

**Identifizierung neuer katalytischer und regulativer
Komponenten des Purinnukleotidkatabolismus von
Arabidopsis thaliana unter Verwendung einer
genetischen Sichtung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
Linda Ewert, M.Sc.

2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Claus-Peter Witte
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pfannschmidt
Tag der Promotion: 13.10.2020

Zusammenfassung

Im Purinkatabolismus wurden gerade in den letzten Jahren viele Enzyme neu entdeckt und charakterisiert. Besonders die Forschungsarbeiten zur Uratoxidase zeigten die Wichtigkeit dieses Enzyms im Stoffwechsel der Pflanzen. Während bei Menschen und den meisten Primaten Harnsäure als Endprodukt ausgeschieden wird, baut die Uratoxidase in Pflanzen Harnsäure zu Allantoin ab. Eine Harnsäureakkumulation ist toxisch für Pflanzen und führt zur Unfähigkeit einen Keimling zu etablieren. Die Mutationen von Genen deren Produkte Reaktionen katalysieren, welche der Uratoxidase im Stoffwechsel vorgeschaltet sind wie z.B. die *xdh*-Mutante, können diesen spezifischen Phänotyp unterdrücken, man spricht von einer genetischen Suppression.

In einer genetischen Sichtung, bei der durch EMS-Mutagenese der *uox*-Samen Mutationen erzeugt wurden, konnten neben bekannten auch zwei unbekannte Suppressoren gefunden werden. Diese wurden als *ups1*-Mutanten mit jeweils einem Aminosäureaustausch bestätigt. Zur Familie der Ureidpermease (UPS) gehören in den Brassicaceae insgesamt fünf Transporter, von denen einer sehr wahrscheinlich ein Pseudogen ist und daher nicht weiter untersucht wurde. In der Einzelmutante *uox* akkumuliert Harnsäure in großen Mengen. Die Suppressoren S-A231V und S-E209K akkumulieren wie die *ups1 x uox* Doppelmutante nur halb so viel Harnsäure im Samen wie die übrigen *ups x uox* Doppelmutanten. Hintergrund ist der niedrigere Harnsäureimport in den Samen wie durch Kreuzungen bestätigt werden konnte.

Die UPS-Transporter wurden in Spezies wie Reis, Soja- oder Gartenbohne als Allantointransporter charakterisiert. In *A. thaliana* konnten für UPS5 *in vitro* jedoch bessere Spezifitäten für Uracil als Allantoin nachgewiesen werden. Die Etablierung und Messung verschiedener heterozyklischer Verbindungen in der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie sollte zu einem besseren Verständnis der Transporter *in vivo* beitragen. Da der Funktionsverlust eines einzelnen Transporters sehr wahrscheinlich durch die verbliebenen funktionsfähigen Transporter ausgeglichen werden kann, wurden Mehrfachmutanten der Transporter mittels CRISPR/Cas9-System generiert. In der Dreifachmutante *ups1 x ups2 x ups5* konnte in Blättern eine Akkumulation und in Samen eine Verringerung von Uracil

festgestellt werden, die in den Einzelmutanten und auch in der Doppelmutante *ups1 x ups5* nicht detektierbar war. Die UPS-Transporter vermitteln somit den Transport von Uracil von altem in neues Gewebe. Auch Dihydrouracil ist wahrscheinlich ein *in vivo* Substrat von UPS.

Promotor-GUS-Studien der einzelnen Transporter zeigten, dass vor allem UPS1 und UPS5 in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiv sind. Während der Embryonalentwicklung wurde eine Aktivität von UPS1 in den Kotyledonen und von UPS5 im Hypokotyl beobachtet.

Schlagworte: Ureidpermease, subzelluläre Lokalisation, Stickstoffmangel

Abstract

Many enzymes have been newly discovered and characterized in purine catabolism during the last years. Research on urate oxidase in particular showed the importance of this enzyme in the metabolism of plants. While uric acid is excreted as a final product in humans and most primates, urate oxidase breaks down uric acid into allantoin in plants. Uric acid accumulation is toxic to plants and leads to the inability to establish a viable seedling. Mutants above urate oxidase such as the *xdh* mutant can suppress this specific phenotype.

In a genetic screen, in which mutations were generated by EMS mutagenesis of the *uox* seeds, two unknown suppressors were found in addition to known ones. These were confirmed as *ups1* mutants with one amino acid exchange each. The family of ureid permease (UPS) in Brassicaceae includes a total of five transporters, in which one of them is very likely a pseudogene and is therefore excluded in this study. The single *uox* mutant accumulates high amounts of uric acid. Like the *ups1* x *uox* double mutant, the suppressors S-A231V and S-E209K accumulate only half as much uric acid in seeds as the other *ups* x *uox* double mutants. Background is the lower uric acid import in the seeds, as confirmed by crosses.

The UPS transporters have been characterized as allantoin transporters in species such as rice, soybean or french bean. In *A. thaliana*, better specificities for uracil than allantoin were demonstrated for UPS5 *in vitro*. The establishment and measurement of various heterocyclic compounds via liquid chromatography mass spectrometry should contribute to a better understanding of the transporters *in vivo*. Since the loss of function of an individual transporter is very likely to be compensated for by the remaining functional transporters, multiple mutants were generated using the CRISPR/Cas9 system. In the triple mutant *ups1* x *ups2* x *ups5* an accumulation in leaves and a decrease in seeds for uracil was found, which was not detectable in the single mutants and also not in the double mutant *ups1* x *ups5*. The UPS transporters mediate the transport of uracil from old to new tissue. Dihydrouracil is also likely to be an *in vivo* substrate for UPS.

Promoter-GUS studies of the individual transporters showed that especially UPS1 and UPS5 are expressed in different tissues at different time point during plant

development. Expression of UPS1 in the cotyledons and of UPS5 in the hypocotyl was observed during embryonic development.

Keywords: ureid permease, subcellular localization, nitrogen deficiency

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xv
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzen und die Bedeutung von Stickstoff im Stoffwechsel	1
1.2 Purinnukleotidbiosynthese	2
1.3 Pyrimidinnukleotidbiosynthese	3
1.4 Purinnukleotidabbau und –recycling	4
1.5 Abbau der Pyrimidine	7
1.6 Die Uratoxidase und die Folgen bei Funktionsverlust	8
1.7 Suppressoren von uox	10
1.8 Die Familie der Ureidpermeasen	13
1.9 Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Gele	21
2.1.4 Kultur- und Anzuchtmedien	22
2.1.5 Antibiotika	23
2.1.6 Extraktionskits	23
2.1.7 DNA-Größenstandards	24
2.1.8 Protein-Größenstandard	25
2.1.9 Ligasen und Polymerasen	25
2.1.10 Oligonukleotide	26
2.1.11 Antikörper	31
2.1.12 Vektoren	32
2.1.13 Bakterienstämme	33
2.1.14 Pflanzenmaterial	33
2.2 Methoden	36
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1 DNS-Isolation aus Pflanzengewebe	36
2.2.1.2 RNS-Isolation aus Pflanzengewebe	36

2.2.1.3 RT-PCR und cDNS-Synthese	36
2.2.1.4 Plasmidisolierung	38
2.2.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.7 Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.2.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
2.2.1.9.1 Standard-PCR.....	39
2.2.1.9.2 Kolonie-PCR	40
2.2.1.10 Restriktionsverdau	41
2.2.1.11 Ligation des Inserts in den Zielvektor	42
2.2.1.12 CRISPR/Cas9-System	43
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	43
2.2.2.1 Kultivierung von E. coli.....	43
2.2.2.2 Transformation von E. coli.....	44
2.2.2.3 Transformation von Rhizobium radiobacter	44
2.2.3 Anzucht und Analyse von Pflanzen	45
2.2.3.1 Pflanzenanzucht von <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i>	45
2.2.3.2 Keimungsrate and Etablierung des Keimlings	46
2.2.3.3 Kreuzungen von <i>A. thaliana</i>	46
2.2.3.4 Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i>	46
2.2.3.5 Infiltration von <i>N. benthamiana</i>	47
2.2.3.6 Konfokalmikroskopie	47
2.2.3.7 High Resolution Melt-Analyse	48
2.2.3.8 Analyse der CRISPR-Pflanzen im Kapillar-Sequenzierer	49
2.2.3.9 Proteinisolierung aus Pflanzengewebe.....	50
2.2.3.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	50
2.2.3.11 Western Blot	51
2.2.3.12 Immunfärbung.....	51
2.2.3.13 GUS-Färbung.....	51
2.2.3.14 Metabolitanalyse durch Flüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrieanalyse.....	52
3. Ergebnisse	55
3.1 Charakterisierung der <i>A. thaliana</i> T-DNS Linien	55
3.2 Suppressoren sind ups1-Mutanten	56
3.3 Phänotypische Analyse der Suppressoren	58
3.4 Analysen der Keimung und Keimlingsetablierung.....	61
3.5 Herstellung der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-Methode	65

3.6	Pflanzenanzucht unter Stickstoffmangel.....	69
3.7	Metabolitanaylsen	69
3.8	Subzellulare Lokalisation von AtUPS1.....	86
3.9	Promotor-GUS-Studien	88
4.	Diskussion.....	99
4.1	Analyse der Suppressoren, Einzel- und Doppelmutanten der UPS-Transporter	99
4.2	Erzeugung und Effizienz der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-System 101	
4.3	Auswirkungen des Stickstoffmangels beim Pflanzenwachstum	102
4.4	Uracil-Transport in reproduktives Gewebe.....	103
4.5	Aktivitäten von pUPS1 und pUPS5 in unterschiedlichen Geweben.....	107
4.6	Lokalisation von UPS1 an der Plasmamembran.....	109
4.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	110
5.	Literaturverzeichnis.....	113
6.	Anhang	119
	Danksagung	146
	Lebenslauf.....	147

Abkürzungsverzeichnis

35S	Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor 35S
°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
μF	Mikrofarad
μE	Mikroeinstein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
cDNS	komplementäre DNS
cm	Zentimeter
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia-0
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
dai	<i>days after imbibition</i> (Tage nach dem Auslegen)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
FAM	6-Carboxyfluorescein
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSDA	Guanosindeaminase
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRM	<i>High Resolution Melt-Analyse</i>
IMP	Inosinmonophosphat
JOE	6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock out</i> (Verlustmutante)
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LP	Ladepuffer
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Murashige Skoog

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
<i>N. bethamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NSH	Nukleosidhydrolase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
<i>R. radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelbasenaustausch)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	TBS mit Tween-20
T-DNS	Transfer-DNS
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UOX	Uratoxidase
UpM	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ureidpermease
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

XMP	Xanthosinmonophosphate
XMPP	XMP-Phosphatase
YEB	<i>yeast extract broth</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der Purin- und Pyrimidinnukleotide.....	2
Abbildung 1.2: Purinnukleotidmetabolismus in <i>A. thaliana</i>	5
Abbildung 1.3: Pyrimidinnukleotidmetabolismus in <i>A. thaliana</i>	8
Abbildung 1.4: Allelfrequenz der Einzelbasenaustausche (SNPs) in 66 Individuen einer segregierenden Suppressor-Kartierungspopulation im <i>uox</i> Hintergrund.....	12
Abbildung 1.5: Phylogenetische Analyse von UPS-Proteinen.....	15
Abbildung 2.1: Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder der Firma Thermo Scientific.....	24
Abbildung 2.2: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).....	25
Abbildung 3.1: Charakterisierung der <i>A. thaliana</i> T-DNS-Insertionslinien <i>AtUPS1</i> (At2g03590), <i>AtUPS2</i> (At2g03530), <i>AtUPS4</i> (At2g03520) und <i>AtUPS5</i> (At1g26440).....	55
Abbildung 3.2: Aminosäuresequenzvergleich der beiden Suppressoren mit <i>AtUPS1</i>	57
Abbildung 3.3: Topologiekarte von <i>AtUPS1</i>	58
Abbildung 3.4: Keimlingsetablierung der Suppressoren.....	59
Abbildung 3.5: Keimlingsetablierung der <i>AtUPS</i> -Transporter 2, 4 und 5.....	60
Abbildung 3.6: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in verschiedenen Mutanten.....	61
Abbildung 3.7: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in Einzel- und Doppelmutante von <i>AtUPS4</i>	62
Abbildung 3.8: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in Einzelmutanten.....	63
Abbildung 3.9: Harnsäuregehalte in Samen von Col-0, Einzel- und Doppelmutanten des Purinkatabolismus im <i>uox</i> -Hintergrund.....	64
Abbildung 3.10: Harnsäuregehalte in Samen von Col-0, <i>uox</i> , <i>ups1 x uox</i> und der Kreuzung <i>ups1/uox x uox/uox</i>	65
Abbildung 3.11: Schmelzkurven nach <i>High Resolution Melt</i> -Analyse (HRM) bei CRISPR-Pflanzen.....	67
Abbildung 3.12: CRISPR-Ereignisse nach Analyse der zweiten Generation im Sequenzierer.....	68
Abbildung 3.13: <i>A. thaliana</i> Pflanzen unter Stickstoffmangel.....	69

Abbildung 3.14: Allantoatgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	71
Abbildung 3.15: Allantoingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	72
Abbildung 3.16: Dihydrouracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	73
Abbildung 3.17: Harnsäuregehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	74
Abbildung 3.18: Uracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	75
Abbildung 3.19: Xanthingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	76
Abbildung 3.20: Xanthingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	77
Abbildung 3.21: Allantoatgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	78
Abbildung 3.22: Allantoingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	79
Abbildung 3.23: Dihydrouracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	80
Abbildung 3.24: Harnsäuregehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	81
Abbildung 3.25: Uracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	82
Abbildung 3.26: Uracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	83
Abbildung 3.27: Xanthingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus.....	84
Abbildung 3.28: Xanthingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	85
Abbildung 3.29: Subzelluläre Lokalisation von UPS1-mCherry in <i>N. benthamiana</i>	86
Abbildung 3.30: Western Blot des Fusionsproteins UPS1-mCherry.....	87
Abbildung 3.31: Subzelluläre Lokalisation 2 von UPS1-mCherry in <i>N. benthamiana</i>	88
Abbildung 3.32: Embryonale Entwicklungsstadien in <i>A. thaliana</i>	88

Abbildung 3.33: UPS1-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von <i>A. thaliana</i>	89
Abbildung 3.34: UPS1-Promotor-Aktivität in verschiedenen Geweben von <i>A. thaliana</i>	90
Abbildung 3.35: UPS1-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von <i>A. thaliana</i>	91
Abbildung 3.36: UPS2-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von <i>A. thaliana</i>	92
Abbildung 3.37: UPS2-Promotor-Aktivität in Blättern und Wurzeln von <i>A. thaliana</i>	93
Abbildung 3.38: UPS2-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von <i>A. thaliana</i>	93
Abbildung 3.39: UPS4-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von <i>A. thaliana</i>	94
Abbildung 3.40: UPS4-Promotor-Aktivität in Blättern von <i>A. thaliana</i>	94
Abbildung 3.41: UPS4-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von <i>A. thaliana</i>	95
Abbildung 3.42: UPS5-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von <i>A. thaliana</i>	96
Abbildung 3.43: UPS5-Promotor-Aktivität in Blättern von <i>A. thaliana</i>	97
Abbildung 3.44: UPS5-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von <i>A. thaliana</i>	98
Abbildung 4.1: Schematisches Modell mit Funktionen und Lokalisationen der UPS-Transporter von <i>A. thaliana</i>	112
Abbildung 6.1: Sequenzvergleich von 112 UPS-Proteinen aus 46 Pflanzenarten....	139
Abbildung 6.2: Aminosäurevergleich von AtUPS1 (At2g03590), AtUPS2 (At2g03530), AtUPS3 (At2g03600), AtUPS4 (At2g03520) und AtUPS5 (At1g26440).....	140
Abbildung 6.3: Schematische Übersicht der Herstellung der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-Methode.....	141
Abbildung 6.4: Allantoat- und Allantoingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col 0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	142
Abbildung 6.5: Dihydrouracil- und Uracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	143
Abbildung 6.6: Allantoat-, Allantoin- und Dihydrouracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, <i>uox</i> , Suppressoren, <i>ups</i> -Einzel- und Mehrfachmutanten ohne <i>uox</i> -Mutanten.....	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Gele.....	21
Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien zur Anzucht von Bakterien.....	22
Tabelle 2.4: Antibiotika.....	23
Tabelle 2.5: Extraktionskits.....	23
Tabelle 2.6: Verwendete Ligasen und Polymerasen.....	25
Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide.....	26
Tabelle 2.8: Antikörper.....	31
Tabelle 2.9: Verwendete Vektoren.....	32
Tabelle 2.10: Verwendete Bakterienstämme.....	33
Tabelle 2.11: Verwendete Verlustmutanten.....	33
Tabelle 2.12: Verwendete Mehrfachmutanten.....	34
Tabelle 2.13: Verwendete transgene Linien.....	35
Tabelle 2.14: DNase Behandlung.....	37
Tabelle 2.15: Ansatz und Programm für die cDNS-Synthese.....	37
Tabelle 2.16: Ansatz für die Standard-PC.....	39
Tabelle 2.17: Programm zur Amplifizierung.....	40
Tabelle 2.18: Ansatz für die Kolonie-PCR.....	41
Tabelle 2.19: Programm für die Kolonie-PCR.....	41
Tabelle 2.20: Ansatz für den Restriktionsverdau... ..	42
Tabelle 2.21: Ansatz für die Ligation.....	42
Tabelle 2.22: Zusammensetzung der Düngelösung ohne Stickstoff.....	45
Tabelle 2.23: Oligonukleotid-Vorgaben für die High Resolution Melt-Analyse.....	48
Tabelle 2.24: Ansatz für die HRM-PCR.....	49
Tabelle 2.25: Ansatz für die Analyse im Sequenzierer.....	50
Tabelle 2.26: Einstellungen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	52
Tabelle 2.27: Einstellungen der Binärpumpe.....	53
Tabelle 2.28: Ionenquelleninformationen des Massenspektrometers.....	53

Tabelle 2.29: Einstellungen der MS/MS-Methode im positiven Modus.....	54
Tabelle 2.30: Einstellungen der MS/MS-Methode im negativen Modus.....	54
Tabelle 6.1: Auswahl der UPS-Proteine aus 46 Pflanzenarten für den Sequenzvergleich.....	118

1. Einleitung

1.1 Pflanzen und die Bedeutung von Stickstoff im Stoffwechsel

Pflanzen sind eine besondere Gruppe von Arten, die sich durch vielerlei Faktoren von Menschen und Tieren unterscheiden. Der größte Unterschied liegt ganz offensichtlich in der fehlenden Fortbewegung, die es letztgenannten ermöglicht, sich nicht nur vor Feinden zu schützen, sondern auch ihre Nahrung zu sammeln. Pflanzen können nicht vor Fressfeinden fliehen, müssen die für ihr Wachstum notwendigen Nährstoffe direkt aus ihrer unmittelbaren Umgebung beziehen und sind somit stark von den Bodenbedingungen abhängig.

Für Wachstum und Reproduktion ist Stickstoff essenziell, da er ein wichtiger Baustein für viele zentrale Metabolite ist. In Proteinen ist er ein Bestandteil der Aminogruppe von Aminosäuren. Stickstoff kann auch in der Seitenkette von Aminosäuren enthalten sein. Chlorophyll ist etwa aus Pyrrolringen aufgebaut, in deren Ringsystem ein Stickstoffatom enthalten ist. Auch pflanzliche Kofaktoren wie Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Flavinadenindinukleotid (FAD) enthalten ebenso Stickstoff wie Alkaloide. Als Baustein der Purine und Pyrimidine, die vier bzw. zwei Stickstoffatome im Ring aufweisen, ist Stickstoff nicht zuletzt für den Aufbau der RNS und DNS essentiell. Zu den Purinen zählen Adenin, Guanin, Xanthin und Hypoxanthin. Die Nucleobasen Thymin, Uracil und Cytosin gehören zur Gruppe der Pyrimidine (Abb. 1.1), die aus einem sechsgliedrigen heterocyclischen aromatischen Amin mit zwei Stickstoffatomen bestehen. Die Purine setzen sich wiederum aus einem Pyrimidin und Imidazol zusammen, wobei der Doppelring insgesamt vier Stickstoffatome enthält.

Purine und Pyrimidine sind über eine N-glykosidische Bindung mit dem C1-Atom einer Pentose, genauer Ribose oder 2-Desoxyribose, verknüpft und bilden ein Nucleosid. Ist das Nucleosid am C5-Atom mit einem bis drei Phosphatresten verknüpft, wird dieses als Nucleotid bezeichnet. Je nach Anzahl der Phosphatgruppen liegen Nucleosidmonophosphate, Nucleosiddiphosphate oder Nucleosidtriphosphate vor (Abb. 1.1).

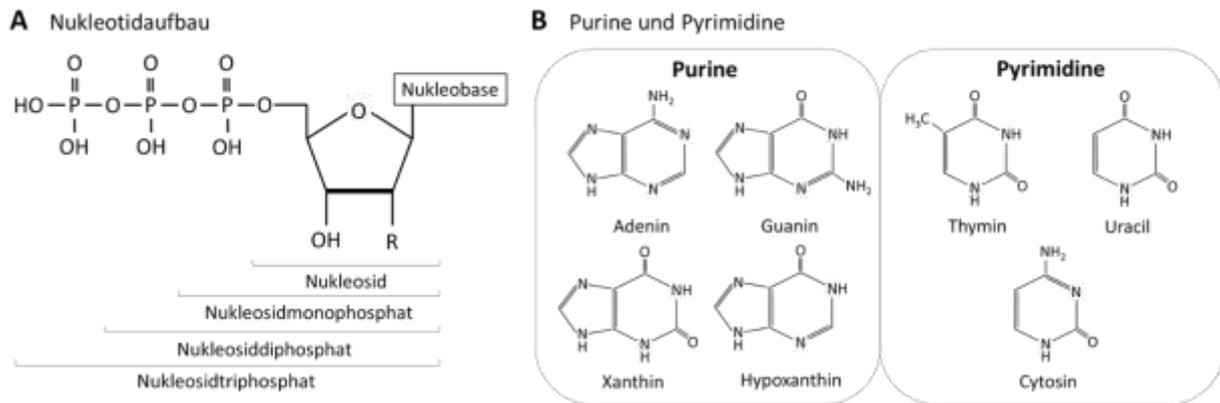


Abbildung 1.1: Aufbau der Purin- und Pyrimidinnukleotide. A: Der allgemeine Nukleotidaufbau. Das Nucleosid besteht aus einer Base und einer Desoxyribose (R = H) oder Ribose (R = OH). Nucleotide umfassen Nucleosidmono-, Nucleosiddi- und Nucleosidtriphosphate. **B:** Purine und Pyrimidine. Adenin, Guanin, Xanthin und Hypoxanthin gehören zur Gruppe der Purine und Thymin, Uracil sowie Cytosin zu den Pyrimidinen.

Pflanzen sind in der Lage Stickstoff aus altem Gewebe zu remobilisieren und diesen in junges wachsendes Gewebe zu transportieren. Für diese Neuverteilung kann Stickstoff aus Proteinen, die den größten Stickstoffspeicher bilden, aber auch durch den Abbau der DNS bzw. RNS aus Nucleotiden remobilisiert werden. Bei diesem Abbauprozess werden Purine und Pyrimidine vollständig abgebaut (Zrenner *et al.*, 2006), wobei die Stickstoffatome in Form von Ammonium freigesetzt werden und für die de-novo-Synthese von Biomolekülen wiederverwendet werden (Werner und Witte, 2011).

1.2 Purinnucleotidbiosynthese

Die Biosynthese des Purinrings von Adenin und Guanin beginnt durch Anhängen einer Diphosphatgruppe am C1-Atom von Ribose-5-Phosphat, das aus dem Pentosephosphatweg stammt. Unter ATP-Verbrauch entsteht dabei 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP). Die Synthesewege von Purinbasen und

Pyrimidinbasen spalten sich beim PRPP auf. Bei der Purinsynthese wird der Purinring schrittweise durch Anhängen von einzelnen Bausteinen an Ribose-5-Phosphat aufgebaut. Dafür sind insgesamt zehn Reaktionsschritten bis zum Inosinmonophosphat (IMP) erforderlich (Traut *et al.*, 1996; Zrenner *et al.* 2006). Im ersten Schritt entsteht 5-Phosphoribosylamin durch Austausch der Diphosphatgruppe gegen eine Aminogruppe. Für den Aufbau des Purinrings des IMPs werden insgesamt ein Glycin, zwei Formylgruppen aus Tetrahydrofolat (THF), die Amid-Aminogruppe aus einem Glutamin, ein Hydrogencarbonation, die Aminogruppe aus einem Aspartat sowie vier ATP benötigt. Ab dieser Stelle verzweigt sich die Biosynthese von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Durch den Ersatz des Sauerstoffatoms am IMP gegen eine Aminogruppe von Aspartat entsteht das Nukleotid AMP unter GTP-Verbrauch. Für die Bildung des GMP aus IMP wird zunächst durch Oxidation des IMP ein zweites Sauerstoffatom eingeführt. Es entsteht Xanthosinmonophosphat (XMP). Das Sauerstoffatom wird dann unter ATP-Verbrauch gegen eine Aminogruppe aus der Amidseitenkette von Glutamin ausgetauscht. Der Energieaufwand für die Synthese von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) ist sehr hoch, da für AMP sieben und für GMP acht energiereiche Bindungen benötigt werden. Deshalb erfolgt eine Inhibition der Ausgangssubstanzen über Rückkopplung der gebildeten Produkte IMP, AMP und GMP (Stasolla *et al.*, 2003). Die Synthese des GMP aus IMP findet in Pflanzen im Cytosol statt, während die Synthese des AMP weiter in den Plastiden abläuft.

1.3 Pyrimidinnukleotidbiosynthese

Die Pyrimidinbiosynthese findet in den Plastiden, den Mitochondrien und im Cytosol statt (Zrenner und Ashihara, 2011). Die Biosynthese des Pyrimidinrings der drei Nucleobasen Uracil, Cytosin und Thymin beginnt mit der Synthese von Carbamoylphosphat aus Hydrogencarbonat und der Amid-Aminogruppe des Glutamin unter ATP-Verbrauch (Zrenner *et al.*, 2006; Nara *et al.*, 2000). In drei weiteren Reaktionsschritten wird aus Carbamoylphosphat und Aspartat Orotat synthetisiert, das bereits den Pyrimidinring enthält. Anschließend wird Orotat zuerst in Orotidine 5'-Monophosphat (OMP) und im nächsten Schritt in Uridinmonophosphat (UMP)

umgewandelt. Die Synthese der Pyrimidine verzweigt sich hier in Richtung Cytosin und Thymin. Zur Synthese von Cytidintriphosphat (CTP) wird UMP zunächst zweifach zu Uridintriphosphat (UTP) phosphoryliert, welches dann zu CTP aminiert wird.

1.4 Purinnukleotidabbau und –recycling

Der Abbau der Purinnukleotide lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: Im ersten verzweigten Teil des Purinnukleotidabbaus werden Nukleosidmonophosphate zur Oxopurinbase Xanthin abgebaut. Dabei werden (Desoxy-) Ribose sowie Phosphat freigesetzt. Im zweiten Teil wird der Purinring von Xanthin unter Freisetzung von Ammoniak und Kohlenstoffdioxid zu Glyoxylat abgebaut.

Wie in Abbildung 1.2 ausführlich dargestellt sind Adenosin, Adenin, Guanosin und Guanin die Ausgangspunkte des Abbauweges. Adenosin wird zunächst durch die Adenosinkinase zu Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt und dann schrittweise dephosphoryliert. Dabei ist zwischen dem biosynthetischen Weg, also der Synthese von Guanosinmonophosphat (GMP) aus AMP, und dem katabolischen Weg (dem Abbau von AMP) zu unterscheiden. Nach der Desaminierung von AMP zu Inosinmonophosphat (IMP) durch die AMP-Deaminase wird IMP im Folgenden durch die IMP-Dehydrogenase zu Xanthosinmonophosphat (XMP) dephosphoryliert, da von IMP aus der Abbauweg nicht direkt begonnen wird (Baccolini und Witte, 2019). GMP entsteht dann durch die GMP-Synthetase aus XMP. Die Phosphatasen von IMP, XMP und GMP wurden bisher bei Arabidopsis *in vivo* noch nicht entdeckt (Witte und Herde, 2020). Im katabolischen Weg wird GMP dann zum Nukleosid Guanosin abgebaut (Dahncke und Witte, 2013). Durch das cytosolische Enzym Guanosindeaminase erfolgt die Desaminierung zu Xanthosin. Durch eine bisher noch nicht beschriebene XMP-Phosphatase kann XMP unter Abspaltung eines Phosphatrests zum Nukleosid Xanthosin dephosphoryliert werden (Baccolini und Witte 2019). Kürzlich durchgeführte Studien legen nahe, dass dieser Weg jedoch nur minimal zum Xanthosin-Pool beiträgt. Shelp und Atkins (1983) beschreiben etwa die Dephosphorylierung von XMP in Knöllchen von Leguminosen. Der Hauptweg führt über den Abbau von GMP zu Guanosin.

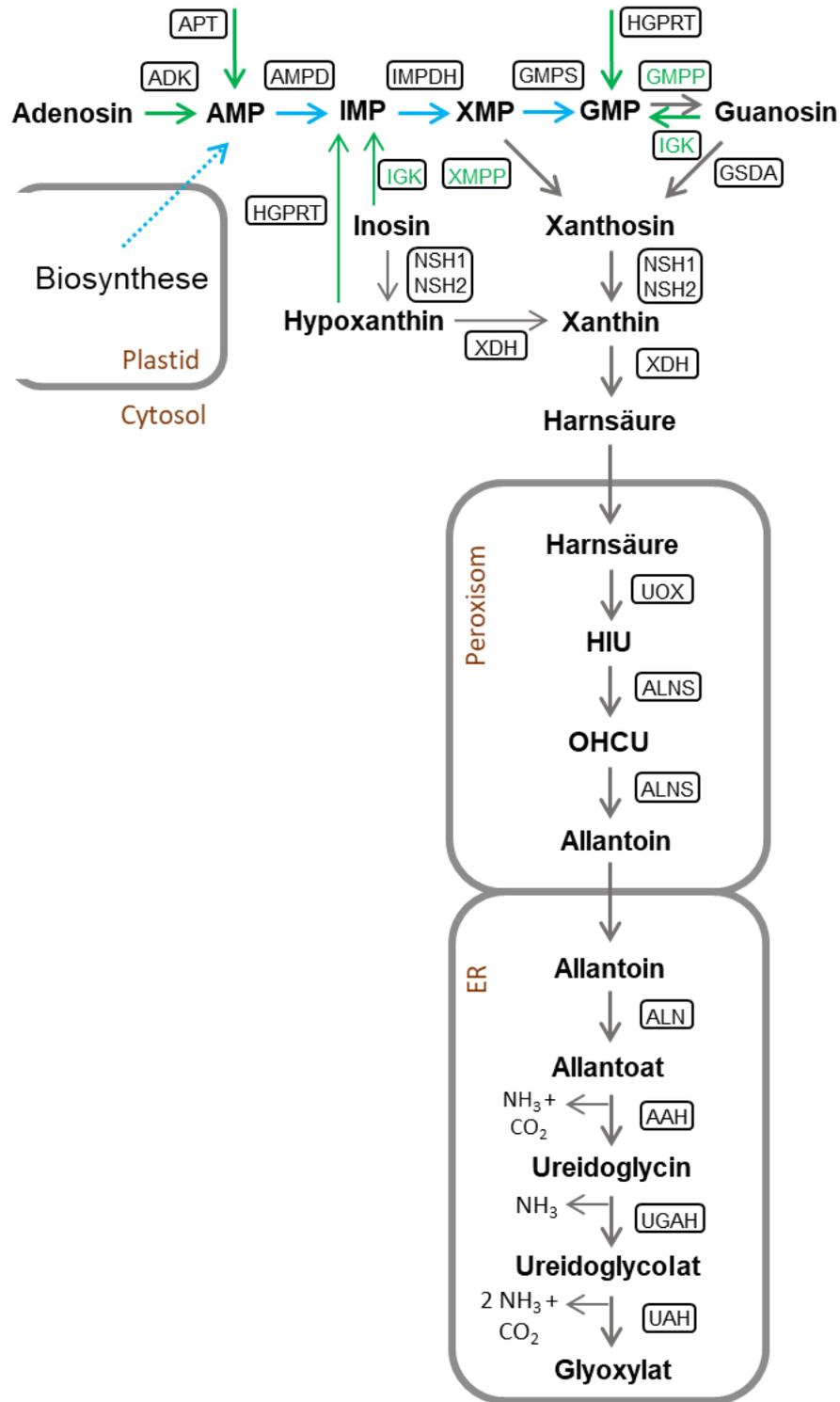


Abbildung 1.2: Purinnukleotidmetabolismus in *A. thaliana*. ADK: Adenosinkinase; APT: Adeninphosphoribosyltransferase; AMPD: Adenosinmonophosphat-Desaminase; IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase; XMP: Xanthosinmonophosphat; GMPS: Guanosinmonophosphat-Synthetase; GMPD: 5'-Nucleotidase; HIU: 5-Hydroxyisourat; OHCU: 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin; IGK: Inosin-Guanosin-Kinase; GSDA: Guanosindeaminase; XMPP: XMP-Phosphatase; HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; NSH1:

Nucleosidhydrolase 1; NSH2: Nucleosidhydrolase 2; XDH: Xanthin-Dehydrogenase; UOX: Harnsäureoxidase; HIU: 5-Hydroxyisourat; ALNS: Allantoin-Synthase; OHCU: 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin; ALN: Allantoinase; AAH: Allantoatamidohydrolase; UGAH: Ureidoglycinaminohydrolase; UAH: Ureidoglykolatamidohydrolase. Grüne Pfeile: Rückgewinnung; graue Pfeile: Katabolismus; blau Pfeile: Katabolismus und Biosynthese (modifiziert nach Zrenner *et al.*, 2009; Werner und Witte, 2011; Baccolini und Witte, 2019).

Im weiteren linearen Verlauf wird Xanthosin durch den Nucleosidhydrolasekomplex NSH1/NSH2 zu Xanthin abgebaut (Dahnke *et al.*, 2013; Baccolini und Witte, 2019). Durch die Hydrolase wird bei diesem Schritt aus den Nucleosiden durch Abspaltung von D-Ribose die Nucleobase freigesetzt (Jung *et al.*, 2009 und 2011; Riegler *et al.*, 2011). Auch kann der NSH1/2-Komplex die Hydrolyse von Inosin zu Hypoxanthin bewirken. Dieser Weg hat jedoch laut Baccolini und Witte (2019) nur einen geringen Einfluss auf den Xanthinpool. Hypoxanthin kann dann im Folgenden durch das Enzym Xanthin-Dehydrogenase (XDH) zu Xanthin umgewandelt werden.

XDH oxidiert Xanthin schließlich zu der toxischen Harnsäure, die in Pflanzen im Gegensatz zu Menschen und Tieren nicht als Endprodukt des Stoffwechsels ausgeschieden werden kann (Smith und Atkins, 2002; Zrenner *et al.*, 2006; Brychkova *et al.*, 2008; Dahncke und Witte, 2013). Über bisher unbekannte Transporter wird die Harnsäure zum weiteren Abbau in die Peroxisomen transportiert. Im weiteren Verlauf wird die Harnsäure durch das Enzym Uratoxidase (UOX) in 5-Hydroxyisourat (HIU) umgewandelt. Die Allantoin synthase katalysiert die Reaktion von HIU in Allantoin (Kahn *et al.*, 1998; Ramazzina *et al.*, 2006; Hauck *et al.*, 2014). Der weitere Abbau von Allantoin erfolgt nach dem Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) (Werner und Witte 2011). Wie die Intermediate des Abbaus in die entsprechenden Kompartimente transportiert werden, ist bisher noch ungeklärt. Im ER katalysiert die Allantoinase die Öffnung des Imidazolrings von Allantoin (Werner *et al.*, 2008). Das entstandene Allantoat wird im Folgenden zunächst mittels der Allantoatamidohydrolase unter Freisetzung von Ammoniak zu Ureidoglycin umgesetzt (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Die Ureidoglycinaminohydrolase und die Ureidoglykolatamidohydrolase bauen Ureidoglycin ebenfalls unter Freisetzung von Am

moinak erst zu Ureidoglycolat und dann zu Hydroxyglycin ab, das sofort zu Glyoxylat und Ammoniak zerfällt (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Durch diesen Abbauweg werden alle vier Ringstickstoffe des Purinrings als Ammoniak-Moleküle freigesetzt.

Da die Synthese von Nucleobasen einen hohen Energieaufwand bedeutet, gibt es als Alternative zu dem beschriebenen Abbau für die Purinbasen Wiederverwertungsreaktionen, die zusammenfassend als *salvage pathway* (Rückgewinnung) bezeichnet werden. Durch diese Reaktionen werden Adenin, Guanin und Hypoxanthin vor dem Abbau bewahrt und stattdessen mit PRPP wieder in Nucleotide überführt, um erneut verwendet zu werden.

1.5 Abbau der Pyrimidine

Der Abbau der Pyrimidinnucleotide beginnt mit der Dephosphorylierung von Uridinmonophosphat (UMP) und Cytidinmonophosphat (CMP) durch noch unbekannte Nucleotidasen zu Uridin und Cytidin. Die Umwandlung von Cytidin in Uridin erfolgt durch die Cytidineaminase. Im nachfolgenden Schritt entsteht dann, katalysiert durch das Enzym NSH1, Uracil durch Hydrolyse und unter Abspaltung von Ribose (Jung *et al.*, 2009). In den Plastiden wird Uracil anschließend zu Dihydrouracil reduziert. Dieses wird über noch unbekannte Dihydrouracil-Transporter in das endoplasmatische Retikulum transportiert. In der nachfolgenden Reaktion wird der Pyrimidinring des Dihydrouracils hydrolytisch geöffnet und über die Zwischenstufe Ureidopropionat schließlich unter Abspaltung von CO₂ und Ammoniak im Cytosol zu β-Alanin umgewandelt (Zrenner und Ashihara, 2011).

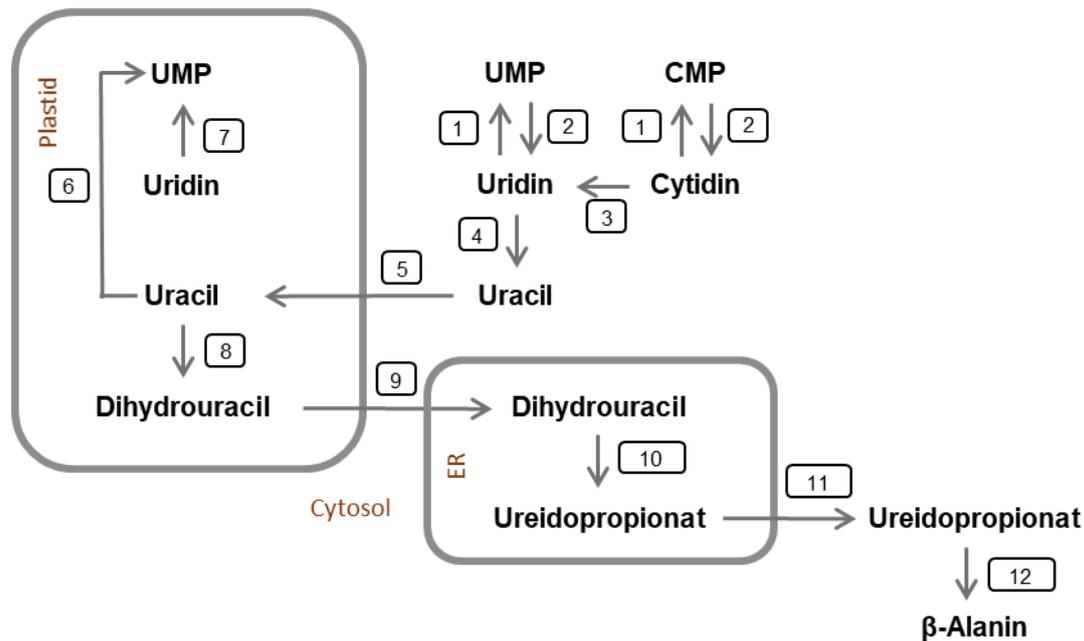


Abbildung 1.3: Pyrimidinnucleotidmetabolismus in *A. thaliana*. 1: Pyrimidin-spezifische 5'-Nucleotidase; 2: Uridin/Cytidin-Kinase; 3: Cytidineaminase (CDA); 4: Nucleosidhydrolyase 1 (NSH1); 5: Plastid-Uracil-Translokator (PLUTO); 6: Uracilphosphoribosyltransferase (UPP); 7: Uridinkinase (UKL1 und UKL2); 8: Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (PYD1); 9: Dihydrouracil-Transporter; 10: Dihydropyrimidinase (PYD2); 11: Ureidopropionat / Ureidoisobutyrat-Transporter; 12: Ureidopropionase (PYD3). Modifiziert nach Zrenner *et al.* (2006) und Chen *et al.* (2016).

1.6 Die Uratoxidase und die Folgen bei Funktionsverlust

Im Gegensatz zu Pflanzen endet beim Menschen wie auch bei einigen Primaten, Vögeln sowie Reptilienarten der Abbauweg der Purinnucleotide mit dem Endprodukt Harnsäure, welches überwiegend mit dem Urin ausgeschieden wird (Wu *et al.*, 1992). Grund hierfür ist eine schrittweise Mutation des *UOX*-Gens zu einem funktionslosen Gen im Laufe der Evolution (Wu *et al.*, 1992; Oda *et al.*, 2002; Álvarez-Lario und Macarrón-Vicente, 2010).

Die Harnsäure zeigt eine Ketoenoltautomerie. Die Enolform ist eine schwache Säure. Nach Dissoziation liegt sie als Urat-Anion vor. Wird etwa beim Menschen zu wenig Harnsäure ausgeschieden oder zu viel gebildet, spricht man von einer Hyperurikämie. Dann kann es zu Ablagerungen von Natrium-Urat in Gelenkflüssigkeiten, Bindegewebe und peripheren Gelenken kommen. Dies ist von Entzündungsschüben und starken Schmerzen begleitet, eine Symptomatik, die als Gicht bekannt ist (Rock *et al.*, 2013).

In Pflanzen wird die Harnsäure wie unter 1.2 beschrieben in weiteren Reaktionen zu Glyoxylat, Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut. Ist das Enzym Uratoxidase gestört bzw. blockiert, akkumuliert die Harnsäure. Die Anhäufung der Harnsäure im Samen von *A. thaliana* hat drastische Auswirkungen auf die Keimungsrate. Diese ist stark vermindert. Eine Etablierung des Keimlings ist nicht möglich, da die Keimblattentwicklung blockiert wird. Auch eine Primärwurzel bildet sich nicht aus. Gekeimte Samen erreichen nur das Zweiblattstadium und können keinen Sämling ausbilden, was zum Absterben des Keimlings führt. Hintergrund ist ein lokaler Defekt in den Peroxisomen, in denen der Abbau der Speicherfette stattfindet. In der Verlustmutante der Uratoxidase ist die peroxisomale β -Oxidation von freien Fettsäuren in Samen teilweise defekt, sodass es zu einer Akkumulation von freien Fettsäuren im Samen kommt, da die Speicherlipide in den Kotyledonen nicht abgebaut werden können (Hauck *et al.*, 2014).

Durch Zugabe von Saccharose während der Etablierung des Keimlings können Mutanten mit fehlerhafter Speicherlipidmobilisierung und Lipidoxidation oder teilweise beeinträchtigtem peroxisomalem Proteinimport grüne Keimblätter ausbilden und sich folglich zu einer phänotypisch unauffälligen Pflanze entwickeln (Footitt *et al.*, 2006; Khan and Zolman, 2010). Im Falle der *uox*-Verlustmutante kann durch Zugabe von Saccharose ein Keimling etabliert werden. Die stark verminderte Keimungsrate wird dadurch nicht beeinflusst.

Die Ursache des drastischen Phänotyps der *uox*-Mutante ist aber nicht der fehlerhafte Purinkatabolismus, sondern die erhöhte Harnsäurekonzentration im Embryo (Hauck *et al.*, 2014). Ist neben der Uratoxidase zusätzlich auch die Xanthindehydrogenase defekt, kommt es weder zu einer verminderten Keimungsrate noch zu Schwierigkeiten bei der Etablierung des Keimlings. Harnsäure kann in der *xdh* x *uox* Doppelmutante nicht mehr gebildet werden. Stattdessen sammelt sich Xanthin an. Das angereicherte Xanthin akkumuliert zwar in ähnlichen Mengen wie die Harnsäure in der *uox*-Mutante,

es hat aber keine toxische Wirkung (Hauck *et al.* 2014). Folglich supprimiert die *xdh*-Mutante den *uox*-Phänotyp. Auch andere Mutation von Genen deren Produkte Reaktionen katalysieren, die der Uratoxidase im Stoffwechsel vorgeschaltet sind, wie beispielsweise die *gsda*-Verlustmutante können Suppressoren von *uox* sein, da es bei vollständiger Blockierung nicht zu einer Akkumulation von Harnsäure kommen kann. Generell können Suppressormutationen sehr nützlich sein, um regulatorische oder katalytische Komponenten bzw. Funktionen biochemischer Pfade zu definieren und somit neue Erkenntnisse zu erlangen.

1.7 Suppressoren von *uox*

Um weitere Suppressoren der *uox*-Mutante zu finden, wurde eine EMS-Mutagenese im Vorfeld dieser Doktorarbeit durchgeführt. Neben den bekannten Suppressoren wie XDH, GSDA, NSH1 und NSH2 sollten weitere Suppressoren gefunden werden, die eine erhöhte Toleranz gegenüber der Harnsäure haben. Diese könnten beispielsweise die Akkumulation der Harnsäure im Samen unterdrücken oder es finden sich weitere Gene für Enzyme dieses Stoffwechselweges oberhalb der Uratoxidase oder regulatorische Gene, die für die Expression des Purinnukleotidkatabolismus wichtig sind.

Ethylmethansulfonat (EMS) ist eine mutagene organische Verbindung, die durch Nukleotidsubstitution zufällige Mutationen im genetischen Material erzeugt. Aus den mutagenisierten Samen wurden insgesamt 5700 Pflanzen (M1) in 528 Gruppen auf halbkonzentriertem MS-Medium mit Saccharose angezogen. Nach Selbstung wurde die M2-Generation ohne Saccharose und zugleich mit Zugabe von 75 mM NaCl im Medium angezogen und phänotypisch selektiert. Auf diesen Medien konnten folglich nur Suppressormutanten der Uratoxidase wachsen. Das Salz hat zudem einen verstärkenden Effekt auf den *uox*-Phänotyp, indem es die Keimung erschwert. Die bekannten Suppressorkontrollen wie die *xdh-uox* Doppelmutante sind davon jedoch nicht betroffen.

Um die überlebenden Pflanzen aus dieser Generation von den bereits bekannten Suppressoren zu unterscheiden, wurde sowohl der Xanthin- und Harnsäuregehalt gemessen als auch die Aktivität der XDH in einem XDH-Aktivitätstest überprüft. Mit

Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR wurde, sofern keine Unterschiede in der XDH-Aktivität zum Wildtyp festgestellt wurden, das Expressionsniveau der Gene der bekannten Suppressoren untersucht. Von den vier gefundenen Suppressoren wurden die kodierenden Sequenzen kloniert und sequenziert. Bei zwei Suppressoren wurde eine Mutation der Xanthindehydrogenase festgestellt, während bei den beiden verbliebenen Suppressoren kein schon bekanntes Gen getroffen wurde. Bei der ersten Mutante war keine mRNA der XDH vorhanden. Im zweiten Fall konnte ein Basenaustausch im hochkonservierten Glycin der Molybdän-Kofaktor-Bindedomäne der XDH nachgewiesen werden. Durch die Punktmutation der Base G3635 zu A erfolgte ein Austausch der Aminosäure Glycin zu Glutamat an Position 1212.

Nachkommen der beiden unbekanntenen Suppressoren wurden auf eine Uricase-Mutante zurückgekreuzt (Parentallinie) und zeigten den *uox*-Phänotyp. Die Suppressor-Mutation ist damit rezessiv.

Die auf die Parentallinie zurückgekreuzten Suppressorlinien wurden durch Zugabe von Zucker zu adulten Pflanzen angezogen, geselbstet und für die segregierenden Populationen wurde jeweils eine Kartierungspopulation erstellt. Dazu wurden die Samen wieder auf halbkonzentriertem MS-Medium ohne Saccharose ausgelegt und gepoolte DNA von 66 überlebenden Individuen der ersten sowie 51 Individuen der zweiten Suppressorlinie durch *Next Generation*-Sequenzierung analysiert.

In Abbildung 1.4 ist die Allelfrequenz der Einzelbasenaustausche (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in der ersten segregierenden Suppressor-Kartierungspopulation im *uox*-Hintergrund dargestellt. Als Referenz für die mittels *Next Generation*-Sequenzierung analysierten Fragmente diente das Genom von Col-0 (TAIR10). Bei der Kartierung wurden die Position der SNPs sowie die Häufigkeit der Sequenzfragmente, die einen bestimmten SNP enthielten, bestimmt. Für beliebige SNPs wird eine Häufigkeit von durchschnittlich 50% in der Population erwartet, während solche SNPs, die in direktem Zusammenhang mit der Suppression stehen oder hieran eng gekoppelt vorliegen, mit einer höheren Häufigkeit von bis zu 100% erwartet werden. Nach Ausschluss der SNPs, die in beiden Linien identisch auftraten, d.h. die bereits in der Elternlinie im Vergleich zum Col-0 Referenzgenom vorhanden waren, wurden insgesamt 526 SNPs identifiziert, die durch die EMS-Mutagenese ausgelöst wurden. Die Abbildungen 1.4 A bis E zeigen für die erste Suppressor-Kartierung die Allelfrequenz und die Position auf den fünf Chromosomen. Dabei zeigte sich eine Häufung von überrepräsentierten SNPs auf Chromosom 2. Abbildung 1.4 F

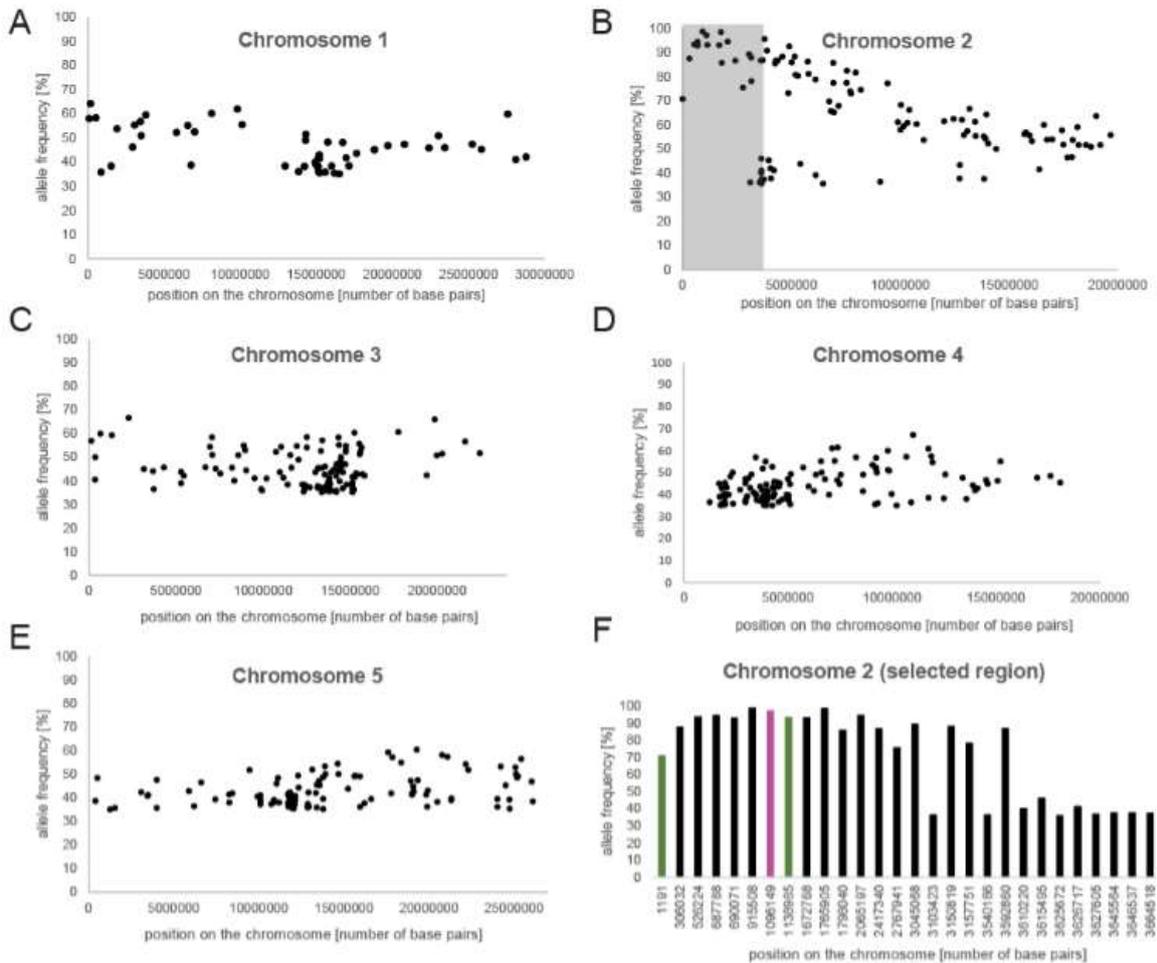


Abbildung 1.4: Allelfrequenz der Einzelbasenaustausche (SNPs) in 66 Individuen einer segregierenden Suppressor-Kartierungspopulation im *uox*-Hintergrund. Die sequenzierten Fragmente (*short reads*) der über *Next Generation*-Sequenzierung sequenzierten genomischen DNA der Population wurden mit Hilfe des Arabidopsis Referenzgenoms (TAIR 10) kartiert. Die Position von SNPs und die Häufigkeit der Sequenzfragmente, die einen bestimmten SNP enthielten, wurden bestimmt. Insgesamt wurden 526 durch die EMS-Mutagenese ausgelöste SNPs identifiziert, die durch mindestens 50 Sequenzfragmente abgesichert waren. Die Allelfrequenz und die Position auf jedem Chromosom wurde graphisch aufgetragen (A bis E) und eine Region auf Chromosom 2 (schattiert in B) mit höherer Auflösung dargestellt (F). Hier sind SNPs, die in einem Protein zu einem Aminosäureaustausch führen, farbig dargestellt. Grün: die Position 1191 in At2g01008 (Thr56Ile) und die Position 1138985 in At2g03730 (Val131Ile); magenta: die Position 1096149 in At2g03590 (Ala231Val in der Ureidpermease 1).

zeigt an dieser Stelle die genaue Analyse der drei Mutationsereignisse, von denen zwei fast zu 100% vorliegen und eine Veränderung der Aminosäuresequenz hervorrufen. Bei dem ersten handelt es sich um das ACT Domain Repeat Protein 5 (ACR5, At2g03730), das einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin zeigt. Laut Hsieh und Goodman (2002) enthalten die acht ACR-Proteine an dieser Stelle variabel Leucin, Valin und Isoleucin. Eine Funktionseinschränkung des Proteins wegen dieser Mutation ist deshalb nicht wahrscheinlich.

Bei dem zweiten Mutationsereignis mit fast 100% liegt ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin in der 6. Transmembranhelix der Ureidpermease 1 (UPS1) vor. Der Austausch von Alanin zu Valin legt eine Funktionseinschränkung nahe, da an dieser Stelle in der UPS-Proteinfamilie nur die Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin und Glycin vorkommen.

Die zweite Suppressorlinie ergab bei der genetischen Kartierung keine deutlich überrepräsentierten SNPs, da mögliche Suppressor-Pflanzen anscheinend nicht eindeutig genug identifiziert werden konnten.

In einer zweiten genetischen Sichtung der Mutantenpopulation wurde eine weitere *ups1*-Mutante als möglicher Suppressor identifiziert.

1.8 Die Familie der Ureidpermeasen

Die bei der genetischen Sichtung gefundenen möglichen Punktmutationen lassen vermuten, dass UPS1 im Purinkatabolismus eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Ureidpermease 1 gehört zu einer Superfamilie von polytopischen Membranproteinen (Desimone *et al.*, 2002). Diese sind Transporter heterozyklischer Stickstoffkomponenten aus der Familie der *drug/metabolite transporter* (DMT) (Desimone *et al.*, 2002; Rentsch *et al.*, 2007). Zu der Membranfamilie zählen in *A. thaliana* fünf Gene, die als *AtUPS1* (At2g03590), *AtUPS2* (At2g03530), *AtUPS3* (At2g03600), *AtUPS4* (At2g03520) und *AtUPS5* (At1g26440) bekannt sind (Desimone *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2004). Während die ersten vier Gene auf Chromosom 2 in einem Cluster liegen, ist letzteres auf dem 1. Chromosom lokalisiert. Bei *AtUPS3* sind große Bereiche konservierter Stellen nicht mehr vorhanden, sodass es sehr wahrscheinlich seine Genexpression oder seine Fähigkeit

für ein Protein zu kodieren verloren hat und daher als Pseudogen zumindest in Bezug auf eine UPS-Funktion eingestuft wird.

Neben den UPS-Transportern in *A. thaliana* wurden weitere Studien in anderen Spezies durchgeführt. In der grünen Bohne (*Phaseolus vulgaris*) wurde ein UPS-Transporter biochemisch als Allantoin-Transporter charakterisiert (Pelissier, 2004). In Sojabohne wurden zwei UPS-Transporter gefunden deren Funktion als Allantoin- und Allantoat-Exporter aus Knöllchen beschrieben wurde (Collier und Tegeder, 2012). Eine in unserem Labor durchgeführte phylogenetische Analyse von 112 UPS-Sequenzen von 46 verschiedenen Spezies zeigt, dass in diversen anderen Pflanzen UPS-Proteine zu finden sind (siehe Tabelle 6.1 im Anhang). Während viele Pflanzenarten nur einen UPS-Transporter aufweisen, zeigen die Familien der Gräser, Moose und Leguminosen zwei Unterfamilien. Bei den Brassicaceae sind sogar drei Unterfamilien vorhanden, die möglicherweise verschiedene Funktionen in der Pflanze haben. Die Erdbeere (*Fragaria vesca*) besitzt hingegen gar keinen UPS-Transporter. Daher ist mindestens ein UPS-Transporter in fast allen Pflanzen notwendig, während in manchen Pflanzenfamilien eine weitere funktionelle Diversifizierung vorzuliegen scheint.

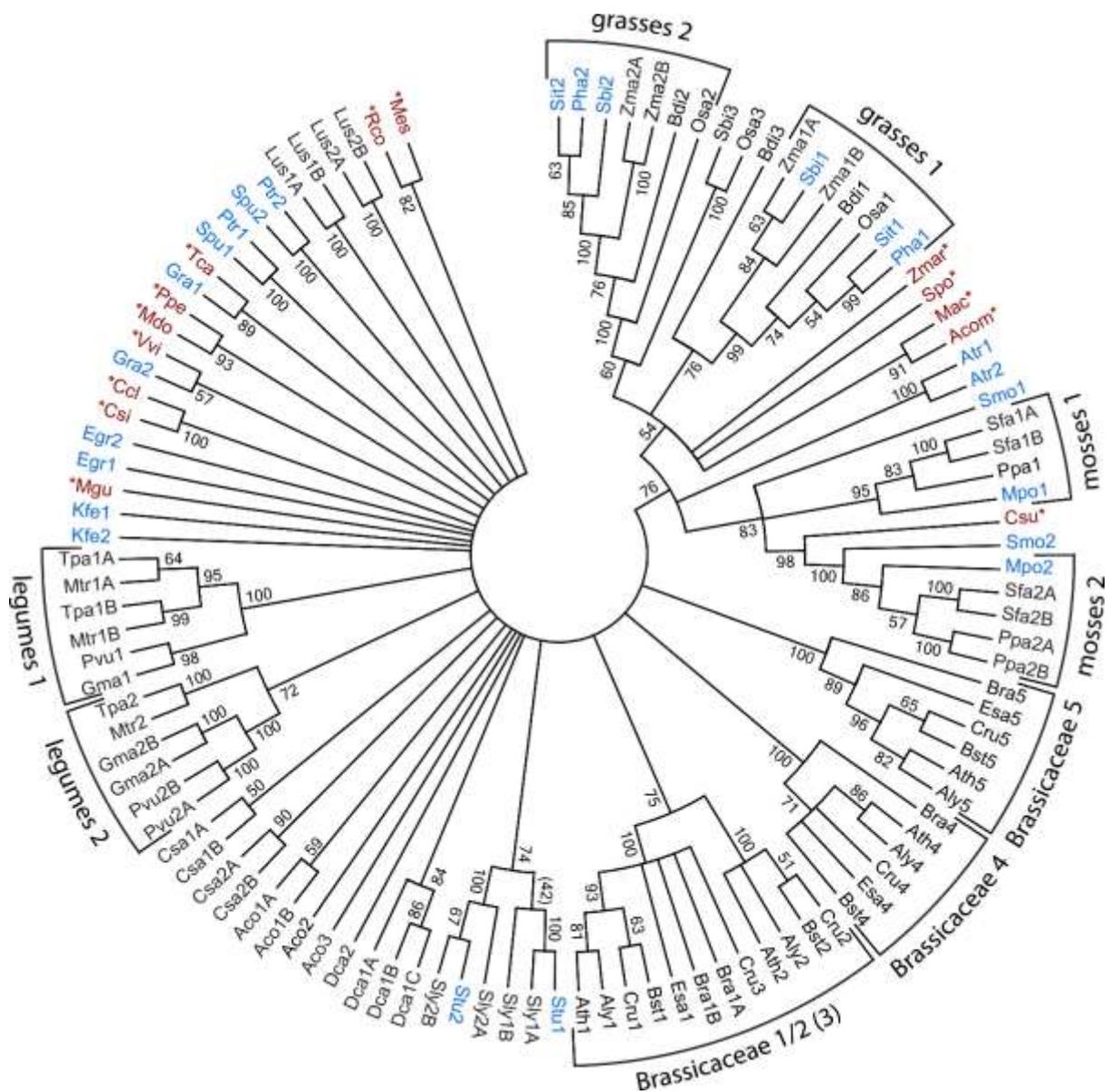


Abbildung 1.5: Phylogenetische Analyse von UPS-Proteinen. Aus der Phytozome Datenbank wurden 112 UPS-Sequenzen von 46 Pflanzenspezies heruntergeladen und analysiert (Multiples Alignment mit MUSCLE und phylogenetische Analyse mit MEGA7). Äste mit weniger als 50% Bootstrap-Unterstützung wurden zusammengeführt. Rotes Symbol: Nur ein *UPS*-Gen vorhanden; Blaues Symbol: zwei *UPS*-Gene vorhanden; Schwarzes Symbol: Mehr als zwei *UPS*-Gene vorhanden. Für die Gräser, die Mose, die Leguminosen und die Brassicaceae konnten mehr als eine *UPS*-Gruppe identifiziert werden. Die Gruppen sind entsprechend gekennzeichnet.

Die Struktur der UPS-Proteine lässt sich in 10 putative Transmembrandomänen unterteilen, die je eine große zytosolische Domäne mit einem „Walker A“-Motiv für

ATP-Bindung enthalten (Desimone *et al.*, 2002). Erste Studien zu AtUPS1 in Hefe und *Xenopus* Oozyten von Krallenfröschen zeigten, dass die polytopen Membranproteine in einem protonengekoppelten Transport (Protonengradient) verschiedene heterocyclischer Stickstoffverbindungen transportieren (Schmidt *et al.*, 2004). In weiteren Versuchen wurden die Substratspezifitäten sowie die Expression von AtUPS1, AtUPS2 und AtUPS5 untersucht. Da alle genannten Transporter Oxoderivate von heterozyklischen Stickstoffkomponenten transportieren, sind die Substratspektren ähnlich aber dennoch nicht völlig identisch. Neben Allantoin, Cytosin, Hydantoin und Thymin nehmen AtUPS1 und AtUPS2 auch Uracil, Dihydrouracil, 5-Fluorouracil, Harnsäure und Xanthin als Substrat (Schmidt *et al.*, 2004). Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin und Xanthosin sind dagegen keine Substrate der beiden Transporter (Schmidt *et al.*, 2004). In einem weiteren Experiment mit Oozyten fanden Schmidt *et al.* (2004) zudem heraus, dass AtUPS1 und AtUPS2 eine deutlich höhere Affinität für Uracil gegenüber Allantoin zeigten. In Komplementationsexperimenten in *S. cerevisiae* konnten Hefezellen, die einen Defekt in der Allantoin- bzw. Uracilaufnahme zeigten, nach Zugabe von Allantoin bzw. Uracil ohne Einschränkungen normal wachsen und wurden folglich als Transporter für Allantoin und Uracil deklariert (Desimone *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004).

Weitere Studien von Schmidt *et al.* (2006) in Hefe zeigten, dass AtUPS5 ebenfalls heterozyklische Stickstoffkomponenten wie Allantoin, Uracil und Xanthin transportiert. AtUPS5 transportiert im Gegensatz zu UPS1 und UPS2 Allantoin mit höherer Affinität als Uracil, was auf einen möglichen Funktionsunterschied *in vivo* hindeutet.

Publizierte Daten aus Promotor-GUS-Studien zeigen eine starke Induktion von AtUPS1 am Beginn der Keimungsentwicklung. Diese nimmt jedoch in den folgenden Tagen (bis Tag 5 nach Keimungsbeginn) stetig ab. UPS2 wird dagegen erst ab Tag 3 langsam hochreguliert und wird besonders an Tag 9 nach Keimungsbeginn stark exprimiert (Schmidt *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Promotor-GUS-Studien in Keimlingen von *A. thaliana*. Außer in der Wurzelspitze ist AtUPS1 an Tag 2 nach Keimungsbeginn im gesamten Keimling exprimiert. Nach wenigen Tagen ist eine Expression nur noch im Hypokotyl und in den Hydathoden zu beobachten. Im Gegensatz zu UPS1 wird UPS2 zunächst nur in den Kotyledonen (Tag 2) und ab Tag 5 auch in den Wurzeln exprimiert (Schmidt *et al.*, 2004). Weitere Promotor-GUS Studien von Schmidt *et al.* (2004) in etwa sechs Wochen alten Pflanzen zeigten die Expression

von *UPS2* in der Blattspreite, dem Stiel und dem Stängel sowie in Trichomen, Blüten und dem Stigma während *UPS1* nicht exprimiert wird.

Da *AtUPS5* in kortikalen Zellen und in der Endodermis von Wurzeln exprimiert wird, ist dieser Transporter vermutlich für den Ferntransport von Allantoin von der Wurzel zum Spross verantwortlich (Schmidt *et al.*, 2006; Lescano, 2016). *AtUPS5* wird ab Tag 5 in der Wurzel und ab Tag 13 in älteren Blättern exprimiert. Weiterhin kann in transgenen Linien eine GUS-Färbung in vaskulärem Gewebe von jüngeren Blättern, in Blüten und in der Blattspreite sowie dem Stiel von älteren Blättern beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 2006). In weiteren Arbeiten von Winter *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass *AtUPS1*, 2 und 5 in seneszenten Blättern stark hochreguliert sind. Auch unter Stickstoffmangel ist die Expression von *AtUPS1* und *AtUPS5* signifikant erhöht (Desimone *et al.*, 2002; Lescano *et al.*, 2016).

In weiteren Studien anderer Mitglieder der UPS-Familie, wie *PvUPS1* aus der grünen Bohne und *GmUPS1-1* und *GmUPS1-2* aus Sojabohnen (*Glycine max*) konnte gezeigt werden, dass diese für den symplasmatischen Transport und die Xylembeladung von Allantoin in Knöllchen verantwortlich sind (Pelissier, 2004 und 2007; Collier und Tegeder, 2012). In Leguminosen wie Sojabohne und grüne Bohne sind die Ureide Allantoin und Allantoat das Vehikel für den Langstrecken-Stickstofftransport von symbiotisch fixiertem Stickstoff.

1.9 Ziel der Arbeit

Die bei der genetischen Sichtung gefundenen Suppressormutanten, in denen die Suppression möglicherweise durch Mutation von *UPS1* ausgelöst wurde, sollten bestätigt und weiter analysiert werden. Dazu wurde eine Linie mit einer T-DNS-Insertion in *UPS1* in den *uox*-Hintergrund gekreuzt und die Doppelmutante auf Suppression des *uox*-Phänotyps untersucht. Da Mutationen in *UPS1* den *uox*-Phänotyp unterdrücken, wurden in diesem Zusammenhang auch die anderen UPS-Transporter sowie deren Doppelmutanten mit *uox* phänotypisch und biochemisch untersucht. Dazu wurden Kreuzungen generiert und genotypisiert. Da die UPS-Familie in Brassicaceae gegenüber anderen Spezies deutlich diverser ist und eine mögliche funktionelle Redundanz vorliegt, sollten auch Mehrfachmutanten der UPS-

Transporter analysiert werden. Solche wurden durch Kreuzungen von T-DNA Linien sowie mittels CRISPR/Cas9 erzeugt. In bisherigen Studien wurden für UPS1, UPS2 und UPS5 die Substratspezifitäten nur in Hefe- oder Oozyten-Experimenten getestet. Um die *in vivo* Substrate der einzelnen Transporter zu ermitteln, wurde die Analyse relevanter Metabolite aus Samen und Blättern von *A. thaliana* für die Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie etabliert. Damit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden uniforme Samen- und Pflanzensätze mehrfach angezogen. Die Lokalisation der UPS-Transporter mittels Promotor-GUS-Studien wurde in bisherigen Studien nur teilweise und überwiegend in Sämlingen und sehr jungen Pflanzen durchgeführt. Die Analyse von Promotor-GUS-Pflanzen, die in dieser Arbeit generiert wurden, soll Aufschluss über die Expression der einzelnen Transporter in verschiedenen Geweben von jungen und alten Pflanzen sowie während der embryonalen Entwicklung im Samen geben. Darüberhinaus wurde die subzelluläre Lokalisation von UPS1 mittels eines internen mCherry-Markers erforscht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Bayer AG (Leverkusen), Biomol GmbH (Hamburg), Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie (Amsterdam), GE Healthcare (Freiburg), Macherey-Nagel (Düren), Merck KGaA (Darmstadt), Nippon Genetics Europe GmbH (Düren), Promega (Madison, WI, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) und VWR International (Radnor, PA, USA) bezogen und entsprachen analytischem Reinheitsgrad.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Für die Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese, PCR, DNS- und Proteinextraktion aus Pflanzengewebe, Metabolitextraktion aus Blättern und Samen für die Massenspektrometrie und die GUS-Färbung wurden die unter Tab. 2.1 aufgeführten Puffer und Lösungen nach angegebener Zusammensetzung genutzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Einsatz
10 x TAE-Puffer	20 mM Tris-HCL; 10 mM Essigsäure	Agarose- Gelelektrophorese
1% Agarose	Agarose in 1 x TAE-Puffer	Agarose- Gelelektrophorese

dNTP-Mix	2,5 mM dGTP; 2,5 mM dCTP; 2,5 mM dATP; 2,5 mM dTTP	PCR
Extraktionspuffer 1	200 mM Tris HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 7,5	DNS-Extraktion aus Pflanzengewebe
Extraktionspuffer 2	1 x SDS-LP	Proteinextraktion aus Pflanzengewebe
Extraktionspuffer 3	10 mM NH ₄ Ac pH 8,5	Metabolitextraktion aus Blättern und Samen
5 x SDS-Probenpuffer	10% SDS; 300 mM Tris HCl (pH 6,8); 50% Glycerin; 0,04% Bromphenolblau; 500 mM DTT	Proteinextraktion aus Pflanzengewebe
Laufpuffer (1 x)	250 mM Tris Base; 1,92 M Glycerin	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Blotting Buffer (10 x)	58,15 g/L Tris; 30,03 g/L Glycin; 1,44 g/L SDS; pH 9,2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS (10 x)	1 M Tris pH 7,5; 5 M NaCl pH 7,6 (mit HCL)	Immunfärbung
TBS-T	1 x TBS; 0,1% Tween20	Immunfärbung
Blockierungslösung	5% Milchpulver in TBS-T	Immunfärbung
Substratpuffer	100 mM Tris Base; 0,5 mM MgCl ₂ (pH 9,2)	Immunfärbung
Substrat	30 mg/mL NBT in 70% DMF 10 mg/mL BCIP in 100% DMF in Substratpuffer gelöst	Immunfärbung

GUS-Farbelösung	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 0,2% (v/v) Triton X-100 1 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) 1 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) 2 mM X-Gluc in DMF	GUS-Färbung
Infiltrationspuffer	10 mM MES pH 5,6; 10 mM MgCl ₂ 150 µM Acetosyringon	Infiltration von <i>N. benthamiana</i>

2.1.3 Gele

In Tabelle 2.2 sind die Gele sowie deren Zusammensetzung aufgeführt, die zur Gelelektrophorese und für den Western Blot verwendet wurden.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Gele

Gel	Zusammensetzung	Einsatz
Agarosegel	1% Agarose; 1 µL Midori Green / 50 mL Agarose	Gelelektrophorese
Sammelgel	125 mM Tris-HCl (pH 6.8); 4% (w/v) Acrylamid : Bis-acrylamid (37.5 : 1); 0.1% (w/v) SDS; 0.1% (w/v) APS1; 0.1% (w/v) TEMED	SDS-Page
Trenngel	375 mM Tris-HCl (pH 8.8); 10% (w/v) Acrylamid : Bis-acrylamid (37.5 : 1); 0.1% (w/v) SDS; 0.075% (w/v) APS; 0.05% (w/v) TEMED	SDS-Page

2.1.4 Kultur- und Anzuchtmedien

Für die Anzucht von Bakterienstämmen wurden LB- und YEB-Medien verwendet. Halbkonzentriertes MS-Medium kam für die Anzucht von *A. thaliana* zum Einsatz. Die Medien wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren bei 1 bar und einer Temperatur von 121°C für 20 min sterilisiert. Für Festmedium musste vor dem Autoklavieren noch Agar-Agar hinzugegeben werden. Die genaue Zusammensetzung für feste und flüssige Medien ist Tab. 2.3 zu entnehmen. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 40°C unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien zur Anzucht von Bakterien

Medium	Zusammensetzung	Einsatz
LB	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl, pH 7,0 (mit NaOH); 1,5% (w/v) Agar-Agar (bei Festmedium)	Anzucht von <i>E. coli</i>
YEP	0,5% (w/v) Fleischextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) Pepton; 0,5% (w/v) Saccharose; 2 mM MgSO ₄ , pH 7,2 (mit NaOH); 1,5% (w/v) Agar-Agar (bei Festmedium)	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>
½ MS	10 x Makroelemente; 10 x KNO ₃ ; 100 x Eisensulfat; 100 x Mikroelemente; MES (pH 5,7 mit KOH); 0,8% (w/v) Phytoagar (bei Festmedium)	Anzucht von <i>A. thaliana</i>

2.1.5 Antibiotika

Für die Kulturmedien wurden als Selektion die in Tab. 2.4 aufgeführten Antibiotika genutzt. Weiterhin sind die Konzentrationen der Stamm- und Arbeitslösung angegeben sowie das Lösungsmittel des Antibiotikums.

Tabelle 2.4: Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung (mg mL⁻¹)	Arbeitskonzentration (µg mL⁻¹)	Lösungsmittel
Ampicillin	100	50	H ₂ O
Carbenicillin	50	50 bzw. 75	H ₂ O
Gentamycin	15	15	H ₂ O
Kanamycin	50	50	H ₂ O
Rifampicillin	50	50	DMSO

2.1.6 Extraktionskits

Für die Extraktion von RNS aus Pflanzengewebe, Plasmid-DNS aus einer Bakterienflüssigkultur, die Aufreinigung von Plasmid-DNS aus einem Agarosegel und die Klonierung von PCR-Produkten wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Laborkits verwendet.

Tabelle 2.5: Extraktionskits

Art der Aufreinigung	Name des Kits	Hersteller
Extraktion von RNS aus Pflanzengewebe	NucleoSpin™ RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

Extraktion von Plasmid-DNS aus einer Bakterienflüssigkultur	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
Aufreinigung von Plasmid-DNS aus einem Agarosegel	NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Klonierung von PCR-Produkten	CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific

2.1.7 DNA-Größenstandards

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde der Längenstandard *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* (Abb. 2.1.1) von Thermo Scientific verwendet, um die Größe der aufgetrennten DNS-Fragmente zu bestimmen.

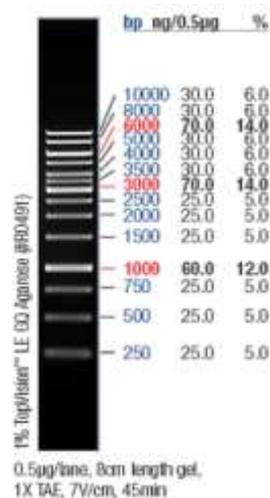


Abbildung 2.1: *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* der Firma Thermo Scientific

2.1.8 Protein-Größenstandard

Bei der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde der Protein-Größenstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (Abb. 2.1.2) verwendet, um die Größe der Proteine abzuschätzen.

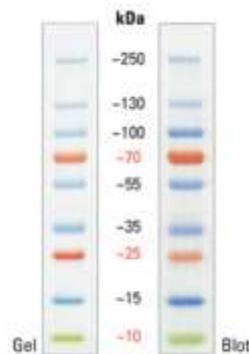


Abbildung 2.2: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

2.1.9 Ligasen und Polymerasen

In Tab. 2.6 sind die verwendeten Ligasen und Polymerasen aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Ligasen und Polymerasen

Name	Konzentration	Hersteller	Einsatz
T4 DNA Ligase	400,000 Units/mL	NEB	Ligation eines Inserts in Vektor
Phusion High Fidelity (HF) DNA polymerase	2000 Units/mL	NEB	Klonierung von PCR-Fragmenten
Taq-DNA-Polymerase	keine Angabe	laborintern	PCR

2.1.10 Oligonukleotide

In Tab. 2.7 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt, welche durch die Firma Merck KGaA (Darmstadt) hergestellt werden. Bei der Oligonukleotid-Nummer handelt es sich um ein internes Nummernsystem des Instituts für Pflanzenernährung.

Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz	Verwendung
1033	Actin2 F	GTGAACGATTCCTG GACCTGCCTC	Amplifikation von Aktin
1034	Actin2 R	GAGAGGTTACATGT TCACCACAAC	Amplifikation von Aktin
1233	At2g26230 E4R	AGTAGAGCTAGTCC TCCAATACCG	Uricase (At2g26230) reverse Primer in Exon 4
1886	At2g26230E1F2	GATACAAGGCGAAA TCGATCTTC	Amplifikation von T-DNS- Insertionen von Uricase
N0061	SALK LB a1	TGGTTCACGTAGTG GGCCATC	um SALK T-DNS-Linien zu screenen, bindet nahe der linken Grenze (437 bp in T- DNS)
N0400	At2g03590F	GAGGAGCAATTGCA TGTATGCTC	T-DNS screen für UPS1, At2g03590
N0401	At2g03590R	CCGATAACAACAGT GATACTAGCTGTG	T-DNS screen für UPS1, At2g03590
N0402	At2g03530F	GATGATAAGATCAAC AAAGCCGAGATC	T-DNS screen für UPS2, At2g03530
N0403	At2g03530R	TCTGTTCCATTGATC GTTAGTGGC	T-DNS screen für UPS2, At2g03530
N0404	At2g03520F	TGAATTATTTCTTGG ACAACAAG	T-DNS screen für UPS4, At2g03520
N0405	At2g03520R	CGAACAGCGTTATG AATAGTC	T-DNS screen für UPS4, At2g03520

N0406	At1g26440F1	CGATGATGATAGCT CAAGAATTGG	T-DNS screen für UPS5, At1g26440
N0407	At1g26440R1	GCACTCTTCAGGGG TCACAG	T-DNS screen für UPS5, At1g26440
N0408	At1g26440F2	CTCTGGTGTGGTT GCTTCATG	T-DNS screen für UPS5, At1g26440
N0409	At1g26440R2	GTGAGAACAATGAG AAAGAAAGTCCTG	T-DNS screen für UPS5, At1g26440
N0444	At2g03530F2	GCTCAACCTTGA ACTATTCTTG	um UPS2-Mutanten zu screenen
N0445	At2g03530R2	GAAGAATGCTGTGT AAACGACTAG	um UPS2-Mutanten zu screenen
N0448	At2g03590E1F	ATGATTTTTATAAGT ATATAAAAGAG	Amplifikation von UPS1 in genetischer Sichtung
N0449	At2g03590E6R	GATCCTTTTAGCAGT TTAAC	Amplifikation von UPS1 in genetischer Sichtung
N0450	At2g03590E1F2	TCCATGGAAAATGT ATATGATAGAGAGC AAAGGAG	Klonierung von UPS1, enthält NcoI Schnittstelle
N0451	At2g03590E6R2	TGAATTCATTTTCTA TGTCCCGAGG	Klonierung von UPS1, enthält EcoRI Schnittstelle
N0452	At2g03590g	TGGCGCGCCACTAC ATCAAGATTATTG	Klonierung von genomischen UPS1- Fragment mit Promotor für Komplementation, enthält Ascl Schnittstelle
P344	At_UPS2_gR1-F	TAGGTCTCCTTTTCC CCGGTGGTTTTAGA GCTAGAA	CRISPR für At2g03530.1
P345	At_UPS2_gR1-R	ATGGTCTCAAAAAG GATCTCGTGCACCA GCCGGGAA	CRISPR für At2g03530.1

P346	At_UPS2_gR2-F	TAGGTCTCCAACAG GCCACACGTTTTAG AGCTAGAA	CRISPR für At2g03530.1
P347	At_UPS2_gR2-R	ATGGTCTCATGTTTC TTGATCTGCACCAG CCGGGAA	CRISPR für At2g03530.1
P348	At_UPS4_gR1-F	TAGGTCTCCTCCTA GGCGCTGGTTTTAG AGCTAGAA	CRISPR für At2g03520.1
P349	At_UPS4_gR1-R	ATGGTCTCAAGGAA AACAGCGTGCACCA GCCGGGAA	CRISPR für At2g03520.1
P350	At_UPS4_gR2-F	TAGGTCTCCTACCG TCGTCATGTTTTAGA GCTAGAA	CRISPR für At2g03520.1
P351	At_UPS4_gR2-R	ATGGTCTCAGGTAAT GCTTGCTGCACCAG CCGGGAA	CRISPR für At2g03520.1
P352	At_UOX_gR1-F	TAGGTCTCCATCGG CTCTCGGGTTTTAGA GCTAGAA	CRISPR für At2g26230.1
P353	At_UOX_gR1-R	ATGGTCTCACGATCT CCACATTGCACCAG CCGGGAA	CRISPR für At2g26230.1
P354	At_UOX_gR2-F	TAGGTCTCCTGTCTC CATCGAGTTTTAGAG CTAGAA	CRISPR für At2g26230.1
P355	At_UOX_gR2-R	ATGGTCTCAGACAC GCTCCCATGCACCA GCCGGGAA	CRISPR für At2g26230.1
P381	mcs_oligo_V98_ sense	CGCGCCCCTGCAGG CACTCTGTGGACAC GAAGTGGC	fügt die Sfbl- und Dralli- Schnittstellen in V98 hinzu

P382	mcs_oligo_V98_anti	GGCCGCCACTTCGT GTCCACAGAGTGCC TGCAGGGG	fügt die SfbI- und DraIII-Schnittstellen in V98 hinzu
P511	CRISPR_insert_seq _sense	GCCCATTTAAGTTGA AAACA	Sequenzierung von CRISPR-Vektor + Insert; bessere Version von P-307
P512	CRISPR_insert_seq _anti	AAACACCGGTCTAG ACGC	Sequenzierung von CRISPR-Vektor + Insert; bessere Version von P-308
P759	mCherry_sense_ BstBI	TTTCGAAAAAATGGT GAGCAAGGGCGAG GA	forward Primer für Klonierung von mCherry, enthält BstBI Schnittstelle
P760	mCherry_anti_BstBI	TTTCGAACTTGTACA GCTCGTCCAT	reverse Primer für Klonierung von mCherry, enthält BstBI Schnittstelle
P814	CRISPR_UPS2_ M13_for	GTAAAACGACGGCC AGTCATAGGTTAGAT CATGAAGT	CRISPR-Primer für UPS2 mit M13-Sequenz
P815	CRISPR_UPS2_rev	GCCTTGTTATCGTCT GCATTGGATC	CRISPR-Primer für UPS2
P816	CRISPR_UPS4_ M13_for	GTAAAACGACGGCC AGTGATAATTGGCC GTCGGTATTGCTTG	CRISPR-Primer für UPS4 mit M13-Sequenz
P817	CRISPR_UPS4_rev	TGAACCGCAGCGCC TAGGAA	CRISPR-Primer für UPS4
P818	CRISPR_UOX_M13 _for	GTAAAACGACGGCC AGTTGGTCTTAGAGT CATTCTAG	CRISPR-Primer für UOX mit M13-Sequenz
P819	CRISPR_UOX_rev	CCATGTAAATGTGGT TTTCCATCGA	CRISPR-Primer für UOX
P1093	UPS1_fw_Ndel	TCATATGTATATGAT AGAGAGCAAAGGAG	Klonierung von UPS1 + mCherry in V50, enthält Ndel Schnittstelle

P1539	CRISPR_UPS4_for	GATAATTGGCCGTC GGTATTGCTTG	CRISPR-Primer für UPS4
P1540	CRISPR_UOX_for	TATATCCTAGTGTCT GACAAATGTTTTA	CRISPR-Primer für UOX
P1743	AT2G03520_guide2 _seq_M13_fwd	GTAAAACGACGGCC AGTAGTCGCAGGCG GTGTGCTTCTTAG	zur Sequenzierung von Guide 2 in UPS4
P1744	AT2G03520_guide2 _seq_rev	TGTTGTACCTATAAA ATTCAACCGT	zur Sequenzierung von Guide 2 in UPS4
P1745	AT2G03520_guide1 _seq_M13_fwd	GTAAAACGACGGCC AGTACGGTTGAATTT TATAGGTACAACA	zur Sequenzierung von Guide 1 in UPS4
P1746	AT2G03520_guide1 _seq_rev	AGCAACATCTTAGTT TGTCTCAGCT	zur Sequenzierung von Guide 1 in UPS4
P1747	AT2G26230_guide1 _seq_M13_fwd	GTAAAACGACGGCC AGTCTGTTCTTATTC ATGGTTATATCCTAG	zur Sequenzierung von Guide 1 in UOX
P1748	AT2G26230_guide1 _seq_rev	ATATATCCAATTGCT TACTAAAAAAG	zur Sequenzierung von Guide 1 in UOX
P1749	AT2G26230_guide2 _seq_M13_fwd	GTAAAACGACGGCC AGTTCACCTTAAAGA TGTTTTATTCATT	zur Sequenzierung von Guide 2 in UOX
P1750	AT2G26230_guide2 _seq_rev	CCTTCAAACAAAAG ATTGATT	zur Sequenzierung von Guide 2 in UOX
P1839	AT2G03530_Guide 1 und 2_HRM_for	CTTTCAGGCTCAAC CTTGA	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G03530 (Guide 1 und 2), forward
P1840	AT2G03530_Guide 1 und 2_HRM_rev	ATGAACTGCTGAAC CAAGA	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G03530 (Guide 1 und 2), reverse
P1841	AT2G26230_Guide 1_HRM_for	TCCTAGTGTCTGACA AATGT	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G26230 (Guide 1), forward

P1842	AT2G26230_Guide 1_HRM_rev	GCAAAAGTGTTTCC CAATA	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G26230 (Guide 1), reverse
P1843	AT2G26230_Guide 2_HRM_for	CAGGTATTTACTGCT ATCG	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G26230 (Guide 2), forward
P1844	AT2G26230_Guide 2_HRM_rev	CCAGAAAAAAGTGT CAGAAC	für CRISPR-HRM Analyse von AT2G26230 (Guide 2), reverse

2.1.11 Antikörper

Für die Immunfärbung wurde als erster Antikörper anti-mCherry und als zweiter Antikörper anti-Maus mit alkalischer Phosphatase verwendet. Die verwendeten Antikörper sowie Konzentration und Hersteller sind Tab. 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8: Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Hersteller	Verwendete Konzentration
anti-mCherry	mCherry	abcam	1:10000
anti-Maus-IgG (ganzes Molekül), konjugiert an alkalische Phosphatase	Mouse IgG	sigma	1:10000

2.1.12 Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Verwendete Vektoren

Nummer	Name	Resistenz	Verwendung
keine Nummer	pJet1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific)	Ampicillin	Klonierung von blunt-end PCR-Produkten
V21	pI2 pCPK1-GUS	BASTA ^R	Promotor-GUS Fusion und Expression <i>in planta</i>
V50	pXS1pat	BASTA ^R	Klonierung von mCherry
V98	pXCSnpt-HA-Strep	Kanamycin	Vektor mit Kanamycin-Resistenz für CRISPR-Vektor
V112	pB-CRISPR-35S:GFP	BASTA ^R	CRISPR-Vektor mit BASTA-Resistenz in Pflanzen
V116	pXCSnpt UBI10:CRISPR 35S::GFP	Kanamycin	CRISPR-Vektor mit Kanamycin-Resistenz in Pflanzen

2.1.13 Bakterienstämme

Für die Klonierungsarbeit wurden die in Tabelle 2.10 aufgeführten Bakterienstämme genutzt.

Tabelle 2.10: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Spezies	Eigenschaft	Resistenz
19k	<i>R. radiobacter</i>	elektrokompetent	Rifampicillin, Kanamycin
AGL1	<i>R. radiobacter</i>	elektrokompetent	Carbenicillin
DH10B	<i>E. coli</i>	chemokompetent	keine
GV3101::pMP90RK	<i>R. radiobacter</i>	elektrokompetent	Gentamycin, Kanamycin, Rifampicillin

2.1.14 Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden die Pflanzen *A. thaliana* und *N. benthamiana* verwendet. Die unter Tabelle 2.11 aufgeführten Verlustmutanten wurden vom *European Arabidopsis Stock Centre* bezogen und werden unter einem laborinternen Nummernsystem geführt.

Tabelle 2.11: Verwendete Verlustmutanten

Nummer	Name	Ökotyp	Linie	Referenz
KO10	<i>uox-1</i>	Col-0	SALK131438	Hauck <i>et al.</i> , 2014
KO25	<i>xdh-1</i>	Col-0	GK049D04	Hauck <i>et al.</i> , 2014

KO28	<i>gsda-2</i>	Col-0	GK432D08	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012
KO32	<i>nsh2-1</i>	Col-0	SALK128723	Riegler <i>et al.</i> , 2011
KO34	<i>nsh1-1</i>	Col-0	SALK083120C	Jung <i>et al.</i> , 2011
KO113	<i>ups1</i>	Col-0	SAIL549F06	-
KO114	<i>ups2</i>	Col-0	SALK150805C	-
KO115	<i>ups4</i>	Col-0	GK685C03	-
KO116	<i>ups5</i>	Col-0	SAIL312E09	-

In Tabelle 2.12 sind die verwendeten Mehrfachmutanten aufgeführt.

Tabelle 2.12: Verwendete Mehrfachmutanten

Nummer	Name	Pollenempfänger	Pollenspender
C11	<i>uox-1 xdh1-2</i>	<i>uox-1</i>	<i>xdh1-2</i>
C18	<i>uox1 gsda-2</i>	<i>gsda-1</i>	<i>uox-1</i>
C39	<i>uox-1 nsh1-1</i>	<i>nsh1-1</i>	<i>uox-1</i>
C40	<i>uox-1 nsh2-1</i>	<i>nsh2-1</i>	<i>uox-1</i>
C120	<i>ups1 ups5</i>	<i>ups1</i>	<i>ups5</i>
C121	<i>uox-1 ups1</i>	<i>ups1</i>	<i>uox-1</i>
C125	<i>uox-1 ups2</i>	<i>ups2</i>	<i>uox-1</i>
C126	<i>uox-1 ups4</i>	<i>ups4</i>	<i>uox-1</i>
C127	<i>uox-1 ups5</i>	<i>ups5</i>	<i>uox-1</i>
C239t	<i>uox-1 ups1 ups5</i>	C121	C120

In Tabelle 2.13 sind die verwendeten transgenen Linien aufgeführt.

Tabelle 2.13: Verwendete transgene Linien

Nummer	Name	Hintergrund	Promotor	Gen	Resistenz
H28	<i>pUPS1-GUS</i>	WT	UPS1 Promotor	GUS	BASTA
H30	<i>pUPS2-GUS</i>	WT	UPS2 Promotor	GUS	BASTA
H32	<i>pUPS5-GUS</i>	WT	UPS5 Promotor	GUS	BASTA
H582	<i>pUPS4-GUS</i>	WT	UPS4 Promotor	GUS	BASTA
H470	CRISPR- UPS2	C120	35S	At2g03530	Kanamycin
H471	CRISPR- UPS2-UOX	C120	35S	At2g03530; At2g26230	Kanamycin
H472	CRISPR- UOX	C120	35S	At2g26230	Kanamycin

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNS-Isolation aus Pflanzengewebe

Für die Isolation von DNS aus Pflanzengewebe wurde ein kleines Blatt zusammen mit 5 kleinen Stahlkugeln (Durchmesser 1 mm) und 200 µL Extraktionspuffer 1 für 3 min bei 1/30 s in der Schüttelmühle gemösert. Nach Zugabe von 10 µL 10% SDS wurden die Proben für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden etwa 100 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 75 µL Isopropanol zugegeben und mehrfach invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurde die DNS mit 100 µL 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Durch Zugabe von 500 µL H₂O wurde die DNS gelöst.

2.2.1.2 RNS-Isolation aus Pflanzengewebe

Für die Isolation von RNS aus Pflanzengewebe wurde das NucleoSpin® RNA Plant Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die RNS wurde nach dem beiliegenden Protokoll isoliert.

2.2.1.3 RT-PCR und cDNS-Synthese

Die RT-PCR sowie die cDNS-Synthese wurden wie in Tabelle 2.14 und 2.15 dargestellt durchgeführt.

Tabelle 2.14: DNase Behandlung

Komponente	Volumen
RNS	1 µg in 8 µL
10 x DNase Puffer	1 µL
DNase Enzym	1 µL
37°C für 30 min	
Stop-Lösung	1 µL
65°C für 10 min	

Tabelle 2.15: Ansatz und Programm für die cDNS-Synthese

Komponente	Volumen
RNS (aus DNase Behandlung)	11 µL
Oligo dT	1 µL
H ₂ O	2 µL
70°C für 5 min	
4°C für 5 min	
5 x Puffer	5 µL
2,5 mM dNTPs	1,25 µL
Reverse Transkriptase	1 µL
H ₂ O	3,75 µL
42°C für 60 min; 65°C für 10 min	
4°C für 5 min	

2.2.1.4 Plasmidisololation

Für die Isolation der Plasmid-DNS wurde das Isolationskit GeneJET™ Plasmid-Miniprep-Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNS erfolgte nach dem beiliegenden Protokoll. Es wurden 2 mL einer Bakteriensuspension (Übernachtskultur) eingesetzt. Die Plasmid-DNS wurde in 50 µL H₂O eluiert.

2.2.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Mit dem Extraktionskit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) wurden DNS-Produkte nach der Polymerase-Ketten-Reaktionen aufgereinigt. Das Extraktionskit wurde auch verwendet, um DNS aus einem Agarosegel aufzureinigen.

2.2.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren und der Reinheit der isolierten DNS-Proben erfolgte im NanoPhotometer®. Die Konzentration wurde in ng/µL ausgegeben, das Verhältnis der Werte von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gibt die Reinheit der Proben an. Dazu werden die Absorptionsverhältnisse von A₂₆₀/A₂₈₀ sowie A₂₆₀/A₂₃₀ bestimmt. Der Nullwert wurde mit 3 µL H₂O eingestellt. Von der DNS-Probe wurden ebenfalls 3 µL aufgetragen.

2.2.1.7 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Für die Sequenzierung bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) wurden 1 µg DNS zusammen mit 10 µmol Primer eingeschickt.

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Quantität und Qualität von Nukleinsäuren können nicht nur mittels NanoPhotometer®, sondern auch durch Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden. Die Größe von DNA-Fragmenten wurde durch den Vergleich mit dem in Abb. 2.1.1 aufgeführten Längenstandard ermittelt. Für die Auftrennung der DNS-Fragmente wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel mit Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte bei 120 V und 400 mA für 20 bis 30 min in einer Gelelektrophorese-Kammer. Die nach der Größe aufgetrennten DNS-Fragmente wurden anschließend im mittels UV-Licht visualisiert.

2.2.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.2.1.9.1 Standard-PCR

Für die Amplifizierung von DNS-Fragmenten wurde der Ansatz einer Standard-PCR verwendet. Dieser sowie das dazugehörige PCR-Programm sind in Tab. 2.16 und Tab. 2.17 gezeigt.

Tabelle 2.16: Ansatz für die Standard-PCR

Komponente	Volumen
10 x Thermo Pol Buffer (NEB)	2 µL
10 mM dNTP-Mix	1,6 µL
Primer 1 (4 µm)	1 µL
Primer 2 (4 µm)	1 µL
1-2 ng DNS	5 µL
Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
H ₂ O	<i>ad</i> 20 µL

Tabelle 2.17: Programm zur Amplifizierung

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	30 s
Anlagerung der Primer	55 bis 65°C	30 s
Elongation	72°C	1 min/1000 bp
Finale Elongation	72°C	10 min

Zyklenanzahl für Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation: 25 bis 40

2.2.1.9.2 Kolonie-PCR

Die nach der Hitzeschocktransformation erhaltenen Bakterienkolonien wurden mittels PCR überprüft. Jede zu untersuchende Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze gepickt. Es erfolgte ein Ausstrich auf einer frischen Petrischale mit LB-Festmedium und entsprechendem Antibiotikum zur Kultivierung der jeweiligen Kolonie. Die Pipettenspitze, an der sich noch ein Teil der Kolonie befand, wurde dann in ein mit 15 µL H₂O befülltes Reaktionsgefäß gestellt. Nach ein bis zwei Minuten konnte die Spitze aus der Bakteriensuspension entfernt werden. Alle Bakteriensuspensionen wurden für 5 min bei 94°C gekocht. Für die PCR wurden pro Ansatz 2 µL aufgekochte Bakteriensuspension hinzugegeben. Tab. 2.18 zeigt den entsprechenden Ansatz und Tab. 2.19 das Kolonie-PCR-Programm für den Thermocycler.

Tabelle 2.18: Ansatz für die Kolonie-PCR

Komponente	Volumen
10 x Thermo Pol Buffer (NEB)	2 µL
10 mM dNTP-Mix	1,6 µL
Primer 1 (4 µM)	1 µL
Primer 2 (4 µM)	1 µL
Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
aufgekochte Kolonie	2 µL
H ₂ O	<i>ad</i> 20 µL

Tabelle 2.19: Programm für die Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	30 s
Anlagerung der Primer	55 bis 65°C	30 s
Elongation	72°C	1 min/1000 bp
Finale Elongation	72°C	10 min

Zyklenanzahl für Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation: 25

2.2.1.10 Restriktionsverdau

Um ein Insert in einen Vektor zu klonieren, wurde der in Tabelle 2.20 aufgeführte Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation bei 65°C für 10 min gestoppt.

Tabelle 2.20: Ansatz für den Restriktionsverdau

Komponente	Volumen
10 x CutSmart (NEB)	2 μ L
DNS	1 μ g
Enzym 1 (10 U/ μ L)	0,5 μ L
Enzym 2 (10 U/ μ L)	0,5 μ L
H ₂ O	<i>ad</i> 20 μ L

2.2.1.11 Ligation des Inserts in den Zielvektor

Durch den Restriktionsverdau von Insert und Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen konnte mittels Ligation der gerichtete Einbau des Inserts in den jeweiligen Vektor erfolgen. Der für die Ligation verwendete Ansatz ist in Tab. 2.21 aufgeführt. Der Ligationsansatz wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert.

Tabelle 2.21: Ansatz für die Ligation

Komponente	Volumen
Insert	1 bis 2 μ L
Vektor	6 bis 7 μ L
10x Ligase Puffer	1 μ L
T4 Ligase (NEB)	1 μ L
H ₂ O	<i>ad</i> 10 μ L

2.2.1.12 CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System ist eine biochemische Methode, um DNS spezifisch zu schneiden und zu modifizieren. Gene können mit dieser Gen-Editierung gezielt eingefügt, entfernt oder ausgeschaltet werden, auch Nukleotide in einem Gen können verändert werden (Jinek *et al.*, 2012). Das System besteht aus zwei verschiedenen Komponenten: Einer *guide*RNS und einer unspezifischen CRISPR-assoziierten Endonuklease (Cas9). Die *guide*RNS ist eine kurze synthetische RNS, die aus einer *scaffold*-Sequenz besteht, welche für die Cas9-Bindung erforderlich ist, und einer Zielsequenz, die das zu modifizierende genomische Ziel definiert. Das CRISPR/Cas9-System wurde wie in Xie *et al.* (2015) beschrieben angewendet.

Für die Mehrfachmutanten wurden verschiedene CRISPR-Konstrukte entwickelt, für die Transformation der Pflanzen (*ups1 x ups5*) wurde dann das *UPS2/UPS4/UOX*-CRISPR-Konstrukt ausgewählt, da mit diesem Konstrukt theoretisch Dreifach- und Vierfachmutanten sowie die Fünffachmutante generiert werden können.

Da die zu transformierenden Pflanzen eine BASTA-Resistenz aufweisen, wurde ein neuer Expressionsvektor mit einem Kanamycin-Resistenzgen für die Pflanzenselektion erstellt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Aus einer Glycerin-Dauerkultur von *E. coli* wurden 20 µL entnommen und in ein steriles 15 mL-Reaktionsgefäß mit 5 mL LB-Medium gegeben. Insgesamt wurden dann noch 50 µg/mL des selektierenden Antibiotikums hinzugegeben. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 UpM über Nacht inkubiert.

Die Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium mit dem selektierenden Antibiotikum erfolgte ebenfalls bei 37°C über Nacht. Dazu wurde eine Bakteriensuspension auf LB-Festmedium ausplattiert.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurden 5 µL des Ligationsansatzes zu 50 µL chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien hinzugegeben und mittels Pipettenspitze vorsichtig vermischt. Es erfolgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s durchgeführt und der Ansatz im Anschluss für 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 0,5 mL vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben. Der Ansatz wurde nun bei 37°C bei 180 UpM für 1 Stunde schüttelnd inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.2.3 Transformation von *Rhizobium radiobacter*

Für die Transformation von *Rhizobium radiobacter* wurde zu 50 µL kompetenten Zellen 1 µL Plasmid in Küvetten gegeben. Der Ansatz blieb etwa 3 min auf Eis stehen. Die Elektroporation erfolgte bei einer elektrischen Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer elektrischen Feldstärke von 2,5 kV/cm im MicroPulser™ (Bio-Rad, München). Nach der sofortigen Zugabe von 0,5 mL vorgewärmten SOC-Medium (ca. 28°C) wurde der Bakterienansatz bei 28°C und 180 UpM für 1 h schüttelnd inkubiert. Von der Lösung wurden dann 50 µL auf YEP-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 28°C für zwei bis drei Tage inkubiert.

2.2.3 Anzucht und Analyse von Pflanzen

2.2.3.1 Pflanzenanzucht von *A. thaliana* und *N. benthamiana*

Für die Anzucht von *A. thaliana* wurden Samen der verschiedenen Genotypen (siehe Tab. 2.1.11-2.1.13) auf Substratmedium ausgelegt und 2 Tage bei 4°C stratifiziert, um ein gleichmäßiges Keimungsverhalten zu gewährleisten. Danach wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht von 100 µE bei 22°C, 8 h Dunkelheit bei 20°C und 70% Feuchtigkeit) angezogen. Für einen homogenen Pflanzensatz wurden die Samen zunächst auf halbkonzentriertem MS-Medium (teilweise mit 1% Saccharose) angezogen und nach etwa 2 Wochen auf Erde umgesetzt. Während der ersten vier Wochen erfolgte eine wöchentliche Düngung. Für die MS-Analysen sowie die GUS-Färbungen wurden die Pflanzen unter Stickstoffmangel auf Nullerde angezogen. Eine Zusammensetzung der Düngelösung ist in Tabelle 2.22 aufgeführt.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung der Düngelösung ohne Stickstoff

Nährstoff	Salz	Stammlösung	Molarität
Phosphat, Kalium	KH ₂ PO ₄	1 M	8 mM
Calcium	CaCl ₂	1 M	10 mM
Magnesium, Schwefel	MgSO ₄	1 M	8 mM
Eisen	Sequestren	10 mM	10 µM
Zink	ZnSO ₄ *7H ₂ O	100 mM	10,8 µM
Mangan	MnSO ₄ *H ₂ O	100 mM	65,2 µM
Molybdän	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	100 mM	7,2 µM
Kupfer	CuSO ₄ *5H ₂ O	100 mM	45 µM
Nickel	NiCl ₂ *6H ₂ O	100 mM	7,2 µM
Bor	H ₃ BO ₃	100 mM	130,8 µM

Die Anzucht von *N. benthamiana* erfolgte ebenfalls unter Langtagsbedingungen (16 h Licht) im Gewächshaus. Zum Zeitpunkt der Infiltration waren die Pflanzen etwa 5 Wochen alt.

2.2.3.2 Keimungsrate and Etablierung des Keimlings

Für die Bestimmung der Keimungsrate und der Etablierung des Keimlings wurden je Genotyp fünf biologische Replikate zu je 100 Samen auf halbkonzentriertem MS-Medium ausgelegt, für zwei Tage stratifiziert und dann Langtagbedingungen ausgesetzt. Die Dokumentation der Keimungsrate wurde jeweils an den ersten sieben Tagen durchgeführt. Die Rate der Etablierung des Keimlings wurde an Tag 15 gezählt. Für die visuelle Dokumentation wurden repräsentative Bilder der einzelnen Genotypen aufgenommen.

2.2.3.3 Kreuzungen von *A. thaliana*

Um zwei *A. thaliana* Pflanzen zu kreuzen, wurden unter dem Binokular von der Mutterpflanze zunächst alle Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt und somit der Stempel freigelegt. Von der Vaterpflanze wurden die Kelch- und Kronblätter entfernt. Der Pollen auf dem Staubblatt wurde dann auf den Stempel der Mutterpflanze übertragen. Die sich nun entwickelnde Schote konnte nach etwa 2 Wochen geerntet werden. Die Samen wurden auf halbkonzentriertem MS-Medium oder Erde angezogen und auf eine erfolgreiche Kreuzung mittels DNS-Analyse getestet.

2.2.3.4 Stabile Transformation von *A. thaliana*

Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde eine Flüssigkultur (200 mL YEB mit entsprechenden Antibiotika) von dem zu infiltrierenden Konstrukt vorbereitet und bei 28°C für 16 h schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden bei 3000 UpM für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 5% Saccharose mit 0,05% Silwet L-77

resuspendiert bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Nun wurden etwa 6 Wochen alte blühende Pflanzen für 5 min in die Bakterienlösung getaucht. Über Nacht wurden die infiltrierten Pflanzen mit einer Plastiktüte abgedeckt im Dunkeln gehalten. Nach 24 h wurden die Pflanzen bis zur Ernte der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Samen wurden dann auf BASTA®- bzw. Kanamycin-Resistenz selektiert. Überlebende Pflanzen wurden in der nächsten Generation auf Homozygotie getestet.

2.2.3.5 Infiltration von *N. benthamiana*

Für die Infiltration von *N. benthamiana* wurden die Bakterien zunächst über Nacht bei 28°C und 180 UpM in einer Flüssigkultur angezogen. Die Zellen wurden dann für 15 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde nachfolgend in 10 mL Resuspensionspuffer aufgenommen und die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension ermittelt. Diese wurde auf OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt und für etwa 2 Stunden bei RT ruhen gelassen. Junge Blätter von 5 bis 6 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen wurden mittels einer Spritze mit der Bakteriensuspension infiltriert. Die infiltrierten Blätter wurden nach 3-5 Tagen für weitere Analysen geerntet.

2.2.3.6 Konfokalmikroskopie

Für die Konfokalmikroskopie wurde eine etwa 1 cm² große Blattscheibe von einem infiltrierten *N. benthamiana* Blatt (2.2.3.5) ausgeschnitten. Dieses wurde auf einem Objektträger platziert, mit einigen Tropfen 0,1% TWEEN® überschichtet und unter dem konfokalen Lasermikroskop „Leica TCS-SP8“ mit dem Objektiv „HCX PL APO 40 x 1.20 UV“ und der dazugehörigen „Leica Application Suite Advanced Fluorescence Software“ analysiert. Weitere Blattproben wurden mit einigen Tropfen 1 M NaCl behandelt und anschließend konfokalmikroskopisch analysiert.

2.2.3.7 High Resolution Melt-Analyse

Mit der *High Resolution Melt*-Analyse (HRM) können Variationen in Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden. Das Verfahren basiert auf dem Nachweis kleiner Unterschiede in den PCR-Schmelzkurven (Dissoziationskurven). Die Daten werden mithilfe einer speziell für die HRM-Analyse entwickelten Software analysiert und bearbeitet. Die *High Resolution Melt*-Analyse wurde als Vorselektion der CRISPR-Pflanzen angewendet, um zwischen hetero- und homozygoten Pflanzen zu unterscheiden. Die für die Analyse notwendigen Oligonukleotide wurden nach den in Tab. 2.23 aufgeführten Vorgaben erstellt.

Tabelle 2.23: Oligonukleotid-Vorgaben für die *High Resolution Melt*-Analyse

Charakteristikum	Vorgaben
Amplikon	weniger als 250 bp; keine sich wiederholenden Elemente; entspricht einer eindeutigen Sequenz innerhalb der Probe
Länge	etwa 20 bp
Schmelztemperatur	58°C bis 60°C
% GC-Gehalt	30% bis 80% je Primer
3´ Ende	nicht mehr als zwei GC-Elemente in den letzten fünf Nukleotiden am 3´ Ende

Der Ansatz für die PCR ist in Tab. 2.24 aufgeführt. Mit der Software „QuantStudio Design & Analysis Software“ wurde die Analyse im QuantStudio 3™ (Applied Biosystems, CA, USA) gestartet und die Proben im Anschluss analysiert.

Tabelle 2.24: Ansatz für die HRM-PCR

Komponente	Volumen
MeltDoctor HRM Master Mix 2x	5 µL
Primer 1 (10 µM)	0,3 µL
Primer 2 (10 µM)	0,3 µL
20 ng/L DNS	1 µL
H ₂ O	3,4 µL

2.2.3.8 Analyse der CRISPR-Pflanzen im Kapillar-Sequenzierer

Nach Vorselektion der CRISPR-Pflanzen mittels HRM-Analyse wurden die homozygoten Pflanzen auf Basenverluste oder –zusätze im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer analysiert. Dazu wurde zunächst der Bereich des Gens, in dem ein Ereignis zu erwarten war, mittels entsprechender Primer (siehe Tabelle 2.25) amplifiziert. An die M13-Sequenz (GTAAAACGACGGCCAGT) der erstellten Oligonukleotide wird während der zweiten PCR eine Zusatzsequenz angehängt, welche an den jeweiligen Farbstoff (FAM oder JOE) bindet. Mittels dieses Farbstoffs kann die Länge der Fragmente auf die Base genau im Sequenzierer bestimmt werden. Von der PCR wurde jeweils 1 µL mit 0,2 µL Orange Standard (Größenstandard) und 10 µL Formamid gemischt, zur Einzelstrangbildung für 5 min bei 95°C erhitzt und sofort auf Eis gelegt. Die Proben wurden dann in den Probenträger gestellt und mit der Software „GeneMapper ID v3.2“ analysiert.

Tabelle 2.25: Ansatz für die Analyse im Sequenzierer

Komponente	Volumen
10 x Thermo Pol Puffer (NEB)	5 µL
10 mM dNTP-Mix	1
Primer 1 (0,5 µM)	2,5 µL
Primer 2 (5 µM)	2,5 µL
Primer 3 (2,5 µM)	2,5 µL
10 ng/µL genomische DNS	10 µL
Polymerase	0,5
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µL

2.2.3.9 Proteinisolation aus Pflanzengewebe

Ein etwa 1 cm² großen Blattstück der transformierten Pflanze wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe des Extraktionspuffers 2 wurde die Probe für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend bei 13000 UpM für 5 min abzentrifugiert. Von dem Überstand wurden 15 µL auf ein Polyacrylamidgel geladen.

2.2.3.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet, eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die SDS-PAGE setzt sich aus einem 12%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel zusammen (Tab. 2.1.2). Die unter 2.2.15 hergestellten Proben wurden in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V und 300 mA für 20 min im Sammelgel und dann bei 120 V und 300 mA für 60 min im Trenngel.

2.2.3.11 Western Blot

Beim Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde für 3 min in Blotting-Puffer (Tab. 2.1.1) inkubiert und dadurch aktiviert. Bei dem verwendeten SemiDry Blot-Verfahren wurden die Membran und das Gel von jeweils 3 Filterpapieren von jeder Seite umschlossen, die mit 1 x Laufpuffer benetzt wurden. Für 45 min wurden eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 2,5 mA/cm² angelegt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Blockierungslösung (Tab. 2.1.1) inkubiert.

2.2.3.12 Immunfärbung

Nachdem die Membran über Nacht in Blockierungs-Lösung inkubiert wurde, erfolgte eine Waschung mit TBS-T (3 x für jeweils 10 min). Anschließend wurde der erste Antikörper (Tab. 2.1.8) für 1 h auf die Membran gegeben. Nach dem Entfernen des ersten Antikörpers wurde die Membran erneut mit TBS-T (3 x für jeweils 10 min) gewaschen. Die Inkubation des zweiten Antikörpers mit alkalischer Phosphatase erfolgte ebenfalls für 1 h. Die Membran wurde dann mit TBS-T (1 x für 10 min) gewaschen. Nun wurde das Substrat auf die Membran gegeben und solange inkubiert bis Banden sichtbar wurden. Mittels Proteinlängenstandard (Abb. 2.2.1) konnte dann die Größe der aufgetrennten Proteine ermittelt werden.

2.2.3.13 GUS-Färbung

Als Material für die GUS-Färbung wurden Promotor-GUS-Linien von *A. thaliana* nach 3 Wochen Wachstum (Beginn der Sprossbildung), 6 Wochen alte Pflanzen (am Ende der Reproduktionsphase) sowie fünf, sieben und elf Tage alte Schoten verwendet. Das jeweilige Pflanzenmaterial wurde in GUS-Färbelösung gelegt und unter Vakuum dreimal für 5 min inkubiert, wobei die Schoten zuvor geöffnet wurden. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C wurde die GUS-Färbelösung abgenommen und durch 70% Ethanol ersetzt, die fortan bis zur vollständigen Entfärbung des Pflanzenmaterials regelmäßig gewechselt wurde. Wurzeln und Blätter wurden in 5%ige Agarose eingebettet. Mit

Hilfe eines Vibratoms wurden 50 µm dicke Querschnitte angefertigt. Die Dokumentation der GUS-Färbung erfolgte mit einer Kamera, dem Binokular sowie dem AXIO-Mikroskop.

2.2.3.14 Metabolitanalyse durch Flüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrieanalyse

Für die Analyse im Massenspektrometer wurden 10 mg Samen oder 100 mg Blattmaterial eingewogen und je Probe eine große sowie fünf kleine Metallkugeln hinzugegeben. Der Materialaufschluss erfolgte unter flüssigem Stickstoff in der Schüttelmühle für 3 min bei einer Frequenz von 20 s⁻¹. Nach der Zugabe von 500 µL Extraktionspuffer 3 wurden die Proben für etwa 30 s geschüttelt. Anschließend wurden die Proben auf einem Heizblock bei 95°C für etwa 10 min schüttelnd inkubiert. Um die Zellbestandteile von den Proben abzutrennen, erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 40.000 xg. Der flüssige Überstand wurde erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann über eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µM) gefiltert. Die fertige Probe wurde massenspektrometrisch analysiert. Die spezifischen Einstellungen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, der Ionenquellen des Massenspektrometers sowie die Einstellungen der MS/MS-Methode im positiven und negativen Modus sind den Tabellen 2.26 bis 2.30 zu entnehmen.

Tabelle 2.26: Einstellungen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Komponente	Einstellung
Injektionsvolumen	20 µL
Nadelwaschung	10% Isopropanol
Flussrate	0,8 mL/min
Mobile Phase A	10 mM Ammoniumacetat pH 8,5
Mobile Phase B	Methanol
Temperatur der Säule	25°C
Temperatur Autosampler	4°C

Tabelle 2.27: Einstellungen der Binärpumpe

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
1,5	95	5
3,5	85	15
6	5	95
7	5	95
7,1	95	5

Tabelle 2.28: Ionenquelleninformationen des Massenspektrometers

Quelle	ESI+Agilent Jet Stream	
Scantyp	Dynamic MRM	
Polarität	Positiver Modus	Allantoat, Dihydrouracil, Uracil, Xanthin
	Gas Temperatur	300°C
	Gasfluss	12 L/min
	Zerstäuber	30 psi
	<i>Sheath gas</i> Temperatur	300°C
	<i>Sheath gas flow</i>	11 L/min
	Kapillarspannung	positiv: 4000 V; negativ: 2500 V
	<i>Nozzle Voltage</i>	positive: 1500 V; negative: 1000 V
Polarität	Negativer Modus	Allantoin, Harnsäure
	Gas Temperatur	350°C
	Gasfluss	12 L/min
	Zerstäuber	40 psi
	<i>Sheath gas</i> Temperatur	350°C
	<i>Sheath gas flow</i>	12 L/min
	Kapillarspannung	positiv: 2500 V; negativ: 2500 V
	<i>Nozzle Voltage</i>	positive: 500 V; negative: 5000 V

Tabelle 2.29: Einstellungen der MS/MS-Methode im positiven Modus

Komponente	Precursor Ion (Unit)	Product Ion (Unit)	Fragmentorenspannung (V)	Kollisionsenergie (V)	Retention (min)
Allantoat	177.06	134	60	5	1.067
Allantoat	177.06	74	60	15	1.067
Dihydrouracil	155.05	73,2	103	15	7
Dihydrouracil	155.05	55,2	103	19	7
Uracil	113.04	96	82	19	1.48
Uracil	113.04	70,1	82	19	1.48
Xanthin	153.1	136	100	15	1.847
Xanthin	153.1	55,2	100	33	1.847

Tabelle 2.30: Einstellungen der MS/MS-Methode im negativen Modus

Komponente	Precursor Ion (Unit)	Product Ion (Unit)	Fragmentorenspannung (V)	Kollisionsenergie (V)	Retention (min)
Allantoin	157	113,9	96	15	1
Allantoin	157	96,9	96	15	1
Harnsäure	167	124	91	14	1
Harnsäure	167	69,2	91	20	1

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *A. thaliana* T-DNS Linien

T-DNS-Insertionslinien von *AtUPS1* (At2g03590), *AtUPS2* (At2g03530), *AtUPS4* (At2g03520) und *AtUPS5* (At1g26440) wurden beim *Eurasian Arabidopsis Stock Centre* (uNASc) bestellt und auf die Insertion der T-DNS geprüft.

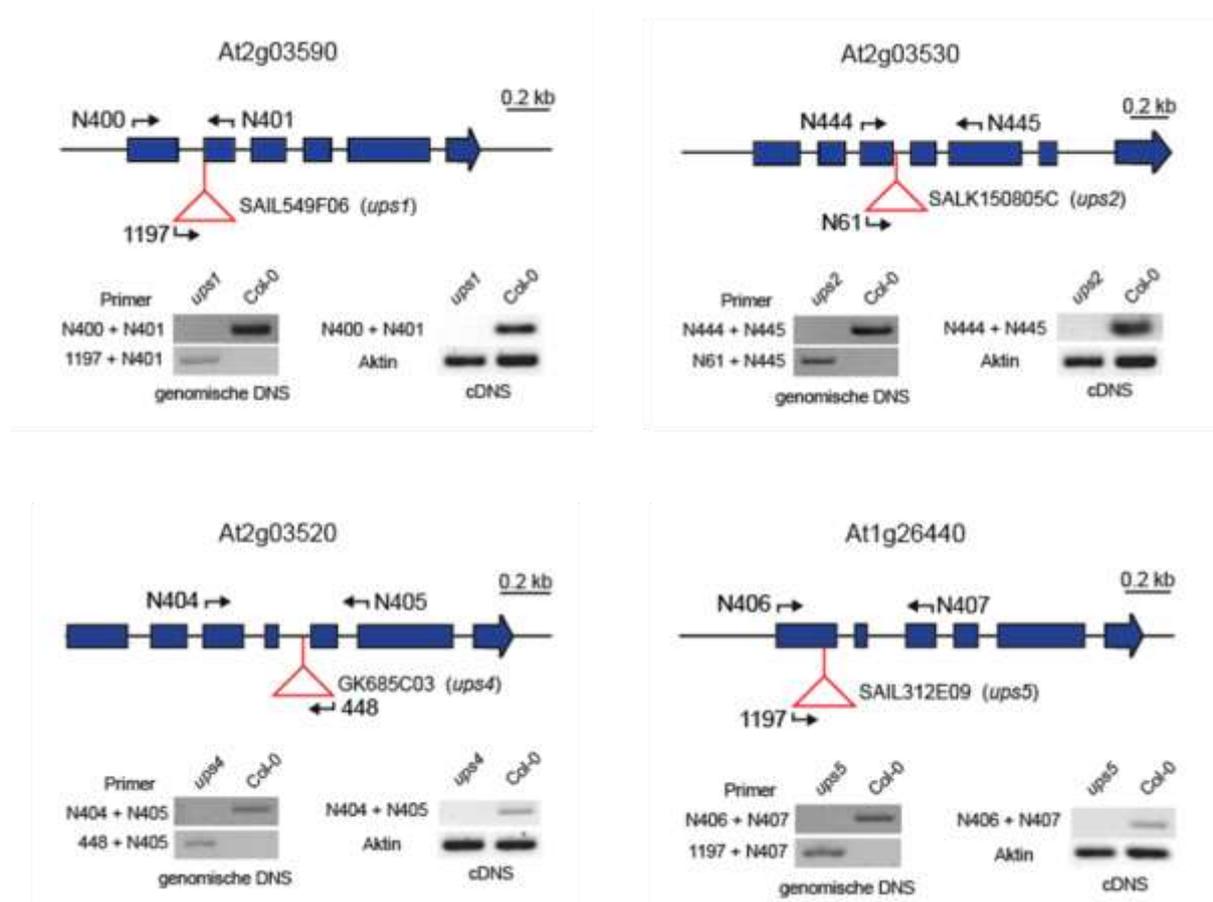


Abbildung 3.1: Charakterisierung der *A. thaliana* T-DNS-Insertionslinien *AtUPS1* (At2g03590), *AtUPS2* (At2g03530), *AtUPS4* (At2g03520) und *AtUPS5* (At1g26440). In der schematischen Darstellung der Genstruktur sind die Exons mit blauen Rechtecken dargestellt, die roten Dreiecke markieren die Position der Insertion der T-DNS. Schwarze Pfeile zeigen die amplifizierende Richtung der genspezifischen und T-DNS-spezifischen Primer an. Die Amplifikation wurde mit genomischer DNS

und cDNS von homozygoten Pflanzen durchgeführt. Aktin (At2g37620) wurde für den Vergleich der Transkriptmengen als Kontrolle amplifiziert.

Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau der vier Gene und markiert die Position der Insertion (rotes Dreieck). Mit Oligonukleotiden, die den Bereich der Insertionsstelle flankieren bzw. nur auf einer spezifischen Sequenz der T-DNS binden können, wurden jeweils genomische DNS und cDNS analysiert. Bei allen Insertionslinien konnte nachgewiesen werden, dass die Gene nicht mehr exprimiert werden und somit Verlustmutanten vorliegen. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Mutantenlinien wurden in der Literatur bereits beschrieben (Tabelle 2.11) und der Funktionsverlust der entsprechenden Gene nachgewiesen.

3.2 Suppressoren sind ups1-Mutanten

Die beiden in der genetischen Kartierungspopulation gefundenen Suppressoren, die nicht bereits bekannten Suppressoren wie der XDH zugeordnet werden konnten, wurden auf halbkonzentriertem MS-Medium ohne Zucker angezogen. Die Sequenzierung der cDNS zeigte jeweils eine Punktmutation an unterschiedlicher Position der Ureidpermease 1. In beiden Fällen führte diese Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch. Abbildung 3.2 zeigt die Position der veränderten Aminosäuren (s153 und s18) im Vergleich mit der Sequenz von AtUPS1. In der einen Suppressormutante liegt ein Aminosäureaustausch des hochkonservierten Glutamats 209 zu Lysin vor (E209K). Bei dem zweiten Suppressor führte die Punktmutation dazu, dass statt der Aminosäure Alanin an Position 231 Valin vorliegt (A231V). An dieser Stelle kommen neben Alanin alternativ nur die Aminosäuren Threonin, Serin und Glycin in UPS-Proteinen von Pflanzen vor.

```

s153 1 MYMIESKGGAIACMLLALLFLGTWPAIMTLTERRGRLPQHTYLDYTLTNLLAAVIALTL
UPS1 1 MYMIESKGGAIACMLLALLFLGTWPAIMTLTERRGRLPQHTYLDYTLTNLLAAVIALTL
s18 1 MYMIESKGGAIACMLLALLFLGTWPAIMTLTERRGRLPQHTYLDYTLTNLLAAVIALTL

s153 61 GEIGPSRPNFFTQLSQDNWQSVMFAMAGGIVLSLGNLATQYAWAYVGLSVTEVITASITV
UPS1 61 GEIGPSRPNFFTQLSQDNWQSVMFAMAGGIVLSLGNLATQYAWAYVGLSVTEVITASITV
s18 61 GEIGPSRPNFFTQLSQDNWQSVMFAMAGGIVLSLGNLATQYAWAYVGLSVTEVITASITV

s153 121 VIGTTLNLYFLDDRINRAEVLFPGVACFLIAVCFGS AVHKSNAADNKT KLQNFKSLETTSS
UPS1 121 VIGTTLNLYFLDDRINRAEVLFPGVACFLIAVCFGS AVHKSNAADNKT KLQNFKSLETTSS
s18 121 VIGTTLNLYFLDDRINRAEVLFPGVACFLIAVCFGS AVHKSNAADNKT KLQNFKSLETTSS

s153 181 FEMETISASNGLTKGKAKEGTA AFLIELK KQRAIKVFGKSTI IGLVITFFAGICFSLFSP
UPS1 181 FEMETISASNGLTKGKAKEGTA AFLIELEKQRAIKVFGKSTI IGLVITFFAGICFSLFSP
s18 181 FEMETISASNGLTKGKAKEGTA AFLIELEKQRAIKVFGKSTI IGLVITFFV GICFSLFSP

s153 241 AFNLATNDQWHTLKHGVPKLN VYTAFFYFSISAFVVALILNIRFLYWPILGLPRSSF KAY
UPS1 241 AFNLATNDQWHTLKHGVPKLN VYTAFFYFSISAFVVALILNIRFLYWPILGLPRSSF KAY
s18 241 AFNLATNDQWHTLKHGVPKLN VYTAFFYFSISAFVVALILNIRFLYWPILGLPRSSF KAY

s153 301 LNDWNGRGWSFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAAAADAVQALPLVSTFWGILLFGEYRRS
UPS1 301 LNDWNGRGWSFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAAAADAVQALPLVSTFWGILLFGEYRRS
s18 301 LNDWNGRGWSFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAAAADAVQALPLVSTFWGILLFGEYRRS

s153 361 SRKTYTLLISMLLMFIVAVAVLMASSGHRK*
UPS1 361 SRKTYTLLISMLLMFIVAVAVLMASSGHRK*
s18 361 SRKTYTLLISMLLMFIVAVAVLMASSGHRK*

```

Abbildung 3.2: Aminosäuresequenzvergleich der beiden Suppressoren mit AtUPS1. Die cDNS der in der genetischen Suppressor-Kartierungspopulation gefunden Suppressoren s18 und s153 wurden sequenziert. Bei beiden Suppressoren liegt eine Punktmutation vor, die zu einem Aminosäureaustausch führt (s153: E209K; s18: A231V).

Die beiden Aminosäureaustausche der Suppressoren, die im Folgenden mit E209K (s153) und A231V (s18) bezeichnet werden, fanden an unterschiedlicher Position der Aminosäuresequenz von AtUPS1 statt. Während der Austausch der hochkonservierten Aminosäure Glutamat von E209K in der zytoplasmatischen Region von AtUPS1 vorliegt, wurde bei A231V eine Aminosäure ausgetauscht, die sich in der 6. Transmembranhelix des Proteins befindet (Abbildung 3.3).

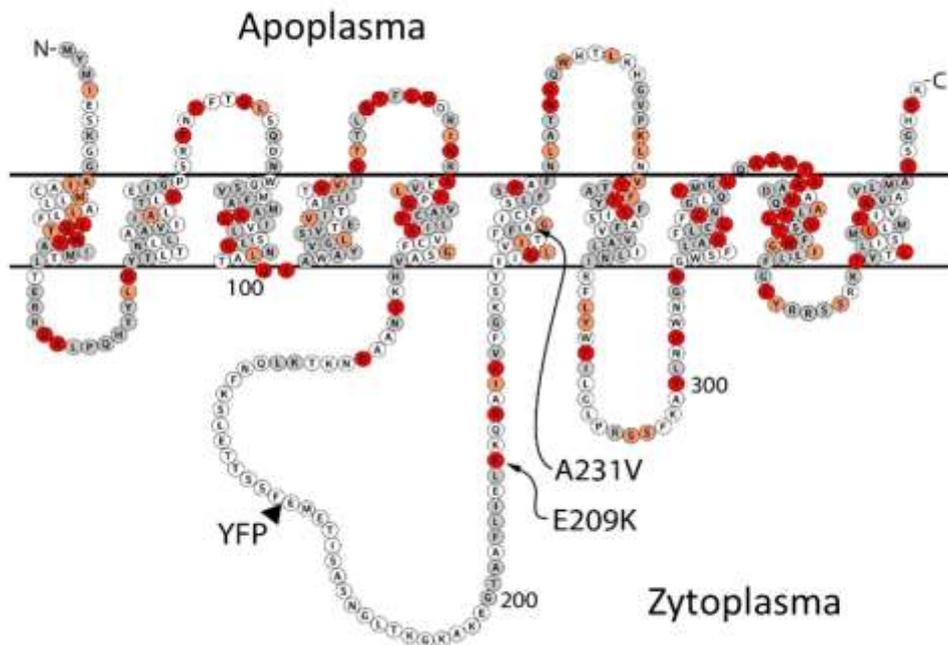


Abbildung 3.3: Topologiekarte von AtUPS1. Die Positionen der über EMS-Mutagenese erzeugten Aminosäureaustausche sind markiert, ebenso die Insertionsposition für ein fluoreszierendes Protein (mCherry). Rot: Aminosäuren die in UPS-Proteinen absolut konserviert sind. Orange: Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften konserviert (Gruppen: MIVL; KRH; ED; GA; TS; FWY). Grau: Aminosäuren oder Aminosäuregruppen mit ähnlichen Eigenschaften, die in 90% aller analysierten Sequenzen konserviert sind. Insgesamt wurden 112 UPS-Proteine aus 46 Pflanzenarten analysiert.

Die Auswahl sowie Analyse der 112 UPS-Proteine aus 46 Pflanzenarten sind in Tabelle 6.1 und Abbildung 6.1 im Anhang dargestellt.

3.3 Phänotypische Analyse der Suppressoren

Aufgrund der fehlenden Peroxisomen in den Kotyledonen kann die *uox*-Mutante nur sehr schlecht keimen und ist nicht in der Lage einen Keimling zu etablieren (Hauck *et al.*, 2014). Während Enzyme wie *GSDA*, *NSH1* und *NSH2* oder *XDH* den *uox*-Phänotyp unterdrücken und somit als Suppressoren fungieren, sollte mittels einer

EMS-Mutagenese nach neuen unbekanntem Suppressoren des *uox*-Phänotyps gesucht werden, die auch neue Erkenntnisse hinsichtlich weiterer regulatorischer oder katalytischer Komponenten im Purinnukleotidkatabolismus bringen könnten. Da die *uox*-Mutante nur unter Zuckerzugabe einen Keimling etablieren kann, finden sich neue Suppressoren auf Medium ohne Saccharose. Die in der genetischen Sichtung gefundenen Mutanten der Ureidpermease 1, die Suppressoren E209K und A231V, zeigten sich in ihrem Wachstum sehr ähnlich. Verglichen mit Col-0 und der Einzelmutante *ups1* konnten beide Suppressoren keimen und teilweise auch Keimlinge etablieren während die *uox*-Mutante dies nicht konnte (Abbildung 3.4). Die Doppelmutante *ups1 x uox* kann ebenfalls aus etwa der Hälfte der ausgelegten Samen Keimlinge etablieren und zeigt damit einen sehr ähnlichen Phänotyp zu den beiden Suppressoren. Durch den wahrscheinlichen Funktionsverlust des Transporters UPS1 kann der *uox*-Phänotyp folglich teilweise überwunden werden, da zumindest einige Speicherlipide in den Peroxisomen wieder remobilisiert werden können. Hintergrund könnte eine verminderte Harnsäurekonzentration bzw. ein verminderter Import von Harnsäure im Samen sein, die durch das Fehlen von AtUPS1 verursacht wird.

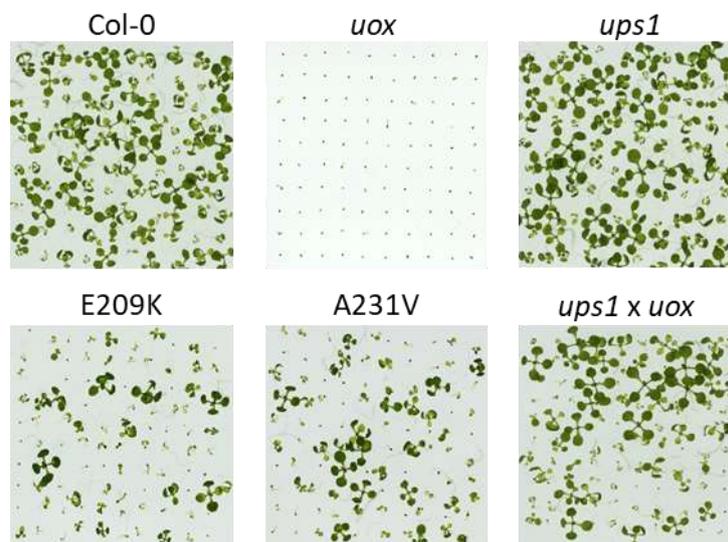


Abbildung 3.4: Keimlingsetablierung der Suppressoren. Samen wurden auf halbkonzentriertem MS-Medium ohne Zuckerzugabe ausgelegt, 48 h im Dunkeln gelagert und dann für 15 Tage bei 16 h Licht ausgesetzt. Repräsentative Bilder wurden an Tag 10 aufgenommen.

Bisher wurden nur die Verlustmutante *ups1* und die Doppelmutante *ups1 x uox* phänotypisch analysiert. Die Familie der Ureidpermeasen besitzt in *A. thaliana* aber

noch vier weitere Transporter, wovon eines (AtUPS3) seine Fähigkeit für ein UPS-Protein zu kodieren aufgrund großer abhandengekommener Genbereiche verloren hat und daher als Pseudogen in Bezug auf eine UPS-Funktion eingestuft wird (siehe Abbildung 6.2 im Anhang). AtUPS3 wird deshalb für diese Arbeit nicht weiter betrachtet. Für die verbliebenen drei Transporter wurden die Verlustmutanten unter 3.1 charakterisiert und mit der *uox*-Verlustmutante gekreuzt. Da *ups1* x *uox* den *uox*-Phänotyp teilweise unterdrückt und als Suppressor fungiert, könnte es sein, dass *ups2* x *uox*, *ups4* x *uox* und *ups5* x *uox* einen ähnlichen Phänotyp zeigen. Studien von Schmidt *et al.* (2004 und 2006) zeigten für AtUPS1, AtUPS2 und AtUPS5 jeweils ein ähnliches Substratspektrum: In Hefezellen und *Xenopus* Oozyten transportierten sie alle unter anderem Harnsäure, Allantoin, Xanthin oder Uracil. Die Einzel- sowie die *uox*-Doppelmutanten von *ups2*, *ups4* und *ups5* wurden auf halbkonzentriertem MS-Medium ohne Zuckerzusatz ausgelegt und phänotypisch betrachtet (Abbildung 3.5). Das Wachstum der drei Einzelmutanten unterscheidet sich weder untereinander noch gegenüber dem vom Wildtyp. Die Doppelmutanten können ohne Zuckerzugabe keinen Keimling etablieren und zeigen damit den *uox*-Phänotyp. Auffällig an *ups4* x *uox* ist jedoch die Keimungsrate: Hier keimen deutlich mehr Samen als bei den anderen beiden Doppelmutanten.

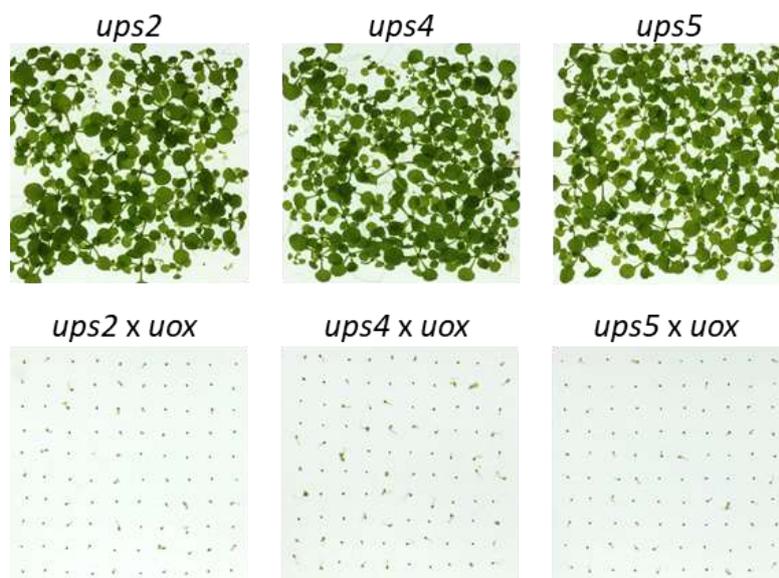


Abbildung 3.5: Keimlingsetablierung der AtUPS-Transporter 2, 4 und 5. Samen wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium ohne Zuckerzugabe ausgelegt, 48 h im Dunkeln gelagert und dann für 15 Tage bei 16 h Licht ausgesetzt. Repräsentative Bilder wurden an Tag 10 aufgenommen.

3.4 Analysen der Keimung und Keimlingsetablierung

Um die phänotypischen Beobachtungen statistisch zu erfassen, wurden die Keimungsrate sowie die Rate zur Etablierung des Keimlings ermittelt. Hierzu wurden je Genotyp jeweils fünf biologische Replikate mit je 100 Samen ausgezählt. Während die Keimungsrate im Wildtyp bereits an Tag 5 auf über 80% steigt, erreichen alle anderen Genotypen weniger als 20% (Abbildung 3.6 A). Die Keimungsrate nimmt auch in den nächsten 10 Tagen nur minimal zu und bleibt zwischen 10 und 20%. Mit weniger als 10% Keimungsrate ist die Doppelmutante *ups4 x uox* am geringsten. Bei der Etablierung des Keimlings beträgt die Rate bei E209K und *ups1 x uox* zwischen 15 und 20% während sich bei A231V signifikant weniger gekeimte Samen zu einem Keimling entwickeln (Abbildung 3.6 B).

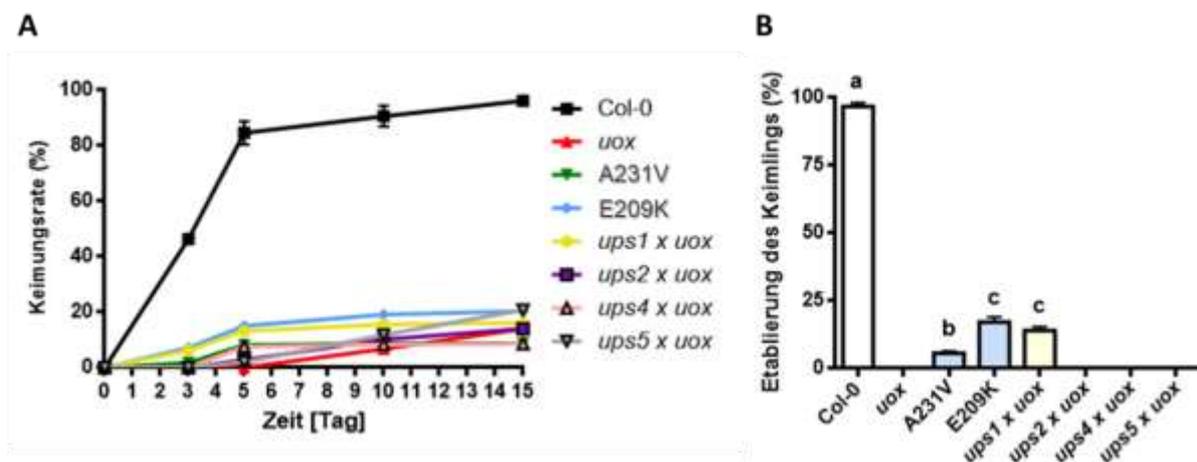


Abbildung 3.6: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in verschiedenen Mutanten. A: Keimungsraten; B: Raten der Etablierung des Keimlings. Col-0: Wildtyp; kleine Gensymbole: T-DNA Einzel- und Doppelmutanten; A231V und E209K (in *uox*-Hintergrund). Fehlerbalken sind Standardabweichung (n = 5 unabhängige biologische Replikate).

Die geringe Keimungsrate von *ups4 x uox* wurde in einem weiteren Experiment mit Samen, die nicht älter als vier Wochen waren, erneut untersucht. Während die *uox*-Mutante eine ähnliche Keimungsrate wie im vorigen Experiment zeigte, war diese bei der Doppelmutante deutlich erhöht und lag bei etwa 30% (Abbildung 3.7 A). Dies konnte bereits bei der phänotypischen Analyse (Abbildung 3.1) beobachtet werden. Vermutlich hat das Alter der Samen einen Einfluß auf die Keimungsrate dieser Doppelmutante, nicht jedoch auf die der anderen Doppelmutanten. Auch bei mehrfachen Wiederholungen fiel die erhöhte Keimungsrate bei *ups4 x uox* nur bei frischen Samen auf. Bei allen anderen Genotypen konnte hingegen kein Einfluß des Samenalters auf die Keimungsraten beobachtet werden.

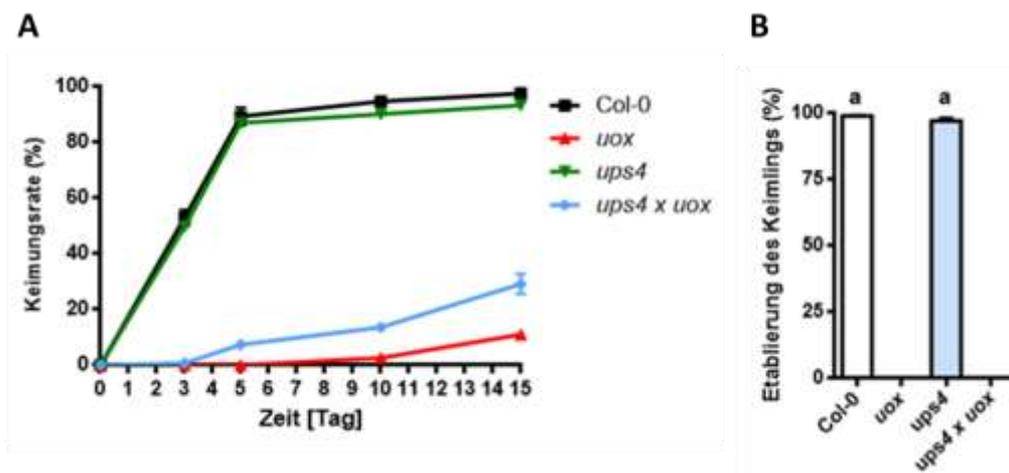


Abbildung 3.7: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in Einzel- und Doppelmutante von AtUPS4. A: Keimungsraten; B: Raten der Etablierung des Keimlings. Col-0: Wildtyp; kleine Gensymbole: T-DNA Einzel- und Doppelmutanten. Fehlerbalken sind Standardabweichung (n = 5 unabhängige biologische Replikate).

Analysiert wurden auch die Keimungsraten der *ups*-Einzelmutanten sowie der Einzelmutanten von den Enzymen, welche der Uratoxidase im Stoffwechsel vorgeschaltet sind. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten verglichen mit dem Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 3.8 A). Auch die Keimlingsetablierungsrate lag übereinstimmend zwischen 90 und 100%

(Abbildung 3.8 B). Der Verlust eines einzelnen UPS-Transporters hat somit, im Gegensatz zu den beiden Suppressoren (und *ups1*-Mutanten), keine Auswirkungen auf die Keimlingsetablierung.

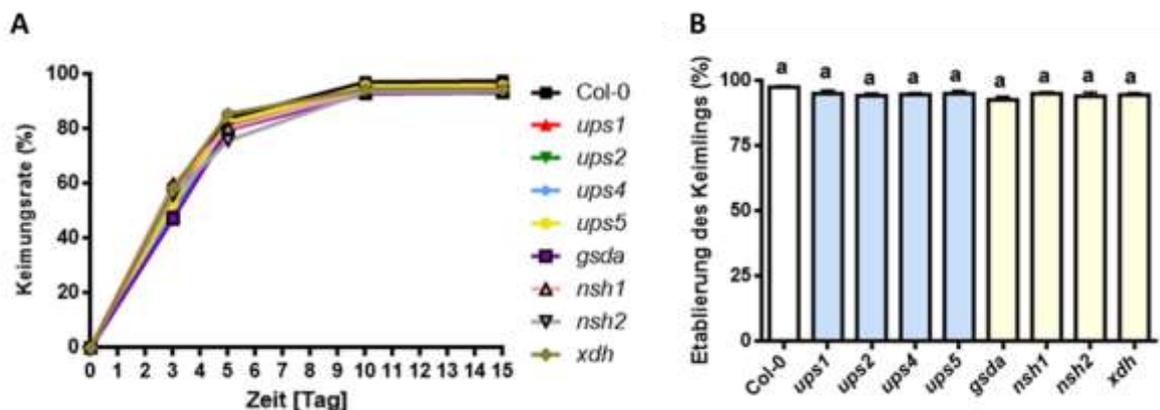


Abbildung 3.8: Charakterisierung der Phänotypen in der Keimung und der Etablierung des Keimlings in Einzelmutanten. A: Keimungsraten; B: Raten der Etablierung des Keimlings. Col-0: Wildtyp; kleine Gensymbole: T-DNA Einzelmutanten. Fehlerbalken sind Standardabweichung (n = 5 unabhängige biologische Replikate).

Wie bereits in Hauck *et al.* (2014) beschrieben, ist die Akkumulation der Harnsäure toxisch und ursächlich für den speziellen *uox*-Phänotyp. Die Messung der Harnsäure in Samen zeigt die hohen toxischen Konzentrationen sowohl in der *uox*-Mutante als auch in den *ups-uox* Doppelmutanten (Abbildung 3.9). Einzige Ausnahme ist *ups1 x uox*, in der die Harnsäurekonzentration um mehr als ein Drittel gegenüber der Einzelmutante reduziert ist. Die beiden Suppressoren akkumulieren sogar noch weniger Harnsäure als die *ups1 x uox* T-DNA-Doppelmutante. Durch den verringerten Harnsäurespiegel im Samen können sowohl die Suppressoren als auch die Doppelmutante *ups1 x uox* teilweise Keimlinge etablieren.

Harnsäure

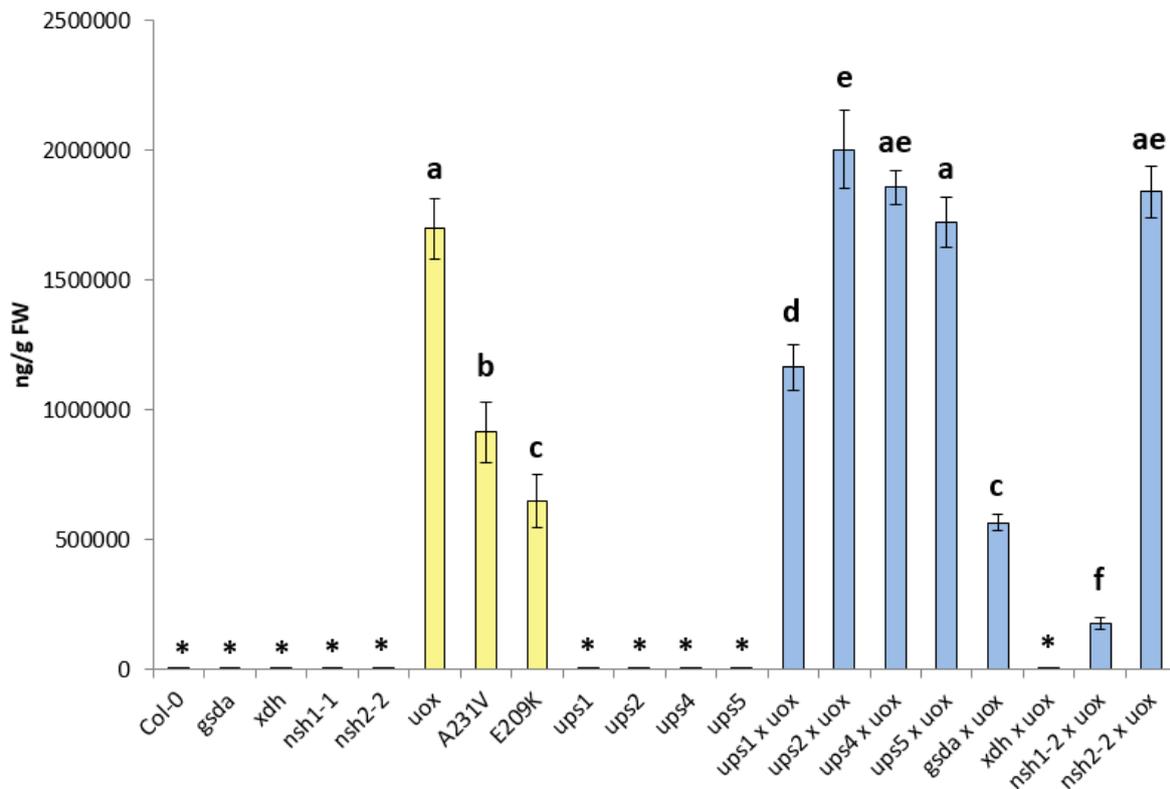


Abbildung 3.9: Harnsäuregehalte in Samen von Col-0, Einzel- und Doppelmutanten des Purinkatabolismus im *uox*-Hintergrund. Analysiert wurden folgende Genotypen: Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb) und Doppelmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. Sternchen, nicht detektiert. FW, Frischgewicht.

Um herauszufinden, was die deutlich verringerten Harnsäurekonzentrationen in der *ups1 x uox* Doppelmutante verursacht, wurde eine Kreuzung von *uox/uox ups1/ups1* Pflanzen mit *uox/uox* durchgeführt. Die Mutterpflanze und das Gewebe im Samen, welches von der Mutterpflanze gebildet wird, sind somit für die *ups1*-Mutation homozygot, wohingegen Endosperm und Embryo, welche sich aus dem befruchteten Gewebe entwickeln, ein *UPS1*-Wildtyp-Allel besitzen. Der Harnsäuregehalt in den Kreuzungen wurde zusammen mit den jeweiligen Einzelmutanten und Col-0 massenspektrometrisch bestimmt. In Col-0 konnte erwartungsgemäß keine

Harnsäure und in *uox* eine hohe Harnsäuremenge detektiert werden (Abbildung 3.10). Die Konzentration in der *ups1 x uox* Doppelmutante war ähnlich wie zuvor (Abbildung 3.9) nur etwa halb so hoch wie in *uox*. Die Samen aus der Rückkreuzung der Doppelmutante mit *uox* als Vater akkumulierten vergleichsweise genauso viel Harnsäure wie *uox*. Ein intaktes *UPS1*-Allel im Endosperm und Embryo kann die Harnsäureakkumulation also nicht verhindern.

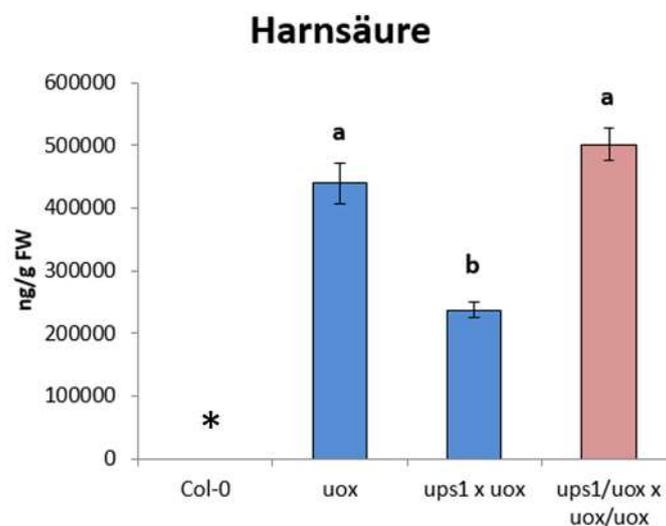


Abbildung 3.10: Harnsäuregehalte in Samen von Col-0, *uox*, *ups1 x uox* und der Kreuzung *ups1/uox x uox/uox*. Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. Sternchen, nicht detektiert; FW, Frischgewicht.

3.5 Herstellung der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-Methode

Für die vorliegende Arbeit wurden diverse *ups-uox* Doppelmutanten durch Kreuzung erzeugt und genotypisch analysiert. Für weitere Analysen, die genaueren Aufschluß über die Funktion und Aufgaben der UPS-Transporter bringen sollten, wurde auch

bereits eine *ups1 x ups5* Doppelmutante generiert. Erste massenspektrometrische Analysen der *ups*-Einzelmutanten und der *upsn x uox* sowie der *ups1 x ups5* Doppelmutante lieferten keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion der Transporter *in vivo*. Da *A. thaliana* vier funktionsfähige Transporter besitzt, die zwar leicht unterschiedliche Präferenzen bezüglich ihrer Substratspezifikationen haben, jedoch in Hefe und Oozyten die gleichen heterozyklischen Verbindungen transportieren können, liegt die Vermutung nahe, dass bei Funktionsverlust eines Transporters ein anderer Transporter das jeweilige Substrat *in vivo* befördert. Somit entsteht weder eine Akkumulation noch eine Verringerung von Metaboliten in Blättern oder Samen bei Abwesenheit von nur einem Transporter. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, ist es notwendig, Mehrfachmutanten zu erzeugen. Da *AtUPS1*, *AtUPS2* und *AtUPS4* in enger genetischer Kopplung in einem Cluster auf Chromosom 2 liegen, können diese folglich nicht durch Kreuzung generiert werden. Hierfür wurde das CRISPR/Cas9-System angewendet, das es ermöglicht, gezielt Nukleotide oder ganze Gene einzufügen, zu entfernen oder auszuschalten. Die *ups1 x ups5* Doppelmutante wurde als Ausgangspunkt für die weitere Mutagenese mittels CRISPR/Cas9 gewählt. Für die Ausschaltung der Gene *UPS2*, *UPS4* und *UOX* wurden jeweils zwei *guideRNS* eingesetzt. Nach der Transformation mit einem Konstrukt, das die entsprechenden *guideRNS* für alle drei Gene kodierte, wurden die Samen (T1) auf Selektionsmedium mit Kanamycin ausgelegt. Nur die Samen, die das CRISPR-Konstrukt trugen, konnten auf diesem Medium einen Keimling etablieren. Insgesamt konnten vier überlebende Pflanzen generiert werden. In der nächsten Generation (T2) wurden alle Pflanzen ausgewählt, die das CRISPR-Konstrukt nicht mehr trugen, weil der Einbau der mutmaßlichen Mutationseignisse in das Genom bereits erfolgt war. Da der CRISPR-Transformationsvektor GFP enthält, sollten in dieser Generation alle nicht leuchtenden Pflanzen zur weiteren Analyse ausgewählt werden. Die Pflanzen mussten nun auf mögliche Ereignisse wie Baseninsertionen oder -deletionen in allen *guideRNS* untersucht werden. Aufgrund der Vielzahl der Gene multipliziert mit der Anzahl der *guideRNS* wurden insgesamt etwa 400 Pflanzen analysiert. Eine schematische Übersicht der Herstellung der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-Methode ist im Anhang in Abbildung 6.3 dargestellt.

Die *High Resolution Melt*-Analyse (HRM) wurde für eine Vorselektion der CRISPR-Pflanzen verwendet, um möglicherweise editierte Pflanzen im Hochdurchsatz zu erkennen. Anhand der Schmelzkurven des genspezifischen Amplifikats, in dem das

CRISPR-Ereignis vermutet wird, kann zwischen homo- und heterozygoten Pflanzen unterschieden werden. Abbildung 3.11 zeigt repräsentative Ereignisse der Schmelzkurven aus der HRM-Analyse.

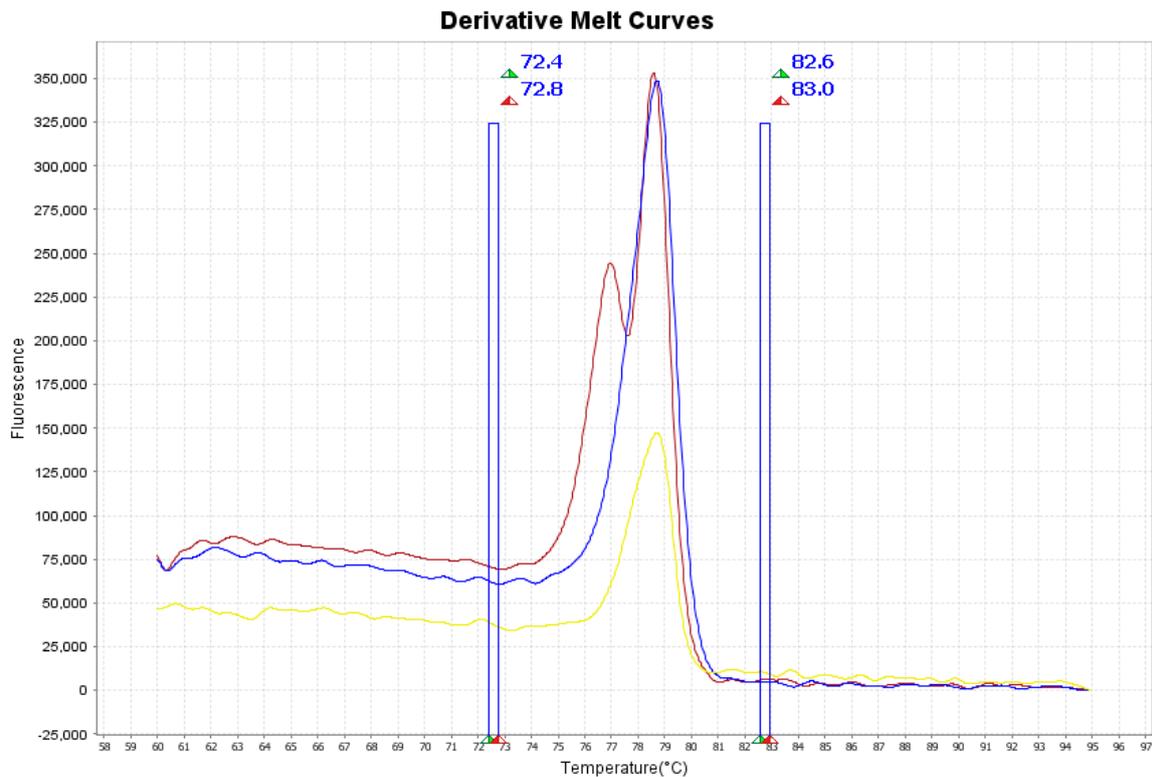


Abbildung 3.11: Schmelzkurven nach *High Resolution Melt*-Analyse (HRM) bei CRISPR-Pflanzen. Analysiert wurden *A. thaliana* Pflanzen der zweiten Generation nach Transformation mit dem CRISPR-Konstrukt. Dargestellt sind die Schmelzkurven von drei repräsentativen Ereignissen. Blau: Wildtyp; rot: Mutante heterozygot und gelb: Mutante homozygot.

Da die HRM-Analyse homozygot mutante und Wildtyp-Pflanzen nicht (sicher) unterscheiden kann, wurden nur die heterozygoten Pflanzen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. In 69% der getesteten Pflanzen waren entweder *UPS2* oder *UOX* oder beide Gene heterozygot. Folglich wurden etwa ein Drittel der Pflanzen im Kapillar-Sequenzierer, der eine Fragmentgrößenbestimmung auf ein Basenpaar genau vornehmen kann, untersucht. Für *UOX* konnten für beide *guideRNS* diverse Insertions- und Deletionsereignisse gefunden werden (Abbildung 3.12). Die Deletionen waren dabei häufig 1 bis 7 bp groß. Neben homozygoten wurden auch

biallelische Pflanzen gefunden. Für *UPS2* konnten in den getesteten Pflanzen zur Hälfte 1 bp Insertionen oder Deletionen festgestellt werden. Für *UPS4* konnten hingegen keine Ereignisse gefunden werden. Insgesamt wurden zwei Pflanzen gefunden, die jeweils eine 1 bp Insertion in *UPS2* aufweisen (Dreifachmutante *ups1 x ups2 x ups5*) sowie mehrere Vierfachmutanten (*ups1 x ups2 x ups5 x uox*). Die beiden Dreifachmutanten werden im Folgenden als 1_*ups1 x ups2 x ups5* und 2_*ups1 x ups2 x ups5* bezeichnet. Die Effizienz der *guideRNS* ist sehr unterschiedlich. Während die erste *guideRNS* für *UOX* in über 60% der Fälle zu einem homozygoten Mutationseignis geführt hat, konnte für die zweite *guideRNS* zu 38% eine oder mehrere Baseninsertionen oder –deletionen beobachtet werden. Für *UPS2* lagen Mutationseignisse von 1 bp Insertionen oder Deletionen in knapp 13% der im Kapillarsequenzierer analysierten Pflanzen vor, der Rest war nicht mutant.

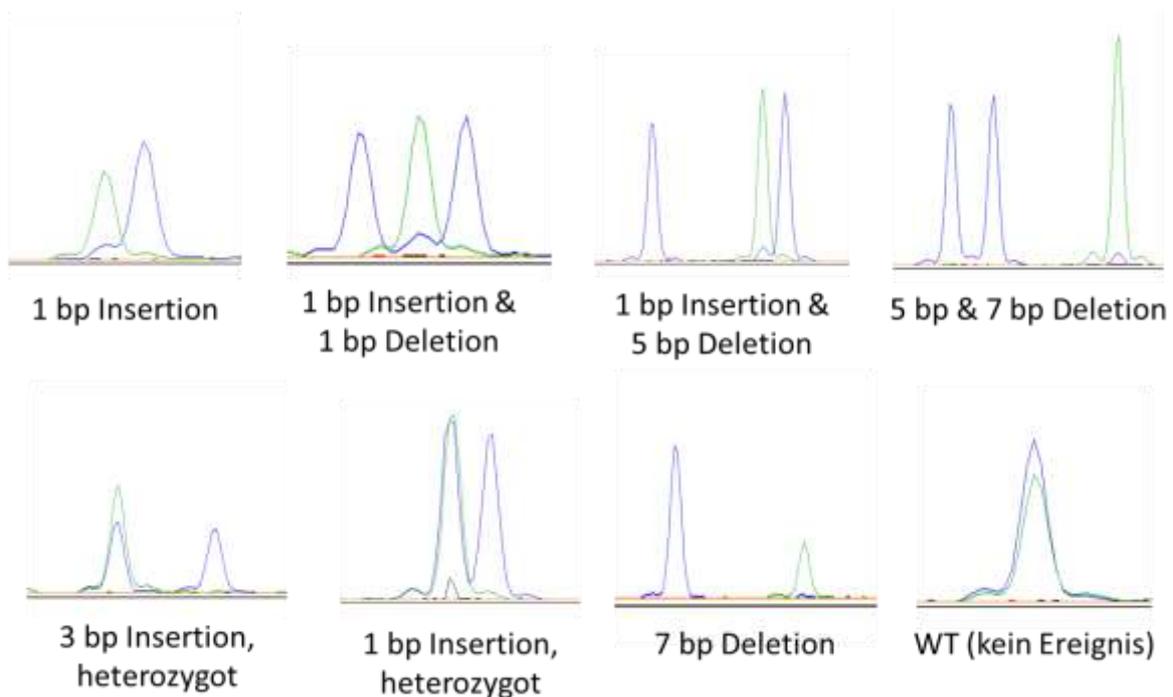


Abbildung 3.12: CRISPR-Ereignisse nach Analyse der zweiten Generation im Sequenzierer. Die Proben wurden während der PCR mit einem blauen Farbstoff (FAM) markiert. Zum Vergleich wurde der Wildtyp Col-0 mit einem grünen Farbstoff (JOE) markiert. Gezeigt sind die am häufigsten beobachteten Ereignisse in *UPS2*, *UPS4* und *UOX*. Zu Beginn der Analyse der CRISPR-Pflanzen wurde ausschließlich der Kapillarsequenzierer genutzt, sodass hier auch heterozygote CRISPR-Ereignisse beobachtet wurden.

3.6 Pflanzenanzucht unter Stickstoffmangel

Bereits in vorigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der UPS-Transporter durch limitierte Stickstoffverfügung im Boden oder durch Salz- und Dunkelstress erhöht wird (Lescano *et al.*, 2016). Deshalb wurden homogene Samensätze für die Analyse im Massenspektrometer und der Promotoraktivitäten unter Stickstoffmangel angezogen. Die genaue Zusammensetzung der Düngelösung ohne zusätzliche Gabe von Stickstoff ist Tabelle 2.22 zu entnehmen. Unter Stickstoffmangel produzierten die Pflanzen deutlich weniger Biomasse und erreichten nur etwa ein Drittel der Größe wie unter Wachstumsbedingungen mit ausreichender Stickstoffversorgung (Abbildung 3.13).



Abbildung 3.13: *A. thaliana* Pflanzen unter Stickstoffmangel. Die Samen wurden sterilisiert, auf Nullerde ausgelegt, für 2 Tage im Dunkeln gelagert und dann Langtagsbedingungen (16 h) ausgesetzt. Die obere Reihe zeigt etwa 3 Wochen alte Pflanzen unter Stickstoffmangel, die untere Reihe bei normaler Stickstoffdüngung.

3.7 Metabolitanaylsen

Da in Komplementationsexperimenten bisher nur Substratspezifitäten für AtUPS1, 2 und 5 ermittelt wurden, sollten mittels Metabolitanalyse die *in vivo* Substrate analysiert werden. Weil die UPS-Transporter bei geringerer Stickstoffzugabe stärker exprimiert werden, wurden die Pflanzen unter Stickstoffmangel angezogen (Lescano *et al.*, 2016). In Leguminosen ist UPS1 an dem Transport von Metaboliten aus dem in

neues reproduzierendes Gewebe beteiligt. Deshalb wurden für die Metabolitanalyse alte Blätter, aus denen die Metabolite transportiert werden, und Samen, in denen die Metabolite für die Reproduktion verwendet werden, ausgewählt.

Für die Analyse im Massenspektrometer wurden homogene Pflanzen- und Samensätze unter Stickstoffmangel angezogen. Dabei wurden der Wildtyp, Col-0, die beiden Suppressoren, sämtliche Einzelmutanten von UPS und den Enzymen des Purinnukleotidkatabolismus (GSDA, NSH1, NSH2, XDH und UOX) sowie die dazugehörigen Doppelmutanten mit *uox*, die Dreifachmutanten und die Vierfachmutante analysiert. Die beiden Suppressoren A231V und E209K wurden zuvor auf Col-0 zurückgekreuzt, sodass bei beiden *ups1*-Mutanten kein *uox*-Hintergrund mehr vorliegt. Die Suppressoren ohne *uox*-Hintergrund werden im Folgenden als S-A231V und S-E209K bezeichnet. Aus der Kreuzung wurde auch der verwendete Wildtyp selektiert. Nach etwa 6 Wochen Wachstum unter Langtagbedingungen wurden die alten Blätter (die unteren vier Blätter der Rosette) geerntet und für die Analyse im Massenspektrometer aufbereitet. Die Samen eines zweiten homogenen Pflanzensatzes, der zeitgleich mit dem ersten unter gleichen Bedingungen angezogen wurde, wurden nach vollständiger Reife geerntet und zeitnah massenspektrometrisch analysiert. Für die MS-Messung wurden die Metabolite Allantoin, Allantoat, Dihydrouracil, Harnsäure, Uracil und Xanthin als mögliche *in vivo* Substrate für die UPS-Transporter ausgewählt und für die Flüssigkeitschromatographie etabliert.

Die Allantoat-Gehalte in alten Blättern liegen im Schnitt im Bereich zwischen 85 und 120 ng g⁻¹ FW (Abbildung 3.14). Dabei sind zwischen den einzelnen Mutanten gegenüber dem Wildtyp und Col-0 keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Bei Betrachtung der Mutanten ohne *uox*-Hintergrund können ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den *ups*-Einzelmutanten, der Doppelmutante sowie den beiden Dreifachmutanten ausgemacht werden, was darauf schließen lässt, dass kein UPS-Transporter Allantoat als Substrat *in vivo* transportiert.

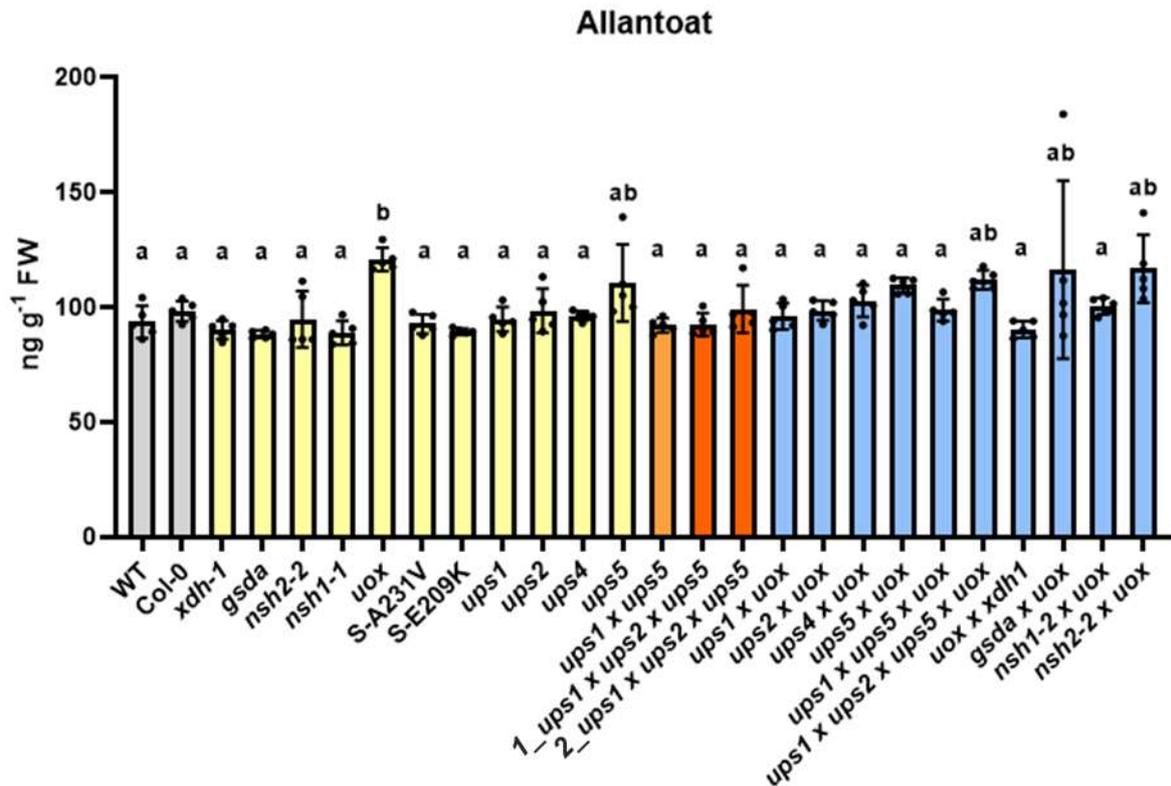


Abbildung 3.14: Allantoatgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Der höchste Gehalt an Allantoin konnte in der *ups1*-Mutante gemessen werden (Abbildung 3.15). Dieser ist signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp aber auch zu sämtlichen Einzel- und Mehrfachmutanten. Auffallend niedrig ist die Konzentration von Allantoin in *ups5* sowie der *ups1 x ups5* Doppelmutante. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch bei den Mutanten im *uox*-Hintergrund.

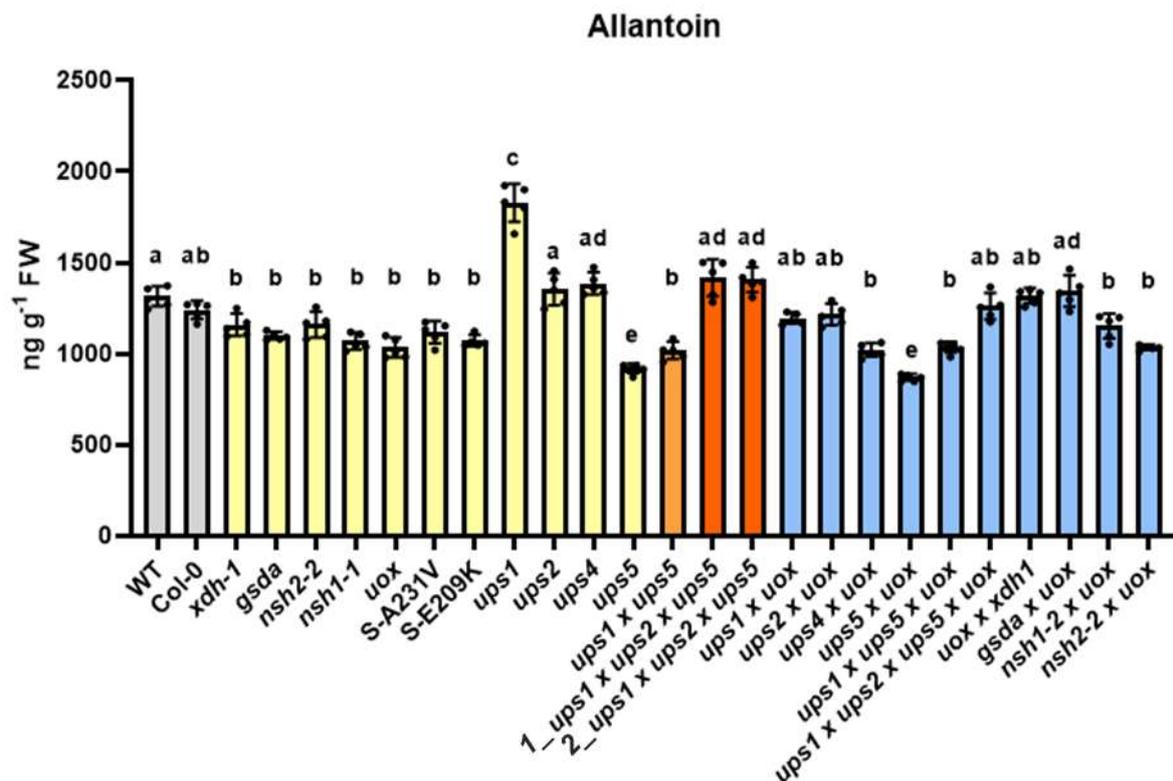


Abbildung 3.15: Allantoingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Die Gehalte von Dihydrouracil in alten Blättern variieren je nach Mutante unterschiedlich stark (Abbildung 3.16). Auffallend sind jedoch die hohen Konzentrationen des Metaboliten in den *ups*-Dreifachmutanten. Die Metabolitmengen in den Einzelmutanten sind mit Ausnahme von *ups2* signifikant niedriger als Wildtyp und Col-0. Die Mehrfachmutanten im *uox*-Hintergrund zeigen eine ähnliche Verteilung, jedoch sind die Dihydrouracilmengen um etwa die Hälfte geringer.

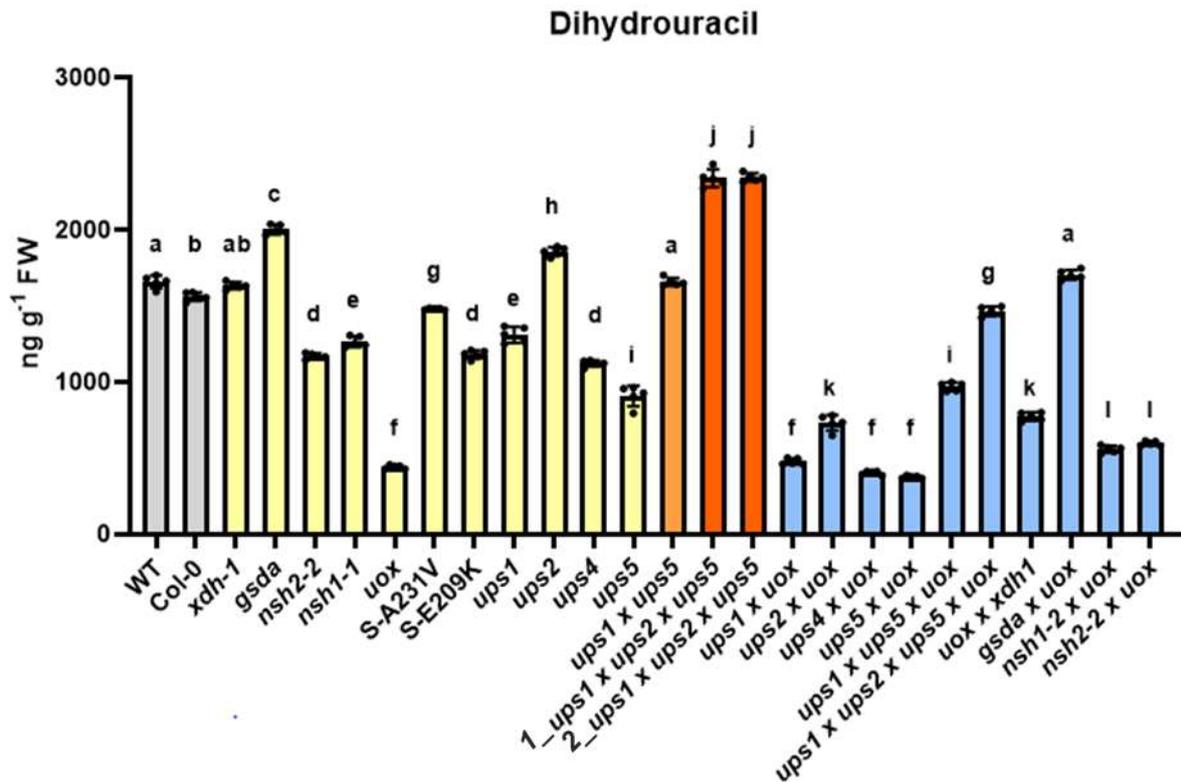


Abbildung 3.16: Dihydrouracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Die Harnsäuregehalte in verschiedenen Einzel- und Doppelmutanten wurden bereits mehrfach gemessen (Kapitel 3.4). Die Suppressoren S-A231V und S-E209K zeigten eine verminderte Akkumulation der toxischen Harnsäure, die mit der Konzentration der *ups1 x uox* Doppelmutante korrelierte. Für die hier gezeigten Messungen wurden die Suppressoren aus dem *uox*-Hintergrund mit Col-0 gekreuzt, sodass das *UOX* wieder als Wildtyp vorliegt. Folglich kann wie bei allen Einzelmutanten mit Ausnahme der *uox*-Mutante keine Harnsäureakkumulation detektiert werden (Abbildung 3.17). Die Konzentrationen in den *uox*-Mutanten variieren stark. Während XDH, GSDA und NSH1 als Suppressoren von UOX bekannt sind und dementsprechend geringere

Mengen an Harnsäure akkumulieren, ist die Konzentration in *ups1 x uox* und *ups2 x uox* mehr als doppelt so hoch wie in der Einzelmutante.

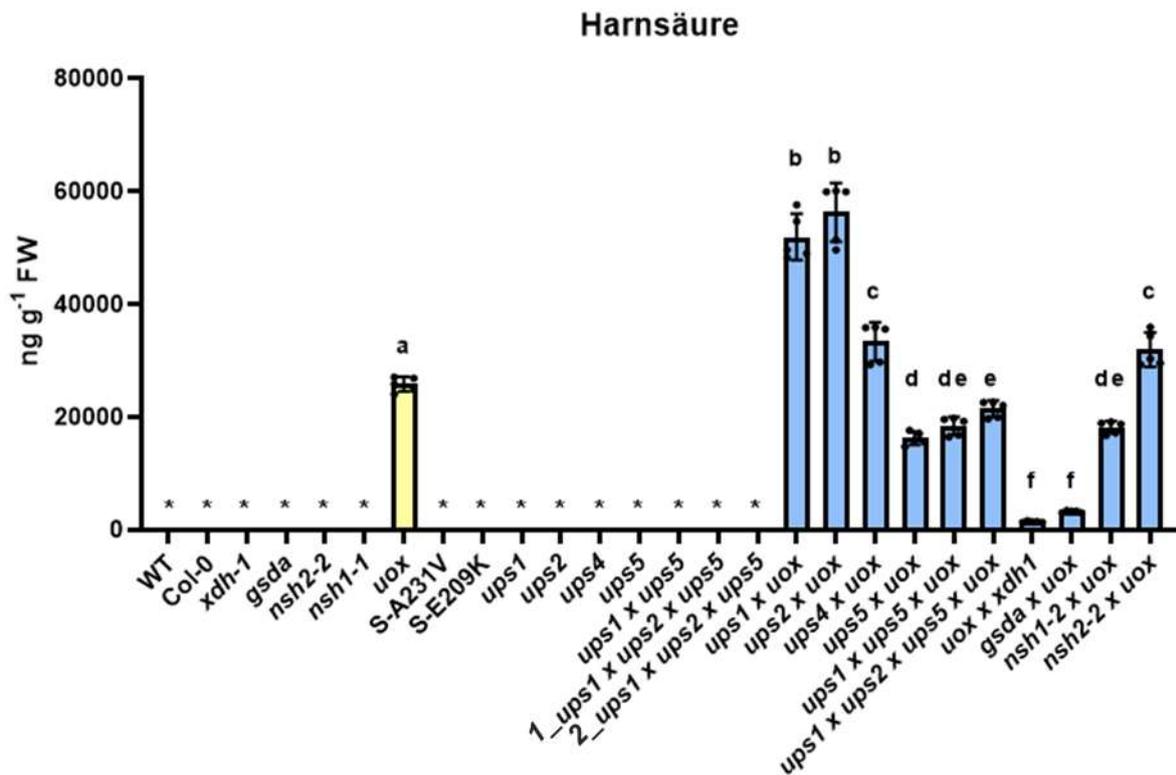


Abbildung 3.17: Harnsäuregehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. Sternchen, nicht detektiert; FW, Frischgewicht.

Die massenspektrometrische Analyse des Metaboliten Uracil zeigt unter den *ups*-Einzelmutanten nur geringe Unterschiede (Abbildung 3.18). Auch die *ups*-Doppelmutante unterscheidet sich nicht wesentlich vom Wildtyp-Niveau. Erst in den *ups*-Dreifachmutanten kann eine signifikant höhere Menge an Uracil in alten Blättern verzeichnet werden.

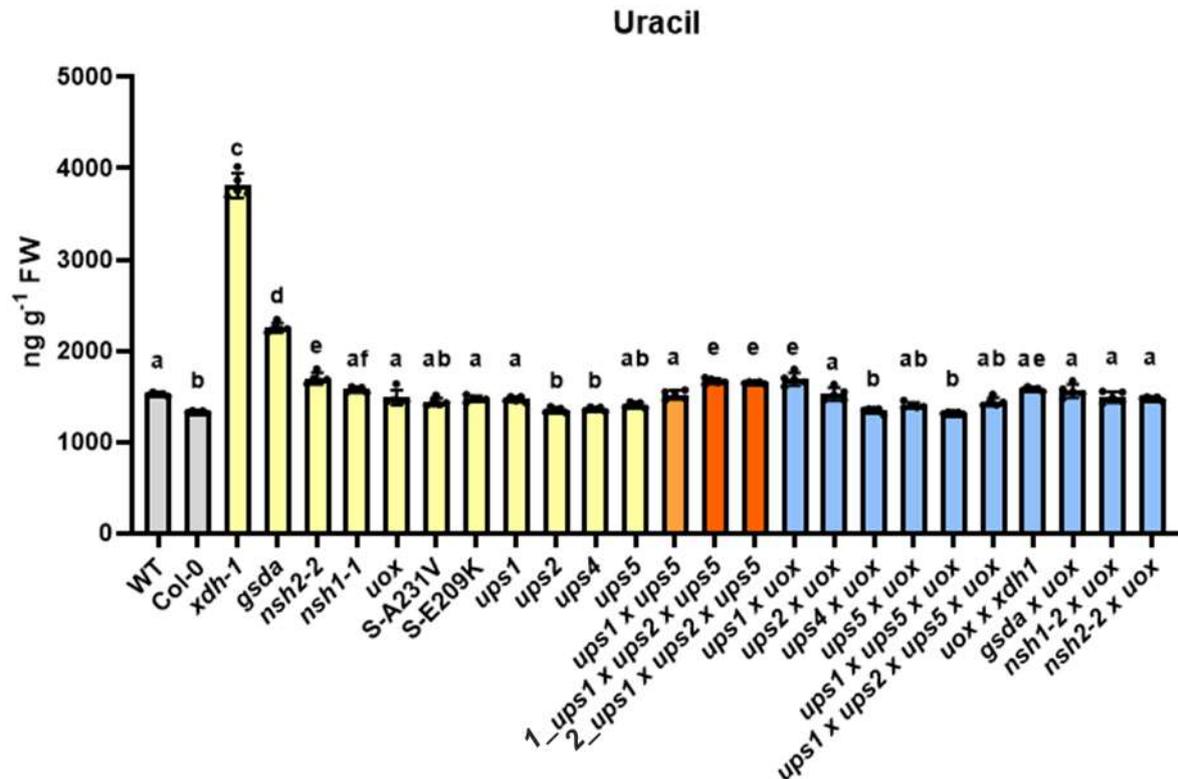


Abbildung 3.18: Uracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Für den Metaboliten Xanthin wurden sehr hohe Konzentrationen in der *xdh-1* sowie etwas geringere in der *nsh-1* gemessen (Abbildung 3.19). Parallel dazu konnte ein gleiches Verhältnis in den beiden Mutanten mit *uox*-Hintergrund detektiert werden. Die Xanthin-Konzentrationen der *nsh-1* Mutanten sollten in etwa auf dem Wildtyp-Niveau liegen (Baccolini und Witte, 2019). Grund dafür ist der Zerfall von Xanthosin in der MS-Quelle. Xanthin und Xanthosin eluieren etwa zur gleichen Zeit und können chromatographisch nicht ganz sauber getrennt werden.

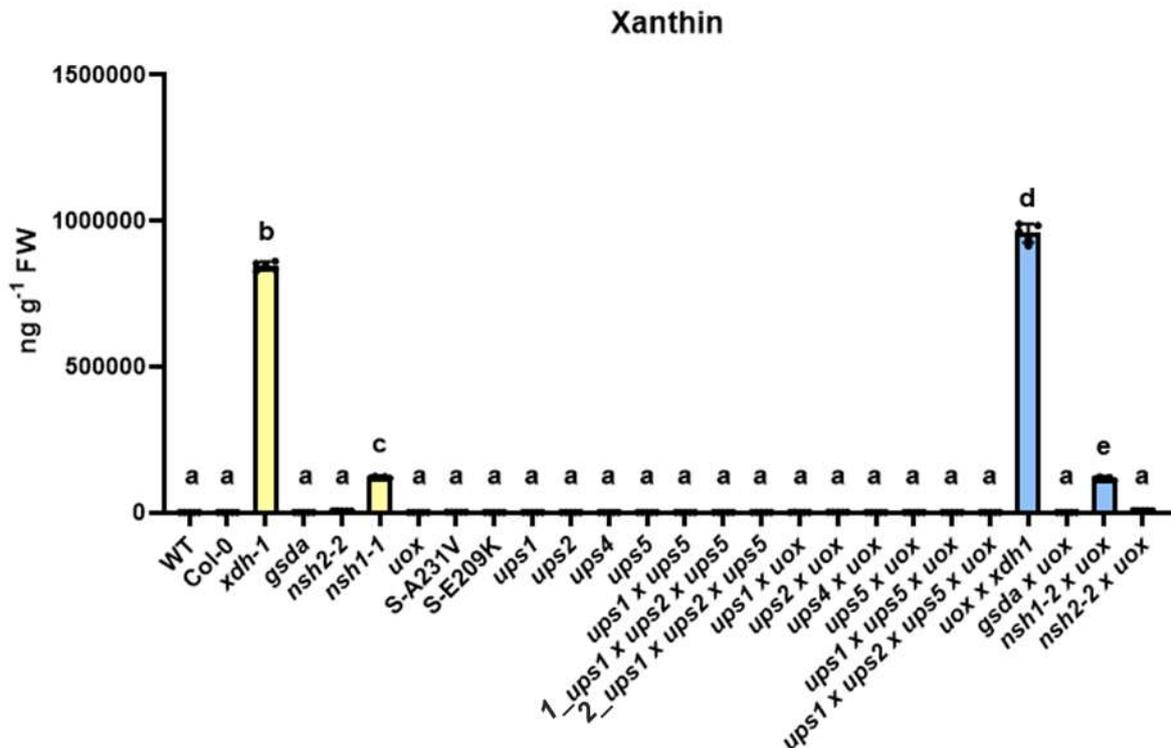


Abbildung 3.19: Xanthingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Wegen der extrem hohen Xanthinkonzentrationen in der *xdh*-Mutante wurden in Abbildung 3.20 nur der Wildtyp, Col-0, *uox*, die beiden Suppressoren sowie die *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Auffallend ist die deutlich höhere Xanthinkonzentration in S-A231V. Die *ups*-Einzelmutanten zeigen zwar untereinander signifikante Unterschiede, jedoch konnte in den Dreifachmutanten weder eine höhere noch niedrigere Konzentration von Xanthin verglichen mit Wildtyp und Col-0 festgestellt werden.

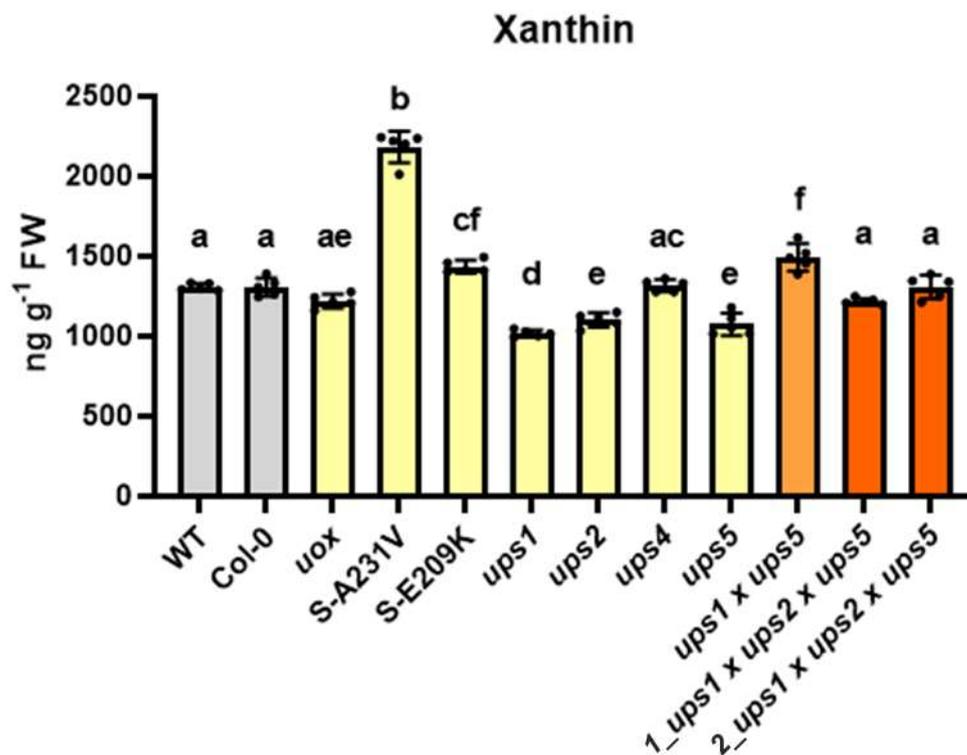


Abbildung 3.20: Xanthingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange) und *ups*-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Die Allantoatgehalte in den Samen zeigen signifikant höhere Werte für die beiden Einzelmutanten *ups4* und *ups5* sowie die Doppelmutante *ups1 x ups5* (Abbildung 3.21). Auf dem gleichen hohen Niveau akkumuliert S-A231V Allantoat, nicht jedoch S-E209K und auch nicht *ups1* und *ups2*. Die *ups*-Dreifachmutanten weisen in etwa gleiche Konzentrationen wie der Wildtyp auf.

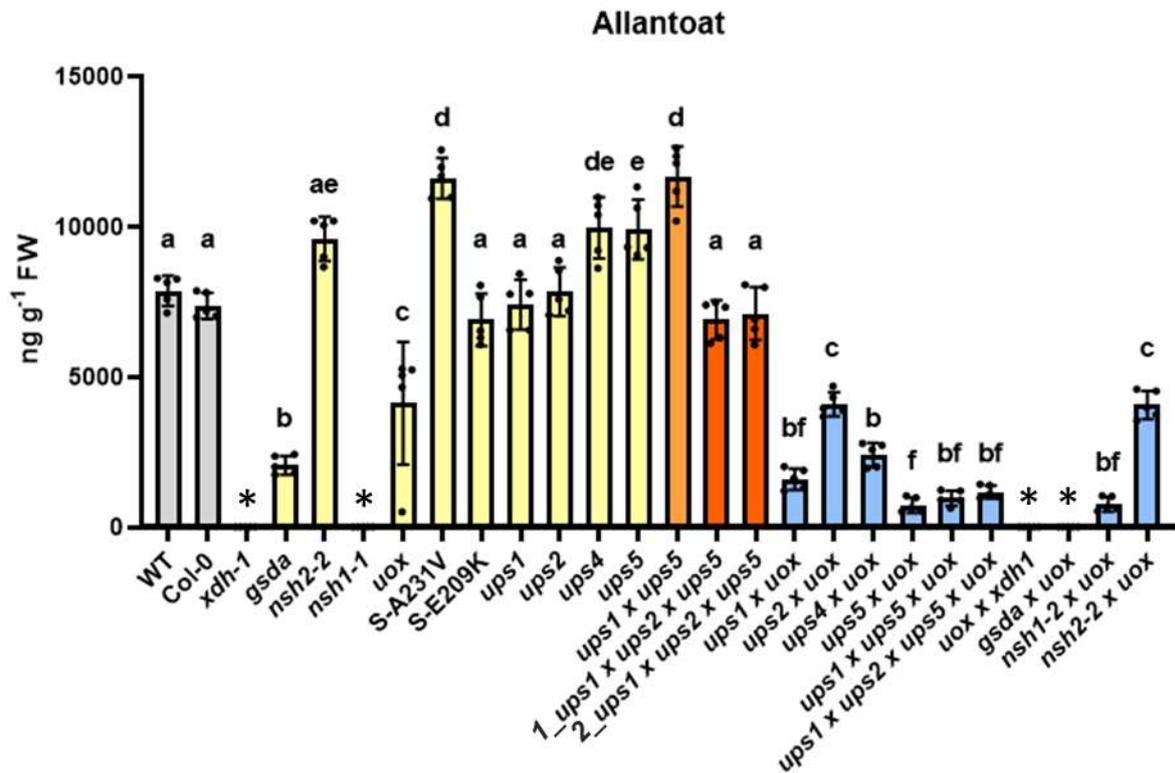


Abbildung 3.21: Allantoatgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. Sternchen, nicht detektiert; FW, Frischgewicht.

Ähnlich wie bei der Messung von Allantoat akkumuliert S-A231V Allantoin in hohen Mengen (Abbildung 3.22). S-E209K und *ups1* zeigen dagegen deutlich geringere Konzentrationen. Die Einzelmutanten *ups4* und *ups5* sowie die *ups*-Mehrfachmutanten weisen signifikant höhere Allantoinkonzentrationen als der Wildtyp auf.

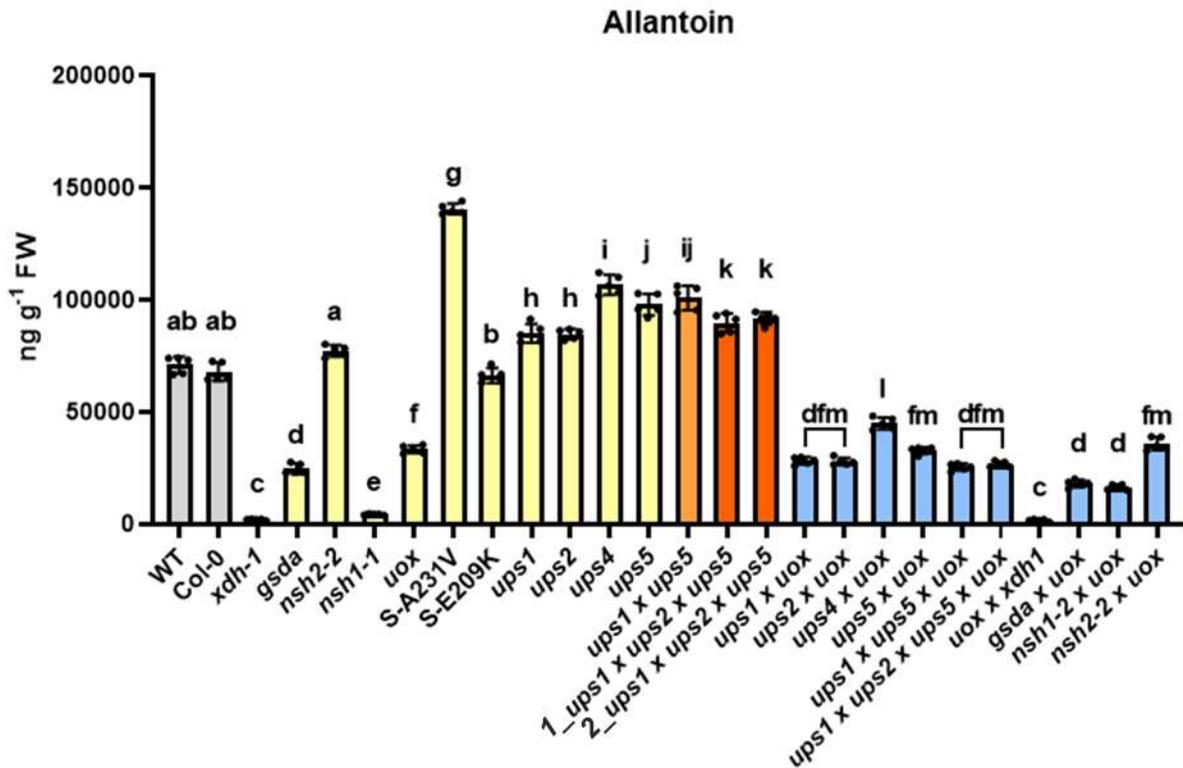


Abbildung 3.22: Allantoingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Auch bei der Messung von Dihydrouracil im Samen liegt der Fokus bei der Analyse der Ergebnisse auf dem Vergleich der *ups*-Einzelmutanten mit den *ups*-Mehrfachmutanten. Hierbei fällt auf, dass die *ups*-Dreifachmutanten deutlich weniger Dihydrouracil enthalten (Abbildung 3.23). Die *ups*-Einzelmutanten sowie die Doppelmutante zeigen Konzentrationen ähnlich des Wildtyp-Niveaus.

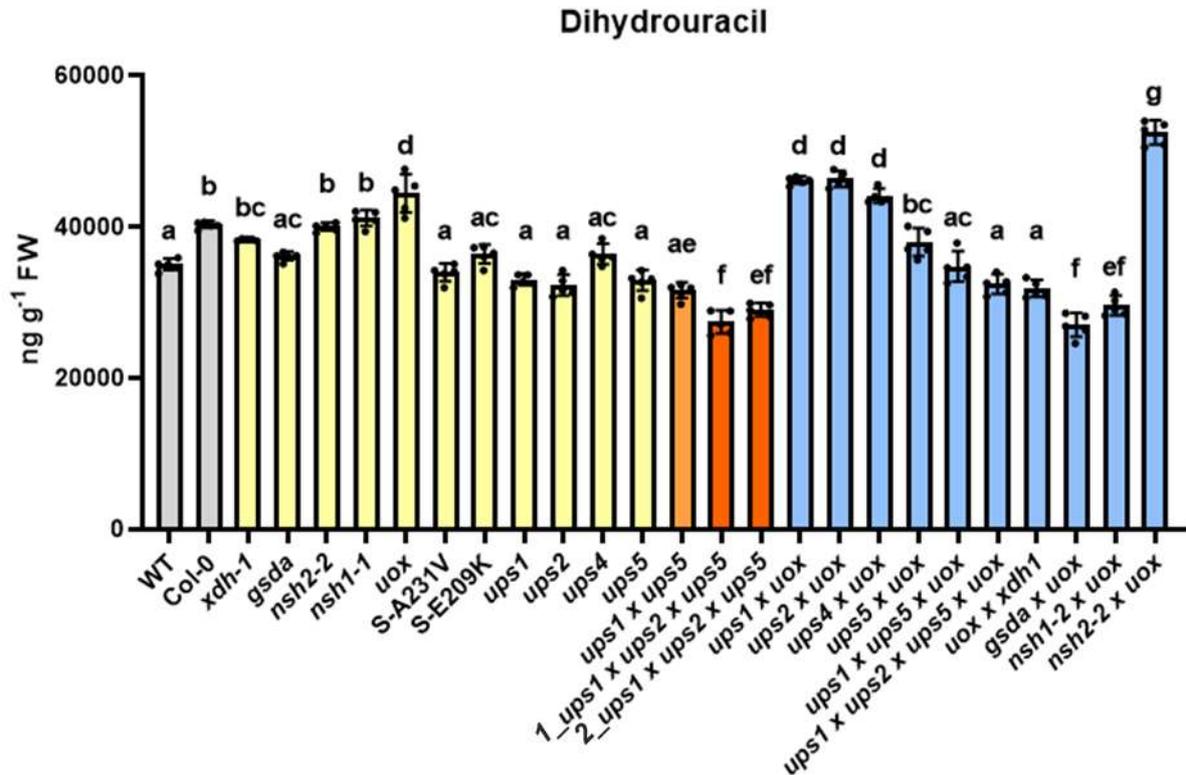


Abbildung 3.23: Dihydrouracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Bei der Messung der Harnsäure im Samen konnten bisherige Tendenzen in einzelnen Mutanten reproduziert werden. Harnsäure akkumuliert in hohen Konzentrationen in *uox*, *ups2 x uox*, *ups4 x uox*, *ups5 x uox* sowie dem schwachen Suppressor *nsh2-2 x uox* (Abbildung 3.24). In Mehrfachmutanten mit *ups1* wurde dagegen nur etwa halb so viel Harnsäure gemessen.

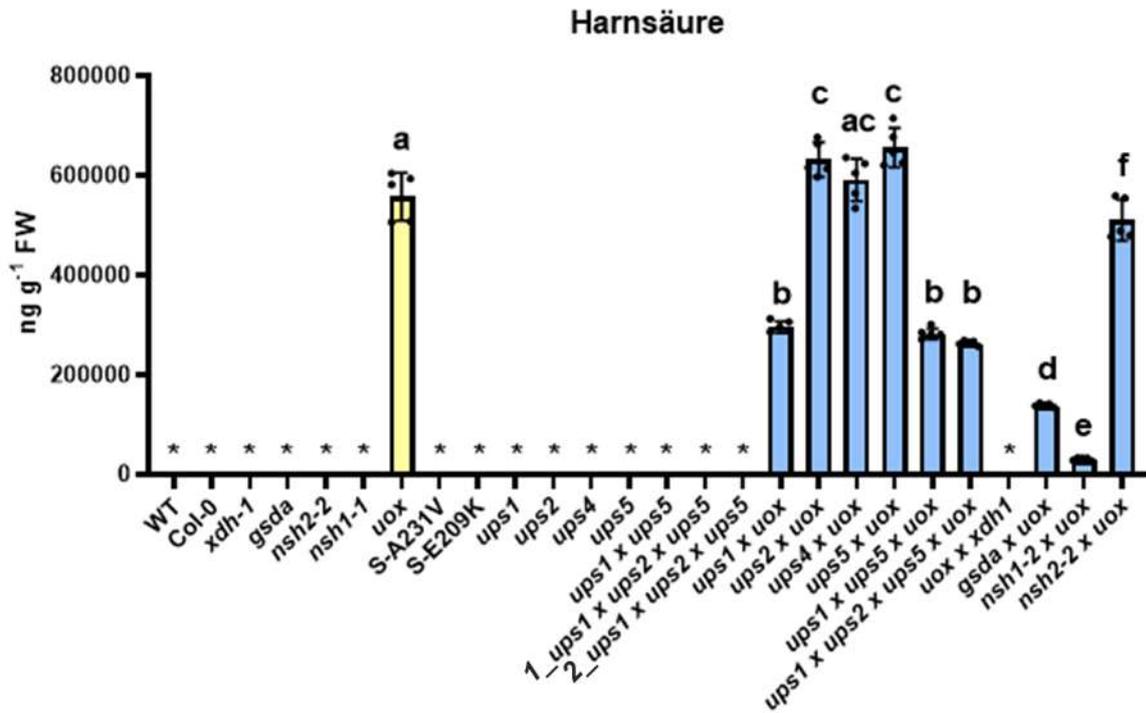


Abbildung 3.24: Harnsäuregehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. Sternchen, nicht detektiert; FW, Frischgewicht.

Aufgrund der extrem hohen Uracilgehalte in einzelnen Mutanten im Samen können etwa für die *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten aus der Abbildung 3.25 keine Aussagen über mögliche Signifikanzen oder Tendenzen in diesen Mutanten getroffen werden. In Abbildung 3.25 können daher nur die Mutanten mit *uox*-Hintergrund verglichen werden.

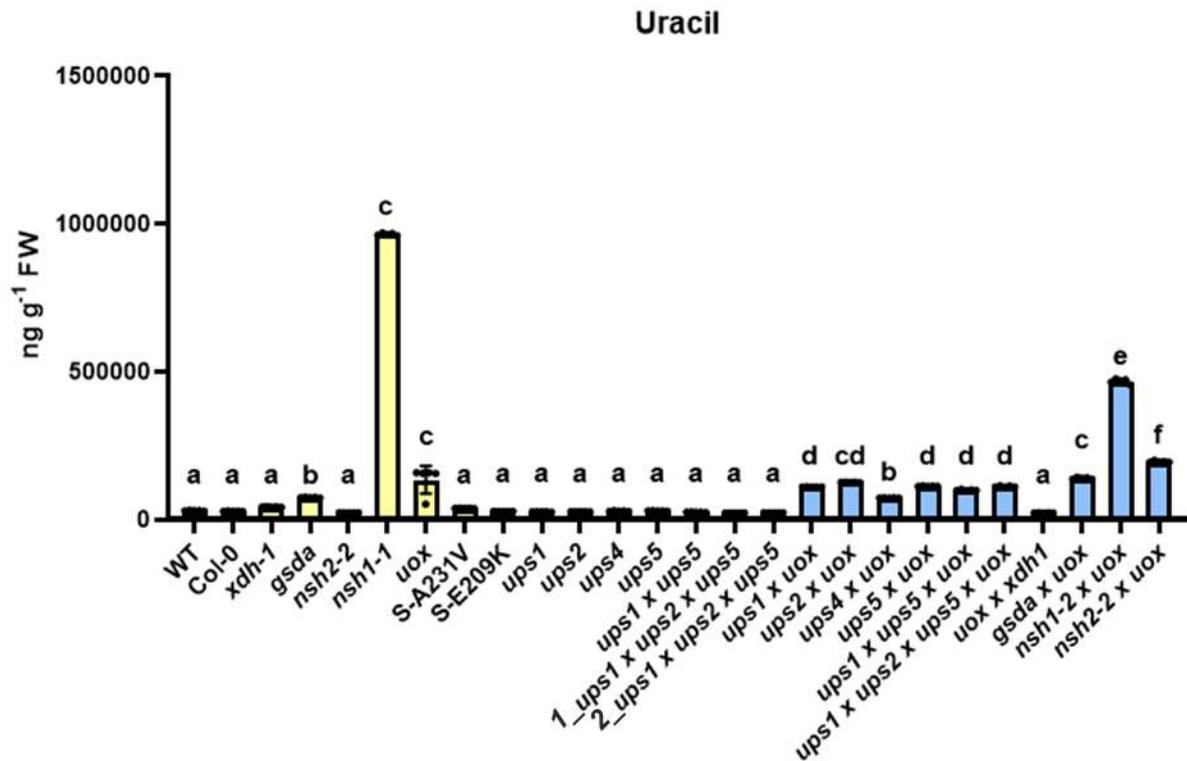


Abbildung 3.25: Uracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Während in den Einzelmutanten *ups1* und *ups2* etwas weniger Uracil im Samen gemessen wurde als im Wildtyp, zeigen die beiden *ups*-Dreifachmutanten deutlich geringere Werte (Abbildung 3.26). In *ups4* und *ups5* liegen die Konzentrationen im Wildtyp-Bereich.

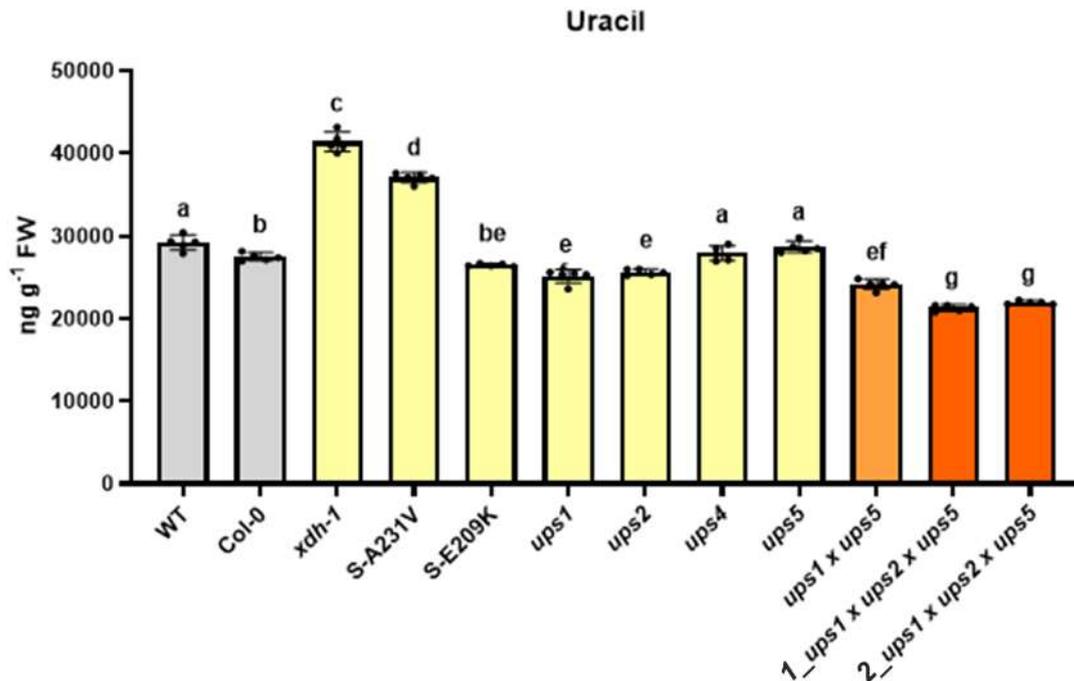


Abbildung 3.26: Uracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange) und *ups*-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Ähnlich wie schon bei der Messung von Uracil behindern auch bei der Betrachtung der Konzentrationen von Xanthin die extrem hohen Mengen in einzelnen Mutanten die Analyse im Hinblick auf die *ups*-Mutanten (Abbildung 3.27). Deshalb werden in Abbildung 3.28 nur die *ups*-Mutanten mit den dazugehörigen Kontrollen isoliert analysiert. Die hohen Konzentrationen in den *nsh-1* Mutanten können wie bei der Akkumulation in Blättern mit ähnlichen Eluationszeiten von Xanthin und Xanthosin erklärt werden.

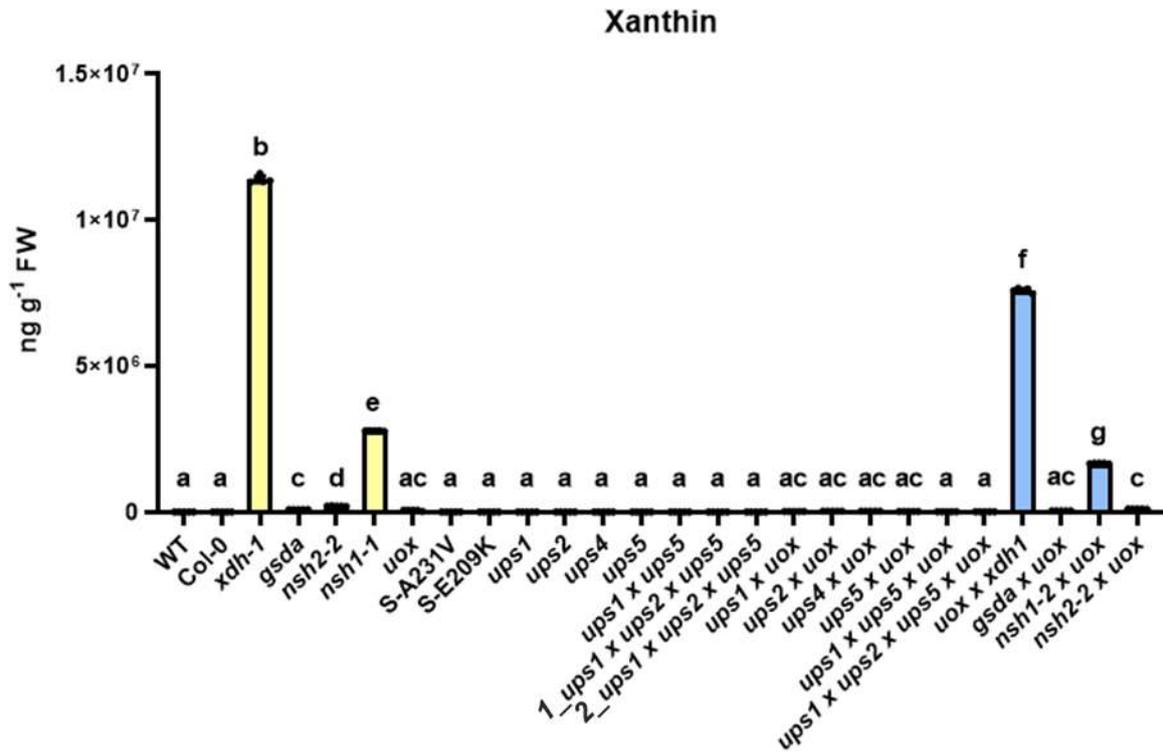


Abbildung 3.27: Xanthingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, Einzel- und Mehrfachmutanten des Purinkatabolismus. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange), *ups*-Dreifachmutante (orange) und Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten mit *uox*-Hintergrund (blau). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Bei der Metabolitanalyse von Xanthin zeigen die *ups*-Einzelmutanten weder untereinander noch im Vergleich zum Wildtyp signifikante Unterschiede (Abbildung 3.28). Auch die *ups*-Doppelmutante akkumuliert nicht weniger Xanthin als die Einzelmutanten. Deutlich weniger Xanthin konnte dagegen gemessen werden, wenn drei UPS-Transporter funktionsunfähig sind.

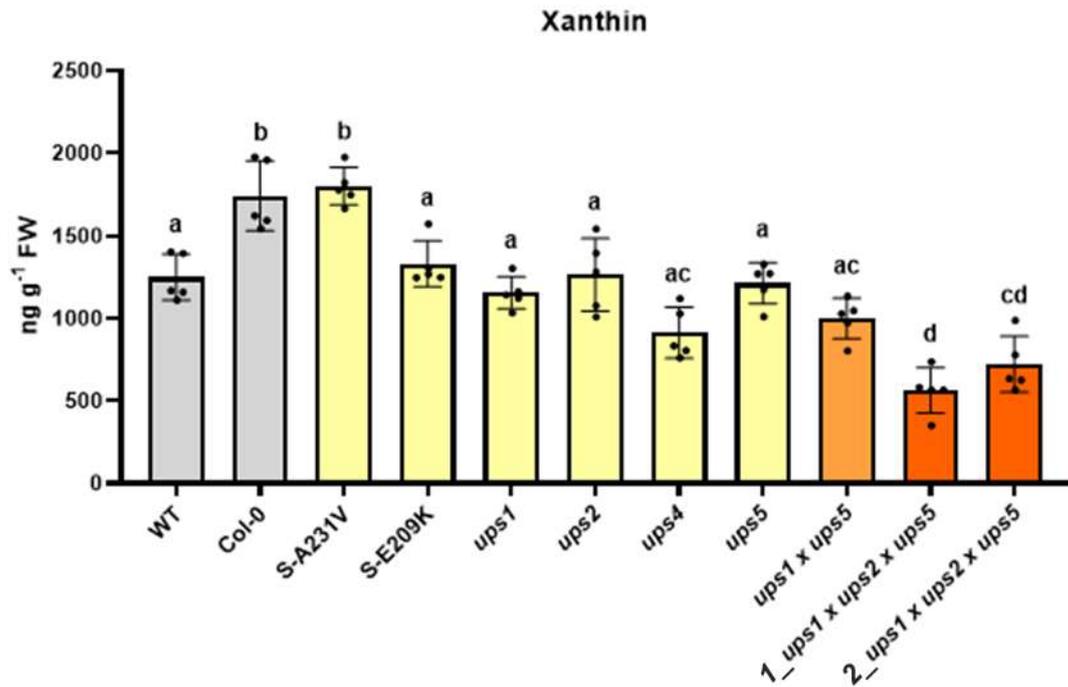


Abbildung 3.28: Xanthingehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), *ups*-Doppelmutante (hellorange) und *ups*-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Die Allantoat-, Allantoin, Dihydrouracil- und Uracilgehalte in alten Blättern sowie die Samengehalte von Allantoat, Allantoin und Dihydrouracil ohne *uox*-Mutanten sind im Anhang (Abbildungen 6.4 bis 6.6) dargestellt.

3.8 Subzelluläre Lokalisation von AtUPS1

Bisher wurde die subzelluläre Lokalisation von AtUPS1 von Lescano *et al.* (2020) in Wurzeln beschrieben und hauptsächlich an der Plasmamembran von Wurzelzellen verortet. Bei der Analyse der Topologie von AtUPS1 (Abbildung 3.3) wurde eine passende Insertionsstelle für den subzellulären Marker mCherry in einer wenig konservierten zytoplasmatischen Region von UPS1 gefunden. Das klonierte UPS1-mCherry-Konstrukt wurde transient in *N. benthamiana* exprimiert. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigten die Expression des Proteins an der Plasmamembran in Blättern (Abbildung 3.29). Da bereits eine Lokalisation in der Plasmamembran vermutet wurde, wurde das cytosolische Kontrollprotein (β -Ureidopropionase-CFP) mit dem UPS1-mCherry-Konstrukt koexprimiert. Zusätzlich wurde eine Salzbehandlung mit 1M NaCl durchgeführt. Das Salz führt zur Plasmolyse, bei der sich der Protoplast von der Zellwand ablöst. Im Bereich der Tüpfel und Plasmodesmen haftet das Plasma jedoch etwas stärker an die Zellwand, sodass dünne Plasmaverbindungen erhalten bleiben, die als Hecht'sche Stränge bezeichnet werden. Diese reißen jedoch mit fortschreitender Plasmolyse immer weiter ab.

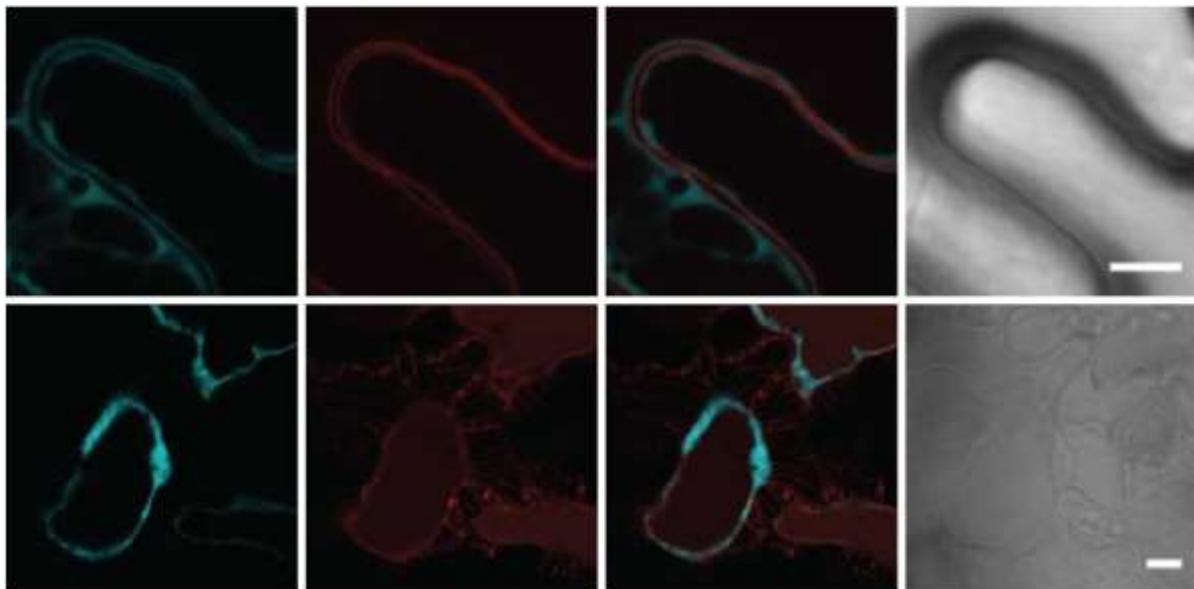


Abbildung 3.29: Subzelluläre Lokalisation von UPS1-mCherry in *N. benthamiana*. Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Links: cytosolisches Kontrollprotein (β -Ureidopropionase-CFP); Mitte links: UPS1-mCherry; Mitte rechts: überlappende Darstellung; rechts: Hellfeld. Zeile oben: ohne Salz; Zeile unten mit 1 M NaCl, Hecht'sche Stränge werden sichtbar. Balken sind 10 μ M.

Die Stabilität des UPS1-mCherry-Konstruktes wurde mittels eines Western Blots analysiert. Das Fusionsprotein hat eine Größe von insgesamt 69.5 kDa. Eine schwache Bande konnte bei dieser Größe detektiert werden (Abbildung 3.30). Freies mCherry hat eine Größe von ca. 25 kDa und wurde am stärksten vom mCherry-spezifischen Antikörper detektiert. Weiterhin wurden auf dem Western Blot hauptsächlich nur Teile des UPS1-mCherry-Konstruktes detektiert. Da es sich um ein Membranprotein handelt, wurde die Probenaufbereitung des Konstruktes aus Blättern durch verschiedene Konzentrationen an Extraktionspuffer sowie verschiedene Temperatureinstellungen mehrfach wiederholt, um das gesamte Proteinkonstrukt zu extrahieren. Eine wesentliche Verbesserung der Extraktion konnte jedoch nicht erreicht werden.

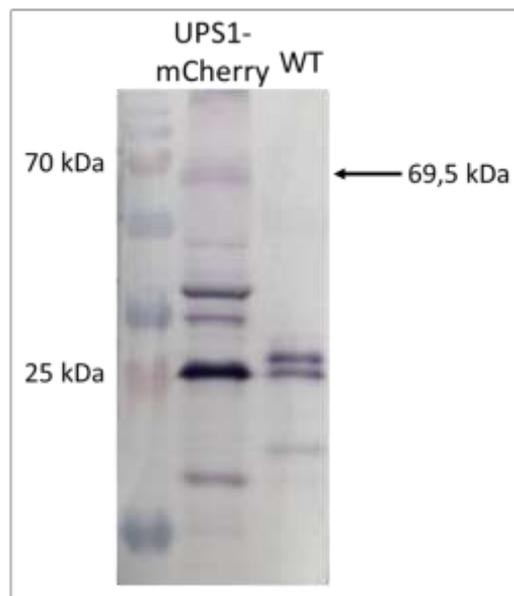


Abbildung 3.30: Western Blot des Fusionsproteins UPS1-mCherry. Nach transienter Expression in Blättern von *N. benthamiana* wurden zwei kleine Blattscheiben in flüssigem Stickstoff gemörsert, 1 x SDS LP hinzugegeben und für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Detektion des Konstruktes im Western Blot erfolgte mit einem mCherry-spezifischen Antikörper.

Um sicherzustellen, dass die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.29) reproduzierbar sind, wurde die Expression des Konstruktes noch einmal durchgeführt. Wie in Abbildung 3.31 zu sehen konnten erneut eine Lokalisation des Konstruktes an der Plasmamembran sowie die Hecht'schen Stränge während der Plasmolyse beobachtet werden.

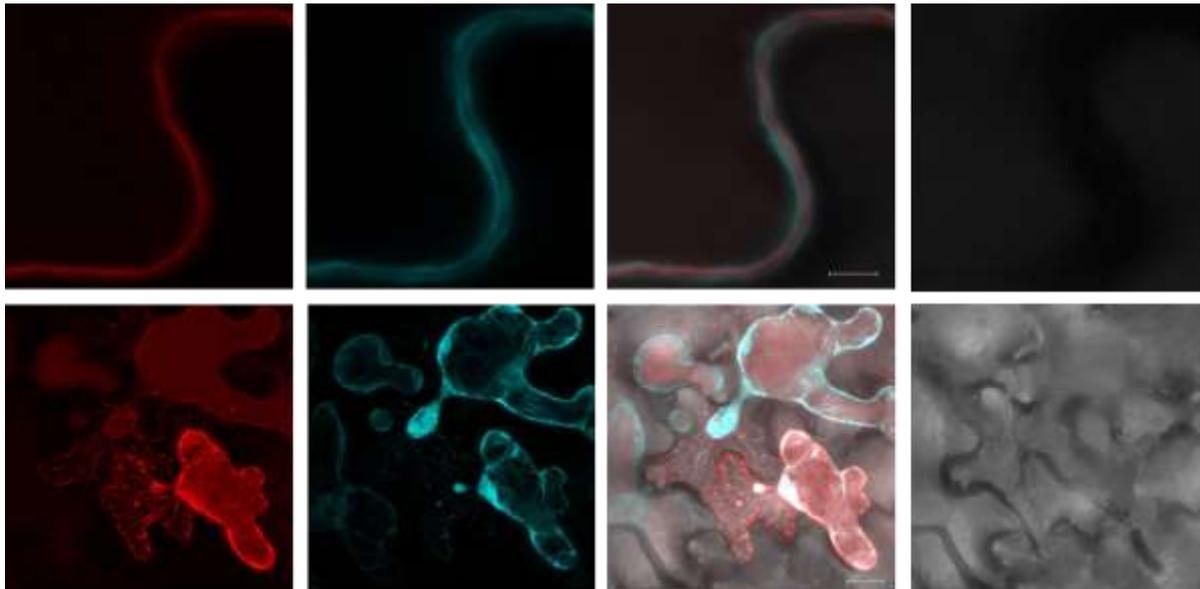


Abbildung 3.31: Subzelluläre Lokalisation 2 von UPS1-mCherry in *N. benthamiana*. Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Links: UPS1-mCherry; Mitte links: cytosolisches Kontrollprotein (β -Ureidopropionase-CFP); Mitte rechts: überlappende Darstellung; rechts: Hellfeld. Zeile oben: ohne Salz; Zeile unten mit 1 M NaCl, Hecht'sche Stränge werden sichtbar. Balken sind 10 μ M.

3.9 Promotor-GUS-Studien

Für die Promotor-GUS-Studien wurden die Pflanzen wie für die massenspektrometrische Analyse unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen. Ganze Pflanzen wurden kurz vor der Sprossbildung und kurz nach der Blüte in GUS-Färbelösung inkubiert. Desweiteren wurden Embryonen während ihrer Entwicklung im Herz- und Torpedo-Stadium sowie im reifen Embryo untersucht (Abbildung 3.32).

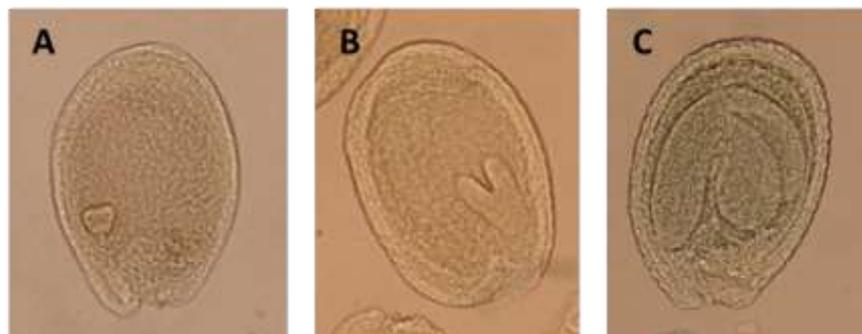


Abbildung 3.32: Embryonale Entwicklungsstadien in *A. thaliana*. A: Herzstadium; B: frühes Torpedostadium, C: reifer Embryo.

In bisherigen Promotor-GUS-Studien wurde die Expression von *AtUPS1* in Keimlingen nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 2004). War zu Beginn der Keimlingsentwicklung *UPS1* noch im ganzen Keimling exprimiert, konnte nach wenigen Tagen eine Färbung nur noch im Hypokotyl und in den Hydathoden beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 2004). In 11-Tage-alten Pflanzen war keine Aktivität von *UPS1* mehr zu beobachten. Wie in den Abbildungen 3.33 und 3.34 zu sehen ist, konnte an jungen Pflanzen (3 Wochen alt) kurz vor Sprossbildung eine Expression nur in Hydathoden und teilweise am äußeren Blattrand festgestellt werden. In alten Pflanzen (6 Wochen alt), deren Blühphase fast komplett abgeschlossen war, war keine Promotoraktivität sichtbar.



Abbildung 3.33: UPS1-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von *A. thaliana*. A: 6 Wochen alte Pflanze; B: 3 Wochen alte Pflanze. Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von *UPS1* wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und fotografisch dokumentiert. Balken entsprechen 1 cm.

Bei Betrachtung der einzelnen Gewebe konnte eine GUS-Färbung im vaskulären Gewebe, genauer im Phloem zu Beginn der reproduktiven Phase detektiert werden (Abbildung 3.34 E). Während in jungen Blättern eine Expression im gesamten Leitgewebe der Blätter sichtbar ist, nimmt diese mit zunehmendem Blattalter weiter ab (Abbildung 3.34 A-C). UPS1-Aktivität konnte darüberhinaus auch in den Tragblättern beobachtet werden (Abbildung 3.34 D). In Wurzeln ist der Promotor von UPS1 nicht aktiv (Abbildung 3.34 F).

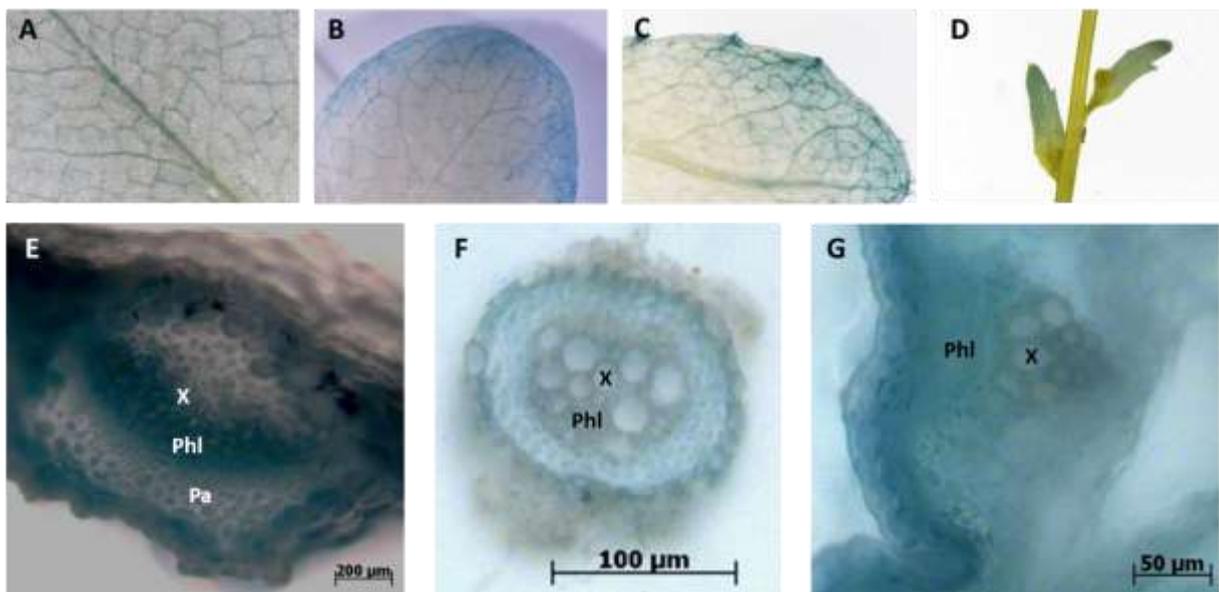


Abbildung 3.34: UPS1-Promotor-Aktivität in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*. A: Blatt (Blattposition 10) einer 3 Wochen alten Pflanze; B und C: Blatt (Blattposition 8 und 9) einer 6 Wochen alten Pflanze; D: Sprossachse mit stängelständigen Blättern; E: Querschnitt eines Blattes (Blattposition 10 einer 3 Wochen alten Pflanze); F: Querschnitt des Stängels einer 3 Wochen alten Pflanze; G: Querschnitt eines Blattstängels (6 Wochen alte Pflanze). Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS1 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und photographisch dokumentiert. X: Xylem; Phl: Phloem; P: Perizykel; Pa: Parenchym.

Bei der Embryonalentwicklung wird ist der Promotor von UPS1 in den Kotyledonen, aber nicht im Hypokotyl, ab dem späten Torpedostadium aktiv (Abbildung 3.35). Bei einem aus der Samenschale herausgelösten Embryo ist die Expression deutlich zu erkennen (Abbildung 3.35 D). In früheren Stadien ist der UPS1-Promotor nicht aktiv.

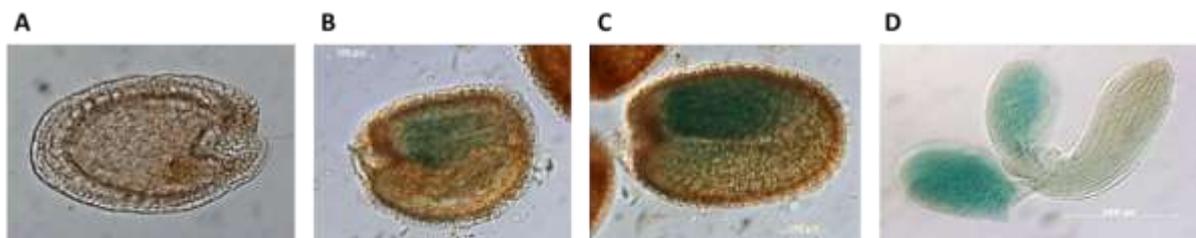


Abbildung 3.35: UPS1-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von *A. thaliana*. A: Herzstadium; B: Torpedostadium, C: reifer Embryo; D: einzelner Embryo aus Samenschale gelöst. Embryonen von Promotor-GUS-Linien von UPS1 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und mikroskopisch betrachtet.

Auch für den Promotor von UPS2 wurden bisherige GUS-Färbungen nur in der Keimlingsentwicklung durchgeführt. Hier ist die Promotor-Aktivität analog zu pUPS1. Die Expression von *UPS2* ist erst ab Tag 5 nach Keimungsbeginn in den Kotyledonen zu verorten und 2 Tage später auch in den Wurzeln (Schmidt *et al.*, 2004). Für den Promotor von UPS2 konnte in jungen Pflanzen eine Färbung an den Spitzen von Primärblättern und teilweise in den Hydathoden beobachtet werden (Abbildung 3.36). In alten Pflanzen, die die reproduktive Phase fast abgeschlossen haben, ist UPS2 nicht exprimiert.

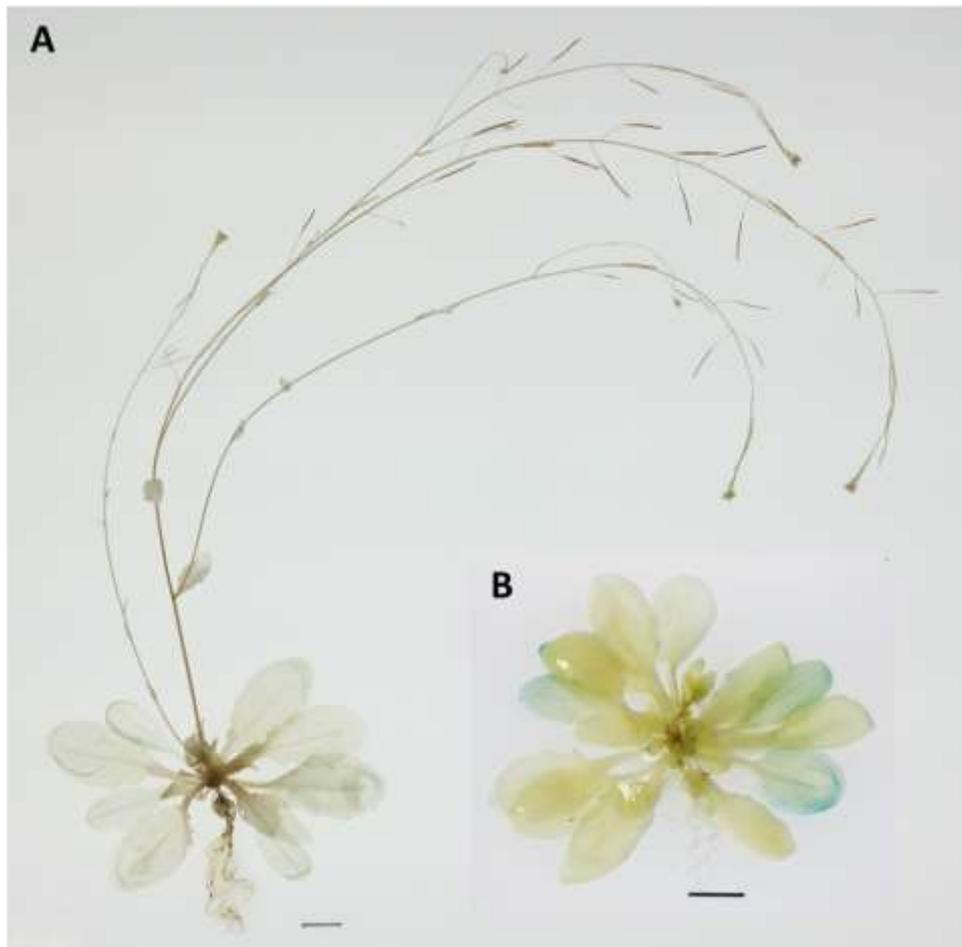


Abbildung 3.36: UPS2-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von *A. thaliana*. A: 6 Wochen alte Pflanze; B: 3 Wochen alte Pflanze. Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS2 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und photographisch dokumentiert. Balken entsprechen 1 cm.

Wie in Abbildung 3.37 zu sehen konnte pUPS2 teilweise in Blättern junger Pflanzen (3 Wochen alt) sowie in der Wurzel nachgewiesen werden. Dort ist UPS2 vor allem im Perizykel aber auch im Phloem aktiv (Abbildung 3.37 D). In Wurzeln von Pflanzen am Ende der Reproduktionsphase konnte keine Aktivität der Promotors detektiert werden (Abbildung 3.37 E).

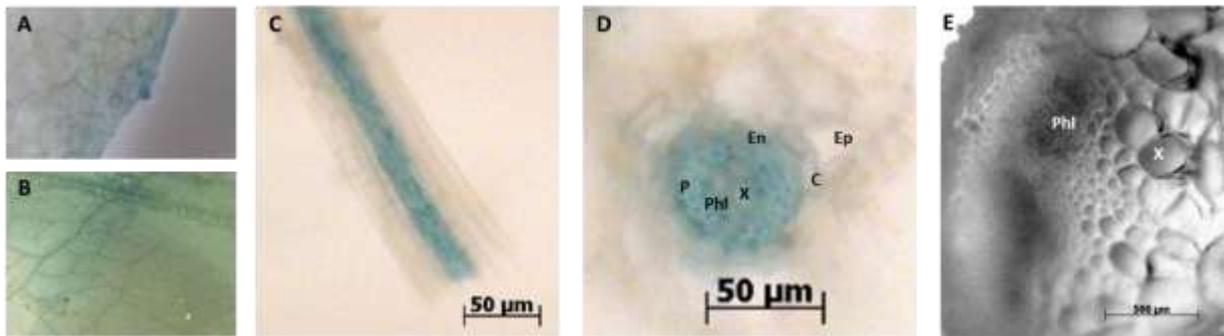


Abbildung 3.37: UPS2-Promotor-Aktivität in Blättern und Wurzeln von *A. thaliana*. A und B: Blatt einer 3 Wochen alten Pflanze (Blattposition 8); C: Wurzel einer 3 Wochen alten Pflanze; D: Querschnitt der Wurzel einer 3 Wochen alten Pflanze; E: Querschnitt der Wurzel einer 6 Wochen alten Pflanze. Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS2 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und photographisch dokumentiert. X: Xylem; Phl: Phloem; P: Perizykel; En: Endodermis; C: Cortex; Ep: Epidermis.

Auch in der Keimlingsentwicklung ist pUPS2 weder in frühen Stadien noch im reifen Embryo aktiv (Abbildung 3.38).



Abbildung 3.38: UPS2-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von *A. thaliana*. A: Herzstadium; B: Torpedostadium, C: reifer Embryo. Embryonen von Promotor-GUS-Linien von UPS2 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und mikroskopisch betrachtet.

In verschiedenen erzeugten und getesteten Linien konnte weder in jungen noch in alten Pflanzen eine Promotoraktivität für UPS4 nachgewiesen werden (Abbildungen 3.39 und 3.40).

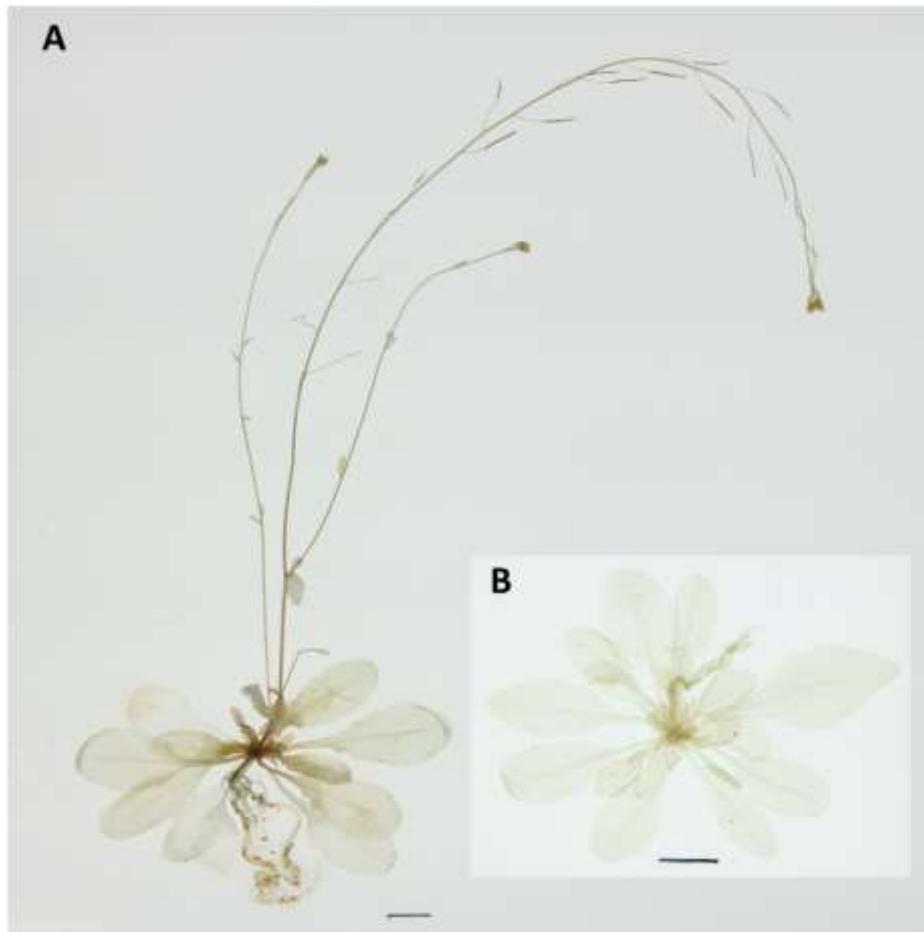


Abbildung 3.39: UPS4-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von *A. thaliana*. A: 6 Wochen alte Pflanze; B: 3 Wochen alte Pflanze. Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS4 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und fotografisch dokumentiert. Balken entsprechen 1 cm.

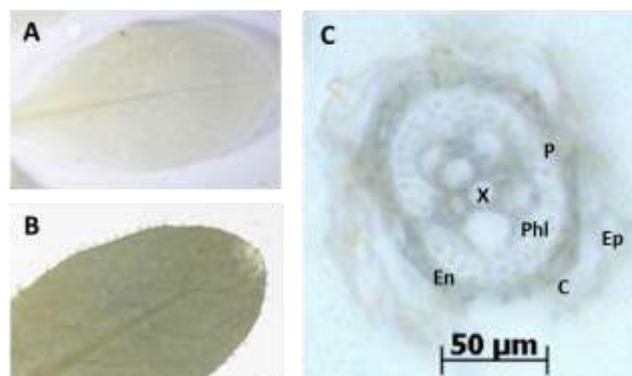


Abbildung 3.40: UPS4-Promotor-Aktivität in Blättern von *A. thaliana*. A: Blatt einer 3 Wochen alten Pflanze (Blattposition 7); B: Blatt einer 6 Wochen alten Pflanze (Blattposition 10); C: Querschnitt der Wurzel einer 3 Wochen alten Pflanze. Die

Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS4 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und fotografisch dokumentiert. X: Xylem; Phl: Phloem; P: Perizykel; En: Endodermis; C: Cortex; Ep: Epidermis.

Auch während der gesamten Embryonalentwicklung konnte in sämtlichen getesteten Linien keine pUPS4-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.41). Die RNS-Sequenzierungsdaten (*EFP Browser*) zeigen jedoch eine Expression im reifen Embryo an.

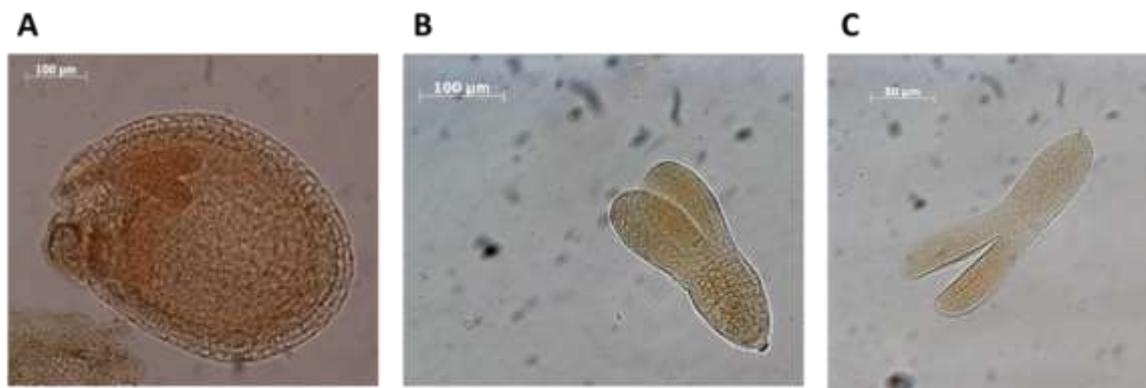


Abbildung 3.41: UPS4-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von *A. thaliana*. A: Herzstadium; B: Torpedostadium, C: reifer Embryo aus Samenschale gelöst. Embryonen von Promotor-GUS-Linien von UPS4 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und mikroskopisch betrachtet.

Bei den Promotor-GUS-Studien zu UPS5 konnte eine Aktivität des Transporters sowohl in jungen als auch in alten Pflanzen in verschiedenen Geweben beobachtet werden (Abbildung 3.42).

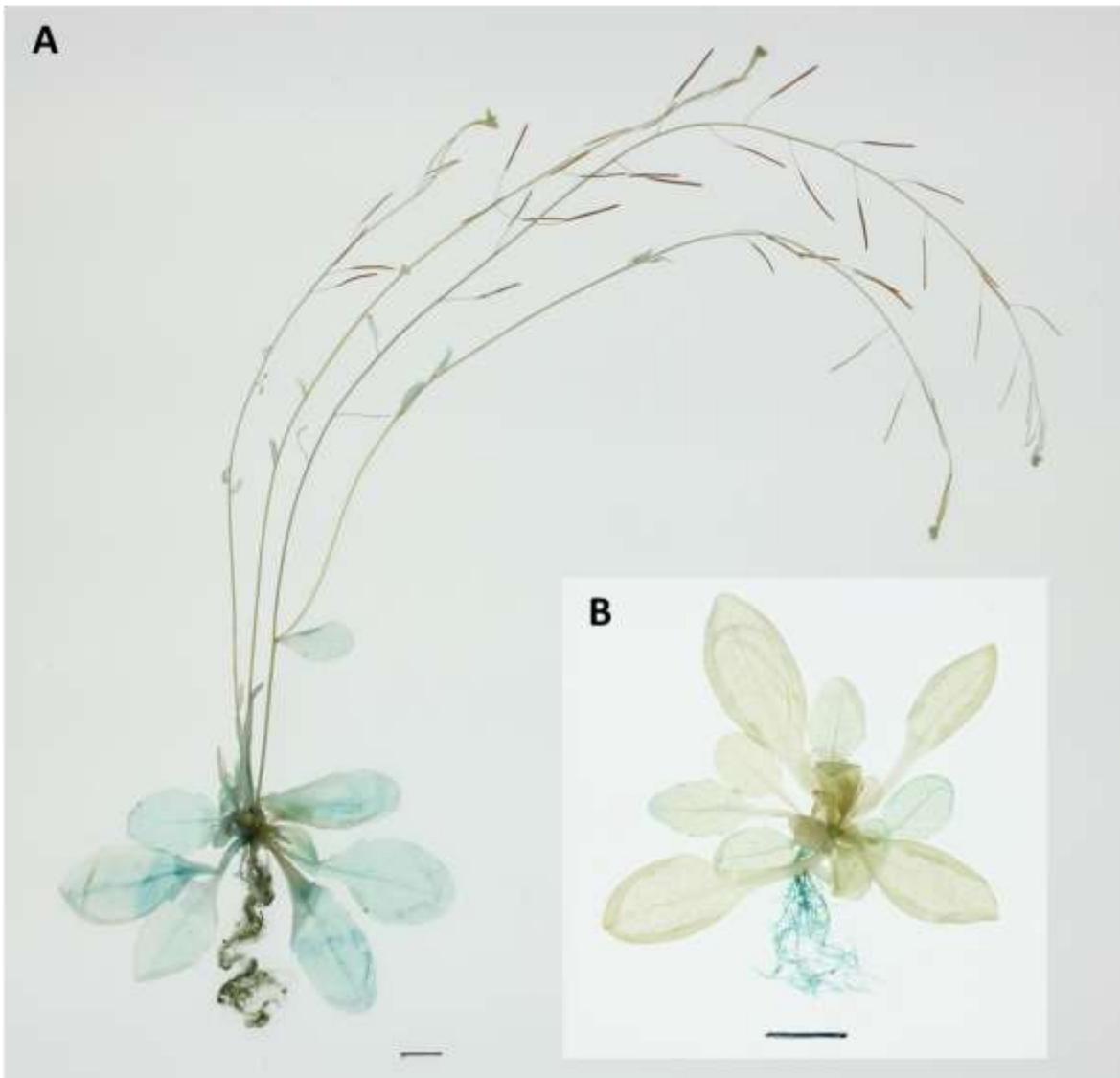


Abbildung 3.42: UPS5-Promotor-Aktivität in jungen und alten Pflanzen von *A. thaliana*. A: 6 Wochen alte Pflanze; B: 3 Wochen alte Pflanze. Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS5 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und photographisch dokumentiert. Balken entsprechen 1 cm.

Besonders in Wurzeln ist der Promotor im Perizykel und Phloem sowohl in jungen als auch in alten Pflanzen aktiv (Abbildung 3.43 D und E). Auch im vaskulären Gewebe, genauer im Phloem und Parenchymgewebe in Blättern, wird UPS5-Aktivität beobachtet (Abbildung 3.43 A-C, F). Mit zunehmender Seneszenz nimmt die Aktivität des Promotors langsam ab (Abbildung 3.43 C). Im Blattstängel ist UPS5 im Perizykel aktiv, nicht jedoch im Xylem- oder Phloemgewebe (Abbildung 3.43 G).

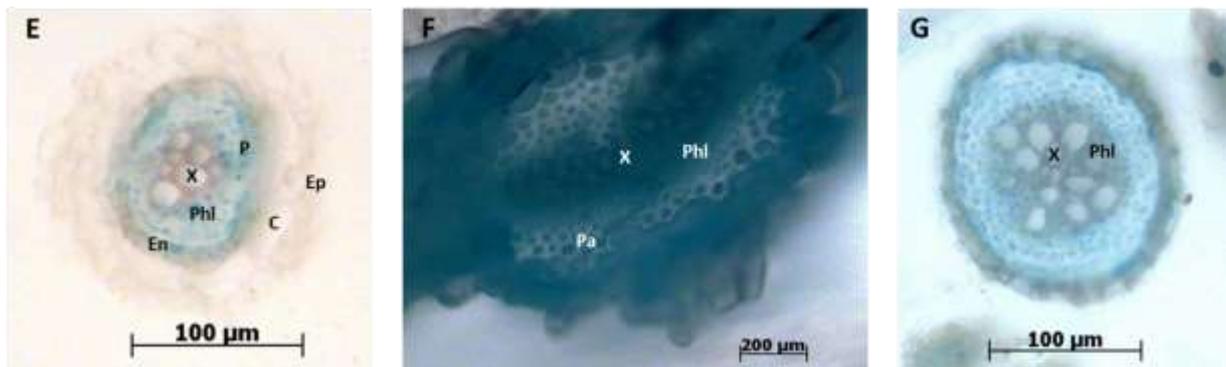
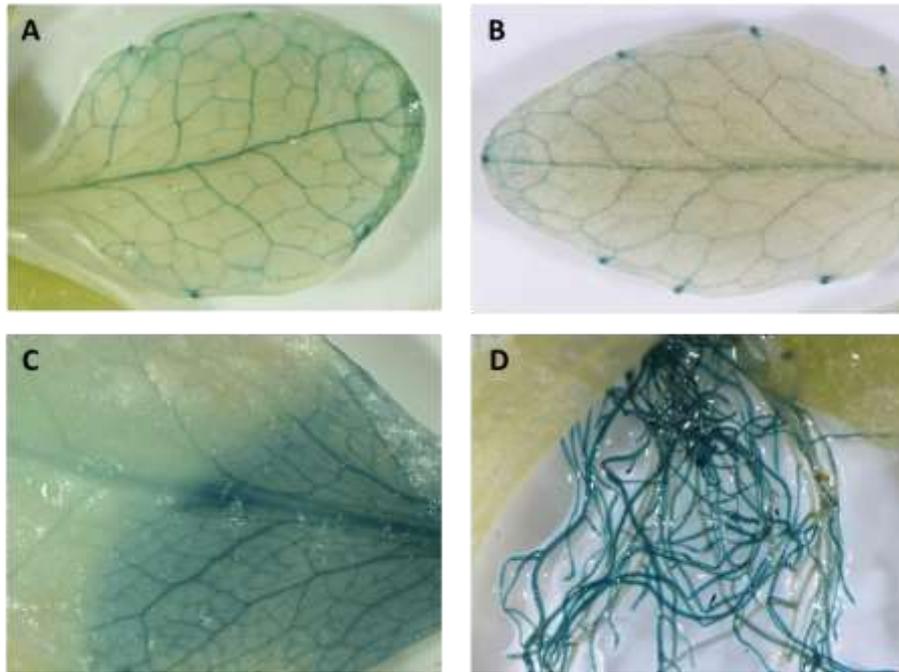


Abbildung 3.43: UPS5-Promotor-Aktivität in Blättern von *A. thaliana*. A und B: Blatt (Blattposition 5 und 6) einer 3 Wochen alten Pflanze; C: Blatt (Blattposition 4) einer 6 Wochen alten Pflanze; D: Wurzeln einer 3 Wochen alten Pflanze; E: Querschnitt der Wurzel einer 6 Wochen alten Pflanze; F: Querschnitt eines Blattes (Blattposition 6 einer 3 Wochen alten Pflanze); G: Querschnitt eines Blattstängels (6 Wochen alt). Die Pflanzen wurden unter Stickstoffmangel angezogen. Die Promotor-GUS-Linien von UPS5 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und photographisch dokumentiert. X: Xylem; Phl: Phloem; P: Perizykel; En: Endodermis; C: Cortex; Ep: Epidermis.

Während der Embryonalentwicklung ist der UPS5-Promotor bereits ab dem Gobulistadium aktiv (Abbildung 3.44). Mit zunehmender Entwicklung des Embryos wird die gewebespezifische Funktion von UPS5 deutlich. Dieser ist ab dem Torpedostadium ausschließlich im Hypokotyl aktiv (Abbildung 3.44 C-E).

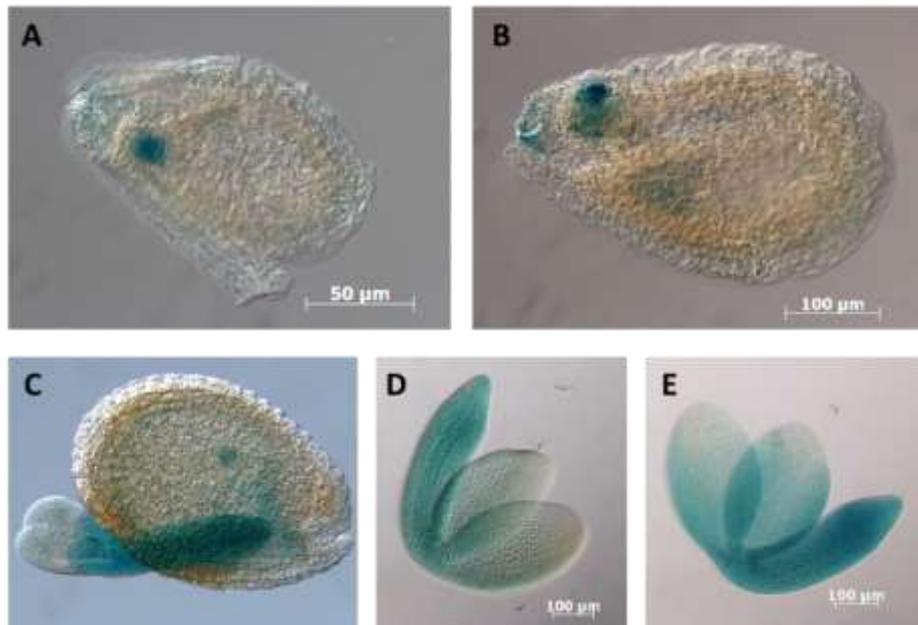


Abbildung 3.44: UPS5-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung von *A. thaliana*. A: Globulistadium B: Herzstadium; C: Torpedostadium, D: reifer Embryo aus Samenschale gelöst; E: einzelner Embryo 1 Tag nach Keimung. Embryonen von Promotor-GUS-Linien von UPS5 wurden in GUS-Färbelösung inkubiert, entfärbt und mikroskopisch betrachtet.

4. Diskussion

4.1 Analyse der Suppressoren, Einzel- und Doppelmutanten der UPS-Transporter

Ziel der genetischen Sichtung war es, neue katalytische und regulative Komponenten des Purinkatabolismus zu identifizieren und damit neue Erkenntnisse über dessen Funktion zu erlangen. Dabei wurden zwei Suppressorallele der XDH gefunden. Diese war jedoch schon im Vorfeld als Suppressor der Uratoxidase bekannt (Hauck *et al.*, 2014). Bei zwei weiteren Suppressoren wurden Punktmutationen an unterschiedlichen Stellen im *UPS1*-Gen gefunden (Abbildung 3.2). In beiden Fällen führte ein Basenaustausch in einem konservierten Bereich zu einem Aminosäureaustausch. Während bei E209K der zytoplasmatische Bereich betroffen ist, liegt der Austausch bei A231V in der Transmembranhelix vor. Dieser Unterschied hat Auswirkungen auf die Effizienz der Suppressoren, wie an verschiedenen Stellen deutlich wird. Generell sind beide Suppressoren phänotypisch in etwa mit der *ups1 x uox* Doppelmutante zu vergleichen (Abbildung 3.4). Während die Punktmutation im zytoplasmatischen Bereich zu einer ähnlichen Keimlingsetablierungsrate wie bei *ups1 x uox* führt, ist diese für A231V signifikant geringer. Dazu passt die gemessene erhöhte Harnsäurekonzentration im Samen von A231V (Abbildung 3.9). Allerdings kann der Harnsäurespiegel und die damit verbundenen Keimlingsetablierungsrate bei den Suppressoren je nach Samensatz leicht variieren. Die EMS-Suppressoren sind höchstwahrscheinlich Funktionsverlustmutanten von *UPS1*, weil sie ähnlich wie die T-DNS-Doppelmutante signifikant verringerte Harnsäurekonzentrationen im Samen aufweisen. Während der Defekt von *UPS1* im *uox*-Hintergrund zu einer geringeren Harnsäurekonzentration im Samen führt, zeigen Defekte von *UPS2*, *UPS4* und *UPS5* in *uox*-Doppelmutanten keine verminderte Harnsäure in Samen. Diese Doppelmutanten können im Gegensatz zu *ups1 x uox* keinen Keimling etablieren (Abbildung 3.4) und unterschieden sich nicht gegenüber *uox*. Allerdings konnte bei der Auslegung von sehr frischen Samen auf halbkonzentriertem MS-Medium ein spezieller Keimungsphänotyp ausschließlich für *ups4 x uox* entdeckt werden. Während die Keimungsrate für die Doppelmutante wie

in Abbildung 3.6 A gezeigt nur bei knapp 10% lag, konnte mit frisch geernteten Samen eine Keimungsrate von etwa 30% erreicht werden (Abbildung 3.7 A). Der *uox*-Hintergrund beeinträchtigt die Langlebigkeit der Samen erheblich und führt mit zunehmendem Alter der Samen schließlich zur Keimungsunfähigkeit. UPS4 könnte bei der Umverteilung von Harnsäure im Samen eine Rolle spielen, so dass für die Keimung kritische Bereiche des Samens in der *ups4*-Mutante im *uox*-Hintergrund zunächst weniger Harnsäure enthalten. Bereits bekannte Suppressoren wie GSDA, XDH und NSH1 können den Harnsäurespiegel teilweise oder komplett reduzieren.

Eine verminderte Harnsäurekonzentration im Samen konnte nur in der *ups1 x uox* Doppelmutante beobachtet werden (Abbildung 3.9). Sinkt der Harnsäurespiegel im Samen, sind die Keimlinge teilweise überlebensfähig (Abbildung 3.6 B) wie in den *ups1*-Mutanten im *uox*-Hintergrund gezeigt wurde. An dieser Stelle ist die Frage zu klären, ob die geringe Harnsäuremenge durch reduzierten Import in die Samen oder mangelnden Import in die Kotyledonen, den Expressionsort von *UPS1*, verursacht wird. Im letzten Fall müsste man postulieren, dass die Produktion von Harnsäure im Samen bei defekter Verteilung (defektem Import in die Kotyledonen) gehemmt wird, so dass insgesamt weniger Harnsäure entsteht.

Durch Rückkreuzung einer *ups1 x uox* Doppelmutante als Mutter mit einer *uox*-Mutante als Vater wurde eine *uox*-Pflanze erzeugt, die maternales Gewebe enthält, das *ups1* ist, aber im Endosperm und Embryo ein Wildtyp-Allel für *UPS1* enthält. Da in dieser Pflanze genauso viel Harnsäure akkumulierte wie in *uox*, muss der Defekt von *UPS1* im maternalen Gewebe für die verringerte Harnsäuremenge ursächlich sein. Es ist daher wahrscheinlich, dass nicht die Verteilung von Harnsäure im Samen, sondern der Import von Harnsäure in den Samen für die verringerte Harnsäurekonzentration im *ups1 x uox*-Hintergrund verantwortlich ist. Da *UPS1* im Phloemgewebe von Blättern aktiv ist, könnte in der *ups1*-Mutante die Phloembeladung mit Harnsäure aus den *uox*-Blättern defekt sein, wodurch weniger Harnsäure in den Samen ankommt. Entsprechend akkumuliert Harnsäure in alten Blättern mit *ups1 x uox* Hintergrund stärker als in der *uox*-Mutante (Abbildung 3.17).

4.2 Erzeugung und Effizienz der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-System

Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie sollten Mehrfachmutanten erzeugt werden, die weiteren Aufschluss über die physiologische Funktion der UPS-Transporter geben sollten. Die Effizienz der ausgewählten *guide*RNS war dabei sehr unterschiedlich. Während besonders die *guide*RNS für *UOX* häufig zu Mutationen führten, war die Mutationseffizienz der *guide*RNS für *UPS4* so gering, dass keine Mutationen in *UPS4* gefunden werden konnten (siehe Kapitel 3.5). Da die Wahl der *guide*RNS die Effizienz der Transformationsereignisse und somit die erfolgreiche Erzeugung von Mutanten mittels CRISPR/Cas9 beeinflusst, wurden alle erstellten gRNS zuvor *in silico* auf Effizienz und sekundäre Strukturen getestet (Doench *et al.*, 2016; Zuker 2003). Dafür wurden die Programme CRISPRdirect, Doench score und Mfold Webserver verwendet. Dennoch kann die Effizienz nicht mit 100%iger Sicherheit vorhergesagt werden. Um einen Funktionsverlust für *UPS4* zu erzeugen, müssen in weiterführenden Arbeiten neue *guide*RNS erstellt und getestet werden. Alternativ könnte zur Steigerung der Editierungereignisse auch ein anderes Cas9-Protein verwendet werden (Steinert *et al.*, 2014).

Die häufigsten Mutationsereignisse in *A. thaliana* als auch in *Oryza sativa* sind 1 bp Insertionen oder Deletionen, die zu einer Verschiebung des Leserasters der Nukleotidsequenz führen (Feng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Dies war in den getesteten Pflanzen auch für *UPS2* der Fall. Für *UOX* konnten häufiger bis zu 7 bp große Insertionen oder Deletionen beobachtet werden. Wenn die Anzahl der zu testenden Pflanzen sehr groß ist, ist eine Vorselektion mittels Schmelzkurvenanalytik sinnvoll. Da heterozygote Pflanzen in der Analyse zwei Schmelzpunkte zeigen, sind sie leicht von homozygoten zu unterscheiden (Abbildung 3.11). Ob bei den homozygoten Pflanzen tatsächlich Mutationsereignisse vorliegen oder diese doch nicht editiert sind, kann mit der *High Resolution Melt*-Analyse nicht sicher beantwortet werden. Deshalb müssen alle homozygoten Pflanzen im Kapillar-Sequenzierer weiter analysiert werden. Mit dieser Methode können die Fragmentgrößen auf ein Basenpaar genau bestimmt werden. Häufig waren die homozygoten Pflanzen nicht editiert.

Mit der Auswahl von zwei *guide*RNS je Gen sollte die Wahrscheinlichkeit eines Mutationsereignisses erhöht werden. Allerdings besteht bei zwei *guide*RNS auch die

Gefahr einer Rückverschiebung ins Leseraster, wenn beispielsweise eine Doppelmutation (1 bp Insertion bei *guideRNS 1* und 1 bp Deletion bei *guideRNS 2*) vorliegt. Dieses Ereignis konnte in den analysierten Pflanzen nicht beobachtet werden.

4.3 Auswirkungen des Stickstoffmangels beim Pflanzenwachstum

In mehreren initialen Experimenten wurden die Pflanzen stets unter vollständiger Nährstoffzugabe angezogen. Gerade Stickstoff ist als Bestandteil von Proteinen, Nucleinsäuren und weiterer wichtiger Substanzen wie Chlorophyll und Coenzymen ein wichtiges Makroelement, welches unter anderem über den Abbau von Nucleotiden aus alten Blättern zurückgewonnen und in junges Gewebe transportiert werden kann. Unter ausreichendem externen Stickstoffangebot sind die Pflanzen nicht nur optimal mit Stickstoff versorgt, auch die Enzyme des Purinnucleotidkatabolismus sind weniger stark exprimiert. Unter der Annahme, dass die UPS-Transporter Allantoin, welches beim Abbau von Harnsäure entsteht, aus den alten in junge Blätter remobilisieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Transporter bei hoher Stickstoffversorgung und daher geringer Remobilisierung kaum aktiv sind. Der benötigte Stickstoff wird stattdessen bevorzugt und in großen Mengen aus dem Boden aufgenommen. Deshalb wurden alle Pflanzen für die Metabolit- und Promotoranalysen unter Stickstoffmangel angezogen, um die Remobilisierung zu fördern. Lediglich eine sehr geringe Menge an Stickstoff, der in der verwendeten Erde vorhanden ist, stand den Pflanzen beim Wachstum zur Verfügung. Dies führte zu deutlich reduziertem Wachstum der Pflanzen gegenüber ausreichender Stickstoffgabe (Abbildung 3.13). Soltabayeva *et al.* (2018) zeigten in ihren Studien unter anderem anhand der *AtXDH1*-Mutante, dass ältere Blätter eine frühe Seneszenz und niedrigere organische Stickstoffkonzentrationen im Vergleich zu älteren Wildtyp-Blättern aufwiesen, wenn diese unter Stickstoffmangel (Zugabe von 1 mM NaNO₃) angezogen wurden. Auch die Expression der *AtUPS*-Transporter 1, 2 und 5 wurde untersucht. Hier konnte unter Stickstoffmangelbedingungen eine 5 bis 10-fach höhere Expression in älteren Blättern des Wildtyps im Vergleich zu ausreichender Stickstoffgabe festgestellt werden (Soltabayeva *et al.*, 2018). Weiterhin zeigten Casartelli *et al.* (2019) in Weizen, dass

Stickstoffmangel den Purinkatabolismus verstärkt, sodass mehr Stickstoff in den zentralen Stoffwechsel zurückgeführt wird, was zur Aufrechterhaltung des Pflanzenwachstums beiträgt.

Neben Stickstoffmangel kann auch Salzstress zur Erhöhung der Transkription der Ureidpermease 5 in *A. thaliana* beitragen (Lescano *et al.* 2016). Unter Zugabe von 150 mM NaCl ist die Expression von *UOX* beispielsweise doppelt so hoch wie ohne Salz. Der Salzstress wurde allerdings nur für AtUPS5 getestet. Ob diese Beobachtungen auch für die anderen Transporter zutreffen, kann damit nicht beantwortet werden. Weiterhin wurde für AtUPS5 unter Salzstress ein auffälliger Phänotyp beobachtet: In Sämlingen waren die Blätter und die Seitenwurzeln verglichen mit dem Wildtyp signifikant kleiner bzw. kürzer. Anhand dieser Studien wurden die Metabolit- und GUS-Analysen unter Stickstoffmangel durchgeführt.

4.4 Uracil-Transport in reproduktives Gewebe

Die Messung der verschiedenen Metabolite sollte Aufschluss über die möglichen *in vivo* Substrate der einzelnen UPS-Transporter geben. Bisher konnte nur in Komplementationsexperimenten die Substratspezifität von AtUPS1, 2 und 5 ermittelt werden (Schmidt *et al.*, 2004 und 2006) nicht jedoch die natürlichen Substrate. In der Literatur wurde UPS1 bisher eingehend als Allantoin-Transporter beschrieben. Pellissier *et al.* veröffentlichten bereits 2004 und 2007 ihre Studien über die Rolle von UPS1 in *Phaseolus vulgaris*. Demnach ist der Transporter in allen Pflanzenteilen aktiv und zuständig für die Verteilung des Allantoins innerhalb der Pflanze. Wie die phylogenetische Analyse der UPS-Proteine zeigte, besitzen Leguminosen lediglich zwei UPS-Unterfamilien (Abbildung 1.5). Damit sind sie weniger divers wie die Familie der Brassicaceae, die drei phylogenetische Gruppen aufweist. In Sojabohnen, die nur zwei UPS-Proteine besitzen, wurde UPS1 als Transporter für Allantoin und Allantoat aus dem Knöllchen beschrieben (Collier und Tegeder, 2012). Mit diesen beiden Metaboliten werden bis zu 80% des Stickstoffs transportiert (Todd *et al.*, 2006). Ob die UPS-Transporter in Brassicaceae ebenfalls Allantoin transportieren, konnte bisher nicht geklärt werden. Schmidt *et al.* vermuteten bereits 2006, dass AtUPS5 Allantoin

von der Wurzel in den Spross transportiert, da der Transporter eine hohe Affinität für den Metaboliten zeigt. Liegt Allantoin als externe Stickstoffquelle bei einer defekten AtUPS5-Mutante vor, so kann diese Allantoin nicht aufnehmen und im Stoffwechsel nutzen (Lescano *et al.*, 2016). Für AtUPS1 und AtUPS2 konnte in Experimenten mit Hefe und Oozyten eine hohe Affinität für Uracil und dessen toxisches Analog 5-Fluoruracil nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2004). In alten Blättern wurde in der *ups1*-Einzelmutante eine signifikant höhere Menge an Allantoin gegenüber den restlichen *ups*-Einzelmutanten verzeichnet (Abbildung 3.15). Dies konnte jedoch nicht in den beiden Suppressoren aus der genetischen Sichtung gemessen werden. Erwartungsgemäß hätten die beiden *ups1*-Mutanten ebenfalls Allantoin in den Blättern akkumulieren sollen. In *ups5* ist die Konzentration von Allantoin im Vergleich zu *ups2* und *ups4* dagegen deutlich vermindert und auch signifikant niedriger als im Wildtyp. Diese Beobachtung legt nahe, dass AtUPS1 an dem Export von Allantoin aus alten Blättern beteiligt sein könnte. Ohne funktionsfähigen UPS1-Transporter akkumuliert Allantoin in alten Blättern und wird nicht genügend in neue Organe transportiert. Diese Tendenz zeigt sich teilweise in Samen, wo signifikant weniger Allantoin in *ups1* gemessen wurde als in *ups5* (Abbildung 3.22). Ähnlich wie in alten Blättern ist die Messung schwierig zu bewerten, da beispielsweise die Allantoingehalte in den beiden UPS1-Suppressoren, die auch untereinander nicht einheitlich sind, nicht mit *ups1* vergleichbar sind. In der Doppelmutante *ups1 x ups5* ist die Allantoinkonzentration im Samen mit der Einzelmutante *ups5* vergleichbar, in alten Blättern ist sie zwar gegenüber *ups5* etwas höher jedoch signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen Einzelmutanten von UPS. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass AtUPS1 an dem Transport von Allantoin aus alten Blättern beteiligt ist und im Vergleich zu den anderen Transportern auch einen Einfluss auf den Import von Allantoin in den Samen hat.

Die Messungen von Allantoat zeigen in alten Blättern keinerlei Unterschiede weder zwischen den Einzel-, Doppel- oder Mehrfachmutanten noch im Vergleich zum Wildtyp oder Col-0. Insgesamt sind die gemessenen Konzentrationen von etwa 100 ng/g Frischgewicht gegenüber Allantoin sehr gering. Die tausendfach höheren Allantoinkonzentrationen unterstützen die These, dass Stickstoff in Form von Allantoin aus alten Blättern in neues Gewebe transportiert wird. Die Messungen von Allantoat

im Samen liefern keine eindeutigen Ergebnisse über eine mögliche Rolle der Ureidpermeasen als Allantoat-Transporter (Abbildung 3.14).

Die S-A231V Mutante zeigt auffällig hohe Konzentrationen von Allantoat, Uracil und vor allem Allantoin im Samen (aber nicht in den Blättern). Diese Daten passen nicht mit denen der S-E209K Mutante und der *ups1*-Mutante zusammen. Da S-A231V aus einer EMS-Mutagenese generiert wurde, könnte der Suppressor in einem anderen Gen mutant sein, welches den Samengehalt dieser Metabolite beeinflusst. In der Mutante im *uox*-Hintergrund (A231V) sind die Konzentrationen von Allantoin, Allantoat und Uracil im Samen ebenfalls hoch (Daten hier nicht gezeigt). Diese Pflanzen wurden für diese Analyse nicht unter Stickstoffmangel angezogen. Da die hohen Metabolitmengen auch nach der Rückkreuzung mit einem Wildtyp gemessen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass in A231V noch ein anderes Gen mutiert ist und diese Mutation eventuell an *UPS1* gekoppelt ist.

In alten Blättern zeigen die Messungen in der Triplemutante eine signifikant höhere Uracilmenge (Abbildung 3.18) wohingegen die Konzentration in Samen deutlich niedriger ist (Abbildung 3.26). Die Einzelmutanten zeigen untereinander in alten Blättern keine drastischen Unterschiede, auch die Doppelmutante *ups1 x ups5* unterscheidet sich nicht von den Einzelmutanten oder dem Wildtyp. Erst wenn drei UPS-Transporter nicht mehr funktionsfähig sind, akkumuliert mehr Uracil im alten Gewebe. Analog dazu sieht die Situation im Samen aus. Hier wurde signifikant weniger Uracil in den Dreifachmutanten gemessen als in den übrigen Mutanten. An dieser Stelle kann der Rückschluss gezogen werden, dass die UPS-Transporter Uracil aus den Blättern in den Samen transportieren, welches dort für die Samenentwicklung benötigt wird. Da die Einzelmutanten untereinander keine wesentlichen Unterschiede aufweisen, ist ein Funktionsausgleich bei Verlust eines Transporters naheliegend. Auch in der Doppelmutante *ups1 x ups5* sind UPS2 und UPS4 immer noch aktiv und können die fehlenden Ureidpermeasen 1 und 5 beim Transport von Uracil in den Samen ausgleichen. Erst wenn drei Transporter in ihrer Funktion eingeschränkt sind, wird dies durch eine erhöhte Uracilkonzentrationen im Blatt und eine verminderte im Samen deutlich. In einer Funktionsverlustmutante, in der alle vier Transporter blockiert sind, sollten die Uracilkonzentrationen dieser Theorie folgend deutlich drastischere Effekte erzielen. Eine solche Mehrfachmutante kann jedoch nur mit der CRISPR/Cas9-Methode erzeugt werden, da *UPS1*, *UPS2* und *UPS4* genetisch eng

gekoppelt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Mutante leider nicht generiert werden.

Ähnliche Tendenzen wie bei Uracil können aber auch bei Dihydrouracil beobachtet werden, welches durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase aus Uracil in den Plastiden entsteht oder beim Abbau der tRNS frei wird (Zrenner *et al.*, 2006). Dihydrouracil ist eine heterocyclische Verbindung und kann somit ebenfalls ein mögliches Substrat für die Ureidpermease sein. Die Konzentrationen von Dihydrouracil in den *ups*-Dreifachmutanten sind im Samen signifikant niedriger wohingegen die Konzentrationen in alten Geweben deutlich erhöht sind (Abbildungen 3.23 und 3.16). Die Messung der *ups2*-Einzelmutante kann an dieser Stelle die These verstärken, warum erst in der Dreifachmutante und nicht in der *ups1 x ups5* Doppelmutante deutlichere Effekte zu beobachten sind. Sowohl *ups1* und *ups5* als auch die Doppelmutante der beiden Transporter haben relativ geringe Konzentrationen von Dihydrouracil in Blättern. Die Dihydrouracilmenge in *ups2* ist dagegen fast doppelt so hoch wie in *ups5* und liegt auch deutlich über dem Wildtyp-Niveau. Dies lässt vermuten, dass UPS2 wesentlich an der Remobilisierung von Dihydrouracil aus alten Blättern beteiligt ist. Analog zu altem Gewebe ist die Situation in Samen. Hier wurden in den *ups*-Dreifachmutanten signifikant geringere Konzentrationen von Dihydrouracil gemessen, was mit der Akkumulation des Metabolits in den Blättern erklärt werden kann. Die einzelnen UPS-Transporter zeigen jedoch keine Spezifität für Dihydrouracil im Samen.

Xanthin kann sehr wahrscheinlich als mögliches *in-vivo* Substrat für die UPS-Transporter ausgeschlossen werden. In alten Blättern deuten die massenspektrometrischen Analysen nicht auf einen Xanthin-spezifischen Transporter hin (Abbildungen 3.20). Die gemessenen Konzentrationen in altem Gewebe variieren zwar je nach Transporter, die *ups*-Dreifachmutanten unterscheiden sich jedoch nicht vom Wildtyp. In Samen enthalten nur die Dreifachmutanten deutlich weniger Xanthin als die Einzelmutanten und die Doppelmutante (Abbildung 3.28). Sind also drei Transporter funktionsunfähig, wird weniger Xanthin in den Samen transportiert.

Neben Xanthin und Allantoat ist auch Harnsäure kein *in vivo* Substrat für die UPS-Transporter. Die Harnsäureakkumulation kann nur in Mutanten mit *uox*-Hintergrund beobachtet werden. Hier zeigen die *ups x uox* Doppelmutanten sowohl in alten

Blättern als auch in Samen sehr hohe Konzentrationen an Harnsäure. Nur in *ups1 x uox* Doppel- und Mehrfachmutanten akkumuliert nur halb so viel Harnsäure wie in *uox* (Abbildung 3.27). Anders verhält sich die Situation in altem Gewebe. Hier ist der Verlust von UPS5 verantwortlich für die niedrigen Harnsäurekonzentrationen (Abbildung 3.17). Diesen Daten zufolge hätte UPS1 die Funktion den Metaboliten ins Phloem zu transportieren während UPS5 eventuell für den Rücktransport in die Parenchymzellen verantwortlich ist. Aus den Promotor-GUS-Studien, die im Folgenden diskutiert werden, ist ersichtlich, dass pUPS1 im Phloem und pUPS5 unter anderem auch im Parenchymgewebe aktiv ist.

4.5 Aktivitäten von pUPS1 und pUPS5 in unterschiedlichen Geweben

Die Analyse der UPS-Promotoren soll zu einem besseren Verständnis der Lokalisation und physiologischen Rollen der Transporter beitragen. Bereits Anfang der 2000er wurden erste Promotor-GUS-Studien in *A. thaliana* durchgeführt. Ausgehend von mRNA-Daten, die UPS1 während der frühen Phase der Sämlingsentwicklung und UPS2 in der späten Phase verschiedene biologische Rollen zuschreiben, wurde vor allem die Entwicklung der Promotorexpression in jungen Pflanzen untersucht. Der Fokus der hier durchgeführten Studien liegt auf dem Übergang in die reproduktive Phase sowie der Expression der einzelnen Transporter im späten Stadium der reproduktiven Phase. Auch die Embryonalentwicklung wurde hier systematisch untersucht.

AtUPS1 ist nach Schmidt *et al.* (2004) vor allem in Kotyledonen und im Hypokotyl von jungen Sämlingen stark exprimiert. Die Stärke der Expression nimmt dabei mit zunehmenden Sämlingsalter stetig ab. In 6 Wochen alten Pflanzen konnten dann keine Promotoraktivitäten weder in Blättern, Sprossen noch in reproduktiven Organen mehr beobachtet werden. Desimone *et al.* (2002) wiesen die mRNA von AtUPS1 in diversen Geweben wie jungen und alten Blättern, Blüten, Wurzeln und dem Stamm nach. In verschiedene Linien der selbst generierten pUPS1-Pflanzen konnte in 3 Wochen alten Pflanzen Promotor-Aktivität in den Blattadern junger Blätter

nachgewiesen werden (Abbildung 3.34). In älteren Blättern war teilweise an den Blatträndern, größtenteils jedoch keine GUS-Färbung sichtbar. Die Querschnitte von Blättern und Blattstielen zeigen eine Expression von pUPS1 im Phloemgewebe. Somit scheint UPS1 unter Stickstoffmangelbedingungen im Übergang in die reproduktive Phase als Phloembelader zu fungieren. In Wurzeln konnte dagegen keine Promotoraktivität nachgewiesen werden.

Die Expression von UPS2 konnte in bisherigen Studien analog zu UPS1 erst in der späten Entwicklungsphase von Sämlingen beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 2004). In Wurzeln ist UPS2 stark im Perizykel, etwas schwächer aber auch im Xylem exprimiert. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine starke Expression des Transporters in Wurzeln beobachtet werden. Zu lokalisieren ist dieser im Perizykel, aber auch im Phloem. Im Xylem konnte keine Aktivität detektiert werden. In 5 bis 6 Wochen alten Pflanzen konnten Schmidt *et al.* (2006) den UPS2-Promotor in diversen Organen wie Blattspreiten, Stängeln und Blüten nachweisen. In den eigenen Promotor-GUS-Linien wurde eine Aktivität von UPS2 teilweise in jungen Blättern und in den Hydathoden lokalisiert (Abbildung 3.37). In der reproduktiven Phase war der UPS2-Promotor in keinem Gewebe mehr aktiv. Folglich ist UPS2 vornehmlich in jungen Pflanzen während der Entwicklungsphase und zu Beginn der reproduktiven Phase in Wurzeln von Bedeutung. Mit zunehmendem Alter wird *UPS2* nicht mehr exprimiert. Laut Klepikova *et al.* (2016) wird *UPS2* dagegen erst mit zunehmendem Blattalter leicht exprimiert.

Die Expression des UPS4-Promotors konnte in bisherigen Studien vorübergehend in 6 Tagen alten Sämlingen sowie in Blüten nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2006). GUS-Aktivität konnte in sämtlichen eigenen pUPS4-Linien weder in jungen Pflanzen kurz vor Eintritt in die reproduktive Phase noch in 6 Wochen alten Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 3.39 und 3.40). Diese Ergebnisse stimmen mit den RNS-Sequenzierungsdaten von AtUPS4 überein, denn *UPS4* wird weder in altem noch in jungem Gewebe exprimiert (Klepikova *et al.*, 2016). Da UPS4 in den vorliegenden Promoter-GUS-Studien nicht nachweisbar war, ist der Transporter wahrscheinlich nicht beim Eintransport von Metaboliten in den Samen wichtig. Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte wie unter Kapitel 4.4 schon erwähnt eine Vierfachmutante analysiert werden, in der alle Transporter funktionsunfähig sind.

Bei der Analyse der UPS5-Promotor-GUS-Linien konnte eine starke Aktivität des Transporters im Perizykel und Phloem der Wurzeln beobachtet werden (Abbildung 3.43 und 3.44). In jungen Sämlingen wird *UPS5* bereits ab Tag 5 nach Keimbungsbeginn in der Wurzel exprimiert. Die Expression ist laut Schmidt *et al.* (2006) in späteren Wachstumsphasen der Pflanze nur noch auf die Seitenwurzeln beschränkt. In den eigenen Linien ist die Expression von *UPS5* durchgängig auch in späteren Phasen der Reproduktion zu sehen. In Blättern ist *UPS5* stark im vaskulären Gewebe exprimiert. Hier konnte eine Promotoraktivität im Phloem und Parenchymgewebe detektiert werden. In der späten Phase der Reproduktion nimmt die Aktivität des Promotors langsam ab.

Während der Embryonalentwicklung sind UPS1 und UPS5 in unterschiedlichen Geweben aktiv während UPS2 und UPS4 nicht aktiv sind (Abbildungen 3.35, 3.38, 3.41 und 3.44). RNS-Sequenzierungsdaten zeigen, dass *AtUPS2* während der gesamten embryonalen Entwicklung nicht exprimiert wird. Für *AtUPS4* konnte lediglich eine sehr schwache Expression am Ende der embryonalen Entwicklungsphase beobachtet werden (Winter *et al.*, 2007). Auffallend sind die unterschiedlichen Promotoraktivitäten von UPS1 und UPS5: Während der UPS1-Promotor nur im späten embryonalen Entwicklungsstadium und ausschließlich in den Kotyledonen aktiv ist, ist der UPS5-Promotor bereits ab dem Gobulistadium und später nur im Hypokotyl aktiv (Abbildungen 3.35 und 3.44).

Die gewebespezifischen Expressionen von UPS1, UPS2 und UPS5 zeigen deutlich die unterschiedlichen Funktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben und erklären die Diversität in der Familie der Brassicaceae.

4.6 Lokalisation von UPS1 an der Plasmamembran

Bei der Erstellung der Topologiekarte von UPS1 (Abbildung 3.3) konnte eine passende Insertionsstelle für den subzellulären Marker mCherry in einem wenig konservierten Bereich der großen zytoplasmatischen Schleife gefunden werden. Bisherige Studien legen eine Verortung des Proteins an der Plasmamembran nahe. So konnte bereits bei der heterologen Expression von *AtUPS1* in Hefe die subzelluläre

Lokalisation beobachtet werden (Froissard *et al.*, 2006). Auch in Reis ist UPS1 an der Plasmamembran lokalisiert. Redillas *et al.* (2019) nutzten dabei ebenfalls mCherry als Marker. In den erst kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Lescano *et al.* (2020) konnte durch die Insertion des Markerproteins GFP in AtUPS1 ebenfalls die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran in Wurzeln nachgewiesen werden. Auch ein schwaches Signal um das endoplasmatische Retikulum war detektierbar. Wie in den Abbildungen 3.29 und 3.31 dargestellt konnte eine Lokalisation des Konstruktes an der Plasmamembran verortet werden. Mittels Koexpression des cytosolischen Kontrollprotein β -Ureidopropionase-CFP und einer NaCl-Behandlung konnten aufgrund der herbeigeführten Plasmolyse die Ablösung des Protoplasten und die sich in Folge dessen gebildeten Hecht'schen Stränge sichtbar gemacht werden. Bei dem Nachweis des vollständig exprimierten Proteins konnte allerdings nur eine sehr schwache Bande bei etwa 69 kDa detektiert werden (Abbildung 3.30). Dagegen sind Fragmentteile und freies mCherry am stärksten im Western Blot sichtbar. Das Fusionsprotein ist demzufolge nicht stabil. Die beobachtete Lokalisation ist sehr wahrscheinlich freies mCherry und nicht das Fusionsprotein. Aufgrund der oben genannten Studien (Redillas *et al.*, 2019 und Lescano *et al.*, 2020) ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass UPS1 an der Plasmamembran lokalisiert ist.

Neben AtUPS1 untersuchten Lescano *et al.* (2020) auch die Lokalisation von AtUPS5. Der Transporter ist außer in der Plasmamembran auch im Endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat exprimiert. Diese Beobachtung unterstützt die Tatsache, dass AtUPS5 in diversen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten während des gesamten Pflanzenwachstums exprimiert wird.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit kurz zusammengefasst und schematisch dargestellt (Abbildung 4.1) sowie ein kurzer Ausblick auf weiterführende Arbeiten gegeben:

- Über die gentische Sichtung konnten zwei *ups1*-Mutanten gefunden werden, die als *uox*-Suppressoren nur halb so viel Harnsäure im Samen akkumulieren wie die Einzelmutante *uox*.
- Andere *ups*-Einzelmutanten sind keine Suppressoren des *uox*-Phänotyps.
- Ein verminderter Import von Harnsäure in den Samen ist die Ursache für geringere Konzentration.
- Eine Lokalisation von AtUPS1 an der Plasmamembran ist sehr wahrscheinlich, konnte aber nicht bestätigt werden.
- Unter Stickstoffmangel ist die Expression der Transporter verstärkt.
- UPS1 ist in den Kotyledonen sowie im Phloemgewebe von Blättern aktiv.
- UPS2 ist teilweise in jungen Blättern sowie im Perizykel und Phloemgewebe von Wurzeln aktiv.
- Für UPS4 konnten keine gewebespezifischen Lokalisationen nachgewiesen werden.
- UPS5 ist während der embryonalen Entwicklungsphase im Hypokotyl aktiv. Während der gesamten reproduktiven Phase konnte eine Expression im Phloemgewebe und Perizykel von Wurzeln sowie im vaskulären Gewebe von Blättern nachgewiesen werden.
- In der Dreifachmutante *ups1 x ups2 x ups5* akkumuliert Uracil in alten Blättern, im Samen ist die Konzentration dagegen vermindert. Der Transport von Uracil wird daher über die UPS-Transporter vermittelt.
- AtUPS1 ist möglicherweise am Transport von Allantoin aus alten Blättern in Samen beteiligt.
- AtUPS2 kann Dihydrouracil aus alten Blättern transportieren. AtUPS1 und 5 sind am Transport beteiligt.
- Dihydrouracil ist wahrscheinlich ein *in vivo* Substrat von UPS.

Mehrere Forschungsarbeiten hatten bereits zum Ziel, die Familie der UPS-Transporter zu charakterisieren. Das Vorhandensein mehrerer phylogenetischer Gruppen vor allem bei den Brassicaceae indiziert, dass die Aufgaben der Transporter unterschiedlich sind. Dies konnte vor allem in den Promotor-GUS-Studien beobachtet werden. Die Metabolitanalysen deuten in den UPS-Dreifachmutanten darauf hin, dass Uracil ein Substrat *in vivo* ist. Weitere Mehrfachmutanten wie z.B. *ups1 x ups2 x ups4*

könnten genauen Aufschluss darüber geben, ob diese Vermutung stimmt. Dann könnte auch eine explizite Aussage darüber getroffen werden, inwiefern die Transporter in der Lage sind, bei Teilausfällen die Funktion anderer Ureidpermeasen zu kompensieren. Desweiteren sollte gezeigt werden, ob Dihydrouracil tatsächlich ein Substrat für die UPS-Transporter ist.

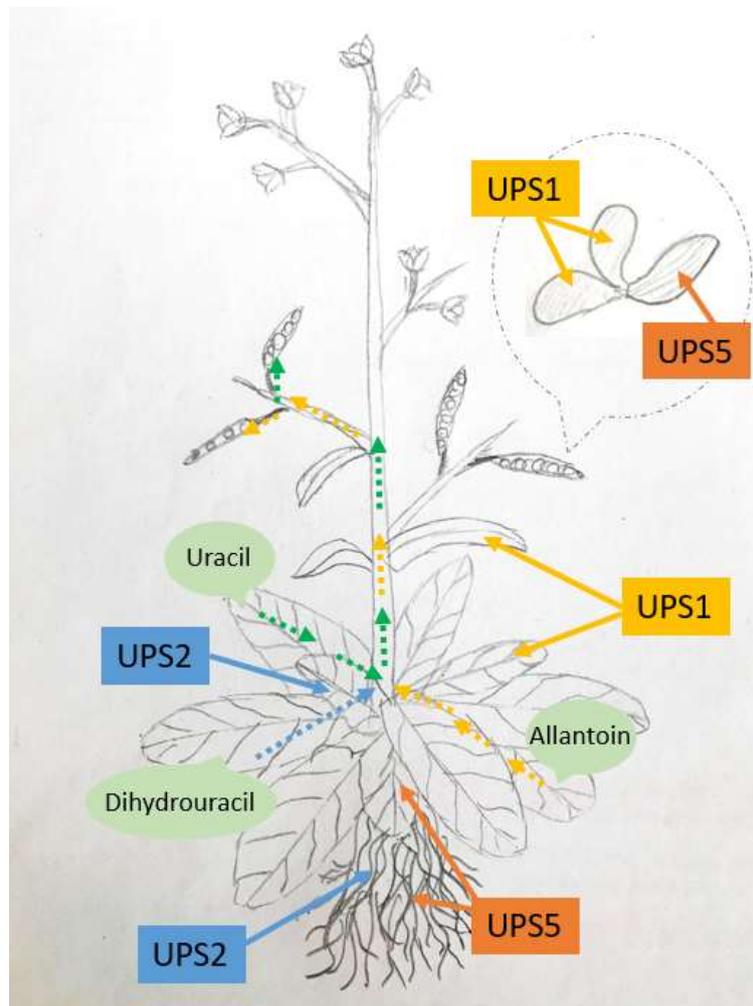


Abbildung 4.1: Schematisches Modell mit Funktionen und Lokalisationen der UPS-Transporter von *A. thaliana*. Die UPS-Transporter sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Rechtecke zeigen die Expression des jeweiligen Transporters an. Gepunktete Pfeile: Transportrichtung der Metabolite. Gelb: AtUPS1; blau: AtUPS2, orange: AtUPS5, grün: kein definierter Transporter.

5. Literaturverzeichnis

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633): 653–657.

Álvarez-Lario, B. und Macarrón-Vicente, J. (2010): Uric acid and evolution. *Rheumatology* 49, 2010-2015.

Baccolini, C., Witte, C.-P. (2019): AMP and GMP catabolism in *Arabidopsis* converge on xanthosine which is degraded by a nucleoside hydrolase heterocomplex. *The Plant Cell* 31, 734–751.

Brychkova, G.; Alikulov, Z.; Fluhr, R.; Sagi, M.(2008): A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* *Arabidopsis* mutant. *The Plant Journal* 54, 496–509.

Casartelli, A.; Melino, V. J.; Baumann, U.; Riboni, M.; Suchecki, R.; Jayasinghe, N. S.; Mendis, H.; Watanabe, M.; Erban, A.; Zuther, E.; Hoefgen, R.; Roessner, U.; Okamoto, M.; Heuer, S. (2019): Opposite fates of the purine metabolite allantoin under water and nitrogen limitations in bread wheat. *Plant Molecular Biology* 99, 477-497.

Chen, M., Herde, M., Witte, C.-P. (2016): Of the nine cytidine deaminase-like genes in *Arabidopsis*, eight are pseudogenes and only one is required to maintain pyrimidine homeostasis in vivo. *Plant Physiology* 171 (2): 799–809.

Collier, R.; Tegeder, M. (2012): Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *The Plant Journal* 72 (3): 355-67.

Dahncke, K., Witte, C.-P. (2013): Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25 (10): 4101–4109.

Desimone, M.; Catoni, E.; Ludewig, U.; Hilpert, M.; Schneider, A.; Kunze, R. (2002): A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14 (4), 847–856.

Doench, J. G.; Fusi, N.; Sullender, M.; Hegde, M.; Vaimberg, E. W.; Donovan, K. F. et al. (2016): Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology* 34, 184–191.

Feng, Z.; Mao, Y.; Xu, N.; Zhang, B.; Wei, P.; Yang, D.-L. (2014): Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 4632–4637.

Footitt, S.; Marquez, J.; Schmutts, H.; Baker, A.; Theodoulou, F.L.; Holdsworth, M. (2006): Analysis of the role of COMATOSE and peroxisomal beta-oxidation in the determination of germination potential in Arabidopsis. *Journal Experimental Botany* 57, 2805-2814.

Froissard, M.; Belgareh-Touzé, N.; Buisson, N.; Desimone, M.; Frommer, W. B.; Haguenaer-Tsapis, R. (2006): Heterologous expression of a plant uracil transporter in yeast: Improvement of plasma membrane targeting in mutants of the Rsp5p ubiquitin protein ligase. *Biotechnology Journal* 1, 303-320.

Hauck, O. K.; Scharnberg, J.; Escobar, N. M.; Wanner, G.; Giavalisco, P.; Witte, C.-P. (2014): Uric acid accumulation in an Arabidopsis urate oxidase mutant impairs seedling establishment by blocking peroxisome maintenance. *The Plant Cell* 26 (7): 3090–3100.

Hsieh, M.-H.; Goodman, H. M. (2002): Molecular characterization of a novel gene family encoding ACT domain repeat proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 130 (4): 1797-1806.

- Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. (2012):** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096): 816-821.
- Jung, B.; Flörchinger, M.; Kunz, H.-H.; Traub, M.; Wartenberg, R.; Jeblick, W.; Neuhaus, H.E.; Möhlmann, T. (2009):** Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of Arabidopsis. *The Plant Cell* 21 (3): 876–891.
- Jung, B.; Hoffmann, C.; Möhlmann, T. (2011):** Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 65 (5): 703–711.
- Kahn, K.; Tipton, P. A. (1998):** Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. *Biochemistry* 37, 11651–11659.
- Khan, B.R.; Zolman, B.K. (2010):** pex5 mutants that differentially disrupt PTS1 and PTS2 peroxisomal matrix protein import in Arabidopsis. *Plant Physiology* 154, 1602-1615.
- Kleinboelting, N.; Huep, G.; Kloetgen, A.; Viehoveer, P.; Weisshaar, B. (2012):** GABI-Kat SimpleSearch: New features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue): D1211-5.
- Klepikova, A. V.; Kasianov, A. S.; Gerasimov, E. S.; Logacheva, M. D.; Penin, A. (2016):** A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal* 88 (6), 1058-1070.
- Lescano, I.; Bogino, M. F.; Martini, C.; Tessi, T. M.; González, C. A.; Schumacher, K.; Desimone, M. (2020):** Ureide permease 5 (AtUPS5) connects cell compartments involved in ureide metabolism. *Plant Physiology* 182.
- Lescano, I.; Martini, C.; Gonzalez, C. A.; Desimone, M. (2016):** Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to Arabidopsis plants. *Plant Molecular Biology* 91 (4-5), 581–595.
- Nara, T.; Hshimoto, T.; Aoki, T. (2000):** Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine-biosynthetic pathway in eukaryotes. *Gene* 257: 209-222.

Oda, M.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahata, N. (2002): Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Molecular biology and evolution* 19, 640-653.

Pélissier, H. C.; Frerich, A.; Desimone, M.; Schumacher, K.; Tegeder, M. (2004): PvUPS1, an Allantoin Transporter in Nodulated Roots of French Bean. *Plant Physiology* 134 (2): 664–675.

Pélissier, H. C.; Tegeder, M. (2007): PvUPS1 plays a role in source-sink transport of allantoin in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Functional Plant Biology* 34, 282-291.

Ramazzina, I.; Folli, C.; Secchi, A.; Berni, R.; Percudani, R. (2006): Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nature Chemical Biology* 3 , 144–148.

Redillas, M. C. F.; Bang, S. W.; Lee, D.-K.; Kim, Y. S.; Jung, H.; Chung, P. J.; Suh, J.-W.; Kim, J.-K. (2019): Allantoin accumulation through overexpression of ureide permease 1 improves rice growth under limited nitrogen conditions. *Plant Biotechnology Journal* 17, 1289-1301.

Rentsch, D.; Schmidt, S.; Tegeder, M. (2007): Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* 581 (12), 2281–2289.

Riegler, H.; Geserick, C.; Zrenner, R. (2011): *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *The New Phytologist* 191 (2): 349–359.

Rock, K. L.; Kataoka, H.; Lai, J. J. (2013): Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nature Reviews Rheumatology* 9, 13-23.

Schmidt, A.; Baumann, N.; Schwarzkopf, A.; Frommer, W. B.; Desimone, M. (2006): Comparative studies on ureide permeases in *Arabidopsis thaliana* and analysis of two alternative splice variants of AtUPS5. *Planta* 224 (6), 1329–1340.

Schmidt, A.; Su, Y.-H.; Kunze, R.; Warner, S.; Hewitt, M.; Slocum, R. D. (2004): UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (43), 44817–44824.

Serventi, F.; Ramazzina, I.; Lamberto, I.; Puggioni, V.; Gatti, R.; Percudani, R. (2010): Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation

and hydrolysis of S -ureidoglycine in plants and bacteria. *ACS Chemical Biology* 5, Nr. 2, 203– 214.

Shelp, B. J.; Atkins, C. A. (1983): Role of inosine monophosphate oxidoreductase in the formation of ureides in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Plant Physiology* 72 (4), 1029–1034.

Smith, P. M.; Atkins, C. A. (2002): Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128 (3): 793–802.

Soltabayeva, A.; Srivastava, S.; Kurmanbayeva, A.; Bekturova, A.; Fluhr, R.; Sagi, M. (2018): Early senescence in older leaves of low nitrate-grown *Atxdh1* uncovers a role for purine catabolism in N supply. *Plant Physiology* 178: 1027–1044.

Stasolla, C.; Katahira, R.; Thorpe, T. A.; Ashihara, H. (2003): Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 160 (11): 1271–1295.

Steinert, J.; Schiml, S.; Fauser, F.; Puchta, H. (2015): Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *The Plant journal for cell and molecular biology* 84, 1295–1305.

Todd, C. D.; Tipton, P. A.; Blevins, D. G.; Piedras, P.; Pineda, M.; Polacco, J. C. (2006): Update on ureide degradation in legumes. *Journal of experimental botany* 57, 5-12.

Traut, T. W.; Jones, M. E. (1996): Uracil metabolism-UMP synthesis from orotic acid or uridine and conversion of uracil to beta-alanine: enzymes and cDNAs. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 53, 1-78.

Werner, A. K.; Romeis, T.; Witte, C.-P. (2010): Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* 6 (1), 19–21.

Werner, A. K.; Sparkes, I. A.; Romeis, T.; Witte, C.-P. (2008): Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoin amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology* 146 (2), 418–430.

Werner, A. K.; Witte, C.-P. (2011): The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* 16 (7), 381–387.

- Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G. V.; Provart, N. J.** (2007): An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2 (8), e718.
- Witte, C.-P.; Herde, M.** (2020): Nucleotide Metabolism in Plants. *Plant Physiology* 182 (1), 63–78.
- Wu, X. W.; Muzny, D. M.; Lee, C. C.; Caskey, C. T.** (1992): Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *Journal of molecular evolution* 34, 78-84.
- Xie, K.; Minkenberg, B.; Yang, Y.** (2015): Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *PNAS* 112 (11), 3570-3575.
- Zhang, H.; Zhang, J.; Wei, P.; Zhang, B.; Gou, F.; Feng, Z.** (2014): The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant biotechnology journal* 12, 797–807.
- Zrenner, R.; Ashihara, H.** (2011): Nucleotide metabolism. In *Plant Metabolism and Biotechnology*, 135–162.
- Zrenner, R.; Riegler, H.; Marquard, C. R.; Lange, P. R.; Geserick, C.; Bartosz, C. E.; Chen, C. T.; Slocum, R. D.** (2009): A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 183, 117-132.
- Zrenner, R.; Stitt, M.; Sonnewald, U.; Boldt, R.** (2006): Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 805–836.
- Zuker, M.** (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31, 3406–3415.

6. Anhang

Tabelle 6.1: Auswahl der UPS-Proteine aus 46 Pflanzenarten für den Sequenzvergleich.

Pflanze	Gen	Kennzeichnung	Funktionale Kopien
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ath_UPS1	At2g03590.1	4
	Ath_UPS2	At2g03530.1	
	Ath_UPS3	AT2G03600.4	
	Ath_UPS4	At2g03520.1	
	Ath_UPS5	At1g26440.3	
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Aly_UPS1	AL5G13380.t1	4
	Aly_UPS2	AL5G13300.t1	
	Aly_UPS3	AL5G13390.t1	
	Aly_UPS4	AL5G13290.t1	
	Aly_UPS5	AL1G39310.t1	
<i>Boechera stricta</i>	Bst_UPS1	Bostr.0556s0177.1	4
	Bst_UPS2	Bostr.0556s0176.1	
	Bst_UPS3	Bostr.0556s0178.1	
	Bst_UPS4	Bostr.0556s0175.1	
	Bst_UPS5	Bostr.12659s0354.1	
<i>Brassica rapa</i>	Bra_UPS1A	Brara.B03160.1	4
	Bra_UPS1B	Brara.I02096.1	
	Bra_UPS4	Brara.I02095.1	
	Bra_UPS5	Brara.I03115.1	
<i>Capsella rubella</i>	Cru_UPS1	Carubv10018586m	5
	Cru_UPS2	Carubv10017373m	
	Cru_UPS3	Carubv10018586m	
	Cru_UPS4	Carubv10019411m	
	Cru_UPS5	Carubv10009115m	
<i>Eutrema salsugineum</i>	Esa_UPS1	Thhalv10004375m	3
	Esa_UPS4	Thhalv10005450m	
	Esa_UPS5	Thhalv10007943m	
<i>Theobroma cacao</i>	Tca_UPS	Thecc1EG011542t4	1
<i>Gossypium raimondii</i>	Gra_UPS1	Gorai.013G093800.2	2
	Gra_UPS2	Gorai.013G094100.1	
<i>Citrus sinensis</i>	Csi_UPS	orange1.1g015514m	1
<i>Citrus clementina</i>	Ccl_UPS	Ciclev10031708m	1
<i>Salix purpurea</i>	Spu_UPS1	SapurV1A.0176s0260.1	2
	Spu_UPS2	SapurV1A.0176s0250.1	
<i>Ricinus communis</i>	Rco_UPS	30174.m009109	1

	Rco_UPS2	30174.m009113	
<i>Populus trichocarpa</i>	Ptr_UPS1	Potri.008G095600.1	2
	Ptr_UPS2	Potri.008G095500.1	
<i>Manihot esculenta</i>	Mes_UPS	Manes.01G027800.1	1
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus_UPS1	Lus10036910	4
	Lus_UPS2	Lus10037075	
	Lus_UPS3	Lus10037074	
	Lus_UPS4	Lus10036911	
<i>Vitis vinifera</i>	Vvi_UPS	GSVIVT01012215001	1
<i>Eucalyptus grandis</i>	Egr_UPS1	Eucgr.B03152.1	2
	Egr_UPS2	Eucgr.G02448.1	
<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	Kfe_UPS1	Kaladp0043s0179.1	2
	Kfe_UPS2	Kaladp0061s0153.1	
<i>Solanum tuberosum</i>	Stu_UPS1	PGSC0003DMT4000254 63	2
	Stu_UPS2	PGSC0003DMT4000729 30	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sly_UPS1A	Solyc01g010290.2.1	4
	Sly_UPS1B	Solyc04g005410.1.1	
	Sly_UPS2A	Solyc05g012330.2.1	
	Sly_UPS2B	Solyc05g012310.2.1	
<i>Mimulus guttatus</i>	Mgu_UPS1	Migut.L01193.1	1
	Mgu_UPS2	Migut.K01275.1	
<i>Daucus carota</i>	Dca_UPS1A	DCAR_007193	4
	Dca_UPS1B	DCAR_027473	
	Dca_UPS1C	DCAR_023803	
	Dca_UPS2	DCAR_011041	
<i>Aquilegia coerulea</i>	Aco_UPS1A	Aqcoe3G366400.1	4
	Aco_UPS1B	Aqcoe5G369800.1	
	Aco_UPS2	Aqcoe3G061500.1	
	Aco_UPS3	Aqcoe6G034100.1	
<i>Cucumis sativus</i>	Csa_UPS1A	Cucsa.078130.1	4
	Csa_UPS1B	Cucsa.284510.1	
	Csa_UPS2A	Cucsa.284530.1	
	Csa_UPS2B	Cucsa.284520.1	
<i>Fragaria vesca</i>	none		0
<i>Glycine max</i>	Gma_UPS1	Glyma.02G116400.1	3
	Gma_UPS2A	Glyma.01G058500.3	
	Gma_UPS2B	Glyma.02G116300.2	
<i>Malus domestica</i>	Mdo_UPS	MDP0000313843	1
<i>Medicago truncatula</i>	Mtr_UPS1A	Medtr5g044710.1	3
	Mtr_UPS1B	Medtr5g045530.1	
	Mtr_UPS2	Medtr5g045520.1	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pvu_UPS1	Phvul.003G042700.1	3
	Pvu_UPS2A	Phvul.003G042800.1	
	Pvu_UPS2B	Phvul.010G069400.1	

<i>Prunus persica</i>	Ppe_UPS	Prupe.1G286600.3	1
<i>Trifolium pretense</i>	Tpr_UPS1A	Tp57577_TGAC_v2_mR NA25283	3
	Tpr_UPS1B	Tp57577_TGAC_v2_mR NA25285	
	Tpr_UPS2	Tp57577_TGAC_v2_mR NA25307	
<i>Zea mays</i>	Zma_UPS1A	GRMZM2G025528_T04	4
	Zma_UPS1B	GRMZM2G091891_T01	
	Zma_UPS2A	GRMZM2G055238_T01	
	Zma_UPS2B	GRMZM2G135746_T01	
<i>Sorghum bicolor</i>	Sbi_UPS1	Sobic.008G104500.1	3
	Sbi_UPS2	Sobic.008G105500.3	
	Sbi_UPS3	Sobic.008G106100.1	
<i>Setaria italica</i>	Sit_UPS1	Seita.3G357100.2	2
	Sit_UPS2	Seita.3G356700.1	
	Sit_UPS3	Seita.3G357700.1	
<i>Panicum hallii</i>	Pha_UPS1	Pahal.C04132.1	2
	Pha_UPS2	Pahal.C04126.1	
<i>Oryza sativa</i>	Osa_UPS1	LOC_Os12g31850.1	3
	Osa_UPS2	LOC_Os12g31860.1	
	Osa_UPS3	LOC_Os12g31890.1	
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bdi_UPS1	Bradi4g06750.1	3
	Bdi_UPS2	Bradi4g06740.1	
	Bdi_UPS3	Bradi4g06757.1	
	Bdi_UPS4	Bradi4g06780.4	
<i>Zostera marina</i>	Zmar_UPS1	Zosma99g00990.1	1
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Spo_UPS1	Spipo2G0086100	1
<i>Musa acuminata</i>	Mac_UPS1	GSMUA_Achr3T15960_0 01	1
<i>Amborella trichopoda</i>	Atr_UPS1	evm_27.model.AmTr_v1. 0_scaffold00033.253	2
	Atr_UPS2	evm_27.model.AmTr_v1. 0_scaffold00110.113	
<i>Ananas comosus</i>	Aco_UPS1	Aco000112.1	1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Smo1_UPS1	124621	2 (1)
	Smo_UPS2	232132	
<i>Sphagnum fallax</i>	Sfa_UPS1A	Sphfalx0119s0074.1	4
	Sfa_UPS1B	Sphfalx0043s0009.1	
	Sfa_UPS2A	Sphfalx0040s0083.1	
	Sfa_UPS2B	Sphfalx0226s0019.1	
<i>Physcomitrella patens</i>	Ppa_UPS1	Pp3c5_5560V3.5	3
	Ppa_UPS2A	Pp3c26_310V3.3	
	Ppa_UPS2B	Pp3c15_100V3.1	
<i>Marchantia polymorpha</i>	Mpo_UPS1	Mapoly0103s0027.1	2
	Mpo_UPS2	Mapoly0033s0146.3	
<i>Coccomyxa subellipsoidea*</i>	Csu_UPS	28301	1

Smo2	1	-----	MYFVTD	GWAIL
Mpo2	1	-----	MFVVTD	ASATA
Sfa3	1	-----	MYVMSD	GVAVI
Sfa4	1	-----	MYVMTD	IVGAI
Ppa2	1	-----	MYVMQD	EAGAI
Ppa3	1	-----	MYVMQD	EAGAI
Csul	1	-----	MYVVTST	GGGVV
Sbi2	1	-----	MPVAVED	GGGAA
Osa2	1	-----	MFVVED	GGGAA
Mpo1	1	-----	MYLVQD	GGGAI
Bdi2	1	-----	MFVMQD	AGAI
Zma3	1	-----	MYVVKD	IGGAI
Zma4	1	-----	MYVVKD	IGGAI
Sbi3	1	-----	MYLVKD	ISGAI
Sit3	1	-----	MYLVKD	ISGAI
Pha2	1	-----	MYLVKD	ISGAI
Bdi3	1	-----	MYLVKD	IDGAI
Osa3	1	-----	MYLVKD	IGGAI
Sfal	1	-----	MYLIQD	GGGAI
Sfa2	1	-----	MYLVQD	GGGAI
Aco4	1	-----	MYLVES	GGGAI
Ppa1	1	-----	MYLVEN	GGGAI
Smo1	1	-----	MYVVED	GGGAI
Csa4	1	-----	MYLVET	GGGAI
Dca3	1	-----	MYLVES	GGGAI
Esa5	1	-----	MVADGL	LYVVES
Bra5	1	-----	MMIMVS	AGELG
Cru5	1	MGFVPCPNKYSFDFCNFSIRSVLVGLVFYRSLICLVARFMMIGQGLG	LYVVES	GGGAIL
Bst5	1	-----	MMIAQGL	LYVVES
Ath5	1	-----	MMIAQEL	LYVVES
Aly5	1	-----	MMIAQGL	LYVVES
Bra4	1	-----	MYVIES	TEAIG
Esa4	1	-----	MYVVES	TARAIG
Bst4	1	-----	MYVVES	TACAIG
Cru4	1	-----	MYVVES	TGAIG
Ath4	1	-----	MYVVES	TACAIG
Aly4	1	-----	MYVVES	TACAIG
Egr2	1	-----	MDFSWTPFLNFFSIEGTTSSGLK	MYLVEN
Aco3	1	-----	MYEVQS	NGGAI
Csa3	1	-----	MYVVES	TACAIG
Kfe2	1	-----	MDFVDLLKVIQIRLPSYRVDSNRLK	MYVVES
Sly4	1	-----	MYLVES	TACAIG
Sly3	1	-----	MYVVES	DGAI
Stu2	1	-----	MYVVES	DGAI
Sly2	1	-----	MYVVES	GGGAI
Csi	1	-----	MYVVES	TACAIG
Ccl	1	-----	MYVVES	TACAIG
Dca4	1	-----	MYLVES	GGGAI
Pvu2	1	-----	MDSKEFSGICSLVPSLSESSLCTTGLK	MYLVES
Pvu3	1	-----	MDSKEFSGICSLVPSLSESSLCTTGLK	MYLVES
Gma2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Gma3	1	-----	MYLVES	GGGAI
Aco2	1	-----	MYVVES	GGGAI
Kfe1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Cru2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Bst2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Ath2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Aly2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Dca2	1	-----	MYLVES	GGGAI
Dca1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Aco1	1	-----	MYVVES	GGGAI
Stu1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Sly1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Gra2	1	-----	MYVVES	GGGAI
Mdo1	1	-----	MYVVES	GGGAI
Mgul	1	-----	MDYLGIPPTILSIEEGEVVSSRLK	MYLVES
Cru3	1	-----	MYVIES	GGGAI
Bst1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Cru1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Aly1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Ath1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Bra1B	1	-----	MYLVES	GGGAI
Esa1	1	-----	MYLVES	GGGAI
Bra1A	1	-----	MYLVES	GGGAI

```

Mtr3      1 -----MYLVESGGGAI G
Tpa3      1 -----LSYGPLLNLLLT SNCN WDFSEITSLTSSISESNLRAELKMYLVESGGGAI G
Mtr2      1 -----MYLVESGGGAI V
Tpa2      1 -----MYVVESEGGGAI V
Mtr1      1 -----MYMVESGGGAI V
Tpa1      1 -----MYMVESGGGAI V
Gma1      1 -----MYVVESVGGAI G
Pvu1      1 -----MYLVESGGGAI V
Ppe1      1 -----MYVVESGGGAI A
Egr1      1 -----MYLVESGGGAI G
Csa1      1 -----MYVVESGGGAI A
Vvi       1 -----MKQMGPLYMTYPGFSLIPLLTEGIYSSGLKMYLVESGGGAI A
Csa2      1 -----MYVLESGGGAI A
Lus1      1 -----MYLVESGGGAI A
Lus2      1 -----MYLVESGGGAI A
Lus3      1 -----MYVVESGGGAI L
Lus4      1 -----MYVVESGGGAI L
Spu1      1 -----MYLVESGGGAI V
Ptr1      1 -----MYLVESGGGAI V
Rco1      1 -----MYMIESGGGAI I
Mes1      1 -----MYLVESGGGAI V
Spu2      1 -----MVFGIPSLVILQPEGIIRIALKMYVVESGGGAI A
Ptr2      1 -----MYVVESGGGAI A
Gra1      1 -----MYVVESGGGAI A
Tca       1 -----MYLVESGGGAI A
Atr1      1 -----MYVVEDGGGAI A
Atr2      1 -----MEVVEDGGGAI A
Zmar1     1 -----MYVVENGGGAI A
Spo1      1 -----MYVVEDGGGAI A
Bdi1      1 -----MDRALACASSLVPCQEVVEGPLLNSFLSIKQGLKMEVIEDGGGAI A
Zma2      1 -----MEVVEDGGGAI A
Osa1      1 -----MDHVLGCATSLVSCQKVFEGPLVNSLLSIRQGGLKMYVIEDGGGAI A
Sit1      1 -----MDHVLACASSPLTCHVLEGLPLSSLSVVRTGLTMYVIEDGGGAI A
Pha1      1 -----MDHVLACASSPLTCHVQLDPLSSLSIRAGLTMYVIEDGGGAI A
Zma1      1 -----MNRVLALACASSLLTCREVLQEVPSTRSRLGMEVIEDGGGAI A
Sbi1      1 -----MEHVLACASSLLSCHKVLQEEEGPLLLLSSIRARLSMYVIEDGGGAI A
Mac1      1 -----MYLVQDGGGAI A
Acom1     1 -----MYVVEDGGGAI A

```

Smo2 13 LMLCSLWGLGTPWIFFNLAERRGRPQHTYIDIAISTFAVAVIFALTLGQIGDSD-PSAP
 Mpo2 13 LMIVSLWGLGSWPAFFNVIERRGRPQHTYLDIAISTYIACFFALTLGQAGPSS-QSSP
 Sfa3 13 LM1ISLWGLGSWPALFNVIERRGRVPMHTYMDYTIATYCVAVGFALTLGCEIGGSS-ANYP
 Sfa4 13 LMVLSLWGLGSWPAFFNVIERRGRVPMHTYMDYTIATYCVAVGFALTLGCEIGPSS-AEYP
 Ppa2 13 LMIVSLWGLGSWPALFNVIERRGRVPMHTYMDYTFANYGVAVLFAFTLGDIGPDT-PEAP
 Ppa3 13 LMIVSLWGLGSWPALFNVIERRGRVPMHTYMDYTFSNYSVALFALTVGNIGPDT-PQSP
 Csu1 13 LMTAALILLGTWPALFNVIERRGRKPOHTFMDYCFINYVAIIHALTLGQIGYST-EETP
 Sbi2 14 LMLASLFLGTPWALITLERRGRPQHTYLDYSITNLVAGVLAVALGQAGDSR----P
 Osa2 13 LMVASLFLGTPWALITLERRGRPQHTYLDYSVTNLAAAVVAITFGQIGETR-PSMP
 Mpo1 13 LMLAALVFLGTPWAIMNFVQRGRKQHTYLDYSITNLVAIVFALTFQGFCHSD-DGQP
 Bdi2 13 SIFSLFLGTPWPTLTHAERKGRPQHTYLDYSVSNLAAVLAHALTFQIGDGR----P
 Zma3 13 LMAVALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGPAS--STP
 Zma4 13 LMAVALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGPAS--STP
 Sbi3 13 LMAVALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGPDT-PETP
 Sit3 13 LMAVALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGPDT-PETP
 Pha2 13 LMAVALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGPDT-PETP
 Bdi3 13 LMAAALVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYFSLTNFMAAVLVGLTFQIGPDS-PDTP
 Osa3 13 LMGVSLVLLGTWPVLAIVLERRGRPQHTYLDYSITNFAALLVAFTFGQIGADT-PETP
 Sfa1 13 LMLAALVLLGTWPALINLVERQRNLMHTYLDYSITNLVAIIHALTLGQIGSST-PESP
 Sfa2 13 LMVAALCFLGTPALINLVERQRNLMHTYLDYSFTNYVAIIHALTFQIGSST-PESP
 Aco4 13 CMLLALVFLGTPAIMNFVERRGRHPQHTNLDSDIASLVATIIHALTLGQIGNST-PDVP
 Ppa1 13 LMLGALVFLGTPAIMNLVERRGRHLVHTYLDYSITNFAAGLVAHALTLGQIGSST-PEQP
 Smo1 13 LMLTALVFLGTPAIMNLVERRGRPQHTYLDYMCITNYAAIVHALTLGQIGESS-TQTP
 Csa4 13 CMILSLFLGTPVLLSVEERRGRPQHTYLDYSIANYAAVIAHALTLGQIGKSS-PDRP
 Dca3 13 CMILALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAVVIHALTLGQIGDSR-QNMP
 Esa5 20 CMLLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGGSS-LEAP
 Bra5 24 CMTLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGESTPEEAP
 Cru5 61 CILLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGEST-HEAP
 Bst5 21 CILLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGEST-QEAP
 Ath5 21 CILLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGEST-HEAP
 Aly5 21 CILLSLFLGTPALMALLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIFAVVFGGIGEST-HEAP
 Bra4 13 CMILSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FQTP
 Esa4 13 CMILSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FQTP
 Bst4 13 CMILSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FQTP
 Cru4 13 CMIVSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FQTP
 Ath4 13 CMILSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FLKP
 Aly4 13 CMILSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYFSAATNFMAAVLAHALTFQIGKST-FRKP
 Egr2 36 CMLLSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIVAFSLGEGKST-TDSP
 Aco3 13 CMLIALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIVAFSLGEGKST-TDSP
 Csa3 13 CMFSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIVAFSLGEGKST-TDSP
 Kfe2 38 CMILALVFLGTPAVLTFERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGSST-TLMP
 Sly4 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGTNS-MKQP
 Sly3 13 CMLLSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PERP
 Stu2 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PEMP
 Sly2 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PERP
 Csi 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PERP
 Ccl 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PERP
 Dca4 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGPST-PERP
 Pvu2 40 CMFLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGKGT-HDQP
 Pvu3 40 CMFLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGKGT-HDQP
 Gma2 13 CMFLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGKGT-HDQP
 Gma3 13 CMFLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGKGT-HDQP
 Aco2 13 CMFLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGKGT-HDQP
 Kfe1 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGGSS-PDLP
 Cru2 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGGSS-PDLP
 Bst2 13 CMFLSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGGSS-PDLP
 Ath2 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGSTK-PDSP
 Aly2 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGSTK-PDSP
 Dca2 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGSTK-PDSP
 Dca1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGSTK-PDSP
 Aco1 13 CMILSLLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGEDK-LSMP
 Stul 13 CMLLSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGTSS-LEKP
 Sly1 13 CMLLSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGTSS-LEKP
 Gra2 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGDST-VERP
 Mdo1 13 CMLLSLFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYSITNFAAIAVAHALTFQIGSST-PEEP
 Mgu1 36 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Cru3 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Bst1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Cru1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Aly1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Ath1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Bra1B 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Esa1 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP
 Bra1A 13 CMLLALVFLGTPALITLERRGRPQHTYLDYITNFAAIAVAHALTFQIGNGT-IEKP

Mtr3	13	CMLLALFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIIHALTFCEI	GNGT-VDAP
Tpa3	52	CMLLALFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GKGT-HDAP
Mtr2	13	CMLFSLFFLGTWPAVMNLLERRGRLPQHTYLDYTIANFAAVIHALTFCEI	G----TDDP
Tpa2	13	CMLFSLFFLGTWPAIMNLLERRGRLPQHTYLDYTIANLAAVIFAFTFGQI	G----TDDP
Mtr1	13	CMLVSLFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYTIITNFAAVIHALTFCEI	G----TDHP
Tpa1	13	CMLLSLFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYTIITNFAAVIHALTFCEI	G----TDHP
Gma1	13	CMLVSLFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYTLTNLAAVIFAFTFGQI	G----NAQP
Pvu1	13	CMLVSLFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYTLTNLAAVIFAFTFGCEI	GNTA----P
Ppe1	13	CMLLALIFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAILHALTFCEI	GNST-PEMP
Egr1	13	CMLLSLFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYTIITNFAAVIHALTFCEI	QAGT-PEAP
Csa1	13	CMVFALMFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAILHALTFCEI	GNSS-LHHP
Vvi	44	CMLLSLFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYTIITNFAAVIHALTFCEI	GSST-AEVP
Csa2	13	CMLLALFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GKSS-DDSP
Lus1	13	CMFLSLFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GSST-PATP
Lus2	13	CMLLALFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSVTNLAAVIHALTFCEI	GSST-TATP
Lus3	13	CMLLALFFLGTWPAIMALLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIIHALTFCEI	GKNS----P
Lus4	13	CMLLALFFLGTWPAIMALLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIIHALTFCEI	GNNS----P
Spu1	13	CMLFSLFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	G----NGRP
Ptr1	13	CMLFSLFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	G----SGRP
Rco1	13	CMLLSLFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GNST-PESP
Mes1	13	CMLLALFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GFSGEIGKST-PQSP
Spu2	36	CMLLALFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GKST-HEAP
Ptr2	13	CMLLALFFLGTWPAVMTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GKST-HEAP
Gra1	13	CMLLALFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYITMTNLAAVIHALTFCEI	GSST-PEKP
Tca	13	CMLLALFFLGTWPAIMTLLERRGRLPQHTYLDYTLTNLAAIVHALTFCEI	GKGS-PEQP
Atr1	13	LMFAALFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIIHALTFCEI	GRSK-PGEP
Atr2	13	LMFAALFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIIHALTFCEI	GSSK-PGMP
Zmar1	13	LMLSALFFLGTWPAIITLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAIFHALTFCEI	G DST-PTMP
Spo1	13	LMFAALFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDDT-PDMP
Bdi1	47	IMCASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDSK-HNMP
Zma2	13	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSVTNLAAVLHALTFCEI	GGAR-RGMP
Osa1	48	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDSK-PNMP
Sit1	47	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GN SK-DGMP
Pha1	47	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDSK-DGMP
Zma1	45	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDSR-RGMP
Sbi1	50	LMLASLFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVLHALTFCEI	GDSK-RGMP
Mac1	13	LMLAALFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	G DST-PEMP
Acom1	13	LMLAALFFLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNFAAVIHALTFCEI	GDSK-PDMP

Smo2 72 NFIQQLSQ--DNLPCVLFAMAGGIALCIGNICMOYSLVAVGLSITTEVVSASIAVIFGTTA
 Mpo2 72 NFIQQLSQ--ENLPSVLFAMLGGVALCFGNISMQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Sfa3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALCIGNISMQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Sfa4 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALCIGNISMQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Ppa2 72 NFIQQLSQ--ENLPSVLFAMLGGVALCIGNISIQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Ppa3 72 NFIQQLSQ--ENLPSVLFAMLGGVALCIGNISIQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Csu1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALCIGNISIQYSLAVVGLSITTEVVSASIAVAVGGTTV
 Sbi2 70 DEFTQLTQMDDNWPSVLFAMAGGIALSIGNLVSQYAWAVGLSVTNVICSSMTVVGTTT
 Osa2 72 SEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGIALSIGHLISQYAWAVGLSVTNVICSSIAVAVGGTTM
 Mpo1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALSIGNLACQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bdi2 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Zma3 71 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Zma4 71 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMLGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sbi3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sit3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Pha2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bdi3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Osa3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sfa2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aco4 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ppa1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Smo1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Csa4 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Dca3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Esa5 79 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bra5 84 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Cru5 120 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bst5 80 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ath5 80 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aly5 80 SEFTQLTHIQDNNWPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bra4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Esa4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bst4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Cru4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ath4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aly4 72 DEFTQLTQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Egr2 95 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aco3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Csa3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Kfe2 97 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sly4 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sly3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Stu2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sly2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Csi 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ccl 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Dca4 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Pvu2 99 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Pvu3 99 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Gma2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Gma3 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aco2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Kfe1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Cru2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bst2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ath2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aly2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Dca2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Dca1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aco1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Stu1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Sly1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Gra2 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Mdo1 72 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Mgu1 95 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Cru3 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bst1 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Cru1 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Aly1 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Ath1 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bra1B 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Esa1 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM
 Bra1A 69 NFIQQLSQ--DNLPSVLFAMAGGVALSIGNLCTQYAWAVGLSVATEVVSASITVVGTTM

Mtr3 72 NFLTQLAQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAFALVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Tpa3 111 NELAQLAQ--NNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAFALVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Mtr2 69 NELSQLSQ--DNLFSVLFAMAGGVVLSIGNVSGQYVWAFVGLSVAGVTSSII VVI GTVL
Tpa2 69 NELSQLTQ--DNLFSVLFAMAGGVVLSIGNLSSQYVWAFVGLSVAGVTSSII VVI GTTL
Mtr1 69 NELSQLSQ--DNLFSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTL
Tpa1 69 NELSQLSQ--DNLFSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTL
Gma1 69 NELSQLSQ--DNWPSVLFAMGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTL
Pvu1 69 NELSQLHQ--ENWPSVLFAMGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTL
Ppe1 72 NFLTQLSQ--DNWPCVLFAMTGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTSSITVVI GTTF
Egr1 72 NELLQLSQ--DNWSSVLFAMAGGVVLSIGNLASQYAFALVGLSVTEVTASITVVI GTTV
Csa1 72 NELLQLSQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTSSITVVI GTTL
Vvi 103 NFLTQLSQ--DNWPCILTFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTSSITVVI GTTL
Csa2 72 NELLQLYQ--DNWSSAMFAMGGGVVLSIGNLSTQYAFALVGLSVTEVTASITVVI GTTV
Lus1 72 NFLTQLSQLGDNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLCTQYAWAFVGLSVTEVTSSIVVI GTTL
Lus2 72 NFLTQLSQLGDNWPSVLFAMGGGVVLSIGNLCTQYAWAFVGLSVTEVTSSIVVI GTTL
Lus3 69 NELLQLSQ--LSENWPSVVFAMVGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTV
Lus4 69 NELLQLSQ--LSENWPSVVFAMVGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTV
Spu1 69 NELLQLSQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTSSITVVI GTTL
Ptr1 69 NELLQLSQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTSSITVVI GTTL
Rco1 72 NELLQLSQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTM
Mes1 72 NELLQLSQ--DNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVVEVTSSITVVI GTTL
Spu2 95 NELLQLSQ--LSDNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Ptr2 72 NELLQLSQ--LSDNWPSVVFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Gra1 72 NELLAQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Tca 72 NELLAQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Atr1 72 NELLQLSQ--DNWPSVCFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSCITVVI GTTM
Atr2 72 NELLQLSQ--DNWPSVCFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSCITVVI GTTM
Zmar1 72 NELLQLTQ--DNWTSVLFAMAGGVVLSIGNLSSQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTL
Spo1 72 NELLQLTQ--DNWPSVLFAMGGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVTASITVVI GTTM
Bdi1 106 NELLQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Zma2 72 NELLQLGQ--PNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Osa1 107 NELLQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Sit1 106 NELLQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Pha1 106 NELLQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Zma1 104 NELLQLGQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Sbi1 109 NELLQLSQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSSMVVI GTTL
Mac1 72 NELLQLGQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSITVVI GTTL
Acom1 72 NELLQLTQ--DNWPSVLFAMAGGVVLSIGNLSTQYAWAFVGLSVTEVSSITVVI GTTL

Smo2 130 NYFLDNCINNSARILFPGVCCFLAVVILGVSFCHASNANDRTARL----GPSNPR-----
 Mpo2 130 NYFLDEGLNKASILFPGVCCFLAVILGVSFCHASNADTKAKFVLPDAGPAYKALAEDA
 Sfa3 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAVVILGVSFCHASNADIALKLI----NSKPIVYRLEDA
 Sfa4 130 NYFLDGGVNCVAILFPGVCCFLAVVILGVSFCHASNADITLKI----NSKQIVPYRSEDL
 Ppa2 130 NYFLDDGINRASILFPGVCCFLAVVILGVSFCHASNVDIQAQKI----KAAEAS-----
 Ppa3 130 NYFLDDGINRASILFPGVCCFLAVVILGVSFCHASNVDMQTKI----KAAEPL-----
 Csu1 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAAITLGFVHASNMDHNTKI----GRKSSK-----
 Sbi2 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAVFLGAAVHASNANDDEQKI----SMKSAD-----
 Osa2 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAIFLGSVAVHASNAKDEEEKI----SMRGI-----
 Mpo1 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAVCLGSALHKSNDKDIKRKI----QLALKE-----
 Bdi2 129 NYFLDNKINRAILFPGVCCFLAAATLGCALHASNKADDKKI----SASPNS-----
 Zma3 131 NYFLDGRMNKAEILFPGVCCFLAAAILGSLVHASNADNQEKI----ANNNAS-----
 Zma4 131 NYFLDGRMNKAEILFPGVCCFLAAAILGSLVHASNADNQEKI----ANNNAS-----
 Sbi3 130 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAAAILGSLVHASNADNQEKLANSKAKYSKN-----
 Sit3 130 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAAAILGSLVHASNADNQEKL----ANSGVV-----N
 Pha2 130 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAAAILGSLVHASNADNQEKLAKSLANYSKN-----
 Bdi3 132 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAAACLSLVHASNADNQEKL----SRSRHA-----
 Osa3 132 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAAACLSLVHASNADNQEKL----SSAMVN-----
 Sfa1 130 NYFLDGRINRAILFPGVCCFLAVFLGAAALHTYSRDNLSKI----QAYSRS-----
 Sfa2 130 NYFLDDRINKAQILFPGVCCFLAVFLGAAALHTYSRDNLSKI----QAQNQS-----
 Aco4 130 NYFLDEQINRAILFPGVCCFLAVFLGAAVHFNADNEVKI----SNVSNT-----
 Ppa1 130 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVWLCAWLLKSNADNAAKI----QAHHKI-----
 Smo1 130 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVFLGSAALHNSNTKDNRAKI----AAEELL-----
 Csa4 130 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNTADIKMKI----ESLSED-----
 Dca3 130 NYFLDDRINKAGILFPGVCCFLAIFLGSVAVHNSNSADNAAKI----ERLSYG-----
 Esa5 139 NYFLDNKINRAILFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNSADIEGTL----GRVSGD-----
 Bra5 144 NYFLDNKINRADVLFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNSDVEAKI----GKLSVS-----
 Cru5 180 NYFLDNKINRAILFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNSADTEEKI----GKFTRD-----
 Bst5 140 NYFLDNKINRADVLFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNYADIEAKI----GKVS GD-----
 Ath5 140 NYFLDNGINRAILFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNSADIKAKI----GKLSGD-----
 Aly5 140 NYFLDNKINRADVLFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNSADIEAKI----GKLSGD-----
 Bra4 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGAAVHYSNADVKAKI----ESLPSE-----
 Esa4 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVILGAAVHASNADVKAKI----ESLPSE-----
 Bst4 130 NYFLDNKINKAEILFPGVCCFLAVFLGAAVHASNADVKAKI----KSLPSN-----
 Cru4 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGAAVHASNADVKAKI----KSFPS-----
 Ath4 130 NYFLDNKINKAEILFPGVCCFLAVFLGAAVHASNADVKEKI----KSLPSE-----
 Aly4 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGAAVHASNADVKAKI----KSLPSE-----
 Egr2 153 NYFLDNKINNAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADDTMKI----DQSGLG-----
 Aco3 131 NYFLDDRINKAKILFPGVCCFLAVFLGFAVHNSNADPKAKI----RSLSDN-----
 Csa3 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAAFLGSLVHASNMDNDLKI-----
 Kfe2 155 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNADNKAKI----GSLPYK-----
 Sly4 132 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKEKI----EYFSND-----
 Sly3 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKTKI----DNYSND-----
 Stu2 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKS KI----DNYSND-----
 Sly2 130 NYFLDDKINKAEILFSGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKT KI----DNYSND-----
 Csi 129 NYFLDDKINKAEILFPGIACFLAVGLGSVAVHNSNADNKA KI----NNLPSD-----
 Ccl 129 NYFLDDKINKAEILFPGIACFLAVGLGSVAVHNSNADNKA KI----NNLPSD-----
 Dca4 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCFGLSGLHASNENEAKI----KTLANN-----
 Pvu2 157 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNASDNKA KI----NNYSND-----
 Pvu3 157 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNASDNKA KI----NNYSSD-----
 Gma2 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNADNKA KI----SNFTGD-----
 Gma3 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNADNKA KI----NNFTGD-----
 Aco2 130 NYFLDDRINNAKILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNEAKI----SALPDS-----
 Kfe1 130 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNAGDNKA KI----ESLPHD-----
 Cru2 130 NYFLDDRINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNASDNKA KI----RDFEMT-----
 Bst2 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNAGDNKA KI----SDFEMT-----
 Ath2 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKA KI----RDFETA-----
 Aly2 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKA KI----RDFEMA-----
 Dca2 130 NYFLDDRINKAEILFPGVCCFLAVCLGSGLHASNADNKA KI----SALEFC-----
 Dca1 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKA KI----RHFANS-----
 Aco1 130 NYFLDDRINKAEILFPGVCCFLAVFLGSVAVHNSNADNKT KI----SSLPTN-----
 Stu1 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKA KI----DSYSNE-----
 Sly1 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKA KI----DSYKNE-----
 Gra2 130 NYFLDGRINKAEILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADYKAKI----SSWPID-----
 Mdo1 130 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVXLSVAVHNSNADNKA KI----ESMATD-----
 Mgu1 153 NYFLDDKINKAEILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKK KI----TTFSD-----
 Cru3 127 NYFLDDKINKAEILFPGIACFLAVCFGSVAVHNSNASDNKS KI----QDFKSL-----
 Bst1 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKS KI----QDFKSL-----
 Cru1 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKS KI----QDFKSL-----
 Aly1 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKS KI----QDFKSL-----
 Ath1 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKT KI----QNFKSL-----
 Bra1B 127 NYFLDDRINRAILFPGIACFLAVCFGSVAVHNSNADNKS KI----QNFNSL-----
 Esa1 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCLGSVAVHNSNADNKS KI----QDFKSL-----
 Bra1A 127 NYFLDDRINRAILFPGVCCFLAVCFGSVAVHNSNADNKS KI----QDFKSL-----

Mtr3	130	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNQAKL	----	KDFSSH	-----
Tpa3	169	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTSDNRAKL	----	QEYSSD	-----
Mtr2	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFFAVCLGYFLHSSNIADNQAKL	----	KDFANK	-----
Tpa2	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFFAVCLGFIVHSSNIADNQAKL	----	KEFASD	-----
Mtr1	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNQAKL	----	SSHHKD	-----
Tpa1	127	NYFLDDRINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNQAKL	----	KDFSND	-----
Gma1	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTVDNKAKL	----	SDYKDA	-----
Pvu1	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNKAKL	----	NGFSTD	-----
Ppe1	130	NYFLDDKINRADLFPGVCCFLAVCLGAAVHSSNAADNKVKL	----	DSLSSD	-----
Egr1	130	NYFLDDKINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKRKL	----	NNLPGN	-----
Csa1	130	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNKAKL	----	KLSLHN	-----
Vvi	161	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKAKL	----	MAQGID	-----
Csa2	130	NYFLDNKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNTADNKAKL	----	DTLADY	-----
Lus1	132	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFFAACLGSVVHSSNAADNKAKL	----	QNL PVD	-----
Lus2	132	NYFLDNRINRAETLFPGVCCFFAACLGSAVHSSNAADNKAKL	----	ENL PVD	-----
Lus3	129	NYFLDDRINKAETLFTGVCCFLAVFLGSLVHSSNAADNRAKL	----	ESLSIK	-----
Lus4	129	NYFLDDRINKAETLFTGVCCFLAVFLGSLVHL SNAADNRAKL	----	ESLSIK	-----
Spu1	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNRAKL	----	ESLTS D	-----
Ptr1	127	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNRAKL	----	KGLTSD	-----
Rco1	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKAKL	----	KNFSSD	-----
Mes1	130	NYFLDDKINKAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKAKL	----	QNLAND	-----
Spu2	155	NYFLDDRINNAKTLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNADNRAKL	----	SCLPSD	-----
Ptr2	132	NYFLDDKINNAKTLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNRAKL	----	SCLSND	-----
Gra1	130	NYFLDDKINRAQLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKAKL	----	KGAGYS	-----
Tca	130	NYFLDDKINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNKAKL	----	IELREA	-----
Atr1	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFFAVCLGSVHSSNKADIEAKL	----	SIMDK E	-----
Atr2	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFFAVCLGSVHSSNFADIKAKL	----	SVKGNE	-----
Zmar1	130	NYFLDDRINKAETLFTGVCCFFAVFLGPAVHSSNGTDNKKKL	----	NAANNQ	-----
Spo1	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNSADNRKKL	----	AGSSNY	-----
Bdi1	164	NYFLDNRINKAETLFTGVCCFLAVILGSLVHSSNAADNAQKL	----	SASTNS	-----
Zma2	130	NYFLDNRINRAETLFPGVCCFLAVILGSVHSSNAADNEEKL	----	SASTNA	-----
Osa1	165	NYFLDNRINRAETLFPGVCCFLAVILGSVHSSNAADNEEKL	----	NGSTNI	-----
Sit1	164	NYFLDNRINRAETLFTGVCCFLAVILGSVHSSNAADNAEKL	----	NASNKL	-----
Pha1	164	NYFLDNRINKAETLFTGVCCFLAVILGSVHSSNAADNEEKL	----	NASNKL	-----
Zma1	162	NYFLDNRINRAETLFPGVCCFLAVILGSVHSSNAADNEQKL	----	GASTNA	-----
Sbi1	167	NYFLDNRINRAETLFPGVCCFLAVILGSVHSSNAADNEKKL	----	SGSTNA	-----
Mac1	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNTKKL	----	SGSSSN	-----
Acom1	130	NYFLDDRINRAETLFPGVCCFLAVCLGSVHSSNAADNEKKL	----	SGSSTN	-----

Smo2 179 CEAEQDL-----HTNLLKSSLVDL-----
Mpo2 190 PENRQSD-RSSRRSGEVLLRGKSLLEQWSVKGKDMETGAPQTYEHVSGKAPQLYEHVSDK
Sfa3 186 EEAIMNS-----DNAKLLGKRRFTEGVAQTEEGRGSCSHFPI-----R
Sfa4 186 EETTMNV-----DFTDCVNAKLLNKQCFTEGIAQ-----VEEGK
Ppa2 179 AQTLEDN-----GSSFKNSEASAPLLINHPN-----L
Ppa3 179 SQMLEDM-----KSPMKGSEEFALLVNSNNHEAYTEYHGDVKKRVASSLNLVSSSH
Csu1 179 GWLSKGV-----GVDLEK-----A
Sbi2 179 IELSNDF-----SDKAKLLPA-PEES-K-----N
Osa2 179 ELSSDVA-----DQVKLLPNQEELE-----N
Mpo1 179 QGSTHEEL-----KTRPAVGAAE-PSEL-E-----S
Bdi2 178 YSFCTNG-----GLTLGEQVSITEPLRDT-E-----N
Zma3 180 NAAAAAD-----EEKDLTKHLE-----
Zma4 180 NAAAAAD-----EEKDLTKHLE-----
Sbi3 183 TRKNTAD-----DEDLTKHLLNKEIPKDPPEA-----A
Sit3 180 YSKNTRN-----SAYEDLAEHLEKEGQKDLLE-----A
Pha2 183 TRNTASY-----DDLTKHLEKEG-PKDL-E-----E
Bdi3 181 TTGNTAN-----EELTKNLLDKEEKPKDCEE-----A
Osa3 181 HSNNTGD-----TENEELTKHLEIEQ-PKDC-E-----E
Sfa1 179 DAKINTE-----KSPDLEIMDAPSKSVAQEE-----N
Sfa2 179 DAKLKMD-----HTYDPESIESPTKNSKEE-----K
Aco4 179 CNEKEKA-----IEIPGFKKIFPHKDG-HKDLEQ-----E
Ppa1 179 GTNSEPD-----PESVVRD-SDFIAE-----E
Smo1 179 NSNDGSG-----SSYKRLDVEMA AVETKNQPEEE-----N
Csa4 179 SNNESKP-----IDVSSIS-VESA-E-----N
Dca3 179 HPEGAGA-----VQMSSHKNTHSLKDG-VKDL-E-----N
Esa5 188 CKTVNPE-----DCQRLFGVEEEEE-----
Bra5 193 QEECQRL-----F
Cru5 229 CEIVNPE-----ECQRLFGVDEEE-E-----
Bst5 189 FETVTPE-----ECQRLFGVVEEE-E-----
Ath5 189 CETVTPE-----ECQRLFG-VEEEEE-----E
Aly5 189 CETVDTE-----ECQRLFG-----E
Bra4 179 -----D-----FYSSIKKGEDNPEKE-ETDL-E-----S
Esa4 179 YKAGTDD-----VE-----S
Bst4 179 -----D-----FYSSVKNGEDNPEKE-KTDV-E-----S
Cru4 179 YKARTQD-----FYSSIKKGEDNPEKE-KTDV-E-----S
Ath4 179 -----D-----LYSSIENGEDKPEIE-KTDV-E-----S
Aly4 179 YKAETKD-----FYSSTKNVEDNPEKE-KNDV-E-----S
Egr2 202 NIDAKTS-----SFSALKGVHQN-DEDM-E-----N
Aco3 180 NMDGIRTYTCQLWSFTGKKKIQGSRMKSQRKISDYLYG-TKDL-E-----N
Csa3 173 KIESTNL-----E-----S
Kfe2 204 -----AEARAQ-----G
Sly4 181 SNNVGVT-----KDVTSKPTNTNKVDMNDL-E-----N
Sly3 179 CKDGVRT-----DGVTSFKPTDFNQGGTNGL-E-----D
Stu2 179 CKDRVRT-----NGVTSFKPTNFNQGGINGL-E-----D
Sly2 179 CKDGVRT-----NGVTSFKPTNFNQGGTNGL-E-----D
Csi 178 SKPGTRA-----TFIPTSCETLPENGIKDP-----V
Ccl 178 SKPGTRA-----TFIPTSCETLPENGIKDP-----V
Dca4 179 KIEEIGE-----QVPIYKEICLISDARDI-E-----N
Pvu2 206 YKEAAIS-----SKERDLVSKKDL-E-----R
Pvu3 206 YKEAAIS-----SKERDLVSKKDL-E-----S
Gma2 179 YKGDGDIS-----SSKEGDIVKSKDL-E-----S
Gma3 179 YKNGDTS-----SLKGDGDIVKSKDL-E-----G
Aco2 179 YNDALGD-----KEK-----TGSNDAFPN-KKDL-E-----S
Kfe1 179 YKDGIEI-----TGDEAE-----Q
Cru2 179 NQEPSGL-----STDIETTNS-SKDL-E-----T
Bst2 179 KQEASCP-----STEIETNSKQDV-E-----T
Ath2 179 KQEASGP-----STEIGTNSKDL-E-----
Aly2 179 KQEASGP-----STEIGTNSKDL-E-----T
Dca2 179 KIDESRD-----SKVPLSKETKSI AVGKDL-E-----N
Dca1 179 KSDASRS-----SLPVSHEHYEDSVGKNL-----Q
Aco1 179 YIDGTGE-----EKTSGFKEGSPDKDGKDL-E-----N
Stu1 179 SKDGIRA-----NNITDSKQAYTKTVDINDAE-----K
Sly1 179 SKDGIRA-----NSITDSKQAYTKTVDVNDAE-----K
Gra2 179 NETGKGT-----VLPSASEEAVLKDR-E-----N
Mdo1 179 HVXGEKP-----SNASVIPSEAGLKDV-E-----X
Mgu1 202 TKDGEIK-----CIDISVGLFFDRTNDAHASETYAKKDL-E-----N
Cru3 176 ETTSSLQ-----TETNPE-----T-----N
Bst1 176 ETTSSFQ-----METNPA-----N-----N
Cru1 176 ETASSFE-----METVSG-----S-----N
Aly1 176 ETASSFE-----METVSA-----N-----N
Ath1 176 ETTSSFE-----METISA-----S-----N
Bra1B 176 ETTSSFQ-----IETNHA-----N-----S
Esa1 176 ETASSSQ-----IETNQA-----N-----
Bra1A 176 ETTSSFQ-----IETGPA-----D-----S

Mtr3 179 HNDVTLD-----SLKEGNIVKSKDL-E-----S
Tpa3 218 SLDSLKE-----GNIVKSKDV-E-----S
Mtr2 176 DVAQGTS-----LSTLKEASHEVDSKDL-E-----N
Tpa2 176 YKDVASE-----ETVDSKDLLEN-----R
Mtr1 176 VVQGTNL-----STLNEEKDDSKDL-E-----N
Tpa1 176 PKNATQG-----TSLSTLKEASEVD-SKDL-E-----N
Gma1 176 AKGTSVT-----TFKETSEVE-SKDL-E-----D
Pvu1 176 YKDAAKT-----TTMTTSIETSEVDSKDL-E-----D
Ppe1 179 HIDAVKV-----SNTSMIPNEAASKDL-E-----N
Egr1 179 ---GKSN-----DACITG-RKDM-E-----N
Csa1 179 TNQESNT-----TDAPPRSCKDL-E-----S
Vvi 210 TSVVKEA-----SPNNGDP---E-----N
Csa2 179 -----
Lus1 181 QKDDEEN-----NGG-----H-----S
Lus2 181 QKHDEEN-----
Lus3 178 -----NEV-E-----N
Lus4 178 -----NDM-E-----N
Spu1 176 NKNVTAT-----VGSSAYSNEASQKNG-VKDL-E-----N
Ptr1 176 NKNVTET-----VGSSAYSNEASQKNG-VKDM-E-----N
Rco1 179 YKLRTVD-----TGSSITKEESTSNGSKDP-E-----T
Mes1 179 YELQTED-----KDSSTIKEDFPNNG-RKDL-E-----N
Spu2 204 -----DKHRSV-AADITQ-----S
Ptr2 181 DKLRSVA-----TDISTS-REAFPE-----K
Gra1 179 PTSNGAI-----TNEELRNL-E-----K
Tca 179 GYPSASK-----EATTNKELKDL-E-----N
Atr1 179 KTRIANS-----ET-----TKDLQST-ALDL-E-----N
Atr2 179 LVSIKLN-----SGVTTSTDVTTDL-E-----K
Zmar1 179 -----LNNL-E-----N
Spo1 179 KVNQGLN-----EDEGMKGDAKMNEVTADMEA-----G
Bdi1 213 YKIGTTG-----DDMEPSKQVIDKDAPKDM-E-----N
Zma2 179 YQLGRTA-----GAAEPSKHVLDKDVAKDL-E-----N
Osa1 214 YKLGENG-----SVEPNKEVIEKDAPKDL-E-----N
Sit1 213 GANGSVE-----PSKGVLDKDKAPKDL-E-----N
Pha1 213 GANGSVE-----PSKGVDPKDKAPKDL-E-----N
Zma1 211 YKLGTS-----NVEPSKQAVDRDAPKDL-E-----S
Sbi1 216 NKLGTS-----TVEPSKQVLDKDKAPKDL-E-----N
Mac1 179 STSQTCI-----TSSILCSKLFFLNSLAVDE-PRDL-E-----D
Acom1 179 YTKTTRA-----NSDVSKDM-E-----K

Smo2 198 -----IATESSSFYDTEEQRAIK---VRDSSVMFGLVIAFITGMCY
 Mpo2 249 A-----PQLHYLDESSAAGSAAYLEHEEETRAIK---VRGHSVMFGLGIAFLTGLCY
 Sfa3 224 G-----SEWGSETTELAMGSAEFLHNLEDQRAIK---TKGRSVGFGLGIALFTGACY
 Sfa4 220 G---SCSSEEWGLETAEEAVGSAEFLQNEEDHRAIK---TKGRSVGFGLGIALFTGGCY
 Ppa2 207 E---THSKYCADPEIGGSAATGAEYFESLESHRAIK---VKCKSVLFGGLIAFTGLCC
 Ppa3 231 N---SDCKSRKPEPLSKGVVANAAYLLENEESHRAIK---VNGKSVVFGGLGIALITGLCY
 Csu1 193 G-----AKSEGSSARGSAQFLADVESRRSIK---VVGNVSLIGLFILOFNCTCY
 Sbi2 201 G-----DAEDYSASNELKPGIAEFLIQVEERRSIK---VLGHSKLLGLGLVFEACACF
 Osa2 200 G-----EDDDFDTGIAEFLIVQVEKRRSIK---VFGSSRWLGLGMVLLAGVCF
 Mpo1 202 G-----VNVPTTETKTIVIGSAEFLKQLEDKRAIK---VGSANYLFGLSIVLVAGLGF
 Bdi2 204 G-----DSPVTDATRAKPGSKELYLEEQRRSIK---VLESNKFIGLAIVLEAGFLM
 Zma3 198 -----LEIPSQEAEPDAGIAGFLVGLLEEKRSIK---VLGSHTLLGLGIVVEAGIFY
 Zma4 198 -----LEIPSQEAEPDAGIAGFLVGLLEEKRSIK---VLGSHTLLGLGIVVEAGIFY
 Sbi3 210 K---PDAADQATEAPEKVEAGTAEFLVNEEEKRSIK---VLGSHTLLGLGIVVEAGVfy
 Sit3 209 A-----LDAPEAKLEKVQAGTAEFLVHLEEKRSIK---VLGSNTLLGLGIVVEAGVfy
 Pha2 208 A---KLDAPENTQKLEKVEAGTAEFLVHLEEKRSIK---VLGSHTLLGLGIVVEAGVfy
 Bdi3 208 K-----PDEPKAVEKIEAGTADFLIHLEDKRSIK---VLGSHTLVGLGIVVEAGICY
 Osa3 209 Q---EPEVAPAAQAVEKLEAGTAEFLVDLEEGRSIK---VLGSNTFLGLGIVVEAGVSY
 Sfa1 206 GIDKNAKVTLQANGLGGKAGTQYLQOLEDQRAIK---ISGVKTTFFGLVIVVIAGFCF
 Sfa2 206 G---SDNNEFQAQANSVEVKAGSAQYLTQLEEQRAIK---ITGAKVPFGLAIAAASGICF
 Aco4 208 A-----VHAQKAIVGSAEFLRQENRRAIK---VFGKRKLIGLGIAFESGLCF
 Ppa1 200 P-----VKALPGSCAYLQOLEEQRAIK---SSCASTIFGLAIVVEAGICF
 Smo1 209 G-----TTKTVKAQAGTAEFLDQLEHKKRAIK---NTTNTIILGLIIFEAGACF
 Csa4 199 A-----NCSLRNAEAGTAEFLVQENRRSIK---VAGKSTLVGLGIIIFEAGVSL
 Dca3 207 G-----IGEGGKTKAGTADFLIELEENTRSIK---VYGKSIMIGLVIITFEAGCCF
 Esa5 209 -----MENVHEWTAFLIAEHEHTRAIK---VLGKSMVVGLGITFEAGLCL
 Bra5 201 G-----GEEEMENVKEGTAFLIAENKRAIK---VLGKSMVVGLSITFEAGLCF
 Cru5 249 -----KDMENVKEGTAFLIAENTRAIK---VFGKSMVVGLGITFEAGLSF
 Bst5 209 -----KEMENVKEGTAFLIAENTRAIK---VFGKSMVVGLGITFEAGLCF
 Ath5 210 E-----KEMENVKEGSAFLIAENKRAIK---VLGKSMVVGLGITFEAGLSF
 Aly5 205 E-----EKEMENVKEGTAFLIAENTRAIK---VFGKSMVVGLGITFEAGLCF
 Bra4 201 H-----EQPVEKAKAGTAGFVVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGTCL
 Esa4 189 Q-----EKPTGKAKAGTAGFVVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGICL
 Bst4 201 Q-----EKQAEKAKAGTAGFVVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGICL
 Cru4 207 Q-----EKQAGKAKAGTAGFVVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGICL
 Ath4 201 Q-----EKLAEKAKAGTAGFYVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGISL
 Aly4 207 Q-----EKQAGKAKAGTAGFVVELENKRAIK---VFGKSIMIGLFIITFEAGTCL
 Egr2 226 A-----SGLSEKVEVGLADSLIELEYRRAIK---VLGRNTLSGLGIAFEGGVCF
 Aco3 224 G-----YVNDKKAIEFGTAEFLVLENKRAIK---VFGKRTMIGLGITFEAGICL
 Csa3 182 A-----AYSSRAKAGTAEFLVQENRRSIK---VFGKSTLIGLITFEASVSI
 Kfe2 211 G-----EMSTGKAKVGSAGYLELEEGRRSIK---VFGKNTYIGLAMCFEAGGCF
 Sly4 209 G-----EKKAKAGTAEFLIEVENRRAIK---VFGKSTYIGLAITFEAGACL
 Sly3 207 G-----DASEKAKFGTAEFLIELENMRSIK---VLGKGTLIGLITFEAGICF
 Stu2 207 G-----DASEKAKFGTAEFLIELEENTRSIK---VLGKGTFIGLITFEAGICF
 Sly2 207 G-----DASEKAKFGTAEFLIELEENTRSIK---VLGKGTLIGLITFEAGICF
 Csi 205 G-----NDTVGKLGKAGTAGFLVELENRRSIK---VFGKSILIGLAITFEAGVCF
 Ccl 205 G-----NDTVGKLGKAGTAGFLVELENRRSIK---VFGKSILIGLAITFEAGVCF
 Dca4 205 V-----LGTAKAKVGTAEFLIEVENRRAIK---VFGKSTYTGGLITFEAGLCF
 Pvu2 227 G-----SSSADNVEAGTAEFLIELEERRAIK---VFGKSTLIGLSITFEAGLCF
 Pvu3 227 G-----SSSADNVEAGTAEFLIELEERRAIK---VSGKSTLIGLITFEAGLCF
 Gma2 201 G-----SSSADNVEAGTAEFLVLEEEKRAIK---VFGKSTLIGLITFEAGLCF
 Gma3 201 G-----SSSADNVEAGTAEFLVLEEEKRAIK---VFGKSTLIGLITFEAGLCF
 Aco2 204 V-----S---DHQEKAKVGTAEFLIQENKRAIK---VFGKSTLIGLITFEAGFCF
 Kfe1 193 R-----RNPPDKAKFGTAEFLIELENRRSIK---VFGKSTFTGLAITFEAGVCF
 Cru2 201 N-----VTKTTSEPKPEGTAEFLIELENKRAIK---VFGKRKIIGLAITFEAGLCF
 Bst2 200 N-----VTNRI SAKPKEGTAFLIELENKRAIK---VFGKHKIIGLAITFEAGLCF
 Ath2 199 -----TNVTTKPKEGTAFLIELEENTRAIK---VFGKRKIIGLAITFEAGLCF
 Aly2 200 N-----VTDETSTKPKEGTAFLIELENKRAIK---VFGKRKIIGLAITFEAGLCF
 Dca2 206 A-----VEKTEKAKVGTAEFLIELENRRSIK---VFGKSTFVGLGITFEAGLCF
 Dca1 204 G-----EITSDKTKVGSASEFLIELENRRSIK---VFGKSTIIGLITFEAGVCF
 Aco1 206 G-----DVNVEKAKFGTAEFLIELENRRAIK---VFGKSTVIGLAITFEAGVCF
 Stu1 207 G-----VASTEKAKFGTAEFLIDLEKRRAIK---VFGKSAIIGLAITFEAGVCF
 Sly1 207 G-----AASTEKAKFGTAEFLIDLEKRRAIK---VFGKSAIIGLAITFEAGVCF
 Gra2 202 G-----GGPIRKAKAGTAEFLIELEEKRRSIK---VFGKSMFIGLITFEAGVCF
 Mdo1 203 G-----NGPAHSAKAGTAKYLVQENRRSIK---VFGKNTFIGLGITFEAGLCF
 Mgu1 238 G-----SASNEKAKFGTAEFLIELENKRAIK---VFGKGTLIGLSITFEAGFCF
 Cru3 191 G-----LAKGEAKKGTAEFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLMTFEAGICI
 Bst1 191 G-----LAKGKAKEGTAFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGICF
 Cru1 191 G-----LTKGKAKEGTAFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGICF
 Aly1 191 G-----LAKGKAKEGTAFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGICF
 Ath1 191 G-----LTKGKAKEGTAFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLITFEAGICF
 Bra1B 191 G-----LGKEKAKEGTAFLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGICF
 Esa1 190 S-----RLAKGKAKEGTAFLVLEEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGLCF
 Bra1A 191 G-----LAKGKAKEGTAAYLIELEKQRAIK---VFGKSTIIGLAITFEAGICF

Mtr3 201 G-----GSSAEKLGAVFLIENENRRAIK---VFGKRPLIGLTIIVFAGICF
Tpa3 236 G-----SDSAEKLKAGAVFLIDLEKRRSIK---VFGKSTLIGLTIIVFAGSCF
Mtr2 201 G-----SDPTCKVKVGLAVFLIELEKRRSIKASGYVFEKSTFIGLAITVFAGISF
Tpa2 194 S-----DLSPYKVKAGAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTFIGLAIIVFAGGISF
Mtr1 199 G-----TANKAKAGAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTFIGLAITVFAGVCF
Tpa1 202 G-----SDSAYKAKAGAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTFIGLTIIVFAGVCF
Gma1 198 G-----THKAKAGAVFLIELEKRRSIK---VLGKSTFIGLAITVFAGVCF
Pvu1 202 G-----SAAAVHKAKAGAVFLIELEKRRSIK---VLGKNSFIGLAIIVFAGVCF
Ppe1 203 G-----NDPAQKAKAGAVFLVQLENRRSIK---VFGKSTFIGLGIIVFAGVCF
Egr1 195 G-----NGFTCKAKVGLAVFLVLENRRSIK---VFGKSAVFIGLTIIVFAGVCF
Csa1 199 A-----DSSSLKAKVGLAVFLIQLEKRRSIK---VFGKSTLIGLTIIVFAGICF
Vvi 226 G-----SSGTAPKAKVGLAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTLIGLTIIVFAGVCF
Csa2 179 -----FSLKAKAGAVFLVLENRRSIK---VFGKSAVFIGLTIIVFAGVCF
Lus1 193 G-----SNEKKAVPGLAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTMIGLAIIVFAGVCF
Lus2 189 G-----GHSGNVKAVPGLAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTMIGLAIIVFAGVCF
Lus3 183 G-----DVRAKKAAFGLAVFLVQLENRRRAIK---VLGKGTITGLAIIVFAGVCF
Lus4 183 G-----DVRAKKAAFGLAVFLVQLENRRRAIK---VLGKGTITGLAIIVFAGVCF
Spu1 204 G-----SSTPEKAKAGAVFLIDLENRRSIK---VFGKSTFIGLTIIVFAGVCF
Ptr1 204 G-----SSTPERAKAGAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTLIGLTIIVFAGVCF
Rco1 206 G-----NVPAGKAKAGAVFLVLEESKRSIK---VFGKSTLIGLAIIVFAGVCF
Mes1 206 G-----NAPPEKAKAGAVFLIELEKRRSIK---VFGKSTLIGLAIIVFAGVCF
Spu2 217 G-----EAFPVKERKAKVGLAVFLVQLEKRRRAIK---VFGKSTLIGLAIIVFAGLCF
Ptr2 201 E-----RRAKFGVGLAVFLVLENRRRAIK---VFGKSTLIGLAIIVFAGICF
Gra1 196 G-----SGIIEEKAGAVFLIELEKRRRAIK---VFGKSTIIGLTIIVFAGVCF
Tca 199 A-----NGTTEKAKAGAVFLVLENRRRAIK---VFGKSTFVGLAIIVFAGVCF
Atr1 201 E-----KNEAVIPFSENKAKAGAVFLVLEKRRSIK---VVGSTMFGLCIIVFMAGICF
Atr2 201 G-----KYEAVPFTDKEVGAGVAVFLVLEESRRSIK---VVGSTMFGLWIVFMSGICF
Zmar1 185 G-----IGPDSLISDEIKYGLAVFLIELEKRRSIK---VHGSIIYGLGIVFVAGICF
Spo1 207 G-----YDSSTPKGEKAKYGLAVFLIELEKRRSIK---VLGSRITVGLSIVFVAGVCF
Bdi1 240 G-----ASPTKYATKAEAGVAVFLIELEEQRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Zma2 206 G-----VSGTKQADKAEAGVAVFLIQLEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Osa1 240 G-----ASATKYVAKAEAGVAVFLIELEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Sit1 236 G-----ASGTKHVTKAEAGVAVFLIELEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Pha1 236 G-----ASGTKHVTRAEAGVAVFLIELEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Zma1 238 G-----ASGIRQPDKAEAGVAVFLIELEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Sbi1 242 G-----ASGAKQVDRAEAGVAVFLIELEERRSIK---VFGSNTFIGLGIIVFVAGVCF
Mac1 211 G-----GLVSGSNINSEKAKVGLAVFLIQLENRRSIK---VIGSNTFVGLSIVFVAGICF
Acom1 196 G---VTNTSDPTVGVENAKAGVAVFLIQLENRRSIK---VLGKSNLFFGLGIVFVAGLCF

Smo2 237 GFFSPLFNLATNDQFHLLNPKVPHLVVYTSFFVSTAFVLVGLVNLNVLVLYYP L-GLPK
 Mpo2 299 ALFSPFLNLAVDNQFHLLKPGVPHLSVYATFFVSTAFVIVAVSLNIFFLYNP M-GLPK
 Sfa3 273 ALFSPFLNLAVDNQFHLLKPDVPHLVVYTTFFVSTSEFICAMLNILLIYYP V-GLPK
 Sfa4 273 ALFSPFLNLAVDNQFHLLKPNVPHLVVYTTFFVSTSEFICAMVNIYLYHP L-DIPK
 Ppa2 260 AAFSPLFNLAVDNQFHLLKPDVPHLVVYTTFFVSTAFGLICSVLNVLVLYHP L-GIPK
 Ppa3 284 AAFSPLFNLAVDNQFHLLKPGIPHLVYTSFFVSTAFGLICSVLNVLVLYHP L-GIPK
 Csu1 239 ALFSPAFLNLAVDNQWNRLEPGVPHLVVYTAFFVSTSEFIFSLINNTVLYFP L-GAPK
 Sbi2 251 SLFSPAFLNLAVDNQWHAERKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVLCACLNWLLYHP A-GVPA
 Osa2 244 SLFSPAFLNLAVDNQWRTLRDSVPHLVVYTAFFVSVSCFVAVGILNARLLYRP A-GVPP
 Mpo1 251 SLFSPAFLNLAVDNQWNSLKPNVPHLVVYTAFFVSIAAFVFCFGLNLLLYRPAM-GLPK
 Bdi2 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLKDGVPKLVVYTAFFVSISSFVIGVGNLWLYCP A-DVEK
 Zma3 246 ALFAPAFNLAVDNQWHTLPAGVPHLVVYTAFFVSLACLAVSAALNWLWLYRP V-GVPS
 Zma4 246 ALFAPAFNLAVDNQWHTLPAGVPHLVVYTAFFVSLACLAVSAALNWLWLYRP V-GVPS
 Sbi3 263 ALFAPAFNLAVDNQWHAERKGVPHLVVYTAFFVSLACLAVSAALNWLWLYRP MAGVPA
 Sit3 259 ALFTPAFLNLAVDNQWHAERKGVPHLVVYTAFFVSLACFAVSVGLNWLWLYHP V-GVPR
 Pha2 261 ALFTPAFLNLAVDNQWHTLPAGVPHLVVYTAFFVSLACFAVSVGLNWLWLYRP V-GVPR
 Bdi3 257 SLFSPAFLNLAVDNQFHLLPGTAPHLGVAAYFFVSLSCFVAVGVLNWLWLYRP A-GVPO
 Osa3 262 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEGGVPHLVVYTAFFVSLACFAIGIALNWLWLYHP V-GVPR
 Sfa1 262 ALFSPAFLNLAVDNQWHRLEKGVPHLVVYTAFFVSMMAFVIGVGNLWLYCP A-DVEK
 Sfa2 260 ALFSPAFLNLAVDNQWHTLKPGVPHLVVYTAFFVSTMSFVWGLTNTVLYRP L-GLPK
 Aco4 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCSMTTILNIRFLYHP L-NLPK
 Ppa1 242 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLKPGVPHLVVYTAFFVSLSAFVIGAMSLNIFFLYHP L-GLPK
 Smo1 255 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLKPGVPHLVVYTAFFVSTSEFVLAFLSLVLYRPVAV-GLPK
 Csa4 245 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSTSEFVLAFLSLVLYRPVAV-GLPK
 Dca3 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSSFTVAVLNLIIFLYRP L-KSPK
 Esa5 251 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Bra5 249 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Cru5 293 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Bst5 253 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Ath5 255 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Aly5 251 SLFSPFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYKP L-DSPK
 Bra4 247 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP A-GLAR
 Esa4 235 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP V-GLER
 Bst4 247 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP V-GLER
 Cru4 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP V-GLAR
 Ath4 247 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP V-GLAR
 Aly4 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIAGFLIALILNLIIFLYRP V-GLAR
 Egr2 272 ALFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIISCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Aco3 270 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVACFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Csa3 228 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVLSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Kfe2 257 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYHP L-GLPK
 Sly4 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSSSLDAMILNFTFLYRP L-NAPK
 Sly3 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSCFCFIAMVNLNIFLYHP L-NAPK
 Stu2 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSCFCFIAMVNLNIFLYHP L-NAPK
 Sly2 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSCFCFIAMVNLNIFLYHP L-NAPK
 Csi 251 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-DTHR
 Ccl 251 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-DTHR
 Dca4 251 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIISCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Pvu2 273 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIISCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Pvu3 273 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIISCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Gma2 247 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSIISCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Gma3 247 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Aco2 250 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Kfe1 239 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSCFVIAIALNVSFLYHP L-GLPK
 Cru2 249 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-GLPK
 Bst2 248 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSSFIAMVNLNIFLYHP L-GLPK
 Ath2 244 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-GLPK
 Aly2 248 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-GLPK
 Dca2 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Dca1 251 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Aco1 252 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVACFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Stu1 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NAPK
 Sly1 253 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NAPK
 Gra2 248 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-GVSK
 Mdo1 249 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSLSGTVAVILNLIIFLYRP AL-GSQK
 Mgu1 284 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSCFVIAIALNVSFLYHP L-NLPR
 Cru3 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Bst1 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Cru1 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Aly1 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Ath1 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Bra1B 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Esa1 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR
 Bra1A 236 SLFSPAFLNLAVDNQWHTLEKGVPHLVVYTAFFVSVSAFVIAIALNVSFLYWP L-GLPR

Mtr3	247	SLFSPA	FNLATNDQWHS	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVIGI	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Tpa3	282	SLFSPA	FNLATNDQWHS	LEKGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	VVIGV	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Mtr2	251	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	LSIT	FLYHP	L-NLPK
Tpa2	241	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Mtr1	243	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Tpa1	248	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Gma1	241	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Pvu1	249	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Ppe1	249	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKTGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Egr1	241	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Csa1	245	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Vvi	273	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Csa2	222	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Lus1	238	SLFSPA	FNLATNDQWHA	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Lus2	238	SLFSPA	FNLATNDQWHA	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Lus3	229	SLFSPA	FNLATNDQWHS	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Lus4	229	SLFSPA	FNLATNDQWHA	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Spu1	250	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Ptr1	250	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Rco1	252	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Mes1	252	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Spu2	266	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Ptr2	243	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Gra1	242	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Tca	245	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Atr1	253	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKTGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Atr2	252	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKPEVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Zmar1	235	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LNHGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Spo1	258	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LNEGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Bdi1	289	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Zma2	255	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Osa1	289	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKQGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Sit1	285	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Pha1	285	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Zma1	287	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Sbi1	291	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKDGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Mac1	263	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKQGVPH	LSVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK
Acom1	249	SLFSPA	FNLATNDQWHT	LKKGVP	PLVVYTAFF	FVSVSC	FVVAII	ILNII	FLYHP	L-NLPK

Smo2 296 SS-LSAYTSD-WK--GRHLAVIAGLVCCFGNGVFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Mpo2 358 SS-LSAYTVD-FK--GRHLAVIAGLVCCFGNVCQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Sfa3 332 SS-LHAYTRD-WE--GRYPAVIAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Sfa4 332 SS-LRAYTRD-WK--GRDLAVIAGLVCCFGNGVFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Ppa2 319 SS-LSMYCQD-RE--GRHTAVIAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Ppa3 343 SS-LTMYCQD-RE--GRHTAVIAGLICCVGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVGTTLWG
 Csu1 298 SS-LPEYFKD-MN--GRLWAVIAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTIING
 Sbi2 310 ST-AGAYARD-WN--GRHWALLAGLICCGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Osa2 303 ST-IGAYAGD-WN--GRHWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Mpo1 310 SS-FPAYTAD-WN--GRPWALLAGLVCCCGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bdi2 312 SS-LKAYTKD-WK--GRQWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Zma3 305 ST-LAAYTLD-GD--GRGLAMLAGMCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Zma4 305 ST-LAAYTLD-GD--GRGLAMLAGMCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Sbi3 323 ST-TVSAYTRDGGE--GRAPAMLAGMVCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Sit3 318 ST-VAAYTRD-GE--GRGLALLAGMVCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Pha2 320 ST-VAAYTRD-GE--GRWLALLAGLVCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Bdi3 316 SS-LRAYTHD-PDTGGRALALLAGMVCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Osa3 321 SS-LTAYTKD-WK--GRDLALLAGMVCCGNGNALTFFMAGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sfa1 321 SS-LKAYTKD-WE--GRQWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sfa2 319 SS-LKMYTND-WR--GRQWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aco4 312 SS-LHAYTND-WS--GRTLALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTLWG
 Ppa1 301 TS-FKAYTSD-WN--GRKWALLAGFLCCGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sma1 314 SS-LTAYTAD-WN--GRPWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTLWG
 Csa4 304 TS-FKGYTND-WD--GRGLALLAGLFCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQAFPLVSTFWG
 Dca3 312 SS-MAKYTND-WN--GRYWAFAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Esa5 310 SS-FRDYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bra5 308 SS-FKGYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Cru5 352 SS-FTEYTND-WN--GRGLAVIAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bst5 312 SS-FREYTSD-WN--GRGLALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Ath5 314 SS-FREYTSD-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aly5 310 SS-FKEYTSD-WN--GRGWALLAGLFCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bra4 306 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Esa4 294 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Bst4 306 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Cru4 312 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Ath4 306 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Aly4 312 SS-LKMYTND-SK--GRSWAVFAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Egr2 331 SS-FKAYTSD-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aco3 329 SS-LKAYTSD-WN--GRKWALLAGLFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Csa3 287 ST-IKAYTKD-WN--GRGWALLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Kfe2 316 SS-FKAYTSD-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sly4 311 SS-LMAYTND-WD--GRGWALLAGLFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sly3 311 SS-FTAYTND-WN--GRGWALLAGLVCCFGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Stu2 311 SS-FKAYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sly2 311 SS-FTAYTND-WN--GRGWALLAGLVCCFGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Csi 310 SS-FKAYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Ccl 310 SS-FKAYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Dca4 310 SS-FKAYTND-WD--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Pvu2 332 SS-LKAYTAD-SD--GRMWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Pvu3 332 SS-LKAYTAD-SD--GRWALLAGLICCVGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Gma2 306 SS-FKAYTAD-SD--GRVWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Gma3 306 SS-FKAYTAD-SD--GRVWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aco2 309 SS-FKAYTAD-WQ--GRQWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Kfe1 298 SS-LAAYTSD-WD--GRGWSFVAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Cru2 308 SS-FKAYTSD-WN--GRYWAFVAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Bst2 307 SS-FKAYTND-WD--GRYWAFVAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Ath2 303 SS-FKAYTND-WN--GRYWAFVAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Aly2 307 SS-FKAYTND-WN--GRYWAFVAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Dca2 311 SS-FKDYTND-WN--GRQWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Dca1 310 SS-FKAYTND-WD--GRGWALLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aco1 311 SS-LKAYTSD-WN--GRKWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADSVQALPLVSTFWG
 Stu1 312 SS-LKAYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Sly1 312 SS-LKAYTND-WN--GRGWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Gra2 307 SS-FKAYTKD-WN--GRGWALLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Mdo1 308 TS-FRAYTND-WN--GRGWALLAGLVCCFGNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Mgu1 343 SS-IKAYTSD-WE--GRWALLAGLICCFGNSEQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Cru3 295 SS-FKAYTND-WN--GRGLSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bst1 295 SS-FKAYTND-WN--GRWWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Cru1 295 SS-FKAYTND-WN--GRDWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Aly1 295 SS-FKDYTND-WN--GRGWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Ath1 295 SS-FKAYTND-WN--GRGWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bra1B 295 SS-FKGYTND-WN--GRGWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Esa1 295 SS-FKAYTND-WN--GRGWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
 Bra1A 295 SS-FKAYTND-WN--GRGWSFLAGFLCCGFCNGNLFQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG

Mtr3	306	SS-LTNYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Tpa3	341	SS-LKAYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Mtr2	310	SS-LKAYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Tpa2	300	SS-FKAYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Mtr1	302	SS-LKAYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Tpa1	307	SS-FKAYIGD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Gma1	300	SS-LKAYISD-WD--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Pvu1	308	SS-LKAYIRD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Ppe1	308	TS-FQAYIRD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Egr1	300	TS-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Csa1	304	TT-LKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Vvi	332	ST-LRAYISD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Csa2	281	TT-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Lus1	297	SS-PKAYFND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Lus2	297	SS-PKAYFND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Lus3	288	SS-FKAYIHD-WD--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Lus4	288	SS-LKAYIHD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Spu1	309	SS-LKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Ptr1	309	SS-LKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Rco1	311	ST-LKAYIND-GN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Mes1	311	ST-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Spu2	325	SS-LKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Ptr2	302	SS-LKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Gra1	301	SS-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Tca	304	SS-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Atr1	312	SS-LTAYAKD-WK--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Atr2	311	SS-LTAYAKD-WK--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Zmar1	294	SS-ITAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Spo1	317	SS-FRAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Bdi1	348	SS-FRAYIND-WE--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Zma2	314	SS-LGAYIGD-WD--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Osa1	348	SS-FKAYIND-WE--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Sit1	344	SS-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Pha1	344	SS-FKAYIND-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Zma1	346	SS-LGAYIRD-WD--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Sbi1	350	SS-FGAYIRD-WN--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Mac1	322	SS-FTAYIKD-WK--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG
Acom1	308	SS-FAAYIKD-WK--	GRGWALLAGFLCCFGNGLQFMGGQAAGYAAADAVQALPLVSTFWG

Smo2	352	VLIIFGEYRFGSSHRTLALLVSMVMFVAVALLMASA---RER-----
Mpo2	414	VLIIFGEYHRSSRRTYMLLGAMLFMFLAVVLLIASS---TERC-----
Sfa3	388	ILIFGEYHKSSRRTYMLLSAMLMFAVAVTLLIASS---SQRG-----
Sfa4	388	ILIFGEYHKSSRRTYMLLSAMLMFGIAVTLIASS---RQRD-----
Ppa2	375	IVIFREYYGSSGRTYSLLIAMLMFATAVVMVLIASS---MPRDSRT-----
Ppa3	399	VLIIFKEYRFGSSRRTYILLIGMLLMFLTAVVMVLIASS---MPRHGSETLT-----
Csul	354	VVIIFGEYFRSSKRTYILLAGMLLMFAVAVGILLMCSA---CTRNE-----
Sbi2	366	VIIIFGEYRRSSRRTYLLSSMLLMFIIAVAVFASA---CHRKGFDTNARFIVTRLNRSS-----
Osa2	359	VIIIFGEYRRSSRRTYLLLGCMLSMFIVAVVLLIASS---AHRKTG-----
Mpo1	366	ILIFGEYHRSSRRTYVLLVSMVMFIAAVALLMSSS---CHRKS-----
Bdi2	368	ILLLKEYWRASKRTYILLVSMLETFAAVAILMCSA---QORSTK-----
Zma3	361	VLIIFGEYRRSSRRTYTLASMLLMFTVAVVLLIASS---CSRSIIH-----
Zma4	361	VLIIFGEYRRSSRRTYTLASMLLMFTVAVVLLIASS---CSRSIIH-----
Sbi3	381	VVIIFGEYRRSSRRTYTLASMLLMFTVAVVLLIASS---NHRKPL-----
Sit3	374	VVIIFGEYRRSSRRTYTLASMLLMFAVAVVLLIASS---NHRKPL-----
Pha2	376	VVIIFGEYRRSSRRTYTLASMLLMFAVAVVLLIASS---NHRKPL-----
Bdi3	374	VVIIFGEYRRSSRRTYVLLGSMLLMFVVAVLLIASS---AHRKPL-----
Osa3	377	IVIFGEYRRSSRRTYTLVSMLEMFVVAVLLIASS---AHRKPL-----
Sfal	377	VVIIFGEYFRSSRRTYILLVAMLEMFCLAVGELASA---GTRNTS-----
Sfa2	375	VLIIFKEYRFGSSRRTYILLAAMLLMFSLAVCLLASSS---CTRKTS-----
Aco4	368	IIILFGEYRFSKRTYILLGSMLLMFSAVFGILLMSSS---QQRK-----
Ppa1	357	IVIFKEYRFGSSRRTYVLLVAMLMFSAVAVGILLMCSA---CHRKAD-----
Smo1	370	VLIIFGEYRFGSSRRTYMLLAAMLIMFCIAVAVLIMASA---CHRKHS-----
Csa4	360	VVIIFGEYRRSSRRTYILLAGMLLMFTVAVVLLIASS---CHRHEIERGIFKNSKFYN-----
Dca3	368	ILIFGEYRRSFKRTYVLLVSMVMFIVAVSVLLIASS---CHRKT-----
Esa5	366	IYIFGEYKRSSRRTYGLLIGMLLMFAVAVGILLMASA---GERDLVYLKS-----
Bra5	364	IYIFGEYKRSSRRTYALLVGMVMFVAVAVLLMASA---GKRETR-----
Cru5	408	IYIFGEYKRSSRRTYALLVGMVMFTVAVGILLMASA---GEREQFT-----
Bst5	368	IYIFGEYKRSSRRTYALLVGMVMFTVAVGILLMASA---GERETRFT-----
Ath5	370	IYIFGEYKRSSRRTYALLVGMVMFTVAVGILLMASA---GERETRFT-----
Aly5	366	IYIFGEYKRSSRRTYALLVGMVMFTVAVGILLMASA---GERETRFT-----
Bra4	362	IIIFGEYRRSSRRTYVLLVSMLEMFVAAVAILMSSGRCHRK-----
Esa4	350	IVIFGEYRRSSRRTYVLLVSMVMFVAAVAILMSSS---CHRK-----
Bst4	362	IVIFGEYRRSSRRTYALLVSMVMFVAAVAILMSSS---CHRK-----
Cru4	368	IVIFGEYRKSRRRTYALLVSMVMFVAAVAILMSSS---CHRK-----
Ath4	362	IVIFGEYRKSRRRTYALLVSMVMFVAAVAILMSSS---CHRK-----
Aly4	368	IVILFGEYRKSRRRTYALLVSMVMFVAAVAILMSSS---CHRK-----
Egr2	387	ILIFGEYRRSSRRTYVLLVSMLEMFVAVVLLIASS---QORSVSATA-----
Aco3	385	ILIFGEYRKSRRRTYLLVSMLEMFIIAVGVLMSSS---CHRKNTRLKTIDIPCYTLKVQ-----
Csa3	343	IVIFGEYHKSSRRTYTLVITLVMFTVAVGVLMSSS---GGRRTN-----
Kfe2	372	ILIFGEYRRSSRRTYVLLAGMLLMFMVAVGVLMASA---CTRKEE-----
Sly4	367	VLIIFGEYRRSSGRTYTLLAGMLLMFIAAVAILMASA---CKRK-----
Sly3	367	VMIIFGEYRRSSRRTYTLLAGMLLMFTAAVAVLIMASA---CHRK-----
Stu2	367	VIIIFGEYRRSSRRTYTLLAGMLLMFTAAVAILMASA---CHRK-----
Sly2	367	VMIIFGEYRRSSRRTYTLLAGMLLMFTAAVAILMASA---CHRK-----
Csi	366	ILIFGEYRKSRRRTYILLVSMLSMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Ccl	366	ILIFGEYRKSRRRTYILLVSMLSMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Dca4	366	IIIFREYHRSSRRTYTLIIIMLMFIVAVGVLMSSS---QQRKRL-----
Pvu2	388	VVIIFGEYRRSSRRTYALLGSMLLMFIVAVGVLMSSS---CHRSSSHTAKE-----
Pvu3	388	VVIIFGEYRRSSRRTYILLGSMLLMFIVAVGVLMSSS---CHRSSSHTAKE-----
Gma2	362	VIIIFGEYRKSRRRTYILLGSMLLMFIVAVAVLIMASA---QORNSTAKE-----
Gma3	362	VVIIFGEYRKSRRRTYILLGSMLLMFIVAVAVLIMASA---QORTSTAKE-----
Aco2	365	VLIIFGEYRKSRRRTYVLLVSMVMFIVAVGVLMSSS---CHRKT-----
Kfe1	354	VVIIFGEYRKSRRRTYVLLGGMLLMFVAVGVLMSSS---CHRK-----
Cru2	364	VVIIFGEYRKSRRRTYLLIFGMLLMFISAVAVLIMASA---CHRK-----
Bst2	363	VVIIFGEYRKSRRRTYLLIFSMMLLMFISAVAVLIMASA---CHRK-----
Ath2	359	VVIIFGEYRKSRRRTYLLIFCMLLMFISAVAVLIMASA---CHRK-----
Aly2	363	VVIIFGEYRKSRRRTYLLIFSMMLLMFISAVAVLIMASA---CHRK-----
Dca2	367	VLIIFGEYRKSRRRTYILLNSMLLMFIVAVGVLMSSS---CHRK-----
Dca1	366	VIIIFGEYRKSRRRTYILLGGMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Aco1	367	IIIFGEYRKSRRRTYVLLVSMVMFVAVAVATLMSSS---CHRK-----
Stu1	368	VIIIFGEYRKSRRRTYTLVGMVMFVAVAVGILLMSSS---CHRK-----
Sly1	368	VIIIFGEYRKSRRRTYTLVGMVMFVAVAVGILLMSSS---CHRK-----
Gra2	363	VVIIFGEYRKSRRRTYLLIFSMMLLMFIAVAVGILLMSSS---CHRK-----
Mdo1	364	ILIMFGEYRKSRRRTYVLLCSMLLMFIIAVAILMSSS---CHRK-----
Mgu1	399	VLIIFGEYRKSRRRTYVLLIGMLLMFIVAVGVLMSSS---CHRK-----
Cru3	351	ILIFGEYRKSRRRTYILLICMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Bst1	351	ILIFGEYRKSRRRTYTFILSMMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Cru1	351	ILIFGEYRKSRRRTYTLISMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Aly1	351	ILIFGEYRKSRRRTYTFILSMMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Ath1	351	ILIFGEYRKSRRRTYTLISMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Bra1B	351	ILIFGEYRKSRRRTYVLLISMLLMFIVAVAVLIMASA---GRRK-----
Esa1	351	ILIFGEYRKSRRRTYVLLISMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----
Bra1A	351	ILIFGEYRKSRRRTYVLLISMLLMFIVAVAVLIMASA---CHRK-----

Mtr3	362	IIIFGEYRKSSGR	TYILLGSMLFMF	IIVAVGVLMASS	---	CHRKH	-----
Tpa3	397	IIIFGEYRRSSP	TYILLGSMLFMF	IIVAVGVLMASS	---	CHRKH	-----
Mtr2	366	VVIFGEYRKSSR	TYILLGSMLFMF	IAAVAVLMASS	---	CHRKLS	-----
Tpa2	356	VVIFGEYRKSSK	TYTLLGSMLFMF	IAAVVVLMASS	---	CHRK	-----
Mtr1	358	VVIFGEYRKSSR	TYTLLGSMLFMF	IAAVAVLMASS	---	CHRK	-----
Tpa1	363	VVIFGEYRKSSK	TYTLLGSMLFMF	IAAVATLMASS	---	CHRK	-----
Gmal	356	IVIFGEYRKSSR	TYVLLGSMLFMF	VAAVAVLMASS	---	CHRK	-----
Pvu1	364	IVIFGEYRKSSK	TYALLGSMLFMF	IIVAVSVLMASS	---	CHRK	-----
Ppe1	364	VVIFGEYRKSSR	TYILLFSMLFMF	ITAVLMASS	---	CHRK	-----
Egr1	356	VVIFGEYRRSSR	TYVLLFGMLFMF	IAAVGVLMASS	---	CHRK	-----
Csa1	360	IVIFGEYRRSSK	TYALLISMLFMF	MVAVGILMASS	---	CHRNQS	-----
Vvi	388	IVIFGEYRKSSR	TYILLGSMLFMF	IAAVGILMGSS	---	CHRKD	-----
Csa2	337	ILIFGEYRKSSK	TYVLLISMLFMF	IIVAVGVLMASS	---	CHRKQ	-----
Lus1	353	ILIFKEYRRSSG	RYVLLVAMLSMF	IAAVGILMGSS	---	CHRK	-----
Lus2	353	ILIFKEYRRSSR	RYVLLVAMLSMF	IAAVGILMGSS	---	CHRK	-----
Lus3	344	ILIFGEYRKSSR	TYLLVGMLEMF	VVAVALLMASS	---	CHRK	-----
Lus4	344	MLIFGEYRKSSR	TYLLVGMLEMF	VVAVALLMASS	---	CHRK	-----
Spu1	365	VVIFGEYRKSSR	TYILLVNMLFMF	IAAVGILMASS	---	CHRK	-----
Ptr1	365	ILIFGEYRKSSR	TYILLVNMLFMF	IAAVGILMASS	---	CHRK	-----
Rco1	367	IVIFKEYRKSSR	TYVLLISMLFMF	IIVAVGVLMASS	---	CHRK	-----
Mes1	367	IVIFKEYRKSSR	TYILLSSMLFMF	IIVAVGILMASS	---	CHRK	-----
Spu2	381	ILIFGEYRKSSR	TYVFLASMLFMF	IIVAVLMASSA	---	CHRK	-----
Ptr2	358	ILIFGEYRKSSR	TYVFLVSMLEMF	VAAVAVLMASSA	---	CHRK	-----
Gra1	357	VVIFGEYRKSSR	TYVLLFGMLFMF	IIVAVGVLMASS	---	CHRK	-----
Tca	360	ILIFGEYRRSSR	TYILLGSMLFMF	IIVAVAVLMASS	---	CHRK	-----
Atr1	368	ILIFGEFRKSSR	TYILLVAMLSMF	FAAVGVLMASS	---	CHRKT	-----
Atr2	367	ILIFGEFRSSKM	TYILLVAMLSMF	FAAVGVLMASS	---	CHRKRESREISYSNKLNYL	---
Zmar1	350	IVIFGEYRKSSK	TYILLSSMLFMF	VVAVAVLMASS	---	CHRNTS	-----
Spo1	373	ICIFGEYRKSSR	TYVLLGGMLFMF	VAAVAVLMASS	---	CHRHTS	-----
Bdi1	404	ILIFGEYRKSSK	TYILLVFMLFMF	IAAVATLMASSA	---	CHRSTK	-----
Zma2	370	VVIFGEYRKSSR	TYLLGFMLFMF	VAAVAVLMASS	---	CHRTE	-----
Osa1	404	ILIFGEYRKSSR	TYLLGFMLFMF	IIVAVAVLMASS	---	CHRSTK	-----
Sit1	400	ILIFGEYRKSSR	TYILLGFMLFMF	VAAVATLMASS	---	CHRSTK	-----
Pha1	400	ILIFGEYRKSSR	TYILLGFMLFMF	VAAVATLMASS	---	CHRSTK	-----
Zma1	402	VVIFGEYRKSSR	TYVLLGFMLFMF	VAAVAVLMASS	---	CHRSTE	-----
Sbi1	406	VVIFGEYRKSSR	TYVLLGFMLFMF	VAAVAVLMASS	---	CHRSTE	-----
Mac1	378	IVIFGEYRRSSR	TYVLLVSMLEMF	VVAVGVLMASS	---	CHRKIHNKLSICICSEIRL	---
Acom1	364	ILIFGEYRKSSR	TYALLVSMLEMF	VAAVAVLMASS	---	CHRKQ	-----

Abbildung 6.1: Sequenzvergleich von 112 UPS-Proteinen aus 46 Pflanzenarten.

Für den Sequenzvergleich wurden die in Tabelle 6.1 aufgeführten UPS-Proteine verwendet. Die rot markierten Gene wurden als Pseudogene identifiziert und nicht in den Sequenzvergleich einbezogen. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software „MUSCLE“ und „Boxshade“ durchgeführt. Schwarz: hohe Konservierung einer Aminosäure. Grau: Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften konserviert. Weiß: Aminosäuren oder Aminosäuregruppen mit ähnlichen Eigenschaften, die in 90% aller analysierten Sequenzen konserviert sind.

```

Ath1 1 .....MYMIESKGGAIACMLLALLFLGTWPAIMTLTERRGRLPQHTYLDYTLTNLLA
Ath2 1 .....MYLVESKGGAIACMLLALLSLGTWPAVLTLLERRGRLPQHTYLDYSITNLLA
Ath3 1 .....MYVIESKGGTITCMLLALLFLGTWPAIMTLTERRGRLPQHTYLDYTLTNLLA
Ath4 1 .....MYVVESKAGAIGCMIISLCLGSPWPAITLLERRGRLPQHTFLDFATANLLA
Ath5 1 MMIAQELGTYVVESKGGAILCIIISLLCLGTWPAIMALLERRGRLPQHTYLDYSITNFLA

Ath1 53 AVIIAALTIGEIG...PSRPNFFTQLS..QDNWQSVMFAMAGGIVLSLGNLATQYAWAVVG
Ath2 53 AIIIAFTFGQIGSTKPDSPNFITQLA..QDNWPSVMFAMAGGIVLSLGNLSIQYAWAVVG
Ath3 53 AVIIAFTLGEIS...PSRPNFFTQLS..QDNWPSVMFAMAGGIFLSLGLTLATQYAWAVVG
Ath4 53 AVIIAFTSLGEIGKSTFLKPDFTTQLP..QDNWPSVLLAVAGGVLSISGNLATQYAFVAVG
Ath5 61 AIFIAFVFGGIGESTHEAPSFITQLTQIQDNWPSVLFAMAGGVLSISGNLATQYSLAVVG

Ath1 108 LSVTEVITASITVVIGTTLNYFLDDRINRAEVLFPGVACFLIAVCEFGSAVHKSNAAADNKT
Ath2 111 LSVTEVITSSITVVIGSTLNYFLDDKINKAEILFPGVACFLIAVCLGSAVHRSNADDNKA
Ath3 108 LSVTEVITASIAVVIGTTLNYFLDDRINRAEVLFPGVACFLIAVCEFGSAVHKSNAAADNKS
Ath4 111 LSVTEVITASITVVIGTTLNYFLDNKINKAEILFPGVGCFLIAVFLGAAVHASNAADVKE
Ath5 121 LSVTEVTAASITVVVGTTVNYFLDNGLNRADILFSGVGCFMVAVCLGSAVHSSNSADIKK

Ath1 168 KLQNFKSLETTSS.....FEMETISASNGLT..K GKAKEGTAAFLIELEKQRAIKVFG
Ath2 171 KLRDFETAKQEASGPS....TEIGTNSSKDLNVTTKPKEGTARFLIELENTRAIKVFG
Ath3 168 KLQGFKSLETTSS.....EQMETSSIK.....EGKAKVGTADFLIEVEKQRAIKHNN
Ath4 171 KLKSLPSEDLYSSIENGEDKPEIEKTDVES.QEKLAEKAKAGTAGFYVELENKRAIKVFG
Ath5 181 KLKGLSGDCEITVTPPEECQRLFGVEEEEEEE...EKEMENVKEGSAAFLLIENKRAIKVLG

Ath1 219 KS.TIIGLIVITFFAGICFSLFSPAFNLATND..QWHTLKHGVPKLNIVYTAFFYFSSISAFV
Ath2 227 KR.KIIGLAITFFAGLCFSLFSPAFNLATND..QWNRLKQGVPKLVVYTAFFYFSSSCEFI
Ath3 215 WTGDNILCRYLFLSNLTC SKLSDKRSM AHFETWSWHTLKHGVPKLNIVYTAFFYFSSSSEFG
Ath4 230 KS.IMIGLIFITL FAGISL FSLFSPAFNLATND..QWSTLPKGVPKLVVYTAFFYFSSIAGEL
Ath5 238 KS.MVVG LGITFFAGLSFSLFSPAFNLATND..QWHTLKHGVPKLVVYTAFFYFSSSCEFI

Ath1 276 VALILNIRFLYWPILGLPRSSFKAYLNDWNGRGWSFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAA
Ath2 284 IALILNVVFLYYPVGLGLPKSSFKAYLNDWNGRYWAFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAA
Ath3 275 VGLILNIIFLYWPILGLPRSSFKAYLNDWNGRGWSFLAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAA
Ath4 287 ISLILNLIIFLYRPMVGLARSSLKKYIYDSKGRGWAVFAGFLCGFGNGLQFMGGQAAGYAA
Ath5 295 IAAVALNISFLYKPVLDSPRSSFREYLSDWNGRGWALAAAGLLCGFGNGLQFMGGQAAGYAA

Ath1 336 ADAVQALPLVSTFWGIYLFGEYRRSSRRTYTLLSMLLMFVAVAVLMASSGHRK....
Ath2 344 ADSVQALPLVSTFWGVVLFGEYRRSSRRTYTLLEFCMLFMFISAVAVLMASSGHRK....
Ath3 335 AGAVQV.....
Ath4 347 ADSVQALPLVSTFWGIYLFGEYRSSKRTYALLVSMLAMFVAVAVLMASSGHRK....
Ath5 355 SDAVQALPLVSTFWGIYLFGEYRRSSRTYALLVGMVMEVAVAVGLMASAGERETRFT

```

Abbildung 6.2: Aminosäurevergleich von AtUPS1 (At2g03590), AtUPS2 (At2g03530), AtUPS3 (At2g03600), AtUPS4 (At2g03520) und AtUPS5 (At1g26440). In AtUPS3 ist der Verlust großer konservierter Bereiche zu sehen. Schwarz: hohe Konservierung einer bestimmten Aminosäure. Grau: Konservierung einer Aminosäure.

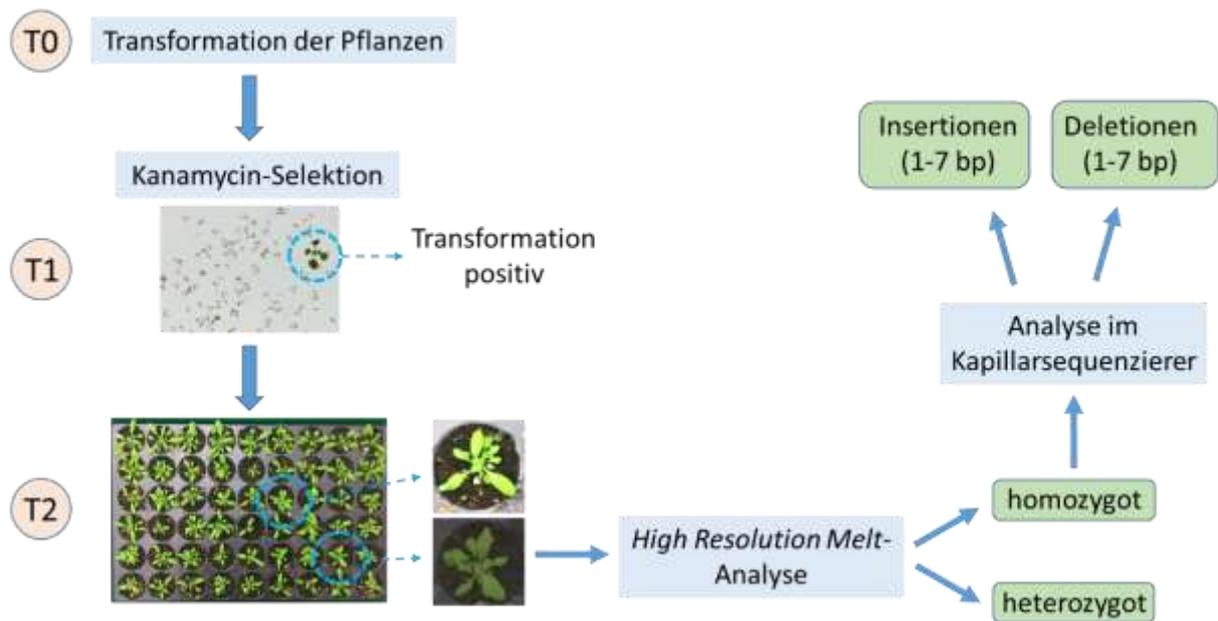


Abbildung 6.3: Schematische Übersicht der Herstellung der Mehrfachmutanten mittels CRISPR/Cas9-Methode. Nach der Transformation (T0) wurden die Samen auf Kanamycin-Selektionsmedium ausgelegt. Nur transgene Pflanzen können auf diesem Medium wachsen (T1) und wurden weiter vermehrt. In der T2-Generation liegt das mutmaßliche Mutationsereignis in der Keimbahn vor. Der Vektor, der ein GFP enthält, sollte dann nicht mehr in der Pflanze vorhanden sein. Deshalb wurden Pflanzen, die keine GFP-Fluoreszenz zeigten, für die weitere Analyse ausgewählt. Mittels *High Resolution Melt*-Analyse wurden hetero- und homozygote Pflanzen unterschieden. Die homozygoten Pflanzen wurden im Kapillarsequenzierer auf Insertionen und Deletionen getestet.

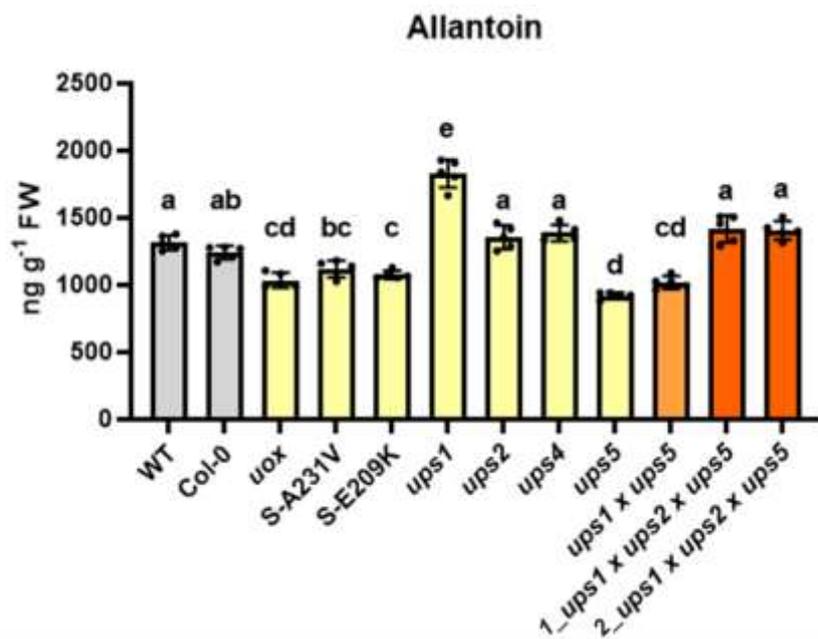
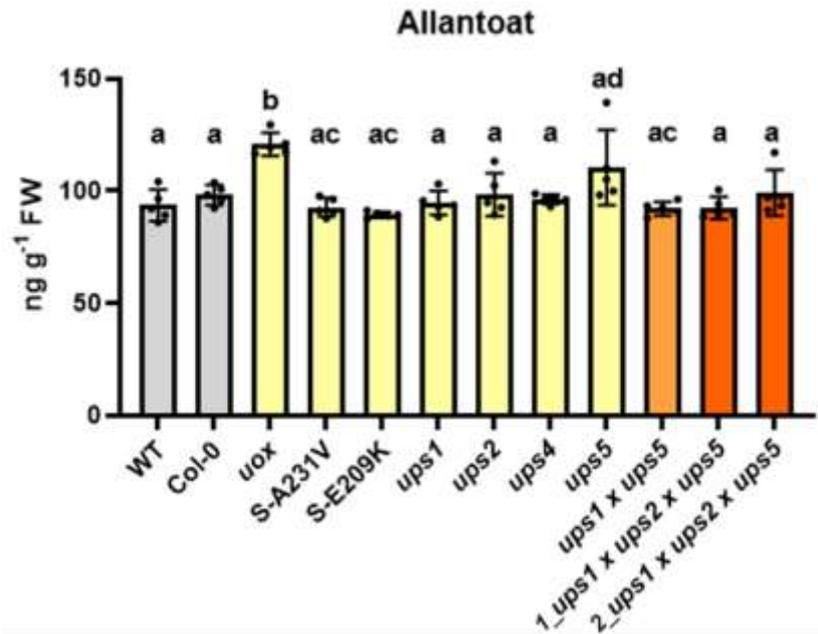


Abbildung 6.4: Allantoat- und Allantoingehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), UPS-Doppelmutante (hellorange) und UPS-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

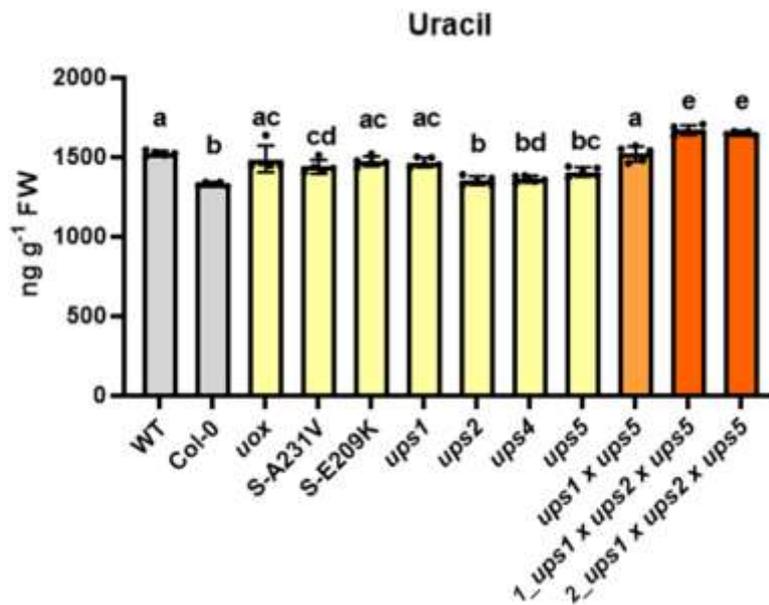
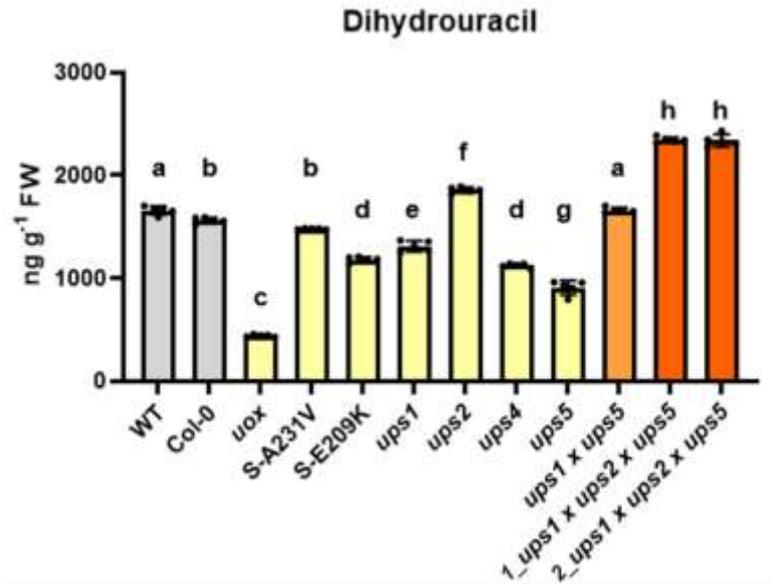


Abbildung 6.5: Dihydrouracil- und Uracilgehalte in alten Blättern von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), UPS-Doppelmutante (hellorange) und UPS-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

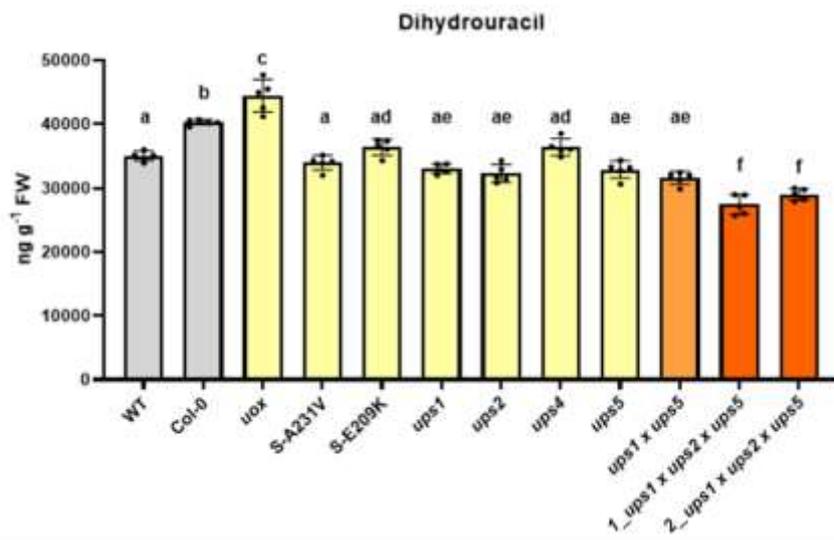
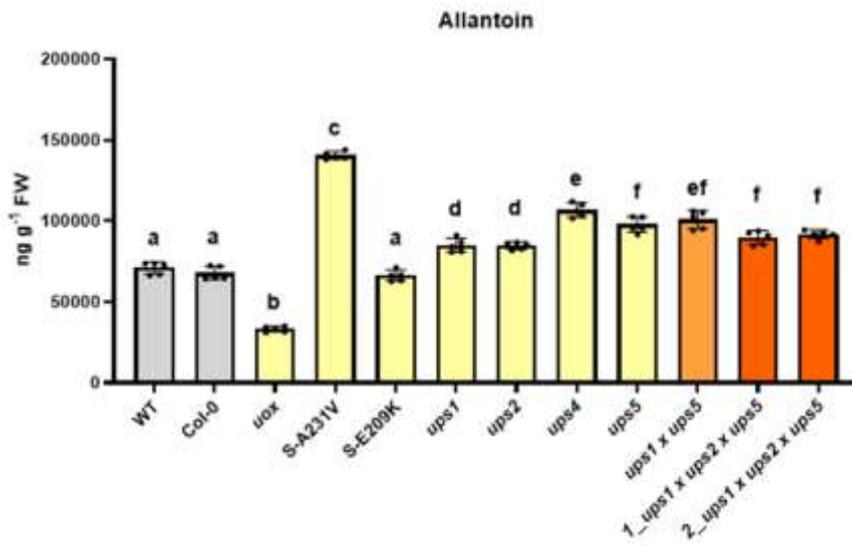
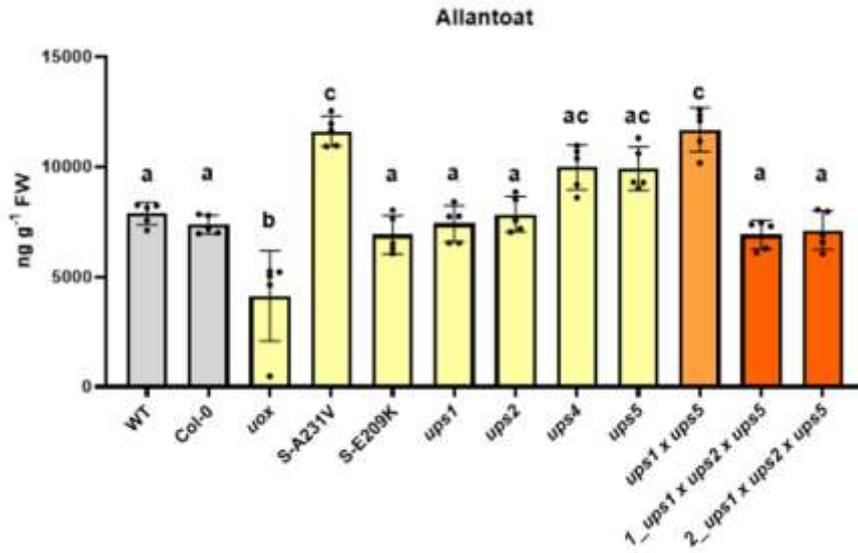


Abbildung 6.6: Allantoat-, Allantoin- und Dihydrouracilgehalte in Samen von Wildtyp, Col-0, *uox*, Suppressoren, *ups*-Einzel- und Mehrfachmutanten ohne *uox*-Mutanten. Analysiert wurden folgende Genotypen: Wildtyp und Col-0 (grau), Einzelmutanten und Suppressoren (gelb), UPS-Doppelmutante (hellorange) und UPS-Dreifachmutante (orange). Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen und parallel angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf biologischer Replikate und deren Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte sind als Punkte sichtbar. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an, die von OneWay ANOVA mit Tukeys Post-Test-Analyse ermittelt wurden. FW, Frischgewicht.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Claus-Peter Witte für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Danke, dass Deine Tür bei Fragen oder Problemen immer offen stand und Dein Optimismus mich stets motiviert hat! Danke auch für die geteilte Freude bei kleinen und größeren Erfolgen!

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Pfannschmidt für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit und Herrn Prof. Dr. Braun für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes in der Promotionskommission danken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Nieves Medina Escobar und Dr. Marco Herde. Nieves, Du hast mich immer optimistisch gestimmt auch wenn die Aussichten nicht so gut waren. Tausend Dank für die gemeinsamen Stunden im Labor – besonders beim Schoten öffnen! Marco, ohne Dich wäre das CRISPR-Projekt wahrscheinlich nicht so erfolgreich verlaufen. Danke für die vielen Ideen und Lösungen bei kleinen und größeren Problemen!

André, Iris und Hilde: Egal, ob technische Fragen, Verwaltungsprobleme oder Laborfragen – auf Euch war immer Verlass und es gab kein Problem, das Ihr nicht lösen konntet. Ein dreifaches dickes Dankeschön!

Danke auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die vielen unvergesslichen Jahre im Labor! Besonders danken möchte ich Kathi und Markus für einen unvergesslichen Laboralltag – und natürlich für die schönen Unternehmungen außerhalb der Universität!

Meinen Freunden aus Lehrte und „näherer Umgebung“ danke ich für die vielen wunderbaren Jahre, die wir nun schon gemeinsam durchs Leben gehen! Auf Eure Unterstützung und Eure Freundschaft ist immer Verlass! Danke dafür und auf alles, was noch kommt!

Und das Beste kommt ja bekanntlich zum Schluss: Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für einfach für alles! Ihr seid meine größte Motivation, unterstützt mich zu jeder Zeit mit allen Kräften und glaubt immer an mich!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Linda Ewert
Geburtsort	Hannover
Geburtsdatum	16.10.1990

Ausbildung

06/2010	erworbene Hochschulreife
10/2010-10/2013	Bachelorstudium Pflanzenbiotechnologie Leibniz Universität Hannover Abschluss: B.Sc. (Bachelor of Science)
10/2013-11/2015	Masterstudium Pflanzenbiotechnologie Leibniz Universität Hannover Abschluss: M.Sc. (Master of Science)
01/2016-03/2020	Promotion am Institut für Pflanzenernährung Leibniz Universität Hannover

Publikationen

Petereit, J., Katayama, K., Lorenz, C., Ewert, L., Schertl, P., Kitsche, A., Wada, H., Frentzen, M., Braun, H.P., Eubel, H. (2017): Cardiolipin Supports Respiratory Enzymes of Plants in Different Ways, *Frontiers in Plant Science*, 8, p72.