blätter in WT und Einzelmutanten 0,74-0,79 betrug, lag es bei den *tpt/xpt* Doppelmutanten bei 0,49-0,54. Nach Induktion der Photosynthese (Induktionskurve, Abb. 3.11) war die ETR im Fließgleichgewicht im Vergleich zu den Wildtypen und Einzelmutanten um etwa 37-53 % erniedrigt. Auch die maximale ETR bei Belichtung mit höheren Lichtintensitäten (Lichtkurve, Abb 3.11) war mit zunehmender PFD signifikant verringert in *tpt/xpt*. Während die Wildtypen im HL max. ETRs von über  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  erreichen konnten, war diese in *tpt/xpt* mit 28,4 bzw.  $32,7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  signifikant um mindestens 45-60 % reduziert (Signifikanztafel 8.6 D und F).

Unter LL-Bedingungen angezogene *tpt/xpt* unterschieden sich nach Dunkeladaption nicht von den anderen Linien in  $F_0$ ,  $F_v/F_m$  sowie der ETR im Fließgleichgewicht (Abb. 3.11). In der Lichtkurve zeigte sich eine signifikant verringerte ETR bei einer PFD von  $461 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in *tpt-2/xpt-1* verglichen mit *Ws-2* und *xpt-1* (Signifikanztafel 8.6 D). Die *amiRNA:XPT tpt-2* Linien verhielten sich, wie auch schon bei der Wachstumsanalyse festgestellt, ähnlich *tpt/xpt*, nur in abgeschwächter Form. Insgesamt waren die Unterschiede in den bestimmten Photosyntheseparametern in *tpt/xpt* verglichen mit *adg1-1/tpt-2* deutlich geringer.

Bei Anzucht unter Kurztag-Bedingungen (KT) und NL war *tpt/xpt* weiterhin lebensfähig und besaß wie auch im LT den Wachstums- und Photosynthesephänotyp. Aufgrund der Ausbildung einer größeren Blattrosette im KT zeigte sich, dass in jungen Blättern die Photosynthesephänotypen weniger stark ausgeprägt sind. Dies war insbesondere in den *amiRNA:XPT tpt-2* Linien der Fall (Abb. 3.11).

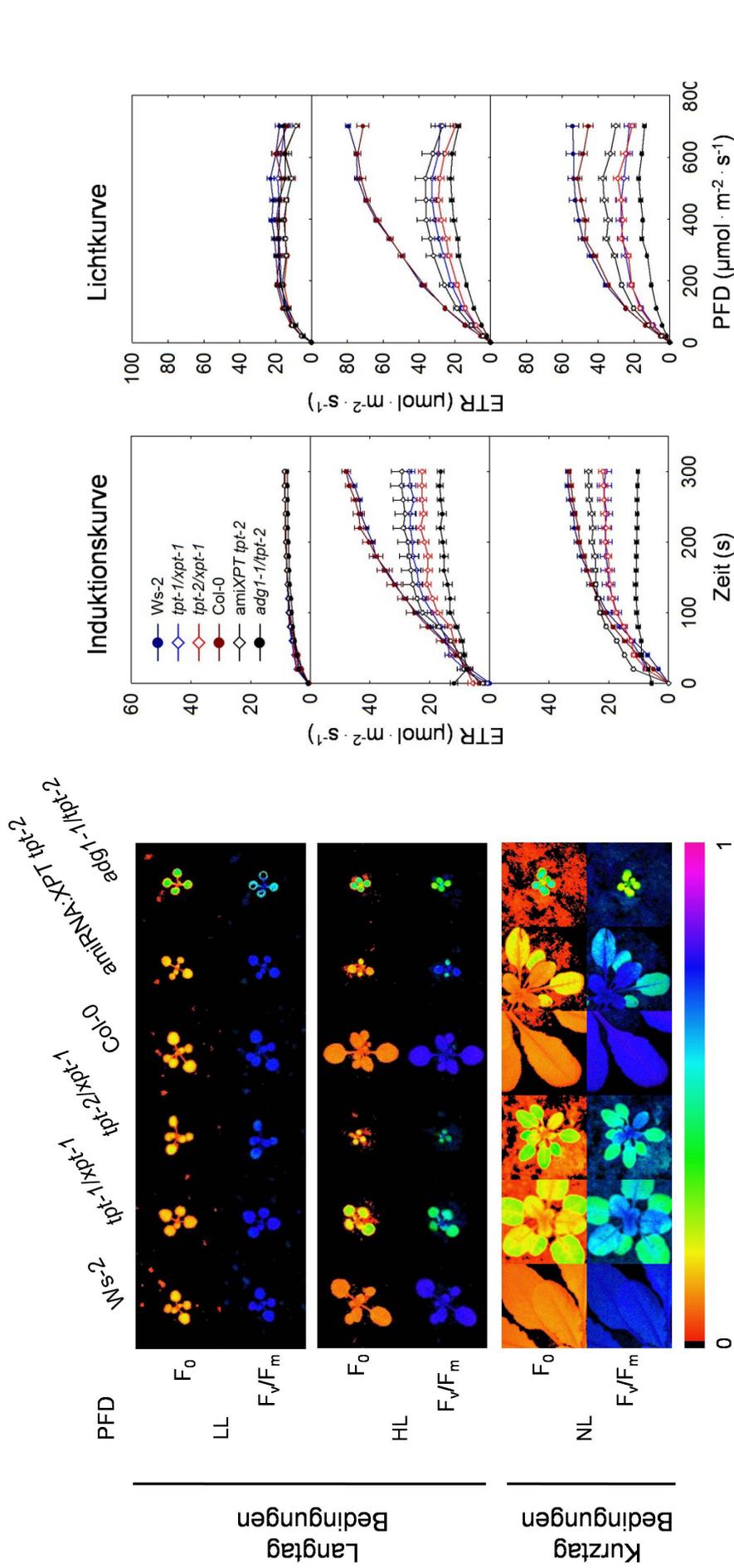


Abbildung 3.11: Photosynthesephänotyp von *tp1/xpt* in Abhängigkeit zur Lichtintensität. Die Anzuchtbedingungen waren im Langtag, LL, niedrige Lichtintensität (PFD =  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), HL, hohe Lichtintensität (PFD =  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) und im Kurztag, NL, mittlere Lichtintensität (PFD =  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ );  $F_0$  = Grundfluoreszenz an PSII von dunkeladaptierten Blättern,  $F_v/F_m$  = Quanteneffizienz an PSII von dunkeladaptierten Blättern, Induktionskurve = ETR dunkeladaptierter Blätter mit der Zeit, Lichtkurve = ETR mit steigender Lichtintensität. Die Pflanzen wurden vor der Messung 20 Minuten dunkeladaptiert und das Messlicht bei der Induktion der Photosynthese entsprach dem Wachstumslicht. Signifikante Unterschiede wurden über oneway ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt und sind in Signifikanztafel 8.6 D und F bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 8-9.

### 3.2.4 Einfluss der exogenen Fütterung mit Metaboliten auf den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von *tpt/xpt*

Bei der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante kann der Wachstum- und Photosynthesephänotyp durch exogene Fütterung von Glc und Suc gerettet werden. Bei Fütterung von Fru wird nur der Photosynthesephänotyp nicht aber der Wachstumsphänotyp gerettet (Heinrichs *et al.*, 2012). Aufgrund der ähnlichen Phänotypen wurde überprüft, ob eine exogene Fütterung mit 50 mM Suc, Glc oder Fru auch bei *tpt/xpt* zu einer Rettung der Phänotypen führt. Es zeigte sich jedoch, dass der Photosynthesephänotyp bei steriler Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS (siehe auch 2.2.1.1) mit zunehmenden Pflanzenalter verschwand und zwar unabhängig von der Zuckerfütterung (Abb. 3.12). Zehn Tage nach der Keimung konnte auf den Kontrollplatten noch ein erhöhtes  $F_0$  und ein verringertes  $F_v/F_m$  vor allem in den Keimblättern von *tpt/xpt* erkannt werden. Nach weiteren acht Tagen waren diese Phänotypen bei *tpt/xpt* unter allen vier Bedingungen nahezu vollständig verschwunden (Abb. 3.12). Die als Kontrolle für den experimentellen Aufbau dienende *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigte bei Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS auch 18 Tage nach der Keimung den beschriebenen Photosynthesephänotyp (Schmitz *et al.*, 2012; Heinrichs *et al.*, 2014). Durch die exogene Fütterung von Suc, Glc und Fru wurden diese Phänotypen, wie von Heinrichs *et al.* (2012) beschrieben, in *adg1-1/tpt-2* gerettet (Abb. 3.12). Um die mögliche Ursache für das Verschwinden des Photosynthesephänotyps von *tpt/xpt* bei steriler Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten zu identifizieren, wurden die Inhaltsstoffe des MS-Mediums mit denen der verwendeten Erde verglichen. Der Vergleich offenbarte einen zehnfach höheren Stickstoffgehalt im  $\frac{1}{2}$  MS Medium zu der verwendeten Erde.

Um zu überprüfen, ob das Verschwinden des Photosynthesephänotyps mit dem erhöhten Stickstoffgehalt im MS-Medium zusammenhängt, wurden Anstauungsexperimente (Daten nicht gezeigt) mit  $\frac{1}{2}$  MS, 1 MS oder einer Kombination von 9,395 mM  $KNO_3$  mit 10,305 mM  $NH_4NO_3$  (entspricht den Konzentrationen im verwendeten  $\frac{1}{2}$  MS) durchgeführt. Die Anstauung führte allerdings in keinem Fall bei den auf Erde angezogenen Pflanzen zu einer Rettung des Photosynthesephänotyps (Daten nicht gezeigt). Bei Anstauung mit 1 MS starb sogar ein Großteil der Doppelmutanten ab. Dies könnte in dem durch  $NH_4NO_3$  zugeführten Ammoniumanteil begründet sein. Insgesamt zeigten die Pflanzen bei Anstauung mit  $H_2O$  das beste Wachstum. Ein Wechsel von  $\frac{1}{2}$  MS Medium zu einem anderen Pflanzenwachstumsmedium (MM-Medium) mit sehr geringer Stickstoffkonzentration (1 mM  $Ca(NO_3)_2$  und 1,25 mM  $KNO_3$ ) führte ebenfalls zu einem Verschwinden der Photosynthesephänotypen (Abb. 3.13). Da bei steriler Plattenanzucht nur der Photosynthesephänotyp, nicht aber der Wachstumsphänotyp betroffen war, sollte die Wirkung der Fütterung mit Metaboliten anhand des Blattrosettenzuwachs untersucht werden.

Ws-2 beginnt jedoch bereits nach ungefähr 2 Wochen Infloreszenzen auszutreiben; um dies zu unterdrücken, wurden die Fütterungsexperimente im KT durchgeführt.

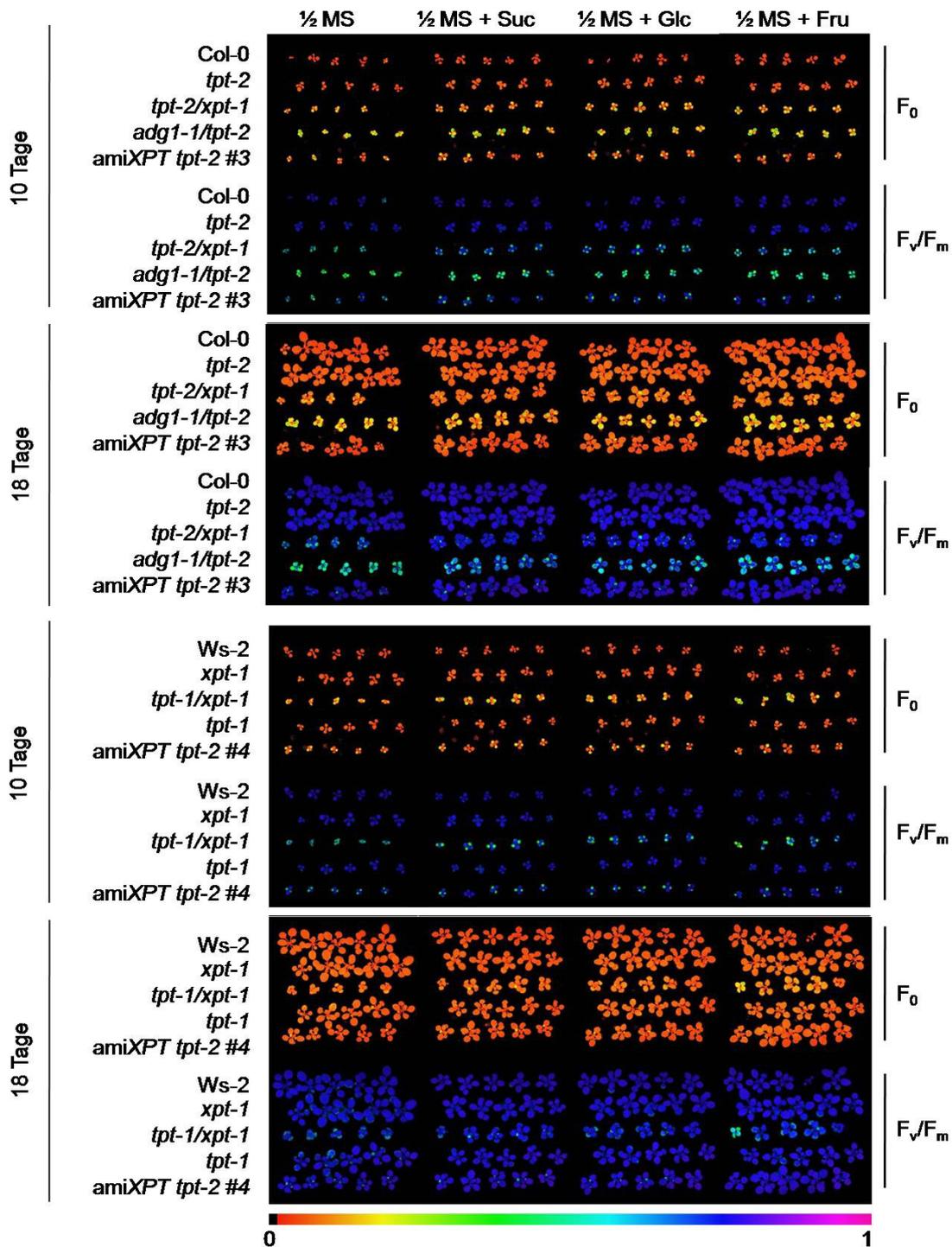


Abbildung 3.12: Wachstums- und Photosynthesephänotyp bei Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS von *tpt/xpt*. Gezeigt sind mit der ImagingPAM in Falschfarben aufgenommene Bilder von  $F_0$  und  $F_v/F_m$ -Verhältnis der verschiedenen Pflanzenlinien 10 und 18 Tage nach der Keimung bei Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS ohne oder mit Zusatz von 50 mM Suc, Glc oder Fru im LT unter HL (PFD =  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Der Farbbalken dient der numerischen Abschätzung des  $F_v/F_m$ -Verhältnis.

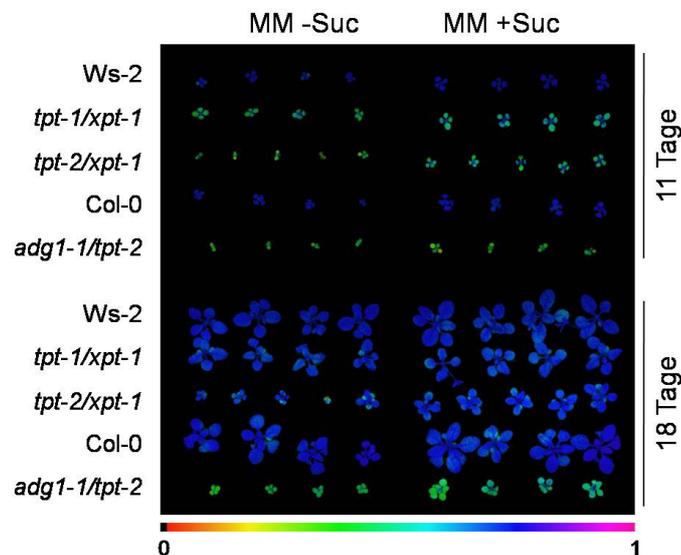


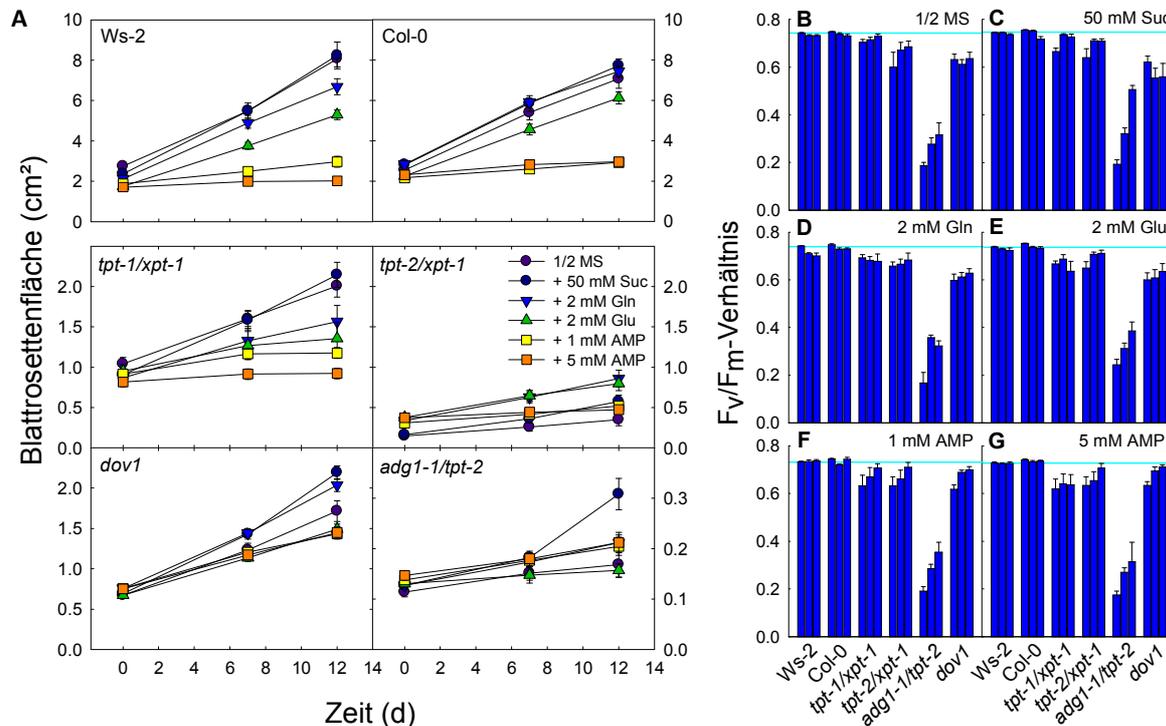
Abbildung 3.13: Wachstums- und Photosynthesephänotyp bei Anzucht auf MM von *tpt/xpt*. Gezeigt ist das mit der ImagingPAM in Falschfarben aufgenommene Bild zum  $F_v/F_m$  Verhältnis der verschiedenen Pflanzenlinien 11 und 18 Tage nach der Keimung bei Anzucht auf MM ohne oder mit Zusatz von 50 mM Suc im LT unter HL. Der Farbbalken dient der numerischen Abschätzung des  $F_v/F_m$ -Verhältnis.

Bei den Metabolit-Fütterungsexperimenten sollte zum einen erneut der Effekt einer exogenen Zuführung von 50 mM Suc auf das Blattrosettenwachstum untersucht werden. Als Kontrolle für den experimentellen Aufbau diene *adg1-1/tpt-2*. Daneben sollte durch Fütterung der Aminosäuren Glutamin (2 mM Gln) und Glutamat (2 mM Glu) überprüft werden, ob eine Stickstofflimitierung bzw. Störung in der Stickstoffassimilation den Wachstumsphänotyp begründen. Dies wäre möglich, wenn durch die verringerte Photosyntheseleistung nicht genügend Kohlenstoffgerüste für die N-Assimilation bereitgestellt oder nicht ausreichend Reduktionsäquivalente über den OPPP für die Nitrit-Reduktase generiert werden könnten.

Desweiteren besteht eine weitläufige Koexpression des XPTs mit plastidären Enzymen (At3g57610 und At3g55010) der Purinbiosynthese (ATTEDII, Aoki *et al.*, 2016). Mutanten mit einer Defizienz in der ATase2 (Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphate-Aminotransferase) wie die *cia1* (*chloroplast import apparatus 1*) oder aber *dov1* (*differential development of vascular associated cells 1*) Mutanten (Hung *et al.*, 2004; Rosar *et al.*, 2012) weisen ähnlich wie *tpt/xpt* eine Wachstumsretardierung sowie ein verringertes  $F_v/F_m$ -Verhältnis und eine erhöhte Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) auf (Rosar *et al.*, 2012). Zusammengenommen könnte dies auf eine Funktion des XPT in der Zulieferung von Pentosephosphaten für die Purinbiosynthese aus dem Cytosol in das Chloroplastenstroma hindeuten. Eine verminderte Bereitstellung von Pentosephosphaten könnte zu einer verminderten Verfügbarkeit an

Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) im Chloroplast führen. PRPP ist jedoch wichtiges Substrat bei der Purin-, Pyrimidin- sowie Histidinsynthese (Zrenner *et al.*, 2006; Ingle 2011). Die Phänotypen von ATase2 Mutanten lassen sich durch exogene Fütterung von AMP retten (Hung *et al.*, 2004). Über Fütterungsversuche mit 1 mM und 5 mM AMP sollte eine Limitation an Purinen als Ursache der Phänotypen von *tpt/xpt* ausgeschlossen werden.

Als Kontrolle für den experimentellen Aufbau diente hier neben *adg1-1/tpt-2* auch *dov1*. Der Zuwachs der Blattoberfläche sowie das  $F_v/F_m$ -Verhältnis wurde 7 und 12 Tage nach Umsetzen der Pflanzen von 1/2 MS Platten (Zeitpunkt 0) auf die Fütterungsplatten bestimmt. Da *A. thaliana* AMP nicht über die Wurzeln aufnehmen kann (Hung *et al.*, 2004), wurde die Wurzel für die AMP Fütterung entfernt. In Abb. 3.14 sind der Zuwachs der Blattoberfläche (Abb. 3.14 A) über die Zeit, sowie das zugehörige  $F_v/F_m$  Verhältnis (Abb. 3.14 B-G) in Zusammenhang zur jeweiligen Metabolitfütterung dargestellt.



**Abbildung 3.14:** Einfluss der Fütterung verschiedener Metabolite auf den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von *tpt/xpt*. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Kurztag bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . **A:** Gezeigt ist die Zunahme der Blattoberfläche über die Zeit vor (Zeit 0 d) und nach (Zeit 7 d bzw. 12 d) Umsetzen der Pflanzen von 1/2 MS Platten auf die verschiedenen Fütterungsplatten bzw. 1/2 MS Platten als negativ Kontrolle. Man beachte, dass die Skalierung in den beiden oberen Diagrammen der Wildtypen Ws-2 und Col-0 von den mittleren der Doppelmutanten *tpt-1/xpt-1* und *tpt-2/xpt-1*, sowie *dov1* (links unten) abweicht. Um Unterschiede der Fütterung auch bei *adg1-1/tpt-2* (rechts unten) ersichtlich zu machen wurde hier eine wiederum andere Skalierung gewählt. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway* ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt und sind in Signifikanztafel 8.6 G bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 6-18.

**B-G:**  $F_v/F_m$ -Verhältnis über die Zeit vor und nach Umsetzen der Pflanzen von 1/2 MS Platten auf die verschiedenen Fütterungsplatten bzw. 1/2 MS Platten (Kontrolle). Pro Pflanzenlinie und Anzuchtbedingung wurde  $F_v/F_m$  dreimal bestimmt. Die erste Messung erfolgte wie auch die Bestimmung der Blattoberfläche vor dem Umsetzen (0 d) und entspricht jeweils dem ersten Balken im Diagramm. Im Anschluss wurde 7 (zweiter Balken) und 12 Tage (dritter Balken) nach dem Umsetzen  $F_v/F_m$  erneut bestimmt. Die Pflanzenanzucht erfolgte unter KT und NL Bedingungen. **B** = Kontrolle (1/2 MS), **C** = Fütterung mit 50 mM Suc, **D** = Fütterung mit 2 mM Gln, **E** = Fütterung mit 2 mM Glu, **F** = Fütterung mit 1 mM AMP und **G** = Fütterung mit 5 mM AMP. MW  $\pm$  SF; n = 6-18.

Die Fütterung von Suc, Gln und Glu hatte einen signifikant wachstumsfördernden Effekt auf das Blattrosettenwachstum von *tpt-2/xpt-1*, die Fütterung von AMP brachte keine Veränderung im Wachstum verglichen zur Kontrolle ( $\frac{1}{2}$  MS) (Signifikanztafel 8.6 G). Bei Col-0 führte AMP zu einer signifikanten Verringerung des Blattrosettenzuwachs, Suc, Gln und Glu hatten hingegen keinen Einfluss. Ws-2 zeigte ein ähnliches Verhalten wie Col-0, wobei hier durch Glu ein signifikant verringertes Wachstum hervorgerufen wurde. In gleicher Weise wie ihr WT reagierte *tpt-1/xpt-1* auf die Fütterung der Metabolite und somit in Bezug auf Glu und Gln gegensätzlich zu *tpt-2/xpt-1*. Um den Erfolg der Suc Fütterung zu beurteilen, wurde *adg1-1/tpt-2* als Kontrolle verwendet. Diese zeigte wie erwartet eine signifikante Zunahme des Blattrosettenwachstums sowie eine deutliche Steigerung des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses bei Suc Fütterung. Die Fütterung der anderen Metabolite hatte verglichen mit der Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS jedoch keinen Einfluss auf das Blattrosettenwachstum oder das  $F_v/F_m$ -Verhältnis in *adg1-1/tpt-2*. Generell konnte, wie schon im Vorfeld beobachtet, anhand von Photosyntheseparametern wie dem  $F_v/F_m$ -Verhältnis kein aussagekräftiger Effekt durch die Zufütterung der Metabolite bei *tpt/xpt* beobachtet werden (Abb. 3.14 B-G). Es zeigte sich im Zeitverlauf bei *tpt/xpt* als auch *adg1-1/tpt-2* zwar teilweise ein tendenzieller Anstieg von  $F_v/F_m$ , jedoch war dieser Effekt verglichen mit der Kontrolle ( $\frac{1}{2}$  MS) und dem Start der Fütterung (Abb. 3.14 B-G, erster bis dritter Balken) innerhalb der Fehlerwerte sehr gering und dadurch nicht aufschlussreich. Für *dov1*, die als Kontrolle für die AMP Fütterung diente, konnte zwar ein deutlicher Anstieg von  $F_v/F_m$  durch die Zufuhr von AMP beobachtet werden, das Blattrosettenwachstum war verglichen zur Kontrolle jedoch trotz gesteigertem  $F_v/F_m$ -Verhältniss signifikant verringert (Signifikanztafel 8.6 G). Während Gln und Glu keinen Effekt auf Wachstums- und Photosynthesephänotyp von *dov1* hatten, war bei Anzucht mit Suc eine signifikante Zunahme der Blattrosettenfläche, nicht aber von  $F_v/F_m$  zu beobachten (Signifikanztafel 8.6 G).

### 3.2.5 Metabolitgehalte in Blattrosetten der *tpt/xpt* Doppelmutanten

In *tpt/xpt* ist der Export von Photoassimilaten über den TPT und XPT vollständig inhibiert. Durch einen simultanen Auf- und Abbau von Stärke schon während der Lichtperiode könnte dieser doppelte Verlust kompensiert werden, wie es bereits für Pflanzen mit eingeschränkter oder fehlender TPT-Aktivität gezeigt wurde (Häusler *et al.*, 1998, Schneider *et al.*, 2002; Schmitz 2012). Das inhibierte Wachstum von *tpt/xpt* deutet jedoch darauf hin, dass dieser alternative Weg des Photoassimilatexports durch den zusätzlichen Ausfall des XPT nicht mehr wie in *tpt* kompensiert werden kann. Eine verringerte Bereitstellung an Kohlenstoffgerüsten hätte auch Auswirkung auf die N-Assimilation sowie die Synthese von Aminosäuren und könnte sich daher in verminderten Aminosäuregehalten widerspiegeln. Um Hinweise auf den Kohlenhydratstatus in *tpt/xpt* zu erhalten, wurden im Folgenden die Gehalte von Stärke und löslichen Zuckern (Glc, Fru, Suc) sowie der Abundanz freier Aminosäuren in Blattrosetten überprüft.

#### 3.2.5.1 Stärke- und lösliche Zuckergehalte im Tagesverlauf

Bei Fütterung mit 50 mM Suc auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten konnte für *tpt-2/xpt-1* ein signifikanter Zuwachs der Blattrosettenfläche verglichen zur Anzucht auf reinem  $\frac{1}{2}$  MS beobachtet werden. Durch die verringerte Photosyntheseleistung könnte eine verminderte Produktion von Kohlenstoffgerüsten für die starke Wachstumsinhibition verantwortlich sein. Um den Kohlenstoffstatus im Fließgleichgewicht in der *tpt-2/xpt-1* Doppelmutanten zu überprüfen, wurden über den Tag und die Nacht verteilt Blattrosettenproben genommen und die Gehalte an Stärke (Abb. 3.15 A-C) und löslichen Zuckern (Abb. 3.15 D-L) bestimmt.

Beide *tpt/xpt* Doppelmutanten zeigten, verglichen mit den Wildtypen, zwar einen tendenziell erhöhten Stärkegehalt, signifikante Unterschiede gab es jedoch hauptsächlich zu Beginn der Lichtperiode (*tpt/xpt* zu Ws-2) sowie am Ende der Dunkelperiode (*tpt-2/xpt-1* zu Ws-2 und Col-0) (Signifikanztafel 8.6 H und K). Im Vergleich zu den *tpt* Einzelmutanten war der Stärkegehalt im Tagesverlauf in *tpt/xpt* hingegen signifikant verringert (Signifikanztafel 8.6 H und K). Die *tpt* Mutanten zeigten, wie bereits durch Schneider *et al.* (2002) und Schmitz *et al.* (2012) beschrieben wurde, verglichen zum WT sowie auch zu *tpt/xpt* einen signifikant erhöhten Stärkegehalt im Tagesverlauf. Dieser war für *tpt* auch am Ende der Dunkelperiode im Vergleich zu den anderen Pflanzenlinien signifikant erhöht (Signifikanztafel 8.6 H und K). Die Summe an freien Zuckern war hingegen während der Lichtperiode in *tpt* verglichen zum WT erniedrigt. Mit Ausnahme des ersten Messwerts im Licht war die Summe an freien Zuckern in *tpt-1/xpt-1* während der Lichtperiode zu Ws-2 sowie *xpt-1* signifikant verringert

und verhielt sich insgesamt ähnlich wie in *tpt-1* (Signifikanztafel 8.6 M). Während der Dunkelperiode zeigte sich eine Erhöhung der freien Zucker in *tpt-2/xpt-1*, die vermutlich mit einer vermehrten Abbaurrate der Stärke zusammenhängt (Abb. 3.15 N). In *tpt-2/xpt-1* waren die Zucker auch während der Lichtperiode im Vergleich zu *tpt-2* und zeitweise auch zu *Ws-2* erhöht. Die Gehalte an Fru waren fast über den gesamten Tagesverlauf in *tpt-2/xpt-1* signifikant zu den anderen Linien erhöht (Abb. 3.15 H und Signifikanztafel 8.6 I). In den Wildtypen und *xpt-1* waren die Summe an freien löslichen Zuckern sowie der Stärkegehalt im Tagesverlauf sehr ähnlich (Abb. 3.15 A und M) Die beiden amiRNA:*XPT tpt-2* Linien verhielten sich in Glc- und Fructosegehalt nahezu identisch zu *tpt-2* (Abb. 3.15 E, F, H und I). Der Gehalt an Suc war zu Beginn der Lichtperiode, ähnlich wie schon in *tpt/xpt*, verglichen zu *tpt-2* signifikant erhöht (Signifikanztafel 8.6 J). Insbesondere amiRNA:*XPT tpt-2* #3 zeigte wie auch *tpt-2/xpt-1* am Ende der Dunkelphase eine Zunahme von Suc und dadurch ebenso an Gesamtzuckern (Abb. 3.15 L und O). Auffällig für die amiRNA:*XPT tpt-2* Linien war, dass über die Dunkelperiode nur wenig Stärke abgebaut wurde, so dass zu Beginn der Lichtperiode der Stärkegehalt signifikant zu *tpt-2* erhöht war (Abb. 3.15 C und Signifikanztafel 8.6 H). Die nahezu stärkefreie *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante besaß während der Lichtperiode im Vergleich zu *tpt-2/xpt-1* tendenziell verringerte Gehalte an freien löslichen Zuckern im Fließgleichgewicht (Abb. 3.15 N). Mit Beginn der Dunkelperiode nahmen die Zuckergehalte in *adg1-1/tpt-2* im Gegensatz zu *tpt/xpt* schlagartig ab, so dass nahezu keine freien löslichen Zucker mehr verfügbar waren (Abb. 3.15 N).

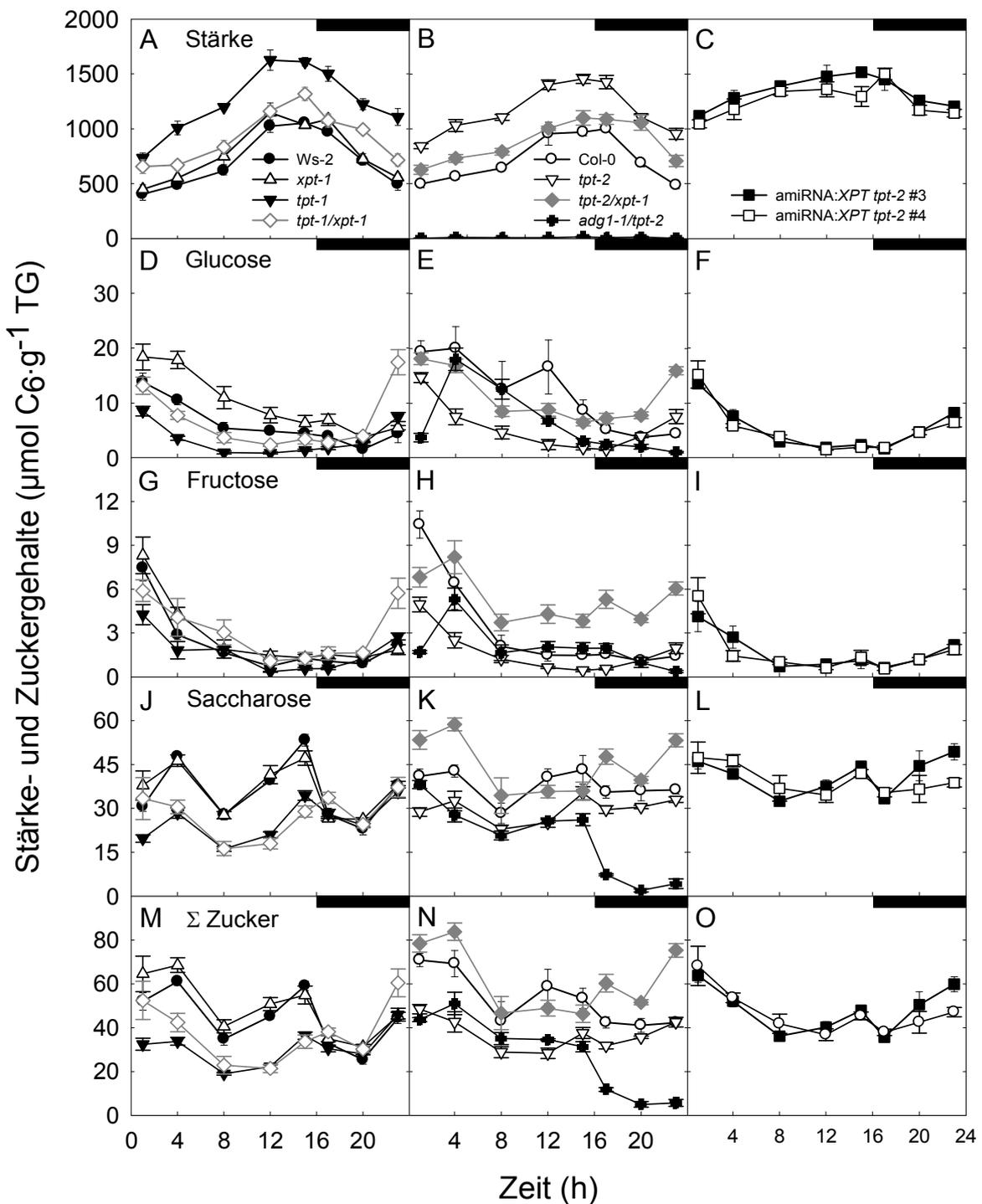


Abbildung 3.15: Stärke- und lösliche Zuckergehalte in Blattrosetten von *tpt/xpt* im Tagesverlauf. Die Anzucht erfolgte im Langtag bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die Extraktion der Metabolite erfolgte nach 8h Belichtung. Es sind Stärke- (A-C), Glucose- (D-F), Fructose- (G-I) und Saccharosegehalt (J-K) im Tagesverlauf gezeigt. Zusätzlich wurden die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose addiert und als Summe freier Zucker ( $\Sigma$  Zucker, M-O) ebenfalls im Tagesverlauf dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway* ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt und sind in den Signifikanztafel 8.6 H-J bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 3-5.

### 3.2.5.2 Bestimmung freier Aminosäuren in *tpt/xpt*

Um weitere Hinweise auf Veränderungen im Metabolismus in *tpt/xpt* zu bekommen, wurden die Gehalte an freien Aminosäuren (AS) analysiert. Der Gesamtgehalt an freien AS in Col-0 war zu *Ws-2* signifikant erhöht; dies zeigte sich auch im Vergleich zu den Einzel- und Doppelmutanten (Abb. 3.16 A, Signifikanztafeln 8.6 N und O). In *tpt-2/xpt-1* gab es verglichen mit *Ws-2* und den beiden Einzelmutanten keine signifikante Veränderung im Gesamtgehalt an freien AS (Abb. 3.16 A, Signifikanztafeln 8.6 N). Für *tpt-1/xpt-1* hingegen war der Gesamtaminosäuregehalt gegenüber *xpt-1* signifikant verringert, nicht aber gegenüber *tpt-1* oder dem WT (*Ws-2*) (Abb. 3.16 A, Signifikanztafeln 8.6 O).

Aufgrund der auffällig hohen Gesamtaminosäuregehalte für Col-0 (Abb. 3.16 A) wurde die Komposition der verschiedenen AS anhand des prozentualen Anteils im Vergleich zum jeweiligen WT analysiert und sind in Abb. 3.16 B als *Heatmap* der Log<sub>2</sub>-Verhältnisse dargestellt. Hier zeigten sich bereits zwischen den beiden Wildtypen deutliche Unterschiede. Die AS Asparagin (Asn) und Arginin (Arg) waren in *Ws-2* verglichen mit Col-0 signifikant verringert, Alanin (Ala), Serin (Ser) sowie Glycin (Gly) hingegen signifikant erhöht (Signifikanztafel 8.6 N). In *tpt-1/xpt-1* konnten zu *Ws-2* signifikant erhöhte Gehalte an Glutamat (Glu), Aspartat (Asp), und den davon abgeleiteten AS Asparagin (Asn), Threonin (Thr) und Isoleucin (Ile), sowie der von Pyruvat abgeleiteten AS Valin (Val) identifiziert werden (Signifikanztafel 8.6 O). Bei *tpt-2/xpt-1* waren im Vergleich zu den Wildtypen zusätzlich noch die ebenfalls von Pyruvat abstammenden AS Ala und Leucin (Leu) sowie alle aromatischen AS (Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp)) signifikant erhöht (Signifikanztafel 8.6 N). Der Gehalt an Glu war in *tpt-2/xpt-1* jedoch nur im Vergleich mit *Ws-2*, nicht aber mit Col-0 signifikant erhöht. Der Gehalt an Glycin (Gly) war verglichen mit den Wildtypen in beiden *tpt/xpt* Doppelmutanten signifikant verringert (Signifikanztafel 8.6 N und O). Die amiRNA:*XPT tpt-2* Linien zeigten wie auch *tpt-2* einen signifikant verringerten Anteil an Arginin (Arg) im Vergleich zu Col-0. Die Abundanz anderer AS war in den amiRNA:*XPT tpt-2* Linien zum Teil ähnlich *tpt-2/xpt-1*. So waren auch in diesen die Gehalte an Asp, Thr, Phe, Trp und Val signifikant, die der weiteren von Pyruvat, Aspartat und Shikimat abgeleiteten AS tendenziell erhöht (Signifikanztafel 8.6 N). In *adg1-1/tpt-2* waren die Gesamtaminosäuren im Vergleich zum WT ebenfalls verringert. Hier zeigte sich auch eine starke Reduktion des Glycingehaltes, wohingegen der Seringehalt im Vergleich zu den anderen Linien stark erhöht war. Eine Auftragung des Glycins- bzw. Seringehaltes gegen die ETR der einzelnen Pflanzenlinien offenbarte einen direkten Zusammenhang von Gly mit der ETR nicht aber für Ser (Abb. 3.16 C und D). Es zeigten sich zwischen den Pflanzenlinien mit Ausnahme von *adg1-1/tpt-2* tendenziell ähnliche Seringehalte im Fließgleichgewicht.

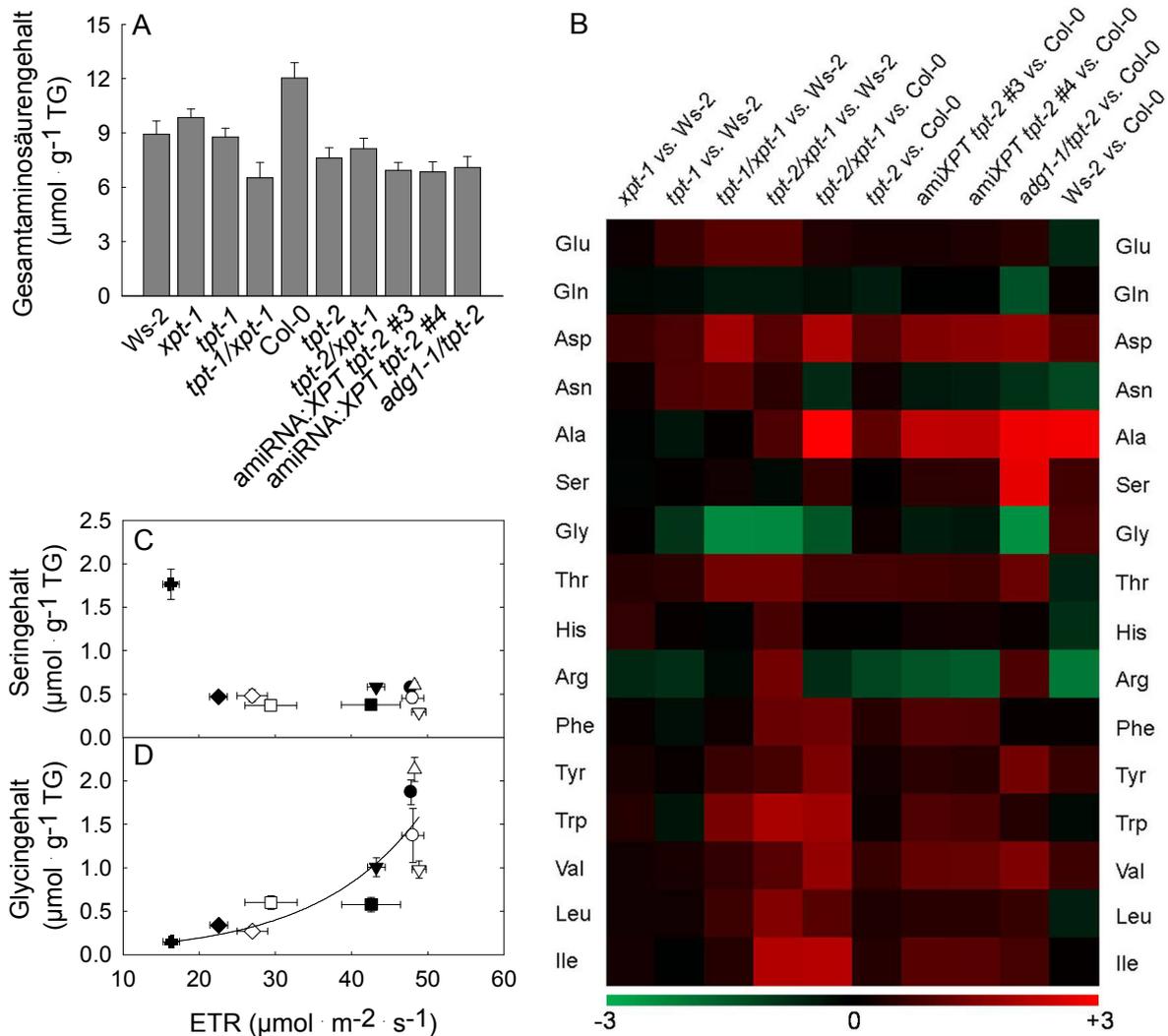


Abbildung 3.16: Analyse der Gehalte an freien Aminosäuren. Die Pflanzen wurden im LT unter HL (PFD =  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) angezogen und die Aminosäuren ganzer Blattrosetten nach 8 h Belichtung analysiert. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway ANOVA* und anschließendem *Tukey Kramer post hoc* Test ermittelt und sind in den Signifikanztafeln 8.6 N und O bildlich dargestellt. Die tatsächlichen Werte zu prozentualen und auch absoluten Aminosäuregehalten finden sich unter 8.4 Tabelle 8.3 und 8.4.

A: Gesamtgehalt freier AS in den einzelnen Pflanzenlinien. B: Heatmap zu den prozentualen Anteilen der AS vom Gesamtaminosäuregehalt als  $\log_2$  ratio zum jeweiligen WT. C: Auftragung des absoluten Seringehalts gegen die ETR der einzelnen Pflanzenlinien. D: Auftragung des absoluten Glycingehalts gegen die ETR der einzelnen Pflanzenlinien. Mutantenzuordnung: Ws-2 (schwarzer Kreis), Col-0 (weißer Kreis), xpt-1 (weißes Dreieck Spitze nach oben), tpt-1 (schwarzes Dreieck Spitze nach unten), tpt-2 (weißes Dreieck Spitze nach unten), tpt-1/xpt-1 (weiße Raute), tpt-2/xpt-1 (schwarze Raute), amiRNA:XPT tpt-2 #3 (schwarzes Quadrat), amiRNA:XPT tpt-2 #4 (weißes Quadrat), adg1-1/tpt-2 (schwarzes Kreuz). MW  $\pm$  SF; n = 3-5.

Zusammenfassend weisen die ermittelten Gesamtgehalte von Stärke, löslichen Zuckern sowie Aminosäuren im Fließgleichgewicht nicht auf einen Kohlengerüstmangel in *tpt/xpt* hin. Die Unterschiede in der Abundanz der Aminosäuren implizieren jedoch Veränderungen im metabolischen Fluss.

### 3.2.6 Untersuchungen zum Photosyntheseephänotyp in *tpt/xpt*

In *adg1-1/tpt-1* und *adg1-1/tpt-2* ist ein Teil des erhöhten  $F_0$  dunkeladaptierter Blätter durch einen teilweise weiterhin reduzierten PQ-Pool bedingt. Die partielle Reduktion des PQ-Pools im Dunkeln konnte bei Häusler *et al.* (2009) sowie Schmitz *et al.* (2012) durch spezifische Anregung von PSI mit dunkelrotem Licht (FR) gelöscht werden und auf den Prozess der Chlororespiration (siehe Review Peltier und Cournac, 2002) im Dunkeln zurückgeführt werden. Desweiteren konnte durch Belichtung mit aktinischem Licht (AL) das erhöhte  $F_0$  in *adg1-1/tpt-2* auf WT Niveau gesenkt werden (Abb. 3.17). Untersuchungen zur Abundanz der mit dem Photosyntheseapparat-assoziierten Proteine über immunologische Detektion nach Western Blot lieferten in *adg1-1/tpt-2* deutliche Unterschiede verglichen zu WT und Einzelmutanten. Interessanterweise war die Abundanz aller plastomkodierten Proteine, wie den Reaktionszentren der PS deutlich reduziert, während die Abundanz der kernkodierten Proteine, wie bspw. den LHCs vornehmlich nicht verändert war (Schmitz *et al.*, 2012). Anhand von Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K kann die energetische Kopplung der LHCs an die Reaktionszentren überprüft werden. In *adg1-1/tpt-2* konnten so Verschiebungen der Emissionspeaks von PSII und PSI festgestellt werden, die auf freie, nicht an die PS gebundene LHCs zurückzuführen sind (Schmitz *et al.*, 2012). Ungebundene LHCs sind hochfluoreszent und konnten bei *adg1-1/tpt-2* für einen Großteil der erhöhten Grundfluoreszenz verantwortlich gemacht werden (Schmitz *et al.*, 2012). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Grundlagen zur Entstehung des erhöhten  $F_0$  in *tpt/xpt* identisch zu *adg1-1/tpt-2* sind.

#### 3.2.6.1 Die spezifische Anregung von PSI oder Zugabe von aktinischem Licht führt zu keiner Abnahme der erhöhten Grundfluoreszenz in *tpt/xpt*

Durch Belichtung mit FR konnte für die dunkeladaptierte *tpt/xpt* keine teilweise Löschung des erhöhten  $F_0$  erzielt werden (Abb. 3.17). Wie im WT oder den Einzelmutanten (Daten nicht gezeigt) führte FR zu einem minimalen Anstieg des  $F_0$ -Wertes in *tpt/xpt*. Belichtung mit aktinischem Licht (AL) hatte zunächst eine kurzzeitige Löschung von  $F_0$  bis auf WT-Niveau zur Folge, wobei  $F_0$  im Anschluss auf einen Wert oberhalb des dunkeladaptierten  $F_0$ -Wertes von *tpt/xpt* und somit auch im Vergleich zum WT anstieg. Mit dem Ausschalten von AL kehrte die relative Chl *a* Fluoreszenz auf den  $F_0$ -Wert von dunkeladaptierten Blättern zurück. Die Gabe von gesättigten Lichtblitzen ( $4000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 800 ms) hatten im

dunkeladaptierten Zustand, während der Belichtung mit AL oder auch nach Ausschalten von AL keinen auffälligen Effekt bei *tpt/xpt* im Vergleich zu WT und Einzelmutanten (Abb 3.17). Die beiden Wildtypen sowie die Einzelmutanten zeigten untereinander ein nahezu identisches Verhalten bei Bestrahlung mit FR sowie AL; daher ist in Abb 3.17 exemplarisch nur der Ws-2 WT gezeigt.

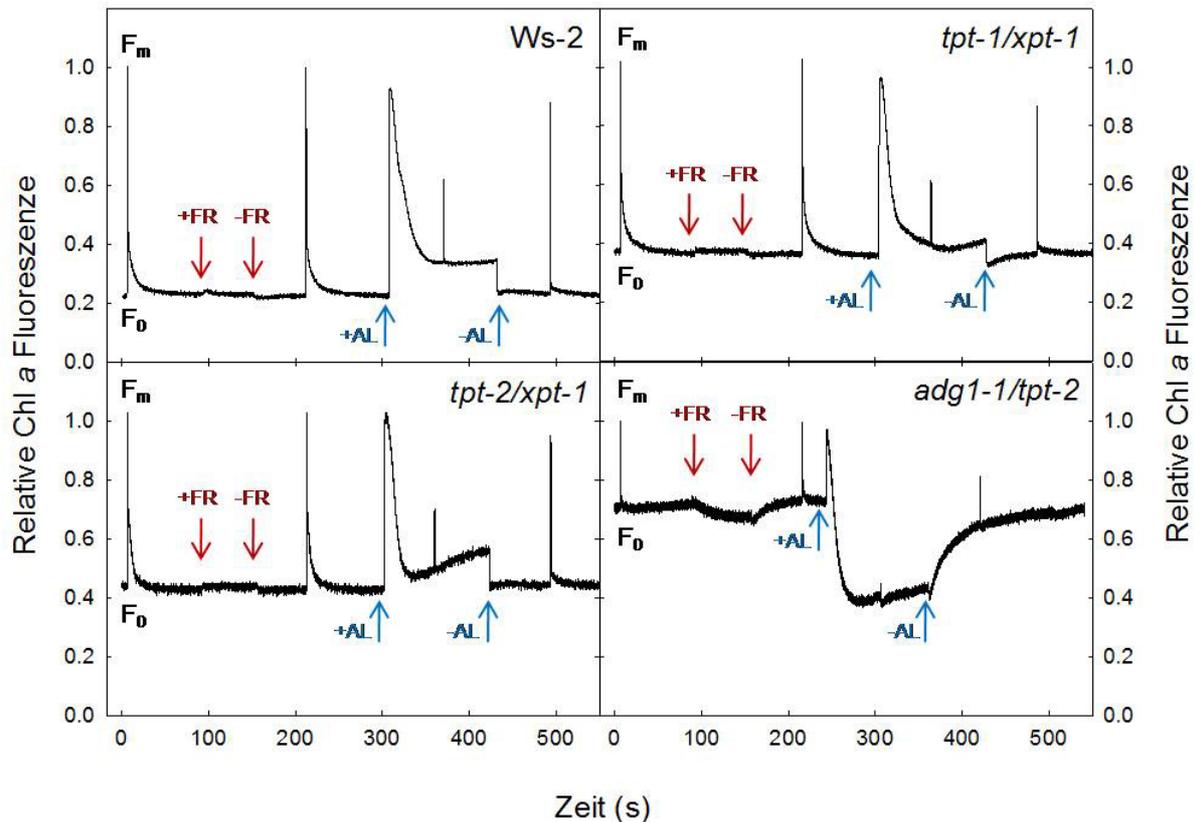


Abbildung 3.17: Einfluss von dunkelrotem (FR) bzw. aktinischem Licht (AL) auf die relative Chl a Fluoreszenz in *tpt/xpt*. Die Chl a Fluoreszenzkinetiken wurden mit der PAM2100 aufgenommen. Die weiteren Peaks gehen auf die Gabe von gesättigten Lichtblitzen (PFD =  $4000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 800 ms) zurück, wie auch die anfängliche Bestimmung von  $F_0$  und  $F_m$ . + = an, - = aus.

### 3.2.6.2 In *tpt/xpt* sind die Kernkomponenten der Reaktionszentren und des Cyt $b_6/f$ -Komplexes deutlich dezimiert

Für *adg1-1/tpt-2* zeigten Schmitz *et al.* (2012), dass vor allem plastomkodierte und weniger kernkodierte Proteine der Photosysteme deutlich in ihrer Häufigkeit verringert waren. Um einen Überblick zur Abundanz Photosynthese-assoziiierter Proteine in *tpt/xpt* zu erhalten, wurden einige plastom- und kernkodierte Proteine von PSII, dem Cyt  $b_6/f$ -Komplex sowie PSI immunologisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.18 zusammengestellt. Die Signalintensitäten der PSII-Kernkomponenten PsbA (D1) und PsbD (D2) von PSII waren um etwa 75% in *tpt-2/xpt-1* und 50% in *tpt-1/xpt-1* gegenüber dem WT

reduziert. Ähnlich verhielt es sich auch mit PsbE, der  $\alpha$ -Untereinheit von Cyt  $b_{559}$  welches in *tpt/xpt* um etwa die Hälfte im Vergleich zu Wildtypen und Einzelmutanten verringert war. Die detektierten Signale für Lhcb1 und Lhcb2, als Bestandteile der LHCII, waren in *tpt/xpt* hingegen nicht verringert und glichen den anderen Linien. Stellvertretend für den Cyt  $b_6/f$ -Komplex wurde die Abundanz des Rieske-Proteins (PetC) analysiert, welches an der Elektronenübertragung von PQ über die Cytochrom-*f*-Untereinheit auf PC beteiligt ist. Es zeigte sich eine Verringerung des Rieske-Proteins von etwa 50% in *tpt-2/xpt-1*, in *tpt-1/xpt-1* verhielt es sich tendenziell ähnlich. Lhca1, als Bestandteil der LHCI, zeigte keine deutliche Veränderung in der Abundanz in *tpt/xpt*, wohl aber die Kernkomponente des PSI-Reaktionszentrums PsaB. In *tpt/xpt* war PsaB um etwa 70% reduziert, die pigmentbindende Komponente PsaL war ebenfalls deutlich verringert.

Damit waren alle untersuchten plastomkodierte Untereinheiten des Photosyntheseapparats deutlich in ihrer Abundanz in *tpt/xpt* verringert. Bei den kernkodierten LHCs gab es keine Abnahmen in ihrer Abundanz, wohingegen die ebenfalls vom Kern kodierten Protein-UE PetC und PsaL deutlich in ihrer Häufigkeit verringert waren.

Zur Bestimmung der Abundanz von Photosynthesekomplexen in *tpt/xpt* wurden neben der immunologischen Detektion von Proteinuntereinheiten (Abb. 3.18) auch spektroskopische Messungen zu spezifischen Proteinuntereinheiten anhand isolierter Thylakoide durchgeführt. In Abb. 3.19 sind die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen zur Quantifizierung von PSII, dem Cyt  $b_6/f$ -Komplex sowie PSI dargestellt. Die bestimmten Komplexgehalte offenbarten in *tpt/xpt* deutliche Verringerungen ihrer Abundanz bezogen auf die Blattoberfläche und unterstützen somit die Ergebnisse der immunologischen Nachweise zu den Kernkomponenten dieser Komplexe (Signifikanztafel 8.6 P und Q). Interessanterweise ist der PSI Gehalt pro  $m^2$  in *xpt-1* verglichen zum WT signifikant erhöht; dies zeigte sich auch bei den Immunoblot Analysen durch ein deutlich intensiveres Signal für die PsaB Untereinheit des PSI (Signifikanztafel 8.6 Q). Die Wildtypen besaßen untereinander nahezu identische, die beiden *tpt* Mutanten hingegen tendenziell bzw. für PSI signifikant verringerte Komplexgehalte zu den Wildtypen (Signifikanztafel 8.6 P und Q).

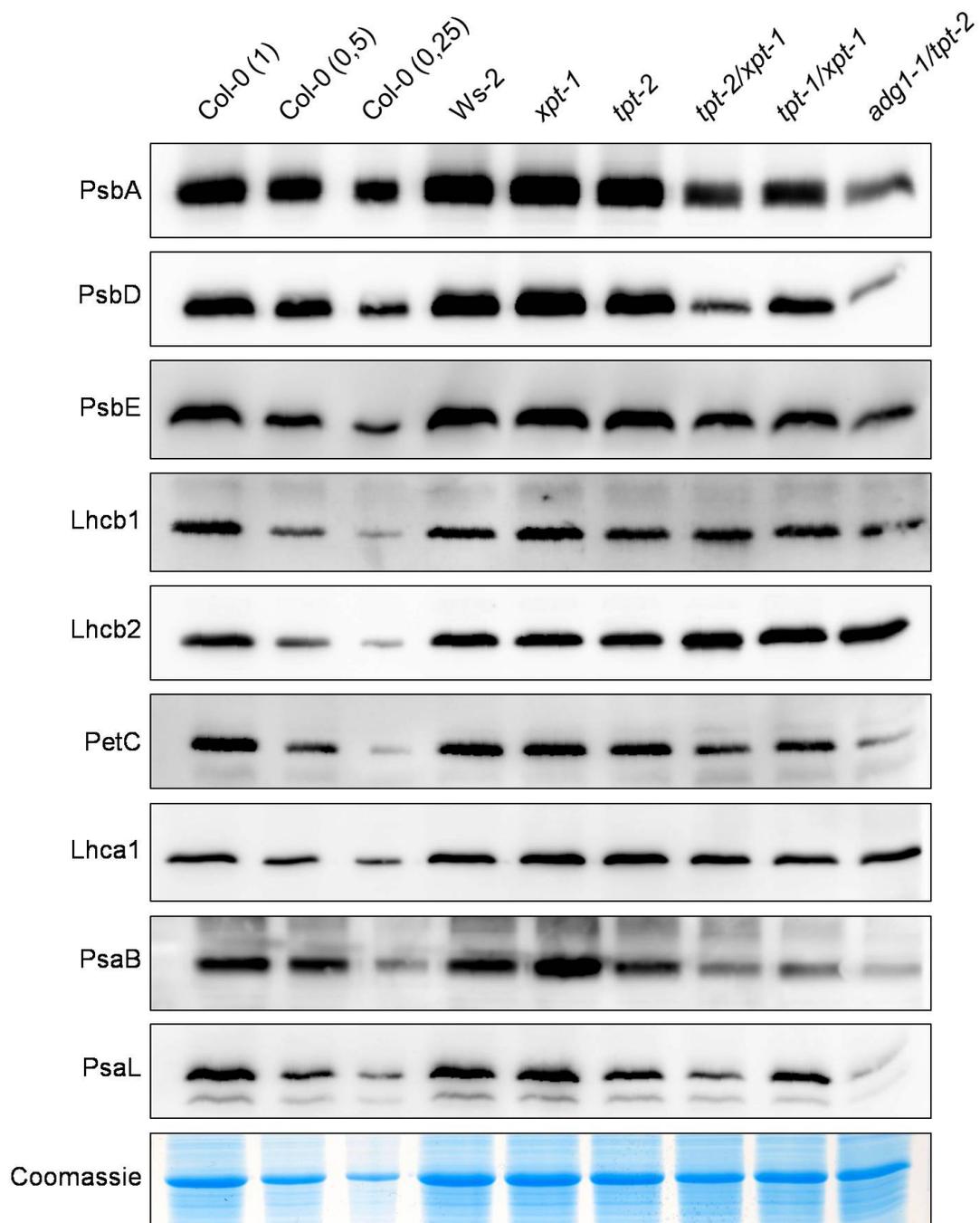


Abbildung 3.18: Immunologischer Nachweis von Photosyntheseapparat-assoziierten Proteinen. Es wurden in jede Proteingelkassette 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus Blattrosettenextrakten geladen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Abschätzung bzw. der Vergleichbarkeit der Proteinabundanz in den verschiedenen Pflanzenlinien wurde zusätzlich von Col-0 neben den 10  $\mu\text{g}$  (1) auch 5  $\mu\text{g}$  (0,5) und 2,5  $\mu\text{g}$  (0,25) Gesamtprotein aufgetragen. Die Extraktion der Proteine erfolgte von im LT unter HL ( $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) angezogener Blattrosetten.

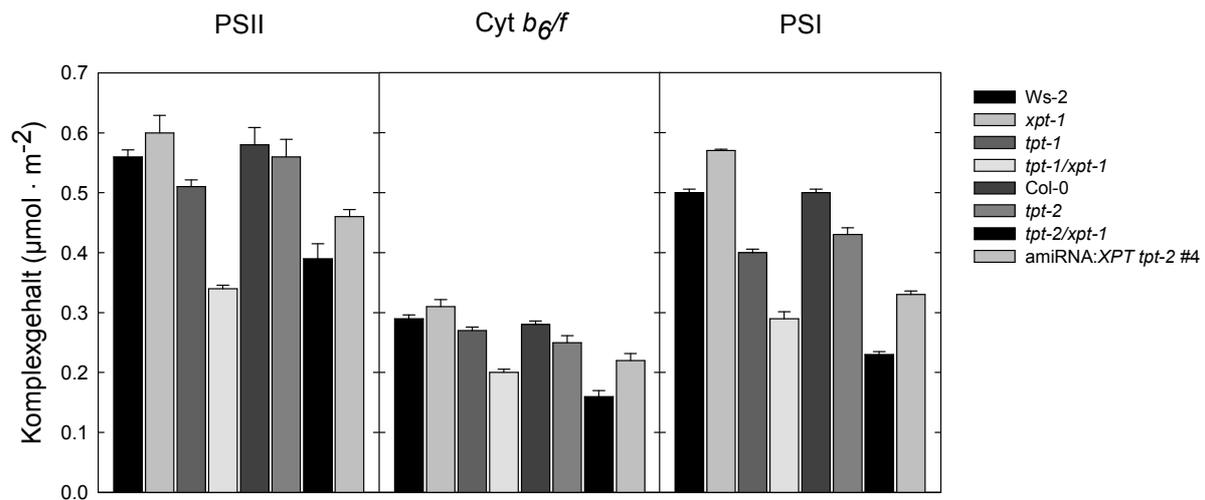
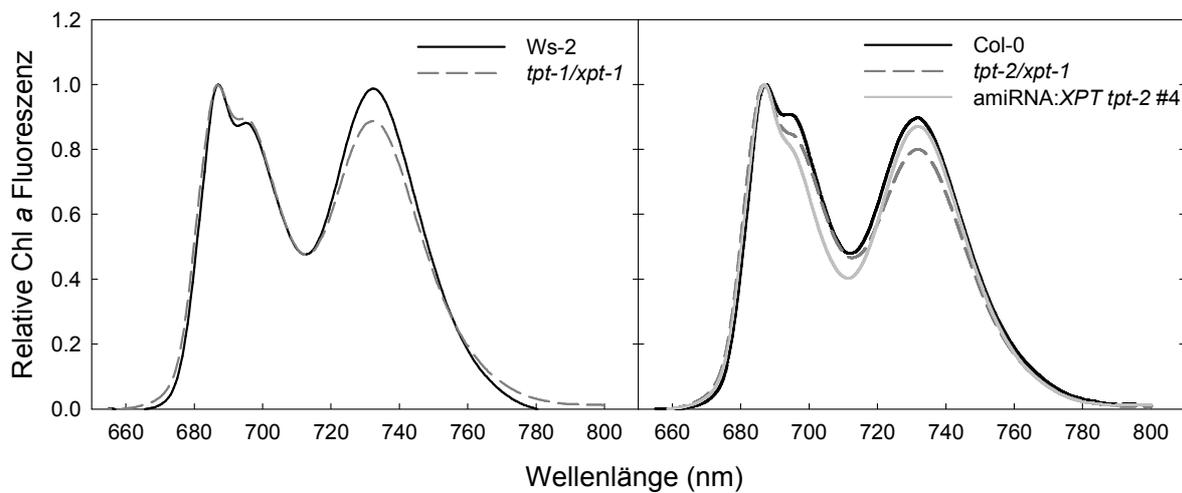


Abbildung 3.19: Ermittelte Gehalte an PSII, Cyt  $b_6/f$  und PSI in *tpt/xpt* über spektroskopische Analyse. Die spektroskopische Bestimmung der Komplexgehalte erfolgte anhand charakteristischer Absorptionssignale der jeweiligen Kernkomponenten. Die hierzu isolierten Thylakoide stammen von im LT unter HL angezogener Pflanzen. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway ANOVA* und anschließend *Tukey Kramer post hoc Test* ermittelt und sind in den Signifikanztafel 8.6 P und Q bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 3-4.

Die bei den immunologischen Untersuchungen festgestellte verringerte Abundanz von Protein-UE der PS-Reaktionszentren, nicht aber von Komponenten der LHCs könnten, wie es bereits für *adg1-1/tpt-2* gezeigt wurde (Schmitz *et al.*, 2012), auf freie nicht an die PS gebundene LHCs hindeuten. Diese ungebundenen LHCs könnten Ursache für das erhöhte  $F_0$  in *tpt/xpt* sein. Anhand von Chl *a* Fluoreszenz-Emissionsspektren bei 77 K wurde die Kopplung der LHCs an die Reaktionszentren in *tpt/xpt* über die Emissionsmaxima überprüft (Abb 3.20). Freie nicht an die PS gekoppelte LHCs führen zu einer Verschiebung des jeweiligen Emissionsmaximums. Im WT liegt das Emissionsmaximum von PSII-LHCII bei 687 nm, das von PSI-LHCI bei 732 nm (Abb. 3.20). Die bei 694 nm hervortretende Schulter ist auf PsbB (CP47) zurückzuführen. Für die Einzelmutanten (Daten nicht gezeigt) und *tpt/xpt* erhaltene Chl *a* Fluoreszenz-Emissionsspektren (Abb. 3.20) zeigen jedoch keine Verschiebung der Absorptionsmaxima im Vergleich zum WT. Somit sollten freien LHCs nicht an der erhöhten Fluoreszenz in *tpt/xpt* beteiligt sein. Das bei 732 nm (PSI-LHCI) deutlich vermindert Signal weist wiederum auf eine verringerte Abundanz von PSI im Vergleich zum WT hin, wohingegen bei 689 nm keine verringerte relative Chl *a* Fluoreszenz zu beobachten war. In *tpt-2/xpt-1* und auch *amiRNA:XPT tpt-2 #4* ist die von PsbB verursachte Schulter bei 694 nm ebenfalls deutlich verringert.



**Abbildung 3.20:** Relative Chlorophyll a Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K. Gezeigt sind die Emissionsspektren von *tpt/xpt* im Vergleich zu ihren Wildtypen. Der erste Peak bei 687 nm geht auf den PSII-LHCII-Komplex zurück, die Schulter dieses Peak ist auf CP47 (PsbB) von PSII zurückzuführen. Der zweite Peak bei 732 nm entspricht dem PSII-LHCI-Komplex. Die Wellenlänge zu den Peakmaxima in *tpt/xpt* entspricht denen der Wildtypen und deutet auf keinerlei Veränderung in der energetischen Kopplung der LHCs an die Reaktionszentren hin. Die untersuchten Thylakoide entstammen von im LT unter HL angezogenen Blattrosetten. MW; n = 3-4.

Die Beteiligung von einem im Dunkeln reduzierter PQ-Pool, sowie freier LHCs an der erhöhten  $F_0$ , wie es durch Schmitz *et al.* (2012) für *adg1-1/tpt-2* gezeigt wurde, können für *tpt/xpt* anhand der erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

### 3.3 Untersuchungen zur Rolle des XPT in der Vitalität von *adg1-1/tpt-2* und *cue1-6/ppt2-1*

#### 3.3.1 Ein kombinierter Funktionsverlust von *TPT* und *XPT* im stärkefreien Hintergrund ist letal

Ein doppelter Funktionsverlust von TPT und der AGPase, wie in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante oder auch der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutante, führt zu einer Retardierung des Wachstums sowie einem HCF-Phänotyp (Häusler *et al.*, 2009, Schmitz *et al.*, 2012). Die Mutanten sind jedoch weiterhin lebensfähig und die Phänotypen können fast vollständig durch Fütterung mit Glc oder Suc gerettet werden (Schmitz *et al.*, 2012). Da neben dem TPT auch der XPT TP transportieren kann (Eicks *et al.*, 2002) lag die Vermutung nahe, dass die Transportaktivität des XPT für die Lebensfähigkeit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verantwortlich ist. Um die Bedeutung des XPT für die Lebensfähigkeit der *adg1-1/tpt-2* Doppel- bzw. *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutante zu untersuchen, wurde die *xpt-1* Mutante in die *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutante eingekreuzt. Insbesondere bei Fütterung mit Suc oder Glc wird die Expression des endogenen GPT2 induziert (Bläsing *et al.*, 2005; Microarray data *pgm1* für MapMan; Kunz *et al.*, 2010, Schmitz *et al.*, 2012) und könnte daher bei Ausfall des TPTs sowohl Glc6P als auch TP exportieren (Kammerer *et al.*, 1998). Der zusätzliche Knockout des *GPT2* in der Dreifachmutante verhindert diesen alternativen Weg des Assimilatexports.

Pflanzen, die doppelthomozygot auf die *adg1-1* und *tpt-2* Mutation sowie doppelheterozygot auf die *xpt-1* und *gpt2-1* Mutation waren, wurden bis zur Samenreife gebracht. Die erhaltenen Samen wurden dann unter sterilen Bedingungen auf ½ MS-Medium mit 50 mM Suc gekeimt und die resultierenden Keimlinge mit Hilfe der ImagingPAM entsprechend ihres  $F_v/F_m$ -Verhältnisses (Abb. 3.21) auf frische Platten vorselektiert. Die Genotypisierung der Pflanzen mittels Stärketest und PCR zeigte, dass das  $F_v/F_m$ -Verhältnis mit den Genotypen zusammenhängt und die Funktionalität des GPT2 dabei eher geringeren Einfluss zu haben scheint (Abb. 3.21). Die Keimblätter von *adg1-1/tpt-2* Doppel- und *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutanten wiesen ein  $F_v/F_m$ -Verhältnis von etwa 0,4 bis 0,5 auf und erschienen farbkodiert blau-grün. Bei *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifach- und *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten, die heterozygot auf die Mutation im *XPT* waren, lag das  $F_v/F_m$ -Verhältnis bei 0,2 bis 0,3 und die Keimblätter erschienen grün-gelb. Hier traten häufig in der Mitte der Keimblätter schwarze Bereiche auf, die ein  $F_v/F_m$ -Verhältnis von 0 aufwiesen. Bei einer homozygoten Mutation im *XPT* erschienen die Keimblätter in den Dreifach- und Vierfachmutanten rot-orange und das  $F_v/F_m$ -Verhältnis lag etwa bei 0,1 bis 0,15.

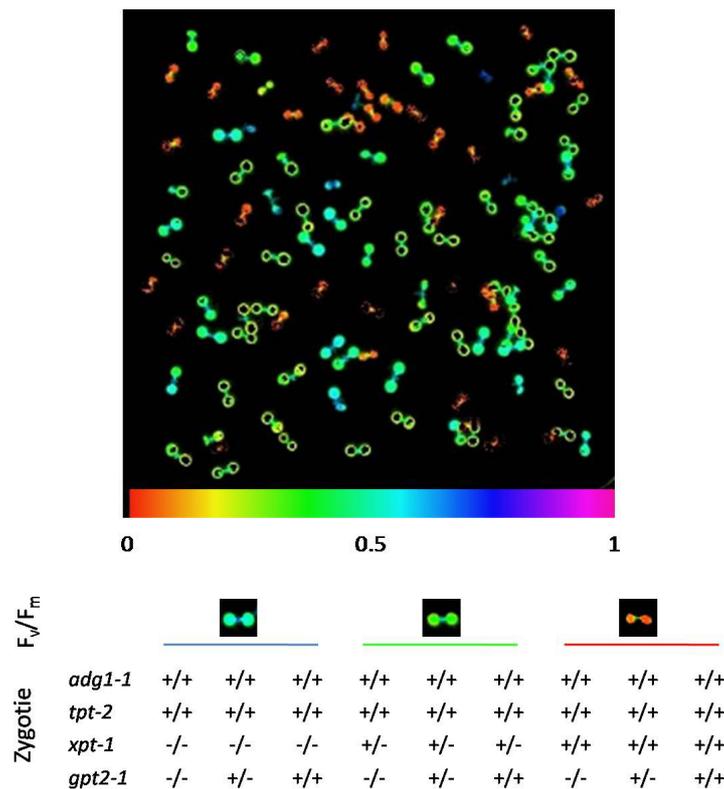


Abbildung 3.21: Durchmusterung unterschiedlich stark ausgeprägter HCF-Phänotypen über das  $F_v/F_m$ -Verhältnis. Oben: ImagingPAM-Bild in Falschfarben zum  $F_v/F_m$ -Verhältnis von auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 50 mM Suc angezogenen Keimlingen. Der Farbbalken dient dem Abschätzen des numerischen  $F_v/F_m$ -Verhältnisses. Unten: Bedeutung der Farben des  $F_v/F_m$ -Verhältnis für die Zygotie von *adg1-1/tpt-2* Doppel-, *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifach- bzw. *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten. -/- = wildtypisch auf beide Allele, +/- = heterozygot auf die Mutation, +/+ = doppelthomozygot auf die Mutation.

Nach 28 Tagen wurde ein Teil der Pflanzen von den Platten auf Erde überführt und ein zweiter Teil weiterhin auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium mit 50 mM Suc angezogen. Als Kontrolle wurden gleichalte *adg1-1/tpt-2* (Abb. 3.22, #6) ebenfalls von Platte auf Erde überführt. Auf Erde transferierte *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifach- bzw. *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten starben spätestens 15 Tage nach der Überführung auf Erde ab (Abb. 3.22, #22). Der Großteil der auf Erde überführten Dreifach- und Vierfachmutanten war jedoch bereits nach sechs Tagen abgestorben. Hierfür ist in Abb. 3.22 exemplarisch #23 gezeigt, die sich zwar in ihrer Blattrosettengröße, nicht aber genotypisch von #21 unterscheidet. Die in Abb. 3.22 gezeigten #21, #22 und #37 wiesen von insgesamt zehn auf Erde überführten in der *XPT* Mutation homozygoten Dreifach- und Vierfachmutanten die größten Blattrosetten auf und überlebten auch am längsten nach der Überführung auf Erde. Auf die *XPT*-Insertion heterozygote Dreifach- und Vierfachmutanten (Abb. 3.22, #10 und #16) waren wie auch *adg1-1/tpt-2* (Abb. 3.22, #6) auf Erde weiterhin lebensfähig und auch in der Lage, Schoten mit keimungsfähigen Samen zu bilden (Abb. 3.23 A).

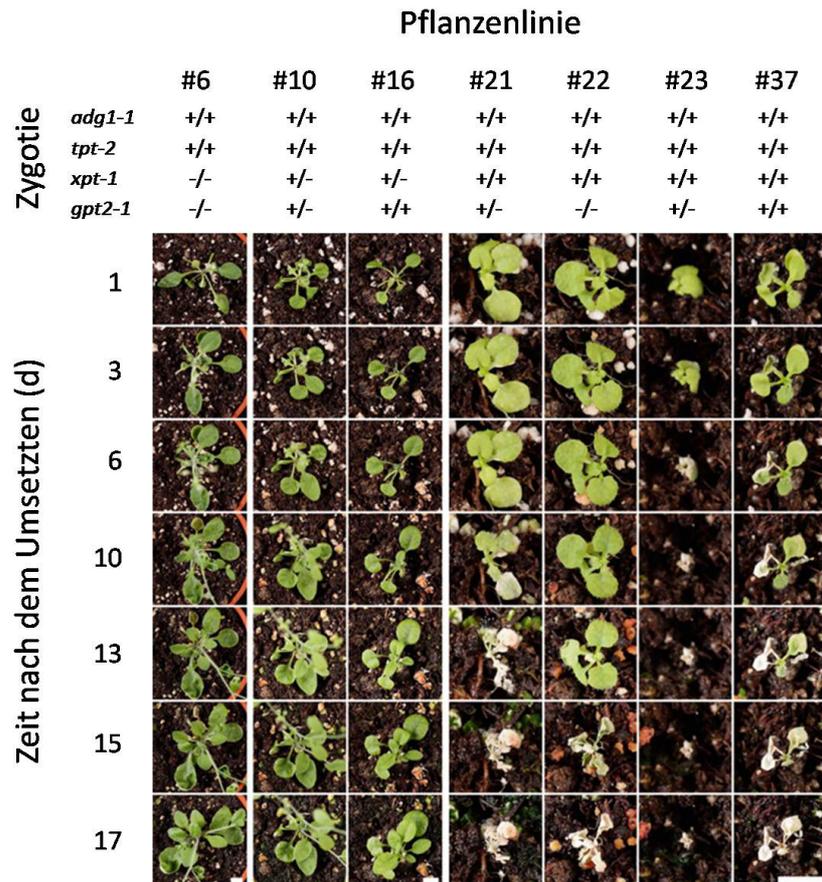


Abbildung 3.22: Darstellung des letalen Phänotyps der *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifachmutante bzw. *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutante. Die Pflanzen #21, #22 und #37 wiesen von insgesamt 10 auf Erde überführten und die *XPT* Mutation homozygoter Dreifach- und Vierfachmutanten die größten Blattrosetten auf und überlebten auch am längsten nach der Überführung auf Erde. Die kleinere Linie #23 hatte zwar eine weniger ausgeprägte Blattrosette, unterschied sich aber genotypisch nicht von Linie #21. Auf die *XPT* Insertion heterozygote Dreifach- und Vierfachmutanten (#10 und #16) waren vital und in der Lage sich zu reproduzieren. Als Kontrolle wurde auch *adg1-1/tpt-2* (#6) von  $\frac{1}{2}$  MS Platte auf Erde überführt. Zygotie: -/- = wildtypisch auf beide Allele, +/- = heterozygot auf die Mutation, +/+ = doppelthomozygot auf die Mutation. Der weiße Balken dient als Größenstandard und entspricht jeweils 5 mm.

Im *XPT* Allel heterozygote Vierfachmutanten waren auf Erde weiterhin lebens- und reproduktionsfähig (Abb. 3.22 und Abb. 3.23 A). Auf die *GPT2* Insertion heterozygote *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutanten, die auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium mit 50 mM Suc angezogen wurden, waren vital und auch in der Lage kleine Schoten mit Samen zu bilden (Abb. 3.23 B-D). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Lebensfähigkeit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante von der Transportaktivität des *XPT* abhängt.

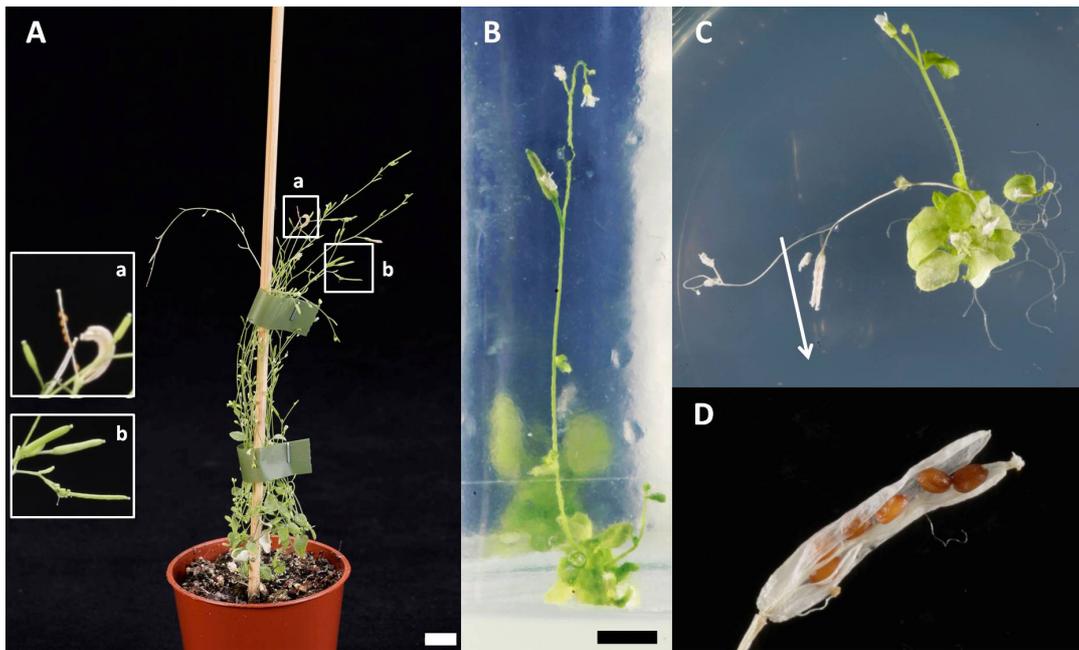


Abbildung 3.23: Schotenbildende Vierfachmutanten. A: Eine auf die *xpt-1* Mutation heterozygote *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutante ist bei Anzucht auf Erde lebens- und reproduktionsfähig. Dargestellt ist Linie #16 aus Abb. 22. Pflanzenalter 17 Wochen. a: Reife Schoten mit reifen Samen; b: Unreife grüne Schoten; Weißer Balken = 1 cm. B: Bei Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 50 mM Saccharose ist eine auf die *GPT2* Insertion heterozygote *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutante fähig Schoten zu bilden. Pflanzenalter 17 Wochen. Schwarzer Balken = 0,5 cm. C: In A abgebildete Pflanze eine Woche später mit reifer samenenthaltender Schote. C: Nahaufnahme der reifen Schote mit Samen aus B.

### 3.3.2 Ein Funktionsverlust des XPT im Hintergrund von *cue1-6/ppt2-1* hat keinen zusätzlichen Effekt auf Wachstum und Reproduktion.

In *A. thaliana* führt ein doppelter Funktionsverlust beider PPTs (PPT1 und PPT2) wie in der *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante zu keinem letalen Phänotyp (Staeher, Dissertation 2010). Die meisten Plastiden, so auch die Chloroplasten, sind jedoch auf den Import von PEP als Ausgangssubstrat für u.a. den Shikimatweg angewiesen, weil ihnen die Enolase fehlt, die 2-PGA in PEP umwandelt. Da die *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante weiterhin lebensfähig ist, sollte es einen weiteren Weg geben, über den PEP in die Plastiden gelangt. Transport- und Inhibitionsstudien mit einem heterolog exprimierten XPT Protein aus *A. thaliana* lieferten Hinweise auf einen pH-Wert abhängigen bzw. ladungsabhängigen Transport von PEP über den XPT (Eicks *et al.*, 2002; Hilgers, Diplomarbeit 2011). Um das Fehlen des XPT bei gleichzeitigem Funktionsverlust beider PPTs zu untersuchen wurde die *xpt-1* Mutante in die *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante eingekreuzt. Die resultierende *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante ist weiterhin lebensfähig (Abb. 3.24).

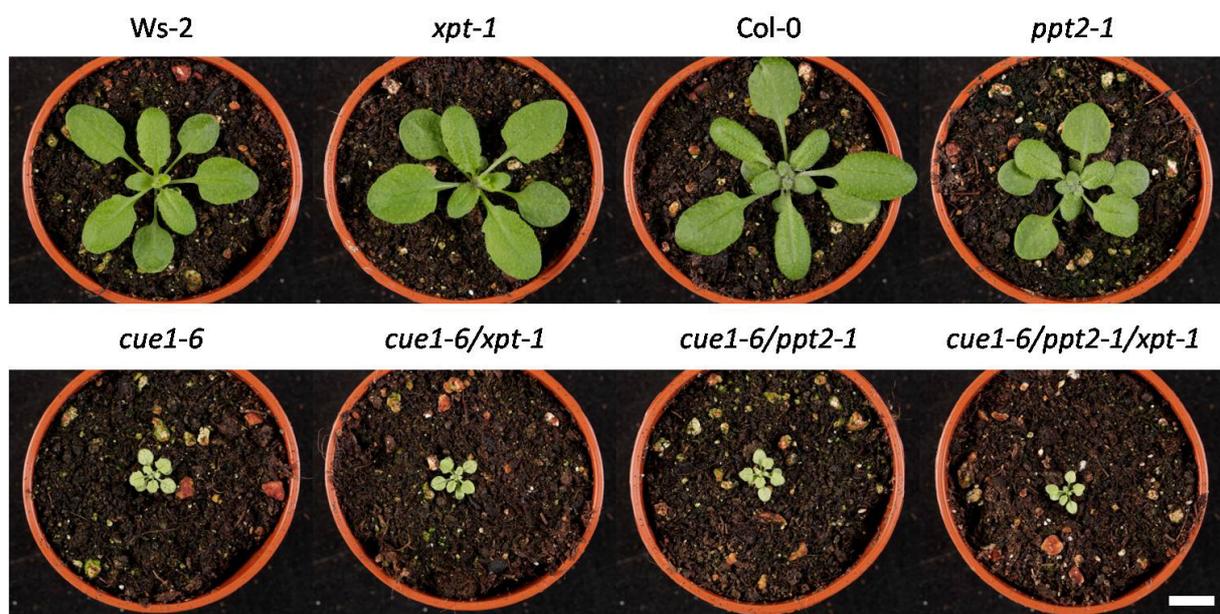
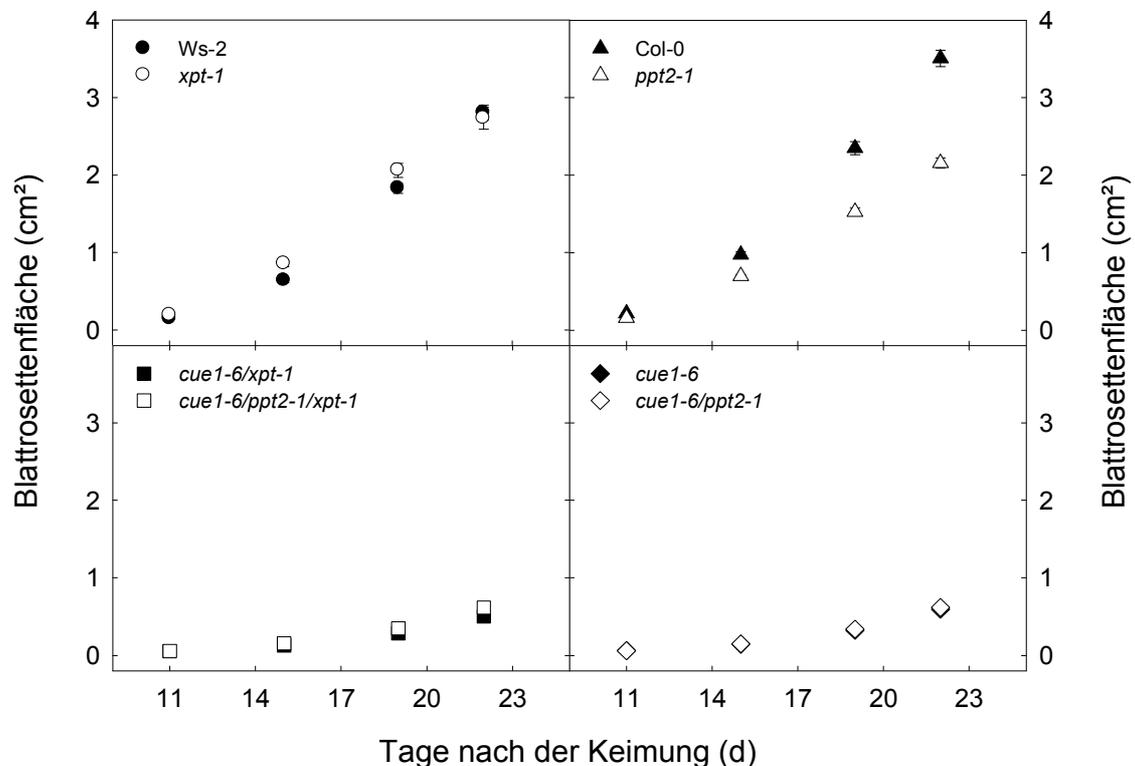


Abbildung 3.24: Wachstumsphtyp der *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante. Gezeigt ist die *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante bei Anzucht auf Erde im Vergleich zu WT, Einzel- und Doppelmutanten 16 Tage nach der Keimung. Die Anzucht erfolgte unter LT-Bedingungen bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Der weiße Balken entspricht 1 cm.

Die *cue1-6* Einzelmutante weist neben retikulierten Blättern und deutlich kleineren Blattrosetten auch ein stark verringertes Wurzelwachstum auf (Streatfield *et al.*, 1999; Staeher *et al.*, 2014). Durch Pfropfungsexperimente konnte bereits gezeigt werden, dass Blattrosetten- und Wurzelphänotyp jedoch unabhängig voneinander sind (Löttgert, Dissertation 2007; Staeher *et al.*, 2014). Um zu überprüfen, ob der zusätzliche Ausfall vom XPT im Hintergrund der *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante einen zusätzlichen Einfluss auf das

Pflanzenwachstum hat, wurde das Blattrosetten- und Wurzelwachstum der Dreifachmutante im Vergleich zu Doppel- und Einzelmutanten sowie der Wildtypen analysiert. Während *cue1-6*, *cue1-6/ppt2-1*, *cue1-6/xpt-1* und *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* im Vergleich zu den Wildtypen (Ws-2 und Col-0), der *xpt-1* und der *ppt2-1* Einzelmutante signifikant kleinere Blattrosettenflächen (Abb. 3.25, Signifikanztafel 8.6 R) und Wachstumsraten (nicht gezeigt) aufwiesen, brachte der weitere Ausfall von PPT2 und/oder XPT im Hintergrund der *cue1-6* Mutante keinen zusätzlichen signifikanten Unterschied zu *cue1-6*. Die *xpt-1* Mutante besaß 11 und 15 Tage nach der Keimung eine signifikant vergrößerte Blattrosettenfläche gegenüber dem WT (Ws-2); in *ppt2-1* hingegen war diese über den gesamten Messzeitraum signifikant zum WT (Col-0) verringert (Abb. 3.25, Signifikanztafel 8.6 R).



**Abbildung 3.25:** Analyse des Blattrosettenwachstums über die Zeit der *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante. Die Pflanzen wurden im LT bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten angezogen und alle 3-4 Tage die Blattrosettenfläche bestimmt. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway ANOVA* und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt und sind in Signifikanztafel 8.6 R bildlich dargestellt.  $\text{MW} \pm \text{SF}$ ;  $n = 15 - 16$ .

Für die Analyse des Wurzelwachstums wurden die Wurzellängen von 9 Tage alten Pflanzen bestimmt, nach 8 Tagen erneut vermessen und aus der Differenz der Wurzellängen die Zuwachsrate (cm/d) und der prozentuale Zuwachs (%) pro Tag berechnet. Die in Tabelle 3.4 zusammengefasste Analyse zeigt keinen signifikanten additiven Effekt durch den zusätzlichen Ausfall von XPT und/oder PPT2 im *cue1-6* -Hintergrund verglichen mit der *cue1-6* Einzelmutante (Tab. 3.4, Signifikanztafel 8.6 R). Für *xpt-1* bzw. *ppt2-1* Mutante zeigt sich kein Unterschied im Wurzelwachstum gegenüber dem jeweiligen WT (Ws-2 bzw. Col-0).

Tabelle 3.4: Analyse des Wurzelwachstums von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1*. Die Wurzellänge wurde zunächst bei 9 Tage alten Pflanzen (I) bestimmt und ein weiteres Mal nach 8 Tagen (II). Aus der Differenz ( $\Delta$ ) der Werte (II-I) wurde dann der tägliche Zuwachs der Wurzel berechnet. Die Anzucht erfolgte vertikal bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten. Signifikante Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp sind fett gedruckt in der Tabelle und wurden über *oneway* ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt. Die signifikanten Unterschiede sind in der Signifikanztafel 8.6 R bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 11-12.

	Wurzellänge (cm)			Zuwachs	
	I	II	$\Delta$	(cm/d)	%
Ws-2	2,51 $\pm$ 0,10	7,08 $\pm$ 0,18	4,57 $\pm$ 0,15	0,57 $\pm$ 0,02	22,8
<i>xpt-1</i>	2,82 $\pm$ 0,17	8,37 $\pm$ 0,34	5,55 $\pm$ 0,46	0,69 $\pm$ 0,06	24,6
<i>cue1-6/xpt-1</i>	<b>1,53 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>4,57 <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>3,04 <math>\pm</math> 0,41</b>	<b>0,38 <math>\pm</math> 0,05</b>	24,9
<i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i>	<b>1,57 <math>\pm</math> 0,15</b>	<b>4,07 <math>\pm</math> 0,27</b>	<b>2,51 <math>\pm</math> 0,32</b>	<b>0,31 <math>\pm</math> 0,04</b>	20,0
<i>cue1-6/ppt2-1</i>	<b>1,39 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>4,48 <math>\pm</math> 0,44</b>	<b>3,09 <math>\pm</math> 0,40</b>	<b>0,39 <math>\pm</math> 0,05</b>	27,7
<i>cue1-6</i>	1,60 $\pm$ 0,18	<b>4,91 <math>\pm</math> 0,39</b>	<b>3,31 <math>\pm</math> 0,41</b>	<b>0,41 <math>\pm</math> 0,05</b>	26,0
<i>ppt2-1</i>	2,37 $\pm$ 0,20	7,51 $\pm$ 0,27	5,14 $\pm$ 0,35	0,64 $\pm$ 0,04	27,1
Col-0	2,21 $\pm$ 0,25	8,32 $\pm$ 0,33	6,11 $\pm$ 0,37	0,76 $\pm$ 0,05	34,5

Streatfield *et al.*, 1999 zeigten, dass in den *cue1* Mutanten auch die Photosyntheseleistung verringert ist, daher wurde auch die Photosyntheseeffizienz an PSII bei den Mehrfachmutanten überprüft. Eine zusätzliche Defizienz von PPT2 im Hintergrund von *cue1-6* hatte keinen weiteren Einfluss auf die Photosyntheseleistung (Tab. 3.5). In der *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante, die einen zusätzlichen Ausfall des XPTs aufweist, zeigten sich hingegen signifikante Unterschiede im  $F_v/F_m$ -Verhältnis sowie der ETR (Signifikanztafel 8.6 S). Im Vergleich zu den anderen Pflanzenlinien waren sowohl  $F_v/F_m$  im dunkeladaptierten Zustand signifikant verringert, als auch die ETR bei einer PFD von  $164 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Wachstumslicht). Die ETR von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* bei  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (gesättigtes Licht, Lichtkurve) war nur im Vergleich zu den WTs, *xpt-1*, *ppt2-1* und *cue1-6/ppt2-1* signifikant verringert (Signifikanztafel 8.6 S). Die *xpt-1* und *ppt2-1* Mutante unterschied sich in ihren Photosyntheseparametern nicht vom jeweiligen WT (Tab 3.5, Signifikanztafel 8.6 S).

Die verringerte ETR in *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* und den weiteren Linien, die einen Ausfall von PPT1 zeigen, sind möglicherweise eine Konsequenz des signifikant reduzierten Chlorophyllgehaltes (Tab. 3.6). Insbesondere im Vergleich zum WT sind die Chlorophyllgehalte in der Dreifachmutante nahezu halbiert (Tab. 3.6). Bezieht man die maximale ETR auf den Chlorophyllgehalt, erhält man jedoch für alle Pflanzenlinien recht ähnliche Werte (Tab. 3.6, max. ETR/Chl). Weitere Parameter, wie Chl *a/b* Verhältnis,

Tabelle 3.5: Analyse der Photosyntheseparameter von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1*. Die Pflanzen wurden bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in der LT-Phytokammer auf Erde angezogen. Die PFD bei der Induktion der Photosynthese für die Analyse der ETR im Fließgleichgewicht betrug  $164 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die Bestimmung der maximalen ETR erfolgte aus den Lichtkurven bei einer PFD von  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Signifikante Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp sind fett gedruckt, zusätzliche Unterschiede zu *cue1-6* kursiv in der Tabelle dargestellt und wurden über oneway ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt. Die signifikanten Unterschiede sind in der Signifikanztafel 8.6 S bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 9.

	F <sub>o</sub>	F <sub>m</sub>	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	ETR	Max. ETR
Ws-2	0,235 $\pm$ 0,013	0,978 $\pm$ 0,049	0,760 $\pm$ 0,002	33,9 $\pm$ 0,5	80,8 $\pm$ 2,3
<i>xpt-1</i>	0,237 $\pm$ 0,010	1,024 $\pm$ 0,035	0,769 $\pm$ 0,002	34,3 $\pm$ 0,2	85,6 $\pm$ 3,9
<i>cue1-6/xpt-1</i>	<b>0,199 <math>\pm</math> 0,005</b>	<b>0,685 <math>\pm</math> 0,020</b>	<b>0,708 <math>\pm</math> 0,009</b>	<b>29,0 <math>\pm</math> 1,1</b>	<b>57,1 <math>\pm</math> 3,9</b>
<i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i>	0,244 $\pm$ 0,009	<b>0,707 <math>\pm</math> 0,016</b>	<b>0,655 <math>\pm</math> 0,009</b>	<b>25,8 <math>\pm</math> 1,2</b>	<b>46,4 <math>\pm</math> 2,3</b>
<i>cue1-6/ppt2-1</i>	0,235 $\pm$ 0,007	<b>0,781 <math>\pm</math> 0,016</b>	<b>0,699 <math>\pm</math> 0,006</b>	31,5 $\pm$ 0,6	<b>58,5 <math>\pm</math> 1,7</b>
<i>cue1-6</i>	0,231 $\pm$ 0,008	<b>0,779 <math>\pm</math> 0,022</b>	<b>0,704 <math>\pm</math> 0,004</b>	<b>30,2 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>58,2 <math>\pm</math> 1,9</b>
<i>ppt2-1</i>	0,227 $\pm$ 0,005	0,934 $\pm$ 0,019	0,757 $\pm$ 0,003	35,2 $\pm$ 0,2	83,3 $\pm$ 1,9
Col-0	0,247 $\pm$ 0,007	1,000 $\pm$ 0,027	0,753 $\pm$ 0,002	33,9 $\pm$ 0,5	81,4 $\pm$ 3,1

Tabelle 3.6: Physiologische Parameter von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1*. Bestimmung des Pigment- und Proteingehaltes sowie des spezifischen Blatttrockengewichts (FG) von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1*. Die Pflanzen wurden bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in der LT-Phytokammer auf Erde angezogen. Signifikante Unterschiede zum korrespondierenden Wildtyp sind fett gedruckt in der Tabelle und wurden über oneway ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt. Die signifikanten Unterschiede sind in der Signifikanztafel 8.6 S bildlich dargestellt. MW  $\pm$  SF; n = 4-10.

	Chl (mg/m <sup>2</sup> )	Car (mg/m <sup>2</sup> )	Chl a/b	Chl/Car	Protein (g/m <sup>2</sup> )	FG (g/m <sup>2</sup> )	Max. ETR/Chl
Ws-2	192,29 $\pm$ 10,53	19,97 $\pm$ 2,40	3,18 $\pm$ 0,03	10,16 $\pm$ 1,25	3,51 $\pm$ 0,08	206,18 $\pm$ 4,35	0,42
<i>xpt-1</i>	194,94 $\pm$ 4,62	20,14 $\pm$ 1,66	3,17 $\pm$ 0,08	9,88 $\pm$ 0,64	3,66 $\pm$ 0,28	217,67 $\pm$ 5,98	0,44
<i>cue1-6/xpt-1</i>	<b>135,50 <math>\pm</math> 8,47</b>	23,82 $\pm$ 0,61	2,79 $\pm$ 0,13	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,23</b>	3,23 $\pm$ 0,50	<b>171,91 <math>\pm</math> 12,21</b>	0,42
<i>cue1-6/ppt2-1/xpt-1</i>	<b>109,96 <math>\pm</math> 7,26</b>	21,58 $\pm$ 1,37	2,83 $\pm$ 0,19	<b>5,10 <math>\pm</math> 0,13</b>	3,06 $\pm$ 0,27	<b>164,49 <math>\pm</math> 13,35</b>	0,42
<i>cue1-6/ppt2-1</i>	<b>127,48 <math>\pm</math> 9,36</b>	22,33 $\pm$ 1,20	2,72 $\pm$ 0,07	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,33</b>	3,07 $\pm$ 0,28	<b>178,73 <math>\pm</math> 12,70</b>	0,46
<i>cue1-6</i>	<b>115,13 <math>\pm</math> 3,07</b>	21,92 $\pm$ 0,93	3,23 $\pm$ 0,27	<b>5,28 <math>\pm</math> 0,24</b>	3,11 $\pm$ 0,51	<b>166,80 <math>\pm</math> 10,91</b>	0,51
<i>ppt2-1</i>	203,51 $\pm$ 7,74	19,38 $\pm$ 1,45	3,10 $\pm$ 0,01	10,70 $\pm$ 0,75	3,30 $\pm$ 0,09	230,56 $\pm$ 4,92	0,41
Col-0	200,60 $\pm$ 4,69	22,23 $\pm$ 0,62	3,20 $\pm$ 0,07	9,04 $\pm$ 0,25	3,39 $\pm$ 0,26	242,57 $\pm$ 14,19	0,41

Carotinoid- und Proteingehalt, korrelieren hingegen nicht mit der ETR. Veränderungen im spezifischen Blattrosettgewicht wie in *cue1-6* weisen auf ein verringertes Verhältnis von Mesophyllzellen zu Interzellularräumen hin. Jedoch sind die durch den Verlust des XPT und/oder PPT2 bewirkten zusätzlichen Veränderungen im Hintergrund von *cue1-6* nur sehr geringfügig und nicht signifikant (Signifikanztafel 8.6 S).

Eine Bestimmung der Schotenanzahl pro Pflanze sowie des Pflanzengewichts (Abb. 3.26) nach Anzucht für sieben Wochen auf Erde zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den *cue1-6* Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten. Die Schotenanzahl von *xpt-1* war verglichen mit *Ws-2* signifikant erhöht, während es zwischen *ppt2-1* und *Col-0* keine Unterschiede gab (Signifikanztafel 8.6 R).

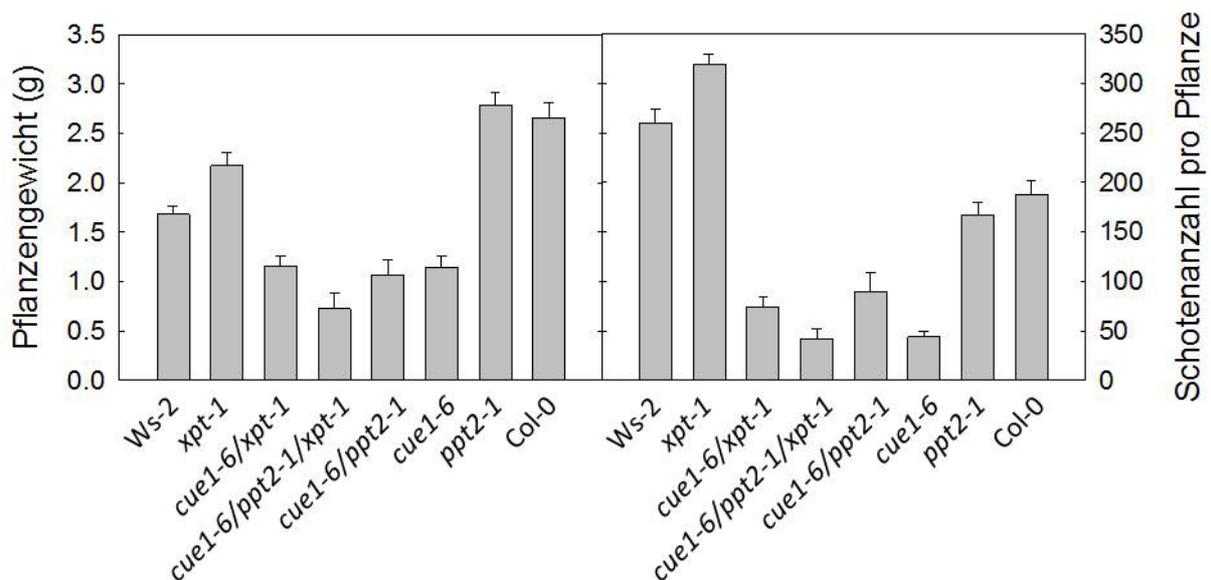


Abbildung 3.26: Pflanzengewicht und Schotenanzahl der *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante. Für die Bestimmung des Pflanzengewichts und der Schotenanzahl pro Pflanze wurden die Pflanzen für sieben Wochen bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in der LT-Phytokammer auf Erde angezogen. Für die Bestimmung des Pflanzengewichts wurde die Wurzel entfernt und der oberirische Teil der Pflanze gewogen. Im Anschluss wurden die Schoten gezählt. Signifikante Unterschiede wurden über *oneway* ANOVA und anschließendem Tukey Kramer *post hoc* Test ermittelt. Die signifikanten Unterschiede sind in der Signifikanztafel 8.6 S bildlich dargestellt.  $\text{MW} \pm \text{SF}$ ;  $n = 8 - 10$

Zusammengefasst scheint der XPT nicht für die Lebensfähigkeit der *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante verantwortlich zu sein und sein Ausfall im Hintergrund der *cue1-6* Einzel- sowie *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante wenig Einfluss auf die Fitness der Pflanze zu haben.

## 4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Einbindung des plastidären Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokators (XPT) in Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen von *A.thaliana*. Der XPT ist als *single-copy* Gen ubiquitär in *A. thaliana* exprimiert und es wird für ihn eine Funktion in der Verknüpfung von cytosolischem OPPP und plastidärem OPPP bzw. RPPP angenommen (Eicks *et al.*, 2002). Durch die Bereitstellung von unterschiedlichen Kohlenstoffgerüsten über RPPP und OPPP für Synthesewege, sowie seiner energetischen Bedeutung durch die Bereitstellung von NAD(P)H (Schopfer und Brennicke, 2006; Heldt und Piechulla, 2008) könnte ein Metabolitaustausch über den XPT essentiell sein. Ein Ausfall des XPT könnte daher Auswirkungen auf eine Vielzahl an Stoffwechselwegen haben. Im Vorfeld wurde bereits im Rahmen einer Doktorarbeit (Eicks, 2004) sowie einer Diplomarbeit (Hilgers, 2011) der vollständige Funktionsverlust des XPT anhand der *xpt-1* Mutante im Vergleich zu ihrem Wildtyp (Ws-2) phänotypisch untersucht. Hierbei wurde durch Eicks (Dissertation 2004), eine verringerte Photosyntheseleistung, sowie Veränderungen in Stärke- und löslichen Zuckergehalten beobachtet. Dies konnte jedoch bei Untersuchungen durch Hilgers (Diplomarbeit 2011) nicht bestätigt werden. Dort konnten während der vegetativen Entwicklung keine morphologischen oder physiologischen Unterschiede zwischen WT und Mutante festgestellt werden, wohl aber während der generativen Entwicklung. Neben einer erhöhten Schotenanzahl und einer verringerten Gesamtsamenanzahl pro Pflanze waren die Samen in *xpt-1* signifikant vergrößert (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Diese Beobachtungen, die möglicherweise interessant für biotechnologische Ansätze in Form von Ertragssteigerung bzw. gezielter Veränderungen in der Komposition von Speicherproteinen oder -lipiden sein könnten, sollten nach Etablierung weiterer unabhängiger *XPT*-Mutanten, verifiziert und tiefer analysiert werden. Daneben sollten weiterführende Analysen an Mehrfachmutanten zum besseren Verständnis der Funktion des XPT in Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen bei *A. thaliana* beitragen.

## 4.1 Ein Funktionsverlust des XPT führt zu keinem Phänotyp

Anhand der neu etablierten *xpt-2 knockout* Mutante, sowie den amiRNA:*XPT*-Ansätzen im *Ws-2* und *Col-0* Hintergrund konnte ein nicht vorhandener Phänotyp bei Ausfall des XPT während der vegetativen Entwicklung bestätigt werden. Es zeigten sich keine einheitlichen Veränderungen im Blattrosetten- oder aber Wurzelwachstum. Damit in Einklang stehen Daten zu physiologischen Parametern, wie Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteingehalt, dem Chl *a/b* Verhältnis sowie dem spezifischen Blattrosettengewicht. Untersuchungen mit der ImagingPAM zur Photosyntheseeffizienz an PSII ließen ebenfalls keine deutlichen Veränderungen erkennen. Auch die Analyse zu den Gehalten an Stärke und löslichen Zuckern im Tagesverlauf (innerhalb den Untersuchungen zu den *tpt/xpt* Doppelmutanten), offenbarten für *xpt-1* erneut keine starke Akkumulation löslicher Zucker oder Veränderungen im Stärkemetabolismus im Vergleich zum WT (siehe Eicks, Dissertation 2004 und Hilgers, Diplomarbeit 2011).

Die im Rahmen der Diplomarbeit (Hilgers, 2011) festgestellten Unterschiede von *xpt-1* zum WT während der generativen Entwicklung konnten für *xpt-1* erneut beobachtet werden, nicht aber für die anderen *xpt*-Allele (Tab. 3.1). Die Analyse der vergrößerten Samen von *xpt-1* hinsichtlich der Hauptspeicherkomponenten offenbarte einen signifikant erhöhten Protein-, sowie Fettsäuregehalt. Die Komposition der Proteine und Fettsäuren war allerdings sehr ähnlich zum WT. Da vergrößerte Samen und erhöhte Protein- und Fettsäuregehalte für *xpt-2* sowie den amiRNA:*XPT Ws-2 knockdown* Linien nicht festgestellt werden konnte, handelt es sich dabei möglicherweise entweder um einen ökotypspezifischen Effekt für *Ws-2*, der nur bei einem vollständigen Funktionsverlust des XPT auftritt oder aber um eine zweite Mutation im Hintergrund von *xpt-1*. Über Southern Blot Analysen von *xpt-1* konnte jedoch von Eicks (Dissertation, 2004) eine weitere T-DNA-Insertion ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist im Laufe der Jahre eine weitere Mutation bspw. durch UV-Licht im Hintergrund von *xpt-1* entstanden, die zu den Veränderungen im generativen Wachstum führt. Damit hier eine genauere Aussage getroffen werden kann, müsste eine weitere *knockout* Linie des *XPT* im *Ws-2* Hintergrund etabliert werden, um anhand dieser den Phänotyp der Samen von *xpt-1* zu überprüfen. Eine weitere Möglichkeit, um zu überprüfen, ob die Veränderungen im generativen Wachstum auf den Verlust des XPT zurückzuführen sind, wäre die *xpt-1* Mutante unter dem eigenen Promotor mit dem *XPT* Gen zu komplementieren und im Anschluss erneut das generative Wachstum sowie Protein- und Fettsäuregehalt der Samen der komplementierten *xpt-1* zu analysieren. Die amiRNA:*XPT Col-0*-Linie zeigte zwar ähnlich signifikante Unterschiede (Schotenlänge, Samen/Schoten, Samengröße) wie *xpt-1*, allerdings ist im Hinblick auf die anderen Mutanten schwer zu unterscheiden, ob die Veränderung durch den *knockdown* des *XPTs* oder aber die Insertionsstelle des

amiRNA:XPT-Konstruktes bedingt ist. Vor allem weil die zweite *XPT knockout* Linie *xpt-2* die Daten von *xpt-1* zum generativen Wachstum nicht stützt. Eine Analyse weiterer amiRNA:XPT Col-0 Linien oder aber die Bestimmung der Insertionsstelle in amiRNA:XPT Col-0 #50 könnten hier aufschlussreich sein. Um jeglichen Zweifel am vollständigen Aktivitätsverlustes des XPT in *xpt-2* zu beseitigen, könnte man versuchen die *tpt/xpt* Doppelmutante mit dem um drei Transmembrandomänen verkürzten XPT-Restprotein zu komplementieren. Hierbei könnte direkt über den Wachstums- und Photosynthesephänotyp selektiert werden. Eine heterologe Expression des Restproteins in Hefe mit anschließenden Transportexperimenten wäre auch eine Möglichkeit, den vollständigen Aktivitätsverlust des XPT-Restproteins zu überprüfen, allerdings wesentlich aufwändiger.

## 4.2 Einkreuzung von Mutanten weiterer plastidärer PTs und des Stärkeanabolismus in *xpt-1*

Neben den Veränderungen im generativen Wachstum konnte für *xpt-1* im Vorfeld und auch innerhalb dieser Arbeit kein eindeutiger Phänotyp identifiziert werden (Eicks, Dissertation 2004; Hilgers, Diplomarbeit 2011). Aufgrund der überschneidenden Substratspezifität des XPT (Eicks *et al.*, 2002) wäre es möglich, dass redundante Funktionen anderer plastidärer PTs die Entstehung eines offensichtlichen Phänotyps verhindern. Die aus diesem Grund vorgenommenen Kreuzungen von *xpt-1* mit Mutanten anderer plastidärer PTs (*tpt-2*, *gpt2-1*, *cue1-6*) und daneben mit Mutanten des plastidären Stärkeanabolismus (*adg1-1*, *pgm1*) führten insbesondere bei einem kombinierten Funktionsverlust von XPT mit TPT zu einem starken Wachstums- und Photosynthesephänotyp. In den generierten Doppelmutanten *gpt2-1/xpt-1*, *cue1-6/xpt-1*, *adg1-1/xpt-1* und *xpt-1/pgm1* konnte kein direkt offensichtlicher Einfluss anhand des Pflanzenwachstums durch den zusätzlichen Ausfall des XPT beobachtet werden. Da zudem eine starke Veränderung der Photosyntheseleistung nur in der kombinierten Defizienz von XPT mit TPT zu beobachten war (Abb. 8.2, Tab. 8.1), wurden weitere Untersuchungen zur Rolle des XPT anhand der *tpt/xpt* Doppelmutanten durchgeführt. Aufgrund der ähnlichen Phänotypen von *tpt/xpt* und *adg1-1/tpt-2* (Schmitz *et al.*, 2012) wurde desweiteren überprüft, ob die Grundlagen zur Entstehung von Wachstums- und Photosynthesephänotyp in *adg1-1/tpt-2* und *tpt/xpt* identisch sind.

### 4.3 Die *tpt/xpt* Doppelmutante

Die *tpt-2/xpt-1* Doppelmutante zeigt einen starken Wachstums- und Photosynthesephänotyp, der auch anhand der im Verlauf dieser Arbeit generierten *tpt-1/xpt-1* sowie den amiRNA:*XPT tpt-2* Linien bestätigt werden konnte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Phänotypen auf den kombinierten Funktionsverlust von XPT mit TPT zurückzuführen sind. Obwohl *tpt/xpt* ebenfalls, wie bereits für *tpt* gezeigt, den inhibierten Tagesexport von Photoassimilaten über den TPT durch einen simultanen Stärkeaufbau und -abbau und dem damit verbundenen Export von Glc und Mal schon während der Lichtperiode kompensieren könnte (Schneider *et al.*, 2002; Weise *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2004), zeigt *tpt/xpt* eine sehr starke Wachstumsretardierung von Blattrosette und Wurzeln sowie einen stark erniedrigten Samenertrag (Abschnitt 3.3.1). Das verminderte Wachstum wird von einer verringerten Photosyntheseleistung begleitet, die auf einem erhöhten  $F_0$  basiert und das  $F_v/F_m$ -Verhältnis deutlich verringert (Abschnitt 3.3.3).

In den amiRNA:*XPT tpt-2*-Linien wurden die Phänotypen mit zunehmenden Pflanzenalter abgeschwächt. Dies ist vermutlich auf die zwar geringe aber dennoch vorhandene Transkriptmenge des XPT in diesen Linien zurückzuführen. Bisher scheinen keine Untersuchungen zu Halbwertszeiten plastidärer PTs durchgeführt worden zu sein. Es wäre möglich, dass die Abundanz funktioneller XPT durch die geringen Transkriptmengen mit dem Pflanzenalter ansteigt und dadurch die Phänotypen in den amiRNA:*XPT tpt-2* Linien immer geringer werden. Ähnliches wurde bereits für Transportaktivitäten bei der *tpt-1* Mutante beobachtet. Auch diese nahmen mit dem Alter der Pflanze zu (R.E. Häusler, persönliche Mitteilung).

Interessanterweise sind unter LL-Bedingung beide Phänotypen von *tpt/xpt* abwesend und das Ausmaß der Phänotypen steigt mit zunehmender Lichtintensität (Abb. 3.11). Damit in Einklang stehen die Daten zu physiologischen Parametern bei Anzucht unter HL und LL (Tab. 3.3). Während unter HL-Bedingung insbesondere Chlorophyll- und Proteingehalt sowie das spezifische Blattrosettgewicht signifikant verringert waren, konnten im LL keine Unterschiede dieser Parameter in *tpt/xpt* verglichen mit den WTs festgestellt werden. Allerdings zeigte sich im LL ein signifikant erhöhtes Chl *a/b* Verhältnis in *tpt-2/xpt-1*, das entweder auf eine erhöhte Abundanz des PSI im Vergleich zu PSII zurückzuführen ist oder aber auf kleinere Antennenkomplexe an PSII im Vergleich zu WT und Einzelmutanten (Leong und Anderson, 1984; Bailey *et al.*, 2001). Dies könnte über zukünftige Westernblots und immunologische Detektion geklärt werden. Unter HL war das Chl *a/b* Verhältnis hingegen signifikant verringert und konnte durch spektroskopische Untersuchungen sowie Immunoblotanalysen auf eine stark verringerte Abundanz von PSI zurückgeführt werden.

Bei steriler Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten verschwindet der Photosynthesephänotyp von *tpt/xpt* mit zunehmenden Pflanzenalter, nicht aber der Wachstumsphänotyp (Abb. 3.12). Hierdurch kam es zu einer deutlichen Einschränkung bei der Untersuchung einer Metabolitfütterung auf den Photosynthesephänotyp. Eine Überprüfung der Inhaltsstoffe des genutzten MS-Mediums offenbarte einen stark erhöhten Stickstoffgehalt im Vergleich zur verwendeten Erde. Die durchgeführten Anstauungsexperimente von auf Erde angezogener Pflanzen mit  $\frac{1}{2}$  MS, 1 MS oder einer dem MS-Medium entsprechenden Kombination aus 9,395 mM KNO<sub>3</sub> mit 10,305 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> führten jedoch zu keiner Rettung des Photosynthesephänotyps. Auch bei einem Wechsel des Mediums verschwand der Photosynthesephänotyp mit der Zeit (Abb. 3.13). Die Grundlage zum Verschwinden des Photosynthesephänotyps unter den beschriebenen Bedingungen ist somit weiterhin unklar.

#### 4.3.1 Mögliche Konsequenzen des kombinierten Ausfalls von XPT und TPT für den Stoffwechsel

Bisher konnten in *A. thaliana* keine cytosolischen Isoformen der Transketolase oder Transaldolase identifiziert werden (Eicks, Dissertation 2004). Somit scheint es im Cytosol keine Möglichkeit zu geben, Pentosephosphate in Hexosephosphate oder TP umzusetzen. Aus diesem Grund sollten im Cytosol über den OPPP generierte Pentosephosphate, sofern sie nicht für die Nukleotidsynthese (Zrenner *et al.*, 2006) verwendet werden, nicht weiter verstoffwechselt werden können. Ein Ausfall des XPT führt jedoch zu keinen offensichtlichen Einschränkungen in Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen in *A. thaliana*. Damit scheint die von Eicks *et al.* (2002) vorgeschlagene Rolle des XPT als Verknüpfung zwischen cytosolischem und plastidärem OPPP bzw. RPPP zu fungieren entweder nicht essentiell für das Stoffwechselgeschehen zu sein oder es kommen hier kompensatorische Prozesse zum Einsatz, die der Entstehung eines Phänotyps entgegenwirken.

Theoretisch könnte der Verlust des XPT aufgrund der Substratspezifitäten über die GPTs kompensiert werden (Eicks *et al.*, 2002). Die Expression des *GPT1* ist jedoch auf die Schließzellen der Spaltöffnungen und die Leitbündelbereiche beschränkt (Kunz *et al.*, 2010), die des *GPT2* in der Regel auf reproduktive sowie heterotrophe Gewebe (Arabidopsis eFP Browser; Winter *et al.*, 2007). Durch hohe Konzentrationen löslicher Zucker kann die Expression des *GPT2* im Blatt jedoch induziert werden. Für Mutanten mit einer Defizienz in der Stärkebiosynthese (*adg1-1*, *pgm1*, *pgi1-1*) konnte eine direkte Korrelation zwischen der Akkumulation löslicher Zucker und der *GPT2* Aktivität in Blättern gezeigt werden (Kunz *et al.*, 2010). Neben Glc6P kann der GPT auch TP und Xu5P transportieren (Eicks *et al.*, 2002), allerdings ist der Transport von Xu5P aufgrund hoher Glc6P und niedriger Xu5P

Konzentrationen in Stroma und Cytosol über den GPT *in vivo* eher unwahrscheinlich (Flügge *et al.*, 1980; Heldt *et al.*, 1980; Winter *et al.*, 1994; Vosloh, Dissertation 2011; Szecowka *et al.*, 2013). Eine generierte *gpt2-1/xpt-1* Doppelmutante zeigte keine offensichtlichen Beeinträchtigungen im Wachstum und der Photosyntheseleistung. Auch der zusätzliche Ausfall des GPT2 im Hintergrund von *adg1-1/tpt-2* (Schmitz *et al.*, 2012) oder aber der auf den XPT heterozygoten *adg1-1/tpt-2/xpt-1/gpt2-1* Vierfachmutante weist auf eine nur untergeordnete Rolle des GPT2 in Bezug auf Wachstum, Entwicklung und Photosyntheseleistung in diesen Mutanten hin. Interessanterweise führt jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, der kombinierte Funktionsverlust des XPT mit dem TPT zu starken Phänotypen. Als Hauptsubstrate des XPT wurden Xu5P und TP identifiziert (Eicks *et al.*, 2002), für den TPT ebenfalls TP und daneben 3-PGA (Fliege *et al.*, 1978; Flügge *et al.*, 1989; Flügge, 1999). Xu5P wurde als Substrat für den TPT bisher nicht getestet, allerdings zeigten Flügge und Gao (2005), dass XPT, TPT und GPT in der Lage sind, das C<sub>5</sub>-Molekül 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate (DOXP) zu transportieren, welches ein Intermediat des MEP-Weges darstellt und eventuell im *cross-talk* zwischen plastidärem und cytosolischem Isoprenoidstoffwechsel beteiligt ist (Flügge und Gao, 2005). Möglicherweise kann Xu5P bei hohen Konzentrationen als C<sub>5</sub>-Molekül auch vom TPT transportiert werden und dadurch den Ausfall des XPT kompensieren. So würde erst bei einem doppelten Ausfall ein Support des RPPP mit Xu5P nicht mehr stattfindet und möglicherweise zu einer Inhibition des RPPP führen, was sich in dem verminderten Wachstum von *tpt/xpt* widerspiegeln könnte. Dies könnte über Transportkinetiken des TPT in Bezug auf Xu5P überprüft werden. Auch Störungen im *cross-talk* des Isoprenoidstoffwechsels oder eine Akkumulation von Xu5P im Cytosol könnten metabolische Veränderungen hervorrufen, die für das retardierte Wachstum verantwortlich sein könnten.

#### **4.3.1.1 Mögliche physiologische Konsequenz eines inhibierten Transports von Xylulose-5-Phosphat**

In Rattenleber wurde durch Kabashima *et al.* (2003) für Xu5P eine Signalfunktion nachgewiesen. Xu5P fungiert hier als Glucose-Signal-Komponente und aktiviert bei hohen Glucosekonzentrationen spezifische Protein-Phosphatasen (PP2A). PP2A aktiviert durch Dephosphorylierung bspw. einen Transkriptionsfaktor (ChREBP = *carbohydrate-responsive element binding protein*), der die Transkription von Genen die im Fettsäuremetabolismus und Glycolyse involviert sind veranlasst (Kabashima *et al.*, 2003). Daneben führt PP2A in Rattenleber auch zur Aktivierung des bifunktionalen Enzyms 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphat-Phosphatase (F2KP). Durch die Aktivität der F2KP steigt die Konzentration an Fru2,6BP an, wodurch die in der Glycolyse involvierte

Phosphofruktokinase (PFK) aktiviert wird (Okar und Lange, 1999; Kabashima *et al.*, 2003). PP2A hat auch in Pflanzen wichtige regulatorische Funktionen u.a. in der Aktivität metabolischer Schlüsselenzyme, wie bspw. der Saccharosephosphat-Synthase, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase und der Nitratreduktase (Farkas *et al.*, 2007) oder aber auch in ROS Homöostase und ROS-signalgebenden Prozessen (Konert *et al.*, 2015). Ob es in Pflanzen einen ähnlichen Mechanismus gibt in dem Xu5P eine mögliche Rolle als Signalmolekül spielt, ist bisher nicht untersucht worden. Die vergrößerten Samen von *xpt-1*, denen u.a. ein erhöhter Ölgehalt zu Grunde liegt, könnten einen ähnlichen Mechanismus implizieren. Allerdings konnte ein erhöhter Ölgehalt in Samen für unabhängige *xpt*-Allele nicht verifiziert werden. Schwender *et al.* (2003) zeigten in Rapsembryos gezüchteter Ölsamen, dass etwa 22% der Reduktionsäquivalente für die Fettsäuresynthese durch den Fluss über den OPPP entstehen. Auch wenn durch die cytosolische Glc6PDH Reduktionsäquivalente für die Samenfüllung bereitgestellt werden, zeigten Wakao *et al.* (2008), dass *g6pdh5/g6pdh6* Doppelmutanten, die einen vollständigen Verlust cytosolischer Glc6PDH Aktivität aufweisen, größere Samen mit erhöhtem Ölgehalt im Vergleich zum WT produzieren. Sie führten dies auf eine erhöhte Verfügbarkeit von Kohlenstoffsubstraten für die Fettsäuresynthese in Plastiden zurück, durch einen erhöhten Transport von Hexosephosphaten in die Plastiden.

#### **4.3.1.2 Ein inhibierter Triosephosphat-Export aus den Chloroplasten hätte hohe Fru2,6BP Gehalte im Cytosol zur Folge**

Durch den kombinierten Ausfall von XPT und TPT sollten keine TP mehr aus den Chloroplasten der Mesophyllzellen in das Cytosol exportiert werden können. Der inhibierte Export von TP könnte bedingt durch hohe Konzentrationen an Fru2,6BP, zu einer vollständigen Hemmung der cytosolischen FBPase auch während der Lichtperiode führen (Stitt, 1990). In Pflanzen wird die Konzentration an Fru2,6BP, wie auch in Rattenleber, durch das bifunktionale Enzym F2KP bestimmt. TP und 3-PGA hemmen die Kinaseaktivität dieses Enzyms und damit die Bildung von Fru2,6BP aus Fru6P. Fru6P und  $P_a$  hingegen inhibieren die Phosphataseaktivität der F2KP und damit die Hydrolyse von Fru2,6BP (Stitt, 1990; McCormick und Kruger, 2015). Das Zusammenspiel der Kinase- und Phosphataseaktivität der F2KP bestimmt somit die Konzentration an Fru2,6BP und damit die Aktivität der cytosolischen FBPase. Da durch den Funktionsverlust von TPT und XPT keine TP mehr ins Cytosol exportiert werden sollten und somit nur geringfügige Gehalte an TP durch den Ablauf der Glycolyse im Cytosol vorhanden sein dürften, müsste die Generierung von Hexosephosphaten aus TP im Cytosol durch hohe Konzentrationen an Fru2,6BP vollständig inhibiert sein. Somit sollten Hexosephosphate für die Saccharosesynthese nur über den

Stärkeabbau und den damit verbundenen Export von Glc und Maltose im Cytosol verfügbar sein. Die Letalität von *adg1-1/tpt-2/xpt-1* stützt die Annahme, dass die Saccharosesynthese in *tpt/xpt* nur über den Stärkeabbau, dem Export von Maltose und Glc und der nachfolgenden Aktivierung zu Hexosephosphaten stattfinden kann. Neben seiner inhibitorischen Wirkung auf die cytosolische FBPase und somit der Bildung von Hexosephosphaten aus TP, aktiviert Fru2,6BP die  $PP_a$ -abhängige Phosphofruktokinase (PFP), die Fru6P in Fru1,6BP überführt. Die PFP könnte das bei der Reaktion der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase entstehende  $PP_a$  verwerten, wodurch ein Metabolitfluss in Richtung Glycolyse bedingt wird. Hierbei könnte sich auch ein Fließgleichgewicht zwischen Saccharosesynthese und Glycolyse einstellen, wodurch nur ein Teil der exportierten Photoassimilate in *tpt/xpt* in die Saccharosesynthese fließt. Möglicherweise führt diese verminderte Saccharosesynthese zu einer Unterversorgung heterotropher Gewebe mit Photoassimilaten, wenn ein Teil der durch den Stärkeabbau bereitgestellten Hexosephosphate direkt durch die Aktivität der PFP in die Glycolyse eingeschleust wird. Der verminderte Export an Photoassimilaten in Form von Suc in die heterotrophen Gewebe könnte das retardierte Wachstum von *tpt/xpt* teilweise bedingen. Um diese Theorie zu überprüfen, könnte ein *knockout* der *F2KP* im Hintergrund von *tpt/xpt* durch Einkreuzen von *f2kp*-Mutanten oder aber Transformation mit einem amiRNA:*F2PK*-Konstrukt helfen. Durch den Funktionsverlust der *F2KP* würde die Synthese von Fru2,6BP wegfallen, so dass der Einfluss dieses Regulationsmetabolits auf die Saccharosesynthese in *tpt/xpt* überprüft werden könnte. McCormick und Kruger (2015) zeigten, dass ein *knockout* der *F2KP* und somit der Wegfall des Regulators Fru2,6BP, die Photoassimilate zugunsten der Saccharosesynthese verteilt. Es konnte jedoch unter konstanten Wachstumsbedingungen kein negativer Effekt auf die Pflanzenfitness festgestellt werden. Erst unter fluktuierenden Bedingungen zeigten sich signifikante Änderungen im Pflanzenwachstum und der Photosyntheseleistung. Da im Fall von *tpt/xpt* die im RPPP generierten TP nicht exportiert werden können und daher in die Stärkesynthese einfließen, könnte durch den *knockout* der *F2KP* der Einfluss von Fru2,6BP unter konstanten Bedingungen auf das retardierte Wachstum in *tpt/xpt*, sowie die Beteiligung der PFP überprüft werden.

Im Gegensatz zu *tpt* kann ein zum Stärkeaufbau simultaner Stärkeabbau während der Lichtperiode den Wachstumsphänotyp von *tpt/xpt* jedoch nicht unterdrücken. Kunz *et al.* (2014) zeigten, dass durch einen *knockdown* der cytosolischen Phosphoglucoisomerase (cPGI; amiRNA:*cPGI*) Suc nur durch den kombinierten Export von TP und Stärkeabbauprodukten synthetisiert werden kann. Da Fru6P und Glc6P nicht mehr über die cPGI ineinander überführt werden können, wird Fru6P über die exportierten TP und Glc6P durch die exportierten Produkte des Stärkeabbaus für die Suc-Synthese bereitgestellt. Die amiRNA:*cPGI*-Pflanzen sind dennoch wachstumsinhibiert und weisen einen

Hochstärkephänotyp auf (Kunz *et al.*, 2014). Kunz *et al.* (2014) vermuten, dass es eine bisher unbekannte *feed-back* Regulation geben muss, die zu einer Feinabstimmung zwischen Saccharosemetabolismus und Stärkeumsatz führt. Möglicherweise ist der Stärkeabbau in *tpt/xpt* im Vergleich zu *tpt* vermindert, wodurch der Fluss von Photoassimilaten in die Saccharosesynthese und Glycolyse verringert wird.

Durch den inhibierten Export von TP in *tpt/xpt* können die physiologisch wichtigen Metabolite PEP und Pyruvat nicht mehr wie im WT direkt aus den exportierten TP generiert werden. Dies hätte zu verringerten Gehalten aller aromatischen und den von Pyruvat abgeleiteten AS führen müssen. Die erhaltenen Ergebnisse zu den Aminosäuremessungen zeigen jedoch eine prozentuale Erhöhung der von PEP und Pyruvat abgeleiteten AS, was eindeutig für die glycolytische Bereitstellung von TP über die PFP spricht. Interessanterweise zeigen *tpt/xpt* und *adg1-1/tpt-2* im Gegensatz zu anderen zwergwüchsigen Mutanten (*cue1* [Staeher *et al.*, 2014]; *pig1-1* [*phenylalanine insensitive growth*; Voll *et al.*, 2004]), keine Erhöhung des Gesamtaminosäuregehalts bezogen auf das Pflanzengewicht (Abb. 3.16 A). Dies deutet darauf hin, dass die Verfügbarkeit von TP im Cytosol die Aminosäuresynthese und somit wahrscheinlich auch direkt das Pflanzenwachstum bestimmt. Das sollte auch Auswirkung auf die primäre N-Assimilation haben, da die Verfügbarkeit von 2-Oxoglutarat (2-OG) mit der Veratmung von Pyruvat im Citrat-Zyklus zusammenhängt. Die Verfügbarkeit von 2-OG ist essentiell für die Reaktionssequenz von Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase in der Ammonium-Assimilation und könnte hier limitierend wirken. Eine verringerte Bereitstellung von 2-OG würde auch erklären, dass *tpt/xpt* im Gegensatz zum WT bei den Anstauungsexperimenten, insbesondere beim Anstauen mit 1 MS und dem damit zunehmenden Ammoniumanteil, eine höhere Sterblichkeit zeigte. Gestützt werden diese Theorien durch die Ergebnisse der Fütterungsexperimente mit Metaboliten. Die Fütterung mit Suc führte zu einer partiellen Rettung des inhibierten Wachstums in *tpt/xpt*, im Fall von *tpt-2/xpt-1* auch die mit Glu oder Gln (Abb. 3.14 A). Eine kombinierte Fütterung mit Suc und Glu bzw. Gln sollte somit zu einer nahezu vollständigen Rettung des Wachstumsphänotyps führen und die vorhergegangene Theorie belegen. Flussanalysen mit <sup>15</sup>N könnten Aufschluss über eine verminderte N-Assimilation und somit AS-Synthese geben. Eventuell wäre auch eine Überexpression der PFP oder auch Phosphofruktokinase (PFK) und somit einem erhöhten Fluss der Photoassimilate in die Glycolyse mit einer Rettung des Wachstumsphänotyps von *tpt/xpt* gekoppelt.

Eine Fütterung von AMP brachte keine partielle Rettung des Wachstumsphänotyps von *tpt/xpt* (Abb: 3.14 A). Eine verringerte Purinbiosynthese, aufgrund einer geringeren Bereitstellung von PRPP, scheint insbesondere durch die unveränderten Gehalte an His, welches ebenfalls aus PRPP synthetisiert wird, als Auslöser für den Wachstumsphänotyp unwahrscheinlich zu sein. Der bei der Aminosäurebestimmung beobachtete verringerte

Glycingehalt in *tpt/xpt* hätte hingegen eine Limitation in der Purinsynthese bedingen können. Die Analyse der Aminosäuregehalte in *tpt/xpt* zeigte nur für Gly eine signifikante Verringerung (Abb. 3.16 B). Der Glycingehalt korrelierte in allen untersuchten Linien mit der ETR (Abb. 3.14 D) und kann wahrscheinlich auf den Ablauf der Photorespiration (siehe Review: Peterhänsel *et al.*, 2010) zurückgeführt werden. Für den Gehalt an Serin, ebenfalls ein Intermediat der Photorespiration, konnte eine Korrelation mit der ETR hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Dies könnte auf einen hohen Fluß von Gly in Ser schließen lassen, wenn Ser nicht über einen alternativen Biosyntheseweg, den Phosphoserinweg aus 3-PGA synthetisiert wird (Benstein *et al.*, 2013). Gly fließt im Stoffwechsel neben der Photorespiration und der Proteinbiosynthese vor allem in die Purinbiosynthese sowie die Bildung von Gluthation ein. Da die Fütterung mit AMP keinen wachstumsfördernden Effekt bei *tpt/xpt* zeigte, scheint Gly jedoch nicht primär limitierend für die Purinbiosynthese zu sein. Ein hoher Fluss von Gly in die Gluthationbiosynthese wäre im Hinblick auf den Photosynthesephänotyp vorstellbar. Aufgrund eines hohen Reduktionsgrad von Fd und fehlender Elektronenakzeptor in Form von NADP<sup>+</sup> könnte es zu einer Übertragung der Elektronen auf O<sub>2</sub> kommen, wodurch es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen würde (Krieger-Liszkay, 2005). Diese können über ein Zusammenspiel von Ascorbat mit Fd<sub>red</sub> oder aber Glutathion unschädlich gemacht werden (Foyer und Noctor, 2011).

#### **4.3.1.3 Ein inhibierter Export von TP könnte Veränderungen in Signalkaskaden bewirken**

TP könnten auch direkt an Signalkaskaden beteiligt sein, durch die der Wachstums- und/oder Photosynthesephänotyp ausgelöst wird. Vogel *et al.* (2014) zeigten, dass bestimmte APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR Transkriptionsfaktoren (AP2/ERF-TF) beim Transfer von LL nach HL im WT hochreguliert wurden, sowie die Aktivität der MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6 (MPK6) nach einer Minute im HL angestiegen war. Dies war allerdings nicht in *tpt-1* und *tpt-2* der Fall. Da in *tpt*-Mutanten die Aktivierung der MPK6 ausblieb, scheint es eine Verbindung in der frühen HL-Antwort zwischen dem TP-Export und MAPK Signalkaskaden zu geben (Vogel *et al.*, 2014). Durch die Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung (Gerhardt und Heldt, 1984) konnte gezeigt werden, dass nach Belichtung verdunkelter Blätter die Konzentration an DHAP im Cytosol innerhalb von Sekunden ansteigt (Dietz und Heber, 1984). Die exportierten TP werden im Cytosol u.a. in 3-PGA umgewandelt, wodurch es simultan zur Entstehung von ATP und NADH kommt. Daher könnten Änderungen in den Konzentrationen von DHAP, ATP und NADH mit der Aktivierung von Proteinphosphorylierungskaskaden verknüpft sein (Vogel *et*

*al.*, 2014). Basierend auf ihren Ergebnissen schlugen sie ein Modell für eine retrograde Signalübertragung vor, die mit dem Metabolitexport über den TPT startet, wodurch nachfolgend durch Aktivierung der MAK6 die Expression von AP2/ERF-TF und anderer stromabwärtsgelegener Gene einsetzt (Vogel *et al.*, 2014). Moore *et al.* (2014) stellten fest, dass auch in *tpt* eine Aktivierung der MAK6 durch Phosphorylierung stattfindet, allerdings zeitlich verzögert. Sie führten dies auf die Existenz eines TPT-unabhängigen Wegs in der HL-abhängigen MPK6 Phosphorylierung zurück. Möglicherweise könnte dieser TPT-unabhängige Weg über den XPT erfolgen, der ebenfalls TP transportieren kann. Eine Beteiligung des XPT in diesen Signalkaskaden wäre angesichts des starken Wachstums- und Photosynthesephänotyps von *tpt/xpt* durchaus denkbar, wenn TP an der Signalübertragung beteiligt sind. Die Beteiligung von TPT und XPT an diesen Signalkaskaden könnte durch Untersuchung der Abundanz und des Phosphorylierungsgrads von MAK6 auf Proteinebene (Immunodetektion), sowie der Expressionslevel der bereits identifizierten und durch Vogel *et al.* (2014) untersuchten AP2/ERF-TF anhand *tpt/xpt* überprüft werden.

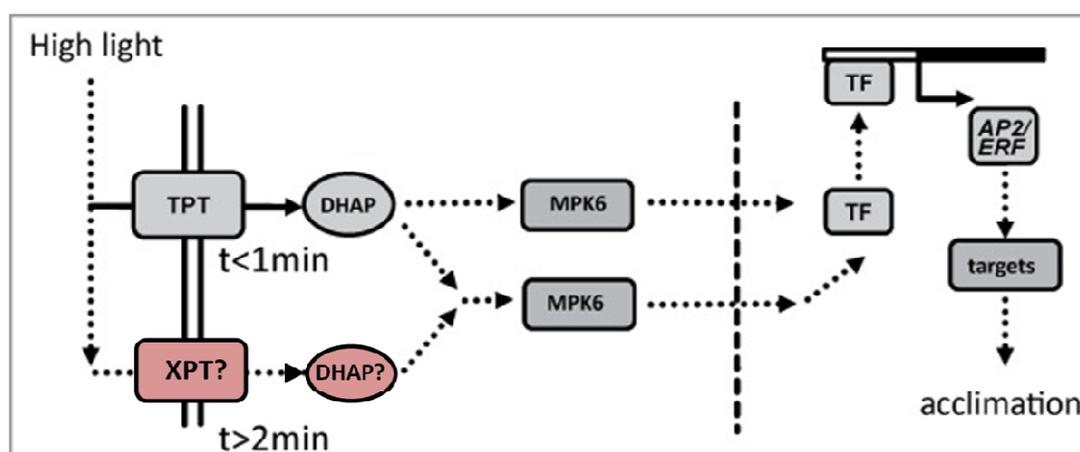


Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Modell der Signalübertragung in der frühen HL-Antwort und mögliche Einbindung des XPT. Als Reaktion auf HL kommt es zu einem Anstieg von DHAP, ATP und NADH im Cytosol, wodurch es zur Aktivierung der MPK6 und stromabwärtsgelegener Transkriptionsfaktoren kommt, die wiederum zur Expression von AP2/ERF-TFs führen. Die durch AP2/ERF-TFs induzierte Genexpression führt dann zur Akklimatisierung. In *tpt*-Mutanten wurde eine verzögerte Signaltransduktion beobachtet, die einen TPT-unabhängigen Weg der Signalinduktion impliziert. Möglicherweise erfolgt dieser alternative Weg über den XPT, der ebenfalls in der Lage ist TP zu transportieren (modifiziert nach Moore *et al.*, 2014).

#### 4.3.2 Untersuchungen zu gemeinsamen Grundlagen der Photosynthese-phänotypen von *tpt/xpt* zu *adg1-1/tpt-2*

Der Wachstums- und Photosynthesephänotyp von *tpt/xpt* erinnert an den der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (Schmitz *et al.*, 2012). Während unter LL-Bedingung die Doppelmutanten nahezu nicht mehr von den WTs unterscheidbar sind, intensivieren sich die Phänotypen mit

zunehmender Lichtintensität (Abb. 3.11). In beiden Doppelmutanten manifestiert sich der Photosynthesephänotyp durch eine starke Verringerung des  $F_v/F_m$ -Verhältniss dunkeladaptierter Pflanzen, dem ein erhöhtes  $F_0$  zugrunde liegt (Schmitz *et al.*, 2012). Häusler *et al.* (2009) nahmen an, dass die erhöhte  $F_0$  von *adg1-1/tpt-1* auf einen auch im Dunkeln stark reduzierten PQ-Pool zurückzuführen ist. In *adg1-1/tpt-1* und später auch *adg1-1/tpt-2* konnte in der Tat ein Teil der erhöhten  $F_0$  durch Belichtung dunkeladaptierter Blätter mit FR und damit spezifischer Anregung von PSI gelöscht werden (Häusler *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2012). Der reduzierte PQ-Pool bzw. dieser durch FR gelöschte Anteil des erhöhten  $F_0$  geht in *adg1-1/tpt* vermutlich auf Prozesse der Chlororespiration (siehe Review: Peltier und Cournac, 2002) zurück (Häusler *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2012). Bei *tpt/xpt* führt eine Belichtung dunkeladaptierter Blätter mit FR nicht zu einer Verringerung des erhöhten  $F_0$  (Abb. 3.17). Die Doppelmutante verhielt sich hierbei identisch zum WT. Ein im Dunkeln reduzierter PQ-Pool bspw. durch Chlororespiration oder einen Elektronenrückstau kann daher als Ursache des erhöhten  $F_0$  für *tpt/xpt* ausgeschlossen werden. Bei Belichtung mit aktinischem Licht verhielt sich *tpt/xpt* ebenfalls gegensätzlich zu *adg1-1/tpt-2*. Es kam nicht, wie für *adg1-1/tpt-2* gezeigt, zu einer Löschung von  $F_0$  auf WT Niveau, sondern sogar zu einem weiteren Anstieg von  $F_0$  in *tpt/xpt* (Schmitz *et al.*, 2012). Der Anstieg von  $F_0$  bei Bestrahlung mit aktinischem Licht über das WT-Niveau könnte auf Störungen innerhalb der ETK bzw. einen Elektronenrückstau von PSII ( $P_{680}$ ) zu PSI ( $P_{700}$ ) im Licht hindeuten.

Die Betrachtung zur Abundanz Photosynthese-assoziiierter Proteine über immunologische Detektion offenbarte eine starke Verringerung der Kernkomponenten der Reaktionszentren und des Cyt *b<sub>6/f</sub>*-Komplex (Abb. 3.18). Die für PSII untersuchten Untereinheiten PsbA (D1), PsbD (D2) und PsbE sind alle plastomkodiert (Race *et al.*, 1999) und zeigten eine eindeutige Reduktion in *tpt/xpt* um mindestens 30-50 %. Die beiden Kernkomponenten des PSII Reaktionszentrums PsbA und PsbD waren verstärkt betroffen. Möglicherweise ist das auf den Prozess der Photoinhibition zurückzuführen (Aro *et al.*, 1993). In Folge dieses protektiven Mechanismus an PSII unterliegen die beiden Proteine einem stetigen Reparaturzyklus (Aro *et al.*, 1993, Kale *et al.*, 2017). Dieser könnte dem Bedarf der Produktion dieser Proteine nicht hinterherkommen, was die verringerten Signalstärken von PsbA und PsbD gegenüber PsbE erklären könnte. Bei PsbE handelt es sich um die  $\alpha$ -UE von Cyt *b<sub>559</sub>*, die essentiell für den Zusammenbau von PSII ist und möglicherweise in der Reoxidation von PSII involviert ist (Nishimura *et al.*, 2016). PsbE ist zwar auch eindeutig in *tpt/xpt* verringert, jedoch nicht so stark wie die Reaktionszentren. Hier könnte eine Analyse dieser drei Proteine auf transkriptioneller Ebene aufschlussreich sein. Eine hohe Expression von PsbA und PsbD könnte auf einen hohen Umsatz dieser Proteine hinweisen, wohingegen eine geringe Expression eher auf Repression dieser Gene schließen lassen würde. Die für PSI untersuchte Reaktionszentrum-UE PsaB ( $P_{700}$  Apoprotein A2) zeigte eine Reduktion um

etwa 70 %, ähnlich verhielt es sich auch für die UE PsaL. Für die UE PsaL wird vermutet wie auch PsaH eine Rolle als Anlegestelle der LHCII bei den *state transitions* zu spielen (Lunde *et al.* 2000, Zhang and Scheller 2004, Qin *et al.* 2011). Trotz der starken Reduktion der Kernkomponenten der Photosysteme war die Signalstärke der jeweiligen LHCs nicht deutlich verringert. Für Lhca1 sowie Lhcb1 könnte anhand der immunologischen Detektion vielleicht eine tendenzielle Abnahme angenommen werden, die aber auch auf kleine Schwankungen bei der Gelbelastung zurückgeführt werden könnten. Für Lhcb2 ist dies jedoch nicht der Fall. Die Veränderungen in der Abundanz der PS und LHCs wurde bereits durch das verringerte Chl *a/b* Verhältnis in *tpt/xpt* impliziert. Das Rieske-Protein (PetC), welches als Komponente des Cyt *b<sub>6</sub>/f*-Komplex untersucht wurde, war auch deutlich in seiner Abundanz reduziert. Die spektroskopische Analyse von Komponenten der Photosynthesekomplexe an isolierten Thylakoidmembranen offenbarte ebenfalls eine massive Verringerung der Komplexgehalte von PSII, Cyt *b<sub>6</sub>/f* und PSI und bestätigt somit die Ergebnisse der immunologischen Nachweise (Abb. 3.19).

Zusammenfassend waren mit Ausnahme der LHC-Proteine sowohl plastom- als auch kern-kodierte UE der Photosynthesekomplexe in ihrer Abundanz in *tpt/xpt* und auch *adg1-1/tpt-2* verringert (Race *et al.*, 1999). Dies gab Grund zur Annahme, dass in *tpt/xpt* freie nicht an die Reaktionszentren gebundene LHCs vorliegen und wie in *adg1-1/tpt-2* die erhöhte  $F_0$  bedingen. Yamane *et al.*, (1997) und Barres *et al.*, (2009) zeigten bereits, dass freie LHCs hochfluoreszent sind und daher eine erhöhte Fluoreszenz verursachen können. Die über 77 K Fluoreszenz-Emissionsspektren untersuchte energetische Kopplung der LHCs an die Reaktionszentren zeigte jedoch ganz klar keine Verschiebung der Emissionspeaks in *tpt/xpt* verglichen zu WT und Einzelmutanten (Abb. 3.20). Demnach liegen in *tpt/xpt* in Gegensatz zu *adg1-1/tpt-2* keine freien LHCs vor, die an der erhöhten Fluoreszenz beteiligt sind. Um hier weitere und auch tiefere Einblicke zu erhalten, wäre eine Untersuchung der Phosphorylierungsgrade der Reaktionszentren sowie der LHCs interessant, die u.a. Hinweis auf mögliche *state transitions* liefern könnten.

Beim Photosynthesephänotyp gibt es also deutliche Unterschiede von *tpt/xpt* im Vergleich zu *adg1-1/tpt-2*. Beide Doppelmutanten besitzen zwar ein vermindertes  $F_v/F_m$ -Verhältnis, das durch ein erhöhtes  $F_0$  verursacht wird. Die Grundlagen für das erhöhte  $F_0$  sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit in den beiden Doppelmutanten nicht komplett identisch. Allerdings ist in *adg1-1/tpt-2*  $F_0$  auch wesentlich stärker erhöht als in *tpt/xpt*. Möglicherweise könnten ultrastrukturelle Untersuchungen zur Chloroplastenanatomie Aufschluss über den Mechanismus der  $F_0$ -Erhöhung geben. Auch der Einsatz von Herbiziden, wie Nigericin (ein Protonophor, der zum Abbau des Protonengradienten führt), DTT (Dithiothreitol – Inhibiert Xanthophyllzyklus) oder Tentoxin (Inhibiert die thylakoidale ATPase) könnten in Kombination mit Chl *a* Fluoreszenz-Messungen helfen die Ursache einzugrenzen. Die erhöhte  $F_0$  sowie

das verringerte  $F_v/F_m$ -Verhältniss an PSII als auch die Ergebnisse zur Abundanz von UE der Photosynthesekomplexe weisen auf Störungen in der Energieübertragung bzw. der optimalen Anpassung des Photosyntheseapparats hin. Um die Ursachen weiter eingrenzen zu können, sollten die erhaltenen Ergebnisse durch Analyse der Effizienz an PSI, dem Protonengradient, der Bildung von ROS sowie Untersuchungen zur Genexpression Photosynthese-assoziiierter Proteine erweitert werden. Auch eine Quantifizierung des  $NADP^+/NADPH$ -Quotienten, der Adenylatgehalte sowie Messungen zur  $CO_2$ -Assimilation und  $O_2$ -Produktion können in der Eingrenzung helfen. Möglicherweise ist eine veränderte Abundanz von Photosynthese-assoziierten Genen auch an veränderte Metabolitlevel gekoppelt. Eine Beteiligung von bspw. Zuckern an der Repression von Photosynthesegenen konnte in Keimlingen bereits gezeigt werden (Jang und Sheen 1994; Jang *et al.*, 1997). Ein wesentlicher Unterschied in den beiden Doppelmutanten ist das Vorhandensein von Stärke in *tpt/xpt*. Durch den in *tpt/xpt* schon während der Lichtperiode stattfindenden Stärkeabbau sollte die Konzentration freier Glc und Mal im Stroma der Chloroplasten deutlich erhöht sein. Dies könnte zu Veränderungen der Genexpression plastomkodierter Gene führen (Häusler *et al.*, 2014).

#### 4.4 Rolle des XPT für die Viabilität von *adg1-1/tpt-2*

Das Überleben von *adg1-1/tpt-2* wurde zunächst auf die Aktivität des GPT2 zurückgeführt, der eine erhöhte Expression in *adg1-1/tpt-2* aufwies (Schmitz, Dissertation 2011). Eine *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Dreifachmutante war jedoch weiterhin lebensfähig und der zusätzliche Ausfall des GPT2 verstärkte die Phänotypen von *adg1-1/tpt-2* nur marginal (Schmitz *et al.*, 2012). Bei Anzucht auf Zuckern wurden die Phänotypen der Dreifachmutante, wie zuvor schon für *adg1-1/tpt-2* gezeigt weiterhin gerettet (Schmitz *et al.*, 2012; Heinrichs *et al.*, 2014). Durch Einkreuzen von *xpt-1* in *adg1-1/tpt-2* bzw. *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überlebensfähigkeit von *adg1-1/tpt-2* auf die Transportaktivität des XPT zurückzuführen ist (Abb. 3.22). Nach Aussaat auf Erde war es nicht möglich positive *adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifachmutanten zu identifizieren. Fand die Anzucht auf zuckerhaltigen  $\frac{1}{2}$  MS Platten statt, so konnten stark wachstumsretardierte Dreifach- und auch Vierfachmutanten identifiziert werden. Mit den Wochen zeigten sich trotz gleichen Alters und Genotyp dennoch optische Unterschiede in der Blattrosettengröße. Es schien, dass eine Art „Schwellenwert“ überschritten werden muss, damit die Dreifach- bzw. Vierfachmutanten auch bei Zuckerfütterung überlebten und eine Art „Wachstumsschub“ bekamen. Im Folgenden waren sie dann auch in der Lage sich zu reproduzieren (Abb. 3.23 B-D). Wurden die Mehrfachmutanten von zuckerhaltigem  $\frac{1}{2}$  MS auf Erde umgesetzt, so starben sie ab. Durch den Wegfall der XPT-Aktivität können in

*adg1-1/tpt-2/xpt-1* wahrscheinlich keine Photoassimilate mehr aus den Chloroplasten exportiert werden. Dadurch wird es zu einem massiven Kohlenstoffmangel im Cytosol kommen, so dass beim Umsetzen auf Erde wahrscheinlich zunächst alle möglichen Metabolite (Proteine, Lipide etc) veratmet werden bevor die Pflanze letztendlich abstirbt (Araujo *et al.*, 2011). Bei Anzucht auf Erde sterben die Keimlinge der Dreifachmutanten wahrscheinlich, sobald die in den Keimblättern gespeicherten Reservestoffe aufgebraucht sind. Untersuchungen mit der ImagingPAM offenbarten, dass dunkeladaptierte Keimlinge von *adg1-1/tpt-2/xpt-1* bei Anzucht auf Zucker ein sehr niedriges  $F_v/F_m$ -Verhältnis von 0,1-0,15 besaßen (Abb. 3.21). Die Entwicklung war trotz Zuckerfütterung extrem langsam, führte letztendlich aber zur Bildung keimungsfähiger Samen. Interessanterweise gibt es jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Expression des *XPT* im Hintergrund von *adg1-1/tpt-2* (R.E. Häusler, unveröffentlichte Daten). Der *GPT2* scheint nur eine untergeordnete Rolle im Überleben von *adg1-1/tpt-2* zu spielen und keine kompensatorische Rolle in *adg1-1/tpt-2/xpt-1* übernehmen zu können, obwohl auch er TP und Xu5P transportieren könnte (Eicks *et al.*, 2002). Aufgrund der starken Phänotypen von *adg1-1/tpt-2* und der Letalität der *adg1-1/tpt-2/xpt-1* ist der *XPT* zwar offensichtlich für die Vitalität der Doppelmutante verantwortlich, seine Aktivität kann den Ausfall des TPT sowie der AGPase jedoch nur zu einem geringen Teil kompensieren, wie die drastischen Phänotypen der Doppelmutante zeigen. Vermutungen, dass das Überleben von *adg1-1/tpt-2* mit einer alternativen Stärkesynthese über die PHS1 in Verbindung stehen könnte (Schmitz, Dissertation 2011), scheinen durch die Letalität bei Ausfall des *XPT* eher unwahrscheinlich zu sein. Bei dieser alternativen Stärkesynthese wird angenommen, dass durch Import von Glc1P in den Plastiden über einen noch unbekanntem Transporter durch die PHS1 Stärke synthetisiert werden kann, da Fettke *et al.* (2010) feststellten, dass in Amyloplasten von Kartoffeln dieses Enzym auch Richtung Stärkesynthese tätig sein kann.

Zusammenfassend scheint ein Export von Photoassimilaten aus dem Chloroplasten bei gleichzeitigem Ausfall von TPT und *XPT* kombiniert mit einem Wegfall des Stärkeanabolismus nicht mehr möglich zu sein.

#### 4.5 Rolle des *XPT* für das Überleben von *cue1-6/ppt2-1*

In *cue1* kann der *PPT2* den Ausfall von *PPT1* nicht kompensieren. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedliche gewebespezifische Expression dieser beiden Gene zurückzuführen (Knappe *et al.*, 2003; eFP Browser, Winter *et al.*, 2007). Der gemeinsame Ausfall beider *PPTs* in *A. thaliana* scheint aber keinen zusätzlichen Phänotyp im *cue1* Hintergrund zu bewirken. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde im Rahmen von Transportstudien des *XPT* festgestellt, dass je nach pH-Wert auch ein PEP-Transport über den *XPT* möglich sein

könnte (Hilgers, Diplomarbeit 2011). Aufgrund der nahezu ubiquitären Expression des XPT und seiner breiten Substratspezifität wäre er ein geeigneter Kandidat, den Verlust beider PPTs zumindest partiell zu kompensieren. Bei einem zusätzlichen Ausfall des XPT im Hintergrund der *cue1-6/ppt2-1* Doppelmutante war die resultierende Dreifachmutante jedoch weiterhin lebens- und reproduktionsfähig. Es zeigten sich bezüglich des Wachstums keine signifikanten Unterschiede von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* zu *cue1-6/ppt2-1* oder aber *cue1-6* (Abb. 3.25). Messungen zur Photosyntheseleistung offenbarten zwar eine verringerte ETR der Dreifachmutante verglichen zu *cue1-6*, die möglicherweise eine Konsequenz des reduzierten Chlorophyllgehalts darstellt. Die verringerte ETR hat offensichtlich jedoch keinen weiteren inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* zur Folge. Da die zusätzlichen Veränderungen in den Doppel- und Dreifachmutanten verglichen mit *cue1-6* nur marginal sind, scheinen andere kompensatorische Prozesse zu greifen, die eine Versorgung der Plastiden mit PEP bewirken. Dies könnte u.a. in der Bereitstellung von PEP durch die Pyruvathosphatkinase (PPDK) erfolgen, die PEP aus Pyruvat synthetisieren kann (Parsley und Hibberd, 2006). Pyruvat könnte über den BASS („*BILE ACID:SODIUM SYMPORTER*“) -Transporter (Furumoto *et al.*, 2011) in den Plastiden importiert werden und nachfolgend durch die PPDK in PEP umgewandelt werden. Ob auch der XPT einen kompensatorischen Beitrag im Hintergrund von *cue1-6/ppt2-1* leistet, lässt sich anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht vollständig ausschließen. Zunächst müsste ein Aktivitätsverlust der PPDK im Hintergrund von *cue1-6/ppt2-1* untersucht werden. Bei weiterer Lebensfähigkeit der resultierenden Dreifachmutante könnte dann der zusätzliche Ausfall des XPT im Rahmen einer Vierfachmutante bei Letalität Aufschluss über eine Beteiligung des XPT geben.

## 4.6 Fazit

Zusammengenommen implizieren die erhaltenen Daten vor allem eine Funktion des XPT im Export von TP. Im Hinblick auf die Rolle von TP in der Regulierung der F2KP und damit den Konzentrationen von Fru2,6BP, sowie der von Vogel *et al.* (2014) vorgeschlagenen Beteiligung von TP in Signalkaskaden, könnte der XPT gemeinsam mit dem TPT in der Lenkung von Stoffwechselwegen sowie der Übertragung von Signalen eingebunden sein. Neben der Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Assimilation, des Maltosegehalts sowie gezielter Flussanalysen mit markiertem <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> sowie <sup>15</sup>N könnte eine tiefgreifende ungerichtete Metabolomanalyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Tagesverlauf (Beginn der Lichtperiode, Mitte der Lichtperiode und Ende der Dunkelperiode) hilfreich sein, detailliertere Einblicke in das Stoffwechselgeschehen von *tpt/xpt* zu erhalten. Eventuell wäre hier auch eine nicht-wässrige Fraktionierung im Vorfeld der Metabolomanalyse sinnvoll, um die

Metabolitlevel direkt in den verschiedenen Zellkompartimenten zu bestimmen und zuordnen zu können. Änderungen in Metabolitgehalten würden dann gezielt Hinweise auf Veränderungen im Stoffwechsel von *tpt/xpt* geben und könnten damit das weitere Vorgehen in die richtige Richtung lenken.

Die bisherigen Ergebnisse weisen zum einen auf eine teils redundante Rolle von XPT und TPT, zum anderen aber auch auf eine vielschichtigeren Funktion des XPTs als der von Eicks *et al.* (2002) vorgeschlagenen Rolle in der Verknüpfung von cytosolischem OPPP und plastidären OPPP bzw. RPPP durch einen Transport von Xu5P im Stoffwechselgeschehen von *A. thaliana* hin. Die *tpt/xpt* Doppelmutante stellt somit, neben der Möglichkeit die Rolle des XPTs zu untersuchen, ein Werkzeug dar, Akklimatisierungsprozesse der Photosynthese, auch in Kombination mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, tiefgreifend zu analysieren. Ebenso für die Aufklärung von Signalkaskaden, basierend auf dem Model von Vogel *et al.* (2014) und Moore *et al.* (2014), könnte eine weitergehende Studie von *tpt/xpt* erfolgsversprechend sein.

## 5 Zusammenfassung

Der XPT ist als *single-copy* Gen nahezu ubiquitär in *Arabidopsis thaliana* exprimiert und es wird für ihn bisher eine Rolle in der Verknüpfung von cytosolischem OPPP mit dem plastidären OPPP bzw. RPPP angenommen (Eicks *et al.*, 2002). Eine bereits im Vorfeld dieser Arbeit generierte und untersuchte *XPT* knockout Mutante (*xpt-1*) offenbarte einen leichten Phänotyp während der generativen, nicht aber während der vegetativen Phase der Entwicklung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion des XPT in Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen von *A. thaliana* durchgeführt. Hierzu wurde (1) ein zusätzliches Mutantenallel isoliert und gemeinsam mit amiRNA:*XPT*-Pflanzen auf phänotypische Gemeinsamkeiten zu *xpt-1* hin untersucht. Der generative Phänotyp von *xpt-1* konnte jedoch anhand der unabhängigen *xpt*-Mutanten nicht bestätigt werden. (2) Durch Kreuzung von *xpt-1* mit Mutanten anderer plastidären Phosphat-Translokatoren sowie des Stärkeanabolismus wurden Mehrfachmutanten hergestellt, um die Konsequenz eines kombinierten Funktionsverlusts zu studieren. Hierbei resultierte insbesondere der kombinierte Funktionsverlust von XPT mit TPT in einer starken Wachstumsinhibition und einer verminderten Photosyntheseleistung, die auf einer erhöhten Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) basierte und daher als „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“ (HCF)-Phänotyp bezeichnet wird. Beide Phänotypen waren klar ersichtlich unter Hochlicht (HL) Bedingungen, aber abwesend unter Schwachlicht (LL) Bedingungen. Die Phänotypen der *tpt/xpt* Doppelmutante erinnerten stark an die der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Daher wurde (3) überprüft, ob die mechanistischen Grundlagen zur Entstehung des HCF-Phänotyps in beiden Doppelmutanten identisch sind. Immunoblotanalysen zu Photosynthese-assoziierten Proteinen offenbarten eine stark verringerte Abundanz plastom- und kernkodierter Proteine mit Ausnahme der LHC. Ähnliches wurde bereits für *adg1-1/tpt-2* beschrieben. Im Gegensatz zu *adg1-1/tpt-2* konnte für *tpt/xpt* die Beteiligung von Chlororespiration und freier LHCs als Ursache des HCF-Phänotyps ausgeschlossen werden. (4) In *adg1-1/tpt-2* konnte ein Mangel an Kohlenhydraten als primäre Ursache für den Wachstums- und Photosynthese-Phänotyp identifiziert werden. Eine Analyse der diurnalen Gehalte an Stärke, löslichen Zuckern und Aminosäuren implizierte keine großen Limitationen im C- und N-Metabolismus in *tpt/xpt*, dennoch führte eine exogene Zufuhr von Saccharose oder Glutamin zu einer partiellen Rettung des Wachstumsphänotyps. Wahrscheinlich können im Cytosol von *tpt/xpt* Triosephosphate (TP) nur glycolytisch generiert werden. Dadurch könnte eine verringerte Verfügbarkeit von TP zu Limitationen in der Aminosäurebiosynthese und dadurch im Wachstum bedingen. (5) Des Weiteren wurde die Rolle des XPT für die Lebensfähigkeit von *adg1-1/tpt-2* durch Generierung einer Dreifachmutante überprüft. Die resultierende

*adg1-1/tpt-2/xpt-1* Dreifachmutante besitzt einen letalen Phänotyp, der durch Anzucht auf Suc überwunden werden kann. Daneben wurde (6) auch eine Beteiligung des XPT an der Viabilität von *cue1-6/ppt2-1* überprüft. Eine *cue1-6/ppt2-1/xpt-1* Dreifachmutante war jedoch weiterhin lebens- und reproduktionsfähig.

Die erhaltenen Daten der vorliegenden Arbeit implizieren vor allem eine Funktion des XPT im Export von TP. Daten aus der Arbeitsgruppe von K.-J. Dietz weisen auf eine direkte oder auch indirekte Beteiligung von TP in der Lenkung von Stoffwechselwegen sowie Signalkaskaden hin. Dies wird in Hinblick auf eine Beteiligung des XPTs diskutiert. Zusammengefasst weisen die erhaltenen Ergebnisse auf eine zum TPT teils redundante aber auch vielschichtigere als von Eicks *et al.* (2002) vorgeschlagene Rolle des XPT im Stoffwechselgeschehen hin.

## 6 Abstract

As a single-copy gene the *XPT* is ubiquitously expressed in *Arabidopsis thaliana* and its proposed role is to connect the cytosolic with the plastidic OPPP or RPPP in chloroplasts (Eicks *et al.*, 2002). A previously generated and analysed *XPT* knockout mutant (*xpt-1*) showed a mild phenotype only in the generative, but not the vegetative phase of development. In the present study the function of the *XPT* in metabolic and developmental processes of *A. thaliana* was thoroughly investigated. Therefore (1) an additional *XPT* mutant allele was isolated and examined together with amiRNA:*XPT* plants for phenotypic similarities with *xpt-1*. However, the generative phenotype of *xpt-1* could not be confirmed with these independent approaches. (2) Crosses of *xpt-1* with mutants defective in other plastidic phosphate translocators or starch metabolism were generated to study the consequences of a combined impairment in their functions. In particular *tpt/xpt* double mutants exhibited in a strong growth retardation and impaired photosynthesis. The latter was accompanied by a “high-chlorophyll-fluorescence” (HCF)-phenotype in the dark-adapted state. Both phenotypes were evident when the plants were grown under high light conditions, but were absent in low light-grown plants. The phenotypes of *tpt/xpt* resembled strongly those of *adg1-1/tpt-2*. (3) It was further investigated whether or not the HCF phenotype of both double mutants had a common mechanistic basis. Similar to *adg1-1/tpt-2* a decrease in selected nuclear- and plastom-encoded photosynthesis-associated proteins was observed on immunoblots. In contrast to *adg1-1/tpt-2*, chlororespiration seemed not to be involved in the HCF of *tpt/xpt*. (4) Neither the analyses of diurnal carbohydrate contents nor determinations of amino acid levels revealed any large limitations in C- and N-metabolism in the *tpt/xpt* double mutant. However, the growth phenotype of *tpt-2/xpt-1* could be partially rescued by exogenously supplied sucrose or glutamine. In case that TP can only be generated glycolytically in the cytosol of *tpt/xpt*, it is likely that the availability of TP and downstream metabolites limit the rate of amino acid biosynthesis and with it probably growth. (5) The role of the *XPT* in the viability of *adg1-1/tpt-2* was investigated in a *adg1-1/tpt-2/xpt-1* triple mutant. This triple mutant was lethal when grown on soil, but could be rescued on agar plates supplemented with sucrose. Finally (6) a possible participation of the *XPT* in the viability of a *cue1-6/ppt2-1* double mutant was analyzed. However, the resulting triple mutant was still viable and able to reproduce.

The data obtained in the present work indicate a function of *XPT* in an additional export of TP from the plastids. As has been shown by the group of K.-J. Dietz, TP might also trigger signal cascades involved in the short-term response to high light treatment. This is also discussed in the present study with regard to the role of the *XPT*. Taking together the data of the

present study indicate a partially redundant function of XPT and TPT, but an even more complex role for XPT in metabolic processes than proposed by Eicks *et al.* (2012).

## 7 Literaturverzeichnis

- Andriotis V.M.E., Pike M.J., Kular B., Rawsthorne S., Smith A.M. (2010). Starch turnover in developing oilseed embryos. *New Phytologist* 187, 791-804.
- Aoki Y., Okamura Y., Tadaka S., Kinoshita K., Obayashi T. (2016). ATTED-II in 2016: A Plant Coexpression Database Towards Lineage-Specific Coexpression. *Plant Cell Physiology* 57, e5 (1-9).
- Araújo W.L., Tohge T., Ishizaki K., Leaver C.J., Fernie A.R. (2011). Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* 16, 489-498.
- Aro E.M., Virgin I., Andersson B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1143, 113-134.
- Baier, M., Ströher, E. und Dietz, K.-J. (2004). The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 45 (8) 997-1006.
- Baier, M. und Dietz, K.-J. (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 56 (416), 1449-1462.
- Bailey S., Walters R.G., Jansson S., Horton P. (2001). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213: 794-801.
- Balazadeh, S., Jaspert N., Arif M., Mueller-Roeber B., Maurino V.G. (2012). Expression of ROS-responsive genes and transcription factors after metabolic formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*, 3, 234, 1-30.
- Barros T, Royant A, Standfuss J, Dreuw A, Kühlbrandt W (2009). Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J* 28, 298-306.
- Benstein R.M., Ludewig K., Wulfert S., Wittek S., Gigolashvili T., Frerigmann H., Gierth M., Flügge U.I., Krueger S. (2013). *Arabidopsis* Phosphoglycerat Dehydrogenase1 of the Phosphoserine Pathway Is Essential for Development and Required for Ammonium Assimilation and Tryptophan Biosynthesis. *The Plant Cell* 25, 5011-5029.
- Bent A.F. (2000). *Arabidopsis* in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiology* 124, 4, 1540-1547.
- Bergmeyer H.U. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage Verlag Chemie Weinheim.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.

- Bläsing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M. (2005). Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 3257-3281.
- Borchert S., Harborth J., Schünemann D., Hoferichter P., Heldt H.W. (1993). Studies of the enzymic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiology* 101, 303-312.
- Bowsher C.G., Boulton E.L., Rose J., Nayagam S., Emes M.J. (1992). Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *The Plant Journal* 2, 893-898.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Browse J., McCourt P.J., Somerville C.R., (1986). Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Analytical Biochemistry* 152, 141-145.
- Cavalier-Smith 2000: Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.-5*, 174-182.
- Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *National Acad Sciences* 86, 2172-2175.
- Chung C.T., Miller R.H. (1993). Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol* 218: 621-627.
- Clough S.J. und Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16, 6, 735-743.
- Coruzzi G.M. (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, e0010.
- Czarnecki, O., Gläßer C., Chen J.G., Mayer K.F.X. Grimm B. (2012). Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 236, 1-15.
- Danielsson R, Albertsson P, Mamedov F, Styring S 2004. Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochem Biophys Acta* 1608:53-61.
- Davuluri R.V., Sun H., Palaniswamy S.K., Matthews N., Molina C., Kurtz M., Grotewold E. (2003). AGRIS: *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server, an information resource of *Arabidopsis* cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* 4, 25.
- Desfeux C., Clough S.J., Bent A.F. (2000). Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the *Arabidopsis* Floral-Dip Method. *Plant Physiology* 123, 3, 895-904.
- Dietz K.J. und Heber U. (1984). Rate-limiting factors in leaf photosynthesis. I. Carbon fluxes in the calvin cycle. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 767, 432-443.

- Dyson B.C., Allwood J.W., Feil R., Xu Y., Miller M., Bowsher C.G., Goodacre R., Lunn J.E., Johnson G.N. (2015). Acclimation of metabolism to light in *Arabidopsis thaliana*: the glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT2 directs metabolic acclimation. *Plant, Cell and Environment* 38, 1404-1417.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 1349.
- Eicks M., Maurino V., Knappe S., Flügge U.I., Fischer K. (2002). The plastidic pentose phosphate translokator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiology* 48, 512-522.
- Eicks M. (2002). Heterologe Expression und Charakterisierung pflanzlicher Transportproteine. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Emes M.J., Neuhaus H.E. (1997). Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *Journal of Experimental Botany* 48, 1995-2005.
- Entwistle G., ap Rees T. (1990). Lack of fructose-1,6-bisphosphatase in a range of higher plants that store starch. *Biochemical Journal* 271, 467-472.
- Farkas I., Dombra V., Miskei M., Szabados L., Koncz C. (2007). Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in Plant Science* 12, 1360-1385.
- Fernie A.R., Carrari F., Sweetlove L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 254-261.
- Fettke J., Albrecht T., Hejazi M., Mahlow S., Nakamura Y., Streup M. (2010). Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by potato (*Solanum tuberosum*) tuber parenchyma cells and converted to reserve starch granules. *New Phytologist* 185, 663-675.
- Fischer K., Weber A., Brink S., Arbinger B., Schünemann D., Borchert S., Heldt H.W., Popp B., Benz R., Link T.A., Eckerskorn C., Flügge U.I. (1994). Porins from Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 41, 25754-25760.
- Fischer K., Kammerer B., Gutensoh M., Arbinger B., Weber A., Häusler R.E., Flügge U.I. (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvat/phosphat antiporter. *The Plant Cell* 9, 453-462.
- Fischer K. (2011). The Import and Export Business in Plastids: Transport Processes across the Inner Envelope Membrane. *Plant Physiology* 155, 1511-1519.
- Fliege R., Flügge U.I., Werdean K., Heldt H.W. (1978). Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate, and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 502, 232-247.
- Flügge U.I. und Heldt W. (1979). Phosphate translocators in chloroplasts identification of the functional protein and characterization of its binding site. *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport*, 373-382.

- Flügge U.I., Freisl M., Heldt H.W. (1980). Balance between metabolite accumulation and transport in relation to photosynthesis by isolated spinach chloroplast. *Plant Physiology* 65, 474-577.
- Flügge U.I. (1985). Hydrodynamic properties of the Triton X-100-solubilizes chloroplast phosphate translocator. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 815, 299-305.
- Flügge U.I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F., 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.
- Flügge U.I., Heldt H.W. (1991). Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 129-144.
- Flügge U.I. (1992). Reaction mechanism and asymmetric orientation of the reconstituted chloroplast phosphate translocator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1110, 112-118.
- Flügge U.I. (1995). Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* 46, 1317-1323.
- Flügge UI (1998) Metabolite translocators in plastids. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 201-206.
- Flügge U.I. (1999). Phosphate translocators in plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 27-45.
- Flügge U.I. und Gao W. (2005). Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biology* 7, 91-97.
- Foyer C.H. und Noctor G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155, 2-18.
- Francis K.E., Lam S.Y., Copenhaver G.P. (2006). Separation of Arabidopsis Pollen Tetrads Is Regulated by *QUARTET1*, a Pectin Methyltransferase Gene. *Plant Physiology* 142, 1004-1013.
- Furumoto T., Yamaguchi T., Ohshima-Ichie Y., Nakamura M., Tsuchida-Iwata Y., Shimamura M., Ohnishi J., Hata S., Gowik U., Westhoff P., Brautigam A., Weber A.P., Izui K. (2011). A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476(7361):472-5.
- Geiger D.R., Servais J.C. (1994). Diurnal Regulation of photosynthetic carbon metabolism in C<sub>3</sub> plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 235-256.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Gerhardt R. und Heldt H.W. (1984). Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology* 75, 542-547.

- Häusler R.E., Geimer S., Kunz H.H., Schmitz J., Dörmann P., Bell K., Hetfeld S., Guballa A., Flüge U.I. (2009) Chlororespiration and grana hypertacking: how an *Arabidopsis* double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiology* 149, 515-533.
- Häusler E.R., Schlieben N.H., Schulz B., Flüge U.I. (1998). Compensation of decreased triosephosphate/phosphate transport activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* 204, 366-376.
- Häusler R.E., Heinrichs L., Schmitz J., Flüge U.I. (2014) How sugars might co-ordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities. *Mol Plant*. 7: 1121-1137.
- Heineke D., Kruse A., Flüge U.I., Frommer W.B., Riesmeier J.W., Willmitzer L., Heldt H.W. (1994). Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* 193, 174-180.
- Heinrichs L., Schmitz J., Flüge U.I., Häusler R.E. (2012). The mysterious rescue of *adg1-1/tpt-2* – an *Arabidopsis thaliana* double mutant impaired in acclimation to high light – by exogenously supplied sugars. *Frontiers in Plant Science* 3, 265.
- Heldt H.W., Portis A.R., Lilley R.M., Mosbach A., Chon C.J. (1980). Assay of nucleotides and other phosphate-containing compounds in isolated chloroplasts by ion exchange chromatography. *Analytical Biochemistry* 101, 278-287.
- Heldt H.W. und B. Piechulla: Pflanzenbiochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2008. ISBN 978-3-8274-1961-3.
- Herrmann K.M. und Weaver L.M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 473-503.
- Hilgers E.J.A. (2011). Einbindung des Xylulose-5-Phosphat/Phosphat-Translokators in Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse in *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit, Universität zu Köln*.
- Hung W.F., Chen L.J., Boldt R., Sun C.W., Li H.M. (2004). Characterisation of *Arabidopsis* Glutamine Phosphoribosyl Pyrophosphate Amidotransferase-Deficient Mutants. *Plant Physiology* 135, 1314-1323.
- Ingle R.A. (2011). Histidine biosynthesis. *The Arabidopsis Book*.
- Jang J.C. und Sheen J. (1994). Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6, 1665-1679.
- Jang J.C., Leon P., Zhou L., Sheen J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9, 5-19.
- Jungblut P.R., Seifert R. (1990). Analysis of high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 21, 1, 47-58.
- Kabashima T., Kawaguchi T., Wadzinski B.E., Uyeda K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *PNAS* 100, 5107-5112.

- Kale R., Hebert A.E., Frankel L.K., Sallans L., Bricker T.M., Pospisil P. (2017). Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II. *PNAS* 114, 2988-2993.
- Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schuber S., Gutensohn M., Weber A., Flügge U.I. (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose-6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell* 10, 105-117.
- Kang D., Gho Y.S., Suh M., Kang C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY* 23, 1511-1512.
- Keeling P.J. und Palmer J.D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 9, 605-618.
- Kim, C., Meskauskiene R., Apel K., Laloi C. (2008). No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO reports* 9(5), 435-439.
- Kirchhoff H., Mukherjee U., Galla H.J. (2002). Molecular Architecture of the Thylakoid Membrane: Lipid Diffusion Space for Plastoquinone. *Biochemistry* 41, 4872-4882.
- Kleinig H. (1989). The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 39-59.
- Knappe S., Flügge U.I., Fischer K. (2003). Analysis of the plastidic phosphate translocator gene family in Arabidopsis and identification of new phosphate translocator-homologous transporters, classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiology* 131, 1178-1190.
- Kofler H., Häusler R.E., Schulz B., Gröner F., Flügge U.I., Weber A. (2000) Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastidic phosphoglucomutase in *Arabidopsis* and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet* 263, 978-986.
- Konert G., Trotta A., Kouvonen P., Rahikainen M., Durian G., Blokhina O., Fagerstedt K., Muth D. (2015). Protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit B'γ interacts with cytoplasmic ACONITASE 3 and modulates the abundance of AOX1A and AOX1D in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 205:1250-1263
- Krause G.H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74, 566-574.
- Krieger-Liszky A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56, 337-346.
- Kruger J.N. und von Schaewen A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 236-246.
- Kunz H.H., Häusler R.E., Fettke J., Herbst K., Niewiadomski P., Girth M., Bell K., Streup M., Flügge U.I., Schneider A. (2010). The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biology* 12, 115-128.

- Kunz H.H., Zamani-Nour S., Häusler R.E., Ludewig K., Schroeder J.I., Malinova I., Fettke J., Flügge U.I., Gierth M. (2014). Loss of Cytosolic Phosphoglucose Isomerase Affects Carbohydrate Metabolism in Leaves and Is Essential for Fertility of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 166, 753-765.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leong T.Y. und Anderson J.M. (1984). Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynth Res* 5: 105-115.
- Li H., Culligan K., Dixon R.A., Chory J. (1995). *CUE1*: A Mesophyll Cell-Specific Positive Regulator of Light-Controlled Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7, 1599-1610.
- Lichtenthaler H.K. (1998). The plants 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 100, 128-138.
- Lin T.P., Caspar T., Somerville C., Preiss J. (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology* 86, 1131-1135.
- Lindroth P., Mopper K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-Phthaldialdehyde - *Analytical chemistry*, 1979 51, 11, 1667-1674.
- Löttgert T. (2007). Der Einfluss eines Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators der inneren Plastidenhüllmembran auf Entwicklungsprozesse in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Lunde C., Jensen P.E., Haldrup A., Knoetzel J., Scheller H.V. (2000). The PS-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408, 613-615.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. (1982). Molecular cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Masami Hasegawa M., Penny D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *PNAS* 99, 12246-12251.
- Martin W. und Hermann R.G. (1998). Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiology Vol. 118*: 9-17
- McCormick A.J., Kruger N.J., 2015. Lack of fructose 2,6-bisphosphate compromises photosynthesis and growth in *Arabidopsis* in fluctuating environments. *The Plant Journal* 81, 670-68.
- McElver J., Tzafrir I., Aux G., Rogers R., Ashby C., Smith K., Thomas C., Schetter A., Zhou Q., Cushman M.A., Tossberg J., Nickle T., Levin J.Z., Law M., Meinke D., Patton D. (2001). Insertional Mutagenesis of Genes Required for Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *GENETICS* 159, 1751-1763.

- McFadden G. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Current Opinion in Plant Biology* 2, Issue 6, Pages 513–519.
- McFadden G. (2001). Chloroplast Origin and Integration. *Plant Physiology* 125, 50-53.
- McGarvey D.J. und Croteau R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell* 7, 1015-1026.
- Mereschkowsky, 1905. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl.*, 25: 593-604
- Meyer T., Hölscher C., Schwöppe C., van Schaewen A. (2011). Alternative targeting of *Arabidopsis* plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD1 involves cysteine-dependent interaction with G6PD4 in the cytosol. *The Plant Journal* 66, 745-758.
- Moore M., Vogel M.O., Dietz K.J. (2014). The acclimation response to high light is initiated within seconds as indicated by upregulation of AP2/ERF transcription factor network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior* 9, e976479-1-e976479-4.
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Müller M., Kunz H.H., Schroeder I.J.I., Kemp G., Young H.S., Neuhaus H.E. (2014). Decreased capacity for sodium export out of *Arabidopsis* chloroplasts impairs salt tolerance, photosynthesis and plant performance. *The Plant Journal* 78, 646-658.
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 34-41.
- Nelson N. und Yocum C.F. (2006). Structure and Function of Photosystems I and II. *Annual Reviews of Plant Biology* 57, 521-65.
- Niewiadomski P., Knappe S., Geimer S., Fischer K., Schulz B., Unte U.S., Rosso M.G., Ache P., Flügge U.I., Schneider A. (2005). The *Arabidopsis* plastidic glucose-6-phosphat/phosphat translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *The Plant Cell* 17, 760-775.
- Niittylä T., Messerli G., Trevisan M., Chen J., Smith A.M., Zeeman S.C. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303, 87-89.
- Nishimura T., Nagao R., Noguchi T., Nield J., Sato F., Ifuku K. (2016). The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt *b*<sub>559</sub> in photosystem II. *Scientific Reports* 6, 21490.
- Obayashi T., Kinoshita K., Nakai K., Shibbaoka M., Hayashi S., Saeki M., Shibata D., Saito K., Ohta H. (2007). ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 35, 863-869.
- Obayashi T., Hayashi S., Saeki M., Ohta H., Kinoshita K. (2007). ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 37, 987-991.
- Ohlrogge J.B. und Jaworski J.G. (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 109-136.

- Okar D.A. und Lange A.J., 1999. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *BioFactors* 10, 1-14.
- Overlach S., Diekmann W., Raschke K. (1993). Phosphate Translocator of Isolated Guard-Cell Chloroplasts from *Pisum sativum* L. Transports Glucose-6-Phosphate. *Plant Physiology* 101, 1201-1207.
- Parsley K. und Hibberd J.M. (2006). The Arabidopsis PPK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins. *Plant Molecular Biology* 62, 339-349.
- Peltier G. und Cournac L. (2002). Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology* 53, 523-550.
- Peterhänzel C., Horst I., Niessen M., Blume C., Kebeish R., Kürkcüoglu S., Kreuzaler F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book* 8, e0130.
- Pfalz, J. *et al.* (2012). Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Frontiers in Plant Science* 3, 257, 1-9.
- Phillips M.A., León P., Boronat A., Rodriguez-Concepcion M. (2008). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science* 13, 619-623.
- Plaxton W.C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 185-214.
- Prabhaker V., Löttgert T., Gigolashvili T., Bell K., Flügge U.I., Häusler E.R. (2009). Molecular and functional characterization of the plastid-localized phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 583, 983-991.
- Prabhaker V., Löttgert T., Geimer S., Dörmann P., Krüger S., Vijayakumar V., Schreiber L., Göbel C., Feussner K., Feussner I., Marin K., Staehr P., Bell K., Flügge U.I., Häusler E.R. (2010). Phosphoenolpyruvate provision to plastids is essential for gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 2594-2617.
- Preuss D., Rhee S.Y., Davis R.W. (1994). Tetrad Analysis Possible in *Arabidopsis* with Mutation of the *QUARTET* (*QRT*) Genes. *SCIENCE* 264, 1458-1460.
- Qin X., Wang W., Wang K., Xin Y., Kuang T. (2011). Isolation and Characteristics of the PSI-LHCI-LHCII Supercomplex Under High Light. *Photochemistry and Photobiology* 87, 143-150.
- Race H.L., Herrmann R.G., Martin W. (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics* 15, 364-370.
- Raven und Allen (2003). Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biology* 4:209.
- Riesmeier J.W., Flügge U.I., Schulz B., Heineke D., Heldt H.W., Willmitzer L., Frommer W.B. (1993). Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *PNAS* 90, 6160-6164.
- Rosar C., Kanonenber K., Nanda A.M., Mielewczik M., Bräutigam A., Novák O., Strnad M., Walter A., Weber A.P.M. (2012). The Leaf Reticulate Mutant *dov1* Is Impaired in the First Step of Purine Metabolism. *Molecular Plant* 5, 1227-1241.

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74, 5463-5467.
- Schaffner W., Weissmann C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytical Biochemistry* 56, 502-514.
- Scheibe R. (1990). Light/Dark Modulation: Regulation of Chloroplast Metabolism in a New Light. *Plant Biology* 103, 327-334.
- Schmidt J. und Amrhein N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39, 737-749.
- Schmitz J., Dissertation (2011). Untersuchung zur Hochlicht-Akklimatsierung von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im Kohlenhydratstoffwechsel. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Schmitz J., Schöttler M.A., Krueger S., Geimer S., Schneider A., Kleine T., Leister D., Bell K., Flügge U.I., Häusler R.E. (2012). Defects in leaf carbohydrate metabolism compromise acclimation to high light and lead to a high chlorophyll fluorescence phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 12, 8.
- Schmitz J., Heinrichs L., Scossa F., Fernie A.R., Oelze M.L., Dietz K.J., Rothbart M., Grimm B., Flügge U.I., Häusler R.E. (2014). The essential role of sugar metabolism in the acclimation response of *Arabidopsis thaliana* to high light intensities. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), 1619-1636.
- Schnarrenberger C, Flechner A, 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* 1995, 108:609-614.
- Schneider A., Häusler R.E., Kolukisaoglu Ü., Kunze R., Van der Graaff E., Schwacke R., Catoni E., Desimonee M., Flügge 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. *The Plant Journal* 32, 685-699.
- Schöttler M.A., Kirchhoff H., Weis E. (2004). The Role of Plastocyanin in the Adjustment of the Photosynthetic Electron Transport to the Carbon Metabolism in Tobacco. *Plant Physiology* 136, 4265-4274.
- Schopfer P. und Brennicke A.: Pflanzenphysiologie. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006. ISBN 978-3-8274-1561-5.
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10, 51-62.
- Schulz B., Frommer W.B., Flügge U.I., Hummer S., Fischer K., Willmitzer L. (1993). Expression of the triose phosphate translocator gene from potato is light dependent and restricted to green tissues. *Molecular and General Genetics* 238, 357-361.
- Schulze-Siebert D., Heineke D., Scharf H., Schultz G. (1984). Pyruvate derived amino-acids in spinach-chloroplasts - synthesis and regulation during photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiology* 76, 465-471.

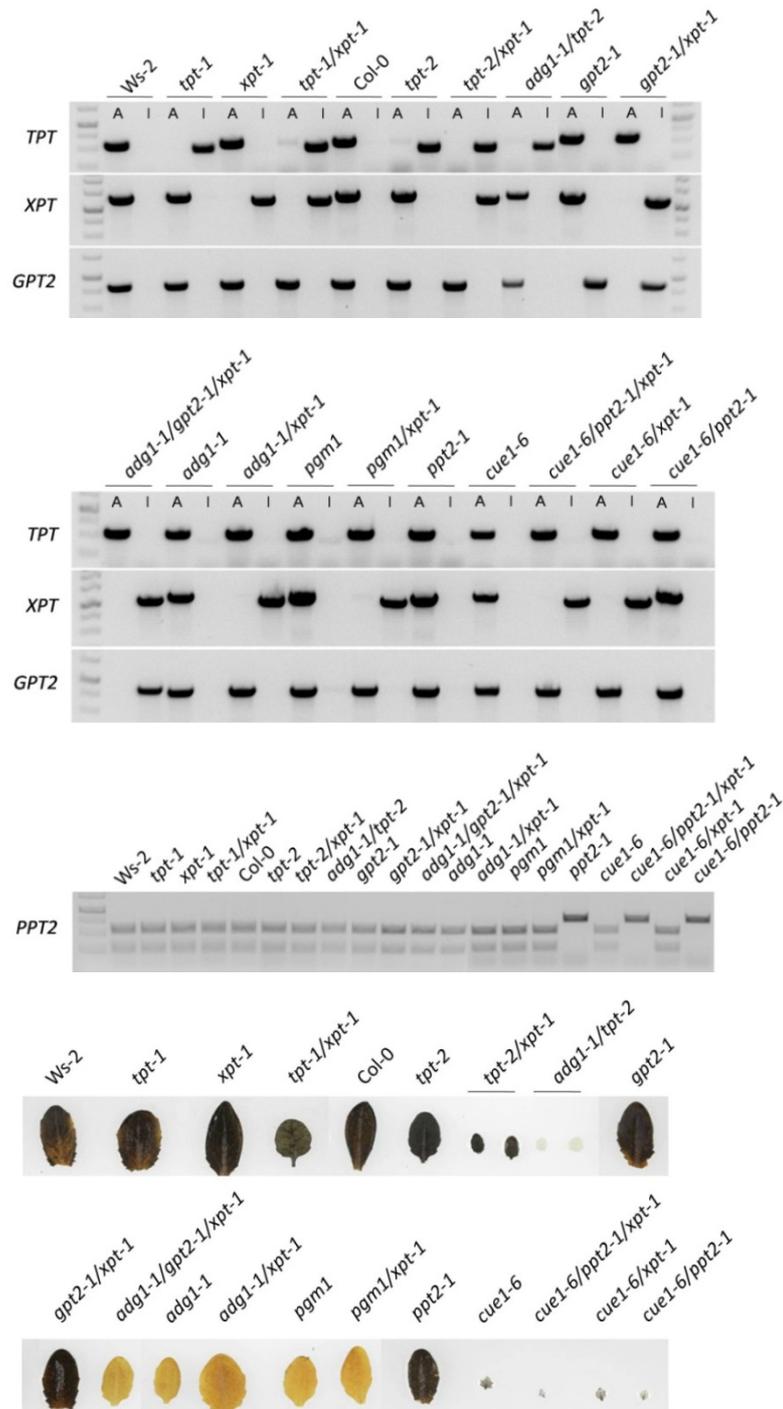
- Schwab R., Palatnik J.F., Rieger M., Schommer C., Schmid M., Weigel D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental Cell* 8, 517-527.
- Schwab R., Ossowski S., Warthmann N., Weigel D. (2010). Directed Gene Silencing with Artificial MicroRNAs. *Methods in Molecular Biology* 592, 71-88.
- Schwacke R., Schneider A., Van Der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.I., Kunze R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* 131: 16-26.
- Schwender J., Ohlrogge J.B., Shachar-Hill Y., (2003). A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing *Brassica napus* Embryos. *Journal of Biological Chemistry* 278, 29442-29453.
- Smeekens, S. (1998). Sugar regulation of gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(3), 230-234.
- Smeekens, S. (2000). SUGAR-INDUCED SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 49-81.
- Staehr P., (2010). Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einer Defizienz der plastidären Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translocatoren (PPT1 und PPT2): Plastidäres Phosphoenolpyruvat steuert Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Staehr P., Löttgert T., Christmann A., Krueger S., Rosar C., Rolcik J., Novak O., Strnad M., Bell K., Weber A.P.M., Flügge U.I., and Häusler R.E. (2014). Reticulate leaves and stunted roots are independent phenotypes pointing at opposite roles of the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator defective in *cue1* in the plastids of both organs. *Front. Plant Sci.* 5, 126.
- Stitt M., ap Rees T. (1979). Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry* 18, 1905-1911.
- 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., Häusler R.E., Li J., Post-Breitenmiller D., Kaiser W.M., Pyke K.A., Flügge U.I., Chory J. (1999). The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development and plastid-dependent nuclear gene expression. *The Plant Cell* 11, 1600-1621.
- Surpin M., Larkin, R.M. und Chory, J. (2002). Signal Transduction between the Chloroplast and the Nucleus. *The Plant Cell* 14, 327-338.
- Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T.Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res* 36, 1009-1014.
- Szeczowka M., Heise R., Tohge T., Nunes-Nesi A., Vosloh D., Huege J., Feil R., Lunn J., Nikoloski Z., Stitt M., Fernie A.R., Arrivault S. (2013). Metabolic Fluxes in an Illuminated *Arabidopsis* Rosette. *The Plant Cell* 25, 694-714.

- Timmis J.N., Ayliffe M.A., Huang C.Y., Martin W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5, 123-135.
- Thomson und Whatley (1980). Development of nongreen plastids. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 31:375-394.
- Tzin V. und Galili G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol. Plant* 3, 956-972.
- Vogel M.O., Moore M., König K., Pecher P., Alsharafa K., Lee J., Dietz K.J. (2014). Fast Retrograde Signaling in Response to High Light Involves Metabolite Export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF Transcription Factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell March 2014* 26, 1151-1165.
- Voll L.M., Häusler R.E., Hecker R., Weber A., Weissenböck G., Fiene G., Waffenschmidt S., Flügge U.I. (2003). The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *The Plant Journal* 36, 301-317.
- Voll L.M., Allaire E.E., Fiene G., Weber A.P.M. (2004). The *Arabidopsis phenyl insensitive growth* Mutant Exhibits a Deregulated Amino Acid Metabolism. *Plant Physiology* 136, 3058-3069.
- Vosloh D., (2011). Subcellular compartmentation of primary carbon metabolism in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation, Universität Potsdam*.
- Wagner R., Apley E.C., Gross A., Flügge U.I. (1989). The rotational diffusion of chloroplast phosphate translocator and of lipid molecules in bilayer membranes. *European Journal of Biochemistry* 182, 165-173.
- Walters R.G., Ibrahim D.G., Horton P., Kruger N.J. (2004). A mutant of *Arabidopsis* lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiology* 135, 891-906.
- Wakao S., Andre C., Benning C. (2008). Functional Analyses of Cytosolic Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases and Their Contribution to Seed Oil Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146, 277-288.
- Ward J.M. (2001). Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 17, 560-563.
- Weber A., Servaites J.C., Geiger D.R., Kofler H., Hille D., Gröner F., Hebbeker U., Flügge U.I. (2000). Identification, purification and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12, 787-801.
- Weber A.P.M., Fischer K. (2007). Making the connections – the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Letters* 581, 2215-2222.
- Weise SE, Weber APM, Sharkey TD (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218, 474-482.
- Welch B.L. (1947). The Generalization of "Student's" Problem when Several Different Population Variances are Involved. *Biometrika* 34, 28-35.

- Wellburn A.R., Lichtenthaler H. (1984). Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Advances in photosynthesis research*, 1984.
- Winter H., Robinson D.G., Heldt H.W. (1994). Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193, 530-535.
- Winter H., Huber S.C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 253-289.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. (2007). An „Electronic Fluorescent Pictograph“ Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PloS one* 2, e718.
- Wieczorek, H., Cioffi, M., Klein, U., Harvey, W. R., Schweikl, H. und Wolfersberger, M. G. (1990). Isolation of Goblet Cell Apical Membrane from Tobacco Hornworm Midgut and Purification of Its Vacuolar-type ATPase. *Methods Enzymol.* 192, 608-616.
- Wolosiuk R.A., Ballicora M.A., Hagelin K. (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation: enzyme modulation. *The FASEB Journal* 7, 622-637.
- Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (1997) Increases in the fluorescence F<sub>0</sub> level and reversible inhibition of photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth Res* 52, 57-64.
- Zhang S. und Scheller H.V. (2004). Light-harvesting Complex II Binds to Several Small Subunits of Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3180-3187.
- Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 805-836.

## 8 Anhang

### 8.1 Bestätigung der Zygotie von generierten Mehrfachmutanten



8.1: Bestätigung der Stoffwechselmutanten. Die generierten Mehrfachmutanten wurden über PCR mit spezifischen Primern und anschließender Agarosegelelektrophorese auf ihre Mutationen überprüft. A: Überprüfung der Homozygotie auf TPT, XPT und GPT2 der Mutanten und Kontrollen. B: Überprüfung der Homozygotie auf das PPT2-Allel bzw. der Punktmutation von ppt2-1. Durch die Punktmutation kommt es zu einem Verlust einer Schnittstelle für BsrI, daher kann die Zygotie über einen enzymatischen Verdau des PCR-Produktes mit BsrI festgestellt werden. C: Die Zygotie von Stärkemutanten wurde in der zweiten Hälfte der Lichtperiode über einen Stärketest an Blättern überprüft. Beim Vorhandensein von Stärke verfärbten sich die Blätter grau-blau, Blätter von stärkefreien Mutanten färben sich nicht an. Der Gelbstich in den Blättern von stärkefreien Mutanten geht auf Reste von Lugolscher Lösung zurück.

## 8.2 Bildliche Darstellung und Photosyntheseleistung generierter Mehrfachmutanten

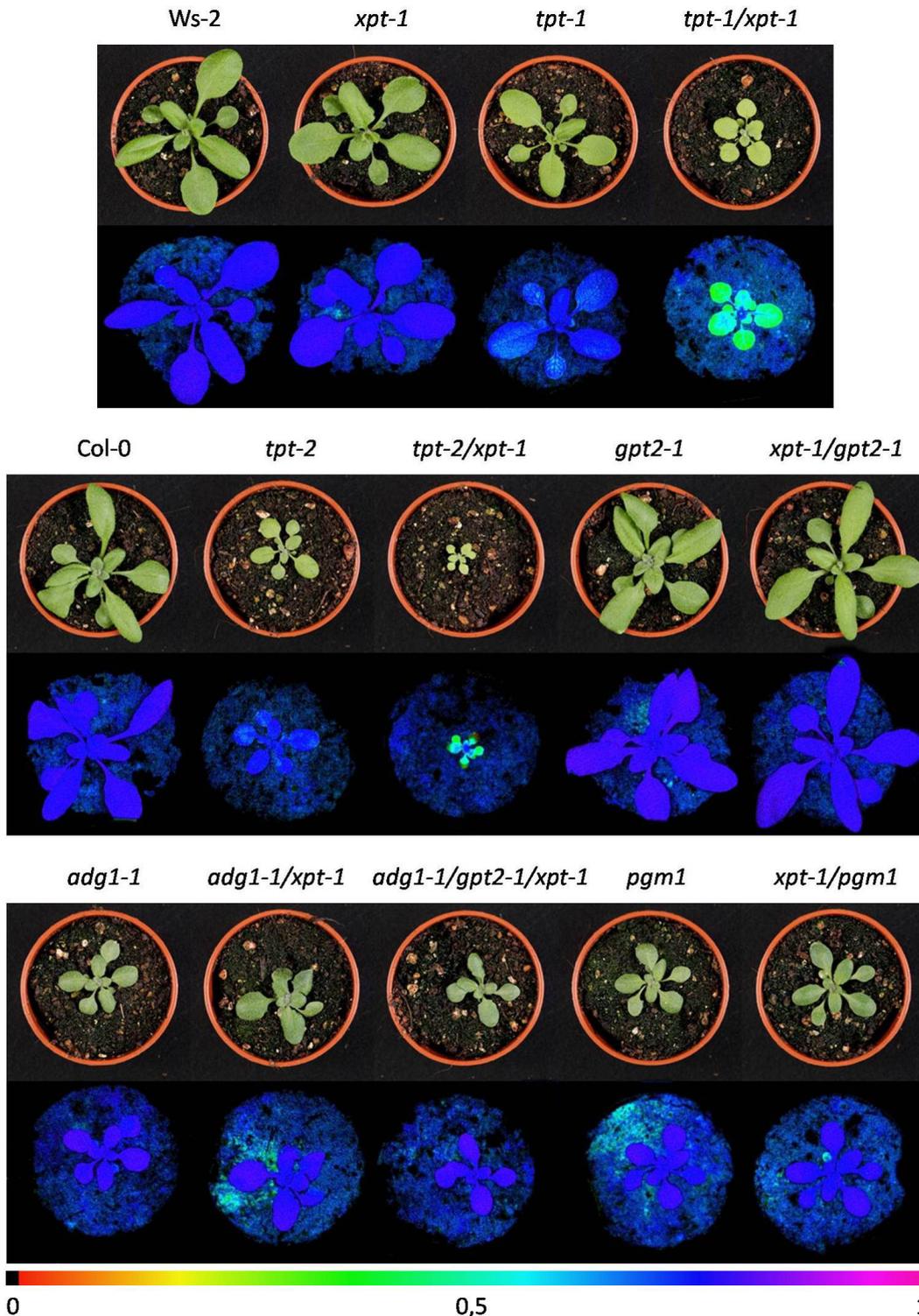


Abbildung 8.2: Übersicht zu den Wachstums- und Photosynthesephänotyp von generierten Mehrfachmutanten und Kontroll-Pflanzen. Es ist jeweils der Wachstumsphänotyp von auf Erde unter Hochlicht (PFD = 300 ) angezogenen Pflanzenlinien, sowie darunter das entsprechende  $F_v/F_m$ -Verhältnis in Falschfarben. Der farbige Balken dient der numerischen Abschätzung des farbkodierten  $F_v/F_m$ -Verhältnis.

**Tabelle 8.1: Übersicht zu den bestimmten Chl a Fluoreszenzparametern von den generierten Mehrfachmutanten und Kontrollpflanzen. Die Pflanzen wurden unter Hochlicht (PFD  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) angezogen und nach etwa zwei Wochen mit Hilfe der ImagingPAM analysiert. Die Messung erfolgte bei PFD von  $327 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die maximale ETR wurde über die Lichtkurve bestimmt. MW  $\pm$  SF; n = 9.**

	$F_0$	$F_m$	$F_v/F_m$	$\Phi_{PSII}$	$ETR_{\max}$
Ws-2	$0,221 \pm 0,013$	$0,976 \pm 0,052$	$0,774 \pm 0,004$	$0,444 \pm 0,013$	$61,0 \pm 1,8$
xpt-1	$0,197 \pm 0,003$	$0,896 \pm 0,024$	$0,780 \pm 0,005$	$0,446 \pm 0,004$	$61,3 \pm 0,6$
tpt-1	$0,185 \pm 0,007$	$0,724 \pm 0,043$	$0,744 \pm 0,007$	$0,451 \pm 0,002$	$61,9 \pm 0,3$
tpt-1/xpt-1	$0,461 \pm 0,034$	$0,927 \pm 0,025$	$0,503 \pm 0,031$	$0,231 \pm 0,027$	$31,8 \pm 3,7$
Col-0	$0,222 \pm 0,009$	$1,000 \pm 0,034$	$0,778 \pm 0,004$	$0,443 \pm 0,007$	$60,8 \pm 1,0$
tpt-2	$0,226 \pm 0,008$	$0,902 \pm 0,018$	$0,750 \pm 0,005$	$0,443 \pm 0,010$	$60,9 \pm 1,4$
tpt-2/xpt-1	$0,368 \pm 0,038$	$0,821 \pm 0,047$	$0,554 \pm 0,030$	$0,263 \pm 0,025$	$36,2 \pm 3,5$
gpt2-1	$0,195 \pm 0,009$	$0,940 \pm 0,053$	$0,792 \pm 0,003$	$0,481 \pm 0,003$	$66,0 \pm 0,4$
gpt2-1/xpt-1	$0,197 \pm 0,016$	$0,913 \pm 0,081$	$0,784 \pm 0,002$	$0,459 \pm 0,005$	$63,0 \pm 0,6$
adg1-1	$0,171 \pm 0,007$	$0,795 \pm 0,018$	$0,785 \pm 0,005$	$0,473 \pm 0,013$	$65,0 \pm 1,7$
adg1-1/xpt-1	$0,196 \pm 0,008$	$0,912 \pm 0,021$	$0,785 \pm 0,006$	$0,489 \pm 0,001$	$67,1 \pm 0,2$
adg1-1/gpt2-1/xpt-1	$0,175 \pm 0,007$	$0,839 \pm 0,027$	$0,792 \pm 0,007$	$0,476 \pm 0,020$	$65,4 \pm 2,8$
pgm	$0,173 \pm 0,003$	$0,817 \pm 0,012$	$0,788 \pm 0,003$	$0,479 \pm 0,002$	$65,8 \pm 0,2$
xpt-1/pgm	$0,188 \pm 0,002$	$0,858 \pm 0,012$	$0,780 \pm 0,005$	$0,481 \pm 0,017$	$66,1 \pm 2,3$

### 8.3 Übersicht zu den immunologisch nachgewiesenen Protein-Untereinheiten

**Tabelle 8.2: Übersicht der immunologisch nachgewiesenen Protein-Untereinheiten. Neben dem Namen ist die jeweilige Größe angegeben. Des Weiteren ist angegeben, ob die Protein-Untereinheit durch das Plastom oder den Kern kodiert wird.**

Protein-Untereinheit	Proteingröße	Kodiert durch
PsbA (D1)	28-30 kDa	Plastom
PsbB (CP47)	40-45 kDa	Plastom
PsbD (D2)	28-30 kDa	Plastom
PsbE	9,25 kDa	Plastom
Lhcb1	25 kDa	Kern
Lhcb2	25 kDa	Kern
PetC (Rieske-Protein)	23 kDa	Kern
PsaB (A2, Apoprotein)	55-60 kDa	Plastom
PsaL	17-18 kDa	Kern
Lhca1	22 kDa	Nukleus

## 8.4 Aminosäuregehalte in Blattproben

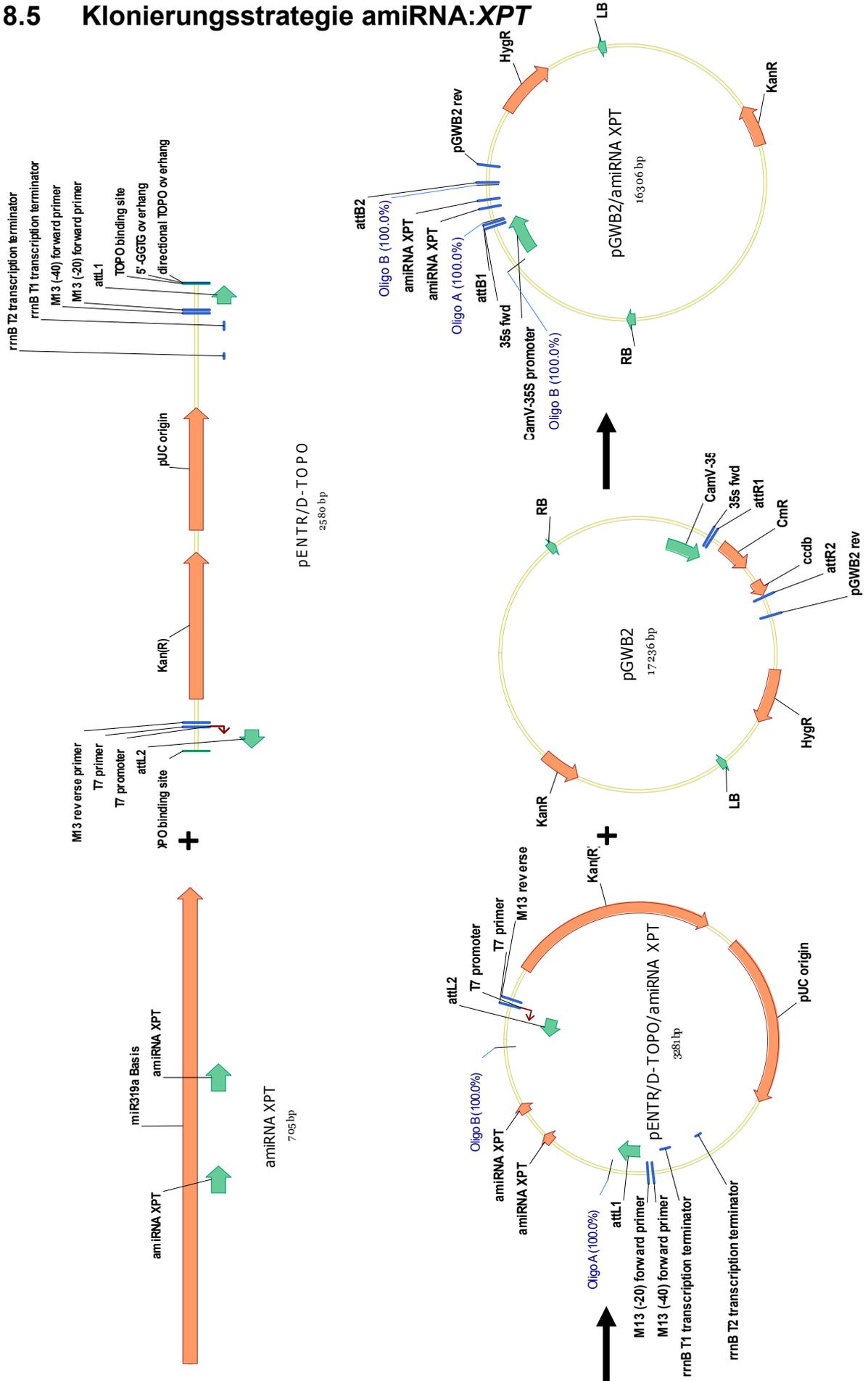
Tabelle 8.3: Prozentuale Aminosäuregehalte in Blattrosettenproben nach Anzucht im HL (PFD = 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) auf Erde. Der Gesamtgehalt an Aminosäuren wurde zur Berechnung der prozentualen Aminosäuregehalte auf 100% gesetzt. MW  $\pm$  SF; n = 3-5.

	Ws-2	xpt-1	tpt-1	tpt-1/xpt-1	Col-0	tpt-2	tpt-2/xpt-1	amiRNA:XPT tpt-2 #3	amiRNA:XPT tpt-2 #4	adg1-1/tpt-2
Glu	8,236 $\pm$ 1,150	9,309 $\pm$ 0,551	13,181 $\pm$ 1,163	16,797 $\pm$ 2,159	12,802 $\pm$ 2,151	15,580 $\pm$ 1,294	16,653 $\pm$ 1,634	15,694 $\pm$ 0,792	16,200 $\pm$ 1,637	17,759 $\pm$ 1,409
Gln	40,727 $\pm$ 4,123	37,124 $\pm$ 2,550	35,794 $\pm$ 2,246	30,472 $\pm$ 5,059	36,909 $\pm$ 0,672	26,686 $\pm$ 1,885	30,773 $\pm$ 2,724	36,116 $\pm$ 3,143	36,442 $\pm$ 3,026	14,321 $\pm$ 1,727
Asp	1,126 $\pm$ 0,212	1,801 $\pm$ 0,285	2,080 $\pm$ 0,207	4,237 $\pm$ 0,571	0,549 $\pm$ 0,147	1,086 $\pm$ 0,113	2,251 $\pm$ 0,268	1,551 $\pm$ 0,120	1,652 $\pm$ 0,205	1,792 $\pm$ 0,238
Asn	10,694 $\pm$ 1,028	11,875 $\pm$ 0,642	20,224 $\pm$ 1,372	21,744 $\pm$ 2,268	24,385 $\pm$ 4,715	28,892 $\pm$ 3,744	15,193 $\pm$ 0,766	18,561 $\pm$ 0,563	17,519 $\pm$ 1,186	13,869 $\pm$ 1,345
Ala	7,604 $\pm$ 0,454	7,391 $\pm$ 0,307	6,032 $\pm$ 0,226	7,978 $\pm$ 2,019	1,051 $\pm$ 0,366	2,287 $\pm$ 0,187	14,056 $\pm$ 2,063	5,029 $\pm$ 0,390	4,909 $\pm$ 0,425	7,394 $\pm$ 0,473
Ser	6,409 $\pm$ 0,790	6,127 $\pm$ 0,340	6,635 $\pm$ 0,359	7,383 $\pm$ 1,087	3,770 $\pm$ 0,477	3,840 $\pm$ 0,500	5,757 $\pm$ 0,479	5,427 $\pm$ 0,359	5,403 $\pm$ 0,472	24,903 $\pm$ 2,477
Gly	20,943 $\pm$ 1,597	21,644 $\pm$ 1,403	11,466 $\pm$ 1,237	4,144 $\pm$ 0,872	11,381 $\pm$ 2,582	12,866 $\pm$ 1,313	4,168 $\pm$ 0,195	8,298 $\pm$ 1,199	8,768 $\pm$ 1,137	2,087 $\pm$ 0,219
Thr	1,643 $\pm$ 0,123	2,225 $\pm$ 0,098	2,335 $\pm$ 0,098	4,195 $\pm$ 0,323	2,422 $\pm$ 0,185	4,185 $\pm$ 0,270	4,141 $\pm$ 0,216	4,083 $\pm$ 0,180	3,912 $\pm$ 0,201	5,707 $\pm$ 0,656
His	0,252 $\pm$ 0,098	0,377 $\pm$ 0,191	0,268 $\pm$ 0,097	0,243 $\pm$ 0,073	0,428 $\pm$ 0,058	0,446 $\pm$ 0,041	0,444 $\pm$ 0,033	0,494 $\pm$ 0,034	0,500 $\pm$ 0,036	0,469 $\pm$ 0,014
Arg	1,190 $\pm$ 0,153	0,771 $\pm$ 0,182	0,694 $\pm$ 0,050	1,083 $\pm$ 0,245	4,948 $\pm$ 1,156	2,203 $\pm$ 0,481	3,023 $\pm$ 0,496	1,836 $\pm$ 0,106	1,689 $\pm$ 0,112	9,258 $\pm$ 2,098
Phe	0,242 $\pm$ 0,010	0,261 $\pm$ 0,017	0,206 $\pm$ 0,014	0,274 $\pm$ 0,033	0,228 $\pm$ 0,034	0,311 $\pm$ 0,037	0,557 $\pm$ 0,040	0,430 $\pm$ 0,026	0,426 $\pm$ 0,041	0,241 $\pm$ 0,007
Tyr	0,058 $\pm$ 0,003	0,071 $\pm$ 0,002	0,062 $\pm$ 0,008	0,092 $\pm$ 0,015	0,037 $\pm$ 0,005	0,043 $\pm$ 0,004	0,101 $\pm$ 0,013	0,052 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,003	0,094 $\pm$ 0,021
Trp	0,044 $\pm$ 0,003	0,058 $\pm$ 0,004	0,035 $\pm$ 0,002	0,117 $\pm$ 0,063	0,048 $\pm$ 0,006	0,054 $\pm$ 0,006	0,174 $\pm$ 0,009	0,090 $\pm$ 0,006	0,086 $\pm$ 0,006	0,064 $\pm$ 0,007
Val	0,587 $\pm$ 0,033	0,678 $\pm$ 0,018	0,720 $\pm$ 0,043	0,868 $\pm$ 0,108	0,354 $\pm$ 0,034	0,555 $\pm$ 0,048	1,172 $\pm$ 0,095	0,783 $\pm$ 0,056	0,790 $\pm$ 0,056	0,993 $\pm$ 0,037
Ileu	0,146 $\pm$ 0,010	0,168 $\pm$ 0,005	0,168 $\pm$ 0,010	0,238 $\pm$ 0,024	0,206 $\pm$ 0,016	0,266 $\pm$ 0,014	0,419 $\pm$ 0,035	0,288 $\pm$ 0,018	0,287 $\pm$ 0,011	0,318 $\pm$ 0,011
Leu	0,101 $\pm$ 0,006	0,120 $\pm$ 0,011	0,101 $\pm$ 0,006	0,134 $\pm$ 0,027	0,097 $\pm$ 0,012	0,130 $\pm$ 0,016	0,428 $\pm$ 0,043	0,195 $\pm$ 0,020	0,193 $\pm$ 0,010	0,169 $\pm$ 0,013

**Tabelle 8.4: Absolute Aminosäuregehalte in Blattrosettenproben nach Anzucht im HL (PFD = 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) auf Erde. Die Aminosäuregehalte sind in  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Trockengewicht (TG) angegeben. MW  $\pm$  SF; n = 3-5.**

	Ws-2	xpt-1	tpt-1	tpt-1/xpt-1	Col-0	tpt-2	tpt-2/xpt-1	amiRNA:XPT tpt-2 #3	amiRNA:XPT tpt-2 #4	adg1-1/tpt-2
	( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ TG)									
Glu	0.735 $\pm$ 0.103	0.917 $\pm$ 0.054	1.156 $\pm$ 0.102	1.096 $\pm$ 0.141	1.541 $\pm$ 0.259	1.187 $\pm$ 0.099	1.356 $\pm$ 0.133	1.090 $\pm$ 0.055	1.110 $\pm$ 0.112	1.258 $\pm$ 0.100
Gln	3.636 $\pm$ 0.368	3.658 $\pm$ 0.251	3.139 $\pm$ 0.197	1.987 $\pm$ 0.330	4.443 $\pm$ 0.081	2.033 $\pm$ 0.144	2.506 $\pm$ 0.222	2.509 $\pm$ 0.218	2.496 $\pm$ 0.207	1.015 $\pm$ 0.122
Asp	0.101 $\pm$ 0.019	0.177 $\pm$ 0.028	0.182 $\pm$ 0.018	0.276 $\pm$ 0.037	0.066 $\pm$ 0.018	0.083 $\pm$ 0.009	0.183 $\pm$ 0.022	0.108 $\pm$ 0.008	0.113 $\pm$ 0.014	0.127 $\pm$ 0.017
Asn	0.955 $\pm$ 0.092	1.170 $\pm$ 0.063	1.774 $\pm$ 0.120	1.418 $\pm$ 0.148	2.936 $\pm$ 0.568	2.201 $\pm$ 0.285	1.237 $\pm$ 0.062	1.289 $\pm$ 0.039	1.200 $\pm$ 0.081	0.983 $\pm$ 0.095
Ala	0.679 $\pm$ 0.040	0.728 $\pm$ 0.030	0.529 $\pm$ 0.020	0.520 $\pm$ 0.132	0.126 $\pm$ 0.044	0.174 $\pm$ 0.014	1.145 $\pm$ 0.168	0.349 $\pm$ 0.027	0.336 $\pm$ 0.029	0.524 $\pm$ 0.033
Ser	0.572 $\pm$ 0.070	0.604 $\pm$ 0.034	0.582 $\pm$ 0.031	0.482 $\pm$ 0.071	0.454 $\pm$ 0.057	0.292 $\pm$ 0.038	0.469 $\pm$ 0.039	0.377 $\pm$ 0.025	0.370 $\pm$ 0.032	1.765 $\pm$ 0.176
Gly	1.870 $\pm$ 0.143	2.133 $\pm$ 0.138	1.005 $\pm$ 0.108	0.270 $\pm$ 0.057	1.370 $\pm$ 0.311	0.980 $\pm$ 0.100	0.339 $\pm$ 0.016	0.576 $\pm$ 0.083	0.601 $\pm$ 0.078	0.148 $\pm$ 0.016
Thr	0.147 $\pm$ 0.011	0.219 $\pm$ 0.010	0.205 $\pm$ 0.009	0.274 $\pm$ 0.021	0.292 $\pm$ 0.022	0.319 $\pm$ 0.021	0.337 $\pm$ 0.018	0.284 $\pm$ 0.013	0.268 $\pm$ 0.014	0.404 $\pm$ 0.046
His	0.022 $\pm$ 0.009	0.037 $\pm$ 0.019	0.023 $\pm$ 0.008	0.016 $\pm$ 0.005	0.052 $\pm$ 0.007	0.034 $\pm$ 0.003	0.036 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.002	0.034 $\pm$ 0.002	0.033 $\pm$ 0.001
Arg	0.106 $\pm$ 0.014	0.076 $\pm$ 0.018	0.061 $\pm$ 0.004	0.071 $\pm$ 0.016	0.596 $\pm$ 0.139	0.168 $\pm$ 0.037	0.246 $\pm$ 0.040	0.128 $\pm$ 0.007	0.116 $\pm$ 0.008	0.656 $\pm$ 0.149
Phe	0.022 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.002	0.018 $\pm$ 0.001	0.018 $\pm$ 0.002	0.027 $\pm$ 0.004	0.024 $\pm$ 0.003	0.045 $\pm$ 0.003	0.030 $\pm$ 0.002	0.029 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.000
Tyr	0.005 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.000	0.008 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.001
Trp	0.004 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.008 $\pm$ 0.004	0.006 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.000	0.014 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001
Val	0.052 $\pm$ 0.003	0.067 $\pm$ 0.002	0.063 $\pm$ 0.004	0.057 $\pm$ 0.007	0.043 $\pm$ 0.004	0.042 $\pm$ 0.004	0.095 $\pm$ 0.008	0.054 $\pm$ 0.004	0.054 $\pm$ 0.004	0.070 $\pm$ 0.003
Ileu	0.013 $\pm$ 0.001	0.017 $\pm$ 0.000	0.015 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.001	0.034 $\pm$ 0.003	0.020 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.001	0.023 $\pm$ 0.001
Leu	0.009 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.000	0.009 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.001	0.010 $\pm$ 0.001	0.035 $\pm$ 0.004	0.014 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.001
Gesamt	8.928 $\pm$ 0.740	9.855 $\pm$ 0.463	8.769 $\pm$ 0.506	6.522 $\pm$ 0.846	12.039 $\pm$ 0.859	7.616 $\pm$ 0.572	8.144 $\pm$ 0.557	6.946 $\pm$ 0.434	6.850 $\pm$ 0.554	7.086 $\pm$ 0.610

## 8.5 Klonierungsstrategie amiRNA:XPT

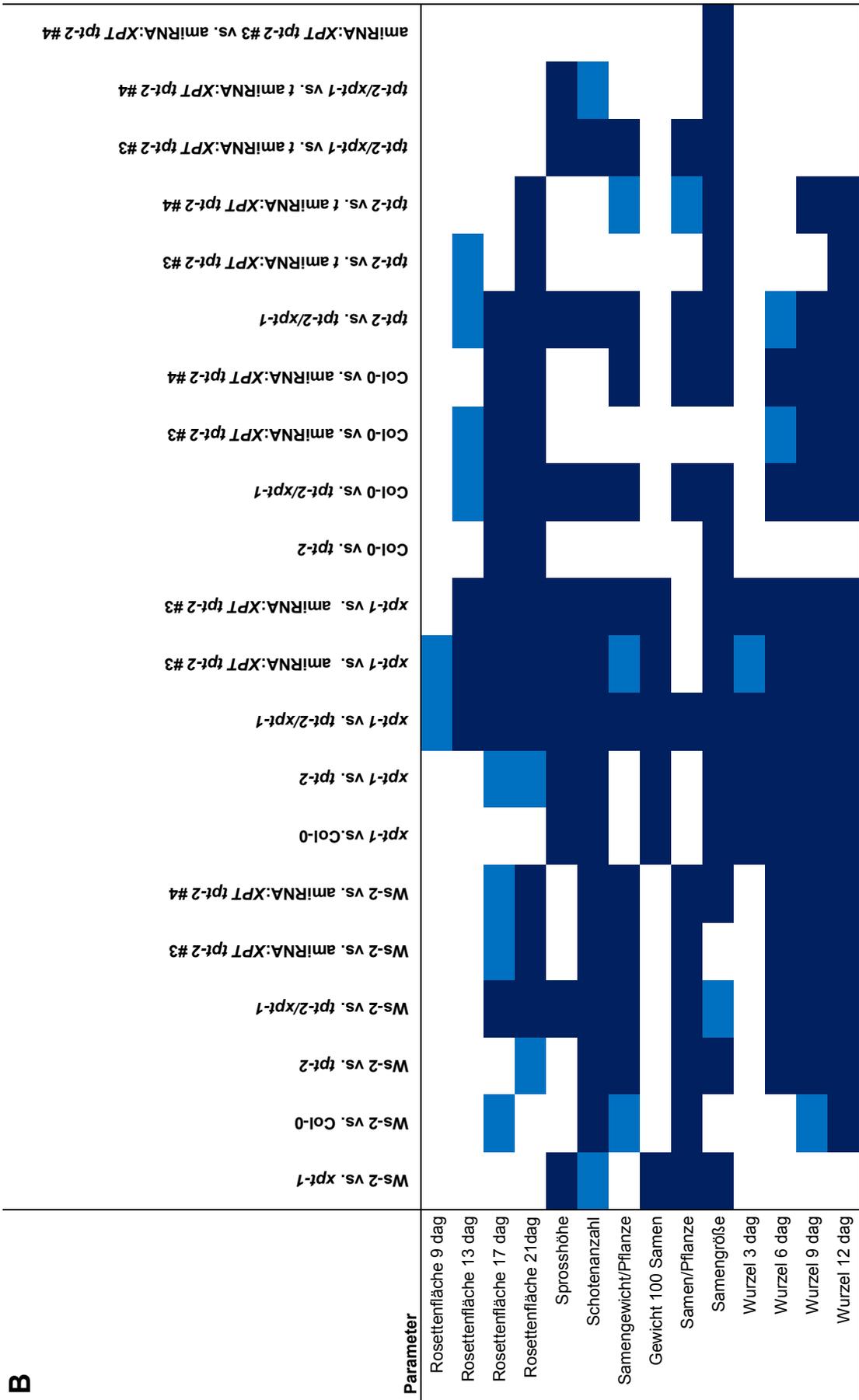


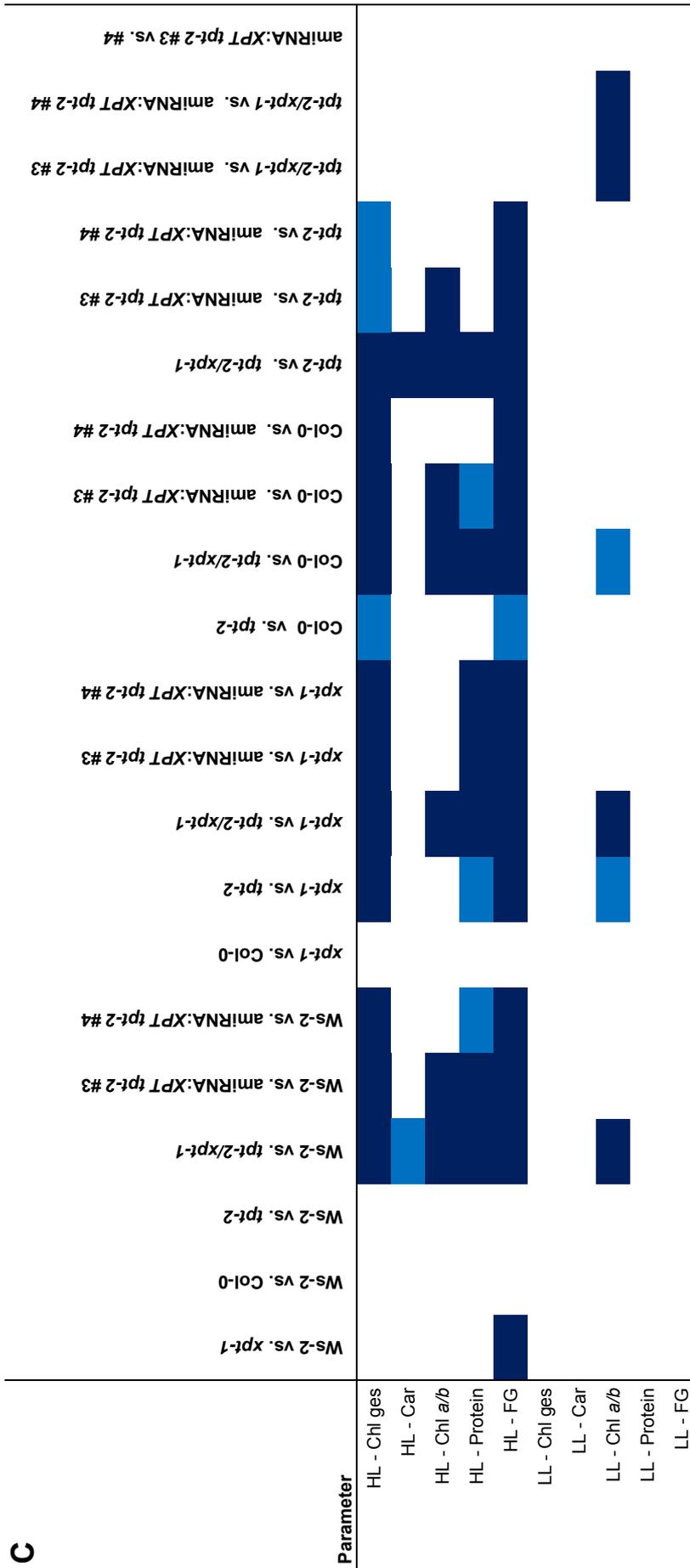
## 8.6 Signifikanztafeln

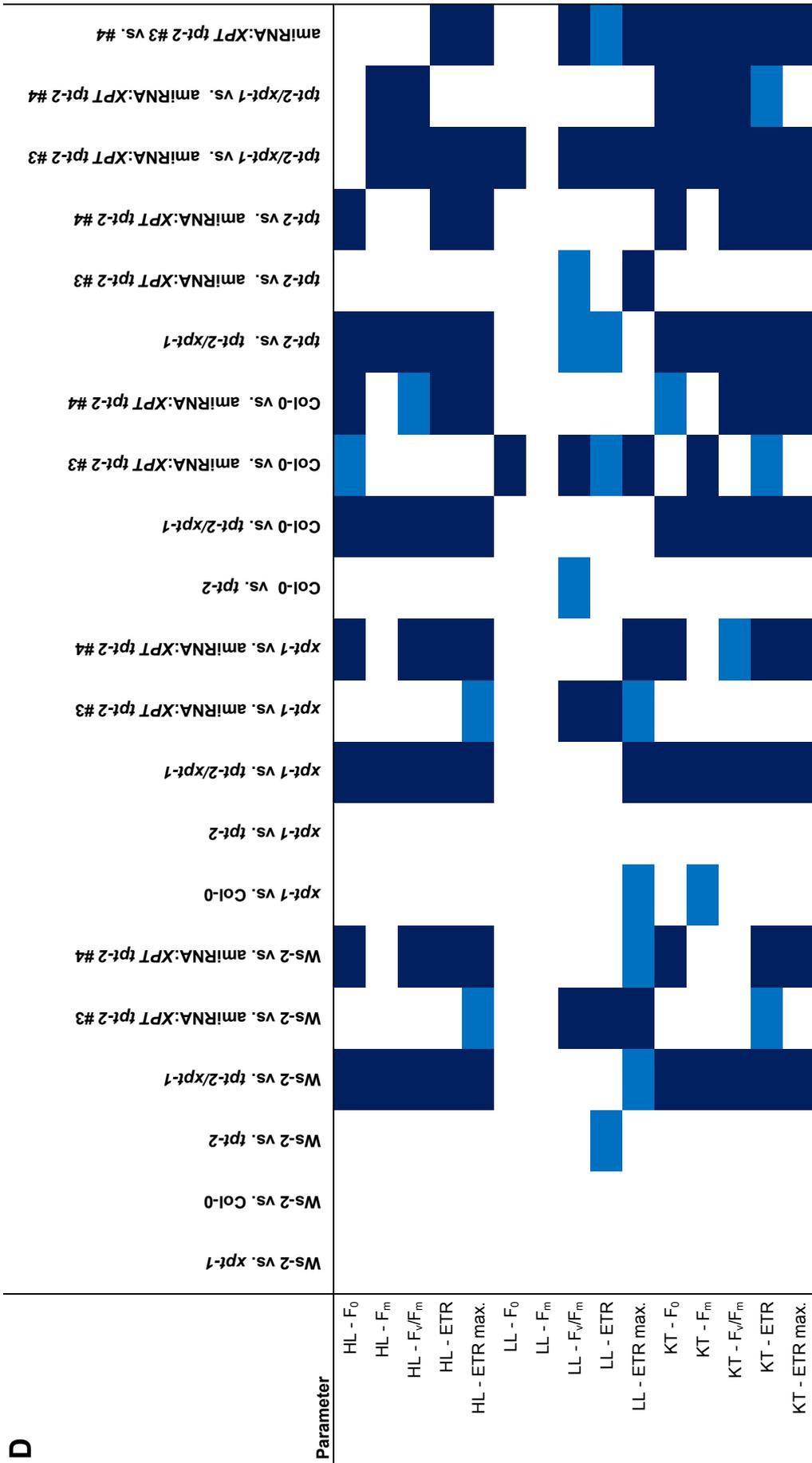
Die Signifikanztafeln wurden anhand der Ergebnisse von Signifikanztests erstellt. Bei einem Vergleich von nur zwei Pflanzenlinien (wie z.B. dem Vergleich von WT und Mutante) wurde der Welsh Student's T-Test verwendet. Eine Signifikanzanalyse zwischen mehreren Pflanzenlinien (Vergleich von WT, Einzel- und Doppelmutanten miteinander) erfolgte über *one-way* ANOVA mit anschließenden Tukey Kramer *post-hoc* Test. Den Signifikanztafeln liegt ein Farbkode zugrunde: Weiße Felder bedeuten nicht signifikant, hellblaue Felder deuten auf einen signifikanten Unterschied bei einem Signifikanzniveau von kleiner 0,5 ( $p < 0,5$ ) hin und dunkelblaue Felder zeigen einen signifikanten Unterschied bei einem Signifikanzniveau kleiner 0,01 ( $p < 0,01$ ) an.

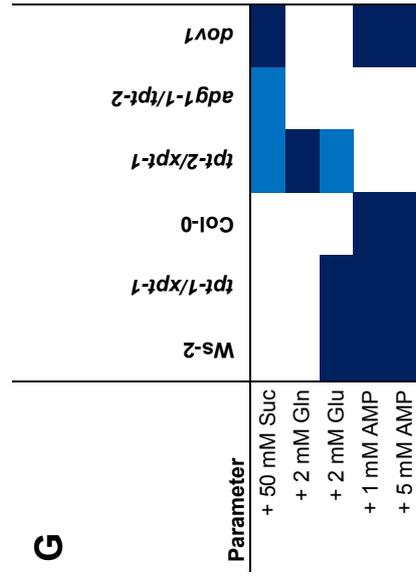
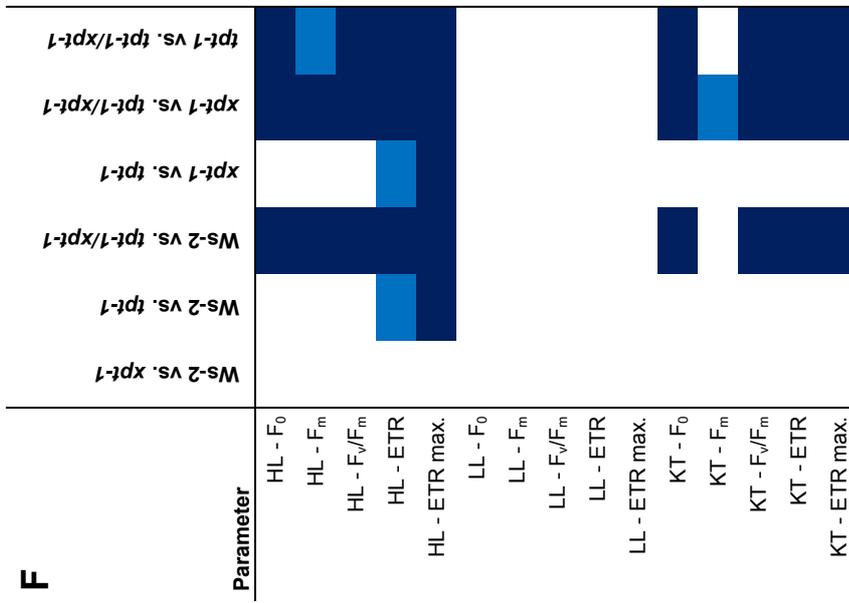
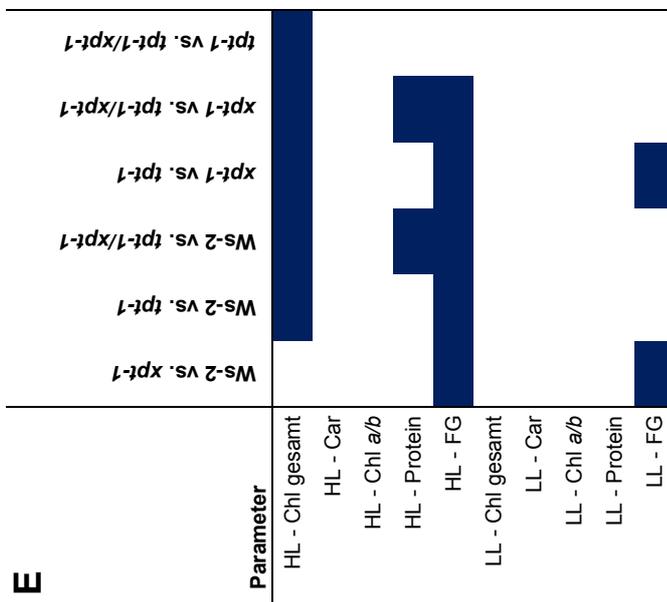
**A**

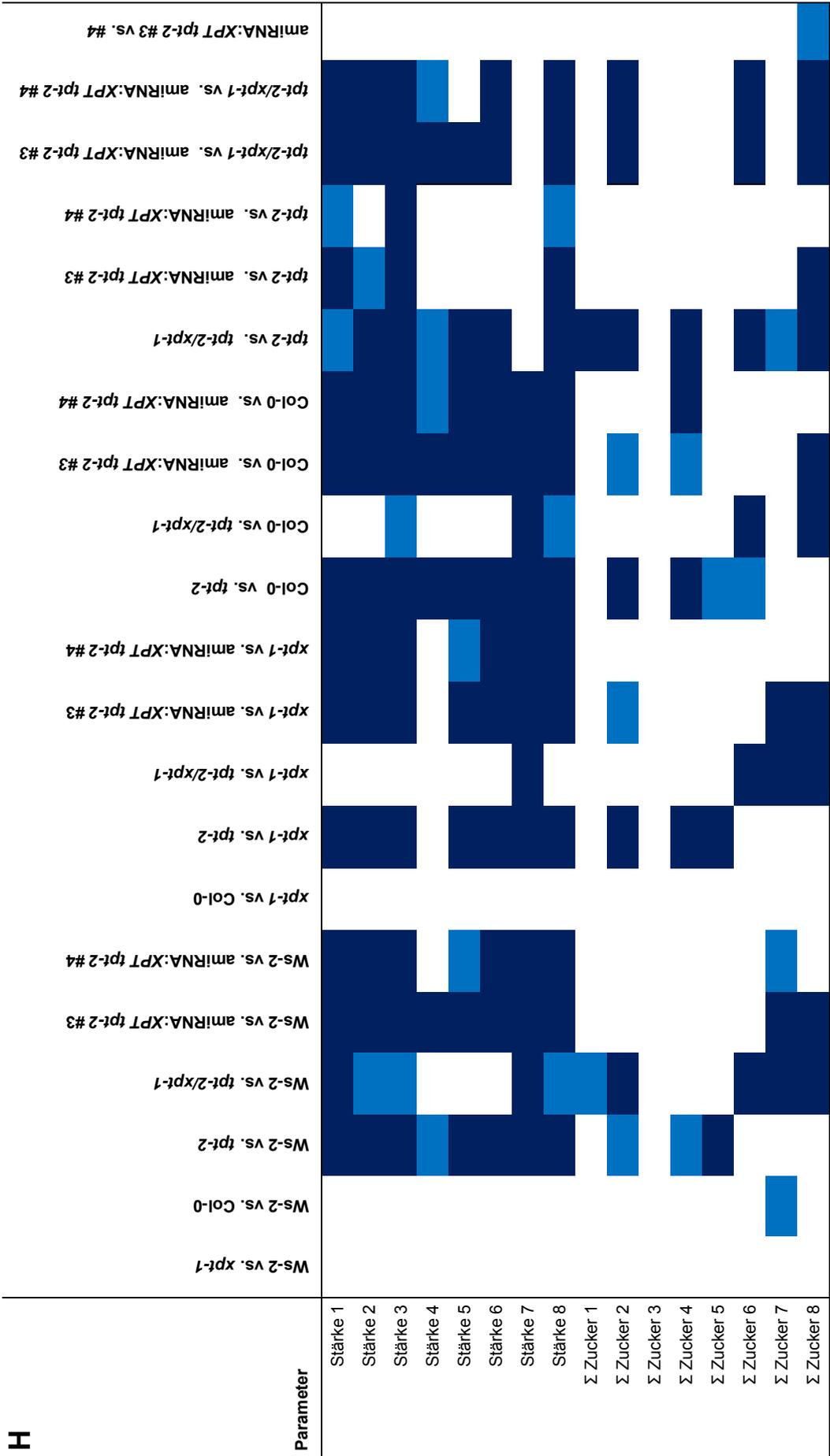
Parameter	WS-2 vs. xpt-1	WS-2 vs. amIRNA:XPT WS-2 #38	WS-2 vs. amIRNA:XPT WS-2 #41	WS-2 vs. amIRNA:XPT WS-2 #53	WS-2 vs. amIRNA:XPT WS-2 #64	Col-0 vs. amIRNA:XPT Col-0 #50	Col-3 vs. xpt-2
Schoten/Pflanze							
Schotenlänge							
Samen/Schote							
Samen/mm Schote							
Samenfläche							
Samengewicht 100 Samen							
Proteingehalt/Same							
Fettsäuregehalt/Same							
Fettsäuregehalt 16:0							
Fettsäuregehalt 16:1							
Fettsäuregehalt 18:0							
Fettsäuregehalt 18:1							
Fettsäuregehalt 18:2							
Fettsäuregehalt 18:3							
Fettsäuregehalt 20:0							
Fettsäuregehalt 20:1							
Fettsäuregehalt 22:0							
Fettsäuregehalt 22:1							

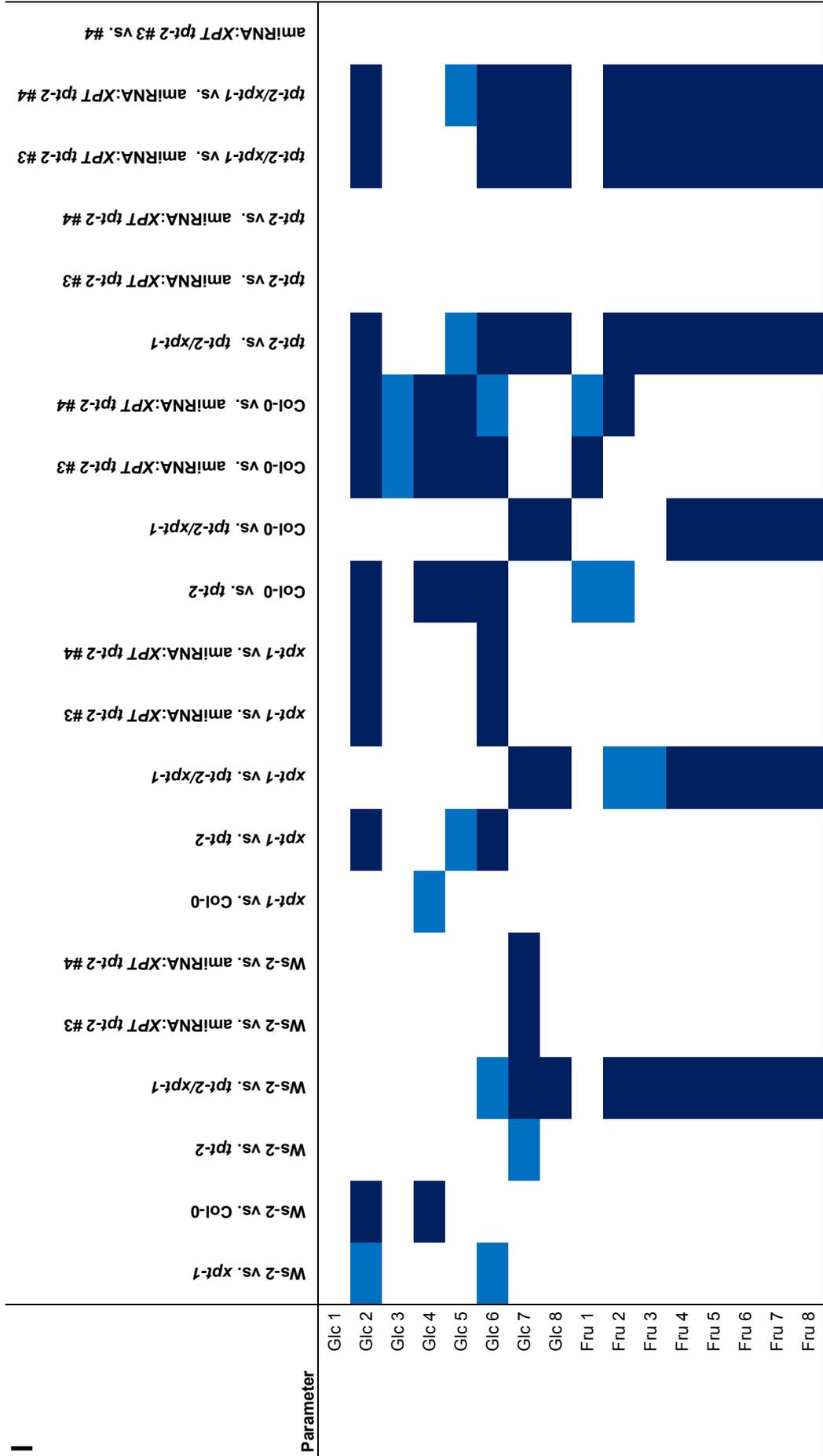


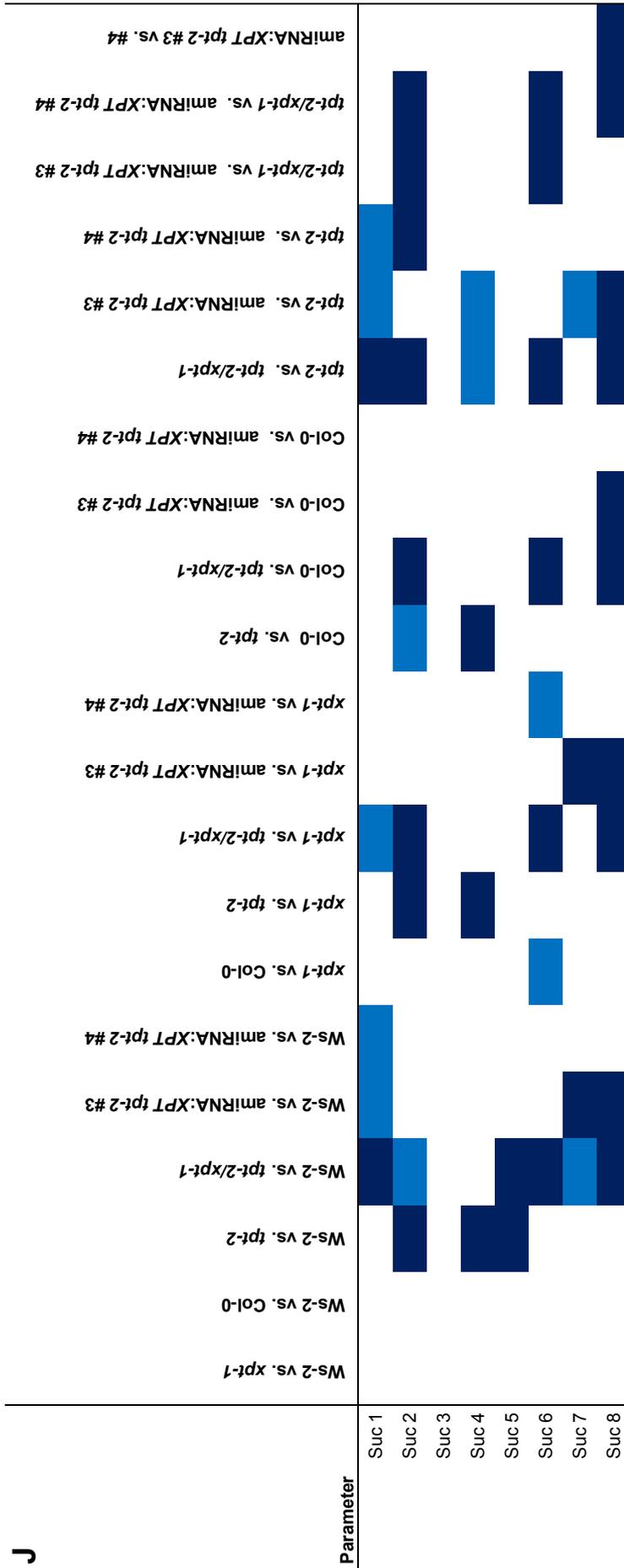




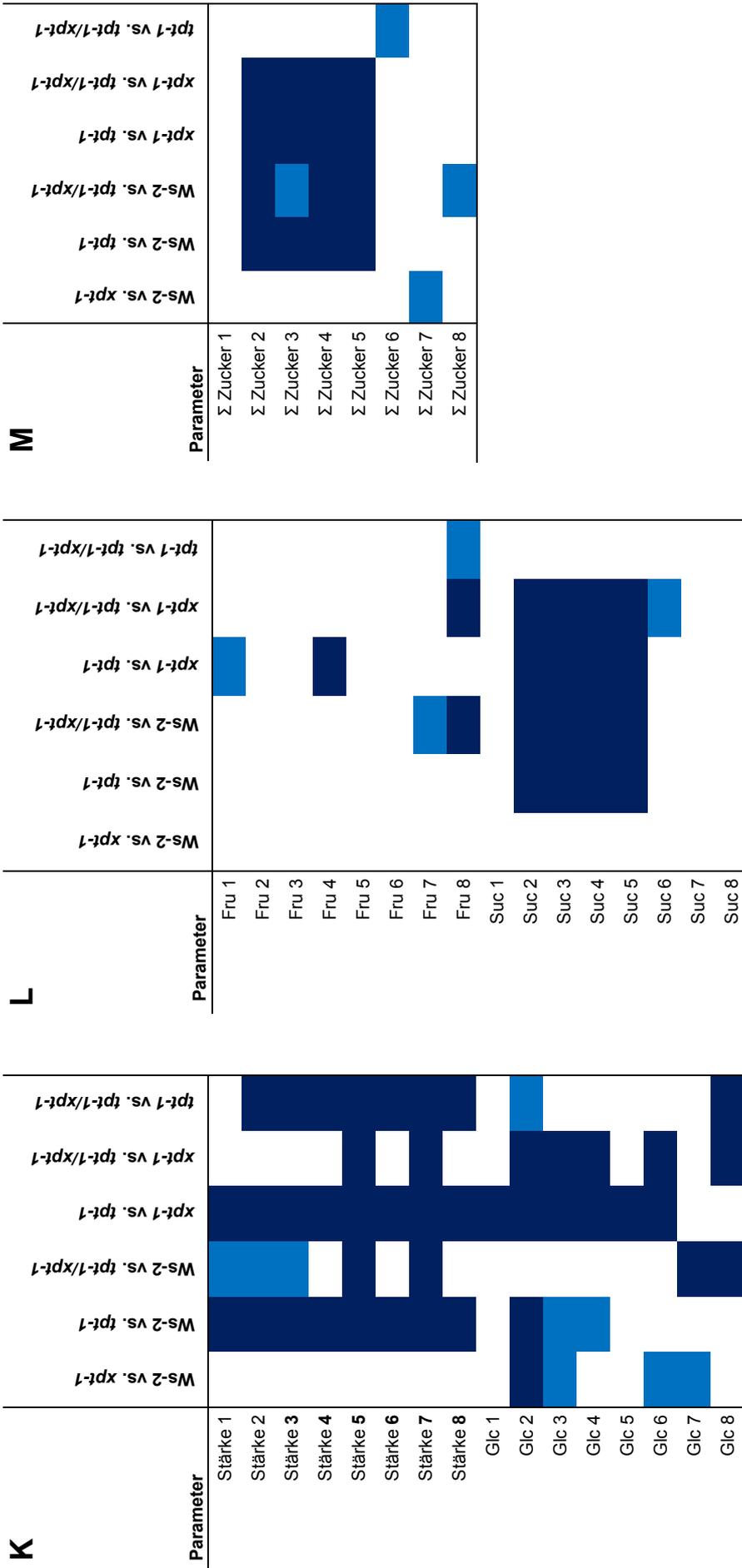


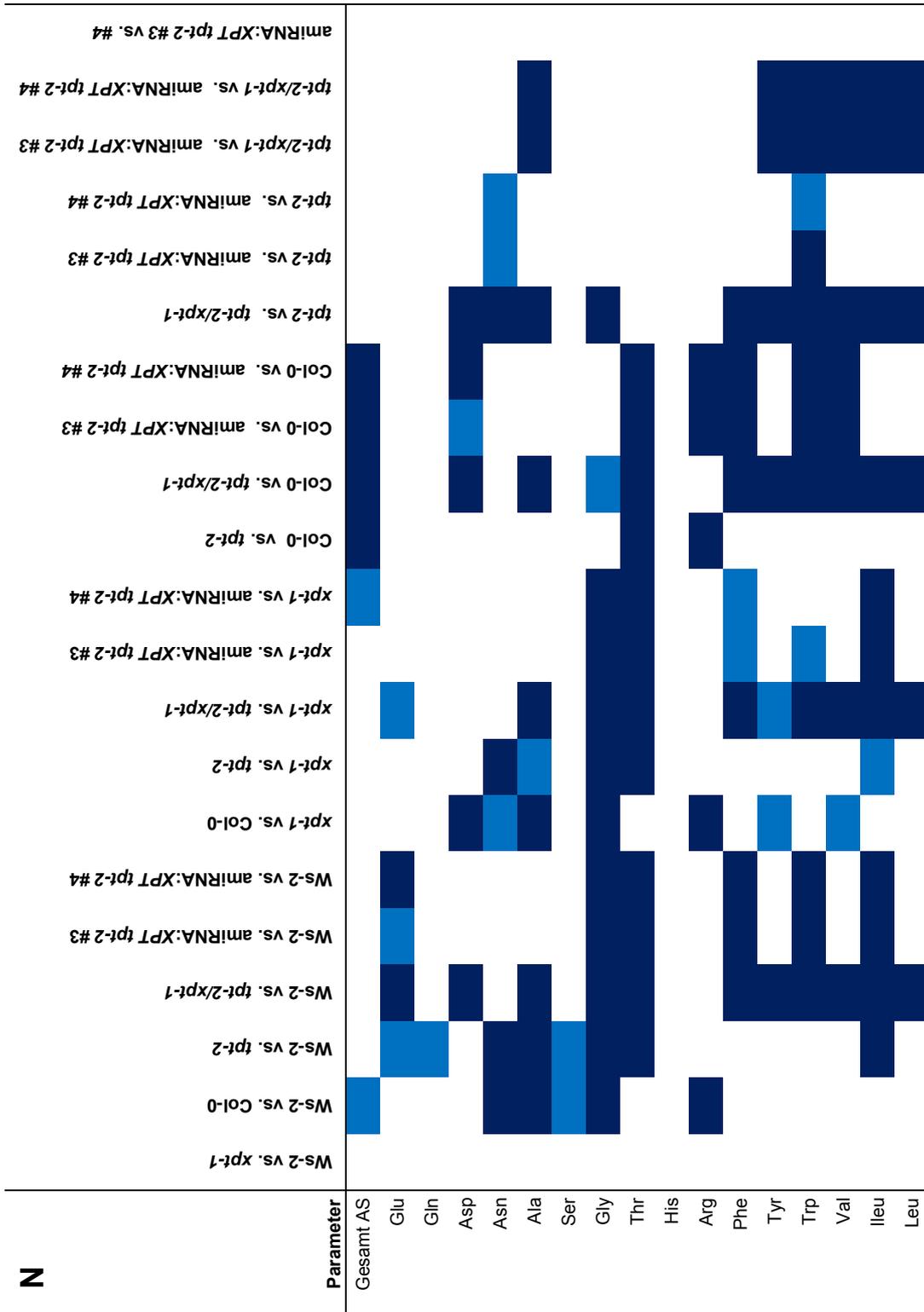


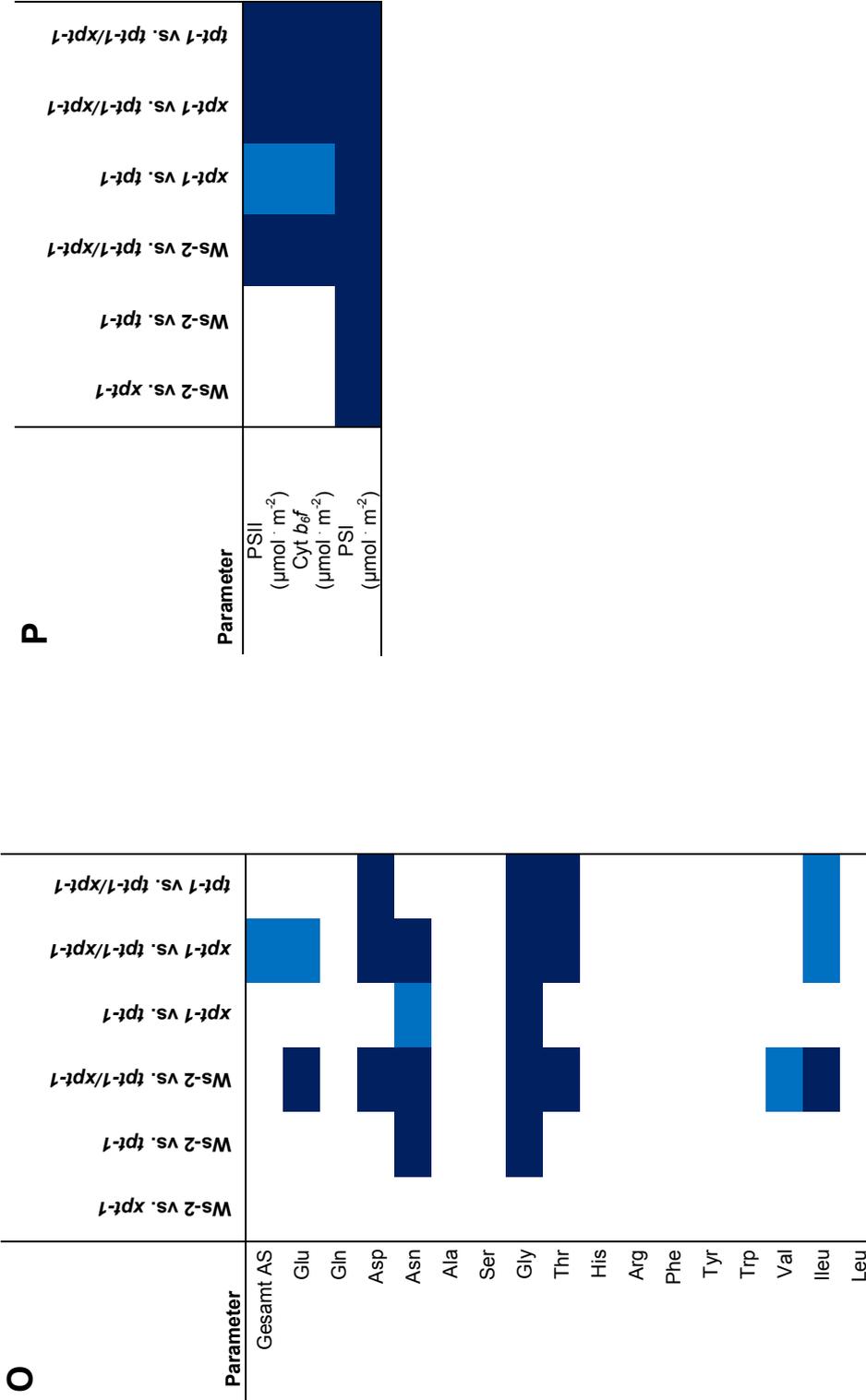




J

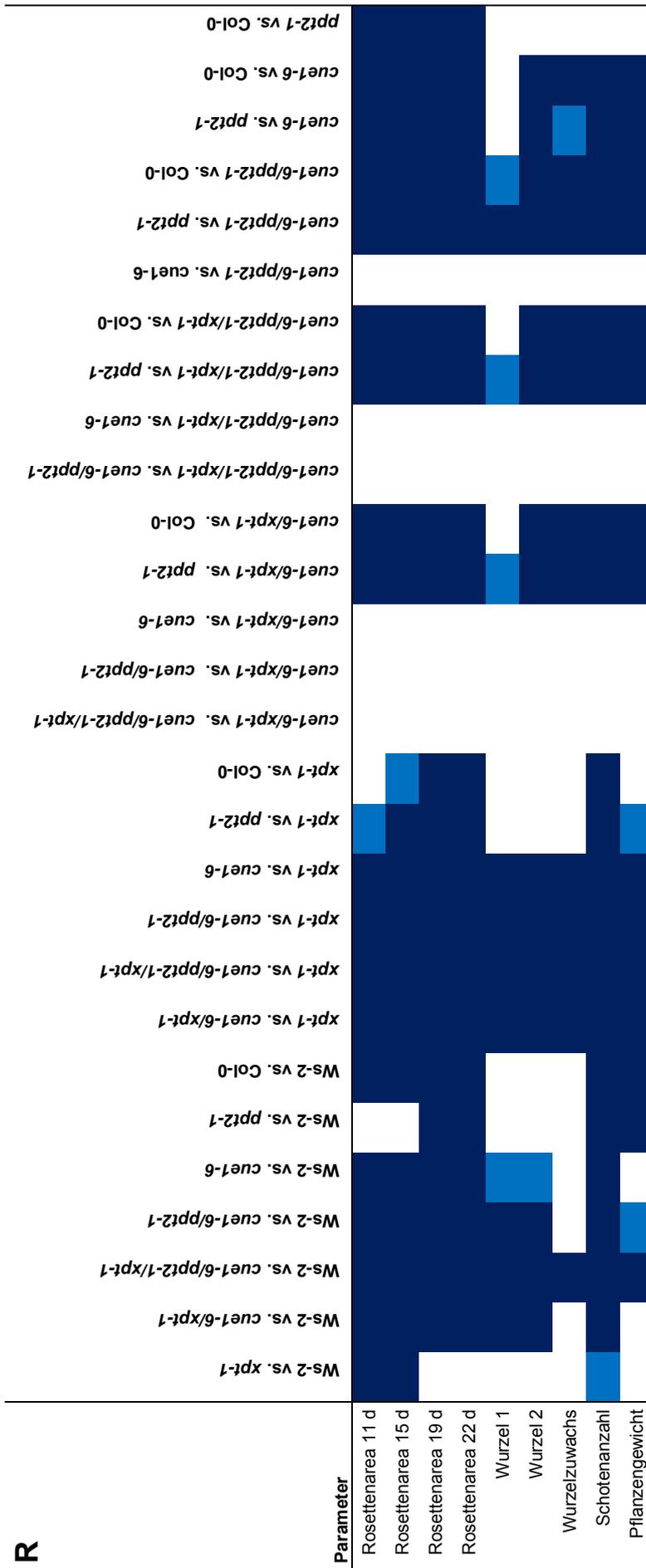








Q



R



## 8 Danksagung

Herrn Prof. Ulf-Ingo Flügge danke ich vielmals für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner wundervollen Arbeitsgruppe zu absolvieren, für die gute Atmosphäre, die schönen gemeinschaftlichen Unternehmungen und des Weiteren für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Marcel Bucher danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und für die tolle Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Frau Prof. Karin Schnetz danke ich, dass sie sich bereit erklärt hat den Vorsitz des Disputations-Prüfungskomitees zu übernehmen.

Für das vielfältige Thema, die Möglichkeit zur freien Arbeit, Verständnis in ungünstigen Lebenslagen und insbesondere von zwei Denkanstößen möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Rainer E. Häusler bedanken.

Herrn Dr. Marc-Aurel Schöttler danke ich für die tolle Korrespondenz bei der Durchführung der 77 K Fluoreszenz-Emissions-Spektren und den spektroskopischen Quantifizierungen.

Herrn Prof. Peter Dörmann danke ich für die Möglichkeit in seinen Laboren die Fettsäureanalysen durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. Stephan Krüger möchte ich mich für die Ermöglichung der Aminosäuremessungen und die vielen Gespräche bedanken.

Raphael Wemhöner, Kirsten Bell und meiner SHK Kristin Gehling danke ich für die schöne Zusammenarbeit und Hilfe im Labor. Vor allem bei der Durchmusterung von Mutanten und dem Pikieren von unzähligen kleinen und großen Pflanzen. Ohne Euch wäre vieles nicht machbar gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich beim kompletten Gärtnerei-Team, Siegfried Werth, Leo Leson sowie den Jungs aus der IT- und Werkstatt für ihren Einsatz bedanken.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine aktuelle Arbeitsgruppe, die AG Bucher, für die freundliche Aufnahme und direkte Integrierung in die Arbeitsgruppe. Daneben möchte ich mich für die Hilfen im Umzugschaos und die Unterstützung in den kleinen Dingen des Alltags bei allen Mitgliedern der AG Bucher bedanken.

Für die familiäre Atmosphäre, die wunderschöne Zeit innerhalb sowie ausserhalb der Uni, die enorme Hilfsbereitschaft und Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten ehemaligen AG Flügge bedanken:

Ruben Benstein, Laura Strubl, Sabine Wulfert, Silke Weckopp, Manuela Peukert, Richard Jakoby, Dorian Baumann, Gadi Vogeler, Sandra Pietras, Samira Blau, Jessica Schmitz, Stephan Krüger, Diana Vogelmann, Kirsten Bell, Raphael Wemhöner, Katja Ludewig, Frank Ludewig, Annemarie Reichel, Nils Jaspert, Nicole Wöstefeld, Martin Engqvist, Pia Staehr, Henning Frerigmann, Luisa Heinrichs, Sonja Lott, Rainer Schwacke, Rainer Häusler, Markus Gierth, Simon von Berlepsch, Shirin Zamani-Nour, Anke Kuhn, Veronica Maurino, Natallia Ashykhmina, Daniela Schmidt, Tamara Gigolashvili, Claudia Nothelle, Ulrike Hebbeker, Dereje Worku Mekonnen, Claudia Schwanitz und Herrn Prof. Ulf-Ingo Flügge.

Ein riesen Dank geht an meine Familie und Biologie-unabhängigen Freunde, für ihr Dasein und die Unterstützung vor allem in schwierigen Zeiten.

## 9 Erklärung

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

---

Köln

---

Elke Jana Andrea Hilgers

### Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Hilgers E., Flügge U.I. and Häusler R.E.

The role of the xylulose 5-phosphate/phosphate translocator (XPT) in generative and vegetative developmental processes of *Arabidopsis thaliana*

Botanikertagung Tübingen (2013) Poster.

Hilgers E., Flügge U.I. and Häusler R.E.

The unexpected phenotype of triose phosphate/phosphate translocator (TPT)/xylulose 5-phosphate/phosphate translocator (XPT) double mutant of *Arabidopsis thaliana*

European Plant Science Retreat Paris (2015) Poster.

Hilgers E., Flügge U.I. and Häusler R.E.

The unexpected phenotype of triose phosphate/phosphate translocator (TPT)/xylulose 5-phosphate/phosphate translocator (XPT) double mutant of *Arabidopsis thaliana*

Botanikertagung München (2015) Poster.