

Funktionelle Analyse der ETCHE1/ZR-  
Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana*  
(L.) HEYNH. und *Zea mays* L.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Jantjeline Kluth  
aus Göttingen

Hamburg, 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. U. WIENAND  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Priv.-Doz: Dr. R. LORBIECKE  
Tag der Disputation: 17. Oktober 2008

Hamburg, den 17. Oktober 2008



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Ganzhorn".

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1 Entwicklung und Funktion der Plastiden.....	4
2.2 Plastidenmutanten.....	6
2.3 Die <i>et1</i> - Mutante aus Mais.....	8
2.4 Der Transkriptionsfaktor TFIS.....	10
2.5 Der Transkriptionsapparat der Plastiden.....	12
2.6 ETCHED1 ist Mitglied der <i>Zinc Ribbon</i> (ZR)-Protein Familie.....	14
2.7 Die Co-Chaperone HEP1 und HEP2.....	15
2.8 Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>3. Material und Methode</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Chemikalien, Radionukleotide und Enzyme.....	18
3.1.2 Größenstandards.....	18
3.1.3 Primer.....	18
3.1.4 Kits.....	19
3.1.5 Vektoren, Mikroorganismen und Pflanzenmaterial.....	19
3.1.6 Medien und Reagenzien.....	21
3.1.6.1 Lösungen.....	21
3.1.6.2 Medien zur Anzucht von Bakterien.....	22
3.1.6.3 Medien zur Anzucht von Hefen.....	22
3.1.6.4 Medien zur Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.2.1 Anzucht von Pflanzenmaterial.....	24
3.2.1.1 Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25

---

3.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	25
3.2.3	Analyse von Nukleinsäuren .....	25
3.2.3.1	Allgemeine Klonierungstechniken.....	25
3.2.3.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen.....	26
3.2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen .....	26
3.2.3.4	Fällung von Nukleinsäuren .....	27
3.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
3.2.3.6	Northern- und Southern Blot-Transfer.....	27
3.2.3.7	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	28
3.2.3.8	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden.....	28
3.2.3.9	Reverse Transkription von RNA.....	28
3.2.3.10	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	29
3.2.3.11	Sequenzierung.....	30
3.2.3.12	Affymetrix <sup>®</sup> Microarray Analyse.....	31
3.2.3.13	Computergestützte Sequenzanalysen.....	32
3.2.4	Analyse von Proteinen .....	32
3.2.4.1	Chloroplastenisolation nach POULSEN .....	32
3.2.4.2	Gesamtproteinextraktion aus Pflanzen.....	33
3.2.4.3	Proteinextraktion aus Chloroplasten .....	33
3.2.4.4	Überexpression rekombinanter Proteine in E.coli .....	34
3.2.4.5	Native Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus E.coli.....	34
3.2.4.6	Native Aufreinigung rekombinanter Strep-Tag-Proteine aus E.coli.....	35
3.2.4.7	Co- Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E.coli.....	35
3.2.4.8	Aufreinigung von AtZR1- Strep- Protein aus Arabidopsis thaliana.....	36
3.2.4.9	Proteinfällung.....	36
3.2.4.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
3.2.4.11	Coomassie-Färbung.....	36
3.2.4.12	Western Blot-Transfer .....	36
3.2.4.13	Western-Detektion.....	37
3.2.5	Yeast-Two-Hybridsystem.....	38



---

3.2.5.1	Anzucht der Hefen.....	38
3.2.5.2	Klonierung der Vektoren .....	39
3.2.5.3	Standard-Hefetransformation .....	39
3.2.5.4	Plasmid-Isolation aus Hefe .....	39
3.2.5.5	Synthese einer cDNA-Bank.....	39
3.2.5.6	Hefetransformation (library scale) .....	41
3.2.5.7	Filterlift-Assay zur Dektektion der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	42
3.2.5.8	X-Gal-Assay im 96-Well Format.....	42
3.2.6	Transiente Transformation von Pflanzen .....	42
3.2.6.1	Fällung von DNA auf Goldpartikel .....	42
3.2.6.2	Biolistische Transformation.....	43
3.2.7	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
3.2.7.1	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
3.2.7.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
3.2.8	GUS-Färbung.....	45
3.2.9	Mikroskopische Techniken .....	45
<b>3.3</b>	<b>Klonierungen.....</b>	<b>47</b>
3.3.1	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	47
3.3.1.1	Klonierung des AtZR1-Promotors.....	47
3.3.2	Klonierung von GFP- und DsRed-Konstrukten.....	49
3.3.3	Klonierung der Vektoren für das Hefe-2-Hybrid-System.....	51
3.3.3.1	Klonierung von pTMBV_Alg5 und pCMBV_Alg5 .....	51
3.3.3.2	Klonierung der Bait-Konstrukte.....	51
3.3.3.3	Klonierung der Prey-Vektoren.....	52
3.3.4	Klonierung binärer <i>Arabidopsis</i> -Expressionsvektoren .....	53
3.3.4.1	Herstellung der Vektoren pAtZR1:ZmET1 und pAtZR1:ZmET1::GFP .....	54
3.3.4.2	Herstellung der Vektoren p35S:ZmET1, p35S:ZmET1::GFP und p35S:ZmET1::DsRed.....	55
3.3.4.3	Klonierung von p35S:AtZR2 .....	55
3.3.4.4	Klonierung von p35S:AtZR1strep.....	56

3.3.4.5	Klonierung der Promotor-Reporter-gen-Konstrukte pAtZR1:gus, pAtZR2:gus, pAtZR3:gus und p4-10:gus .....	56
3.3.5	Klonierung von Expressionsvektoren zur Protein-expression in <i>E.coli</i> .....	57
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
4.1	Die Phylogenie der <i>Zinc Ribbon</i> -Protein-Familie .....	58
4.2	Organellenspezifische Lokalisation von ZR1, ZR2 und ZR3 .....	66
4.2.1	Subzelluläre Lokalisation von ZmET1, ZmZR2 und ZmZR3 .....	66
4.2.2	Co-Lokalisation von ZmET1 und ZmZR2 in Zwiebel-Leukoplasten .....	67
4.2.3	Co-Lokalisation von ZmET1 und ZmZR2 mit plastidärer DNA .....	68
4.2.4	Subzelluläre Lokalisation der ZR-Proteine in Tabak .....	71
4.3	Entwicklungs- und gewebespezifische Expression von <i>AtZR1</i> , <i>AtZR2</i> und <i>AtZR3</i> .....	74
4.3.1	Differenzielle Aktivität der <i>AtZR1</i> -, <i>AtZR2</i> - und <i>AtZR3</i> -Promotoren während der Keimung in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	74
4.3.2	Spezifische <i>AtZR1</i> -, <i>AtZR2</i> - und <i>AtZR3</i> -Promotoraktivität während der Blattentwicklung .....	76
4.3.3	GUS-Expression in Infloreszenzen und Blüten .....	78
4.3.4	Der <i>AtZR1</i> -Promotor ist während der Embryogenese aktiv .....	80
4.4	Charakterisierung von <i>AtZR1</i> -, <i>AtZR2</i> - und <i>AtZR3</i> -T-DNA-Insertionslinien in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
4.4.1	Charakterisierung der <i>atzr1</i> -Knockout-Linie GK-209H11 .....	82
4.4.2	Charakterisierung der <i>atzr2</i> -Knockout-Linie SALK_020364 .....	84
4.4.3	Charakterisierung der <i>atzr3</i> -Knockout-Linie SALK_090006 .....	86
4.4.4	Expression von <i>AtZR1</i> , <i>AtZR2</i> und <i>AtZR3</i> in den T-DNA-Insertionslinien .....	88
4.5	Die <i>atzr1</i> -Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp .....	90
4.5.1	In der <i>atzr1</i> -Mutante sind Samen- und Embryoentwicklung gestört .....	90
4.5.2	Der <i>atzr1</i> -Phänotyp beruht auf einer defekten Plastidenentwicklung .....	93
4.5.3	Der <i>atzr1</i> -Phänotyp ist durch vielschichtige morphologische Anomalien gekennzeichnet. ....	97
4.6	Transkriptom-Analyse der <i>atzr1</i> -Mutante .....	101

---

4.6.1	Probenvorbereitung und Rohdatenanalytik.....	101
4.6.2	45 % der Plastidengene sind durch die <i>atzr1</i> -Mutation beeinflusst .....	103
4.6.3	Verifizierung der Microarray-Daten mittels <i>Realtime-PCR</i> .....	114
4.6.4	Auswirkungen des <i>atzr1</i> -Knockouts auf Proteinebene .....	116
4.7	Komplementation des <i>atzr1</i> - Phänotyps.....	118
4.7.1	Herstellung <i>ZmET1</i> -exprimierender <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen .....	118
4.7.2	<i>ZmET1</i> aus Mais komplementiert den <i>atzr1</i> -Phänotyp in <i>Arabidopsis</i> .....	119
4.7.3	<i>ZmET1::GFP</i> ist in den Chloroplasten lokalisiert.....	122
4.7.4	Herstellung einer <i>AtZR2</i> -Überexpressionslinie in <i>Arabidopsis</i> .....	124
4.7.5	Komplementation des <i>atzr1</i> -Phänotyps durch ektopische <i>AtZR1</i> -Expression.....	127
4.7.6	Nachweis des rekombinanten <i>AtZR1::strep</i> -Proteins in <i>Arabidopsis</i> .....	128
4.7.7	Nur das rekombinante <i>AtZR1</i> -Protein ist <i>in planta</i> nachweisbar.....	130
4.7.8	Das <i>AtZR1::strep</i> -Protein ist im Plastidenstroma lokalisiert .....	131
4.8	Suche nach <i>ZmET1</i> -Interaktionspartnern.....	133
4.8.1	Das Hefe-2-Hybrid-System .....	133
4.8.2	Konstruktion von <i>Bait</i> - und <i>Prey</i> -Konstrukten .....	134
4.8.3	Test auf Interaktion zwischen <i>ZmET1</i> und <i>rpoTP</i> bzw. <i>cpHSP70</i> .....	136
4.8.4	Isolierung von <i>ZmET1</i> -Interaktionspartnern aus einer cDNA-Bank .....	137
4.8.5	Subzelluläre Lokalisation ausgewählter 2-Hybrid-Klone .....	142
4.8.6	Subzelluläre Lokalisation von Klon 2-3 und Klon 4-10.....	145
4.8.7	<i>ZmET1</i> interagiert mit Komponenten der Photosynthesemembran .....	148
4.8.8	Weitere plastidäre <i>ZmET1</i> -Interaktionspartner .....	149
4.9	<i>HSP70</i> als möglicher Interaktionspartner von <i>AtZR1</i> .....	151
4.9.1	Expression rekombinanter <i>Arabidopsis</i> –Proteine in <i>E.coli</i> .....	151
4.9.2	<i>AtZR1</i> interagiert <i>in vitro</i> mit <i>HSP70-1</i> und <i>HSP70-2</i> .....	153
4.9.3	<i>HSP70-1</i> und -2 sind im Chloroplasten differentiell lokalisiert .....	154
4.9.4	Untersuchungen zur Expression von <i>Hsp70-1</i> und <i>Hsp70-2</i> .....	157
4.9.5	Analyse von <i>HSP70</i> -T-DNA-Insertionsmutanten .....	158
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>163</b>
5.1	Die <i>atzr1</i> -Mutante.....	165

---

5.2	Einflüsse der <i>atzr1</i> -Mutation auf die Transkriptregulation.....	173
5.3	<i>Etched1</i> aus Mais und <i>AtZR1</i> aus <i>Arabidopsis</i> sind orthologe Gene.....	176
5.4	Ein Vergleich von ZR1 und ZR2 .....	177
5.5	Das ZR3-Protein.....	180
5.6	Eine TFIIIS-ähnliche Funktion von ETCHED1 während der plastidären Transkription ist unwahrscheinlich .....	182
5.7	Das AtZR1-Protein interagiert <i>in vitro</i> mit plastidären HSP70-Chaperonen....	183
5.8	Co-lokalisieren ZR-Proteine mit den Nukleoiden?.....	186
5.9	Sind ZR-Proteine an der Photosystem-Assemblierung beteiligt? .....	187
5.10	Die phylogenetische Beziehung zwischen den plastidären ZR-Proteinen HEP2, ZR1 und ZR2 .....	189
5.11	Ausblick .....	193
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>194</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>204</b>
	A1 Primer .....	204
	A2 Vektoren.....	210
	A3 Ergänzungen zum Microarray-Experiment .....	214
	A4 In Silico Expressions-Daten.....	216
	<b>Danksagung .....</b>	<b>218</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

### Chemikalien und Lösungen

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumacetat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid
X-Gluc	(5-Brom-4-chlor-indolyl)- $\beta$ -D-Glucuronsäure

### Molekularbiologische Abkürzungen

Amp	Ampicillin	Kan	Kanamycin
BSA	Rinderserum Albumin	mRNA	messenger RNA
Cam	Chloramphenicol	nos	Nopalinsynthase-Terminator
cDNA	komplementäre	ORF	Offener Leserahmen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	rev	reverse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNA	Ribonukleinsäure
EST	expressed sequence tag	RNase	Ribonuklease
for	forward	RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
gDNA	genomische DNA	T	Thymin
GFP	Green fluorescent protein	UTR	nicht translatierte Region

### Einheiten und andere Abkürzungen

Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
ad	auffüllen bis	mM	Millimolar
bp	Basenpaar	$\mu$ g	Mikrogramm
bzw.	beziehungsweise	$\mu$ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius	$\mu$ M	Mikromol
ca.	circa	ng	Nanogramm
cm	Zentimeter	nm	Nanometer
<i>et al.</i>	Und Mitarbeiter	OD	Optische Dichte
g	Gramm	pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>g</i>	Erdbeschleunigung		
inch	= 2,45 cm	psi	Pounds per Square inch
kb	Kilobasen	rpm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton	RT	Raumtemperatur
kg	Kilogramm	U	Einheit
l	Liter	UV	ultraviolett
M	molar	V	Volt
mg	Milligramm	Vol	Volumen
min	Minuten	z.B.	Zum Beispiel

# 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen Funktionsanalyse einer Gruppe kleiner, plastidär und mitochondrial lokalisierter Proteine. Das erste bekannte Mitglied dieser Proteinfamilie war das ETCHED1 (ET1) aus Mais (*Zea mays* L.).

Das *Et1*-Gen kodiert für ein kleines, 19 kDa schweres Plastidenprotein, das über eine C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne verfügt. Das Protein wurde immunologisch ausschließlich im plastidären TAC (*transcriptionally active chromosome*) nachgewiesen und zeigt *in silico* eine strukturelle Ähnlichkeit zum Transkriptionselongationsfaktor TFIIIS im Zellkern.

Ein Verlust der Genfunktion in der *et1*-Mutante von Mais (*Zea mays* L.) zeigt einen pleiotropen Phänotyp, der auf einer Entwicklungsstörung der Plastiden beruht und sich durch eine gefurchte Oberfläche reifer Körner, virescente Blätter im Sämlingsstadium sowie eine verringerte TAC-Aktivität auszeichnet. Daher wurde eine Funktion von ET1 während der plastidären Transkription postuliert.

Datenbankanalysen zeigten, dass ET1 Mitglied einer Familie von Organellen-spezifischen *Zinc Ribbon*-Proteinen ist, die neben der ET1/ZR1-Gruppe die ebenfalls plastidär lokalisierten ZR2-Proteine und die mitochondrialen ZR3-Proteine umfasst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Charakterisierung und Funktionsanalyse ZR-homologer Proteine in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. mit einem Schwerpunkt auf den plastidären Proteinen AtZR1 und AtZR2.

Zunächst wurden subzelluläre Lokalisationsstudien und Promotor:GUS-Analysen durchgeführt. Innerhalb der Plastiden zeigten ZR1- und ZR2-GFP-Proteine ein etwas unterschiedliches Verteilungsmuster, beide Proteine akkumulierten jedoch im Bereich der plastidären DNA. In Hinblick auf ihre entwicklungspezifische Genexpression unterscheiden sich ZR1 und ZR2 hingegen deutlich voneinander, da der *AtZR1*-Promotor vornehmlich in meristematischen und teilungsaktiven Geweben aktiv ist, während der *AtZR2*-Promotor seine höchste Aktivität in ausdifferenzierten Geweben erreicht.

Das ZR3-Protein wurde entsprechend der Vorhersage in die Mitochondrien importiert. Der *AtZR3*-Promotor ist sowohl in jungen als auch in alten Geweben aktiv.

Ein T-DNA-bedingter Knockout der *ZR*-Gene in *Arabidopsis* resultierte lediglich in der *atZR1*-Knockout-Pflanze in einem starken Mutantenphänotyp. *atZR2*-Knockout-Pflanzen zeigten einen schwachen und *atZR3*-Knockout-Pflanzen keinen veränderten Phänotyp. Dies überrascht insofern, da der Verlust eines ZR3-homologen Proteins in Hefe letal ist.

Die *atzr1*-Mutante zeigt, ebenso wie die *et1*-Mutante von Mais, einen pleiotropen Phänotyp während der Samen- und Keimlingsentwicklung, der ebenfalls mit einer gestörten Plastidenmorphogenese einhergeht. Die Schwere und das Ausmaß des *atzr1*-Mutantenphänotyps übertrifft jedoch die *et1*-Mutation in Mais und ist während der gesamten Pflanzenentwicklung sichtbar.

Zahlreiche Merkmale der *atzr1*-Mutante, z.B. extrem deformierte Samen, Organfusionen und eine extrem erhöhte Blattzahl wurden zuvor noch nie in einer Mutante eines plastidären Proteins beobachtet. Die vielfältigen phänotypischen Veränderungen der *atzr1*-Mutante spiegeln sich auch auf Transkriptebene wider: Microarray-Analysen zeigten in der *atzr1*-Mutante eine veränderte Transkriptmenge bei 45 % der kernkodierten und 80 % der plastomkodierten Plastidengene. Neben Photosynthesegenen, waren darunter zahlreiche Komponenten der plastidären Transkription, Translation, der Proteinfaltung und des Proteinabbaus.

Trotz des ungewöhnlich starken Phänotyps ließ sich die *atzr1*-Mutation sowohl durch die Überexpression von *AtZR1* als auch durch die Überexpression von *ET1* aus Mais vollständig komplementieren. Dies belegt, dass *AtZR1* und *ET1* funktionell orthologe Gene sind.

Überexprimiertes *AtZR2* vermochte den *atzr1*-Phänotyp hingegen nicht zu komplementieren. In Anbetracht der Expressions- und Lokalisations-Daten spricht dieses Ergebnis dafür, dass *ET1/ZR1* und *ZR2*-Proteine zwar strukturell eine Familie bilden, jeweils aber spezifische Funktionen innerhalb der Plastiden ausüben und somit nicht redundant sind.

Die Strukturaufklärung des *ZR3*-Homologs aus Hefe (MOMOSE *et al.*, 2007) führte in Bezug auf eine mögliche Funktion der *ZR*-Proteine zu einer überraschenden Wende, da sich die Hypothese einer *TFIIS*-ähnlichen Funktion nicht mehr aufrechterhalten ließ. Stattdessen gab es zunehmend Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen *ZR*-homologen Proteinen und *HSP70* Chaperonen in Hefe und *Chlamydomonas* (SICHTING *et al.*, 2005; WILLMUND *et al.*, 2008).

Höhere Pflanzen besitzen zwei plastidäre *HSP70*-Proteine. Eigene Resultate aus *in vitro*-Interaktionsstudien und die Analyse von *HSP70*-T-DNA-Knockoutpflanzen in *Arabidopsis* lassen darauf schließen, dass die *ZR1*-Proteine höherer Pflanzen mit beiden plastidären *HSP70*-Proteinen interagieren und ihre Funktion wesentlich beeinflussen.

Im Rahmen eines 2-Hybrid-Screens wurden mehrere zueinander benachbarte Proteine des Photosystems I als putative *ZR1*-Interaktoren identifiziert. Es ist also denkbar, dass *ZR*-Proteine im Komplex mit *HSP70* eine Funktion während der Photosystem-Assemblierung besitzen. Da *HSP70* ebenso wie *ET1* im plastidären TAC gefunden wurde, ist eine Rolle dieses Komplexes beim Auf- und Abbau des Transkriptionsapparates ebenfalls möglich.

---

Eine essentielle Beteiligung von ET1/ZR1-Proteinen an verschiedenen elementaren Prozessen innerhalb der Plastiden ist auch deshalb plausibel, da der Funktionsverlust dieser Gene zu einem besonders vielfältigen Mutantenphänotyp führt, obwohl sie nur im Verlauf der Entwicklung nur transient und sehr schwach exprimiert werden.

Die zentrale Funktion von ZR-Proteinen in Organellen wird dadurch hervorgehoben, dass sie eine besonders alte und sehr konservierte Proteinfamilie darstellen.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit geben erstmals einen detaillierten Einblick in die Bedeutung der ZR-Proteine in dikotylen Pflanzen und liefern hierdurch wesentliche neue Ansatzpunkte für die weitere funktionelle Analyse dieser wichtigen und konservierten Proteinfamilie.



## 2. Einleitung

### 2.1 Entwicklung und Funktion der Plastiden

Ein charakteristisches Merkmal von Pflanzen und Algen ist das Vorhandensein von Chloroplasten und die damit verbundene Fähigkeit der Photosynthese (der Erzeugung von chemischer Energie aus Lichtenergie), die den Pflanzen ihre autotrophe Lebensweise ermöglicht. Darüber hinaus sind die Chloroplasten aber auch an zahlreichen weiteren essentiellen Stoffwechselprozessen der Pflanze beteiligt, zu denen unter anderem die Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Lipiden, Phytohormonen, Vitaminen, Nucleotiden und die Biosynthese von Isoprenoiden sowie Tetrapyrrolen gehören (NEUHAUS UND EMES, 2000).

Chloroplasten sind von einer doppelten Hüllmembran umgeben. In ihrem Inneren gliedern sie sich in Stroma und in das Thylakoid-Membransystem, welches das Thylakoidlumen umschließt. In den Thylakoiden sind die Proteinkomplexe für die Lichtreaktion der Photosynthese lokalisiert, während die Kohlenstofffixierung im Stroma stattfindet.

Während einzellige Algen lediglich Chloroplasten besitzen, enthalten höhere Pflanzen weitere Typen von Plastiden, die sich jeweils in ihrer Funktion und Struktur unterscheiden. Dazu zählen die pigmentreichen Chromoplasten in Blüten und Früchten sowie die farblosen Leukoplasten, die beispielsweise der Speicherung von Stärke (Amyloplasten) und Fetten (Elaioplasten) dienen. Die verschiedenen Plastidentypen sind, zumindest teilweise, ineinander umwandelbar (Abb. 2-1).

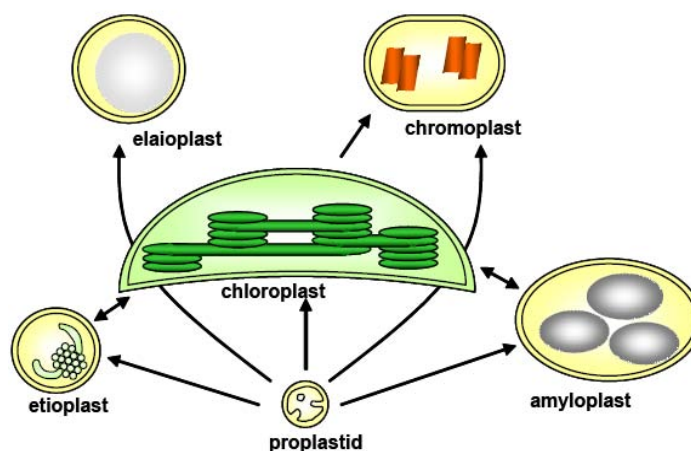


Abb. 2-1: Vielfalt der Plastiden entnommen aus LOPEZ-JUEZ UND PYKE (2005).

Plastiden differenzieren sich aus Proplastiden, die nur in meristematischen Geweben und Embryonen vorkommen. In Abwesenheit von Licht entwickeln sie sich zu Etioplasten, die sich im Licht in Chloroplasten umwandeln. Plastiden entstehen nicht *de novo*, sondern vermehren sich durch Teilung (MAPLE UND MØLLER, 2007). In Angiospermen werden Plastiden in der Regel maternal und in seltenen Fällen biparental vererbt (XU, 2005).

Ihren evolutiven Ursprung nahmen die Plastiden vor über 1 Milliarde Jahren in der Endosymbiose zwischen einem Cyanobakterium und einem eukaryotischen Wirt. Mit der verstärkten Eingliederung des Endosymbionten in die Wirtszelle verlor dieser jedoch weitgehend seine Autonomie. Diese Entwicklung ging unter anderem mit dem weit reichenden Verlust des prokaryotischen Genoms und dem Transfer genetischer Information in den Zellkern einher (DEBASHISH *et al.*, 2007, DYALL *et al.*, 2004). Aber auch heute noch besitzen die Plastiden ein eigenes, wenn auch stark reduziertes Genom sowie eine Transkriptions- und Translationsmaschinerie prokaryotischen Ursprungs (LÓPEZ-JUEZ, 2007).

Das Plastidengenom (Plastom) höherer Pflanzen umfasst nur noch etwa 120 bis 135 offene Leserahmen (ORFs), die neben einigen Proteinen des Photosyntheseapparates für die Untereinheiten einer RNA-Polymerase, einige ribosomale Proteine, tRNAs, rRNAs sowie die *Housekeeping*-Gene *ClpP* und *AccD* kodieren (LÓPEZ-JUEZ, 2007). Der überwiegende Teil plastidärer Proteine (ca. 3000-4000) ist jedoch im Nukleus kodiert und wird in die Plastiden importiert (LEISTER, 2003, OREB *et al.*, 2008). Diese Tatsache erfordert eine präzise Koordination zwischen plastidärer und nukleärer Genexpression.

Neben der plastidenkodierten RNA-Polymerase PEP (plastid-encoded polymerase) enthalten die Plastiden eine weitere, kernkodierte RNA-Polymerase NEP (nucleus-encoded polymerase; HEDTKE *et al.*, 1997). Diese ist unter anderem für die Transkription der PEP verantwortlich. Die PEP wird außerdem durch sechs kernkodierte Sigmafaktoren reguliert (KANAMARU UND TANAKA, 2004). Somit steht die plastidäre Transkription unter strenger Kontrolle des Zellkerns. Darüber hinaus spielt die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression in Plastiden eine erhebliche Rolle. Sie wird ebenfalls durch kernkodierte Proteine koordiniert (WOODSON UND CHORY, 2008).

Diese Kontrolle des Zellkerns über den Chloroplasten wird auch als anterograde Signaltransduktion bezeichnet. Im Gegenzug nimmt der Chloroplast mittels retrograder Signale Einfluss auf den Zellkern und die nukleäre Genexpression.

Die retrograden Signalwege vom Chloroplast zum Zellkern sind bisher nur fragmentarisch bekannt. In erster Linie werden Stoffwechselintermediate wie Mg-Protoporphyrin IX, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Redox-Signale aus der photosynthetischen Elektronentransportkette als schnelles Kommunikationsmittel zwischen dem Plastiden und dem Kern diskutiert (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2007).

Ein weiterer retrograder Signalweg ist der so genannte *plastid gene expression-dependent* (PGE) Signalweg, der für die Plastid→Nukleus-Kommunikation während der Plastidendifferenzierung in jungen Sämlingen aktiv ist und mit der plastidären Proteinexpression in Zusammenhang steht. Die Hemmung des plastidären Translationsapparates durch Lincomycin oder Mutationen löst eine Repression kernkodierter Photosynthesegene aus (GRAY *et al.*, 2003, PESARESI ET AL., 2001).

## 2.2 Plastidenmutanten

Chloroplasten enthalten etwa 3.000 bis 4.000 Proteine, die einerseits für die Aufrechterhaltung der Photosynthese und zahlreicher weiterer Stoffwechselwege verantwortlich sind, andererseits Funktionen im Bereich der Genexpression, des Proteinimports und Proteinabbaus, der Plastidenteilung und Differenzierung sowie der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern erfüllen.

Ebenso vielfältig wie die Funktion plastidärer Proteine gestaltet sich die Bandbreite an Mutationen, die die Chloroplastenfunktion beeinträchtigen.

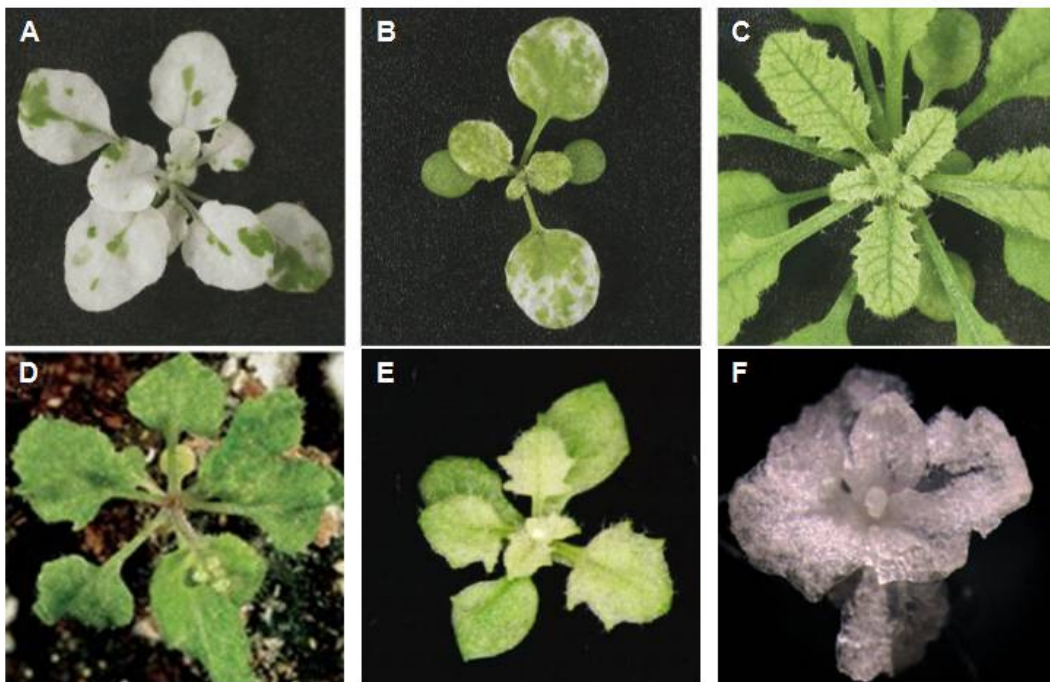
Zahlreiche Mutationen plastidärer Proteine äußern sich durch offensichtliche Phänotypen. So sind beispielsweise allein in Mais und *Arabidopsis* einige Hundert Mutanten mit veränderter Pigmentierung bekannt (Leister, 2003). Neben Albino- oder blassgrünen Phänotypen zeigen einige dieser Mutanten variierte Blätter, die sowohl grüne als auch weiße Sektoren enthalten.

Die Ursachen für den variierten Phänotyp sind sehr vielfältig: So können Plastidmutationen oder aktive Transposons beispielsweise zu verschiedenen Genotypen in grünen und weißen Sektoren führen.

Erstaunlicherweise führen jedoch auch nukleäre Mutationen plastidärer Gene trotz eines einheitlichen Genotyps der Pflanze zu variierten Blättern. Grüne Blattsektoren enthalten normal entwickelte Chloroplasten, während die Chloroplasten in den weißen Sektoren unterentwickelte Thylakoide und keine oder reduzierte Mengen an Chlorophyll und Carotinoiden enthalten (ALURU *et al.*, 2006). Bekannte Beispiele sind die *Arabidopsis* Mutanten *var1* und *var2* (FtsH-Proteasen) und *immutans* (Chloroplast terminale Oxidase) (Abb. 2-2 A und B). Warum diese Mutanten sowohl intakte als auch defekte Chloroplasten entwickeln, konnte bisher nicht im Detail geklärt werden.

Die *cue1*-Mutante (Abb. 2-2 C; LI *et al.*, 1995) weist hingegen einen retikulären Blattphänotyp auf, da in den Blättern der Pflanze die Mesophyllentwicklung spezifisch gestört ist. *CUE1* codiert für einen Phosphoenol-Translokator der inneren Hüllmembran der Chloroplasten.

Interessanterweise lassen sich in einigen Plastidenmutanten neben einer veränderten Pigmentierung und einer gestörten Plastidenentwicklung auch anatomische Veränderungen der Blattmorphologie beobachten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass retrograde Signale der Plastiden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Organentwicklung nehmen (RODMEL, 2001). Als Beispiele sollen hier die *Arabidopsis*-Mutanten *crumpled leaf*, *scabra 3* und *pds3* genannt werden (Abb. 2-2 D-F). *Crumpled Leaf* kodiert für ein integrales Membranprotein der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten. In der Mutante sind sowohl die Zellteilung als auch die Plastidenteilung beeinträchtigt. Die genaue Funktion des Gens ist bisher jedoch unklar. Auch ein Knockout der kernkodierten Plastiden-Polymerase NEP in der *scabra3*-Mutante resultiert in einer veränderten Blattmorphologie (Abb. 2-2 E). Ein Knockout der Phytyl-Desaturase in der *pds3*-Mutante führt zu einem völligen Verlust der photosynthetischen Pigmente. Der Mutanten-Phänotyp kann durch Gibberellin-Gabe gelindert werden.



**Abb. 2-2** Plastidenmutanten aus *Arabidopsis thaliana*

A: *Immutans*, B: *var2*, C: *cue1* (A-C: YU *et al.* 2007), D: *crumpled leaf* (ASANO *et al.* 2004), E: *Scabra3* (HRICOVA *et al.* 2006), F: *pds3* (QIN *et al.*, 2007).

Eine weitere Klasse der Chloroplastenmutanten stellen die Chlorophyll-Fluoreszenzmutanten dar. Ihr Phänotyp ist weniger offensichtlich, liefert jedoch häufig Hinweise auf Störungen im photosynthetischen Elektronentransfer. Hierzu zählen sowohl die *High Chlorophyll Fluorescence (hcf)* Mutanten, als auch *Non-photochemical Quenching (npq)* Mutanten. HCF-Gene erfüllen wichtige Funktionen bei der Thylakoidbiosynthese (*VIPP1*, KROLL *et al.*, 2001), der mRNA-Prozessierung (*HCF107*; FELDER *et al.*, 2001), der Proteintranslokation (*HCF106*, SETTLES *et al.*, 1997) sowie der Translation (*HCF60*, Schultes *et al.*, 2000). Die betroffenen

Gene der *npq*-Mutanten kodieren für Proteine des Photosynthese-Apparates und des Xanthophyll-Zyklus (LI *et al.*, 2000, SHIKANAI *et al.*, 1999).

Bei den *Accumulation and Replication (arc)* Mutanten handelt es sich um Plastiden-Teilungsmutanten, deren Phänotyp erst mikroskopisch sichtbar wird, denn die *arc*-Mutanten besitzen entweder sehr viele verkleinerte oder sehr wenige vergrößerte Chloroplasten. (MAPLE UND MØLLER, 2006).

Andere Chloroplastenmutanten weisen eine Störung in der retrograden Signaltransduktion auf. Sie werden daher als Genome-uncoupled (*gun*, entkoppelte Genome) bezeichnet. Die meisten der zugehörigen Proteine sind an der Porphyrinsynthese (GUN2, GUN3, GUN4, GUN5) beteiligt. *GUN1* kodiert hingegen für ein Pentatricopeptid-Repeat-Protein (PPR) (KOUSSEVITZKY *et al.*, 2007).

Darüber hinaus existieren allein in *Arabidopsis* über 500 Plastidenmutationen, die sich während der Embryoentwicklung oder Sämlingsentwicklung letal auswirken.

## 2.3 Die *et1*- Mutante aus Mais

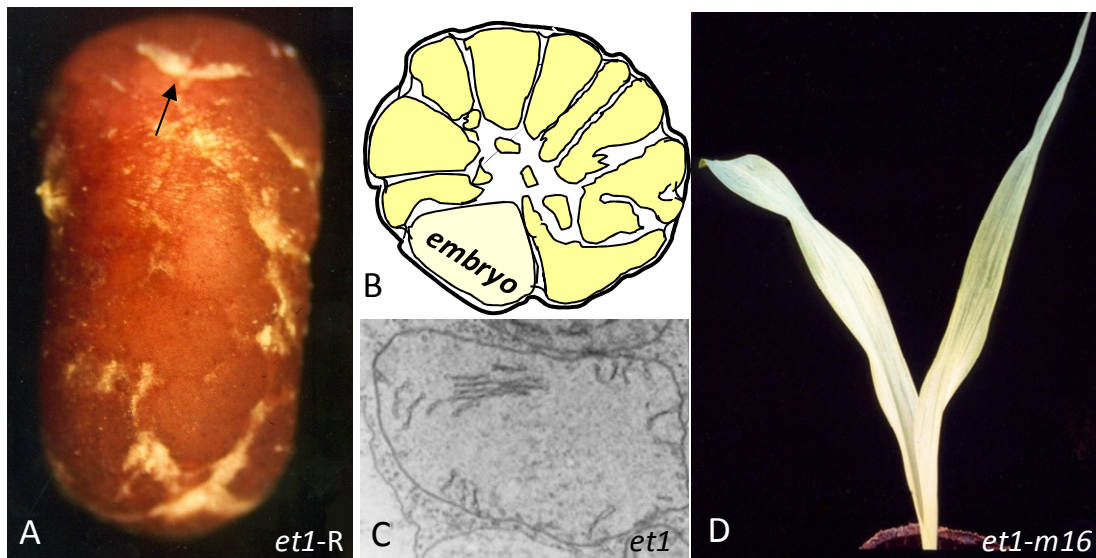
*Etched1 (et1)* ist eine rezessive Mutation in Mais. Sie zeichnet sich durch einen pleiotropen Phänotyp aus, der sowohl die Kornentwicklung als auch die Keimlingsentwicklung betrifft.

Während der Kornentwicklung wirkt sich die *etched1*-Mutation insbesondere auf die Entwicklung des Endosperms aus. Die Endospermoberfläche reifer *et1*-Körner ist mit Rissen und Einkerbungen durchzogen (Abb. 2-3 A). Querschnitte durch das Korn zeigten neben morphologisch unveränderten Zellen Areale mit kollabierten, stärkefreien Endospermzellen, die sich strahlenartig vom Zentrum des Endosperms ausbreiten (Abb. 2-3 B). Die Reduktion des Stärkegehaltes lässt auf eine gestörte Stärkebiosynthese in der *etched1*-Mutante schließen. Die Entwicklung des Aleurons und des Perikarps sind durch die *et1*-Mutation hingegen nicht beeinträchtigt, die Aleuronschicht passt sich lediglich den Unebenheiten der Endospermoberfläche an (AHREND, 1998).

Die Sämlinge der *etched1*-Mutante zeigen einen vireszenten Phänotyp. Die jungen Keimlinge sind zunächst blassgrün bis weiß und akkumulieren im Vergleich zum Wildtyp geringere Mengen an Chlorophyll, Carotinoiden und Chlorophyll-Proteinkomplexen (RAMESH *et al.*, 1984; Abb. 2-3 D). Im Alter von 10 bis 15 Tagen ergrünen die Pflänzchen jedoch zunehmend und sind äußerlich nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden. Messungen der Photosyntheseleistung zeigten allerdings, dass auch in älteren grünen Blättern eine reduzierte Photosynthesekapazität im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist (F. Janowiak, unveröffentlicht).

Der *etched1*-Phänotyp in jungen Blättern wird durch eine verzögerte oder gestörte Chloroplastenentwicklung hervorgerufen. Elektronen-mikroskopische Aufnahmen zeigen ein

reduziertes Thylakoidmembransystem in Chloroplasten junger *et1*-Sämlinge (Abb. 2-3 C). Im Laufe der Zeit scheint sich die Chloroplastenentwicklung jedoch der des Wildtyps anzugleichen, sodass Entwicklung und Wachstum der Pflanze durch die *etched1*-Mutation nicht weiter beeinträchtigt werden. Die Körner und Sämlinge der folgenden Generation zeigen allerdings wieder den oben beschriebenen *etched1*-Phänotyp.



**Abb. 2-3: Der *et1*-Phänotyp in Körnern und Sämlingen der Maislinie *et1*-R.**

A) *etched1*-Phänotyp am Beispiel eines reifen Korns der Mais-Linie *et1*-R. Der Pfeil markiert eine Einkerbung. B) Schematischer Querschnitt durch ein *etched1*-Korn (zur Verfügung gestellt von R. Lorbiecke). Stärkehaltige Sektoren (gelb) wechseln sich mit stärkeleeren Arealen (weiss) ab. C) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines *et1*-Chloroplasten mit stark reduzierten Thylakoiden. D) Virescenter *et1*-*m16*-Keimling.

Das Referenz-Allel der Mutante (*et1*-R) wurde bereits 1940 von J.R. STADLER nach dem Bestäuben von Mais mit röntgenbestrahlten Pollen identifiziert. Zusätzlich wurden 16 verschiedene *Mutator*-induzierte Maislinien mit *etched1*-Phänotyp identifiziert (*et1*-*m1* bis *et1*-*m16*; SCANLON *et al.*, 1994, GARG 2002, WARMANN, 2002). Einige dieser Linien zeigen einen extrem starken *etched1*-Phänotyp: die Körner sind eingefallen und enthalten kleine oder gar keine Embryonen. Die starke Variabilität des *etched1*-Phänotyps ist vermutlich (zumindest teilweise) auf den jeweiligen genetischen Hintergrund der Maislinien zurückzuführen.

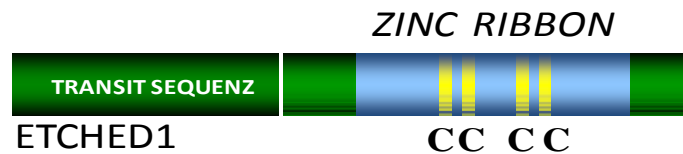
Mit Hilfe dieser *Mutator*-induzierten Linien konnte das *Etched1*-Gen (*ZmET1*) durch *Transposon-tagging* kloniert werden. Das *ZmET1*-Gen enthält 4 Exons und 3 Introns und kodiert für einen offenen Leserahmen von 163 Aminosäuren.

Computeranalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergaben, dass es sich bei *ZmET1* um ein kleines bis dahin unbekanntes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 19 kDa mit einer putativen N-terminalen Transitsequenz für den Import in die Chloroplasten handelt. Der Import von *in vitro*-translatiertem *ZmET1*-Protein ins Plastidenstroma über den generellen Importweg konnte experimentell an isolierten Spinatchloroplasten gezeigt



werden (GARG, 2002). Nach dem Abspalten des N-terminalen Transitpeptids besitzt das reife ZmET1 eine Größe von etwa 12 kDa.

Am C-Terminus besitzt das ZmET1 eine *Zinc Ribbon*-Domäne, die strukturelle Ähnlichkeit zur *Zinc Ribbon*-Domäne des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIIS aufweist (Abb. 2-4; DA COSTA E SILVA *et al.* 2004).



**Abb. 2-4: Schematische Darstellung des ETCHED1-Proteins aus *Zea mays*.**

Die Position der *Zinc Ribbon*-Domäne ist blau unterlegt, die vier konservierten Cysteinreste (C) sind als gelbe Streifen dargestellt.

Zusätzlich zum *ZmET1*-Gen wurde in Mais das *ZmZR1* (*Zea mays Zinc Ribbon 1*, GARG, 2002) identifiziert und kloniert, das auf Aminosäureebene eine hohe Homologie von 83 % zum *ZmET1* zeigt. Die Promotorbereiche von *ZmET1* und *ZmZR1* unterscheiden sich allerdings grundlegend voneinander. Wahrscheinlich handelt es sich beim *ZmZR1* um eine im Zuge der Mais-Evolution entstandene Genduplikation des *ZmET1*. Alle bisherigen Analysen weisen darauf hin, dass das *ZmZR1*-Gen extrem schwach exprimiert wird (DA COSTA E SILVA *et al.* 2004).

## 2.4 Der Transkriptionsfaktor TFIIIS

Im Zellkern eukaryotischer Organismen erfolgt die Transkription proteinkodierender Gene durch die RNA-Polymerase II (RNAP II), einem Proteinkomplex aus 12 Kern-Untereinheiten. Darüber hinaus benötigt die RNAP II für ihre Funktion eine Reihe von transienten Faktoren, die so genannten allgemeinen Transkriptionsfaktoren. Ein essentieller Faktor während der Transkriptionselongation ist der Transkriptionsfaktor TFIIIS.

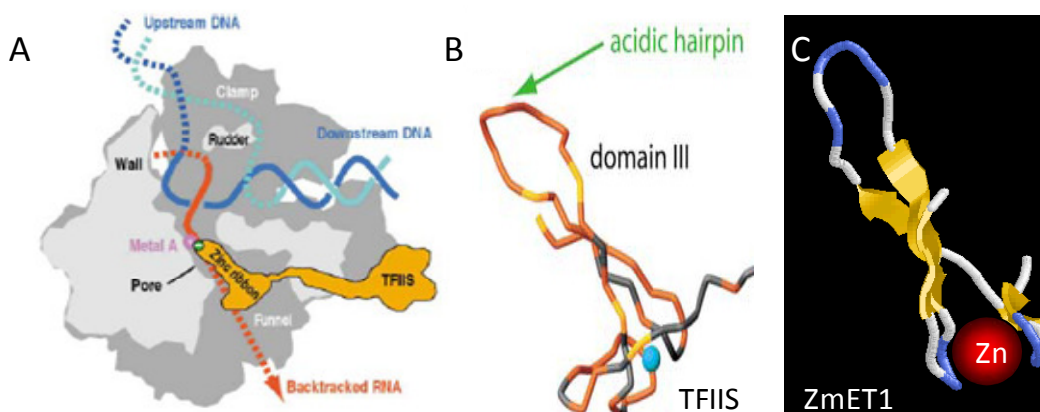
TFIIIS umfasst etwa 300 Aminosäuren und lässt sich in 3 Domänen gliedern: die N-terminale Domäne I ist wenig konserviert und für die Aktivität von TFIIIS während der Elongation nicht von Bedeutung. Die zentrale Domäne II bildet ein Bündel aus drei  $\alpha$ -Helices und ist über einen *Linker* mit der C-terminalen Domäne III verbunden. Die Domäne III des TFIIIS bildet ein so genanntes *Zinc Ribbon*, bestehend aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die über die Komplexierung eines Zink-Atoms durch vier Cysteinreste stabilisiert werden. Eine hervorstehende  $\beta$ -Schleife enthält zwei höchst konservierte saure Aminosäuren, die für die Funktion von TFIIIS essentiell sind (Abb. 2-5 B; KETTENBERGER *et al.*, 2003).

Während der Transkription bindet TFIIIS an die RNAP II. Dabei reicht die *Zinc Ribbon*-Domäne mit der sauren  $\beta$ -Schleife durch einen Tunnel bis in das aktive Zentrum des Enzyms (Abb. 2-5 A). Kommt es während der Transkription zu einer Pause oder zum Arrest des Polymerase-

Komplexes, beispielsweise durch die Paarung falscher Basen in schwierig zu transkribierenden DNA-Bereichen, stimuliert der TFIIIS-Faktor die intrinsische Exonukleaseaktivität der RNAP II. Über die sauren Aminosäurereste der  $\beta$ -Schleife unterstützt TFIIIS die Bindung eines (zweiten) katalytischen Magnesium-Ions zur hydrolytischen Spaltung der RNA. So kann das störende 3'Ende des synthetisierten RNA-Strangs abgespalten und die Transkription fortgesetzt werden. TFIIIS vermittelt demnach also einen „switch“ im aktiven Zentrum der RNA-Polymerase II zwischen Synthese- und Spaltungs- bzw. Korrekturmodus (KETTENBERGER *et al.*, 2004).

Auch die eubakterielle RNA-Polymerase besitzt eine intrinsische RNaseaktivität (CONAWAY *et al.*, 2003). Sie wird durch den *transcript-cleavage*-Faktor GreB vermittelt. Strukturell zeigt dieser zwar keinerlei Verwandtschaft zu TFIIIS (GreB besteht aus einem N-terminalen  $\alpha$ -helikalen coiled-coil-Motiv und einer C-terminalen globulären  $\beta$ -Faltblattdomäne), er arbeitet aber nach einem ähnlichen Prinzip: auch GreB reicht mit seiner coiled-coil-Struktur durch einen Tunnel bis in das aktive Zentrum der RNA-Polymerase und besitzt an seinem Ende zwei saure Aminosäuren zur Aktivierung der Ribonukleasefunktion der Polymerase. Archaeobakterien besitzen hingegen den Transkriptionsfaktor S, der wie TFIIIS eine *Zinc Ribbon*-Domäne enthält (HAUSNER *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, besitzt ZmET1 neben einer spaltbaren Transitsequenz für den Chloroplastenimport eine C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne, die eine vorhergesagte strukturelle Ähnlichkeit zur *Zinc Ribbon*-Domäne des TFIIIS aufweist. ZmET1 besitzt ebenfalls zwei C-X-X-C Motive zur Komplexierung eines Zink-Atoms. Außerdem weisen *in silico* Analysen zur Aufklärung der Sekundärstruktur auf die Ausbildung von drei  $\beta$ -Faltblättern in der *Zinc Ribbon*-Domäne hin.



**Abb. 2-5: Struktur und Funktion der *Zinc Ribbon*-Domäne des Transkriptionsfaktors TFIIIS**

A) Schematische Darstellung der Interaktion zwischen TFIIIS und der RNA-Poymerase II (entnommen aus CONAWAY *et al.*, 2003). B) 3D-Struktur der *Zinc Ribbon*-Domäne (Domäne III) des humanen Transkriptionselongationsfaktors TFIIIS (entnommen aus KETTENBERGER *et al.*, 2003). C) Vorhersage der 3D-Struktur der ZmET1 *Zinc Ribbon*-Domäne. Als Matrize diente die Struktur des TFIIIS aus Hefe (entnommen aus DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).



Allerdings besitzt das ZmET1 in der  $\beta$ -Schleife nur eine der beiden essentiellen sauren Aminosäuren für die Ausübung TFIS-Funktion. Auch die Domäne II und die Linker-Domäne, die die Bindung von TFIS an die RNAP vermitteln und für die Aktivität notwendig sind, treten im ZmET1 nicht auf.

Eine TFIS-ähnliche Funktion von ZmET1 während der Transkription in den Chloroplasten ist aufgrund der strukturellen Verwandtschaft durchaus annehmbar.

## 2.5 Der Transkriptionsapparat der Plastiden

Plastiden enthalten ein eigenes Genom sowie eine eigene Transkriptionsmaschinerie (vgl. Kapitel 2.1). Die plastidäre DNA liegt je nach Entwicklungsstadium der Plastiden in 10 bis 500 Kopien vor, die durch verschiedene Proteine zu Nukleoiden kondensiert werden. In Proplastiden sind die Nukleoide durch das PEND-Protein an die innere Hüllmembran gebunden (SATO *et al.*, 2005), während die plastidäre DNA in ausdifferenzierten Chloroplasten über das MFP1-Protein (MAR binding filament-like protein 1) an die Thylakoidmembran gebunden ist (JEONG *et al.*, 2003).

Wie bereits beschrieben, besitzen die Chloroplasten höherer Pflanzen zwei verschiedene RNA-Polymerasen. Die plastidenkodierte RNA-Polymerase PEP weist Verwandtschaft zur eubakteriellen RNA-Polymerase auf und setzt sich aus vier verschiedenen Untereinheiten,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\beta''$ , zusammen, welche von den Genen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* codiert werden (HESS UND BÖRNER, 1999). Ebenso wie die bakterielle Polymerase benötigt die PEP für die Promotorbindung und Transkriptionsinitiation kernkodierte Sigmafaktoren. In *Arabidopsis* sind sechs verschiedene Sigmafaktoren (SIG 1 bis SIG 6) bekannt, die sich in ihrer entwicklungsabhängigen Expression unterscheiden und jeweils die Transkription spezifischer Plastidengene regulieren (KANAMARU UND TANAKA, 2004). So werden *SIG2* und *SIG6* besonders während der frühen Plastidenentwicklung exprimiert, *SIG1* ist jedoch in ausdifferenzierten Plastiden funktionell. *SIG3*, *SIG4* und *SIG5* sind spezifisch in die Transkription von *PsbN*, *NdhF* bzw. *psbA* sowie *psbD* involviert.

Neben der PEP besitzen die Plastiden höherer Pflanzen eine weitere, im Zellkern kodierte Polymerase NEP, die Verwandtschaft zur RNA-Polymerase der T7-Phagen aufweist. Bisher wurden keine Sigma-ähnlichen Faktoren der NEP identifiziert. Dikotyle Pflanzen wie *Arabidopsis* besitzen neben der NEP die zwei weiteren phagenähnlichen RNA-Polymerasen *rpoTm* und *rpoT2*. Während *rpoTm* in den Mitochondrien lokalisiert ist, besitzt die *rpoT2* *Dual-targeting*-Charakter. Sie ist sowohl in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien lokalisiert (HEDTKE *et al.*, 2000). In monokotylen Pflanzen wurde bisher keine *rpoT2* identifiziert, sie besitzen ausschließlich die plastidenlokalisierte NEP und die mitochondriale *rpoTm*.

Während der plastidären Transkription erfüllen die NEP und die PEP spezifische Funktionen, da sie unterschiedliche Promotorspezifitäten besitzen. Darüber hinaus zeigen sie eine entwicklungsabhängige Expression. Während die NEP die Gene der Transkriptions- und Translationsmaschinerie (d.h. die Untereinheiten der PEP) sowie einige *Housekeeping*-Gene transkribiert und die plastidäre Transkription während der frühen Plastidenentwicklung dominiert, ist die PEP vornehmlich für die Transkription der Photosynthesegene verantwortlich und ist maßgeblich an der Transkription in ausdifferenzierten Chloroplasten beteiligt. Die Promotoren einiger Plastidengene werden sowohl von der NEP als von der PEP erkannt (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997).

Durch biochemische Methoden lässt sich aus Chloroplasten sowohl eine lösliche als auch eine membrangebundene transkriptionsaktive Fraktion aufreinigen. Letztere wird auch als Transkriptionsaktives Chromosom (TAC) bezeichnet (HALLICK *et al.*, 1976). Die plastidäre TAC-Fraktion setzt sich aus plastidärer DNA und assoziierten Proteinkomplexen zusammen und besitzt *in vitro* Transkriptionselongationsaktivität. Über die genaue Zusammensetzung des plastidären Transkriptionskomplexes ist bisher wenig bekannt. Die TAC enthält etwa 80 verschiedene Proteine, von denen bisher nur wenige identifiziert werden konnten. Unter anderem wurden die Untereinheiten der plastidenkodierten RNA-Polymerase PEP (KRAUSE UND KRUPINSKA, 2000) und 18 weitere TAC-Proteine isoliert (PFALZ *et al.*, 2006), deren Funktion im Zusammenhang mit der plastidären Transkription bisher jedoch ungeklärt ist.

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von ZmET1 zum TFIIS wurde eine mögliche Funktion des ZmET1 im TAC untersucht (MÜLLER, 2004). Tatsächlich konnte das ZmET1 mittels Western-Detektion in hoch aufgereinigter TAC aus Wildtyp-Maispflanzen detektiert werden, nicht aber in der TAC aus der ETCHED1-defizienten Maismutante *et1*-Ref. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die relative Transkriptionsaktivität in TAC-Präparationen aus ZmET1-defizienten *et1*-Ref-Pflanzen im Vergleich zur TAC aus Wildtyp-Pflanzen um etwa zwei Drittel reduziert ist. Dies weist darauf hin, dass das ZmET1 eine funktionelle Komponente des plastidären Transkriptionskomplexes ist (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

TFIIS stimuliert die Exonukleaseaktivität der RNAP II im Zellkern und vermittelt die Korrekturlesefunktion des Transkriptionskomplexes (vgl. Kapitel 2.4). Mit Hilfe des Nukleotidanalogs Cordycepin wurde daher die Exonukleaseaktivität des TAC-Komplexes untersucht. Durch den Einbau von Cordycepin in die RNA arretiert der Transkriptionskomplex. Erst nach dem Entfernen des Cordycepins durch die intrinsische Exonukleaseaktivität der RNA-Polymerase kann die Transkription fortgesetzt werden. Experimente mit isolierter TAC aus Chloroplasten von Wildtyp- und *et1*-Ref Maispflanzen zeigten, dass die Exonukleaseaktivität der TAC-Fraktion in der ZmET1-defizienten *et1*-Ref im Vergleich zum Wildtyp deutlich gemindert ist (MÜLLER, 2004).

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass das ZmET1, analog zum TFIIIS im Zellkern, eine funktionelle Komponente des plastidären Transkriptionsapparates ist und die Korrekturfunktion der RNA-Polymerase unterstützt.

## 2.6 ETCHED1 ist Mitglied der *Zinc Ribbon* (ZR)-Protein Familie

Datenbankanalysen haben gezeigt, dass weitere ETCHED1-ähnliche *Zinc Ribbon*-Proteine in höheren Pflanzen existieren (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

Anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer potentiellen subzellulären Lokalisation lassen sich die *Zinc Ribbon*-Proteine in drei Gruppen einteilen, die als ETCHED1/ZR1-, ZR2- und ZR3-Gruppe bezeichnet werden.

Mais besitzt neben dem ZmET1 ein zweites Mitglied der ZR1-Gruppe, das ZmZR1, das sehr wahrscheinlich aus einer Genduplikation des *ZmET1* entstanden ist. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass beispielsweise beim allopolyploiden Weizen, der ein hexaploides Genom besitzt, drei nahe verwandte ZR1-cDNAs gefunden wurden (persönliche Mitteilung R. Lorbiecke). Da die übrigen bisher untersuchten Pflanzen jeweils nur ein ZR1-Protein besitzen, scheinen Mais und Weizen hierbei eher Ausnahmen aufgrund ihrer polyploiden Genomstruktur darzustellen.

Zwei weitere *Etched1*-homologe Sequenzen aus Mais ließen sich jeweils der ZR2- und der ZR3-Gruppe zuordnen und wurden daher als *ZmZR2* und *ZmZR3* bezeichnet. Die zugehörigen cDNAs wurden von KRUSE (2004) kloniert.

*Arabidopsis* besitzt ebenfalls drei ZR-homologe Gene, *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3*. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Funktionsorthologe von *ZmET1/ZmZR1*, *ZmZR2* und *ZmZR3* handelt. Ein experimenteller Nachweis hierfür steht jedoch noch aus.

Während Proteine der ZR1- und ZR2-Gruppe ein Signal zur Translokation in die Plastiden besitzen, wird für Proteine der ZR3-Gruppe der Import in die Mitochondrien vorhergesagt. Eine mitochondriale Lokalisation der ZR3-Proteine ist auch deshalb wahrscheinlich, da cDNA-Sequenzen putativer ZR3-Proteine nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Tieren und Pilzen gefunden werden konnten.

Durch transiente *in vivo*-Lokalisationsstudien konnte der Import des AtZR1 als GFP-Fusion in die Plastiden bestätigt werden. Der Plastiden-Import des AtZR2::GFP konnte hingegen nicht eindeutig geklärt werden (GEBERT, 2003). Die Translokation des ZmZR3-Proteins aus Mais in die Mitochondrien wurde ebenfalls durch Fusion mit GFP gezeigt (Kruse, 2004).

Eine mögliche Funktion der ZR-Proteine konnte bisher jedoch nur dem ETCHED1-Protein aus Mais zugeordnet werden.

## 2.7 Die Co-Chaperone HEP1 und HEP2

2004 wurde von BURRI *et al.* eine mögliche Funktion für das ZR3-homologe Protein YNL310c der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) publiziert. Die Autoren postulierten eine Rolle des Proteins während des Proteinimports in die Mitochondrien und zeigten, dass sich der Verlust des ZR3-homologen Proteins in der Hefe letal auswirkt. Darüber hinaus wurde von YAMAMOTO *et al.* (2005) gezeigt, dass YNL310c *in vitro* mit dem mitochondrialen Hitzeschockprotein HSP70 (mtHSP70) interagiert, welches ebenfalls am Proteinimport in die Mitochondrien beteiligt ist. SANJUÁN SZKLARZ *et al.* (2005) und SIGHTING (2005) stellten eine Funktion von YNL310c im Zusammenhang mit der mitochondrialen Importmaschinerie in Frage, bestätigten jedoch eine Funktion des Proteins als Co-Chaperon von mtHSP70. YNL310c wurde daher als HEP1 (mtHSP70 escort protein) bezeichnet.

HSP70-Proteine besitzen eine N-terminale ATPase-Domäne und eine C-terminale Peptidbindedomäne, welche der Substratbindung dient (MAYER UND BUKAU, 2005). Die Substrataffinität des HSP70 wird durch die Hydrolyse von ATP zu ADP um ein Vielfaches erhöht. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität und die Substratspezifität des HSP70-Proteins werden durch die Bindung von Co-Chaperonen (Hsp40/DNAJ-Proteine und GrpE-Nukleotidaustauschfaktoren) reguliert. SIGHTING *et al.* (2005) zeigten, dass HEP1 nur an die ATP-freie Form des HSP70-Proteins bindet. Ein Einfluss von HEP1 auf die Nukleotidaustauschrate des HSP70 konnte nicht beobachtet werden.

Das HEP1-Protein ist hitzeinduziert (SANJUÁN SZKLARZ, 2005) und HEP1-defiziente Hefezellen zeigen einen temperaturabhängigen, pleiotropen Phänotyp. Neben einer morphologischen Veränderung der Mitochondrienstruktur und einer reduzierten Proteinimportrate aggregiert das mitochondriale HSP70 in HEP1-defizienten Zellen bei erhöhten Temperaturen (SANJUÁN SZKLARZ *et al.*, 2005, SIGHTING *et al.*, 2005). Experimente in *E.coli* zeigten, dass rekombinantes HSP70-Protein in Abwesenheit von HEP1 ebenfalls aggregiert, während es nach Co-Expression mit HEP1 löslich bleibt. Daher wurde von SIGHTING *et al.* (2005) eine Funktion von HEP1 als Co-Chaperon von HSP70 postuliert, das für die Stabilität der ATP-freien HSP70-Form essentiell ist. HEP1 ist jedoch nicht in der Lage, aggregiertes HSP70 zu solubilisieren.

MOMOSE *et al.* (2007) zeigten jedoch, dass auch andere Co-Chaperone (insbesondere Nukleotidaustauschfaktoren) neben ihrer eigentlichen Funktion eine Aggregation des mtHSP70 durch Co-Expression in *E.coli* unterbinden können, sodass für HEP1 neben der Stabilisierung von HSP70 weitere Funktionen anzunehmen sind.

Kürzlich wurde eine mögliche Funktion des HEP1-verwandten HEP2-Proteins aus *Chlamydomonas reinhardtii* publiziert (WILLMUND *et al.* 2008). Im Gegensatz zu HEP1 ist HEP2 im Chloroplast der Alge lokalisiert. Das Protein besitzt eine ZR-verwandte *Zinc Ribbon*-Domäne und weist eine gewisse Homologie sowohl zur ZR1- als auch zur ZR2-Gruppe auf, lässt sich jedoch keiner der beiden Gruppen eindeutig zuordnen (eigene Daten). Ähnlich wie

---

das HEP1-Protein interagiert auch HEP2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit HSP70, in diesem Fall jedoch mit dem plastidären HSP70B. Ebenso wie HEP1 interagiert auch HEP2 verstärkt mit der ATP-freien HSP70-Form und nimmt keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität des Chaperons.

Im Gegensatz zu HEP1 und HSP70B lässt sich die HEP2-Expression nicht durch Hitzeschock induzieren. Gleichzeitig nimmt HEP2 keinen Einfluss auf die Löslichkeit des HSP70B nach Expression in *E. coli*, ist jedoch *in vitro* für dessen Aktivierung (= Bindung des Nukleotid-austauschfaktors CGE1) essentiell (WILLMUND *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HEP2 *in vitro* zur korrekten Faltung von HSP70B nach Abspaltung eines N-terminalen Fusionsproteins beiträgt. Willmund *et al.* (2008) postulieren, dass HEP2 für die *de novo* Faltung von HSP70 nach dem Import in die Chloroplasten benötigt wird, aber nicht die anschließende Stabilität des HSP70-Proteins bedingt.

Die genaue Funktion der HEP-Proteine konnte bisher nicht geklärt werden. Eine HEP2-defiziente *Chlamydomonas*-Linie und ein damit verbundener Knockout-Phänotyp des Chloroplasten ist bisher nicht bekannt. Ebenso wenig ist die genaue *in vivo* Funktion des HSP70B-Proteins in der Alge geklärt. Anders als das HSP70 in den Mitochondrien scheinen die im Stroma lokalisierten HSP70-Chaperone der Plastiden nicht am Proteinimport in das Organell beteiligt zu sein. Liu *et al.* (2007) zeigten, dass HSP70B aus *Chlamydomonas* die Assemblierung und Disassemblierung von VIPP1-Oligomeren katalysiert, welche an der Biogenese der Thylakoidmembran beteiligt sind (KROLL *et al.*, 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass HSP70B während der Photoprotektion und der Photosystem-Reparatur im Chloroplast von Bedeutung ist (SCHRODA *et al.*, 1999).

## 2.8 Zielsetzung der Arbeit

Das ETCHED1-Protein aus Mais ist Mitglied einer neuen Familie von Organellen-spezifischen *Zinc Ribbon*-Proteinen (ZR-Proteinfamilie), die neben der ETCHED1/ZR1-Gruppe die ZR2-Proteine und ZR3-Proteine umfasst. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde lediglich für das ETCHED1-Protein eine mögliche Funktion postuliert.

Um weitere Hinweise auf die Funktion von ETCHED1 und ETCHED1-homologen Proteinen zu erlangen, sollte die ZR-Proteinfamilie in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* unter Einbeziehung der ZR-Proteine aus Mais umfassend charakterisiert werden.

Zunächst sollte die subzelluläre Lokalisation der ZR-Proteine detailliert untersucht und verglichen werden. Außerdem sollten Promotorstudien Aufschluss über die entwicklungs- und gewebespezifische Expression der ZR-Genfamilie in *Arabidopsis* geben.

Durch die Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien und die Identifizierung möglicher Mutanten-Phänotypen auf zellulärer und molekularer Ebene sollten weitere Einblicke in die Bedeutung der ZR-Genfamilie für die Pflanzenentwicklung gewonnen werden.

MÜLLER (2004) konnte zeigen, dass sich die *etched1*-Mutation in Mais negativ auf die Transkriptionsaktivität und die Korrekturfunktion der plastidären TAC (transcriptionally active chromosome) auswirkt. Ob das ETCHED1-Protein tatsächlich eine direkte Interaktion mit einer der beiden plastidären RNA-Polymerasen aus Mais eingeht, wurde bisher jedoch nicht untersucht. Daher sollte eine mögliche Interaktion zwischen ZmET1 und den plastidären RNA-Polymerasen im Hefe-2-Hybridsystem untersucht werden. Zusätzlich sollte mit demselben System eine cDNA-Bank aus Maisblättern nach möglichen anderen ZmET1-Interaktionspartnern durchmustert werden.

Im Verlauf der Arbeit wurde für die ZR-ähnlichen Proteine HEP1 aus der Hefe und HEP2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* eine Funktion als Co-Chaperone der organellenspezifischen HSP70-Proteine beschrieben. Um diese Theorie für ZR-Proteine höherer Pflanzen zu überprüfen, sollte sowohl molekular als auch biochemisch eine mögliche Interaktion zwischen den ZR-Proteinen AtZR1 bzw. AtZR2 und den plastidären HSP70-Proteinen aus *Arabidopsis* untersucht werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, Radionukleotide und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse* (p.A.) von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldenburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (München) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Das Radionukleotid  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (3.000 Ci/mmol) zur Markierung von Nukleinsäuren stammte von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### 3.1.2 Größenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden die *SmartLadder* (Eurogentec, Belgien) und der *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Als Größenstandard für RNA diente die *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot).

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mit Hilfe der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* und der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* von Fermentas (St. Leon-Rot) bestimmt.

#### 3.1.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert. Für die Realtime-PCR wurden HPLC-aufgereinigte Primer (Biozym, Oldenburg) verwendet. Stocklösungen (100 $\mu$ M) und Arbeitslösungen (10 $\mu$ M) wurden mit LiChrosolv®-Wasser angesetzt und bei -20°C gelagert. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer ist dem Anhang (A 1) zu entnehmen.

### 3.1.4 Kits

**Tab. 3.1-1: Molekularbiologische Kits**

Die Anwendung der Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

Anwendung	Kit
Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	NucleoTrap® (Macherey-Nagel, Düren)
Aufreinigung von PCR-Fragmenten	Invisorb Spin® PCRapid Kit (Invitek, Berlin)
Klonierung von PCR-Fragmenten	Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, TOPO®TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
Herstellung einer cDNA-Bank	SMART™cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences, Freiburg)
Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen	GenElute™ Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, München) High-Speed Plasmid Mini Kit (Avegene, Taipei, Taiwan)
Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	Prime-It®II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, Heidelberg)

### 3.1.5 Vektoren, Mikroorganismen und Pflanzenmaterial

Eine vollständige Liste der verwendeten Vektoren ist im Anhang unter Kapitel A2 aufgeführt.

**Tab. 3.1-2: Verwendete Mikroorganismen**

Organismus	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), λ-	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F'</i> { <i>lacIq</i> Tn10 ( <i>Tet<sup>R</sup></i> )} <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) Φ80lacZΔM15 Δ <i>lacX74</i> recA1 araD139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 galU galk rpsL endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL-1 blue MRF' <i>tet<sup>R</sup></i>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [ <i>F'</i> proAB <i>lacIq</i> ZΔM15Tn10 ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL-1 blue MRF' <i>kan<sup>R</sup></i>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [ <i>F'</i> proAB <i>lacIq</i> ZΔM15 Tn5 ( <i>Kan<sup>r</sup></i> )]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup></i> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [<i>lacI</i> lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Qiagen, Hilden
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	C58C1 Riff <sup>r</sup> , pMP90RK <i>kan<sup>r</sup> gent<sup>r</sup></i>	Van Larebeke et al. (1974), Koncz und Schell, (1986)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSY-1	MATa his3Δ200 trp-1-901 leu2-3,112 ade2 LYS::( <i>lexAop</i> ) <sub>4</sub> -HIS3 URA3::( <i>lexAop</i> ) <sub>8</sub> - lacZ Gal4	Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz



**Tab. 3.1-3: Verwendetes Pflanzenmaterial**

*Arabidopsis* T-DNA-Linien wurden über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) bezogen.

Pflanze	Linie / AC-Nummer	Herkunft
<i>Zea mays</i> L.	A188	GREEN und PHILIPS (1975)
	AC 3916 (AtZR1 GFP)	GH3308/09 } K. Müller, Universität Hamburg
	AC4139 (AtZR3 GFP)	
	et-1 Ref	STADLER (1940)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ökotyp Col-0	Zur Verfügung gestellt von M. Sauter, Universität zu Kiel
	GK_209H11 (At1g68730)	Gabi_Kat collection, Rosso et al.(2005)
	WiscDsLox345-348L9 (At1g68730)	WiscDsLox-Collection, Univ. Wisconsin
	SALK_020364 (At5g27280)	Salk collection, ALONSO et al.(2003)
	SALK_090006 (At3g54826)	Salk collection, ALONSO et al.(2003)
	SAIL_443_E10 (At4g22890)	Sail collection, SESSIONS et al.(2002)
	SALK_095715c (At5g49910)	Salk collection, ALONSO et al.(2003)
	SALK_140810 (At4g34380)	Salk collection, ALONSO et al.(2003)
N6153 (35S-GUS, No-0)	NASC/gestiftet von Keith Davis	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Petit Havana SR1	MALIGA et al. (1973)
<i>Allium cepa</i>		Supermarkt
<i>Allium fistulosum</i>		Supermarkt

**Tab. 3.1-4: Transgene *Arabidopsis*-Linien, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden**

Transgene *Arabidopsis*-Linien wurden entweder durch Kreuzung oder durch Agrobakterien-vermittelte Transformation erzielt.

Pflanze	Ursprungslinie(n)	Methoden
p35S:ZmET1/atzr1	GK_209H11 (AtZR1/atzr1)	Transformation mit p35S:ZmET1-Vektor, Segregationsanalyse
pAtZR1:ZmET1/atzr1	GK_209H11 (AtZR1/atzr1)	Transformation mit pAtZR1:ZmET1, Segregationsanalyse
p35S:ZmET1::gfp/AtZR1	GK_209H11 (AtZR1/atzr1)	Transformation mit p35S:ZmET1, nur AtZR1/AtZR1-Nachkommen!
p35S:AtZR2	Col-0	Transformation mit pAtZR1:GUS-Vektor
p35S:ATZR1strep	Col-0	Transformation mit pAtZR1:GUS-Vektor
p35S:ATZR1strep/atzr1	GK_209H11 (atzr1/atzr1)	Kreuzung mit Linie p35S:ATZR1strep
p35S:AtZR2/AtZR1/atzr1	GK_209H11 (atzr1/atzr1)	Kreuzung mit Linie p35S:AtZR2
pAtZR1:GUS	Col-0	Transformation mit pAtZR1:GUS-Vektor
pAtZR2:GUS	Col-0	Transformation mit pAtZR2:GUS-Vektor
pAtZR3:GUS	Col-0	Transformation mit pAtZR3:GUS-Vektor

### 3.1.6 Medien und Reagenzien

Alle Lösungen und Medien wurden mit Wasser der Qualität *Aqua bidest* aus einer *Millipore Milli-Q Plus* Aufbereitungsanlage (Millipore, Billerica, USA) angesetzt. Für sterile Arbeiten wurden die Lösungen und Medien für 20 Minuten auf 125°C und  $2 \cdot 10^5$  Pa erhitzt oder durch einen Sterilfilter (Porengrößen 0,2 µm oder 0,45 µm) filtriert.

#### 3.1.6.1 Lösungen

Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen ist mit Ausnahme der folgenden im Methodenteil beschrieben.

MOPS-Puffer :	400 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure
(10x Stammlösung)	100 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA pH 8.0
	pH 7.2 mit NaOH
SSC:	3 M NaCl
(20x Stammlösung)	300 mM Natriumcitrat pH 7.0
TAE:	2 M Tris-Acetat
(50x Stammlösung)	100 mM EDTA pH 8.0
X-Gluc-Lösung:	100 mg X-Gluc
	in 1 ml Dimethylformamid
Färbepuffer:	50 mM Na-P-Puffer pH 7.0
	0,5 mM K-Ferrocyanid
	0,5 mM K-Ferricyanid
	10 mM EDTA
	0,1 % Triton-X

Zur Herstellung gebrauchsfertiger X-Gluc-Färbelösung wurde 1 ml X-Gluc-Lösung zu 200 ml Färbelösung gegeben.

### 3.1.6.2 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium:  
(Luria-Bertani-Medium)

10 g Caseinhydrolysat  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
(für Platten: 15 g Agar)  
ad 1 Liter H<sub>2</sub>O  
pH 7.4

YEP-Medium:

10 g Hefeextrakt  
10 g Pepton  
5 g NaCl  
(für Platten: 15 g Agar)  
ad 1 Liter H<sub>2</sub>O  
pH 7.0

Zur Selektion der Bakterien wurden die Medien mit einem oder mehreren der folgenden Antibiotika ergänzt:

Ampicillin	100 µg/ml	→ amp <sup>100</sup>
Kanamycin	30 µg/ml	→ kan <sup>30</sup>
	50 µg/ml	→ kan <sup>50</sup>
Spectinomycin	100 µg/ml	→ spec <sup>100</sup>
Gentamycin	30µg/ml	→ gent <sup>30</sup>

### 3.1.6.3 Medien zur Anzucht von Hefen

YEPD-Medium:  
(autoklaviert; ohne Glucose)

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
55 mg Adenin Hemisulfat  
(für YEPD-Platten: 20 g Agar)  
ad 900 ml H<sub>2</sub>O

2x YPAD-Medium:  
(autoklaviert; ohne Glucose)

20 g Hefeextrakt  
40 g Pepton  
80 mg Adenin Hemisulfat  
ad 800 ml H<sub>2</sub>O

---

SD-Medium: (autoklaviert; ohne Glucose und Dropout)	6,7 g Yeast nitrogen base without Amino acids (für SD-Platten: 15g Agar ) ad 800 ml H <sub>2</sub> O pH 5.8
10x Dropout-Lösung (DO) <sup>1</sup> : (autoklaviert)	550 mg L-Adenin Hemisulfat 200 mg L-Arginin HCl 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat 300 mg L-Isoleucin 1000 mg L-Leucin 300 mg L-Lysin HCl 200 mg L-Methionin 500 mg L-Phenylalanin 200 mg L-Tryptophan 300 mg L-Tyrosin 200 mg L-Uracil 1500 mg L-Valin ad 1 Liter H <sub>2</sub> O
20 % Glucose: (sterilfiltriert)	200 g Glucose Monohydrat ad 1 Liter H <sub>2</sub> O

Alle Medien wurden bei 4°C gelagert. Um das Kontaminationsrisiko zu vermindern, wurde den Medien erst kurz vor ihrer Benutzung Glucose zugesetzt. Die Endkonzentration der Glucose betrug 2 % im YEPD-Medium und 4 % im 2x-YPAD-Medium. SD-Medium wurde mit Glucose (Endkonzentration: 2 %) und mit 10x Dropout-Lösung (Endkonzentration: 1x) ergänzt. Zur Selektion der Hefen wurde SD-Medium ohne Leucin (→ SD -leu), ohne Tryptophan (→ SD -trp), ohne Leucin und Tryptophan (→ SD -leu/ -trp) bzw. ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (→ SD -leu/-trp/-his) verwendet.

---

<sup>1</sup> Zur Selektion der Hefen wurden einzelne Komponenten, wie Leucin, Tryptophan oder Histidin in unterschiedlichen Kombinationen weggelassen.

### 3.1.6.4 Medien zur Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

2x MS-Medium (mit Sucrose) : (MURASHIGE-SKOOG-Medium, sterilfiltriert)	8,8 g Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen (Duchefa) (20 g oder 60 g Sucrose) <sup>2</sup> ad 1 Liter H <sub>2</sub> O pH 6.0 mit KOH
Phytigel: (autoklaviert)	1,5 g Phytigel ad 250 ml H <sub>2</sub> O

Phytigel wurde bei Raumtemperatur und MS-Medium wurde bei 4°C gelagert. Zur Herstellung von 1x MS-Platten ohne Sucrose, mit 1 % oder 3 % Sucrose wurden 250 ml Phytigel in der Mikrowelle aufgeköcht und mit 250 ml des entsprechenden MS-Mediums (mit oder ohne Sucrose) versetzt.

Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht von Pflanzenmaterial

#### Zea mays

Maispflanzen wurden im Gewächshaus bei 16 Stunden Helligkeit (24°C) und 8 Stunden Dunkelheit (16°C) bei einer Lichtstärke von 24.000-25.000 Lux und einer Luftfeuchtigkeit von 55-95 % angezogen.

#### Arabidopsis thaliana

Je nach Verwendung wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf einem Erde-Sandgemisch (1:1) oder steril auf MS-Medium (3.1.6.4) angezogen.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte, falls nicht anders vermerkt, im Langtag (16h Licht / 8h Dunkelheit) bei 22-24°C mit einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$  und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70%.

Zur sterilen Anzucht von *Arabidopsis* wurde das Saatgut zunächst 3 Minuten in 70 % EtOH und dann 2 Minuten in 1 % Na-Hypochlorid + 0,2 % Mucasol inkubiert. Nach fünfmaligem

<sup>2</sup> MS-Medium wurde ohne Sucrose oder mit einer Endkonzentration von 1 % bzw. 3 % Sucrose verwendet.

Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Samen einzeln mit einer Pipette angesaugt und im Abstand von ca. 1 cm auf dem entsprechenden MS-Medium verteilt.

Nach Erreichen eines Durchmessers von etwa 2 cm wurden die Pflanzen entweder in Weckgläser mit entsprechendem MS-Medium oder auf Erde umgesetzt.

### *Nicotiana tabacum*

Tabaksamen wurden wie oben beschrieben sterilisiert und auf ½-MS-Medium ausgelegt. Tabakpflanzen wurden im Langtag (s. o.) angezogen. Die Blätter wurden für die biolistische Transformation (3.2.6.2) eingesetzt.

### *3.2.1.1 Kreuzen von Arabidopsis thaliana*

Da es sich bei *A. thaliana* um einen Selbstbestäuber handelt, wurde der weibliche Kreuzungspartner vor der Kreuzung emaskuliert. Dazu wurden am Binokular mit Hilfe einer feinen Pinzette aus ungeöffneten Knospen die unreifen Antheren entfernt (ca. 4-6 Blüten je Blütenstand). Zu junge und zu alte Blüten wurden entfernt.

Zum Bestäuben wurden geöffnete Blüten des männlichen Kreuzungspartners mit einer Pinzette am Blütengrund gefasst und vorsichtig mit den Antheren auf den Stempel der weiblichen Blüte gedrückt. Die Übertragung des Pollens konnte am Binokular verifiziert werden. Der Bestäubungsvorgang wurde am darauf folgenden Tag wiederholt.

## 3.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Grundtechniken wurden, sofern nicht anders erwähnt, nach Standardprotokollen durchgeführt (SAMBROOK *et al.* 1989). Die Anwendung von molekularbiologischen Kits erfolgte in der Regel nach Herstellerangaben.

## 3.2.3 Analyse von Nukleinsäuren

### *3.2.3.1 Allgemeine Klonierungstechniken*

DNA-Fragmente für Klonierungen wurden generell durch PCR (3.2.3.10) oder durch Restriktion von Plasmid-DNA gewonnen.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *NucleoTrap*<sup>®</sup>-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren). Zur Elution wurde anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers H<sub>2</sub>O verwendet.

Die Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt.

Die Transformation chemokompetenter *E. coli* Stämme (3.1.5) erfolgte mittels Hitzeschock. Zur Anzucht und Selektion positiver Klone wurde LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz (3.1.6.2) verwendet.

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte in der Regel mit dem *GenElute™ Miniprep Kit* (Sigma, Taufkirchen) oder dem *High-Speed Plasmid Mini Kit* (Avegene, Taipei, Taiwan). Alternativ wurde Plasmid-DNA durch alkalische Lyse nach dem Protokoll von ZHOU und CHEN (1990) isoliert.

In größerem Maßstab wurde Plasmid-DNA nach dem *Benchmarks*-Protokoll von BAUMANN UND BLOOMFIELD (1995) aus 50 ml *E.coli* -Kultur isoliert.

### 3.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Zur Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana* wurde genomische DNA nach VEJLUPKOVA UND FOWLER (2003) isoliert.

1-2 Rosettenblätter wurden in 200 µl eiskalten Extraktionspuffer (2 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 70 mM EDTA, 20 mM Na-Disulfit, 0,5 % N-Lauroylsacodin) gegeben und für 10-20 Sekunden am Heidolph-Mixer (RZR2051 Electronic, Heidolph, Schwabach) homogenisiert. Nach einstündiger Denaturierung der Probe bei 95°C wurden die Gewebetrümmer pelletiert (15 min, 4°C, 14.000xg). Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit ½ Volumen 10M Ammoniumacetat und 2 Volumen Isopropanol versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde pelletiert (5 min, 20°C, 9400xg), mit 70 % EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in 100-200µl H<sub>2</sub>O gelöst. In der anschließenden PCR (3.2.3.9) wurden je 10 µl DNA eingesetzt.

Für Southern-Analysen von *Arabidopsis* erfolgte die Isolierung genomischer DNA nach DELLAPORTA *et al.* (1983) mit halbierten Volumina.

Genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### 3.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Pflanzengeweben nach dem Protokoll von KLUTH *et al.* (2002) isoliert. In der Regel wurden etwa 1-3 g gemörsertes Gewebe eingesetzt. Während der RNA-Extraktion wurden die Proben auf Eis oder bei 4°C gehalten.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Qualität im Agarosegel kontrolliert.

Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.4 Fällung von Nukleinsäuren

DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat über Nacht bei -20°C gefällt, anschließend 30 Minuten bei 15.000xg und 4°C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Fällung von RNA erfolgte analog, mit der Ausnahme, dass zum Fällungsansatz 1 M NaCl anstelle von Natriumacetat zugesetzt wurde.

### 3.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNA erfolgte mittels horizontaler Gel-Elektrophorese (SAMBROOK *et al.*, 1989) im 0,8 – 1,7 % Agarose-TAE-Gel. Zum Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht wurde den Gelen 100 ng/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte nach SECHZACH *et al.* (1977) im Formaldehyd-Agarosegel (1 % (w/v) Agarose, 6 % (v/v) Formaldehyd, 1x MOPS, 20 ng/ml Ethidiumbromid) in 1x MOPS Laufpuffer.

### 3.2.3.6 Northern- und Southern Blot-Transfer

Zur Restriktionsanalyse genomischer DNA (Southern Blot) aus *Arabidopsis* wurden 12 µg restringierte gDNA im Agarosegel aufgetrennt (3.2.3.1, 3.2.3.5).

Vor dem Blotten wurde das Agarosegel zweimal 15 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) geschwenkt.

Die DNA-Fragmente wurden über Nacht per Kapillarblot mit 10x SSC auf eine *Hybond™ XL-Nylonmembran* (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert.

Anschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und die DNA durch UV-Licht (1200 µJ/cm<sup>2</sup>) im Crosslinker (UVC-1000, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) fixiert.

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA (Northern Blot) erfolgte analog zum Transfer von DNA, allerdings ohne Denaturierung.

Nach dem Fixieren der RNA wurde die Northern-Membran 10-20 Minuten in 0,05 % (w/v) Methylenblau und 0,3 M Natriumacetat gefärbt und die RNA durch Differenzierung mit H<sub>2</sub>O sichtbar gemacht.

Die Hybridisierung von Northern- und Southern-Membran erfolgte mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (3.2.3.7; 3.2.3.8)



### 3.2.3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Als Sonden für Southern- und Northernhybridisierungen wurden radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit dem *Prime It II-Kit* (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Dazu wurden in der Regel 30 ng PCR-Produkt mit 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  nach Herstellerangaben für mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über *MicroSpin™ S-300 HR*-Säulen der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) abgetrennt.

### 3.2.3.8 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden

Vor der Hybridisierung einer Southern- oder Northernblot-Membran (3.2.3.6) mit einer radioaktiv markierten Sonde (3.2.3.7) wurde die Membran für 3 bis 4 Stunden bei 68°C mit Prähybridisierungslösung (10 % (w/v) Dextransulfat, 1 M NaCl, 1 % (w/v) SDS, 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  denaturierte Fischsperma-DNA) inkubiert. Anschließend wurde die aufgereinigte Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben und die Membran über Nacht bei 68°C hybridisiert.

Zum Waschen der Membran wurden 1x SSC (W1) und 1x SSC mit 1 % SDS (W2) verwendet (3.1.6.1). Beide Waschpuffer wurden auf 68°C vorgewärmt. Zunächst wurde die Hybridisierungslösung mit etwas W1 entfernt und die Membran dann einmal 10 Minuten mit W1 und zweimal 7 Minuten mit W2 gewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt, eingeschweißt und mit *Hyperfilm™MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) bei -70°C exponiert.

Zum mehrmaligen Beprobieren der Membran wurde die Sonde durch zweimal 20-minütiges Waschen mit kochender 0,1 % (w/v) SDS-Lösung entfernt. Die Membran wurde anschließend feucht eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

### 3.2.3.9 Reverse Transkription von RNA

Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA (3.2.3.3) wurde die *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

Dazu wurde die RNA zunächst mit RNase-freier DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben behandelt. Standardmäßig wurden 1-3  $\mu\text{g}$  RNA im 100  $\mu\text{l}$ -Ansatz revers transkribiert:

1-3 $\mu\text{g}$	Gesamt-RNA
0,2 $\mu\text{M}$	Oligo dT Primer oder genspezifischer Primer
0,2 mM	dNTP-Mix
20 U	<i>RiboLock™ RNase Inhibitor</i>
10 mM	DTT
20 $\mu\text{l}$	5x <i>M-MuLV-RT</i> Puffer
50 U	<i>H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase</i>

ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Die cDNA-Synthese erfolgte für 75 Minuten bei 42°C mit anschließender Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 72°C im *Uno II*-Thermozykler (Whatman-Biometra, Göttingen).

Erststrang-cDNA wurde für RT-PCR und *Realtime*-PCR eingesetzt.

### 3.2.3.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die *Taq*-Polymerase oder die *Pfu*-Polymerase der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bzw. das *Advantage™ 2 Polymerase Enzyme System* (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

Die PCR wurde standardmäßig im 50 µl-Ansatz durchgeführt, der sich folgendermaßen zusammensetzte (Abweichungen s. unten):

0,5 µM	5'-Primer
0,5 µM	3'-Primer
0,4 mM	dNTP-Mix
ca. 10-100 ng	DNA
1-2 %	DMSO
10 µl	10x PCR-Puffer
1-2 U	<i>Taq</i> - <i>Pfu</i> - oder <i>Advantage™ 2 Polymerase</i>
(1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> bei <i>Taq</i> oder MgSO <sub>4</sub> bei <i>Pfu</i> )
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Die PCR wurde in der Regel mit Anlagerungstemperaturen zwischen 55°C und 62°C und 30 Zyklen in einem *TRIO*-Thermozykler oder einem *Uno II*-Thermozykler der Firma Whatman-Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten Amplifikats.

#### *Failsafe*-PCR

Um die Reaktionsbedingungen für schwer amplifizierbare DNA-Sequenzen zu optimieren, wurden, in Anlehnung an den *FailSafe™ PCR Selection Kit* (BIOzym Diagnostics GmbH, Oldendorf) 15 verschiedene 2x PCR-Puffer mit variierenden MgCl<sub>2</sub>- und Betain-Konzentrationen verwendet.

#### PCR zur Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Bestimmung des Genotyps von *A. thaliana* mittels PCR wurden 10µl gDNA (3.2.3.2) in einem Standard-PCR-Ansatz mit doppelter MgCl<sub>2</sub>-Konzentration eingesetzt.

### RT-PCR

Die RT-PCR erfolgte grundsätzlich nach dem Standard-PCR-Protokoll mit 10 µl cDNA (3.2.3.9). Zum Nachweis spezifischer cDNA oder zur Amplifikation einer cDNA mit dem Ziel der Klonierung wurden PCR-Reaktionen mit 35 Zyklen durchgeführt. Für die Semi-quantitative RT-PCR wurde die Zyklenzahl entsprechend reduziert.

### Realtime-PCR

Für die *Realtime-PCR* wurde der *SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ for quantitative PCR* (Sigma-Aldrich, München) verwendet.

Standardmäßig wurden 25µl Reaktionsansätze in 2facher Ausführung mit 50-100 ng revers transkribierter RNA (3.2.3.9), je 0,2 µM Primer und 12,5 µl *SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™* angesetzt.

Die PCR-Reaktion erfolgte im *iCycler thermal cycler* (Biorad, München) unter folgenden Bedingungen:

15 sek	95°C Denaturierung	} x 40 Zyklen
1 min	60°C Annealing	
1 min	72°C Elongation	
1 min	95°	
1 min	55°C	
10 sek	55°C + 0,5°C je Zyklus für 80 Zyklen (Schmelzkurvenbestimmung)	

Die Auswertung der PCR-Daten erfolgte mit der *iCycler iQ Optical System Software 3.0a* und in Excel (Office 2007, Microsoft, Redmond, USA). UBQ10 (CZECHOWSKI *et al.*, 2005) diente als interner Standard zur Normalisierung der Daten. Expressionslevel wurden als  $2^{-\Delta CT}$  ( $\Delta CT = C_T \text{ target} - C_T \text{ Standard}$ ) berechnet (EMANUEL *et al.*, 2005).

Primerpaare für die Realtime-PCR wurden mit Hilfe des Programms *Primer3* (STEVE ROZEN und HELEN SKALETSKY, 2000) erstellt. Die Primer wurden so gewählt, dass die Primer möglichst keine Dimere oder Sekundärstrukturen bildeten, die Anlagerungstemperatur bei 60°C lag und ein 200-300 bp großes Fragment aus dem 3' Bereich des Zielgens amplifiziert wurde.

### *3.2.3.11 Sequenzierung*

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.* 1977) mit dem *ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt).

Ein Standard-Sequenzierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzte sich aus etwa 500 ng Plasmid-DNA, 0,5 µM Primer, 3 µl BigDye und 0,5 µl DMSO zusammen.

Die Sequenzreaktion verlief nach folgendem PCR-Programm:

Denaturierung	96°C	2 min.	
Denaturierung	96°C	30 sek.	← 25 Zyklen
Annealing	50°C	15 sek.	
Elongation	60°C	4 min.	

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 35 µl EtOH und 20-minütiger Zentrifugation bei 20.000g und 20°C gefällt, der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet.

Die Analyse der Sequenzreaktionen wurde am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie in der Abteilung Richter<sup>3</sup> durchgeführt.

Alternativ wurde die Sequenzierung vom DNA-Cloning Service (Hamburg) durchgeführt.

### 3.2.3.12 Affymetrix<sup>®</sup> Microarray Analyse

Zur Transkriptom-Analyse von *Arabidopsis atzr1*-Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp wurden ATH1-121501 GeneChips<sup>®</sup> der Firma Affymetrix<sup>®</sup> (Santa Clara, USA) verwendet. Es wurden Transkriptionsprofile von 3 *atzr1*-Knockout-Individuen und 2 *Col-0* Wildtyp-Individuen erstellt.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus 3 Wochen alten *Arabidopsis Col-0*-Pflanzen (13-14 Rosettenblätter, keine Triebe) und *atzr1*-Knockout-Pflanzen im vergleichbaren Entwicklungsstadium (5-6 Wochen alt) isoliert (3.2.3.3).

Die Qualität der RNA wurde im Agarosegel überprüft. Durch RT-PCR wurde der *atzr1* – Knockout in den Mutanten verifiziert.

Die Microarray-Hybridisierung und die Auswertung der Rohdaten wurde im Institut für Klinische Chemie<sup>4</sup> nach Herstellerangaben (Affymetrix: GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis *Technical Manual*) durchgeführt. Ausgehend von je 15 µg Gesamt-RNA wurde cDNA mit dem *One Cycle Kit* (Affymetrix<sup>®</sup>, Santa Clara, USA) synthetisiert, die cRNA-Synthese erfolgte mit dem *IVT Labeling Kit* (Affymetrix<sup>®</sup>, Santa Clara, USA). Für die Auswertung der Rohdaten wurde die *GeneChip<sup>®</sup> Operating Software 1.4 (GCOS 1.4)* (Affymetrix<sup>®</sup>, Santa Clara, USA) verwendet. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Array-Datensätze wurden diese basierend auf dem *Target Value Scaling* mit einem *Target Value* von 100 normalisiert.

Darüber hinaus wurden für die Datenauswertung Excel (Office 2007, Microsoft, Redmond, USA), MapMan (THIMM *et al.*, 2004), KEGG (KANEHISA *et al.* 2008) und Gene Ontology (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000) verwendet.

<sup>3</sup> Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

<sup>4</sup> Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

### 3.2.3.13 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Auswertung von Sequenzierungen erfolgte mit FinchTV (Geospiza Inc.). Für die Analyse von Nukleinsäuresequenzen wurden außerdem die Programme *NEBcutter V2.0* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) und *Reverse Complement* (STOTHARD, 2000) verwendet. Für Alignments wurde *GeneDoc* (NICHOLAS und NICHOLAS, 1997) und *ClustalX2* (LARKIN *et al.*, 2007) benutzt. Phylogenetische Bäume wurden mit *Treeview* (PAGE *et al.*, 1996) erstellt.

Die Vorhersage von Signalpeptiden in Proteinsequenzen erfolgte mit *TargetP* (EMANUELSSON *et al.*, 2007).

Darüber hinaus wurden folgende Internet-Ressourcen verwendet: NCBI blast (MCGINNIS & MADDEN, 2004), TAIR (SWARBRECK, 2008), T-DNA Express (ALONSO *et al.*, 2003), EXPASY Proteomics Server (GASTEIGER *et al.*, 2003), *BotanyArrayRessource* (TOUFIGHI *et al.*, 2005; WINTER *et al.*, 2007), *Genevestigator* (ZIMMERMANN *et al.*, 2005).

Für die Flächenberechnung von *Arabidopsis*-Sämlingen wurde *ImageJ 1.34s* (WAYNE RASBAND, National Institutes of Health, USA) verwendet.

## 3.2.4 Analyse von Proteinen

### 3.2.4.1 Chloroplastenisolation nach POULSEN

<u>Puffer A</u>	<u>Puffer B</u>
0,3 M Mannit	0,3 M Sucrose
3 mM EDTA	20 mM EDTA
2 mM DTT	50 mM Tris HCl pH 8.0
0,2 % BSA	
50 mM Tris HCl pH 8.0	

Die Isolation von Chloroplasten erfolgte grundsätzlich auf Eis mit vorgekühlten Reagenzien. Für die Chloroplastenisolation aus Maisblatt wurden 3 g Blattmaterial in 30 ml Puffer A im vorgekühlten Waring-Blendor zerkleinert (2 sek niedrigste Stufe, 4x 2 sek höchste Stufe) und anschließend durch 4 Lagen Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 3.800xg und 4°C zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml Puffer A resuspendiert. Nach Filtration durch 30µm starker Nylongaze wurde erneut zentrifugiert (10 min, 3800xg, 4°C). Zum Entfernen des BSAs wurden die Chloroplasten zweimal mit 50 ml Puffer B gewaschen, in 4 ml Puffer B aufgenommen und zu 2 ml aliquotiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Chloroplastenpellets bei -80°C eingefroren.

Für die Chloroplastenisolation aus *Arabidopsis* wurden Rosettenblätter auf Eis in 2-3 ml Puffer A mit einer Rasierklinge in feine Stücke geschnitten. Der Puffer mit den freigesetzten Chloroplasten wurde aufgenommen und durch Miracloth filtriert. Die Blattstücke wurden

erneut mit 2 ml Puffer A versetzt, zerkleinert, und nach Entfernen des Puffers noch einmal filtriert. Dieser Vorgang wurde noch 1-2mal wiederholt.

Alle weiteren Isolationschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt, aber mit reduzierten Volumina (etwa 1/10 der oben beschriebenen Mengen).

### 3.2.4.2 Gesamtproteinextraktion aus Pflanzen

Für die Proteinextraktion wurden pflanzliche Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 500µl Gewebepulver wurden mit einem Volumen Gesamtprotein-Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton<sup>®</sup>X100, 10 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM PMSF) versetzt, bis zum Auftauen kräftig gemischt und anschließend für 1 Stunde bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert.

Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15.000xg wurde der proteinhaltige Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976) mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, München). Als Referenz diente Rinderserumalbumin (Fermentas, St. Leon-Rot).

Sollte Protein aus sehr wenig Gewebe (z.B. einzelnen Rosettenblättern) isoliert werden, so wurde dieses nicht gemörsert, sondern mit etwas Protein-Extraktionspuffer am *Heidolph-Mixer* (vgl. DNA-Isolation, 3.2.3.1) zerkleinert. Im weiteren Verlauf wurde wie oben beschrieben verfahren. Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

### 3.2.4.3 Proteinextraktion aus Chloroplasten

Für die Proteinisolation wurden Chloroplasten mit einem Volumen Proteinextraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton<sup>®</sup>X100, 10 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM PMSF) versetzt und für 1 Stunde bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

Alternativ wurden die Chloroplasten in *1x LDS-Sample-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert, 10 Minuten bei 95°C erhitzt und direkt für die Gel-Elektrophorese (3.2.4.10) eingesetzt.

Zur Isolation von Stroma- und Thylakoidmembran-Proteinen wurden frisch isolierte Chloroplasten (3.2.4.1) mit einem Volumen Chloroplasten-Lysispuffer (62 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) versetzt und kräftig gemischt. Die vollständige Lyse der Chloroplasten wurde am Mikroskop verifiziert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 20.000xg wurde der Überstand (Stroma-Proteine) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die pelletierten Thylakoide wurden einmal mit Chloroplasten-Lysispuffer gewaschen und

anschließend zur Lyse der Thylakoidmembranen mit einem Volumen Chloroplasten-Lysispuffer und 1 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X100 versetzt und gründlich gemischt.

Stroma- und Thylakoidmembran-Proteine wurden, wie unter 3.2.4.9 beschrieben, gefällt.

#### 3.2.4.4 Überexpression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Die Expression und Isolation rekombinanter Proteine erfolgte im *pET*-System der Firma Novagen (VWR, Darmstadt) oder dem *Strep-Tactin*-System von IBA (Göttingen) in *E. coli* BL21 (*DE3*).

10 bis 200 ml Kulturen wurden mit einer frisch transformierten *BL21*-Kolonie angeimpft und bei 28°C und 180 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.5 angezogen. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG (*pET30*-Vektoren) bzw. 2 mM AHT (*IBA3plus*-Vektoren) für 3-4 Stunden (*IBA3plus*-Vektoren) oder über Nacht (*pET30*-Vektoren) induziert.

Anschließend wurden die Bakterien aliquotiert, durch Zentrifugation (7 Minuten, 4°C, 3500xg) pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.2.4.5 Native Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine aus *E.coli*

Die Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Proteine unter nativen Bedingungen erfolgte in Anlehnung an den *QIAexpressionist*<sup>TM</sup> (2003) aus 2 bis 20 ml Expressionskultur (3.2.4.4). Die *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 0,5 bis 1,4 ml His-Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) aufgenommen. Nach der Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Sekunden bei 20-30 Watt Ausgangsleistung mit einem *Branson Sonifier 250* aufgeschlossen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15.000xg und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10-30 µl *Ni-NTA Agarose* (Qiagen, Hilden) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit je 1 ml His-Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 100 µl *1x LDS-Sample-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) und 10-minütiger Inkubation bei 95°C von der Matrix eluiert.

### 3.2.4.6 Native Aufreinigung rekombinanter Strep-Tag-Proteine aus *E.coli*

Die Aufreinigung rekombinanter Strep-Tag-Proteine erfolgte in Anlehnung an das *Strep-tag*<sup>®</sup> *Purification Protocol* (IBA, Göttingen) aus 2 bis 10 ml Expressionskultur (3.2.4.4). Analog zur His-Tag-Aufreinigung (3.2.4.5) wurden die *E.coli* Zellen in 0,5 bis 1 ml *Buffer W ohne EDTA* (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert, sonifiziert und zentrifugiert. Das geklärte Lysat wurde mit 20  $\mu$ l *Strep-Tactin*-Matrix versetzt, 1 Stunde bei 4°C geschüttelt und die Matrix im Anschluss fünfmal mit 1 ml *Buffer W* gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde die *Strep-Tactin*-Matrix mit 500  $\mu$ l *Buffer E* (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2,5 mM Desthiobiotin) versetzt und 10 Minuten bei RT geschüttelt.

#### Herstellung eines polyklonalen AtZR1-Antikörpers

Für die Herstellung eines AtZR1-Antikörpers wurde rekombinantes Protein aus 400 ml Expressionskultur mit folgenden Änderungen aufgereinigt: Die Bakterien wurden in 10 ml *Buffer W mit 1 mM EDTA* resuspendiert. Das geklärte Lysat wurde mit 1 ml *Strep-Tactin*-Matrix versetzt und 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Insgesamt wurde mit 50 ml *Buffer W* gewaschen. Zur Elution wurde die Matrix dreimal 30 Minuten mit je 5 ml *Buffer E* bei 4°C geschüttelt. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und über eine Ultrafiltrationssäule (Millipore, Schwalbach) auf ein Volumen von 500 $\mu$ l eingengt.

Die Herstellung des polyklonalen AtZR1-Antikörpers in Kaninchen wurde bei Eurogentec (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben.

### 3.2.4.7 Co- Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Um zu testen, ob AtZR1- bzw. AtZR2-strep *in vitro* eine Interaktion mit rekombinantem cpHSP70-1-his bzw. cpHSP70-2-his aus *Arabidopsis* eingeht, wurden geklärte Bakterienlysate aus 3.2.4.5 und 3.2.4.6 verwendet. AtZR1- bzw. AtZR2-strep Lysat wurde mit cpHSP70-1-his bzw. cpHSP70-2-his Lysat gemischt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die rekombinanten Proteine möglichst im gleichen Mengenverhältnis vorlagen (jeweils etwa 1 $\mu$ g). Die Proteingemische wurden mit *Buffer W ohne EDTA* auf ein Volumen von 0,5 ml gebracht, von dem ein 5  $\mu$ l-Aliquot für die SDS-PAGE (3.2.4.10) abgenommen wurde. Die Proben wurden jeweils mit 20 $\mu$ l *Strep-Tactin*-Matrix versetzt und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach achtmaligem Waschen mit je 1 ml *Buffer W ohne EDTA* wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 100 $\mu$ l *BufferE* und 10-minütiger Inkubation bei RT eluiert. Der Nachweis der aufgereinigten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender *Western*-Detektion (3.2.4.10, 3.2.4.13).



#### 3.2.4.8 *Aufreinigung von AtZR1-Strep-Protein aus Arabidopsis thaliana*

Für die Aufreinigung von rekombinantem AtZR1-strep-Protein wurde zunächst Gesamtprotein (3.2.4.2) aus etwa 2 Wochen alten, stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert.

Wie bei der Strep-tag-Aufreinigung aus *E.coli* (3.2.4.8) wurden dem Proteinextrakt 20 – 50 µl *Strep-Tactin*-Matrix zugefügt. Nach ein- bis vierstündiger Inkubation bei 4°C wurde die Matrix fünfmal mit 2 ml *Buffer W* ohne EDTA gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit 100µl Elutionspuffer eluiert. Zur Aufkonzentration der Probe wurden die Proteine anschließend gefällt (3.2.4.9).

#### 3.2.4.9 *Proteinfällung*

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 10 Volumen Aceton (-20°C). Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15.000xg wurde der Überstand entfernt und die Probe nach kurzem Abdampfen des Acetons bei 80°C in 1x *LDS-Sample-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert.

#### 3.2.4.10 *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde das *NuPAGE<sup>®</sup> Gel System* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Die Proteingemische wurden mit 4x *LDS-Sample-Buffer* (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt, auf ein Gesamtvolumen von 10-20 µl gebracht und 10 Minuten bei 70°C erhitzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 10 % *NuPAGE<sup>®</sup>-Bis-Tris-Gel* mit 1x MOPS-Laufpuffer oder 1x MES-Laufpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) bei 25-35 mA je Gel.

#### 3.2.4.11 *Coomassie-Färbung*

Die Coomassie-Färbung zur Sichtbarmachung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989).

#### 3.2.4.12 *Western Blot-Transfer*

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (3.2.4.10) wurden per Elektroblot (KLUTH, 2004) in einer *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, München) auf eine *ECL-Nitrocellulose-Membran* (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert.

Der Transfer Coomassie-gefärbter Proteine erfolgte auf eine *Roti<sup>®</sup>-PVDF-Membran* (Roth, Karlsruhe).

### 3.2.4.13 Western-Detektion

#### Verwendete Antikörper

##### **Primäre Antikörper**

- Monoclonal Anti-polyHistidine-Antikörper aus Maus (Sigma-Aldrich, München) 1:8.000
- Anti-GFP rabbit IgG (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) 1: 1.500
- Anti-AtZR1-Antikörper aus Kaninchen (diese Arbeit) 1:500
- Anti-Etched1-Antikörper aus Kaninchen #4209 (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004) 1:500
- Anti-HSP70B -Antikörper aus Kaninchen (SCHRODA *et al.*, 1999) 1:10.000
- Anti-Lhcl-CP29 Antikörper aus Maus (HUMBECK *et al.*, 2003) 1: 1.000
- Anti-PsbA-Antikörper aus Huhn (Agrisera, Vännäs, Schweden; zur Verfügung gestellt von der AG Krupinska, Universität Kiel) 1: 5.000
- Anti- MFP1- Antikörper aus Maus (JEONG *et al.*, 2003; zur Verfügung gestellt von der AG Krupinska, Universität Kiel) 1:2.000
- Anti-PsbE- Antikörper aus Maus (VALLON *et al.*, 1987; zur Verfügung gestellt von der AG Krupinska, Universität Kiel) 1:2.000
- Anti-Rubisco Gesamt- Antikörper aus Kaninchen (Schneider-Pötsch Universität Köln; zur Verfügung gestellt von der AG Krupinska, Universität Kiel ) 1:3.000
- Anti-LHCa3- & 4-Antikörper aus Kaninchen (Agrisera, Vännäs, Schweden; zur Verfügung gestellt von der AG Krupinska, Universität Kiel) 1:1.000

##### **Sekundäre Antikörper**

- Stabilized Goat-Anti-Rabbit HRP Konjugat (Pierce, Perbio Science, Bonn) 1:2.000
- Stabilized Goat-Anti-Mouse HRP Konjugat (Pierce, Perbio Science, Bonn) 1:2.000
- Anti-Chicken IgG HRP Konjugat (Sigma-Aldrich, München) 1:5.000

##### **Sonstige**

- *Strep*MAB-Classic HRP Konjugat (IBA BioTAGnologies, Göttingen) 1: 10.000

#### Western Blot Protocol der Firma Novagen (2001)

Zunächst wurde die Membran mit den aufgetrennten Proteinen 5 Minuten in 1x TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7,5 mM NaCl) äquilibriert.

Nach einstündiger Inkubation in *Blocking*-Lösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS) wurde die Membran zweimal 5 Minuten in 1x TBSTT (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween<sup>®</sup>20, 0,2 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X100) und einmal 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit dem entsprechenden Primär-

Antikörper inkubiert. Die Membran wurde wie oben beschrieben gewaschen und dann 1 Stunde mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert.

Anschließend wurde die Membran fünfmal 5 Minuten mit 1x TBSTT gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce, Perbio Science, Bonn). Zu diesem Zweck wurde die Membran 5 Minuten in einem Gemisch aus 500 µl Luminol, 500µl Peroxid-Puffer und 5-7 ml 1x TBSTT inkubiert, zwischen Folie gelegt und sofort mit *Hyperfilm™MP* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

#### *Strep-tag® detection in Western blots (IBA BioTAGnologies, 2006)*

Die Membran wurde zunächst eine Stunde in *Blocking-Reagenz* (3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween®20 in 1x PBS (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl)) inkubiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit PBST (1x PBS, 0,1 % (v/v) Tween®20) gewaschen.

Die Membran wurde 1 Stunde mit dem *StrepMAB-Classic HRP Konjugat* (1:10.000 in PBST) geschüttelt und dann zweimal 1 Minute mit PBST und zweimal 1 Minute in PBS gewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte wie in Western Protokoll 1) beschrieben, anstelle des TBSTT Puffers wurde jedoch 1x PBS verwendet.

Vor der erneuten Beprobung von Western-Membranen wurden gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen für je 5-10 Minuten in *Stripping-buffer* (1,5 % (w/v) Glycin, 0,1 % (v/v) SDS, 1 % (v/v) Tween®20, pH 2.2) denaturiert.

## 3.2.5 Yeast-Two-Hybridsystem

Für Yeast-Two-Hybrid-Experimente wurde der DUALmembrane Kit 1 der Firma DUALSystems (Zürich, Schweiz) verwendet.

### 3.2.5.1 Anzucht der Hefen

Für alle Experimente wurde der Hefestamm *DSY-1* verwendet, der auxotroph für die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin ist. Die Anzucht der Hefezellen in Flüssigkultur erfolgte generell bei 30°C und 200 rpm im Reagenzglas oder in einem Erlenmeyerkolben, dessen Volumen dem zehnfachen des Kulturvolumens entsprach. Wurden die Hefen in Vollmedium (YEPD) angezogen, so wurden sie über Nacht (16 Uhr bis 9 Uhr) inkubiert. In Mangelmedium (SD-Medium) betrug die Inkubationszeit 2 Tage. Zum Animpfen von 50 ml-Hefekulturen wurden in der Regel entweder 1 Kolonie (Ø 1,5 mm) oder 30 µl Flüssigkultur verwendet.

Zur Konservierung der Hefen wurden Gefrierstocks angelegt. Dazu wurden 100 µl einer frischen Hefekultur mit 1 ml 25 % Glycerol gemischt und bei -70°C eingefroren.

### 3.2.5.2 Klonierung der Vektoren

Die Herstellung der verschiedenen Konstrukte für das Yeast-Two-Hybridsystem erfolgte nach Herstellerangaben auf der Grundlage der *in vivo*-Rekombination in Hefe.

Die Klonierung der verschiedenen Vektoren ist in Kapitel A.3.3 des Anhangs näher beschrieben.

Für die homologe Rekombination wurden 100 ng linearisierter Vektor zusammen mit 500 ng des zu integrierenden PCR-Fragments (vgl. Tab. 2.3-4 und Tab. 2.3-5) in Hefezellen des Stamms *DSY-1* transformiert (3.2.5.3). Die rekombinanten Vektoren wurden wie unter 3.2.5.4 beschrieben isoliert. *Bait*-Vektoren wurden durch Co-Transformation mit den Kontroll-Plasmiden *pAlg5Nubl* und *pAlg5NubG* auf Expression und eine mögliche Autoaktivität hin untersucht.

### 3.2.5.3 Standard-Hefetransformation

Standardmäßig wurden Hefezellen nach einem modifizierten Protokoll von EBLE (1992) transformiert. Dazu wurden 1,5 ml einer frischen Hefekultur 10 Sekunden in einer Sigma-Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand bis auf etwa 100 µl abgossen. Nacheinander wurden 20 µg denaturierte Fischsperma-DNA, 1µg Plasmid-DNA, 500 µl PLATE mixture (40 % (w/v) PEG 4000, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) und 20 µl 1M DTT zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und 6 bis 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 10-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen kurz auf Eis gekühlt, abzentrifugiert, in 100 µl bis 200 µl 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.2.5.4 Plasmid-Isolation aus Hefe

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden Hefezellen in 2 ml Mangelmedium angezogen. Die Plasmid-DNA wurde nach dem *Yeast Boiling DNA Miniprep* Protokoll (ROBZYK und KASSIR, 1992, mit Modifikationen nach KLUTH, 2004) aus der Hefe isoliert, zur Amplifikation in *E.coli* re-transformiert und nach Standardmethoden aus den Bakterienzellen isoliert.

### 3.2.5.5 Synthese einer cDNA-Bank

Die Synthese einer cDNA-Bank aus Maisblättern der Linie A188 erfolgte mit dem *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (BD Biosciences Clontech, Freiburg).

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass die resultierenden cDNAs Überhänge von etwa 30 Nukleotiden zur homologen Rekombination in den *Prey*-Vektor *pDL2Nx* enthielten.

Für die Erststrangsynthese wurden 2 Ansätze pipettiert, mit je:

- 1 µg Gesamt-RNA aus A188 Mais-Blatt
- 1 µl SMART iv Oligonucleotide-Primer (aus dem Kit)
- 1 µl CDS III/3'Primer (aus dem Kit)
- H<sub>2</sub>O ad 5 µl → 2 min 72°C
- 2 µl 5x First strand Buffer
- 1 µl 20 mM DTT
- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl Powerscript Reverse Transcriptase

10 µl Gesamtvolumen → 1 h 42°C

Für jeden Ansatz aus der Erststrangsynthese wurden 2 Ansätze für die cDNA-Amplifikation angesetzt.

Für die cDNA-Amplifikation wurden 4 Ansätze pipettiert, mit je:

- 2 µl Erststrang cDNA
- 80 µl H<sub>2</sub>O
- 10 µl 10x Advantage 2 PCR Buffer
- 2 µl 50x dNTP Mix
- 2 µl 5' amplification primer (nicht im Kit enthalten)
- 2 µl 3' amplification primer (nicht im Kit enthalten)
- 2 µl Advantage 2 Polymerase Mix

100 µl Gesamtvolumen

PCR-Programm:

95°C 1 min	} 20 Zyklen
95°C 15 sek	
68°C 6 min	

Anschließend wurden die 4 PCR-Ansätze vereinigt. Um kleine DNA-Fragmente unter 200 bp abzutrennen, wurde die cDNA über *SizeSep400 Spun Columns* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zum Äquilibrieren der Säulen wurde STE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) verwendet.

Die gesamte cDNA-Bank wurde für die homologe Rekombination mit dem *prey*-Vektor pDL2Nx eingesetzt.

### 3.2.5.6 Hefetransformation (library scale)

Die Hefetransformation zur homologen Rekombination wurde nach dem *Step-by-Step Protocol for library transformation* aus dem Handbuch des DUALmembrane Kit 2 der Firma DUALSystems (Zürich, Schweiz) durchgeführt.

#### Herstellung Kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden mit dem *pTMBV ZmET1*-Vektor transformierte *DSY-1*-Zellen in 10 ml SD-Medium ohne Leucin für 8 Stunden bei 30°C angezogen. Die gesamte Kultur wurde zum Animpfen einer 100 ml SD -leu –Übernachtskultur eingesetzt. Am nächsten morgen wurden aus dieser Kultur 200 ml 2x YPAD-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,15 angeimpft. Die Kultur wurde 3-4 Stunden bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen, zu 50 ml in Falcons aliquotiert und pelletiert (5 min, 700xg, RT). Jedes Zellpellet wurde in je 30 ml sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert, wie oben beschrieben pelletiert und in 1 ml 1,1x LiAc/TE (110 mM Lithiumacetat, 11 mM Tris-HCl pH 7.5, 1,1 mM EDTA) resuspendiert. Die Hefezellen wurden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, erneut pelletiert, in 600 µl 1,1x LiAc/TE aufgenommen und sofort für die Transformation eingesetzt.

#### Transformation

In 4 Falcons wurden je 200 µg denaturierte Lachssperma-DNA, 5 µg *SfiI*-geschnittener pDL2Nx-Vektor und 100 µl cDNA (3.2.5.5) gegeben. Nach der Zugabe von je 600µl kompetenten Hefezellen wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, dann wurden 2,5 ml LiAc-PEG-Mix (0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 40 % (w/v) PEG 4000) zugegeben und erneut gemischt. Der Ansatz wurde 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von 160 µl DMSO folgte eine 20-minütige Inkubation bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 700xg, RT), in 3 ml 2x YPAD aufgenommen und 90 Minuten bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in 1,5 ml 0,9 % (w/v) NaCl aufgenommen, die 4 Ansätze wurden vereinigt und auf Selektionsmedium (SD -leu/-trp/-his) ausplattiert (je 300 µl Zellen auf 20 15mm-Platten). Von den restlichen Zellen wurden je 100 µl einer 1:100-, 1:1000- und 1:10.000-Verdünnung auf SD -leu/-trp -Platten ausplattiert, um später die Transformationseffizienz bestimmen zu können. Alle Platten wurden 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.2.5.7 Filterlift-Assay zur Detektion der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Der Filterlift-Assay wurde dazu verwendet, die *Bait*-Konstrukte auf Autoaktivierung zu testen und positive Klone bei der Durchmusterung der cDNA-Bank zu identifizieren.

Die zu testenden Hefekolonien wurden auf SD -leu/-trp/-his -Platten ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. 3 mm starkes Whatman-Papier wurde zurechtgeschnitten und 10 Minuten auf die Platte mit den Hefen gelegt, bis das Papier von der Flüssigkeit des Mediums vollständig durchfeuchtet war. Dann wurde es vorsichtig abgezogen, 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und 3 Minuten aufgetaut. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Whatman-Papier mit einem X-Gal-Mix (0,5 mg X-Gal, 0,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,5 % (w/v) Agarose in 1x PBS) überschichtet.

Bis zur Blaufärbung der Zellen wurde das Whatman-Papier bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.2.5.8 X-Gal-Assay im 96-Well Format

Positive Klone aus dem Filterlift-Assay wurden einem zweiten *X-Gal*-Test im 96-well Format unterzogen. Dazu wurde je 1 Hefekolonie in 200  $\mu$ l Z-Puffer+SDS/ $\beta$ -ME/X-Gal (60mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,0017 % SDS, 3 mM  $\beta$ -ME, 1mg/ml X-Gal) resuspendiert und mit 8  $\mu$ l Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde bis zur Blaufärbung der Hefen inkubiert.

## 3.2.6 Transiente Transformation von Pflanzen

Durch die transiente Transformation verschiedener Gewebe mit GFP- und DsRED-Reporter-Gen-Konstrukten sollte die subzelluläre Lokalisation von Proteinen aufgeklärt werden.

### 3.2.6.1 Fällung von DNA auf Goldpartikel

100 mg Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,3 – 3  $\mu$ m (Heraeus, Karlsruhe) wurden gründlich in 2 ml EtOH resuspendiert und 10 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet noch zweimal mit EtOH gewaschen. Anschließend wurde das Gold zweimal mit je 2 ml Aqua bidest. gewaschen. Das Gold wurde erneut in 2 ml Aqua bidest. resuspendiert, 1 Minute im Ultraschallbad (Sonorex Super DK 102, Bandelin electronic, Berlin) vereinzelt und schließlich zu 50  $\mu$ l mit je 2,5 mg Gold aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die biolistische Transformation wurden 500 ng Plasmid-DNA je Schuss eingesetzt. Für 6 Schuss wurden demnach 3  $\mu$ g Plasmid-DNA zu 25  $\mu$ l (~1,2 mg) Gold in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 1 Minute auf einem Vortex gemischt. Zur Fällung der DNA auf

das Gold wurden 25 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 10 µl 0,1 M Spermidin im Deckel des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach dem Schließen des Deckels wurde der Ansatz sofort 2 Minuten gemischt (Vortex). Anschließend wurde 10 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Goldpartikel in 125 µl EtOH resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Goldpartikel wurden in 65 µl EtOH aufgenommen und wie zuvor gründlich gemischt. Zur vollständigen Resuspension wurde der Ansatz kurz (1-2 Sek.) ins Ultraschallbad getaucht. Je 10 µl des Fällungsansatzes wurden auf einen Macrocarrier pipettiert.

### 3.2.6.2 Biolistische Transformation

Epidermiszellen von Tabak (*Nicotiana tabacum*), Küchenzwiebel (*Allium cepa*) und Frühlingszwiebel (*Allium fistulosum*) wurden durch den Beschuss mit einer Partikelkanone PDS 1000/HE der Firma Bio-Rad Laboratories (München) transient transformiert.

Zur Transformation von *Allium fistulosum* bzw. *Allium cepa* wurden die Zwiebeln geviertelt und die innersten Schichten entfernt, sodass die zu beschießende Fläche etwa 1 x 2 cm betrug. Um ihre Position beim Beschuss zu fixieren, wurden die Zwiebelstücke mit der Innenseite nach oben in 0,5 % Wasseragar gedrückt.

Tabakblätter wurden in 2x2 cm große Stücke geschnitten und mit der Unterseite nach oben auf 0,5 % Wasseragar gelegt.

Je Schuss wurden 10 µl eines Fällungsansatzes (3.2.6.1) auf einen Macrocarrier pipettiert, der in einer Halterung in der zweiten Schiene der Partikelkanone platziert wurde. Die Zwiebelstücke oder Tabakblätter wurden in der fünften Schiene von oben mit einem Druck von 1.100 psi und einem Vakuum von 28 inch Hg transformiert. Die Zwiebeln wurden anschließend mit der beschossenen Seite nach unten in eine Plastikschiene mit feuchtem Saugpapier und Deckel gelegt, Tabakblätter wurden auf dem Wasseragar belassen.

Alle Präparate wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend am Mikroskop untersucht (3.2.9).



### 3.2.7 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels *Agrobakterien*.

#### 3.2.7.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur stabilen Transformation von *Arabidopsis* wurden *Agrobakterien* vom Stamm *GV3101* verwendet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine einzelne Bakterienkolonie über Nacht bei 20°C und 150 rpm in 2 ml YEP-Medium angezogen. Mit der Kultur wurden 50 ml YEP-Medium angeimpft und 3-5 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 angezogen. Die Bakterien wurden pelletiert (5 min, 5000 rpm, 4°C), in 10 ml 150 mM NaCl resuspendiert, erneut pelletiert und in 1 ml eiskaltem 20 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Die Zellen wurden zu 200 µl aliquotiert und entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die *Agrobakterien* mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 Minute in flüssigen Stickstoff getaucht und im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEP-Medium wurde der Ansatz 3 Stunden bei 28°C und 150 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert, in 100 µl YEP resuspendiert, auf YEP<sup>Gent30/kan50/spec100</sup> ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

#### 3.2.7.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte in Anlehnung an die *floral dip*-Methode (CLOUGH UND BENT, 1998).

Zu transformierende *Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen (3.2). Um möglichst viele Blüentriebe zu erhalten wurden die Primärfloreszenzen entfernt. Triebe mit einer Höhe von 3-8 cm und wenigen offenen Blüten eigneten sich besonders gut für die Transformation. Am Tag vor der Transformation wurden die Pflanzen gut gewässert.

Für die Transformation wurden frisch transformierte *Agrobakterien* vom Stamm *GV3101* für 24 Stunden bei 28°C in 20 ml YEP-Medium gent<sup>30</sup>/kan<sup>50</sup>/spec<sup>100</sup> angezogen. Nach Zugabe von 0,6 g Sucrose und 10 µl Silwet L-77 wurde die *Agrobakterien*-Suspension mit einer Pipette großzügig auf die *Arabidopsis*-Blüten gegeben. Kleine Blüten im Zentrum der Rosette wurden ebenfalls benetzt. Nach der Transformation wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen für 24 Stunden unter Plastik im Dunkeln gehalten und anschließend Standardbedingungen (3.2) ausgesetzt. Nach etwa 5-6 Tagen wurde die Transformation wiederholt.

Pro Experiment wurden etwa 40-50 Pflanzen transformiert.

Zur Selektion transgener Pflanzen wurde die F<sub>1</sub>-Generation auf Erde ausgesät und nach 1-2 Wochen 2-3mal mit BASTA® (250 mg PPT/0,1 % Tween 20) besprüht.

### 3.2.8 GUS-Färbung

Zur Detektion der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde das zu untersuchende Gewebe vollständig mit X-Gluc<sup>5</sup>-Färbepuffer überschichtet, 2 min einem Vakuum (28 inch Hg) ausgesetzt und anschließend für 6 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen des Chlorophylls wurde das Gewebe bis zur vollständigen Entfärbung in Ethanol:Eisessig (3:1) inkubiert. Dieser Prozess konnte durch Erwärmen der Probe auf 56°C beschleunigt werden.

Die Blaufärbung der Gewebe wurde entweder mikroskopisch (in Samen, jungen Keimlingen und Blüten) oder durch Einscannen dokumentiert.

### 3.2.9 Mikroskopische Techniken

#### Standardmäßig verwendete Mikroskope

1. Lichtmikroskop Modell Axioskop, ausgestattet mit den Fluoreszenzfiltersätzen 01 (Anregung BP 365/12 nm, Emission: LP 397 nm), 09 (Anregung BP 450-490 nm, Emission: LP 520 nm) und 15 (Anregung BP 546/12 nm, Emission: LP 590 nm), einer AxioCamMRC5 CCD-Kamera und der zugehörigen Software AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).
2. Inversmikroskop Axiovert 200, ausgestattet mit den Fluoreszenzfiltersätzen 01, 09, 15 und 38 (Anregung BP 470/40 nm, Emission: BP 525/50 nm) der Firma Zeiss, einer Nikon DS-5M CCD-Kamera und der zugehörigen Software Eclipsenet (Nikon, Tokyo, Japan).
3. Stereobinokular (Leica MZ FL III, Leica, Solms), ausgerüstet mit adäquater Beleuchtung und einer handelsüblichen Digitalkamera.

#### Lichtmikroskopische Aufnahmen

*Arabidopsis*-Keimlinge und -Pflanzen wurden am Stereobinokular aufgenommen. Alternativ wurden die Pflanzen zur Dokumentation mit einer Auflösung von 1200 dpi eingescannt (CanoScan 8800F, Canon, Krefeld).

Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Arabidopsis*-Blättern wurden mit den oben beschriebenen Mikroskopen angefertigt.

Die Präparate wurden in der Regel in Wasser mikroskopiert. Reife *Arabidopsis*-Samen wurden im Dunkelfeld aufgenommen.

Zur Analyse von *Arabidopsis*-Embryonen in unreifen Samen wurden diese auf einem Objektträger in *Hoyer's* Medium (50 g Chloralhydrat, 2,5 ml Glycerin, 3,75g Gum arabicum,

---

<sup>5</sup> X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure) wird in Gegenwart des Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase zu einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) umgesetzt.

15 ml H<sub>2</sub>O) geklärt. Je nach Alter der Samen dauert dieser Prozess zwischen wenigen Minuten (in jungen Samen) und mehreren Stunden. Die Samen wurden anschließend am Axioskop im Dicromat-Filter mikroskopiert. GUS-gefärbte *Arabidopsis*-Samen wurden vor der mikroskopischen Analyse ebenfalls geklärt. Durch das *Gum arabicum* im Hoyer's Medium bleiben die Präparate über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen bis Monate) konserviert.

#### Detektion von GFP- und DsRED-Fluoreszenz

Für die mikroskopische Untersuchung der GFP- und DsRED-Fluoreszenz in transformierten Frühlings- und Küchenzwiebelzellen wurde die innere Epidermis vorsichtig abgezogen und mit der Cuticula nach unten mit etwas Wasser zwischen Objektträger und Deckglas platziert. Die Auswertung erfolgte mit dem Axioskop. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 W (Osram) verwendet. Die Visualisierung der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit dem Filtersatz 09, die DsRED-Fluoreszenz wurde im Filtersatz 15 detektiert (s.o.).

Transient transformierte Tabakblätter wurden von größeren Blattadern befreit und mit der Unterseite nach oben mit etwas Wasser zwischen Objektträger und Deckglas platziert. Die GFP- bzw. DsRED-Fluoreszenz wurde am Axiovert nach Anregung der Fluoreszenz mit einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 W in den Filtersätzen 09 und 38 (GFP) bzw. 15 (DsRED) visualisiert.

Die GFP-Expression in den Blättern stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen wurde ebenfalls mit dem Axiovert wie oben beschrieben analysiert.

#### Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop CLSM710

Die subzelluläre Lokalisation von GFP- und DsRED-Fusionsproteinen in transient transformierten Tabakblättern und Frühlingszwiebeln sowie in stabil transformierten Mais- und *Arabidopsis*-Pflanzen wurde außerdem mit dem Konfokalmikroskop CLSM710 (Zeiss) analysiert. Alle Proben wurden wie für die Lichtmikroskopie vorbereitet und in Wasser mikroskopiert.

Für die Analyse sich entwickelnder *Arabidopsis*-Embryonen wurden frische Samen über Nacht mit Hoyer's Medium geklärt und ebenfalls mit dem CLSM710 mikroskopiert.

Die Aufnahme der Bilder, sowie die Auswertung der Daten und die 3-D-Rekonstruktion aus Z-Stapel-Aufnahmen erfolgte mit der ZEN 2007 LE Imaging software (Zeiss) unter Anleitung eines Zeiss-Mitarbeiters.

#### Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Rasterelektronische Aufnahmen von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter Anleitung von Frau Dehn (Abteilung für Systematik, Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg) am Rasterelektronenmikroskop XL20 (Philips, Hamburg) aufgenommen. Die Vorbereitung der

Proben erfolgte nach dem *Critical-Point*-Verfahren (GERSTENBERGER *et al.*, 1978). Dazu wurde frisches Gewebe sofort nach der Ernte chemisch fixiert, entwässert und in der Trocknungsanlage (CPD 030, BAL-TEC, Witten) getrocknet. Die getrockneten Proben wurden auf Probenhaltern platziert, vakuumbedampft (Bedampfungsanlage SCD 050, BAL-TEC, Witten) und anschließend mikroskopiert.

#### Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Arabidopsis*-Chloroplasten wurden in der Abteilung für Zellbiologie (Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg) erstellt.

## 3.3 Klonierungen

Im folgenden Kapitel werden die Klonierungsschritte der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren erläutert. Ergänzend ist eine vollständige Liste und Beschreibung aller in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Klone in Anhang 2 aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Anhang 1 beschrieben.

### 3.3.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Subklonierung von PCR-Fragmenten wurden die Vektoren *pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup>* nach Amplifikation mittels Taq-Polymerase bzw. Advantage2-Polymerase oder *pCR<sup>®</sup> BluntII TOPO<sup>®</sup>* bzw. *pCR<sup>®</sup> 4Blunt-TOPO<sup>®</sup>* nach Amplifikation mittels Pfu-Polymerase verwendet. Die Klonierung der für diese Arbeit relevanten PCR-Fragmente und die daraus resultierenden TOPO-Klone sind in Tabelle A 3-1 aufgeführt. Alternativ wurden PCR-Fragmente direkt mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten und für die Ligation mit dem entsprechenden Ziel-Vektor eingesetzt.

#### 3.3.1.1 Klonierung des *AtZR1*-Promotors

Da die Klonierung des *AtZR1*-Promotors in den *TOPO*-Vektor erfolglos blieb, wurde das 1,5 kb große Promotor-Fragment nach der Amplifikation aus *Arabidopsis* gDNA (Primer JK46/JK47) mit *Bam*HI und *Sall* verdaut und in einen *Bam*HI/*Sall*-geschnittenen *pBluescriptSK*-Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde *pBS AtZR1-P* genannt.

**Tab. 3.3-1: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte TOPO-Klone.**

Zielvektoren und *template*-Vektoren sind in Anhang A2 beschrieben, Primer-Sequenzen in Anhang A1. Die angegebenen Fragmentgrößen wurden gerundet. BD\*= DNA-Bindedomäne des PEND-Proteins nach SATO *et al.* (2005). A.t. gDNA: gDNA aus *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0. ORFs wurden, falls nicht anders angegeben, ohne Stop-Codon amplifiziert.

Name des Konstrukt	Ziel-Vektor	Amplifikat	Fragmentgröße	Primer		template
				for	rev	
TOPO_AtZR2-LP	pCR®2.1	AtZR2 T-DNA flankierender Bereich	350 bp	JK3	JK17	A.t. gDNA
TOPO_AtZR3-LP	pCR®2.1	AtZR3 T-DNA (LP) flankierender Bereich	650 bp	JK5	JK17	A.t. gDNA
TOPO_AtZR3-RP	pCR®2.1	AtZR3 T-DNA (RP) flankierender Bereich	550 bp	JK6	JK17	A.t. gDNA
TOPO_PGRL1-RP	pCR®2.1	A.t. PGRL1 T-DNA flankierender Bereich	450 bp	JK8	JK18	A.t. gDNA
TOPO_HSP70-2-RP	pCR®2.1	A.t. cpHSP70-2 T-DNA flankierender Bereich	700 bp	JK12	JK17	A.t. gDNA
TOPO_HSP70-1-RP	pCR®2.1	A.t. cpHSP70-1 T-DNA flankierender Bereich	650 bp	JK10	JK17	A.t. gDNA
TOPO_ZmET1ms	pCR® 4Blunt	ZmET1 ORF mit Stop	500 bp	JK54	JK55	ZmET1GFPII
TOPO_gfp	pCR® 4Blunt	GFP ORF mit Stop	900 bp	JK59	JK60	pUbi:GFP
TOPO_nos	pCR® 4Blunt	nos-Terminator	300 bp	JK52	JK53	pUbi:LUC
TOPO_AtZR2-P	pCR®2.1	AtZR2-Promotor	2000 bp	JK48	JK49	A.t. gDNA
TOPO_AtZR3-P	pCR®2.1	AtZR3-Promotor	2100 bp	JK50	JK51	A.t. gDNA
TOPO_4-10-P	pCR®2.1	PGRL1-Promotor	1850 bp	JK72	JK73	A.t. gDNA
TOPO_4-2	pCR®2.1	Klon 4-2 ORF	220 bp	JK38	JK39	pDL2 4-2
TOPO_2-3 cDNA	pCR®2.1	At4g05180 ORF	700 bp	JK34	JK35	A.t. cDNA
TOPO_2-3 gDNA	pCR®2.1	At4g05180 gDNA	1420 bp	JK34	JK35	A.t. gDNA
TOPO_2-3 cDNA	pCR®2.1	At4g05180 ORF	700 bp	JK34	JK35	A.t. cDNA
TOPO_2-3 gDNA	pCR®2.1	At4g05180 gDNA	1420 bp	JK34	JK35	A.t. gDNA
TOPO_4-10 cDNA	pCR®2.1	A.t. PGRL1 ORF	980 bp	JK40	JK41	A.t. cDNA
TOPO_4-10 gDNA	pCR®2.1	A.t. PGRL1 gDNA	2200 bp	JK40	JK41	A.t. gDNA
TOPO_2-15	pCR®2.1	Klon 2-15 ORF	430 bp	JK36	JK37	pDL2 2-15
TOPO_4-13	pCR®2.1	Klon 4-13 ORF	160 bp	JK42	JK43	pDL2 4-13
TOPO_7-8	pCR®2.1	Klon 7-8 ORF	300 bp	JK44	JK45	pDL2 7-8
TOPO_PEND	pCR®2.1	A.t. PEND DNA-BD*	265 bp	JK24	JK25	A.t. cDNA
TOPO_rpoA	pCR®2.1	A.t. rpoA ORF	990 bp	JK28	JK29	A.t. cDNA
TOPO_rpoC1	pCR®2.1	A.t. rpoC1 ORF	2050 bp	JK26	JK27	A.t. cDNA
TOPO_AtZR1	pCR® BluntII	AtZR1 ORF ohne Signal	370 bp	JK104	JK105	A.t. cDNA
TOPO_AtZR2	pCR® BluntII	AtZR2 ORF ohne Signal	460 bp	JK102	JK103	A.t. cDNA
TOPO_Hsp70-1-UTR	pCR® BluntII	A.t. cpHSP70-1 cDNA	2270 bp	JK108	JK109	A.t. cDNA

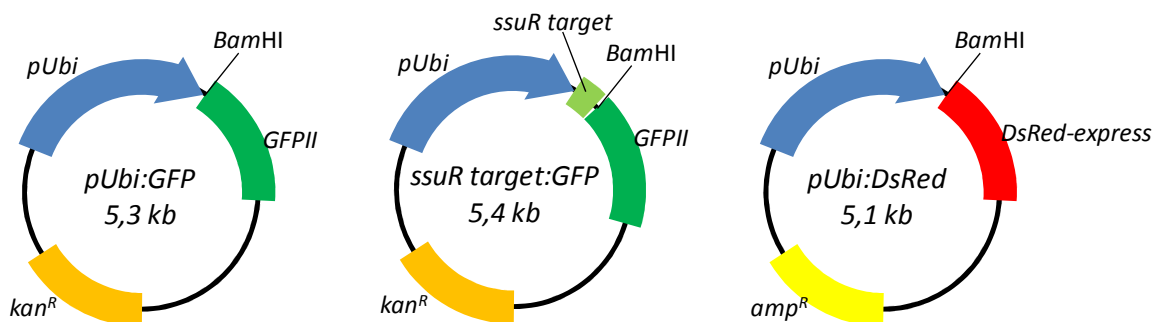
Fortsetzung von Tab. 3.3-2: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *TOPO*-Klone.

<i>TOPO_Hsp70-2 UTR</i>	<i>pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>A.t. cpHSP70-2 cDNA</i>	2250 bp	JK113	JK114	<i>A.t. cDNA</i>
<i>TOPO_Hsp70-1 pET</i>	<i>pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>A.t. cpHSP70-1 ORF ohne Signal</i>	1920 bp	JK98	JK99	<i>A.t. cDNA</i>
<i>TOPO_Hsp70-2 pET</i>	<i>pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>A.t. cpHSP70-2 ORF ohne Signal</i>	1930 bp	JK100	JK101	<i>A.t. cDNA</i>

### 3.3.2 Klonierung von GFP- und DsRed-Konstrukten

Für die Subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurden Fluoreszenz-Reporter-Gen-Konstrukte hergestellt. Die Zielvektoren *pUbi:GFP* bzw. *pUbi:DsRed* enthalten vor der Reporter-Gen-Sequenz eine *Bam*HI-Schnittstelle (Abb. 3-1), über welche sie linearisiert wurden. Die ORFs der zu untersuchenden Gene wurden exklusive des Stop-Codons entweder mittels PCR amplifiziert und restringiert (Tab. 3.3-4) oder aus den entsprechenden *TOPO*-Klonen herausgeschnitten und anschließend mit den Zielvektoren ligiert (Tab. 3.3.-3).

Die ORFs der plastiden-codierten Gene *rpoA* und *rpoC1* wurden mit der *target*-Sequenz der kleinen Untereinheit der Rubisco (*RBCS*) fusioniert, da sie selbst kein Plastiden-Transitpeptid enthalten. Dazu wurden die ORFs exklusive des Stop-Codons mit *Bam*HI aus den *TOPO*-Klonen *TOPO\_rpoA* bzw. *TOPO\_rpoC1* (Tab. 3.3-1) isoliert und in den mit *Bam*HI linearisierten Vektor *ssuR target::GFP* ligiert.



**Abb. 3.3-1: Ziel-Vektoren für die Klonierung von Fluoreszenz-Reporter-Gen-Konstrukten.**

Für die Fusion der Zielgene mit den Reporter-Genen *GFPII* bzw. *DsRed-express* wurden diese über die *Bam*HI-Schnittstelle in die abgebildeten Vektoren ligiert. *pUbi*: Ubiquitin-Promotor. *kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-Resistenz, *amp<sup>R</sup>*: Ampicillin-Resistenz, *ssuR target*: Signalpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco zur Translokation von Proteinen in die Chloroplasten. Vektorelemente sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Die Tabellen 3.3-2 und 3.3-3 geben einen Überblick über die klonierten Fluoreszenz-Reporter-Gen-Konstrukte.

**Tab. 3.3-3: Klonierung von Fluoreszenz-Reportergergen-Konstrukten mittels Restriktionsverdau.**

Die gewünschten Fragmente wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen aus dem jeweiligen Ursprungsvektor isoliert und in den mit *Bam*HI linearisierten Zielvektor ligiert.

Name des Konstrukts	Ziel-Vektor	Insert	Restriktion	Ursprungs-Vektor
<i>AtZR1::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>AtZR1 gDNA</i>	<i>Bam</i> HI	<i>AtZR1::GFPII</i>
<i>AtZR2::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>AtZR2 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>AtZR2::GFPII</i>
<i>PEND::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>PEND DNA-BD</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO-PEND</i>
<i>PEND::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>PEND DNA-BD</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO-PEND</i>
<i>rpoA::gfp</i>	<i>ssuR Target::GFP</i>	<i>rpoA ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_rpoA</i>
<i>rpoC1::gfp</i>	<i>ssuR Target::GFP</i>	<i>rpoC1 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_rpoC1</i>
<i>Klon 2-3::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>PsbQ-2 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_2-3 cDNA</i>
<i>Klon 2-3::gfp gDNA</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>PsbQ-2 gDNA</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_2-3 gDNA</i>
<i>Klon 2-15::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>Klon 2-15 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_2-15</i>
<i>Klon 4-2::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>Klon 4-2 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_4-2</i>
<i>Klon 4-10::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>PGRL1 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_4-10 cDNA</i>
<i>Klon 4-10::gfp gDNA</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>PGRL1 gDNA</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_4-10 gDNA</i>
<i>Klon 4-13::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>Klon 4-13 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_4-13</i>
<i>Klon 7-8::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>Klon 7-8 ORF</i>	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO_7-8</i>

**Tab. 3.3-4: Klonierung von Fluoreszenz-Reportergergen-Konstrukten mittels PCR.**

Die gewünschten Fragmente wurden mit den angegebenen Primern amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den mit *Bam*HI linearisierten Zielvektor ligiert. ORFs wurden ohne Stop-Codon kloniert.

Name	Ziel-Vektor	Amplifikat	Primer 5'/3'	Fragmentgröße	Restriktion	Template
<i>ZmZR3::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>ZmZR3 ORF</i>	<i>JK22/JK23</i>	600 bp	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO ZmZR3</i>
<i>ZmZR3::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>ZmZR3 ORF</i>	<i>JK22/JK23</i>	600 bp	<i>Bam</i> HI	<i>TOPO ZmZR3</i>
<i>AtZR3::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>AtZR3 ORF</i>	<i>JK20/JK21</i>	580 bp	<i>Bcl</i> I	<i>A.t. cDNA</i>
<i>Hsp70-1::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>cpHsp70-1 ORF</i>	<i>JK30/JK31</i>	2150 bp	<i>Bcl</i> I	<i>TOPO- Hsp70-1 UTR</i>
<i>Hsp70-2::DsRed</i>	<i>pUbi:DsRed</i>	<i>cpHSP70-2 ORF</i>	<i>JK32/JK33</i>	2150 bp	<i>Bcl</i> I	<i>TOPO -Hsp70-2 UTR</i>
<i>Hsp70-2::gfp</i>	<i>pUbi:GFP</i>	<i>cpHSP70-2 ORF</i>	<i>JK32/JK33</i>	2150 bp	<i>Bcl</i> I	<i>TOPO- Hsp70-2 UTR</i>

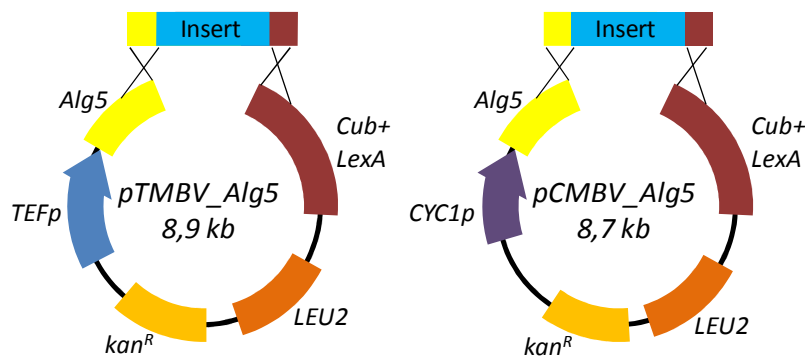
### 3.3.3 Klonierung der Vektoren für das Hefe-2-Hybrid-System

In der vorliegenden Arbeit wurden Hefe-2-Hybrid-Experimente auf der Basis des *DUALmembrane Kit* der Firma DUAL Systems (Zürich, Schweiz) durchgeführt.

Für die Klonierung der *Bait*-Konstrukte wurden die Vektoren *pTMBV* (starker Promotor) und *pCMBV* (schwacher Promotor) verwendet und die Klonierung der *Prey*-Konstrukte erfolgte mittels der Vektoren *pDL2xN* und *pDL2Nx*.

#### 3.3.3.1 Klonierung von *pTMBV\_Alq5* und *pCMBV\_Alq5*

Da das DUAL-System die Integration des *Bait*-Proteins in die Cytoplasma- oder ER-Membran der Hefe voraussetzt, wurden die *Bait*-Vektoren zunächst durch die Insertion des *Alg5*-Gens<sup>6</sup> der Hefe modifiziert: Der *Alg5* ORF wurde mittels *NheI* (5') und *XbaI* (3') aus dem *TOPO\_Alq5\_2* (Tab. A 2-1) restringiert und jeweils in die mit *XbaI* linearisierten Vektoren *pTMBV* und *pCMBV* ligiert. Aus dieser Klonierung resultierten die Konstrukte *pTMBV\_Alq5* und *pCMBV\_Alq5* (Abb. 3-2).



**Abb. 3.3-2: Konstruktion der *Bait*-Vektoren mittels homologer *in vivo*-Rekombination.**

Die *Bait*-Vektoren *pTMBV\_Alq5* und *pCMBV\_Alq5* wurden mit *XbaI* und *NcoI* linearisiert. Das Insert wurde N-terminal mit dem *Alg5* ORF und C-terminal mit der *Cub*-Domäne fusioniert. *Alg5*: *Alg5*-Gen der Hefe codiert für ein membranständiges Protein des ER. *Cub*: C-terminale Domäne des Split-Ubiquitin. *LexA*: *LexA*-DNA-Bindedomäne und *VP16*-Aktivierungsdomäne zur Aktivierung der Reportergene im Zellkern. *LEU2*: Leucin-Synthase-Gen 2. *Kan<sup>R</sup>*: Kanamycin-Resistenz zur Selektion in *E.coli*. Vektorelemente sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

#### 3.3.3.2 Klonierung der *Bait*-Konstrukte

Die Klonierung der *Bait*-Konstrukte erfolgte mittels homologer *in vivo*-Rekombination. Dazu wurden die *Bait*-Vektoren *pTMBV\_Alq5* und *pCMBV\_Alq5* mit *XbaI* und *NcoI* linearisiert (Abb. 3.3-2). Die gewünschten Inserts wurden über PCR mit zu der Vektorsequenz homologen Überhängen versehen. Anschließend wurden Hefezellen mit einem Gemisch aus linearisiertem Vektor und PCR-Fragment transformiert und die rekombinierten Vektoren

<sup>6</sup> Das *Alg5*-Gen der Hefe codiert für ein Transmembranprotein des ER.



isoliert (vgl. Kapitel 3.2.5). Durch die Co-Transformation der *Bait*-Konstrukte mit der Positiv-Kontrolle *pAlg-NubI* und der Negativ-Kontrolle *pAlg5-NubG* wurde die Expression des *Bait*-Proteins bestätigt und eine mögliche Autoaktivität ausgeschlossen.

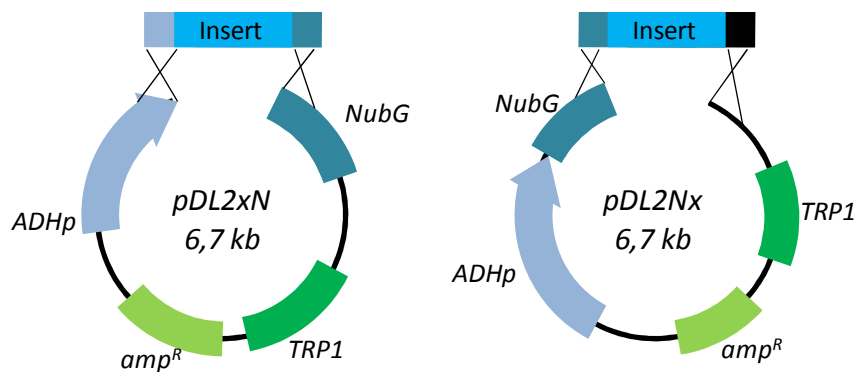
**Tab. 3.3-5: Konstruktion der *Bait*-Vektoren mittels homologer *in vivo* Rekombination.**

Inserts wurden durch PCR mit 60 nt-Überhängen versehen und für die homologe Rekombination zusammen mit den linearisierten *Bait*-Vektoren *pTMBV\_Alq5* bzw. *pCMBV\_Alq5* in die Hefezellen eingeschleust. ORF: Offener Leserahmen ohne Stop-Codon. Die Expression der *Bait*-Konstrukte ließ sich nicht für alle Vektoren bestätigen.

Name des Konstrukt	Ziel-Vektor	Insert	5' Primei	3' Primei	template	Expression bestätigt
<i>pCMBV_ZmET1</i>	<i>pCMBV_Alq5</i>	<i>ZmET1 ORF</i>	JK74	JK75	<i>ZmET1 GFPII</i>	ja
<i>pTMBV_ZmET1</i>	<i>pTMBV_Alq5</i>					ja
<i>pCMBV_ZmZR2</i>	<i>pCMBV_Alq5</i>	<i>ZmZR2 ORF</i>	JK78	JK79	<i>pUbi: ZmZR2:: GFP</i>	nein
<i>pTMBV_ZmZR2</i>	<i>pTMBV_Alq5</i>					ja
<i>pCMBV_rpoTP</i>	<i>pCMBV_Alq5</i>	<i>ZmRpoTp ORF ohne Signal</i>	JK76	JK77	<i>rpoTp (R.Stern)</i>	nein
<i>pTMBV_rpoTP</i>	<i>pTMBV_Alq5</i>					nein
<i>pCMBV_HSP70-1</i>	<i>pCMBV_Alq5</i>	<i>cpHSP70-1 ORF ohne Signal</i>	JK80	JK81	<i>TOPO_Hsp70-1 pET</i>	nein
<i>pTMBV_HSP70-1</i>	<i>pTMBV_Alq5</i>					nein
<i>pCMBV_HSP70-2</i>	<i>pCMBV_Alq5</i>	<i>cpHSP70-2 ORF ohne Signal</i>	JK82	JK83	<i>TOPO_Hsp70-2 pET</i>	nein
<i>pTMBV_HSP70-2</i>	<i>pTMBV_Alq5</i>					nein

### 3.3.3.3 Klonierung der Prey-Vektoren

Die Herstellung der *Prey*-Konstrukte erfolgte analog zur *Bait*-Konstruktion mittels homologer *in vivo*-Rekombination. Die *Prey*-Vektoren *pDL2Nx* und *pDL2xN* (Abb. 3.3-3) wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *SfiI* linearisiert und die gewünschten Inserts über PCR mit homologen Überhängen versehen (Tab. 3.3-6).



**Abb. 3.3-3: Konstruktion der *Prey*-Vektoren mittels homologer *in vivo* Rekombination.**

Die *Prey*-Vektoren *pDL2xN* und *pDL2Nx* wurden mit *SfiI* linearisiert. Inserts wurden C-terminal (xN) oder N-terminal (Nx) mit *NubG* fusioniert. *ADHp*: *ADH*-Promotor, *NubG*: modifizierte N-terminale Domäne des Split-Ubiquitin. *TRP1*: Tryptophan-Synthase-Gen. *amp<sup>R</sup>*: Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E.coli*. Vektorelemente wurden nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Nach der Co-Transformation der linearisierten Vektoren und den entsprechenden PCR-Fragmenten in die Hefezellen konnten die rekombinanten Vektoren isoliert werden (Tab. 3.3-5).

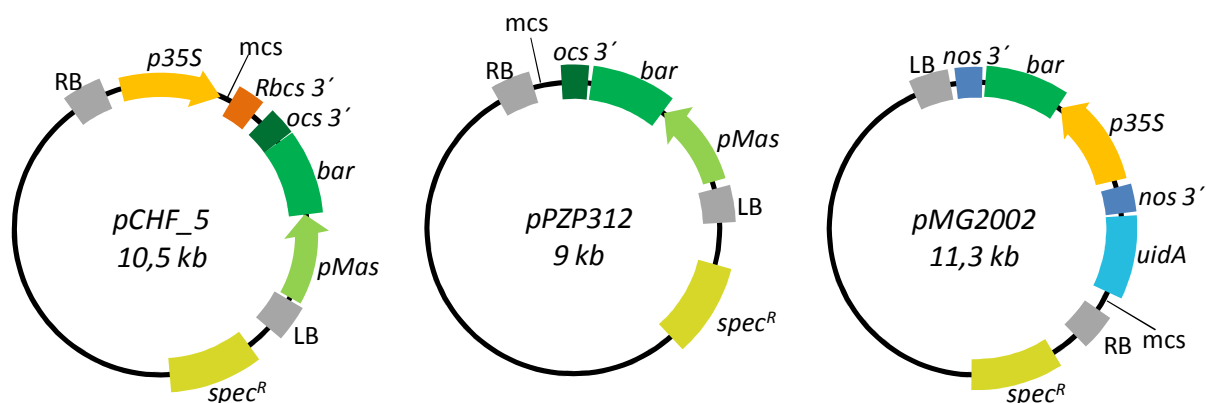
**Tab. 3.3-6: Konstruktion der *Prey*-Vektoren mittels homologer *in vivo* Rekombination.**

Für die homologe Rekombination wurden Inserts mit 60 nt-Überhängen generiert und zusammen mit den *Sfi*I-linearisierten Vektoren in die Hefezellen transformiert. Die cDNA-Synthese zur Herstellung der rekombinanten cDNA-Bank ist ausführlich im Methodenteil (3.2.5.5) beschrieben. a) Primer für die cDNA-Synthese b) Überhang-Primer zur Amplifikation der Bank. ORFs wurden ohne Stop-Codon amplifiziert.

Name des Konstrukti	Vektor	Insert	5'Primer	3'Primer	template
<i>pDL2_ZmET1</i>	<i>pDL2 xN</i>	ZmET1 ORF	JK84	JK85	ZmET1 GFP11
<i>pDL2_ZmZR2</i>	<i>pDL2 xN</i>	ZmZR2 ORF	JK88	JK89	<i>pUbi: ZmZR2:: GFP</i>
<i>pDL2_ORF_121</i>	<i>pDL2 xN</i>	ZmORF 121	JK90	JK91	Mais A188 cDNA
<i>pDL2_rpb6</i>	<i>pDL2 xN</i>	ZmRpb6 ORF	JK92	JK93	Mais A188 cDNA
cDNA Bank	<i>pDL2Nx</i>	Mais A188 cDNA	a) JK94 b) JK96	a) JK95 b) JK97	Mais A188 RNA

### 3.3.4 Klonierung binärer *Arabidopsis*-Expressionsvektoren

Für die Herstellung binärer *Arabidopsis*-Expressionsvektoren wurden die Vektoren *pCHF\_5*, *pPZP312* sowie *pMG2002* verwendet. Die Vektoren sind in Abb. 3.3-4 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.3-4: Binäre *Arabidopsis*-Expressionsvektoren.**

Während der durch Agrobakterien induzierten Transformation werden die Vektorbereiche zwischen *left border* und *right border* in das *Arabidopsis*-Genom integriert. LB: *left border*, RB: *right border*, *p35S*: CaMV 35S-Promotor, *pMas*: Mannopinsynthese-Promotor, *bar*: *bar*-Gen zur Vermittlung der Basta<sup>®</sup>-Resistenz, *uidA*:  $\beta$ -glucuronidase-Gen, *Rbcs3'*: *Pisum sativum Rbcs*-Terminator, *ocs3'*: Octopinsynthese-Terminator *nos3'*: Nopalinsynthese-Terminator, *spec<sup>R</sup>*: Spectinomycin-Resistenz, mcs: multiple cloning site. Vektorelemente wurden nicht maßstabsgetreu abgebildet.

### 3.3.4.1 Herstellung der Vektoren *pAtZR1:ZmET1* und *pAtZR1:ZmET1::GFP*

Die Plasmide *pAtZR1:ZmET1* und *pAtZR1:ZmET1::GFP* basieren auf dem binären Vektor *pPZP312* (Abb. A 3-4). Zunächst wurde der Vektor in der *multiple cloning site* mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *HindIII* geschnitten. Der *nos*-Terminator wurde ebenfalls mit *Sall* (5') und *HindIII*(3') aus dem *TOPO\_nos* (Tab. 3.3-1) isoliert und in den *pPZP312* ligiert. Anschließend wurde der Vektor mit *BamHI* und *Sall* linearisiert. Gleichzeitig wurde der *AtZR1*-Promotor mit *BamHI* und *Sall* aus dem Plasmid *pBS\_AtZr1-P* (3.3.1.1) geschnitten und mit dem *pPZP312\_nos*-Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt *pPZP312\_AtZR1-P:nos* wird in der Folge als *pAtZR1:nos* bezeichnet (Abb. 3-5) und dient als Basis für die Klonierung der Vektoren *pAtZR1:ZmET1* und *pAtZR1:ZmET1::GFP*.

Zur Herstellung des Konstrukts *pAtZR1:ZmET1* wurde der *ZmET1*-ORF inklusive des Stop-Codons mit *NcoI* aus dem *TOPO\_ZmET1ms* (Tab. 3.3-1) isoliert. Der Zielvektor *pAtZR1:nos* wurde über die *NcoI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *AtZR1*-Promotors (vgl. Abb. 3-5; Primer: JK47) linearisiert und mit dem *ZmET1*-ORF fusioniert. Das resultierende Konstrukt *pPZP312\_AtZR1-P:ZmEt1:nos* wird der Folge als *pAtZR1:ZmET1* bezeichnet.

Für die Klonierung von *pAtZR1:ZmET1::GFP* wurde der ORF des *GFP* inklusive des Stop-Codons mit *NcoI* und *Sall* aus dem *TOPO\_GFP* (Tab. 3.3-1) geschnitten und in den *NcoI/Sall*-geschnittenen *pAtZR1:nos* ligiert. Das resultierende Konstrukt *pAtZR1:GFP:nos* wurde anschließend mit *NcoI* linearisiert. Der *ZmET1*-ORF wurde exklusive des Stop-Codons mittels PCR amplifiziert (JK54/JK56; template: *ET1 GFPII*), mit *NcoI* verdaut und direkt für die Ligation mit dem linearisierten Vektor eingesetzt. Das resultierende Konstrukt *pPZP312\_AtZR1-P:ZmEt1::GFP:nos* wird in der Folge als *pAtZR1:ZmET1::GFP* bezeichnet.

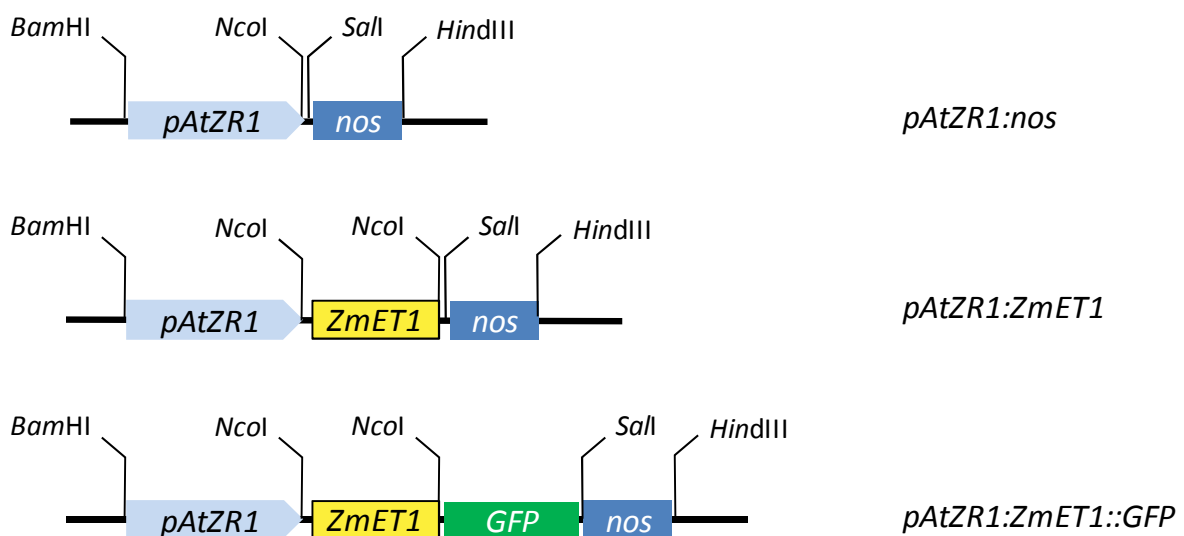


Abb. 3-5: Schematische Darstellung von *pAtZR1:nos*, *pAtZR1:ZmET1* und *pAtZR1:ZmET1::GFP*

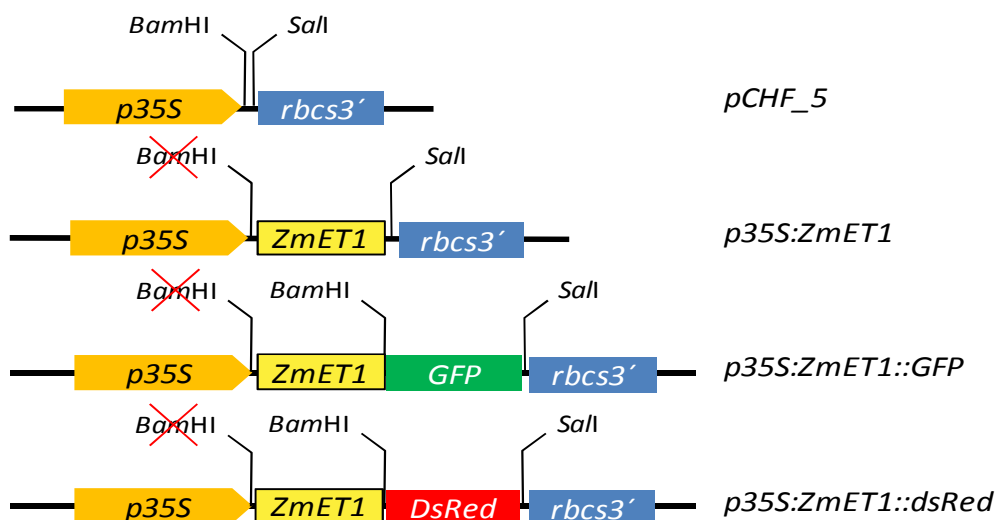
### 3.3.4.2 Herstellung der Vektoren *p35S:ZmET1*, *p35S:ZmET1::GFP* und *p35S:ZmET1::DsRed*

Die Vektoren *p35S:ZmET1*, *p35S:ZmET1::GFP* und *p35S:ZmET1::DsRed* basieren auf dem Vektor *pCHF\_5* (Abb. 3.3-4). Zunächst wurde der Vektor in der *multiple cloning site* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I geöffnet.

Der *ZmET1*-ORF wurde inklusive des Stop-Codons mit den Primern JK57/JK58 vom Vektor *ET1GFPII* amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Sal*I geschnitten und in den mit *Bam*HI/*Sal*I linearisierten *pCHF\_5*-Vektor ligiert. Dabei wurde die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors zerstört. Das resultierende Konstrukt *pCHF\_5\_ZmET1* wird in der Folge als *p35S:ZmET1* bezeichnet.

Das *p35S:ZmET1::GFP*-Konstrukt wurde prinzipiell auf die gleiche Weise kloniert, allerdings wurde der vollständige *ZmET1::GFP*-ORF mit den Primern JK57/JK60 vom *ZmET1 GFPII*-Vektor amplifiziert.

Für die Herstellung des *p35S:ZmET1::DsRed*-Vektors wurde der *GFP*-ORF durch Restriktion mit *Bam*HI und *Sal*I aus dem *ZmET1 GFPII*-Konstrukt entfernt und durch den *DsRed*-ORF ersetzt. Dieser wurde zuvor mit den Primern JK61/JK62 vom Plasmid *pDsRed2* (Tab. A 2-3) amplifiziert und mit *Bam*HI und *Sal*I restringiert.



**Abb. 3.3-6:** Schematische Darstellung von *pCHF\_5*, *p35S:ZmET1*, *p35S:ZmET1::GFP*, *p35S:ZmET1::DsRed*.

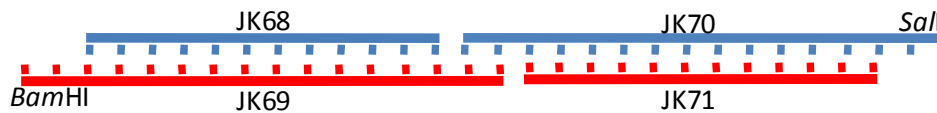
### 3.3.4.3 Klonierung von *p35S:AtZR2*

Der *AtZR2*-ORF wurde inklusive des Stop-Codons mit den Primern JK66/JK65 vom Plasmid *AtZR2GFPII* (Tab. A 2-3) amplifiziert, mit *Bam*HI und *Sal*I geschnitten und in den *Bam*HI/*Sal*I-linearisierten *pCHF\_5* ligiert.

### 3.3.4.4 Klonierung von *p35S:AtZR1strep*

Für die Klonierung des Vektors *p35S:AtZR1strep* wurde zunächst ein *Strep*-Tag, vergleichbar mit dem *Strep*-Tag des *One-STrEP*-Tag-Systems (IBA GmbH, Göttingen), generiert (Abb. 3.3-7), indem vier Primer (JK68, JK69, JK79, JK71) so miteinander ligiert wurden, dass am 5' Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3' Ende eine *Sal*I-Schnittstelle entstand über die das Ligationsprodukt in den mit *Bam*HI/*Sal*I linearisierten *pCHF\_5* ligiert werden konnte.

Das resultierende Konstrukt *pCHF\_5\_strep* wurde anschließend mit *Bam*HI linearisiert und mit der *AtZR1* gDNA ligiert. Das Insert wurde zuvor durch einen *Bam*HI-Verdau des Vektors *AtZR1 GFP*II gewonnen. Das resultierende Konstrukt *pCHF\_5\_AtZR1::strep* wird in der Folge *p35S:AtZR1strep* genannt.



**Abb. 3.3-7 Herstellung eines Strep-Tags durch Primer-Ligation.**

Zunächst wurden je 5 µl der Primer (100 µM) JK68 und JK69 bzw. JK70 und JK71 gemischt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und zur Anlagerung 30 Minuten bei RT inkubiert. Die JK68/69- und JK70/71-Primer-Dimere wurden vereinigt und 1 Stunde bei 16°C mit 1U T4-Ligase inkubiert. Das entstandene Ligationsprodukt besitzt am 5' Ende einen *Bam*HI-Überhang und am 3' Ende einen *Sal*I-Überhang zur Ligation in den *pCHF\_5*.

### 3.3.4.5 Klonierung der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte *pAtZR1:gus*, *pAtZR2:gus*, *pAtZR3:gus* und *p4-10:gus*

Für die Klonierung des Promotor-Reporter-Gen-Konstrukts *pAtZR1:gus* wurde der *nos*-Terminator aus dem Vektor *pAtZR1:nos* durch Restriktion mit *Nco*I und *Hind*III entfernt (vgl. Abb. 3-5) und durch ein *uidA:nos*-Fragment ersetzt, das aus dem Verdau des Plasmids *pBS\_Mu:uidA:nos* (Tab. A 2-1) mit *Nco*I und *Hind*III stammt. Das resultierende Konstrukt *pAtZR1:uidA:nos* wird als *pAtZR1:gus* bezeichnet.

Die Konstrukte *pAtZR2:gus*, *pAtZR3:gus* und *p4-10:gus* basieren auf dem Vektor *pMG2002* (Abb. 3.3-4). Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Pst*I in der *multiple cloning site* linearisiert. Die Promotor-Fragmente *AtZR2-P*, *AtZR3-P* und *4-10-P* wurden durch den Verdau der TOPO-Klone *TOPO\_AtZR2-P*, *TOPO\_AtZR3-P* und *TOPO\_4-10-P* (Tab. 3.3-1) mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Pst*I gewonnen und jeweils in den linearisierten *pMG2002* ligiert. Die resultierenden Konstrukte werden als *pAtZR2:gus*, *pAtZR3:gus* und *p4-10:gus* bezeichnet.

### 3.3.5 Klonierung von Expressionsvektoren zur Proteinexpression in *E.coli*

Zur Überexpression der plastidären *Arabidopsis*-Proteine AtZR1, AtZR2, cpHSP70-1 und cpHSP-70-2 in *E.coli* wurden die ORFs der entsprechenden Gene jeweils ohne Plastidensignalsequenz und ohne Stop-Codon in die Expressionsvektoren *pET30a* oder *pASK IBA3plus* (Tab. A 2-5) kloniert und dabei mit einem C-terminalen *tag* versehen. Dazu wurde der *pET30a* mit *NdeI* und *XhoI* und der *pASK IBA3plus* mit *Eco31I* linearisiert. Die Tab. 3.3-7 gibt eine Übersicht über die Klonierung der einzelnen Konstrukte.

**Tab. 3.3-7: Klonierung von *E.coli* Expressionsvektoren.**

Ursprungsvektoren sind in Tab. 3.3-1 beschrieben, Zielvektoren in Tab. A 2-5.

Name des Konstrukt	Ursprungsvektor	Restriktion	Insert	Zielvektor	tag
<i>pET30_Hsp70-1</i>	<i>TOPO_Hsp70-1 pET</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>cpHSP70-1 ORF ohne Signal</i>	<i>pET30a</i>	<i>6xhis</i>
<i>pET30_Hsp70-2</i>	<i>TOPO_Hsp70-1 pET</i>	<i>NdeI/XhoI</i>	<i>cpHSP70-2 ORF ohne Signal</i>	<i>pET30a</i>	<i>6xhis</i>
<i>IBA_AtZR1strep</i>	<i>TOPO_AtZR1</i>	<i>Esp3I</i>	<i>AtZR1 ORF ohne Signal</i>	<i>pASK IBA3plus</i>	<i>strep</i>
<i>IBA_AtZR2strep</i>	<i>TOPO_AtZR2</i>	<i>Eco31I</i>	<i>AtZR1 ORF ohne Signal</i>	<i>pASK IBA3plus</i>	<i>strep</i>

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Phylogenie der *Zinc Ribbon*-Protein-Familie

*In silico* Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *ZmET1*-Gens haben gezeigt, dass das Protein neben einer N-terminalen Chloroplasten-Importsequenz eine C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne mit zwei charakteristischen c-x-x-c Motiven enthält, die strukturelle Ähnlichkeit zur *Zinc Ribbon*-Domäne des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIIS besitzt. Mais besitzt ein weiteres nahe verwandtes Gen, das *ZmZR1*, das auf Aminosäureebene 87 % Sequenzhomologie zum *ZmET1* aufweist und wahrscheinlich eine Genduplikation des *ZmET1* ist. Darüber hinaus wurden in der Arbeit von KRUSE (2004) die cDNAs von zwei weiteren *Etched1*-verwandten Genen, *ZmZR2* und *ZmZR3*, identifiziert und kloniert. Die Sequenzhomologie auf Proteinebene von *ZmZR2* und *ZmZR3* im Vergleich zum *ZmET1* liegt bei etwa 26 % bzw. 20 % und beschränkt sich in erster Linie auf die C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne. Auch für *ZmZR2* und *ZmZR3* wird laut Computeranalyse eine Signalsequenz für den Organellenimport vorhergesagt. Das *ZmZR2*-Protein wird mit hoher Wahrscheinlichkeit, wie *ZmET1*, in die Chloroplasten importiert, auch wenn die Computervorhersage nicht eindeutig ist. Das *ZmZR3* besitzt hingegen eine Signalsequenz für den Import in die Mitochondrien. Auch in anderen Pflanzen wie *Arabidopsis*, Tomate und Gerste, wurden Sequenzen für *Et1*-homologe Proteine identifiziert, die sich anhand ihrer Homologien der ZR1-, ZR2- oder ZR3-Gruppe zuordnen lassen. Darüber hinaus wurden ZR3-homologe Sequenzen in Tieren und Pilzen gefunden (GEBERT, 2003).

Zwei kürzlich in der Literatur beschriebene Proteine, HEP1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (SICHTING *et al.*, 2005) und HEP2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (WILLMUND *et al.*, 2008), weisen ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit zum ETCHED1-Protein auf. Sie besitzen eine C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne und sind in den Organellen lokalisiert (vgl. Kapitel 2.7).

Da das ETCHED1-Protein in der plastidären TAC detektiert wurde und es strukturelle Ähnlichkeiten zum Transkriptionelongationsfaktor TFIIIS besitzt, nehmen wir eine Funktion von ETCHED1 während der plastidären Transkription an (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). Sowohl für HEP1 als auch für HEP2 wird hingegen eine Funktion als Co-Chaperon für organellenspezifische HSP70-Proteine postuliert.

Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen wurden zunächst Datenbankrecherchen zur Identifikation weiterer ZR-homologer Proteine durchgeführt, die anhand ihrer Aminosäuresequenzen entweder der ZR1-, ZR2-, HEP2- oder ZR3-Gruppe zugeordnet wurden (Abb. 4-1).



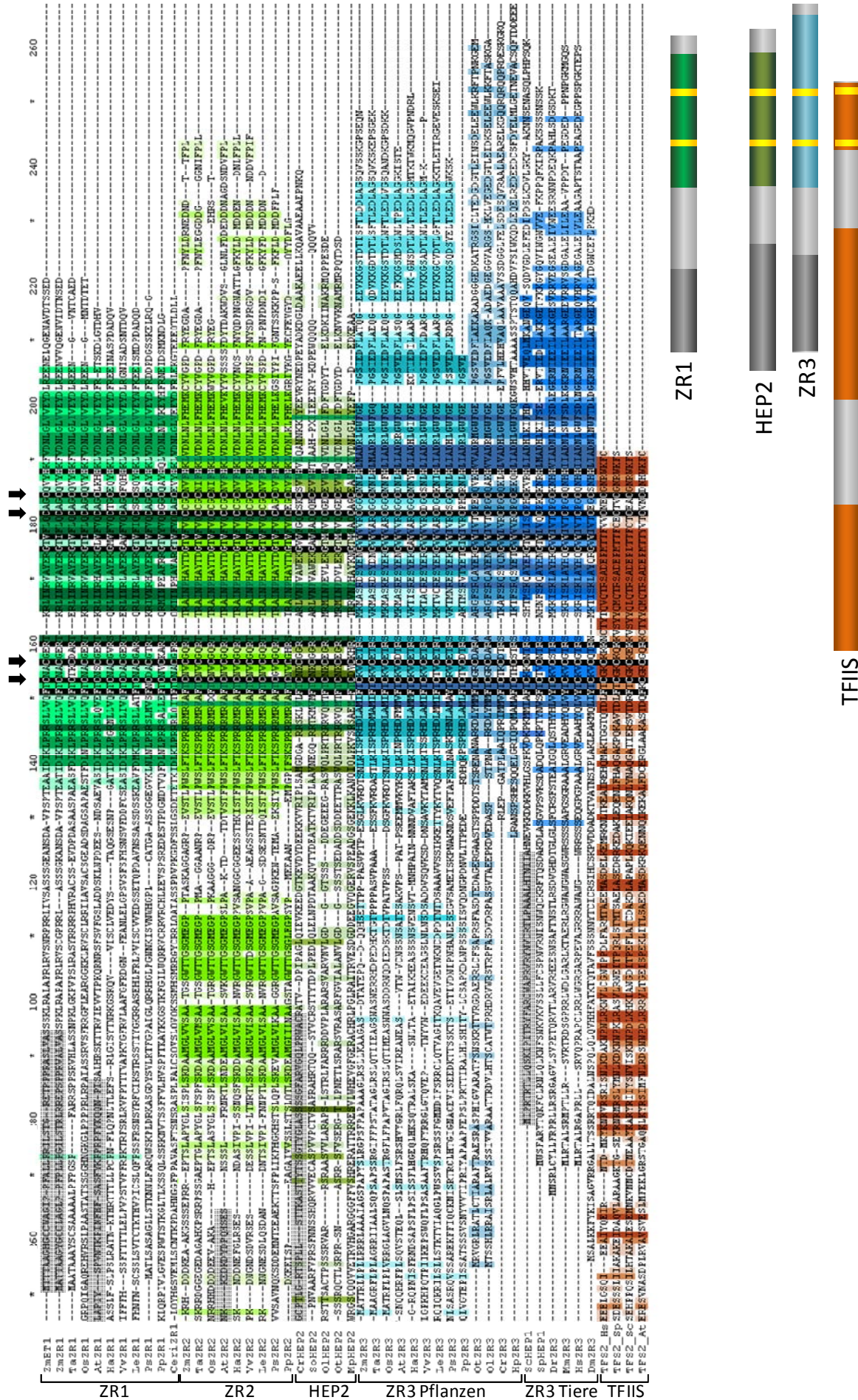


Abb. 4-1: Aminosäurealignment von Mitgliedern der ZR1-, ZR2-, HEP2- und ZR3-Familie im Vergleich zu TF1S (Legende s. folgende Seite)



**Legende zu Abb. 4-1:**

A) Das Alignment der ZR- und TFIS-Proteinsequenzen wurde mit GeneDoc erstellt. Bei einigen Proteinen sind die N-terminalen Sequenzbereiche nicht abgebildet. Diese abgeschnittenen Bereiche enthalten lediglich nicht konservierte Transitpeptide für den Import in die Organellen. Es wurde nur der C-terminale Teil von TFIS abgebildet. Konservierte Aminosäuren innerhalb der einzelnen ZR-Gruppen wurden farbig unterlegt (ZR1: dunkelgrün, ZR2: hellgrün, HEP2: olivgrün, ZR3 Pflanzen hellblau, ZR3 Tiere: dunkelblau, TFIS: rot), die Stärke der Schattierung hängt vom Grad der Konservierung (100 %/80 %/60 %) ab. Konservierte Aminosäuren aller ZR-Proteine sind schwarz unterlegt, Transitsequenzen sind grau unterlegt. Pfeile markieren die Position der konservierten 4 Cysteine. Die folgenden Proteinsequenzen wurden für die Darstellung verwendet (Name, UniProtKB/TrEMBL bzw. GenBank Accessionnr., [Organismus]): ZmET1: Q6KF34 [Zea mays]; ZmZR1: Q6KF33 [Zea mays]; TaZR1: BE591735 [Triticum aestivum]; OsZr1: Q0JLE7 [Oryza sativa]; AtZR1: Q9S7X9 [Arabidopsis thaliana]; HaZR1: BQ913111 [Helianthus annuus]; VvZR1: A7P2Z5 [Vitis vinifera]; LeZR1: DB683692 [Solanum lycopersicum]; PsZR1: A9P1I6 [Picea sitchensis]; PpZR1: A9TGZ2 [Physcomitrella patens]; CerZR1: BE642108 [Ceratopteris richardii]; CrHEP2: A7LNI8 [Chlamydomonas reinhardtii]; SoHEP2: EC188120 [Scenedesmus obliquus]; OIHEP2: A4S8C7 [Ostreococcus lucimarinus]; OtHEP2: Q00U85 [Ostreococcus tauri]; MpHEP2: EC848376 [Micromonas spec]; ZmZR2: DR788132 [Zea mays]; TaZR2: CV768862 [Triticum aestivum]; OsZR2: Q0D9E7 [Oryza sativa]; AtZR2: Q8LD12 [Arabidopsis thaliana]; HaZR2: DY951981 [Helianthus annuus]; VvZR2: A7NVP9 [Vitis vinifera]; LeZR2: AW096348 [Solanum lycopersicum]; PsZR2: A9NKU3 [Picea sitchensis]; PpZR2: A9S1G7 [Physcomitrella patens]; ZmZR3: PC0084909 [Zea mays]; TaZR3: CK161282 [Triticum aestivum]; OsZR3: Q6K719 [Oryza sativa]; AtZR3: Q84TF2 [Arabidopsis thaliana]; HaZR3: CD851593 [Helianthus annuus]; VvZR3: A7PI20 [Vitis vinifera]; LeZR3: BW687291 [Solanum lycopersicum]; PsZR3: A9NTP9 [Picea sitchensis]; PpZR3: A9SDD2 [Physcomitrella patens]; OtZR3: Q01GH6 [Ostreococcus tauri]; OIZR3: A4RR28 [Ostreococcus lucimarinus]; CrZR3: A8JCK9 [Chlamydomonas reinhardtii]; HpZR3: DV203914 [Haematococcus pluvialis]; ScHEP1: A6ZSH0 [Saccharomyces cerevisiae]; SpHEP1: Q09759 [Schizosaccharomyces pombe]; DrZR3: A1L1P7 [Danio rerio]; MmZR3: Q9D113 [Mus musculus]; HsZR3: Q5SXM8 [Homo sapiens]; DmZR3: Q6NMW4 [Drosophila melanogaster]; TFS2\_Hs: P23193 [Homo sapiens]; TFS2\_Sp: P49373 [Schizosaccharomyces pombe]; TFS2\_Sc: A6ZUV3 [Saccharomyces cerevisiae]; TFS2\_At: Q8VXZ6 [Arabidopsis thaliana].

B) Modelle eines ZR1-, ZR2-, HEP2-, ZR3(Pflanze)- und TFIS-Proteins. Konservierte Bereiche sind analog zum Alignment in (A) farbig unterlegt, die Position der beiden c-x-x-c-Motive ist jeweils durch einen gelben Streifen markiert.

Die plastidären ZR1- und ZR2-Proteine wurden ausschließlich in Moosen, Farnen und höheren Pflanzen gefunden. Algen besitzen hingegen das plastidäre HEP2-Protein. Mitochondriale ZR3-Proteine treten sowohl in Pflanzen, wie auch in Tieren und Pilzen auf.

Aus dem Aminosäurealignment (Abb. 4-1) geht deutlich hervor, dass sich die Mitglieder der einzelnen ZR-Gruppen nicht allein auf Grund ihrer subzellulären Lokalisation, sondern auch anhand ihrer konservierten Aminosäurebereiche voneinander unterscheiden.

Die Mitglieder der einzelnen ZR-Gruppen sind untereinander besonders im Bereich der *Zinc Ribbon*-Domäne konserviert. Die ZR2-Gruppe ist die am stärksten konservierte Gruppe der ZR-Proteine. Sie besitzt neben der C-terminalen *Zinc Ribbon*-Domäne eine weitere, sehr konservierte Domäne im N-terminalen Teil des Proteins, die keine Homologie zu bisher charakterisierten Protein-Domänen aufzeigt (Abb. 4-1). Die ZR3-Gruppe der Pflanzen und die ZR3-Gruppe der Tiere/Pilze besitzen hingegen jeweils einen konservierten C-Terminus. MOMOSE *et al.* zeigten 2007, dass diese C-terminale Region essentiell für die Funktion des ZR3-homologen HEP1 in der Hefe ist. Der Vergleich der C-Termini zwischen ZR-Proteinen von Tieren und Pflanzen zeigt jedoch nur eine geringe Ähnlichkeit zueinander. In der

Etched1/ZR1-Familie beschränken sich die konservierten Aminosäuren in erster Linie auf den Bereich um die *Zinc Ribbon*-Domäne. Die Mitglieder der HEP2-Gruppe sind untereinander an wenigsten konserviert.

Die Homologie zwischen den verschiedenen ZR-Gruppen beschränkt sich in der Regel auf wenige Aminosäuren. Aminosäuren, die in allen ZR-Proteinen konserviert sind, wurden im abgebildeten Alignment schwarz unterlegt (Abb. 4-1).

Auf Aminosäureebene weisen die ZR-Proteine nur eine geringe Homologie zur *Zinc-Ribbon*-Domäne des Transkriptionselongationsfaktors TFIS auf, die sich in erster Linie auf die vier Cysteinreste beschränkt. In Bezug auf die vorhergesagte Sekundärstruktur der ZR-Domäne des ETCHED1-Proteins ist jedoch eine strukturelle Ähnlichkeit zur *Zinc Ribbon*-Domäne des TFIS erkennbar (DA COSTA E SILVA *et al.* 2004).

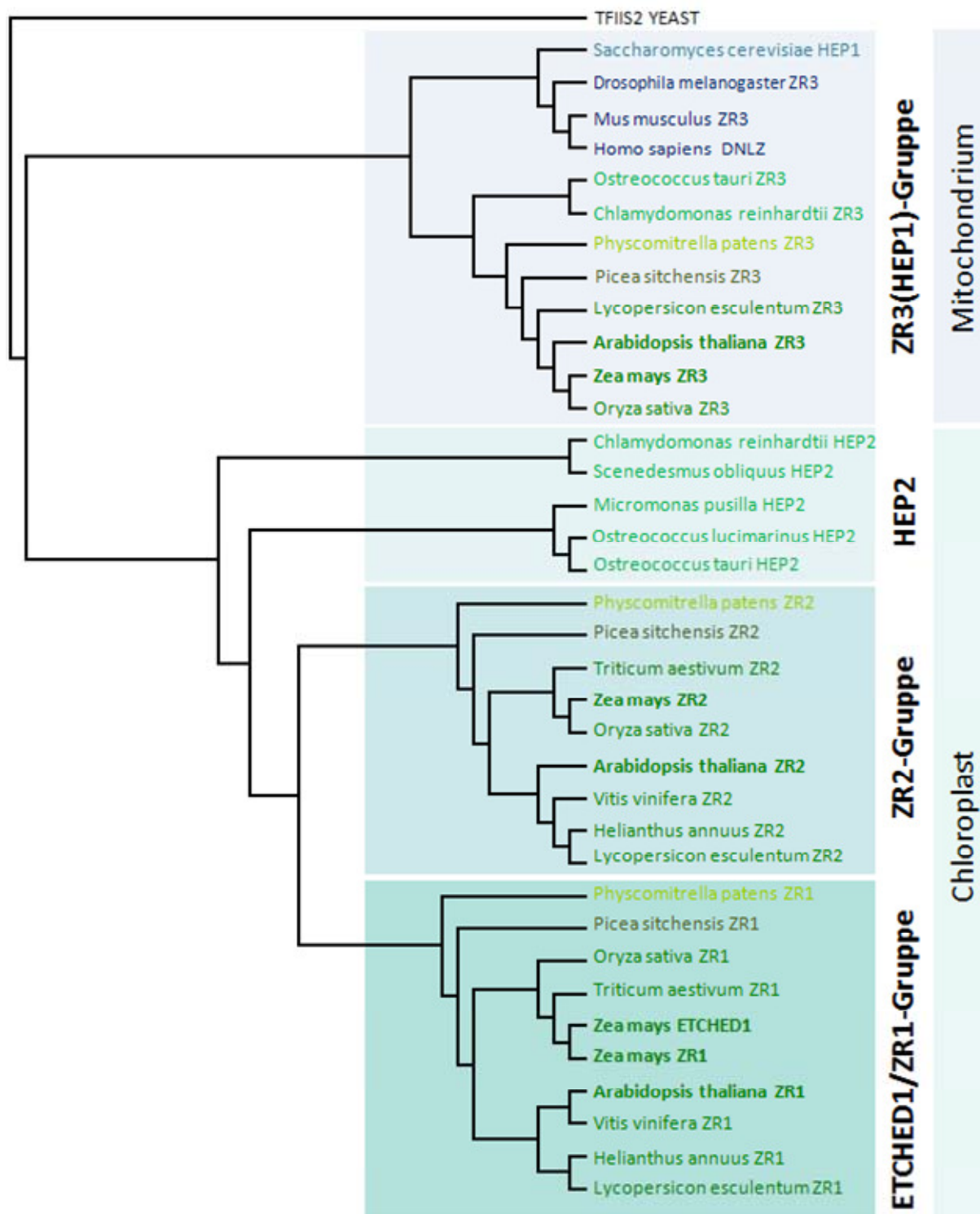
Anhand des Sequenzvergleichs in Abb. 4-1 wurde ein phylogenetischer Baum mit dem TFIS-Protein als Außengruppe erstellt, der die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen ZR-Proteingruppen veranschaulicht (Abb. 4-2).

Demnach besitzen die in den Chloroplasten lokalisierten ZR-Proteine der ZR1-, ZR2- und HEP2-Gruppe zueinander eine stärkere Ähnlichkeit als zur ZR3-Gruppe, deren Mitglieder in den Mitochondrien lokalisiert sind. Da ZR3-Proteine sowohl in Tieren als auch in Pflanzen vorkommen, ist anzunehmen, dass sie die ursprünglichsten ZR-Proteine darstellen. Innerhalb der ZR3-Gruppe lässt sich eine klare Aufspaltung in pflanzliche und tierische ZR3-Proteine erkennen.

Die plastidären HEP2-Proteine der Algen sind phylogenetisch zwischen den ZR3-Proteinen und den plastidären ZR1- und ZR2-Proteinen der Landpflanzen einzuordnen. Die HEP2-Gruppe lässt sich einerseits in die HEP2-Proteine der Chlamydomonales und die der Prassinophyceen (*Micromonas* und *Ostreococcus*) unterteilen. Entwicklungsgeschichtlich stehen die Prassinophyceen den Landpflanzen ebenfalls näher.

Die phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der ZR1- und der ZR2-Gruppe ist nahezu identisch. Das Moos *Physcomitrella patens* weist innerhalb beider Gruppen die geringste Verwandtschaft zu den übrigen Vertretern auf, gefolgt von der Konifere *Picea sitchensis*. Die ZR-Proteine der Magnoliophyten lassen sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander deutlich in die Gruppe der Monokotylen und die der Dikotylen untergliedern (Abb. 4-2).

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den ZR-Proteinen spiegeln demnach die phylogenetische Entwicklung der Pflanzen perfekt wider.



**Abb. 4-2: Phylogenetischer Baum der Zinc Ribbon-Proteinfamilie in Eukaryoten**

Der phylogenetische Baum stellt die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Mitgliedern der ZR-Familie dar. Mitglieder der ZR3-Gruppe sind in den Mitochondrien lokalisiert, während Mitglieder der ETCHED1/ZR1-, der ZR2- und der HEP2-Gruppe in die Plastiden importiert werden. TFIS dient als Außengruppe. Der Baum basiert auf dem Alignment in Abb. 4-1.

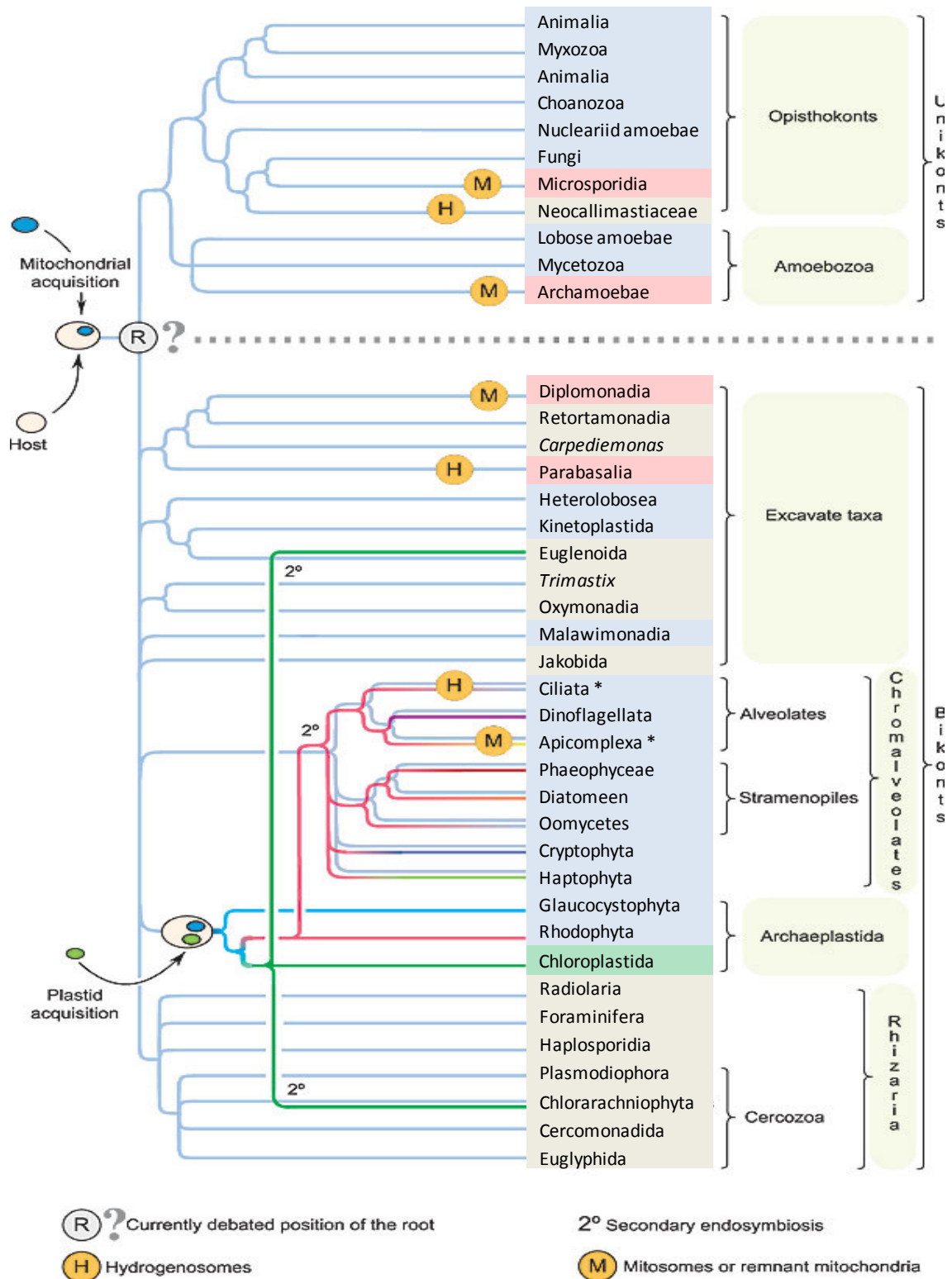
Um weitere Einblicke in die wachsende Familie der HEP- bzw. ZR-Proteine und ihre phylogenetische Entwicklung zu gewinnen, wurden weitere Sequenzdaten zu insgesamt 125 verschiedenen eukaryotischen Organismen gesammelt. In 116 der 125 untersuchten Kandidaten konnten ZR-ähnliche Proteinsequenzen identifiziert werden.

Die Plastidenproteine ZR1, ZR2 und HEP2 wurden ausschließlich in den *Chloroplastida* (= Pflanzen mit grünen Plastiden) gefunden, während ZR3-homologe Proteine mit vorhergesagter mitochondrialer Lokalisation zusätzlich in fast allen untersuchten Protozoa und allen untersuchten Metazoa vorhanden sind (Abb. 4-3). In Prokaryoten konnten hingegen keine ZR-ähnlichen Proteine identifiziert werden.

Nach heutiger Auffassung der Systematik lässt sich die Domäne der Eukaryoten in zwei Gruppen unterteilen: die Unikonten, zu denen Tiere, Pilze und Amoebozoa zählen, und die Bikonten, denen Algen, Pflanzen und die meisten Protisten angehören (CAVALIER-SMITH, 2002). Auf Grund der Tatsache, dass sowohl die Uni- als auch die Bikonten ZR3-homologe Proteine enthalten (Abb. 4-3 blau unterlegt), nicht aber die Bakterien, lässt sich schlussfolgern, dass sich das ZR3-Protein sehr früh in der Evolution der Eukaryoten nach oder während der Entstehung der Mitochondrien entwickelt hat.

Doch nicht alle Eukaryoten besitzen ZR3-Proteine: Dies zeigte eine Analyse vollständig sequenzierter Genome von insgesamt sechs Vertretern der Microsporiden und der Entamoebae aus der Gruppe der Unikonten sowie vier Vertretern der Diplomonaden und Trichomonaden aus der Gruppe der Bikonten (Abb. 4-3 rot unterlegt). Interessanterweise besitzen diese anaeroben Organismen nur rudimentäre Mitochondrien in Form von Hydrogenosomen (*Trichomonas*) oder Mitosomen (Microsporidien, Entamoebae und Diplomonaden). Diese Organellen besitzen kein mitochondriales Genom und haben viele der Mitochondrienfunktionen z.B. die Fähigkeit zur aeroben Atmung und der Hämsynthese verloren. Sowohl Mitosomen als auch Hydrogenosomen besitzen aber noch die Komponenten zur Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (GOLDBERG *et al.*, 2008; DOLEZAL *et al.*, 2007), eine mitochondriale Importmaschinerie und die mitochondrialen Chaperone Hsp60 und Hsp70 (AGUILERRA *et al.*, 2008; HACKSTEIN *et al.*, 2006).

Eukaryotische Vertreter, die anstelle der Mitochondrien Hydrogenosomen oder Mitosomen besitzen, sind im Laufe der Evolution mehrfach und unabhängig voneinander entstanden. Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass sie unabhängig von einander das mitochondriale ZR3-Protein verloren haben (Abb. 4-3 rot unterlegt).



**Abb. 4-3: Vorkommen der ZR-Proteine in Eukaryoten**

Stammbaum der Eukaryoten nach EMBLY UND MARTIN, 2006. Vertreter, die das mitochondriale ZR3 enthalten, sind blau unterlegt, solche, die das ZR3 wieder verloren haben, sind rot unterlegt. Vertreter, die neben dem ZR3 auch ein plastidäres ZR1/ZR2 bzw. HEP2 besitzen, sind grün unterlegt. Gruppen für die keine ausreichenden Sequenzdaten zur Verfügung standen, sind grau unterlegt. \*= in diesen Gruppen wurden nur Individuen mit Mitochondrien berücksichtigt.

Die *Zinc Ribbon*-Proteine der Etched1/ZR1-, ZR2- und HEP2-Familien werden in die Plastiden importiert. Nach heutigen Ansichten geht die Entstehung der Plastiden auf ein einziges endosymbiontisches Ereignis zurück (MC FADDEN UND VAN DOOREN, 2004), aus dem die Archaeplastida ihren Ursprung nehmen (Abb. 4-3). Plastidäre *Zinc Ribbon*-Proteine findet man jedoch nur in der Gruppe der Chloroplastida, die sowohl Grünalgen als auch die Embryophyta umfasst (Abb. 4-3 grün unterlegt). Rotalgen und Glaucocystophyceen besitzen ausschließlich mitochondriale ZR3-Proteine. Die plastidären ZR-Proteine sind also vermutlich nicht parallel mit den Plastiden entstanden, sondern haben sich erst später entwickelt. Vertreter der Chromalveolaten, die ihre Plastiden durch die sekundäre Endosymbiose einer Rotalge erlangt haben, besitzen ebenfalls keine plastidären *Zinc Ribbon*-Proteine. Ob die Vertreter der Euglenoiden und Chlorarachniophyten, die ihre Plastiden durch die sekundäre Endosymbiose einer Grünalge erlangt haben, plastidäre *Zinc Ribbon*-Proteine besitzen, konnte mangels ausreichender Sequenzinformationen bisher nicht geklärt werden. Innerhalb der Gruppe der *Chloroplastida* zeichnen sich die *Chlorophyta* (einzellige Grünalgen) durch das Vorhandensein eines einzigen plastidären *Zinc Ribbon*-Proteins (HEP2-Typ) aus, während die Moose, Farne und höheren Pflanzen stets zwei plastidäre *Zinc Ribbon*-Proteine aus der ZR1- bzw. ZR2-Gruppe, besitzen (siehe auch Abb. 4-2).

Zusammenfassend konnte durch die phylogenetischen Analysen gezeigt werden, dass die organellenspezifischen ZR-Proteine eine konservierte Proteinfamilie eukaryotischen Ursprungs bilden. Anhand ihrer Sequenzhomologie lassen sie sich deutlich in vier Untergruppen (ZR1, ZR2, HEP2 und ZR3) einteilen.

Während die mitochondrialen ZR3-Proteine in nahezu allen eukaryotischen Organismen auftreten, wurden die plastidären ZR-Proteine ausschließlich in den Chloroplastida gefunden. Während einzellige Grünalgen ein einziges plastidäres ZR-Protein vom HEP2-Typ besitzen, treten in höheren Pflanzen stets zwei plastidäre ZR-Proteine (ZR1 und ZR2) auf.

## 4.2 Organellenspezifische Lokalisation von ZR1, ZR2 und ZR3

Wie bereits erläutert wurde, enthalten die ZR-Proteine N-terminale Transitsequenzen zum Proteinimport in die Plastiden oder die Mitochondrien. Der Import des ZmET1-Proteins aus Mais in die Chloroplasten wurde bereits durch Importexperimente (GARG, 2002) belegt. In der Arbeit von GEBERT (2003) wurde darüber hinaus mittels GFP-Fusionsproteinen gezeigt, dass auch das ZmZR1 aus Mais und das *Arabidopsis*-homologe AtZR1 in die Plastiden importiert werden. Die subzelluläre Lokalisation des AtZR2-Proteins wurde im Rahmen der Arbeit ebenfalls untersucht, führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Auch der Import des ZmZR3::GFP Proteins in die Mitochondrien, untersucht in der Arbeit von KRUSE (2004), konnte wegen unzureichender Transformationseffizienz nicht eindeutig belegt werden.

Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von Mitgliedern der ZR-Protein-Familie im Rahmen dieser Arbeit erneut untersucht. Dazu wurden GFP- und DsRed-Fusionskonstrukte auf der Basis der Vektoren *pUbi:gfp* und *pUbi:DsRed* (bzw. *pCHF\_5* für die Konstrukte *p35S:ZmET1::gfp/DsRED*) hergestellt und durch biolistische Transformation transient in Zwiebelepidermis oder in Tabakblättern exprimiert. Eine Beschreibung aller verwendeten Vektoren und die Klonierung der in dieser Arbeit entstandenen Konstrukte sind in Kapitel 2.3.2 und im Anhang (A 2) aufgeführt.

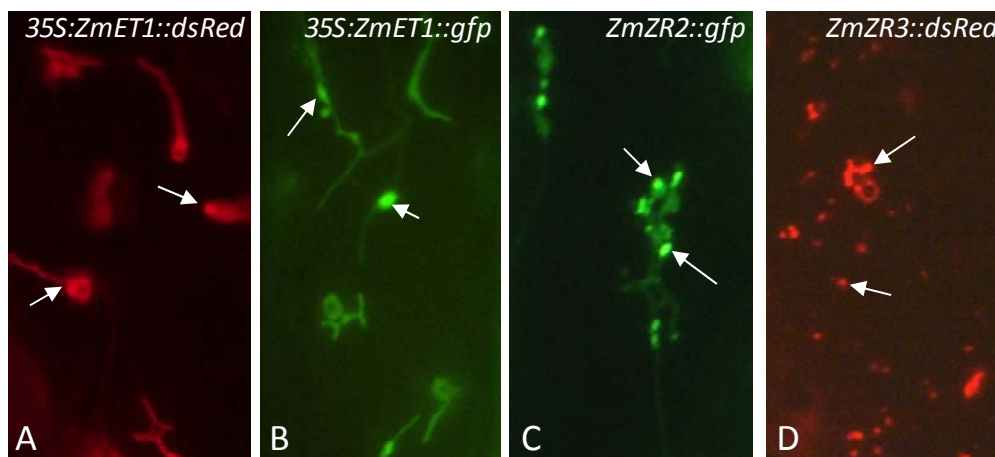
### 4.2.1 Subzelluläre Lokalisation von ZmET1, ZmZR2 und ZmZR3

Zunächst wurde die Lokalisation der Mais-Proteine ZmET1, ZmZR2 und ZmZR3 in Zellen der Zwiebelepidermis untersucht. In der Epidermis liegen die Plastiden als farblose Leukoplasten vor, die kein Chlorophyll enthalten und dementsprechend auch keine Photosynthese betreiben. Die Leukoplasten bilden oft zahlreiche *Stromules* (mit Stroma gefüllte Fortsätze) aus und sind daher in ihrer Form sehr variabel.

Wie zu erwarten, wurde das ZmET1 als Fusion mit GFP oder DsRED in die Plastiden importiert, denn der zentrale Bereich der Plastiden und die teils lang gezogenen *Stromules* fluoreszierten deutlich (Abb. 4-4 A und B). Bei genauem Hinsehen fiel außerdem auf, dass die Fluoreszenz nicht gleichmäßig über die Plastiden verteilt war, sondern in einigen Bereichen stärker zum Ausdruck kam (Pfeile in Abb. 4-4 A und B). Dies lässt vermuten, dass das ZmET1-Protein nicht gleichmäßig im Plastidenstroma vorliegt, sondern präferenziell in bestimmten Subkompartimenten akkumuliert.

Das ZmZR2::GFP-Protein wurde ebenfalls in die Leukoplasten der Zwiebelepidermis importiert. Abb. 4-4 C zeigt zwei stark vergrößerte Plastiden mit ZmZR2::GFP-Expression. Im Vergleich zum ZmET1::GFP war das ZmZR2::GFP allerdings sehr viel ungleichmäßiger im Plastiden verteilt. Das Protein akkumulierte in einigen Regionen sehr stark (Pfeile), sodass die Plastiden gesprenkelt erschienen. Die *Stromules* hingegen waren kaum zu erkennen.

Im Gegensatz zum ZmET1 und dem ZmZR2 wurde das ZmZR3 in sehr viel kleinere Strukturen importiert, die im Vergleich zu den Plastiden in deutlich größerer Zahl auftraten (Abb. 4-4 D). Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich bei diesen Strukturen um die Mitochondrien. Dies ist auch auf Grund der Tatsache anzunehmen, dass für das ZmZR3-Protein ein Mitochondrien-Importsignal vorhergesagt wird.



**Abb. 4-4 Subzelluläre Lokalisation von ZmET1, ZmZR2 und ZmZR3 in Zwiebelepidermis.** Zwiebelepidermis wurde biolistisch mit den Konstrukten *ZmET1::dsRed* (A), *ZmET1::gfp* (B), *ZmZR2::gfp* (C) oder *ZmZR3::gfp* (D) transformiert. Die Pfeile verweisen auf Bereiche mit besonders starker GFP- bzw. DsRED-Fluoreszenz (vgl. Text).

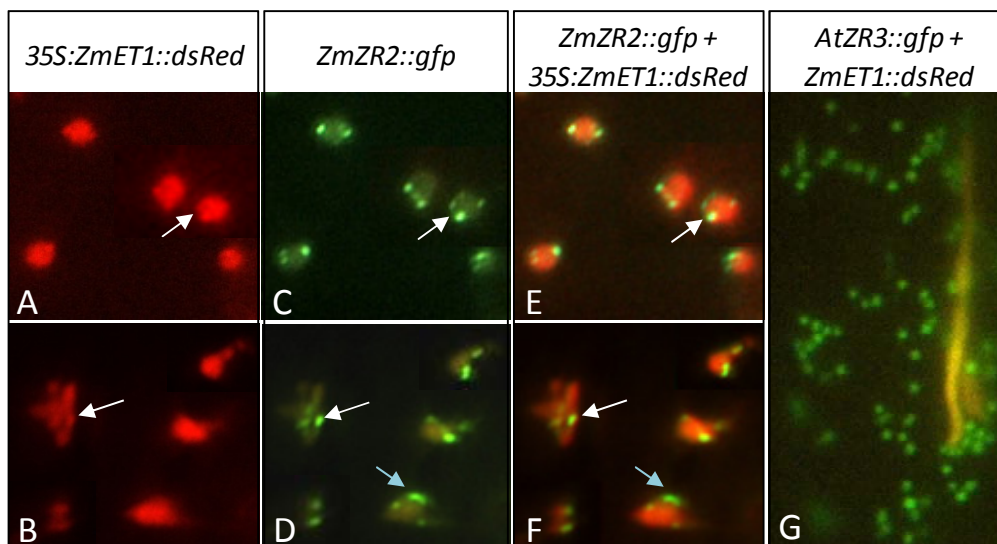
#### 4.2.2 Co-Lokalisation von ZmET1 und ZmZR2 in Zwiebel-Leukoplasten

Sowohl ZmET1 als auch ZmZR2 sind in den Plastiden lokalisiert. Innerhalb dieses Organells zeigten sie allerdings eine unterschiedliche Lokalisation, da ZmZR2 in bestimmten Regionen sehr stark akkumulierte und in anderen Teilen kaum zu detektieren war, während das ZmET1 insgesamt gleichmäßiger über das Stroma verteilt war und in einigen Regionen schwach akkumulierte.

Diese unterschiedliche Verteilung wurde besonders bei der Co-Expression von ZmET1::DsRED und ZmZR2::GFP in Zwiebelzellen deutlich (Abb. 4-5). Die Rotfluoreszenz des ZmET1::DsRED war im gesamten Stroma kräftig, dennoch hoben sich einige Punkte ab, in denen das Protein besonders akkumulierte (weiße Pfeile in A und B). Das ZmZR2::GFP akkumulierte hingegen in etwa 3-4 Punkten je Plastid und war darüber hinaus nur sehr schwach im Stroma zu detektieren. Die DsRED-Fluoreszenz war teilweise als orangefarbenes Signal im GFP-Filter zu sehen (vgl. Abb. 4-5 D).



Die Überlagerung der ZmZR2::GFP-Fluoreszenz mit ZmET1::DsRED (Abb. 4-5 E und F) zeigte, dass die GFP-Signale teilweise mit dem DsRED überlagerten (weiße Pfeile), sie erschienen daher gelb. Andere Punkte überlagerten hingegen nicht (blauer Pfeil) und erschienen weiterhin grün. Demnach ist festzuhalten, dass ZmET1 und ZmZR2 innerhalb des Plastiden nur bedingt co-lokalisieren.



**Abb. 4-5 Co-Expression von ZmET1::DsRED und ZmZR2::GFP in Zwiebelepidermis**  
 (A) und (B) zeigen transformierte Leukoplasten im DsRed-Filter (590 nm), (C) und (D) zeigen die gleichen Organellen im GFP-Filter (520 nm), (E) und (F) zeigen die Überlagerung beider Filter. In (G) ist zum Vergleich die Co-Expression von AtZR3::GFP (grün) und ZmET1::DsRED (orange) abgebildet. Weiße Pfeile weisen auf Co-Lokalisation hin, blaue Pfeile markieren GFP-Expression, die nicht mit DsRED überlagert.

Abb. 4-5 G zeigt zum Vergleich die Co-Expression von ZmET1::DsRED und AtZR3::GFP. Das AtZR3::GFP aus *Arabidopsis* ist ebenso wie das ZmZR3 aus Mais (Abb. 4-4 D) in den Mitochondrien lokalisiert. Des Weiteren ist ein einzelner Plastid sichtbar, in dem das ZmET1::DsRED lokalisiert ist und der mit dem verwendeten GFP-Filter orange erscheint.

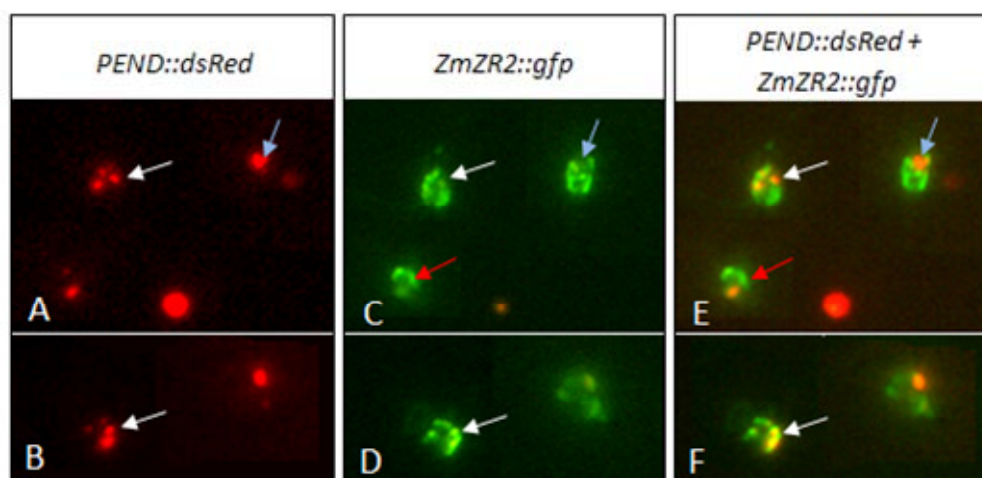
In vorangegangenen Arbeiten wurde das ZmET1-Protein als Komponente des plastidären TAC-Komplexes identifiziert (MÜLLER, 2004). Aufgrund der Akkumulation von ZmET1 und ZmZR2 in distinkten *spots* innerhalb der Plastiden ist es denkbar, dass die ZR-Proteine in den Organellen mit den Nukleoiden<sup>1</sup> co-lokalisieren.

#### 4.2.3 Co-Lokalisation von ZmET1 und ZmZR2 mit plastidärer DNA

Um zu überprüfen, ob ZmET1 und ZmZR2 mit der plastidären DNA co-lokalisieren, wurden weitere Fusionskonstrukte hergestellt. Zur Markierung der Nukleotide wurde die DNA-

<sup>1</sup> Nukleotide: DNA-Protein-Komplexe

Bindedomäne des PEND-Proteins aus *Arabidopsis* in die Vektoren *pUbi:gfp* und *pUbi:DsRed* kloniert. Das PEND-Protein bindet die plastidäre DNA an die innere Hüllmembran des Plastiden und kann daher als Marker für die DNA-Lokalisation dienen (SATO *et al.*, 2005). Außerdem wurden *rpoA* und *rpoC1* aus *Arabidopsis*, die für die  $\alpha$ - und  $\beta$ '-Untereinheit der plastidenkodierten RNA-Polymerase codieren, in den *ssuR target::gfp* kloniert. Der Vektor enthält das Signalpeptid der kleinen Untereinheit der RuBisCO, da *rpoA* und *rpoC* auf dem Plastom codiert sind und daher keine eigenen Signalsequenzen besitzen (vgl. Kapitel 3.3.2). Die Co-Expression des ZmZR2::GFP-Proteins mit dem PEND::DsRED zeigte eine bedingte Co-Lokalisation zwischen den beiden Proteinen (Abb. 4-6).

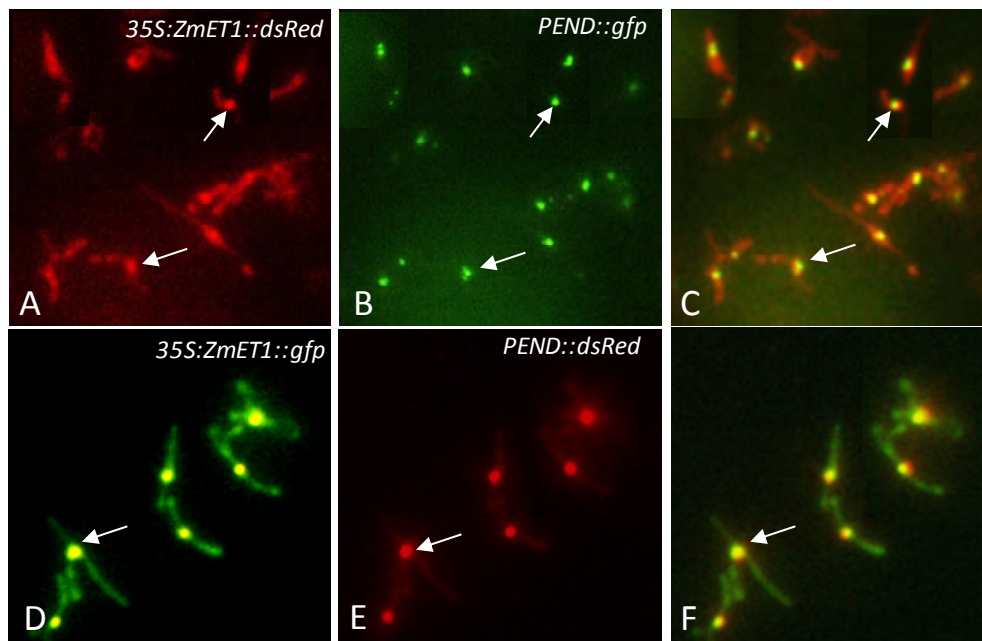


**Abb. 4-6 Co-Lokalisation von ZmZR2::GFP und PEND::DsRED in Zwiebelepidermis**  
 (A) und (B) zeigen transformierte Leukoplasten im DsRed-Filter (590 nm), (C) und (D) zeigen die gleichen Organellen im GFP-Filter (520 nm), (E) und (F) zeigen die Überlagerung beider Filter. Weiße Pfeile weisen auf Co-Lokalisation hin, Blaue Pfeile markieren DsRED-Signale, die nicht mit GFP co-lokalisieren, rote Pfeile zeigen GFP-Signale, die nicht mit DsRED co-lokalisieren.

Zunächst ist festzuhalten, dass das PEND-Protein im Vergleich zum ZmZR2 noch distinkter in wenigen *spots* lokalisierte. Pro Plastid fand man etwa 2-4 durch PEND::DsRED markierte Nukleoide. Das ZmZR2 akkumulierte hingegen in zahlreichen kleinen, weniger scharfen Punkten. Betrachtet man die Überlagerung der DsRED- und der GFP-Fluoreszenz, stellt man fest, dass die DsRED-Signale in den meisten Fällen mit dem GFP überlagern (weiße Pfeile), in seltenen Fällen ergibt sich keine Co-Lokalisation (blaue und rote Pfeile). Dies mag damit zusammenhängen, dass die Plastiden, insbesondere die Leukoplasten, sehr plastische Organellen sind, die ständig ihre Form ändern und sich zusätzlich innerhalb der Zelle bewegen. Diese Bewegung stellt insofern eine experimentelle Schwierigkeit dar, da die mit den verschiedenen Filtersätzen aufgenommenen Digitalbilder kurz hintereinander und nicht gleichzeitig aufgenommen werden konnten.

Das ZmZR2::GFP co-lokalisiert also mit dem PEND::DsRED in den Nukleoiden, akkumuliert aber darüber hinaus auch an anderen Stellen im Plastiden (rote Pfeile). Das PEND::GFP-Protein akkumulierte außerdem stark im Zellkern (nicht abgebildet).

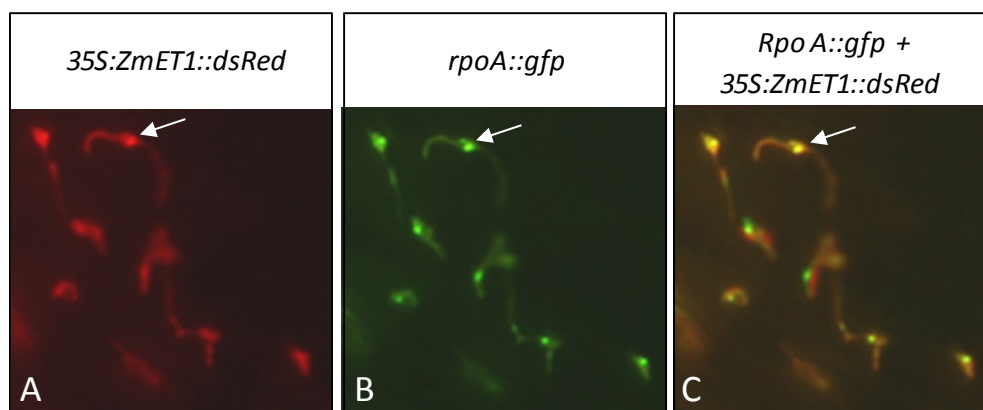
Eine mögliche Co-Lokalisation von ZmET1 und PEND wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde einerseits *ZmET1::dsRed* mit *PEND::gfp* und andererseits *ZmET1::gfp* mit *PEND::dsRed* in Zwiebelepidermis exprimiert (Abb. 4-7). Während PEND::GFP bzw. PEND::DsRED innerhalb der Plastiden vornehmlich in den Nukleoiden akkumulierten (Abb. 4-7 B, D), lag das ZmET1::DsRED bzw. ZmET1::GFP im gesamten Stroma vor, akkumulierte aber in einigen Bereichen verstärkt (Abb. 4-7 A, E, Pfeile).



**Abb. 4-7 Co-Lokalisation von ZmET1- und PEND-Fusionsproteinen in Zwiebelepidermis**  
 (A) und (E) zeigen transformierte Leukoplasten im DsRed-Filter (590 nm), (B) und (D) zeigen die gleichen Organellen im GFP-Filter (520 nm), (C) und (F) zeigen die Überlagerung beider Filter. Pfeile weisen auf Co-Lokalisation hin.

Wie die Überlagerung der GFP- und der DsRED-Fluoreszenz zeigt (Abb. 4-7 C, F), co-lokalisieren diese Areale eindeutig mit den markierten Nukleoiden. Demnach liegt das ZmET1-Protein zwar im gesamten Plastidenstroma vor, akkumuliert aber im Bereich der Nukleide.

Um zu zeigen, dass ZmET1 möglicherweise mit den plastidären Transkriptionskomplexen assoziiert ist, wurde das *35S:ZmET1::dsRed*-Konstrukt mit *rpoA::gfp* (Abb. 4-8) bzw. *rpoC1::gfp* in Zwiebelzellen co-exprimiert. Sowohl *rpoA* als auch *rpoC1* codieren für Untereinheiten der plastidären RNA-Polymerase.



**Abb. 4-8 Co-Lokalisation von ZmET1::DsRED und rpoA::GFP in Zwiebelepidermis**  
 (A) zeigt transformierte Leukoplasten im DsRed-Filter (nm), (B) zeigt die gleichen Organellen im GFP-Filter (nm) und (C) zeigt die Überlagerung beider Filter. Die Pfeile weisen auf Co-Lokalisation zwischen rpoA::GFP und ZmET1::DsRED hin.

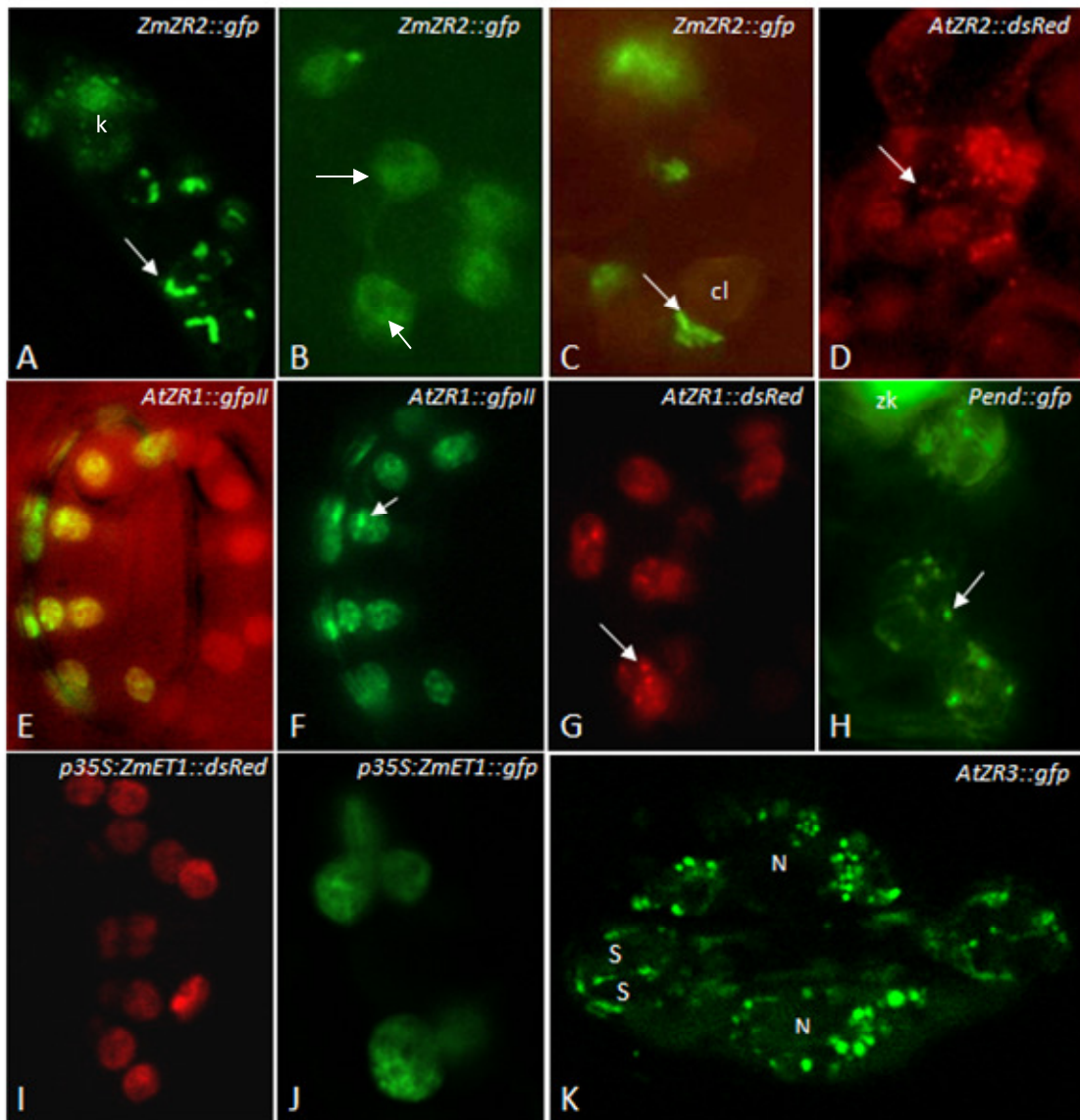
Das rpoA::GFP-Protein war ähnlich wie das ZmET1-Protein im gesamten Plastidenstroma verteilt, akkumulierte aber in distinkten Punkten (Abb. 4-8 B). Die Überlagerung mit der ZmET1::DsRED-Fluoreszenz zeigte, dass ZmET1::DsRED und rpoA::GFP in den gleichen Komplexen akkumulierten (Pfeile), wobei das rpoA::GFP etwas distinkteren spots als das ZmET1::DsRED bildete. Beide Proteine waren außerdem im Stroma lokalisiert.

Das rpoC1::GFP-Protein konnte in Zellen der Zwiebelepidermis nicht zur Expression gebracht werden werden.

#### 4.2.4 Subzelluläre Lokalisation der ZR-Proteine in Tabak

Wie bereits erläutert wurde, liegen die Plastiden in der Epidermis in der Regel als photosynthetisch inaktive Leukoplasten vor. Um die subzelluläre Lokalisation der ZR-Proteine in Chloroplasten zu untersuchen, wurden Tabakblätter biolistisch transformiert, da die Stomata in der Epidermis Chloroplasten enthalten.

Die Lokalisation des ZR2-Proteins in den Stomata der transformierten Tabakblätter erwies sich als indifferent (Abb. 4-9 A-D). In einigen Zellen war das ZmZR2::GFP-Protein im Plastidenstroma verteilt (B), schien aber in bestimmten Regionen stärker zu akkumulieren (Pfeile). Allerdings waren die Signale in diesen Arealen deutlich weniger distinkt als in den Leukoplasten der Zwiebel. In einer weiteren Zelle (A) war die Verteilung des ZmZR2::GFP hingegen extrem ungleich: innerhalb des Chloroplasten beschränkte sich die GFP-Fluoreszenz auf wenige scharf abgegrenzte Regionen in der Peripherie des Stromas. Diese Bereiche unterschieden sich in ihrer Größe und Verteilung aber deutlich von den durch PEND::GFP markierten Nukleoiden (Abb. 4-9 H). Darüber hinaus ließ sich das ZmZR2::GFP schwach im Zellkern detektieren. In einer anderen Zelle (C) lag das ZmZR2::GFP hingegen wie eine Kappe auf dem Chloroplasten (Pfeil).



**Abb. 4-9 Subzelluläre Lokalisation von GFP- und DsRED-Fusionsproteinen in Schließzellen von Tabak und Mais**

Pfeile weisen auf GFP- bzw. DsRED-Lokalisation hin (vgl. Text). cl: Chloroplast, zk: Zellkern, S: Schließzelle, N: Nebenzelle. Abbildungen C, I, J, K wurden mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen.

Auch das ZmZR2-homologe AtZR2 aus *Arabidopsis* wurde als DsRED-Fusion in Tabakblättern exprimiert. In den Chloroplasten lokalisierte es in vielen kleinen Punkten (Abb. 4-9 D, Pfeil). Die AtZR2::DsRED-Lokalisation glich in hohem Maße der Lokalisation des PEND::GFP (Abb. 4-9 H).

ZmET1 und das homologe *Arabidopsis*-Protein AtZR1 lokalisierten als GFP bzw. DsRED Fusionen auch im Tabak ausschließlich in den Chloroplasten (Abb. 4-9 E-G und I-J). Abb. 4-9 E zeigt die Überlagerung der AtZR1::GFP-Fluoreszenz mit der roten Chlorophyllfluoreszenz in den Chloroplasten.

Sowohl AtZR1::GFP als auch AtZR1::DsRED akkumulierten innerhalb der Chloroplasten, ähnlich wie das PEND::GFP, in kleinen Punkten (Pfeile in Abb. 4-9 F, G). Die AtZR1-

---

Fusionsproteine waren darüber hinaus auch im Plastidenstroma detektierbar. Im Vergleich zum AtZR1 war das ZmET1-Fusionsprotein gleichmäßiger im Stroma der Chloroplasten verteilt. Dennoch war die Verteilung nicht homogen (Abb. 4-9 I, J). Die Lokalisation des ETCHED1 bzw. AtZR1 in den Tabakchloroplasten glich im Großen und Ganzen der Verteilung in den Leukoplasten der Zwiebel.

Abb. 4-9K zeigt die subzelluläre Lokalisation des AtZR3::GFP-Proteins in den Mitochondrien des Spaltöffnungsapparates einer stabil transformierten Maispflanze.

Zusammenfassend führten die durchgeführten Lokalisationsstudien zu dem Ergebnis, dass die ZR1-, ZR2- und ZR3-Proteine aus Mais und *Arabidopsis* entsprechend ihrer computer-gestützten Vorhersage in die Plastiden bzw. Mitochondrien importiert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ZR1 und ZR2 nicht homogen im Plastidenstroma verteilt sind, sondern jeweils in distinkten Regionen akkumulieren. Diese Regionen korrelieren, zumindest teilweise, mit den plastidären Nukleoiden. Das Verteilungsmuster des ZmET1-Fusionsproteins gleicht außerdem im Wesentlichen der subplastidären Lokalisation des rpoA::GFP-Proteins.

Dies stärkt die Hypothese, dass die ZR-Proteine an der organellen-spezifischen Transkription beteiligt sein könnten.



### 4.3 Entwicklungs- und gewebespezifische Expression von *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3*

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, besitzen höhere Pflanzen drei ZR-Proteine, von denen *Etched1* bzw. ZR1 und ZR2 in den Plastiden lokalisiert sind, während sich das ZR3 in den Mitochondrien befindet. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der gewebespezifischen Expression der ZR-Gene.

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass das *Etched1*-Gen aus Mais vornehmlich in Blättern und Körnern exprimiert ist. Innerhalb des Kornes wird *Etched1* kaum im Embryo, sondern überwiegend im restlichen Korn transkribiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

Ergänzende Studien in Gerste belegten, dass das *Etched1*-homologe *HvZR1* innerhalb des Blattes in den jungen Geweben der Blattbasis stärker exprimiert wird, als in den älteren Geweben der Blattspitze, während das *ZmZR2*-homologe *HvZR2* genau entgegengesetzt exprimiert ist (MÜLLER, 2004).

Über das Expressionsmuster des mitochondrialen ZR3-Gens liegen bisher keine Daten vor.

In dieser Arbeit wurde nun die entwicklungs- und gewebespezifische Expression der ZR-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* analysiert. Dazu wurden Reporter-gen-Konstrukte hergestellt, die das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) codierende *uidA*-Gen unter der Kontrolle des *AtZR1*-, *AtZR2*- bzw. *AtZR3*-Promotors enthalten (Kapitel 2.3.4.5). Mit diesen Konstrukten wurden *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps *Col-0* stabil transformiert. Je Konstrukt wurden mindestens 5 unabhängige Transformanten erzielt und in der 2. und 3. Generation durch Färbung mit X-Gluc (2.2.8) bezüglich ihrer GUS-Expression untersucht. Die transgenen *Arabidopsis*-Linien wurden analog zu den transformierten Konstrukten als *pAtZR1:GUS*, *pAtZR2:GUS* und *pAtZR3:GUS* bezeichnet. Als Referenz diente die *Arabidopsis*-Linie N6153 des Ökotyps *No-0*, die das *uidA*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors<sup>2</sup> exprimiert.

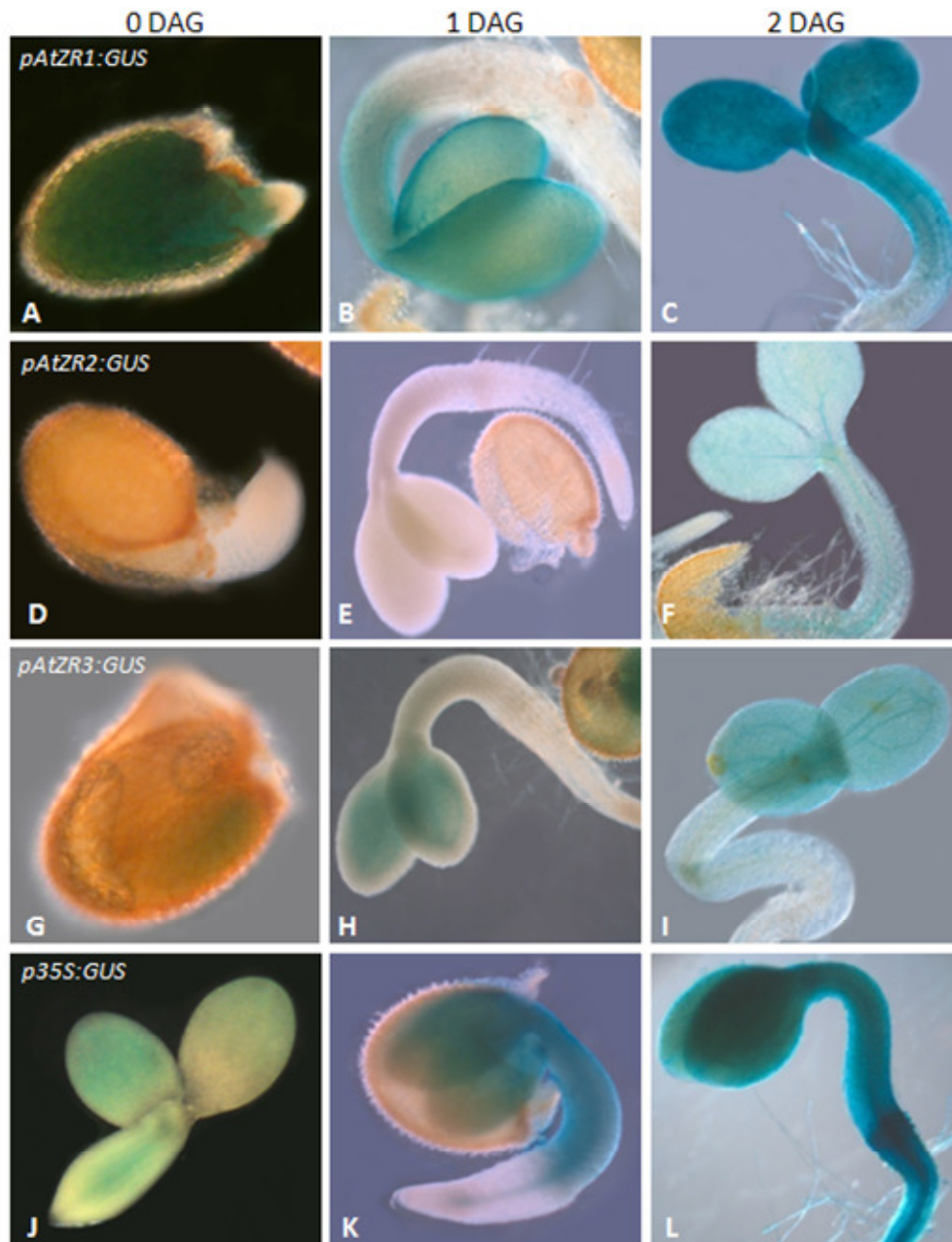
#### 4.3.1 Differenzielle Aktivität der *AtZR1*-, *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotoren während der Keimung in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* wies der *AtZR1*-Promotor während der Keimung und in der frühen Keimlingsentwicklung eine besonders starke Aktivität auf, die sich im Wesentlichen auf das Hypocotyl und die Cotyledonen der Sämlinge beschränkte (Abb. 4-10 A-C). In *pAtZR2:GUS*-Keimlingen war hingegen am Tag der Keimung und auch am Folgetag (1 DAG<sup>3</sup>) keine GUS-Expression detektierbar. Erst 2 Tage nach der Keimung ließ sich die *AtZR2*-Promotoraktivität mittels X-Gluc im Hypocotyl und in den Cotyledonen der Keimlinge nachweisen (Abb. 4-10 D-F).

---

<sup>2</sup> 35S-Promotor des Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV)

<sup>3</sup> DAG: days after germination (Tage nach der Keimung)



**Abb. 4-10: Promotor-spezifische GUS-Expression in *Arabidopsis* 0, 1 und 2 Tage nach Keimung**  
*Arabidopsis*-Saat wurde auf MS-Medium ohne Sucrose ausgelegt und unter Langtag-Bedingungen kultiviert. Samen bzw. Keimlinge wurden nach 2 Tagen (0 DAG), nach 3 Tagen (1 DAG) und nach 4 Tagen (2 DAG) mit X-Gluc gefärbt. Für jeden Zeitpunkt wurden 10-20 Sämlinge analysiert. Pfeil in Abb. G weist auf GUS-Expression im keimenden Embryo hin. Pfeil in Abb. K zeigt GUS-Expression im Zentralzylinder der Wurzel.

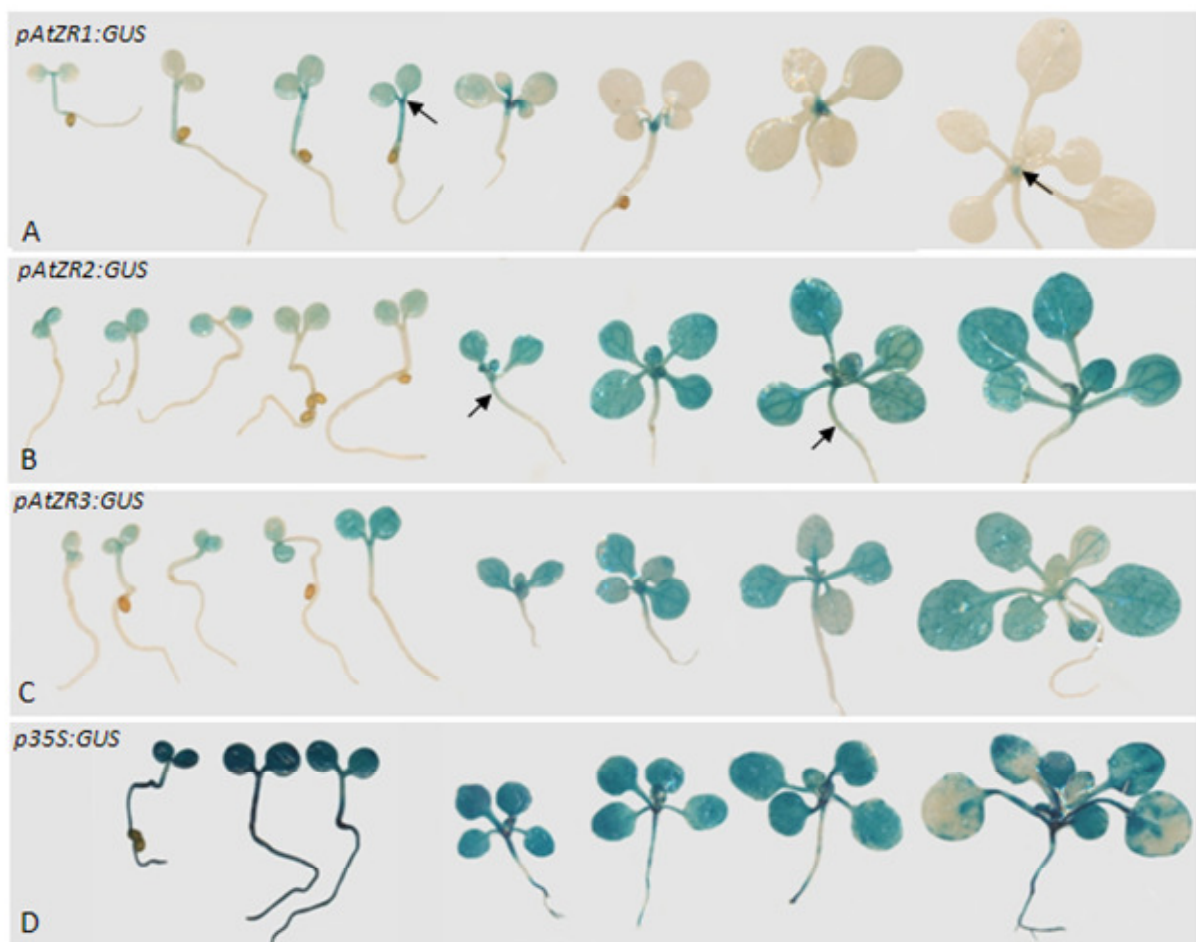
Der *AtZR3*-Promotor war ähnlich wie der *AtZR1*-Promotor bereits während der Keimung aktiv. Allerdings war die GUS-Expression im Vergleich zum *AtZR1*-Promotor wesentlich schwächer und 0 DAG und 1 DAG ausschließlich in den Cotyledonen nachweisbar. Im Verlauf der Keimlingsentwicklung stieg die Aktivität des *AtZR3*-Promotors weiter an, sie blieb aber im Gegensatz zum *AtZR1*- und *AtZR2*-Expressionsmuster hauptsächlich auf die Cotyledonen beschränkt (Abb. 4-10 G-I). Innerhalb der Cotyledonen wies der *AtZR1*-Promotor eine verstärkte



Aktivität im Bereich der Blattränder auf (Abb. 4-10 B), während die GUS-Expression in den *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotor:GUS-Pflanzen in der Blattmitte und im Bereich der Leitbündel am stärksten erschien (Abb. 4-10 H, I, F).

Der konstitutive 35S-Promotor war während der gesamten Keimlingsentwicklung in den Cotyledonen und im Hypocotyl und mit zunehmendem Alter der Sämlinge auch in der Wurzel aktiv (Abb. 4-10 J-L).

#### 4.3.2 Spezifische *AtZR1*-, *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotoraktivität während der Blattentwicklung

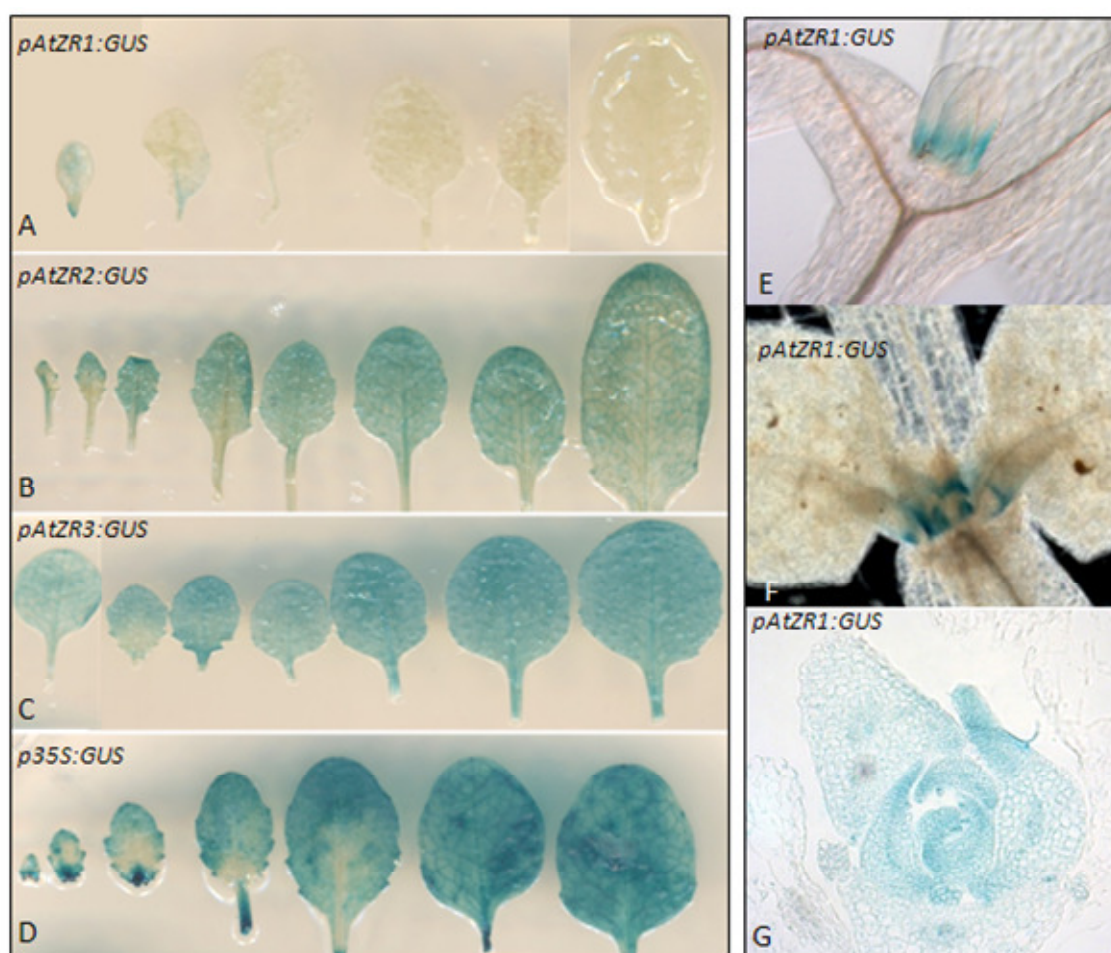


**Abb. 4-11: Promotor-spezifische GUS-Expression in Arabidopsis im Verlauf der Blattentwicklung**

Die GUS-Aktivität in transgenen *Arabidopsis*-Pflänzchen wurde über einen Entwicklungs-Zeitraum von ca. 2 Wochen untersucht. Keimlinge im Cotyledonen-Stadium wurden auf MS-Medium ohne Sucrose angezogen. Für die GUS-Analyse in späteren Entwicklungsstadien wurden die Pflanzen auf Erde angezogen. Das Alter der abgebildeten Keimlinge liegt zwischen 2 DAG (linke Bildseite) und 15 DAG (rechte Bildseite). Pfeile in A markieren das Apikalmeristem, Pfeile in D zeigen auf GUS-Expression im Hypocotyl.

Im Verlauf der Blattentwicklung nahm die Aktivität des *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotors stetig zu (Abb. 4-11 B und C). GUS-Expression war zu allen Entwicklungszeitpunkten im gesamten Blatt (Stiel und Spreite) detektierbar. Darüber hinaus war mit fortschreitender Entwicklung eine geringe *AtZR2*-Promotoraktivität im Hypocotyl der Pflanzen vorhanden. Im Hypocotyl der *pAtZR3:GUS*-Pflanzen wurde, wie schon zum Zeitpunkt der Keimlingsentwicklung, kaum bzw. keine GUS-Expression detektiert (Abb. 4-10; Abb. 4-11).

Der *AtZR1*-Promotor wies im Gegensatz zu den *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotoren ein deutlich anderes Expressionsprofil auf (Abb. 4-11 A). In Keimlingen zeigte der *AtZR1*-Promotor starke Aktivität im Hypocotyl und etwas schwächere Aktivität in den Cotyledonen. Im Zuge des Wachstums nahm die Promotoraktivität in diesen Geweben allerdings deutlich ab und war 8 DAG nicht mehr detektierbar. Mit der Entwicklung der ersten Blätter war hingegen eine vermehrte GUS-Expression im Bereich des Apikalmeristems zu beobachten (Abb. 4-11 A, Pfeile, Abb. 4-12 E-G).



**Abb. 4-12: Promotorspezifische GUS-Expression in *Arabidopsis*-Rosettenblättern**

Abbildung A-D: GUS-Expression in einzelnen Rosettenblättern 2½ -3 Wochen alter *Arabidopsis*-Promotor:GUS-Pflanzen. E-G: GUS-Expression während der Blattentwicklung in *pAtZR1:GUS*-Pflanzen. Entwicklung der Primärblätter 6 DAG (E), Aufsicht auf das Apikalmeristem 8 DAG (F), Schnitt durch das Apikalmeristem 14 DAG (G).

Ein Schnitt durch das Apikalmeristem der *pAtZR1:GUS*-Pflanzen offenbarte eine starke Promotoraktivität im Bereich des Apikalmeristems und der Blattprimordien. In den jungen Blättern war die GUS-Expression primär in der Blattbasis und dem Blattstiel und schwächer in den lateralen Blattbereichen detektierbar (Abb. 4-11 A, Abb. 4-12 E-G). Die Promotoraktivität nahm aber im Laufe der Blattdifferenzierung stetig ab und war in Blättern mit einer Größe über 3 mm nicht mehr durch X-Gluc-Färbung nachweisbar (Abb. 4-12 A).

Während sich die *AtZR1*-Promotoraktivität in erster Linie auf die basalen Bereiche der Blattspreite in jungen Blättern und auf die Blattprimordien beschränkte, waren die *AtZR2*- und *AtZR3*-Promotoren in sehr jungen Blättern verstärkt im Bereich der Blattspitze und später im gesamten Blatt aktiv (Abb. 4-12 B, C). In *p35S:GUS*-Keimlingen und -Pflanzen wurde GUS zu allen Zeitpunkten und in allen untersuchten Organen inklusive der Wurzel stark exprimiert (Abb. 4-11 D, Abb. 4-12 D). Die ungleichmäßige X-Gluc-Färbung der *p35S:GUS*-Pflanzen könnte durch den anderen Ökotyp (*No-0*) dieser Linie verglichen mit den übrigen Promotor:GUS-Linien (Ökotyp *Col-0*) zu erklären sein.

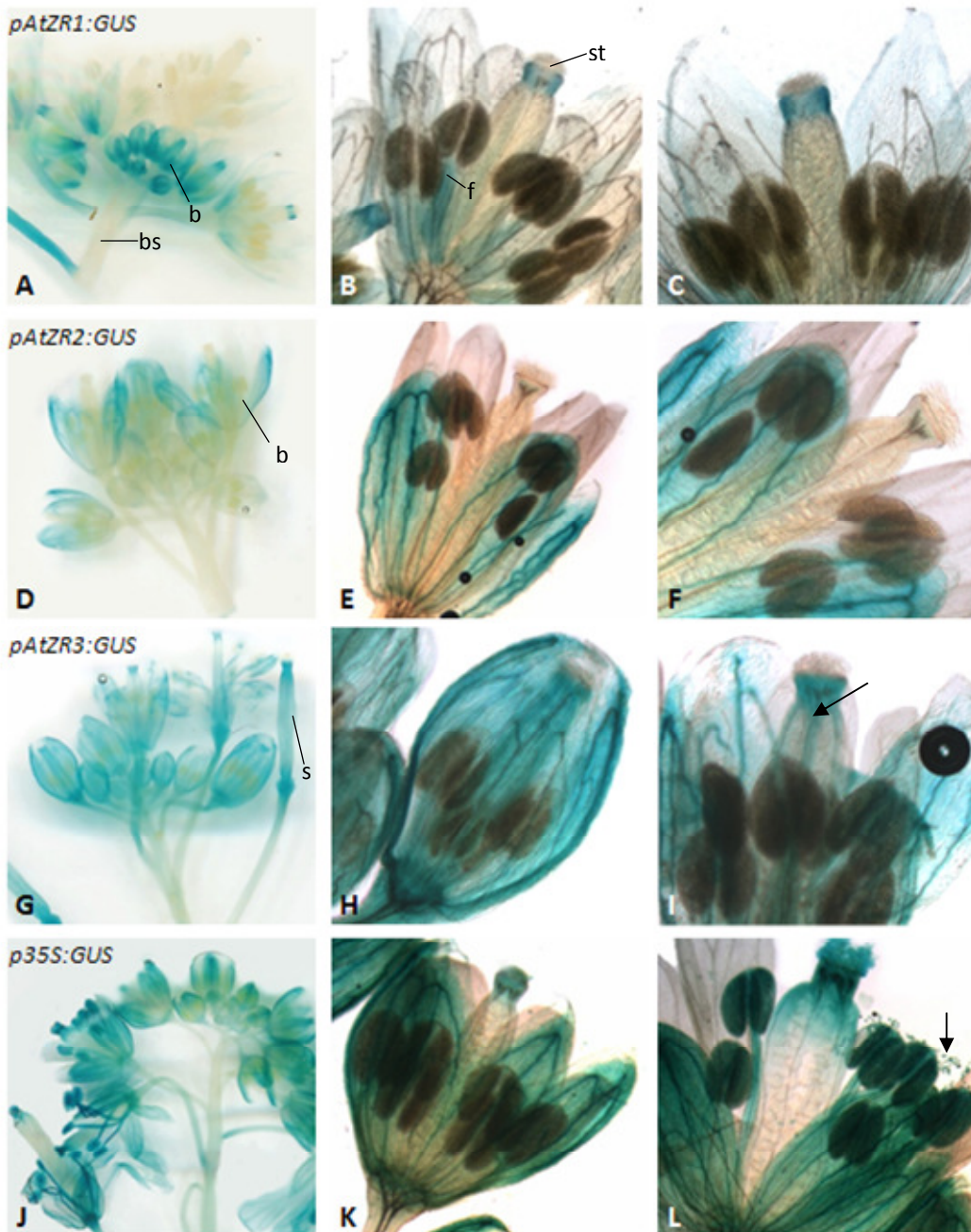
### 4.3.3 GUS-Expression in Infloreszenzen und Blüten

Im den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits gezeigt, dass die Expressionsprofile der *AtZR1*-, *AtZR2*-, und *AtZR3*-Promotoren gewebe- und entwicklungspezifische Unterschiede aufweisen. Diese Unterschiede sind anhand der GUS-Expression in den Infloreszenzen der *Arabidopsis*-Promotor:GUS-Pflanzen besonders deutlich erkennbar (Abb. 4-13).

Wie schon während der Blatentwicklung deutlich wurde, ist der *AtZR1*-Promotor vor allem in jungen Geweben aktiv. Auch während der Blütenentwicklung war die *AtZR1*-Promotoraktivität in den jungen, im Wachstum befindlichen Blüten besonders stark, während in den alten ausdifferenzierten Blüten kaum oder keine GUS-Aktivität zu finden war (Abb. 4-13 A). Man beobachtete hingegen eine zunehmende GUS-Expression in den Blütenstielen älterer Blüten. Diese Stiele durchlaufen während der Schotenentwicklung eine Wachstumsphase.

Abb. 4-13 B und C zeigen eine *pAtZR1:GUS*-Blüte im Detail. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung war die GUS-Expression besonders in den Filamenten der Stamina und im Stylus des Pistills und schwach in den Sepalen der Blüte detektierbar.

Die *AtZR2*-Promotoraktivität ist der des *AtZR1*-Promotors gewissermaßen entgegengesetzt (vgl. Abb. 4-13 A und D). Während in jungen *pAtZR2:GUS*-Blüten keine GUS-Expression nachweisbar war, wurde GUS in älteren Blüten deutlich, jedoch ausschließlich in den Sepalen exprimiert (Abb. 4-13 E, F).



**Abb. 4-13: Promotor-spezifische GUS-Expression in Infloreszenzen und Blüten**

X-Gal gefärbte Infloreszenz (A), Blüte (B) und Detailansicht der Blüte (C) einer *pAtZR1:GUS*-Pflanze und die entsprechenden Ansichten einer *pAtZR2:GUS*-Pflanze (D-F), einer *pAtZR3:GUS*-Pflanze (G-I) und einer *p35S:GUS*-Pflanze (J-L). b: junge Blüte, bs: Blütenstengel, s: Schote, f: Filament, st: Stylus. Pfeil in I markiert das Leitgewebe des Pistills, Pfeil in L zeigt GUS-gefärbten Pollen.

Der *AtZR3*-Promotor war zu jedem Zeitpunkt der Blütenentwicklung und darüber hinaus auch in jungen Schoten und im distalen Bereich der Schotenstengel aktiv (Abb. 4-13 G). Auch Innerhalb der Blüte wies der *AtZR3*-Promotor im Vergleich zum *AtZR1*- und *AtZR2*-Promotor das breiteste Expressionsspektrum auf (Abb. 4-13 H, I). GUS-Aktivität ließ sich in jungen und

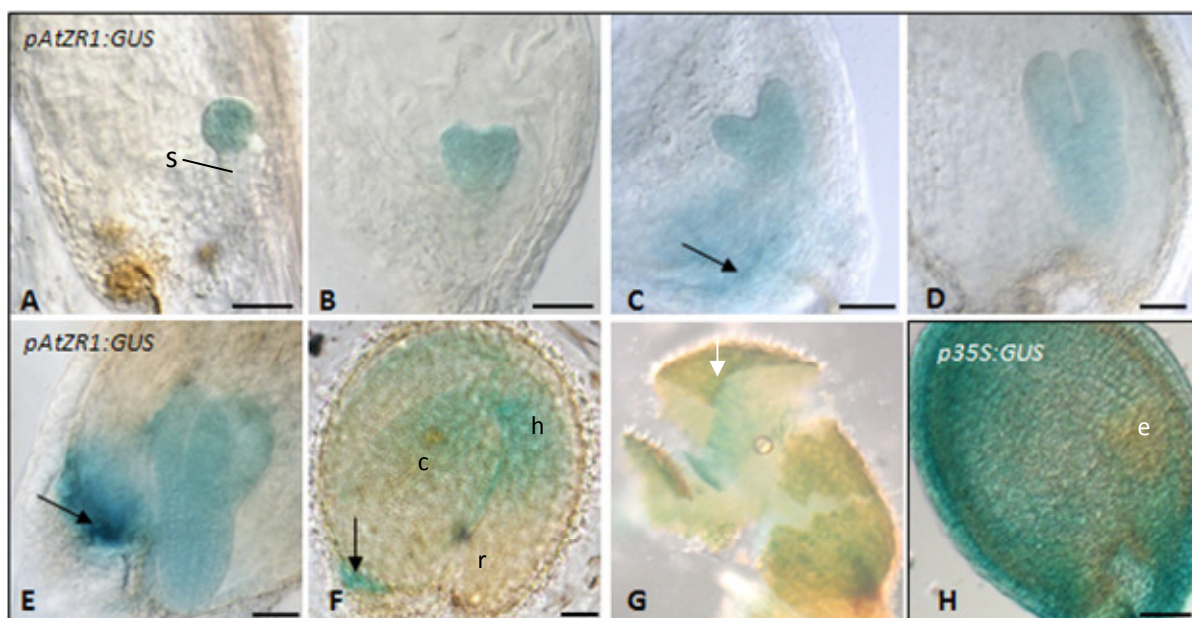


alten Blüten deutlich in den Sepalen, im Stigma, im gesamten Leitgewebe des Pistills und in den Filamenten der Stamina nachweisen (Abb. 4-13 I).

Als Referenz wurden Infloreszenzen der *p35S:GUS*-Pflanze analysiert. Der Promotor wies bei Blüten, wie schon in den vorhergegangenen Untersuchungen, eine starke Expression in jungen und alten Stadien sowie in Schoten auf (Abb. 4-13 J-L). Im Gegensatz zu den *ZR*-Promotoren war er unter anderem auch in den Antheren, in Pollen (Pfeil Abb. 4-13 L) und im Narbengewebe aktiv.

#### 4.3.4 Der *AtZR1*-Promotor ist während der Embryogenese aktiv

Die Promotoraktivität von *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* während der Samenentwicklung wurde ebenfalls untersucht. In den Samen von *pAtZR1:GUS*-Pflanzen wurde zu allen Zeitpunkten der Entwicklung GUS-Expression detektiert, die sich in erster Linie auf den Embryo und das Endosperm am Chalaza-Pol des Samens (Abb. 4-14) beschränkt. Während der Embryogenese war der *AtZR1*-Promotor gleichmäßig in allen Teilen des Embryos, aber nicht im Suspensor aktiv (Abb. 4-14 A-E). In den Embryonen reifer *pAtZR1:GUS*-Samen konzentrierte sich die GUS-Expression hingegen auf die basalen und lateralen Bereiche der Cotyledonen und den apikalen Bereich des Hypocotyls. In der Radicula war keine GUS-Expression detektierbar (Abb. 4-14 F). Dieses Expressionsmuster korreliert mit der *AtZR1*-Promotoraktivität während der Keimung (vgl. Abb. 4-10 A).



**Abb. 4-14: *AtZR1*-Promotoraktivität während der Samen- und Embryoentwicklung in *Arabidopsis***  
 A-G: X-Gluc gefärbte Samen einer *pAtZR1:GUS*-Pflanze zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Entwicklungsstadien der Embryonen: Globulär (A), frühes Herzstadium (B), spätes Herzstadium (C), frühes Torpedostadium (D), Torpedostadium (E), reifer Embryo (F), Samenhülle nach der Keimung (G). H: Samen einer *p35S:GUS*-Pflanze mit Embryo im Herzstadium. Schwarze Pfeile: Chalaza-Endosperm. Weißer Pfeil: Einschichtige Endospermschicht. e: Embryo, c: Cotyledon, h: Hypocotyl, r: Radicula, s: Suspensor. Balken entspricht 50 µm.

Das Endosperm am Chalaza-Pol des Samens unterscheidet sich vom restlichen Endosperm, da es im Zuge der Entwicklung nicht zellularisiert, sondern in Form einer multinukleären Zyste vorliegt und für die Nährstoffversorgung des Embryos verantwortlich ist. Im Chalaza-Endosperm der *pAtZR1:GUS*-Samen wurde während der frühen Samenentwicklung (Abb. 4-14 C, Pfeil) eine mäßig starke GUS-Expression wahrnehmbar, die im Laufe der Entwicklung weiter anstieg (Abb. 4-14 E, F). Im Zuge der Samenentwicklung wird das Endosperm in *Arabidopsis* weitgehend abgebaut, sodass es den Embryo schließlich nur noch als einzellige Schicht umgibt. In dieser Zellschicht war der *AtZR1*-Promotor zumindest während der Keimung (Abb. 4-14 G, weißer Pfeil) ebenfalls aktiv.

Während der Samenentwicklung wurde ausschließlich *AtZR1*-Promotoraktivität nachgewiesen. In den Samen der *pAtZR2:GUS*- und *pAtZR3:GUS*-Pflanzen war zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung GUS-Expression detektierbar, von der *AtZR3*-Promotoraktivität im keimenden Sämling einmal abgesehen (Abb. 4-10 G). Der *35S*-Promotor war hingegen im gesamten Samen aktiv (Abb. 4-14 H).

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so wird deutlich, dass der *AtZR1*-Promotor im Wesentlichen während des Wachstums und der Differenzierung aktiv ist, während *AtZR2*-Promotoraktivität primär in ausdifferenzierten Geweben, insbesondere in Blättern zu finden ist. Dieses Resultat deckt sich mit den Beobachtungen aus Gerste (MÜLLER, 2004).

Der *AtZR3*-Promotor zeigte insgesamt das am wenigsten spezifische Expressionsprofil, da er ebenso in jungen Geweben und während der Keimung als auch in ausdifferenzierten Blättern und Blüten aktiv war.

Sowohl das *AtZR1* als auch das *AtZR2* codieren für ein plastidäres *Zinc Ribbon*-Protein. Aufgrund des gegensätzlichen Expressionsmusters ist es vorstellbar, dass sich die Gene entwicklungsabhängig in ihrer Funktion komplementieren.

Das *AtZR3* tritt hingegen als einziger Vertreter der *Zinc Ribbon*-Proteine in Mitochondrien auf und zeigt ein überwiegend konstitutives Expressionsmuster.

## 4.4 Charakterisierung von *AtZR1*-, *AtZR2*- und *AtZR3*-T-DNA-Insertionslinien in *Arabidopsis thaliana*

Alle bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass *AtZR1* und *AtZR2* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung eine Funktion in den Plastiden erfüllen, die möglicherweise mit der plastidären Transkription im Zusammenhang steht. Weiterhin ist anzunehmen, dass das *AtZR3* eine vergleichbare Funktion in den Mitochondrien ausübt. Um Hinweise auf die genaue Funktion der ZR-Proteine zu erlangen, wurden *AtZR1*-, *AtZR2*- und *AtZR3*-T-DNA-Insertionslinien aus *Arabidopsis* molekularbiologisch und phänotypisch charakterisiert.

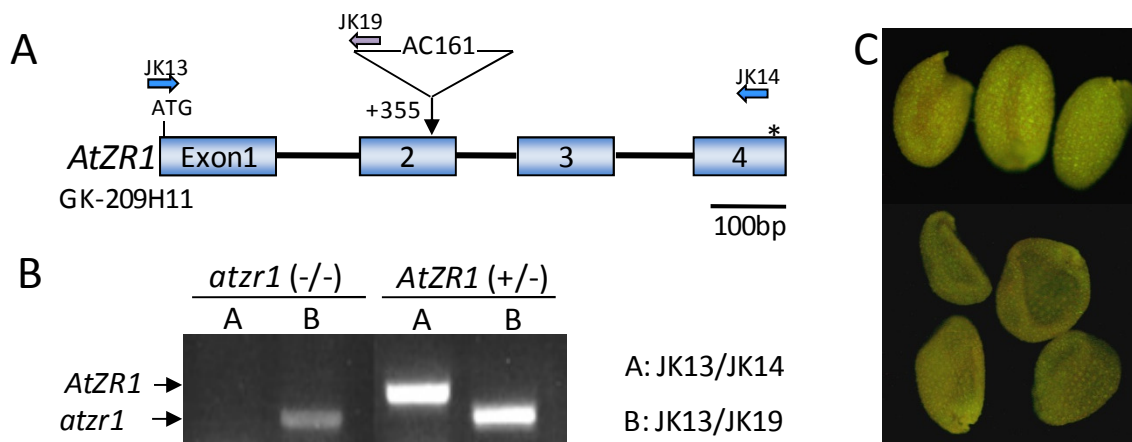
### 4.4.1 Charakterisierung der *atzr1*-Knockout-Linie GK-209H11

Beim *AtZR1* handelt es sich um das *Etched1*-homologe Gen aus *Arabidopsis thaliana*. In Mais führt der Verlust des *ZmET1* zu einem pleiotropen Phänotyp, der sowohl die Korn- als auch die Keimlingsentwicklung betrifft (vgl. Kapitel 2.3). Die Analyse einer *atzr1*-T-DNA-Insertionsmutante soll nun aufklären, ob der Verlust des *AtZR1* in *Arabidopsis* vergleichbare Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanze hat.

Die T-DNA-Insertionslinie GK-209H11 entstammt der *GabiKat*-Kollektion (Rosso *et al.*, 2005). Eine Genotypisierung dieser Linie wurde bereits in der Arbeit von KRUSE (2004) begonnen. Mittels PCR und Southernblot-Analysen wurde gezeigt, dass die Linie GK-209H11 nur eine T-DNA im 2. Exon des *AtZR1*-Locus enthält. Allerdings wurden im Rahmen der Arbeit von Kruse keine homozygoten *atzr1*-Pflanzen identifiziert. Das Saatgut heterozygoter Pflanzen zeigte einen segregierenden Phänotyp:  $\frac{3}{4}$  der Samen glichen Wildtyp-Saatgut, diese Samen keimten normal aus und spalteten im Verhältnis 1:2 in Wildtypen (*AtZR1/AtZR1*) und heterozygote *AtZR1/atzr1*-Pflanzen auf. Ein Viertel der Samen war hingegen stark kollabiert und keimte nicht. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelte es sich bei diesen Samen um homozygote *atzr1*-Saat (Abb. 4-15 C).

Zur möglichen Identifikation einer homozygoten *atzr1*-Mutante wurden daher im Rahmen dieser Arbeit eine größere Menge der kollabierten Samen unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium mit 3 % Sucrose ausgelegt. Nach etwa 2 Wochen unter Langtagbedingungen keimten etwa 10 % der Samen und entwickelten sich zu Sämlingen. Die PCR-Analyse zur Bestimmung des Genotyps zeigte, dass es sich bei diesen Keimlingen tatsächlich um homozygote *atzr1*-Mutanten handelte, da sich in diesen Pflanzen lediglich das Mutanten-Allel (*atzr1*) nachweisen ließ (Abb. 4-15 B). In heterozygoten *atzr1*-Pflanzen wurde hingegen sowohl das Mutanten- als auch das Wildtyp-Allel (*AtZR1*) amplifiziert. Um den genauen Integrationsort der T-DNA zu bestimmen, wurde das *atzr1*-PCR-Produkt sequenziert.

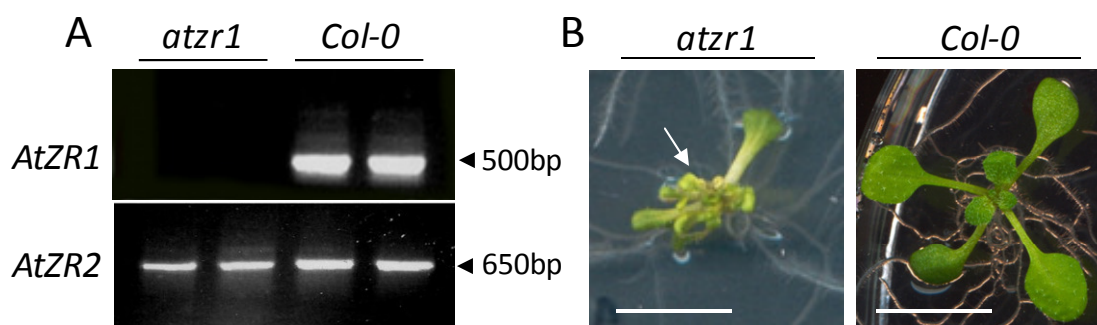
Demnach inseriert die T-DNA im zweiten Exon des *AtZR1*-Gens, 355 Basenpaare stromabwärts des Translationsstarts (Abb. 4-15 A).



**Abb. 4-15 Genotypische Charakterisierung der *AtZR1*-T-DNA-Insertionslinie GK-209H11.**

A) Schematische Darstellung des *AtZR1*-Gens. Exons sind als Boxen, Introns als Linien dargestellt. Translationsstart (ATG) und Translationsstop (\*) sowie der Insertionsort der T-DNA (AC161) sind ebenso eingezeichnet wie die Primer (JK13/JK14/JK19 vgl. A 1), die für die Genotypisierung der T-DNA-Linie verwendet wurden. UTR-Bereiche des *AtZR1* sind nicht bekannt. B) Genomische PCR einer homozygoten und einer heterozygoten *atzr1*-Insertionsmutante. Zum Nachweis des *AtZR1*-Allels wurden die Primer JK13 und JK14 verwendet, das *atzr1*-Allel wurde mit den Primern JK13 und JK19 amplifiziert. C) Saat einer heterozygoten *atzr1*-Insertionsmutante. Runde Samen (oben) und kollabierte Samen (unten) traten im Verhältnis 3:1 auf (KRUSE, 2004).

Die T-DNA-Insertion im 2. Exon des *AtZR1*-Gens führt erwartungsgemäß zum vollständigen Verlust eines intakten *AtZR1*-Transkripts. Der 500 bp große *AtZR1*-ORF ließ sich mittels RT-PCR lediglich aus der cDNA von *Col-0* Wildtyp-Pflanzen amplifizieren. In den untersuchten *atzr1*-Mutanten war ein vergleichbares Amplifikat nicht nachweisbar. Das *AtZR2*-Transkript diente als Referenz und wurde gleichmäßig in Wildtypen und Mutanten detektiert (Abb. 4-16 A).



**Abb. 4-16 Der *atzr1*-Knockout resultiert in einem deutlichen Phänotyp**

A) Der Verlust des vollständigen *AtZR1*-Transkripts in *atzr1*-Pflanzen wurde mittels RT-PCR gezeigt (Primer: JK13/JK14). Als Referenz wurde der *AtZR2*-ORF amplifiziert (Primer: JK66/JK67).

B) Eine 3 Wochen alte *atzr1*-Mutante im Vergleich zu einem 2 Wochen alten Wildtyp. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen auf MS 3 % Sucrose angezogen. Der Maßstabballen entspricht 1 cm.



Der Verlust des *AtZR1*-Transkripts resultiert in einem deutlichen Mutantenphänotyp (Abb. 4-16 B). Neben der bereits erwähnten stark reduzierten Keimungsrate zeigen homozygote *atzr1*-Mutanten eine deutlich verzögerte Entwicklung und einen zwergenhaften Wuchs. Die Pflänzchen entwickeln eine erhöhte Zahl an extrem kleinen und blassen Rosettenblättern (Pfeil, Abb. 4-16 B).

Die *atzr1*-Knockout-Pflanze zeigt, ebenso wie die *et1*-Mutante aus Mais, einen pleiotropen Phänotyp während der Samen- und Keimlingsentwicklung. Einer umfassenden Analyse des *atzr1*-Mutantenphänotyps soll daher ein eigenes Kapitel (4.5) gewidmet werden.

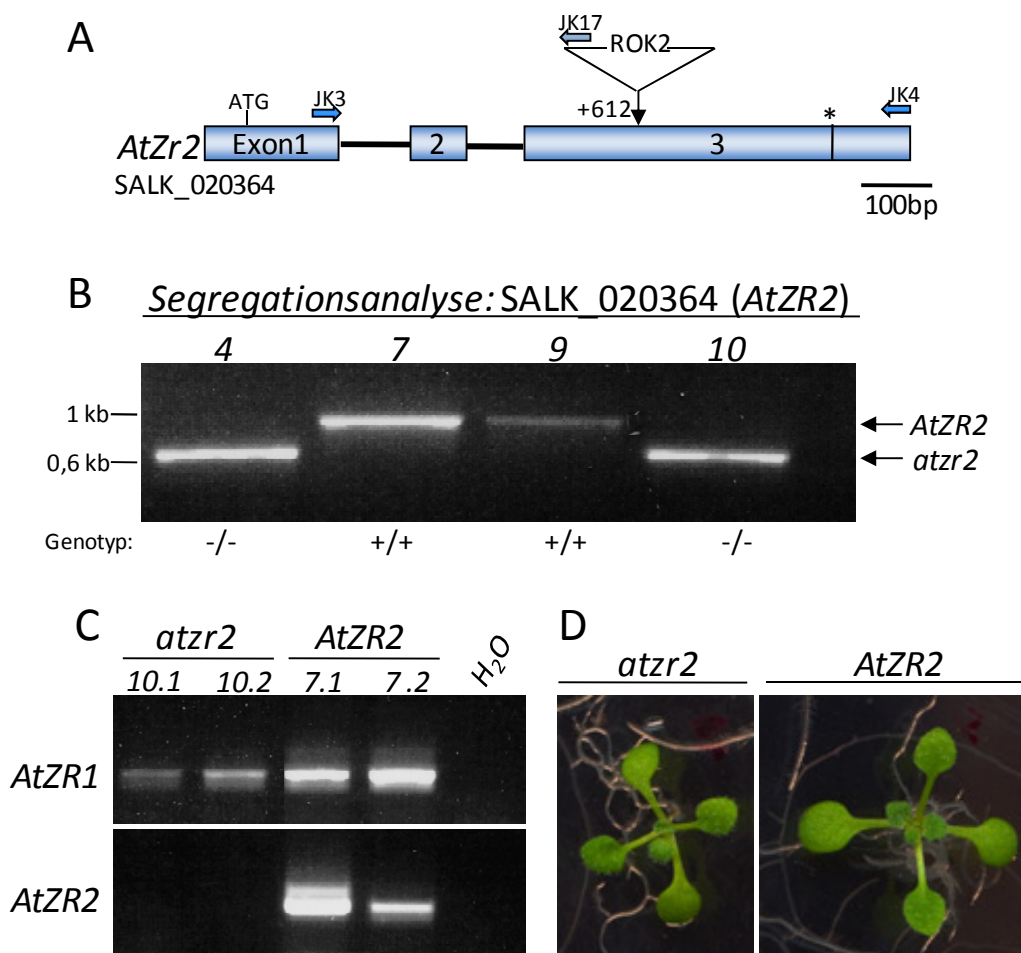
#### 4.4.1.1 Charakterisierung weiterer *atzr1*-T-DNA-Insertionslinien

Anhand des *T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool* (ALONSO *et al.*, 2003) wurden weitere potentielle *atzr1*-T-DNA-Insertionsmutanten identifiziert. Zwei Linien aus der *WiscDsLox*-T-DNA-Kollektion (University of Wisconsin, USA), *WiscDsLox345-348L9* und *WiscDsLox363-D04*, wurden daraufhin näher analysiert. Nachkommen dieser Linien, die hinsichtlich der T-DNA-Insertion als homozygot identifiziert wurden, zeigten jedoch keinen Mutantenphänotyp. Die genauere Bestimmung der T-DNA-Insertion ergab für beide Linien eine Integration im *AtZR1*-Promotor etwa 200-300 bp stromaufwärts des Startcodons (Daten nicht gezeigt). Da aus vorangegangenen Arbeiten bereits bekannt war, dass sich eine T-DNA-Insertion im proximalen Promotorbereich eines Gens nicht zwingend auf dessen Expression auswirkt (KRUSE, 2004), wurde von einer weiteren Charakterisierung der Linien abgesehen.

#### 4.4.2 Charakterisierung der *atzr2*-Knockout-Linie SALK\_020364

Die *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinie SALK\_020364 der *Salk Collection* (ALONSO *et al.*, 2003) enthält mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine T-DNA-Insertion im codierenden Bereich des *AtZR2*-Gens und wurde daher näher charakterisiert. *AtZR2* codiert ebenso wie *AtZR1* für ein plastidäres *Zinc Ribbon*-Protein. Promotoranalysen zeigten, dass das *AtZR2* und *AtZR1* gegensätzlich exprimiert werden (Kapitel 4.3).

Im Gegensatz zur *atzr1*-Mutante zeigen die segregierenden Nachkommen der heterozygoten *AtZr2*-T-DNA-Insertionsmutante keinen Samenphänotyp. Unter den Nachkommen konnten mittels genomischer PCR zwei homozygote *atzr2*-Nachkommen (Nr. 4 und 10) identifiziert werden. In diesen Pflanzen ließ sich ausschließlich das Knockout-Allel *atzr2*, aber nicht das Wildtyp-Allel (*AtZR2*) amplifizieren (Abb. 4-17 B). Der *atzr2*-Knockout-Genotyp in den Nachkommen der *atzr2*-Pflanzen 4 und 10 wurde außerdem mittels Southernblot-Analyse bestätigt. Der Southernblot bestätigte ebenfalls das Vorhandensein einer einzigen T-DNA-Integration in den untersuchten Pflanzen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4-17: Charakterisierung der *AtZR2*-T-DNA-Insertionslinie SALK\_020364**

A) Schematische Darstellung des *AtZR2*-Gens. Exons sind als Boxen, Introns als Linien dargestellt. Translationsstart (ATG) und Translationsstop (\*), der Insertionsort der T-DNA (ROK2) und die Primer (JK3/JK4/JK17 vgl. A 1), die für die Genotypisierung der T-DNA-Linie verwendet wurden, sind eingezeichnet. B) Multiplex-PCR mit 3 Primern (JK3/JK4/JK17) zur Identifikation homozygoter *atzr2*-Insertionsmutanten. Dabei wird das *AtZR2*-Allel (+) mit den Primern JK3/JK4 und das *atzr2*-Allel (-) mit den Primern JK3/JK17 in derselben PCR-Reaktion amplifiziert. C) Der Verlust des *AtZR2*-Transkripts in der *atzr2*-T-DNA-Linie wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (*AtZR2*-ORF: Primer JK66/JK67). Als Referenz wurde der *AtZR1*-ORF (Primer JK13/JK14) amplifiziert. D) Vergleich einer 2 Wochen alten *atzr2*-Knockout-Pflanze mit einer Wildtyp-Pflanze gleichen Alters. Die Pflanzen wurden auf MS-Medium mit 3 % Sucrose im Langtag angezogen.

Der exakte Insertionsort der T-DNA wurde durch die Sequenzierung des *atzr2*-PCR-Produkts bestimmt. Da die T-DNA im dritten Exon des *AtZR2*-Gens, 612 bp hinter dem Transkriptionsstart inseriert, ist davon auszugehen dass das Gen nicht mehr funktionell ist (Abb. 4-17 A). Tatsächlich ließ sich das vollständige *AtZR2*-Transkript mittels RT-PCR nicht in den *atzr2*-Knockout-Pflanzen, aber in *AtZR2*-Wildtypen nachweisen. Das *AtZR1*-Transkript, das hier als Referenz dient, ließ sich hingegen aus *atzr2*- und *AtZR2*-Pflanzen amplifizieren (Abb. 4-17 C).

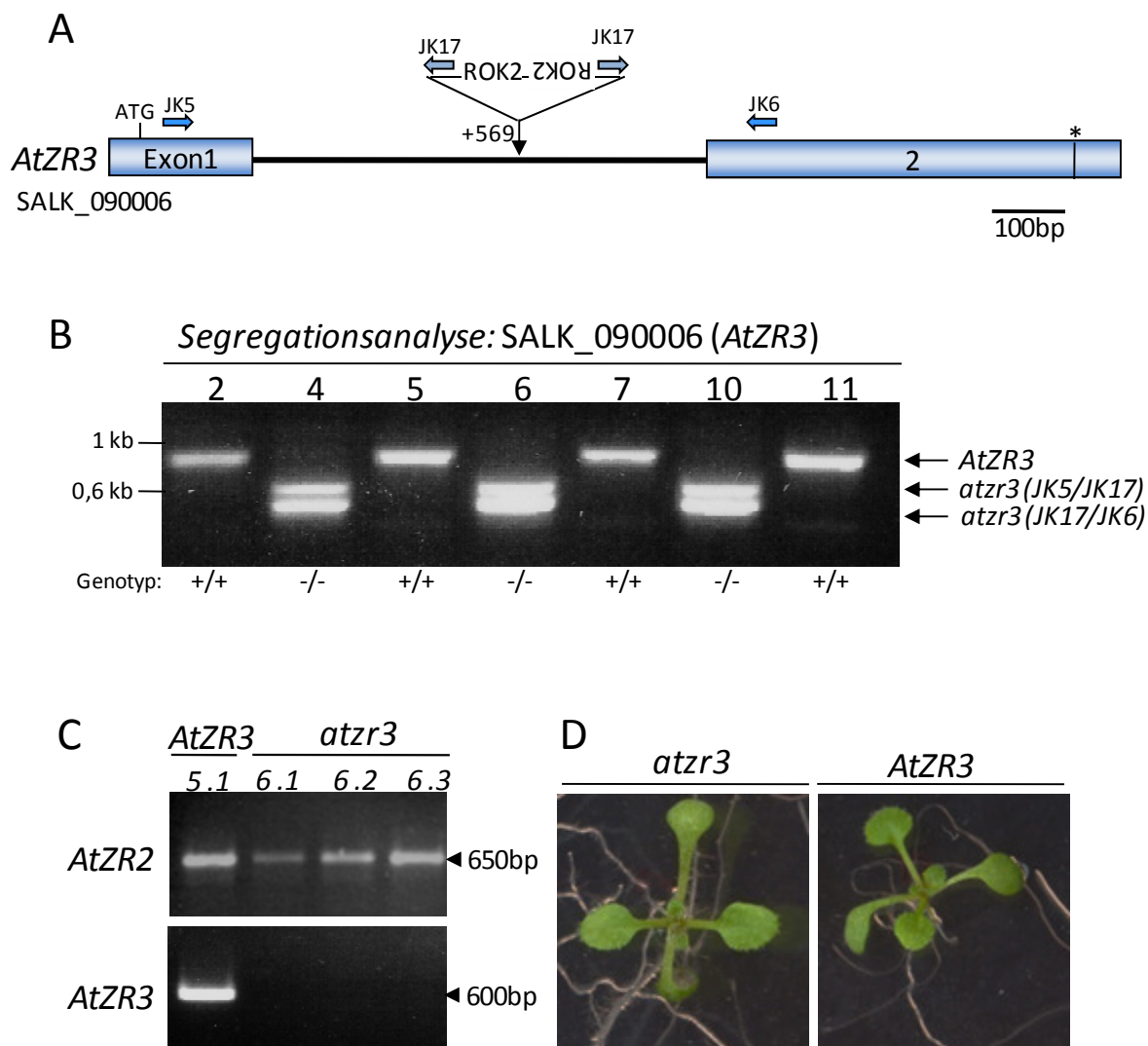
Anders als der *atzr1*-Knockout resultiert der Verlust des *AtZR2* in den *atzr2*-Mutanten in keinem offensichtlichen Phänotyp. Es wurden lediglich Hinweise auf eine minimale Wachstumsverzögerung der *atzr2*-Pflanzen gefunden (Abb. 4-17 D). Das verzögerte Wachstum der *atzr2*-Mutante zeigte sich etwas deutlicher während der Anzucht der Pflanzen auf MS-Medium ohne Sucrose. Nach drei Wochen besaßen *atzr2*-Pflanzen im Durchschnitt 6 Rosettenblätter, während *AtZR2*-Wildtyp Pflanzen bereits 7 Blätter hatten. Die Cotyledonen der Mutante hatten zu diesem Zeitpunkt 90 % der Größe des Wildtyps erreicht, das älteste Blatt, Blatt 1, war hingegen durchschnittlich um 30 % kleiner als im Wildtyp, das jüngste Blatt, Blatt 6, war sogar um 75 % kleiner. Etiolierte *atzr2*-Keimlinge entwickelten sich nach der Rückkehr ins Licht im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls verzögert.

#### 4.4.3 Charakterisierung der *atzr3*-Knockout-Linie SALK\_090006

Das *AtZR3* ist als einziges der drei ZR-Proteine in *Arabidopsis* in den Mitochondrien lokalisiert. In der Hefe ist der Knockout des *AtZR3*-homologen HEP1-Proteins letal (vgl. Kapitel 2.7). Um zu untersuchen, wie sich der Verlust des *AtZR3* auf die Entwicklung von *Arabidopsis* auswirkt, wurde die T-DNA-Insertionslinie SALK\_090006 charakterisiert, die mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine T-DNA-Insertion im *AtZR3*-Gen besitzt.

Zunächst wurde der Genotyp der Nachkommen aus der heterozygoten *AtZR3*-T-DNA-Linie, wie zuvor bei der Charakterisierung der *atzr2*-Linie, mittels genomischer PCR unter Verwendung von drei Primern (zwei genspezifische und einem T-DNA-spezifischer Primer) bestimmt. Unter den sieben analysierten Nachkommen befanden sich 3 homozygote *atzr3*-Pflanzen (-/-; 4, 6, 10) und vier *AtZR3*-Wildtypen (+/+; 2, 5, 7, 11) aber erstaunlicherweise keine heterozygoten (+/-) Pflanzen (Abb. 4-18 B). In den Nachkommen homozygoter *atzr3*-Pflanzen wurde der Verlust des *AtZR3*-Alles mittels Southernblot-Analyse bestätigt. Die Southern-Analyse zeigte außerdem, dass eine T-DNA-Insertion ausschließlich im *AtZR3*-Locus vorliegt (Daten nicht gezeigt).

Die genomische PCR mit den Primern JK5, JK6 und JK17 ergab für das *atzr3*-Allel zwei unterschiedliche Banden. Dies ist damit zu begründen, dass die ROK2-T-DNA mehrfach an derselben Stelle in das *Arabidopsis*-Genom integriert wurde und zwar mindestens einmal in „normaler“ Orientierung und einmal invertiert (Abb. 4-18 A). Der Primer JK17 bindet daher an beiden Enden des T-DNA-Integrats und bildet sowohl mit dem Primer JK5 als auch mit dem Primer JK6 ein PCR-Produkt. Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab, dass die T-DNA im Intron des *AtZR3*, 569 Basenpaare stromabwärts des Transkriptionsstarts inseriert ist. Eine Tandem-Integration mehrerer T-DNAs an einem Locus ist häufig zu beobachten (DE NEVE *et al.*, 1997).



**Abb. 4-18: Genotypische Charakterisierung der *AtZR3*-T-DNA-Insertionslinie SALK\_090006**

A) Schematische Darstellung des *AtZR3*-Gens. Exons sind als Boxen, Introns als Linien dargestellt. Translationsstart (ATG) und Translationsstop (\*), der Insertionsort der T-DNA (ROK2) und die Primer (JK5/JK6/JK17 vgl. A 1), die für die Genotypisierung der T-DNA-Linie verwendet wurden, sind eingezeichnet. B) Genomische PCR mit drei Primern (JK5/JK6/JK17) zur Identifikation homozygoter *atzr3*-Insertionsmutanten (-/-). Das *AtZR3*-Allel (+) wurde mit den Primern JK5/ JK6 amplifiziert, das *atzr3*-Allel (-) wurde sowohl mit den Primern JK5/JK17 als auch mit den Primern JK6/JK17 amplifiziert, da die T-DNA sowohl „normal“ wie auch invertiert integriert vorliegt (vgl. Text). C) Der Verlust des *AtZR3*-Transkripts in der *atzr3*-T-DNA-Linie wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (*AtZR3*-ORF: Primer JK20/JK21). Als Referenz wurde der *AtZR2*-ORF (Primer JK66/JK67) amplifiziert. 5.1 = +/+ Individuum; 6.1, 6.2, 6.3 = -/- Individuen. D) Vergleich einer 2 Wochen alten *atzr3*-Knockout-Pflanze mit einer Wildtyp-Pflanze gleichen Alters. Die Pflanzen wurden auf MS-Medium mit 3 % Sucrose im Langtag angezogen.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass das *AtZR3*-Gen aufgrund der T-DNA-Insertion nicht mehr funktionell ist. In homozygoten *atzr3*-Pflanzen ließ sich im Gegensatz zum Wildtyp kein *AtZR3*-Transkript nachweisen, während das *AtZR2*, das als Referenz diente, in Wildtyp und Mutante nachweisbar war (Abb. 4-18 C). Erstaunlicherweise zeigen zwei

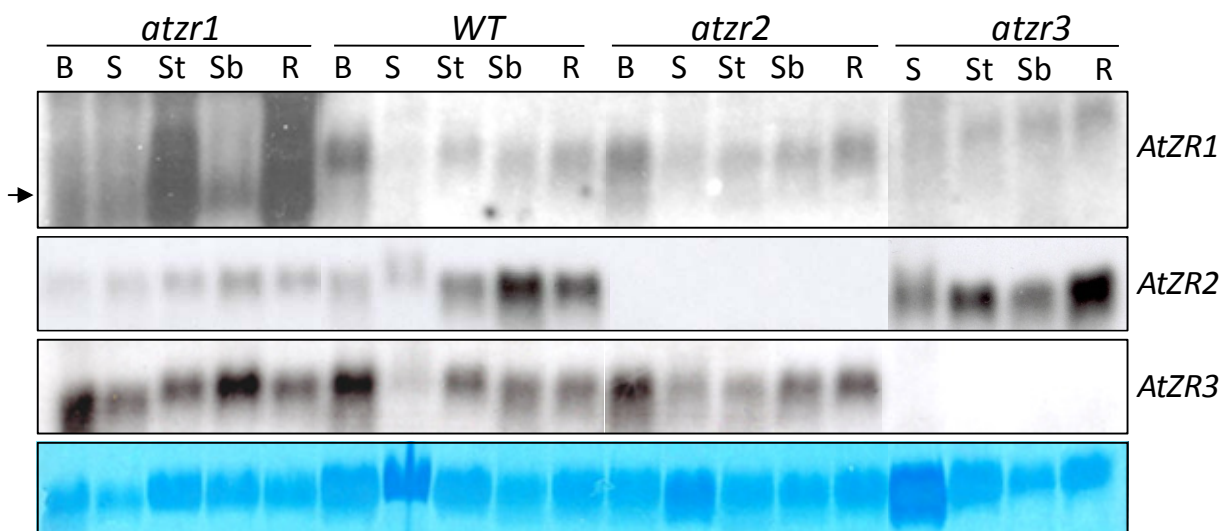
Wochen alte *atzr3*-Keimlinge trotz des vollständigen Verlustes des *AtZR3*-Transkripts im Vergleich zum Wildtyp keinen auffällig veränderten Phänotyp (Abb. 4-18 D).

Die *atzr3*-Mutanten waren auch zu keinem anderen Zeitpunkt ihrer Entwicklung beeinträchtigt.

#### 4.4.4 Expression von *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* in den *T-DNA*-Insertionslinien

Für jedes der drei *Arabidopsis*-Gene *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* wurden homozygote Knockout-Pflanzen identifiziert. Doch während die *atzr1*-Pflanzen einen ausgeprägten Mutantenphänotyp zeigen, unterscheiden sich *atzr2*-Pflanzen kaum und *atzr3*-Pflanzen gar nicht vom Wildtyp. Mittels Northernblot-Analyse sollte nun untersucht werden, ob der Knockout eines *ZR*-Gens Einfluss auf das Expressionsmuster der übrigen beiden *ZR*-Gene nimmt.

Wie die Northernanalyse zeigt, werden *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* in allen untersuchten Geweben (Blüten, Schoten, Stengel, Stengelblätter und Rosettenblätter) exprimiert (Abb. 4-19). In *atzr2*- bzw. *atzr3*-Mutanten ist, wie zu erwarten, kein *AtZR2*- bzw. *AtZR3*-Transkript nachweisbar. In der *atzr1*-Mutante wird mit der *AtZR1*-Sonde ein Transkript detektiert (Abb. 4-19, Pfeil) das aufgrund seiner zu geringen Länge jedoch nicht dem vollständigen *AtZR1*-Transkript entspricht (vgl. Abb. 4-20).



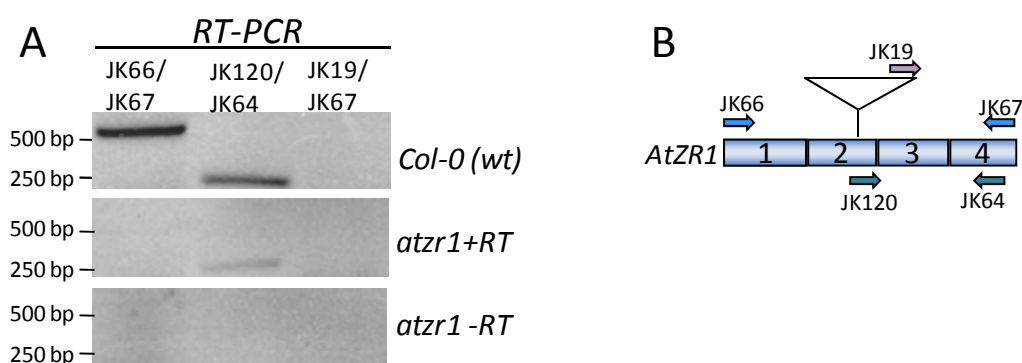
**Abb. 4-19: Northernanalyse der *atzr1*-, *atzr2*- und *atzr3*-Mutante**

Je 15 µg RNA aus Blüten (B), Schoten (S), Stengeln (St), Stengelblättern (Sb) und Rosettenblättern (R) der *atzr1*-, *atzr2*- und *atzr3*-Mutante sowie eines Wildtyps wurden durch Kapillarblot auf eine Membran transferiert und sukzessiv mit radioaktiv markierten *AtZR1*-, *AtZR2*- bzw. *AtZR3*-Sonden beprobt. Als Beladungskontrolle wurde die RNA auf der Membran mit Methylenblau gefärbt.

Der Northernanalyse zufolge wird das *AtZR2*-Gen in der *atzr1*-Mutante schwächer transkribiert als im Wildtyp, während das *AtZR3* in den Stengelblättern der Mutante stärker

exprimiert wird. In der *atzr2*-Mutante ist hingegen weder die Expression des *AtZR1* noch des *AtZR3* beeinflusst. In der *atzr3*-Mutante weist das *AtZR1* das gleiche Expressionsmuster wie im Wildtyp auf, während das *AtZR2* im Stengel und in den Rosettenblättern gegenüber dem Wildtyp verstärkt exprimiert wird. In Wildtyp-Pflanzen weist das *AtZR2* in Stengelblättern die höchste Transkriptmenge auf. Das *AtZR3*-Transkript wird generell besonders stark in Blüten detektiert.

Um zu klären, warum im Northernblot mit der *AtZR1*-Sonde in der *atzr1*-Mutante ein kurzes Transkript detektiert wurde (Abb. 4-19, Pfeil), wurden RT-PCR-Analysen mit verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt (Abb. 4-20). In der *atzr1*-Mutante konnte wie auch im Wildtyp (*Col-0*) mit den Primern JK120/JK64 ein ca. 250 bp langes Fragment aus dem 3'-Bereich des *AtZR1*-Transkriptes amplifiziert werden. Dieser Bereich liegt hinter der T-DNA-Insertion. Der vollständige *AtZR1*-ORF ließ sich hingegen ausschließlich in Wildtyp-Pflanzen nachweisen. Ein chimäres Transkript aus der T-DNA (Primer JK19) und dem 3'-Teil des *AtZR1* (Primer JK67) lies sich unter den gewählten Bedingungen weder in der Mutante noch im Wildtyp nachweisen (Abb. 4-20 Spur JK19/JK67). Ebenso wenig ließ sich ein chimäres Transkript aus der T-DNA und dem 5'-Teil des *AtZR1*-Transkripts amplifizieren (nicht gezeigt). Durch die RT-PCR und die Northernanalyse konnte gezeigt werden, dass in der *atzr1*-Mutante ein verkürztes Transkript aus dem 3'-Bereich des *AtZR1* auftritt. Es kann jedoch nicht für ein funktionelles Protein codieren, da beispielsweise die N-terminale Transitsequenz für die Plastidenlokalisation fehlt.



**Abb. 4-20: RT-PCR zum Nachweis eines fragmentarischen *atzr1*-3'-Transkriptes**

A) Ergebnis der RT-PCR. Mit den Primern JK66/JK67 wurde in (A) der 500 bp lange *AtZR1* ORF amplifiziert, mit den Primern JK120/JK64 (B) wurde ein ca. 250 bp Fragment aus der 3' - Region des *AtZR1* amplifiziert. JK19 bindet in der T-DNA. Als Template wurde Wildtyp (*Col-0*) cDNA, *atzr1*-cDNA (+RT) und als negativ Kontrolle *atzr1*- RNA (-RT) eingesetzt.

B) Schematische Darstellung der *AtZR1*-cDNA. Die in der RT-PCR verwendeten Primer und der Insertionsort der T-DNA sind eingezeichnet.



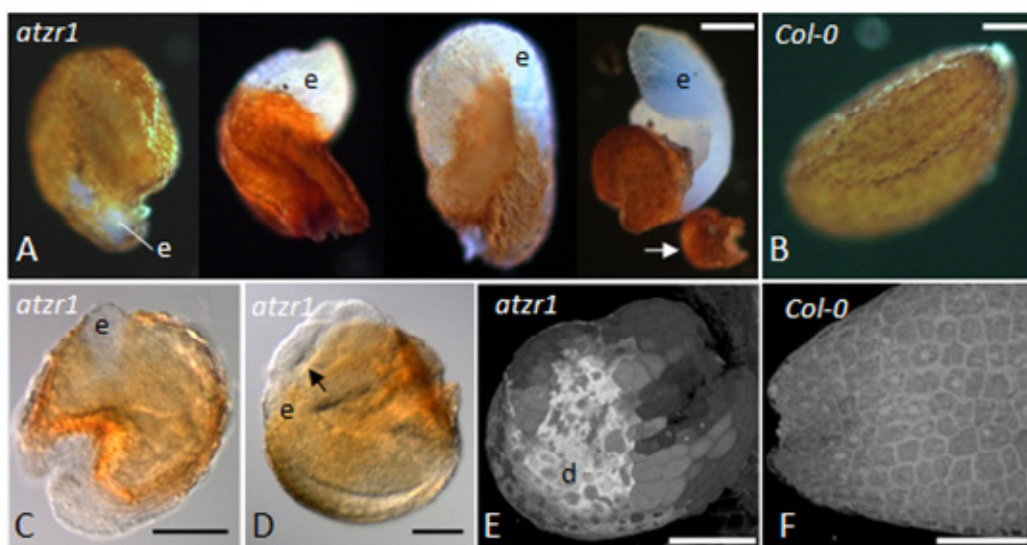
## 4.5 Die *atzr1*-Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp

Im vorangegangenen Kapitel wurden homozygote T-DNA-Insertionsmutanten der *Arabidopsis*-Gene *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* auf molekularer Ebene charakterisiert. Trotz des vollständigen Verlustes des *AtZR3*-Transkripts zeigte die *atzr3*-Mutante äußerlich keine offensichtlichen Veränderungen. Der Verlust des *AtZR2* führte lediglich zu einer minimalen Entwicklungsverzögerung. Nur der Knockout des *AtZR1*-Gens resultierte in einem deutlichen Mutanten-Phänotyp, der sowohl die Samen- als auch die Keimlingsentwicklung betrifft.

### 4.5.1 In der *atzr1*-Mutante sind Samen- und Embryoentwicklung gestört

In Kapitel 4.4 wurde bereits geschildert, dass die Samen heterozygoter *AtZR1*-Knockout-Pflanzen einen aufspaltenden Phänotyp von 3:1 in Wildtypsamen und kollabierte Samen zeigen. Die kollabierten Samen keimen nur zu etwa 10 % aus und wachsen zu homozygoten *atzr1*-Pflanzen heran.

Die homozygoten *atzr1*-Pflanzen setzen generell nur sehr schlecht Saatgut an. Pro Schote fand man in der Regel 1-3 reife Samen und etwa 5-8 Samen, die in ihrer Entwicklung stehen geblieben waren, während Wildtyp-Schoten normalerweise 40-60 Samen enthalten.



**Abb. 4-21: Reife Samen homozygoter *atzr1*-Pflanzen zeigen einen deutlichen Mutanten-Phänotyp**

A) Homozygote *atzr1*-Samen mit unterschiedlich starkem Mutantenphänotyp. e: der Embryo hat die Samenschale durchbrochen. Pfeil: extrem kleine Samenhülle, Embryo fehlt. B) Wildtyp-Samen (*Col-0*). C und D: *atzr1* Samen wurden mit Hoyer's Medium geklärt. e: Embryo. E und F: Oberfläche eines *atzr1*- (E) und eines *Col-0*-Samen (F). 3D-Rekonstruktion aus einem mit dem Konfokalmikroskop aufgenommenen Z-Stapel. d: degenerierte Oberfläche der Testa. Balken entspricht 100  $\mu$ m.

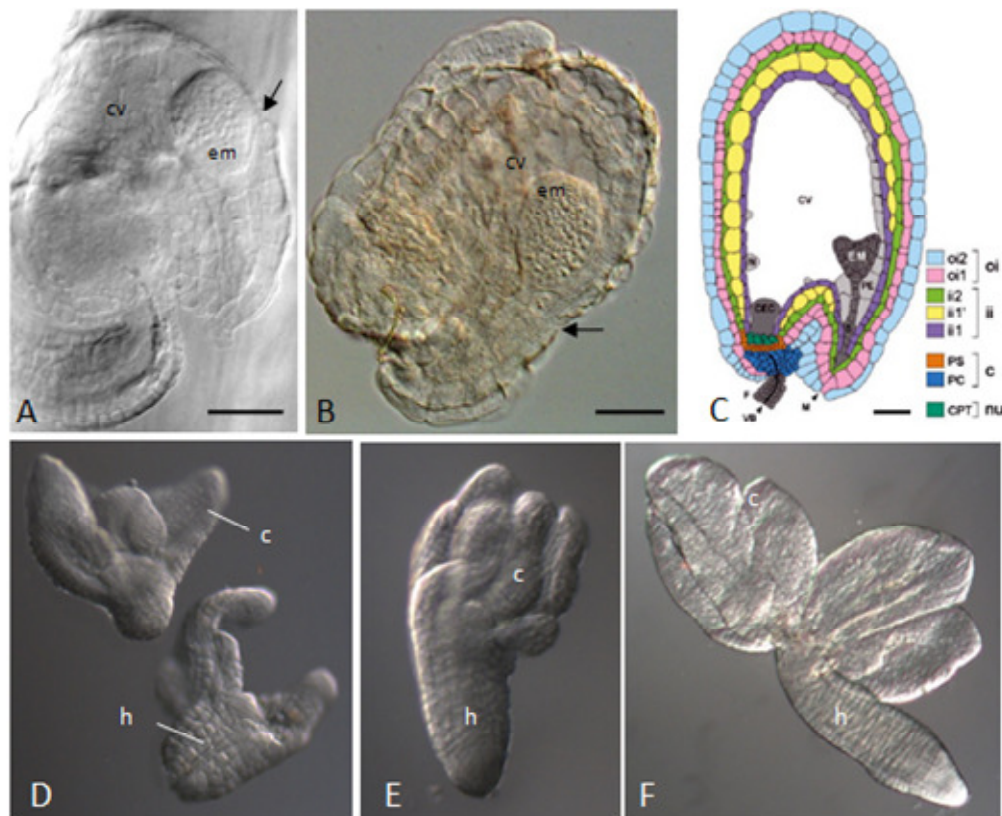
Außerdem zeigten die reifen *atzr1*-Samen homozygoter *atzr1*-Pflanzen einen deutlich stärkeren Mutanten-Phänotyp, als homozygote *atzr1*-Saat aus heterozygoten *AtZR1*-Knockout-Pflanzen (Abb. 4-21 A, C-E).

Insgesamt sind Größe und Form der *atzr1*-Samen sehr heterogen. Für gewöhnlich sind die Samen deutlich kleiner und gestauchter als Samen des Wildtyps und bei etwa der Hälfte der untersuchten Samen hatte der Embryo bereits während der Samenentwicklung die Testa am apikalen Ende durchbrochen (Abb. 4-21 A). Normalerweise verlässt der Embryo die Samenhülle zum Zeitpunkt der Keimung hingegen durch die Mikropyle. Die vorzeitige Keimung der *atzr1*-Embryonen hängt möglicherweise mit einer verminderten Expansion des Samenkorns während der Embryogenese zusammen. Wie man nach Klärung der Samen mit Hoyer's Medium erkennt (Abb. 4-21 C, D), sind die Samen der *atzr1*-Mutante in Relation zum enthaltenen Embryo sehr klein. In Wildtypsamensamen geht die frühe Embryogenese mit einem rapiden Wachstum des gesamten Samenkorns einher, sodass die Samen bereits nach wenigen Tagen nahezu ihre endgültige Größe erreicht haben (Abb. 4-22 C). In der zweiten Phase der Embryogenese nimmt das Embryowachstum dann deutlich zu, sodass der reife Embryo den Samen schließlich vollständig ausfüllt. In der *atzr1*-Mutante füllt der Embryo den Samen jedoch schon im Torpedostadium nahezu komplett aus, sodass die Samenhülle bei einer weiteren Expansion des Embryos aufbricht (Abb. 4-21 C). Aus Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop ließ sich die Oberfläche eines *atzr1*- und eines *Col-0*-Samens rekonstruieren (Abb. 4-21 E und F). Während der Wildtyp-Samen eine gleichmäßige Oberflächenstruktur besitzt (Abb. 4-21 F), ist die äußere Zellschicht der Testa im apikalen Teil des *atzr1*-Samens größtenteils degeneriert. An der Basis des Samens erscheinen die Zellen hingegen intakt zu sein (Abb. 4-21 E). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem verringerten Wachstum der *atzr1*-Samen und den kollabierten Zellen des äußeren Integuments, da diese in der Wachstumsphase nicht mehr expandieren können. Gleichzeitig ist die Samenhülle in den kollabierten Bereichen sehr dünn und kann leicht vom Embryo durchbrochen werden (Pfeile in Abb. 4-22 A, B).

Nicht nur die Entwicklung der äußeren Samenhülle ist durch die *atzr1*-Mutation beeinträchtigt. In den geklärten Samen (Abb. 4-21 C, D) ist deutlich erkennbar, dass sich die *atzr1*-Embryonen ebenfalls nicht normal entwickeln. Der Embryo in Abb. 4-21 C, der sich in seiner Entwicklung schätzungsweise im Torpedostadium befindet, weist im Gegensatz zum Wildtyp eine asymmetrische, dreieckige Form auf und bildet keine Cotyledonen aus. Anhand der Braunfärbung der Testa, die ein Merkmal der Reife ist, lässt sich schlussfolgern, dass die Entwicklung dieses Samens stagniert ist. Andere Embryonen entwickeln sich dagegen weiter, besitzen aber eine deutlich veränderte Morphologie. So besitzt der ausgewachsene Embryo in Abb. 4-21 D zerfurchte Cotyledonen und einen gestauchten Habitus.



Die Entwicklung der *atzr1*-Knockout-Embryonen wurde sowohl in den Samen homozygoter als auch heterozygoter *atzr1*-Elternpflanzen eingehend untersucht. Die Abb. 4-22 A und B zeigen *atzr1*-Knockout-Samen einer homozygoten *atzr1*-Pflanze, die einen besonders starken Mutanten-Phänotyp aufweisen. Die Embryonen sind kugel- bzw. eiförmig, obwohl sie sich ihrer Größe nach mindestens im Herzstadium (vgl. Abb. 4-22 C) befinden sollten. Das für die *Arabidopsis*-Embryonen charakteristische Zellteilungsmuster (BERLETH UND CHATFIELD, 2002) ist in den *atzr1*-Embryonen ebenso wenig erkennbar wie ein Ansatz von Cotyledonen. Auch diese Samen zeigen insgesamt ein reduziertes Wachstum. Im Vergleich zum Wildtyp hat die zentrale Vakuole des Embryosacks in den *atzr1*-Samen kaum an Volumen gewonnen und die Zellschichten des äußeren Integuments sind bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium vielfach kollabiert (Abb. 4-22 A, B Pfeile). In der Folge stagniert die Embryogenese in etwa 60-70 % der *atzr1*-Samen an diesem Entwicklungspunkt.



**Abb. 4-22: Die Embryogenese in der *atzr1*-Mutante unterliegt schwerwiegenden Störungen**

A) und B) *atzr1*-Samen mit Embryonen, die in der frühen Entwicklung gestört sind. cv: Zentrale Vakuole. em: Embryo, Pfeile weisen auf kollabierte Zellen des äußeren Integuments. C) schematische Darstellung eines WT *Arabidopsis*-Samens: oi: äußeres Integument, ii: inneres Integument, c: Chalaza, nu: Nucellus, cv: Zentrale Vakuole. D-F) *atzr1*-Embryonen, die aus voll entwickelten Samen einer heterozygoten *AtZr1*-Pflanze isoliert wurden. h: Hypocotyl, c: Cotyledonen. Alle Objekte wurden mit Hoyer's-Medium geklärt. Balken: 50µm.

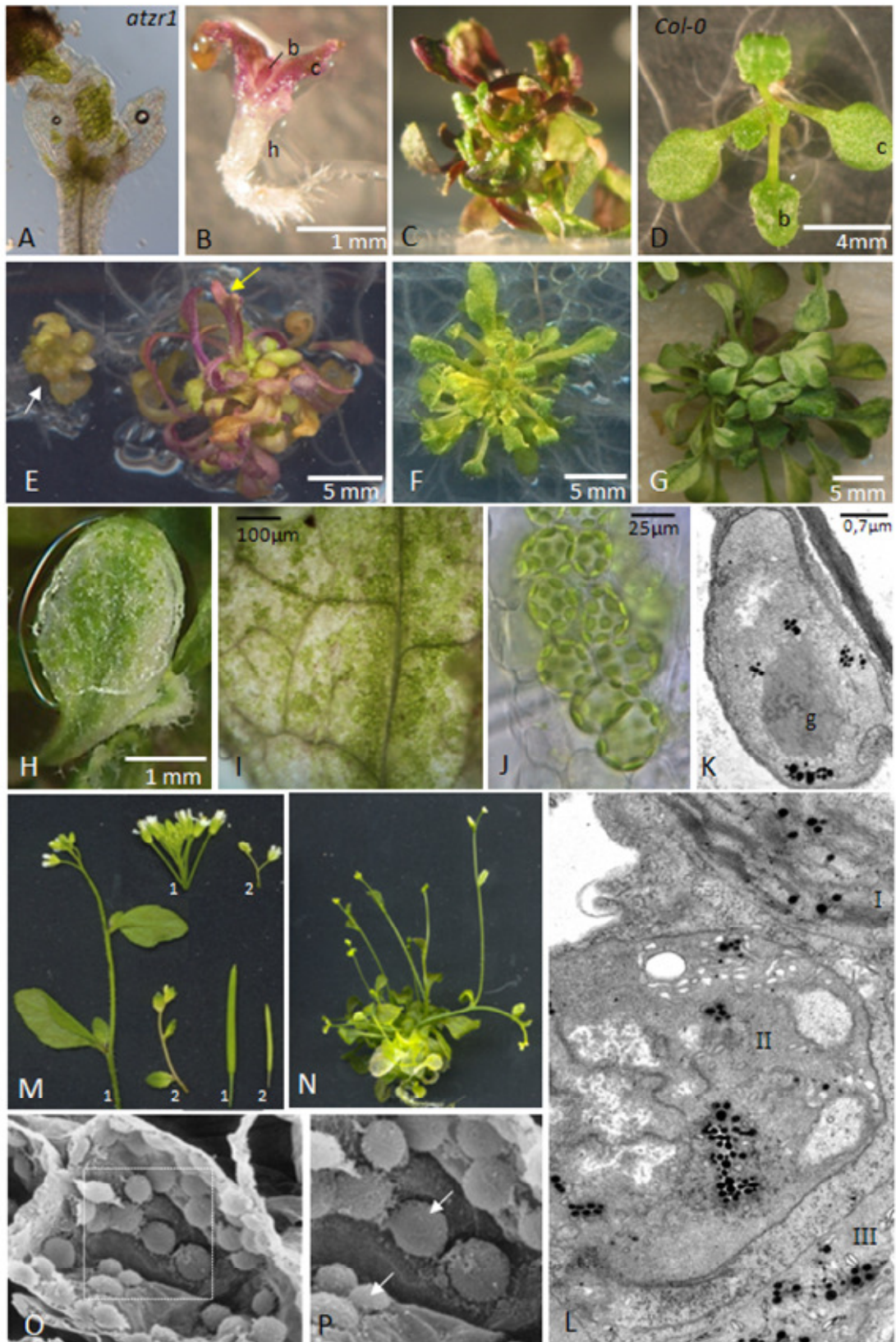
Einen vergleichbar starken Phänotyp findet man in den *atzr1*-Knockout-Samen heterozygoter *AtZR1*-Pflanzen nicht. Die Entwicklung der *atzr1*-Embryonen in den Samen heterozygoter *AtZR1*-Vorfahren ist zwar ebenfalls von der *atzr1*-Mutation betroffen, dies wird jedoch erst ab dem Torpedostadium offensichtlich. In der Wildtypsituation ergrünen die Embryonen in diesem Entwicklungsstadium und sind bis zur Samenreife photosynthetisch aktiv. Die *atzr1*-Embryonen blieben jedoch während der gesamten Embryogenese blass. Darüber hinaus traten weitere Entwicklungsstörungen mit unterschiedlich starker Ausprägung auf. Anhand ihres Mutanten-Phänotyps lassen sich die *atzr1*-Embryonen aus heterozygoten *AtZR1*-Schoten in drei Gruppen unterteilen (Abb. 4-22 D-F). Die erste Gruppe bilden Embryonen mit einem deutlich verkürzten Hypocotyl und einem Defekt in der Cotyledonenentwicklung (Abb. 4-22 D). Die Cotyledonen sind sehr ungleich geformt und so stark gelappt, dass es den Anschein hat, als besäßen die Embryonen drei statt zwei Cotyledonen. Zuweilen hatte es den Anschein, als sei das Apikalmeristem dieser Embryonen vergrößert.

Die Embryonen der zweiten Gruppe bilden zwar ein anscheinend normal elongiertes Hypocotyl aus, die Cotyledonen sind jedoch extrem stark zerfurcht und als solche kaum erkennbar. Die dritte Gruppe bilden Embryonen, die nahezu die Größe von Wildtypembryonen erreichen, wobei die Cotyledonen ebenfalls gefurcht sind. Die drei beschriebenen Phänotypen treten etwa im Verhältnis von 4:5:1 auf.

Im Gegensatz zu den Samen homozygoter *atzr1*-Pflanzen verlaufen die Ausbildung und das Wachstum der Samenhülle in den *atzr1*-Samen heterozygoter *AtZR1*-Pflanzen unauffällig. Ursache hierfür ist vermutlich der unterschiedliche Genotyp in den verschiedenen Geweben dieses Samens (Embryo: *atzr1/atzr1*; Testa: *AtZR1/atzr1*). Die reifen Samen sind nur unwesentlich kleiner als Wildtyp-Samen. Da die kleinen *atzr1*-Embryonen im Gegensatz zum Wildtyp-Embryo den Samen zum Zeitpunkt der Reife jedoch nicht völlig ausfüllen, kollabiert die Samenschale während der Austrocknung (vgl. Kapitel 4.4 Abb. 4-15).

#### 4.5.2 Der *atzr1*-Phänotyp beruht auf einer defekten Plastidenentwicklung

Etwa 10 % der reifen *atzr1*-Samen aus homozygoten oder heterozygoten *atzr1*-Schoten entwickeln sich nach Aussaat auf Sucrose-haltigem MS-Medium zu homozygoten *atzr1*-Pflanzen. Die Keimungsrate der *atzr1*-Samen konnte aber auf mindestens 30-40 % gesteigert werden, wenn die Samen schon vor dem Abreifen aus den Schoten isoliert und auf MS-Medium mit Sucrose ausgelegt wurden. Auf Sucrose-freiem Medium oder auf Erde keimten die *atzr1*-Samen zwar aus, sie entwickelten jedoch keine Blätter und starben im Cotyledonenstadium (Abb. 4-23 A).



**Abb. 4-23:** In *atzr1*-Pflanzen ist die Plastidenentwicklung beeinträchtigt  
Legende siehe folgende Seite

**Legende zu Abb. 4-23:**

*atrz1*-Pflanzen 2 Wochen nach Aussaat auf MS-Medium ohne Sucrose (A), 1 ½ Wochen (B), 3 Wochen (C) und 4 Wochen (E, G) nach Aussaat auf MS-Medium mit 3 % Sucrose und 4 Wochen nach Aussaat auf MS-Medium mit 1 % Sucrose (F). Zum Vergleich: *Col-0* Pflanze 1 ½ Wochen nach Aussaat auf MS-Medium mit 3 % Sucrose (D) b: Primärblatt, c: Cotyledon, h: Hypocotyl. H-J) Detail-Ansichten eines variierten *atrz1*-Rosettenblattes mit 10facher (H), 70facher (I) und 300facher (J) Vergrößerung. K, L) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener *atrz1*-Plastiden-Phänotypen in Mesophyllzellen 4 Wochen alter *atrz1*-Pflanzen g: Granastapel, I: Chloroplast mit wt-Phänotyp, II: Chloroplast mit reduzierten Thylakoiden, III: Chloroplast mit reduzierten aufgeblasenen Thylakoiden. M) Im Vergleich zum Wildtyp (1) zeigt die *atrz1*-Mutante (2) reduziertes Wachstum. N) 6 Wochen alte *atrz1*-Mutante mit Blüentrieben nach Anzucht auf MS-Medium mit 1 % Sucrose. O) Aufsicht auf eine angeschnittene *atrz1*-Mesophyll-Zelle mit unterschiedlich großen Chloroplasten. Das Gewebe wurde nach der Trocknung geschnitten. P) Detailansicht von O. Pfeile markieren unterschiedlich große Chloroplasten.

Die phänotypische Ausprägung der *atrz1*-Mutation in Keimlingen und jungen Pflanzen ist ebenso heterogen wie im Verlauf der Embryogenese. Schon die Keimungsphase kann zwischen einer und vier Wochen betragen (zum Vergleich: WT: 1-3 Tage). In den *atrz1*-Keimlingen enthalten die Cotyledonen kaum Chlorophyll (Abb. 4-23 A, B). Nach Anzucht der Keimlinge auf MS-Medium mit 3 % Sucrose akkumulieren die *atrz1*-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 4-23 D) sehr viel Stärke im Hypocotyl (nicht gezeigt) und große Mengen Anthocyane in den Cotyledonen und Blättern (Abb. 4-23. B).

Im Laufe der weiteren Entwicklung bilden die jungen *atrz1*-Pflanzen übermäßig viele, sehr kleine und blasse Blätter aus, die nicht in einer für *Arabidopsis* typischen Rosettenform angeordnet sind, sondern wahllos in alle Richtungen wachsen (Abb. 4-23 C, E-G).

Je schlechter die einzelnen Rosettenblätter ergrünen, desto kugelig gestaltet sich die Architektur der Pflanze. Blasse Blätter sind oft lang und schmal und akkumulieren Anthocyane (Abb. 4-23 E, gelber Pfeil). Einige der *atrz1*-Pflanzen ergrünen während der Entwicklung gar nicht. Sie bleiben extrem klein und kugelig und bilden in der Regel keine Wurzeln aus (Abb. 4-23 E, weißer Pfeil).

Während der Ergrünung sind Rosettenblätter der *atrz1*-Mutante variiert (Abb. 4-23 G, H). Dabei fällt jedoch auf, dass die grün-weiße Scheckung in allen Blättern recht ähnlich ist. In der Regel sind die Blattränder und die Blattbasis besonders hell, während die Blattspitze und die Zellen in der Blattmitte entlang der Hauptadern bereits ergrünt sind. Im Laufe der Entwicklung ergrünen die Blätter zunehmend, sodass eine Scheckung kaum oder gar nicht mehr sichtbar ist.

Dieser Phänotyp junger Blätter erinnert stark an den vireszenten Keimlingsphänotyp der *et1*-Mutante aus Mais, in der das *AtZR1*-homologe *ZmET1* deletiert ist (vgl. Einleitung). Daraus lässt sich ableiten, dass der variierte Phänotyp der *atrz1*-Mutante in *Arabidopsis* so wie der Phänotyp der *et1*-Mutante aus Mais letztendlich auf einer defekten oder verzögerten Plastidenentwicklung basiert.

Die einzelnen Plastiden eines Blattes scheinen jedoch unterschiedlich stark vom Verlust der AtZR1-Funktion betroffen zu sein, sodass während der Blattentwicklung grüne Areale entstehen, in denen sich die Chloroplasten augenscheinlich normal entwickeln, während in den Zellen der hellen Sektoren lichtmikroskopisch keine oder nur sehr kleine grüne Chloroplasten sichtbar sind (Abb. 4-23 I, J). Da die Blätter der *atzr1*-Mutante jedoch sukzessive ergrünen, scheint die Chloroplastenentwicklung auch in den hellen Sektoren des Blattes nicht permanent gestört zu sein.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von den Chloroplasten der *atzr1*-Mutante (Abb. 4-23 K, L) zeigen deutliche morphologische Veränderungen im Thylakoidmembransystem der Organellen auf. Beispielsweise liegen die Thylakoide in dem in Abb. 4-23 K gezeigten Chloroplasten in Form eines einzigen großen Granastapels vor. Die Abb. 4-23 L zeigt hingegen den Ausschnitt aus einer Zelle, in der drei nebeneinander liegende Chloroplasten jeweils eine sehr unterschiedliche Thylakoidmembranstruktur aufweisen. Während der Chloroplast I phänotypisch unauffällig erscheint und zahlreiche zu Granastapeln angeordnete Thylakoide besitzt, sind die Thylakoidmembranen in Chloroplast II deutlich unterentwickelt, sie erscheinen teilweise aufgebläht und bilden keine Granastapel aus sondern liegen ungeordnet im Stroma verteilt vor. Chloroplast III ist ebenfalls durch wenige, sehr kleine, blasig aufgetriebene und unstrukturierte Thylakoide gekennzeichnet.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mesophyllzellen der *atzr1*-Mutante zeigten außerdem, dass die Chloroplasten innerhalb einer Zelle unterschiedlich groß sind (Abb. 4-23 O, P, Pfeile). Dass sich die Chloroplasten innerhalb einer Zelle in Bezug auf ihre Ultrastruktur (Abb. 4-23 K, L) und ihre Größe (Abb. 4-23 O, P) so stark voneinander unterscheiden, ist sehr ungewöhnlich.

Wie bereits geschildert wurde, gelang die Anzucht der *atzr1*-Knockout-Mutante ausschließlich auf Sucrose-haltigem Medium. Wenn die Pflanzen nach etwa vier Wochen ausreichend ergrünt waren (Abb. 4-23 F, G) konnten sie jedoch auf Erde umgesetzt werden. Die Pflanzen entwickelten eine erhöhte Anzahl kleiner Blüentriebe (Abb. 4-23 N, Tab. 4-1) und setzten letztlich, wenn auch sehr schlecht, Saat an. Insgesamt bleiben die *atzr1*-Mutanten jedoch stets in ihrer Entwicklung hinter dem Wildtyp zurück (Tab. 4-1). Wie ein Größenvergleich verschiedener Organe zwischen dem *Col-0* Wildtyp und der *atzr1*-Mutante zeigt (Abb. 4-23 M, Tab. 4-1), weist die Mutante ihre gesamte Entwicklung hindurch einen zwergenhaften Wuchs auf und Stengel sowie Stengelblätter ergrünen verzögert. Insbesondere bei den Stengelblättern zeigt sich die verzögerte Ergrünung als Gradient entlang der Blattspreite: Plastiden in jüngeren Zellen der Blattbasis sind blassgrün, während diejenigen in älteren Zellen vollständig ergrünt sind (Abb. 4-23 M, Stengel „2“). In der nachstehenden Tabelle sind die entwicklungspezifischen Unterschiede zwischen der *atzr1*-Mutante und *Col-0* Wildtyppflanzen noch einmal zusammengefasst.



**Tab. 4-1: Vergleich der Entwicklung zwischen *Col-0* Wildtyp und *atzr1*-Mutante**

Die Tabelle gibt einen Vergleich zwischen dem *Col-0* Wildtyp und der *atzr1*-Mutante unter Berücksichtigung verschiedener Entwicklungsparameter wieder. Bei den angegebenen Werten in Bezug auf die Organgrößen handelt es sich um Durchschnittswerte aus mindestens 3 Messungen ausgewachsener Organe.

Entwicklungsparameter	<i>Col-0</i>	<i>atzr1</i>
Keimung auf MS + 3 % Suc nach	1-3 Tagen	7-28 Tagen
Keimung auf Erde nach	3-4 Tagen	letal
Rosettendurchmesser	5 cm	2,5 cm
Anzahl der Rosettenblätter	12 Stück	30-40 Stück
Fläche pro Rosettenblatt	1,05 cm <sup>2</sup>	0,12 cm <sup>2</sup>
Blütenbildung nach	4 Wochen	6 Wochen
Anzahl der Triebe	1-2 Stück	7-12 Stück
Länge der Triebe	30 cm	16 cm
Fläche der Stengelblätter	0,82 cm <sup>2</sup>	0,12 cm <sup>2</sup>
Größe der Blüten	2 mm	0,8-1 mm
Länge der Schoten	2 cm	0,7-1 cm
Anzahl der reifen Samen	46 Stück	2 Stück
Absterben der Pflanzen nach	8 Wochen	12-14 Wochen

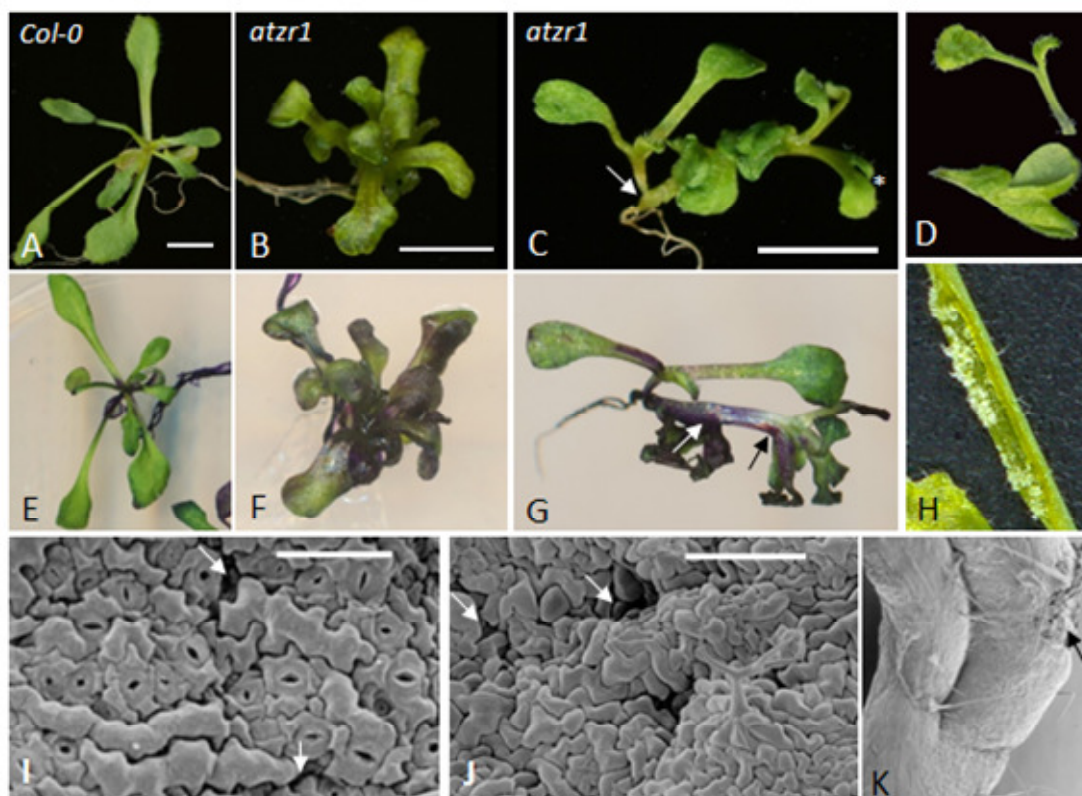
#### 4.5.3 Der *atzr1*-Phänotyp ist durch vielschichtige morphologische Anomalien gekennzeichnet.

Wie bereits gezeigt wurde, hat ein Knockout des *AtZR1*-Gens einen pleiotropen Mutanten-Phänotyp zur Folge, der die gesamte Pflanzenentwicklung von der Embryogenese über die Keimlingsentwicklung bis hin zur adulten Pflanze betrifft und auf eine Störung in der Chloroplastenentwicklung zurückgeführt werden kann.

Der *atzr1*-Phänotyp äußert sich jedoch nicht nur durch eine verzögerte Ergrünung und ein verlangsamtes Wachstum der Pflanze, sondern betrifft darüber hinaus auch die Anzahl und morphologische Struktur verschiedener Organe.

Wie zuvor beschrieben wurde, entwickelt die *atzr1*-Mutante etwa drei- bis viermal so viele Rosettenblätter wie der Wildtyp, die ohne erkennbare Symmetrie durcheinander wachsen. Häufig konnten morphologische Veränderungen in der Blattform beobachtet werden. Dazu zählten nicht nur ein verbreiteter Blattstiel (Abb. 4-24 B), sondern auch gelappte und verwachsene Blätter (Abb. 4-24 C und D). An den Blattstielen einiger Blätter konnte die Entstehung ektopischer Meristeme beobachtet werden, die zu der Bildung kleiner Seitentriebe führte (Abb. 4-24 C und G Pfeile). Es ist sehr gut vorstellbar, dass die „puschelige“ Wuchsform der *atzr1*-Mutante durch eine erhöhte Anzahl von Meristemen

bedingt ist. Ähnlich wie bei den Blättern ließ sich bei der Mutante auch häufig die Fusion von Stengeln beobachten. Dies betraf einerseits die Blattstengel der Rosettenblätter (Abb. 4-24 G, schwarzer Pfeil), aber auch die Stengel der Blütentriebe (Abb. 4-24 K). Der abgebildete Stengel ist jedoch nicht nur mit einem Seitentrieb verwachsen, sondern weist darüber hinaus auch eine kallusartige Wucherung auf (Pfeil). Auch offene Stengel, deren Ränder ebenfalls mit kallusartigem Gewebe gesäumt waren, wurden des Öfteren beobachtet (Abb. 4-24 H).



**Abb. 4-24: Morphologische Anomalien in Blättern und Stengeln der *atzr1*-Mutante**

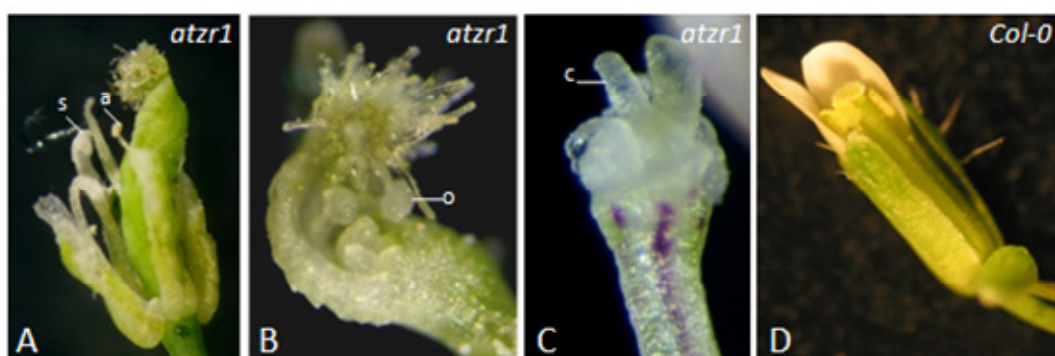
Eine *Arabidopsis* Wildtyppflanze (A) und zwei *atzr1*-Mutanten (B, C) vor bzw. nach Toluidinblau-Färbung (E-G). Weiße Pfeile in Abb. C und G weisen auf ektopische Meristeme hin, der schwarze Pfeil in G markiert einen verwachsenen Blattstiel. \*= stark gelapptes Blatt. D) Starke gelappte und verwachsene Blätter. H) Offener Stengel mit kallusartigen Wucherungen (Pfeil). I-K) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *atzr1*-Mutante: Blattunterseite (I), Blattoberseite (J) und ein verwachsener Stengel (K). Pfeile in I und J zeigen auf Einsenkungen in der Epidermis, Pfeil in K weist auf Kallusartige Wucherung. Balken in A-C= 1 cm, in I und J= 200 $\mu$ m

Die Verschmelzung von Organen ist häufig ein Anzeichen für eine defekte Kutikula oder Epidermis der Gewebe. Um die Integrität der Organoberflächen in der *atzr1*-Mutante zu untersuchen, wurden Mutanten gemeinsam mit *Col-0*-Pflanzen in Toluidinblau-Lösung inkubiert. Ein Eindringen von Toluidinblau-Lösung wird von intakten Oberflächen verhindert, wohingegen bei einer defekten Oberfläche eine Blaufärbung der tiefer liegenden Gewebeschichten beobachtet werden kann (TSUWAMOTO *et al.*, 2008). Während sich in den Wildtypen lediglich die Wurzel durch das Toluidin anfärbte (Abb. 4-24 E), drang der Farbstoff

in der *atZR1*-Mutante teilweise auch in die Blätter ein (Abb. 4-24 F, G). Besonders in Abb. 4-24 G ist deutlich erkennbar, dass sich die Bereiche, in denen morphologische Veränderungen wie zum Beispiel Verwachsungen und gelappte Blätter auftraten, besonders stark anfärbten. Dies spricht für eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit in der *atZR1*-Mutante.

In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von *atZR1*-Blättern wird erkennbar, dass die Blattoberfläche sowohl abaxial als auch adaxial sehr uneben und faltig und teilweise sehr stark eingefallen ist (Abb. 4-24 I, J). Möglicherweise ist die Epidermis im Bereich der Einsenkungen nicht vollständig geschlossen, sodass Farbstoffe wie das hier verwendete Toluidinblau in das Blattinnere eindringen können.

Der Einfluss des *AtZR1* auf die Organentwicklung wird in den Blüten der *atZR1*-Knockout-Pflanze besonders deutlich. Die ersten Blüten einer Infloreszenz zeigten meist nur einen relativ schwachen Phänotyp (Abb. 4-25 A). In der Regel besaßen diese Blüten unterentwickelte Sepalen und verkümmerte Antheren, die jedoch fertilen Pollen bildeten. Die Petalen waren etwas kürzer als im Wildtyp und besaßen eine sehr unregelmäßige Oberfläche. Teilweise wiesen sie, ähnlich wie die Blätter und Stengel der Mutante, kallusartige Strukturen auf. Das Gynoeceum in der in Abb. 4-25 A abgebildeten Blüte ist im apikalen Bereich nach links eingedreht. Die zum Teil sehr langen Narbenfäden des Stigmas schienen den kurzen Antheren entgegen zu wachsen, sodass die Blüten im eingeschränkten Maße zur Selbstbestäubung befähigt waren.



**Abb. 4-25: Phänotyp der *atZR1*-Knockout-Blüten im Vergleich zum Wildtyp**

A) *atZR1*-Blüte mit schwachem Phänotyp. s= Sepal, a= Anthere. B) *atZR1*-Blüte mit starkem Phänotyp und offenem Gynoeceum. o= Samenanlage. C) *atZR1*-Blüte mit sehr starkem Phänotyp. c= Carpel. D) *Col-0* Blüte zum Vergleich. Zwei Sepalen und ein Petal wurden entfernt.

Mit zunehmendem Alter der *atZR1*-Pflanzen verstärkte sich auch der Mutantenphänotyp in den Blüten. Der Blüte in Abb. 4-25 B fehlen nahezu alle Blütenorgane mit Ausnahme der Carpelle. Diese sind jedoch nicht miteinander verwachsen, sodass die Samenanlagen des



---

Gynoeceums freiliegen. In der Blüte in Abb. 4-25 C sind auch die Carpelle nur noch in Form von zwei verlängerten Auswüchsen auszumachen, während die übrigen Blütenorgane nicht erkennbar sind. Das Gewebe der Blütenanlage erscheint außerdem nahezu glasig. Vermutlich enthalten diese Zellen keine oder kaum noch intakte Chloroplasten.

Der starke Mutantenphänotyp in den Blüten der *atzr1*-Pflanzen korreliert mit der deutlichen GUS-Expression durch den *AtZR1*-Promotor in den transgenen *pAtZR1:GUS*-Pflanzen (vgl. Kapitel 4.3).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der Knockout des *AtZR1* in *Arabidopsis* wesentlich auf die Entwicklung der gesamten Pflanze auswirkt. Ähnlich wie die *et1*-Mutation in Mais resultiert die *atzr1*-Mutation in einem pleiotropen Phänotyp der Samen- und der Keimlingsentwicklung, der sehr wahrscheinlich auf einem Defekt der Plastidendifferenzierung beruht. Während der Phänotyp in der *et1*-Mutante aus Mais jedoch etwa zwei Wochen nach Keimung kompensiert wird, sind die *atzr1*-Mutanten aus *Arabidopsis* den gesamten Lebenszyklus hindurch gegenüber dem Wildtyp beeinträchtigt. Darüber hinaus resultiert der Verlust des *AtZR1* in einem Verlust der Rosettensymmetrie sowie in einer deutlichen Missbildung verschiedener Organe.

## 4.6 Transkriptom-Analyse der *atzr1*-Mutante

Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt wurde, resultiert der Knockout des *AtZR1*-Gens in einem starken, pleiotropen Phänotyp, der nahezu die gesamte Pflanzenentwicklung betrifft. Um die Folgen des *atzr1*-Knockouts auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde das Transkriptom der *atzr1*-Mutante anhand von Microarray-Analysen untersucht. Dazu wurde der Oligonukleotid-Array ATH-1 der Firma Affymetrix® verwendet, der mit ca. 22.500 *Probe sets*<sup>4</sup>, die etwa 24.000 Gene repräsentieren, nahezu das gesamte *Arabidopsis*-Transkriptom abdeckt. Im Gegensatz zu den cDNA-Arrays, die gleichzeitig mit zwei zu vergleichenden cDNA-Populationen hybridisiert werden, werden Oligonukleotid-Arrays mit Einzelproben hybridisiert. Anschließend werden die Hybridisierungssignale zwischen den verschiedenen Arrays miteinander verglichen.

### 4.6.1 Probenvorbereitung und Rohdatenanalytik

Um bei der Array-Hybridisierung möglichst reproduzierbare Daten zu erhalten, wurden *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen der Linie *Col-0* und *atzr1*-Mutanten auf Sucrose-haltigem MS-Medium unter Standardbedingungen angezogen. Wildtyp-Pflanzen wurden nach drei Wochen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt war die Blattrosette voll entwickelt, Blütenriebe waren jedoch noch nicht sichtbar. Auf Grund der Entwicklungsverzögerung in der *atzr1*-Mutante wurden die Knockout-Pflanzen ca. ein bis zwei Wochen länger kultiviert, bis sie optisch ein vergleichbares Entwicklungsstadium wie der Wildtyp erreicht hatten. Für die Analytik wurden *atzr1*-Pflanzen mit einem möglichst ähnlichen und vergleichsweise schwachen Mutanten-Phänotyp ausgewählt.

Für die Hybridisierung von insgesamt fünf ATH-1 GeneChips® wurde Gesamt-RNA aus je drei *atzr1*-Knockout- und zwei *Col-0* Wildtyp-Individuen eingesetzt. Der Knockout des *AtZR1*-Transkriptes in den Mutanten wurde zuvor noch einmal mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 4-26. A). Weitere Arbeitsschritte, wie die Hybridisierung der GeneChips®, die Einzelarray-Auswertung und die Vergleichsanalysen zur Identifikation differenziell exprimierter Gene erfolgten in Kooperation mit Dr. T. Streichert (Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf).

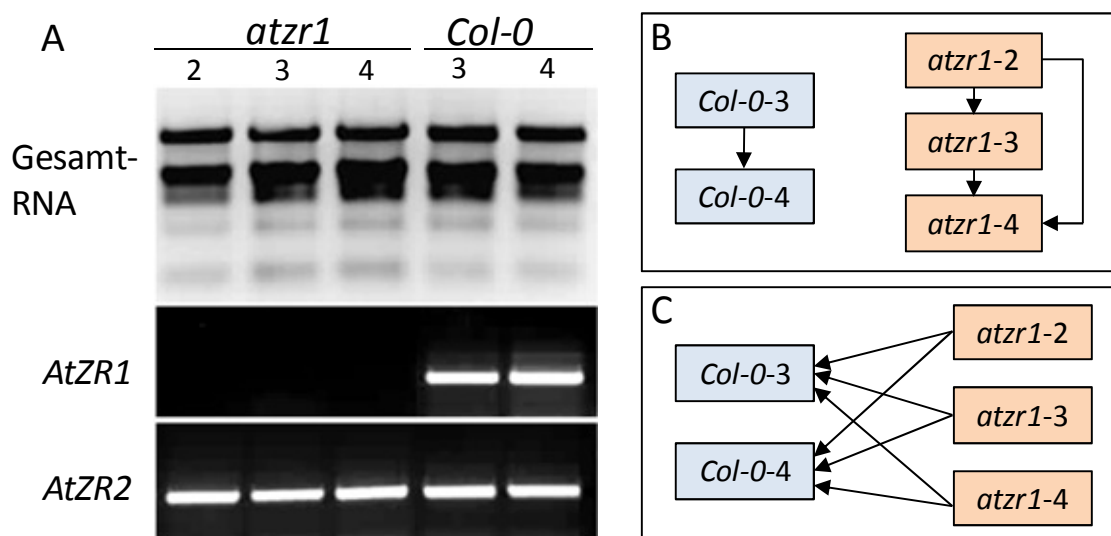
Vor dem eigentlichen Vergleich der Wildtyp- und Mutantenchips wurden zunächst die Expressionsdaten der *Col-0*-Pflanzen und der *atzr1*-Pflanzen untereinander abgeglichen (Abb. 4-26 B). So ließ sich die Variabilität in der Genexpression innerhalb der untersuchten Wildtyp-Population (*Col-0*; zwei Individuen) und der Mutanten-Population (drei Individuen)

---

<sup>4</sup> *Probe set*: Satz aus 11 Transkript-spezifischen perfect match/mismatch Sondenpaaren. Die 22,500 *Probe sets* decken zusammen über 24,000 *Arabidopsis*-Gene ab, da Genduplikationen teilweise durch ein gemeinsames *Probe set* erfasst werden.

abschätzen. Nur wenn diese Variabilität gering ist, können in einem zweiten Schritt die Expressionsunterschiede zwischen beiden Populationen zuverlässig ermittelt werden. Der Vergleich der Expressionsdaten aus den beiden *Col-0*-Pflanzen ergab, dass über 96 % der Gene in beiden Pflanzen gleich exprimiert wurden, während in der Mutanten-Population über 91 % der Gene gleich reguliert waren (vgl. Anhang 3, Abb. A 3.1). Nachdem somit die Reproduzierbarkeit der Expressionsprofile der *Col-0*- und der *atzr1*-Individuen gezeigt werden konnte, wurden Vergleichsanalysen zwischen den *atzr1*- und *Col-0*-Individuen durchgeführt (Abb. 4-26 C).

Die *atzr1*-Knockout-Individuen 3 und 4 zeigten im Vergleich mit den beiden *Col-0*-Individuen jeweils eine differenzielle Expression bei rund 26 % der untersuchten Gene, während in der dritten *atzr1*-Knockout, *atzr1-2*, nur etwa 18 % der Gene eine veränderte Expression zeigten (vgl. Anhang 3, Abb. A 3.2). Aufgrund dieser Abweichung und da auf die *atzr1-2*-Chip-Daten der größte Skalierungsfaktor zur Normalisierung der Signale angewendet werden musste (vgl. Anhang 3, Tab. A 3-1), wurde dieser Datensatz für die weiteren Analysen nur am Rande berücksichtigt.



**Abb. 4-26: Vergleichbarkeit von *Col-0* Wildtyp und *atzr1*-Mutante**

A) Für die Microarray-Analytik wurde Gesamt-RNA aus drei *atzr1*-Individuen und zwei wt-Individuen eingesetzt. Der Knockout des *AtZR1*-Gens in den *atzr1*-Mutanten wurde durch RT-PCR bestätigt. Als Referenz wurde das *AtZR2*-Transkript amplifiziert.

B und C) Schematische Darstellung zum Vergleich der normalisierten Expressionsdaten aus den fünf Einzelhybridisierungen. Zunächst wurden die Daten der beiden Wildtyp-Pflanzen und der drei *atzr1*-Mutanten untereinander verglichen (B), anschließend wurden die einzelnen Daten der Mutanten jeweils mit den Daten der beiden Wildtypen verglichen (C).

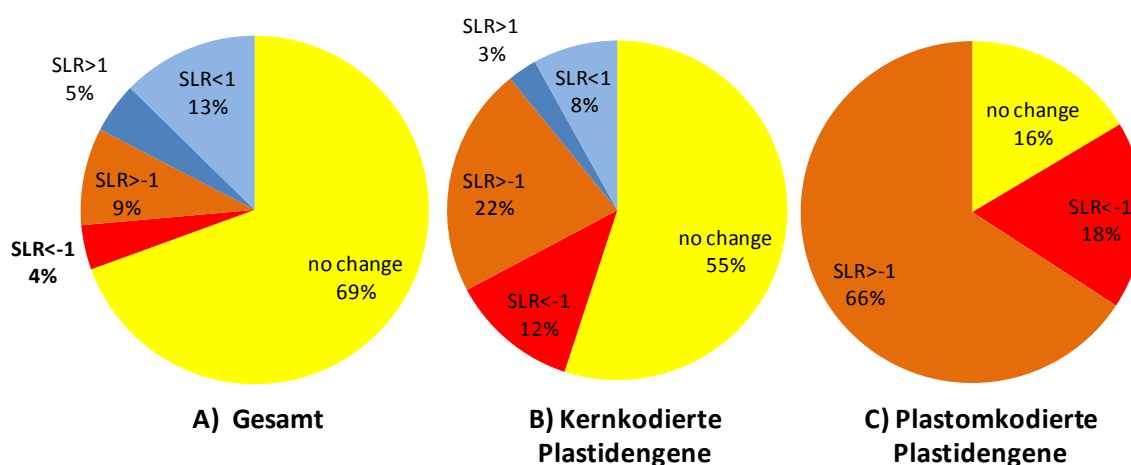
Nur die Gene (*Probe sets*), die in allen Vergleichen<sup>5</sup> zwischen Wildtyp- und Mutanten-Individuen eine veränderte Expression zeigten, wurden als differenziell exprimiert

<sup>5</sup> *atzr1-3* vs. *Col-0-3* bzw. *Col-0-4* und *atzr1-4* vs. *Col-0-3* bzw. *Col-0-4*.

angesehen. Die Expressionsänderungen wurden als  $\log_2$ -Werte (*Signal Log Ratio*; SLR) angegeben. Gene, die in allen Experimenten einen *Absent-Call*<sup>6</sup> erhalten haben, wurden als nicht exprimiert angesehen.

#### 4.6.2 45 % der Plastidengene sind durch die *atyr1*-Mutation beeinflusst

Von den 22746 Genen auf dem Microarray wurden zum untersuchten Zeitpunkt rund 16.100 Gene im Wildtyp und/oder in der Mutante exprimiert. Etwa 30 % (~4800) dieser Gene zeigten in der Mutante eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Expression. 1500 dieser Gene wiesen signifikante Expressionsänderungen, d.h. mindestens eine Halbierung (SLR<-1) oder Verdopplung (SLR>1) der Expressionslevel auf (Abb. 4-27 A).



	A) Gesamt		B) kernkodierte Plastidengene		C) Plastom-kodierte Gene	
<b>total :</b>	<b>22746 Gene</b>		<b>3406 Gene</b>		<b>79 Gene</b>	
<b>present</b>	<b>16095 Gene</b>	<b>100%</b>	<b>2882 Gene</b>	<b>100%</b>	<b>79 Gene</b>	<b>100%</b>
no change	11177	69%	1586	55%	13	16%
change	4918	31%	1296	45%	66	84%
<b>decrease :</b>	<b>2121 Gene</b>	<b>13%</b>	<b>982 Gene</b>	<b>34%</b>	<b>66 Gene</b>	<b>84%</b>
SLR<-1	667	4%	353	12%	14	18%
SLR>-1	1454	9%	629	22%	52	66%
<b>increase :</b>	<b>2797 Gene</b>	<b>17%</b>	<b>314 Gene</b>	<b>11%</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
SLR>1	757	5%	81	3%	0	0%
SLR<1	2040	13%	233	8%	0	0%

**Abb. 4-27: Auswirkung der *atyr1*-Mutation auf die Expression der Plastidengene**

A-C) Die Tortendiagramme stellen den Einfluss der *atyr1*-Mutation auf die Expression aller auf dem Array repräsentierten Gene (A), Kerngene, die für Plastidenproteine kodieren (B) und plastom-kodierter Gene (C) im Vergleich zum Wildtyp dar. SLR (Signal Log Ratio): Darstellung der Expressionsänderung als  $\log_2$ -Wert. Gelb: keine Änderung. Orange: Abnahme der Expression um weniger als 50 % (SLR>-1); Rot: Abnahme der Expression um mehr als 50 % (SLR<-1); hellblau:

<sup>6</sup> *Probe sets* erhalten einen *Absent-Call*, wenn die detektierten Signale (Perfect match) im Vergleich zu den Hintergrundsignalen (Mismatch) als nicht signifikant eingestuft werden.

Zunahme der Expression um weniger als 100 % (SLR<1) dunkelblau: Zunahme der Expression um mehr als 100 % (SLR>1). Die Tortendiagramme basieren auf den Daten der abgebildeten Tabelle.

Auf dem Array sind etwa 3400 Gene repräsentiert, deren Genprodukte (wahrscheinlich) in die Plastiden importiert werden. 2882 dieser Gene wurden in den untersuchten Pflanzen exprimiert. Ein Drittel dieser für Plastidenproteine kodieren Gene waren in der *atrz1*-Mutante herunterreguliert, davon 353 um mindestens die Hälfte.

Dieses Resultat bedeutet, dass knapp die Hälfte der insgesamt in der *atrz1*-Mutante reduzierten Transkripte und über die Hälfte der signifikant reduzierten Transkripte für Plastidenproteine kodieren. Auf der anderen Seite codieren nur 81 der insgesamt 757 signifikant hoch regulierten Gene in der *atrz1*-Mutante für Plastidenproteine. Insgesamt sind 45 % der Kerngene, die für Plastidenproteine kodieren, durch die *atrz1*-Mutation in ihrer Expression beeinflusst (Abb. 4-27 B).

Das *Arabidopsis*-Plastom enthält 85 proteinkodierende ORFs von denen 79 auf dem Array erfasst werden. In der *atrz1*-Mutante ist die Expression von 66 dieser Gene im Vergleich zum Wildtyp verringert. 14 dieser Gene sind um mindestens 50 % herunterreguliert, darunter *rpoC1* und *rpoC2*, die für  $\beta'$ -Untereinheiten der plastidären RNA-Polymerase codieren sowie sechs Gene, die für Komponenten des Photosystems II kodieren. Die 13 Gene, die in der *atrz1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung der Expression zeigen, kodieren für fünf ribosomale Proteine, vier Photosynthesepoteine, *rpoB* und drei offene Leserahmen (Abb. 4-27 C). Betrachtet man nur die 332 Gene auf dem Microarray, die für potentielle Proteine der Thylakoidmembran- oder des Thylakoidlumens kodieren, sind 255 (77 %) dieser Gene in ihrer Expression reduziert, während nur 14 Gene (4,2 %) hochreguliert sind. 33 % der Transkripte, die für Thylakoidproteine kodieren, sind im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 50 % reduziert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Chloroplasten in der *atrz1*-Mutante nur wenige, unstrukturierte Thylakoide besitzen (vgl. Kapitel 4.5.2).

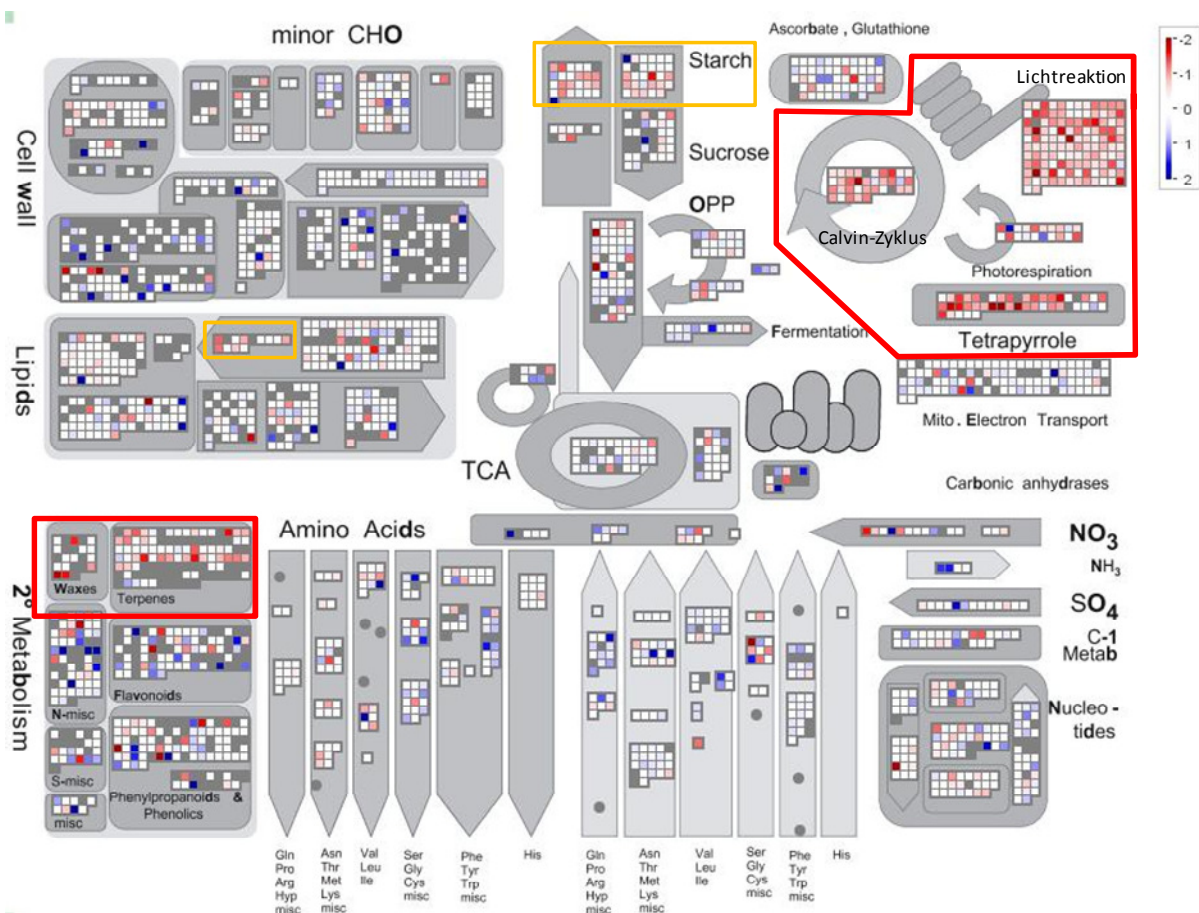
### *Einfluss der atrz1-Mutation auf Gene verschiedener Stoffwechselwege*

Nachdem eine erste Analyse der Microarray-Daten gezeigt hat, dass etwa 30 % aller exprimierten Gene auf dem Microarray infolge des *atrz1*-Knockouts eine veränderte Expression aufweisen, sollte untersucht werden, ob diese Gene in einem funktionellen Zusammenhang stehen. Mit Hilfe des Programms MapMan 2.2.0 (THIMM *et al.*, 2004) wurden die Microarray-Daten in einen biologischen Kontext eingeordnet.

Die Abb. 4-28 gibt einen Überblick über die bekannten Stoffwechselwege und die ihnen zugeordneten Gene (jeweils als Quadrat dargestellt) in *Arabidopsis thaliana*. Je nach Veränderung der Expression in der *atrz1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sind die Gene

rot (herunterreguliert) oder blau (hoch reguliert) eingefärbt. Weiße Boxen entsprechen Genen mit gleich bleibender Expression, während Gene, die weder in der Mutante noch im Wildtyp exprimiert sind, grau dargestellt sind.

Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Großteil der Photosynthesegene aus der Lichtreaktion und aus der Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) in der *atzr1*-Mutante herunterreguliert ist. Darüber hinaus sind auch die Gene der Tetrapyrrol-Biosynthese in der Mutante deutlich schwächer exprimiert als im Wildtyp (Abb. 4-29 roter Kasten oben rechts). Die Expression einiger Komponenten aus der Wachs- und Terpenoid-Biosynthese (Abb. 4-29, roter Kasten unten links) ist in der *atzr1*-Mutante ebenfalls herabgesetzt. Außerdem sind einige Gene aus der Fettsäuresaturierung, der Fettsäureelongation und dem Stärkemetabolismus herunterreguliert (Abb. 4-29, orangefarbene Kästen).



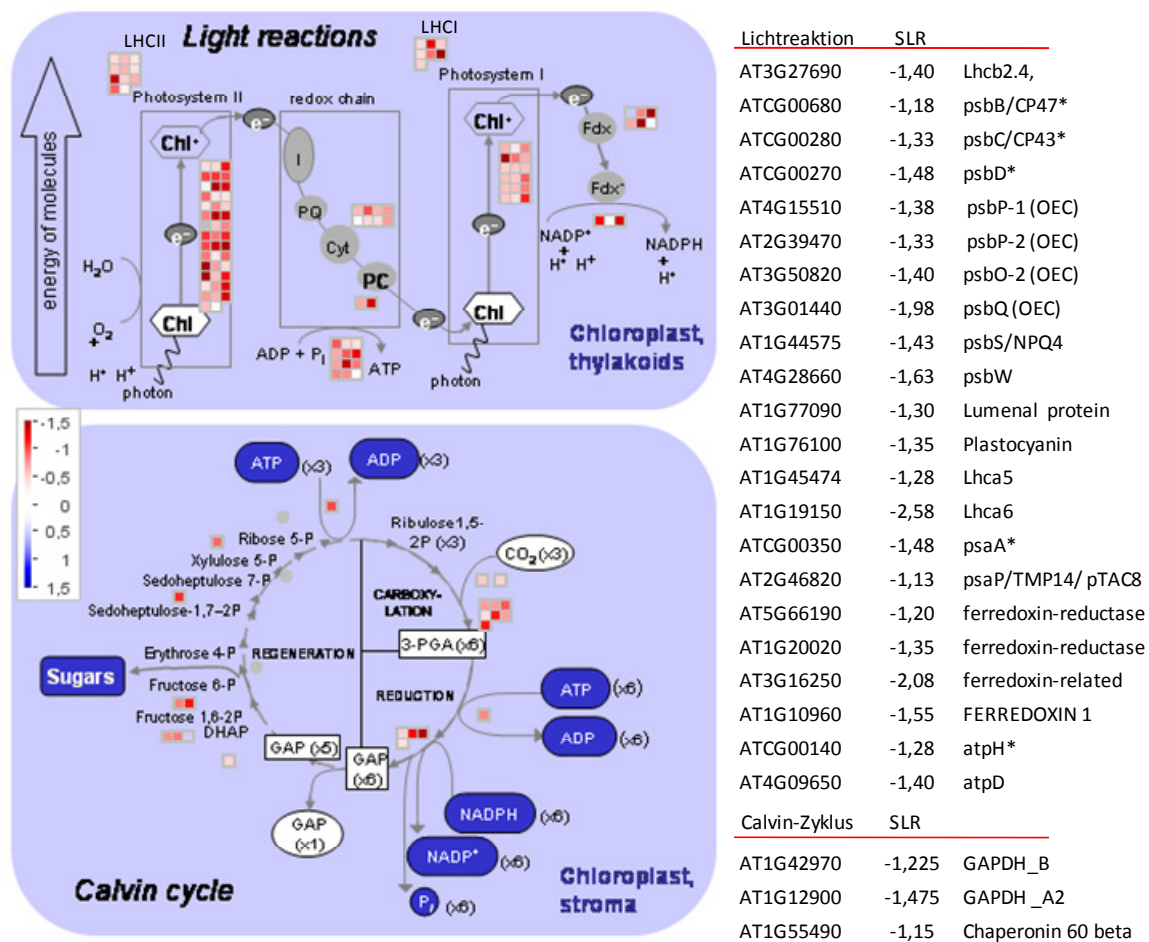
**Abb. 4-28: Einfluss der *atzr1*-Mutation auf die Genexpression verschiedener Stoffwechselkomponenten.** Gene, die in der *atzr1*-Mutante verstärkt exprimiert werden, sind als blaue Quadrate dargestellt, Gene, die schwächer exprimiert werden als im Wildtyp, sind rot eingefärbt. Die Farbintensität korreliert mit der Expressionsänderung (SLR, vgl. Skala rechts im Bild). Nicht exprimierte Gene sind als graue Boxen dargestellt. Für die Darstellung wurde MapMan2.2.0 verwendet. CHO: Kohlenhydrat. OPP: oxidativer Pentosephosphat-Weg. TCA: Citrat-Zyklus.

Stoffwechselwege, die im Gegenzug in der *atrz1*-Mutante hochreguliert sind, lassen sich weniger deutlich erkennen. Einige Gene, die dem Aminosäuremetabolismus zugeordnet werden, sind ebenso wie zwei Glutamatdehydrogenasen (Stickstoffmetabolismus) in der *atrz1*-Mutante verstärkt exprimiert. Die Gene für die cytosolische Alkoholdehydrogenase und Pyruvatdecarboxylase sind neben einigen anderen Komponenten der Fermentation ebenfalls hochreguliert. Auch verschiedene Zellwand-modifizierende Enzyme werden auf Transkriptebene in der Mutante stärker exprimiert.

In den folgenden Abschnitten werden die angesprochenen Expressionsänderungen genauer analysiert.

### Die Transkripte für Komponenten des Photosystem II sind in der *atrz1*-Mutante stark reduziert

Wie die Übersicht über die wichtigsten Stoffwechselwege (Abb. 4-28) zeigt, ist die Expression der Photosynthese-Gene neben den Genen der Tetrapyrrol-Biosynthese in der *atrz1*-Mutante besonders stark beeinflusst.



**Abb. 4-29: Einfluss der *atrz1*-Mutation auf die Expression der Photosynthesegene**

Die Grafik wurde mit MapMan 2.2.0 erstellt. In der *atrz1*-Mutante herunterregulierte Gene sind rot eingefärbt, hochregulierte Gene sind blau dargestellt. Expressionsänderungen sind als SLR-



Werte dargestellt (vgl. Legende). Graue Boxen entsprechen nicht exprimierten Genen. Die Gene mit der stärksten Expressionsänderung ( $SLR < -1,1$ ) sind rechts mit *Gene-Identifizier*, Expressionsänderung ( $SLR; \log_2$ ) und Genbeschreibung aufgeführt. OEC: Sauerstoffspaltender Komplex. \*= plastomkodiert.

Betrachtet man die Komponenten der Photosynthese im Detail, wird deutlich, dass nahezu alle Gene, sowohl der Licht- als auch der Dunkelreaktion, in der Mutante herunterreguliert sind (Abb. 4-29). Im Vergleich zum Wildtyp sind die Transkripte der Photosystem II-Untereinheiten, insbesondere des Sauerstoffspaltenden Komplexes, in der *atyr1*-Mutante insgesamt am stärksten reduziert, doch auch die Plastocyanin-, Ferredoxinreduktase- und Ferredoxingene sowie einige Komponenten des ATPase-Komplexes (aus der  $F_0$  und  $F_1$ -Untereinheit) sind in der Mutante auf Transkriptebene um mindestens 60 % reduziert. Die Gene des Photosystems I, der Lichtsammelkomplexe und des Cytochrom-bf-Komplexes sind, abgesehen von einzelnen Komponenten, insgesamt schwächer herunterreguliert. Das *psaA*-Gen, das für eine Untereinheit aus dem Reaktionszentrum des Photosystems I kodiert, gehört mit einem SLR von -1,48 zu den am stärksten herunterregulierten Genen dieses Komplexes.

Neben den Transkripten, die direkt für die Untereinheiten der Photosystem-Komplexe kodieren, sind in der *atyr1*-Mutante außerdem zahlreiche Transkripte reduziert, deren Genprodukte zur Assemblierung und Regulation der Photosynthesekomplexe beitragen (z.B. *Ccs1* und *NdhN* zur Assemblierung des Cytochrom-bf- bzw. des NADH-Dehydrogenase-Komplexes sowie die Kinasen *STN7*, *STN8*).

Auch die meisten Enzyme des Calvin-Zyklus sind auf Transkriptebene um etwa 40-50 % reduziert. Die Transkripte für zwei der drei annotierten Untereinheiten des GAPDH-Komplexes sind sogar um mindestens 60 % reduziert. Die Zahl der Transkripte für die große und kleine Untereinheit der RuBisCO ist im Vergleich zum Wildtyp zwar nur wenig verringert, jedoch sind die Gene, die für Proteine zur Assemblierung und zur Regulation der RuBisCO codieren (Chaperonin 60 Beta, *RbcL-N-Methyltransferase*) stärker reduziert.

Einige Proteine aus der photosynthetischen Elektronentransportkette, wie die Untereinheiten *psaA*, *psbB* und *atpH* aus den Reaktionszentren von Photosystem I und II bzw. dem ATPase-Komplex, aber auch die große Untereinheit der RuBisCO (*RBCL*) aus dem Calvin-Zyklus sind auf dem Plastom kodiert. Der überwiegende Teil der Photosynthesegene ist jedoch kernkodiert. In der *atyr1*-Mutante ist sowohl die Expression der kernkodierten als auch die der plastomkodierten Photosynthesegene im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 4-29).

Im Einklang mit der Reduktion der meisten Photosynthesegene und einer daraus zu vermutenden geringeren Erzeugung photochemischer Energie sind in der *atyr1*-Mutante auch verschiedene Gene des Stärkemetabolismus schwächer exprimiert.



### *Die Transkripte der Chlorophyll- und Carotenoid-Biosynthese sind in der atzr1-Mutante reduziert*

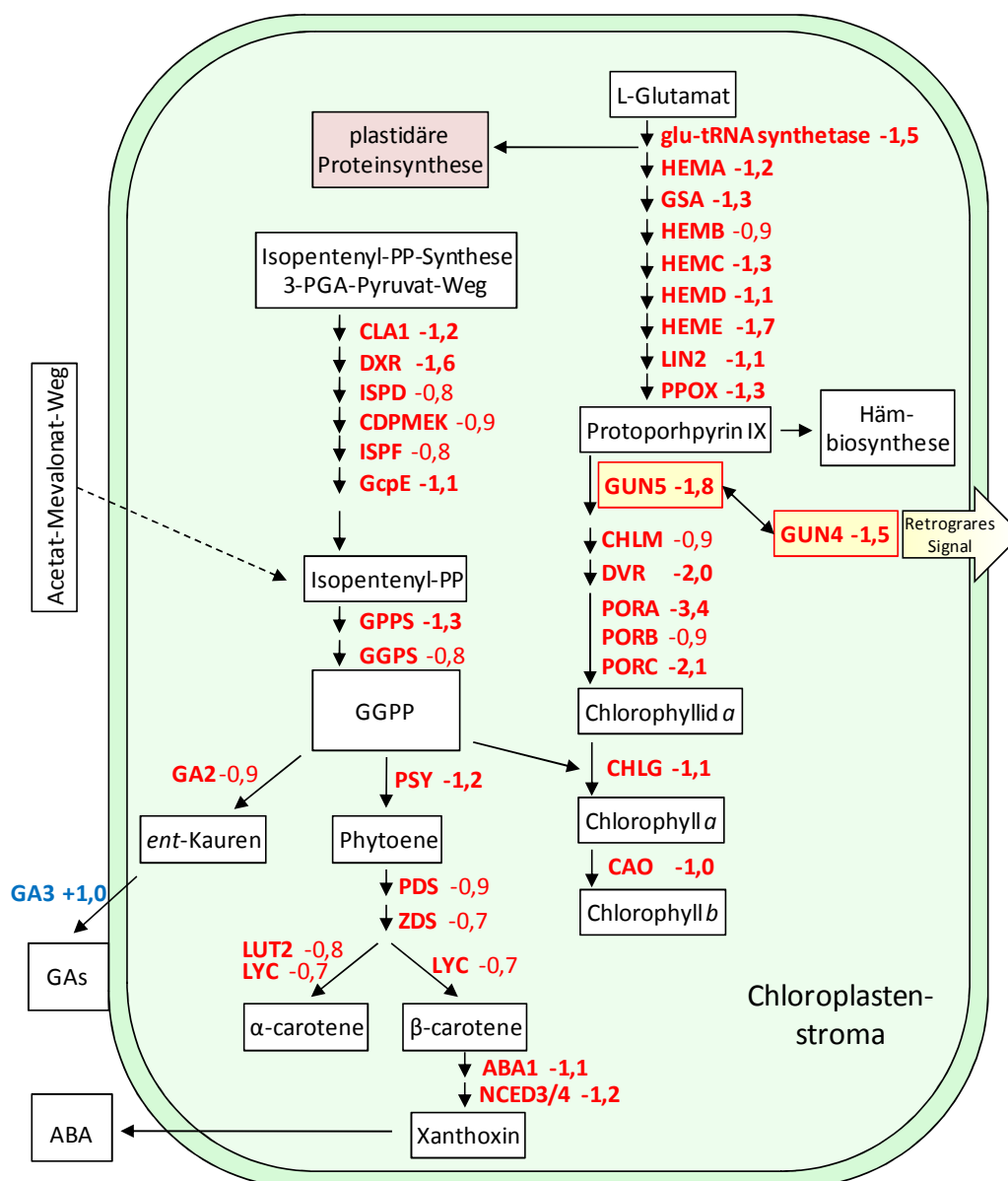
Neben Photosynthesekomponenten sind auch die Enzyme aus Biosynthesewegen für die photosynthetischen Pigmente (Chlorophylle und Carotenoide) auf Transkriptebene stark reduziert. Abb. 4-30 gibt einen Überblick über die Zusammenhänge zwischen der Isoprenoid- und Chlorophyllbiosynthese in den Chloroplasten.

Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP), die aktive Form des Isoprens, ist ein wichtiger Baustein für zahlreiche pflanzliche Verbindungen, z.B. Phytohormone, photosynthetische Pigmente, Plastochinon, Ubichinon und zahlreiche sekundäre Pflanzenstoffe. In Pflanzen sind zwei IPP-Synthesewege bekannt. Einerseits der Mevalonat-Weg (MVA), der im Cytoplasma abläuft und andererseits der Mevalonat-unabhängige 3-PGA-Pyruvat-Weg, der in den Chloroplasten lokalisiert ist und die IPP für die Carotenoid-Biosynthese, Gibberellin-Biosynthese (GA; *ent-Kauren*) sowie die Phytolsynthese (→ Chlorophyll) liefert.

Während die Expression der Gene für den MVA-Weg in der *atzr1*-Mutante unverändert exprimiert werden, sind die Gene, die für die Enzyme des 3-PGA-Pyruvat-Wegs kodieren, im Vergleich zum Wildtyp deutlich herunterreguliert (Anmerkung: ein SLR von -0,8 oder kleiner entspricht einer Reduktion des Transkripts um mehr als 40 %).

Auch die Enzyme für die nachfolgenden Syntheseschritte von Geranylgeranyl-Diphosphat und von *ent*-Kauren, einer Vorstufe für die GA-Biosynthese, sind auf Transkriptebene deutlich reduziert. Die Gene für weitere Stufen der GA-Biosynthese, die im Cytoplasma ablaufen, sind hingegen hochreguliert (insgesamt sind alle Transkripte, die mit der GA-Biosynthese zusammenhängen jedoch schwach detektierbar).

Geranylgeranyl-Diphosphat bildet außerdem die Vorstufe für die Carotinoid-Biosynthese. Das Transkript für das erste Enzym dieses Synthesewegs, die Phytoen-Synthase, ist um fast 60 % reduziert und auch die Enzyme, die die darauf folgenden Syntheseschritte katalysieren, werden auf Transkriptebene deutlich schwächer exprimiert. Carotinoide übernehmen nicht nur eine wichtige Schutzfunktion für die Pflanze sondern dienen auch als Vorstufe für die Synthese von Abscisinsäure (ABA). In der *atzr1*-Mutante sind die Transkripte für die plastidären Enzyme der ABA-Synthese (ABA1 und NCED3 bzw. 4) jeweils um mehr als die Hälfte reduziert (SLR von -1,1 bzw. -1,2).



**Abb. 4-30: Einfluss der *atzr1*-Mutation auf die Gene der Carotinoid- und Chlorophyllbiosynthese.**

Überblick über die Isoprenoid- und Chlorophyllbiosynthese in den Chloroplasten. In der Mutante herunterregulierte Transkripte sind in rot dargestellt, hochregulierte Transkripte in blau. Die Änderung der Genexpression ist als SLR ( $\log_2$ ) angegeben. Biosynthesewege und Stoffwechselprodukte sind schwarz geschrieben. Nachstehend sind die Genbezeichnungen und die kodierten Enzyme aufgeführt: **CLA1**: 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase. **DXR**: 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. **ISPD**: 2-C-Methyl-D-Erythriol 4-Phosphate Cytidyltransferase. **CDPMEK**: 4-(Cytidine 5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol Kinase. **ISPF**: 2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase. **GcpE**: 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-En-1-yl Diphosphate Synthase. **GPPS**: Geranyl-Diphosphate-Synthase. **GGPS**: Geranylgeranyl-Pyrophosphate-Synthase. **PSY**: Phytoene Synthase. **PDS**: Phytoene Desaturase. **ZDS**: Zeta Carotene Desaturase. **LYC**: Lycopene Cyclase. **LUT2**: Lycopene Epsilon Cyclase. **ABA1**: Zeaxanthin Epoxidase. **NCED3,4**: 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase. **GA2**: Ent-Kauren-Synthase. **GA3**: Ent-Kauren-Oxidase. **HEMA**: Glutamyl-tRNA Reductase. **GSA**: Glutamate-1-Semialdehyd 2,1-Aminomutase. **HEMB**: Porphobilinogen Synthase. **HEMC**: Hydroxymethylbilane Synthase. **HEMD**: Uroporphyrinogen-III Synthase. **HEME**: Uroporphyrinogen Decarboxylase. **LIN2**: Coproporphyrinogen Oxidase. **PPOX**: Protoporphyrinogen Oxidase. **GUN5**: Magnesium Chelatase. **CHLM**: Magnesium Protoporphyrin IX Methyltransferase. **DVR**: 3,8-Divinyl Protochlorophyllide A 8-Vinyl Reductase. **PORA,B,C**: Protochlorophyllide Reductase. **CHLG**: Chlorophyll Synthase. **CAO**: Chlorophyll A Oxygenase.

Schließlich wird Geranylgeranyl-Diphosphat auch für die Phytolsynthese benötigt, das ein Bestandteil des Chlorophylls ist. Auch alle anderen wichtigen Enzyme der Chlorophyllbiosynthese sind in der *atzr1*-Mutante auf Transkriptionsebene um mindestens 45 bis 90 % reduziert, angefangen von der Glutamat-tRNA-Synthase über die Enzyme zur Protoporphyrin IX-Synthese bis hin zur Chlorophyllsynthase und Chlorophylloxigenase, die die letzten Schritte der Chlorophyllbiosynthese vollziehen (Abb. 4-30). Die Expression der Gene für die Enzyme zur Hämbiosynthese ist im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert.

Störungen in der Chlorophyll- und Carotinoidbiosynthese können zur Akkumulation von Stoffwechselintermediaten führen, die als wichtiges Kommunikationsmittel (Alarmsignal) zwischen Plastid und Zellkern dienen. Besonders das Mg-Proto-Porphyrinogen IX aus der Chlorophyllbiosynthese gilt als eine wichtige Komponente in der retrograden Signaltransduktion und hemmt die Transkription kernkodierter Photosynthesegene (KOUSSEVIZKY *et al.*, 2007). Ein Regulator der Mg-Chelatase (*GUN4*) bzw. eine Untereinheit dieses Enzyms (*GUN5*), stellen in diesem Zusammenhang ebenfalls Schlüssel-Faktoren in der retrograden Signalkaskade zwischen Chloroplast und Zellkern dar. Die Gene beider Proteine sind in der *atzr1*-Mutante deutlich schwächer exprimiert als im Wildtyp. Das *GUN4*-Transkript ist um etwa 65 % reduziert (SLR -1,5), das *GUN5*-Transkript sogar um über 70 % (SLR -1,8). Ein weiterer Regulator des retrograden Signalwegs, das Pentatricopeptid-repeat (PPR)-Protein *GUN1*, ist in der *atzr1*-Mutante ebenfalls um 50 % reduziert.

### *Einfluss der atzr1-Mutation auf die plastidäre Transkription und Translation*

Wie das Microarray-Experiment zeigt, wirkt sich die *atzr1*-Mutation hemmend auf die Transkriptmenge kernkodierter und plastomkodierter Gene aus, die für wichtige Proteine des plastidären Stoffwechsels kodieren. Ein Merkmal der *et1*-Mutante ist die Reduktion der plastidären Transkription auch in älteren, phänotypisch unauffälligen Maispflanzen (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004; MÜLLER, 2004). Darüber hinaus ist das ZmET1-Protein in der plastidären TAC<sup>7</sup>-Fraktion aus Mais identifiziert worden und könnte somit eine Funktion während der plastidären Transkription ausüben.

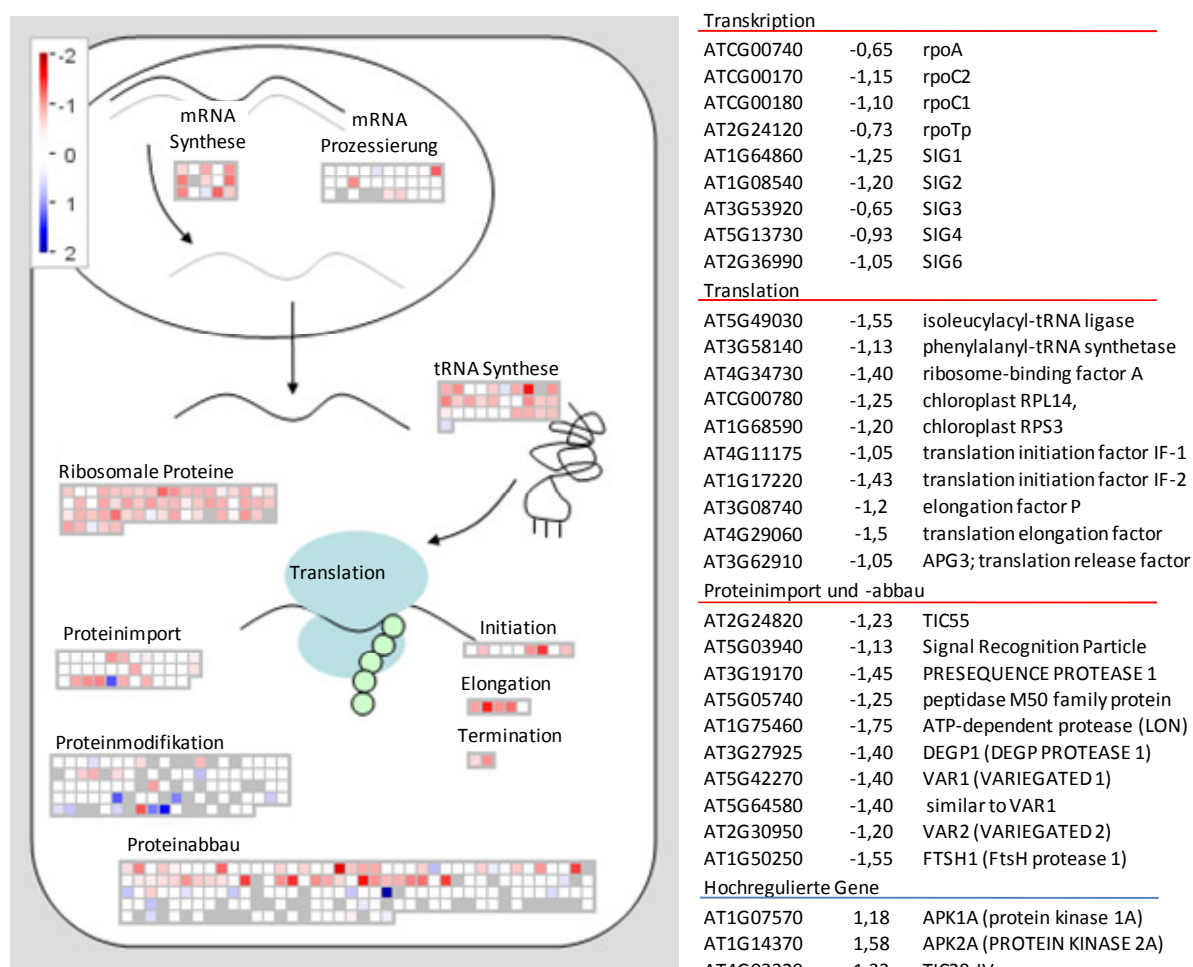
Aus diesem Grund wurde der Einfluss des *atzr1*-Knockouts auf die Transkription und Translation in den Chloroplasten anhand der Microarray-Daten untersucht.

Chloroplasten besitzen zwei RNA-Polymerasen: die kernkodierte NEP (*rpoTp*) und die plastomkodierte PEP, die aus den Untereinheiten *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* zusammengesetzt ist. Die Untereinheiten der PEP werden durch die NEP transkribiert.

---

<sup>7</sup> TAC: Transkriptionsaktives Chromosom: Protein-DNA-Komplex mit *in vitro* Transkriptionsaktivität (vgl. Einleitung).

*Arabidopsis* besitzt darüber hinaus eine weitere kernkodierte Polymerase (rpoT2), die sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten lokalisiert ist. Im Microarray wurden Transkripte der rpoT2 jedoch nicht detektiert, da die Expression des Gens vermutlich unter der Nachweisgrenze des Experiments lag. Sowohl die NEP als auch die PEP weisen in der *atzr1*-Mutante reduzierte Transkriptmengen auf (Abb. 4-31). Insbesondere die Transkripte der PEP-Untereinheiten C1 und C2 sind mit einem SLR von -1,1 bzw. -1,15 um mehr als 50 % reduziert. Das Transkript der rpoB-Untereinheit wurde im Microarray insgesamt nur schwach detektiert und eine reduzierte Expression in der Mutante konnte nicht in allen „Mutanten zu WT“- Vergleichen (4.6.1) bestätigt werden.



**Abb. 4-31: Einfluss der *atzr1*-Mutation auf die plastidäre Transkription, Translation und Proteinmodifikation.**

Die Darstellung erfolgte mit MapMan 2.2.0. herunterregulierte Gene sind als rote Quadrate bzw. Balken dargestellt, hochregulierte Gene als blaue Quadrate oder Balken, Gene, deren Expression in der *atzr1*-Mutante keine signifikante Änderung im Vergleich zum Wildtyp zeigten, sind weiß dargestellt, nicht exprimierte Gene sind als graue Boxen oder schwarze Balken dargestellt. Die Änderung der Genexpression ist als  $\log_2$ -Wert (SLR) angegeben. Gene mit einer besonders starken Expressionsänderung in der *atzr1*-Mutante oder Gene, die von besonderem Interesse sind, wurden rechts aufgelistet.

In *Arabidopsis* sind sechs verschiedene, kernkodierte Sigmafaktoren (SIG1 bis SIG6) bekannt, welche die Transkriptionsaktivität und Promotorspezifität der PEP in unterschiedlicher Weise

regulieren (KANAMARU UND TANAKA, 2004).

Die Transkripte von drei der sechs Sigmafaktoren, SIG1, SIG2 und SIG6, sind in der *atyr1*-Mutante wesentlich schwächer exprimiert als im Wildtyp (SLR von -1,25, -1,2 bzw. -1,05). Auch die Sigmafaktoren SIG3 und SIG4 sind auf Transkriptebene um 35 % bzw. 48 % reduziert, während SIG5 im Vergleich zum Wildtyp keine Expressionsänderung zeigt (Abb. 4-31).

Die TAC-Fraktion der Chloroplasten enthält neben der RNA-Polymerase mindestens 80 weitere Proteine, die größtenteils unbekannt sind. In der Arbeit von PFALZ *et al.* (2006) wurden 18 neue TAC-Proteine aus *Arabidopsis* identifiziert (TAC1 bis TAC18), von denen 16 durch Sequenzen auf Affymetrix® ATH-1 Chip repräsentiert werden. So zeigte sich, dass die Transkripte von 14 der 16 TAC-Komponenten in der *atyr1*-Mutante schwächer exprimiert werden als im Wildtyp. Sechs TAC-Faktoren sind auf Transkriptebene um mindestens 50 % reduziert. Auch das Transkript des MFP1<sup>8</sup>-Proteins, das die plastidäre DNA an die Thylakoidmembran bindet, ist in der *atyr1*-Mutante um etwa 70 % reduziert (Daten nicht gezeigt). Während zahlreiche Faktoren des plastidären Transkriptionsapparates in der *atyr1*-Mutante geringer exprimiert werden, ist die Expression von Genen, die mit der plastidären RNA-Prozessierung im Zusammenhang stehen, kaum verändert (Abb. 4-31).

Neben den Komponenten der plastidären Transkription sind in der *atyr1*-Mutante auch zahlreiche Faktoren der plastidären Translation auf Transkriptebene herunterreguliert.

Wie bereits im Zusammenhang mit der Chlorophyllbiosynthese angesprochen wurde, ist das Transkript der plastidären Glutamyl-tRNA-Synthase in der *atyr1*-Mutante um rund 65 % reduziert. Daneben zeigen vier weitere tRNA-Ligasen auf Transkriptebene eine deutliche Reduktion um mindestens 50%. Neun weitere tRNA-Synthetasen sind auf Transkriptebene um 30-45 % reduziert. Ob auch die entsprechenden tRNAs in der *atyr1*-Mutante reduziert transkribiert werden, ist aus dem Microarray nicht ersichtlich.

Der überwiegende Teil der Transkripte für die verschiedenen Untereinheiten der plastidären Ribosomen ist in der *atyr1*-Mutante ebenfalls um etwa 40-60 % reduziert. plastomkodierte und kernkodierte Transkripte sind in gleichem Maße davon betroffen (Abb. 4-31). Neben den tRNA-Synthetasen und den ribosomalen Proteinen sind auch die Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren des plastidären Translationsapparates auf Transkriptebene auf etwa 35 % bis 65 % der Wildtyp-Transkriptmenge reduziert (Abb. 4-31). Der überwiegende Teil der plastidären Proteine wird im Cytosol translatiert und anschließend in die Chloroplasten importiert. Verglichen mit dem Wildtyp sind in der *atyr1*-Mutante insgesamt nur wenige Transkripte, die für Komponenten der Proteinimport-Maschinerie kodieren, differenziell exprimiert. Darunter befinden sich Gene, die für Proteine des äußeren und

---

<sup>8</sup> MFP1: MAR binding filament-like protein 1

inneren Translokationskomplexes (TOC75, TIC55, TIC110) sowie für Proteine zur Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran oder den Import ins Thylakoidlumen kodieren. Das Transkript für das TIC20-Protein des inneren Translokationskomplexes ist als einziges Transkript um das Zweieinhalbfache hochreguliert (Abb. 4-31). In wieweit sich die veränderte Transkriptmenge dieser Gene letztlich auf die Funktionalität der verschiedenen Importwege auswirkt, ist schwer vorhersehbar.

Die Aktivität vieler Proteine wird posttranslational beispielsweise über Phosphorylierung reguliert. Transkripte, die für Proteine zur posttranslationalen Modifikation in den Chloroplasten kodieren, sind in der *atzr1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wenig verändert (Abb. 4-31). Vier Proteinkinasen mit unbekannter Funktion sind in der *atzr1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp etwa doppelt so stark exprimiert, während die Expression von zwei weiteren Kinasen und einer Phosphatase nur halb so stark wie im Wildtyp detektiert wurde. Eines dieser Transkripte, das um 50 % reduziert ist, kodiert für die STN7 (*state transition7*)-Kinase, welche den LHCII-Komplex zur schnellen Adaption der Photosynthese an veränderte Lichtverhältnisse phosphoryliert.

Transkripte, die für proteinfaltende Proteine der Plastiden kodieren (Chaperone, Co-Chaperone, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen vom FKBP-Typ), sind in der Abb. 4-31 nicht dargestellt. Dennoch sollte erwähnt werden, dass 35 von 59 Genen, die für proteinfaltende Chloroplasten-Proteine codieren, in der *atzr1*-Mutante herunterreguliert sind. Die Hälfte dieser Gene ist um 50 % und mehr reduziert. Andererseits sind vier DNAJ-Proteinkodierende Gene um 50 % bis 75 % hochreguliert.

Schließlich sind in der *atzr1*-Mutante die Transkripte von 16 plastidären Proteasen um mindestens 50 % bis 70 % reduziert (Abb. 4-31). Unter anderem sind auch die Transkripte der Proteasen VAR1 und VAR2 betroffen, deren Knockout jeweils in einem variierten Blattphänotyp resultiert. Interessanterweise lässt sich der *var2*-Phänotyp durch Inhibition der plastidären Translation aufheben (Yu *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau für die Funktionalität der Chloroplasten von großer Wichtigkeit ist. Möglicherweise auch aus diesem Grund sind sowohl Komponenten der Transkription, Translation, Proteinfaltung und des Proteinabbaus in der *atzr1*-Mutante auf Transkriptebene reduziert.

### *Weitere Veränderungen der Genexpression in der atzr1-Mutante*

Bisher wurden in erster Linie Transkripte betrachtet, die in der *atzr1*-Mutante herunterreguliert sind. Dazu gehören insbesondere Gene der Chlorophyll- und Isoprenoidbiosynthese, der Photosynthese (Licht- und Dunkelreaktion) sowie Komponenten der plastidären Transkription, Translation und des Proteinabbaus. Wie in Kapitel 4.6.2 bereits geschildert wurde, sind in der *atzr1*-Mutante etwa 750 Gene mindestens zweimal so

stark exprimiert wie im Wildtyp. Einige dieser Gene kodieren für Faktoren aus dem Aminosäuremetabolismus. Transkripte, die für Aminosäure-abbauende Proteine kodieren, sind in der *atzr1*-Mutante besonders stark exprimiert.

Möglicherweise ist auf Grund eines vorherrschenden Kohlenhydratmangels durch eine verminderte Photosyntheseleistung in der *atzr1*-Mutante die Verstoffwechslung von Aminosäuren erhöht.

Zahlreiche Faktoren, die mit biotischem Stress und Pathogenabwehr in Verbindung stehen (z.B. *Lipid Transfer* Proteine, Defensine), sind in der *atzr1*-Mutante bis zu zehnmals stärker exprimiert als im Wildtyp, obwohl die Pflanzen unter sterilen Bedingungen angezogen worden sind. Auch Transkripte von etwa der Hälfte der exprimierten Peroxidase-Gene sind in der *atzr1*-Mutante verstärkt (SLR 2 oder mehr) detektierbar.

Ebenso sind diverse Gene, die für Komponenten der Zellwandbiosynthese und -modifikation kodieren, in der *atzr1*-Mutante verstärkt exprimiert. Gleichzeitig werden verschiedene Gene aus der Wachsbiosynthese im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert. Dies könnte eine reduzierte bzw. veränderte Ausbildung der Kutikula zur Folge haben. Durch Toluidinblau-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche der Blätter in der *atzr1*-Mutante nicht vollständig intakt ist. Strukturelle Defekte der Kutikula können zu einer erhöhten Expression von Genen zur Pathogenabwehr führen (CHASSOT *et al.*, 2007). Dies mag auch in der *atzr1*-Mutante der Fall sein.

Darüber hinaus zeigen in der *atzr1*-Mutante etwa 60 Gene von Transkriptionsfaktoren und 45 weitere Gene, denen eine Funktion während der Pflanzenentwicklung zugeschrieben wird, eine signifikante Veränderung ihrer Expression (SLR >1 oder <-1). Da die genaue Funktion dieser Gene jedoch in den meisten Fällen nicht bekannt ist, lässt sich kein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression und dem *atzr1*-Knockout herstellen.

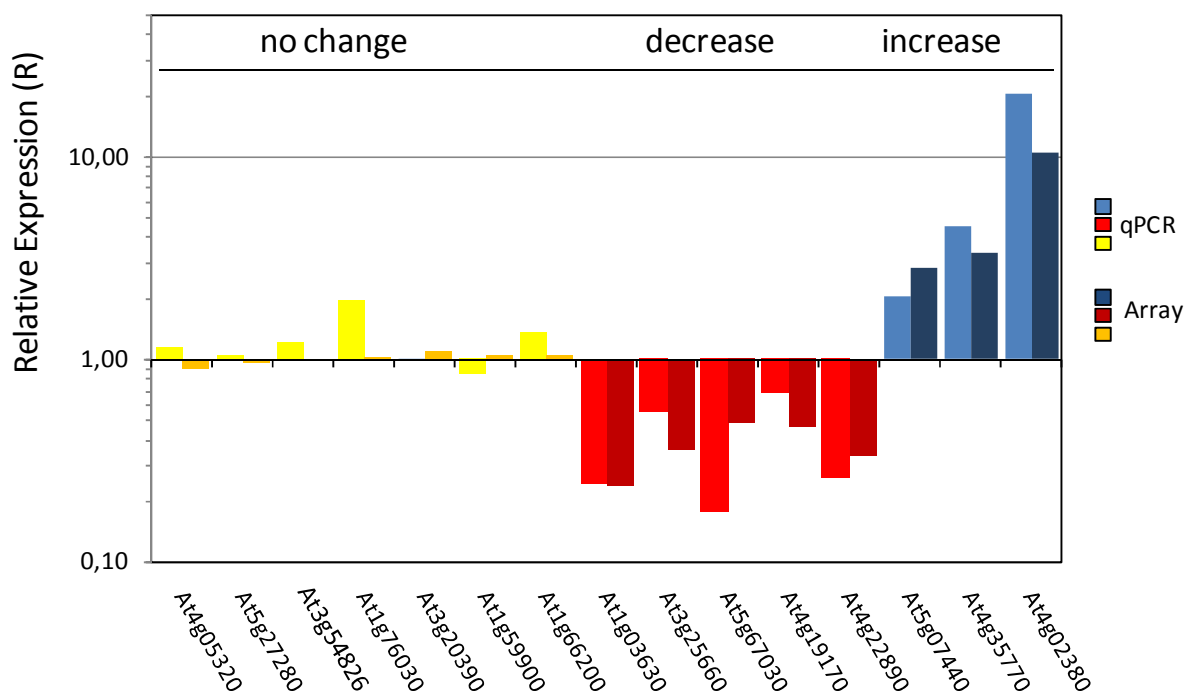
Für etwa 30 % der differentiell regulierten Transkripte in der *atzr1*-Mutante ist bisher keine Funktion bekannt.

#### 4.6.3 Verifizierung der Microarray-Daten mittels *Realtime-PCR*

Das Design der einzelnen *Probe sets* auf dem ATH-1 Affymetrix®-Genchip führt gewöhnlich zu einer hohen Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Expressionsdaten (REDMAN *et al.*, 2004). Dafür sprechen auch die Vergleiche der Hybridisierungen innerhalb der *Col-0* bzw. *atzr1*-Populationen (4.6.1). Dennoch sollte die Zuverlässigkeit der Microarray-Daten zusätzlich stichprobenartig durch RT-PCR bestätigt werden.

Dafür wurden die Transkriptmengen von 13 der auf dem Array enthaltenen Gene mittels *Realtime-PCR* in je vier *AtZR1*-Knockout-Pflanzen und vier Wildtyppflanzen untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des *AtZR3*-Gens analysiert, welches nicht auf dem

Microarray enthalten ist. Neben den Genen für die kernkodierte Plastidenproteine *AtZR2* (gleich bleibende Expression), *PORC*, der glutamyl-tRNA-Amidotransferase, von *ABA1*, *NCED4*, *PGRL1* (Abnahme der Expression) sowie *SEN1* und *LEA3* (Zunahme der Expression) wurde die Expression der Gene *At3g54826* (*AtZR3*), *At1g59900* und *At5g07440*, die für mitochondriale Proteine kodieren sowie *At4g05320* (Polyubiquitin10), *At1g76030* (ATPase der Vakuole), *At3g20390* (Endoribonuclease) und *At1g66200* (Glutaminsynthase) untersucht.



**Abb. 4-32: Realtime-PCR zur Verifizierung der Expressionsdaten aus der Microarray-Analyse**

Die Expressionsstärke der aufgelisteten Gene wurde mittels *Realtime*-PCR (qPCR) in je 4 *atzr1*- und *Col-0*-Individuen ermittelt und als Relative Expression  $R=2^{EXP-(\Delta ct\ atzr1 - \Delta ct\ Col-0)}$  in der Mutante bezogen auf den Wildtyp angegeben. Zum Vergleich ist die relative Expressionsänderung aus den Microarray-Experimenten angegeben. No change (gelb): keine Veränderung, decrease (rot): Abnahme der Expression, increase (blau): Zunahme der Expression in der Mutante bezogen auf den Wildtyp. *At4g05320*: Polyubiquitin 10 ; *At5g27280*: *AtZR2*; *At3g54826*: *AtZR3*; *At1g76030*: vacuolar ATP synthase subunit B; *At3g20390*: endoribonuclease L-PSP family protein; *At1g59900*: pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit; *At1g66200*: glutamine synthetase; *At1g03630*: protochlorophyllide reductase C (PorC); *At3g25660*: glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A; *At5g67030*: zeaxanthin epoxidase (ABA1); *At4g19170*: 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4 (NCED4); *At4g22890*: PGRL1; *At5g07440*: mitochondrial glutamate dehydrogenase 2; *At4g35770*: senescence associated 1 (SEN1); *At4g02380*: late embryogenesis abundant protein 3 (LEA3).

In Abb. 4-32 ist die gemittelte relative Expressionsänderung der untersuchten Gene in der *atzr1*-Knockout in Bezug auf die Expression im Wildtyp dargestellt.

Eine relative Expression von eins bedeutet keine Veränderung der Expression in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Werte unter eins bedeuten eine reduzierte Expression in der *atzr1*-Knockout-Pflanze, während Werte über eins eine größere Transkriptmenge bedeuten.



Als Vergleich wurden die Expressionsänderungen aus dem Microarray-Experiment aufgetragen.

Gene, deren Expression im Vergleich zwischen Wildtyp und *atzr1*-Mutante im Microarray keine Änderung zeigten (no change, gelbe Balken), weisen auch in der *Realtime*-PCR nur geringe Veränderungen in der Expression bei Mutante und Wildtyp auf (mit Ausnahme des Gens At1g76030). Ebenso zeigen die Gene, die in den *atzr1*-Microarrays im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert waren (*decrease*, rote Balken; *increase*, blaue Balken) in der *Realtime*-PCR eine vergleichbare Expression, auch wenn die Spanne der Expressionsänderung zwischen *Realtime*-Experiment und Microarray-Experiment zuweilen schwankt (z.B. Gen At5g67030).

Insgesamt konnten die Expressionsdaten aus der Microarray-Analyse durch die stichprobenartige Kontrolle mittels *Realtime*-PCR sehr gut verifiziert werden.

#### 4.6.4 Auswirkungen des *atzr1*-Knockouts auf Proteinebene

Nachdem durch Microarray-Analyse und *Realtime*-PCR gezeigt werden konnte, dass sich die *atzr1*-Mutation präferentiell auf die mRNA-Expression der im Zellkern und auf dem Plastom codierten Plastidenproteine auswirkt, sollte mittels Western-Analysen untersucht werden, ob sich die Änderung der Transkriptmengen auch auf Proteinebene bemerkbar macht. Hierfür wurde Gesamtprotein aus je vier *atzr1*-Knockout-Pflanzen und vier *Col-0* Wildtypen isoliert, die in ihrer Entwicklung etwa den Pflanzen aus dem Microarray-Experiment entsprachen. Mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteinmengen der kernkodierten Plastidenproteine HSP70<sup>9</sup>, LHCA2, LHCA4, LHCB4 (CP29), RBCS (kleine Untereinheit der RuBisCO) und der plastidenkodierten Proteine PsbA, PsbE des Photosystems II sowie RBCL (große Untereinheit der RuBisCO) untersucht. Im Microarray waren die Transkriptmengen dieser Proteine in der *atzr1*-Mutante um etwa 25 % reduziert (SLR -0,5). Eine Ausnahme bilden die beiden *Hsp70*-Gene und *PsbA*, deren Transkripte um etwa 50 %, 65 % und 40 % (*HSP70-1*: SLR -1/ *HSP70-2*: -1,5/ *PsbA*: SLR -0,8) reduziert waren.

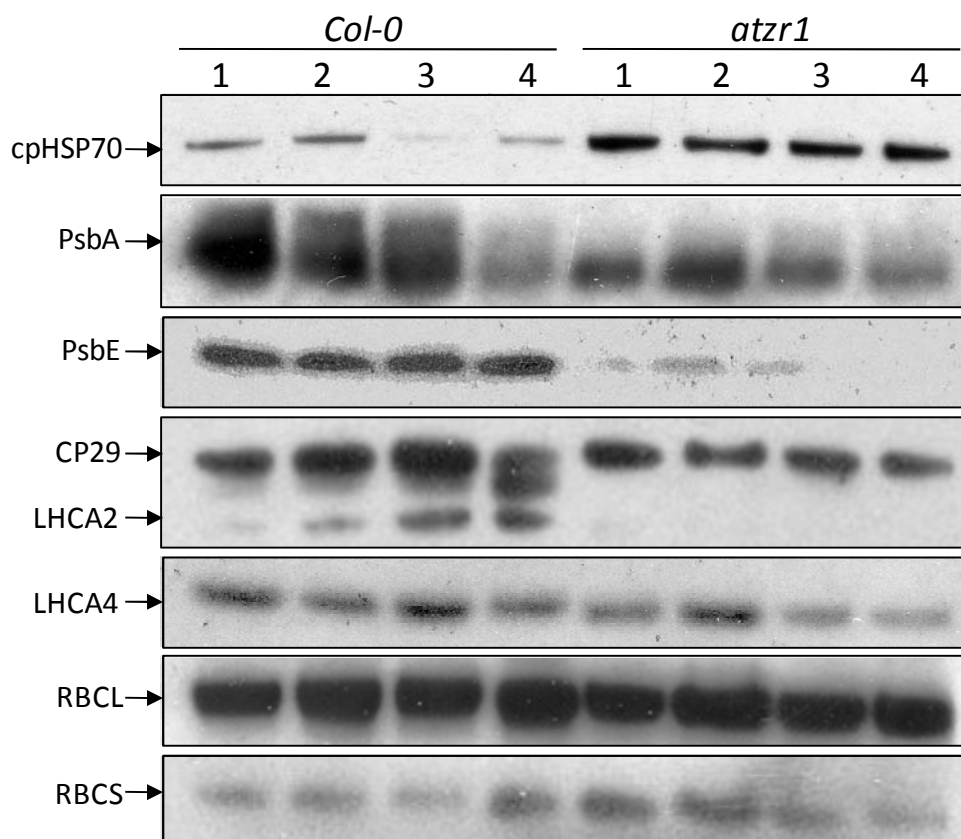
Wie die Western-Detektion der Proteine zeigt (Abb. 4-33), korrelierte die Menge der untersuchten Proteine nicht immer mit der Transkriptmenge. Die HSP70-Proteine, deren Transkripte in der *atzr1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp um 49 % bzw. 65 % reduziert sind, werden auf Proteinebene deutlich stärker in der Mutante als im Wildtyp detektiert. Hier ist demnach eine entgegengesetzte Korrelation zwischen Transkriptmenge und Proteinmenge erkennbar. *PsbA*, das in der *atzr1*-Mutante eine Reduktion des Transkripts auf

---

<sup>9</sup> In *Arabidopsis* existieren zwei plastidäre HSP70-Proteine, HSP70-1 und HSP70-2, die sich im Westernblot nicht voneinander unterscheiden lassen.

etwa 60 % zeigte, wird hingegen (abgesehen von Wildtyp Spur 4) auch im Westernblot etwas schwächer in der Mutante detektiert. Für PsbA lässt sich also sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene eine Reduktion in der *atzr1*-Mutante verzeichnen.

PsbE und LHCA2, die auf Transkriptebene jeweils nur geringfügig durch den *atzr1*-Knockout beeinflusst werden, sind in der Mutante mittels Westernblot hingegen kaum detektierbar. Die *atzr1*-Mutation wirkt sich bei diesen Genen auf Proteinebene demnach stärker aus, als auf Transkriptebene.



**Abb. 4-33: Western-Detektion verschiedener Plastidenproteine in der *atzr1*-Mutante und im *Col-0* Wildtyp.** 30 µg *Arabidopsis*-Gesamtprotein aus je vier verschiedenen *atzr1*-Knockout-Pflanzen und *Col-0*-Wildtyp-Pflanzen wurde für identische Western-Blots durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf ECL-Membranen transferiert. Die für die Immundetektion verwendeten Antikörperkonzentrationen sind im Methodenteil (3.2.4.13) aufgeführt.

Für die Proteine LHCB4 (CP29), LHCA4, RBCL und RBCS lassen sich im Westernblot keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge zwischen Wildtyp und *atzr1*-Mutante feststellen. Im Microarray war die mRNA-Expression dieser Gene im Vergleich zum Wildtyp jedoch nur schwach reduziert, sodass dieses Ergebnis nicht überraschend ist.

Insgesamt zeigten die Westernanalysen, dass die im Microarray detektierten Veränderungen in der Transkriptmenge nicht automatisch mit einer entsprechenden Veränderung der Proteinmenge korrelieren müssen. Obwohl die Transkriptmenge eines Großteils der Plastidenproteine durch die *atzr1*-Mutation negativ beeinflusst wird, scheinen auf

Proteinebene einige der Proteine besonders stark, andere hingegen weniger stark betroffen zu sein. Bekanntermaßen unterliegen sowohl die Plastiden-kodierten als auch die kernkodierten Photosynthese-Gene einer umfassenden posttranskriptionellen Regulation (MARÍN-NAVARRO *et al.*, 2007).

## 4.7 Komplementation des *atzr1*- Phänotyps

Der durch eine T-DNA-Insertion bedingte *Knockout* des *AtZR1*-Gens in *Arabidopsis* resultiert in einem pleiotropen Mutanten-Phänotyp. Auf Grund einer gestörten Plastidendifferenzierung ist der *atzr1*-Phänotyp, ebenso wie die *etched1*-Mutation in Mais, sowohl während der Samen- als auch in der Keimlingsentwicklung stark ausgeprägt. Doch während die Mais-Keimlinge der Linie *et1*-Ref in der Lage sind, die *et1*-Mutation etwa 2 Wochen nach der Keimung zu kompensieren, zeigen *atzr1*-Mutanten in *Arabidopsis* auch in späteren Entwicklungsstadien einen ausgeprägten Mutanten-Phänotyp. Um sicher zu stellen, dass die vielfältigen morphologischen Defekte in der *atzr1*-Knockout-Linie einzig auf den Verlust der *AtZR1*-Funktion zurückgehen, wurden Komplementationsexperimente durchgeführt.

Im Zuge dieser Experimente sollte der *atzr1*-Phänotyp einerseits durch die ektopische Expression der *Arabidopsis*-Gene *AtZR1* bzw. *AtZR2* komplementiert werden, andererseits sollte untersucht werden, ob das *AtZR1*-homologe *ZmET1* aus Mais das *AtZR1* aus *Arabidopsis* funktionell komplementieren kann.

### 4.7.1 Herstellung *ZmET1*-exprimierender *Arabidopsis*-Pflanzen

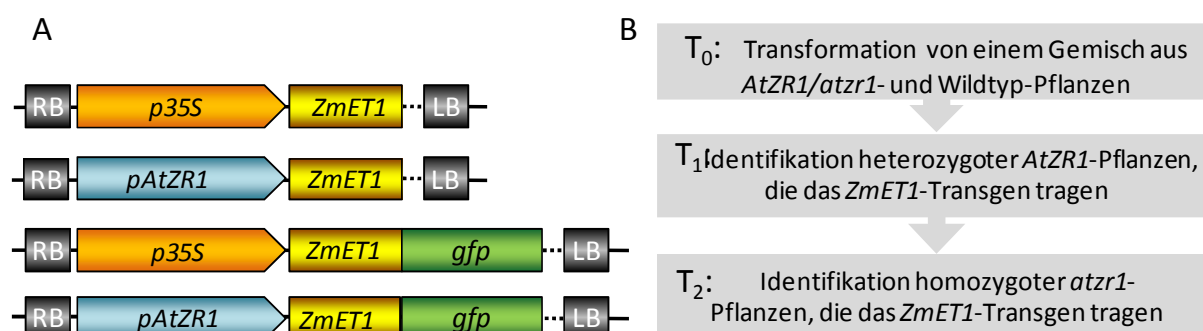
Für die heterologe Expression des *ZmET1* in *Arabidopsis* wurden vier verschiedene binäre Expressions-Vektoren hergestellt. Das *ZmET1* sollte entweder allein oder als *gfp*-Fusion unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors (*p35S:ZmET1*; *p35S:ZmET1::gfp*) beziehungsweise unter der Kontrolle des nativen *AtZR1*-Promotors (*pAtZR1:ZmET1*, *pAtZR1:ZmET1::gfp*) exprimiert werden (Abb. 4-34 A). Die Klonierung dieser Vektoren ist im Einzelnen in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Die stabile Transformation der *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte nach der *Floral-Dip*-Methode (3.2.7), bei der junge *Arabidopsis*-Blüten mit Agrobakterien, die den Zielvektor tragen, infiziert werden. Dabei können sowohl transgene Pollen wie auch Eizellen entstehen.

Auf Grund des ausgeprägten *atzr1*-Mutantenphänotyps in den Blüten erschien die direkte Transformation homozygoter *atzr1*-Pflanzen nicht sehr viel versprechend. Daher wurden Nachkommen einer heterozygoten *AtZR1*-Pflanze für die *Arabidopsis*-Transformation eingesetzt. Die einzelnen Pflanzen wurden vor der Transformation allerdings nicht genotypisiert, sodass davon auszugehen war, dass die transformierte T<sub>0</sub>-Generation ein

Gemisch aus heterozygoten *AtZR1*-Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen darstellte (Abb. 4-34 B). Die Selektion transgener *ZmET1*-Nachkommen in der  $T_1$ -Generation erfolgte zunächst durch das Herbizid BASTA<sup>®</sup>. Anschließend wurde das Vorhandensein des *ZmET1*-Transgens in den BASTA<sup>®</sup>-resistenten Pflanzen mittels genomischer PCR bestätigt. Gleichzeitig wurde der Genotyp dieser Pflanzen in Bezug auf das *atzr1*-T-DNA-Allel bestimmt.

Auf diese Weise konnten in der  $T_1$ -Generation jeweils zwei *Arabidopsis*-Pflanzen identifiziert werden, die die Konstrukte *p35S:ZmET1* bzw. *pAtZr1:ZmET1* enthielten und außerdem einen heterozygoten *AtZR1/atzr1*-Genotyp aufwiesen. Diese Pflanzen zeigten erwartungsgemäß allesamt ein normales Wachstum.



**Abb. 4-34: Heterologe Expression von *ZmET1* aus Mais in *Arabidopsis***

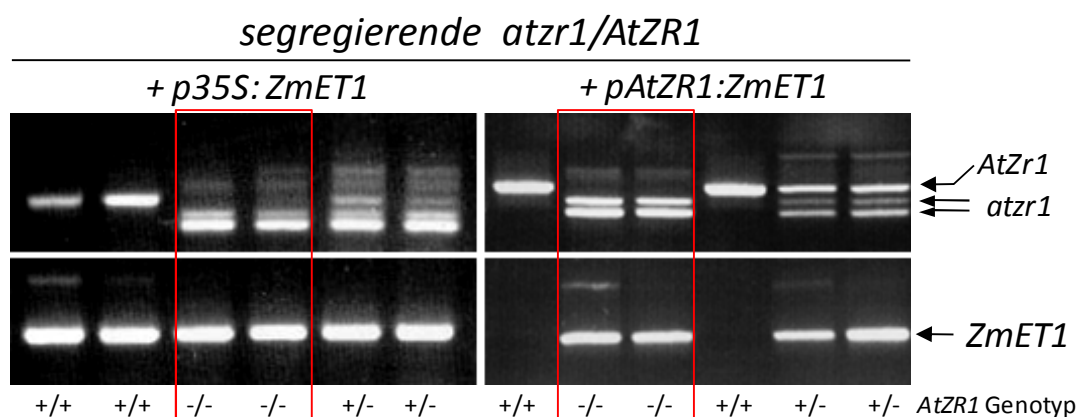
A) Schematische Darstellung der *ZmET1*-Expressionskassetten in den für die *Arabidopsis*-Transformation verwendeten binären Expressionsvektoren. RB: T-DNA Right Border, LB: T-DNA Left Border. Das *bar*-Gen zur Vermittlung der BASTA<sup>®</sup>-Resistenz wurde ausgespart (gepunktete Linie). B) Schema zur Identifikation homozygoter *atzr1*-*Arabidopsis*-Pflanzen, die außerdem eine der vier in A) dargestellten Transgene exprimieren.

Nach der Transformation heterozygoter *AtZR1*-Pflanzen mit dem *p35S:ZmET1::gfp*-Konstrukt besaß in der  $T_1$ -Generation laut PCR-Analyse nur eine von zwölf transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, neben der *p35S:ZmET1::gfp* T-DNA auch ein *atzr1*-T-DNA-Allel. Diese Pflanze entwickelte sich allerdings sehr schlecht und bildete lediglich vier Samen. Diese waren zwar keimfähig, die resultierenden Pflanzen bildeten jedoch keine Blüentriebe, sodass die Linie nicht aufrechterhalten werden konnte. Des Weiteren konnten keine heterozygoten *AtZR1*-Pflanzen identifiziert werden, die zusätzlich die *pAtZr1:ZmET1::gfp*-T-DNA trugen. Somit blieb die Erzeugung einer *ZmET1::GFP* exprimierenden *atzr1*-Knockout-Linie erfolglos.

#### 4.7.2 *ZmET1* aus Mais komplementiert den *atzr1*-Phänotyp in *Arabidopsis*

Nach der Transformation heterozygoter *AtZR1*-Pflanzen mit den Konstrukten *p35S:ZmET1* und *pAtZr1:ZmET1* wurden in der  $T_1$ -Generation jeweils zwei heterozygote *AtZR1*-Pflanzen identifiziert, die außerdem die *p35S:ZmET1*-T-DNA bzw. die *pAtZr1:ZmET1*-T-DNA enthielten (4.7.1). Unter den segregierenden Nachkommen dieser Pflanzen wurden in der  $T_2$ -

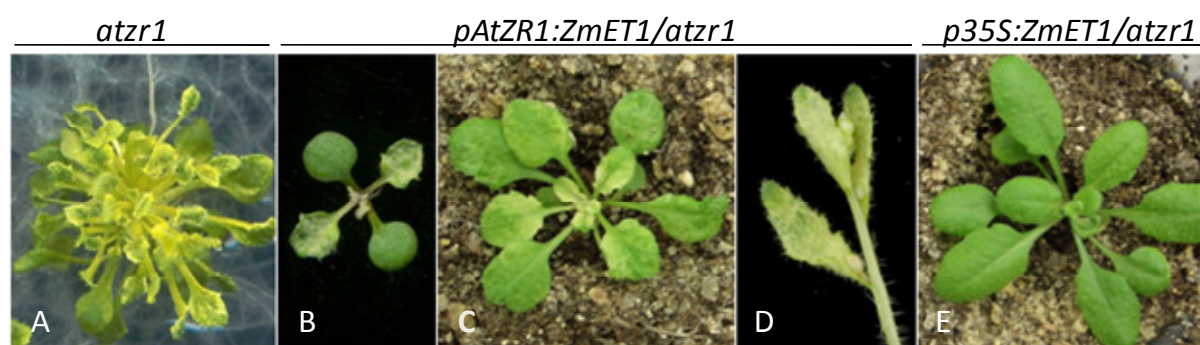
Generation für jede der genannten Linien mittels genomischer PCR homozygote *atzr1*-Pflanzen identifiziert, die zusätzlich die *p35S:ZmET1*-T-DNA bzw. die *pAtZr1:ZmET1*-T-DNA enthielten (Abb. 4-35).



**Abb. 4-35: Genomische PCR zur Identifikation homozygoter *atzr1*-Pflanzen, die das *ZmET1*-Transgen enthalten.**

In den Nachkommen segregierender *atzr1/AtZR1*-Pflanzen wurden das *AtZR1*-Wildtyp- und das *atzr1*-Knockout-Allel durch Multiplex-PCR mit zwei genspezifischen Primern (JK 13/JK14) und einem T-DNA-spezifischen Primer (JK19) nachgewiesen (obere Reihe). Bei diesem Nachweis wurden außerdem eine Reihe unspezifischer PCR-Produkte erhalten, die jedoch keinen Einfluss auf die Auswertung des Ergebnisses hatten. Parallel wurde das Vorhandensein der *p35S:ZmET1*- bzw. der *pAtZr1:ZmET1*-T-DNA mit *ZmET1*-spezifischen Primern (JK 54/JK55) gezeigt (untere Reihe). Homozygote *atzr1*-Pflanzen, die außerdem das *ZmET1* besitzen, sind rot umrandet.

Die phänotypische Analyse homozygoter *atzr1*-Knockout-Pflanzen mit *p35S:ZmET1*-T-DNA- oder *pAtZr1:ZmET1*-T-DNA-Insertion zeigte, dass sich der *atzr1*-Mutanten-Phänotyp in *Arabidopsis* durch die heterologe Expression des *AtZR1*-homologen *ZmET1* aus Mais komplementieren lässt (Abb. 4-36).



**Abb. 4-36: *ZmET1* komplementiert den *atzr1*-Phänotyp in Abhängigkeit der Expressionsstärke**

A) Homozygote *atzr1*-Knockout-Pflanze nach Anzucht auf MS-Medium mit 1 % Sucrose.

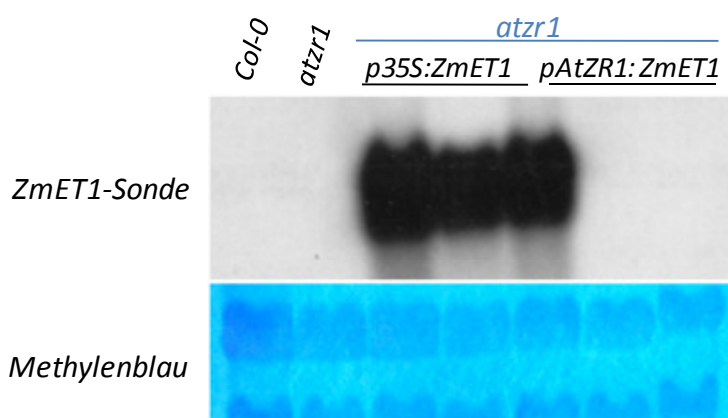
B-D) Homozygote *atzr1*-Pflanze, die das *ZmET1* aus Mais unter der Kontrolle des nativen *AtZR1*-Promotors exprimiert; (B Pflanze nach 1 Woche auf Medium, (C) 4 Wochen auf Erde, (D) Blütrieb.

E) 4 Wochen alte homozygote *atzr1*-Pflanze, die das *ZmET1* aus Mais unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimiert.

Der Grad der Komplementation korreliert dabei mit der Expressionsstärke des Promotors. Steht das *ZmET1* unter der Kontrolle des nativen *AtZR1*-Promotors, so wird der *atzr1*-Phänotyp nur teilweise komplementiert. Während sich die *atzr1*-Mutante nur auf Sucrosehaltigem Nährmedium entwickelt, sind die *pAtZr1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen auch nach der Anzucht auf Erde lebensfähig und entwickeln grüne, morphologisch unauffällige Cotyledonen. Die ersten Blätter sind im Vergleich zum Wildtyp jedoch blasser (Abb. 4-36 B). Auch die folgenden Rosettenblätter, Stengel und Stengelblätter ergrünen in den *pAtZr1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp verzögert (Abb. 4-36 C, D). Ansonsten ist in den *pAtZr1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen der Wildtyp-Habitus wiederhergestellt und die Pflanzen weisen keine der übrigen für die *atzr1*-Mutante typischen strukturellen oder morphologischen Anomalien, wie z.B. eine erhöhte Anzahl der Rosettenblätter und Verwachsungen an Blättern und Blüten auf.

Wird das *ZmET1* in homozygoten *atzr1*-Knockout-Pflanzen unter der Kontrolle des konstitutiven *35S*-Promotors exprimiert, lassen sich die Pflanzen äußerlich nicht mehr vom Wildtyp unterscheiden (Abb. 4-36 E).

Die *ZmET1*-Expression in den komplementierten *atzr1*-Pflanzen wurde mittels Northernblot analysiert (Abb. 4-37). Mit einer *ZmET1*-Sonde ließ sich das *ZmET1*-Transkript sehr deutlich in *atzr1*-Pflanzen detektieren, die das *ZmET1* unter Kontrolle des *35S*-Promotors exprimieren. In *atzr1*-Pflanzen, die das *ZmET1* unter der Kontrolle des schwächeren *AtZR1*-Promotors exprimieren, war hingegen auch nach zweiwöchiger Exposition der Membran kein *ZmET1*-Transkript detektierbar.



**Abb. 4-37: Northernanalyse *ZmET1*-exprimierender *atzr1*-Pflanzen**

Eine Northern-Membran, die mit 15 µg aufgetrennter Gesamt-RNA aus Rosettenblättern sechs Wochen alter *Col-0*-, *atzr1*-, *p35S:ZmET1/atzr1*- und *pAtZr1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen beladen ist, wurde mit einer radioaktiv markierten *ZmET1*-ORF-Sonde beprobt. Die Qualität und Quantität der geladenen RNA wurde durch Methylenblaufärbung geprüft. Jeweils drei Einzelindividuen der transgenen Linien wurden vergleichend untersucht.

Bis dato ließ sich das *ZmET1*-Transkript auch in den Folgegenerationen der *pAtZr1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen auch mittels RT-PCR nicht nachweisen, obwohl die Komplementation des *atzr1*-Phänotyps nahe legt, dass das *ZmET1*-Transgen exprimiert wird und der Komplementationseffekt stets mit dem Genotyp der untersuchten Pflanze korreliert. Es muss daher gefolgert werden, dass das *ZmET1* unter dem *AtZR1*-Promotor nur extrem schwach exprimiert wird. Obwohl die Expression des *AtZR1*-Wildtypgens durch Northern-Hybridisierung generell nachweisbar ist, wird das *pAtZR1:ZmET1* in den transgenen Linien unter Kontrolle des gleichen Promotors offenbar wesentlich schwächer exprimiert. Zusammenfassend belegen die durchgeführten Komplementationsstudien einerseits, dass das *ZmET1* aus Mais und das *AtZR1* aus *Arabidopsis* funktionell orthologe Gene sind, andererseits konnte gezeigt werden, dass der starke Phänotyp der *atzr1*-Mutante allein auf den Verlust der *AtZR1*-Funktion zurückzuführen ist.

### 4.7.3 *ZmET1::GFP* ist in den Chloroplasten lokalisiert

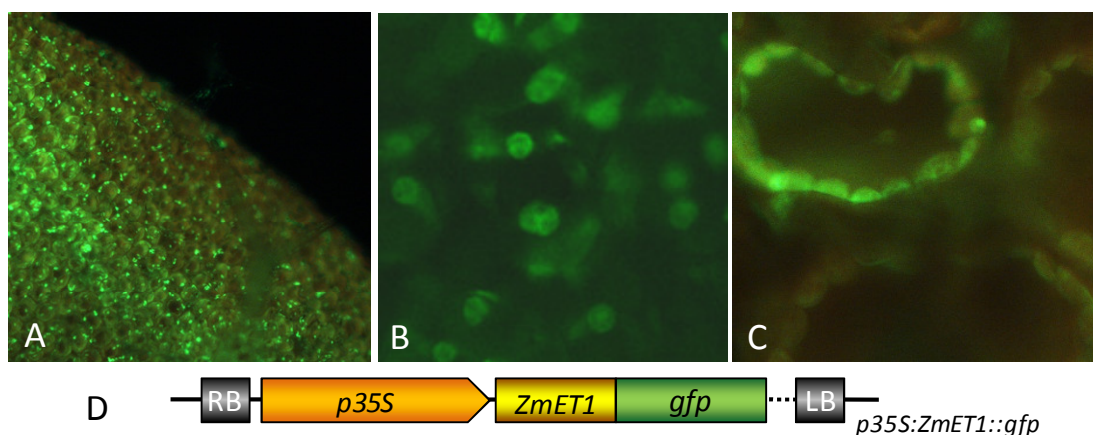
Analog zu den *p35S:ZmET1*- und *pAtZR1:ZmET1*-Konstrukten wurden auch die Konstrukte *p35S:ZmET1::gfp* und *pAtZR1:ZmET1::gfp* für die Transformation heterozygoter *AtZR1-Arabidopsis*-Pflanzen verwendet. Wie in Kapitel 4.7.1 bereits geschildert wurde, konnten dabei jedoch ausschließlich *ZmET1::gfp*-Transgene mit einem *AtZR1*-WT-Genotyp erzeugt werden. Diese Linien wurden genutzt, um die subzelluläre Lokalisation des *ZmET1* in *Arabidopsis* zu untersuchen.

Aufgrund der geringen Expression des *ZmET1*-Transkripts durch den *AtZR1*-Promotor (Abb. 4-37), überraschte es nicht, dass auch das *ZmET1::GFP*-Protein nach Expression unter dem *AtZR1*-Promotor in den *pAtZR1:ZmET1::GFP*-Pflanzen nicht detektiert wurde.

Junge, mit dem *p35S:ZmET1::gfp*-Vektor transformierte, *Arabidopsis*-Pflanzen exprimierten das *ZmET1::GFP* hingegen deutlich (Abb. 4-38). Mit zunehmendem Alter der untersuchten Blätter nahm die GFP-Expression allerdings stetig ab und war in ausdifferenzierten Blättern für gewöhnlich nicht mehr sichtbar.

Wie zu erwarten, ist das *ZmET1::GFP*-Protein in *Arabidopsis* in den Plastiden lokalisiert. Die Abb. 4-38 B und C zeigen die Lokalisation des *ZmET1::GFP* in den Leukoplasten der Epidermis und in den Chloroplasten des Mesophylls. Innerhalb der Leukoplasten und Chloroplasten sind die GFP-Signale ähnlich wie nach der transienten Transformation von Tabak (vgl. Kapitel 4.2.4) verteilt.





**Abb. 4-38: Das ZmET1::GFP-Protein wird in *Arabidopsis* in die Chloroplasten importiert**

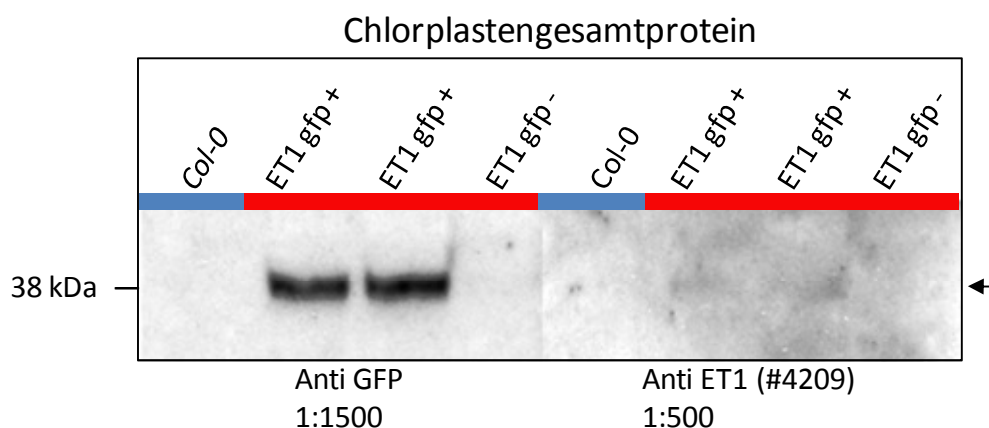
A) Aufsicht auf ein junges Blatt einer ZmET1::GFP exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanze.

B) ZmET1::GFP-Fluoreszenz in den Leukoplasten der Epidermis.

C) ZmET1::GFP-Fluoreszenz in den Chloroplasten des Mesophylls.

D) Schematische Darstellung der ZmET1-Expressionskassette in dem für die *Arabidopsis*-Transformation verwendeten binären Expressionsvektor. RB: T-DNA Right Border, LB: T-DNA Left Border. Das *bar*-Gen zur Vermittlung der Basta®-Resistenz wurde ausgespart (gepunktete Linie).

Darüber hinaus ließ sich das ca. 39 kDa große ZmET1::GFP-Protein mittels Westernblot im Proteinextrakt von Chloroplasten ZmET1::GFP-exprimierender Pflanzen nachweisen. Erwartungsgemäß konnte in Chloroplastenprotein aus Pflanzen, die zwar die *p35S:ZmET1::gfp*-T-DNA enthielten, aber keine GFP-Fluoreszenz zeigten, immunologisch kein GFP-Protein nachgewiesen werden.



**Abb. 4-39: Detektion von ZmET1::GFP in Gesamtprotein aus *Arabidopsis*-Chloroplasten**

Der Nachweis des ZmET1::GFP-Proteins in Chloroplasten-Gesamtprotein aus GFP-fluoreszierenden (+) und nicht GFP-fluoreszierenden (-) *p35S:ZmET1:gfp*-Pflanzen und *Col-0* erfolgte mittels Western-Detektion mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper und einem  $\alpha$ -ZmET1-Antikörper. Roter Balken: *p35S:ZmET1:gfp*-Pflanzen, blauer Balken: *Col-0*. Der Pfeil markiert die Position des immundekorierten Proteins.



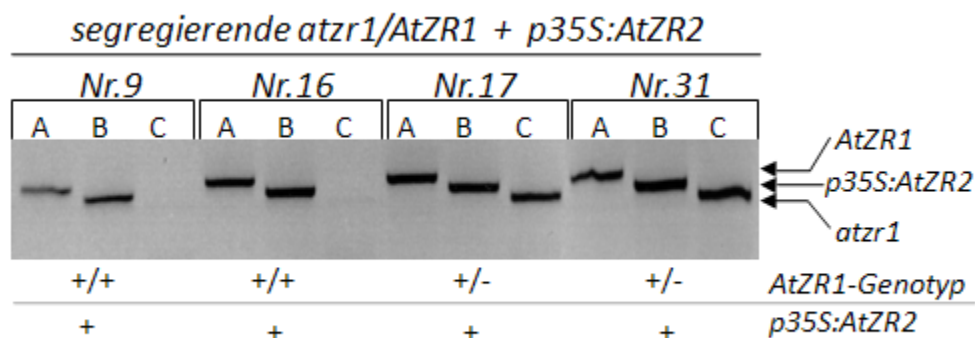
Das ZmET1::GFP-Protein wurde außerdem, wenn auch extrem schwach, mit einem Anti-ZmET1-Peptid-Antikörper (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004) detektiert. Im Experiment der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals zweifelsfrei gezeigt werden, dass dieser Peptid-Antikörper tatsächlich das ZmET1-Protein *in planta* erkennt.

#### 4.7.4 Herstellung einer *AtZR2*-Überexpressionslinie in *Arabidopsis*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der *atzr1*-Knockout-Phänotyp in *Arabidopsis* durch die heterologe Expression des *ZmET1* aus Mais komplementiert wird, stellte sich die Frage, ob auch das mit *AtZR1* verwandte *AtZR2* aus *Arabidopsis* den *atzr1*-Phänotyp komplementieren kann. Die Promotor-GUS-Studien (Kapitel 4.3) haben gezeigt, dass *AtZR1* und *AtZR2* zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung exprimiert werden. Das *AtZR1* ist demnach besonders in jungen Geweben aktiv, während das *AtZR2* überwiegend in differenzierten Geweben exprimiert wird. Besitzen *AtZR1* und *AtZR2* eine vergleichbare biologische Funktion, allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung, so könnte eine ektopische Expression des *AtZR2* während der *AtZR1*-spezifischen Entwicklungsphasen den *atzr1*-Knockout-Phänotyp möglicherweise kompensieren.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen der Linie *Col-0* mit dem binären Expressionsvektor *p35S:AtZR2* (Kapitel 3.3.4) transformiert. Die Nachkommen in der T<sub>1</sub>-Generation wurden mittels BASTA®-Selektion und PCR auf Pflanzen durchmustert, in denen die *p35S:AtZR2*-T-DNA ins Genom integriert wurde. Um *AtZR2*-überexprimierende *atzr1*-Knockout-Pflanzen zu erzeugen, wurden die identifizierten *p35S:AtZR2*-Pflanzen anschließend auf homozygote *atzr1*-Knockout-Pflanzen ausgekreuzt. Da durch die Kreuzung ebenfalls ein Wildtyp-Allel des *AtZR1* in die Pflanzen eingebracht wurde, ließ sich erfolgreich gekreuztes Saatgut in der F<sub>1</sub>-Generation auf Grund des wiederhergestellten Wildtyp-Phänotyps leicht identifizieren.

In zwei der untersuchten heterozygoten *AtZR1*-Pflanzen aus der F<sub>1</sub>-Generation konnte das Vorhandensein des *p35S:AtZR2*-Integrats mittels genomischer PCR bestätigt werden. Nach Aussaat der Nachkommen aus diesen Pflanzen auf Sucrose-haltigem MS-Medium entwickelten sich in der F<sub>2</sub>-Generation ausschließlich Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp. Diese segregierenden Nachkommen der *atzr1/AtZR1/p35S:AtZR2*-Pflanzen wurden anschließend nach Individuen durchgemustert, die einerseits die *p35S:AtZR2*-T-DNA enthielten und außerdem homozygot für das *atzr1*-Knockout-Allel waren (Abb. 4-40).



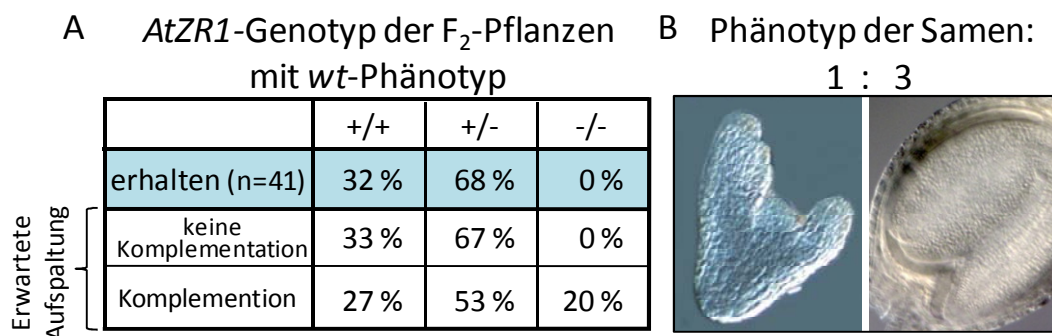
A: *AtZR1*-Allel (JK13/JK106); B: *p35S:AtZR2* (JK125/JK65); C: *atzr1*-Allel JK13/ JK19

#### Abb. 4-40: Genotypisierung heterozygoter *AtZR1/p35S:AtZR2*-Pflanzen

Der Genotyp segregierender *atzr1/AtZR1/p35S:AtZR2*-Individuen wurde mittels genomischer PCR bestimmt. Das *AtZR1*-Allel wurde durch die genspezifischen Primer JK13/JK106 amplifiziert (A), das *atzr1*-Knockout-Allel wurde mit dem genspezifischen Primer JK13 und dem T-DNA-Primer JK19 nachgewiesen (B). Der Nachweis der *p35S:AtZR2*-Integration erfolgte mit dem 35S-Promotor-Primer JK125 und dem *AtZR2*-spezifischen Primer JK65 (C). Die Pflanzen Nr.9 und Nr.16 sind homozygot für das *AtZR1*-Wildtyp-Allel, die Individuen Nr.17 und Nr.31 sind *AtZR1/atzr1* heterozygot. Alle hier gezeigten Individuen enthalten die *p35S:AtZR2*-T-DNA.

Insgesamt wurden die Genotypen von 44 *Arabidopsis*-Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generation analysiert (Abb. 4-41 A). Alle Individuen zeigten einen Wildtyp Phänotyp und waren nicht voneinander zu unterscheiden. Für 41 der 44 Pflanzen konnte der Genotyp in Bezug auf das *AtZR1*-Gen durch PCR eindeutig bestimmt werden. Davon waren 15 Pflanzen (32 %) homozygot für das Wildtyp-Allel *AtZR1* und 28 Pflanzen (68 %) waren heterozygot (*AtZR1/atzr1*). Homozygote *atzr1*-Pflanzen wurden unter den F<sub>2</sub>-Nachkommen mit Wildtyp-Phänotyp nicht identifiziert. Unter der Annahme, dass das *p35S:AtZR2*-Transgen unabhängig vom *AtZR1*-Locus vererbt wird, würde man im Falle einer Komplementation des *atzr1*-Phänotyps durch ektopische *AtZR2* Expression erwarten, dass unter den Nachkommen der F<sub>2</sub> 20 % der Pflanzen (8 von 41) einen homozygoten *atzr1*-Genotyp aber einen Wildtyp-Phänotyp besitzen (Abb. 4-41 A). Da im Experiment keine solche Pflanze gefunden wurde, spricht das Ergebnis gegen eine Komplementation des *atzr1*-Phänotyps durch ektopische *AtZR2*-Expression. Das erwartete Segregationsverhältnis unter Annahme keiner Komplementation liegt dagegen sehr dicht an dem beobachteten Verhältnis (Abb. 4-41 A).

Innerhalb einer Schote spalteten die Samen der heterozygoten *AtZR1/p35S:AtZR2*-Nachkommen in einem Verhältnis von 1:3 in Samen mit *atzr1*-Mutanten-Phänotyp und Samen mit Wildtyp-Phänotyp auf (Abb. 4-41 B). Im Falle einer Komplementation des *atzr1*-Phänotyps durch das *AtZR2* wäre hingegen ein Aufspaltungsverhältnis von 1:16 zu erwarten gewesen. Auch dieses Ergebnis spricht gegen eine Komplementation des *atzr1*-Allels durch *p35S:AtZR2*.



**Abb. 4-41: Segregationsanalyse an Nachkommen heterozygoter *AtZR1/p35S:AtZR2*-Pflanzen und -Samen**

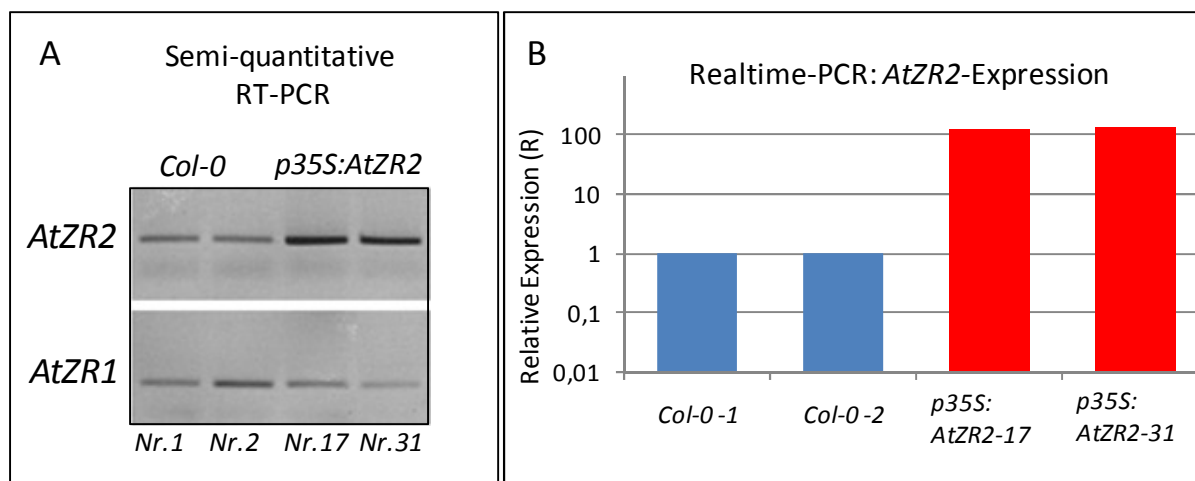
A) In den F<sub>1</sub>-Nachkommen wurden 41 *Arabidopsis*-Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp genotypisiert. 32 % der Nachkommen waren homozygot für das *AtZR1*, 68 % waren heterozygot (*AtZR1/atzr1*), 0 % waren homozygot für das *atzr1*. Dieses Aufspaltungsverhältnis entspricht der erwarteten Aufspaltung von 33 %/68 %/0 % wenn *p35S:AtZR2* den *atzr1*-Phänotyp nicht komplementiert. Im Falle einer Komplementation hätte man unter den Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp 20 % homozygote *atzr1*-Nachkommen erwartet.

B) Die Samen heterozygoter *AtZR1/p35S:AtZR2*-Pflanzen spalten phänotypisch im Verhältnis 1:3 in Mutanten- und Wildtypsamen auf.

Um sicher zu stellen, dass in den *p35S:AtZR2*-Transgenen tatsächlich eine Überexpression des *AtZR2* erfolgt, wurde die *AtZR2*-Transkriptmenge in Rosettenblättern transgener *p35S:AtZR2*-Pflanzen (mit heterozygotem *AtZR1*-Genotyp) und in *Col-0*-Pflanzen mittels semi-quantitativer RT-PCR und quantitativer *Realtime*-PCR ermittelt (Abb. 4-42). Beide Experimente zeigen deutlich, dass das *AtZR2*-Transkript in transgenen *p35S:AtZR2*-Pflanzen stärker akkumuliert als im Wildtyp. In der *Realtime*-PCR ist die relative Expression des *AtZR2* in Rosettenblättern der *p35S:AtZR2*-Pflanzen mehr als hundertmal so hoch wie im Wildtyp. Daher ist von einer Funktionalität des Transgens in der untersuchten Linie auszugehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die ektopische Expression bzw. die Überexpression des *AtZR2*-Transkripts mit sehr großer Wahrscheinlichkeit nicht zur Komplementation des *atzr1*-Phänotyps beitragen kann. Einen endgültigen Beweis könnte eine homozygote *atzr1*-Pflanze liefern, welche das *p35S:AtZR2*-Transgen exprimiert und dennoch einen Mutantenphänotyp aufweist. Eine solche Pflanze konnte bisher allerdings nicht gefunden werden. Dies ist vor allem auf die geringe Regenerationsfähigkeit der *atzr1*-Mutanten zurückzuführen.

Darüber hinaus konnten die Experimente zeigen, dass eine Überexpression des *AtZR2* in *Arabidopsis* keinen auffälligen Phänotyp verursacht.



**Abb. 4-42: Ermittlung der *AtZR2*-Transkriptmenge mittels semi-quantitativer PCR und *Realtime*-PCR**

A) Für die semi-quantitative RT-PCR wurden je 0,5 µg revers transkribierte RNA aus Rosettenblättern von je 2 verschiedenen *p35S:AtZR2*- und *Col-0*- Pflanzen eingesetzt. Die Amplifikation des *AtZR2*- und des *AtZR1*-Transkripts erfolgte mit den Primern *AtZR2* for/rev bzw. *AtZR1* for/rev (Tab. A 1-7). Als Kontrolle zum Nachweis möglicher gDNA Kontaminationen wurden je 0,5 µg der RNA direkt in für PCR-Reaktionen verwendet. Hierbei konnte nie ein Amplifikat erhalten werden (Daten nicht gezeigt.)

B) Für die *Realtime*-PCR wurden die gleichen revers transkribierten RNA-Proben wie in A) verwendet. Das *AtZR2*-Transkript und das Referenz-Transkript *UBQ10* (= Ubiquitin) wurden mit den Primern *AtZR2* for/rev bzw. *UBQ* for/rev amplifiziert. Alle Reaktionen wurden 2-fach angesetzt. Die relative Expression wurde, wie in 3.2.3.10 beschrieben, berechnet. Die *AtZR2*-Expression im *Col-0* Wildtyp wurde gleich 1 gesetzt. Die Analyse von jeweils zwei weiteren Wildtyp- und *p35S:AtZR2*-Pflanzen führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt.).

#### 4.7.5 Komplementation des *atZR1*-Phänotyps durch ektopische *AtZR1*-Expression

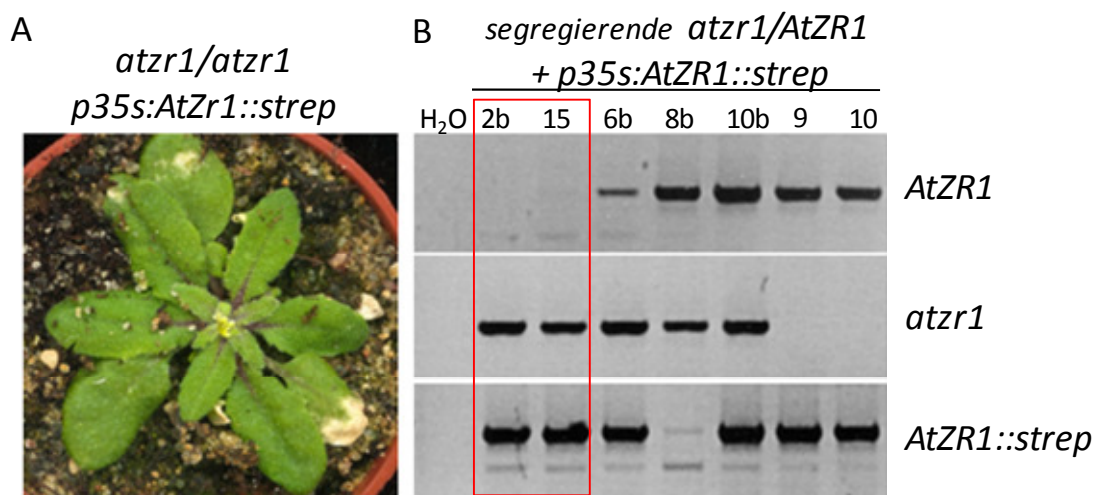
Nachdem sich der *atZR1*-Phänotyp durch die Expression des *AtZR1*-homologen *ZmET1*, nicht aber durch die Überexpression von *AtZR2* komplementieren ließ, sollte die *atZR1*-Mutation durch Expression des *AtZR1*-Wildtypgens ausgeglichen werden. Dieses Experiment ist insofern essentiell, da auf diese Weise die Verbindung zwischen dem beobachteten pleiotropen *atZR1*-Mutantenphänotyp und dem Verlust der *AtZR1*-Genfunktion bewiesen wird. Dazu wurde ein ähnlicher Ansatz gewählt, wie für die *AtZR2*-Komplementation.

Basierend auf dem *pCHF\_5* Plasmid wurde zunächst der binäre Expressionsvektor *p35S:AtZR1::strep* kloniert, der die genomische Sequenz des *AtZR1*-Gens ohne die UTR-Sequenzen unter der Kontrolle des 35S-Promotors enthält. Am 3'-Ende wurde das *AtZR1*-Gen mit einem *Strep-Tag* versehen. Die genaue Strategie zur Klonierung des *p35S:AtZR1::strep* wurde bereits in Kapitel 3.3.4 beschrieben.

Zunächst wurden *Arabidopsis*-Pflanzen der Linie *Col-0* mit dem *p35S:AtZR1::strep*-Konstrukt transformiert. Transgene Pflanzen wurden in der T<sub>1</sub>-Generation durch BASTA®-Selektion und genomische PCR mit spezifischen Primern für das Transgenkonstrukt identifiziert. Für die

Komplementation des *atzr1*-Phänotyps wurden diese transgenen *p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen auf homozygote *atzr1*-Pflanzen ausgekreuzt.

Die F<sub>2</sub>-Nachfahren der heterozygoten *atzr1/AtZR1/p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen wurden dann auf solche Pflanzen durchgemustert, die sowohl einen homozygoten *atzr1*-Genotyp als auch das *p35S:AtZR1::strep*-Transgen aufwiesen (Abb. 4-43). Zwei solcher Pflanzen (Abb. 4-43 Pflanzen 2b, 15) konnten identifiziert werden. Phänotypisch waren diese Pflanzen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Dieses Resultat zeigt, dass das AtZR1::strep-Protein funktionell ist und die *atzr1*-Mutation komplementieren kann.



**Abb. 4-43: Komplementation des *atzr1*-Phänotyps durch *AtZR1*-Überexpression**

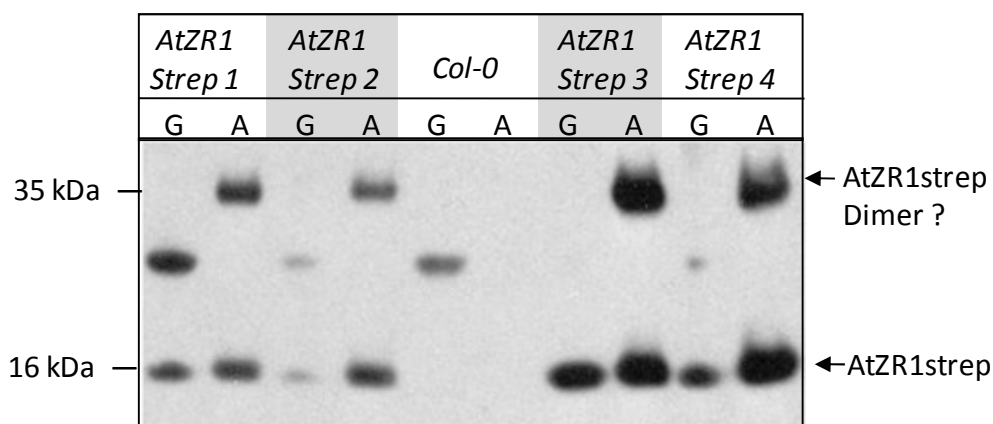
A) Durch das *p35S:AtZR1*-Transgen wurde der Wildtyp-Phänotyp in der homozygoten *atzr1*-Pflanze wiederhergestellt. B) Genotypische Analyse segregierender *atzr1/AtZR1/p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen. Zum Nachweis der Allele *AtZR1*, *atzr1* und *AtZR1::strep* mittels PCR dienten der 5'-Primer JK13 und die Allel-spezifischen 3'-Primer JK106, JK19 und JK107. Homozygote *atzr1*-Pflanzen mit der *p35S:AtZR1::strep*-T-DNA sind rot umrandet. Der Phänotyp der Pflanze 15 ist in A) gezeigt.

#### 4.7.6 Nachweis des rekombinanten AtZR1::strep-Proteins in *Arabidopsis*

Um das ektopisch exprimierte AtZR1-Protein in der Pflanze detektieren zu können, wurde das Expressionskonstrukt mit einem *Strep-Tag* versehen. Das resultierende Fusionsprotein AtZR1:strep kann einerseits über einen *Strep-Tag* spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, andererseits kann es über eine Streptavidin-verwandte *Strep-Tactin*-Matrix spezifisch aus der Pflanze aufgereinigt werden.

Zum Nachweis des AtZR1::strep Proteins in *p35S:AtZR1::strep-Arabidopsis*-Pflanzen wurde Gesamtprotein aus den Blättern zwei Wochen alter *p35S:AtZR1::strep*- und *Col-0*-Pflanzen isoliert. Ein zehntel des Gesamtproteins wurde durch Fällung konzentriert und für eine SDS-Page eingesetzt. Aus dem übrigen Proteinextrakt wurde das AtZR1::strep Protein über die *Strep-Tactin*-Matrix isoliert. Im Westernblot wurde im Gesamtprotein der *p35S:AtZR1::strep*-

Pflanzen mit dem *Strep-Tag*-spezifischen Antikörper ein ca. 16 kDa großes Protein detektiert, das in *Col-0*-Pflanzen fehlt (Abb. 4-44).



**Abb. 4-44: Isolation und Detektion des AtZR1::strep-Proteins aus *Arabidopsis***

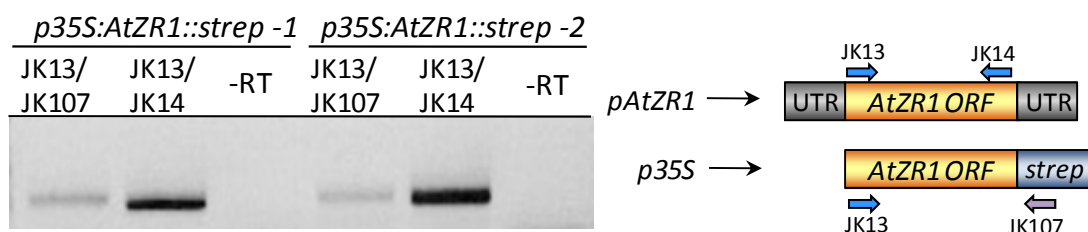
*Arabidopsis*-Gesamtprotein und *Strep-Tactin*-aufgereinigtes Protein wurden in der SDS-Page mit MES-Puffer aufgetrennt. Das rekombinante AtZR1::strep-Protein wurde mit dem HRP-konjugierten Antikörper *StrepMAB-Classic* nachgewiesen. G: Gesamtprotein und A: Aufgereinigtes Protein aus Rosettenblättern.

Auf Grund der Größe des Proteins lässt sich schlussfolgern, dass es sich hierbei um das prozessierte AtZR1::strep-Protein nach Abspaltung des Plastiden-Transitpeptids handelt. Durch die Aufreinigung über die *Strep-Tactin*-Matrix lässt sich das AtZR1::strep-Protein anreichern. Neben der erwarteten Bande von etwa 16 kDa wird in der Aufreinigungsfraction eine weitere Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa detektiert, die in der Gesamtproteinfraktion nicht nachgewiesen wurde. Möglicherweise handelt es sich hierbei um AtZR1::strep-Dimere, die durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen den Proteinen entstanden sind, da für die Aufreinigung zunächst ein Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet wurde.

Nachdem sich das rekombinante AtZR1::strep-Protein in den Rosettenblättern junger *AtZR1::strep*-Pflanzen nachweisen lässt, sollte es in größeren Mengen aus voll entwickelten Rosettenblättern isoliert werden. Doch auch nach mehreren Anläufen konnte das AtZR1::Strep-Protein nicht in den ausdifferenzierten Blättern, sondern lediglich in jungen Geweben (jungen Rosettenblättern, Stengelblättern, Blüten) nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, warum das Protein in ausgewachsenen Blättern nicht detektierbar ist, wurde RNA aus diesen Geweben isoliert und das ektopisch exprimierte *AtZR1::strep*-Transkript im Vergleich zur gesamten *AtZR1*-Transkriptmenge mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 4-45). Obwohl das *AtZR1::strep*-Transgen unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors steht, lässt sich das Transkript in reifen Blättern nur schwach nachweisen. Der Anteil des *AtZR1::strep*-Transkriptes (Primer JK13/JK107) an der Gesamtmenge der *AtZR1*-

Transkripte (Primer JK13/JK14), scheint nahezu vernachlässigbar. Die Untersuchung von vier weiteren *p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen führte zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt). Die geringe (nicht nachweisbare) *AtZR1::strep*-Protein-Menge in ausdifferenzierten Blättern korreliert also mit einer geringen *AtZR1::strep*-Transkriptmenge in diesen Geweben.

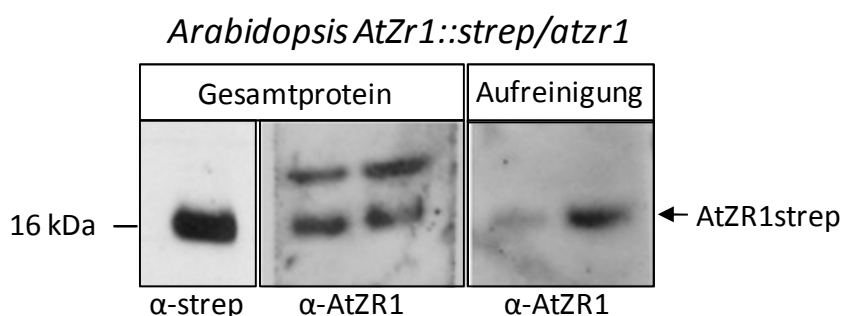


**Abb. 4-45: RT-PCR zum Nachweis des *AtZR1::strep*-Transkriptes in ausdifferenzierten Blättern**

Das *AtZR1::strep*-Transkript in zwei verschiedenen *p35S:AtZR1::strep*-Individuen wurde in der RT-PCR mit dem Primer JK13 und dem *strep*-Tag spezifischen Primer JK107 nachgewiesen. Die Primer JK13 und JK14 amplifizieren den *AtZR1*-ORF aus dem endogenen *AtZR1*-Transkript und dem *AtZR1::strep*-Transkript. Um eine Kontamination mit gDNA auszuschließen, diente RNA ohne Reverse Transkription (-RT) als Kontrolle.

#### 4.7.7 Nur das rekombinante *AtZR1*-Protein ist *in planta* nachweisbar

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das *AtZR1*-Protein aus *Arabidopsis* hergestellt (vgl. Kapitel 3.2.4.6). Die Funktionalität und Spezifität des *AtZR1*-Antikörpers wurde zunächst an *Arabidopsis*-Gesamtprotein aus 7 Tage alten *atzr1/p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen getestet (Abb. 4-46). Diese Pflanzen sind deshalb besonders gut für diese Untersuchung geeignet, da sie ausschließlich das rekombinante *AtZR1::strep*, nicht aber das endogene *AtZR1*-Protein exprimieren.



**Abb. 4-46: Nachweis des *AtZR1::strep*-Proteins mit einem *AtZR1*-spezifischen Antikörper**

Gesamtprotein und über *Strep-Tactin* aufgereinigtes Protein aus 7 Tage alten *atzr1/p35S:AtZR1::strep* *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mittels SDS-Page aufgetrennt. Das *AtZR1::strep*-Protein wurde entweder mit dem  $\alpha$ -StrepMAB Classic (1:10.000) oder mit dem polyklonalen  $\alpha$ -*AtZR1*-Antikörper (1:500) nachgewiesen. In den Spalten 2 und 3 sind jeweils die Resultate für zwei Einzelpflanzen gezeigt.

Im Gesamtprotein dieser Pflanzen reagierte der AtZR1-Antikörper mit einem etwa 16 kDa großen Protein und einem weiteren, etwa 20 kDa Protein. Der *Strep-Tag* spezifische Antikörper reagierte hingegen nur mit dem kleineren 16 kDa Protein, das demnach dem AtZR1::strep entspricht. Nach der Anreicherung des AtZR1::strep-Proteins über die *Strep-Tactin*-Matrix reagierte der AtZR1-Antikörper ebenfalls nur noch mit dem 16 kDa-Protein (Abb. 4-46).

Im Westernblot konnte demnach gezeigt werden, dass der generierte polyklonale AtZR1-Antikörper tatsächlich spezifisch für das AtZR1-Protein ist.

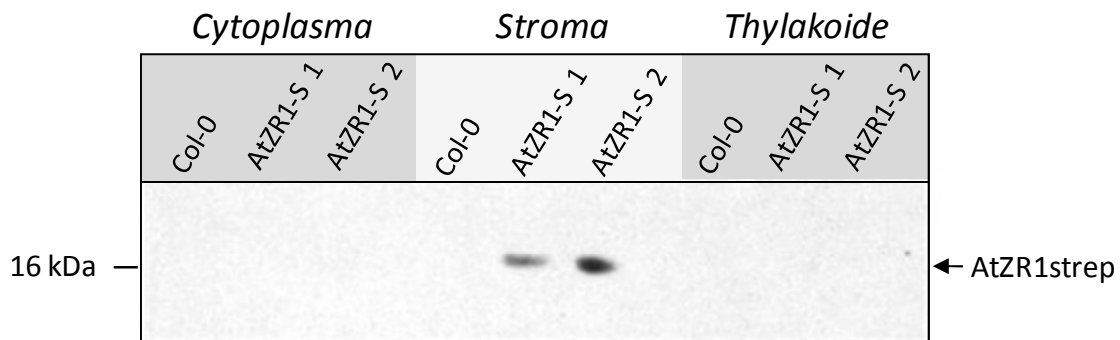
Alle bisherigen Ergebnisse zur Expression von *AtZR1* wiesen darauf hin, dass das AtZR1 vorwiegend in jungen Geweben exprimiert wird.

Um das AtZR1-Protein im Wildtyp durch Westernblot nachzuweisen, wurde deshalb Gesamtprotein aus drei bis sieben Tage alten *Arabidopsis Col-0*-Pflanzen isoliert. Das endogene AtZR1-Protein ließ sich mit dem AtZR1-Antikörper jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte im Gesamtproteinextrakt nachweisen. Offensichtlich reicht die Sensitivität für einen Nachweis der im Wildtyp vorhanden AtZR1-Proteinmenge nicht aus (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des Westernblots deuten darauf hin, dass das AtZR1-Protein unter normalen Bedingungen extrem schwach translatiert wird und/oder nur eine sehr kurze Lebensdauer hat. Diese Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen zum ETCHED1-Protein aus Mais, das sich mit einem ZmET1-spezifischen Antikörper ausschließlich in der TAC-Fraktion der Plastiden nachweisen ließ (MÜLLER, 2005). Auch das ZR-homologe HEP2-Protein aus *Chlamydomonas* wird extrem schwach exprimiert (WILLMUND *et al.*, 2008).

#### 4.7.8 Das AtZR1::strep-Protein ist im Plastidenstroma lokalisiert

Um die subzelluläre Verteilung des rekombinanten AtZR1::strep-Proteins zu untersuchen, wurden Protein-Fractionen aus verschiedenen Zell-Kompartimenten aus 1 ½ Wochen alten *Col-0*- und *p35S:AtZR1::strep*-Pflanzen (Linie 1 und 2) angereichert. Etwa 50-60 Pflänzchen wurden ohne Wurzel in einer kleinen Menge Chloroplasten-Isolationspuffer zerkleinert, filtriert und die Chloroplasten durch Zentrifugation isoliert. Ein Teil des Überstands, der in erster Linie cytoplasmatische Proteine enthält, wurde als „cytoplasmatische Fraktion“ abgenommen. Die Chloroplasten wurden wie unter 3.2.4.2 beschrieben isoliert und in Stroma und Thylakoide fraktioniert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Western-Transfer der Proteine wurde das AtZR1::strep-Protein mit einem Strep-Tag-spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 4-47). Das rekombinante AtZR1::strep-Protein ließ sich hierbei ausschließlich im Plastidenstroma nachweisen.





**Abb. 4-47: Western-Detektion des AtZR1::strep im Plastidenstroma aus *Arabidopsis***

Cytoplasma-, Stroma- und Thylakoidmembran-Protein aus *Col-0* und *AtZR1::strep*-Pflanzen (aus zwei verschiedenen Linien) wurde mittels SDS-Page in MES-Puffer aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und das AtZR1::strep-Protein mit dem StrepMAB Classic-Antikörper auf dem Westernblot detektiert.

Zusammenfassend zeigten die Komplementationsexperimente, dass der *atrz1*-Phänotyp allein auf dem Verlust des AtZR1-Proteins beruht. Dass der *atrz1*-Phänotyp durch ektopische *ZmET1*-Expression komplementiert werden konnte, belegt außerdem, dass *ZmET1* aus Mais und *AtZR1* aus *Arabidopsis* funktionell orthologe Gene sind.

*AtZR1* und *AtZR2* scheinen innerhalb des Plastiden hingegen unterschiedliche Funktionen zu übernehmen, da sie sich nicht komplementieren.

Ebenso wie das ETCHED1-Protein aus Mais scheint auch das AtZR1-Protein extrem schwach in der Pflanze exprimiert zu werden.

## 4.8 Suche nach ZmET1-Interaktionspartnern

Der Verlust des plastidären AtZR1-Proteins bei *Arabidopsis* bzw. dem orthologen ZmET1-Protein bei Mais resultiert in einer gestörten Plastidenentwicklung und führt zu offensichtlichen morphologischen Veränderungen der gesamten Pflanze. Auf molekularer Ebene führt die *et1*-Mutation in Mais zu einer reduzierten Transkriptionsaktivität in den Plastiden. Auch in *Arabidopsis* wirkt sich der Knockout des *AtZR1* auf die Transkription und Translation zahlreicher plastidärer Proteine aus (Kapitel 4.6). Doch die genaue Wirkungsweise des ETCHED1/ZR1 innerhalb der Chloroplasten konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Um weitere Hinweise über die mögliche Funktion des ETCHED1/ZR1 zu gewinnen, sollten putative ETCHED1-Interaktionspartner mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems untersucht werden. Da das ZR1-Protein besonders während der frühen Plastidenentwicklung aktiv ist, erschien die Interaktion zwischen ZmET1 und der kerncodierten RNA-Polymerase der Plastiden (*rpoTP*) als besonders plausibel. ZR-homologe Proteine aus Hefe und *Chlamydomonas* sind bereits als Interaktionspartner von HSP70-Chaperonen beschrieben worden (SICHTING *et al.*, 2005, WILLMUND *et al.*, 2008). Da höhere Pflanzen zwei plastidäre HSP70-Chaperone besitzen, sollte außerdem eine mögliche Interaktion zwischen ZmET1 und den beiden plastidären HSP70-Proteinen untersucht werden. Weiterhin sollten durch Durchmusterung einer cDNA Bank unbekannte ZmET1-Interaktionspartner identifiziert werden.

### 4.8.1 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das Hefe-2-Hybrid-System (FIELDS und SONG, 1989) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Ursprünglich basiert das 2-Hybrid-System auf der Genaktivierung durch den Transkriptionsfaktor GAL4, der sich in zwei funktionelle Domänen, die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne gliedert. Trennt man die beiden Domänen voneinander, verlieren sie ihre Funktionalität. Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu testen, werden die Interaktionspartner mit der DNA-Bindedomäne (*Bait*-Protein) bzw. mit der Aktivierungsdomäne (*Prey*-Protein) des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem *Bait*- und dem *Prey*-Protein, werden dabei die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors zusammengebracht und die Fähigkeit zur Genaktivierung wird rekonstituiert. Dies setzt jedoch den Import beider Interaktionspartner in den Zellkern voraus.

Da das ZmET1 möglicherweise eine Funktion während der Transkription erfüllt, könnte sich die Anwesenheit des Proteins im Zellkern der Hefe als störend erweisen. Daher wurde für die Interaktionsstudien das *DUALmembrane* System der Firma DUAL Systems gewählt, das

auf dem Split-Ubiquitin-System (STAGLIAR, 1998; JOHNSON und VARSHAVSKY, 1994) basiert. In diesem System führt die Interaktion zwischen *Bait*- und *Prey*-Protein nicht zur Entstehung, sondern zur Abspaltung eines Reporterproteins.

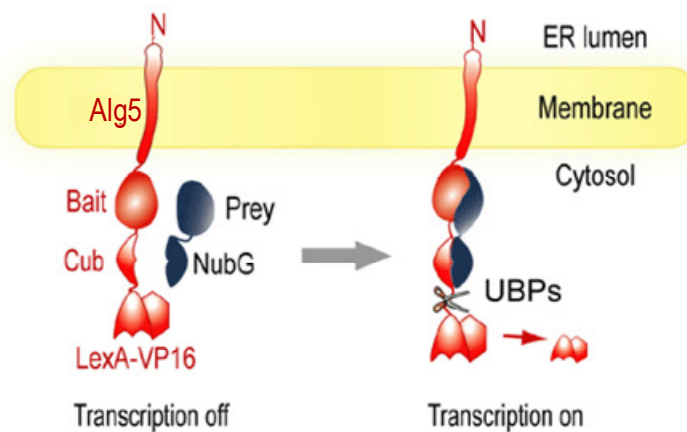
Ubiquitin ist ein kleines, hochkonserviertes Protein, das natürlicherweise am Proteinabbau durch das Proteasom beteiligt ist. In Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) lässt es sich in zwei Hälften, der N-terminalen Nub-Domäne und der C-terminalen Cub-Domäne, exprimieren, die spontan zu einem funktionellen Ubiquitin assemblieren. Dieses Dimer wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt und C-terminal gespalten. Durch eine gezielte Mutation in der Nub-Domäne (Ile13 → Gly13; NubG) lässt sich die natürliche Affinität der beiden Proteinhälften zueinander unterbinden.

Im *DUALmembrane* System wird das zu untersuchende *Bait*-Protein mit der Cub-Domäne des Ubiquitin fusioniert, an die wiederum der künstliche Transkriptionsfaktor LexA-VP16 gebunden ist. Der zu testende Interaktionspartner (*Prey*) wird mit der mutierten NubG-Domäne des Ubiquitin fusioniert. Interagieren *Bait*-Protein und *Prey*-Protein miteinander, werden die Cub- und die mutierte NubG-Domäne so dicht zusammengebracht, dass sie von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen erkannt werden, welche den LexA-VP16-Transkriptionsfaktor vom *Bait*-Protein abspalten (Abb. 4-48). Dieser kann folglich die Reportergene *His3* (→ Histidin-Auxotrophie) und *lacZ* (→  $\beta$ -Galactosidaseaktivität) im Zellkern aktivieren.

#### 4.8.2 Konstruktion von *Bait*- und *Prey*-Konstrukten

Das *DUALmembrane* System ist ursprünglich zum Testen von Proteininteraktionen zwischen membranständigen Proteinen entwickelt worden. So ist gewährleistet, dass die Reportergene im Zellkern erst nach der Abspaltung des LexA-VP16-Aktivators vom *Bait*-Protein aktiviert werden. Ein lösliches *Bait*-Protein könnte hingegen selbständig in den Zellkern migrieren.

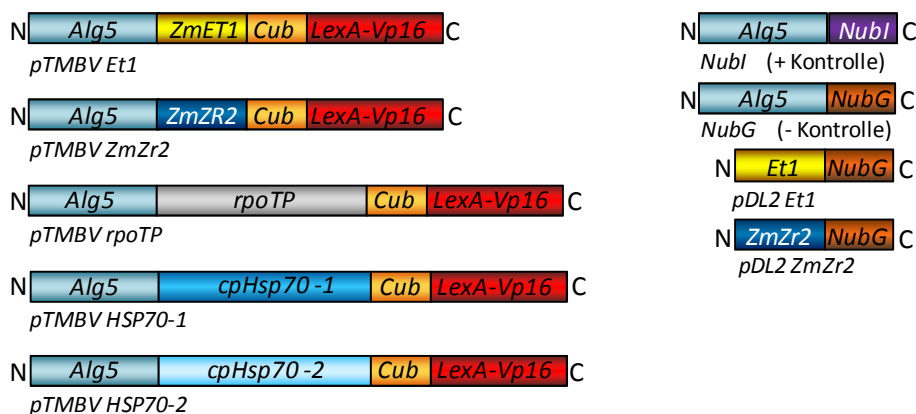
Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich lösliche *Bait*-Proteine untersucht werden sollten, wurden diese N-terminal mit dem membranständigen Alg5-Protein der Hefe fusioniert und auf diese Weise in der ER-Membran verankert (Abb. 4-48).



**Abb. 4-48: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen *Bait*- und *Prey*-Proteinen**

Die *Bait*-Proteine sind über das Alg5-Protein der Hefe in der ER-Membran verankert und sind C-terminal mit der Cub-Domäne und dem LexA-VP16-Transkriptionsfaktor fusioniert. *Prey*-Proteine sind mit NubG fusioniert. Infolge der Interaktion von *Bait* und *Prey* wird der LexA-VP16-Reporter durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) abgespalten und aktiviert die Reportergene *His3* und *lacZ* im Zellkern.

Um die Interaktion zwischen dem ZmET1-Protein und der kerncodierten Plastiden-Polymerase (rpoTP) bzw. den plastidären Chaperonen HSP70-1 und HSP70-2 zu untersuchen, wurden die ORFs der korrespondierenden Gene, wie unter 3.3.3 beschrieben, in die *Bait*-Vektoren *pCMBVAlg5* (schwacher Promotor) und *pTMBVAlg5* (starker Promotor) sowie in den *Prey*-Vektor *pDL2xN* kloniert. Um einen Eindruck von der Spezifität der Interaktion zu erlangen, wurde auch der ORF des ZmET1-verwandten ZmZR2 in die besagten Vektoren kloniert. Die resultierenden Fusionsproteine sowie die Kontrollproteine Alg5-NubI und Alg5-NubG sind in Abb. 4-49 schematisch dargestellt. In den *Prey*-Vektor konnten die ORFs der Plastidenpolymerase und der plastidären HSP70-Proteine aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht kloniert werden.



**Abb. 4-49: Schematische Darstellung der *Bait*- und *Prey*-Proteine**

### 4.8.3 Test auf Interaktion zwischen ZmET1 und rpoTP bzw. cpHSP70

Da sich die ORFs der plastidären RNA-Polymerase sowie der plastidären HSP70-Proteine nicht in die *Prey*-Vektoren klonieren ließen, sollte eine mögliche Interaktion zwischen dem ZmET1 und der rpoTP bzw. den HSP70-Proteinen 1 und 2 durch die Co-Expression der *Bait*-Vektoren *pTMBV\_rpoTP*, *pTMBV\_HSP70-1*, *pTMBV\_HSP70-2* sowie *pCMBV\_rpoTP*, *pCMBV\_HSP70-1* und *pCMBV\_HSP70-2* mit dem *Prey*-Vektor *pDL2\_ZmET1* untersucht werden. Zunächst wurde getestet, ob die gewünschten *Bait*-Proteine in ausreichendem Maße exprimiert werden. Um die Expression des *Bait*-Proteins zu bestätigen, wurden Hefezellen vom Stamm *DSY-1* mit den zu untersuchenden *Bait*-Vektoren und der Positivkontrolle *Alg5\_Nubl* co-transformiert. Durch die Co-Transformation mit der Negativkontrolle *Alg5\_NubG* wurde hingegen eine mögliche Autoaktivität des *Bait*-Proteins ausgeschlossen. Dazu wurden die transformierten Hefezellen unter selektiven Bedingungen angezogen und im X-Gal-Test auf  $\beta$ -Galactosidaseaktivität untersucht. Bei einer adäquaten Expression des *Bait*-Proteins sollten nur Hefezellen, die mit dem *Bait*-Vektor und der Positivkontrolle *Alg5\_Nubl* transformiert wurden, im X-Gal-Assay blau werden.

Durch den X-Gal-Test wurde lediglich die korrekte Expression der *ZmET1*- und *ZmZR2*-*Bait*-Konstrukte bestätigt (Tab. 4-2). Die Expression der plastidären RNA-Polymerase und der plastidären HSP70-Proteine ließ sich auch nach mehreren erfolgreichen Transformationen nicht nachweisen. Eine mögliche Interaktion zwischen diesen Proteinen und dem ZmET1 konnte daher nicht im Hefe-2-Hybridssystem untersucht werden.

**Tab. 4-2: Ergebnis des X-Gal-Tests zur Kontrolle einer korrekten *Bait*-Expression**

Die *Bait*-Konstrukte wurden mit der Positiv-Kontrolle *Alg5\_Nubl* und mit der Negativ-Kontrolle *Alg5\_NubG* co-transformiert und anschließend auf  $\beta$ -Galactosidaseaktivität untersucht.

<i>Bait</i> -Konstrukte	<i>Alg5 Nubl</i>	<i>Alg5 NubG</i>	Ergebnis
<i>pCMBV rpoTp</i> und <i>pTMBV rpoTp</i>	negativ	negativ	Keine Expression
<i>pCMBV HSP70-1</i> und <i>pTMBV HSP70-1</i>	negativ	negativ	Keine Expression
<i>pCMBV HSP70-2</i> und <i>pTMBV HSP70-2</i>	negativ	negativ	Keine Expression
<i>pCMBV ZmET1</i> und <i>pTMBV ZmET1</i>	positiv	negativ	Expression ok!
<i>pCMBV ZmZR2</i> und <i>pTMBV ZmZR2</i>	positiv	negativ	Expression ok!

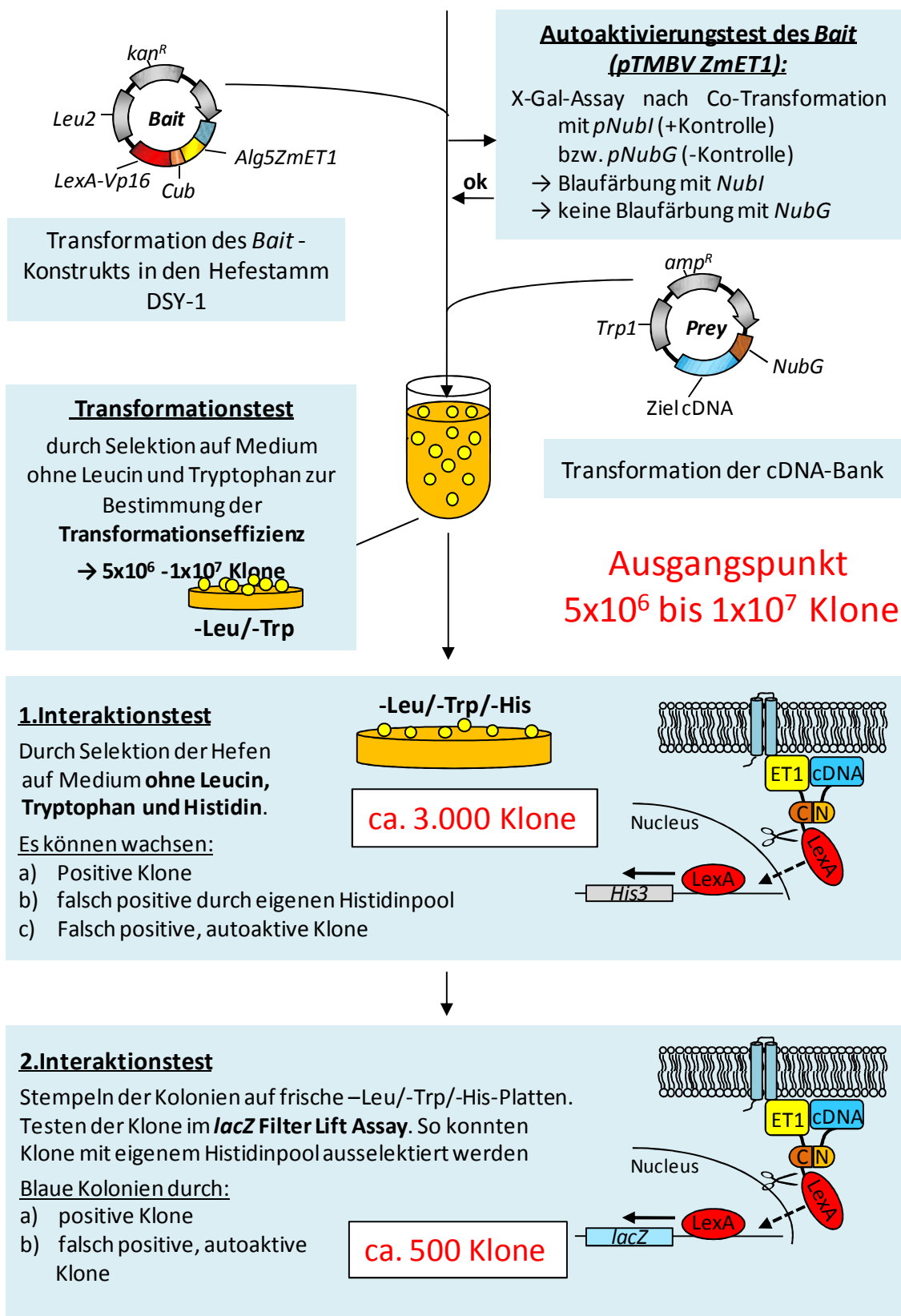
#### 4.8.4 Isolierung von ZmET1-Interaktionspartnern aus einer cDNA-Bank

Da direkte Interaktionsstudien zwischen ZmET1 und den putativen Interaktionspartnern *rpoTP*, *HSP70-1* und *HSP70-2* wegen mangelhafter Expression einiger Konstrukte nicht durchführbar waren, sollten ZmET1-Interaktionspartner aus einer cDNA-Bank isoliert werden. Da das *ZmET1*-Transkript zu allen Entwicklungszeitpunkten in Maisblättern detektierbar ist (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004), wurde für die Herstellung der cDNA-Bank RNA aus ausdifferenzierten Maisblättern der Linie A188 verwendet. Die Synthese und die Amplifikation der cDNA-Bank erfolgten wie unter 3.2.5.5 beschrieben.

Durch die PCR-Reaktion wurden die cDNA-Fragmente mit kompatiblen Überhängen für die homologe Rekombination in den *Prey*-Vektor pDL2Nx versehen. Die cDNA-Bank wurde anschließend gemeinsam mit dem linearisierten *Prey*-Vektor in den *Bait*-exprimierenden Hefestamm *DSY-1 pTMBVZmET1* transformiert (3.2.5.6).

Das vollständige Screening-Verfahren zur Identifikation potentieller ZmET1-Interaktionspartner und zur Eliminierung falsch positiver Klone ist in den Abb. 4-50 und Abb. 4-51 zusammengefasst.

Von ausgangs etwa  $5-10 \times 10^6$  transformierten Hefeklonen wuchsen nach der ersten Selektionsrunde ca. 3000 Kolonien auf Histidin-freiem Mangelmedium. Um Klone mit endogener Histidin-Quelle auszumustern, wurden die Klone mit zwei verschiedenen Verfahren auf Expression des zweiten Reporters, der  $\beta$ -Galactosidase, getestet. Etwa 150 Hefeklone zeigten sowohl im *LacZ*-Filter-Lift-Assay als auch im 96-Well-Assay ein positives Ergebnis. Aus diesen Klonen wurden die *Prey*-Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und die cDNA-Inserts der Plasmide schließlich über die flankierenden Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I analysiert.



**Abb. 4-50: Durchmusterung einer cDNA-Bank zur Identifikation von ZmET1-Interaktionspartnern**  
 Vor dem eigentlichen Screening wurde das Bait-Konstrukt *pTMBV ZmET1* zunächst auf Expression des ZmET1-Fusionsproteins getestet (Tab. 4-2). 500 mögliche ZmET1-Interaktionspartner wurden durch Selektion der Hefen auf Mangelmedium und den Test auf  $\beta$ -Galactosidaseaktivität identifiziert.

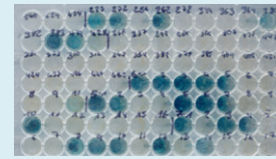
**Wiederholen des 2. Interaktionstests**

Testen der positive Klone aus dem *lacZ* Filter Lift Assay im 96 well  $\beta$ -Galactosidase-Assay zur Verifizierung

Blaue Kolonien durch:

- positive Klone
- falsch positive, autoaktive Klone

ca.150 Klone

**Plasmidpräparation der potentiell positiven Klone aus Hefen**

Durch Anziehen der Hefen in Medium ohne Tryptophan liegt der Selektionsdruck auf dem *Prey*-Vektor

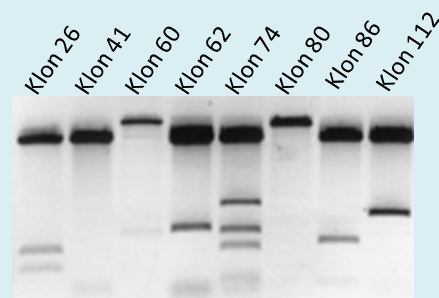
**Vermehrung der *Prey*-Vektoren in *E. coli***

*E. coli* Transformation. Durch die Verwendung von Ampicillin liegt der Selektionsdruck auf den *Prey*-Vektoren. Anschließende **Plasmidpräparation aus je zwei *E. coli*-Klonen.**

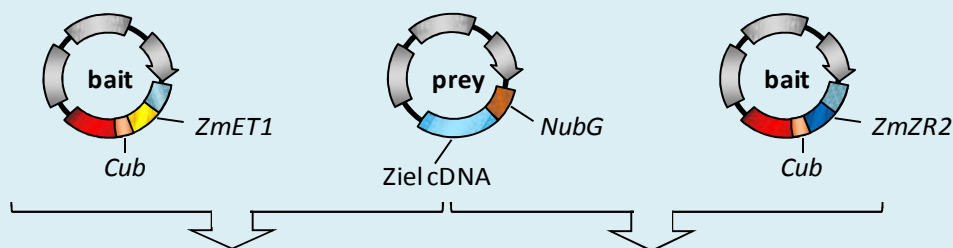
**Weitere Analyse der *Prey*-Vektoren**

1. Testverdau der *Prey*-Vektoren mit *Bam*HI und *Sal*I

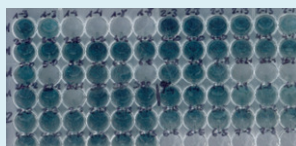
→121 Klone mit Insert



2. Sequenzierung der Vektoren
3. Retransformation ausgewählter Klone mit *pTMBV ZmEt1* bzw. *pTMBVZmZR2*



Selektion auf  $-leu/-trp/-his$  und anschließender  $\beta$ -Galactosidase-Assay



→ 34 potentielle Interaktionspartner

4. Ausschluss falsch positiver Interaktionspartner durch Logik

**Abb. 4-51: Durchmusterung einer cDNA-Bank zur Identifikation von *ZmET1*-Interaktionspartnern**

Durch einen zweiten X-Gal-Test, die Restriktions- und Sequenzanalyse der isolierten Plasmide sowie durch Retransformation dieser Vektoren reduzierte sich die Zahl der möglichen Interaktionspartner auf 34.



121 *Prey*-Vektoren, die ein cDNA-Insert mit einer Mindestgröße von 250 bp enthielten, wurden schließlich am 5'-Ende sequenziert. Da die Sequenzen in der Regel ein Stück der Vektorsequenz enthielten, ließ sich der Leserahmen für die meisten Klone festlegen. In 71 der 121 Klone konnte ein schlüssiger ORF identifiziert werden. Nach Retransformation von 15 ausgewählten Klonen in *ZmET1-Bait*- oder *ZmZR2-Bait*-exprimierende Hefen ließ sich lediglich ein Klon als Interaktionspartner ausschließen, da er keine  $\beta$ -Galactosidaseaktivität zeigte. Die übrigen Klone interagierten in gleichem Maße mit dem *ZmET1*- und dem *ZmZR2-Bait*. Die Retransformation erschien daher nicht als Mittel der Wahl, um falsch positive Klone auszuschließen.

Daher wurden die verbleibenden 70 Kandidaten schließlich auf Sequenzebene näher untersucht, um einige der gefundenen putativen Interaktionspartner aufgrund logischer Gesichtspunkte ausschließen zu können. Zunächst wurden 15 Klone identifiziert, die in der Literatur als häufig gefundene falsch-positive Klone aufgeführt werden (DUALsystems Supports, SEREBRIISKII, 2005). Neben Ubiquitin-konjugierenden Proteinen zählen hierzu in erster Linie Proteine, die im Zusammenhang mit der Translation stehen sowie Chaperone. Auch ATPasen gehören zu den häufig gefundenen falsch positiven Klonen (Tab. 4-3).

**Tab. 4-3: Häufig gefundene falsch-positive Klone**

Die Tabelle gibt die Nummer des Klons, die Anzahl der gefundenen Klone, eine Beschreibung des Proteins, eine zugehörige Identifikation in Form einer Genbank-Accession-Nummer oder des *Gene Identifiers* eines homologen Proteins aus *Arabidopsis* (AGI) und die Länge des ORFs in Aminosäuren im Vergleich zur Gesamtlänge des Proteins wieder.

Klon	Anzahl	Beschreibung	AGI/Accession	Länge
	3	Ubiquitin-konjugierende Enzyme		
	4	Ribosomale Proteine		
<b>Klon 462</b>	1	Putative brix domain-containing protein	At1g52930	30/331
<b>Klon 521</b>	1	Aminoacyl-tRNA Synthetase	At5G10880	21/309
<b>Klon 2-1</b>	3	Translationsinitiationsfaktor eIF5A	At1G13950	160/160
<b>Klon 11-3</b>	1	Translationselongationsfaktor beta	At5g12110	224/224
<b>Klon 3-1</b>	1	HSP90-like (ER)	At5G56000	203/699
<b>Klon 7-4</b>	1	ATPase epsilon chain (mitochondrial)	At1G51650	70/70
<b>Gesamt</b>	15			

Die übrigen 55 potentiellen *ZmET1*-Interaktionspartner kodieren für insgesamt 34 verschiedene Proteinsequenzen, da fünf der Interaktionspartner mindestens zweimal unabhängig voneinander isoliert wurden. Klone, die keine vollständigen Sequenzen enthalten, codieren in der Regel für den C-terminalen Bereich eines Proteins, da die cDNA-

Bank über einen Oligo dT-Primer synthetisiert wurde. Da das ZmET1 in den Chloroplasten lokalisiert ist, wurden die 34 potentiellen Interaktionspartner zunächst mittels Literatur- und Datenbankrecherchen und mit Hilfe des Vorhersage-Programms *TagetP* (EMANUELSSON *et al.*, 2007) hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation analysiert.

**Tab. 4-4: Prey-Proteine, die im Hefe-2-Hybridsystem mit dem ZmET1-Bait interagieren.**

Neben der Klonbezeichnung sind die Häufigkeit des gefundenen Klons, die Beschreibung des Proteins, der Gene Identifier des *Arabidopsis*-Homologs bzw. eine Genbank-Accessionnummer, die Länge des ORFs in Aminosäuren im Vergleich zur Gesamtlänge des Proteins und die (potentielle) subzelluläre Lokalisation angegeben. Chloroplastenproteine sind rot umrandet. Klone, deren Lokalisation mit GFP untersucht wurde, sind grün umrandet. \*: es existiert ein plastidäres Homolog.

Klon	Anzahl	Beschreibung	AGI/ Accession	Länge	Lokalisation
<b>Klon 14-7</b>	1	phosphoenolpyruvate translocator	At5g33320	177/389	Chloroplast
<b>Klon 112</b>	1	Signal sequence receptor $\alpha$ subunit	At2g21160	167/267	Chloroplast
<b>Klon 5-5</b>	1	chloroplast 50S ribosomal protein L6	At1G05190	174/226	Chloroplast
<b>Klon 12-2</b>	1	Chloroplast ribosomal protein rps12	AtCG00065	30/124	Chloroplast
<b>Klon 1-1</b>	1	DNAJ domain-containing protein	At5g23240	31/465	Chloroplast
<b>Klon 9-8</b>	1	chloroplast GAPDH	At1g12900	20/403	Chloroplast
<b>Klon 1-2</b>	1	RBCS	At5G38410	54/170	Chloroplast
<b>Klon 5-2</b>	1	Lhca4	At3g47470	180/244	Chloroplast
<b>Klon 2-3</b>	1	OEE 3-1	At4g05180	103/217	Chloroplast
<b>Klon 4-10</b>	1	PGRL1 /unknown	At4g22890	236/324	Chloroplast
<b>Klon 3-2</b>	5	psaB	AtCG00340	239/734	Chloroplast
<b>Klon 10-1</b>	1	psaE	At2g20260	44/143	Chloroplast
<b>Klon 428</b>	1	psaF	At1g31330	35/235	Chloroplast
<b>Klon 1-8</b>	1	psaJ	AtCG00630	42/42	Chloroplast
<b>Klon 1-3</b>	2	petG	AtCG00600	37/37	Chloroplast
<b>Klon 3-6</b>	10	orf121	chl genome	64/121	Chloroplast
<b>Klon 13-1*</b>	1	Nucleosid Diphosphat Kinase (NDPK1)	At4g09320	149/149	Cytosol
<b>Klon 19-6*</b>	1	GAPDH, cytosol	At1g79530	90/337	Cytosol
<b>Klon 7-14</b>	1	Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	At1G77120	194/286	Cytosol
<b>Klon 1-6</b>	1	Aci-reductone dioxygenase 2	At4g14710	224/224	Cytosol
<b>Klon 6-2</b>	1	Metallothionein-like protein 1	At3G09390	30/76	Cytosol
<b>Klon 10-12</b>	2	BRI1-KD interacting protein 130	At3G53670	127/260	Cytosol
<b>Klon 62</b>	1	CBL interacting Kinase 20 CIPK 20	At5g07070	208/433	PM
<b>Klon 74</b>	1	Receptor-like serine/threonine kinase	At1G56145	500/1027	ER

**Fortsetzung Tab. 4-5: Prey-Proteine, die im Hefe-2-Hybridssystem mit dem ZmET1-Bait interagieren.**

<b>Klon 4-8</b>	1	Calnexin1	At5G61790	85/537	ER
<b>Klon 380</b>	1	Expressed protein	At1g55475	85/156	ER
<b>Klon 10-4</b>	1	Ethylene responsive binding factor3	At5g44210	152/235	Nukleus
<b>Klon 9-10</b>	1	RNA_pol_rpb6	At5g51940	142/142	Nukleus
<b>Klon 15-2</b>	1	succinyl-CoA Ligase	At2g20420	38/422	Mitochondrium
<b>Klon 4-13</b>	1	unknown protein	At1g67785	69/69	Mitochondrium?
<b>Klon 7-8</b>	1	unknown protein/ SPR1-like	At1g26355	119/119	Mitochondrium?
<b>Klon 4-2</b>	7	conserved hypothetical protein	PCO113764	79/79	Mitochondrium?
<b>Klon 2-15</b>	1	unknown/no similarities	gb BM266852.1	142	unbekannt
<b>Klon 10-10</b>	1	unknown/ no similarities	gb EB484079.1	60	unbekannt

16 der 34 Interaktionspartner sind sehr wahrscheinlich in Chloroplasten lokalisiert. Für zwei weitere Klone, die die Sequenz der cytosolischen Proteine GAPDH bzw. NDPK1 enthalten, konnte in *Arabidopsis* jeweils ein nahe verwandtes Chloroplastenprotein mit mindestens 70 % Sequenzhomologie auf Aminosäureebene identifiziert werden. Drei weitere der gefundenen Klone codieren für unbekannte Proteine, für die der Besitz eines mitochondrialen Importsignals mit einer geringen Signifikanz vorhergesagt wurde. Zwei Klone enthalten ORFs, die keine Ähnlichkeit zu Proteinsequenzen aus den Datenbanken aufweisen (Tab. 4-4).

Die subzelluläre Lokalisation der durch die Klone 4-13, 7-8, 4-2 und 2-15 repräsentierten unbekannt Proteine sowie zweier Plastidenproteine (Klon 4-10 und Klon 2-3) wurde mit Hilfe von GFP-Reporter-Gen-Konstrukten näher untersucht.

#### 4.8.5 Subzelluläre Lokalisation ausgewählter 2-Hybrid-Klone

Da das ZmET1-Protein seine Funktion in den Chloroplasten ausübt, ist auch für die potentiellen ZmET1-Interaktionspartner die Lokalisation in den Chloroplasten Voraussetzung für eine tatsächliche Interaktion in der Pflanze. Für einige der identifizierten Kandidaten ließ sich die subzelluläre Lokalisation anhand von Datenbankrecherchen leicht ermitteln, für die Klone 4-13, 7-8, 4-2 und 2-15 war die Vorhersage des Wirkungsortes hingegen weniger eindeutig (vgl. Tab. 4-4). Daher sollte die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine mittels GFP-Fusionskonstrukten untersucht werden.

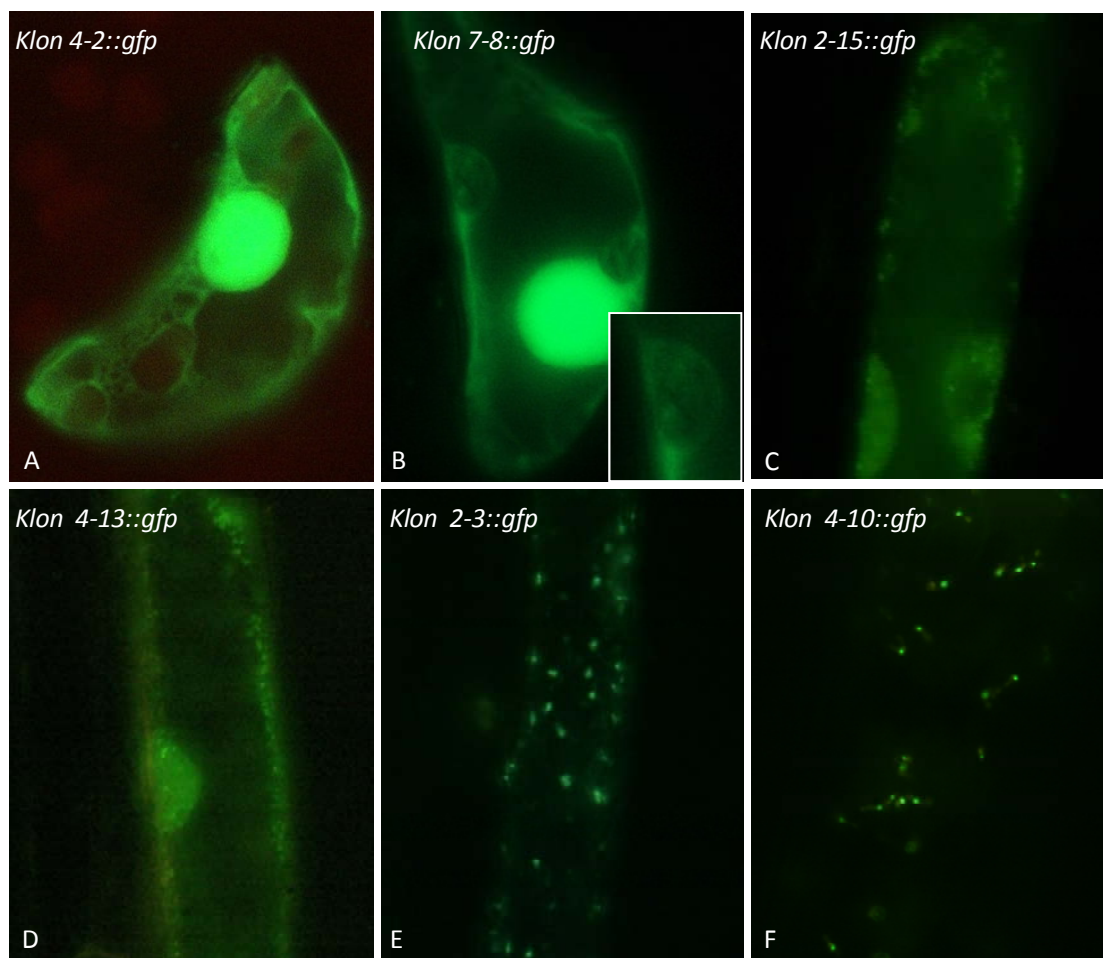
Außerdem wurden GFP-Konstrukte für die Klone 2-3 (OEE-3.1) und 4-10, einem unbekanntem Plastiden-Protein, hergestellt, um die Lokalisation der Proteine innerhalb der Plastiden genauer zu untersuchen. Die Klonierung der GFP-Konstrukte ist in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

#### 4.8.5.1 Subzelluläre Lokalisation von Klon 4-2

Der Klon 4-2 codiert für ein kleines 9 kDa-Protein ohne besondere Sequenzmotive. Interessanterweise wurde dieser Klon insgesamt siebenmal aus der c-DNA-Bank gefischt, und wurde daher näher untersucht. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass das Protein auch in anderen monokotylen Pflanzen, wie Reis und Gerste, aber nicht in *Arabidopsis* zu finden ist. Ob das Protein, wie durch *TargetP* vorhergesagt, in die Mitochondrien importiert wird, wurde durch die Fusion des ORF mit dem Reporterprotein GFP untersucht. Durch die transiente Expression des 4-2::GFP Proteins in Tabakblättern (Abb. 4-52 A) und in Zwiebelepidermis (nicht gezeigt) konnte eine Lokalisation von Klon 4-2 in den Mitochondrien nicht bestätigt werden. Die 4-2::GFP-Signale wurden lediglich im Cytoplasma und auf Grund der geringen Größe des Proteins im Zellkern detektiert. Obwohl der Klon 4-2 in den durchgeführten 2-Hybriduntersuchungen siebenmal als potentieller ZmET1-Interaktionspartner identifiziert worden ist, erscheint eine *in vivo* Interaktion beider Proteine in der Pflanze unwahrscheinlich.

#### 4.8.5.2 Subzelluläre Lokalisation von Klon 7-8

Der Klon 7-8 enthält die Sequenz für ein ebenfalls recht kleines 10 kDa-Protein, das laut einer Vorhersage von *TargetP* wahrscheinlich in die Mitochondrien oder in die Chloroplasten importiert wird. Daher wurde auch für den Klon 7-8 ein GFP-Fusionskonstrukt hergestellt, welches transient in Tabakblättern exprimiert wurde. Wie aus der Abbildung Abb. 4-52 B hervorgeht, ist das 7-8::GFP-Protein jedoch weder in den Mitochondrien lokalisiert noch ist es eindeutig in den Chloroplasten zu erkennen. Es scheint vielmehr die Chloroplasten zu umgeben (Abb. 4-52 B, kleines Bild). Durch einen Sequenzvergleich mit *Arabidopsis* wurde ein plastidäres Protein (At1g26360) identifiziert, dessen C-Terminus 71 % Homologie zum Klon 7-8 aus Mais zeigt. At1g26360 ist jedoch am N-Terminus um 300 Aminosäuren länger. Dies ließ zunächst vermuten, dass der Klon 7-8 unvollständig ist. Trotz umfangreicher Datenbankrecherchen konnten keine Hinweise auf ein mit At1g26360 vergleichbares Protein in Mais gefunden werden. Mit der Veröffentlichung der 8. Version des *Arabidopsis* Genoms durch TAIR im April 2008 (SWARBRECK *et al.*, 2008) wurde der Genlocus At1g26360 jedoch neu annotiert und codiert nun für ein C-terminal kürzeres plastidäres Protein At1g26360. Gleichzeitig wurde ein neues Protein, At1g26355, annotiert, welches homolog zum Klon 7-8 aus Mais ist, und zur SPIRAL1-like-Proteinfamilie in *Arabidopsis* gezählt wird. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der GFP-Reporter-Experimente wird für diese Proteine keine plastidäre Lokalisation vorhergesagt.



**Abb. 4-52: Subzelluläre Lokalisation der potentiellen ZmET1-Interaktionspartner**

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation ausgewählter 2-Hybridklone wurden GFP-Fusionsproteine transient in Tabakblättern (A und B) oder Zwiebelepidermis (C-F) exprimiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Kleines Bild in B: Vergrößerte Ansicht eines Chloroplasten. Die transformierten Konstrukte sind jeweils in der Abbildung angegeben.

#### 4.8.5.3 Subzelluläre Lokalisation von Klon 2-15 und Klon 4-13

Die Klone 2-15 und 4-13 codieren für kleine, 14,5 kDa- bzw. 7,5 kDa schwere Proteine. Während Klon 4-13 in Pflanzen konserviert ist (verwandte Proteine aus Reis und *Arabidopsis* sind zu 94 % bzw. 82 % homolog) konnten durch Datenbankrecherchen keine Proteinsequenzen gefunden werden, die Homologie zum Klon 2-15 aufweisen. Zahlreiche ESTs aus Mais und Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) belegen jedoch die Expression des Transkripts. Der aus 142 Aminosäuren bestehende ORF enthält keine bekannten Sequenzmotive, enthält aber eine Prolin-reiche (20 Proline auf 46 Aminosäuren) Region und außerdem vier Cysteinreste. Dem *Arabidopsis*-Homolog zum Klon 4-13 (At1g67785) wurde eine Funktion in der mitochondrialen Atmungskette zugeordnet (MEYER *et al.*, 2008, HAEZLEWOOD *et al.*, 2003).

Mittels GFP-Fusionskonstrukten wurde die subzelluläre Lokalisation von Klon 2-15 und Klon 4-13 durch transiente Expression in Zwiebelepidermis näher untersucht (Abb. 4-52 C und D). Wie man in Abbildung Abb. 4-52 C sieht, zeigt das 2-15::GFP-Protein ein recht ungewöhnliches Verteilungsmuster. Da eine Lokalisation des Proteins in den Plastiden auf Grund dieser Daten ausgeschlossen werden kann, wurde der genaue Wirkungsort des Proteins innerhalb der Zelle nicht näher bestimmt.

Da das *Arabidopsis*-Protein At1g67785 in den Mitochondrien detektiert wurde (HAEZLEWOOD *et al.*, 2003), ist auch für Klon 4-13, dem At1g67785-homologen Protein aus Mais, ebenfalls eine Lokalisation in den Mitochondrien anzunehmen. Abbildung Abb. 4-52 D zeigt die transiente Expression des 4-13::GFP-Proteins in Zwiebelepidermis. Besonders in der Peripherie der Zelle sind kleine fluoreszierende Strukturen erkennbar, bei denen es sich um Mitochondrien handeln könnte, da sie wesentlich kleiner sind und zahlreicher vorkommen als die durch Klon 2-3::GFP und 4-10::GFP markierten Plastiden (Abb. 4-52 E, F).

Zusammenfassend führten die subzellulären Lokalisationsstudien der unbekannt Klone 4-2, 7-8, 2-15 und 4-13 allesamt zum Ausschluss der Kandidaten als mögliche ZmET1-Interaktionspartner *in planta*, da keines der Proteine in den Plastiden lokalisiert ist. Dieses Ergebnis ist allerdings nach den vagen Lokalisations-Vorhersagen für die untersuchten Proteine durch das Programm *TargetP* nicht sonderlich überraschend.

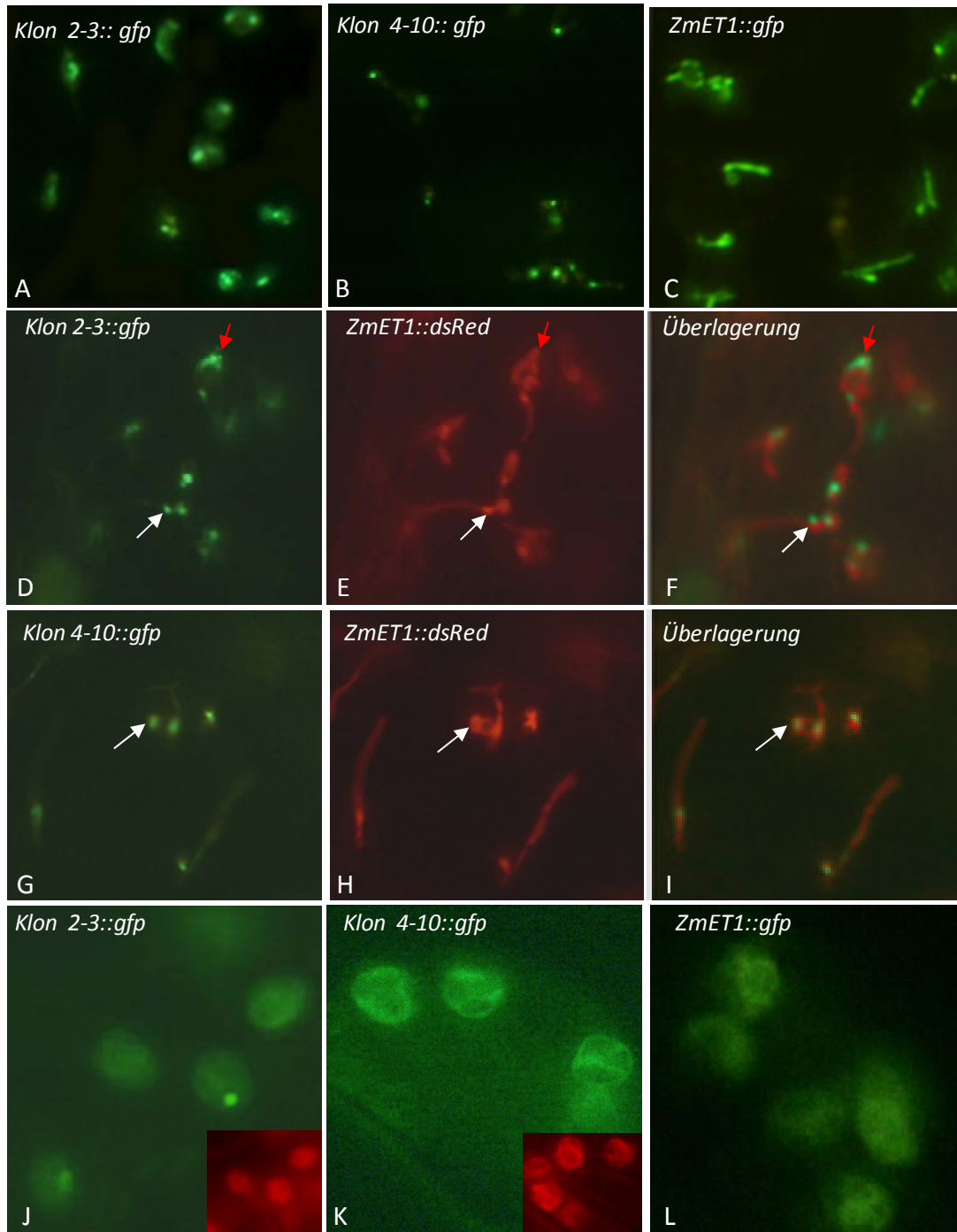
#### 4.8.6 Subzelluläre Lokalisation von Klon 2-3 und Klon 4-10

Auch die subzelluläre Lokalisation von Klon 2-3 und Klon 4-10 wurde mittels GFP näher untersucht. Sequenzvergleiche mit *Arabidopsis* ergaben eine Homologie von 84 % auf Aminosäureebene zwischen dem Klon 2-3 aus Mais und dem *Oxygen evolving enhancer* Protein 3.2 (OEE3.2; At4g05180) aus *Arabidopsis*. Dieses 16 kDa-Protein wird über den TAT-Importweg in das Thylakoidlumen importiert (SCHUBERT *et al.*, 2002) und ist für die Stabilität des Wasserspaltenden Komplexes von Photosystem II unter Schwachlichtbedingungen essentiell (Yi *et al.*, 2006).

Der Klon 4-10 aus Mais weist hingegen 86 % Homologie zum Chloroplastenprotein At4g22890 aus *Arabidopsis* auf. Das 35 kDa große Protein besitzt zwei Transmembrandomänen, über die es in der Thylakoidmembran verankert ist (FRISO *et al.*, 2004; KLEFFMANN *et al.*, 2004) sowie zwei C-terminale CXXC-Motive, die auf das Vorhandensein eines Zinkfingers hinweisen. Eine mögliche Funktion des Proteins war zum Zeitpunkt der 2-Hybridanalysen nicht bekannt.

Da die Klone 2-3 und 4-10 keine vollständigen codierenden Sequenzen beinhalten (Tab. 4-4), wurden für die Herstellung der Fluoreszenzreportergenkonstrukte die korrespondierenden cDNAs aus *Arabidopsis* amplifiziert. Die Klonierung der Vektoren ist in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

Die transiente Expression von Klon 2-3::GFP und Klon 4-10::GFP in Zwiebelepidermis bestätigen eine Lokalisation in den Chloroplasten (Abb. 4-52 E, F; Abb. 4-53 A, B). Verglichen mit dem ZmET1::GFP (Abb. 4-53 C) sind sowohl 2-3::GFP als auch 4-10::GFP stärker in distinkten *spots* und weniger deutlich im Plastidenstroma lokalisiert.



**Abb. 4-53: Untersuchungen zur Co-Lokalisation von ZmET1 mit Klon 4-10 und Klon 2-3**

A-C) Transiente Expression von 2-3::GFP (A), 4-10::GFP (B) und ZmET1::GFP (C) in Zwiebelepidermis. D-F) Co-Expression von 2-3::GFP (D) und ZmET1::GFP (E) in Zwiebelepidermis. F zeigt die Überlagerung aus D und E. G-I) Co-Expression von 4-10::GFP (G) und ZmET1::GFP (H) in Zwiebelepidermis. I zeigt die Überlagerung aus G und H. J-L) Transiente Expression von 2-3::GFP (J), 4-10::GFP (K) und ZmET1::GFP (L) in Tabakepidermis. Kleines Bild in J und K zeigt rote Autofluoreszenz der Chloroplasten.



Das Verteilungsmuster des 2-3::GFP-Proteins innerhalb des Organells erinnert an das des ZmZR2::GFP (vgl. Kapitel 4.2), da das Protein in sehr vielen kleinen Strukturen akkumuliert (Abb. 4-53 A). Das 4-10::GFP-Protein wird im Vergleich zum 2-3::GFP schwächer exprimiert und bildet nur wenige *spots* pro Plastid (Abb. 4-53 B).

Um eine mögliche Co-Lokalisation zwischen Klon 2-3 bzw. Klon 4-10 und dem ZmET1 zu analysieren, wurden die GFP-Konstrukte mit dem ZmET1::DsRed in Zwiebelzellen co-exprimiert (Abb. 4-53 D-I).

Wie man aus der Überlagerung der 2-3::GFP- und der ZmET1::DsRED-Fluoreszenz erkennt, co-lokalisieren die beiden Proteine nur bedingt. Während sich einige der 2-3::GFP *spots* mit Bereichen starker ZmET1::DsRED-Fluoreszenz überlagern (Abb. 4-53 D-F weiße Pfeile), liegen andere *spots* in Arealen schwacher ZmET1::DsRED Akkumulation (Abb. 4-53D-F rote Pfeile). Das 4-10::GFP-Protein ist hingegen immer in Arealen mit starker ZmET1::DsRED-Fluoreszenz zu finden (Abb. 4-53 G-I, weiße Pfeile).

Da Klon 2-3 und Klon 4-10 für Proteine der Thylakoidmembran codieren, stellen die Epidermiszellen der Zwiebel kein optimales System dar, um die Lokalisation dieser Proteine *in organello* zu untersuchen. Wie bereits in Kapitel 4.2 erläutert wurde, enthalten die Epidermiszellen der Zwiebel chlorophyllfreie Leukoplasten, die nicht photosynthetisch aktiv sind. Daher wurden die GFP-Konstrukte ebenfalls transient in Tabakepidermis exprimiert, da die Schließzellen der Spaltöffnungen Chloroplasten enthalten. Weder Klon 2-3::GFP noch Klon 4-10::GFP akkumulieren in Tabakchloroplasten als *spots*, sondern zeigen insgesamt die gleiche Verteilung wie die Chlorophyllautofluoreszenz (Abb. 4-53 J, K).

Das teilweise netzartige Muster der GFP-Fluoreszenz wird durch den hohen Stärkegehalt in den transformierten Blättern verursacht, da Stroma und Thylakoide durch die großen Stärkekörner zusammen geschoben werden. Dies wird durch die ebenfalls netzartige Verteilung der Chlorophyllautofluoreszenz deutlich (Abb. 4-53 K, kleines Bild). Beide Proteine zeigen in Chloroplasten demnach ein anderes Verteilungsmuster als in Leukoplasten der Zwiebelepidermis. Ob 2-3::GFP und 4-10::GFP in Tabakchloroplasten mit dem ZmET1-Protein co-lokalisieren, konnte nicht bestätigt werden, da sich das ZmET1::DsRed nur schwach von der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls abhebt (nicht gezeigt). ZmET1::GFP zeigt jedoch innerhalb der Chloroplasten generell ein ähnliches Lokalisationsmuster wie Klon 2-3::GFP und Klon 4-10::GFP, so dass eine Co-Lokalisation denkbar erscheint.

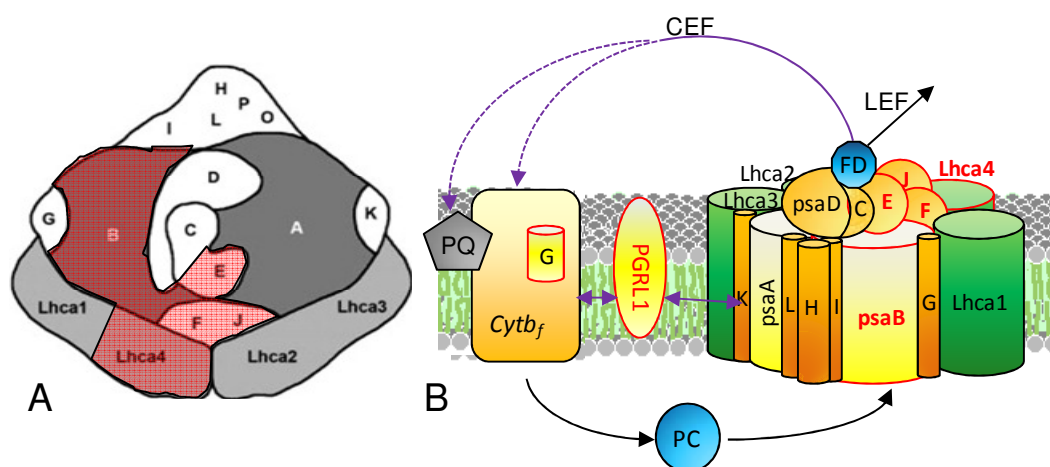
Um Hinweise auf eine mögliche Funktion des 4-10 Proteins zu erlangen und einen Zusammenhang zum ZmET1 bzw. ZR1 herstellen zu können, wurde eine T-DNA-Knockout-Linie des korrespondierenden Gens At4g22890 in *Arabidopsis* analysiert. Homozygote At4g22890 Knockout-Pflanzen zeigten jedoch keinen auffälligen Phänotyp. Dies beruht möglicherweise auf dem Vorhandensein einer zweiten, sehr ähnlichen Genkopie in *Arabidopsis* (At4g11960).



#### 4.8.7 ZmET1 interagiert mit Komponenten der Photosynthesemembran

Im Januar 2008 wurde eine mögliche Funktion für das 4-10 homologe Gen aus *Arabidopsis* publiziert, das im Folgenden als PGRL1 bezeichnet wird (DALCORSO *et al.*, 2008). Ein Doppel-Knockout der *Arabidopsis*-Gene At4g22890 (PGRL1 A) und der zweiten Genkopie At4g11960 (PGRL1 B) resultierte in reduziertem Wachstum, das auf einer Störung im cyclischen Elektronentransport beruht. Für PGRL1 wird daher eine regulatorische Funktion während des cyclischen Elektronentransports angenommen.

Neben den Klonen 2-3 (OEE3.2) und 4-10 (PGRL1) wurden im 2-Hybrid Screen 14 weitere Proteine als mögliche ZmET1-Interaktoren identifiziert, die eine Funktion in den Chloroplasten erfüllen. Darunter waren vier Proteine aus dem Photosystem I (PSI): PsaB, PsaE, PsaF und PsaJ. Das Protein PsaB, das eine der Core-Untereinheiten von PSI darstellt, wurde insgesamt fünfmal gefunden. Außerdem wurde das Lhca4-Protein aus dem Lichtsammelkomplex von PSI und zweimal die Untereinheit PetG aus dem Cytochrom-bf-Komplex identifiziert. Strukturanalysen von PSI ergaben, dass die im 2-Hybrid gefischten Untereinheiten PsaB, PsaE, PsaF und PsaJ auf der Stromaseite des PS I in direkter Verbindung zueinander stehen (FROMME *et al.*, 2003; Abb. 4-54).



**Abb. 4-54: ZmET1 interagiert im 2-Hybrid-System mit Komponenten der Thylakoidmembran**

A) Aufsicht auf die zum Stroma gerichtete Seite des Photosystems I nach JENSEN *et al.* (2007). Komponenten, die mit dem ZmET1-Bait im Hefe-2-Hybrid-System gefischt wurden, sind rot eingefärbt. B) Anordnung einiger im 2-Hybrid identifizierten Proteine in der Thylakoidmembran. LEF: linearer Elektronenfluss, CEF: cyclischer Elektronenfluss. PC: Plastocyanin, PQ: Plastochinonpool, FD: Ferredoxin.

Die im Two-Hybrid gefundenen Klone von PsaB, PsaE und PsaF stellen nur partielle Proteine dar, die jeweils den C-terminalen Teil dieser Photosystem-Untereinheiten abdecken. Wie die Arbeit von SUN *et al.* (1997) zeigt, interagiert PsaE mit den C-terminalen Domänen von PsaB.

Während sich PsaE vollständig auf der Stromaseite von PS I befindet, durchspannt PsaF die gesamte Thylakoidmembran. Das N-terminale Ende ist im Thylakoidlumen an der Bindung des Plastocyanins beteiligt, der C-Terminus befindet sich auf der Stromaseite (BEN-SHEM *et al.*, 2003). PsaF ist darüber hinaus an der Bindung des Lhca4-Proteins aus dem Lichtsammelkomplex des Photosystems I beteiligt. PsaF wird durch das ebenfalls im 2-Hybrid gefischte PsaJ stabilisiert (JENSEN *et al.*, 2007).

Neben den Komponenten des PS I wurde auch die Untereinheit petG aus dem Cytochrom-bf-Komplex zweimal mit dem ZmET1-Bait gefischt. Welche Funktion das petG in diesem Komplex im Detail übernimmt, ist nicht bekannt. Knockout-Analysen zeigten jedoch, dass das Protein Einfluss auf die Komplex-Stabilität und die Assemblierung nimmt (SCHWENKERT *et al.*, 2007). Interessanterweise wird dem PGRL1-Protein (ehemals Klon 4-10) eine Rolle als möglicher „Vermittler“ zwischen dem Photosystem I und dem Cytochrom-bf-Komplex während des cyclischen Elektronentransports zugeschrieben (DALCORSO *et al.*, 2008).

Ein weiterer Klon, Klon 112, zeigt Homologie zu Proteinen, die am Proteintransport an Membranen beteiligt sind. Das homologe Protein aus *Arabidopsis*, At2g21160, wurde auf Grund von Proteomanalysen den Chloroplasten bzw. der Thylakoidmembran zugeordnet (DUNKLEY *et al.*, 2006; PELTIER *et al.*, 2004) und könnte eine Funktion bei der Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran spielen.

#### 4.8.8 Weitere plastidäre ZmET1-Interaktionspartner

Neben den bereits beschriebenen Komponenten der Thylakoidmembran wurden mit dem ZmET1 als Bait sieben weitere plastidäre Proteine identifiziert (Tab. 4-4). Neben zwei ribosomalen Proteinen rpl6 und rps12 wurde ein Phosphoenol-Pyruvat/Phosphat-Translokator aus der plastidären Hüllmembran gefunden. Der Knockout des zugehörigen Gens *CUE1* verursacht den in der Einleitung bereits erwähnten retikulierten Blattphänotyp. Zwei weitere potentielle ZmET1-Interaktoren, die mit dem Stoffwechsel der Plastiden im Zusammenhang stehen, sind die NADPH-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die kleine Untereinheit der Rubisco (RBCS) aus dem Calvin-Zyklus. Neben der plastidären GAPDH wurde im 2-Hybrid-Screen auch die cytoplasmatische GAPDH identifiziert (Tab. 4-4). Ein weiteres cytoplasmatisches Protein, NDPK1, kommt zwar auf Grund der räumlichen Trennung nicht direkt als Interaktionspartner von ZmET1 in Frage, in *Arabidopsis* und Spinat sind jedoch zwei nahe verwandte Proteine NDPK2 und NDPK3 als plastidäre Proteine beschrieben worden (BÖLTER *et al.*, 2007; YANG UND LAMPPA, 1996). Interessanterweise soll NDPK2 in den Plastiden transient mit den Nukleoiden assoziiert (BÖLTER *et al.*, 2007).

Zehnmals wurde ein Klon gefunden, der dem orf121 des Plastidengenoms aus Mais entspricht. Eine entsprechende Sequenz ist jedoch auch im Mitochondriengenom enthalten.

In *Arabidopsis* konnte keine zum orf121 homologe Sequenz gefunden werden. Ob der ORF tatsächlich exprimiert wird und ob ein mögliches Transkript vom Chloroplastengenom oder vom Mitochondriengenom stammt, müssen weitere Analysen zeigen.

Schließlich enthält auch das kurze Peptid von nur 35 Aminosäuren aus Klon 1-1 eine gewisse Homologie zu einem plastidären Protein aus *Arabidopsis*, dem 40 kDa großen DnaJ-Protein At5g23240. DnaJ- bzw. Hsp40-Proteine bilden Co-Chaperone der HSP70-Proteine. Auch die ZR-homologen Proteine HEP1 und HEP2 aus Hefe und *Chlamydomonas* wurden als Interaktionspartner von Hsp70-Proteinkomplexen identifiziert (WILLMUND *et al.*, 2008; SICHTING *et al.*, 2005). Eine Interaktion zwischen ZmET1 und einem plastidären Hsp40-Protein wäre daher durchaus denkbar. Da der im 2-Hybrid-System gefischte Klon 1-1 jedoch extrem kurz ist, müsste eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend führten die Hefe-2-Hybrid-Experimente zur Identifikation einiger Plastidenproteine, die als Interaktionspartner für das ZmET1-Protein in Frage kommen. Insbesondere wurden sieben Komponenten aus der photosynthetischen Elektronentransportkette identifiziert. Ob diese Proteine tatsächlich mit dem ZmET1-Protein in Wechselwirkung treten, müssen weitere Analysen zeigen. Auch eine mögliche Interaktion zwischen ZmET1 und dem Hsp40-Protein At5g23240 oder NDPK2, das mit den Nukleoiden co-lokalisiert (BÖLTER *et al.*, 2007) sollte näher untersucht werden, um die Frage einer möglichen ZmET1-Funktion weiter aufzuklären.

Für einige unbekannte Proteine, die im Rahmen des 2-Hybrid-Screens identifiziert wurden, ließ sich keine Lokalisation in den Chloroplasten nachweisen. Daher kommen sie als ZmET1-Interaktionspartner *in planta* wohl kaum in Frage.

Eine mögliche Interaktion zwischen ZmET1 und der plastidären RNA-Polymerase rpoTp oder den Hsp70-Proteinen 1 und 2 aus dem Plastidenstroma konnte mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems auf Grund mangelnder Expression der Proteine nicht geklärt werden.

## 4.9 HSP70 als möglicher Interaktionspartner von *AtZR1*

Nachdem bereits 2005 eine Interaktion zwischen dem ZR3-homologen HEP1-Protein und einem mitochondrialen HSP70-Chaperon in der Hefe beschrieben wurde (SICHTING *et al.*, 2005; SANJUÁN SZKLARZ *et al.*, 2005), konnte auch für das plastidäre *Zinc Ribbon*-Protein HEP2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* eine Interaktion mit dem plastidären HSP70B nachgewiesen werden (M. Schroda, persönliche Mitteilung, WILLMUND *et al.*, 2008). Die Aufklärung der 3D-Struktur der Zinc-Ribbon-Domäne des HEP1-Proteins aus *Saccharomyces* (MOMOSE *et al.*, 2007) widerlegte gleichzeitig die strukturelle Verwandtschaft der ZR-Proteine mit der Zinc-Ribbon-Domäne des Transkriptionsfaktors TFIIIS. Daher ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch das ET1- bzw. ZR1-Protein mit dem plastidären HSP70-Protein interagiert.

Im Gegensatz zur einzelligen Alge *Chlamydomonas*, die nur das plastidäre HSP70B, besitzt, liegen in den Chloroplasten höherer Pflanzen zwei Hsp70-Proteine vor, die als HSP70-1 und HSP70-2 bezeichnet werden.

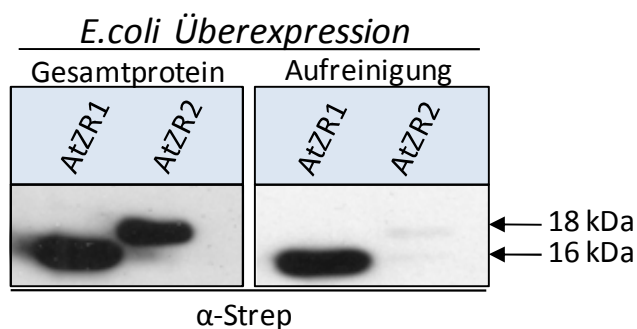
Eine Interaktion zwischen dem ZmET1 aus Mais und den beiden plastidären HSP70-Proteinen ließ sich im Hefe-2-Hybrid-System wegen experimenteller Schwierigkeiten nicht untersuchen (Kapitel 4.8.3). In einem neuen Ansatz sollte daher eine mögliche Interaktion zwischen dem AtZR1- bzw. dem AtZR2 aus *Arabidopsis* und den beiden HSP70-Proteinen durch *in vitro*-Pull-down-Experimente untersucht werden.

### 4.9.1 Expression rekombinanter *Arabidopsis* –Proteine in *E.coli*

Für die Pull-down-Experimente wurden die Proteine AtZR1 und AtZR2 als *Strep-Tag*-Fusion und die Proteine HSP70-1 und HSP70-2 aus *Arabidopsis* als *His-Tag*-Fusion in *E.coli* BL21 exprimiert.

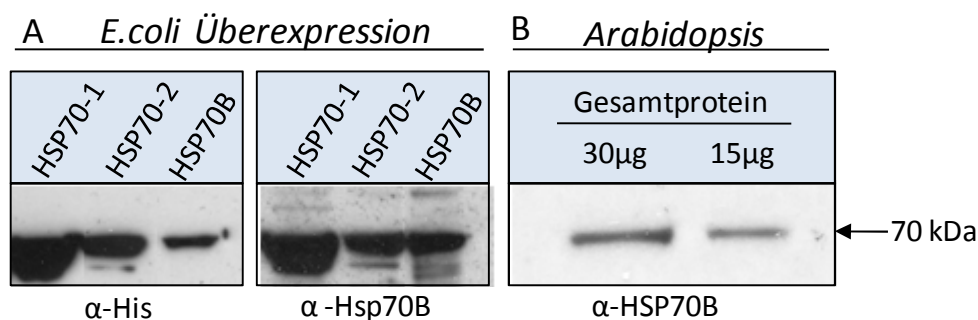
Nach einer drei- bis vierstündigen Expressionsphase konnten das 16 kDa große AtZR1- und das 18 kDa große AtZR2-strep-Protein deutlich mit einem *Strep-Tag*-Antikörper im *E. coli*-Gesamtprotein nachweisen werden (Abb. 4-56 links). Bei längerer Induktion der *E.coli*-Zellen war lediglich das AtZR2-strep-Protein im Westernblot detektierbar (nicht gezeigt).

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der *Strep-Tag*-Proteine erfolgte über eine *Strep-Tactin*-Matrix aus geklärtem *E.coli*-Lysat. Während sich das AtZR1-strep-Protein erfolgreich aufreinigen ließ, wurde das AtZR2-strep-Protein in der Elutionsfraktion nur äußerst schwach detektiert (Abb. 4-55 rechts). Genauere Analysen zeigten, dass das AtZR2-strep-Protein in *E.coli* überwiegend in *Inclusion bodies* vorlag und eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen dementsprechend nicht möglich war. Daher konnte nur das AtZR1-strep-Protein für die *in vitro*-Pull-down-Experimente (4.9.2) eingesetzt werden.



**Abb. 4-55: Nachweis rekombinanter AtZR1- und AtZR2-strep-Proteine in *E. coli***  
 AtZR1- und AtZR2-strep wurden in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert, über eine Strep-Tactin-Matrix aufgereinigt und mit einem *strep-Tag* spezifischen Antikörper im Westernblot detektiert.

Rekombinantes HSP70-1his- und HSP70-2his-Protein war nach 16-stündiger Expression optimal im *E. coli*-Gesamtprotein nachweisbar (nicht gezeigt). Beide Proteine ließen sich unter nativen Bedingungen über Ni-NTA-Agarose aufreinigen. Im Westernblot wurden die 70-kDa-Proteine mit einem *His-Tag* Antikörper und mit einem Antikörper gegen das plastidäre HSP70B<sup>10</sup> aus *Chlamydomonas* mit gleicher Effizienz detektiert (Abb. 4-56 A). Überexprimiertes HSP70B-his diente als Referenz. Den HSP70B-Antikörper sowie ein Konstrukt zur Expression des rekombinanten HSP70B aus *Chlamydomonas* stellte freundlicherweise M. Schroda (Universität Freiburg) zur Verfügung. Darüber hinaus ließen sich die nativen HSP70-Proteine mit dem HSP70B-Antikörper in *Arabidopsis*-Gesamtproteinextrakt nachweisen (Abb. 4-56 B). Da HSP70-1 und HSP70-2 zu 95 % homolog sind und die prozessierten Proteine eine identische Länge von 641 Aminosäuren besitzen, lassen sie sich nach einer Standard-SDS-PAGE im Westernblot nicht voneinander unterscheiden.



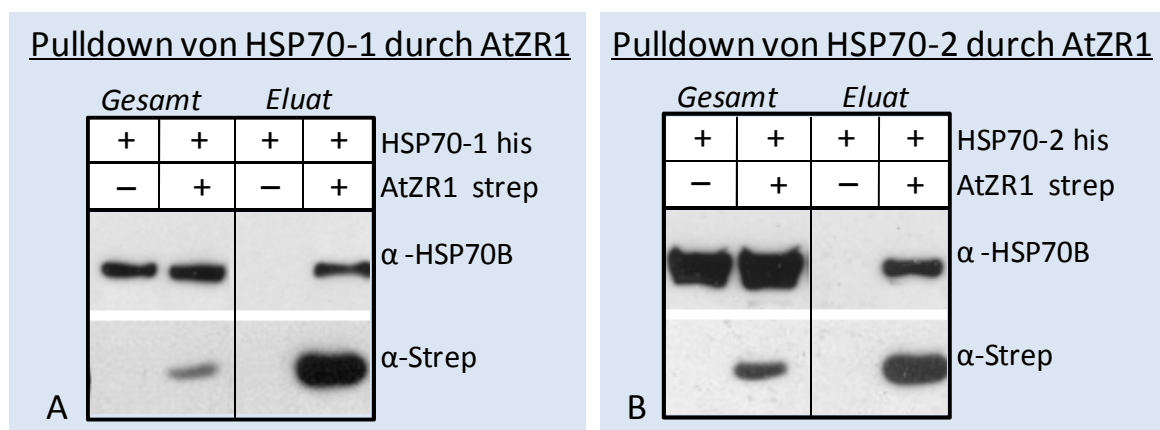
**Abb. 4-56: Nachweis rekombinanter und nativer cpHSP70-Proteine in *E. coli* und *Arabidopsis***  
 A) *Arabidopsis* HSP70-1-His bzw. HSP70-2-His und *Chlamydomonas* HSP70B-his wurden in *E. coli* überexprimiert, über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und mittels Westerndetektion über einen *His-Tag*- bzw. einen HSP70B-Antikörper nachgewiesen. B) Nachweis der plastidären HSP70-Proteine mit dem HSP70B-Antikörper in 30 µg bzw. 15 µg *Arabidopsis*-Gesamtprotein.

<sup>10</sup> HSP70B weist auf Aminosäureebene 89 % Homologie zum plastidären HSP70-1 und HSP70-2 aus *Arabidopsis* auf.

#### 4.9.2 AtZR1 interagiert *in vitro* mit HSP70-1 und HSP70-2

Um eine mögliche *in vitro*-Interaktion zwischen AtZR1-strep und HSP70-1-his bzw. HSP70-2-his zu untersuchen, wurden die Proteine wie unter 4.9.1 beschrieben in *E.coli* exprimiert. Als Kontrolle dienten induzierte *E.coli*-Zellen, die mit dem pET30-Leervektor transformiert worden waren. Geklärte Gesamtproteinlysate aus der Überexpression von HSP70-1-his bzw. HSP70-2-his wurden im Verhältnis 1:2,5 bzw. 1:1 mit *E.coli*-Proteinlysate aus der AtZR1-strep-Überexpression gemischt. Außerdem wurden sie im gleichen Mischungsverhältnis mit *E.coli*-Lysat aus der Leerkontrolle versetzt. Anschließend wurden die Proteingemische über die Strep-Tactin-Matrix aufgereinigt. Der Nachweis von HSP70-his und AtZR1-strep im *E.coli* Gesamtproteinlysate sowie nach der *Strep-Tag*-Aufreinigung erfolgte mittels Westerndetektion.

Wie die Abb. 4-57 zeigt, wurden sowohl HSP70-1his (Abb. 4-57 A) als auch HSP70-2his (Abb. 4-57 B) in Gegenwart von AtZR1-strep über die Strep-Tactin-Matrix aufgereinigt. Enthielt der Ansatz hingegen kein AtZR1-strep-Protein, ließen sich nach der Aufreinigung keine HSP70-his-Proteine nicht mehr im Westernblot detektieren. Demnach geht AtZR1-strep eine *in vitro*-Interaktion mit beiden plastidären HSP70-his-Proteinen ein. Da das AtZR1-strep-Protein durch die Aufreinigung über die Strep-Tactin-Matrix deutlich angereichert wurde, der Gehalt an HSP70-Protein im Vergleich jedoch abnahm, lässt sich mutmaßen, dass die Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen schwach ist.



**Abb. 4-57: Pulldown von HSP70-1 und HSP70-2 durch AtZR1-strep**

A) Je 100 µl *E.coli*-Proteinlysate aus der HSP70-1-his-Überexpression wurden mit 250 µl *E.coli*-Proteinlysate aus der AtZR1-strep-Überexpression bzw. 250 µl *E.coli*-Proteinlysate ohne AtZR1 (-AtZR1-strep) gemischt. Je 15 µl der Gesamt-Proteingemische wurden für die SDS-PAGE eingesetzt (= Gesamt). Das übrige Protein wurde für die Affinitätschromatographie (Strep-Tactin) verwendet. Das Eluat wurde für die SDS-PAGE eingesetzt (= Eluat). Die anschließende Western-Detektion mit einem *Strep-tag*- und einem HSP70-spezifischen Antikörper zeigt, dass Hsp70-1-his nur in Anwesenheit von AtZR1-strep über die Strep-Tactin-Matrix isoliert werden konnte. B) entspricht A) mit der Ausnahme, dass je 250 µl *E.coli*-Proteinlysate aus der HSP70-2-his-Überexpression anstelle von HSP70-1his eingesetzt wurden.

Das reziproke Experiment, eine Aufreinigung des AtZR1-strep-Proteins in Anwesenheit von HSP70-his über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, war nicht durchführbar, da überraschenderweise das AtZR1-strep-Protein (wahrscheinlich über die *Zinc Ribbon*-Domäne) sehr effizient von der Ni-NTA-Matrix gebunden wird. Literaturrecherche ergab, dass solche nicht über einen His-Tag vermittelte Bindung an Ni-Matrizes bereits für verschiedene andere Zink-komplexierende Proteine beobachtet wurde (BOLANOS-GARCIA UND DAVIES, 2006).

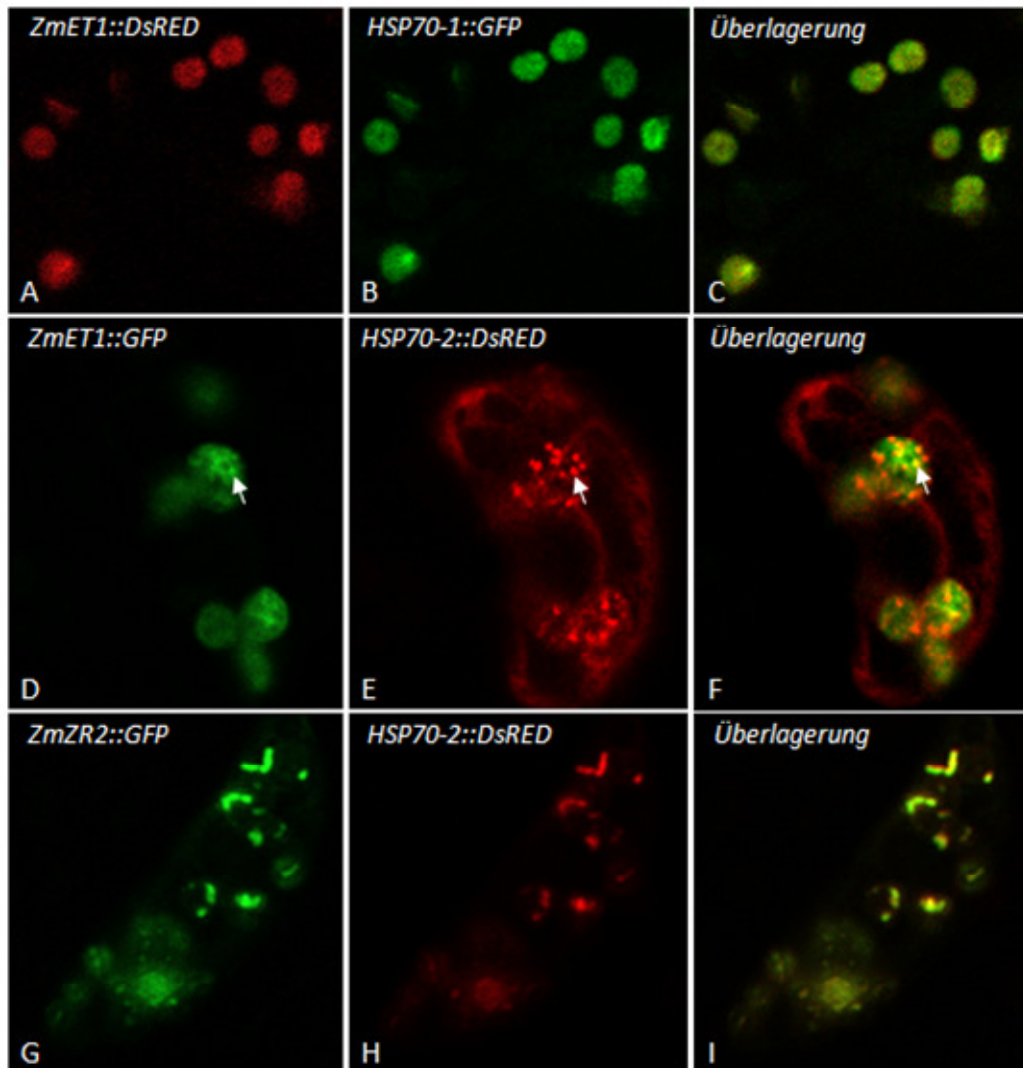
Durch die *Pulldown*-Experimente konnte gezeigt werden, dass AtZR1 sowohl mit HSP70-1 als auch mit HSP70-2 *in vitro* interagiert. Da die genaue Funktion der plastidären HSP70-Proteine in höheren Pflanzen noch weitgehend unbekannt ist, wurden verschiedene Experimente zur subzellulären Lokalisation und Expression dieser Gene durchgeführt. Des Weiteren wurde der Phänotyp von *Arabidopsis* T-DNA Mutanten beider HSP70 Gene untersucht und mit dem *atzr1*-Mutantenphänotyp verglichen. Die erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt. Daher sollten die beiden plastidären HSP70-Proteine aus *Arabidopsis* auf den folgenden Seiten näher charakterisiert werden.

#### 4.9.3 HSP70-1 und -2 sind im Chloroplasten differentiell lokalisiert

Die ZR1- und die ZR2-Proteine aus *Arabidopsis* und Mais zeigten nach Fusion mit GFP und DsRED innerhalb des Chloroplasten ein spezifisch unterschiedliches Verteilungsmuster und co-lokalisierten zumindest teilweise mit dem plastidären DNA-Bindeprotein PEND (vgl. Kapitel 4.2). Aufgrund der gefundenen *in vitro* Interaktion (4.9.2) war es interessant, auch die subzelluläre Lokalisation der plastidären HSP70-Proteine aus *Arabidopsis* näher zu untersuchen. Dazu wurden die ORFs der korrespondierenden Gene At4g24280 (HSP70-1) und At5g49910 (HSP70-2) mit GFP und DsRED fusioniert (vgl. Kapitel 3.3.2) und transient in Zwiebel- und Tabakepidermis exprimiert.

Nach transienter Expression der Konstrukte in den Epidermiszellen der Zwiebel zeigte das HSP70-1-Protein in Fusion mit GFP eine relativ gleichmäßige Verteilung im gesamten Stroma der Leukoplasten. Das HSP70-2::GFP-Fusionprotein akkumulierte hingegen in vielen kleinen *spots* und war kaum im Stroma detektierbar. Eine Fusion des Proteins mit DsRED lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden die HSP70-Reportergenkonstrukte mit ZmET1::GFP bzw. ZmET1::DsRED oder ZmZR2::GFP in Tabakepidermiszellen co-exprimiert (Da mit den Konstrukten, die das *ZmET1* und *ZmZR2* aus Mais enthalten, insgesamt höhere Transformationseffizienzen erreicht wurden, wurden sie den Konstrukten mit dem *AtZR1* bzw. *AtZR2* aus *Arabidopsis* vorgezogen).



**Abb. 4-58: Co-Expression von GFP- und DsRED-Fusionskonstrukten in den Schließzellen der Tabakepidermis**

A-C) Co-Expression von ZmET1::DsRED (A) und HSP70-1::GFP (B). C) Zeigt die Überlagerung aus A und B. D-F) Co-Expression von ZmET1::GFP (D) und HSP70-2::DsRED (E). F) zeigt die Überlagerung aus D und E. G-I) Co-Expression von ZmZR2::GFP (G) und HSP70-2::DsRED (H). I) Zeigt die Überlagerung aus D und E. Alle Bilder wurden am Konfokalmikroskop LSM710 aufgenommen.

Aufnahmen co-transformierter Schließzellen der Tabakepidermis mit dem Konfokalmikroskop (Abb. 4-58) zeigen eine deutliche Co-Lokalisation von HSP70-1::GFP und ZmET1::DsRED. Beide Proteine liegen verteilt im Plastidenstroma vor (Abb. 4-58 A-C).

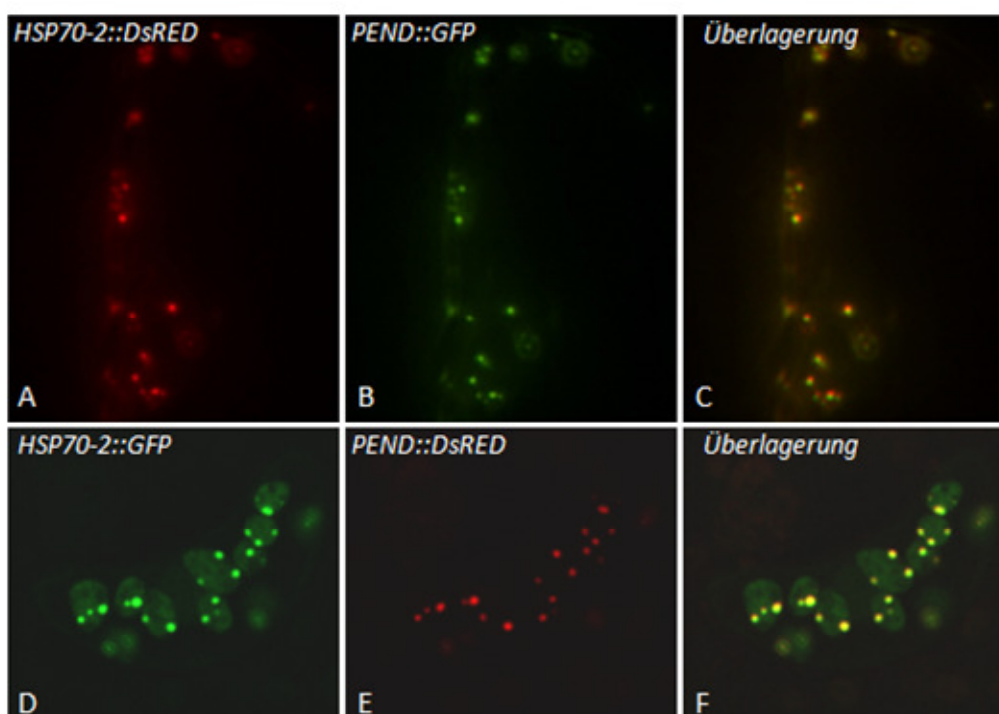
HSP70-2::DsRED und ZmET1::GFP co-lokalisieren hingegen weniger gut miteinander (Abb. 4-58 D-F), da das HSP70-2::DsRED auch in den Tabakchloroplasten in sehr distinkten *spots* akkumuliert, während das ZmET1::GFP im gesamten Stroma vorliegt (Abb. 4-58 E). Allerdings ist auch die ZmET1::GFP-Fluoreszenz nicht völlig homogen, und Bereiche mit besonders starker ZmET1::GFP-Fluoreszenz überlagern mit den HSP70-DsRED *spots* (Abb. 4-58 D-F, Pfeile). Eine ausschließliche Co-Lokalisation wurde jedoch nicht gefunden..



Im Gegensatz dazu resultiert die Co-Expression von HSP70-2::DsRED und ZmZR2::GFP in einer deutlichen Co-Lokalisation beider Proteine (Abb. 4-58 H-I).

Da das HSP70-2 in Fusion mit den Reportern GFP bzw. DsRED sowohl in den Zwiebel-leukoplasten als auch in den Tabakchloroplasten in distinkten *spots* akkumuliert, sollte durch Co-Expression des Proteins mit dem DNA-bindenden PEND::GFP und PEND::DsRED untersucht werden, ob HSP70-2 mit den Nukleoiden co-lokalisiert.

Sowohl die Expression von HSP70-2::DsRED mit PEND::GFP in der Zwiebelepidermis (Abb. 4-59 A-C), als auch die Expression von HSP70-2::GFP mit PEND::DsRED in den Schließzellen von Tabakblättern (Abb. 4-59 D-F) resultiert in einer sehr deutlichen Co-Lokalisation beider Proteine (Abb. 4-59 C, F).



**Abb. 4-59: Co-Expression von HSP70-2- und PEND-Reportergenkonstrukten**

A-C) Co-Expression von HSP70-2::DsRED (A) und PEND::GFP (B) in Zwiebelepidermis.

Die Überlagerung aus A und B zeigt, dass die Proteine co-lokalisieren (C).

D-F) Auch HSP70-2::GFP (D) und PEND::DsRED (E) zeigen in den Schließzellen der

Tabakepidermis eine Co-Lokalisation (F). A und B wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) aufgenommen, D und E am Konfokalmikroskop LSM710.

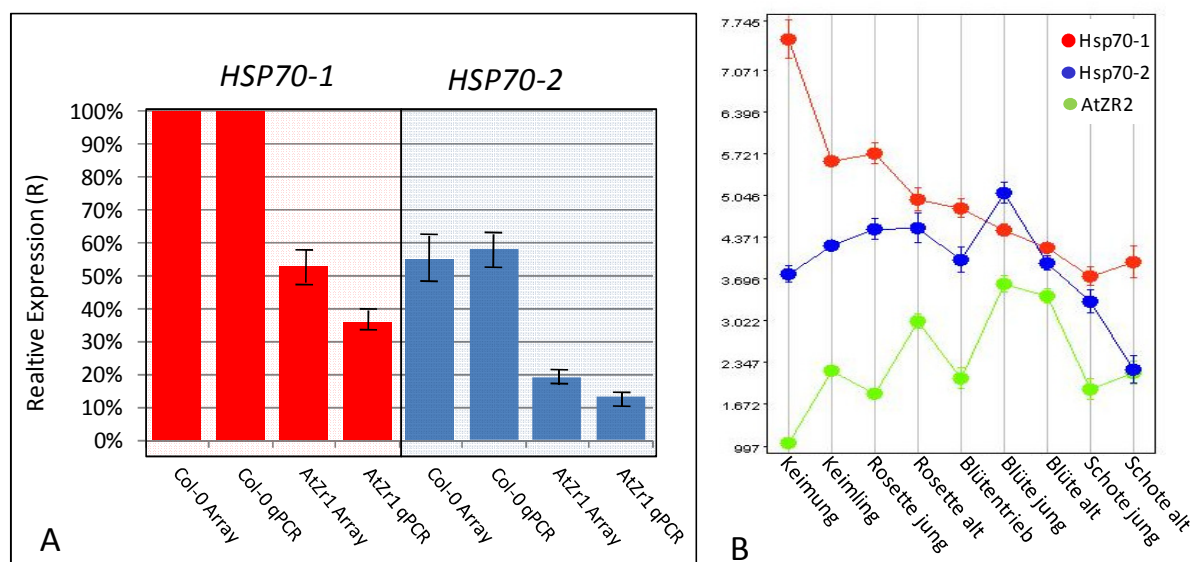
Insgesamt zeigen die plastidären Proteine HSP70-1 und HSP70-2 in Fusion mit den Reporterproteinen GFP oder DsRED eine differenzielle Lokalisation innerhalb der Chloroplasten. Das HSP70-1 ist, ähnlich wie das ZmET1-Fusionsprotein, über das gesamte Stroma verteilt. Das HSP70-2 akkumuliert dagegen in distinkten *spots*, die den Nukleoiden der Plastiden entsprechen, wie durch den Vergleich zwischen der HSP70-2 und der PEND-Lokalisation gezeigt werden konnte. Darüber hinaus co-lokalisiert HSP70-2 mit dem

ZmZR2::GFP. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation der beiden HSP70-Proteine ist anzunehmen, dass sie jeweils spezifische Funktionen innerhalb der Chloroplasten erfüllen.

#### 4.9.4 Untersuchungen zur Expression von *Hsp70-1* und *Hsp70-2*

Anhand der subzellulären Lokalisationsstudien lässt sich mutmaßen, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem AtZR1-Protein und dem HSP70-1 sowie zwischen AtZR2 und HSP70-2 besteht. Da sich die Expressionsmuster von *AtZR1* und *AtZR2* deutlich voneinander unterscheiden (Kapitel 4.3), wurde die Expression der *Hsp70-1* und *Hsp70-2* *in silico* untersucht und mit der Expression der *AtZR*-Gene verglichen.

Zunächst wurden die Expressionsdaten der beiden *Hsp70*-Gene aus dem Microarray-Experiment (Kapitel 4.6) analysiert. Die Auswertung des *Col-0*-Wildtyps ergab, dass *Hsp70-1* im untersuchten Entwicklungsstadium (4 Wochen alte Rosettenblätter) etwa 1,8-mal so stark exprimiert ist wie das *Hsp70-2*. Dieses Ergebnis konnte mittels *Real Time PCR* bestätigt (Abb. 4-60 A). In der *atzr1*-Mutante sind die Transkriptmengen der beiden plastidären *Hsp70*-Gene hingegen sowohl im Microarray als auch in der *Real Time PCR* drastisch reduziert (*Hsp70-1* um etwa 48 % bzw. 65 % und *Hsp70-2* um etwa 70 %). Demnach nimmt der Knockout des *AtZR1*-Gens wesentlichen Einfluss auf die Expression der beiden plastidären *Hsp70*-Gene.



**Abb. 4-60: Expression von HSP70-1 und HSP70-2 in der *atzr1*-Mutante und *Arabidopsis* Wildtypen**

A) Relative Expression von *Hsp70-1* und *Hsp70-2* im *Col-0* Wildtyp und in der *atzr1*-Mutante. Die Microarray-Daten wurden mittels *Real Time PCR* (qPCR) verifiziert.

B) Expressionsprofil von *Hsp70-1* (●) und *Hsp70-2* (●) im Vergleich zu *AtZR2* (●) im Verlauf der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*. Für die Darstellung wurde Genevestigator V3 (ZIMMERMANN *et al.*, 2005) verwendet.

Erstaunlicherweise war die HSP70-Proteinmenge in der *atzr1*-Mutante trotz der deutlichen Reduktion der *Hsp70*-Transkripte, signifikant erhöht (vgl. Abb. 4-33, Kapitel 4.6.4). Da die beiden plastidären HSP70-Proteine im Westernblot nicht voneinander zu unterscheiden sind, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob tatsächlich beide Proteine im verstärkt exprimiert werden.

Die Recherche in Datenbanken wie *Genevestigator V3* und *eFP-Browser* (WINTER *et al.*, 2007), die Expressionsdaten zu rund 24.000 *Arabidopsis*-Genen aus über 3.000 Affymetrix Microarray-Experimenten enthalten, ergab ein durchaus unterschiedliches Expressionsprofil für *Hsp70-1* und *Hsp70-2* im Verlauf der Pflanzenentwicklung (Abb. 4-60 B). Während das *Hsp70-1*-Transkript zum Zeitpunkt der Keimung und Keimlingsentwicklung besonders stark exprimiert ist und dann sukzessive abnimmt, steigt die *Hsp70-2*-Transkriptmenge im Laufe der Entwicklung stetig an, fällt aber mit dem Einsetzen der Schotenentwicklung rapide ab. Insgesamt zeigt das *Hsp70-2* eine schwächere Expression als das *Hsp70-1*. Dies korreliert auch mit den Expressions-Daten aus dieser Arbeit (Abb. 4-60 A). Das *AtZR2* zeigt im Verlauf der Entwicklung ein ähnliches Expressionsmuster wie das *Hsp70-2*, ist jedoch insgesamt deutlich schwächer exprimiert.

Die Datenbank-Recherchen zeigten außerdem, dass die Transkriptmengen von *Hsp70-1* und *Hsp70-2* infolge von Hitzestress auf das Vierfache anstiegen (KILIAN *et al.*, 2007). *AtZR2* reagiert hingegen nicht auf Hitze (Daten siehe Anhang). Auch in Bezug auf andere abiotischer Einflüsse (z.B. Licht) deuten die *in silico* Expressionsdaten auf eine entgegengesetzte Regulation beider Gene (Daten nicht gezeigt).

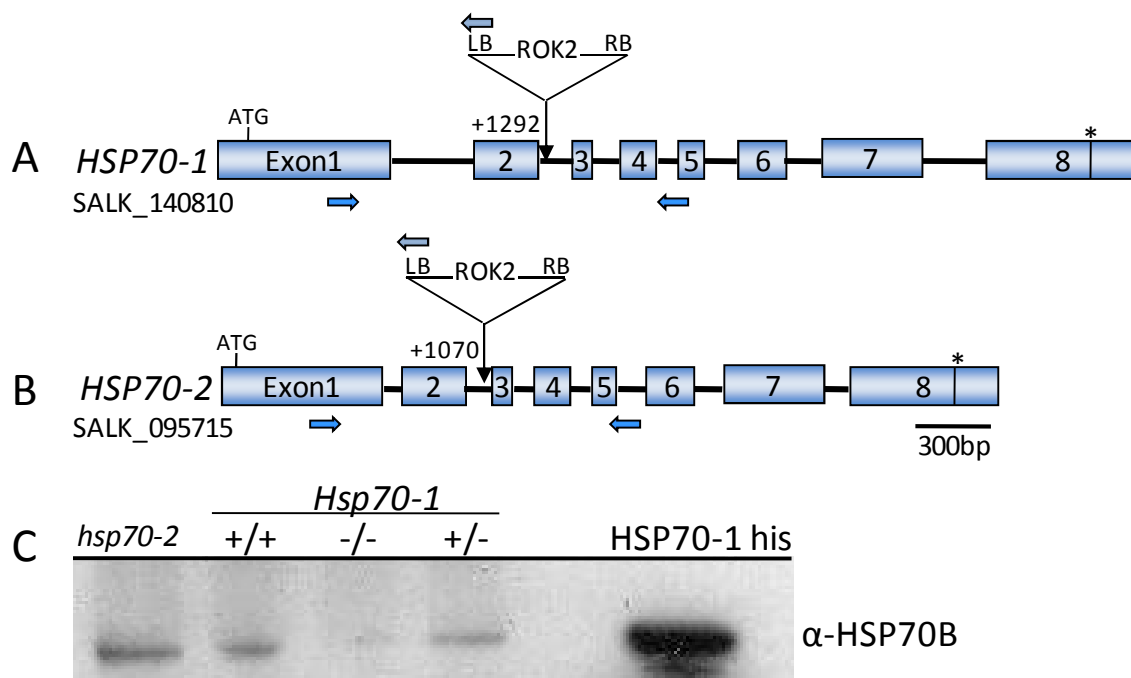
#### 4.9.5 Analyse von HSP70-T-DNA-Insertionsmutanten

Um zu untersuchen, ob der Verlust der *Hsp70*-Transkripte einen ähnlich starken Einfluss auf die Pflanzenentwicklung hat, wie der Knockout des *AtZR1*, wurden *Arabidopsis* T-DNA-Insertionsmutanten für die Gene *At4g24280* (*Hsp70-1*) und *At5g49910* (*Hsp70-2*) untersucht. Die segregierenden Mutanten-Linien wurden über das *Nottingham Arabidopsis stock Centre* bezogen.

Homozygote *hsp70-1*- und *hsp70-2*-Knockout-Pflanzen wurden mittels genomischer PCR identifiziert. Da die T-DNA-Insertion in den beiden untersuchten SALK-Linien jeweils im zweiten Intron des Gens liegt, ist davon auszugehen, dass die homozygoten Knockout-Pflanzen für das betroffene Gen kein funktionelles Transkript synthetisieren (Abb. 4-61).

Western-Analysen homozygoter *hsp70-2*-Knockout-Pflanzen zeigten, dass der Verlust des *Hsp70-2* keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Gesamtmenge an plastidärem HSP70-Protein hat. In der homozygoten *hsp70-1*-Knockout-Pflanze war hingegen nur noch sehr wenig HSP70-Protein nachweisbar. Ursache für den Nachweis von HSP70-Protein in den beiden Knockout-Linien ist die Expression des jeweils anderen HSP70-Proteins, da der

Antikörper, wie bereits geschildert nicht selektiv zwischen HSP70-1 und HSP70-2 unterscheiden kann. Die unterschiedlichen Restmengen HSP70 in beiden Mutantenlinien korreliert gut mit den unterschiedlichen mRNA-Mengen beider Gene (Abb. 4-60).



**Abb. 4-61: Charakterisierung einer *Hsp70-1*- und einer *Hsp70-2*-T-DNA-Insertionsmutante**

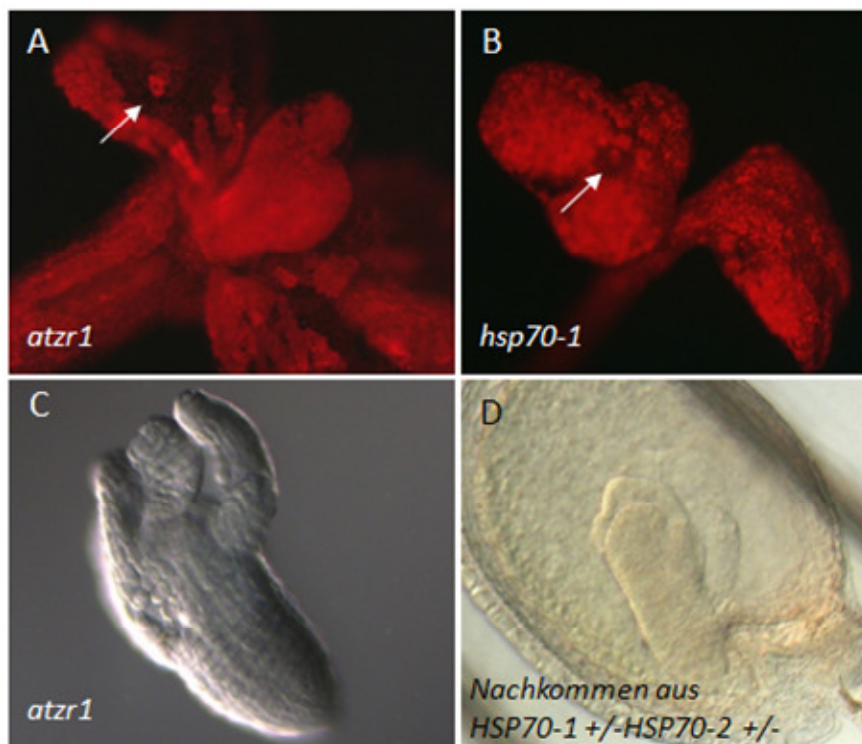
A und B) Schematische Darstellung der Gene *Hsp70-1* (At4g24280) und *Hsp70-2* (At5g49910). Exons sind als Boxen und Introns als Linien dargestellt. ATG: Translationsstart, \*: Translationsstop. Der Insertionsort der ROK2-T-DNAs in den Salk-Linien 140810 (*Hsp70-1*) und 095715 (*Hsp70-2*) ist ebenfalls markiert. Die Pfeile markieren die Primerbindestellen zur Genotypisierung der T-DNA-Insertionsmutanten.

C) Westerndetektion des HSP70-Proteins mit einem HSP70B-spezifischen Antikörper im Chloroplastenprotein einer homozygoten *hsp70-2* Knockout-Pflanze sowie von Pflanzen, die in Bezug auf das *Hsp70-1* homozygot Wildtyp (+/+), homozygot Knockout (-/-) oder heterozygot (+/-) waren. Als Referenz wurde rekombinantes HSP70-1-his-Protein aufgetragen.

Auch in Bezug auf den Phänotyp ergibt sich ein ähnliches Bild: Während homozygote *hsp70-2*-Knockout-Pflanzen, in denen die HSP70-Gesamtproteinmenge kaum verändert ist, äußerlich keinen auffälligen Phänotyp entwickeln, wirkt sich der Verlust des *Hsp70-1* deutlich auf die Pflanzenentwicklung aus. Die Cotyledonen der Keimlinge sind variiert und zeigen in den hellen Bereichen keine Autofluoreszenz des Chlorophylls (Abb. 4-62 B). Auch junge *atyr1*-Keimlinge besitzen vielfach Areale ohne Chlorophyllautofluoreszenz (Abb. 4-62 A). Darüber hinaus sind Blattoberfläche und Blattränder von *hsp70-1*-Knockout-Pflanzen unregelmäßig geformt. Dieser Phänotyp zeigt sich auch in den ersten Blättern, wird jedoch mit zunehmendem Alter der Pflanzen schwächer. Auch hier bestehen gewisse Parallelen

zwischen dem *hsp70-1*- und dem *atrz1*-Phänotyp, bzw. dem Phänotyp teil-komplementierter *atrz1/pAtZR1:ZmET1*-Pflanzen (Abb. 4-63).

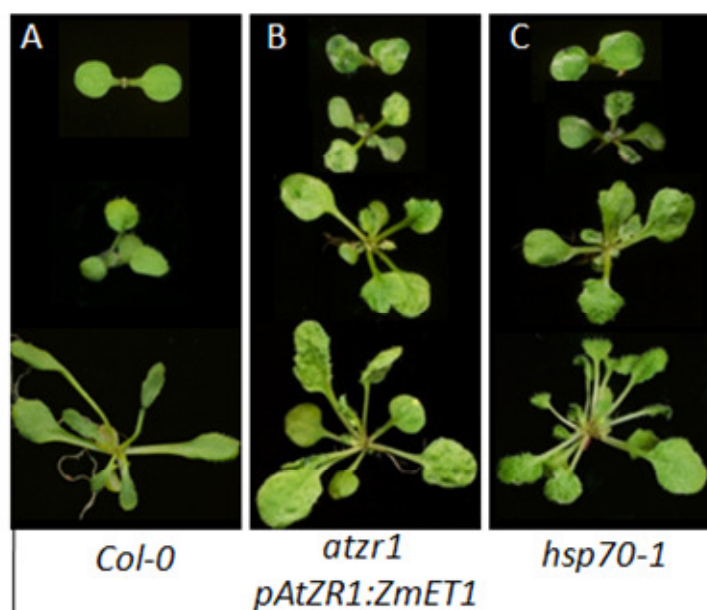
Die *hsp70-1*-Mutante zeigt außerdem leichte morphologische Veränderungen der Blüte (vergleichbar mit der schwächsten Ausprägung des *atrz1*-Blütenphänotyps), die mit einer leicht verminderten Fertilität einhergehen. Die Samen der Pflanze entwickeln sich jedoch unauffällig.



**Abb. 4-62: Vergleich zwischen der *hsp70-1*- und der *atrz1*-Mutante**

A und B) Chlorophyll-Autofluoreszenz eines *atrz1*-Keimlings (A) und eines *hsp70-1*-Keimlings (B). Pfeile weisen auf Areale ohne Chlorophyll-Autofluoreszenz. C) Ein isolierter *atrz1*-Embryo wurde mit Hoyer's Medium geklärt. D) Der geklärte Samen einer Pflanze, die sowohl in Bezug auf das Hsp70-1 als auch das Hsp70-2 heterozygot ist, enthält einen Embryo mit *atrz1*-ähnlichem Phänotyp.

Trotz einiger Gemeinsamkeiten bestehen wesentliche Unterschiede zwischen der *hsp70-1*- und der *atrz1*-Mutante, die in erster Linie die Stärke der phänotypischen Ausprägung betreffen: Im Gegensatz zur *atrz1*-Mutante ist die *hsp70-1*-Knockout-Pflanze auf Erde lebensfähig und weist nicht die extremen strukturellen und morphologischen Veränderungen auf, die die *atrz1*-Mutante zeigt (vgl. Kapitel 4.5.3). Im Vergleich mit einer komplementierenden *atrz1/pAtZR1:ZmET1*-Linie zeigen sich zwar große Ähnlichkeiten in Bezug auf die veränderte Blattform und -oberfläche, insgesamt erscheint die *hsp70-1*-Mutante jedoch immer etwas grüner.



**Abb. 4-63: Vergleich der *hsp70-1*- und der Teil-komplementierten *atzr1*-Mutante**

A) *Col-0*-Pflanze 2 Tage, 8 Tage und 21 Tage nach Keimung. B) Teil-komplementierte *atzr1/pAtZR1:ZmET1*-Pflanze 2, Tage, 8 Tage, 14 Tage und 21 Tage nach Keimung. C) *hsp70-1*-Mutante 2, Tage, 8 Tage, 14 Tage und 21 Tage nach Keimung.

Um zu untersuchen, inwiefern der vergleichsweise schwache *hsp70-1*-Phänotyp mit dem zweiten plastidären *Hsp70*-Gen zusammenhängt, wurden homozygote *hsp70-2*-Pflanzen auf homozygote *hsp70-1*-Pflanzen ausgekreuzt. Die heterozygoten  $+/hsp70-1/+/hsp70-2$ -Nachkommen waren durch die Wiederherstellung des Wildtypphänotyps leicht erkennbar. In den unreifen Schoten dieser Pflanzen konnten Samen mit einem deutlichen Mutanten-Phänotyp der Embryonen identifiziert werden. Der beobachtete Phänotyp zeigte signifikante Parallelen zum Phänotyp der *atzr1*-Mutante (Abb. 4-62 C, D).

In reifen Schoten wurden Samen mit einem segregierendem Phänotyp gefunden werden. Neben Wildtyp-Samen enthielten die Schoten auch Samen, die unterschiedlich stark kollabiert waren. Nach Aussaat der kollabierten Samen auf Sucrose-haltigem Medium entwickelten sich daraus Pflanzen mit unterschiedlichem Phänotyp. Die Hälfte der Pflanzen zeigte nur leichte morphologische Veränderungen und ein reduziertes Wachstum. Wie die genotypische Analyse dieser Pflanzen zeigte, handelte es sich um homozygote *hsp70-2*-Knockouts, die in Bezug auf das *Hsp70-1* heterozygot waren. Die andere Hälfte der Pflanzen zeigte einen weitaus auffälligeren Phänotyp: Ähnlich wie die *atzr1*-Mutante, besaßen sie eine erhöhte Anzahl kleiner blasser Rosettenblätter und zeigten einen kompakten Wuchs. Teilweise ergrünten die Pflanzen nicht richtig und akkumulierten verstärkt Anthocyane. Nach dem Austopfen der Pflanzen auf Erde starben sie jedoch, bevor der Genotyp bestimmt werden konnte. Somit lässt sich nur spekulieren, dass es sich bei diesen Pflanzen eventuell

---

um homozygote *hsp70-1*-Mutanten handelte, die heterozygot für das *Hsp70-2* oder Doppelknockouts waren.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel gezeigt, dass die beiden plastidären HSP70-Proteine eine *in vitro*-Interaktion mit dem AtZR1 eingehen. Eine mögliche Interaktion mit dem AtZR2 ließ sich hingegen nicht untersuchen. Subzelluläre Lokalisationsstudien der HSP-Proteine zeigten, dass sie innerhalb des Chloroplasten unterschiedlich lokalisiert sind. HSP70-1 liegt, ähnlich wie das ZR1/ETCHED1, im gesamten Stroma vor. Die starke Expression des Gens während der frühen Pflanzenentwicklung bildet ebenso eine Parallele zum ZR1/ETCHED1 wie das Auftreten eines Mutantenphänotyps durch den Knockout des Gens.

Das HSP70-2 co-lokalisiert innerhalb des Chloroplasten sowohl mit ZR2 als auch mit dem PEND-Protein. Auch das Expressionsprofil des *Hsp70-2* korreliert im weitesten Sinne mit der Expression des *AtZR2*. Unter Stress-Bedingungen (z.B. Temperatur, Licht) weichen die Expressionsdaten jedoch voneinander ab.

Obwohl sich HSP70-1 und HSP70-2 in ihrer subzellulären Lokalisation und der entwicklungsabhängigen Expression voneinander unterscheiden, sprechen die Kreuzungsanalysen der T-DNA-Mutanten für eine gewisse funktionelle Komplementation zwischen den beiden Proteinen.

## 5. Diskussion

Die pleiotrope *etched1*-Mutante aus Mais wurde bereits 1940 von STADLER beschrieben, doch der *Etched1*-Genlocus wurde erst viele Jahre später identifiziert und kloniert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). *Etched1* kodiert für ein kleines, 19 kDa schweres Plastidenprotein, das neben einem Transitpeptid zum Import in die Plastiden über eine C-terminale *Zinc Ribbon*-Domäne verfügt. Datenbankanalysen zeigten, dass ETCHED1 Mitglied einer neuen Familie von organellenspezifischen *Zinc Ribbon*-Proteinen ist, die neben der ETCHED1/ZR1-Gruppe die ebenfalls plastidär lokalisierten ZR2-Proteine und die mitochondrialen ZR3-Proteine umfasst (GARG, 2002, GEBERT, 2003, KRUSE, 2004). Aufbauend auf den bestehenden Daten wurde die phylogenetische Verwandtschaft der verschiedenen ZR-Familienmitglieder besonders in Hinblick auf die Entwicklung der plastidären HEP- und ZR-Proteine näher charakterisiert.

Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich eine mögliche Funktion für das ETCHED1-Protein bekannt (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). Unter der Annahme, dass *Etched1*-homologe Gene anderer Pflanzen vergleichbare Aufgaben erfüllen, wurde die ZR-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* umfassend charakterisiert, um neue bzw. ergänzende Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Funktion der ZR1-, ZR2- und ZR3-Proteine zu erlangen. Neben der subzellulären Lokalisation und gewebespezifischen Expression der Gene *AtZR1*-, *AtZR2*- bzw. *AtZR3* wurden Knockout-Phänotypen anhand von T-DNA-Insertionslinien untersucht. Der Verlust des *AtZR1* resultierte in einem pleiotropen Mutanten-Phänotyp, der im Rahmen dieser Arbeit umfassend charakterisiert wurde. Durch Komplementationsexperimente wurde gezeigt, dass *AtZR1* und *ZmET1* orthologe Gene sind, *AtZR1* und *AtZR2* jedoch nicht.

Da ETCHED1 immunologisch ausschließlich im plastidären TAC (*transcriptionally active chromosome*) nachgewiesen wurde und eine gewisse vorhergesagte Strukturverwandtschaft zum Transkriptionselongationsfaktor TFIIS besteht, wurde dem Protein eine Funktion während der plastidären Transkription zugeschrieben. Das ETCHED1-Protein enthält in der  $\beta$ -Schleife der *Zinc Ribbon*-Domäne jedoch nur eine von zwei essentiellen sauren Aminosäuren des TFIIS (vgl. Abb. 2-5). Trotzdem scheint ETCHED1 in den Plastiden, ähnlich wie TFIIS im Zellkern, die Exonukleaseaktivität der RNA-Polymerase zu stimulieren (MÜLLER, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob das ETCHED1-Protein eine direkte Interaktion mit einer der beiden plastidären RNA-Polymerasen aus Mais eingeht. Zudem wurde nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern des Proteins gesucht.

Im Verlauf der Arbeit wurden biochemische Studien der ZR-homologen Proteine HEP1 aus Hefe (SICHTING *et al.*, 2005; MOMOSE *et al.*, 2007) und HEP2 aus *Chlamydomonas* (WILLMUND *et al.*, 2008) veröffentlicht, die eine Interaktion der Proteine mit organellenspezifischen HSP70-



Proteinen belegten. Daher wurde ebenfalls eine mögliche Interaktion der Proteine AtZR1 und AtZR2 aus *Arabidopsis* mit den plastidären HSP70-Chaperonen untersucht.

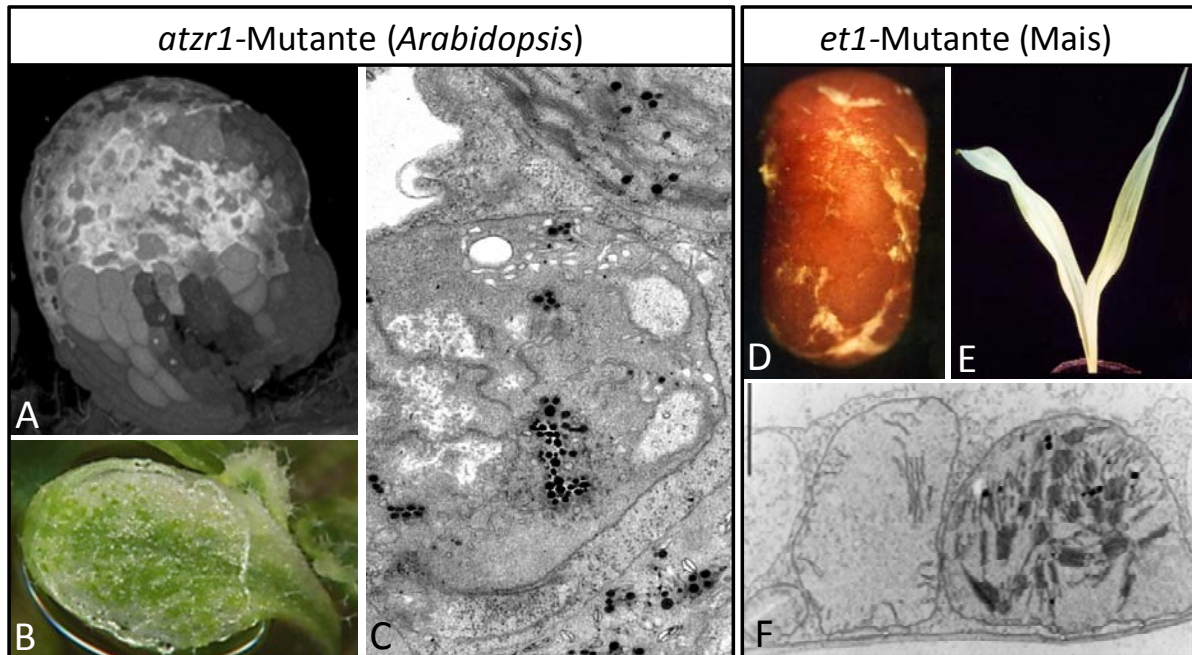
Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der molekularen Charakterisierung der ZR-Gen-Familie in höheren Pflanzen. Obwohl das *Etched1*-Gen als erstes der ZR-Gene ursprünglich in Mais identifiziert und beschrieben worden ist (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004), wurde in dieser Arbeit weitestgehend auf die dikotyledone Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zurückgegriffen. Diese Pflanze bietet gegenüber dem Mais einige Vorteile: Zum einen ist sie klein, leicht zu kultivieren, sie besitzt einen kurzen Lebenszyklus und lässt sich genetisch gut manipulieren. Zum anderen ist das Genom vollständig sequenziert und es existieren ein umfangreiches Netzwerk aus Genom- und Expressionsdatenbanken (SWARBRECK *et al.*, 2008) sowie verschiedene Mutanten-Kollektionen (T-DNA-Insertionslinien, Transposon-Mutanten), die inzwischen einen Großteil der proteinkodierenden Gene im *Arabidopsis*-Genom abdecken (LI *et al.*, 2007).

Datenbankanalysen haben gezeigt, dass die ZR-Genfamilie in höheren Pflanzen konserviert ist (Kapitel 4.1), sodass anzunehmen ist, dass die ZR-Gene verschiedener Spezies ortholog zueinander sind.

## 5.1 Die *atZR1*-Mutante

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionsmutanten der Gene *AtZR1*, *AtZR2* und *AtZR3* untersucht. Da im Wesentlichen nur der Knockout des *AtZR1*-Gens in einem deutlichen Mutantenphänotyp resultierte, wurde diese Mutante zunächst phänotypisch (Kapitel 4.5) und mittels Microarrays auch auf molekularer Ebene (Kapitel 4.6) untersucht. Um zu belegen, dass der *atZR1*-Mutanten-Phänotyp allein durch den Verlust des *AtZR1*-Proteins bedingt wird, wurde der Phänotyp komplementiert (Kapitel 4.7).

Ähnlich wie der Verlust des *Etched1* in Mais resultierte der Knockout des orthologen *AtZR1*-Gens in *Arabidopsis* in einem pleiotropen Phänotyp der Samen- und Keimlingsentwicklung (Abb. 5-1 A, B, D, E). Ebenso wie in Mais, ist dieser Phänotyp auch in *Arabidopsis* auf eine gestörte bzw. verzögerte Plastidenentwicklung zurückzuführen (Kapitel 4.5.2). In den Mesophyllzellen der *et1*-Mutante sowie der *atZR1*-Mutante findet man Chloroplasten mit unterentwickelten Thylakoidmembranen neben phänotypisch unauffälligen Chloroplasten (Abb. 5-1 C, F).



**Abb. 5-1: Vergleich der *atzr1*-Mutante in *Arabidopsis* und der *et1*-Mutante in Mais**

Sowohl die *atzr1*-Mutante in *Arabidopsis* (A-C) als auch die *et1*-Mutante in Mais (D-F) zeigen einen pleiotropen Phänotyp in Samen (A) bzw. Körnern (D) und Blättern (B, E). In beiden Mutanten basiert der Phänotyp auf einer defekten Chloroplastenentwicklung (C, F).

Der *atzr1*-Samenphänotyp in *Arabidopsis* beruht jedoch in erster Linie auf einer Entwicklungsstörung des Embryos, während in den Körnern der *et1*-Mutante in Mais primär die Endospermentwicklung betroffen ist. Im Gegensatz zur *et1*-Mutation in Mais wirkt sich die gestörte Plastidenentwicklung in der *atzr1*-Mutante auch auf die Anatomie der Blätter und anderer oberirdischer Organe aus. Anders als die *et1*-Mutante in Mais ist die *atzr1*-Mutante außerdem nicht in der Lage, den Mutantenphänotyp nach wenigen Tagen oder Wochen zu überwinden, da *atzr1*-Mutanten über die gesamte Pflanzenentwicklung einen extrem starken Knockout-Phänotyp zeigen.

Wie lässt sich diese Diskrepanz in der pflanzeigenen Kompensation des Phänotyps erklären? Eine logische Erklärung ist das Vorhandensein einer zweiten *Etched1*-homologen Genkopie, *ZmZR1*, im Maisgenom. Das *ZmZR1* wird zwar nur extrem schwach in der Maispflanze (*et1*-Mutante) exprimiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004), die erfolgreiche Teilkomplementation der *atzr1*-Mutante durch eine extrem schwache *Etched1*-Expression (Kapitel 4.7.2) zeigt jedoch, dass eine sehr geringe Gendosis bereits ausreicht, um den *atzr1*-Mutantenphänotyp wesentlich zu lindern.

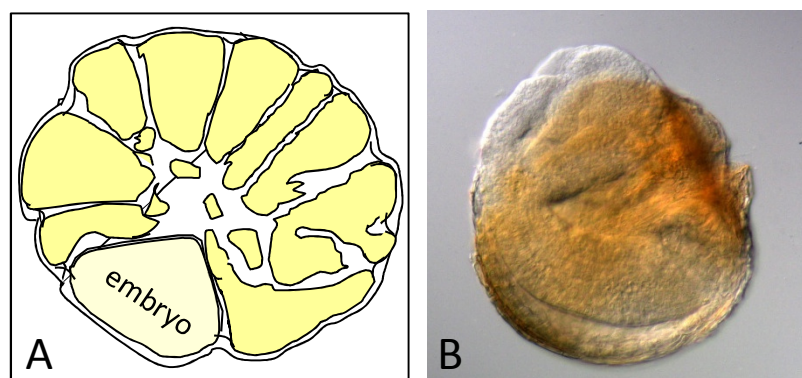
Darüber hinaus bestehen vielfältige Unterschiede in der Korn/Samen- und Blatt-Entwicklung zwischen der monokotylen Pflanze Mais und der dikotylen Pflanze *Arabidopsis*, die die phänotypische Variabilität erklären können. Trotz dieser Unterschiede belegt die erfolgreiche vollständige Komplementation der *atzr1*-Mutante durch ektopische *ZmET1* Expression (Kapitel 4.7.2) jedoch die orthologe Funktion beider Gene.

### *Der atzr1-Phänotyp in Samen*

Entwicklungsspezifische Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Mais und *Arabidopsis* sind während der Samen- bzw. Kornentwicklung besonders offensichtlich. Nach der doppelten Befruchtung geht aus der Zentralzelle in beiden Organismen zunächst ein nukleäres Endosperm hervor (Coenocytium), das anschließend zellularisiert. Diese Mechanismen verlaufen in Mais und *Arabidopsis* nach einem vergleichbaren Prinzip (OLSEN, 2004). Während das Endosperm im reifen Maiskorn erhalten bleibt und später als Nährstoffreservoir für die keimende Pflanze dient, wird das Endosperm in *Arabidopsis*-Samen bereits während der Embryoentwicklung nahezu vollständig abgebaut. Speicherstoffe für die spätere Versorgung des Keimlings werden hingegen in den Cotyledonen eingelagert. Ein Vergleich des *atzr1*-Samen-Phänotyps mit dem *et1*-Körner-Phänotyp zeigt, dass sich die *atzr1*-Mutation besonders stark auf die Entwicklung des Embryos und insbesondere auf die Ausbildung der Cotyledonen auswirkt. Die Cotyledonen der *atzr1*-Embryonen sind oft unterentwickelt und stark zerfurcht. Während der Samenreife kollabieren die Samen schließlich, da der Embryo nicht seine volle Größe erreicht hat.

Der Körner-Phänotyp der *et1*-Mutante wirkt sich hingegen besonders auf die Entwicklung des stärkehaltigen Endosperms aus. Dabei entwickeln sich stärkehaltige und stärkefreie Zelllinien. Während der Reifung des Kornes kollabieren die stärkefreien Endospermzellen und es entstehen die charakteristischen Furchen auf der Kornoberfläche, die namensgebend für die *etched1*-Mutante waren.

Während der Samen- bzw. Korn-Entwicklung sind demnach sowohl in der *Arabidopsis atzr1*-Mutante als auch in der *et1*-Mutante in Mais die Gewebe zur Synthese von Reservestoffen zur Versorgung des Keimlings betroffen.



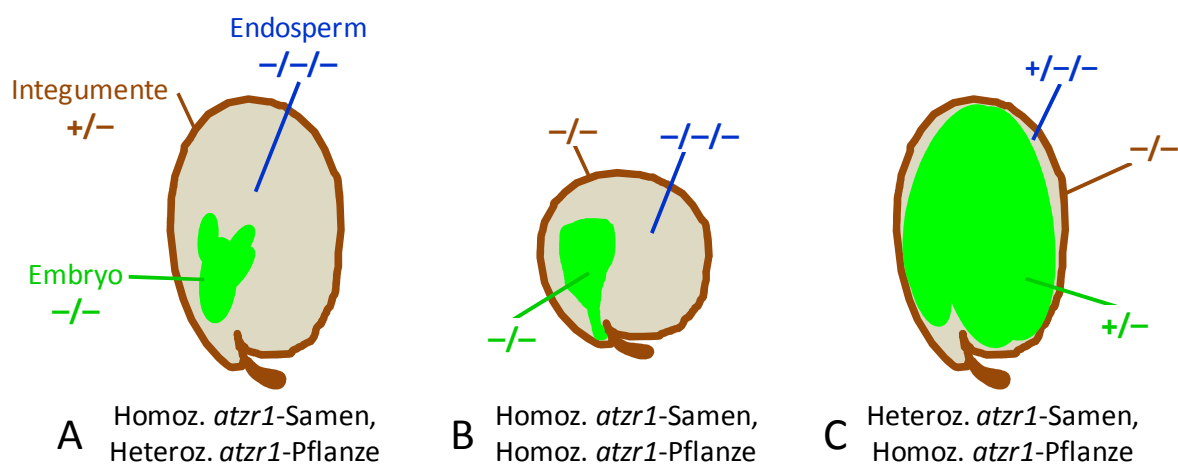
**Abb. 5-2: Phänotyp eines *et1*-Maiskorns (A) und eines *atzr1*-Samens (B)**

Die Hauptspeicherform von Reservestoffen im Endosperm des Maiskorns ist die Stärke, die in den Amyloplasten des Endosperms synthetisiert wird. In den Cotyledonen von *Arabidopsis* werden hingegen primär Triacylglycerole (TAGs) und Proteine als Reservestoffe gespeichert. Lipidanalysen von *atzr1*-Samen wiesen auf einen um ca. 40 % reduzierten TAG-Gehalt

gegenüber Wildtypsamen hin (Lorbiecke unveröffentlicht). In *Arabidopsis* erfolgt die Synthese der TAGs in den Plastiden des Embryos (BAUD *et al.*, 2008). Die dafür notwendige Energie gewinnen die Embryonen dabei durch Photosynthese (GOFFMAN *et al.*, 2005), was wiederum erklärt, warum die Embryonen der Brassicaceen zeitweilig im Inneren der Samen ergrünen. Die Embryonen der *atrz1*-Mutante entwickeln hingegen keine photosynthetisch aktiven Chloroplasten. Damit fehlt ihnen eine wichtige Energiequelle zur Synthese von Speicherlipiden.

Einhergehend mit dem Befund, dass Reservestoffe in Mais durch das Endosperm und in *Arabidopsis* durch den Embryo gebildet werden, ist das *Etched1*-Transkript in Wildtyp-Maispflanzen während der Kornentwicklung überwiegend im Endosperm und kaum im Embryo exprimiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004), während der *AtZR1*-Promotor seine stärkste Aktivität im Embryo entfaltet und nur schwache Aktivität im Endosperm von *Arabidopsis*-Samen aufweist (Kapitel 4.3.4).

In *Arabidopsis atrz1*-Mutantensamen hängt die phänotypische Ausprägung vom Genotyp der Elternpflanze ab. In homozygoten *atrz1*-Samen heterozygoter Pflanzen ist primär der Embryo von der *atrz1*-Mutation betroffen, das Endosperm und die Samenschale (heterozygoter *atrz1*-Genotyp) zeigen hingegen keinen auffälligen Phänotyp (vgl. Abb. 5-3 A). In Samen homozygoter *atrz1*-Knockout-Pflanzen zeigt neben dem Embryo hingegen auch die Samenschale (homozygoter *atrz1*-Genotyp) einen deutlichen Mutantenphänotyp (vgl. Abb. 5-3 B). Die Samen expandieren kaum und die Embryonen durchbrechen die Samenschale oft schon während der Entwicklung. Außerdem sind die Zellen der Testa zuweilen stark kollabiert (vgl. Kapitel 4.5.1, Abb. 5-1 A).



**Abb. 5-3: Vergleich von Samenphänotypen und Samengenotypen in der *atrz1*-Mutante**

A) Embryo + Endosperm (triploid) = homozygot *atrz1*; Integumente = heterozygot *atrz1*: Samengröße und Testa sind unauffällig, Embryo mit Mutantenphänotyp. B) Embryo, Endosperm und Integumente = homozygot *atrz1*: kleiner Samen, Testa und Embryo mit Mutantenphänotyp. C) Embryo + Endosperm = heterozygot *atrz1*; Integumente = homozygot *atrz1*: Samen entspricht optisch dem Wildtyp.

In *Arabidopsis* wurde ein ähnlich starker Samenphänotyp bisher nur in einer *ttg2/iku*-Doppelknockout-Mutante beschrieben (DAMIEN *et al.*, 2005). *TTG2* (*transparent testa glabra2*) kodiert für einen WRKY-Transkriptionsfaktor, der stark in den Integumenten des Samens exprimiert wird. *ttg2*-Mutanten zeigen reduzierte Elongation der Integumentzellen, die zu einer verfrühten Zellularisierung des Endosperms und somit zu kleineren Samen führt. In der *iku*-Mutante sind die Samen ebenfalls kleiner als in Wildtyppflanzen, was im Kontrast zur *ttg2*-Mutante jedoch auf einer reduzierten Proliferation des syncycialen Endosperms beruht. Das zugehörige *IKU*-Gen wurde bisher jedoch nicht kloniert (GARCIA *et al.*, 2003). Samen der *ttg2/iku*-Doppelknockout-Mutante sind extrem klein, besitzen eine reduzierte Testa und ähnlich wie in der *atZR1*-Mutante keimen die Embryonen verfrüht. Die Autoren DAMIEN *et al.* begründen die frühzeitige Keimung mit der schwächeren Testa der Mutante, während die extreme Reduktion der Samengröße durch eine sehr frühe Zellularisierung des Endosperms bedingt ist. Auf Grund der additiven Effekte in der *ttg2/iku* Doppelknockout kann man schlussfolgern, dass die Samengröße sowohl durch Faktoren des Endosperms als auch der maternalen Samenschale reguliert wird (BERGER, 2007).

Ein ähnliches Phänomen ist auch in der *atZR1*-Mutante zu beobachten: Wie bereits geschildert, besitzen homozygote *atZR1*-Samen heterozygoter *atZR1*-Pflanzen nahezu normal große Samen, während homozygote *atZR1*-Samen homozygoter *atZR1*-Pflanzen extrem klein sind (Abb. 5-3 A, B). Bestäubt man homozygote *atZR1*-Blüten mit Wildtyp-Pollen, so reifen hingegen phänotypisch unauffällige Samen heran, obwohl die Integumente homozygot *atZR1* sind. Aus diesen Samen gehen heterozygote *atZR1*-Pflanzen hervor (Abb. 5-3 C; vgl. Kreuzungsexperimente zur Komplementation des *atZR1*-Phänotyps, Kapitel 3.7.4, 3.7.5).

Das bedeutet, dass ein einziges *AtZR1*-Wildtyp-Allel entweder in den maternalen Integumenten oder im triploiden Endosperm des Samens ausreicht, um (nahezu) normal große Samen zu entwickeln. Erste eigene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die extreme Reduktion der Samengröße in der *atZR1*-Mutante ebenso wie in der *ttg2*- und *iku*-Mutante mit einer verfrühten Zellularisierung des syncycialen Endosperms einhergeht.

*AtZR1* ist das erste Beispiel eines Plastidenproteins, dessen Verlust sich in diesem Maße auf die Samenentwicklung in *Arabidopsis* auswirkt. (Bisher beschriebene Gene in *Arabidopsis*, deren Verlust sich stark auf die Expansion des Samens auswirkt, kodieren für regulatorische Gene wie Transkriptionsfaktoren oder Rezeptorkinasen).

### *Der atzr1-Phänotyp ist einzigartig unter den Plastidenmutanten*

Chloroplasten enthalten etwa 3000 bis 4000 verschiedene Proteine. In *Arabidopsis* sind bis heute bereits einige hundert Plastidenmutanten beschrieben worden (vgl. Kapitel 2.2). Die am weitesten verbreiteten Merkmale der Plastidenmutanten umfassen einerseits eine Störung im Aufbau der Thylakoidmembran (in Verbindung mit blassen oder variierten Blättern) und/oder Mutanten mit einer gestörten Photosyntheseleistung (ETR und NPQ<sup>1</sup>). Andererseits kennt man über 500 Plastidenmutanten, die einen dauerhaften Albinophänotyp zeigen und im Keimlingsstadium letal sind (LEISTER, 2003).

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Plastidenmutanten weist der *atzr1*-Knockout-Phänotyp in *Arabidopsis* zum Teil recht typische Charakteristika der übrigen Plastidenmutanten auf. Dazu gehört die zum Teil sehr stark gestörte Struktur der Thylakoidmembran in Verbindung mit hellen Blattarealen (vgl. Kapitel 4.5.2, Abb. 4-23) sowie eine deutlich reduzierte Photosyntheserate gegenüber dem Wildtyp (J. Melonek, Universität Kiel, mündliche Mitteilung). Diese phänotypischen Merkmale finden sich auch in der *et1*-Mutante aus Mais wieder (vgl. Abb. 5-1).

Darüber hinaus zeigte die *atzr1*-Mutante jedoch Merkmale, die in anderen Plastidenmutanten nur selten auftreten oder bisher gar nicht im Zusammenhang mit einem Plastidendefekt beschrieben worden sind (dazu gehören verschieden große Plastiden und eine veränderte Blattanatomie). Insbesondere die extremen morphologischen Veränderungen, wie z.B. der bereits beschriebene komplexe Phänotyp der Samen, die strukturellen Veränderungen der Blattrosette und der Blüten sowie die beobachteten Verwachsungen an Stengeln und Blättern sind für Plastidenmutanten sehr untypisch (Kapitel 4.5).

Dies macht die *atzr1*-Knockout-Pflanze zu einer sehr außergewöhnlichen und interessanten Plastidenmutante.

Eine Veränderung der Blattanatomie im Zusammenhang mit einer gestörten Plastidendifferenzierung wurde bereits in verschiedenen Plastidenmutanten beobachtet. Dazu gehören beispielsweise die variierten Mutanten *immutans* und *var2* und die retikulären Mutanten *cue1* und die *scabra3* (vgl. Kapitel 2.2, Abb. 2-2). Die Mesophyllzellen dieser Mutanten enthalten in den weißen bzw. hellen Blattsektoren in der Regel eine verminderte Anzahl an Chloroplasten, die in ihrer Größe reduziert sind und morphologische Veränderungen aufweisen. Darüber hinaus ist die Anzahl der Mesophyllzellen reduziert, die Zellen sind ungleich geformt und ein Palisadenparenchym ist nicht erkennbar.

Diese Daten zeigen, dass die Chloroplastenentwicklung einen erheblichen Einfluss auf die Differenzierung der Mesophyllzellen hat und sich darüber hinaus auf die Anatomie des

---

<sup>1</sup> ETR: Photosynthetischer Elektronentransfer. NPQ: Non-photochemical Quenching.

gesamten Blattes auswirken kann. Es wird angenommen, dass der regulatorische Einfluss des Chloroplasten auf den Blattaufbau über retrograde Signalwege gesteuert wird (Yu *et al.*, 2007, HVICOVA *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden in diesen Mutanten innerhalb einer Zelle zuweilen Plastiden beobachtet, die in ihrer Größe und ihrem Entwicklungszustand sehr heterogen waren (ALURU UND RODERMEL, 2004).

Vergleichbare Beobachtungen wurden ebenfalls in der *atzr1*-Mutante gemacht (vgl. Kapitel 4.5.2 Abb. 4-23).

Eine veränderte Morphologie der Chloroplasten wirkt sich jedoch nur in seltenen Fällen auf die Form der Blattspreite aus (z.B. in der *scabra3*-Mutante vgl. Abb.2-2). Extreme Verwachsungen der Blätter und Stengel, die in der *atzr1*-Mutante des Öfteren auftraten, wurden bisher nicht im Zusammenhang mit Plastidenmutanten beschrieben.

Zwei *Arabidopsis*-Mutanten, *bdg* (*Bodyguard*) (KURDYUKOV *et al.*, 2006) und *atwbc11* (LUO *et al.*, 2007) zeigen ähnliche Organverwachsungen wie die *atzr1*-Mutante. In beiden Mutanten beruhen die Organfusionen auf einem Defekt in der Biosynthese der Cuticula und den Genprodukten von *BDG* (alpha-beta-Hydrolase) und *AtWBC11* (ABC-Transporter) wird eine Funktion während der Cutin-Synthese bzw. Cutin-Sekretion zugesprochen.

Die Organverwachsungen in der *atzr1*-Mutante können daher ebenfalls als Anzeichen für eine defekte Cuticula gedeutet werden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Toluidinblau verstärkt in *atzr1*-Knockout-Pflanzen eindringt (vgl. Kapitel 4.5.3). Eine direkte Funktion des AtZR1 im Zusammenhang mit der Cuticula-Synthese ist jedoch unwahrscheinlich. Allerdings könnte die Fettsäurebiosynthese, die zur Wachs- und Cutin-Produktion in den Leukoplasten der Epidermis stattfindet (SAMUELS *et al.*, 2008), durch die *atzr1*-Mutation beeinflusst werden.

Die Ergebnisse aus dem Microarray-Experiment stützen diese Annahme, da zahlreiche Transkripte, die für Proteine aus der Fettsäuresaturierung und Wachsbiosynthese kodieren, in der *atzr1*-Mutante herunterreguliert sind (vgl. Kapitel 4.6.2, Abb. 4.28).

Darüber hinaus ist das AtZR1-homologe ETCHED1-Protein aus Mais für die Amyloplastenentwicklung im Mais Korn essentiell. Diese Tatsache belegt, dass ZR1-Proteine nicht ausschließlich für die Funktion der Chloroplasten, sondern auch für die Differenzierung anderer Plastidentypen wichtig sind.

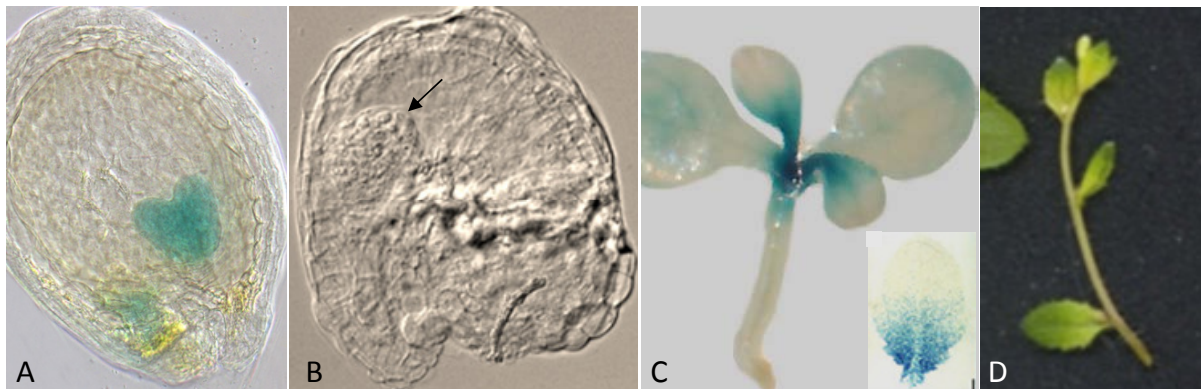
In der bereits erwähnten *scabra3*-Mutante aus *Arabidopsis* wurde hingegen kein Einfluss der Mutation auf die Plastiden in der Epidermis festgestellt (HVICOVA *et al.*, 2006). Auch für die variierte *var2*-Mutante scheint eine Funktion in den Leukoplasten nicht wahrscheinlich, da das *VAR2*-Genprodukt (eine FtsH-Protease) in der Thylakoidmembran lokalisiert ist.

Möglicherweise beruht die starke Ausprägung des *atzr1*-Phänotyps im Vergleich zu anderen Plastidenmutanten also auf dem Einfluss des AtZR1-Proteins auf die Differenzierung/Entwicklung verschiedener Plastidentypen.



Veränderungen in der Form oder Zahl der Organe und die Bildung ektopischer Meristeme können auf einer fehlerhaften Regulation von Faktoren beruhen, die die Aufrechterhaltung von Meristemen steuern. In *Arabidopsis* wurden inzwischen zahlreiche dieser Faktoren identifiziert. Dazu gehören beispielsweise die *Clavata*-Faktoren sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren und Phytohormone, die einer komplexen wechselseitigen Regulation unterliegen.

Aus den durchgeführten Promotor-GUS-Studien wird deutlich, dass die Mutationen in der *atzr1*-Mutante immer dann auftreten, wenn der *AtZR1*-Promotor in der Wildtyppflanze in dem entsprechenden Gewebe eine hohe Aktivität besitzt. Dies ist insbesondere während der Embryogenese, in jungen Keimlingen, jungen Blättern und Blüten der Fall (Kapitel 4.3; Abb.5-4).



**Abb. 5-4: Der *atzr1*-Knockout-Phänotyp korreliert mit der *AtZR1*-Promotoraktivität**

A) *AtZR1*-Promotor:Gus-Aktivität ist während der Samenentwicklung im Embryo und im Chalaza-Endosperm zu erkennen. B) Der *atzr1*-Knockoutsamen ist extrem klein und Testa sowie Embryo (Pfeil) sind deformiert. C) *AtZR1*-Promotoraktivität ist im Apikalmeristem und in den undifferenzierten teilungsaktiven Zellen der Blattbasis besonders stark. Zum Vergleich: GUS-Expression unter der Kontrolle des CyclinB-Promotors (kleines Bild, entnommen aus DONNELLY *et al.*, 1999). D) Spross einer *atzr1*-Knockout-Pflanze: die Stengelblätter sind virescent und zeigen einen deutlichen Farbverlauf von hellgrün (Basis) nach dunkelgrün (Spitze), der dem Entwicklungsgradienten des Blattes folgt.

Interessanterweise korreliert die *AtZR1*-Promotoraktivität außerdem deutlich mit dem von DONNELLY *et al.* (1999) gezeigten Expressionsmuster des CyclinB-Promotors (Abb. 5-4 C;). Die Expression von B-Typ Cyclinen spiegelt die Expression meristematisch aktiver Zellen wieder. Die in weiten Teilen vergleichbaren Expressionsmuster von *AtZR1*-GUS und CyclinB-GUS sprechen dafür, dass ein Verlust der *AtZR1*-Funktion Einfluss auf Meristemidentität bzw. -aktivität nehmen könnte.

Auch die extrem hohe Zahl der Rosettenblätter in der *atzr1*-Mutante, die scheinbar unkontrolliert zu allen Seiten wachsen, so wie die Entstehung ektopischer Meristeme am



Hypocotyl und an Blattstielen deuten auf eine veränderte Meristemaktivität in der *atzr1*-Mutante hin. Darüber hinaus wirkt das Apikalmeristem in den *atzr1*-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp zuweilen deutlich vergrößert (vgl. Kapitel 4.5.1).

Da *AtZR1* ein Plastidenprotein ist, lässt sich ein direkter Einfluss des Proteins auf die Regulation des Apikalmeristems nicht annehmen. Vielmehr kann man spekulieren, dass eine mögliche Veränderung der Meristemidentität in der *atzr1*-Mutante indirekt z.B. durch ein verändertes Hormongleichgewicht innerhalb Pflanze ausgelöst werden könnte.

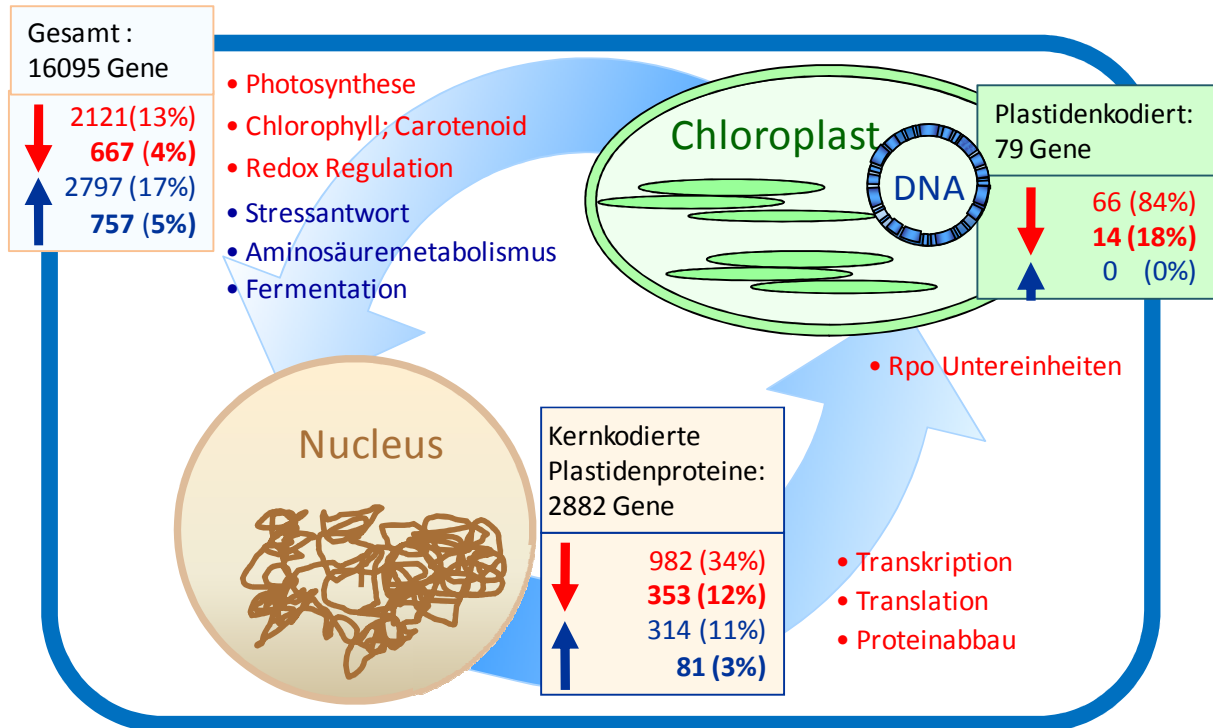
In erster Linie werden im Zusammenhang mit der Ausbildung und dem Erhalt des Apikalmeristems die Phytohormone Cytokinin (als Induktor der Zellteilungsaktivität in der Meristemperipherie) und Auxin (als Regulator zur Bildung der Blattprimordien) genannt (WANG UND LI, 2008). Beide Hormone werden allerdings nicht in den Plastiden synthetisiert.

In den Proplastiden werden Vorstufen des Phytohormons Gibberellin produziert (LANGE, 1998). Wenn sich die *atzr1*-Mutation auf die Integrität der Proplastiden auswirkt, wäre ein Effekt auf die GA-Synthese denkbar. Diesem Phytohormon wird eine Funktion während der Blattexpansion in den Blattprimordien zugesprochen. Für die Meristemerhaltung ist hingegen ein niedriges Verhältnis von GA zu Cytokinin von Nöten und die Synthese von Gibberellin innerhalb des Meristems wird durch die *Knox*-Transkriptionsfaktoren aktiv unterdrückt (JASINSKI *et al.*, 2005). Eine Veränderung (Reduktion) im GA-Haushalt aufgrund einer defekten Plastidenentwicklung würde demnach zwar die kleinwüchsigen Blätter der *atzr1*-Mutante erklären, kann aber nicht direkt für eine erhöhte Meristemaktivität sprechen. Zusammengefasst weisen die bisherigen Daten darauf hin, dass die Funktion des *AtZR1*-Proteins überall dort, wo die Meristem- und Zellteilungsaktivität der Pflanze hoch ist, immer wieder aufs Neue für die Plastidenentwicklung und die Gewebedifferenzierung von großer Wichtigkeit ist. Die Frage ob und wie die *atzr1*-Mutante die Funktion des Apikalmeristems beeinflusst, bleibt jedoch offen. Zur Klärung dieser Frage wären weitere Experimente nötig.

## 5.2 Einflüsse der *atzr1*-Mutation auf die Transkriptregulation

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen zu erlangen, die mit dem pleiotropen *atzr1*-Knockout-Phänotyp einhergehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Microarray-Analysen der *atzr1*-Mutante durchgeführt. Auf molekularer Ebene zeigte sich in der Mutante eine differentielle Expression von 45 % aller exprimierten Gene, die für plastidäre Proteine kodieren (vgl. Kapitel 4.6). Drei Viertel dieser Transkripte waren in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert.

Die Abbildung 4-5 fasst noch einmal die wichtigsten transkriptionellen Veränderungen in der *atzr1*-Mutante zusammen.



**Abb. 5-5: Veränderung der Transkriptexpression in der *atzr1*-Mutante**

Transkripte, die in der *atzr1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert waren, sind rot dargestellt, Transkripte die hochreguliert waren, sind blau dargestellt. Der Anteil der stark regulierten Transkripte (SLR >1; <-1) ist fett dargestellt. Die betroffenen biologischen Prozesse sind in den entsprechenden Farben dargestellt.

In den untersuchten *atzr1*-Mutanten waren zum untersuchten Zeitpunkt (ausdifferenzierte Rosette) wichtige lichtregulierte Biosynthesewege im Chloroplasten (Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese, Chlorophyll- und Carotinoidbiosynthese) auf Transkriptebene herunterreguliert. Außerdem konnten die Proteine PsbE und LHCA2 im Westernblot nur extrem schwach in der *atzr1*-Mutante detektiert werden. LHCA2 ist eine Komponente des Lichtsammelkomplexes von Photosystem I, PsbE ist eine essentielle Untereinheit für die stabile Assemblierung des Photosystems II (ROKKA *et al.*, 2005). Einhergehend mit diesen Ergebnissen zeigten PAM (Puls-Amplituden-Modulation)-Messungen eine Reduktion des Elektronentransports um etwa 50 % an beiden Photosystemen, I und II (J. Melonek, Universität Kiel, mündliche Mitteilung).

Die Reduktion der Pigmentbiosynthese und der Photosynthese korreliert wiederum mit dem blassen Phänotyp und dem heterotrophen Wachstum, besonders in jungen *atzr1*-Mutanten (vgl. Kapitel 4.5.2). Zur Kompensation dieses Zustandes scheinen die fermentative Energiegewinnung und der Aminosäurekatabolismus in der *atzr1*-Mutante erhöht zu sein. Dies kann daraus geschlossen werden, dass Transkripte von Schlüsselproteinen beider Prozesse (z.B. Alkoholdehydrogenase) in der *atzr1*-Mutante verstärkt exprimiert waren (vgl. Kapitel 4.6.2).

Darüber hinaus waren in der Mutante zahlreiche kernkodierte Transkripte, die mit der plastidären Transkription, Translation und dem Proteinabbau in Verbindung gebracht werden und nahezu alle plastidären Transkripte deutlich reduziert.

Weitreichende Veränderungen des Transkriptomoms besonders in Bezug auf kernkodierte plastiden-spezifische Gene, wie sie in der *atzr1*-Mutante zu beobachten waren, werden oft mit retrograder Signaltransduktion zwischen den Chloroplasten und dem Zellkern diskutiert.

RICHLY *et al.* (2003) untersuchten die Regulation des kernkodierten Plastiden-Transkriptomoms unter 35 verschiedenen Bedingungen (Mutanten und Umwelteinflüsse). Sie beobachteten überwiegend zwei Fälle: 1) eine koordinierte Hochregulation sehr vieler Transkripte oder 2) eine generelle Reduktion der Transkripte vieler Plastidengene, aber nur selten eine Mischung aus hoch- und herunterregulierten Transkripten. Daher postulierten sie einen generellen „master switch“ für die Transkriptionsregulation kernkodierter Plastidenproteine, sodass diese unabhängig vom genauen physiologischen Zustand der Plastiden entweder hoch- oder herunterreguliert werden.

Nach diesem Schema lässt sich die *atzr1*-Mutante in die zweite Gruppe einordnen, da der überwiegende Teil der kernkodierten Plastidenproteine auf Transkriptebene reduziert ist.

In verschiedenen Vergleichen mit anderen Microarray-Experimenten zeigte sich, dass die Transkripte plastidärer Proteine in der *atzr1*-Mutante einer ähnlichen Regulation unterlagen, wie in Norflurazon-behandelten *Arabidopsis*-Pflanzen<sup>2</sup>. Norflurazon inhibiert die Phytoen-Desaturase (ein Schlüsselenzym der Carotinoid-Biosynthese vgl. Kapitel 4.6.2 Abb. 4-30) und bewirkt die Photobleichung der Pflanze. Auch die Transkripte in der Albino-Mutante *pds3* (*Phytoenedesaturase 3*; vgl. Kapitel 2.2) sind im Microarray ähnlich wie in der *atzr1*-Mutante reguliert (QIN *et al.*, 2007), während die Transkripte in der Albino-Mutante *ptac3* (TAC-Protein 3; PFALZ *et al.*, 2005) entgegengesetzt reguliert werden (TIAN *et al.*, 2007).

Vier verschiedene retrograde Signalwege aus dem Chloroplasten werden derzeit diskutiert (WOODSON UND CHORY, 2008): 1. ROS (Reaktive Sauerstoff-Spezies)-Signale, 2. Redox-Signale aus der photosynthetischen Elektronentransportkette, 3. Signale aus der Tetrapyrrol-Biosynthese (Mg-Proto) und 4. Signale aus der plastidären Transkription (PGE).

ROS- und Redox-Signale sind in der Regel stress- oder lichtinduziert, während Mg-Proto- und PGE-Signale sowohl stress- als auch entwicklungsabhängig bedingt sein können. Die Mg-Proto- und PGE-vermittelte Signaltransduktion verläuft wahrscheinlich über ähnliche Transduktoren (GUN1 und ABI4) und hemmt in erster Linie die Photosynthesegene.

Es ist schwer abzuschätzen, welcher dieser Signalwege am stärksten zu den Transkriptionsveränderungen in der *atzr1*-Mutante beiträgt. Die vergleichbare Regulation der Plastiden-spezifischen Transkripte zwischen der *atzr1*-Mutante und den Norflurazon-

---

<sup>2</sup> NASCArrays Experiments reference number: NASCARRAYS-51.

behandelten Keimlingen bzw. der *pds3*-Mutante spricht deutlich für den Mg-Proto-Signalweg, während die Tatsache, dass das AtZR1-Protein in die frühe Plastidenentwicklung involviert ist, für eine Aktivierung des PGE-Signalwegs spricht. PGE-Signale spielen hauptsächlich bei der Koordination der Expression während der Plastidendifferenzierung eine Rolle (z.B. in der *albostrians*-Mutante der Gerste).

Einige Transkripte, die in der *at zr1*-Mutante herunterreguliert sind, scheinen nicht unter dem Einfluss des Mg-Proto oder des PGE-Signalwegs zu stehen, da ihre Expression in Norflurazon-behandelten Pflanzen nicht reduziert ist. Dazu gehören einerseits viele Transkripte, die für Redox-Enzyme und Katalasen kodieren (Abb. 5-5), aber auch die Sigma-Faktoren, die NEP, verschiedene Faktoren aus der plastidären Translation, plastidäre Chaperone und plastidäre Proteasen (vgl. Kapitel 4.6.2). Die NEP ist in Norflurazon-behandelten Pflanzen sogar hochreguliert. Dies könnte auf den undifferenzierten Zustand der Plastiden in diesen Pflanzen zurückgeführt werden. In den weißen Blättern der *albostrians*-Mutante in Gerste ist die NEP ebenfalls verstärkt exprimiert (EMANUEL *et al.*, 2004).

Da die differenzielle Regulation dieser Faktoren in der *at zr1*-Knockout nicht dem allgemeinen Mechanismus oder „Master-switch“ unterliegt, sondern eine „*at zr1*-Knockout spezifische“ Regulation zu sein scheint, könnten diese Faktoren in einem direkten Zusammenhang mit der AtZR1-Funktion stehen.

### 5.3 *Etched1* aus Mais und *AtZR1* aus *Arabidopsis* sind orthologe Gene

Auf Grund der Komplexität des *at zr1*-Phänotyps war die phänotypische Komplementation der *at zr1*-Mutation durch die ektopische Expression der *AtZR1*-Gens ein wichtiges Experiment (Kapitel 4.7.5). Nur so konnte einwandfrei bewiesen werden, dass der Phänotyp allein durch den Verlust des AtZR1-Proteins bedingt ist.

Darüber hinaus konnte der *at zr1*-Mutantenphänotyp auch durch die ektopische Expression der *Etched1*-cDNA aus Mais vollständig komplementiert werden (Kapitel 4.7.2). Dieses Experiment hat bewiesen, dass *Etched1* aus Mais und *AtZR1* aus *Arabidopsis* trotz einer Homologie von nur 50 % auf Aminosäureebene die gleiche Funktion *in planta* besitzen.

Die Expression des *Etched1* unter dem nativen *AtZR1*-Promotor führte jedoch lediglich zu einer teilweisen Komplementation, die sehr wahrscheinlich auf die extrem schwache Expression des *Etched1*-Transkripts und nicht auf eine unzureichende Funktionalität des Proteins zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 4.7.2, Abb. 4-37). Die genauen Gründe für die extrem schwache Expression unter dem verwendeten *AtZR1*-Promotor wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Da der identische Promotor ebenfalls für die Promotor:GUS-

Analysen verwendet wurde, ist die prinzipielle Funktionalität des ausgewählten Promotor-Bereichs (1,5 kb stromaufwärts des ATG) experimentell belegt. Studien in *Arabidopsis* zum Einfluss des T-DNA-Integrationsortes auf die Transgenexpression zeigten, dass eventuelles *Silencing* eines Transgens in der Regel nicht mit dem Integrationsort der T-DNA im Zusammenhang steht, sondern in Abhängigkeit des Konstrukts und der Kopienzahl der Integrate (T-DNAs integrieren häufig als Konkatemere) durch das Transgen selbst verursacht wird (SCHUBERT *et al.*, 2004; NAGAYA *et al.*, 2005).

Möglichweise wird die schwache Expression des *Etched1*-Gens unter der Kontrolle des *AtZR1*-Promotors in der Mutante daher durch den *atzr1*-Knockout Hintergrund verursacht. In Northern- und RT-PCR-Analysen der *atzr1*-Mutante wurde kein partielles 5'-*AtZR1*-Transkript detektiert, was die Vermutung zulässt, dass der *AtZR1*-Promotor in der Mutante epigenetisch inaktiviert vorliegen könnte. Möglicherweise wirkt sich dies auch auf den *AtZR1*-Promotor des Transgens aus.

Northern-Experimente mit heterozygoten *pAtZR1:ZmET1/atzr1*-Pflanzen oder *pAtZR1:ZmET1*-Pflanzen mit *AtZR1*-Wildtyp-Hintergrund könnten klären helfen, ob die schwache Expression des *Etched1* durch den *atzr1*-Knockout-Hintergrund bedingt wird.

Insgesamt haben die Komplementationsexperimente eindeutig bewiesen, dass der *atzr1*-Mutantenphänotyp allein durch den Verlust des *AtZR1* verursacht wird und es sich bei *Etched1* aus Mais und *AtZR1* aus *Arabidopsis* um orthologe Gene handelt.

## 5.4 Ein Vergleich von ZR1 und ZR2

Höhere Pflanzen besitzen stets zwei plastidäre ZR-Proteine, die als ZR1 und ZR2 bezeichnet werden. Sehr wahrscheinlich entwickelten sie sich durch Duplikation des HEP2-ähnlichen ZR-Proteins einzelliger Grünalgen parallel zur Entstehung der Streptophytina (mehrzellige Grünalgen und Pflanzen) oder der Embryophyta (Landpflanzen) (Kapitel 4.1).

Auf Aminosäureebene zeigen die reifen, prozessierten ZR1- und ZR2-Proteine jedoch nur etwa 30 % Homologie zueinander. Besonders das Vorkommen einer zusätzlichen N-terminalen Domäne in den ZR2-Proteinen (Kapitel 4.1, Abb. 4.1) spricht für eine funktionelle Differenzierung/Spezialisierung zwischen der ZR1- und der ZR2-Familie in höheren Pflanzen. Einhergehend mit dieser Theorie wiesen ETCHED1/ZR1-Proteine und ZR2-Proteine nach Fusion mit GFP bzw. DsRED ein unterschiedliches Verteilungsmuster innerhalb der Plastiden von Tabak- und Zwiebelzellen auf (Kapitel 4.2). Während die ZR2-Fusionsproteine in distinkten *Spots* akkumulierten, war die ZR1-Reporter-Fluoreszenz breiter über das Plastidenstroma verteilt und akkumulierte nur schwach. Ob die zusätzliche Domäne des ZR2-Proteins die unterschiedliche Lokalisation von ZR1 und ZR2 bedingt, wurde im Rahmen einer

Diplomarbeit von T. Meineke (Universität Hamburg, 2008) näher untersucht. GFP-Lokalisationsstudien in Zwiebel-Leukoplasten mit chimären Konstrukten der AtZR1- und AtZR2-Domänen führten jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Die spezifische Aktivität der *AtZR1*- und *AtZR2*-Promotoren, die mittels Promotor:GUS-Studien in *Arabidopsis thaliana* untersucht wurde, weist außerdem darauf hin, dass ZR1 und ZR2 entwicklungsabhängig und weitestgehend unabhängig voneinander agieren (Kapitel 4.3). Während der *AtZR1*-Promotor besonders in jungen, teilungsaktiven Geweben aktiv ist, ist der *AtZR2*-Promotor entgegengesetzt aktiv und besitzt seine stärkste Expression in ausdifferenzierten grünen Geweben.

In jungen *AtZR2*-Promotor:GUS-Keimlingen ließ sich erst etwa zwei Tage nach der Quellung eine deutliche *AtZR2*-Promotoraktivität nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen *Arabidopsis*-Keimlinge deutlich zu ergrünen. In Spinatkeimlingen wird die Transkription kern- und plastomkodierter Photosynthesegene ebenfalls ca. zwei Tage nach der Quellung induziert (HARRAK *et al.*, 1995).

Da ZR2-Proteine plastidenlokalisiert sind, spricht das Ergebnis der *AtZR2*-Promotorstudie für eine Funktion der ZR2-Proteine in ausdifferenzierten, photosynthetisch aktiven Chloroplasten.

Die Ergebnisse der *AtZR2*-Promotor:GUS-Analysen können zusätzlich durch in *silico* Northern (efp-Browser, Genevestigator)<sup>3</sup> des *AtZR2*-Transkripts gestützt werden (vgl. Abb. 4-60 B). Für das *AtZR1* existieren vergleichbare Daten leider nicht, da das *AtZR1*-Gen nicht auf dem Affymetrix Microarray vertreten ist.

Aus dem Muster der *AtZR1*-Promotoraktivität lässt sich jedoch schlussfolgern, dass ZR1-Proteine eher an der frühen Plastidenentwicklung und/oder Plastidendifferenzierung beteiligt sind.

Diese Vermutung wird auch durch Expressionsdaten aus Primärblättern der Gerste gestützt, die einen natürlichen Entwicklungsgradienten der Plastiden zwischen Blattbasis und -spitze aufweisen. MÜLLER (2004) zeigte, dass das *HvZR1*-Transkript sehr stark in den meristematischen Zellen der Blattbasis, aber nur schwach in den ausdifferenzierten Zellen der Blattspitze exprimiert ist. Außerdem wurde die *HvZr1*-Expression in der *albostrians*-Mutante untersucht. Trotz eines einheitlichen Genotyps weisen die Blätter dieser Mutante verschieden starke Phänotypen auf: etwa 10 % der Blätter sind komplett weiß, 10 % sind komplett grün und 80 % der Blätter sind grün-weiß gestreift (EMANUEL *et al.*, 2004). Weiße Blätter enthalten unterentwickelte Plastiden, die ribosomendefizient und photosynthetisch inaktiv sind (HESS *et al.*, 1994). MÜLLER (2004) konnte zeigen, dass das *HvZR1*-Transkript in Albino-Blättern der *albostrians*-Mutante deutlich stärker exprimiert wird als in grün-weißen

---

<sup>3</sup> Diese Datenbanken umfassen *Arabidopsis*-Expressions-Daten aus insgesamt über 3000 veröffentlichten Affymetrix-Microarray-Experimenten.

oder grünen Blättern, während die Transkriptmengen von Kerngenen, die für Photosynthese-spezifische Proteine kodieren, in den weißen Blättern der *albostrians*-Mutante infolge retrograder Plastidensignale deutlich reduziert sind (HESS *et al.*, 1994). Interessanterweise zeigte das Transkript der kernkodierten Plastidenpolymerase NEP (*rpoTp*) in grünen und weißen Blättern der *albostrians*-Mutante ein Expressionsmuster, das dem des *HvZR1* sehr ähnlich ist. EMANUEL *et al.* (2004) interpretieren die verstärkte Expression des *rpoTp*-Transkripts in der Mutante als Konsequenz eines retrograden Plastidensignals, das durch eine gestörte Plastidenentwicklung ausgelöst wird und eine verstärkte (bzw. länger anhaltende) Transkription der kernkodierten Gene bewirkt, die an der Plastidendifferenzierung beteiligt sind.

Entwicklungsabhängige Plastidensignale wurden in der Literatur mehrfach beschrieben (GRAY *et al.*, 2003, PESARESI *et al.*, 2001). Möglicherweise regulieren diese Signale auch die Expression des ZR1.

Die Annahme, dass das ZR1-Protein an der frühen Plastidendifferenzierung beteiligt ist, korreliert sehr gut mit dem ZR1-Phänotyp der *et1*-Mutante aus Mais (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004) und der *atzr1*-Mutante aus *Arabidopsis* (Kapitel 4.5). In beiden Mutationen wirkt sich der Verlust des ZR1 (bzw. ETCHED1) deutlich auf die Plastidendifferenzierung in Blättern junger Keimlinge aus (vgl. Kapitel 4.5.2, Abb. 4-23 und Kapitel 5.1).

Im Gegensatz zum starken *atzr1*-Mutantenphänotyp wirkt sich der Knockout des *AtZR2* in *Arabidopsis* hingegen kaum auf die Entwicklung der Pflanze aus (Kapitel 4.4.2). In homozygoten *atzr2*-Knockout-Pflanzen wurde lediglich eine minimale Verzögerung des Blattwachstums sowie eine verzögerte Ergrünung bei etioliert angezogenen und ins Licht transferierten Keimlingen beobachtet.

Der Mutantenphänotyp junger *et1*-R-Sämlinge ist in den ersten zwei Wochen nach Keimung deutlich ausgeprägt, wird dann jedoch nahezu vollständig kompensiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). Auch der *atzr1*-Knockout-Phänotyp ist in jungen *Arabidopsis*-Pflänzchen stärker ausgeprägt als in älteren. Im Gegensatz zur *etched1*-Mutation bleibt die *atzr1*-Mutation jedoch die gesamte Pflanzenentwicklung hindurch phänotypisch sichtbar. Die (teilweise) Kompensation der ZR1-Funktion in älteren Geweben/Chloroplasten, könnte auf einen Faktor schließen lassen, der das ZR1 in seiner Funktion zu diesem Zeitpunkt komplementieren kann. Auf Grund der gegensätzlichen Expressionsmuster von *ZR1* und *ZR2* wurde daher zunächst angenommen, dass das ZR2-Protein die Funktion des ZR1 in älteren Geweben übernehmen könnte.

Ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen ZR1 und ZR2 besteht, wurde zunächst durch Northernanalysen von *Arabidopsis* Wildtyp- und Knockout-Pflanzen untersucht (Kapitel 4.4.4). Es konnte aber weder ein Anstieg des *AtZR1*-Transkripts in der *atzr2*-Mutante noch ein Anstieg des *AtZR2*-Transkripts in der *atzr1*-Mutante beobachtet werden. Das *AtZR2*-

Transkript schien in Stengel- und Rosettenblättern der untersuchten *atzr1*-Mutante sogar schwächer als in Wildtyp-Blättern exprimiert zu sein. In den Microarray-Analysen der *atzr1*-Mutante zählte das *AtZR2*-Transkript hingegen zu den Genen, die im Vergleich zum Wildtyp keine Expressionsänderung aufwiesen. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die Gewebe, die für das Microarray-Experiment eingesetzt wurden, nicht dem Entwicklungsstadien der im Northern untersuchten Gewebe entsprachen.

Die Beobachtung, dass weder das *AtZR1*- noch das *AtZR2*-Transkript in der Knockout-Mutante des jeweils anderen ZR-Gens hochreguliert wird, kann als Indiz gedeutet werden, dass beide Gene unabhängig voneinander reguliert werden und sich vermutlich nicht funktionell komplementieren können. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass *AtZR1* und *AtZR2* nur zu bestimmten Phasen der Pflanzenentwicklung eine biologische Funktion erfüllen. Diese Annahme deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Promotor-GUS Analysen (vgl. hierzu auch Kapitel 5.1.)

Experimente zur Komplementation des *atzr1*-Mutantenphänotyps (Kapitel 4.7) unterstützen diese Hypothese ebenfalls: der *atzr1*-Mutantenphänotyp ließ sich sowohl durch ektopische *AtZR1*-Expression als auch durch ektopische Expression des *Etched1*-Gens aus Mais vollständig komplementieren. Eine Komplementation des *atzr1*-Mutantenphänotyps durch die Überexpression des *AtZR2* ließ sich hingegen nicht beobachten.

Durch Kreuzungsexperimente wird derzeit untersucht, wie sich ein *atzr1/atzr2*-Doppelknockout in *Arabidopsis* auf den Phänotyp der Pflanze auswirkt. Eine homozygote *atzr2*-Knockout-Pflanze mit einem heterozygoten *atzr1*-Genotyp wurde bereits identifiziert und ist phänotypisch unauffällig. Mikroskopische Analysen der unreifen Samen dieser Pflanze ergaben einen segregierenden Mutanten-Phänotyp der Embryonen im Verhältnis 3:1, der dem Embryophänotyp der *atzr1*-Mutante gleicht. Diese Beobachtung spricht zunächst dafür, dass ein Doppelknockout von *AtZR1* und *AtZR2* nicht letal ist. Die Analyse möglicher *atzr1/atzr2*-Doppelknockout-Pflanzen steht jedoch noch aus. Da der *atzr1*-Phänotyp allein bereits sehr stark, zuweilen jedoch auch variabel ist (vgl. Kapitel 4.5), lässt sich schwer abschätzen, ob ein Einfluss des *AtZR2*-Knockout in einer homozygoten *atzr1*-Mutante phänotypisch erkennbar sein wird.

Insgesamt sprechen alle im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse dafür, dass die *Zinc Ribbon*-Proteine ZR1 und ZR2 zwar strukturell eine Familie bilden, sich in ihrer biologischen Funktion jedoch voneinander unterscheiden und nicht redundant sind.

Dies ist auch unter dem Aspekt phylogenetischen Entstehung der ZR-Familie bemerkenswert, da einzellige Grünalgen nur ein einziges plastidäres ZR-Protein besitzen (vgl. Kapitel 4.1). Möglicherweise stellt daher die Evolution der ZR1 und ZR2-Familien eine spezifische Anpassung an die zunehmende Komplexität der Pflanzen- und Plastidenmorphogenese dar.



## 5.5 Das ZR3-Protein

Während höhere Pflanzen im Zuge der Evolution zwei plastidäre ZR-Proteine entwickelt haben, besitzen sie mit dem ZR3 nur ein einziges ZR-Protein mit Vorhersage zur Lokalisation in den Mitochondrien.

In dieser Arbeit wurde neben den Plastidenproteinen ZR1 und ZR2 daher auch das mitochondriale ZR3-Protein näher charakterisiert. Wie zu erwarten, waren sowohl AtZR3 aus *Arabidopsis* als auch ZmZR3 aus Mais als Fusion mit GFP bzw. DsRED in den Mitochondrien lokalisiert (Kapitel 4.2).

In den Promotorstudien war die Aktivität des AtZR3-Promotors im Vergleich zu den AtZR1- und AtZR2-Promotoren unspezifischer und wurde sowohl in jungen als auch in älteren Geweben detektiert (Kapitel 4.2). Dennoch beschränkte sich die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität unter der Kontrolle des AtZR3-Promotors stets auf die meisten oberirdischen Organe, wie Blätter und Blüten. In Wurzeln und auch im Hypocotyl der AtZR3-Promotor:GUS-Pflanzen konnte keine GUS-Aktivität detektiert werden. Das ZR3-Protein scheint demnach keine konstitutive Funktion in den Mitochondrien auszuüben.

Da das ZR3 scheinbar als einziges der ZR-Proteine in den Mitochondrien lokalisiert ist, erstaunte es umso mehr, dass der Knockout des AtZR3 in *Arabidopsis* in keinem sichtbaren Mutanten-Phänotyp resultierte (Kapitel 4.4). Eine Null-Mutante des ZR3-homologen HEP1-Proteins in der Hefe ist hingegen letal (SANJUAN SZKLARZ *et al.*, 2005).

Eine mögliche Theorie wäre, dass das ZR2-Protein nicht, wie zunächst angenommen, ausschließlich in den Plastiden lokalisiert ist, sondern *Dual targeting*-Charakter besitzt und sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten lokalisiert ist. Schließlich war die subzelluläre Lokalisation des ZmZR2 in den Tabakblättern nicht immer eindeutig (vgl. Kapitel 4.3, Abb. 4-9). In *Arabidopsis* und anderen Pflanzen ist bereits für zahlreiche Proteine eine duale Lokalisation in den Chloroplasten und Mitochondrien beschrieben worden, z.B. für eine tRNA-Synthase (ROKOV-PLAVEC *et al.*, 2008), eine DNA-Gyrase (WALL *et al.*, 2004) und eine RNA-Polymerase (HEDTKE *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen ZR2 und ZR3 besteht, wurden Kreuzungen zwischen der *atrz2*- und der *atrz3*-Knockout-Mutante begonnen, um so eine homozygote *atrz2/atrz3*-Doppelknockout-Mutante zu generieren. Inzwischen wurden zwei homozygote *atrz3*-Knockout-Pflanzen identifiziert, die heterozygot für das *atrz2*-Knockout-Allel sind.

Ein Viertel der Nachkommen aus diesen Pflanzen sollte einen homozygoten *atrz2/atrz3*-Doppelknockout-Genotyp besitzen. Mikroskopische Analysen unreifer Samen ergaben bisher allerdings keinen auffälligen Phänotyp und es konnten keine abgestorbenen Samen beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass sich auch ein *atrz2/atrz3*-Doppelknockout

zumindest während der Embryo-Entwicklung von *Arabidopsis* nicht letal auswirkt. Die Analyse der potentiellen *atzr2/atzr3*-Doppelknockout-Pflanzen steht jedoch noch aus.

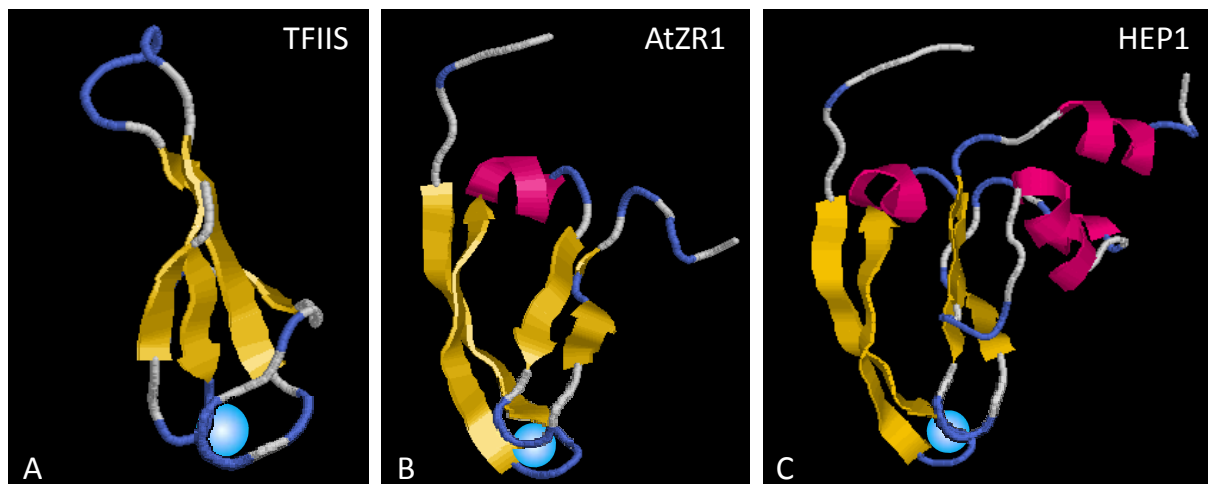
Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass die ZR-Familie in höheren Pflanzen zwar sehr konserviert ist, dass sich die einzelnen Mitglieder jedoch in ihrer Lokalisation, Expression und in ihrem Knockout-Phänotyp zuweilen deutlich voneinander unterscheiden. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass die ZR-Proteine jeweils spezielle Funktionen innerhalb der Pflanze ausüben und somit nicht redundant sind. Dennoch wurde bisher nur nach Verlust des *Etched1/ZR1* in Mais oder *Arabidopsis* ein deutlicher Mutanten-Phänotyp beobachtet.

## 5.6 Eine TFIIS-ähnliche Funktion von ETCHED1 während der plastidären Transkription ist unwahrscheinlich

Das ETCHED1-Protein aus Mais wurde als funktionelle Komponente im plastidären TAC identifiziert (MÜLLER, 2004) und zeigt strukturelle Ähnlichkeit zum TFIIS im Zellkern (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). Demnach erschien es plausibel, dass ETCHED1 direkt mit einer der beiden plastidären RNA-Polymerasen interagiert. Da das *Etched1*-homologe *AtZR1*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* besonders stark in jungen, teilungsaktiven Geweben, aber weniger stark in differenzierten Geweben mit hoher Photosyntheseaktivität (Kapitel 4.3) exprimiert wird, schien eine Interaktion mit der kernkodierten NEP, welche besonders während der frühen Plastidenentwicklung aktiv ist, am wahrscheinlichsten. Daher sollte eine physikalische Interaktion zwischen dem ETCHED1-Protein und NEP (*rpoTP*) aus Mais im Hefe-2-Hybridsystem untersucht werden. Die Polymerase wurde in der Hefe jedoch nicht adäquat exprimiert, sodass das Interaktionsexperiment letztlich nicht durchführbar war (Kapitel 4.8). Da es sich bei der plastomkodierte PEP um ein multimeres Enzym handelt, schienen Interaktionsstudien im Hefe-2-Hybridsystem wenig sinnvoll. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen ETCHED1 und den plastidären RNA-Polymerasen geliefert werden. Darüber hinaus lieferten Run-on-Transkriptionsanalysen von *Arabidopsis* Wildtyp- und *atzr1*-Chloroplasten keine Unterschiede im Transkriptionsmuster (J. Melonek, Universität Kiel, mündliche Mitteilung). Bei einer direkten Interaktion von *AtZR1* mit der NEP oder der PEP hätte man erwartet, dass NEP- bzw. PEP-spezifische Transkripte in der Mutante schwächer exprimiert würden.

Im vergangenen Jahr wurde die 3D-Struktur der *Zinc Ribbon*-Domäne des ZR3-homologen HEP1-Proteins aus Hefe aufgeklärt (MOMOSE *et al.*, 2007). Ein Vergleich zwischen der *Zinc Ribbon*-Domäne von HEP1 und TFIIS legt deutliche strukturelle Unterschiede offen (Abb.

5-6). Die räumliche Struktur des HEP1-Proteins entspricht in etwa einem „L“ und nicht wie TFIIIS einem schlanken Finger. Anstelle der sauren Haarnadelschleife, welche das katalytische Zentrum von TFIIIS bildet (KETTENBERGER *et al.*, 2004), enthalten die *Zinc Ribbon*-Domänen von HEP1 und dem AtZR1-Modell eine  $\alpha$ -Helix, die am breiten Ende des Moleküls liegt.



**Abb. 5-6: Vergleich der *Zinc Ribbon*-Domäne zwischen TFIIIS und den ZR-Proteinen**

A) *Zinc Ribbon*-Domäne von TFIIIS (1TFi). B) Basierend auf der HEP1-Struktur wurde mit Hilfe von *Swiss model* (ARNOLD *et al.*, 2006) ein neues Modell der AtZR1 *Zinc Ribbon*-Domäne erstellt. C) *Zinc Ribbon*-Domäne von HEP1 (2E2Z). Die Darstellung der Struktur erfolgte mit RasMol Vers.2.7.4.2, die komplexierten Zinkatome sind als blaue Kugeln dargestellt und wurden nachträglich eingefügt.

Die Strukturaufklärung der *Zinc Ribbon*-Domäne des HEP1-Proteins aus Hefe widerlegt die bisher angenommene strukturelle Verwandtschaft zwischen ETCHED1 und der *Zinc Ribbon*-Domäne des TFIIIS. Somit ist eine Funktion des ETCHED1-Proteins als TFIIIS-ähnlicher Transkriptionselongationsfaktor der plastidären RNA-Polymerase (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004) nahezu ausgeschlossen.

Dennoch wurde das ETCHED1-Protein immunologisch ausschließlich in der plastidären TAC-Fraktion gefunden. Außerdem resultierte der Verlust des ETCHED1-Proteins in der Mais-Linie *et1-R* in einer reduzierten Transkriptions- und Exonukleaseaktivität der isolierten TAC-Fraktion (DA COSTA E SILVA ET AL. 2004). Der Verlust des ETCHED1-orthologen AtZR1-Proteins in *Arabidopsis* wirkte sich negativ auf die Expression zahlreicher Gene aus, welche die Transkription in den Chloroplasten regulieren (Kapitel 4.6.2). Aufgrund dieser Ergebnisse ist daher zumindest von ein indirekter regulativer Einfluss der ETCHED1/ZR1-Proteine auf die plastidäre Transkription anzunehmen.

## 5.7 Das AtZR1-Protein interagiert *in vitro* mit plastidären HSP70-Chaperonen

Diese Arbeit wurde unter der Annahme begonnen, dass das ETCHED1-Protein aus Mais und dazu homologe Proteine eine TFIIIS-ähnliche Funktion während der plastidären Transkription erfüllen. Die Aufklärung der *Zinc Ribbon*-Domäne des ZR3-homologen HEP1-Proteins aus Hefe spricht jedoch klar gegen diese Theorie. Für das HEP1-Protein aus der Hefe wurde hingegen eine Interaktion mit dem mitochondrialen HSP70-Chaperon gezeigt (MOMOSE, 2007, SICHTING, 2005). Auch das Chloroplasten-lokalisierte HEP2 aus *Chlamydomonas* interagiert mit HSP70 (WILLMUND *et al.*, 2008).

Während einzellige Algen nur ein einziges plastidäres HSP70-Protein enthalten, besitzen höhere Pflanzen immer zwei plastidäre HSP70-Proteine. In dieser Arbeit konnte anhand von *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass rekombinantes AtZR1-Protein mit den beiden plastidären HSP70-Chaperonen aus *Arabidopsis* interagiert (Kapitel 4.9.2). Die Bindung von HSP70 an AtZR1 ist somit der erste Beleg für eine physikalische Interaktion zwischen einem ZR-Protein und HSP70-Chaperonen in höheren Pflanzen.

HSP70-Proteine bestehen im Wesentlichen aus zwei konservierten Domänen: einer etwa 45 kDa schweren N-terminalen ATPase-Domäne und einer 25k Da schweren Peptidbinde-Domäne. Eine kleine C-terminale Domäne der HSP70-Chaperone ist hingegen höchst variabel. Ihre Funktion wurde bisher jedoch nicht aufgeklärt.

Detaillierte Analysen der mitochondrialen HEP1-Proteine aus Hefe und Mensch führten zu dem Ergebnis, dass die Interaktion zwischen HEP1 und HSP70 durch die ATPase-Domäne des Chaperons vermittelt wird (SICHTING *et al.*, 2005; ZHAI *et al.*, 2008).

Daher ist anzunehmen, dass auch AtZR1 an die ATPase-Domäne der plastidären HSP70-Proteine aus *Arabidopsis* bindet. Da die Primärsequenz der ATPase-Domäne zwischen HSP70-1 und HSP70-2 zu 95 % identisch ist, überrascht es nicht, dass AtZR1 *in vitro* mit beiden HSP70-Chaperonen interagieren konnte (Kapitel 4.9.2).

Da höhere Pflanzen im Gegensatz zu den Algen nicht nur zwei plastidäre HSP70-Chaperone, sondern auch zwei plastidäre ZR-Proteine besitzen, sollte auch die Interaktion zwischen dem AtZR2 und den HSP70-Proteinen untersucht werden. Das Protein ließ sich jedoch nicht in seiner löslichen Form in *E.coli* exprimieren (Kapitel 4.9.1).

Das HEP1-Protein der Hefe erhöht die Löslichkeit des menschlichen HSP70-Chaperons in *E.coli* (ZHAI *et al.*, 2008). Auf Grund dieses Befundes wurde in der vorliegenden Arbeit AtZR2-Protein mit dem HSP70B-Chaperon aus *Chlamydomonas* in *E.coli* co-exprimiert. Dabei konnte aber ebenfalls kein lösliches AtZR2-Protein aus *E.coli* gewonnen werden.

Dies könnte einerseits bedeuten, dass ZR-Proteine zwar die Löslichkeit der HSP70-Proteine beeinflussen, diese aber im Gegenzug keinen Einfluss auf die Löslichkeit der ZR-Proteine nehmen (obwohl darin eigentlich die Funktion eines Chaperons besteht). Andererseits

könnte es bedeuten, dass das pflanzliche AtZR2 *in vitro* nicht mit dem HSP70 der Alge interagieren kann. Trotz einer hohen Konservierung der HSP70-Proteinfamilie auf Aminosäureebene bestehen durchaus gewisse strukturelle Unterschiede in der dreidimensionalen Konformation der Chaperone verschiedener Spezies (MORO *et al.*, 2005).

#### 5.7.1.1 Die plastidären HSP70-Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Obwohl HSP70-Proteine wichtige Faktoren für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion darstellen, spielten die plastidären HSP70-Proteine in den letzten Jahren auf dem Sektor der Pflanzenforschung nur eine untergeordnete Rolle. Lediglich das plastidäre HSP70B-Protein in *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eingehend charakterisiert (LIU *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2005; SCHRODA, 2004; SCHRODA *et al.*, 2001; SCHRODA *et al.*, 1999). Doch die genaue Funktion des Chaperons bleibt bis heute ungeklärt.

Um Einblicke in eine mögliche Funktion der plastidären HSP70-Proteine in *Arabidopsis thaliana* zu erlangen und um einen möglichen Zusammenhang zwischen der HSP70-Funktion und der Funktion der ZR-Proteine (insbesondere des ZR1-Proteins) *in planta* herstellen zu können, wurde die beiden HSP70-Chaperone näher charakterisiert (vgl. Kapitel 4-9).

Obwohl die beiden Proteine HSP70-1 und HSP70-2 eine Homologie von 90 % zueinander aufweisen, wurden durchaus Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation innerhalb der Plastiden und in ihrer entwicklungspezifischen Expression gefunden:

Wie *in silico* Northern zeigten, wird das *Hsp70-1* Transkript besonders stark während der Keimung sowie in Keimlingen exprimiert und nimmt im weiteren Verlauf der Entwicklung stetig ab, während das *Hsp70-2*-Transkript im Verlauf der Entwicklung zunimmt.

Innerhalb der Plastiden war das HSP70-1 Protein als Fusion mit GFP über das gesamte Stroma verteilt, während das HSP70-2-Fusionsprotein in distinkten *spots* akkumulierte. In Co-Expressionsstudien co-lokalisierte das HSP70-2-Fusionsprotein innerhalb des Chloroplasten sowohl mit dem DNA-bindenden PEND::GFP als auch mit dem ZmZR2::GFP (vgl. Abb. 4-58, 4-59), während das HSP70-1::GFP eine deutliche Co-Lokalisation mit dem ZmET1::DsRED-Protein zeigte.

Anhand der Lokalisations- und Expressionsdaten könnte spekuliert werden, dass HSP70-1 *in planta* vornehmlich in jungen Geweben mit dem ZR1 interagiert, während das HSP70-2 *in planta* eine Interaktion mit dem ZR2-Protein eingeht.

Eine Analyse von HSP70-T-DNA-Knockout-Linien stellt diese Vermutung allerdings in Frage, da homozygote *hsp70-1*-Knockout-Pflanzen im Vergleich zur *atzr1*-Mutante nur einen schwachen Mutantenphänotyp zeigen, während die homozygoten *hsp70-2*-Knockout-Pflanzen phänotypisch unauffällig sind. Unter der Annahme, dass ZR-Proteine generell Co-Faktoren der HSP70-Proteine darstellen (WILLMUND *et al.*, 2008, SICHTING *et al.*, 2005), würde

man erwarten, dass ein HSP70-Knockout in einem mindestens so starken Phänotyp resultiert, wie der Verlust des *AtZR1*.

Aufgrund der *hsp70*-Knockout-Pflanzen lassen sich zwei Dinge schlussfolgern: HSP70-1 und HSP70-2 sind trotz ihrer unterschiedlichen subplastidären Lokalisation und ihrer unterschiedlichen entwicklungspezifischen Expressionsmuster zumindest teilweise in ihrer Funktion redundant. Agiert *AtZR1* als Co-Faktor von HSP70-Proteinen, dann geht es sowohl mit HSP70-1 als auch mit HSP70-2 eine Interaktion ein.

Diese Schlussfolgerungen wurden durch Kreuzungsexperimente zwischen der *hsp70-1*- und der *hsp70-2*-Mutante bekräftigt, da einige der Nachkommen heterozygoter *hsp70-1/hsp70-2*-Pflanzen einen stärkeren Phänotyp als die homozygoten *hsp70-1*-Mutanten zeigten. Dies kann als Beleg der teilweisen funktionellen Redundanz von *Hsp70-1* und *Hsp70-2* gelten.

Einige der Nachkommen zeigten einen Phänotyp mit deutlichen Parallelen zum *atZR1*-Mutantenphänotyp. Eine genotypische Analyse dieser Pflanzen sowie eine umfassende Charakterisierung stehen jedoch noch aus.

Nachdem bereits eine *in vitro*-Interaktion zwischen *AtZR1* und den beiden plastidären HSP70-Proteinen gezeigt werden konnte, spricht nun auch die Analyse der *hsp70*-Knockout-Mutanten für einen funktionellen Zusammenhang zwischen *AtZR1* und beiden plastidären HSP70-Proteinen *in planta*.

Welche Funktion *AtZR1* im Komplex mit den beiden HSP70-Charonen allerdings genau übernimmt und welche Rolle dem *AtZR2* zugeordnet werden kann, ist noch unklar.

## 5.8 Co-lokalisieren ZR-Proteine mit den Nukleoiden?

In Anbetracht der Tatsache, dass das native ETCHED1-Protein aus Mais bisher ausschließlich in der plastidären TAC-Fraktion nachweisbar war (DA COSTA E SILVA, 2004), wurde mittels GFP- und DsRED-Reportergen-Konstrukten untersucht, ob die ZR1 (bzw. ETCHED1)- und ZR2-Proteine mit der plastidären DNA co-lokalisieren. Als Marker für die plastidären Nukleoide dienten das plastidäre DNA-Bindeprotein PEND und die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP (*rpoA*), jeweils als Fusion mit GFP und/oder DsRED. Eine Co-Lokalisation des plastidären HSP70-2-Proteins mit dem DNA-Marker PEND wurde ebenfalls untersucht (vgl. Kapitel 4.2, 4-9.3).

Co-Expressions-Analysen in Zwiebel-Leukoplasten und Tabak zeigten zwar teilweise eine Co-Lokalisation zwischen dem ETCHED1 und dem ZR2 mit dem PEND-Protein, darüber hinaus akkumulierten die beiden ZR-Proteine jedoch auch in anderen Bereichen der Plastiden. ETCHED1 und *rpoA* zeigten hingegen eine deutlichere Co-Lokalisation (vgl. Abb. 4-8). DAPI-Färbungen an isolierten Chloroplasten einer *AtZR1::GFP*-exprimierenden Mais-Pflanze zeigten ebenfalls, dass das ZR1-Protein bevorzugt im Bereich der angefärbten DNA akkumulierte, darüber hinaus aber auch im restlichen Stroma detektierbar war (eigene Daten und R. Lorbiecke, Universität Hamburg, mündliche Mitteilung).

Überraschenderweise zeigte das plastidäre HSP70-2-Protein die deutlichste Co-Lokalisation mit der durch das PEND-Protein markierten Nukleoid-DNA und zwar sowohl in Leukoplasten der Zwiebel als auch in Chloroplasten aus Tabak (vgl. Kapitel 9.3, Abb. 4-59).

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde mindestens eines der plastidären HSP70-Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse in der aufgereinigten TAC-Fraktion aus Spinat-Chloroplasten identifiziert (J. Melonek, Universität Kiel, mündliche Mitteilung).

Sind HSP70 und ZR1/ZR2 tatsächlich mit der plastidären DNA assoziiert und erfüllen sie eine gemeinsame Funktion in der plastidären TAC?

Über diese Frage lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Immerhin wurden sowohl HSP70 als auch das ETCHED1-Protein aus Mais im plastidären TAC identifiziert. Da HSP70-Chaperone an der Assemblierung und Disassemblierung von Multienzym-Komplexen beteiligt sind (MORANO, 2007), wäre es durchaus vorstellbar, dass HSP70 gemeinsam mit ETCHED1/ZR1 am Auf- und Abbau von Proteinkomplexen im TAC beteiligt ist. Das mitochondriale HSP70-Protein Ecm10p aus Hefe wurde ebenfalls in den Nukleoiden (der Mitochondrien) gefunden und die Überexpression des Proteins resultierte in Aggregaten der mitochondrialen DNA (SAKASEGAWA *et al.*, 2003).

In der TAC-Fraktion von *Arabidopsis thaliana* wurden unter anderem verschiedene ribosomale Proteine identifiziert (PFALZ *et al.*, 2006). Es wäre daher auch denkbar, dass HSP70 und ETCHED1/ZR1 an der Faltung *de novo* synthetisierter plastidärer Proteine beteiligt sind. Ein Großteil der plastomkodierte Proteine sind Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette und somit über hydrophobe Transmembrandomänen in der Thylakoidmembran verankert. HSP70-Chaperone sind insbesondere für die Erkennung und die korrekte Faltung dieser hydrophoben Proteinbereiche notwendig (MORANO, 2007).

Es wäre auch denkbar, dass die ZR-Proteine im Komplex mit HSP70 am Transport plastomkodierter Proteine zur Thylakoidmembran und der Assemblierung der Photosystem-Komplexe beteiligt sind.

## 5.9 Sind ZR-Proteine an der Photosystem-Assemblierung beteiligt?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefe-2-Hybrid-Experimente zur Identifikation von ETCHED1-Interaktionspartnern durchgeführt (vgl. Kapitel 4.8). In diesem Zusammenhang wurden 16 plastidäre Proteine als potentielle ETCHED1-Interaktoren identifiziert sowie zwei cytosolische Proteine, für die ein Homolog in den Plastiden existiert.

Unter anderem wurde ein plastidäres DNAJ/HSP40-Protein mit unbekannter Funktion identifiziert. HSP40-Proteine dienen als Co-Chaperone von HSP70 und regulieren die Substratspezifität und ATPase-Aktivität des Proteins (vgl. Einleitung 2.7).

Darüber hinaus wurden acht Proteine aus der photosynthetischen Elektronentransportkette identifiziert, von denen fünf im Photosystem I lokalisiert sind und räumlich auf der Stromaseite beieinander liegen (vgl. Kapitel 4.8.7, Abb. 4-54). Ein weiterer identifizierter ETCHED1-Interaktionspartner, das PGRL1, zeigte auch nach transienter Expression in Zwiebelzellen Co-Lokalisation mit dem ETCHED1-Protein und ist sehr wahrscheinlich an der Regulation des zyklischen Elektronentransports beteiligt (DALCORSO *et al.*, 2008).

Eine weitere Komponente auf der Stromaseite des Photosystems I, die Ferredoxin:NADP(H)-Oxidoreduktase (At5g66190), wurde kürzlich in einem Hefe-2-Hybrid-Screen mit dem ETCHED1-homologen AtZR1-Protein identifiziert (Marlen Helbig, Universität Hamburg, mündliche Mitteilung). Diese Daten werden derzeit verifiziert. Die Ferredoxin:NADP(H)-Oxidoreduktase wurde ebenfalls als Substrat von plastidären HSP70-Proteinen identifiziert (TSUGEKI UND NISHIMURA, 1993).

Aufgrund der Interaktion von ETCHED1 mit verschiedenen Proteinen des Photosystems I ist es denkbar, dass ZR1-Proteine in Kooperation mit HSP70-Chaperonen an der Photosystem-Assemblierung beteiligt sind. Für plastidäre HSP70-Chaperone wurde bereits gezeigt, dass sie an der Integration von LHC-Proteinen in die Thylakoidmembran beteiligt sind (YALOWSKI *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde eine Interaktion von HSP70 mit der CF<sub>1</sub>-Untereinheit der ATPase (CHEN UND JAGENDORF, 1994) sowie dem Rieske-Protein (MADUEÑO *et al.*, 1993) nach dem Import der Proteine in die Chloroplasten gezeigt.

Neuere Studien bezüglich der Funktion des plastidären HSP70B-Chaperons aus *Chlamydomonas reinhardtii* haben gezeigt, dass das Protein nicht nur an der Photoprotektion und der Photosystem-Reparatur beteiligt ist (SCHRODA *et al.*, 1999 und 2001) sondern auch an der Regulation der VIPP1-Oligomerisierung im Zusammenhang mit dem Aufbau und der Erhaltung der Thylakoidmembranen (LIU *et al.*, 2005 und 2007). An dieser Stelle sei vermerkt, dass das VIPP1-Protein lediglich am Aufbau der Thylakoid-Biomembran, nicht aber an der Assemblierung der Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran beteiligt ist (ASEEVA *et al.*, 2007). Das HSP70-Protein scheint demnach mehrfach in unterschiedliche Prozesse der Thylakoidmembran-Synthese beteiligt zu sein.



Eine mögliche Beteiligung des ZR-Proteins am Aufbau der Photosystem-Komplexe könnte die reduzierte Photosyntheserate in der *atzr1*-Mutante erklären. Darüber hinaus haben Westernblot-Analysen der Mutante gezeigt, dass einige Untereinheiten (*psbE* und *Lhca2*) nur in extrem geringen Mengen vorhanden sind. Andererseits führt eine Reduktion der Photosysteme in der Regel nicht zu einer so weit reichenden Störung des Thylakoidmembranaufbaus, wie er in der *atzr1*-Mutante zu beobachten ist. Sollte das ZR1-Protein also tatsächlich in den Aufbau der Photosystem-Komplexe involviert sein, so wäre es mit Sicherheit nur eine Funktion unter Vielen. Ein weiterer Aspekt, der sich nicht ohne weiteres mit einer primären Rolle des ZR1-Proteins während der Photosystem-Assemblierung vereinbaren lässt, ist das Expressionsmuster des Gens basierend auf den Promotor:GUS-Analysen: In *Arabidopsis* zeigte der *AtZR1*-Promotor bereits während der Keimung eine starke Aktivität, die sich primär auf sehr junge Gewebe und Meristeme beschränkt. Parallel zur Ergrünung eines Gewebes war ein Rückgang der *AtZR1*-Promotoraktivität zu beobachten, während die Aktivität des *AtZR2*-Promotors anstieg (Kapitel 4.3). Die Expression der Photosynthesegene wird in Spinat, ähnlich wie die *AtZR2*-Expression in *Arabidopsis*, etwa ein bis zwei Tage nach der Keimung induziert (HARRAK *et al.*, 1995) und verläuft somit diametral zur *AtZR1*-Promotoraktivität.

Obwohl *AtZR1* im Hefe-2-Hybridsystem mit verschiedenen Komponenten des Photosystems I interagiert hat, ist eine Funktion im Zusammenhang mit dem Photosystem-Assembly *in planta* auf Grund des Expressionsmusters von *AtZR1* und *AtZR2* eher für das *AtZR2*-Protein vorstellbar. Eine Interaktion zwischen dem *ZmZR2*-Protein aus Mais und den identifizierten Photosystem-Klonen fiel im Hefe-2-Hybridsystem ebenfalls positiv aus. Somit ist zu vermuten, dass im artifiziellen Hefesystem nicht zwischen *AtZR1*- und *AtZR2*-spezifischen Interaktoren unterschieden werden kann und einige der gefundenen Proteine *in planta* mit *AtZR2* und nicht mit *AtZR1* interagieren.

Während die hier postulierten Funktionen der ZR-Proteine in der plastidären TAC bzw. während der Photosystem-Assemblierung eine Interaktion der ZR-Proteine mit den HSP70-Chaperonen innerhalb spezifischer Komplexen impliziert, wird für das ZR-homologe HEP2-Protein aus *Chlamydomonas* eine allgemeine Funktion angenommen. WILLMUND *et al.* (2008) postulieren, dass HEP2 für die korrekte Faltung des HSP70B nach dem Import des Proteins in den Chloroplasten verantwortlich ist. Allerdings beruhen alle bisherigen Untersuchungen zur Funktion des HEP2 auf *in vitro*-Daten, da in *Chlamydomonas* keine *hep2*-Knockout-Mutante existiert bzw. ein RNAi-Ansatz nicht erfolgreich war (M. Schroda, persönliche Mitteilung).

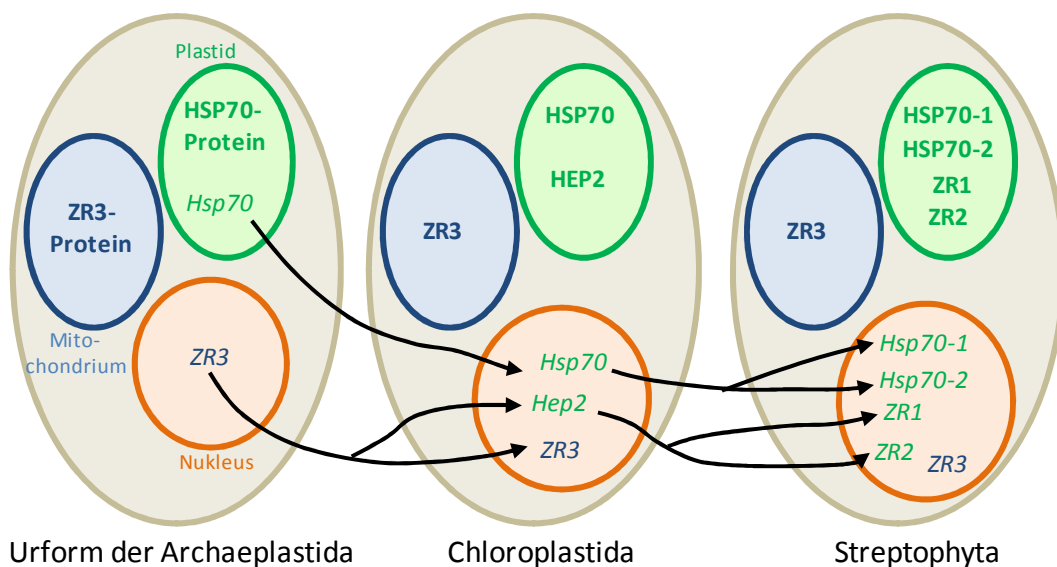
Bevor im Detail auf die unterschiedlichen Annahmen bezüglich der ZR/HEP-Funktion eingegangen wird, soll zunächst noch einmal die phylogenetische Beziehung zwischen den plastidären ZR-Proteinen unter Einbeziehung der evolutiven Entwicklung der plastidären HSP70-Proteine rekapituliert werden.

## 5.10 Die phylogenetische Beziehung zwischen den plastidären ZR-Proteinen HEP2, ZR1 und ZR2

Umfassende Sequenzanalysen von 125 eukaryotischen Organismen haben ergeben, dass organellenspezifische, ZR-homologe Proteine in nahezu allen Eukaryoten vorkommen. Grünalgen und höhere Pflanzen besitzen neben einem mitochondrialen ZR3 weitere ZR-homologe Proteine in den Plastiden (Kapitel 4.1). Während höhere Pflanzen stets zwei plastidäre ZR-Proteine enthalten (ein Etched1/ZR1-Protein und ein ZR2-Protein) verfügen die einzelligen Grünalgen lediglich über ein einziges ZR-homologes Protein (HEP2).

Phylogenetisch lassen sich die HEP2-Proteine zwischen den mitochondrialen ZR3-Proteinen und den plastidären ZR1/ZR2-Proteinen einordnen (vgl. Kapitel 4.1, Abb. 4.2). Es ist daher anzunehmen, dass sich das plastidäre HEP2 nach der Entstehung der Chloroplasten und nach der Abspaltung von den Glaucophyten und Rhodophyten in der Linie der Chloroplastida aus einem duplizierten ZR3-Gen entwickelt hat.

Interessanterweise hat in der Linie der Chloroplastida neben der Entstehung des HEP2-Proteins ein Gentransfer des plastidären HSP70-Proteins vom Chloroplasten-Genom in den Nukleus stattgefunden (Abb. 5-7). Diese Tatsache steht im Einklang mit der Theorie, dass das plastidäre HEP2-Protein aus *Chlamydomonas* für die korrekte Faltung des HSP70 nach dem Proteinimport benötigt wird (WILLMUND *et al.*, 2008).



**Abb. 5-7: Modell zur Entstehung der plastidären ZR-Proteine im Verlauf der Evolution**  
kursiv = Gene; nicht-kursiv = Proteine.

In Glaucocystophyceen und Rotalgen ist das plastidäre HSP70-Protein auch heute noch auf dem Plastom kodiert und muss daher nicht importiert werden. Diese Algen besitzen keine plastidären ZR-Proteine. In Bezug auf das Vorkommen von HSP70- und ZR-Proteinen entsprechen sie demnach wahrscheinlich der Urform der Archaeplastida (Abb. 5-7).

Mit der Entstehung vielzelliger Pflanzen und/oder der Adaption an das Landleben entwickelten sich die ZR1- und ZR2-Proteine. Sequenzvergleiche zeigen, dass sowohl zwischen HEP2 und ZR1 als auch zwischen HEP2 und ZR2 konservierte Aminosäuren vorhanden sind. Folglich sind die Mitglieder der ZR1 und ZR2 Genfamilie sehr wahrscheinlich parallel aus einem einzelnen HEP2-ähnlichen Vorläufergen entstanden (Abb. 5-7).

Die Anpassung der Pflanzen an das Landleben und die damit verbundene Zunahme an abiotischen und biotischen Stressfaktoren ging unter anderem mit der Vervielfältigung zahlreicher Chaperone einher (WATERS, 2003). In Folge dessen besitzen höhere Pflanzen im Gegensatz zu den Algen zwei plastidäre HSP70-Proteine (Abb. 5-7).

Im Allgemeinen findet man unter den HSP70-Proteinen die so genannten „Generalisten“, die innerhalb eines Kompartiments mit einer großen Anzahl von Substraten interagieren und allgemeine Funktionen im Zusammenhang mit der Proteinfaltung erfüllen, und die „Spezialisten“. Wie der Name vermuten lässt, erfüllen diese sehr spezifische Funktionen innerhalb des Kompartiments.

Es ist daher durchaus denkbar, dass die Duplikation der plastidären HSP70-Proteine im Zuge der Evolution mit einer Spezialisierung beider Proteine (oder eines der beiden Proteine) einherging, da ein Knockout des *Hsp70-1*-Gens nur teilweise durch das *Hsp70-2*-Gen kompensiert wurde. Da HSP70-1 insgesamt stärker exprimiert ist als HSP70-2 und innerhalb des Chloroplasten weniger spezifisch lokalisiert ist (vgl. Kapitel 4.9.3), lässt sich spekulieren, dass HSP70-1 eine generelle Funktion innerhalb der Chloroplasten erfüllt.

Der extrem starke Phänotyp der *atzr1*-Knockout-Mutante spricht ebenfalls dafür, dass das Protein eine zentrale Rolle innerhalb der Plastiden erfüllt. Man kann außerdem spekulieren, dass das Protein eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung der HSP70-Funktion spielt, und zwar sowohl für die Funktion von HSP70-1 als auch für die Funktion von HSP70-2.

Eine reduzierte Funktion von HSP70 in den Plastiden kann für die Entwicklung der Pflanze schwerwiegende Folgen haben, da eine Missfaltung von Proteinen zur Anhäufung toxischer Aggregate führen kann (MORANO, 2007).

Darüber hinaus zeigten Komplementationsexperimente der *var2*-Mutante (vgl. Kapitel 2.2), dass die Homöostase des Proteinhaushalts innerhalb der Chloroplasten essentiell ist für seine Funktion (MIURA *et al.*, 2007). VAR2 kodiert für eine von insgesamt sechs FtsH-Proteasen der plastidären Thylakoidmembran und der Verlust des Proteins resultiert in einem variierten Phänotyp der Blätter. Reduziert man in dieser Mutante die plastidäre Proteinsynthese (durch Kreuzung mit entsprechenden Mutanten oder durch leichte Inhibierung mittels Chloramphenicol), so wird der *var2*-Phänotyp komplementiert, da Synthese und Abbau von Thylakoidmembranproteinen wieder ins Gleichgewicht gelangen können.

Dieses Schema eines Fließgleichgewichts lässt sich sehr gut durch die Proteinfaltung ergänzen.

Wie die Microarray-Analyse der *atzr1*-Knockout-Mutanten gezeigt hat, waren in den untersuchten Pflanzen zahlreiche Proteine, die an der Synthese und am Abbau von Proteinen innerhalb der Chloroplasten beteiligt sind, auf Transkriptebene reduziert (Kapitel 4.6.2, Abb. 4-31). Auch Transkripte für Komponenten der plastidären Transkription, die der Translation vorausgeht, waren in der Mutante reduziert. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in einer verminderten Proteinfaltungsaktivität in den Plastiden der Mutante. Durch die allgemeine Reduktion nahezu aller Plastidenfunktionen könnte die Bildung schädlicher Proteinaggregate durch fehlerhafte Faltung reduziert werden.

HSP70-Proteine werden in den untersuchten *atzr1*-Mutanten verstärkt exprimiert (Kapitel 4.6.4, Abb. 4-33), obwohl die Transkriptmenge reduziert war (Kapitel 4.9.4). Dies weist möglicherweise auf eine veränderte/erhöhte Stabilität des Proteins hin. Möglicherweise versucht die Pflanze eine reduzierte Funktion des HSP70 durch verstärkte Synthese des Proteins zu kompensieren.

Nachdem viele Indizien für eine funktionelle Interaktion zwischen den ZR1-Proteinen und den plastidären HSP70-Chaperonen sprechen, bleibt die Frage, in welcher Beziehung diese Proteine genau stehen mögen.

SICHTING *et al.* (2005) führten den letalen *hep1*-Phänotyp in der Hefe auf die Aggregation des mitochondrialen HSP70-Proteins zurück. Eine vergleichbare Funktion ist für das ZR1 allerdings nicht anzunehmen, da die HSP70-Proteine in der *atzr1*-Mutante ausschließlich in der löslichen Fraktion gefunden wurden.

Für das HEP2-Protein aus *Chlamydomonas* wird hingegen angenommen, dass es für die *de novo*-Faltung des HSP70-Chaperons nach dem Import in den Chloroplasten notwendig ist.

Es werden mindestens 3000 verschiedene Proteine in die Chloroplasten importiert, die nach der Prozessierung neu gefaltet werden müssen. Diese Aufgabe wird sehr wahrscheinlich vom Chaperonin 60 und eventuell auch von HSP70 übernommen. Warum sollte HSP70 einen „Extra-Faktor“ zur korrekten Faltung benötigen?

Wenn ZR-Proteine ausschließlich für die korrekte Faltung der HSP70-Proteine nach dem Import notwendig sind, warum haben sich in höheren Pflanzen dann zwei plastidäre ZR-Proteine entwickelt?

Alle Experimente in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Proteine ZR1 und ZR2 unterschiedliche Funktionen innerhalb des Plastiden erfüllen. Für das ZR1-Protein konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es *in vitro* und aller Wahrscheinlichkeit nach auch *in vivo* mit beiden HSP70-Proteinen interagiert.

---

Eine mögliche Erklärung wäre also, dass ZR1 und ZR2 an der Regulation der HSP70-Aktivität in den Chloroplasten beteiligt sind. Möglicherweise sind sie daran beteiligt, die HSP70-Chaperone zu bestimmten Komplexen (zum Beispiel im TAC oder an der Photosynthesemembran) zu rekrutieren.

Eine ähnliche Funktion erfüllen die DNAJ-Proteine. Sie bestehen aus einer N-terminalen J-Domäne zur Rekrutierung des HSP70-Proteins und aus einer C-terminalen Zinkfinger-Domäne zur Bindung von Substraten. Diese ist allerdings nicht mit der *Zinc Ribbon*-Domäne der ZR-Proteine verwandt. Eine J-Domäne ist in den ZR-Proteinen ebenfalls nicht vorhanden. In welcher Form also eine Interaktion zwischen ZR-Proteinen und HSP70-Proteinen *in planta* stattfindet, ist unklar. Einige Tatsachen sprechen für eine sehr transiente Interaktion. Einerseits liegen ZR-Proteine und HSP70-Proteine in extrem unterschiedlichen Mengen im Organell vor. Während die plastidären HSP70-Proteine sehr leicht im Western-Blot nachgewiesen werden können, ließ sich das native AtZR1-Protein *in planta* bisher nicht immunologisch detektieren und für die Western-Detektion von HEP2 in *Chlamydomonas* wurden 300 µg Gesamtprotein geladen (WILLMUND *et al.*, 2008).

Die Expressionsmuster der *Hsp70*-Transkripte in *Arabidopsis* überschneiden sich zudem nur bedingt mit den Expressionsmustern von *AtZR1* und *AtZR2*.

Schließlich war ein Interaktionsnachweis zwischen einem HEP- oder ZR-Protein und HSP70 *in vivo* unter nativen Bedingungen bisher nicht möglich, da die Aufreinigungsexperimente aus Hefe und *Chlamydomonas* jeweils nur nach ATP-Depletion der Zellextrakte möglich war.

## 5.11 Ausblick

Als Interaktionspartner von HSP70 wird den ZR-Proteinen höherer Pflanzen inzwischen eine völlig andere Rolle zugeschrieben, als zunächst angenommen.

Erste Experimente zur Funktionsaufklärung des ETCHED1-Proteins aus Mais ließen vermuten, dass ZR-Proteine eine TFIIIS-ähnliche Funktion während der organellen-spezifischen Transkription ausüben (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass ZR-homologe Proteine wahrscheinlich an der Regulation organellenspezifischer HSP70-Chaperone beteiligt sind. In welcher Form die ZR-Proteine ihre Funktion im Zusammenhang mit HSP70 genau ausüben, bedarf jedoch weiterer Klärung. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit scheinen bisherige Modelle aus Hefe und *Chlamydomonas* (eine Stabilisierung von HSP70 zum Schutz vor Aggregation bzw. die *de novo* Faltung importierter HSP70-Moleküle) nicht unbedingt auf die ZR-Proteine höherer Pflanzen zuzutreffen. Eine nähere Charakterisierung der ZR-HSP70-Interaktion *in vitro* und *in planta* ist daher notwendig, um die genauen Zusammenhänge zwischen der HSP70- und der ZR-Proteinfunktion aufzuklären.

Einerseits gilt es, einen Beleg für die Interaktion zwischen dem ZR2-Protein und den plastidären HSP70-Proteinen zu liefern, um die bisherige Theorie der generellen ZR-HSP70-Interaktion aufrecht zu erhalten.

Die genaue Lokalisation des AtZR1-Proteins mittels immunologischer Techniken *in planta* könnte ebenfalls zur weiteren Funktionsaufklärung des Proteins beitragen. Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob sich das AtZR1-Protein und das HSP70-Protein immunologisch in den plastidären Nukleoiden nachweisen lassen.

Derzeitig wird die Analyse der *Arabidopsis*-Knockout-Linien und der begonnenen Kreuzungen unter Einbeziehung verschiedener abiotischer Stresssituationen fortgeführt. Ein detaillierter Vergleich zwischen dem *atzr1*-Knockout-Phänotyp und *hsp70-1/hsp70-2*-Doppel-Knockout-Phänotypen könnte Hinweise liefern, ob die Mutantenphänotypen tatsächlich auf jeweils vergleichbaren Ursachen beruhen.

Der einzigartige Phänotyp der *atzr1*-Mutante kann darüber hinaus dazu dienen, grundlegende Einflüsse der Plastidenentwicklung und Plastidenfunktionen auf die Entwicklung der gesamten Pflanze aufzuklären, da einige phänotypische Merkmale, beispielsweise der extreme Samenphänotyp und die veränderte Meristemaktivität bisher nie im Zusammenhang mit einer Plastidenmutante untersucht worden sind.

## 6. Literatur

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS et al.** (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*;52(5):399-451.
- Aguilera P, Barry T, Tovar J.** (2008): Entamoeba histolytica mitochondria: Organelles in search of a function. *Experimental Parasitology* 118, 10–16.
- Ahrend M.** (1998): Molekulare Analyse der *etcd1-Reference* Mutante von *Zea mays* L. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Alonso J M, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim C J et al.** (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Aluru MR, Rodermel SR.** (2004): Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiologia Plantarum*. 120; 1, 4 – 11.
- Aluru MR, Yu F, Fu A, Rodermel S.** (2006): *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J Exp Bot.* 57(9):1871-81.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T.** (2006): The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Asano, T, Yoshioka, Y, Kurei, S, Sakamoto, W, Sodmergen, Machida, Y.** (2004): A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 38, 448-459.
- Aseeva E, Ossenbühl F, Sippel C, Cho WK, Stein B, Eichacker LA, Meurer J, Wanner G, Westhoff P, Soll J, Voithknecht UC.** (2007): Vipp1 is required for basic thylakoid membrane formation but not for the assembly of thylakoid protein complexes. *Plant Physiol Biochem*.45(2):119-28.
- Azevedo J, Courtois F, Lerbs-Mache S.** (2006): Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 18;34(2):436-44.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L.** (2008): Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0113.
- Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N.** (2003): Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426,630-635.
- Berleth T, Chatfield S.** (2002): Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book* Article: pp. 1–22 DOI: 10.1199/tab.0051.
- Bhattacharya D, Archibald J, Weber APM, Reyes-Prieto A.** (2007): How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays* 29, 1239–1246.
- Biehl A, Richly E, Noutsos C, Salamini F, Leister D.** (2005): Analysis of 101 nuclear transcriptomes reveals 23 distinct regulons and their relationship to metabolism, chromosomal gene distribution and co-ordination of nuclear and plastid gene expression. *Gene*. 344:33–41.
- Bolanos-Garcia VM, Davies OR.** (2006): Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1760, 9, 1304-1313

- Bölter B, Sharma R, Soll J.** (2007): Localisation of Arabidopsis NDPK2--revisited. *Planta*. 226(4):1059-65.
- Brylka H.** (2002): Molekulare Charakterisierung eines kornspezifisch exprimierten Gens aus *Zea mays* L. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Burri L, Vascotto K, Fredersdorf S, Tiedt R, Hall MN, Lithgow T.** (2004): Zim17, a Novel Zinc Finger Protein Essential for Protein Import into Mitochondria. *J. of Biol. Chem.* 279, 48, 50243–50249.
- Cavalier-Smith, Thomas** (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** (2): 297–354.
- Chen GG, Jagendorf AT.** (1994): Chloroplast molecular chaperone-assisted refolding and reconstitution of an active multisubunit coupling factor CF1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(24):11497-501.
- Clough SJ, Bent AF.** (1998): Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant* 16 (6) 735-743.
- Conaway RC, Kong SE, Conaway JW.** (2003): TFIIIS and GreB: Two Like-Minded Transcription Elongation Factors with Sticky Fingers. *Cell* 114, 272-274.
- DalCorso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D.** (2008): A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132(2):273-85.
- da Costa e Silva O, Lorbiecke R, Garg P, Müller L, Wassmann M, Lauer P, Scanlon M, Hsia AP, Schnable PS, Krupinska K, Wienand U.** (2004): The *Etched1* gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein similar to the transcription factor TFIIIS and belonging to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids. *Plant Journal* 38: 923-939.
- Dellaporta GL, Wood J, Hicks JB.** (1983): A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1: 19-21.
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A.** (1997): T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant Journal* 11(1), 15-29.
- Dolezal P, Dancis A, Lesuisse E, Sutak R, Hrdý I, Embley TM, Tachezy J.** (2007): Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* 6(8):1431-8.
- DUALSYSTEMS BIOTECH**, Dualmembrane Kit Protocol P20303-1A <http://www.dualsystems.com>.
- DUALsystems Support:** <http://www.dualsystems.com/support.html>
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS.** (2006): Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;103(17):6518-23.
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ.** (2004): Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science* 304 253 – 257.
- Elble, R** (1992): A simple and efficient procedure for transformation of yeasts *BioTechniques* 13, 18–20.
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess WR, Börner T.** (2004): Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J.* 38(3):460-72.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H.** (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971.
- Embley TM, Martin W.** (2006): Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440,623-630.



- Favory JJ, Kobayshi M, Tanaka K, Peltier G, Kreis M, Valay JG, Lerbs-Mache S.**(2005): Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 33(18):5991-9.
- Friso G, Giacomelli L, Ytterberg AJ, Peltier J B, Rudella A, Sun Q, Wijk KJ.** (2004): In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16(2):478-99.
- Fromme P , Melkozernova A, Jordanb P, Kraussc N. (2003):** Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Letters.* 555,40-44.
- Garg P** (2002): Molecular Characterisation of the *et1* gene of *Zea mays* L. Dissertation, Universität Hamburg
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A.** (2003): ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784-3788.
- Gebert M.** (2003): Molekulare Charakterisierung von *Etched1*-homologen Genen in Mais (*Zea mays* L.) und *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Gerstenberger P & Leins P.** (1978): Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. *Ber Deutsch Bot Ges* 91:381-387.
- Goffman FD, Alonso AP, Schwender J, Shachar-Hill Y, Ohlrogge JB.** (2005): Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed. *Plant Physiol.* 138: 2269–2279.
- Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, Delbac F, Vivares CP, Hirt RP, Lill R, Embley TM.** (2008): Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature.* 452(7187):624-8.
- Gray JC, Sullivan JA, Wang JH, Jerome CA, MacLean D.** (2003): Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 358, 135-145.
- Hackstein JHP, Tjaden J, Huynen M.** (2006): Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr Genet.* 50:225–245.
- Hajdukiewicz PT, Allison LA, Maliga P.**(1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.*16(13):4041-8.
- Hallick R, Lipper C, Richards O, Rutter W.** (1976): Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochemistry.* 15: 3039-3045.
- Harrak H, Lagrange T, Bisanz-Seyer C, Lerbs-Mache S, Mache R.** (1995) The expression of nuclear genes encoding plastid ribosomal proteins precedes the expression of chloroplast genes during early phases of chloroplast development. *Plant Physiol.* 108: 685–692.
- Hausner W, Lange U, Musfeldt M.** (2000): Transcription factor S, a cleavage induction factor of archael RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275 (17): 12393-12399.
- Heazlewood JL, Howell, KA , Millar AH.** (2003): Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta* 1604(3):159-69.
- Hedtke B, Börner T, Weihe A.** (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science.*277(5327):809-11.
- Hedtke B, Börner T, Weihe A.** (2000): One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.*1(5):435-40.
- Hess WR, Müller A, Nagy F, Börner T.** (1994): Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol. Gen.Genet,* 242, 305-312.

- Hess WR, Börner T.** (1999): Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol.*190:1-59.
- Hricova A, Quesada V, Micol JL.** (2006): The Scabra3 Nuclear Gene Encodes the Plastid RpoTp RNA Polymerase, Which Is Required for Chloroplast Biogenesis and Mesophyll Cell Proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141 942-956.
- Humbeck K, Krupinska K.** (2003): The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCl of barley (*Hordeum vulgare* L) during leaf senescence is controlled by light. *J Exp Bot* 54(381):375-83.
- Inoué H, Nojima H, Okayama H.** (1990): High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jain SK, Langen G, Hess W, Börner T, Hückelhoven R, Kogel KH.** (2004): The white barley mutant albostrians shows enhanced resistance to the biotroph *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(4):374-82.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden, P, and Tsiantis M.** (2005): KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* 15: 1560–1565.
- Jensen PE, Bassi R, Boekema EJ, Dekker JP, Jansson S, Leister D, Robinson C, Scheller HV.** (2007): Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim Biophys Acta.* 1767(5):335-52.
- Jeong SY, Rose A, Meier I** (2003): MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res.* 31(17): 5175–5185.
- Johnsson N, Varshavsky A.** (1994): Split Ubiquitin as a Sensor of Protein Interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(22): 10340-10344.
- Kanamaru K, Tanaka K.** (2004): Roles of Chloroplast RNA Polymerase Sigma Factors in Chloroplast Development and Stress Response in High Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (11): 2215-2223.
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, and Yamanishi, Y.** (2008): KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 36, D480-D484.
- Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P.** (2003): Architecture of the RNA Polymerase II-TFIIS Complex and Implications for mRNA Cleavage. *Cell* 114, 347–357.
- Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P.** (2004): Complete RNA Polymerase II Elongation Complex Structure and Its Interactions with NTP and TFIIS. *Molecular Cell*, Vol. 16, 955–965.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K.** (2007): The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50(2):347-63.
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Grisse W, Baginsky S.** (2004): The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* 14(5):354-62.
- Kluth J.** (2004): Molekulare Untersuchungen zum Einfluss der *ZmPti1*-Kinase auf die Pollenentwicklung bei *Zea mays* (L.). Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Koncz C, Schell J.** (1986): The promoter of T<sub>1</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204:383-396.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J.** (2007): Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science.* 316(5825):715-9.

- Krause K, Krupinska K.** (2000): Molecular and functional properties of highly purified transcriptionally active chromosomes from spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 109 (2), 188-195.
- Kroll D, Meierhoff K, Bechtold N, Kinoshita M, Westphal S, Vothknecht UC, Soll J, Westhoff P.** (2001): VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(7):4238-42.
- Kruse K.** (2004): ETCHED1-homologe Proteine aus *Zea mays* (L.) und *Arabidopsis thaliana* Heinh. (L.): Subzelluläre Lokalisation und Charakterisierung von T-DNAInsertionsmutanten. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Métraux JP, Yephremov A.** (2006): The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in *Arabidopsis* *Plant Cell* 18: 321-339
- Lange T.** (1998): Molecular biology of gibberellin biosynthesis. *Planta.* 204; 409-419.
- Larkin, MA, Blackshields, G, Brown, NP, Chenna, R, McGettigan, PA, McWilliam, H, Valentin, F, Wallace, IM, Wilm, A, Lopez, R, Thompson, JD, Gibson, TJ, Higgins, DG.** (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Leister D.** (2003), Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics* 19, 47-56.
- Li Y, Rosso MG, Viehoveer P, Weisshaar B.** (2007): GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. *Nucleic Acids Res.* 35.D874-8.
- Liu C, Willmund F, Whitelegge JP, Hawat S, Knapp B, Lodha M, Schroda M.** (2005): J-Domain Protein CDJ2 and HSP70B Are a Plastidic Chaperone Pair That Interacts with Vesicle-Inducing Protein in Plastids 1. *Mol. Biol. Cell.* 16, 1165–1177.
- Liu C, Willmund F, Golecki JR, Cacace S, Hess B, Markert C, Schroda M.** (2007): The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 50(2):265-77.
- Lokstein H, Tian L, Polle JE, DellaPenna D.** (2002): Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in Photosystem II antenna size and stability. *Biochim Biophys Acta.* 1553(3):309-19.
- López-Juez E, Pyke KA.** (2005): Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* 49, 557-577.
- López-Juez E.** (2007): Plastid biogenesis, between light and shadows. *Journal of Exp Botany* 58, 11-26.
- Luo B, Xue XY, Hu WL, Wang LJ, Chen XY.** (2007): An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant and Cell Physiology.* DOI 10.1093/pcp/pcm152.
- Maliga P, Sz-Breznovits A, Marton L.** (1973): Streptomycin resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature New Biol* 224, 29–30.
- Madueño F, Napier JA, Gray JC.** (1993): Newly imported iron-sulfur protein associates with both Cpn60 and Hsp70 in the chloroplast stroma. *Plant Cell* 5: 1865-1876.
- Maple J, Møller S G.** (2006): Plastid division: Evolution, Mechanism and Complexity. *Annals of Botany* 1-15.
- Maple J, Møller S G.** (2007): Plastid division coordination across a double-membraned structure. *FEBS Letters.* 581, 2162–216.
- Mayer MP, Bukau B.** (2005): Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 62(6):670-84.

- McFadden GI, van Dooren GG.** (2004): Evolution: Red Algal Genome Affirms a Common Origin of All Plastids. *Current Biology*, Vol. 14, R514–R516.
- McGinnis S, Madden TL.** (2004): "BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools". *Nucleic Acids Res* 32:W20-W25.
- Meineke T.** (2008): Molekulare Studien zum Einfluß der Proteindomänen auf die Lokalisation ETCHED1-homologer Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (L.). Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M.** (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*. 282(5389):662, 679-82.
- Meyer EH, Taylor NL, Millar AH.** (2008): Resolving and Identifying Protein Components of Plant Mitochondrial Respiratory Complexes Using Three Dimensions of Gel Electrophoresis. *J Proteome Res* 7(2):786-94.
- Momose T, Ohshima C, Maeda M, Endo T.** (2007): Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. *EMBO Rep*. 8(7):664-70.
- Morano K.** (2007): New Tricks for an Old Dog: The Evolving World of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci*. 1113:1-14.
- Moro F, Fernández-Sáiz V, Slutsky O, Azem A, Muga A.** (2005): Conformational properties of bacterial DnaK and yeast mitochondrial Hsp70. *FEBS Journal*. Volume 272, Issue 12, Pages 3184-3196
- Müller L.** (2004): Untersuchungen zum Transkriptionsapparat von Plastiden verschiedener Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Funktion des mit dem eukaryotischen Transkriptionsfaktor TFIIIS verwandten ETCHED1-Proteins. Dissertation, Universität zu Kiel.
- Nagaya S, Kato K, Ninomiya Y, Horie R, Sekine M, Yoshida K, Shinmyo A.** (2005): Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 46(3):438-44.
- Neuhaus HE, Emes, M J.** (2000): Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:111–40.
- Nicholas KB, Nicholas, HB.** (1997): GeneDoc: a Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments. <http://www.psc.deu/biomed/genedoc>.
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J.** (2006): PLASTID-TO-NUCLEUS RETROGRADE SIGNALING. *Annu Rev. Plant Biology*. 57: 739-759.
- Olsen OA.** (2004): Nuclear Endosperm Development in Cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 16. 214-227.
- Oreb M, Tews I, Schleiff E.** (2008): Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts. *TRENDS in Cell Biology*. 18(1), 19-27.
- Page RDM.** (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Peltier JB, Ytterberg AJ, Sun Q, van Wijk KJ.** (2004): New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J Biol Chem*. 279(47):49367-83.
- Pesaresi P, Varotto C, Meurer J., Jahns P, Salamini F, Leister D.** (2001): Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J* 27, 179-189.
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R.** (2006): pTAC2, -6, and -12 Are Components of the Transcriptionally Active Plastid Chromosome That Are Required for PlastidGene Expression. *Plant Cell*. 18(1):176-97.

- Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ, Mache-Lerbs S.** (2003): Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol.* 51(3):385-99.
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z, Qu L.** (2007): Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellins biosynthesis. *Cell Research:* 1-12.
- Ramesh SV, Kumari AS, Reddy AR.** (1984): Photoacoustic and physiological studies on a maize mutant: a delay in leaf pigment synthesis in virescent seedlings. *Biochemistry International* 9 (1): 121-128
- Redman JC, Haas BJ, Tanimoto G, Town CD.** (2004): Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant Journal* 38: 545–561.
- Richly E, Dietzmann A, Biehl A, Kurth J, Laloi C, Apel K, Slamini F, Leister D.** (2003): Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch. *EMBO reports.* 4 (5): 491-498.
- Rodermel S.** (2001): Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in Plant Science* 6, 471–478.
- Rodermel S.** (2002): Arabidopsis Variegation Mutants. *The Arabidopsis Book* DOI: 10.1199/tab0079.
- Rokka A, Suorsa M, Saleem A, Battchikova N, Aro EM.** (2005): Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J.* 388(Pt 1): 159–168.
- Rokov-Plavec J, Dulic M, Duchêne AM, Weygand-Durasevic I.** (2008): Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Rep.* 27(7):1157-68.
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B.** (2003): An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53: 247-259.
- Rozen S, Skaletsky H J.** (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sakamoto W, Miyagishima S, Jarvis P.** (2008): Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book.* doi: 10.1199/tab.0110
- Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R.** (2008): Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol.* 59:683-707.
- Sane AP, Stein B, Westhoff P.** (2005): The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in Arabidopsis. *Plant J.* 42(5):720-30.
- Sanger, F, Nickler, S, Coulson, AR** (1977): DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sanjuán Szklarz LK, Guiard B, Rissler M, Wiedemann N, Kozjak V, van der Laan M, Lohaus C, Marcus K, Meyer HE, Chacinska A, Pfanner N, Meisinger C.** (2005): Inactivation of the mitochondrial heat shock protein zim17 leads to aggregation of matrix hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis. *J Mol Biol.* 351(1):206-18.
- Scanlon MJ, James MG, Stinard PS, Myers AM, Robertson DS.** (1994): Characterization of ten new mutations of the maize *Etched-1* locus. *Maydica* 39: 301-308
- Schroda M, Vallon O, Wollman FA, Beck CF.** (1999): A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell.* 11(6):1165-78.

- Schroda M, Kropat J, Osterå U, Rüdiger W, Vallon O, Wollman FA, Beck CF.** (2001): Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 4: 413-418.
- Schroda M.** (2004): The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth. Research* 82: 221–240.
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R.** (2004): Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell.* 16(10):2561-72.
- Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schröder WP, Kieselbach T.** (2002): Proteome Map of the Chloroplast Lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, Vol 277, Issue 10, 8354-8365.
- Schultes NP, Sawers RJ, Brutnell TP, Krueger RW.** (2000): Maize high chlorophyll fluorescent 60 mutation is caused by an Ac disruption of the gene encoding the chloroplast ribosomal small subunit protein 17. *Plant J.* 21(4):317-27.
- Schwenkert S, Legen J, Takami T, Shikanai T, Herrmann RG, Meurer J.** (2007): Role of the low-molecular-weight subunits PetL, PetG, and PetN in assembly, stability, and dimerization of the cytochrome b6f complex in tobacco. *Plant Physiol.* 144(4):1924-35.
- Serebriiskii, Ilya (2005).** <http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html> (10.08.2008).
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G et al.** (2002): A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* 14, 2985-94.
- Settles AM, Yonetani A, Baron A, Bush DR, Cline K, Martienssen R.** (1997): Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science.* 278(5342):1467-70.
- Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, Endo T, Hashimoto T.** (1999): Identification and characterization of *Arabidopsis* mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 40(11):1134-42.
- Sichting M, Mokranjac D, Azem A, Neupert W, Hell K.** (2005): Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. *EMBO J.* 24(5):1046-56.
- Stadler LJ.** (1940): Gene list and linkage map of corn (maize). *Maize Genet Coop News Lett* 14: 26-27.
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S.** (1998): A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 5187–5192.
- Stothard P.** (2000): The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Sun J, Xu Q, Vaishali VP, Jin P, Parag CR.** (1997): Topography of the Photosystem I Core Proteins of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803\*. *J. Biol. Chem.* 272 (35) 21793–21802.
- Sung DY, Vierling E, Guy CL.** (2001): Comprehensive Expression Profile Analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 Gene Family. *Plant Physiol.* Vol. 126, 789-800.
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ et al.** (2008): The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* 36:D1009-D1014.
- Terasawa K, Sato N.** (2005): Visualization of plastid nucleoids *in situ* using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol* 46(4):649-60.
- The Gene Ontology Consortium** (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet* 25: 25-29.

- Thimm O, Blaesing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee S Y, Stitt M.** (2004): MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37(6):914-39.
- Tian C, Chikayama E, Tsuboi Y, Kuromori T, Shinozaki K, Kikuchi J, Hirayama T.** (2007): Top-down phenomics of *Arabidopsis thaliana*: metabolic profiling by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy and transcriptome analysis of albino mutants. *J Biol Chem.* 282(25):18532-41.
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart NJ.** (2005): The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J* 43: 153-163.
- Tozawa Y, Teraishi M, Sasaki T, Sonoike K, Nishiyama Y, Itaya M, Miyao A, Hirochika H.** (2004): The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *Plant J.* 52(1):124-32.
- Tsugeki R, Nishimura M.** (1993): Interaction of homologues of Hsp70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP+ reductase upon its import into chloroplasts. *FEBS Lett.* 320(3):198-202.
- Vallon et al.** (1987): *Carlsberg Research Commun* 52, 502.
- Vallon O, Tae GS, Cramer WA, Simpson D, Høyer-Hansen G, and Bogorad L.** (1989): Visualization of antibody binding to the photosynthetic membrane: the transmembrane orientation of cytochrome b-559. *Biochim.Biophys.Acta* 975 (1) 132-141.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van Den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J.** (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169 – 170; doi:10.1038/252169a0.
- Wall MK, Mitchenall LA, Maxwell A.** (2004): *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101(20):7821-6.
- Waßmann M.** (2002): Molekulare Analyse des *Etched1* Gens aus *Zea mays* L. unter Einbeziehung von Transposon induzierten Mutanten. Dissertation, Universität Hamburg.
- Waters ER.** (2003): Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 29. 3. 456-463.
- Willmund F, Hinnenberger M, Nick S, Schulz-Raffelt M, Mühlhaus T, Schroda M.** (2008): Assistance for a Chaperone: CHLAMYDOMONAS HEP2 ACTIVATES PLASTIDIC HSP70B FOR COCHAPERONE BINDING. *JBC.* 283. 24: 16363–16373.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G V, Provart, N.** (2007): An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2(8): e718 doi:10.1371/journal.pone0000718.
- Woodson JD, Chory, J.** (2008): Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics* Published online March 2008.
- Xu J.**(2005): The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome.* 48(6):951-8.
- Yalovsky S, Paulsen H, Michaeli D, Chitnis RP, Nechushtai R.** (1992): Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 89: 5616-5619.
- Yamamoto H, Momose T, Yatsukawa Y, Ohshima C, Ishikawa D, Sato T, Tamura Y, Ohwa Y, Endo T.** (2005): Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. *FEBS Lett.* 579(2):507-11

- 
- Yang LM, Lamppa GL.** (1996): Rapid purification of a chloroplast nucleoside diphosphate kinase using CoA-affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* Volume 1294, Issue 2, Pages 99-102.
- Yi X, Hargett SR, Frankel LK, Bricker TM.** (2006): The PsbQ protein is required in Arabidopsis for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *J Biol Chem* 281(36):26260-7.
- Yu F, Fu A, Aluru M, Park S, Xu Y, Liu H, Liu X, Foudree A, Nambogga M, Rodermeil S.** (2007): Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant, Cell and Environment* 30, 350–365.
- Yu F, Liu X, Alsheikh M, Park S, Rodermeil S.** (2008): Mutations in SUPPRESSOR OF VARIATION1, a Factor Required for Normal Chloroplast Translation, Suppress var2-Mediated Leaf Variegation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. doi/10.1105/tpc.107.054965.
- Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W.** (2005): Gene expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends in Plant Science* 9 10, 407-409.
- Zhai P, Stanworth C, Liu S, Silberg JJ.** (2008): The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial Hsp70 and regulates ATP hydrolysis. *J Biol Chem*. [Epub ahead of print].



# Anhang

## A 1 Primer

In den folgenden Tabellen A 1-1 bis A1-7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet.

**Tab. A 1-1: Primer zur Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten**

*Bam*HI-Schnittstellen in den Primern JK13 und JK14 sind in der Sequenz unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	T-DNA Linie
JK1	<i>AtZR1-LP</i>	TTCTGAAACTGGCTAAAGATCAG	<i>At1g68730</i> ( <i>WiscDsLox345</i> )
JK2	<i>AtZR1-RP</i>	TGCGGAATCATTGATTCTTC	
JK3	<i>AtZR2-LP neu</i>	GATGAAGCAATGGGACTG	<i>At5g27280</i> ( <i>SALK_020364</i> )
JK4	<i>AtZR2-RP neu</i>	GCTGGTGATAGCAATGAT	
JK5	<i>AtZR3-LP</i>	TTGCTTTGAGACGCGCTTTGT	<i>At3g54826</i> ( <i>SALK_090006</i> )
JK6	<i>AtZR3-RP</i>	AGGGAACCTTGGCCGATTGAG	
JK7	<i>At4g22890-LP</i>	CTTCAAGAGCCTGAGAATTGC	<i>At4g22890</i> ( <i>SAIL_443_E10</i> )
JK8	<i>At4g22890-RP</i>	CCAAAGAAGGAGGTGTTTTCC	
JK9	<i>At4g24280-LP</i>	CAAGCTGTTGTTAATCCCGAG	<i>cp Hsp70-1</i> ( <i>SALK_140810</i> )
JK10	<i>At4g24280-RP</i>	GAAGCCAGATGCTTGTGAAAG	
JK11	<i>At5g49910 homoz. LP</i>	TTACCACCACCAACCATTTTC	<i>cpHSP70-2</i> ( <i>Salk_095715c</i> )
JK12	<i>At5g49910 homoz RP</i>	GAAAGCACTTCAAAAACACCG	
JK13	<i>At1 for (BamHI)</i>	AGGAG <u>GATCC</u> CATGGCGAATACTGCCGCCGGTT	<i>At1g68730</i> ( <i>Gabi_Kat 209H11</i> )
JK14	<i>At1 rev (BamHI)</i>	CCTGGATCCCTAACGTGATCGGTACCCAAATCC	
JK15	<i>p745</i>	AACGTCGCATGTGTTATTAAGTTGTC	<i>WiscDsLox</i>
JK16	<i>LBB1 neu</i>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	<i>Salk-Linien</i>
JK17	<i>LBB1</i>	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	<i>Salk-Linien</i>
JK18	<i>LB1</i>	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	<i>Sail-Linien</i>
JK19	<i>T-DNA</i>	C ATATTGACCATCATACTCATTGC	<i>Gabi-kat-Linie</i>

**Tab. A 1-2: Primer zur Klonierung von GFP- und DsRed-Konstrukten (Kapitel 3.3.2)**

Schnittstellen sind unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
JK20	<i>AtZR3 GFP 5'</i>	CAGGT <u>GATCA</u> ATGGCCGCTAGGTTACTT	<i>BclI</i>
JK21	<i>AtZR3 GFP 3'</i>	TCACT <u>GATCA</u> TACAGTAGAAATCTTTCC	<i>BclI</i>
JK22	<i>5`- B- ZmZR3</i>	TTGGGATCCATGGCCACCACCCGCTTGCTG	<i>KRUSE (2004)</i>
JK23	<i>3`- B- ZmZR3</i>	ATGGATCCGAATTTT GTTCGGAAGGCCCTTAG	
JK24	<i>PEND GFP 5'</i>	GAGAG <u>GATCC</u> ATGCACTCTCTTAAGACT	<i>BamHI</i>

Fortsetzung von Tab. A 1-3: Primer zur Klonierung von GFP- und DsRed-Konstrukten.

<b>JK25</b>	<i>PEND GFP 3'</i>	GCTCCTGGATCCTCACCAGGACCAAGGACTCT	<i>Bam</i> HI
<b>JK26</b>	<i>rpoC1 GFP 5'</i>	ACTGGGATCCAATGATCGATCGGTATAAACATGTTATACCG ATCGATCAT	<i>Bam</i> HI
<b>JK27</b>	<i>rpoC1 GFP 3'neu</i>	TCCTGGATCCTCGGTATCATATGAACAGGCTT	<i>Bam</i> HI
<b>JK28</b>	<i>rpoA GFP 5'</i>	CATGGGATCCAATGGTTCGAGAGAAAAGTCAA	<i>Bam</i> HI
<b>JK29</b>	<i>rpoA GFP 3'neu</i>	TCCTGGATCCTCTTTTTTCTAGAATGTCTAATATCTT	<i>Bam</i> HI
<b>JK30</b>	<i>HSP70-1 GFP 5'</i>	ATCGTGATCAATGGCATCTTCAGCCGCCCA	<i>Bcl</i> I
<b>JK31</b>	<i>HSP70-1 GFP 3'</i>	ATCGTGATCATGGCTGTCTGTGAAGTCAGC	<i>Bcl</i> I
<b>JK32</b>	<i>HSP70-2 GFP 5'</i>	ATCGTGATCAATGGCTCCTCCGCCGCCAA	<i>Bcl</i> I
<b>JK33</b>	<i>HSP70-2 GFP 3'</i>	ATCGTGATCATTGCTGTCTGTGTGTCAGCGTC	<i>Bcl</i> I
<b>JK34</b>	<i>Klon 2-3 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGGCTCAAGCAGTGACTTCG	<i>Bam</i> HI
<b>JK35</b>	<i>Klon 2-3 GFP 5'</i>	AGTAGGATCCGGACCGAGCTTGGCAAGAAC	<i>Bam</i> HI
<b>JK36</b>	<i>Klon 2-15 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGGCATCCAACAAGTCC	<i>Bam</i> HI
<b>JK37</b>	<i>Klon 2-15 GFP 3'</i>	AGTAGGATCCGGGATAAAGGGAGGGCCTGC	<i>Bam</i> HI
<b>JK38</b>	<i>Klon 4-2 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGTCTCAAGCCAGCCC	<i>Bam</i> HI
<b>JK39</b>	<i>Klon 4-2 GFP 3' neu</i>	AGTAGGATCCGGGGTAGAAGGTTGGTACAT	<i>Bam</i> HI
<b>JK40</b>	<i>Klon 4-10 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGGGTAGCAAGATGTTG	<i>Bam</i> HI
<b>JK41</b>	<i>Klon 4-10 GFP 3'</i>	AGTAGGATCCGGAGCTTGGCTTCTTCTGG	<i>Bam</i> HI
<b>JK42</b>	<i>Klon 4-13 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGACCTTCGGGGCGTTCC	<i>Bam</i> HI
<b>JK43</b>	<i>Klon 4-13 GFP 3'</i>	AGTAGGATCCGGTGATTCATTCTCTTAGC	<i>Bam</i> HI
<b>JK44</b>	<i>Klon 7-8 GFP 5'</i>	ATTCGGATCCATGAGCCGTGGTGGTAGT	<i>Bam</i> HI
<b>JK45</b>	<i>Klon 7-8 GFP 3'</i>	AGTAGGATCCGGGTTGCCACCGAACAGGTA	<i>Bam</i> HI

Tab. A 1-4: Primer zur Klonierung binärer *Arabidopsis*-Expressionsvektoren (Kapitel 3.3.4)  
Schnittstellen sind unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
<b>JK46</b>	<i>AtZR1-Promotor 5'</i>	CTAAAGGATCCTCCCATTTGTTTTCCCAT	<i>Bam</i> HI
<b>JK47</b>	<i>AtZR1-Promotor 3'</i>	CCGGGTCGACTCTAGACCATGGTTTCCGTCCTTGTCTCTCTG T	<i>Nco</i> I, <i>Sal</i> I
<b>JK48</b>	<i>AtZR2-Promotor 5'</i>	GAGAAGATCTGAGATGGAAGCTACCTAGTTG	<i>Bgl</i> II
<b>JK49</b>	<i>AtZR2-Promotor 3'</i>	CAGACTGCAGGATATTTGTTTCTATCTA	<i>Pst</i> I
<b>JK50</b>	<i>AtZR3-Promotor 5'</i>	TAGCAGATCTCGACGAAGGCTGAATACCAT	<i>Bgl</i> II
<b>JK51</b>	<i>AtZR3-Promotor 3'</i>	CAGACTGCAGTAGAGTTAGTTTTCGTTATGGTCAA	<i>Pst</i> I
<b>JK52</b>	<i>Nos-Terminator 5'</i>	TACCGTCGACGAATTTCCCCGATCGTCCAAA	<i>Sal</i> I
<b>JK53</b>	<i>Nos-Terminator 3'</i>	ACCAAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGATG	<i>Hind</i> III
<b>JK54</b>	<i>ZmET1 ORF 5'(Nco)</i>	GCGGCCATGGCGACGACGGCCGCCGGG	<i>Nco</i> I
<b>JK55</b>	<i>ZmET1 ORF 3'Stop (Nco)</i>	TCACCCATGGTCAATCTTCAGAACTGGT	<i>Nco</i> I

Fortsetzung von Tab. A 1-5: Primer zur Klonierung binärer *Arabidopsis*-Expressionsvektoren

<b>JK56</b>	<i>ZmET1 ORF 3'ohne Stop</i>	CAGCCCATGGAATCTTCAGAACTGGTGT	<i>NcoI</i>
<b>JK57</b>	<i>ZmET1 ORF 5'(BglII)</i>	GCGGAGATCTATGGCGACGGCCGCCGGG	<i>BglII</i>
<b>JK58</b>	<i>ZmET1 ORF 3'Stop (Sall)</i>	TCACGTCGACTCAATCTTCAGAACTGGT	<i>Sall</i>
<b>JK59</b>	<i>GFP ORF 5'</i>	GCAACCATGGGCAAGGGCGAG	<i>NcoI</i>
<b>JK60</b>	<i>GFP ORF 3'</i>	CCCGGTCGACTCAGCCATGCGTGATCCC	<i>Sall</i>
<b>JK61</b>	<i>DsRed ORF 5'</i>	CCCGGGATCCGGTCGCCACCATGGCCTC	<i>BamHI</i>
<b>JK62</b>	<i>DsRed ORF 3'</i>	TAGAGTCGACGCCGCTACAGGAACAGGT	<i>Sall</i>
<b>JK63</b>	<i>AtZR1 ORF 5'</i>	GCAACCATGGCGAATACTGCCGCCGGT	<i>NcoI</i>
<b>JK64</b>	<i>AtZR1 ORF 3'</i>	CCCGGTCGACTCAAACGTGATCGGTACC	<i>Sall</i>
<b>JK65</b>	<i>AtZR2 ORF Stop 3'</i>	CCCGGTCGACTTACAAAGGAAAGACATCATTGCT	<i>Sall</i>
<b>JK66</b>	<i>At2 for (BamHI)</i>	CTTCGGATCCCATGGAAGCTACCTCTCTAAGC	<i>GEBERT (2003)</i>
<b>JK67</b>	<i>At2rev (BamHI)</i>	CAAGGATCCTTCAAAGGAAAGACATCATTGCT	
<b>JK68</b>	<i>Strep-tag primer1a</i>	GATCCaAgcgcTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGTGG AGGTTCCGGAGGTGG	<i>BamHI</i>
<b>JK69</b>	<i>Strep-tag primer1b</i>	CTCCGGAACCTCCACCTTTCTCGAACTGCGGGTGGCTCCAA gcgTtG	
<b>JK70</b>	<i>Strep-tag primer2a</i>	ATCGGGAGGTGGATCGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA TAAG	<i>Sall</i>
<b>JK71</b>	<i>Strep-tag primer2b</i>	TCGACTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACGATCC ACCTCCCGATCCAC	
<b>JK72</b>	<i>4-10-Promotor 5'</i>	CTTAGGCCAAATTGATAGATCTCTC	<i>BglII</i>
<b>JK73</b>	<i>4-10-Promotor 3'</i>	AGTCTGCAGGATAGAAAAGGGAGCTCC	<i>PstI</i>

Tab. A 1-6: Primer zur Klonierung der Hefe-2-Hybridvektoren (Kapitel 3.3.3)

Nr.	Name	Sequenz	Anmerkungen
<b>JK74</b>	<i>pCMBV ZmET1 5'</i>	<u>AGAATGGCCTATTTATTAGGGATATATAGAGATAATAAGAAAT</u> <u>GTCTAATGACGACGACGGCCGCC</u>	Primer mit Überhängen zur homologen Rekombi- nation in <i>pCMBV_Alg5</i> sowie <i>pTMBV_Alg5</i>
<b>JK75</b>	<i>pCMBV ZmZmET1 3'</i>	<u>CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGATATACC</u> <u>CATGATCTTCAGAACTGGTGTC</u>	
<b>JK76</b>	<i>pCMBV ZmRpoTp 5'</i>	<u>AGAATGGCCTATTTATTAGGGATATATAGAGATAATAAGAAAT</u> <u>GTCTACACTGGCTCGACCTATTCGCGTTC</u>	
<b>JK77</b>	<i>pCMBV ZmRpoTp 3'</i>	<u>CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGATATACC</u> <u>CATGGTTGAAGAAGTATGTTGA</u>	
<b>JK78</b>	<i>pCMBV ZmZR2 5'</i>	<u>AGAATGGCCTATTTATTAGGGATATATAGAGATAATAAGAAAT</u> <u>GTCTAATGGAGGCCGCCGCGATC</u>	
<b>JK79</b>	<i>pCMBV ZmZR2 3'</i>	<u>CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGATATACC</u> <u>CATGGAGAGGGAAGGTAGTGTC</u>	
<b>JK80</b>	<i>pCMBV HSP70-1 5'</i>	<u>AGAATGGCCTATTTATTAGGGATATATAGAGATAATAAGAAAT</u> <u>GTCTAATGGAGAAGGTTGTTGGAATTGAT</u>	
<b>JK81</b>	<i>pCMBV HSP70-1 3'</i>	<u>CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGATATACC</u> <u>CATGTTGGCTGTCTGTGAAGTCAGC</u>	

## Fortsetzung von Tab. A 1-7: Primer zur Klonierung der Hefe-2-Hybridvektoren

<b>JK82</b>	<i>pCMBV Hsp70-2 5'</i>	<u>AGAATGGCCTATTTATTAGGGATATATAGAGATAATAAGAAAT</u> <u>GTCTAATGGAGAAAGTCGTCGGAATCGAT</u>	<i>Primer mit Überhängen zur homologen Rekombination in pDL2xN</i>
<b>JK83</b>	<i>pCMBV Hsp70-2 3'</i>	<u>CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGATATACC</u> <u>CATGATTGCTGTCTGTGTGTCAGCGT</u>	
<b>JK84</b>	<i>pDL2 ZmZmET1 5'</i>	<u>TCAACTCACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA</u> <u>AAAATGACGACGACGGCCGCC</u>	
<b>JK85</b>	<i>pDL2 ZmZmET1 3'</i>	<u>ATCGTATGGGTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAG</u> <u>AATCTTCAGAACTGGTGTC</u>	
<b>JK86</b>	<i>pDL2 ZmrpoTp 5'</i>	<u>TCAACTCACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA</u> <u>AAAATGCACTGGCTCGACCTATTCGCGTTC</u>	
<b>JK87</b>	<i>pDL2 ZmrpoTp 3'</i>	<u>ATCGTATGGGTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAG</u> <u>AGTTGAAGAAGTATGTTGA</u>	
<b>JK88</b>	<i>pDL2 ZmZR2 5'</i>	<u>TCAACTCACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA</u> <u>AAAATGGAGGCCGCCGCGATC</u>	
<b>JK89</b>	<i>pDL2 ZmZR2 3'</i>	<u>ATCGTATGGGTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAG</u> <u>AGAGAGGGAAGGTAGTGTC</u>	
<b>JK90</b>	<i>pDL2 orf121 5'</i>	<u>TCAACTCACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA</u> <u>AAAATGTCAGCGGTTTCGAGTCCG</u>	
<b>JK91</b>	<i>pDL2 orf121 3'</i>	<u>ATCGTATGGGTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAG</u> <u>AAGATGTTTCAGTTCGCCAGG</u>	
<b>JK92</b>	<i>pDL2 rpb6 5'</i>	<u>TCAACTCACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA</u> <u>AAAATGGCGGACGACGATTACAAC</u>	
<b>JK93</b>	<i>pDL2 rpb6 3'</i>	<u>ATCGTATGGGTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAG</u> <u>AGTCTCCACCACTGGCGTT</u>	
<b>JK94</b>	<i>SMART IV (cDNA 5')</i>	AAGCAGTGGTATCAACGCAGTGGCCATTACGGCCGGG	
<b>JK95</b>	<i>CDSIII/3' (cDNA 3')</i>	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGACATG-d(T)30N-1N	
<b>JK96</b>	<i>5' amplification</i>	CAAGATTACGCTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG	
<b>JK97</b>	<i>3' amplification</i>	GTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCGAGAGGTC TAGAGGCCGAG	

Tab. A 1-8: Primer zur Klonierung von *E.coli* Expressionsvektoren (Kapitel 3.3.5)

Schnittstellen sind unterstrichen

Nr.	Name	Sequenz	Schnittstelle
<b>JK98</b>	<i>HSP70-1 pET 5'</i>	ATCGTGAC <u>ATATGG</u> GAGAAGGTTGTTGGAATTGAT	<i>NdeI</i>
<b>JK99</b>	<i>HSP70-1 pET 3'</i>	GCTA <u>CTCGAG</u> TTGGCTGTCTGTGAAGTCAGC	<i>XhoI</i>
<b>JK100</b>	<i>HSP70-2 pET 5'</i>	ATCGTGAC <u>ATATGG</u> GAGAAAGTCGTCGGAATCGAT	<i>NdeI</i>
<b>JK101</b>	<i>HSP70-2 pET 3'</i>	GCTA <u>CTCGAG</u> ATTGCTGTCTGTGAAGTCAGC	<i>XhoI</i>
<b>JK102</b>	<i>AtZR2-strep 5'</i>	ATGGTAGG <u>TCTCAA</u> ATGAGCCTCTCCGGAATCGAACT	<i>Eco31I</i>
<b>JK103</b>	<i>AtZR2-strep 3'</i>	ATGGTAGG <u>TCTCAG</u> CGCTCAAAGGAAAGACATCATTGCTATCA	<i>Eco31I</i>
<b>JK104</b>	<i>AtZR1-strep 5'</i>	ATGGTAGG <u>TCTCAA</u> ATGGCTCTACACAGGTCGAAAAC	<i>Esp3I</i>
<b>JK105</b>	<i>AtZR1-Strep3'</i>	ATGGTAGG <u>TCTCAG</u> CGCTAACGTGATCGGTACCCAAATCCT	<i>Esp3I</i>

Tab. A 1-9: Sonstige Primer

Nr.	Name	Sequenz	Anmerkungen
JK106	AtZr1 3' UTR	GAACAAAACCTTGATTCAACGTAGC	
JK107	Strep tag 3'	ATCCACCTCCCGATCCAC	
JK108	HSP70-1 5' UTR	CAAACCTCCTTGCACTCTC	
JK109	HSP70-1 3' UTR	CATCGCATCCCATGTATGAA	
JK110	HSP70-1-Seq1	AACAATTTGCTGCTGAGGAG	Sequenzierprimer
JK111	HSP70-1-Seq2	CTCCACGTGGTGCAGGTGGAATAC	Sequenzierprimer
JK112	HSP70-1 intern	TTCAACTGCTGCTGATGGAC	
JK113	HSP70-2 5' UTR	ATTTCCAACCATGGCTTCCT	
JK114	HSP70-2 3' UTR	TTGCTGCCAACAAATCACAT	
JK115	HSP70-2-Seq1	AATGTTAAGCTTGAGTGTCC	
JK116	HSP70-2-Seq2	CAAACCTCCTCTCACCTGC	
JK117	HSP70-2 intern	CTGTCAGTGCTTCGGACAAA	
JK118	AtZR3-Promotor (intern)	GTGGATCGCCTCAAACATCT	
JK119	AtZR2-Promotor (intern)	TTAGGTTCGAGGAACGTCAAG	
JK120	AtZR1 intern	TTGCAAGTGAATTCACCTTGCAATT	
JK121	Primer GUS	TAATGAGTGACCGCATCGAA	
JK122	GFP seq	GGTGAGCTTTCCGTAGGTGGCATCACCT	Sequenzierprimer
JK123	UP (M13 forward)	GTAAAACGACGGCCAG	TOPO- Sequenzierung
JK124	RP (M13 reverse)	CAGGAAACAGCTATGAC	
JK125	p35S intern		

Tab. A 1-10: Primer für die Realtime-PCR (Kapitel 4.6)

Neben der Primerbezeichnung und der Primer-Sequenz sind der *Arabidopsis Gene Identifier* (AGI), die konventionelle Genbezeichnung bzw. Beschreibung, die subzelluläre Lokalisation des Genprodukts sowie die relative Expression des Gens im Microarray (vgl. Kapitel 3.6) angegeben. →: die Expression ist in *Col-0* und *atrz1* gleich. ↘: die Expression sinkt in der *atrz1* verglichen mit *Col-0*. ↗: die Expression steigt in der *atrz1* verglichen mit *Col-0*.

Primer	Sequenz	AGI	Gen-Name	Lokalisation	Expression Array
UBQ	for GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG	At4g05320	UBQ10	Nucleus	→4000
	rev AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT				
YLS8	for TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT	At5g08290	YLS8	Nucleus	→1300
	rev CACTGAATCATGTTCTGAAGCAAGT				
AtZR1	for GATATTAAGCTACCGAGAAGAAGTTTG	At1g68730	AtZR1	Chloroplast	n.d.
	rev GGAAATCATACTCAACAATGAGACC				
AtZR2	for ACTGTCTTCGTGCAGTGTTGTG	At5g27280	AtZR2	Chloroplast	→900
	rev CCTCATCATCGAAAAGATTCAAG				

Fortsetzung von Tab. A 1-11: Primer für die *Realtime-PCR*

<b>AtZR3</b>	<i>for</i>	TCAGCAGAAGTCATGTTTATGGA	<i>At3g54826</i>	<i>AtZR3</i>	<i>Chloroplast</i>	<i>n.d.</i>
	<i>rev</i>	CGGGTTTATTTTTAACTGGGACT				
<b>At4g22890</b>	<i>for</i>	TGGAACAATTCTGTCAATCTCCA	<i>At4g22890</i>	<i>PGRL1</i>	<i>Chloroplast</i>	4000↘1500
	<i>rev</i>	CATTCTCTTTTCCCATCTTCATCT				
<b>rpl11</b>	<i>for</i>	GTTGGGGTGATAACAATAGACCA	<i>At1g32990</i>	<i>prl11</i>	<i>Chloroplast</i>	1600↘1000
	<i>rev</i>	ACTGCTTCTTTTTGGGTTCAAG				
<b>At4g35770</b>	<i>for</i>	CTCGTCCCACTTCAGGAAAC	<i>At4g35770</i>	<i>SEN1</i>	<i>Chloroplast</i>	2500↗7500
	<i>rev</i>	GCAGCTCATTCTCTGTCCAA				
<b>At5g07440</b>	<i>for</i>	GAGGCAGCTAACCATCCAAC	<i>At5g07440</i>	<i>glutamate DH 2</i>	<i>Mito- chondrion</i>	400 ↗ 1300
	<i>rev</i>	TCCTCTCCACATGAATCC				
<b>At1g03630</b>	<i>for</i>	GGCAAAAGACTAGCACAGGTTG	<i>At1g03630</i>	<i>PORC</i>	<i>Chloroplast</i>	1500↘300
	<i>rev</i>	CTCGCTAACCTCCACAGTTT				
<b>At5g67030</b>	<i>for</i>	CGAACACGGAACCTATGTGA	<i>At5g67030</i>	<i>ABA1</i>	<i>Chloroplast</i>	1600↘700
	<i>rev</i>	GTCGATTCGGAGTTTTCT				
<b>At1g59900</b>	<i>for</i>	AAGGAGAGCCCATAACCAGA	<i>At1g59900</i>	<i>pyruvate DH Komplex E1</i>	<i>Mito- chondrion</i>	→1200
	<i>rev</i>	GCCTTGCCTTCTGATTATTGA				
<b>At1g66220</b>	<i>for</i>	GGACACCATGAAACTGCTGA	<i>At1g66200</i>	<i>glutamine synthetase</i>	<i>Cytosol</i>	→1200
	<i>rev</i>	CAACGTAAGGGTCCATGTTTG				
<b>At1g76030</b>	<i>for</i>	GCTTCCATCCCTTCTCGTT	<i>At1g76030</i>	<i>vacuolar ATPsynthase</i>	<i>Cytosol</i>	→1300
	<i>rev</i>	GCTCCTGCATCACAACTTC				
<b>At3g20390</b>	<i>for</i>	GTTGGCTGATTTGGCTGACT	<i>At3g20390</i>	<i>ribonuclease L-PSP</i>	<i>Chloroplast</i>	→1600
	<i>rev</i>	CCCTTCGTAGAGATTGATTGA				
<b>At3g25660</b>	<i>for</i>	AGCAGCGTTTGATGAGGAGA	<i>At3g25660</i>	<i>gln-tRNA transferase</i>	<i>Chloroplast</i>	500↘200
	<i>rev</i>	TGCTTAAACCAAGCATGAAATG				
<b>At4g19170</b>	<i>for</i>	TCGAAGTTTCTGGTGATGGAC	<i>At4g19170</i>	<i>NCED4</i>	<i>Chloroplast</i>	1300↘700
	<i>rev</i>	TGCAACAACACTATGCGATTT				
<b>At4g02380</b>	<i>for</i>	GATCGTATCTGCTTTCGTCTCTC	<i>At4g02380</i>	<i>Lea3</i>	<i>Chloroplast</i>	300 ↗ 3000
	<i>rev</i>	GTTGATTCTTCCACTCCCTTCTT				
<b>cpHSP70-2</b>	<i>for</i>	ATGCGATGGGAGAGACAAAT	<i>At5g49910</i>	<i>cpHSP70-2</i>	<i>Chloroplast</i>	500↘200
	<i>rev</i>	CCCACTGCTTCTTCTAACG				
<b>cpHSP70-1</b>	<i>for</i>	CTTCTCGTCTGCTGACACA	<i>At4g24280</i>	<i>cpHSP70-1</i>	<i>Chloroplast</i>	1000↘500
	<i>rev</i>	TGCTGCCAACAAATCACATT				

## A 2 Verwendete Vektoren

Auflistung aller Vektoren, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden.

**Tab. A 2-1: Klonierungsvektoren**

Die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ist in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Ursprung</i>
<i>pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup></i>	<i>Klonierungsvektor</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>pCR<sup>®</sup> BluntII TOPO<sup>®</sup></i>	<i>Klonierungsvektor</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>pCR<sup>®</sup> 4Blunt-TOPO<sup>®</sup></i>	<i>Klonierungsvektor</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>pBlueskriptIIISK</i>	<i>Klonierungsvektor</i>	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
<i>TOPO_ZmZR3_2</i>	<i>ZmZR3 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>KRUSE, 2004</i>
<i>TOPO_Alg5_2</i>	<i>Alg5 ORF in pCR<sup>®</sup> 4Blunt</i>	<i>KLUTH, 2004</i>
<i>TOPO_AtZR2-LP</i>	<i>AtZR2 T-DNA flankierender Bereich in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_AtZR3-LP</i>	<i>AtZR3 T-DNA flankierender Bereich (LP) in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_AtZR3-RP</i>	<i>AtZR3 T-DNA flankierender Bereich (RP) in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_PGRL1-RP</i>	<i>A.t. PGRL1 T-DNA flankierender Bereich in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_HSP70-2-RP</i>	<i>A.t.cpHSP70-2 T-DNA flankierender Bereich in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_HSP70-1-RP</i>	<i>A.t.cpHSP70-1 T-DNA flankierender Bereich in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_ZmET1ms</i>	<i>ZmET1 ORF mit Stop in pCR<sup>®</sup> 4Blunt</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_GFP</i>	<i>GFPII ORF in pCR<sup>®</sup> 4Blunt</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_nos</i>	<i>NOS-Terminator in pCR<sup>®</sup> 4Blunt</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_AtZR2-P</i>	<i>AtZR2-Promotor in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_AtZR3-P</i>	<i>AtZR3-Promotor in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_4-10-P</i>	<i>PGRL1-Promotor in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_4-2</i>	<i>ZmZR3 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_2-3 cDNA</i>	<i>At4g05180 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_2-3 gDNA</i>	<i>At4g05180 gDNA in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_4-10 cDNA</i>	<i>A.t. PGRL1 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_4-10 gDNA</i>	<i>A.t. PGRL1 gDNA in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_2-15</i>	<i>Klon 2-15 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_4-13</i>	<i>Klon 4-13 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_7-8</i>	<i>Klon 7-8 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_PEND</i>	<i>A.t. PEND DNA-BD in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_rpoA</i>	<i>A.t. rpoAORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_rpoC1</i>	<i>A.t. rpoC1 ORF in pCR<sup>®</sup>2.1</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_Hsp70-1 UTR</i>	<i>A.t. cpHSP70-1 cDNA in pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_Hsp70-1 UTR</i>	<i>A.t. cpHSP70-2 cDNA in pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>TOPO_Hsp70-1 pET</i>	<i>A.t. cpHSP70-1 ORF ohne Signal in pCR<sup>®</sup> BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>



## Fortsetzung Tab. A 2-2: Klonierungsvektoren

<b>TOPO_Hsp70-2 pET</b>	<i>A.t. cpHSP70-2 ORF ohne Signal in pCR® BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>TOPO_AtZR1</b>	<i>AtZR1 ORF ohne Signal in pCR® BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>TOPO_AtZR2</b>	<i>AtZR2 ORF ohne Signal in pCR® BluntII</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pBS Mu uidA nos</b>	<i>Mu 3'-TIR, uiA-Gen und nos-Terminator in pBSKS</i>	<i>M.Littek</i>
<b>pBS_AtZr1-P</b>	<i>AtZR1-Promotor in pBSSK</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>rpoTp</b>	<i>enthält ZmRpoTp</i>	<i>R. Stern</i>

Tab. A 2-2: Binäre *Arabidopsis*-Expressionsvektoren

Die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ist in Kapitel 3.3.4 beschrieben.

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Ursprung</b>
<b>pCHF_5</b>	<i>enthält 35S-Promotor und RBCS-Terminator, basiert auf pCAMBIA3300 (Cambia, Canberra, Australien), bar-Gen unter Kontrolle des mas-Promotors</i>	<i>C.Fankhauser, Universität Genf, Schweiz</i>
<b>pPZP312</b>	<i>Enthält bar-Gen unter Kontrolle des mas-Promotors</i>	<i>HAJDUKIEWICZ et al., 1994</i>
<b>PMG2002</b>	<i>enthält uidA, bar-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors</i>	<i>M.Gahrtz, Universität Hamburg</i>
<b>pAtZr1:nos</b>	<i>NOS-Terminator über Sall/HindIII und AtZR1-Promotor über BamHI/Sall in pPZP312</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pAtZR1:ZmET1</b>	<i>ZmET1 ORF über NcoI in pAtZr1:nos</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pAtZR1:ZmET1::GFP</b>	<i>GFP ORF über NcoI/Sall und ZmET1 ORF über NcoI in pAtZr1:nos</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p35S:ZmET1</b>	<i>ZmET1 ORF über BglII/Sall in pCHF_5</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p35S:ZmET1::GFP</b>	<i>ZmET1::GFP ORF über BglII/Sall in pCHF_5</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p35S:ZmET1::DsRed</b>	<i>DsRed-express über BamHI/Sall gegen GFP im p35S:ZmET1::GFP ausgetauscht</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p35S:AtZR2</b>	<i>AtZR2 ORF über BamHI/Sall in pCHF_5</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCHF_5_strep</b>	<i>Strep-Tag über BamHI/Sall in pCHF_5</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p35S:AtZR1strep</b>	<i>AtZR1 gDNA über BamHI in pCHF_5_strep</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pAtZR1:gus</b>	<i>uidA:nos über NcoI/HindIII gegen nos im pAtZR1:nos ausgetauscht</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pAtZR2:gus</b>	<i>AtZR2-Promotor über BglII/PstI in PMG2002</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pAtZR3:gus</b>	<i>AtZR3-Promotor über BglII/PstI in PMG2002</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>p4-10:gus</b>	<i>A.t. PGRL1-Promotor über BglII/PstI in PMG2002</i>	<i>diese Arbeit</i>



**Tab. A 2-3: Fluoreszenz-Reportergergen-Konstrukte**

Die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ist in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Ursprung</i>
<b>pDsRed2</b>	enthält DsRed-express	BD Biosciences, Heidelberg
<b>pUbi:GFP</b>	enthält Ubiquitin-Promotor, basiert auf p35S:GFPII	KLUTH, 2004
<b>pUbi:DsRed</b>	enthält DsRed express, basiert auf pUbi:cas (Brettschneider,?)	R.Brettschneider, Universität Hamburg
<b>pUbi:LUC</b>	enthält Ubiquitin-Promotor, Luciferase, nos-Terminator	R.Brettschneider, Universität Hamburg
<b>p35S:GFPII</b>	enthält GFPII, basiert auf pMON 30049 (Monsanto, St. Louis, USA)	BRYLKA, 2002
<b>ZmET1::GFPII</b>	ZmET1 ORF über BamHI in p35S: GFPII	GEBERT, 2003
<b>ZmZR2::GFP</b>	ZmET1 ORF über BamHI in pUbi: GFP	K. Müller, Universität Hamburg
<b>AtZR1::GFPII</b>	AtZR1 ORF über BamHI in p35S: GFPII	GEBERT, 2003
<b>AtZR2::GFPII</b>	AtZR1 ORF über BamHI in p35S: GFPII	GEBERT, 2003
<b>ssuR target::GFP</b>	ZmRBCS-target über BglII/BamHI in p35S: GFPII	K. Müller, Universität Hamburg
<b>AtZR1::DsRed</b>	AtZR1 gDNA über BamHI in pUbi:DsRed	diese Arbeit
<b>AtZR2::DsRed</b>	AtZR2 ORF über BamHI in pUbi:DsRed	diese Arbeit
<b>ZmZR3::GFP</b>	ZmZR3 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>ZmZR3::DsRed</b>	ZmZR3 ORF über BamHI in pUbi:DsRed	diese Arbeit
<b>AtZR3::GFP</b>	AtZR3 ORF über BclI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>PEND::GFP</b>	A.t. PEND DNA BD über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>PEND::DsRed</b>	AtZR1 DNA BD über BamHI in pUbi:DsRed	diese Arbeit
<b>rpoA::GFP</b>	A.t. rpoA ORF über BamHI in ssuR target::GFP	diese Arbeit
<b>rpoC1::GFP</b>	A.t. rpoC1 ORF über BamHI in ssuR target::GFP	diese Arbeit
<b>Hsp70-1::DsRed</b>	A.t. cpHSP70-1 ORF über BclI in pUbi: DsRed	diese Arbeit
<b>Hsp70-2::DsRed</b>	A.t. cpHSP70-2 ORF über BclI in pUbi: DsRed	diese Arbeit
<b>Hsp70-2::GFP</b>	A.t. cpHSP70-2 ORF über BclI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 2-3::GFP</b>	At4g05180 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 2-3::GFP gDNA</b>	At4g05180 gDNA über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 2-15::GFP</b>	Klon 2-15 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 4-2::GFP</b>	Klon 4-2 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 4-10::GFP</b>	A.t. PGRL1 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 4-10::GFP gDNA</b>	A.t. PGRL1 gDNA über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 4-13::GFP</b>	Klon 4-13 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit
<b>Klon 7-8::GFP</b>	Klon 7-8 ORF über BamHI in pUbi: GFP	diese Arbeit

**Tab. A 2-4: Vektoren des Hefe-2-Hybridsystems**

Die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Ursprung</i>
<b>pTMBV4</b>	<i>Bait-Vektor mit "starkem" TEF-Promotor</i>	<i>Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz</i>
<b>pCMBV4</b>	<i>Bait-Vektor mit "schwachem" CYC1-Promotor</i>	<i>Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz</i>
<b>pDL2-Nx</b>	<i>Prey-Vektor zur N-terminalen Fusion mit NubG</i>	<i>Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz</i>
<b>pDL2-xN</b>	<i>Prey-Vektor zur C-terminalen Fusion mit NubG</i>	<i>Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz</i>
<b>pAlg5-NubI</b> <b>pAlg5-NubG</b>	<i>Positiv-Kontrolle</i> <i>Negativ-Kontrolle</i>	<i>Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz</i>
<b>pCMBV_AlG5</b>	<i>Alg5 ORF über NheI/XbaI in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_AlG5</b>	<i>Alg5 ORF über NheI/XbaI in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCMBV_ZmET1</b>	<i>ZmET1 ORF über homologe Rekombination in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_ZmET1</b>	<i>ZmET1 ORF über homologe Rekombination in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCMBV_ZmZR2</b>	<i>ZmZR2 ORF über homologe Rekombination in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_ZmZR2</b>	<i>ZmZR2 ORF über homologe Rekombination in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCMBV_rpoTp</b>	<i>ZmRpoTp ORF über homologe Rekombination in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_rpoTp</b>	<i>ZmRpoTp1 ORF über homologe Rekombination in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCMBV_HSP70-1</b>	<i>A.t cpHSP70-1 ORF über homologe Rekombination in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_HSP70-1</b>	<i>A.t cpHSP70-1 ORF über homologe Rekombination in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pCMBV_HSP70-2</b>	<i>A.t cpHSP70-2 ORF über homologe Rekombination in pCMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pTMBV_HSP70-2</b>	<i>A.t cpHSP70-2 ORF über homologe Rekombination in pTMBV</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_ZmET1</b>	<i>ZmET1 ORF über homologe Rekombination in pDL2xN</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_ZmZR2</b>	<i>ZmZR2 ORF über homologe Rekombination in pDL2xN</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_orf_121</b>	<i>ZmORF121 über homologe Rekombination in pDL2xN</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_rpb6</b>	<i>ZmRbp6 ORF über homologe Rekombination in pDL2xN</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_2-3</b>	<i>Klon 2-3 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_2-13</b>	<i>Klon 2-13 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_2-15</b>	<i>Klon 2-15 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_4-2</b>	<i>Klon 4-2 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_4-10</b>	<i>Klon 4-10 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_4-13</b>	<i>Klon 4-13 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pDL2_7-8</b>	<i>Klon 7-8 des Hefe-2-Hybrid-Bankenscreens in pDL2Nx</i>	<i>diese Arbeit</i>

**Tab. A 2-5: Vektoren zur Proteinexpression in *E.coli***

Die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ist in Kapitel 3.3.6 beschrieben.

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Ursprung</i>
<b>pET30a</b>	<i>Induzierbarer T7-Promotor, 6xhis-Tag</i>	<i>Novagen, Merck, Schwalbach</i>
<b>pASK IBA3plus</b>	<i>Induzierbarer tet-Promotor, Strep-Tag</i>	<i>IBA BioTAGnology, Göttingen</i>
<b>pMS461</b>	<i>enthält CrHSP70B-6xhis, basiert auf pCDF-duet (Novagen, Merck, Schwalbach)</i>	<i>WILLMUND et al., 2008</i>
<b>pET30_Hsp70-1</b>	<i>A.t. cpHSP70-1 ORF ohne Signal in pET30a</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>pET30_Hsp70-2</b>	<i>A.t. cpHSP70-2 ORF ohne Signal in pET30a</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>IBA_AtZR1strep</b>	<i>AtZR1 ORF ohne Signal in pASK IBA3plus</i>	<i>diese Arbeit</i>
<b>IBA_AtZR2strep</b>	<i>AtZR2 ORF ohne Signal in pASK IBA3plus</i>	<i>diese Arbeit</i>

### A 3 Ergänzungen zum Microarray-Experiment

Folgende Daten werden ergänzend zu den Microarray-Experimenten in Kapitel 3.6 aufgeführt:

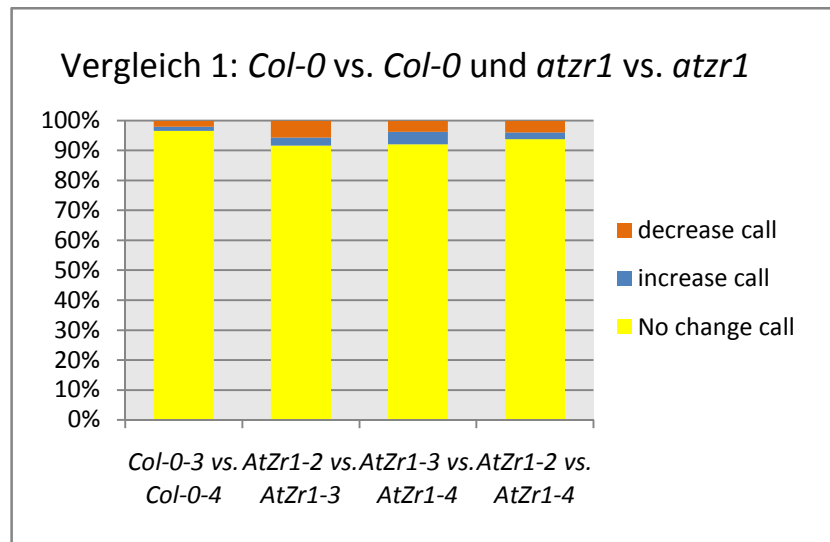
- 1) Eine Tabelle die das Ergebnis der fünf durchgeführten Einzelhybridierungen zusammenfasst.
- 2) Zwei graphische Darstellungen der Ergebnisse aus den Vergleichen der fünf Hybridierungsexperimente.

**Tab. A 3-1: Ergebnis der Microarray-Hybridisierung.**

Die Tabelle gibt die Intensität der Hintergrundsignale, den Anteil der als „anwesend“ und „abwesend“ gewerteten *Probesets*, die durchschnittliche Stärke der detektierten Signale *Probesets* und den Skalierungsfaktor zur Normalisierung der Signale für die fünf Hybridisierungsexperimente wieder.

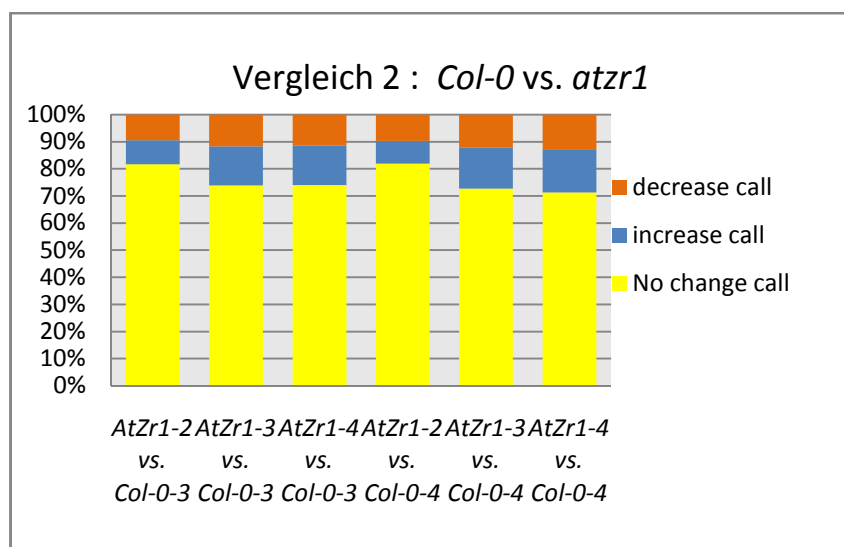
<b>Probe</b>	<b>Background</b>	<b>Number Present</b>	<b>Number Absent</b>	<b>Average Signal (all)</b>	<b>Scale Factor</b>
<b>AtZr1 ko2</b>	69.80	61.8%	37.3	220.9	1.715
<b>AtZr1 ko3</b>	84.76	65.0%	34.2	215.1	1.008
<b>AtZr1 ko4</b>	81.04	65.0%	34.3	216.2	0.984
<b>Col-0 wt 3</b>	77.63	61.0%	38.1	228.9	1.425
<b>Col-0 wt 4</b>	87.37	61.4%	37.6	229.3	1.161

Auf den Array „AtZR1 ko2“ musste zur Normalisierung ein deutlich höherer Skalierungsfaktor angewendet werden als auf die übrigen Arrays.



**Abb. A 3-1: Vergleiche *Col-0* vs. *Col-0* und *atzr1* vs. *atzr1*.**

Gene, die im Vergleich zwischen den beiden untersuchten Array in ihrer Expression unverändert blieben, sind gelb dargestellt, Veränderungen der Expression sind orange (Abnahme) bzw. blau (Zunahme) dargestellt.



**Abb. A 3-2: Vergleiche zwischen *Col-0*- und *atzr1*-Hybridisierungen**

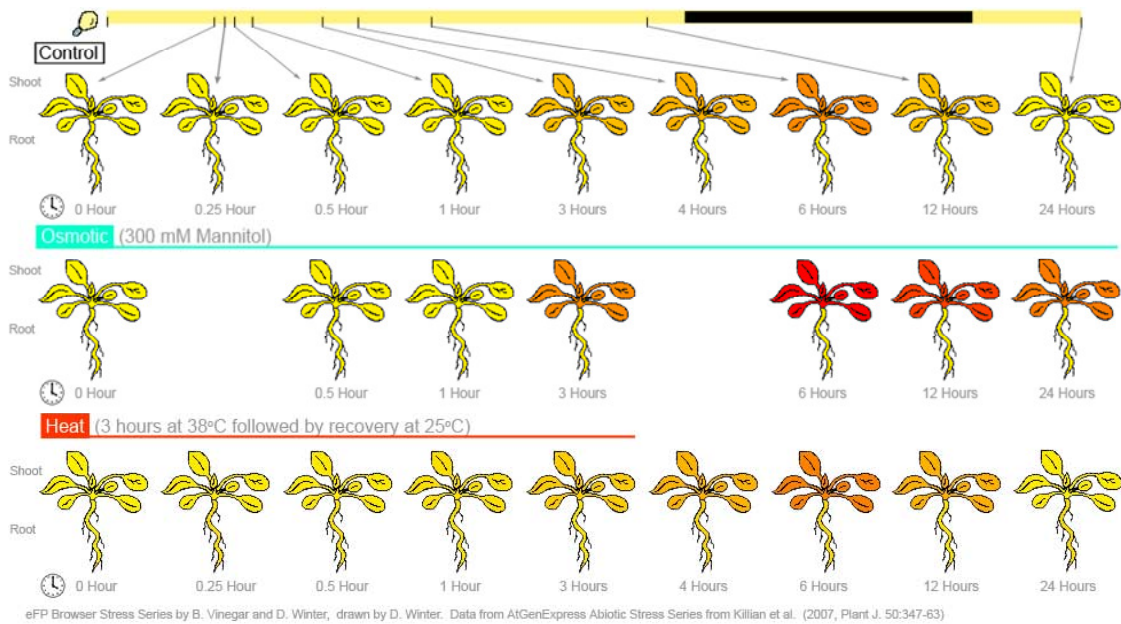
Gene, die im Vergleich zwischen den beiden untersuchten Array in ihrer Expression unverändert blieben, sind gelb dargestellt, Veränderungen der Expression sind orange (Abnahme) bzw. blau (Zunahme) dargestellt.

Insgesamt wird in den Abbildungen deutlich, dass innerhalb der *Col-0*- und der *atzr1*-Population nur geringe Schwankungen in der Transkriptmenge einzelner Gene bestehen. Der Vergleich zwischen *Col-0* und *atzr1*-Hybridisierungen weist hingegen auf deutliche Expressionsänderungen zwischen Wildtyp und Mutante hin. Der Vergleich von *atzr1-2* zu *Col-0-3* und -4 ergibt eine weniger starke Expressionsänderung als der Vergleich von *atzr1-3* und -4 mit den beiden *Col-0*-Wildtypen.

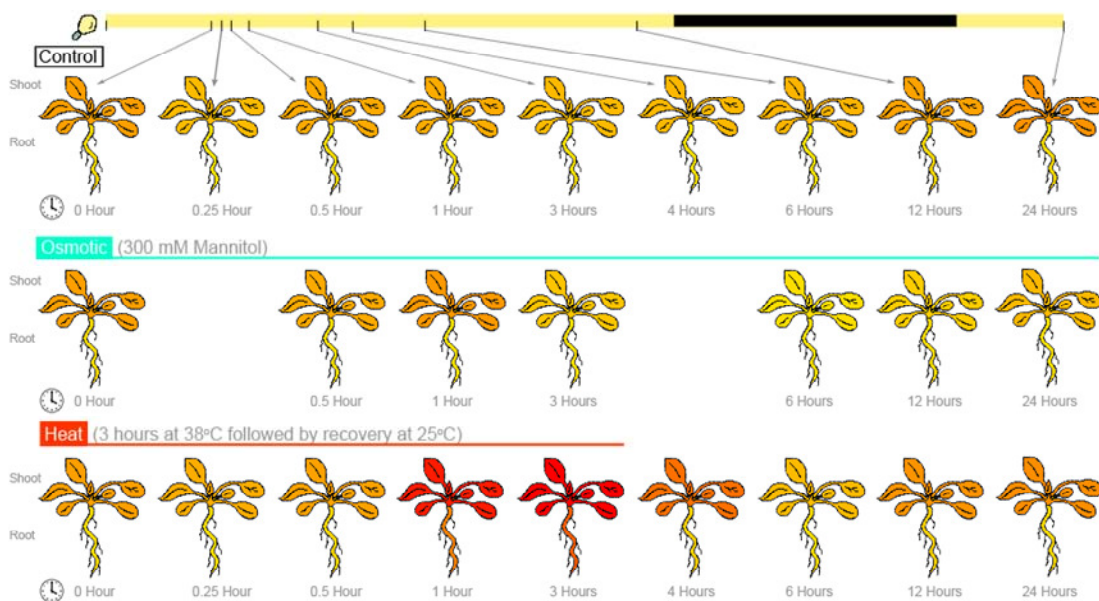
## A 4 *In Silico* Expressions-Daten

Die folgenden drei Abbildungen zeigen die Expressionsänderung der Transkripte *AtZR2*, *Hsp70-1* und *Hsp70-2* unter osmotischem Stress und Hitzestress in *Arabidopsis*-Blattrosetten. Die Grafiken wurden mit dem eFP-Browser (WINTER *et al.*, 2007) erstellt.

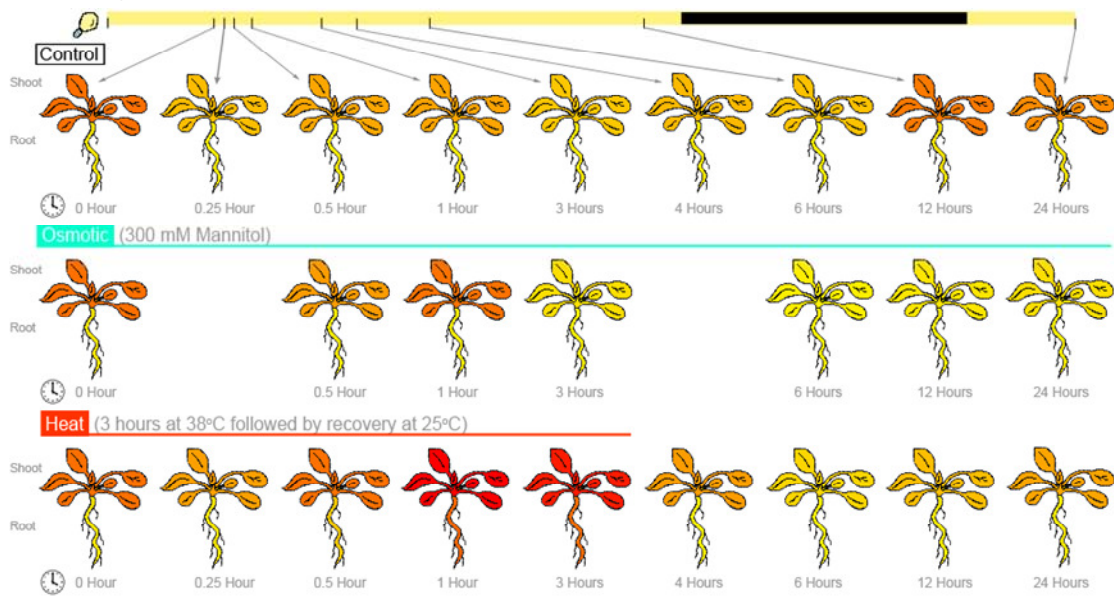
### *AtZR2* abiotischer Stress



### *Hsp70-1* abiotischer Stress



## Hsp70-2 abiotischer Stress



## Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Udo Wienand für die Möglichkeit in seiner netten Arbeitsgruppe zu promovieren (und natürlich für die hübschen Hello Kitty-Mitbringsel aus NY) .

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. René Lorbiecke für die gute Betreuung dieser Arbeit, die vielen Gespräche und Tipps und die spaßigen Kongressreisen.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt Katja Müller, die mich stets so fleißig im Labor unterstützt hat. Darüber hinaus danke ich ihr natürlich auch für die nette Gesellschaft in der Teeküche und bei gemeinsamen IKEA-Shopping-Touren.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Projektstudenten Eva Buchert, Anneke Marks und Till Meineke bedanken.

Unseren Kooperations-Partnern aus Kiel, Frau Prof. Dr. Karin Krupinska und Joanna Melonek, danke ich ebenfalls für die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen Ideen zu ETCHED1 und Co.

Bei Dr. Thomas Streichert und Kristin Reeck bedanke ich mich herzlich für die Durchführung der Microarray-Experimente, die uns viele aufschlussreiche Informationen liefern konnten.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Woelken für die TEM-Bilder und bei Frau Dehn für die Anleitung und Hilfe mit den REM-Bildern bedanken.

Mein Dank gilt natürlich auch allen Mitarbeitern vom AMPI. Mit euch hatte ich immer viel Spaß und eine gute Zeit. Insbesondere danke ich Holdi für sein offenes Ohr jederzeit.

Natürlich danke ich auch allen anderen, die mir mit Rat und Tat zu Seite gestanden haben.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt hat, und natürlich bei Marco und Nyima.