

**Charakterisierung der patatin-ähnlichen Phospholipase A-I (pPLA-I)
aus *Arabidopsis thaliana***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
M. Sc. Katrin Radatz
geboren am 13.07.1980 in Göttingen

2012

Referent: Prof. Dr. G. F. E. Scherer

Korreferent: Prof. Dr. H.-P. Braun

Tag der Promotion: 19. Juni 2012

Zusammenfassung

Die Proteinfamilie der patatin-ähnlichen Phospholipasen (pPLA's) aus *Arabidopsis thaliana* besteht aus 10 Mitgliedern, von denen die patatin-ähnliche Phospholipase A-I (pPLA-I) in dieser Arbeit untersucht wurde. Sie verfügt im Vergleich zu den anderen pPLA's über zusätzliche N- und C-terminale Domänen mit enzymatischer Funktion und einer möglichen G-Protein-Bindestelle. Untersuchungen an den isolierten *ppla-I*-Knockoutmutanten *ppla-I-1* und *ppla-I-3* lassen eine Beteiligung der pPLA-I am Auxinsignalweg, Phototropismus und Gravitropismus in *Arabidopsis* vermuten.

Die Sequenzanalyse der pPLA-I ergab das Vorhandensein von zwei Sequenz-Varianten. Die eine Sequenz stimmt vollständig mit der seit 2011 allgemein angenommenen cDNA-Sequenz überein. Gleichzeitig konnte eine verkürzte Sequenz, verursacht durch einen Sequenzabbruch an Position 435 der Aminosäuresequenz, gefunden werden. Mittels qPCR konnte festgestellt werden, dass diese im Vergleich zur Gesamtsequenz wesentlich höher exprimiert wird. Dennoch gibt es keine Anzeichen für eine Funktion der theoretisch resultierenden verkürzten Proteinsequenz. Aufgrund der hier vorliegenden Studien ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Fehlspleißing der mRNA handelt, die in der Folge degradiert wird, so dass es nicht zur Translation kommt. Weiter konnte durch die Sequenzanalyse das Vorhandensein der von Yang *et al.* (2007) postulierten Sequenzvariante widerlegt werden. Auch zeigten die Wildtypen Wassiljewskia und Columbia keine Unterschiede in der RNA-Expressionsrate der *pPLA-I* oder in Bezug auf das gefundene Fehlspleißing. So können in den Knockoutmutanten *ppla-I-1* (Wassiljewskia-Hintergrund) und *ppla-I-3* (Columbia Hintergrund) gefundene phänotypische Unterschiede nicht durch den jeweiligen *Arabidopsis*-Ökotyp begründet werden.

Mittels eines hergestellten pPLA-I-GFP Reporterproteins konnte die pPLA-I *in vivo* lokalisiert werden. Es konnte eine Expression des Reporterproteins in der Wurzelspitze, der Elongationszone, beginnenden Seitenwurzeln und im Pollen festgestellt werden. Zellulär ist das Protein cytosolisch, im Zellkern, im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum und Plasmamembran-nah lokalisiert. Die Proteinexpression wird durch Licht hochreguliert und in Dunkelheit reprimiert. Diese Licht-abhängige Expression konnte mittels qPCR-Analyse auf RNA-Ebene bestätigt werden.

Weiter wurden zwei pPLA-I-spezifische Antikörper hergestellt. Diese ermöglichten die Lokalisierung der pPLA-I *in situ* mittels Immunolabeling. Das gefundene Expressionsmuster stimmt größtenteils mit dem des GFP-Reporterproteins, sowie dem pPLA-I-GUS-Konstrukt (Effendi *et al.*, in Vorbereitung) überein, so dass bezüglich des Expressionsmusters weitere Sicherheit gewonnen werden konnte. Die Lichtabhängigkeit der Expression konnte ebenfalls bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Auxinkonzentrationen in den Zellen der Wurzelspitze Einfluss auf das Expressionsmuster und die Expressionsstärke haben. Die Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum nimmt bei den *in situ* - Lokalisierungsstudien einen besonderen Stellenwert ein. Sie ist in Blaulicht und bei Behandlung mit NPA erhöht, in *ABP1*-Mutanten hingegen reduziert. Die Ergebnisse unterstützen den von Effendi *et al.* (in Vorbereitung) postulierten gemeinsamen Signalweg von ABP1 und pPLA-I.

Im Rahmen des WAICO-Weltraumprojektes wurde eine morphologische Analyse des Wachstums von *Arabidopsis* Wildtyp-Keimlingen und *ppla-I-1*-Keimlingen durchgeführt. Die Auswertung ergab Hinweise darauf, dass die pPLA-I die PHY B - Signalantwort moduliert. Auch verhalfen die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis des Coiling-Phänomens. Mittels Immunolabeling der unter μg -Bedingungen angezogenen Keimlinge konnte gezeigt werden, dass die funktionsbezogene Anordnung der Mikotubuli schwerkraft-abhängig ist und bei Wachstum unter μg -Bedingungen gestört ist. Auch konnte eine eindeutige Verlagerung der PIN-Proteine PIN1, PIN2 und PIN4 in *ppla-I-1* in Schwerelosigkeit festgestellt werden. Dies zeigt, dass pPLA-I die schwerkraft-abhängige Lokalisierung der PIN-Proteine steuert. Die Verlagerung der pPLA-I in Schwerelosigkeit lässt eine Beteiligung an der gravitropen Reaktion der Wurzel vermuten.

Abschließend führen die genannten Ergebnisse zu der Hypothese, dass pPLA-I eine Komponente des Signalweges von ABP1 und PIN ist und den PHYB-Signalweg indirekt moduliert.

Stichwörter: Phospholipase A-I, Auxin, Phytochrom, PIN-Proteine

Abstract

The family of the patatin-related phospholipases A (*pPLAs*) from *Arabidopsis thaliana* consists of 10 genes and in the present study sequence and function of patatin-related phospholipase A-I (*pPLA-I*) gene was investigated. In comparison to the other *pPLAs*, *pPLA-I* has additional N- and C-terminal domains, an enzymatic domain and a possible G-protein binding site. Analysis of two *ppla-I* knockout mutant alleles, *ppla-I-1* and *ppla-I-3*, revealed the involvement of *pPLA-I* in auxin pathway, phototropism and gravitropism.

The sequence analysis of *pPLA-I* revealed the existence of two different sequence variants. One sequence shows total similarity to the sequence commonly accepted since 2011 and one shorter sequence variant due to the presence of stop codon at 435 of the deduced amino acid sequence. qPCR analysis gave evidence that this variant is drastically upregulated in comparison to the full length sequence. Despite this, there is no evidence for the existence of a truncated *pPLA-I* protein. It can be assumed that this sequence variant is due to missplicing and as a result it is degraded without translation. Further it could be shown that the sequence proposed by Yang *et al.* (2007) does not exist. The two wild type parent lines Wassilijewskia and Columbia have identical mRNA's and missplicing. Therefore, differences in the phenotype of the knockout mutants *ppla-I-1* (Wassilijewskia background) and *ppla-I-3* (Columbia background) are not due to differences in both *Arabidopsis* ecotypes.

Expression of the *pPLA-I*-GFP fusion protein was observed in root tip, in elongation zone of the root, in emerging side roots and in the pollen. In the cellular level, it is localized to the cytosol, nucleus, in endoplasmic reticulum around the nucleus and close to the plasma membrane. *pPLA-I*-GFP expression is upregulated by light and downregulated by dark. The light dependent expression could be confirmed at RNA-level by qPCR.

Two *pPLA-I*-specific antibodies were produced. Localization of *pPLA-I* by immunolabeling indicated similar patterns as observed by *pPLA-I*-GFP and *pPLA-I*-GUS (Effendi *et al.*, in prep.). Light induced expression of *pPLA-I* could also be verified by immunolabeling. Further, it could be shown that differences in auxin concentration of the root tip influence the expression pattern and level. Localization in the endoplasmic reticulum around the nucleus is increased by blue light and application of NPA, whereas it is reduced in *ABP1* mutants. These results support a common signal pathway of *pPLA-I* and *ABP1* suggested by Effendi *et al.* (in prep.).

With the WAICO space project, a morphological analysis of *Arabidopsis* wild type and *ppla-I-1* seedlings showed a possible link of *pPLA-I* to PHY B response. Additionally the results lead to a better understanding of the coiling. It could be shown by immunolabeling of seedlings grown under μ g-conditions that the functional arrangement of the microtubuli is gravity dependent and is disturbed in seedlings grown under μ g conditions. Also a clear difference of the PIN proteins PIN1, PIN2 and PIN4 in their subcellular localization could be shown in *ppla-I-1* under μ g conditions. This shows, that *pPLA-I* regulates the gravity dependent localization of PIN proteins. Differences in localization of *pPLA-I* under μ g conditions support its involvement in the gravitropic response of the root.

Taken together, all these results suggest a function of *pPLA-I* in the *ABP1*, the *PHYB* and the *PIN* signal pathway.

key words: Phospholipase A-I, auxin, phytochrome, *PIN* proteins

Inhaltsverzeichnis

• 1. Einleitung.....	1
1.1 Patatin-ähnliche Phospholipase A-I aus <i>A. thaliana</i> (pPLA-I).....	1
1.2 Beteiligung der pPLA-I am Auxin-Signalweg.....	3
1.3 PIN-Proteine.....	7
1.4 Auxin binding protein 1 (ABP1).....	8
1.5 Phytochrome und Chrysochrome.....	10
1.6 Ziel der Arbeit.....	12
• 2. Material und Methoden.....	13
2.1 Sequenzanalyse der pPLA-I.....	13
2.1.1 Extraktion von RNA aus Arabidopsis und cDNA-Synthese.....	13
2.1.2 Screening der Phagenbank CD4-16 auf das Vorhandensein einer pPLA-I-Sequenz.....	14
2.1.3 Gewinnung von Plasmid-DNA.....	18
2.1.4 Amplifikation von Sequenzteilen der pPLA-I und Sequenzierung.....	19
2.2 Quantitative Realtime-PCR.....	20
2.2.1 Herstellung von pPLA-I Exon7/pENTRY221 als Template für den Primereffizienztest.....	21
2.2.2 Ermittlung der Primereffizienz.....	22
2.2.3 qPCR-Analyse der Expressionsraten der Splicingvarianten.....	24
2.2.4 qPCR-Analyse des Einflusses von Licht auf die pPLA-I-Expression.....	25
2.3 Lokalisierungsstudien der pPLA-I mittels Immunolabeling.....	26
2.3.1 Herstellung von pPLA-I-spezifischen Antikörpern.....	28
2.3.1.1 Herstellung eines pPLA-I-Exon18-His-Tag-Peptids.....	29
2.3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.3.1.3 Konzentration des aufgereinigten Proteins und Proteinbestimmung.....	35
2.3.1.4 Überwachung des Immunisierungsprozesses mittels Immunoblot.....	36
2.3.2 Immunocytologische Untersuchung von Arabidopsis.....	37
2.3.2.1 Isolierung des C-terminalen Antikörpers aus dem Antiserum.....	37
2.3.2.2 Immunolabeling.....	38
2.3.2.3 Konfokale Lasermikroskopie.....	40
2.4 Lokalisierungsstudien der pPLA-I mittels Reporterproteinen.....	41
2.4.1 Herstellung von pPLA-I-GFP.....	41
2.4.1.1 Klonierung von B1- pPLA-I-Genom -B2 in pDONR221.....	41
2.4.1.2 Klonierung von L1- pPLA-I-Genom -L2 in pGWB4.....	43
2.4.2 Herstellung von GFP-pPLA-I (-Exon7).....	44
2.4.2.1 Klonierung von B1- pPLA-I (-Exon7) -B2 in pDONR221.....	45
2.4.2.2 Klonierung von L1- pPLA-I (-Exon7) -L2 in pK7FWGF2.....	46
2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Transformation.....	46
2.4.4 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> , Vakuum-Infiltration der Transformanden.....	47
2.4.5 Überprüfung der hergestellten GFP-Pflanzen auf Komplementation.....	50
2.4.6 Konfokale Lasermikroskopie.....	50
2.5 Coiling-Verhalten von ppla-I-1 und ppla-I-3.....	51
2.6 WAICO-Weltraumprojekt.....	52
2.6.1 Allgemeines.....	52
2.6.2 Präparation der Samen auf Wachstumsstreifen.....	53
2.6.3 Ansetzen des Wachstumsmediums und Befüllen der Boxen.....	53
2.6.4 Wachstum der Keimlinge in Schwerelosigkeit.....	55
2.6.4.1 Durchführung von WAICO 1.....	55
2.6.4.2 Durchführung von WAICO 2.....	56

• 3. Ergebnisse	60
3.1 cDNA-Sequenzanalyse der pPLA-I.....	60
3.1.1 Gewinnung der cDNA der pPLA-I durch Phagenverdünnung	62
3.1.2 Amplifikation von Teilsequenzen der pPLA-I.....	63
3.1.3 Alignment der Sequenzvarianten der pPLA-I.....	64
3.2 Ermittlung der relativen RNA-Expressionsrate der pPLA-I.....	66
3.2.1 RNA-Expressionsraten verschiedener pPLA-I-Sequenzvarianten	67
3.2.1.1 Überprüfung der Primerpaare auf spezifische und unspezifische Amplifikation.....	67
3.2.1.2 Quantitative Realtime-PCR (qPCR).....	68
3.2.2 Abhängigkeit der pPLA-I-Expression vom Licht-Dunkel-Rhythmus	71
3.3 Lokalisierung von pPLA-I in <i>A. thaliana</i> mittels Immunolabeling	72
3.3.1 Herstellung von pPLA-I spezifischen Antikörpern	72
3.3.1.1 Herstellung von B1-pPLA-I Exon18-B2/ pGEX-2TM-GW.....	72
3.3.1.2 Überexpression von pPLA-I-Exon18-His-tag in <i>E. coli</i> und Aufreinigung	74
3.3.1.3 Überprüfung des Immunisierungsfortschritts.....	75
3.3.2 Konfokale Lasermikroskopie	75
3.3.2.1 Negativkontrollen.....	76
3.3.2.2 Wachstum der Keimlinge in 15µE Weißlicht.....	78
3.3.2.3 Wachstum der Keimlinge in Dunkelheit.....	82
3.3.2.4 Wachstum der Keimlinge in verschiedenen Lichtfarben	83
3.3.2.4.1 Wachstum der Keimlinge in 15µE Blaulicht.....	83
3.3.2.4.2 Wachstum der Keimlinge in 15µE Rotlicht.....	84
3.3.2.4.3 Wachstum der Keimlinge in 15µE Dunkelrotlicht.....	85
3.3.2.4.4 Zusammenfassende Darstellung.....	86
3.3.2.5 Einfluss von 1-NAA auf die Lokalisierung der pPLA-I.....	87
3.3.2.6 Einfluss von NPA auf die Lokalisierung der pPLA-I.....	87
3.3.2.7 Lokalisierung der pPLA-I in ABP1-Mutanten.....	90
3.3.2.8 WAICO 2: PIN-Lokalisierung nach Wachstum in µg.....	92
3.3.2.8.1 Lokalisierung des PIN1-spezifischen Antikörpers.....	92
3.3.2.8.2 Lokalisierung des PIN2-spezifischen Antikörpers.....	93
3.3.2.8.3 Lokalisierung des PIN4-spezifischen Antikörpers.....	94
3.3.2.8.4 Lokalisierung des pPLA-I-spezifischen Antikörpers	95
3.3.2.8.5 Lokalisierung des α -Tubulin-spezifischen Antikörpers.....	96
3.4 Lokalisierung von pPLA-I-GFP-Reporterproteinen.....	97
3.4.1 Herstellung eines pPLA-I-GFP-Konstruktes.....	98
3.4.2 Herstellung eines GFP-pPLA-I (-Exon7)-Konstruktes.....	99
3.4.3 Transformation von <i>A. tumefaciens</i> und Saatgutanzucht.....	100
3.4.4 Überprüfung der hergestellten Transformanden auf Komplementation	101
3.4.5 Konfokale Lasermikroskopie	102
3.4.5.1 Expression von PpPLA-I::pPLA-I-GFP nach Wachstum in 15µE Weißlicht.....	102
3.4.5.2 Expression von PpPLA-I::pPLA-I-GFP nach Wachstum in Dunkelheit.....	106
3.4.5.3 Expression von PpPLA-I::pPLA-I-GFP beim Dunkel-Licht-Wechsel.....	107
3.4.5.4 Ermittlung der Expression von P35S::GFP-pPLA-I (-Exon7).....	108
3.5 Auswertung von WAICO 1.....	109
3.5.1 Manuell erstellte Bilder nach 12Tagen Wachstum.....	109
3.5.2 Morphologische Auswertung der Keimlingsphysiologie	111
3.5.3 Auswertung des Wurzelwachstums der Keimlinge der A-Boxen.....	111
3.6 Coilingverhalten als Oberflächen-abhängiges Phänomen und Penetration des Agars.....	114
• 4. Diskussion.....	118
4.1 Phänotypische Unterschiede zwischen ppla-I-1 und ppla-I-3.....	118

4.2 Sequenzanalyse des pPLA-I-Gens.....	120
4.3 Mögliche Funktionen der gefundenen Splicingvarianten.....	120
4.4 Expressionsstudien der pPLA-I.....	121
4.4.1 Spezifität der Antikörper gegen pPLA-I und des detektierten Signals.....	122
4.4.2 In situ - Expressionsstudien der pPLA-I.....	123
4.4.3 In vivo - Expressionsstudien von PpPLA-I::pPLA-I-GFP	124
4.4.4 Vergleich des gefundenen Expressionsmuster.....	124
4.5 Zellbiologische Untersuchungen zur Lokalisierung und Expression von pPLA-I.....	126
4.5.1 In situ - Lokalisierung der pPLA-I auf Zellebene.....	126
4.5.2 In vivo - Lokalisierung von PpPLA-I::pPLA-I-GFP auf Zellebene	127
4.5.3 Vergleich der gefundenen Lokalisierungen der pPLA-I.....	127
4.5.4 Interpretation der gefundenen Lokalisierungen der pPLA-I	128
4.6 pPLA-I-Expression und ihre Reaktionen auf Auxin und Licht.....	129
4.6.1 Auswirkung der Auxinkonzentration auf die pPLA-I-Expression auf Proteinebene.....	129
4.6.2 Auswirkung von Licht auf die pPLA-I Expression und Lokalisierung.....	131
4.6.2.1 pPLA-I-Expression wird durch Blaulicht hochreguliert.....	131
4.6.2.2 Nukleus-lokalisierte pPLA-I	132
4.6.2.3 RNA-Expression der pPLA-I wird durch Licht hochreguliert.....	134
4.7 Wurzelbewegungen von ppla-I-1 und ppla-I-3.....	135
4.8 WAICO.....	136
4.8.1 Stellenwert der erhaltenen Daten aus WAICO.....	136
4.8.2 WAICO 1.....	137
4.8.2.1 Einfluss von Schwerelosigkeit auf den PHYB-Signalweg	137
4.8.2.2 Vermehrtes Coiling in Mikrogravitation erfolgt unabhängig von der Torsion.....	138
4.8.3 WAICO 2.....	139
4.8.3.1 pPLA-I steuert Schwerkraft-abhängige PIN-Lokalisierung.....	139
4.8.3.2 Anordnung der Mikrotubuli ist in Mikrogravitation gestört	140
• 5. Literatur.....	141
• 6. Anhang	151
6.1 Verwendete DNA- und Protein-Standards.....	151
6.2 Verwendete Vektoren.....	152
6.3 Verwendete Primer.....	155
6.4 Sequenzierungen.....	158
6.4.1 Vollständige cDNA-Sequenz der pPLA-I	158
6.4.2 Sequenz der cDNA von pPLA-I (-Exon7).....	159
6.4.3 Verwendete cDNA-Sequenz von Exon18 zur Antikörperherstellung.....	160
6.4.4 Genomische Sequenz der pPLA-I	161
6.4.5 Verwendete Primer zur vollständigen Sequenzierung der pPLA-I	162
6.5 Epitopanalyse zur pPLA-I-spezifischen Antikörper-Herstellung.....	164
6.5.1 N-Glykosylierungsstellen	164
6.5.2 Avidität.....	165
6.5.3 Oberflächenprofil.....	166
6.6 Immunolabelings.....	165
6.6.1 Expression bei Wachstum in 15µE Blaulicht.....	168
6.6.2 Expression bei Wachstum in 15µE Rotlicht.....	168
6.6.3 Expression bei Wachstum in 15µE Dunkelrotlicht.....	169
6.6.4 Expression bei Wachstum in Dunkelheit.....	170
6.6.5 Expression nach Inkubation in 1µM 1-NAA.....	171
6.6.6 Expression nach Inkubation in 10µM NPA.....	172

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
cm	Centimeter
ca.	<i>circa</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>GFP</i>	Green fluorescent protein
h	hour
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Lauri Bertani
M	Molar
μ M	Mikromolar
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Murashige & Skoog
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rfp	red fluorescent protein
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S. E.	Standard Error
sec	Sekunde
<i>Tab.</i>	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	DNA polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

1. Einleitung

1.1 Patatin-ähnliche Phospholipase A-I aus *A. thaliana* (pPLA-I)

Patatin-ähnliche Phospholipasen A (pPLA) sind Acylhydrolasen, die Phospholipide und Galactolipide in Fettsäuren und andere lipophile Substanzen hydrolysieren können und in ihrer Struktur Ähnlichkeiten zum Kartoffel-Speicherprotein Patatin aufweisen. Die pPLA-Genfamilie aus *A. thaliana* besteht aus 10 Genen, für die zunächst unterschiedliche Nomenklaturen existierten. Inzwischen wurden die Bezeichnungen für die einzelnen Mitglieder der Genfamilie vereinheitlicht (Scherer *et al.*, 2010, s. Abb. 1).

Die pPLA's sind nach ihrer Ähnlichkeit in der DNA-Sequenz in drei Gruppen unterteilt (Holk *et al.*, 2002, Ryu *et al.*, 2004). Die pPLA-I bildet aufgrund ihrer DNA-Sequenz eine eigene Gruppe. Sie verfügt im Vergleich zu allen anderen pPLA's über zusätzliche N- und C-terminale Domänen und weist größte Übereinstimmung zu tierischen iPLA₂-Enzymen auf. Daher wird angenommen, dass es sich bei der pPLA-I um die evolutionär älteste pPLA handelt (Holk *et al.*, 2002).

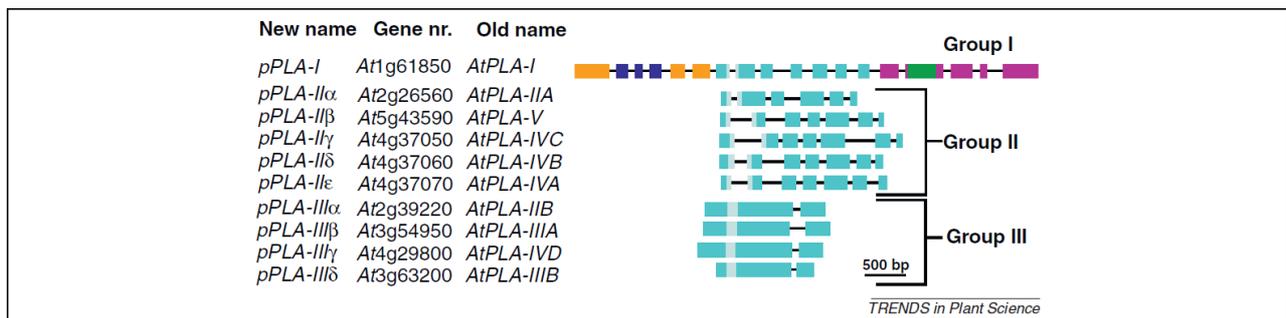


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genfamilie der pPLA's in *A. thaliana* mit alten und neuen Bezeichnungen der einzelnen Gene, unterteilt in drei Gruppen und deren Exon-/Intron-Struktur. Abgebildet sind Exons (türkis), Introns (schwarze Linien), katalytische Domäne (hellblau), N-terminale Domäne (gelb) mit LRR-Struktur (dunkelblau) und C-terminale Domäne (magenta) mit ankyrin-ähnlicher Struktur (grün). Scherer *et al.* (2010).

Die pPLA-I verfügt wie alle pPLA's über ein katalytisches Zentrum, bestehend aus einer Esterasebox (GTSTG), einem Phosphat- oder Anionen-bindenden Element (DGGGXRG) und weiteren spezifischen Motiven. Zusätzlich verfügt sie über eine N-terminale Domäne mit Leucinreichen Wiederholungen (LRR) und eine C-terminale Domäne mit Ankyrin-ähnlicher Struktur (s. Abb. 2). Das LRR-Motiv beinhaltet eine G-Protein-Bindestelle, was vermuten lässt, dass die pPLA-I an G-Protein-vermittelten Signalwegen beteiligt ist. Allgemeine, nicht an PLA assoziierte

Untersuchungen ergaben eine Beteiligung an der Vermittlung spezifischer Protein-Protein-Interaktionen für die Ankyrin-Domäne (Mosavi *et al.*, 2004). Untersuchungen an iPLA₂-VIA zeigen, dass das Vorhandensein einer Ankyrin-Domäne hier für die vollständige enzymatische Funktion des Proteins notwendig ist und diese direkt an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt sind (Balsinde und Balboa, 2005).

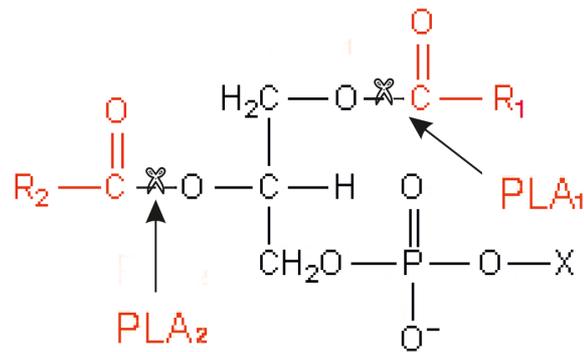


Abbildung 2: Dargestellt ist die Strukturformel eines Phospholipids mit eingezeichneten Schnittstellen von Phospholipasen mit PLA₁- bzw. PLA₂-Aktivität

Die pPLA-I ist in der Lage, ihr Substrat sowohl am C₁-, als auch am C₂-Atom zu hydrolysieren, weist also sowohl PLA₁-, als auch PLA₂-Spezifität auf (Scherer *et al.*, 2010). Galaktolipide werden als Substrat gegenüber den Phospholipiden bevorzugt umgesetzt (Yang *et al.*, 2007).

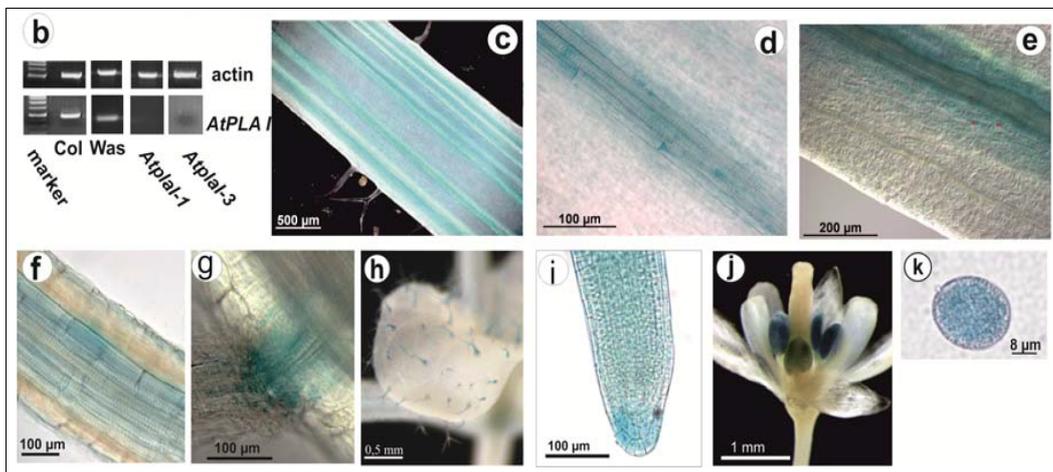


Abbildung 3: b) RT-PCR 7 Tage alter Keimlinge zeigt die mRNA-Expression der pPLA-I in Col Wt, Ws Wt, *ppla-I-1* und *ppla-I-3*. c)-k) Übersicht über die GUS-Expression von *PPLA1::uidA* c) in den Leitbündeln des Sprosses, d) in einem einzelnen Leitbündel des Sprosses, e) im Leitbündel der Petiolen, f) im Zentralzylinder der Wurzel, g) in beginnenden Seitenwurzeln, h) in den Trichomen der Blätter, i) in der Wurzelspitze, j) in der Blüte und k) im Pollen. Effendi *et al.* (in Vorbereitung).

Mittels eines *pPLA-I*-Promotor-GUS-Konstruktes konnten Effendi *et al.* (in Vorbereitung) die Promotor-gesteuerte Expression der *pPLA-I* in *Arabidopsis* zeigen (s. Abb. 3). Die Untersuchungen ergaben GUS-Färbung in den Leitbündeln des Sprosses und der Petiolen, im Zentralzylinder der Wurzel, an der Basis beginnender Seitenwurzeln, in der Wurzelspitze, in den Trichomen der Blätter und im Pollen.

1.2 Beteiligung der pPLA-I am Auxin-Signalweg

Allgemein ist für die Gruppe der pPLA eine Beteiligung an Auxin-vermittelten Signalwegen bekannt. Die ersten Hinweise darauf gaben Versuche zur schnellen Aktivierung von PLA's durch Auxin in 1-5min (Scherer und André, 1989). Insbesondere wurde eine Rolle der pPLA₂-Spaltprodukte Fettsäuren und Lysophospholipide als second-messenger im Auxin-Signalweg postuliert (Paul *et al.*, 1998, Scherer *et al.* 2002). Weitere Nachweise einer Beteiligung von pPLA's an Auxin-vermittelten Signalwegen konnten durch Verwendung pPLA-spezifischer Inhibitoren erbracht werden, die gleichzeitig als Inhibitoren im Auxin-Signalweg fungieren (Yi *et al.*, 1996, Scherer und Arnold, 1997).

Die wichtigsten Hinweise auf eine Beteiligung der pPLA-I am Auxin-Signalweg konnten mit Hilfe von Knockoutmutanten der *pPLA-I* in den Ökotypen Wassilijewskia (*ppla-I-1*) und Columbia (*ppla-I-3*) erbracht werden. So konnte festgestellt werden, dass verschiedene frühe Auxin-induzierte Gene in Licht-gewachsenen *ppla-I-1* und *ppla-I-3* nicht hochreguliert waren (Effendi *et al.*, in Vorbereitung).

Weitere Untersuchungen befassten sich mit dem phänotypischen Unterschieden der *ppla-I*-Knockoutmutanten im Vergleich zum Wildtyp. So blüht *ppla-I-1* im Kurztag signifikant früher im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp und bildet unter spezifischen Lichtbedingungen (simulierte Bedingungen des shade avoidance syndroms / SAS, s. 1.5) ein längeres Hypokotyl aus. Sowohl das frühe Blühen als auch die unterdrückte Hemmung des Hypokotylwachstums geben einen Hinweis auf die Beteiligung der pPLA-I an einem Lichtsignalweg. Versuche zum Phototropismus ergaben eine verminderte Reaktionsfähigkeit der *ppla-I-1* auf phototrophe Reize. So zeigten seitlich belichtete Hypokotyle der *ppla-I-1* eine zeitlich verzögerte und schwächer ausgeprägte Umorientierung zum neuen Lichtreiz im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp. Dies lässt auf einen Defekt im Phototropismus dieser Knockoutmutante schließen (Effendi *et al.*, in Vorbereitung).

Doch auch der Wurzelphänotyp der *ppla-I*-Knockoutmutanten kann entscheidende Hinweise auf eine Beteiligung der pPLA-I am Auxinsignalweg liefern. Als allgemein anerkannt gilt, dass das Wurzelwachstum durch Auxin stimuliert wird (Simmons *et al.*, 1995b) und maßgeblich durch drei Faktoren bestimmt wird. Dies sind die Circumnutation, der positive Gravitropismus und der negative Thigmotropismus (Migliaccio *et al.*, 2000). Zudem kann die Beteiligung weiterer Wachstumskomponenten nicht ausgeschlossen werden (Migliaccio und Piconese, 2001). Die Circumnutation bewirkt eine kreisförmige bis elliptische Bewegung der Wurzelspitze, die beim *Arabidopsis*-Wildtyp im Uhrzeigersinn aus abwärtsgerichteter Sicht entlang der Wurzelachse verläuft (Baillaud, 1962). Es wird angenommen, dass sie spontan auftritt und grundsätzlich nicht durch äußere Faktoren induziert wird. Jedoch gibt es Anzeichen, dass die Gravitation Einfluss auf die Circumnutation nimmt (Johnsson 1979). Weiterhin ist das Wurzelwachstum grundsätzlich geprägt von positivem Gravitropismus, welcher einen Mechanismus beschreibt, bei dem der Gravitationsreiz als Impuls dient, der das Wachstum des Wurzelgewebes hin zum Erdmittelpunkt bewirkt. Die Erkennung des Gravitationsreizes wird dabei durch die Umlagerung stärkehaltiger Amyloplasten gesteuert, die sich in den Columnellazellen der Wurzelhaube befinden (Sack, 1991; Kuznetsov und Hasenstein, 1996). Sie fungieren als Schwerkraft-Sensoren, indem sie sich bei Lage-Änderung der Wurzel umverteilen und so einen asymmetrischen Rückstrom des Auxins steuern (Blancaflor *et al.*, 1998, Sack, 1997, Younis, 1954). Die Folge ist ein Umbiegen der Wurzelspitze hin zum Gravitationsreiz. Negativer Thigmotropismus beschreibt eine „Hindernis-Vermeidungs-Bewegung“ (obstacle avoiding movement, Darwin, 1880), bei der die Wurzel sich von einem Hindernis weg bewegt (Massa und Gilroy 2003, nicht veröffentlichte Daten).

Die Summe dieser Wachstumskräfte bewirkt letztendlich ein helikales, dreidimensionales Wachstum der Wurzel zum Erdmittelpunkt. Werden *Arabidopsis*-Keimlinge jedoch auf Vertikalplatten mit hohem Agaranteil im Nährmedium angezogen, so dringen die Wurzeln beim Wachstum nicht in das „harte“ Nährmedium ein, sondern wachsen an ihm entlang nach unten (s. Abb. 4).

Hierbei wird die dreidimensionale Helixstruktur der Wurzel gebrochen und in eine zweidimensionale Struktur adaptiert, wodurch es zu den Wachstumsarten Waving, Slanting, Coiling und Torsion kommt. Waving wird vermutlich ausgelöst, indem die im Uhrzeigersinn verlaufende Circumnutation das Wurzelwachstum zunächst nach links (bei Aufsicht) lenkt. Durch den spiraligen Wachstumsdruck wird die Wurzelspitze zunächst in Richtung Agarfläche gedrückt. Aufgrund des Härtegrades des Agars kommt es jedoch nicht zur Penetration, sondern im Zusammenspiel mit dem negativen Thigmotropismus (Simmons *et al.*, 1995a) zu einer Umkehr der Wachstumsrichtung

(Okada und Shimura, 1990) nach rechts (bei Aufsicht). Diese Bewegung ist zudem an den positiven Gravitropismus gekoppelt, so dass waving, also ein abwärtsgerichtetes, wellenförmiges Wachstum der Wurzel auftritt (Okada und Shimura, 1995).

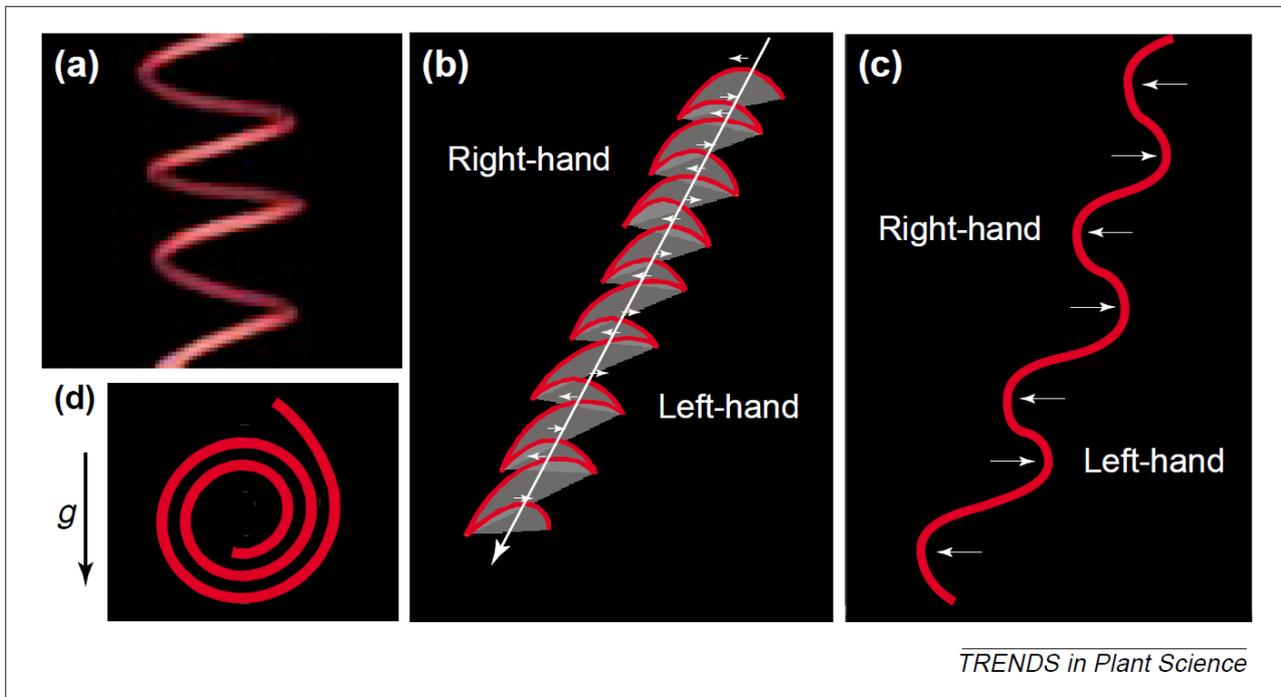


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer *Arabidopsis* Hauptwurzel, die auf senkrecht stehenden "harten" Agarplatten (Agaranteil 1,5%) angezogen wurden. a) Theoretisches helikales Wachstum der Wurzel im Uhrzeigersinn (abwärtsgerichtete Sicht in Richtung der Wurzelachse), wenn diese frei in der Luft elongieren würden. b) Alternierende Bewegungen der Wurzel, die zum Slanting führen. Das Nettowachstum weicht dabei nach links von Richtung zum Erdmittelpunkt ab (Aufsicht). c) Zweidimensionales wellenförmiges Wachstum der Wurzel als Reaktion auf das Wachstum auf einer gekippten Agarplatte. d) Coilwachstum im Uhrzeigersinn als Resultat des zweidimensionalen Wachstums auf einer Agaroberfläche. Migliaccio und Piconese (2001).

Eine andere Hypothese besagt, dass die Circumnutation einen größeren Einfluss auf das Wurzelwachstum hat, als die thigmotrophe „Rückreaktion“ (Simmons *et al.*, 1995a), wodurch es zum Slanting kommt: die linksgerichtete Wachstumskraft ist stärker ausgeprägt im Gegensatz zur rechtsgerichteten Wachstumskraft, so dass anstelle eines Wachstums zum Erdmittelpunkt eine linksgerichtete Verschiebung der Wachstumsrichtung auftritt. Coiling entsteht, wenn die Circumnutation zur entscheidenden Wachstumskraft wird und es dadurch nicht zur Rückreaktion kommt. Anstelle einer wellenförmigen Bewegung kommt es dann zu einer geschlossenen kreisförmigen Bewegung (s. Abb. 5), die in der Richtung der Circumnutation (also in aller Regel im

Uhrzeigersinn) erfolgt (Mirza, 1987).

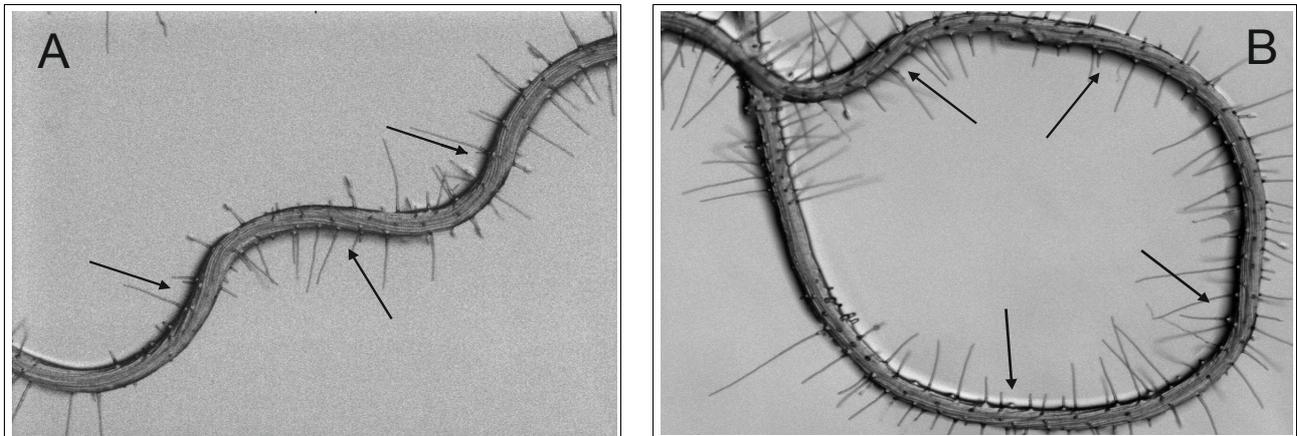


Abbildung 5: Dargestellt sind Wurzeln des *Wassilijewskia* Wildtyps, die für 10 Tage auf hartem Agar angezogen wurden und Waving (A) oder Coiling (B) zeigen. Die Pfeile zeigen Bereiche der Wurzelepidermis an, bei denen die Torsion besonders deutlich zu erkennen ist. Während die Torsionsrichtung mit jedem Wave wechselt, verläuft sie beim Coil konstant gegen den Uhrzeigersinn.

Eine weiterer morphologischer Effekt, der möglicherweise durch die Adaption der dreidimensionalen Wurzelhelix in eine zweidimensionale, flache Struktur ausgebildet wird, ist die Torsion. Hierbei handelt es sich um eine rillenförmig aussehende Struktur der Rhizodermiszellen, die entgegengesetzt zur Richtung der Circumnutation verläuft. Eine Hypothese besagt, dass es sich bei der Torsion lediglich um ein strukturelles Artefakt handelt, welches durch die Verringerung der Fläche im Inneren bei einer Vergrößerung der Fläche im Äußeren der Wurzel verursacht wird. Durch den Verlauf der Torsion entgegengesetzt zur Circumnutation könnte es zu einem Ausgleich der konformativen Spannungen kommen (Migliaccio und Piconese, 2001). Es ist bislang jedoch ungeklärt, ob die Torsion eine Folge von Waving und Coiling ist oder deren Auslöser.

Ebenfalls noch nicht völlig geklärt ist die Beteiligung des Cytoskeletts an der Gravotropismusreaktion. Während es eine wichtige Rolle in der Erkennung von Gravitationsreizen zu spielen scheint, zeigten einige Experimente, dass weder Mikrotubuli noch Mikrofilamente essentiell notwendig für das beschriebene differentielle Wachstum der Wurzel als Antwort auf gravitrope Reize sind (Baluska und Hasenstein, 1997).

In den vergangenen Jahren wurden mehr und mehr *Arabidopsis*-Mutanten isoliert, die eine Abweichung vom regulären Wurzelwachstum des Wildtyps in Bezug auf Waving, Coiling oder Slanting aufweisen. Zusätzlich konnte für diese Mutanten neben einem Defekt im Gravotropismus auch ein Defekt im Auxintransport festgestellt werden. Ein gutes Beispiel hierfür gibt die *ppla-1-1*.

Sie bildet im Vergleich zum Wildtyp signifikant mehr Wurzel-Coils aus und zeigt ein verstärktes Slanting (Effendi *et al.*, in Vorbereitung, s. Abb. 6), was ein Indiz für einen reduzierten Gravitropismus darstellen könnte (Ferrari *et al.*, 2000). Effendi *et al.* fanden zudem deutliche Defekte dieser Mutante in der Auxin-induzierten Genregulation.

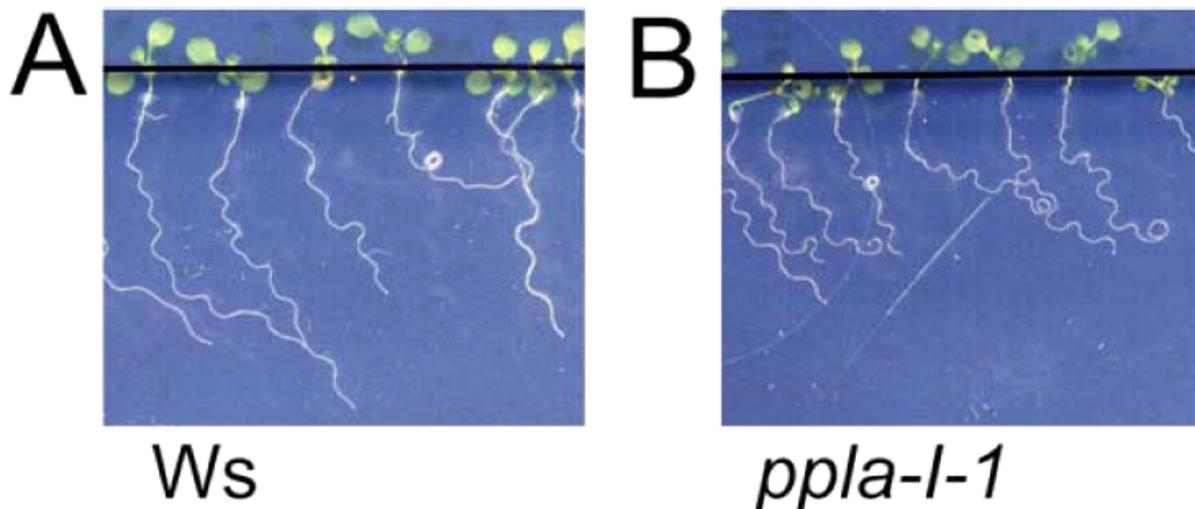


Abbildung 6: Dargestellt sind Keimlinge des Wassiljewskis-Wildtyps (A) und der *ppla-I-1*-Knockoutmutante *ppla-I-1* (B) nach Wachstum auf 45° gekippten, harten Agarplatten. Der Vergleich zeigt deutlich eine erhöhte Anzahl an Coils und ein verstärktes Slanting der *ppla-I-1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp. Effendi *et al.* (in Vorbereitung).

Dies unterstützt die Hypothese, dass der Auxintransport in irgendeiner Weise mit der Ausbildung von Waving, Coiling und Slanting der Wurzel verknüpft sein muss. Weiter führt es zu der Annahme, dass Auxin nicht nur Gravitropismus und Phototropismus kontrolliert, sondern auch Nutationsbewegungen (Migliaccio *et al.*, 2009).

1.3 PIN-Proteine

Der Transport von IAA in der Pflanze kann auf zwei Arten erfolgen: Den nicht-polaren Langstreckentransport über das Phloem oder den polaren Transport von Zelle zu Zelle. Der polare Auxinstrom erfolgt dabei von seinem hauptsächlichen Synthesort, dem Sprossspitzenmeristem über den Spross basipetal bis zur Wurzelspitze, wo es dann zu einem Rückstrom des Auxins hin zur Basis kommt. Dieser Transport erfolgt von Zelle zu Zelle über in der Plasmamembran lokalisierte Carrier-Proteine (Rubery und Sheldrake, 1974, Raven, 1975). Die Aufnahme von IAA in eine Zelle

erfolgt durch Influx-Carrier (AUX1/LAX) (Bennett *et al.*, 1996) oder durch Diffusion. Der Efflux von IAA wird über die Familie der PINFORMED (PIN)-Proteine ermöglicht (Petrasek *et al.*, 2006). Diese können asymmetrisch in der Plasmamembran lokalisiert sein und ermöglichen dann den polaren Transport von IAA aus der Zelle (Wisniewska *et al.*, 2006). Die Lokalisierung der PIN-Proteine ist jedoch nicht statisch. Vielmehr befinden sie sich in einem konstitutiven zyklischen Transport zwischen der Plasmamembran und den Endosomen, der über Vesikel funktioniert (Geldner *et al.*, 2001). Das Gleichgewicht kann hierbei durch unterschiedliche Faktoren, wie Gravitations- oder Lichtreize in die eine oder andere Richtung verschoben werden. Somit sind die PIN-Proteine in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Lokalisierung unmittelbar an der wichtigen Rolle des polaren Auxinstroms für Wachstum und Entwicklung pflanzlicher Zellen und Gewebe beteiligt. In diesem Zusammenhang ist auch die Beteiligung der PIN-Proteine an den Tropismus-Signalwegen der Pflanze hinreichend bekannt (Luschnig *et al.*, 1998, Friml *et al.*, 2002b)

1.4 Auxin binding protein 1 (ABP1)

In den 70er Jahren identifizierte man in Bindungsstudien mittels radioaktiv markierter Auxine (Hertel *et al.*, 1972) Auxinbindungsstellen im Endoplasmatischen Retikulum (site I), in der Plasmamembran (site II) und im Tonoplasten (site III) (Dohrmann *et al.*, 1978), wobei site I die stärkste Bindungsaktivität zugeschrieben wird (Venis und Napier 1997). In der Folge konnte von site I der potentielle Auxinrezeptor ABP1 isoliert werden, welcher im Endoplasmatischen Retikulum (ER) am stärksten akkumuliert ist. In *Arabidopsis* existiert im Gegensatz zu bspw. Mais nur ein Gen der ABP1. Es codiert für ein hydrophiles Glycoprotein mit N-terminalem Signalpeptid, welches das vermutlich am ER synthetisierte ABP1 zum Lumen transloziert. Ein weiteres C-terminales Motiv (KDEL, ER-Retentionssignal) hält das Protein im ER zurück. ABP1 verfügt über keinerlei intrinsische hydrophobe Domäne. Dennoch konnte es bisher nur in Assoziation mit Membranfraktionen nachgewiesen werden.

Tomas *et al.* postulierten 2010 das Vorhandensein eines C-terminalen Bindungsproteins (CBP1), welches spezifisch das KDEL-Motiv von ABP1 maskiert und so den Transport vom ER zur äußeren Oberfläche der Plasmamembran ermöglicht (s. *Abb. 7*). Dort dient ABP1, möglicherweise in Beteiligung eines weiteren Proteins, der Auxin-Signalübertragung ins Zellinnere.

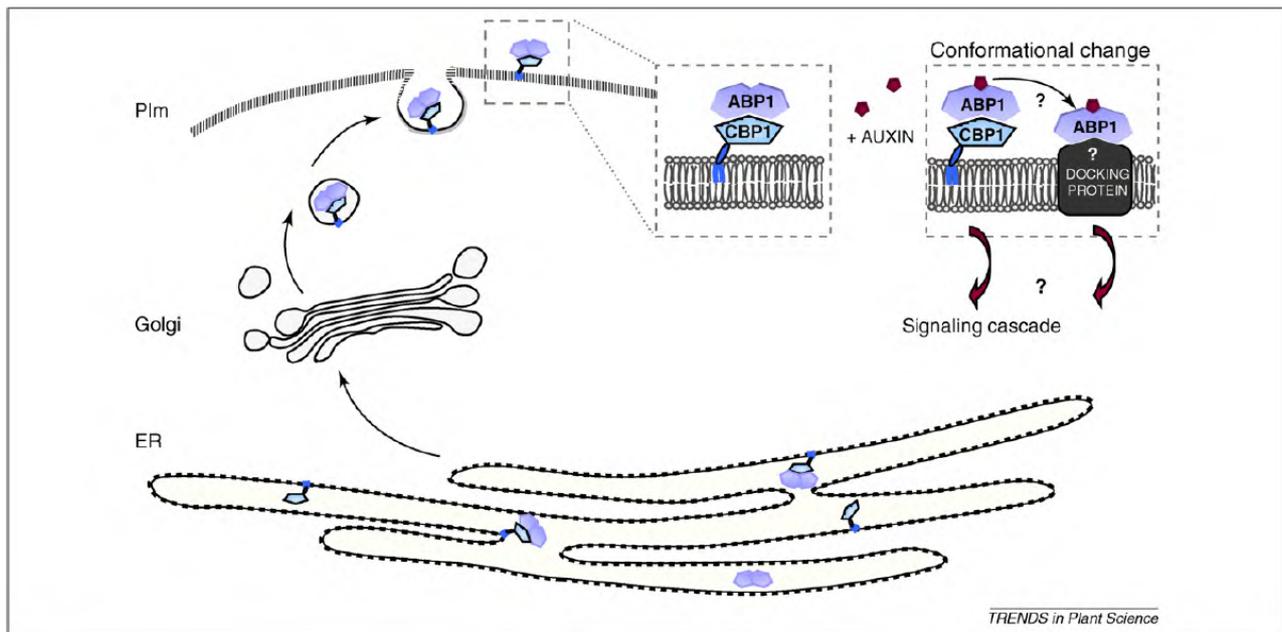


Abbildung 7: Hypothetische Modell für das ABP1-targeting an der Plasmamembran. ABP1 ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER), sowie an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert. Das Protein ist ungeachtet einer nicht vorhandenen intrinsischen hydrophoben Domäne immer mit Membranfraktionen assoziiert. Es wird angenommen, dass die Lokalisierung an der Oberfläche der Plasmamembran aus der C-terminalen Domäne mit KDEL-Motiv mit einem anderen Protein (CBP1) resultiert. CBP1 könnte am Transport von ABP1 zur Plasmamembran beteiligt sein. Die Beteiligung eines weiteren Proteins an der Signaltransduktion nach dem Binden von Auxin an ABP1 ist dabei nicht auszuschließen. Tomas *et al.* (2010).

Weitere Untersuchungen an isolierten Protoplasten konnten belegen, dass ABP1 an schnellen Auxineffekten beteiligt ist (Ephritikhine *et al.*, 1987). Auch konnte festgestellt werden, dass ABP1-Dimere die Auxinmoleküle binden (Napier *et al.*, 2002). Eine besondere Funktion kommt dabei dem C-terminalen Peptid des ABP1 zu, welches direkt an der Auxinbindung beteiligt ist und biologische Aktivität aufweist (Thiel *et al.*, 1993). Heterozygote *abp1*-Insertionsmutanten weisen agravitrope Wurzeln und Hypokotyle auf, sind aphototroph und verfügen über eine verminderte Apikaldominanz. Auch der akropetale Auxintransport der Wurzel ist verringert. Die aufgezeigten Merkmale lassen die Regulation des PIN-abhängigen Auxintransportes über den ABP1-Signalweg vermuten. Es konnten zudem von vielen Autoren Nachweise für die Funktion von ABP1 als Auxin-Rezeptor erbracht werden (Effendi *et al.*, 2011, Scherer 2011).

1.5 Phytochrome und Cryptochrome

Bei den Phytochromen handelt es sich um Chromoproteine, die vor allem hellrotes und dunkelrotes Licht, aber auch Blaulicht absorbieren können. Sie sind als Dimere mit zwei äquivalenten Untereinheiten aufgebaut. Jede Untereinheit besteht wiederum aus zwei Komponenten, dem Chromophor und dem Apoprotein. Aus *Arabidopsis* wurden fünf Mitglieder der Genfamilie, die Phytochromogene A bis E (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* und *PHYE*) isoliert. Sie werden anhand ihrer lichtabhängigen Expression in TypI- und TypII-Phytochrome unterteilt. *PHYA* ist dabei das einzige Gen, welches für ein TypI-Phytochrom codiert.

Die Phytochrome können – abhängig von den vorherrschenden Lichtbedingungen – in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen. In etiolierten Pflanzen liegen sie vorwiegend in der Hellrotlicht-absorbierenden Form (Pr-Form) vor. Durch Bestrahlung mit hellrotem Licht können die Phytochrome in die Dunkelrotlicht-absorbierende Form (Pfr-Form) umgewandelt werden. Dieser Vorgang ist photoreversibel, denn durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht kann die Pfr-Form wieder in die Pr-Form umgewandelt werden. Die beiden Formen unterscheiden sich maßgeblich in den Absorptionsmaxima für die Wellenlängen des Lichtes, zeigen aber deutliche Überlappungen in ihrem gesamten Absorptionsspektrum. Daher kommt es nie zur vollständigen Umwandlung in eine Form, sondern Pr- und Pfr-Form liegen in einem Gleichgewicht (photostationärer Zustand) vor. Die Lage des Gleichgewichts ist dabei maßgeblich für den Verlauf Phytochrom-induzierter Reaktionen. Ein Beispiel hierfür ist das shade avoidance syndrome (SAS). Dieser Mechanismus beruht auf dem Sachverhalt, dass grüne Blätter wegen ihres hohen Chlorophyllgehaltes hellrotes Licht absorbieren, andererseits für dunkelrotes Licht aber relativ durchlässig sind (s. *Abb. 8*). Pflanzen, die sich im Schatten dieser Blätter befinden, empfangen demnach verstärkt dunkelrotes Licht. Dies hat Auswirkungen auf das vorliegenden Phytochrom-Gleichgewicht: Bei starker Beschattung ist der hellrot(R)/dunkelrot(FR)-Quotient niedrig und es wird mehr Pfr in Pr umgewandelt.

Die physiologische Folge ist ein verstärktes Sproßwachstum, wodurch für die beschattete Pflanze ein deutlicher adaptiver Vorteil entsteht. Denn durch das schnelle Streckungswachstum erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Individuums, über das Pflanzendach hinauszuwachsen und so einen höheren Anteil an ungefiltertem, photosynthetisch wirksamem Licht zu erhalten (Physiologie der Pflanzen, Taiz und Zeiger, 1999). Weitere SAS-Merkmale sind die Elongation der Petiolen, Blatthyponastie, verringerte Seitensprossbildung und eine verstärkte phototrophe Orientierung des Sprosses in Richtung von Lücken im Pflanzendach (Ballaré, 1999). Speziell in Hinblick auf das Wurzelwachstum kommt es zu einer Reduktion der Seitenwurzelbildung und möglicherweise zu

einer Verringerung des Wachstums der Hauptwurzel (Morelli und Ruberti, 2000). Hauptsächlich verantwortlich für das Einsetzen eines solchen SAS-Phänotyps durch eine Verringerung des R:FR-Quotienten ist PHYB (Franklin, 2008, Ballaré, 2009, Jaillais und Chory, 2010, Martinez-Garcia *et al.*, 2010).

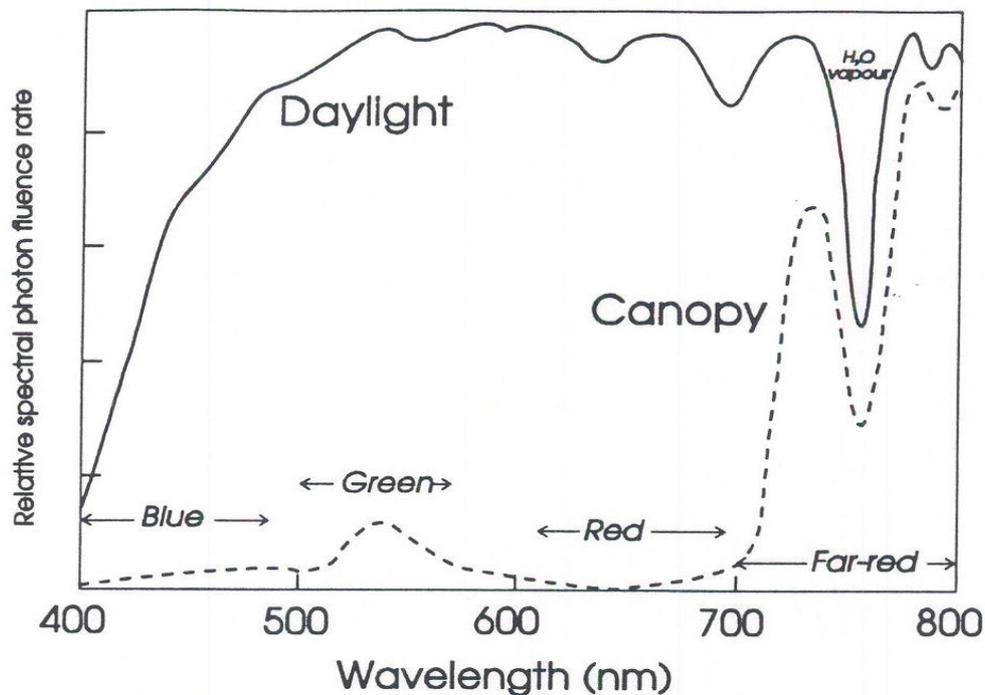


Abbildung 8: Spektrale Verteilung des Tageslichts auf der Erdoberfläche (durchgehende Linie) und unter einem dichten Blätterdach (gepunktete Linie). Photosynthetische Pigmente wie Chlorophylle und Carotinoide absorbieren fast vollständig die Lichtstrahlung des sichtbaren Spektrums (400nm - 700nm). Jedoch absorbiert die Vegetation kaum Licht im Wellenlängenbereich von 700nm - 800nm. Die Grafik zeigt deutlich die Dezimierung des roten Lichtspektrums unter einem dichten Blätterdach, während der Anteil des dunkelroten Lichtspektrums nahezu unverändert bleibt. Die Folge ist eine Verringerung des hellrot(R)/dunkelrot(FR)-Quotienten. Smith (1994).

Eine weitere wichtige Rolle wird PHYB bei der Regulierung von Tagesrhythmen zuteil. Viele Stoffwechselprozesse der Pflanze durchlaufen abwechselnde Phasen hoher und niedriger Aktivität mit einer gleichmäßigen Periodendauer von ungefähr 24 Stunden, dem circadianen Rhythmus. PHYB ist in der Lage, diesen Rhythmus durch Veränderung des Transkriptlevels verschiedener Phytohormone als Reaktion auf definierte Lichtsignale zu kontrollieren (Michael *et al.*, 2008).

Chrytochrome sind Photorezeptoren, die ausschließlich Reaktionen auf Blaulicht und Wellenlängen nahe der UV-Strahlung vermitteln. Sie fungieren ebenfalls wie die Phytochrome in der photomorphogenen Signalantwort und sind diesen in manchen Grundfunktionen sehr ähnlich

(Casal *et al.*, 2000, Fankhauser *et al.*, 2002). Phänotypisch bewirken sie die Hemmung der Hypokotylstreckung, Öffnung der Kotyledonen und Vergrößerung der Kotyledonenfläche, sowie die Akkumulation von Anthocyanen (Ahmad *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 1998). In *Arabidopsis* existieren die Chrytochromgene 1 und 2 (*CRY1* und *CRY2*). Chrytochrom1 ist sowohl Blaulicht, als auch UV-A-Lichtrezeptor, der photomorphogene Signalantworten insbesondere bei mittleren und hohen Lichtintensitäten steuert. Dabei ist seine Funktion unmittelbar mit seiner subzellulären Lokalisierung verknüpft: Wu *et al.* veröffentlichten 2007 Ergebnisse, die zeigten, dass nuklear lokalisiertes *CRY1* (Lokalisierung bei hoher Blaulicht-Intensität) das Wurzelwachstum hemmen kann, nicht aber cytoplasmatisches *CRY1* (Lokalisierung bei geringer Blaulicht-Intensität). *CRY2* fungiert hingegen in der Signalantwort auf geringe Blaulicht-Intensitäten (Lin *et al.*, 1996). Möglicherweise spielt es auch eine wichtige Rolle bei der Tageslicht-abhängigen Induktion der Blüte (Guo *et al.*, 1998, Yanovsky und Kay, 2002).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchung der im Hypokotyl-Gravitropismus und Phototropismus gestörten Knockoutmutante *ppla-I-1*. Studien zur Analyse der *pPLA-I*-Sequenz, der Expression und der subzellulären Lokalisation der *pPLA-I*- und morphologische Untersuchungen der *ppla-I-1*-Mutante sollten zu einem tiefer gehenden Verständnis dieser Mutante führen. Die Studie sollte auch im Hinblick auf kommende Experimente zum Wachstum von Pflanzen in Schwerelosigkeit mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* im Rahmen des WAICO-Weltraumprojektes stattfinden. Insbesondere sollte dazu die Bildung von Coils im Rahmen des WAICO-Experiments untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Sequenzanalyse der *pPLA-I*

Effendi *et al.* (in Vorbereitung) konnten feststellen, dass die Knockoutmutanten *ppla-I-1* aus dem Ökotyp Wassilijewskia und *ppla-I-3* aus dem Ökotyp Columbia in einigen Versuchsreihen deutliche phänotypische Unterschiede zeigen. Um eine mögliche Ursache für diese Unterschiede zu finden wurde in dieser Arbeit zunächst eine gründliche Analyse der cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus den beiden Ökotypen vorgenommen. Hierzu wurde jeweils die Gesamt-RNA gewonnen und mittels RT-PCR cDNA hergestellt. Im Weiteren wurde versucht, die vollständige cDNA-Sequenz der *pPLA-I* zu amplifizieren. Trotz Auswahl verschiedener Primerpaare, Polymerasen, PCR-Mix-Varianten und Thermocycler-Programme war es jedoch nicht möglich, spezifische Fragmente größer als ca. 2,7kb zu amplifizieren. Daher wurden Primerpaare zur Amplifikation von vier verschiedenen Sequenzteilen ermittelt, die die Gesamtsequenz vollständig abdecken und dabei miteinander überlappen. Die erhaltenen Amplifikate wurden dann mit spezifischen Primern sequenziert und die erhaltenen Sequenzstücke zur Gesamtsequenz zusammengefügt. Zusätzlich wurde mittels Phagenverdünnung die cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus der Phagenbank CD4-16 gewonnen und auf gleiche Weise sequenziert.

2.1.1 Extraktion von RNA aus *Arabidopsis* und cDNA-Synthese

Für die Gewinnung von RNA wurden 7 Tage alte Wassilijewskia und Columbia Wildtyp-Keimlinge als Ausgangsmaterial verwendet. Die RNA-Extraktion erfolgte mittels NucleoSpin[®] RNA-Plant Kit der Firma Machery-Nagel (Katalog-Nr.: 740 949-50). Anschließend wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung mittels Safas SP2000 Spectrophotometer der Firma Monaco durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde anschließend für eine RT-PCR ZUR cDNA-Synthese weiterverwendet.

500ng RNA wurden wie in *Tab. 1* beschrieben für die Synthese von cDNA mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Katalog-Nr. K1622) eingesetzt. Anschließend wurde die cDNA für die Amplifikation von *pPLA-I*-Sequenzteilen verwendet oder bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Komponenten und Inkubationszeiten der cDNA-Synthese aus extrahierter RNA

Komponente	Volumen
RNA (500ng/ μ l)	1 μ l
pPLA-I_for (10pmol/ μ l)	2 μ l
pPLA-I_rev (10pmol/ μ l)	2 μ l
DEPC-behandeltes Wasser (RNase-frei)	7 μ l
Inkubation bei 65°C für 5min	
5x Reaktionspuffer	4 μ l
RiboLock™ Ribonuklease-Inhibitor (20u/ μ l)	1 μ l
dNTP-Mix (10mM)	2 μ l
RevertAid™M-MuLV Reverse Transkriptase (200u/ μ l)	1 μ l
Inkubation bei 25°C für 10min und anschließend 42°C für 60min	
RNase H	1 μ l
Inkubation bei 37°C für 10min und abschließend bei 70°C für 10min	

2.1.2 Screening der Phagenbank CD4-16 auf das Vorhandensein einer pPLA-I-Sequenz

Die Phagenbank CD4-16 beinhaltet cDNA aus Gewebe von *A. thaliana*, Ökotyp Columbia mit einer Fragmentgröße von 3 - 6kb. Mittels der Screeningmethode von Watanabe *et al.* (1997) wurde ein pPLA-I - haltiger Phagenklon aus dem Klontgemisch isoliert. Hierzu wurden XL1-Blue MRF'-*E. coli*-Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Phagenbank infiziert und wie folgt der Phagentiter bestimmt:

- MRF'-Zellen in 50ml LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10mM MgSO₄ animpfen
- Inkubation über Nacht bei 140rpm und 30°C
- MRF'-Zellen in SS34-Röhrchen für 10min bei 4000xg und 4°C abzentrifugieren
- Zellsediment in 10mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 lösen
- Verdünnungsstufen der Phagenbank mit SM-Puffer ansetzen (Verdünnungen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ bei einer Ausgangskonzentration von 10¹¹ Phagen/ μ l)
- je 400 μ l MRF'-Zellen mit 1 μ l einer Phagen-Verdünnungsstufe versetzen und 15min bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- 4 x 4ml NZY-Top-Agar in 15ml Reaktionsgefäß aliquotieren, MRF'-Zellen mit Phagenverdünnung hinzugeben und auf Agarplatten ausgießen

- Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C
- Auszählung der plaque performing units (pfu). Der Phagentiter wird wie folgt bestimmt:

$$\text{pfu} \times \text{Verdünnungsstufe} = \text{Phagen} / \text{ml}$$

Nach erfolgter Titerbestimmung wurde die Phagenbank auf das Vorhandensein der pPLA-I-Sequenz gescreent. Hierzu wurden die Phagen-haltigen Agarplatten mit SM-Puffer verdünnt und 10 Agarplatten mit jeweils etwa 5000 Phagen hergestellt. Statistisch gesehen sollte eine dieser Platten einen Phagenklon mit *pPLA-I*-cDNA-Sequenz besitzen. Die Platten wurden mit SM-Puffer ausgeschwämmt und die phagenhaltige Aufschwämmung für eine PCR mit spezifischen *pPLA-I*-Primern (pPLA-I Exon18_for - und pPLA-I Exon18_rev) verwendet. Zur Amplifikation wurde *taq*-Polymerase der Firma 5Prime (Katalog-Nr. 2900169) verwendet. Die PCR-Bedingungen lauteten, wie in *Tab. 2* und *3* beschrieben:

Tabelle 2: PCR-Mix zur Amplifikation von pPLA-I-Exon18 mittels taq-Polymerase

PCR-Komponente	Volumen
10x-PCR-Puffer	5,0 µl
dNTP's (10mM)	1,0 µl
pPLA-I_Exon18_for (10mM)	1,0 µl
pPLA-I_Exon18_rev (10mM)	1,0 µl
Template (phagenhaltige Aufschwämmung)	1,0 µl
taq-Polymerase (2,5u/µl)	0,5 µl
destilliertes Wasser	36,5 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

Tabelle 3: Thermocycler-Programm zur Amplifikation von pPLA-I-Exon18

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95°C	2min	1
Denaturierung	95°C	30s	35
Annealing	50°C	30s	
Elongation	72°C	1min	
Elongation	72°C	15min	1
Lagerung	4°C	∞	

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde der Erfolg der Amplifikation überprüft. Dazu wurden zunächst 0,5g Agarose in einer 250ml-Flasche abgewogen und mit 50ml 1 x TAE-Puffer versetzt. Zum Lösen wurden die Flasche für 1min 30s bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Die Agaroselösung wurde dann auf etwa 50°C abgekühlt und mit 1,3µl Ethydiumbromid versetzt. Durch Schwenken der Flasche wurde das Ethydiumbromid gleichmäßig in der Agaroselösung verteilt und diese in eine Agarosegel-Form ausgegossen. Die Form wurde mit Kämmen belegt und die Agaroselösung für etwa 15min bis zum Verfestigen der Agarose stehen gelassen. Dann wurde die Form in eine mit 1 x TAE-Puffer befüllte Gelkammer überführt und die Kämmen entfernt. Die gebildeten Taschen wurden jeweils mit 5µl cDNA-Probe + 1µl 6xLadepuffer befüllt. Zudem wurden 5µl DNA-Standard zur Größen- und Gehaltsbestimmung der cDNA aufgetragen. Das Agarosegel wurde für 45min bei 80V und 6W elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit den aufgetrennten cDNA-Proben unter UV-Licht abgelichtet.

10 x TAE-Puffer:	400 mM	Tris, pH 8,0
	200 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
	Verdünnung 1:10 mit destilliertem Wasser zur Verwendung für die Agarosegellösung oder zum Ansetzen des Ladepuffers	
6xLadepuffer:	30 %	Glycerin
	0.125%	Bromphenolblau
	0.125%	Xylencyanol

Konnte für eine der Platten nach PCR und Agarosegelelektrophorese eine spezifische *pPLA-I-Exon18*-Bande amplifiziert werden, so wurde die jeweilige Aufschwämmung verwendet, um weitere 10 Platten mit jeweils etwa 500 Phagen herzustellen. Wurde auf einer der Platten ein positiver Klon detektiert, konnte eine erneute Verdünnung auf neuen Agarplatten mit etwa 50 Phagen/Platte angefertigt und erneut gescreent. Von der ermittelten Platte, die einen positiven Klon beinhaltet, wurde jeder einzelne Plaque gescreent:

- wie unter 2.1.2 beschrieben MRF'-Zellen mit einer entsprechend dem Titer hergestellten Phagenverdünnung inkubieren und 10 NZY-TOP-Agarplatten mit je 5000 Phagen ausplattieren
- je 5ml SM-Puffer auf die Platten geben und über Nacht auf dem Schüttler bei 100rpm die Phagen lösen
- ein 2ml Reaktionsgefäß je Platte mit der Aufschwämmung befüllen auf 5% Chloroform einstellen, vortexen und für 15min bei RT inkubieren

- Suspension für 10min bei 10000 x g zentrifugieren und ein 1,5ml Reaktionsgefäße je Platte mit Überstand befüllen
- je 1µl Überstand als Template für die PCR mit *pPLA-I Exon18*-Primern verwenden; bei Amplifikation einer spezifischen Bande den entsprechenden Überstand mit Phagensuspension für eine erneute Titerbestimmung verwenden
- die Phagenverdünnung wie oben beschrieben fortführen, bis der positive Phagenklon auf 50 Phagen je Platte eingegrenzt wurde; dann jeden einzelnen Phagenklon mit einer Pipettenspitze picken und für 5min in einem PCR-Ansatz inkubieren; anschließend wie in *Tab. 2* und *3* beschrieben die PCR durchführen und so den positiven Phagenklon identifizieren

Der ermittelte Einzelphage mit positivem Klon wurde dann wie folgt mit einem Ex-Assist-Helferphagen Co-infiziert und der enthaltene Bluescript-Vektor in Form von Phagenpartikeln in SOLR-*E. coli*-Zellen transformiert:

- Ausstechen des positive Phagenplaques und lösen in 10µl SM-Puffer
- MRF'- und SOLR-Zelle über Nacht in 30ml LB (0,2% Maltose, 10mM MgSO₄) bei 30°C und 14rpm anziehen
- MRF'- und SOLR-Zellen in SS34-Röhrchen für 10min bei 1000xg abzentrifugieren und bis zu einer OD₆₀₀ = 1,0 resuspendieren
- in ein 1,5ml Reaktionsgefäß 200µl MRF'-Zellen, 5µl Phagensuspension und 1µl Helferphagen zusammen pipettieren und für 15min bei 37°C inkubieren
- in einem 15ml Reaktionsgefäß 3ml LB-Medium vorstrecken, den MRF'-Zellen-Ansatz hinzugeben und für 3h bei 37°C und 150rpm im Wasserbad inkubieren; anschließend für 20min bei 70°C inkubieren
- nach erfolgter Inkubation den MRF'Zellen-Ansatz in zwei 2ml Reaktionsgefäße überführen und für 15min bei 1000xg abzentrifugieren; anschließend den Überstand mit pBluescript-Phagemiden in zwei 2ml Reaktionsgefäße pipettieren
- 200µl resuspendierte SOLR-Zellen mit 10µl des Phagen-haltigen Überstandes versetzen und für 15min bei 37°C inkubieren
- 10µl des SOLR-Zellen-Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (c = 50µg/ml) ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren
- einzelne Kolonie mit einer Pipettenspitze von der Platte picken und damit 2,5ml LB-

Medium mit Ampicillin ($c = 50\mu\text{g/ml}$) animpfen und über Nacht bei 37°C inkubieren

- 1,5 ml der ü.N.-Kultur zur Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Minipräparation verwenden

LB-Medium: 10,0 g NaCl
 10,0 g Tryptone
 5,0 g Hefeextrakt
 mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen, mit 5M NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren

NZY-Medium (1l): 5,0 g NaCl
 2,0 g MgSO_4
 5,0 g Hefeextrakt
 10,0 g Trypton
 mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen, mit 5M NaOH auf pH 7,5 einstellen

NZY-TOP-Agar : NZY-Medium + 0,7% Agarose; autoklavieren

SM-Puffer (1l): 5,8 g NaCl
 2,0 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ dH}_2\text{O}$
 50,0ml 1M Tris, pH 7,5
 5,0ml 2% Gelatin
 mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen und autoklavieren

2.1.3 Gewinnung von Plasmid-DNA

Von der in selektivem LB-Medium über Nacht angezogenen Zellkultur wurde ein 1,5ml Reaktionsgefäß befüllt und dieses für 45s bei $10000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100\mu\text{l}$ Lösung A resuspendiert. Dann wurden $200\mu\text{l}$ Lösung B hinzugegeben und das Reaktionsgefäß nach kurzem Schütteln für 5min bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von Lösung C und eine erneute Inkubation für 5min bei 4°C . Die Suspension wurde anschließend für 5min bei 8°C und $10000\times g$ zentrifugiert. Vom gebildeten Überstand wurden $380\mu\text{l}$ abgenommen und mit $380\mu\text{l}$ Lösung D versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurde das Reaktionsgefäß für 15min bei 15°C und $10000\times g$ abzentrifugiert. $700\mu\text{l}$ des Überstandes wurden mit $420\mu\text{l}$ Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA für 10min bei -20°C gefällt. Das Reaktionsgefäß wurde dann für 10min bei 8°C und $1000\times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mit $300\mu\text{l}$ Ethanol (70%) für 5min bei 8°C und $10000\times g$

gewaschen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac Concentrator SVC100H der Firma Savant) bis zum vollständigen Verflüchtigen des Ethanol getrocknet und in 50µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels photometrischer Extinktionsbestimmung bei 260nm.

Lösung A:	25 mM	Tris, pH 8,0
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	50 mM	Glucose
	steril-filtrieren	
Lösung B:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Lösung C (11):	600 ml	5M Kaliumacetat
	115 ml	Eisessig
Lösung D:	7,5 M	Ammoniumacetat

2.1.4 Amplifikation von Sequenzteilen der *pPLA-I* und Sequenzierung

Die zur Verfügung stehende cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus extrahierter RNA und die aus der Phagenbank CD4-16 isolierte *pPLA-I*-haltige Plasmid-DNA konnten nun für die Sequenzierung weiterverwendet werden. Hierzu wurden zunächst vier überlappende Sequenzteile der *pPLA-I* amplifiziert (s. Tab. 4 und 5). Dies erfolgte mittels pfu-Proofreading-Polymerase der Firma Promega (Katalog-Nr. M7741).

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.1.2) um die erfolgte Amplifikation zu überprüfen. Das gebildete Fragment konnte dann entweder aus dem Gel extrahiert oder direkt aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt werden (jeweils Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Katalog-Nr. A1460).

Die Sequenzierung der aufgereinigten *pPLA-I*-Fragmente wurde mittels diverser Sequenzierprimer durch die Firma SeqLab durchgeführt (verwendete Sequenzierprimer für die jeweiligen Teilamplifikate s. Anhang). Die erhaltenen Sequenzen wurden untereinander, sowie mit der *pPLA-I*-Sequenz aus NCBI und der genomischen *pPLA-I*-Sequenz aus dem Klon F8K4 auf Nukleotid- und Proteinebene verglichen. Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche oder Unterschiede in der Exon/Intron-Struktur konnten so ermittelt werden. In Tab. 6 sind die verwendeten Primer und

Amplifikate zur vollständigen Sequenzierung der *pPLA-I* aus den Ökotypen Wassilijewskia und Columbia aufgeführt.

Tabelle 4: PCR-Mix zur Amplifikation der vier Sequenzteile von *pPLA-I* mittels *pfu*-Polymerase

PCR-Komponente	Volumen
10x- <i>pfu</i> -Puffer	5,0 μ l
dNTP's (10mM)	1,0 μ l
forward-Primer (10mM)	3,0 μ l
reverse Primer (10mM)	3,0 μ l
Template (cDNA, bzw. Plasmid-DNA CD4-16, c = 100ng/ μ l)	1,0 μ l
<i>pfu</i> -Polymerase (2,5u/ μ l)	0,5 μ l
destilliertes Wasser	36,5 μ l
Gesamtvolumen	50,0 μ l

Tabelle 5: Thermocycler-Programm zur Amplifikation der vier Sequenzteile der *pPLA-I*

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95°C	2min	1
Denaturierung	95°C	1min	35
Annealing	50°C	30s	
Elongation	68°C	2min	
Elongation	68°C	10min	1
Lagerung	4°C	∞	

2.2 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR dient der Ermittlung von Expressionsraten von Genen. Hier wurde die Expressionsrate der zwei unterschiedlichen Splicingvarianten der *pPLA-I* in den Ökotypen Wassilijewskia und Columbia mittels der komparativen C_t -Methode ($\Delta\Delta C_t$) untersucht. Dadurch sollte zum einen festgestellt werden, in welchem Verhältnis die gefundene fehl-gespleiste Sequenzvariante der *pPLA-I* ohne Exon 7 (*pPLA-I (-Exon7)*) im Vergleich zur vollständigen cDNA-Sequenz der *pPLA-I* exprimiert wird.

Hierzu wurden Primerpaare entwickelt, mit deren Hilfe die Expressionsrate von Exon 7 im Vergleich zu Sequenzabschnitten ermittelt werden sollte, die bei beiden RNA-Sequenzvarianten identisch sind. Hierfür wurde die Software Primer 3 verwendet. Es wurden jeweils 8 Primerpaare für identische Sequenzabschnitte aus dem N-terminalen und C-terminalen Sequenzbereich, sowie 6 Primerpaare für Exon7 auf ihre Primereffizienz hin untersucht. Um festzustellen, ob die Primerpaare unter den in der Realtime-PCR gegebenen Bedingungen ausschließlich das spezifische Fragment oder auch unspezifische Fragmente amplifizieren, wurde eine PCR mit cDNA aus 7 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen durchgeführt und das PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 2.1.3). Wurde ausschließlich ein Fragment spezifischer Größe amplifiziert, konnten die Primerpaare für einen Primereffizienztest weiterverwendet werden. Für den Primereffizienztest wurden Verdünnungsstufen von Plasmid-DNA verwendet, die die jeweils zu amplifizierenden Sequenzteile enthielten. Für die Primerpaare aus den N- und C-terminalen Sequenzbereichen konnte die *pPLA-I*-haltige Plasmid-DNA aus dem CD4-16-Klon verwendet werden. Für die Überprüfung der Exon7-Primerpaare wurde ein Exon7-haltiges Fragment aus der cDNA der *pPLA-I* in *E. coli* transformiert und die Plasmid-DNA gewonnen. Dann wurde ein Primereffizienztest mittels Verdünnungsstufen der *pPLA-I*-haltigen Plasmid-DNAs durchgeführt. Je Primergruppe wurde ein Primerpaar mit der besten Primereffizienz für die quantitative Realtime-PCR ausgewählt. Dann wurden Wassilijewskia und Columbia Wildtyp-Keimlinge angezogen und deren RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA transkribiert, welche dann für die Realtime-PCR eingesetzt werden konnte. Die Auswertung der aus der Realtime-PCR erhaltenen Messwerte erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode und der Auswertungssoftware REST 2009.

2.2.1 Herstellung von pPLA-I Exon7 / pENTRY221 als Template für den Primereffizienztest

Für die N- und C-terminalen Sequenzabschnitte konnte der Klon CD4-16 als Template für den Primereffizienztest verwendet werden. In diesem ist Exon 7 jedoch nicht enthalten. Daher musste ein zusätzliches, Exon7-haltiges Template hergestellt werden. Zur Herstellung von Exon7-haltiger Plasmid-DNA wurde ein ca. 1500bp langes Sequenzstück der *pPLA-I* mittels B1- pPLA-I Exon7 -B2-Primern amplifiziert (Amplifikationsbedingungen s. 2.1.6). Dieses beinhaltete die vollständige Sequenz von Exon7. Das gebildete Amplifikat wurde mittels 30% PEG 8000 / 30mM MgCl₂ aufgereinigt. Der DNA-Gehalt des aufgereinigten Fragmentes und des Vektors pDONR221 wurden mittels Gelelektrophorese bestimmt (s. 2.1.3) und ein BP-Klonierungsansatz pipettiert (s. Tab. 6). Die DNA-Molarität von Vektor und Amplifikat sollten dabei jeweils ca. 50fmol betragen. Das

entspricht in Abhängigkeit von der Sequenzlänge einem DNA-Gehalt von 150ng für pDONR221 und ca. 60ng für B1-Exon7-B2.

Tabelle 6: BP-Klonierungsansatz zur Klonierung von B1- pPLA-I Exon7-B2 in pDONR221

BP-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
pDONR221	1µl	150ng/µl	150ng
B1-pPLA-I Exon7-B2	1µl	60ng/µl	20ng
TE-Puffer (pH 8,5)	6µl	-	-
BP-Clonase	2µl	-	-
Gesamtvolumen	10µl		

Der BP-Klonierungsansatz wurde für 16h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10min bei 37°C inkubiert, um die BP-Clonase (Invitrogen, Katalog-Nr. 11789-020) zu inaktivieren. 1µl des Ansatzes wurde in 50µl Stbl2-Zellen (Invitrogen, Katalog-Nr. 10268-019) pipettiert und der Transformationsansatz für 30min auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Hitzeschock-Transformation für 25s bei 42°C. Der Ansatz wurde mit 250ml SOC-Medium versetzt und für 90min bei 225rpm und 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf Selektionsagar mit 50µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C in selektivem LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde für eine Kontroll-PCR mit M13-Primern, sowie für eine Kontroll-Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verwendet. Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde zur Sequenzierung an die Firma Peqlab versandt. Das gewonnene Plasmid konnte anschließend für einen Primereffizienztest der Exon7-Primerpaare verwendet werden.

2.2.2 Ermittlung der Primereffizienz

Von Primerpaaren, die bei der Standard-PCR ausschließlich Fragmente spezifischer Größe amplifizierten und deren Negativkontrolle in der Realtime-PCR keinen Hinweis auf unspezifische Amplifikate oder Wechselwirkungen der Primer untereinander lieferten, wurde die Primereffizienz ermittelt. Diese sollte zwischen 0,8 und 1,2 liegen und für einen Vergleich der drei Sequenzbereiche unter den ausgewählten Primerpaaren möglichst ähnlich sein. Für die Überprüfung der N- und C-terminalen Primerpaare wurde die aus dem Phagenklon CD4-16 isolierte Plasmid-DNA verwendet.

Als Template für die Exon7-Primerpaare diente die hergestellte Exon7-haltige Plasmid-DNA. Die Realtime-PCR wurde mit dem Gerät StepOne Plus der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Amplifikationsbedingungen wurden mittels der Software StepOne Software v2.0 bestimmt. Es wurden jeweils sechs Verdünnungsstufen der Plasmid-DNA von 100ng/Reaktion bis 0.001ng/Reaktion verwendet (s. *Tab. 7*). Parallel zu den Verdünnungsstufen wurde in der Realtime-PCR auch eine Kontrollamplifikation ohne Template (Negativkontrolle) durchgeführt. Eine gemessene Zyklenzahl unterhalb des Richtwertes von 31 lässt dabei auf Wechselwirkungen der Primer untereinander schließen (z. B. Dimerisierung). Da die tatsächlichen Amplifikationszahlen in diesem Fall nicht berechnet werden können, wurden Primerpaare mit einer Zyklenzahl unterhalb von 31 nicht für die Ermittlung der Primereffizienz weiterverwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der Power SYBR[®]Green PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (Katalog-Nr.: 4367659) verwendet. Die Amplifikationsbedingungen der Realtime-PCR sind *Tab. 8* und *9* zu entnehmen.

Tabelle 7: DNA-Gehalt der einzelnen Verdünnungsstufen der Plasmid-DNA in der Realtime-PCR

Verdünnungsstufe	Konzentration Plasmid-DNA
10 ²	100 ng/μl
10 ¹	10 ng/μl
10 ⁰	1 ng/μl
10 ⁻¹	0,1 ng/μl
10 ⁻²	0,01 ng/μl
10 ⁻³	0,001 ng/μl

Tabelle 8: Anzahl der Zyklen und Inkubationszeiten der Realtime-PCR

Anzahl Zyklen	Temperatur	Inkubationszeit	Schritt
1	95°C	10min	Holding stage
40	95°C	15s	Cycling stage
	60°C	1min	
1	95°C	15s	Melt curve stage
1	60°C	1min	
1	95°C	15s	

Tabelle 9: Komponenten der Realtime-PCR und eingesetzte Volumina

Komponente	Volumen in μl für eine Reaktion
SYBR Green Master Mix (2x)	5
forward Primer (c = 10pmol/ μl)	0.20
reverse Primer (c = 10pmol/ μl)	0.20
Plasmid-DNA Verdünnungsstufe (100ng – 0.0001ng)	1
HPLC-Wasser	3,6
Gesamtvolumen Reaktion	10

Aus den erhaltenen C_t -Werten wurde anschließend die Amplifikations-Effizienz jedes Primerpaares berechnet. Hierzu wurden die C_t -Werte der einzelnen Verdünnungsstufen in einen logarithmischen Graphen eingezeichnet und eine Trendlinie eingefügt. Die Steigung dieser Geraden wurde in die folgende Formel eingesetzt: $E(\text{ffizienz}) = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$

Die Primereffizienz sollte dabei zwischen 0,8 und 1,2 liegen. Zudem sollte darauf geachtet werden, dass die verwendeten Negativkontrollen in der Realtime-PCR keinen ermittelbaren C_t -Wert besitzen, oder der C_t -Wert über 31 liegt.

Anhand der kalkulierten Ergebnisse aller Primerpaare wurde für den C- und N-terminalen Bereich, sowie für das Exon7 jeweils ein Primerpaar ausgewählt.

2.2.3 qPCR-Analyse der Expressionsraten der Splicingvarianten

Für die Ermittlung der Expressionsrate von *pPLA-I (-Exon7)* im Vergleich zur vollständigen *pPLA-I*-Sequenz wurden die ausgewählten Primerpaare in einer Realtime-PCR zusammen mit verschiedenen endogenen Genen getestet. Hierzu wurde von 7 Tage alten Keimlingen der Ökotypen Wassilijewskia und Columbia RNA isoliert und in cDNA umgewandelt (s. 2.1.1). Verdünnungsstufen von 1000ng – 0.0001ng cDNA je Reaktion wurden eingesetzt.

Nach erfolgter Realtime-PCR wurden zunächst die Negativkontrollen auf einen C_t -Wert von über 31 hin untersucht. Dann wurde von den verwendeten endogenen Genen eines als Referenzgen (Ubiquitin) für die weitere Berechnung ausgewählt. Das Referenzgen sollte dabei in seinem C_t -Wert dem Testgen möglichst ähnlich sein. Auch sollte der Wert zwischen den Messungen für RNA aus Wassilijewskia und Columbia und in den drei obligatorischen Wiederholungen möglichst wenig

schwanken. Je Primerpaar und Ökotyp wurden drei biologische Wiederholungen mit jeweils drei technischen Wiederholungen durchgeführt. Die Berechnung der Expressionsrate erfolgte mittels direktem Vergleich der C_t -Werte anhand der folgenden Formel:

$$\Delta C_t(\text{Probe}) = \Delta C_t(pPLA-I\text{-Exon7}) - \Delta C_t(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta C_t(\text{Calibrator}) = \Delta C_t(pPLA-I\text{ cDNA}) - \Delta C_t(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Probe}) - \Delta C_t(\text{Calibrator})$$

Der berechnete Genexpressionslevel der zu untersuchenden Probe entspricht dann $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Die Expressionsraten der einzelnen Sequenzabschnitte wurde mittels der Software REST 2009 ermittelt (Pfaffl *et al.*, 2002).

2.2.4 qPCR-Analyse des Einflusses von Licht auf die *pPLA-I*-Expression

Da Vorversuche mit den *pPLA-I*-Knockoutmutanten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der *pPLA-I* am Auxinsignalweg, bzw. am Lichtsignalweg geben, wurde im folgenden überprüft, ob die RNA-Expressionsrate der *pPLA-I* durch unterschiedlichen Lichtbedingungen oder eine veränderte Auxinkonzentration im Gewebe verändert wird.

Hierfür wurden Keimlinge des *Wassilijewskia* Wildtyp 7 Tage lang auf $\frac{1}{2}$ MS, 1% Agar angezogen. Belichtet wurden sie dabei täglich für 16h mit Weißlicht gefolgt von mit darauffolgender 8h Dunkelheit. Nach der siebten Dunkelphase im Übergang zur Lichtphase wurden die Keimlinge nach definierten Inkubationszeiten (0min / Beginn der Belichtung, 15min, 30min, 60min, 90min, 120min, 150min, 180min und 300min) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde eine RNA-Extraktion durchgeführt.

Umgekehrt wurden in einem weiteren Versuchsaufbau die Keimlinge nach Ende der siebten Lichtphase im Übergang zur Dunkelphase (0min = Beginn der Dunkelheit) nach denselben Inkubationszeiten in Dunkelheit in flüssigem Stickstoff eingefroren und eine RNA-Extraktion nach der Trizol-Methode durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst 50 – 100mg Pflanzenmaterial zusammen mit vier Mahlkugeln in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in der Schüttelmühle bei höchster Stufe bis zu acht mal 3 min lang gemahlen, bis ein feines Pulver entstand. Dabei war darauf zu achten, dass die Proben zwischen den einzelnen Mahlschritten jeweils in flüssigen Stickstoff getaucht wurden, um ein Auftauen der Proben zu

verhindern. Dann wurde sofort 1ml eiskaltes Trizol-Reagenz (Invitrogen, Katalog-Nr. 15596-018) je 100mg Pflanzenmaterial hinzu pipettiert und gründlich gevortext. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5min. Die Zelltrümmer wurden bei 12000xg für 10min abzentrifugiert und der Überstand in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200µl Chloroform hinzu pipettiert und für 15s gevortext. Der Ansatz wurde erneut für 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert und für 15min bei 12000xg abzentrifugiert. Die klare, obere Phase wurde abpipettiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut für 10min bei 12000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal für 10min bei 10000xg in 70% Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde abpipettiert und das Reaktionsgefäß zusätzlich für 5min bei 45°C im Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde in 50µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert oder direkt für die cDNA-Synthese weiterverwendet. Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung mittels Safas SP2000 Spectrophotometer der Firma Monaco durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte wie in 2.1.1 beschrieben.

In den bisher durchgeführten Realtime-PCR's konnte festgestellt werden, dass die Amplifikationsraten der eingesetzten Ubiquitin-Primer und des ausgewählten Exon7-Primerpaares am dichtesten beieinander liegen. Daher wurde für die folgenden Versuchsreihen dieses Ubiquitin-Primerpaar als endogene Kontrolle verwendet. Die Realtime-PCR wurde wie in 2.2.3 beschreiben durchgeführt.

2.3 Lokalisierungsstudien der pPLA-I mittels Immunolabeling

Ein Ansatz zur Lokalisierung der pPLA-I in *Arabidopsis* war das Immunolabeling mittels pPLA-I-spezifischer Antikörper im Whole Mount-Verfahren. Hierbei handelt es sich aufgrund der vorangehenden Fixierung des Gewebes um ein Verfahren zur *in situ* - Lokalisierung. Der eindeutige Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch schnell veränderliche Prozesse in Bezug auf die zelluläre Lokalisierung der pPLA-I genau festgehalten werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Eignung des Immunolabelings im Embedding-Verfahren überprüft. Hierbei wird nicht, wie im Whole Mount-Verfahren der gesamte Keimling unter dem Mikroskop betrachtet. Stattdessen wird der Keimling in ein Medium eingebettet und anschließend mittels Mikrotom in 6-10µM dicke Scheiben geschnitten. Der eindeutige Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Proben aufgrund der wesentlich geringeren Schichtdicke auch unter einem einfachen Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden können. Das Verfahren ist gut geeignet für

„robuste“ Pflanzenarten, wie z. B. Mais, welcher über ein solides Wurzelgewebe verfügt. *Arabidopsis*-Wurzels sind hingegen wesentlich empfindlicher gegenüber Verletzungen. So wurde in allen Versuchen das Gewebe beim Schneiden derart beschädigt, dass eine adäquate Erstellung von Mikroskopaufnahmen nicht möglich war. Getestet wurde das Verfahren mit verschiedenen Einbettungsmedien (Wachs, Paraffin, Technovit), jeweils mit gleichem Resultat.

Für das Immunolabeling war zunächst die Herstellung pPLA-I-spezifischer Antikörper angezeigt. Erste Versuche zur Herstellung eines pPLA-I-spezifischen Antikörpers mittels der gesamten pPLA-I-Proteinsequenz schlugen fehl. Die Verwendung von Sequenzteilen der pPLA-I wurde daher als vielversprechender bezüglich der Bildung spezifischer Antikörper angesehen. Auch wurde in die Überlegungen zur Antikörperherstellung einbezogen, dass die Sequenzanalyse zwei verschiedene Sequenzvarianten der *pPLA-I* aufzeigte, von denen die aus dem CD4-16-Klon stammende Variante durch das Fehlen von Exon 7 einen Abbruch der Aminosäuresequenz bei 435 AS aufwies. Um aufzuklären, wo im Gewebe die vollständige und die verkürzte Proteinvariante lokalisiert sind und wie stark sie exprimiert werden, sollten zwei verschiedene Antikörper hergestellt und für das Immunolabeling verwendet werden.

Bei dem einen Antikörper handelt es sich um einen Peptidantikörper aus einem N-terminalen Sequenzbereich, der beide Sequenzvarianten detektieren sollte. Die Auswahl einer geeigneten Sequenz, Antikörperproduktion und Aufreinigung aus dem Antiserum erfolgten dabei über die Firma Eurogenetec.

Der zweite Antikörper sollte spezifisch nur die vollständige Sequenzvariante von pPLA-I detektieren. Hierfür wurde eine 480kb lange, C-terminale Nukleinsäuresequenz, die aus dem letzten Exon gebildet wird (*pPLA-I Exon18*), ausgewählt und mittels spezifischer Gateway-Primer amplifiziert. Das Amplifikat wurde dann in einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR221 kloniert. Nach Ermittlung eines positiven Klons mittels spezifischer PCR, Kontrollspaltung und Sequenzierung wurde eine LR-Reaktion mit dem Proteinexpressionsvektor pGEX-2TM-GW durchgeführt. Erneut wurde ein Screening auf positive Klone durchgeführt. Ein Klon mit korrekter Nukleinsäuresequenz von *pPLA-I Exon18* wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Mittels IPTG wurden die transformierten Zellen dann zur Expression eines pPLA-I Exon18-His-Tag-Fusionsproteins induziert. Das gebildete Protein wurde mittels denaturierender Aufreinigung über Ni-NTA-Säule aufgereinigt, durch Auftragen einer Probe des Eluates auf ein Proteingel auf Spezifität überprüft und zur Antikörperherstellung an die Firma Pineda übersandt. Proben des Antiserums wurden während des Immunisierungsverfahrens in regelmäßigen Zeitabständen mittels Immunoblot mit überexprimiertem Protein auf Antikörpergehalt und -spezifität hin untersucht. Eine

Aufreinigung des Antikörpers aus dem Antiserum war nicht notwendig, da eine Überprüfung des Serums mittels Immunolabeling von *ppla-I-1*- und *ppla-I-3*-Knockoutlinien keine unspezifischen Bindungen erkennen ließ. Die aufgereinigten Antikörper wurden dann für immunocytologische Studien weiterverwendet.

2.3.1 Herstellung von pPLA-I-spezifischen Antikörpern

Die Herstellung des N-terminalen Peptid-Antikörpers einschließlich der vorherigen Ermittlung einer geeigneten Sequenz und der Aufreinigung aus dem Serum wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Der gelieferte Peptid-Antikörper konnte direkt für immunocytologische Untersuchungen verwendet werden. Für die Herstellung des C-terminalen Antikörpers wurde zunächst wie folgt eine geeignete Sequenz ausgewählt:

- Für beide Antikörper musste zunächst eine sorgfältige Epitopanalyse durchgeführt werden, um eine geeignete Protein-, bzw. Peptidsequenz für die Antikörperherstellung zu ermitteln.
- Sequenzen, die Signaltriplette für eine mögliche N-Glykosylierung (NXT, NXS) enthalten, sollten bei Membran-gebundenen bzw. Membran-assoziierten Proteinen für die Antikörpergewinnung nicht eingesetzt werden.
- Für den erfolgreichen Einsatz von Peptid-Antikörpern ist außer der Lokalisierung der Peptidsequenz an der Proteinoberfläche eine möglichst große Bindungskraft (Avidität) des Antikörpers erforderlich. Das Vorhandensein von mehreren positiv und/oder negativ geladenen Aminosäuren in der Peptidsequenz hat sich in diesem Zusammenhang als sinnvoll erwiesen. Daher wurde die pPLA-I-Peptidsequenz auf das Vorhandensein solcher Anhäufungen positiver oder negativer Ladungen hin untersucht.
- Aufgrund der genannten Parameter wurde aus einer Reihe geeigneter Sequenzen eine 480kb lange C-terminale Sequenz, welche aus dem letzten Exon der *pPLA-I* besteht, ausgewählt (*pPLA-I Exon18*).
- Für die spätere Bindung des Antikörpers am Protein ist eine Lokalisierung der Bindungsstelle an der Proteinoberfläche notwendig. Die Analyse der pPLA-I-Sekundärstruktur für die Ermittlung möglicher Epitope des C-terminalen Antikörpers basiert auf der von Parker *et al.* (1986) veröffentlichten Methode. Dabei wurden verschiedene Algorithmen eingesetzt:

- 1) Hydrophilicity scale (Parker *et al.*, 1986)

- 1) Accessibility scale (Janin, 1979)
- 2) Bulk hydrophobic scale (Karplus und Schulz, 1985)

Mit Hilfe dieser Algorithmen wurde ein zusammengesetztes Oberflächenprofil des Proteins erstellt. Aminosäuresequenzen, die dabei hohe Peaks ergeben, wurden als geeignet für die Gewinnung von Antikörpern bewertet (Peaks oberhalb von 50% über dem Mittelwert der jeweiligen Skala für das untersuchte Protein).

In *Abb. 9* ist die Lage der für die Antikörper-Herstellung ausgewählten Sequenzen dargestellt.



Abbildung 9: Lage des N-terminalen und des C-terminalen Antikörpers innerhalb der genomischen Sequenz der pPLA-I. Die ausgewählte Sequenz zur Herstellung des N-terminalen Peptid-Antikörpers befindet sich in Exon3, während für die Herstellung des C-terminalen Antikörpers die Sequenz des gesamten letzten Exons (Exon 18) ausgewählt wurde.

2.3.1.1 Herstellung eines pPLA-I-Exon18-His-Tag-Peptids, Überexpression in *E. coli* und Peptidaufreinigung

Die ausgewählte Sequenz wurde mittels spezifischer B1-pPLA-I Exon18-B2-Primer unter Verwendung von pfu-Proofreading-Polymerase der Firma Promega (Katalog-Nr. M7741) amplifiziert. Als Template diente der Phagen-Klon CD4-16, welcher zunächst in *E. coli* inseriert wurde. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gewonnen und in der PCR eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen sind in *Tab. 10* und *11* beschrieben.

Das gebildete Amplifikat wurde mittels 30% PEG 8000 / 30mM MgCl₂ aufgereinigt. Der DNA-Gehalt des aufgereinigten Fragmentes und des Vektors pDONR221 wurden mittels Gelelektrophorese bestimmt und ein BP-Klonierungsansatz pipettiert (s. *Tab. 12*). Die DNA-Molarität von Vektor und Amplifikat sollten dabei jeweils ca. 50fmol betragen. Das entspricht in Abhängigkeit von der Sequenzlänge einem DNA-Gehalt von 150ng für pDONR221 und ca. 20ng für B1-pPLA-I Exon18-B2.

Tabelle 10: PCR-Mix zur Amplifikation von B1- pPLA-I Exon18-B2 mit pfu-Polymerase

PCR-Komponente	Volumen
10x-pfu-Puffer	5,0 µl
dNTP's (10mM)	1,0 µl
B1- pPLA-I Exon18-B2_for (10mM)	3,0 µl
B1- pPLA-I Exon18-B2_rev (10mM)	3,0 µl
Template (Plasmid-DNA CD4-16, 100ng/µl)	1,0 µl
pfu-Polymerase (2,5u/µl)	0,5 µl
destilliertes Wasser	36,5 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

Tabelle 11: Thermocycler-Programm zur Amplifikation von B1- pPLA-I Exon18 -B2

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95°C	2min	1
Denaturierung	95°C	1min	35
Annealing	50°C	30s	
Elongation	68°C	1min	
Elongation	68°C	10min	1
Lagerung	4°C	∞	

Tabelle 12: BP-Klonierungsansatz zur Klonierung von B1- pPLA-I Exon18-B2 in pDONR221

BP-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
pDONR221	1µl	150ng/µl	150ng
B1- pPLA-I Exon18-B2	1µl	20ng/µl	20ng
TE-Puffer (pH 8,5)	6µl	-	-
BP-Clonase	2µl	-	-
Gesamtvolumen	10µl		

Der BP-Klonierungsansatz wurde für 16h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10min bei 37°C inkubiert, um die BP-Clonase (Invitrogen, Katalog-Nr. 11789-020) zu inaktivieren. 1µl des Ansatzes wurde in 50µl Stbl2-Zellen (Invitrogen, Katalog-Nr. 10268-019) pipettiert und der Transformationsansatz für 30min auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Hitzeschock-Transformation für 25s bei 42°C. Der Ansatz wurde mit 250ml SOC-Medium versetzt und für 90min bei 225rpm und 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf

Selektionsagar mit 50µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C in selektivem LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde für eine Kontroll-PCR mit M13-Primern, sowie für eine Kontroll-Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verwendet. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde zur Sequenzierung an die Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) versandt.

Der hergestellte Entry-Vektor L1-pPLA-I Exon18-L2-pDONR221 wurde für eine LR-Klonierung mit dem Proteinexpressionsvektor pGEX-2TM-GW verwendet. Im Klonierungsansatz sollten jeweils 150ng DNA der beiden Vektoren eingesetzt werden. Der DNA-Gehalt der Vektoren wurde mittels Gelelektrophorese ermittelt und ein LR-Klonierungsansatz pipettiert (s. *Tab. 13*). Der LR-Klonierungsansatz wurde für 16h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10min bei 37°C inkubiert, um die LR-Clonase (Invitrogen, Katalog-Nr.11791-020) zu inaktivieren. 1µl des Ansatzes wurde in 50µl Stbl2-Zellen (Invitrogen, Katalog-Nr. 10268-019) pipettiert und der Transformationsansatz für 30min auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Hitzeschock-Transformation für 25s bei 42°C. Der Ansatz wurde mit 250ml SOC-Medium versetzt und für 90min bei 30°C und 225rpm geschüttelt. Die Kultur wurde auf Selektionsagar mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 30°C in selektivem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mittels eine Kontroll-PCR mit Exon18-Primern auf Spezifität überprüft.

Tabelle 13: LR-Klonierungsansatz zur Klonierung von B1-pPLA-I Exon18-B2 in pGEX-2TM-GW

LR-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
L1- pPLA-I Exon18-L2/pENTRY221	1µl	150ng/µl	150ng
pGEX-2TM-GW	1µl	150ng/µl	150ng
TE-Puffer (pH 8,5)	6µl	-	-
LR-Clonase	2µl	-	-
Gesamtvolumen	10µl		

Die hergestellte Plasmid-DNA wurde für die Transformation in BL21-Zellen verwendet. 1µl Plasmid-DNA wurde dazu in 50µl BL21-Zellen pipettiert, der Ansatz für 30min auf Eis gelagert und eine Hitzeschock-Transformation für 30s bei 42°C durchgeführt. 250ml LB-Medium wurden

zum Transformationsansatz pipettiert und für 60min bei 30°C und 225rpm geschüttelt. Die Kultur wurde auf Selektionsagar mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 30°C in selektivem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin angezogen.

Mittels der so erhaltenen Kultur wurde eine Protein-Expression des pPLA-I-His-Tag-Peptids durchgeführt. 10ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden dazu mit dem ausgewählten Klon angeimpft und über Nacht bei 180rpm und 30°C inkubiert. 1ml der Vorkultur wurde in 250ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin pipettiert und die Kultur bei 30°C und 180rpm bis zu einer OD von 0,5 – 0,8 angezogen. Anschließend wurde durch Zugabe von 250µl IPTG (1mM) die Überexpression von pPLA-I Exon18 mit His-TAG induziert. Das Medium wurde weitere 3h bei 30°C und 180rpm inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in GSA-Röhrchen überführt und im GSA-Rotor für 12min bei 12000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gebildete Bakterienpellet für eine erste Lyse der Bakterien über Nacht eingefroren.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung. Dabei war eine denaturierende Reinigung des rekombinanten Proteins notwendig, da dieses nach der Überexpression im Sediment in Form von Inclusion Bodies vorliegt, so dass eine native Aufreinigung nicht möglich ist. Es erfolgte zunächst eine mechanische Lyse mittels French Press. Im Weiteren wurden denaturierende (chaotrophe) Puffer (Guanidinhydrochlorid) zum Lösen des Proteins verwendet. Die eigentliche Aufreinigung erfolgte dann mittels Ni-NTA-Säule im Batch-Verfahren.

Hierzu wurde zunächst je 7,5ml Lysis-Puffer A, sowie 1mg/ml Lysozym und 10µg/ml DNaseI zu Zellsediment aus 125ml ü.N.-Kultur gegeben. Das Sediment wurde auf dem Vortexer resuspendiert und für 1h auf Eis inkubiert. Es folgte ein Aufschluss in der French Press bei 1000psi. Anschließend wurde der Ansatz für 10min bei 4°C und 12000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5ml Lysis-Puffer B resuspendiert. Über Nacht wurden die Inclusion Bodies bei 4°C vollständig gelöst. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10min bei 12000xg und 4°C. Der Überstand wurde in ein 15mL Sarstedt-Röhrchen überführt und mit MgSO₄ zu einer Gesamtkonzentration von 10mM aufgefüllt. Hierdurch sollte das EDTA chelatisiert werden. Dann wurde die Proteinlösung mit 500µl Ni-NTA-Säulenmaterial versetzt und auf dem Schüttler für 30min bei 160rpm auf Eis inkubiert, um das fusionierte His-tag des Zielproteins an die Matrix zu binden. Anschließend wurde die Suspension in ein konisches Zentrifugenglas überführt und für 1min bei 4°C und 2000xg in der Heraeus Biofuge (Rotor HSA 4100) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA-Agarose in 5ml Puffer C resuspendiert. Der Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt und der Überstand erneut verworfen. Dann wurde die

Agarose in 0,5ml Puffer D resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Der Überstand mit dem gereinigten Eluat wurde abgenommen und der Elutionsschritt zweimal wiederholt. Nach Einstellen des gesammelten Eluates auf 2mM EDTA wurde es bei 4°C gelagert.

Die Überprüfung des Eluates auf das Vorhandensein des spezifischen pPLA-I Exon18-His-Tag-Fusionsproteins und den Reinheitsgrad erfolgte mittels SDS-PAGE (s. 2.3.1.2). Zuvor wurde das in der Proteinlösung befindliche Guanidinhydrochlorid mittels TCA-Fällung entfernt, da es ansonsten Präzipitate mit SDS bilden würden.

Lysis-Puffer A:	25 mM	Tris, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	10 mM	β-Mercaptoethanol
Lysis-Puffer B:		Lysis-Puffer A
	4 M	Guanidin-HCl
Puffer C:	25 mM	Tris, pH 8,0
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	1 M	Guanidin-HCl
Puffer D:	25 mM	Tris, pH 8,0
	500 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	4 M	Guanidin-HCl

Für die TCA-Fällung wurde die Guanidinhydrochlorid-haltige Proteinlösung 1:20 mit Wasser und mit dem gleichen Volumen 10-prozentigem TCA versetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 20min bei 4 °C und eine Zentrifugation für 15min bei 12000xg. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 10µL eiskaltem Ethanol gewaschen. Dann wurde für weitere 10min bei 12000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend für die SDS-Gelelektrophorese weiterverwendet.

2.3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Sie besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zum Gießen des Geles wurde zunächst die Gießvorrichtung

aufgebaut. Anschließend wurde das Trenngel zusammen pipettiert und in die Kammer zwischen die Glasscheiben gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und zum Polymerisieren des Acrylamids ca. 45min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde zusammen pipettiert und zwischen die Glasscheiben über das Trenngel gegossen. Dann wurde ein Kamm in die Kammer zwischen die Glasscheiben eingesetzt. Nach weiteren 45min bei Raumtemperatur war das Sammelgel polymerisiert und konnte in die Elektrophoresekammer überführt werden. Diese wurde mit Tris-Glycin-Puffer befüllt. Dann wurde der Kamm entfernt. Die Proteinproben wurden zunächst für 10min gekocht, 1 : 1 mit Probenpuffer vermischt und dann in die Geltaschen pipettiert. Aufgetragen wurden Proben der einzelnen Reinigungsschritte bis zur Gewinnung des Eluats. Die Auftrennung erfolgte bei 140V, 100mA, 15W für ca. 1,5h.

9 %iges Trenngel (20ml):	6,67 ml 2,67 ml 4,50 ml 6,05 ml 10,0 µl 100,0 µl	3 x Gelpuffer Glycerin (88 %) Acrylamid-Lösung 1 dH ₂ O TEMED APS (10%)
3 %-iges Sammelgel (6,5 ml):	1,6 ml 0,86 ml 4,0 ml 4,0 µl 40,0 µl	3 x Gelpuffer Acrylamid-Lösung 2 dH ₂ O TEMED APS (10%)
1 x Probenpuffer:	62 mM 20 % 10 % 10 % mit einigen Tropfen Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt	Tris, pH 6,8 Glycerin β-Mercaptoethanol SDS
Acrylamid-Lösung 1:	40 % 1,6 %	Acrylamid Bisacrylamid
Acrylamid-Lösung 2:	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid
10 x Tris-Glycin-Puffer (1l):	30,3 g 14,4 g 0,1 %	Tris, pH8,3 Glycin SDS (10%)

Anschließend erfolgte die Silberfärbung. Es wurde eine durch Nesterenko *et al.* (1994) modifizierte Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Dazu wurde das Gel mit den aufgetrennten

Proteinen in 60ml Aceton-Lösung (50%) mit 1,5ml Trichlor-Essigsäure-Lösung (50%) und 25µl Formaldehyd für 5min geschwenkt. Dann wurde es dreimal 5s mit destilliertem Wasser gespült, 5min geschwenkt und wieder dreimal 5s gespült. Es folgte eine Inkubation in Aceton-Lösung für 5min. Anschließend wurde das Gel für 1min in 60ml destilliertes Wasser mit 100µl Natriumthiosulfatlösung (10%) überführt und erneut dreimal 5s gespült. Als nächstes wurde es in 60ml destilliertem Wasser mit 0,8ml Silbernitrat-Lösung (20%) und 0,6ml Formaldehyd für 8min inkubiert. Nach zweimaligem Spülen für 5s wurde das Gel in Entwicklerlösung inkubiert, bis die gewünschte Färbung eintrat. Um den Entwicklungsvorgang zu beenden, wurde es für 30s in Eisessig (1%) inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Die Konzentration und Reinheit des aufgereinigten Proteins wurde anhand des gefärbten SDS-Gels beurteilt.

2.3.1.3 Konzentration des aufgereinigten Proteins und Proteinbestimmung nach Bradford

Das aufgereinigte Protein wurde bis zu einer Konzentration von 1mg/ml aufkonzentriert. Hierzu wurden Centricon YM-10 Zentrifugenfilter der Firma Millipore (Katalog-Nr. 4241) verwendet. Die befüllten Centricon wurden dabei so lange bei 5000xg zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration an Proteinlösung erreicht war. Überprüft wurde der Proteingehalt der Lösung dabei regelmäßig mittels Bradford-Assay.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde 1µl aufkonzentrierte Proteinlösung in eine Küvette pipettiert und auf 1ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Eine zweite Küvette wurde mit 1ml destilliertem Wasser als Nullprobe befüllt. In weitere Küvetten wurden je 1µl BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin) steigender Konzentrationen im Bereich von 0,5mg/ml bis 2mg/ml pipettiert und ebenfalls mit destilliertem Wasser auf 1ml aufgefüllt. Diese BSA-Konzentrationsreihe diente der Erstellung einer Kalibrierungskurve. Dann wurde in jede Küvette 1 ml Bradford-Reagenz hinzupipettiert, gut gemischt und für 5min im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 595nm mittels Safas SP2000 Spectrophotometer der Firma Monaco. Aus der gemessenen Extinktion konnte mittels der erstellten Kalibrierungskurve graphisch oder durch Interpolation der Proteingehalt der Probe ermittelt werden. Wurde für das gereinigte Antigen eine Konzentration von 1mg/ml oder mehr festgestellt, konnte dies zur Antikörperherstellung an die Firma Pineda Antikörperservice übersandt werden. Für die Immunisierung eines Kaninchens war dabei ein Volumen von ca. 500µl notwendig. Da zwei Kaninchen immunisiert werden sollten, wurde demnach 1ml Proteinlösung verwendet.

BSA-Lösungen:	0,5 – 2	mg/ml	BSA
Bradford-Reagenz:	100	mg/l	Coomassie Brilliant Blue G-250
	50	ml	Ethanol (96 %)
	100	m	H ₃ PO ₄ (85 %)
			mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen und über Papierfilter (Schleicher & Schull) filtrieren

2.3.1.4 Überwachung des Immunisierungsprozesses mittels Immunoblot

Der Immunisierungserfolg mit dem pPLA-I Exon18-Antigen wurde mittels Serumproben der zwei Kaninchen vom 120., 150. und 165. Immunisierungstag überprüft. Dazu wurden jeweils 5µl des pPLA-I-His-Tag-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.3.1.2) und das Gel für einen Westernblot weiterverwendet. Dieser wurde mit einer Verdünnung des Antiserums und anschließend mit einem Biotin-markierten anti-rabbit-Antikörper behandelt. Die Biotinfärbung ließ dann Rückschlüsse auf den Immunisierungsfortschritt zu, so dass über die Gesamtlänge des Immunisierungszeitraums entschieden werden konnte.

Für den Immunoblot wurden zunächst vier Whatman-Filter und ein Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schull Membranfilter, 0,2µm, 150 x 200mm, BA 83) auf die Größe des Proteingels zugeschnitten. Dann wurden sie je 1min in destilliertem Wasser und Transfer-Puffer vorbehandelt. Anschließend wurde die Western Blot - Kammer mit Transfer-Puffer befüllt und der Western Blot zusammengestellt. Auf die Einspannvorrichtung wurden zunächst 2 Lagen Whatman-Filter gelegt, darauf das Proteingel, dann die Nitrocellulose-Membran und 2 weitere Lagen Whatman-Filter. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen oder Verunreinigungen zwischen die Lagen gelangt sind. Die Einspannvorrichtung wurde geschlossen und in die Western Blot - Kammer eingehängt. Es wurde ein Strom von 50mA angelegt und über Nacht (ca. 20h) geblottet. Dann wurde die Nitrocellulose-Membran aus der Blot-Vorrichtung entnommen und für 30min in TTBS inkubiert.

Der so vorbehandelte Western Blot wurde zunächst über Nacht bei 4°C in Antiserum-Lösung inkubiert. Hierzu wurden 2µl der jeweiligen Antiserum-Probe in 20ml TTBS-Puffer mit 5%BSA gelöst. Die Verdünnung 1:10000, sowie das inkubieren über Nacht dienten dabei dem möglichst effektiven Binden des spezifischen Antikörpers an das Protein, ohne dass unspezifische Bindungen eintraten.

Es folgte die Färbung mit Vectastain (Vector laboratories, Katalog-Nr. BA-1000). Hierzu wurde der

Filter für 3 x 10min mit 100ml TTBS gewaschen. Dann wurde die Lösung mit dem sekundären Antikörper angesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde entsprechend der Immunisierung im Kaninchen ein anti-rabbit-Antikörper verwendet. 1 Tropfen des Antikörpers wurde mit 15ml TTBS-Puffer versetzt und der Filter darin für weitere 2h im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. 30min vor Gebrauch wurde je 1 Tropfen Vectastain-Lösung A und B in 15ml TTBS-Puffer gegeben. Nach der Inkubation wurde der Filter für 3 x 10min mit 100ml TTBS-Puffer gewaschen und anschließend erneut für 2h im Dunkeln mit Vectastain A und B auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in TTBS-Puffer für 10min. Im Folgenden wurde der Filter für ca. 1min in Entwicklerlösung inkubiert, bis eine deutliche Graufärbung der spezifischen Antikörper-Proteinbanden auf dem Filter eintrat. Nach dem Wässern des Filters für 10min wurde dieser an der Luft getrocknet.

Transfer-Puffer:	12,1 g 56,3 g 1000 ml	20mM Tris 150mM Glycin 20% Methanol
TTBS-Puffer:	100 ml 20 ml 62 ml	2M Tris-HCl, pH 7,4 10% Tween 20 5M NaCl
Entwicklerlösung (100ml):	5,0 ml 93,0 ml 0,5 ml 30,0 µl 1,5ml	2M Tris-HCl, pH 7,4 H ₂ O dest. NiCl ₂ -Stammlösung 30% H ₂ O ₂ DAB
NiCl ₂ -Stammlösung:	80mg/ml	

2.3.2 Immunocytologische Untersuchung von *Arabidopsis*

2.3.2.1 Isolierung des C-terminalen Antikörpers aus dem Antiserum

Für das Immunolabeling wurde der C-terminale Antikörper jeweils aus einem Aliquot des Antiserums frisch aufgereinigt. Hierzu wurde ein Stück Nitrocellulosemembran (1cm x 0,5cm) mit überexprimiertem Protein des *pPLA-I Exon18*-Fragmentes (40µg/ml) belegt und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 30min bei RT. Anschließend wurde die Membran fünfmal mit Blockierpuffer gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit 1ml Antiserum in Blockierpuffer (Verdünnung 1:10) inkubiert. Dann wurde die Membran in

Blockierpuffer überführt und dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Elutionslösung überführt und 20s inkubiert. Die Membran wurde entfernt und die Antikörperhaltige Lösung mittels 1M Tris/HCl, pH 8,0 neutralisiert.

Blockierpuffer:	5% Milchpulver	
	10mg/ml BSA	
	in TTBS-Puffer	
Elutionslösung:	0,2M	Glycin-HCl
	0,5M	NaCl
	1 mg/ml	BSA
	0,02%	Natriumazid

2.3.2.2 Immunolabeling

Der frisch hergestellten C-terminale Antikörper und der N-terminale Antikörper konnten nun für das Immunolabeling im Whole Mount-Verfahren eingesetzt werden. Hierzu mussten die verschiedenen *Arabidopsis*-Gewebe nach 7-28 Tagen Wachstum unter verschiedenen Testbedingungen zunächst fixiert werden. Dann erfolgte ein Zellwandabbau und das Benetzen mit Detergens für ein besseres Eindringen des Antikörpers in das Gewebe, sowie für ein besseres Anhaften. Ein weiterer Schritt war die Behandlung mit BSA zur Vermeidung unspezifischer Bindungen durch die Antikörper. Dann wurde das Gewebe mit dem pPLA-I-spezifischen Antikörper und anschließend mit einem sekundären anti-rabbit-Antikörper behandelt. Die Präparation des mit Antikörpern markierten Gewebes erfolgte auf Objektträgern mit Mounting-Medium, welches den Brechungsindex für das Mikroskopieren optimiert und einem Abbau der Fluoreszenz entgegenwirkt. Zudem ist dem Mounting-Medium DAPI zugesetzt, welches DNA fluoreszent markiert. Lokalisierungen in und um den Zellkern konnten so leichter nachgewiesen werden. Zunächst wurde das grundsätzliche Expressionsmuster der pPLA-I in *Wassilijewskia* und *Columbia* Wildtyp unter Wachstumsbedingungen in Weißlicht ermittelt. Weitere Testbedingungen waren das Wachstum in verschiedenen Lichtfarben, in Dunkelheit, unter Zusatz von 1-NAA und unter Zusatz von NPA. Als Negativkontrollen dienten *ppla-I-1*- und *ppla-I-3*-Knockoutlinien. Weiter wurden zwei heterozygote *abpl*-Insertionsmutanten und eine *ABPI*-Überexpressionsmutante auf das Expressionsmuster der pPLA-I hin untersucht.

Für die Anzucht der Keimlinge wurden die Samen zunächst sterilisiert. Hierzu wurden sie 3min in 70% Ethanol inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 3min in 4% Natriumhypochlorit. Anschließend wurden die Keimlinge gründlich mit sterilem Wasser gewaschen und über Nacht bei 4°C in sterilem destilliertem Wasser inkubiert. Dann wurden die Samen auf Agarplatten mit ½ MS-

Medium aufgebracht und erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Wachstum der Keimlinge erfolgte dann für 7-14 Tage. Weitere Wachstumsbedingungen (Licht, Additive im Nähragar) waren abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau und sind in *Tab. 14* und *15* dargestellt. Zur Analyse des Pollens wurden *Arabidopsis*-Keimlinge für 4 Wochen im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen angezogen und die aufbrechenden Blüten geerntet.

Tabelle 14: Verwendete Lichtfarben und Lichtstärken.

Lichtfarbe	Lichtstärke
Blaulicht	15 μ E
Rotlicht	15 μ E
Dunkelrotlicht	15 μ E
Weißlicht	15 μ E

Tabelle 15: Verwendete Additive und ihre Endkonzentration im Nähragar.

Additiv	Konzentration Stammlösung	Konzentration im Nähragar
1-NAA	0,1 mM	1 μ M
NPA	10 mM	10 μ M

Die Fixierung der Keimlinge erfolgte ohne Zeitverlust nach der Entnahme aus den Agarplatten, um den tatsächlichen zellulären Zustand zu erhalten. Hierzu wurden die Keimlinge in ELISA-Platten mit 2% Formaldehyd in MTSB gegeben und zweimal für je 1min im Exsikkator ein Vakuum angelegt. Waren alle Luftblasen aus den ELISA-Vertiefungen entwichen, erfolgte eine Inkubation auf dem Schüttler für 30min. Nach zwei Waschschritten mit MTSB für je 5min wurden Blatt und Hypokotyl der Keimlinge mit dem Skalpell entfernt und die verbleibenden Wurzel zur leichteren Überführung in andere Medien in Inkubation Baskets (medium incubation baskets der Firma Intavis, Katalog-Nr. 12.442) gegeben. Dann wurden die Wurzeln in den Baskets in MTSB mit 0,15% Driselase/0,15% Mazerozym überführt und für 30min bei 37°C inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit MTSB für je 5min. Das Gewebe wurde für weitere 30min bei 37°C in 3% NP40/10% DMSO in MTSB inkubiert. Es folgten mindesten 3 Waschschrritte für je 5min in MTSB auf dem Schüttler, um das Detergens gründlich auszuwaschen. Im Weiteren wurde mit 2%BSA in MTSB für 30min bei 37°C geblockt. Dann wurde für 2h bei 37°C mit dem pPLA-I-Antikörper (1:1000 in 2%BSA/MTSB) inkubiert. Es folgten drei Waschdurchgänge mit MTSB für jeweils 5min auf dem Schüttler. Anschließend wurde für 40min bis 2h mit dem sekundären anti-

rabbit-Antikörper (1:100 – 1:1000) in MTSB inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit MTSB auf dem Schüttler wurde einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Vorbereitung entspricht der Methode des Labors Prof. Dr. K. Palme (Freiburg).

MTSB: 50 mM PIPES
5mM MgSO₄*7H₂O
5mM EGTA
auf pH 6,9 einstellen auf 1L mit destilliertem Wasser auffüllen und autoklavieren.

2.3.2.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die Präparation der Gewebestücke wurden zunächst Objektträger mit 80µl Mounting-Medium (SlowFade®Gold Antifade der Firma Invitrogen, Katalog-Nr. S36936) versehen. Die gelabelten Gewebeproben wurden mit äußerster Vorsicht aus den Inkubation Baskets auf die Objektträger überführt. Dann wurden sie mit einem Objektträger (Maße 24 X 60mm) bedeckt und mit Nagellack am Rand versiegelt. Die Proben konnten direkt für die Lasermikroskopie verwendet oder für 2-3 Monate bei 4°C im Dunklen gelagert werden.

Für die konfokale Lasermikroskopie wurden das Zeiss LSM 510 Meta und das Leica inverted-2 der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung konfokale Lasermikroskopie, verwendet. Die eingesetzten Objektive, Laserlinien und Detektoren sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen (s. *Tab. 16*):

Tabelle 16: Eingesetzte Objektive, Laserlinien und Detektoren der verwendeten konfokalen Lasermikroskope

	Verwendete Objektive	Verwendete Laserlinien	Verwendete Detektoren
Zeiss LSM 510 Meta mit Axiovert 200M	20x	488	2 confocal PMTs
	63x		1x Meta Detektor
			1 transmission PMT
Leica inverted-2	20x	405	3 confocal PMTs
	63x	488	1 transmission PMT

2.4 Lokalisierungsstudien der pPLA-I mittels Reporterproteinen

2.4.1 Herstellung von pPLA-I-GFP

Für die Lokalisierung der pPLA-I in *Arabidopsis* wurde zunächst ein pPLA-I-GFP-Fusionsprotein mit nativem Promoter in der Knockoutmutante *ppla-I-1* exprimiert. So sollten über eine Lokalisierung bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins in *Arabidopsis* gezogen werden können. Zur Überprüfung auf Funktionalität des Fusionsproteins wurde zusätzlich ein Blühversuch als Komplementationstest durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Transformanten in ihren Blüheigenschaften weiterhin die Eigenschaften von *ppla-I-1* oder des Wassilijewskia Wildtyp zeigen.

Hierzu wurde die genomische *pPLA-I*-Sequenz mit vorangeschaltetem nativem Promotor mittels spezifischer attB-Gateway-Primer amplifiziert und in einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR221 kloniert. Der entstehende Entry-Vektor L1- pPLA-Igenom -L2-pDONR221 wurde dann für eine LR-Reaktion mit dem Destination-Vektor (binärer Vektor) pGWB4 verwendet. Der resultierende Expressions-Vektor B1- pPLA-Igenom -B2 /pGWB4 verfügte somit über eine genomische *pPLA-I*-Sequenz mit C-terminaler GFP-Sequenz, die als T-DNA in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert wurde. Nach Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* wurde eine Vakuum-Infiltration der *Arabidopsis*-Knockoutlinien und der korrespondierenden Wildtypen durchgeführt. Die so behandelten Pflanzen wurden bis zur Samenreife angezogen.

Die Samen der ersten Generation wurden auf Selektionsagar aufgetragen und positive (hemizygot) Transformanten bis zur erneuten Samenreife angezogen. Die Transformanten der zweiten Generation wurden nun erneut auf Selektionsagar aufgetragen, um Linien zu ermitteln, die homozygot transformiert waren. Das konstitutiv transformierte Saatgut wurde anschließend unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen und mittels konfokaler Lasermikroskopie auf die Expression und die Lokalisierung des pPLA-I-GFP-Fusionsproteins hin untersucht.

2.4.1.1 Klonierung von B1- pPLA-I genom -B2 in pDONR221

Die Amplifikation der genomischen Sequenz der *pPLA-I* mit flankierenden attB1- und attB2-sites erfolgte mittels spezifischer Gateway-Primer und dem Klon F8K4 als Template. Als Polymerase wurde aufgrund der 7817bp langen Sequenz die i-Proof-Polymerase der Firma Biorad (Katalog-Nr. 72-53011) verwendet. Die Amplifikationsbedingungen sind in Tab. 17 und 18 dargestellt. Das

gebildete Amplifikat wurde aufgereinigt. Hierzu wurden 50µl PCR-Produkt mit 150µl TE-Puffer, pH 8,0 und 100µl 30% PEG 8000 / 30mM MgCl₂ versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig durch Vortexen gemischt und für 15min bei 10.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 50µl TE-Puffer, pH 8,0 resuspendiert. Der DNA-Gehalt des aufgereinigten Fragmentes und des Vektors pDONR221 wurden mittels Gelelektrophorese bestimmt und ein BP-Klonierungsansatz pipettiert (s. *Tab. 19*). Die DNA-Molarität von Vektor und Amplifikat sollten dabei jeweils ca. 50fmol betragen. Das entspricht in Abhängigkeit von der Sequenzlänge einem DNA-Gehalt von 150ng für pDONR221 und ca. 250ng für B1- pPLA-Igenom -B2. Der BP-Klonierungsansatz wurde für 16h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10min bei 37°C inkubiert, um die BP-Clonase zu inaktivieren. 1µl des Ansatzes wurde in 50µl Stb12-Zellen (Invitrogen, Katalog-Nr. 10268-019) pipettiert und der Transformationsansatz für 30min auf Eis gelagert.

Tabelle 17: PCR-Mix zur Amplifikation von B1- pPLA-Igenom -B2 mit i-Proof-Polymerase

PCR-Komponente	Volumen
5 x-HF-Puffer	10,0 µl
dNTP's (10mM)	1,0 µl
B1- pPLA-Igenom -B2_for (10mM)	2,5 µl
B1- pPLA-Igenom -B2_rev (10mM)	2,5 µl
Template (Plasmid-DNA CD4-16, 100ng/µl)	0,5 µl
i-Proof-Polymerase (2,5u/µl)	0,5 µl
destilliertes Wasser	33,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

Tabelle 18: Thermocycler-Programm zur Amplifikation von B1- pPLA-Igenom -B2

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	98°C	30s	1
Denaturierung	98°C	10s	35
Annealing	70°C	30s	
Elongation	72°C	4min	
Elongation	72°C	10min	1
Lagerung	4°C	∞	

Tabelle 19: BP-Klonierungsansatz zur Klonierung von B1- pPLA-Igenom -B2 in pDONR221

BP-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
pDONR221	1,0µl	150ng/µl	150ng
B1- pPLA-Igenom -B2	2,5µl	100ng/µl	250ng
TE-Puffer (pH 8,5)	4,5µl	-	-
BP-Clonase	2,0µl	-	-
Gesamtvolumen	10,0µl		

Es erfolgte eine Hitzeschock-Transformation für 25s bei 42°C. Der Ansatz wurde mit 250ml SOC-Medium versetzt und für 90min bei 225rpm und 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf Selektionsagar mit 50µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C in selektivem LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Katalog-Nr. A1460) der Firma Promega durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde für eine Kontroll-PCR mit den Primern M13_for und pPLA-Igenom_rev1, sowie für eine Kontroll-Spaltung mit dem Restriktionsenzym *NcoI* verwendet. Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde mit den Primern pPLA-Igenom_rev1 bis pPLA-Igenom_for13 zur Sequenzierung an die Firma Peqlab versandt. Nach vollständiger Überprüfung der Sequenz und Feststellung einer fehlerfreien Sequenzabfolge wurde eine Glycerin-Dauerkultur des Entry-Klons angelegt.

Zur Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 10ml LB-Medium mit einer Kolonie des positiven Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C und 155rpm auf dem Schüttler inkubiert. 1ml der Zellsuspension wurde mit 1ml Glycerin (50%) in LB-Medium vermischt, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C dauerhaft gelagert. In gleicher Weise wurden von allen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Klonen Glycerindauerkulturen hergestellt.

2.4.1.2 Klonierung von L1- pPLA-I genom -L2 in pGWB4

Der hergestellte Entry-Vektor mit in der BP-Reaktion gebildeten L-sites (L1- pPLA-I genom -L2 / pDONR221) wurde für eine LR-Klonierung mit dem Pflanzentransformationsvektor pGWB4 verwendet. Im Klonierungsansatz sollten jeweils 150ng DNA der beiden Vektoren eingesetzt werden. Der DNA-Gehalt der Vektoren wurde mittels

Gelelektrophorese bestimmt und ein LR-Klonierungsansatz pipettiert (s. *Tab. 20*). Der LR-Klonierungsansatz wurde für 16h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10min bei 37°C inkubiert, um die LR-Clonase zu inaktivieren. 1µl des Ansatzes wurde in 50µl Stb12-Zellen (Invitrogen, Katalog-Nr. 10268-019) pipettiert und der Transformationsansatz für 30min auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Hitzeschock-Transformation für 25s bei 42°C. Der Ansatz wurde mit 250ml SOC-Medium versetzt und für 90min bei 225rpm und 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf Selektionsagar mit 50µg/ml Hygromycin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 30°C in selektivem LB-Medium mit 50µg/ml Hygromycin angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Katalog-Nr. A1460) der Firma Promega durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde für eine Kontroll-PCR mit den Primern pPLA-I genom_for und pPLA-I genom_rev1 verwendet.

Tabelle 20: LR-Klonierungsansatz zur Klonierung von L1- pPLA-I genom -L2 in pGWB4

LR-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
L1- pPLA-I genom -L2/pDONR221	1µl	150ng/µl	150ng
pGWB4	1µl	150ng/µl	150ng
TE-Puffer (pH 8,5)	6µl	-	-
LR-Clonase	2µl	-	-
Gesamtvolumen	10µl		

2.4.2 Herstellung von GFP-pPLA-I (-Exon7)

Die Sequenzierung der aus dem CD4-16-Klon erhaltenen *pPLA-I*-Sequenz ergab das Fehlen von Exon 7. Der hierdurch entstehende Frameshift führte zu einer Unterbrechung des Open Reading Frames, so dass es bei dieser cDNA-Sequenzvariante tatsächlich nur zur Expression der Exone 1-6 kommt. Durch Herstellung eines pPLA-I (-Exon7) - Fusionsproteins mit N-terminal fusioniertem GFP sollte eine möglicherweise unterschiedliche Expression dieser verkürzten Sequenz im Gegensatz zur vollständigen pPLA-I-Sequenz festgestellt werden, um Rückschlüsse auf Funktionsunterschiede zwischen beiden Sequenzvarianten feststellen zu können. Hierzu wurde der mittels Phagenverdünnung aus der CD4-16 Phagenbank gewonnene cDNA-Klon der *pPLA-I*-Sequenz ohne Exon7 verwendet. Die Sequenz wurde mit B1- pPLA-I-cDNA -B2-Primern

amplifiziert und eine BP-Reaktion mit dem Vektor pDONR221 durchgeführt. Einzelne Klone dieser Reaktion wurden mittels PCR, Kontrollspaltung und Sequenzierung auf Spezifität überprüft. Ein positiver Klon wurde für eine LR-Reaktion mit dem *Arabidopsis*-Transformationsvektor pK7FWGF2 verwendet. Die gebildeten Klone wurden erneut in gleicher Weise überprüft und die Plasmid-DNA eines positiven Klons für die Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Anschließend wurde eine Vakuum-Infiltration der Knockoutlinien *ppla-I-1* und *ppla-I-3* mit den transformierten Agrobakterien durchgeführt. Nach Selektion transformierter Samen und Anzucht einer zweiten Generation homozygot transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die einzelnen Gewebe mittels konfokaler Lasermikroskopie auf das Vorhandensein des gebildeten Fusionsproteins hin untersucht.

2.4.2.1 Klonierung von B1- pPLA-I (-Exon7) -B2 in pDONR221

Die Amplifikation der cDNA-Sequenz von *pPLA-I (-Exon7)* mit flankierenden attB1- und attB2-sites erfolgte mittels spezifischer Gateway-Primer und dem Klon *pPLA-I (-Exon7)* als Template. Als Polymerase wurde auch hier die i-Proof-Polymerase der Firma Biorad (Katalog-Nr. 72-53011) verwendet (Amplifikationsbedingungen s. 2.4.1.1). Die folgende Fragmentaufreinigung wurde wie in 2.4.1.1 beschrieben durchgeführt. Der DNA-Gehalt des aufgereinigten Fragmentes und des Vektors pDONR221 wurden mittels Gelelektrophorese bestimmt und ein BP-Klonierungsansatz pipettiert (s. Tab. 21). Die DNA-Molarität von Vektor und Amplifikat sollten dabei jeweils ca. 50fmol betragen. Das entspricht in Abhängigkeit von der Sequenzlänge einem DNA-Gehalt von 150ng für pDONR221 und ca. 125ng für B1- pPLA-I (-Exon7) -B2.

Tabelle 21: BP-Klonierungsansatz zur Klonierung von B1- pPLA-I (-Exon7) -B2 in pDONR221

BP-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
pDONR221	1,00µl	150ng/µl	150ng
B1-pPLA-I (-Exon7) -B2	1,25µl	125ng/µl	125ng
TE-Puffer (pH 8,5)	5,75µl	-	-
BP-Clonase	2,00µl	-	-
Gesamtvolumen	10,00µl		

Die Inkubation des BP-Klonierungsansatzes, die Transformation in *E. coli*, das Ausplattieren auf Selektionsagar und die Selektion positiver Klone s. 2.4.1.1. Die Kontroll-PCR erfolgte mit B1-pPLA-I (-Exon7) -B2 - Primern, die Kontrollspaltung mit dem Restriktionsenzym *NcoI*. Die

Sequenzierung eines positiven Klons wurde mit den Primern pPLA-I _rev1 bis pPLA-I _for7 durchgeführt.

2.4.2.2 Klonierung von L1- pPLA-I (-Exon7) -L2 in pK7FWGF2

Der hergestellte Entry-Vektor L1- pPLA-I (-Exon7) -L2 / pENTRY221 wurde für eine LR-Klonierung mit dem Pflanzentransformationsvektor pK7FWGF2 verwendet. Im Klonierungsansatz sollten jeweils 150ng DNA der beiden Vektoren eingesetzt werden. Der DNA-Gehalt der Vektoren wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt und ein LR-Klonierungsansatz pipettiert (s. Tab. 22).

Tabelle 22: LR-Klonierungsansatz zur Klonierung von L1 -pPLA-I (-Exon7) -L2 in pK7FWGF2

LR-Klonierungsansatz	Volumen	DNA-Konzentration	DNA-Gehalt
L1-pPLA-I (-Exon7)-L2/pENTRY221	1µl	150ng/µl	150ng
pK7FWGF2	1µl	150ng/µl	150ng
TE-Puffer (pH 8,5)	6µl	-	-
LR-Clonase	2µl	-	-
Gesamtvolumen	10µl		

Die Inkubation des LR-Klonierungsansatzes, die Transformation in *E. coli*, das Ausplattieren auf Selektionsagar, die Selektion positiver Klone und die Sequenzierung eines positiven Klons s. 2.4.1.2. Die Selektion erfolgte jedoch auf 50µg/ml Spectinomycin. Die Kontroll-PCR erfolgte mit den Primern pPLA-I Exon18_for und pPLA-I Exon18_rev durchgeführt.

2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* und Transformation

Nach Fertigstellung der Fluoreszenzkonstrukte sollten diese in *A. tumefaciens* transformiert werden. Hierzu wurden 5ml LB-Medium mit *A. tumefaciens*-Zellen angeimpft und die Kultur über Nacht bei 28°C und 180rpm auf dem Schüttler inkubiert. Aufgrund einer vorhandenen Resistenz der Zellen wurde dem LB-Medium Rifampicin (c = 100µg/ml) als Selektivum zugesetzt. Die ü.N.-Kultur wurde verwendet, um 500ml LB-Medium mit Rifampicin und 0,5% Glucose anzuimpfen. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 - 0,6 angezogen. Dann wurde die Kultur in GSA-

Röhrchen für 5min bei 4°C und 6000xg abzentrifugiert und das Pellet in 25ml eiskaltem 0,15M Natriumchlorid resuspendiert und für weitere 15min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde erneut in GSA-Röhrchen für 5min bei 4°C und 6000xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5ml 20mM Calciumdichlorid resuspendiert, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und in 250µl-Aliquots bei -80°C dauerhaft gelagert.

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels Vakuum-Infiltration wurde der *Agrobacterium*-Stamm GV3101 verwendet. Zur Transformation mit den hergestellten Konstrukten wurde je 1µl Plasmid-DNA in 250µl chemisch kompetente *Agrobacterien* pipettiert und der Transformationsansatz für 5min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5min in flüssigem Stickstoff und eine weitere für 5min bei 37°C. Dann wurde 1ml LB-Medium auf den Ansatz pipettiert und dieser für 4-6h bei 225rpm und 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agar mit 100µg/ml Rifampicin als Bakterien-Selektivum, sowie 50µg/ml Hygromycin als Plasmid-Selektivum für B1- pPLA-I genom -B2 / pGWB4, bzw. 50µg/ml Spectinomycin für B1- pPLA-I (-Exon7) -B2 / pK7FWGF2 ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Einige der gebildeten Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 30°C in dem jeweiligen selektiven LB-Medium angezogen. Von 2ml der ü.N.-Kultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt.

2.4.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*, Vakuum-Infiltration und Selektion der Transformanden

Die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen für die Vakuum-Infiltration erfolgte in der Klimakammer im Kurztag. Hierfür wurden zunächst Wassilijewskia und Columbia Wildtyp-Pflanzen, sowie *ppla-I-1* und *ppla-I-3* in einer Pikierkiste ausgesät. Nach zwei Wochen wurden je vier Keimlinge einer Sorte in einen Topf (Durchmesser 10cm) mit Pikiererde umgesetzt. Nach etwa acht Wochen kam es zur Ausbildung der Blütenstände. War die primäre Infloreszenz bis zu einer Höhe von ca. 10cm gewachsen, wurde sie an der Basis entfernt, um eine höhere Anzahl an nachwachsenden Infloreszenzen zu erhalten. Die Pflanzen konnten für die Transformation verwendet werden, wenn sich die Blütenknospen der sekundären Infloreszenzen öffneten. Für die *A. tumefaciens*-Transformation von *A. thaliana* wurde die Vakuum-Infiltration nach Bechthold *et. al.* (1993) angewendet. Die Anzucht des *A. tumefaciens*-Stammes GV3101 erfolgte drei Tage vor der Vakuum-Infiltration. Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit 100µg/ml Rifampicin und 50µg/ml

Spectinomycin mit 100 µl der jeweiligen Glycerindauerkultur transformierter *A. tumefaciens* inokuliert. Die Zellsuspension wurde zwei Tage bei 155 rpm und 28 °C auf dem Schüttler vorkultiviert. 1ml dieser Vorkultur wurde in 400ml LB-Medium mit 100µg/ml Rifampicin und 50µg/ml Hygromycin, bzw. 50µg/ml Spectinomycin in Schikaneflaschen überimpft. Die Zellkultur wurde bei 140 rpm und 28 °C auf dem Schüttler angezogen, bis eine OD_{600nm} von etwa 1,2 erreicht war. Dann wurde die Suspension bei 6000xg und RT abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in Infiltrationsmedium resuspendiert, bis dieses eine OD_{600nm} von etwa 0,8 aufwies. Das erhaltene Volumen an mit *A. tumefaciens* -Zellen versetztem Infiltrationsmedium entsprach dabei etwa dem Volumen an zuvor kultiviertem LB-Medium. Mit dem Infiltrationsmedium wurde ein Becherglas (Volumen 400ml) befüllt und dieses in einen Exsikkator gestellt. Auf das Becherglas wurde kopfüber der Pflanztopf so platziert, dass möglichst alle Blüten in die Lösung eintauchten, während die Rosettenblätter nicht von der Suspension benetzt werden sollten. Dann wurde mittels Wasserstrahlpumpe für 1-2min der maximale Unterdruck (etwa 100mbar) im Exsikkator angelegt, wobei sich Luftblasen an den Blütenständen bildeten. Anschließend wurde das Vakuum möglichst schnell aufgehoben, um das Eindringen der *A. tumefaciens* in das pflanzliche Gewebe zu erleichtern. Die Töpfe mit den infiltrierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden aus dem Exsikkator genommen und der nächste Topf auf dem Becherglas platziert. Das Infiltrationsmedium wurde jeweils für vier Infiltrationsdurchgänge mit neuen Pflanzen verwendet und dann gewechselt. Nach der Infiltration wurden die Töpfe in Plastikbeutel gehüllt und für einen Tag liegend in der Klimakammer (23°C, 12h Licht) gelagert. Dann wurden die Beutel entfernt und die Töpfe aufgestellt. Die vier Pflanzen jedes Topfes wurden vollständig mit einer Papiertüte umhüllt und an den Stängeln dicht mit Tesa-Film umwickelt. Etwa vier bis sechs Wochen nach der Transformation konnten die Samen aus den Tüten gewonnen und in einem Sieb mit 425µm - Maschen ausgesiebt werden. Das Saatgut wurde eine Woche bei RT getrocknet und bei 4°C im Dunkel gelagert.

BAP-Stammlösung (1 mM):	225,3 mg/l	BAP
Infiltrationsmedium:	1/2 x	Murashige & Skoog Salze
	1 x	B5-Vitamine
	5 %	Saccharose
	in dH ₂ O lösen, mit KOH auf pH 5,7 einstellen und autoklavieren; dann Zugabe von:	
	0,044 µM	BAP
	0,15 %	Tween 80

Für die Selektion transgener Keimlinge mittels Kanamycin wurde eine Enzymspatelspitze (etwa

10mg) transformiertes Saatgut von Wassilijewskia und Columbia Wildtyppflanzen wie in 2.3.2.2 beschrieben sterilisiert. Zum Auftragen auf die Petrischale wurde die Suspension mit einer 1ml-Pipette aufgenommen und auf 1/2 x MS-Agar mit 50µg/ml Kanamycin verteilt. Nach einer dreitägigen Vernalisation bei 4°C und etwa drei Wochen Wachstum hatten die Antibiotika-insensitiven *Arabidopsis*-Pflanzen ein ausreichendes Wurzelwerk aufgebaut und konnten einzeln in Töpfe (Durchmesser 6cm) mit Einheitserde P gepflanzt werden. Nicht Kanamycin-resistente Keimlinge blieben im Wuchs sehr klein oder waren gelblich verfärbt. Die positiven Transformanten wurden im Gewächshaus bis zur Samenreife weiter angezogen. Zum Auffangen der Samen diente ein Auffangbehälter aus Kunststoff (Arasystem, BetaTech). In den Samen lag das jeweilige inserierte Konstrukt hemizygot vor. Um homozygot transformierte Pflanzen zu erhalten, wurden die hemizygoten *Arabidopsis*-Samen direkt in Pikiererde ausgesät um Samen der zweiten Generation zu erhalten. Nach den Mendelschen Gesetzen kam es hier zu einer Aufspaltung im Verhältnis 1 (homozygot transformiert) : 2 (hemizygot transformiert) : 1 (homozygot Wt). Von den einzelnen Linien wurde nun eine dritte Generation auf Selektivmedium angezogen. Waren alle Keimlinge resistent und wuchsen auf dem Selektionsagar normal, musste es sich um eine homozygot transformierte Linie handeln. Nachkommen einer hemizygoten Linie waren zu ¼ nicht resistent. Die homozygot transformierten Samen wurden für die weitere Verwendung in der Samenbank gelagert.

1/2 x MS-Agar:	1/2 x	Murashige & Skoog Medium
	3 %	Saccharose
	1 %	Pflanzenagar in dH ₂ O lösen,
		mit KOH auf pH 5,7 einstellen und autoklavieren

Die komplementierten *pPLA-I*-Knockoutmutanten konnten aufgrund der schon vorhandenen Kanamycin-Resistenz alternativ nur mit dem zweiten Selektivum des Vektors pGWB4, Hygromycin, selektiert werden. Hierzu wurden die Samen wie in X vorbehandelt und nach dem Aussäen auf Hygromycin-haltigem Medium (½ MS) zunächst für drei Tage vernalisiert. Dann wurden sie für 4-12h mit etwa 50µE Weißlicht behandelt. Anschließend wurden sie für 5-7 Tage in Dunkelheit angezogen. Hygromycin-sensitive Keimlinge zeigten nur geringes Wachstum mit sehr kurzen Hypokotylen. Hygromycin-resistente Keimlinge waren dagegen viel besser entwickelt und zeigten einen typischen etiolierten Phänotyp. Die Keimlinge wurden auf ½ MS-Medium ohne Hygromycin überführt und im schwachen Weißlicht für etwa 3 Wochen angezogen, bis ein ausreichendes Wurzelwerk vorhanden war. Anschließend wurden sie wie für die Kanamycin-Selektion beschrieben weiter behandelt. In Abb. 10 ist der morphologische Unterschied Kanamycin- und Hygromycin-resistenter Keimlinge zu nicht-resistenten Keimlingen dargestellt.

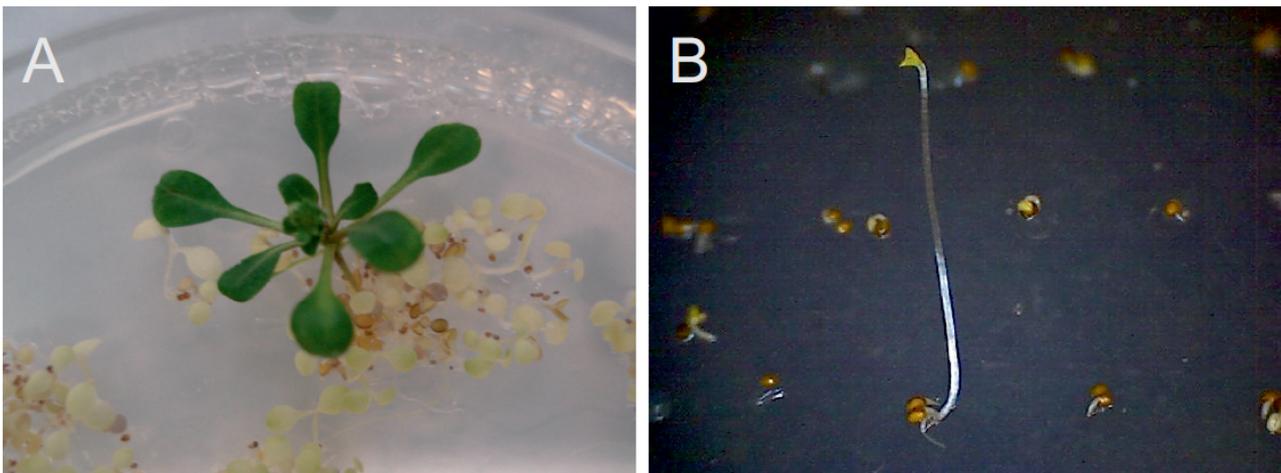


Abbildung 10: Selektion transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen mittels spezifischer Antibiotikaresistenz. A) Kanamycin-resistenter Transformant nach 3-wöchigem Wachstum auf Kanamycin-haltigem Nähragar. B) Hygromycin-resistenter Transformant nach 1-wöchigem Wachstum auf Hygromycin-haltigem Nähragar im Dunkeln.

2.4.5 Überprüfung der hergestellten GFP-Pflanzen auf Komplementation

Um zu überprüfen, ob mittels Transformation von *ppla-I-1*-Knockoutpflanzen mit *pPLA-I-GFP* und *pPLA-I-GFP (-Exon7)* eine Komplementation hergestellt wurde, bietet die Feststellung des Blühzeitpunktes eine geeignete Methode. Während der durchschnittliche Blühzeitpunkt bei im Kurztag angezogenen *Wassilijewskia* Wildtyp-Pflanzen bei ca. 10 Wochen liegt, benötigen *ppla-I-1*-Knockoutpflanzen nur etwa 7 Wochen bis zur Blüte. Durch Ermittlung des Blühzeitpunktes der transformierten Pflanzen sollte überprüft werden, ob eine Komplementation der Knockout vorliegt oder nicht.

2.4.6 Konfokale Lasermikroskopie

Die Untersuchungen zur Lokalisierung der Fusionsproteine beschränkten sich auf den Wurzelbereich, die Pollenkörner und die Trichome der Blätter. Alle weiteren Gewebe sind zu dick, um unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet werden zu können. Auch wird die spezifische GFP-Fluoreszenz hier weniger durch unspezifische Autofluoreszenz, z. B. durch Chlorophylle, überlagert. Untersucht wurde die Lokalisierung der Reporterproteine bei verschiedenen Wachstumsbedingungen der Keimlinge.

Für die konfokale Lasermikroskopie der Wurzel und der Trichome wurden 7-14 Tage alte Keimlinge verwendet, für die Mikroskopie des Pollens mussten die Keimlinge etwa 6 Wochen angezogen werden. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die entsprechenden Gewebe präpariert und zusammen mit einer Positivkontrolle (DR5-GFP) und einer Negativkontrolle (Wildtyp) auf Objektträger aufgebracht und mit $\frac{1}{2}$ MS-Medium benetzt. Waren für das Keimlingswachstum zuvor dem Nähragar weitere Reagenzien zugesetzt worden, so wurden diese im gleichen Mengenverhältnis auch dem MS-Medium zugesetzt. Die Keimlinge wurden mit Deckgläschen luftdicht abgedeckt und mit Nagellack versiegelt. Anschließend erfolgte die konfokale Lasermikroskopie. Die verwendeten Objektive, Laserlinien und Detektoren sind *Tab. 23* zu entnehmen.

Tabelle 23: Eingesetzte Objektive, Laserlinien und Detektoren des Zeiss LSM 510 Meta

	Verwendete Objektive	Verwendete Laserlinien	Verwendete Detektoren
Zeiss LSM 510 Meta	20x	488	2 confocal PMTs
	63x		1x Meta Detektor
			1 transmission PMT

2.5 Coiling-Verhalten von *ppla-I-1* und *ppla-I-3*

Ziel dieses Versuchsteils war die Untersuchung der Beteiligung der pPLA-I an der gravitropen Reaktion der *Arabidopsis*-Wurzel. Pflanzen mit einem Defekt im Gravitropismus zeigen häufig ein verstärktes Coiling. Das Coiling wird vermutlich ausgelöst, indem die am gravitropen Wurzelwachstum beteiligte Wachstumskraft zum Erdmittelpunkt vermindert oder ganz ausgeschaltet wird und so eine weitere, spiralige Wachstumskraft der Wurzeloberfläche (Circumnutation) zum wichtigsten Wachstumsfaktor wird. Die Folge ist demnach ein Coiling-Verhalten der Wurzel. Ein Maß für die Ausprägung des Coiling-Phänotyps könnte der Coil-Durchmesser sein: Je größer der Einfluss der Circumnutation, umso kleiner müsste auch der Coil-Durchmesser werden. Nach dieser Hypothese zur Entwicklung von Coils würde eine verminderte Wachstumskraft zum Erdmittelpunkt zudem auch zu einer verminderten Penetrationsrate (Einwachsen der Wurzel in das Wachstumsmedium), insbesondere bei erhöhtem Penetrationswiderstand durch ein festes Wachstumsmedium, führen.

In diesem Versuch wurden die *ppla-I*-Knockoutlinien *ppla-I-1* und *ppla-I-3* für 10 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit steigendem Gehalt an MS-Agar angezogen. Die Wurzeln wurden auf ihr Coiling-

Verhalten hin untersucht. Zudem wurde die Penetrationsrate der Keimlinge ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann mit denen des Wassilijewskia und des Columbia Wildtyps verglichen. Die Daten sollten zu einem tiefer gehenden Verständnis des Coiling-Vorgangs führen.

Die Sterilisation der Samen wurde wie in 2.3.2.2 beschrieben durchgeführt und die Samen über Nacht im Dunkeln bei 4°C gelagert. Es wurden ½ MS-Medium mit verschiedenen Agarkonzentrationen von 0.8% bis 2.0% angesetzt, autoklaviert und jeweils 8 Platten mit etwa 50 Keimlingen für die *ppla-I*-Knockoutlinien und die korrespondierenden Wildtypen hergestellt.

. Die Samen wurden einzeln mittels 10µl-Pipette mit ein wenig Wasser auf die Platten aufgebracht. Anschließend erfolgte eine 3-tägige Vernalisation bei 4°C im Dunkeln. Dann wurden die Platten bei Raumtemperatur und Weißlicht für 7 Tage angezogen. Die Auswertung des Wurzelwachstums erfolgte durch Bonitur penetrierender Wurzeln, Bonitur gebildeter Coils, sowie durch Ausmessen des Coildurchmessers, jeweils in Abhängigkeit zur Agarkonzentration.

MS-Agar: ½ MS
0.8% - 2.0% Agar
auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.

2.6 WAICO-Weltraumprojekt

2.6.1 Allgemeines

Im Rahmen des Weltraumprojektes WAICO (waving and coiling response of *Arabidopsis thaliana* at different g-levels) wurden *Arabidopsis thaliana*-Samen des Wassilijewskia Wildtyps und der Knockoutmutante *ppla-I-1* auf die Weltraumstation ISS verbracht und dort für 12 Tage in Wachstumsboxen in einer ruhenden Zentrifuge unter Bedingungen nahe der Schwerelosigkeit ($\mu\text{g} \leq 10^{-6}\text{g}$) angezogen. Parallel wurden Vergleichspflanzen mittels einer baugleichen Zentrifuge in simulierter Schwerkraft angezogen. Das Wachstum wurde durch automatisch erstellte Bilder, sowie durch den Astronauten erstellte Fotos nach 12 Tagen dokumentiert und überwacht. Die Wachstumsphase konnte dann durch Einleiten einer Fixierungslösung in die Wachstumsboxen beendet werden. Anschließend wurde das Fixanz mittels in die Boxen eingeleitetem Waschpuffer weitgehend entfernt. Die Keimlinge wurden anschließend zurück auf die Erde verbracht und dort untersucht. Das WAICO-Projekt wurde zweimal durchgeführt.

Alle Vorgänge zur Vorbereitung des Weltraumexperiment wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Arbeiten wurden bereits einen Monat vor dem eigentlichen Termin und jeweils

doppelt ausgeführt. Dadurch konnte ein Vorversuch auf der Erde geprobt werden, um die Präparationen zu überprüfen (Kontamination, Keimung).

2.6.2 Präparation der Samen auf Wachstumsstreifen

Durch einfache Wachstumsversuche konnte festgestellt werden, dass größere Samen eine höhere Keimungswahrscheinlichkeit haben. Daher wurden die Samen auf ihre Größe hin selektiert. Anschließend folgte die Sterilisation der Samen wie in 2.3.2.2 beschrieben. Dann wurde das Reaktionsgefäß mit 5ml Wasser befüllt und zur Vernalisation über Nacht bei 4°C im Dunkeln gelagert. Anschließend wurde noch einmal das Wasser gewechselt und erneut über Nacht vernalisiert. Dann konnten die Samen zur späteren Präparation auf den Nähragar auf Filterstreifen aufgebracht werden.

Als Haftgrund für die Samen wurden Membranen aus Polyethersulfon (Supor[®]-800black, 0,8µM) der Firma Pall Corporation verwendet (Katalog-Nr. S80678). Diese wurden bereits fertig zurechtgeschnitten an die Firma OHB nach Bremen versandt. Dann wurden jeweils 15 Samen mittels einer 10µl-Pipette mit einem Tropfen Wasser in einem Abstand von ca. 5mm aufgebracht. An den Rändern musste dabei ein Bereich von 1cm freigehalten werden. Dieser wurde später abgeknickt, um den Streifen auf dem Stempeltool zu fixieren. Dann wurde der Samenstreifen für 5min getrocknet und auf die Samen 1-2µl *Gummi Arabicum* (15%) gegeben. Nach dem erneuten Antrocknen wurden die Samen in den Stempeltool eingebracht. Dieser wurde steril und unter Vakuum in ein WhirlPak[®]bag verpackt und in einem Container für einen sterilen Transport präpariert.

2.6.3 Ansetzen des Wachstumsmediums und Befüllen der Boxen

Zum Ansetzen des Wachstumsmediums wurden neue 0,5L-Flaschen verwendet. Der Ring am Verschluss wurde aus hygienischen Gründen entfernt. Zur ersten Reinigung und Sterilisation wurden die Flaschen mit 100ml Wasser befüllt und dieses in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend wurde das noch kochende Wasser ausgekippt. Der Vorgang wurde wiederholt. Das MS-Medium wurde zunächst in einem Messzylinder angesetzt, der zuvor mit 1M Salzsäure und 1M Ammoniak behandelt und anschließend gespült wurde. Anschließend wurde 1L 3/4MS-Medium angesetzt und mit einem Rührstab autoklaviert. Die Wachstumsboxen wurden zur Sterilisation inzwischen für mindestens 30min in 70% Ethanol gebadet. Zum Spülen wurde 100% Ethanol

verwendet. Die Wachstumsboxen wurden auf ein mit 100% Ethanol benetztes Tuch gelegt und für 10min unter UV-Licht erneut sterilisiert. Die getrockneten Boxen wurden dann mit 3/4MS-Medium befüllt. Hierzu wurden jeweils 11ml Medium mittels einer 25ml-Pipette blasenfrei in die Wachstumsboxen pipettiert und bis zum Erkalten stehen gelassen. Die Boxen wurden mit Folie abgedeckt, in WhirlPak[®]bag's verpackt und in Container für den Transport verpackt.

3/4MS-Medium: 3,3g MS-Fertigmischung der Firma Sigma (Katalog-Nr. M5519)
 13,3g Saccharose
 7,5ml 100xMS Vitaminstammlösung
 20g Agar
 auf pH 5,7 – 5,8 einstellen und mit reinstem Wasser auf einen Liter auffüllen

100xMS Vitaminstammlösung: 50mg/l Nicotinsäure
 10mg/l Thiamin HCl
 50mg/l Pyrodoxol HCl
 10 g/l myo-Inositol

Zur Herstellung von Fixierlösung und Waschpuffer wurden 3L Waschpuffer, sowie weitere 1,5L Waschpuffer als Grundlage für das Fixanz hergestellt und autoklaviert. Dann wurde 1L Formaldehyd-Lösung (20%) hergestellt. Dazu wurde das Formaldehyd bei ständigem Rühren und Erhitzen (max. 70°C) zum Wasser gegeben. Um den Lösungsvorgang zu erleichtern, wurden nach Bedarf einige Tropfen konzentrierte Natronlauge hinzugegeben. Die erkaltete Formaldehydlösung wurde zu den 1,5L autoklaviertem Waschpuffer gegeben. Fixierlösung und Waschpuffer wurden anschließend mittels Anlegen eines Unterdrucks entgast und blasenfrei in Vorratsbehälter (ACTS) eingefüllt, aus denen im Biolab der ISS später die Einspritzung in die Wachstumsboxen erfolgen konnte. Auch die Vorratsbehälter wurden in WhirlPak[®]bag verpackt und in Containern für den Transport vorbereitet.

Fixierlösung: 37,5ml 1M PIPES
 7,5ml 1M MgSO₄
 75 ml 100mM EGTA
 75 ml DMSO
 auf pH 6,8 eingestellt und auf 1,35L mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 150ml Formaldehyd (20%)

Waschpuffer: wie Fixierlösung, jedoch ohne Zugabe von Formaldehyd

2.6.4 Wachstum der Keimlinge in Schwerelosigkeit

Die Samen auf Wachstumsstreifen, Fixierlösung, Waschpuffer und die mit Wachstumsagar befüllten Boxen wurden mittels eines Space-Shuttles in das Biolab der ISS verbracht und dort bis zum Beginn des Experimentes meist bei 4°C gelagert. Am Tage des Wachstumsbeginns wurden durch den zuständigen Astronauten mit Hilfe eines Stempels die Wachstumsstreifen auf den Wachstumsagar gepresst und so der Wachstumsvorgang eingeleitet. Das Keimlingswachstum wurde mittels automatisch erstellter und durch den Astronauten durchgeführter Fotoaufnahmen dokumentiert. Bedingungen wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur sollten jederzeit angepasst werden können, was jedoch nur bei WAICO2 funktionierte. Um schließlich das Wachstum zu beenden, wurde mittels einer Pumpe und einer Kanüle aus dem ACTS Fixierlösung in die Boxen eingeleitet. Dies führte zum Fixieren der pflanzlichen Zellstruktur. Anschließend wurde die Fixierlösung abgepumpt und Waschpuffer eingeleitet. Später erfolgte der Rücktransport des fixierten Pflanzenmaterials zur Erde.

2.6.4.1 Durchführung von WAICO 1

Die erste morphologische Auswertung der Keimlinge erfolgte anhand automatisch erstellter Aufnahmen nach 12 Tagen störungsfreiem Wachstum. Beim Versuch der anschließenden Fixierung verklemmte die aktive Zentrifuge, so dass diese nicht durchgeführt werden konnte. Während die A-Boxen (Wachstum unter μg -Bedingungen) nach 10 Tagen zurück auf die Erde verbracht werden konnten, verblieben die B-Boxen (geplantes Wachstum unter 1g-Bedingungen) für weitere 6 Monate ohne Schwerkraft auf der ISS, so dass die Keimlinge bis zum Absterben unter μg -Bedingungen weiterwuchsen. Daher wurden die Keimlinge der A-Boxen nach Rückkehr auf die Erde einer weiteren morphologischen Untersuchung unterzogen, während die Keimlinge der B-Boxen aufgrund des ungeplanten Wachstum nicht weiter ausgewertet wurden.

Im Labor in Hannover wurden die Keimlinge der A-Boxen zunächst vollständig mittels Fotoapparat und Stereolupe fotografiert. Die Morphologie der in Schwerelosigkeit und in simulierter Schwerkraft gewachsenen Keimlinge wurde, insbesondere in Hinblick auf Coil-Bildung (Anzahl, Durchmesser, Torsion) verglichen. Anschließend wurden die Keimlinge aus dem Agar entnommen, in Wurzel und Blattanteil aufgetrennt und verschiedene Parameter vermessen (Haupt- und Seitenwurzellänge, Anzahl Seitenwurzeln, Hypokotyl- und Petiolenlänge, Blatt- und Kotyledonenfläche).

2.6.4.2 Durchführung von WAICO 2

Der zweite Durchlauf der Weltraumversuche auf der ISS verlief bis auf einen kurzfristigen Ausfall von Licht und Zentrifugalkraft für alle Boxen zu Beginn des Wachstums störungsfrei. Das Wachstum erfolgte bei 70% Luftfeuchtigkeit in LED-belichteten Boxen. Die Fixierung erfolgte mit Ausnahme der Box B5 planmäßig nach 12-tägigem Wachstum in den Zentrifugen des BIOLAB auf der ISS. Für Box B5 konnte aus technischen Gründen keine Fixierung durchgeführt werden. Diese Box wurde daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Anschließend wurden die Keimlinge mit Waschpuffer gespült und bei konstanter Kühlung zurück auf die Erde verbracht.

Im Anschluss erfolgte die Ermittlung von Proteinexpressionsmustern in den Wurzelzellen der Keimlinge mittels maschinell durchgeführtem Immunolabeling. Hierzu wurden im sogenannten Whole Mount – Verfahren die Wurzel-Anteile der Keimlinge mit Hilfe eines in Freiburg etablierten Verfahrens auf die Lokalisierung einzelner Proteine, konkret PIN1, PIN2, PIN4, alpha Tubulin und pPLA-I hin untersucht. Es handelt sich hierbei um ein maschinell durchgeführtes Verfahren, bei dem die Zellwände der Keimlinge zunächst mittels Zellwand-degenerierender Enzyme aufgebrochen werden, um das Eindringen von Antikörpern zu erleichtern, die spezifisch an die oben genannten Proteine binden. Anschließend werden diese primären Antikörper mit weiteren, sekundären Antikörpern markiert. Diese verfügen über ein Fluoreszenz-Merkmal (rote oder grüne Fluoreszenz), welches dann mittels konfokaler Lasermikroskopie detektiert werden kann und indirekt die Lokalisierung des gewünschten Proteins anzeigt.

Nach dem maschinellen Labeling-Verfahren wurden die Wurzeln äußerst vorsichtig auf Objektträger überführt, mit einem Mounting-Medium versetzt und luftdicht mit einem Deckglas abgedeckt. Das Mounting-Medium fördert aufgrund seines Brechungsindex die Aufnahmequalität der Konfokal-Fotos, verhindert die Degradierung von Proteinen und ist zudem mit DAPI versetzt, welches DNA blau anfärbt. Somit konnten unter dem konfokalen Lasermikroskop insgesamt drei verschiedene Fluoreszenzfarben detektiert werden. Das blaue Spektrum diente der Detektion der Zellkerne. Mittels roter Fluoreszenz wurden primäre Antikörper detektiert, die aus Kaninchen (R) stammten und mittels grüner Fluoreszenz wurden primäre Antikörper detektiert, die in Meerschweinchen (GP) und Mäusen (M) hergestellt wurden. Im ersten Konfokal-Durchgang wurden zunächst die Keimlinge der Boxen A3, A5, B3 und B6 in 15ml-Reaktionsgefäße (Falcon) mit Waschpuffer überführt und bei 4°C nach Freiburg überführt. Dort wurde der Großteil der Keimlinge für das Immunolabeling verwendet. Hierzu wurde jeweils die komplette Wurzel vom Hypokotyl abgetrennt und entsprechend dem Immunolabeling-Protokoll (s. *Tab. 24*) behandelt.

Tabelle 24: Protokoll des maschinell durchgeführten Immunlabeling von Keimlingen aus WAICO2

Behandlung	Reagenz	Temperatur	Dauer
Waschen	MTSB	RT	10min
Enzymatische Zellwanddegeneration	Driselase/Mazerozym *	37°C	30min
Waschen	MTSB	RT	12min
Waschen	MTSB	RT	12min
Detergenzbehandlung	NP40/DMSO **	RT	20min
Waschen	MTSB	RT	12min
Waschen	MTSB	RT	12min
Blocken	2%BSA	RT	1h
Primärer Antikörper	PIN / AtPLAI-AK	RT	4h
Waschen	MTSB	RT	15min
Waschen	MTSB	RT	15min
Waschen	MTSB	RT	15min
Sekundärer Antikörper	Anti-M, -R, GB ***	RT	3h
Waschen	MTSB	RT	15min
Waschen	MTSB	RT	15min
Postfixierung	4% Formaldehyd	RT	30min
Waschen	MTSB	RT	15min
Waschen	dH ₂ O	RT	15min

*3%NP40 (Nonidet) / 10% DMSO

**Driselase 0,20% / Mazerozym 0,20%
Driselase from Basidiomycetes sp. (Sigma D9515 - 25g)

***Anti-GP-AK, Alexa Fluor 488 (green), Invitrogen, 1:500
Anti-R-AK, Alexa Fluor 546 (red), Invitrogen, 1:500

Mounting Medium: SlowFadeRGold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Katalog-Nr. S36936).

Hypokotyl und Blätter wurden wieder in die 15ml-Reaktionsgefäße überführt und zusammen mit den nicht-genutzten Keimlingen (A3:12, 13, 15; A5: 1, 10, 14; B3: 9; B6: 7, 11M, 12M,13) zurück nach Hannover verbracht. Von den weiteren Keimlingen der Boxen A3, A5, B3 und B6 wurden ein Labeling mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Wurzeln der Keimlinge, deren zugehörige Boxen und verwendete Fluoreszenzfarben sind in *Tab. 25* aufgeführt.

Tabelle 25: Entnahmebox der verwendeten Keimlinge und jeweiliges Labeling mit primären und sekundären Antikörpern, Durchlauf 1.

Proben-Nr.	Entnahmebox	Keimling Nr.	Antikörperbehandlung (R-red, GP-green, M-green)
1	A3 (Wt Ws / 1g)	1-4	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
2	A5 (KO Ws /1g)	2-5	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
3	B3 (Wt Ws / μ g)	1-4	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
4	B6 (KO Ws / μ g)	1-4	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
5	A3 (Wt Ws / 1g)	5-8	PIN3-GP 1:300, PIN4-R 1:400
6	A5 (KO Ws /1g)	6-9	PIN3-GP 1:300, PIN4-R 1:400
7	B3 (Wt Ws / μ g)	5-8	PIN3-GP 1:300, PIN4-R 1:400
8	B6 (KO Ws / μ g)	5,6,8,9	PIN3-GP 1:300, PIN4-R 1:400
9	A3 (Wt Ws / 1g)	9-11, 14	PIN7-M 1:50 , pPLA-I-R 1:1000
10	A5 (KO Ws /1g)	11-13	PIN7-M 1:50 , pPLA-I-R 1:1000
11	B3 (Wt Ws / μ g)	10-13	PIN7-M 1:50 , pPLA-I-R 1:1000
12	B6 (KO Ws / μ g)	10-12,14	PIN7-M 1:50 , pPLA-I-R 1:1000

Im zweiten Durchlauf wurden neben den Wurzeln der zurück verbrachten Keimlinge auch diese aus den Boxen A2, B2 und A6 verwendet. Hierzu wurden die Wurzeln diesmal direkt in Hannover präpariert und in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in MTSB bei 4°C nach Freiburg transportiert. Dabei wurde die Wurzel teilweise in Hauptwurzel und Mittelstück (M) der Wurzel unterteilt. Das Hypokotyl und die Blätter wurden ebenfalls in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei 4°C weiter in Hannover gelagert. Keimlingswurzeln, zugehörige Boxen und Färbungen sind *Tab. 27* zu entnehmen.

Die konfokale Lasermikroskopie wurde im Freiburger Labor von Prof. Dr. K. Palme in Zusammenarbeit mit Dr. F. Ditengou durchgeführt. Verwendet wurde ein Konfokalmikroskop der Firma Leica. Es wurde mit 20- und 60-facher Vergrößerung und teilweise einem weiteren Zoom gearbeitet. Der verwendete Detektor Gain für die drei Fluoreszenzfarben, welcher ein Maß für die Detektionsgrenze und damit für die Spezifität der Fluoreszenz darstellt, lag zwischen 100 und 164 und wurde für eine verbesserte Bildqualität jeweils optimiert, so dass die einzelnen Fluoreszenz-Signale gut sichtbar waren und sich nicht gegenseitig überlagerten.

Tabelle 26: Entnahmebox der verwendeten Keimlinge und jeweiliges Labeling mit primären und sekundären Antikörpern, Durchlauf 2.

Proben-Nr.	Entnahmebox	Keimling Nr.	Antikörperbehandlung (R-red, GP-green, M-green)
17	A2	1-5	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
	A3	12, 15	
18	B2	1-6	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
	B3	9	
19	A6	1-6, 1M, 2M	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
	A5	1, 10, 14	
20	B6	7, 12M,13	PIN1-R 1:600, PIN2-GP 1:600
21	A2	06.10.10	PIN4-R 1:400, PIN7-M 1:50
	A3	13	
22	B2	7-12	PIN4-R 1:400, PIN7-M 1:50
23	A6	7-11, 3M,4M	PIN4-R 1:400, PIN7-M 1:50
	A5	14M	
24	B6	11M, 13M	PIN4-R 1:400, PIN7-M 1:50
25	A2	1M-4M	pPLA-I-R 1:1000, α -Tub-M 1:200
26	B2	1M-4M,13,14	pPLA-I-R 1:1000, α -Tub-M 1:200

3. Ergebnisse

3.1 cDNA-Sequenzanalyse der *pPLA-I*

Nach Extraktion von RNA aus 7 Tage alten Keimlingen von *A. thaliana* der Ökotypen Wassilijewskia und Columbia, sowie anschließender RT-PCR mit *pPLA-I*-spezifischen Primern wurde zunächst versucht, die Gesamtsequenz der *pPLA-I* zu amplifizieren. Jedoch konnten aus den jeweiligen Genpools von RNA Wassilijewskia und Columbia Wildtyp) trotz Variation verschiedenster Amplifikationsbedingungen (Polymerase, Thermocyclerprogramm, Primer, Templatekonzentration im PCR-Ansatz) keine spezifischen Fragmente größer als ca. 2,7 kb amplifiziert werden. Daher wurde die Sequenz in vier überlappende Teilamplifikate T1 – T4 unterteilt und anschließend sequenziert. Zusätzlich wurde *pPLA-I*-haltige cDNA mittels Phagenverdünnung aus der Phagenbank CD4-16 gewonnen und ebenfalls eine vollständige Sequenzierung der *pPLA-I* vorgenommen. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden dann mittels der Software „clc free workbench 3“ zu einer kompletten Sequenz zusammengefügt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden sowohl miteinander, als auch mit der bei NCBI vorhandenen cDNA-Sequenz (NM_104867.4), sowie mit der von Yang *et al.* (2007) postulierten Sequenz abgeglichen. Zusätzlich wurden die cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz der *pPLA-I* aus dem Klon F8K4 verglichen. Die gefundenen Unterschiede zwischen den Sequenzen der beiden Ökotypen sollten Rückschlüsse auf die beobachtete unterschiedliche Physiologie der Knockoutmutanten *ppla-I-1* und *ppla-I-3* liefern. Sollten keine Sequenzunterschiede gefunden werden, müssten andere Faktoren für die phänotypischen Differenzen von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* ursächlich sein.

Die Amplifikation der *pPLA-I*-cDNA-Gesamtsequenz scheiterte trotz der Verwendung unterschiedlichster Amplifikationsbedingungen. Daher wurde mittels PCR überprüft, bis zu welcher Länge Amplifikate der *pPLA-I* hergestellt werden konnten. Die Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass 9 verschiedene *pPLA-I*-Amplifikate mit Längen zwischen 368bp und 3936bp gebildet werden sollten. Es konnte festgestellt werden, dass eine Amplifikation von Teilfragmenten größer als 2729bp unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht möglich war (s. Tab. 27, s. Abb. 11). Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA der *pPLA-I*-Sequenz aus dem Klon CD4-16 verwendet. In Tab. 28 sind die Amplifikatlängen der jeweiligen Primerpaare aufgeführt.

Tabelle 27: Verwendete PCR-Bedingungen zur vollständigen Amplifikation der pPLA-I-cDNA-Sequenz

Primerpaare	pPLA-I Yang, pPLA-I cDNA 4.1kb, pPLA-I cDNA full length, B1 -pPLA-I cDNA -B2
Polymerasen	taq-Polymerase (5-Prime), pfu-Polymerase (Biorad), i-Proof Polymerase (Biorad), pfx 50 (Invitrogen)
Templategehalt	10pg – 1µg DNA /Reaktionsansatz in Abständen von einer Zehnerpotenz
Thermocyclerprogramm	veränderte Parameter: Elongationszeit (30s – 3min / kb), incl. Nachpipettieren von Polymerase, Annealingtemperatur (40°C – 72°C)

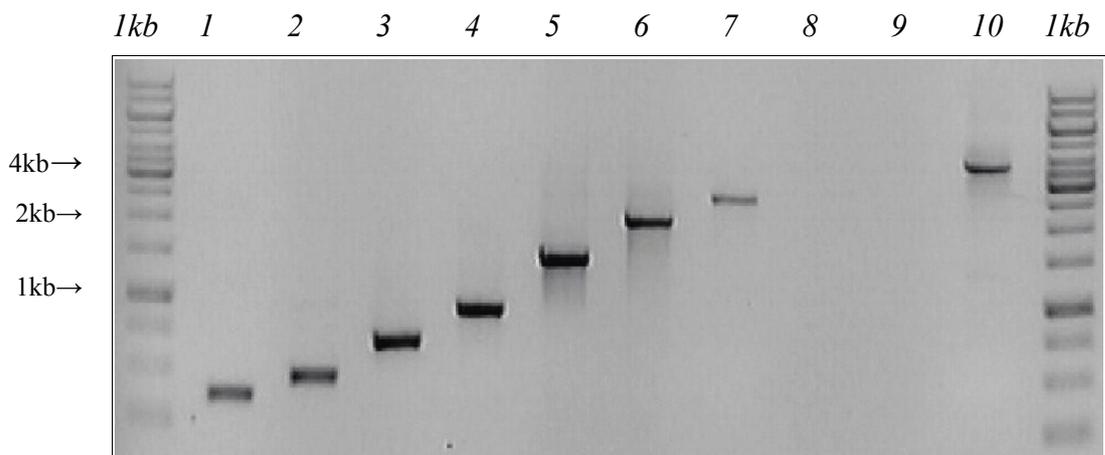


Abbildung 11: Gelelektrophorese verschieden langer Teilamplifikate der pPLA-I-cDNA-Sequenz aus *Wassilijewskia Wildtyp*. Verwendete Primer für die einzelnen Teilamplifikate Reihe 1-10: s. Tab. 29. 1kb: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5µl.

Tabelle 28: Verwendete Primerpaare für pPLA-I-Amplifikationsreihe mit *Wassilijewskia Wildtyp* (*Ws Wt*) als cDNA-Template.

Spur	forward-Primer	reverse-Primer	Amplifikatlänge	cDNA-Template
1	pPLA-I cDNA_for7	pPLA-I full length cDNA_rev	368 bp	Ws Wt
2	pPLA-I Exon18_for	pPLA-I Exon18_rev	483 bp	Ws Wt
3	pPLA-I full length cDNA_for	pPLA-I cDNA_rev1	680 bp	Ws Wt
4	pPLA-I cDNA_for6	pPLA-I full length cDNA_rev	926 bp	Ws Wt
5	pPLA-I cDNA_for5	pPLA-I full length cDNA_rev	1465 bp	Ws Wt
6	pPLA-I cDNA_for4	pPLA-I full length cDNA_rev	2076 bp	Ws Wt
7	pPLA-I cDNA_for3	pPLA-I full length cDNA_rev	2729 bp	Ws Wt
8	pPLA-I cDNA_for2	pPLA-I full length cDNA_rev	3354 bp	Ws Wt
9	pPLA-I full length cDNA_for	pPLA-I full length cDNA_rev	3936 bp	Ws Wt
10	pPLA-I full length cDNA_for	pPLA-I full length cDNA_rev	3767 bp	CD 4-16 als Positivkontrolle

3.1.1 Gewinnung der cDNA der pPLA-I durch Phagenverdünnung der Phagenbank CD4-16

Zur Gewinnung eines *pPLA-I*-haltigen Klons aus der Phagenbank CD4-16 wurden die Phagen zunächst in MRF'-Zellen kloniert und der Phagentiter bestimmt. In der ersten Verdünnungsstufe wurden auf 10 LB-Platten jeweils etwa 5000 Phagenklonen ausplattiert. So wurden insgesamt ca. 50000 Phagenklone gescreent. Die Platten wurden in einer Kolonie-PCR mittels spezifischer *pPLA-I Exon18*-Primer auf das Vorhandensein der *pPLA-I*-Sequenz getestet. Platten, deren Screening ein spezifisches Amplifikat ergab, wurden mit Pufferlösung aufgeschwemmt, und die Phagen-haltige Pufferlösung erneut auf 10 Platten (also geschätzte 500 Phagenklone je Platte) aufgeteilt und diese gescreent. Nach einer weiteren durchgeführten Verdünnungsstufen wurden von Proben einzelner Plaques Kolonie-PCR's durchgeführt, bis letztendlich eine positive Kolonie gefunden werden konnte (s. Abb. 12). Mittels des so erhaltenen Phagenklons wurde *pPLA-I*-haltige Plasmid-DNA gewonnen und diese zur Amplifikation der *pPLA-I*-cDNA und zur Sequenzierung weiterverwendet.

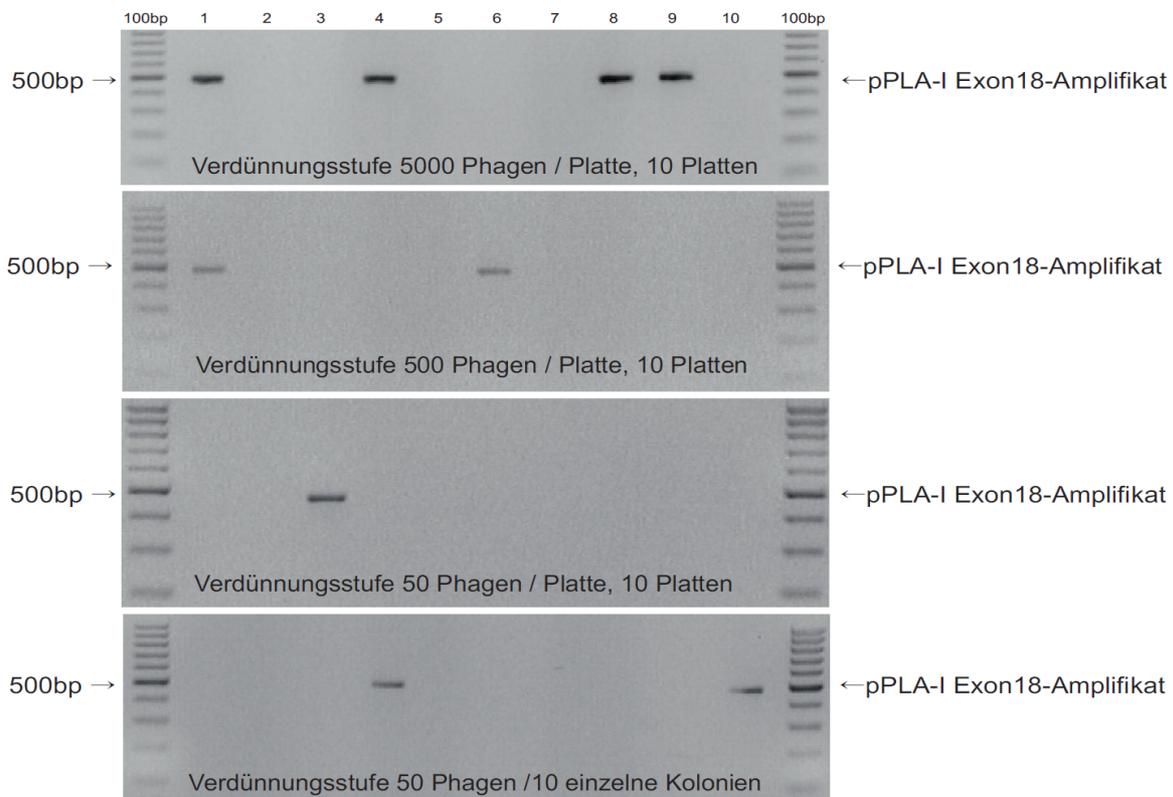
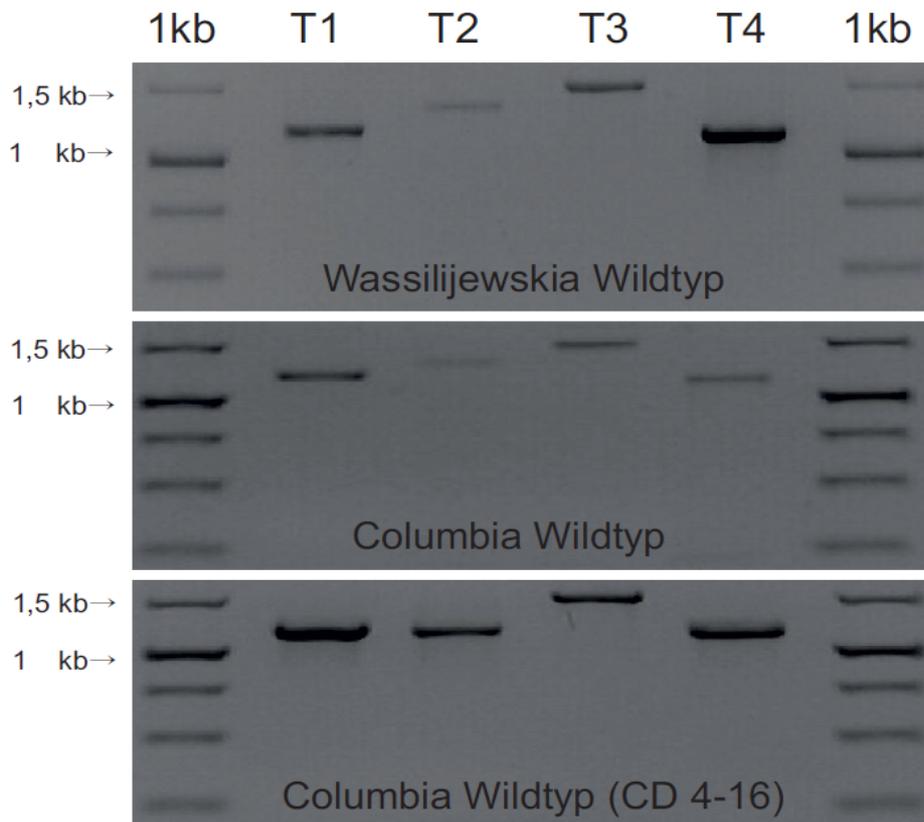


Abbildung 12: DNA-Gelelektrophorese nach PCR mit *pPLA-I Exon18*-Primern. Dargestellt ist das Screening der einzelnen Phagenverdünnungsstufen bis zur Überprüfung einzelner Plaques. Spuren 1-10 zeigen die gebildeten Amplifikate jeweils einer Platte/einer Kolonie. 100bp: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

3.1.2 Amplifikation von Teilsequenzen der *pPLA-I*

Wenn cDNA aus den Wildtypen *Wassilijewskia* und *Columbia* oder dem Phagenklon CD4-16 eingesetzt worden war, ergab die Gelelektrophorese bei allen drei Templates jeweils gleich große Amplifikate für T1, T3 und T4. Lediglich bei Fragment T2 zeigten sich Längenunterschiede der Amplifikate bei Verwendung unterschiedlicher Templates. So wies das Teilamplifikat T2 bei Verwendung von cDNA aus isolierter RNA der beiden Ökotypen jeweils eine Länge 1358 bp auf, während dieses Fragment bei Einsatz von Plasmid-DNA des Klons CD4-16 nur 1189 bp lang war. Auch war festzustellen, dass die Amplifikation von T2 unter Verwendung gleicher PCR-Bedingungen bei Benutzung von RNA aus den Ökotypen *Wassilijewskia* und *Columbia* weniger effizient im Vergleich zur Amplifikation von T2 aus dem Klon CD4-16 war (s. *Abb. 13*, s. *Tab. 29*).



*Abbildung 13: Gelelektrophorese der Teilamplifikate T1 – T4 unter Verwendung der hergestellten cDNA aus dem Ökotypen *Wassilijewskia* und *Columbia*, sowie dem Phagenklon CD4-16 (*Columbia*) als Template. T1 - T4 stellen Teile der Gesamtsequenz von *pPLA-I* dar. 1kb: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.*

Tabelle 29: Länge in bp der Teilfragmente T1 - T4 bei Verwendung der unterschiedlichen Templates

Template / Teilamplifikat	cDNA aus Ws Wt Position / Länge	cDNA aus Col Wt Position / Länge	Plasmid-DNA aus CD4-16 Position / Länge
T1	1 - 1201bp / 1200bp	1 - 1201bp / 1200bp	1 - 1201bp / 1200bp
T2	1101 - 2458bp / 1358bp	1101 - 2458bp / 1358bp	1101 - 2289bp / 1189bp
T3	2401 - 3936bp / 1536bp	2401 - 3936bp / 1536bp	2232 - 3767bp / 1536 bp
T4	2207 - 3361bp / 1155bp	2207 - 3361bp / 1155bp	2038 - 3192bp / 1155bp

Die amplifizierten Teilsequenzen der *pPLA-I*-cDNA aus den Ökotypen Wassilijewskia und Columbia, sowie aus dem isolierten CD4-16-Klon wurden zur Sequenzierung an die Firma Seqlab versandt. Anschließend wurden die überlappenden Sequenzstücke mittels der Software „clc free worbench 3“ zusammengesetzt und so jeweils eine Gesamtsequenz erhalten. Die einzelnen *pPLA-I*-Sequenzen wurden dann für ein Alignment mit der in NCBI angegebenen cDNA-Sequenz, der von Yang *et al.* (2007) postulierten Sequenz und der genomischen Sequenz aus dem Bac-Klon F8K4 verwendet (Gesamtsequenz s. Anhang)

3.1.3 Alignment der Sequenzvarianten der *pPLA-I*

Die aus der Gesamt-RNA hergestellte cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus dem Ökotypen Wassilijewskia hat eine Gesamtlänge von 3936bp und besteht aus 18 Exonen. Im Vergleich zu der durch Yang *et al.* (2007) bei NCBI angegebenen cDNA-Sequenz enthält sie ein zusätzliches Exon (Exon 4) im Bereich von 2352bp bis 2504bp mit einer Gesamtlänge von 153bp, sowie 3 zusätzliche Nukleotide am beginnenden Exon 5 (2595bp – 2597bp). Im Vergleich zur cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus dem CD4-16-Klon verfügt sie zudem über ein zusätzliches Exon (Exon 7) im Bereich von 1278bp bis 1440bp mit einer Länge von 163bp. Die Sequenz stimmt mit dem korrespondierenden Sequenzteil der genomischen *pPLA-I*-Sequenz aus dem Klon F8K4 vollständig überein.

Die aus der Gesamt-RNA hergestellte cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus dem Ökotypen Columbia verfügt ebenfalls wie die Wassilijewskia-Variante über eine Gesamtlänge von 3936bp und besteht aus 18 Exonen. Die Nukleotidabfolge ist mit der Wassilijewskia-Variante vollständig identisch.

Die cDNA-Sequenz der *pPLA-I* aus der CD4-16-Phagenbank weist eine Gesamtlänge von 3767bp auf. Sie verfügt zwar, wie die aus extrahierter RNA erhaltenen Sequenzen, über ein weiteres Exon im Bereich von 2352bp bis 2504bp (Exon4). Ihr fehlt jedoch das allen anderen Sequenzen

gemeinsame Exon 7 im Bereich von 1278bp bis 1440bp. Zudem existieren 18 Punktmutationen im Vergleich zu den anderen vorliegenden Sequenzvarianten. Hierbei handelt es sich um T→C - Austausche an den Positionen 94bp, 488bp, 499bp, 558bp, 728bp, 1716bp und 1949bp, G→A - Austausche an den Positionen 939bp, 1759bp, 1769bp, 2657bp und 3418bp, A→G - Austausche an den Positionen 146bp, 1467bp, 2657bp, 3418bp, 3712bp und 3905bp, sowie einen A→T - Austausch bei 225bp.

Eine Zusammenfassung der jeweiligen Sequenz-Eigenschaften und - Unterschiede ist in *Abb. 14* dargestellt. Die Sequenzierungsergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

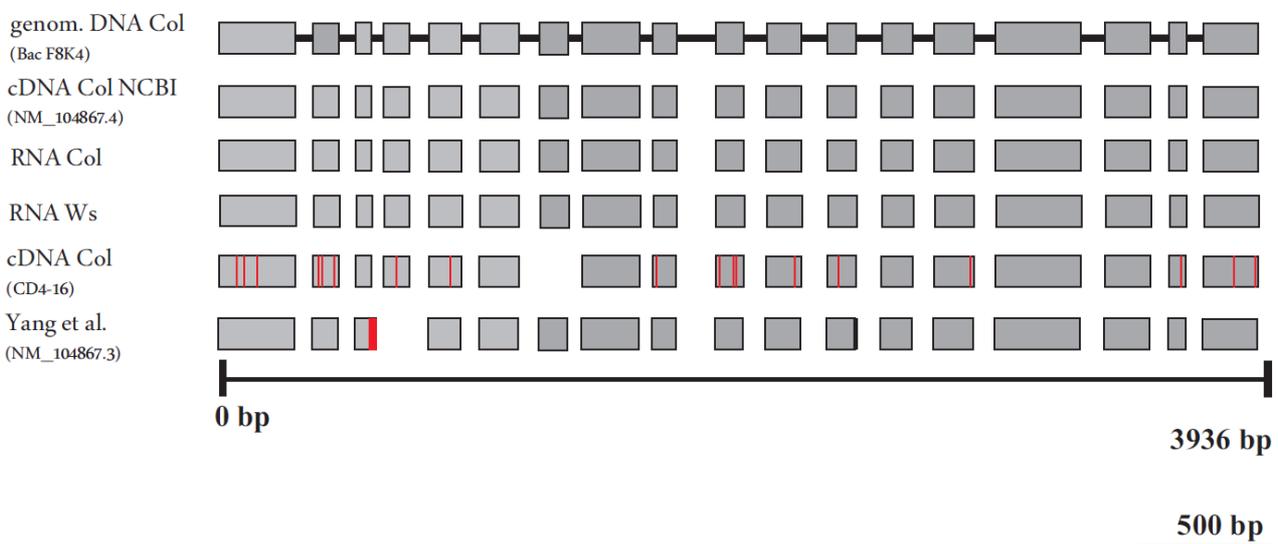


Abbildung 14: Graphische Darstellung der pPLA-I-Sequenzunterschiede zwischen der bei NCBI veröffentlichten cDNA-Sequenz (NM_104867.4), der cDNA-Sequenz von aus den Ökotypen Wassilijewskia und Columbia isolierter RNA, der cDNA-Sequenz aus dem Klon CD4-16 und der postulierten cDNA-Sequenz von Yang et al. (2007) im Vergleich zur genomischen DNA-Sequenz aus dem Bac-Klon F8K4 (Col Wt). Graue Kästen zeigen Exon-Strukturen, schwarze Striche Intron-Strukturen. Mit rot sind die Unterschiede in der Nukleotidsequenz im Vergleich zur Konsensussequenz (F8K4) dargestellt.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aus der RNA von Wassilijewskia und Columbia Wildtyp gewonnenen pPLA-I-cDNA's sind einander vollkommen identisch und zeigen auch im Vergleich zur in der Datenbank NCBI seit 05/2011 eingestellten Sequenz keine Unterschiede. Im Vergleich zur abgeleiteten Aminosäuresequenz der von Yang *et al.* (2007) postulierten cDNA-Sequenz fehlen jedoch 2 Aminosäuren ab Position 729, anschließend folgt ein Aminosäureaustausch D→N. Anstelle der Aminosäuresequenz im Bereich von Exon4 weist diese Sequenz im Bereich von 223

AS - 226AS eine alternative Sequenz auf, die sich von der auf Exon3 direkt nachfolgenden Intron-Sequenz herleiten lässt. Die abgeleitete AS-Sequenz aus der cDNA des CD4-16-Klons zeigt fünf Aminosäureaustausche: H→R an Position 49, R→S an Position 75, L→P an Position 163, I→T an Position 243 und M→I an Position 313. Durch das Fehlen von Exon7 kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und einer daraus resultierenden „nonsense“-Sequenz, in der zahlreiche Stop-Codons enthalten sind. Ab Position 426 unterscheidet sich die AS-Sequenz aus dem CD4-16-Klon daher im Vergleich zu den anderen Sequenzen vollständig. Der erste Sequenzabbruch durch ein Stop-Codon liegt an Position 435 (s. Abb. 15).

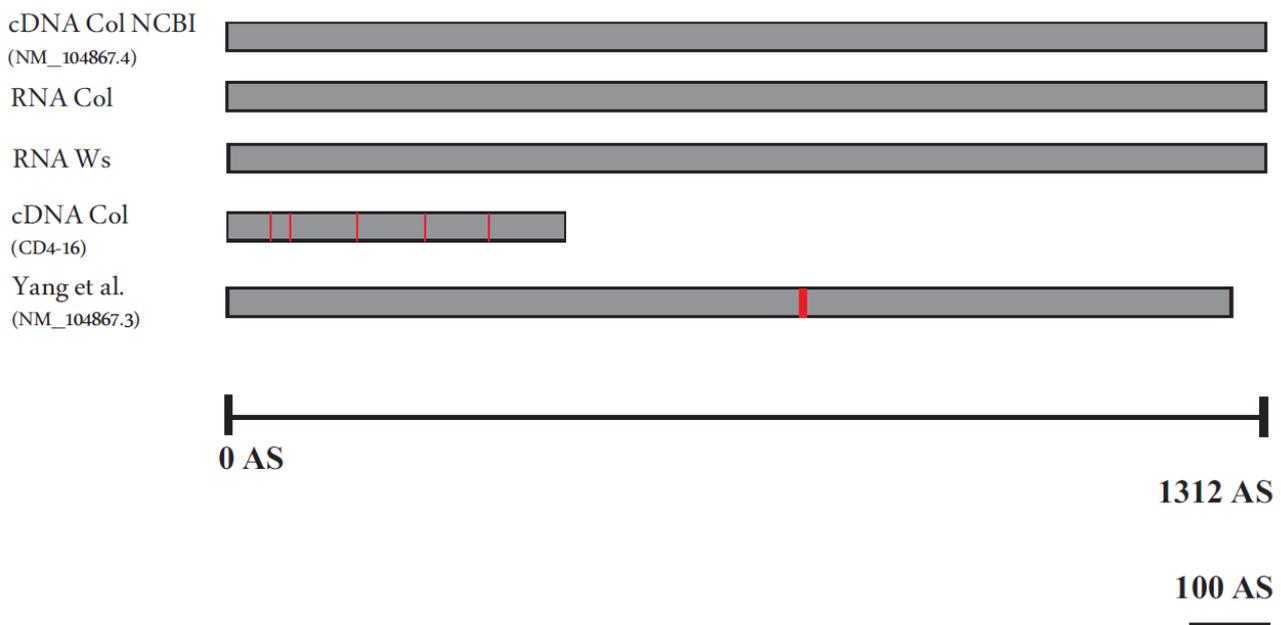


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der aus der Nukleinsäuresequenz verschiedener *pPLA-I*-Varianten hergeleiteten Proteinsequenz. Verglichen wurden die hergeleiteten Sequenzen von aus den Ökotypen *Wassilijewskia* und *Columbia* isolierter RNA, der cDNA aus dem CD4-16-Klon und der von Yang et al. (2007) vorgeschlagenen cDNA-Sequenz mit der bei NCBI eingestellten cDNA-Sequenz der *pPLA-I* (NM_104867.4).

3.2 Ermittlung der relativen RNA-Expressionsrate der *pPLA-I*

Das in der *pPLA-I*-Sequenz des Phagenklons CD4-16 fehlende Exon 7 legt den Schluss nahe, dass die cDNA-Sequenz von CD4-16 aus einer häufig vorkommenden, fehlgespleisten mRNA übersetzt wurde und dass durch dieses Fehlspleicing die vollständige Sequenz-Variante mit Exon7 seltener exprimiert wird. Dies könnte im Zusammenhang mit den gefundenen phänotypischen Unterschiede zwischen den *pPLA-I*-Knockoutmutanten *ppla-I-1* und *ppla-I-3* stehen. Um die RNA-

Expressionsrate der vollständigen Sequenz im Vergleich zur Sequenz mit fehlendem Exon7 in Abhängigkeit zum jeweiligen Ökotyp (Wassilijewskia oder Columbia) zu ermitteln, wurden Primerpaare entwickelt, die entweder in beiden Sequenzvarianten spezifische PCR-Produkte amplifizieren (N- und C-terminale Primer) oder nur in der Gesamtsequenz (Exon7-Primer). Der Vergleich der Expressionsraten sollte dann mögliche Unterschiede auf Transkript-Ebene aufdecken. Im weiteren sollte die vermutete Beteiligung des pPLA-I am Lichtsignalweg von *Arabidopsis* anhand des RNA-Levels nachgewiesen werden. Diesbezüglich mittels Immunolabeling und Reporterproteinen gefundene Resultate sollten untermauert werden. Hierzu wurden Primer verwendet, die spezifisch nur Teile der Gesamtsequenz der *pPLA-I* amplifizieren (Exon7-Primer). Die verwendeten *Arabidopsis*-Keimlinge wurden in einem definierten Licht-Dunkel-Rhythmus angezogen und an definierten Zeitpunkten die RNA-Expressionsrate ermittelt. So sollte eine mögliche Licht-abhängige Steuerung der RNA-Expression nachgewiesen werden.

3.2.1 RNA-Expressionsraten verschiedener *pPLA-I*-Sequenzvarianten

Die gefundene Sequenzvariante des CD4-16-Klons mit fehlendem Exon 7 führte zu der Überlegung, dass diese Sequenz aus einer häufigen mRNA übersetzt wurde und dass eventuell durch Fehlspllicing die Variante mit Exon 7 seltener überexprimiert wird. Um dies zu testen, wurden für C-terminus, Exon7 und N-terminus geeignete Primer für qPCR-Analysen gesucht und auf ihre Effizienz getestet. Anschließend wurde die relative RNA-Expressionsrate der genannten Sequenzteile ermittelt.

3.2.1.1 Überprüfung der Primerpaare auf spezifische und unspezifische Amplifikation

Um festzustellen, ob die entwickelten Primer grundsätzlich für die Verwendung in der Realtime-PCR geeignet sind, wurde eine Standard-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Als Template wurde cDNA verwendet die aus isolierter RNA aus *Arabidopsis* (Wassilijewskia Wildtyp) transkribiert wurde. Nur Primerpaare, die in der PCR ein Fragment spezifischer Größe, aber keine weiteren unspezifischen Fragmente amplifizierten, wurden für die Primeroptimierung weiterverwendet (s. Abb. 16). Einige Primerpaare konnten nicht für einen Primereffizienztest weiterverwendet werden, da sie unspezifische Amplifikate ausbildeten (C4 und C6, sowie Ex7/2 - Ex7/5) oder kein spezifisches Amplifikat synthetisierten (C3).

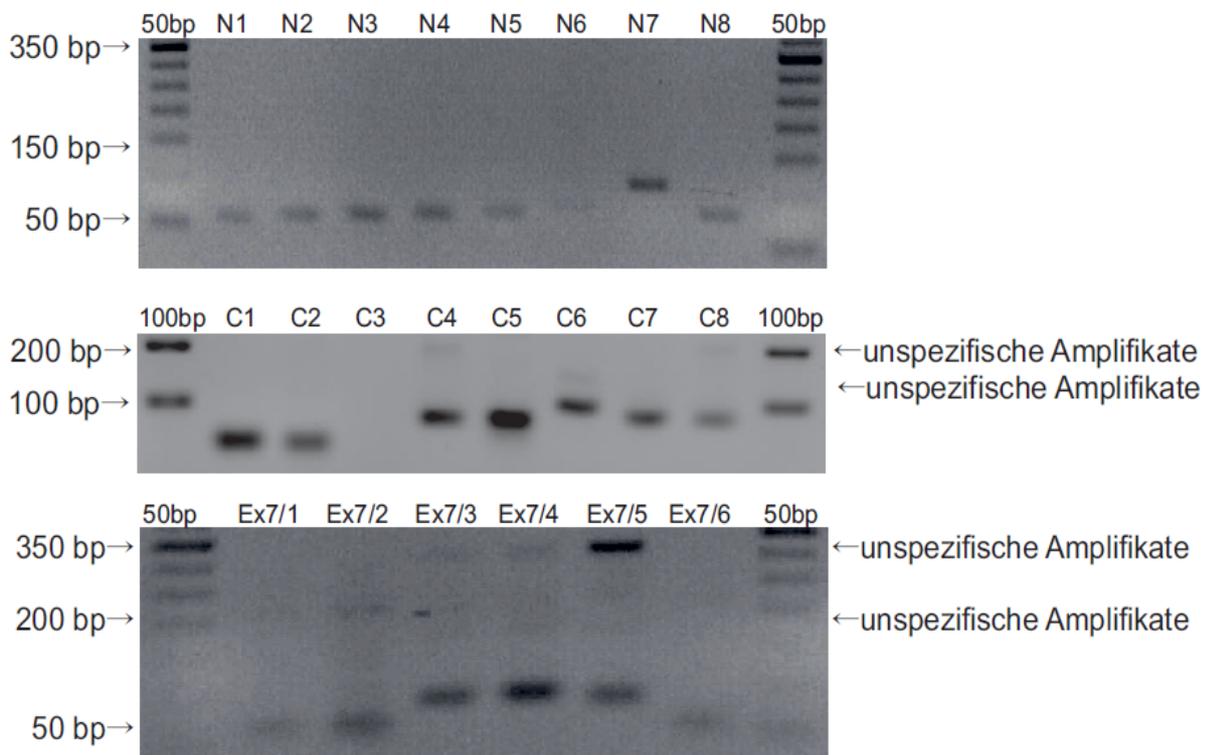


Abbildung 16: Gelelektrophorese der PCR mit verschiedenen Realtime Primern zur Überprüfung auf spezifische und unspezifische Amplifikationen. N1-N8: Primer zur Amplifikation von N-terminalen Sequenzstücken, C1-C8: Primer zur Amplifikation von C-terminalen Sequenzstücken, Exon7/1 -Exon7/6: Primer zur Amplifikation von Sequenzstücken aus Exon7. Die Primerpaare Cterm4, Cterm6, Cterm 8, sowie Exon 7/2 bis Exon 7/5 bildeten bei der PCR unspezifische Amplifikate aus. 50bp: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

3.2.1.2 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Für den Primereffizienztest musste zunächst Exon7-haltige Plasmid-DNA hergestellt werden, um die Exon7-Primerpaare testen zu können. Daher wurde eine ca. 1400bp lange, Exon7-haltige Sequenz (*pPLA-I*-Teilamplifikat T2 aus Wassilijewskia, s. 3.1.2) mittels attB-Primern amplifiziert und in den Vektor pDONR221 kloniert. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges des Exon7-haltigen Fragmentes wurde eine PCR mit den Primern B1-pPLA-I Exon7-B2_for und -rev, sowie eine Kontrollspaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* durchgeführt. Das Amplifikat sollte eine spezifische Länge von ca. 1400bp aufweisen. Die Kontrollspaltung sollte zwei Fragmente mit einer Größe von 2,5kb und 1,5kb ergeben (s. Abb. 17).

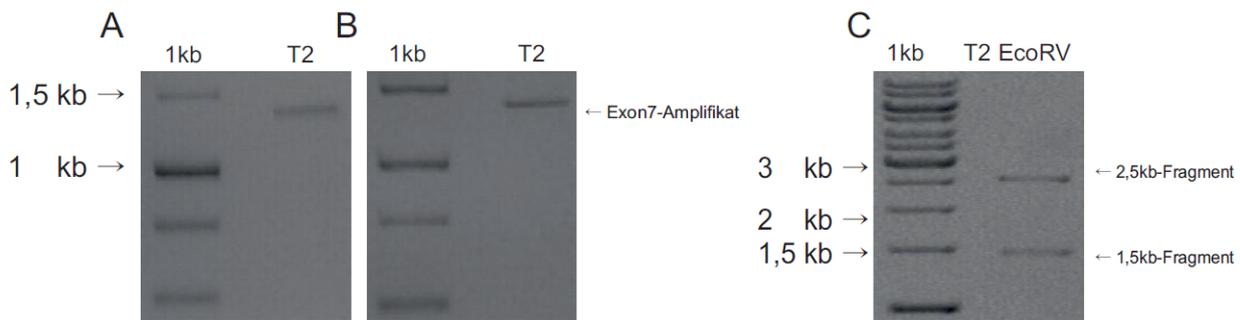


Abbildung 17: Gelelektrophoresebilder zur Herstellung des Konstruktes pPLA-I Exon7/pENTRY221. A) Amplifikation von B1-pPLA-I Exon7-B2 aus pPLA-I-haltiger cDNA (Wassilijewskia Wildtyp) mit B1-pPLA-I Exon7-B2-Primern. B) PCR zur Überprüfung des Klonierungserfolges von pENTRY221-Exon7 mit M13-Primern C) Restriktionsenzymspaltung von B1-pPLA-I Exon7-B2/pENTRY221 mit EcoRV. 1kb: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

Nach Gewinnung der Exon7-haltigen Plasmid-DNA konnte der Primereffizienztest durchgeführt werden. Die getesteten Primerpaare wurden zunächst anhand der Negativkontrolle der qPCR auf unspezifische Amplifikationen untersucht. Die Primereffizienz wurde nur für Primerpaare ermittelt, bei denen die Negativkontrolle Amplifikationswerte über 31 aufwies oder keine Amplifikationszahl ermittelt werden konnte (s. Tab. 30).

Das Primerpaar Nterm6 ergab in der PCR eine Amplifikationszahl unter 31, was auf unspezifische Bindungen der Primer hindeutet. Die Primerpaare Cterm4, Cterm6, Cterm 8, sowie Exon 7/2 bis Exon 7/5 bildeten bei der PCR unspezifische Amplifikate aus. Bei der PCR mit den C-term3-Primerpaaren konnte kein Amplifikat spezifischer Länge gebildet werden. Daher scheidet die genannten Primerpaare für eine Verwendung in der Realtime-PCR aus.

Tabelle 30: Überprüfung der Primerpaare auf Eignung für den Einsatz in der Realtime-PCR.

Primerpaar	Zyklenzahl	Primerpaar	Zyklenzahl	Primerpaar	Zyklenzahl
Nterm1	-	Cterm1	-	Exon7/1	33,8
Nterm2	-	Cterm2	-	Exon7/2	Unspez. Ampl.
Nterm3	-	Cterm3	kein Ampl.	Exon7/3	Unspez. Ampl.
Nterm4	-	Cterm4	Unspez. Ampl.	Exon7/4	Unspez. Ampl.
Nterm5	34,4	Cterm5	-	Exon7/5	Unspez. Ampl.
Nterm6	25,64	Cterm6	Unspez. Ampl.	Exon7/6	-
Nterm7	38,6	Cterm7	35,5		
Nterm8	34,9	Cterm8	Unspez. Ampl.		

Die in Tab. 31 genannten Primerpaare weisen eine Primereffizienz im Bereich von 0,8 - 1,2 auf. Die Primerpaare Nterm5, Cterm1 und Exon7/1 wurden für die Realtime-PCR zur Ermittlung der Expressionsraten der betreffenden Sequenzabschnitte ausgewählt.

Tabelle 31: Ermittelte Primereffizienz für die ausgewählten Primerpaare

Primerpaar	Steigung Primereffizienz-Gerade	E(ffizienz) = $10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$
Nterm5	-3,27	1,02
Nterm7	-2,93	1,19
Nterm8	-3,36	0,99
Cterm1	-3,72	0,86
Cterm7	-3,73	0,85
Exon 7/1	-3,14	1,08

Die anschließende Realtime-PCR wurde mit Primerpaaren des endogenen Vergleichsgens Ubiquitin durchgeführt, da die Amplifikationszahlen denen der *pPLA-I*-spezifischen Primerpaare am ähnlichsten sind. Als Template diente cDNA, die zuvor aus RNA von Wassilijewskia und Columbia Wildtyp gewonnen worden war. Die aus der Realtime-PCR erhaltenen Zyklenzahlen der Sequenz-spezifischen Primerpaare, sowie der Primerpaare der endogenen Gene wurden mittels der Software REST 2009 ausgewertet (s. Abb. 18).

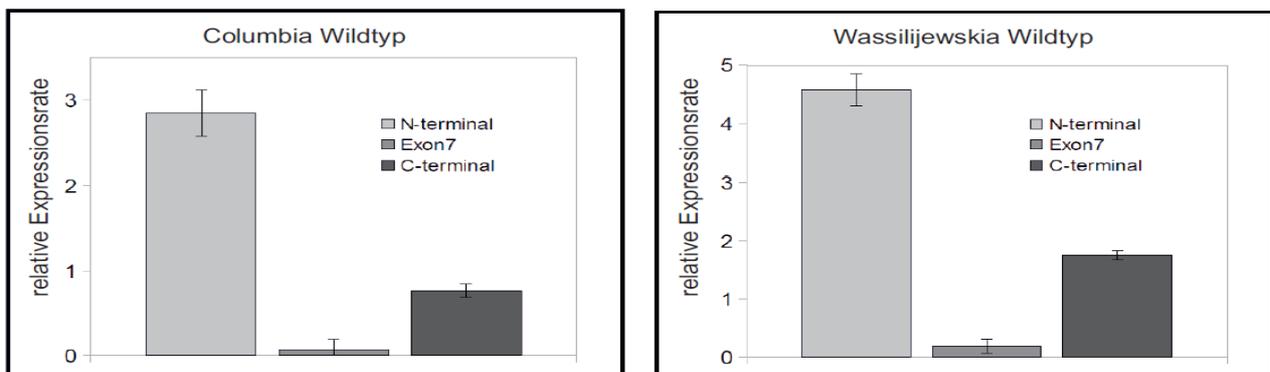


Abbildung 18: Dargestellt ist die relative Expressionsrate verschiedener Sequenzbereiche der *pPLA-I* aus Wassilijewskia und Columbia Wildtyp.

Zwar wurden für den Wassilijewskia Wildtyp insgesamt höhere Expressionsraten als für den Columbia Wildtyp ermittelt, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der Expressionsraten untereinander. Die errechneten Expressionsraten ergaben für den Wassilijewskia Wildtyp ein etwa 40-fach höhere Expressionsrate des N-terminalen Sequenzbereichs, sowie eine

etwa 8-fach höhere Expressionsrate des C-terminalen Sequenzbereichs im Vergleich zum Sequenzbereich von Exon7. Im Columbia Wildtyp war die Expressionsrate im N-terminalen Sequenzbereich etwa 30-fach und im C-terminalen Sequenzbereich erneut etwa 8-fach hochreguliert, im Vergleich zur Expressionsrate des Sequenzbereiches von Exon7. Somit geben nur Messwerte, die mit Primern für Exon7 erzeugt wurden, die Expressionsrate korrekt wieder. Daher wurden die Exon7-Primer in allen folgenden Experimenten eingesetzt.

3.2.2 Abhängigkeit der *pPLA-I*-Expression vom Licht-Dunkel-Rhythmus

Die RNA-Expressionsanalyse von *pPLA-I* in *Wassilijewskia* Wildtyp-Keimlingen nach Beginn der Lichtphase ergab zunächst ein Ansteigen der relativen Expressionsrate bis auf 1,9-fach nach 15min. Dann kam es zu einem leichten tendenziellen Abflachen des Wertes bis auf das 1,6-fache nach einer Inkubationszeit von 300min. Im gesamten Zeitraum war eine Hochregulation der Expression durch Licht zu verzeichnen.

Nach Beginn der Dunkelphase kam es zu einem geringen tendenziellen Abfall der relativen Expressionsrate bis auf einen Minimalwert von 0,6-fach nach 150min. Nach 30min war bis zum Ende des Untersuchungs-Zeitraums eine geringe Repression im Dunkeln im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen (s. *Abb. 19*).

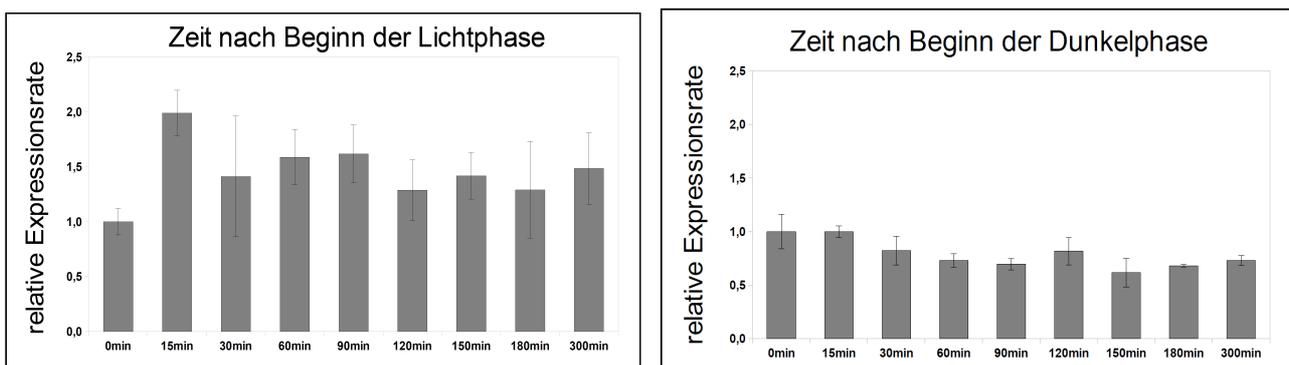


Abbildung 19: Dargestellt ist die relative Expressionsrate der *pPLA-I* aus dem *Wassilijewskia* Wildtyp mit Exon7/1-Primern nach Beginn der Lichtphase und der Dunkelphase.

3.3 Lokalisierung von pPLA-I in *A. thaliana* mittels Immunolabeling

Der Einsatz des Immunolabelings im Whole Mount Verfahren sollte die *in situ* - Lokalisierung der pPLA-I in *Arabidopsis* ermöglichen, nachdem festgestellt wurde, dass das Immunolabeling im Embedding-Verfahren nicht für *Arabidopsis*-Wurzeln geeignet ist. Zum einen sollte dadurch die grundsätzliche Expression der pPLA-I auf Zellebene ermittelt werden, um Hinweise auf die Funktion zu erhalten. Durch Veränderung der Lichtbedingungen oder der Auxinkonzentration der Zellen sollte weiter die Hypothese über eine mögliche Beteiligung der pPLA-I am Licht- und Auxinsignalweg in *Arabidopsis* gefestigt werden.

3.3.1 Herstellung von pPLA-I spezifischen Antikörpern

Für ein späteres Immunolabeling der pPLA-I in *A. thaliana* wurden zunächst zwei spezifische Antikörper hergestellt. Ein N-terminaler Peptidantikörper sollte dabei an beide ermittelten Sequenzvarianten der pPLA-I binden können. Ein C-terminaler Antikörper, welcher mittels einer in *E. coli* überexprimierten Peptidsequenz hergestellt wurde, diente der spezifischen Bindung an das pPLA-I-Protein, das aus der vollständigen RNA mit Exon7 synthetisiert wurde. Das hypothetische Protein, das möglicherweise aus RNA mit fehlendem Exon7 synthetisiert wurde, könnte durch diesen Antikörper nicht detektiert werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, gegebenenfalls Unterschiede in der Expression beider Proteinvarianten der pPLA-I zu ermitteln. Ansonsten bieten zwei verschiedene Antikörper die Möglichkeit, die Ergebnisse wechselseitig zu überprüfen.

Die Auswahl der N-terminalen Peptidsequenz zur Herstellung des Peptidantikörpers erfolgte aufgrund von Sequenzvorschlägen der Firma Eurogentec. Für die Herstellung des C-terminalen Antikörpers wurde die komplette Proteinsequenz von Exon 18 ausgewählt. Diese wurde in *E. coli* überexprimiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils in zwei Kaninchen und wurde mittels Western Blot überwacht. Nachdem die pPLA-I-Antikörper-Produktion ihr Optimum erreicht hatte wurde das gesamte Antiserum gewonnen und übersandt.

3.3.1.1 Herstellung von B1-pPLA-I Exon18-B2/ pGEX-2TM-GW

Mittels spezifischer attB-Primer wurde das Fragment B1- pPLA-I Exon18 -B2 amplifiziert und das PCR-Produkt gelelektrophoretisch auf die spezifische Länge von 480bp überprüft (s. Abb. 20).

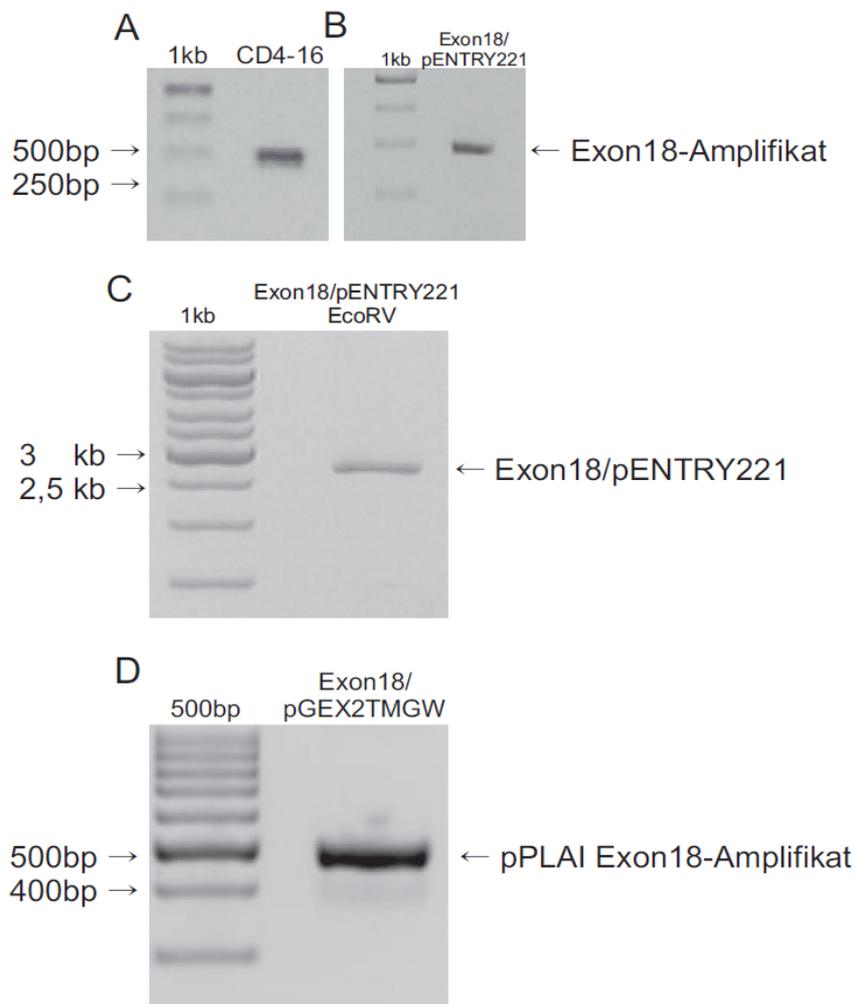


Abbildung 20: DNA-Gelelektrophorese A) des gebildeten Amplifikates pPLAI Exon18 unter Verwendung des Phagenklons CD4-16 als Template und den Primern B1-pPLAI Exon18-B2_for und _rev B) des gebildeten Amplifikates pPLAI Exon18 unter Verwendung von L1 -pPLAI Exon18 -L2 / pENTRY221 als Template und M13-Primern, C) der Restriktionsenzymspaltung von L1 -pPLAI Exon18 -L2 / pENTRY221 mit EcoRV und D) des gebildeten Amplifikates pPLAI Exon18 mit B1- pPLAI Exon18 -B2 / pGEX-2TM-GW als Template und pPLAI Exon18-Primern. 1kb und 500bp: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

Nach erfolgter Klonierung eines spezifischen Amplifikates wurde der Entry-Vektor L1-pPLAI Exon18-L2 /pENTRY221 auf Präsenz des Inserts hin überprüft. Hierzu wurde die Plasmid-DNA des Vektors für eine Kontroll-PCR mit M13-Primern, sowie für eine Kontroll-Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verwendet und die Ansätze jeweils gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Amplifikat sollte erneut eine Größe von 480bp aufweisen. Die Restriktion hatte eine Linearisierung zur Folge, so dass das resultierende Fragment eine Länge von 2900bp aufweisen sollte. Zudem

wurde eine Sequenzierung der Klonierungsstelle mit M13_for- und M13_rev-Primern vorgenommen und die erhaltenen Sequenzstücke zu einer kompletten Sequenz zusammengefügt (s. Anhang). Ein nachfolgendes Alignment mit der bekannten *pPLA-I*-cDNA-Sequenz ergab eine vollständige Übereinstimmung. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges von B1- *pPLA-I Exon18 -B2* / *pGEX-2TM-GW* wurde eine PCR mit den Primern *pPLA-I Exon18_for* und *pPLA-I Exon18_rev* durchgeführt. Das Amplifikat sollte wieder eine spezifische Länge von 480bp aufweisen (s. *Abb. 20*). Die durchgeführten Gelelektrophoresen ergaben die gewünschten Ergebnisse.

3.3.1.2 Überexpression von *pPLA-I-Exon18-His-tag* in *E. coli* und Aufreinigung

Das rekombinante *pPLA-I-Exon18-His-Tag*-Protein wurde denaturierend aus den transformierten *E. coli* aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE von Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte dokumentiert. Zu erwarten war die Aufreinigung eines spezifischen Proteins mit einem Molekulargewicht von 18kDa. Diese Annahme stützt sich auf eine Berechnung durch das Softwareprogramm „Exspasy Compute pI/Mw“ anhand der übersetzten Aminosäuresequenz von Exon18. Die SDS-PAGE ergab die selektive Aufreinigung eines Proteins mit spezifischer Größe (s. *Abb 21*).

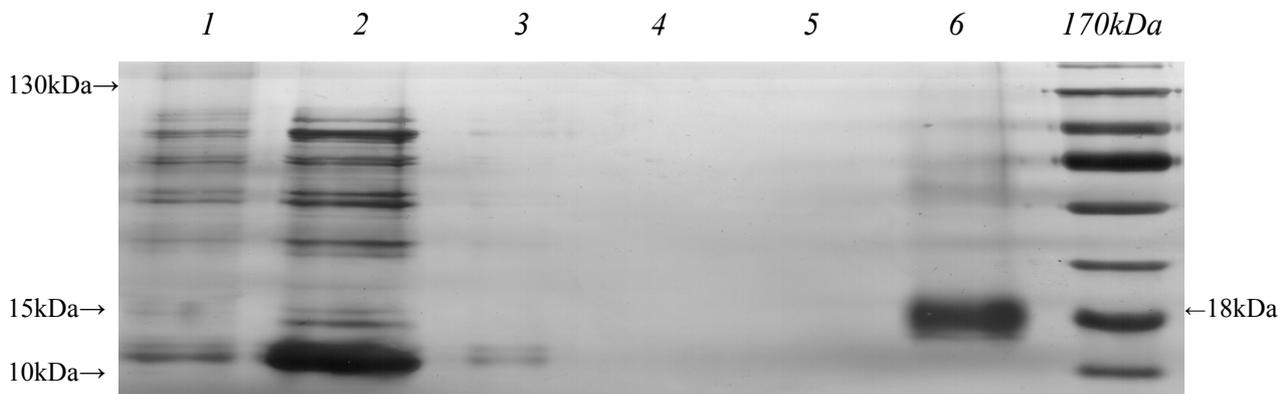


Abbildung 21: SDS-PAGE der denaturierenden Proteinaufreinigung mittels His-Tag und Ni-NTA-Säule. Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung von pPLA-I-Exon18-His-Tag. Spur1: 0,5µl Suspension nach Proteinaufschluss mittels French Press, Spur2: 5µl Überstand gelösten Proteins in Lysis-Puffer B, Spur3: 5µl Überstand nach erstem Waschschrift der Ni-NTA-Matrix, Spur4: 5µl Überstand nach zweitem Waschschrift der Ni-NTA-Matrix, Spur5: 5µl Überstand nach drittem Waschschrift der Ni-NTA-Matrix, Spur6: 5µl von Ni-NTA-Säule eluiertes Protein, 170kDa: 5µl Proteinstandard.

3.3.1.3 Überprüfung des Immunisierungsfortschritts

Serumproben der zwei zur Immunisierung mit dem rekombinanten pPLA-I Exon18-His-Tag-Protein verwendeten Kaninchen des 120., 150. und 165. Immunisierungstages wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für einen Western Blot mit rekombinantem pPLA-I Exon18-His-Tag-Protein verwendet (s. Abb. 22). Die Immunisierung wurde nach dem 165. Immunisierungstag beendet, da der Western Blot für beide Kaninchen eine ausreichende Menge an gebildetem pPLA-I-spezifischen Antikörper vermuten ließ und zudem keine wesentliche Erhöhung der pPLA-I-Antikörperkonzentration im Serum der Kaninchen zu erwarten war.

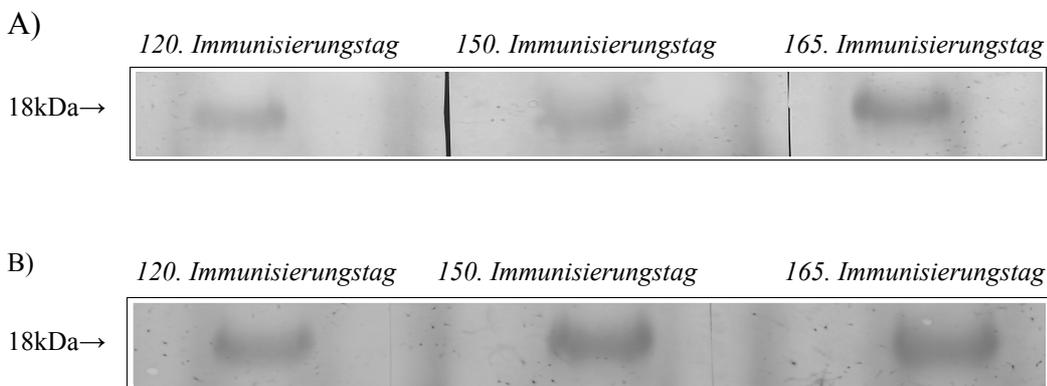


Abbildung 22: Überprüfung des Immunisierungsfortschritts mittels SDS-PAGE und Western Blot der übersendeten Immunisierungsproben von A) Kaninchen 1 und B) Kaninchen 2 vom 120., 150. und 165. Immunisierungstag. Gelbild zeigt die spezifische 18kDa-Bande.

3.3.2 Konfokale Lasermikroskopie

Ein wichtiger Parameter bei der Erstellung von Konfokal-Aufnahmen ist der Detektor Gain. Durch die Einstellung dieses Faktors wird die Verstärkung des Fluoreszenzsignals justiert. Ein zu stark erhöhter Detektor Gain würde zwangsläufig zur Darstellung unspezifischer Autofluoreszenz führen. Daher wurde mittels *Arabidopsis*-Proben, die nur mit dem ersten Antikörper, aber nicht mit dem zweiten, Fluoreszenz-markierten Antikörper inkubiert wurden, ansonsten aber identisch behandelt worden waren, der maximal mögliche Detektor Gain ermittelt, bei dem keine unspezifische Fluoreszenz mehr detektierbar war. Für die zu untersuchenden Gewebe konnte dann der Detektor Gain unterhalb dieses Schwellenwertes so eingestellt werden, dass die spezifische Fluoreszenz gut erkennbar war. Eine weitere Einstellung ist das Pinhole, welches ein Maß für die betrachtete

Schichtdicke im Gewebe darstellt. Je höher der Pinhole-Wert, umso größer ist auch der Gewebebereich, aus dem die Fluoreszenz wiedergegeben wird. Bei Verwendung einer zu großen Einstellung des Pinholes ist die Aufnahme im eigentlichen Sinne aber nicht mehr konfokal. Um die Konfokalität zu gewährleisten und Lokalisierungen in der Zelle optimal darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Pinhole-Einstellung verwendet, welche die Darstellung von maximal 1µM Schichtdicke ermöglicht.

Im folgenden werden zur Beschreibung des erkennbaren Fluoreszenzsignals die Begriffe Expression und Lokalisierung verwendet. Der Begriff Expression bezieht sich dabei ausschließlich auf die Proteinebene und meint das Vorhandensein von Protein auf Gewebe-spezifischer Ebene. Die Lokalisierung beschreibt hingegen die subzelluläre Expression.

In allen folgenden Abbildungen zur Immunocytochemie sind die einzelnen Fluoreszenzbilder durch Großbuchstaben bezeichnet. Mit den entsprechenden klein geschriebenen Buchstaben werden die korrespondierenden DIC-Aufnahmen (Differentialinterferenzkontrast) des betrachteten Gewebes zugewiesen. Zu jeder Abbildung sind die verwendete *Arabidopsis*-Linie und der verwendete Antikörper angegeben.

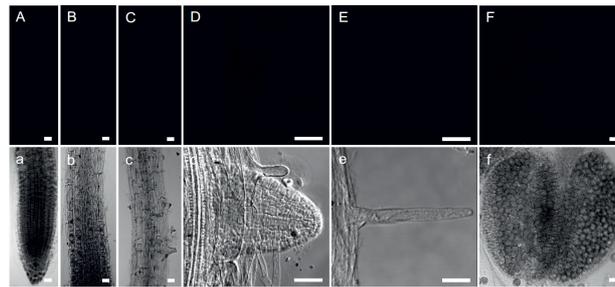
3.3.2.1 Negativkontrollen

Versuche, das vollständige pPLA-I-Protein im Western Blot darzustellen, schlugen fehl. Daher wurden die Knockoutlinien *ppla-I-1* und *ppla-I-3* als Kontrollen für die Spezifität der hergestellten Antikörper im Immunolabeling verwendet. Die Abbildungen A - F zeigen mittels konfokaler Lasermikroskopie erstellte Aufnahmen verschiedener Gewebe von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* nach Immunolabeling mit N-terminalen oder C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern.

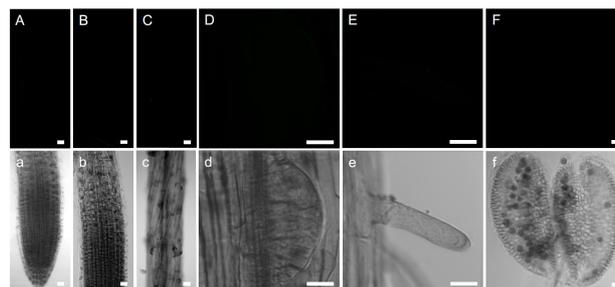
Die Untersuchungen beschränken sich dabei auf Wurzel und Pollen, da die anderen Gewebe von *Arabidopsis* zum einen durch ihren hohen Chlorophyllgehalt ein zu hohes Maß an Autofluoreszenz aufweisen. Ein weiteres Problem ist die Gewebedicke. Die Erstellung konfokaler Mikroskopieaufnahmen ist rein technisch auf 100µm begrenzt. Hypokotyle, Petiolen oder Blätter sind daher nicht Bestandteil der folgenden lasermikroskopischen Untersuchungen.

Die Aufnahmen von Wurzelspitze, beginnender Elongationszone, physiologischer älterer Elongationszone, entstehender Seitenwurzel, Wurzelhaar und Pollenkörner zeigen kein detektierbares spezifisches Fluoreszenzsignal bei Verwendung von N-terminalen oder C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in den Knockoutmutante *ppla-I-1* und *ppla-I-3* (s. Abb. 23).

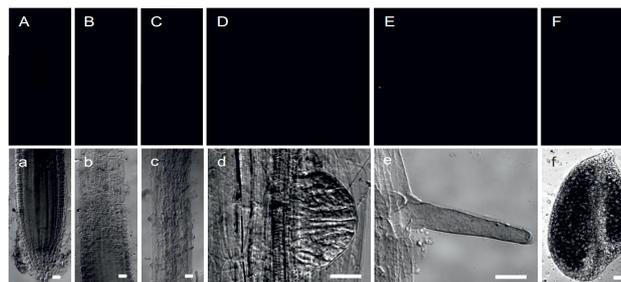
Immunolabeling von *ppla-I-1* mit N-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern



Immunolabeling von *ppla-I-1* mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern



Immunolabeling von *ppla-I-3* mit N-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern



Immunolabeling von *ppla-I-3* mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern

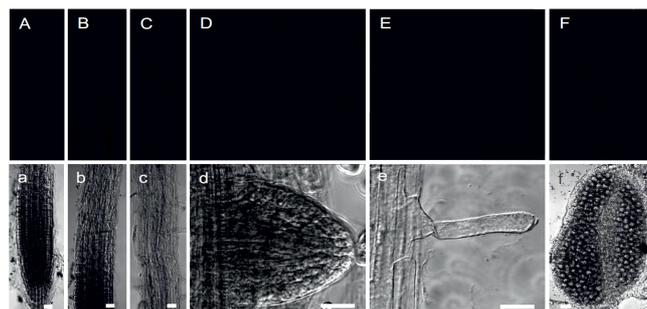
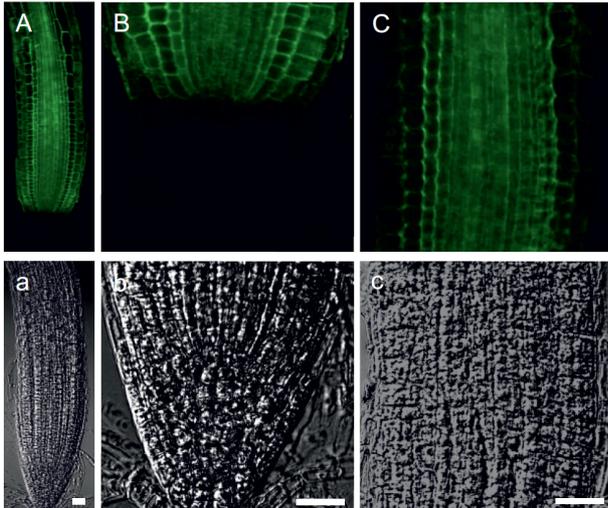


Abbildung 23: Wurzel und Pollen von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* nach Immunolabeling (Wachstum in $15\mu\text{E}$ Weißlicht) mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, 7 Tage, B) meristematische Zone, 7 Tage, C) Elongationszone, 7 Tage, D) beginnende Seitenwurzel, 14 Tage, E) Wurzelhaar, 14 Tage, F) Pollen, 28 Tage, A)-F) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-f) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

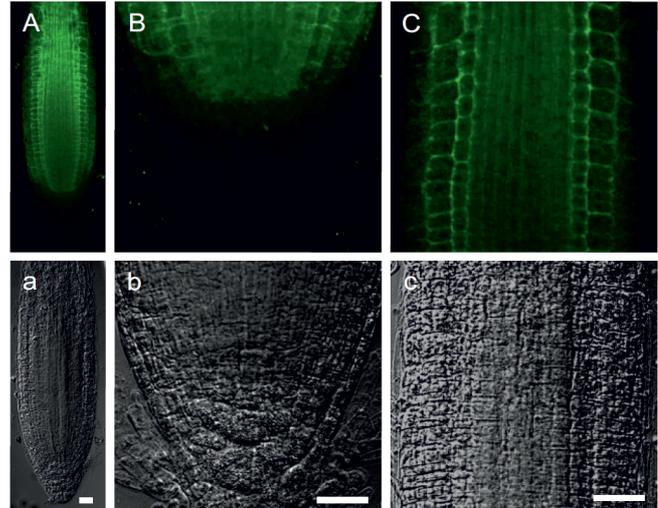
3.3.2.2 Wachstum der Keimlinge in 15 μ E Weißlicht

Die lasermikroskopischen Übersichtsabbildungen 24 A - C zeigen die Expression spezifischer Fluoreszenz in der Wurzelspitze von *Wassilijewskia* und *Columbia* Wildtyp nach Immunolabeling mit N- und C-terminalen Antikörpern. Fluoreszenzsignal konnte mit Ausnahme der Wurzelhaube in

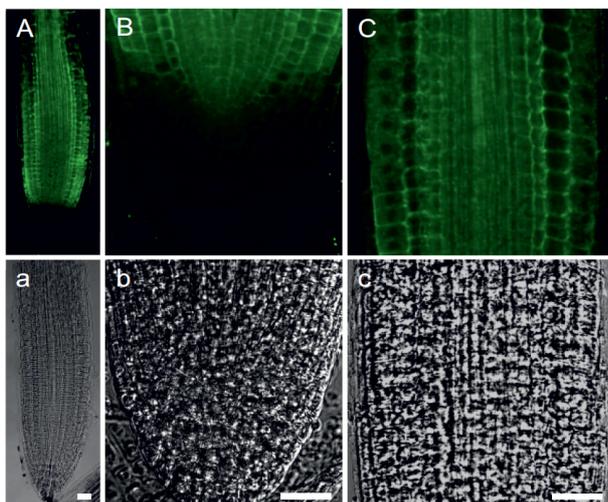
Immunolabeling von *Ws Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *Ws Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *Col Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *Col Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern

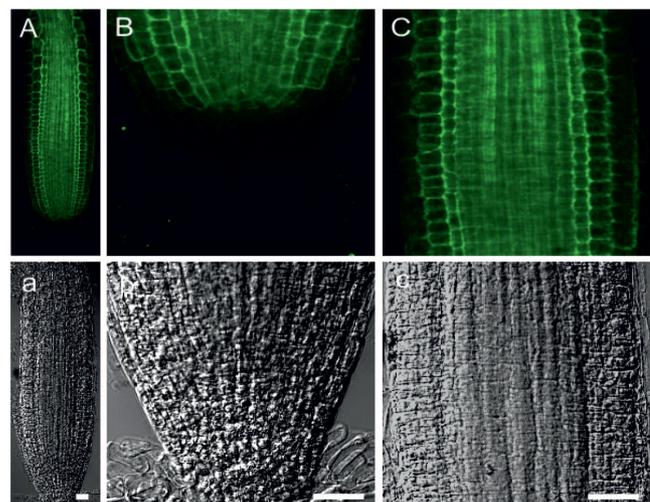


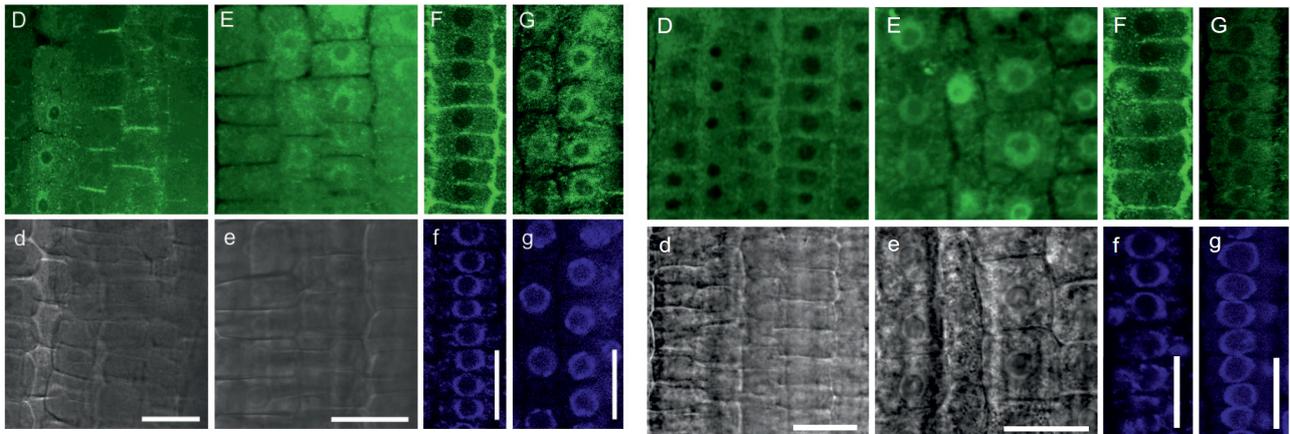
Abbildung 24: Wurzelspitze von *Wassilijewskia* (*Ws Wt*) und *Columbia* Wildtyp (*Col Wt*) nach 7 Tagen Wachstum in 15 μ E Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, A)-C) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-c) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20 μ m. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

der gesamten Wurzelspitze gefunden werden. Plasmamembran-nah ist spezifisches Fluoreszenzsignal insbesondere in Epidermis, Cortex und Endodermis detektierbar. Cytosolisch lokalisiert ist es hauptsächlich in der Stele vorzufinden.

Die lasermikroskopischen Detailaufnahmen 25 D - G zeigen die Lokalisierung spezifischer Fluoreszenz in der meristematischen Zone der Wurzelspitze. In allen Zellschichten ist ein cytosolisches Fluoreszenzsignal erkennbar. In Endodermis (Abb. 25 D) und Cortex (Abb. 25 D und F) ist zudem eine erhöhte Lokalisierung nahe der Plasmamembran zu verzeichnen.

Immunolabeling von *Ws Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern

Immunolabeling von *Ws Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *Col Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern

Immunolabeling von *Col Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern

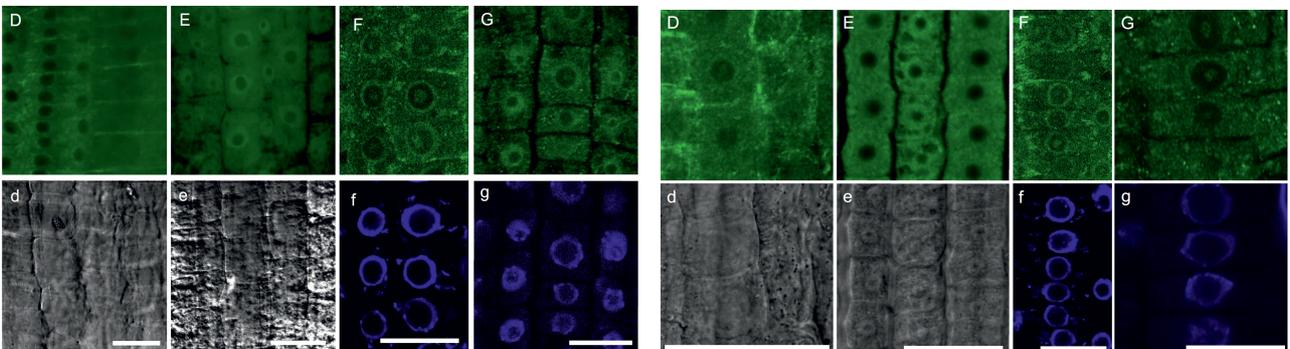


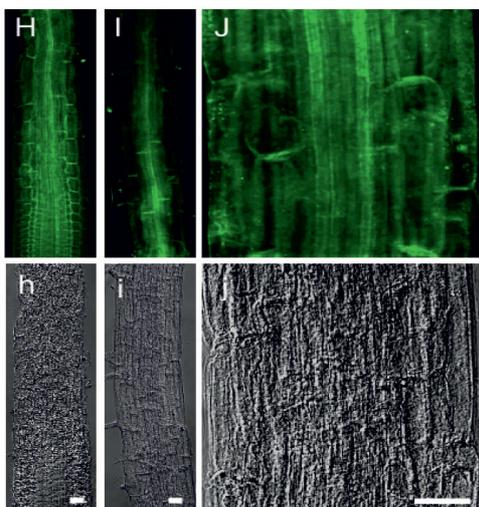
Abbildung 25: Detailaufnahmen der meristematischen Zone der Wurzelspitze von *Wassiljewskia (Ws Wt)* und *Columbia Wildtyp (Col Wt)* nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. D) meristematische Zone \emptyset , 20-fach E) Epidermis, Aufsicht, 20-fach, F) Cortex, Aufsicht, 63-fach G) Epidermis, Aufsicht, 63-fach, D)-G) Alexa Fluor[®]488-Signal, d) und e) korrespondierende DIC-Aufnahmen, f) und g) korrespondierende DAPI-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. \emptyset = Längsschnitt.

Insbesondere in der Epidermis (*Abb. 25 E und G*) und auch im Cortex (*Abb. 25 D und F*) ist ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im endoplasmatische Retikulum um den Nukleus herum und im Zentrum des Nukleus detektierbar.

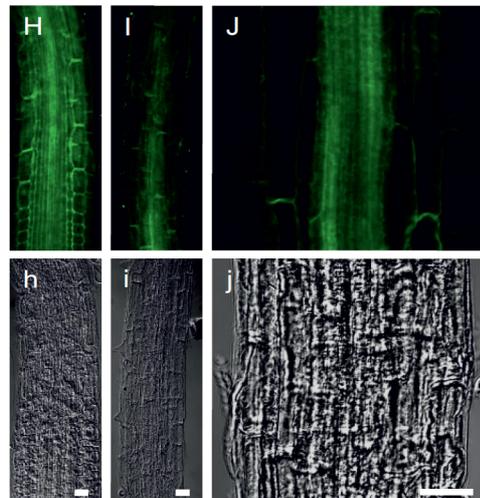
Die Übersichtsabbildungen 26 H - J zeigen die Lokalisierung in der beginnenden Elongationszone. Spezifisches Fluoreszenzsignal ist am Übergang von meristematischer Zone zu Elongationszone (*Abb. 26 H.*) weiterhin im Cytosol zu sehen und Plasmamembran-nah detektierbar. Jedoch nimmt das Signal in Richtung Wurzelbasis deutlich ab. Diese Abnahme ist zunächst in Epidermis, Cortex und Endodermis erkennbar. Im weiteren Verlauf Richtung Wurzelbasis wird auch die spezifische Fluoreszenz in der Stele deutlich schwächer (*Abb. 26 I*). Zunächst verschwindet das Plasmamembran-nahe Signal entlang der lateralen Zellwände. In *Abbildung 26 J* ist jeweils die zelluläre Lokalisierung des Fluoreszenzsignals in der beginnenden Elongationszone dargestellt. Ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum ist hier nicht mehr zu verzeichnen.

Abbildung 27 K zeigt jeweils eine an der Hauptwurzel entstehende Seitenwurzel. In diesem Gewebe konnte kein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Lediglich in den zur Elongationszone der Hauptwurzel zählenden Randbereichen ist eine schwache Fluoreszenz erkennbar. In *Abbildung 27 L* wurde jeweils ein Wurzelhaar in der Elongationszone der Hauptwurzel untersucht. Auch hier war kein spezifisches Signal feststellbar. *Abbildung 27 M* zeigt einen Pollensack. In den Pollenkörnern und den Teka des Pollensacks ist ein deutliches Fluoreszenzsignal feststellbar. Auch in den Trichomen der Blätter (*Abb. 27 N*) konnte kein spezifisches Signal detektiert werden.

Immunolabeling von *Ws* *Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *Ws* *Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von Col *Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern

Immunolabeling von Col *Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern

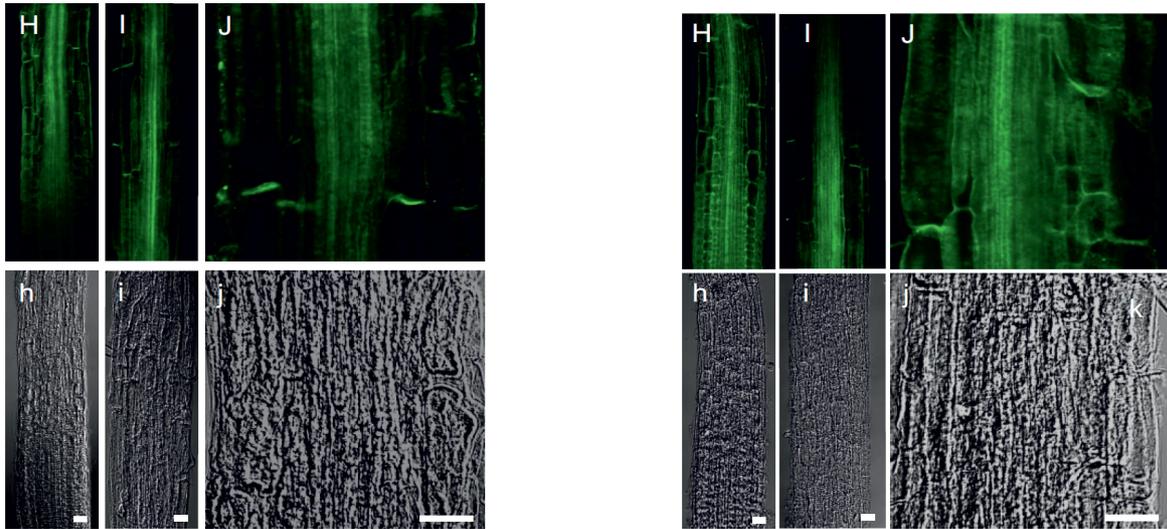
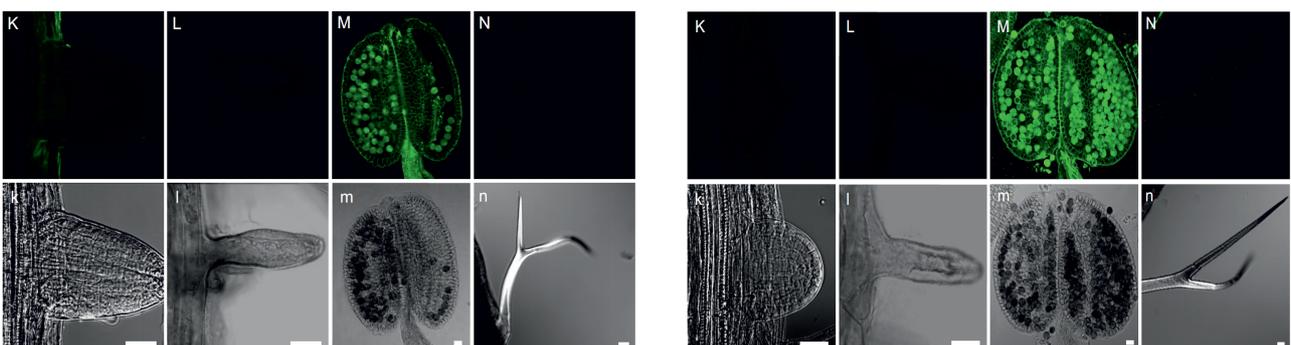


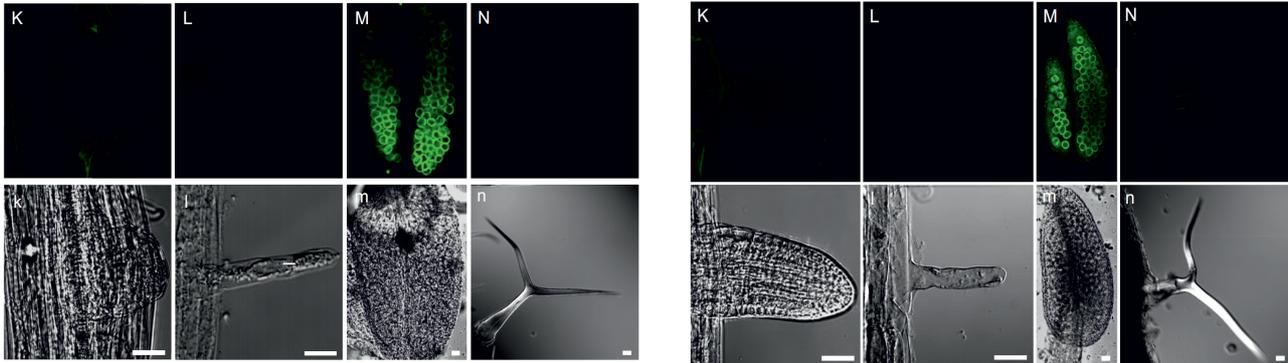
Abbildung 26: Meristematische Zone und beginnende Elongationszone von *Wassilijewskia* (*Ws Wt*) und *Columbia Wildtyp* (*Col Wt*) nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. H) endende meristematische Zone und beginnende Elongationszone, 20-fach, I) beginnende Elongationszone, 20-fach, J) beginnende Elongationszone, 63-fach H)-J) Alexa Fluor[®]488-Signal, h)-j) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

Die Auswertung aller durchgeführten Immunlabelings ergab keine Antikörper- oder Ökotyp-bezogenen Unterschiede im spezifischen Fluoreszenzmuster. Daher wird bei allen folgenden Auswertungen jeweils nur eine der vier durchgeführten Varianten (N- oder C-terminaler pPLA-I-spezifischer Antikörper, *Wassilijewskia* oder *Columbia Wildtyp*) dargestellt (Zusammenfassung aller Varianten s. Anhang).

Immunolabeling von *Ws Wt* mit N-terminalen pPLA-I-Antikörpern

Immunolabeling von *Ws Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von Col *Wt* mit N-terminalen pPLA-I-AntikörpernImmunolabeling von Col *Wt* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern

*Abbildung 27: Elongationszone in der Nähe der Basis und Pollen von Wassilijewskia (Ws *Wt*) und Columbia Wildtyp (Col *Wt*) nach Wachstum in 15µE Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. K) beginnende Seitenwurzel, 14 Tage, Ø, L) Wurzelhaar, 14 Tage, Ø, M) Pollen, 28 Tage, Ø, N) Trichom, 28 Tage, Aufsicht. K)-N) Alexa Fluor[®]488-Signal, k)-n) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20µm. Ø = Längsschnitt.*

3.3.2.3 Wachstum der Keimlinge in Dunkelheit

In den Abbildungen 28 A - C ist das spezifische Fluoreszenzsignal in der Wurzelspitze dargestellt. Das detektierbare Signal ist sehr schwach und grenzwertig zu unspezifischer Fluoreszenz. Insbesondere in der unteren Wurzelspitze und der Wurzelhaube (*Abb. 28 B*) ist kaum spezifische Fluoreszenz detektierbar. Es ist hauptsächlich cytosolisch in der Stele der meristematischen Zone vorzufinden (*Abb. 28 C*). In Epidermis und Cortex der meristematischen Zone ist es zudem Plasmamembran-nah und möglicherweise im Nukleus lokalisiert. Die Abbildungen 28 D und E zeigen den Übergang von der meristematischen Zone zur Elongationszone. In *Abbildung 28 D* ist ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal in der Stele am Rande der Detektionsgrenze erkennbar. Im weiteren Verlauf der Elongationszone ist keine weitere Fluoreszenz zu verzeichnen (*Abb. 28 E*).

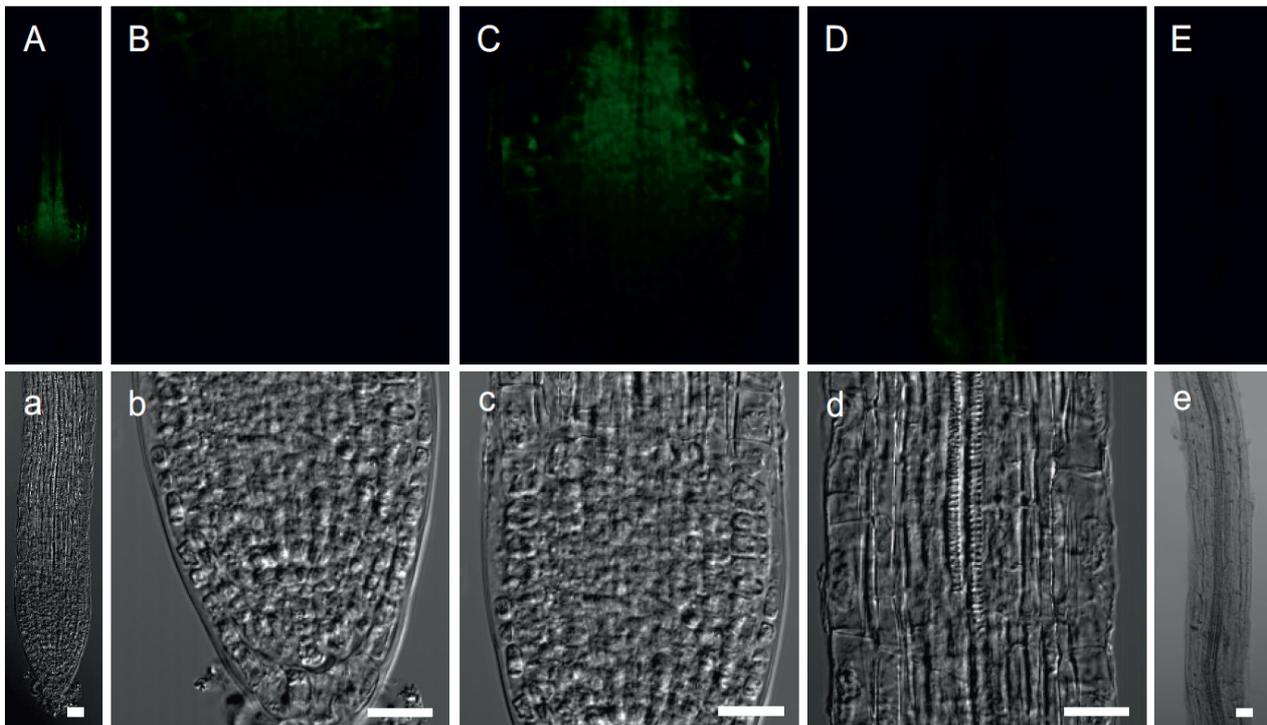


Abbildung 28: Meristematische Zone und Elongationszone von *Wassilijewskia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in Dunkelheit und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) meristematische Zone und beginnende Elongationszone, E) beginnende Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20µm. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.4 Wachstum der Keimlinge in verschiedenen Lichtfarben

3.3.2.4.1 Wachstum der Keimlinge in 15µE Blaulicht

Die Abbildungen 29 A - C zeigen die Expression spezifischer Fluoreszenz in der Wurzelspitze. Analog zu in Weißlicht angezogenen Keimlingen findet sich das spezifische Signal cytosolisch und Plasmamembran-nah. Eine Ausnahme bildet wiederholt die Wurzelhaube, in der sich keine spezifische Fluoreszenz detektieren lässt (Abb. 29 B). Auffällig ist die erhöhte Fluoreszenz im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum, welche insbesondere in der Epidermis, in verringertem Maße aber auch im Cortex vorzufinden ist (Abb. 29 C). Im Cortex ist die cytosolische Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen Zellschichten deutlich herabgesetzt. In den Abbildungen 29 D und E ist die beginnende Elongationszone dargestellt. Korrespondierend zu den Ergebnissen von in Weißlicht angezogenen Keimlingen nimmt die Fluoreszenz in Richtung Wurzelbasis

drastisch ab. Das Signal lässt dabei zunächst in den äußeren Zellschichten nach und ist zuletzt noch in der Stele nachzuweisen. Im Bereich der Elongationszone findet sich auf zellulärer Ebene (Abb. D) wenig oder keine Fluoreszenz im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum.

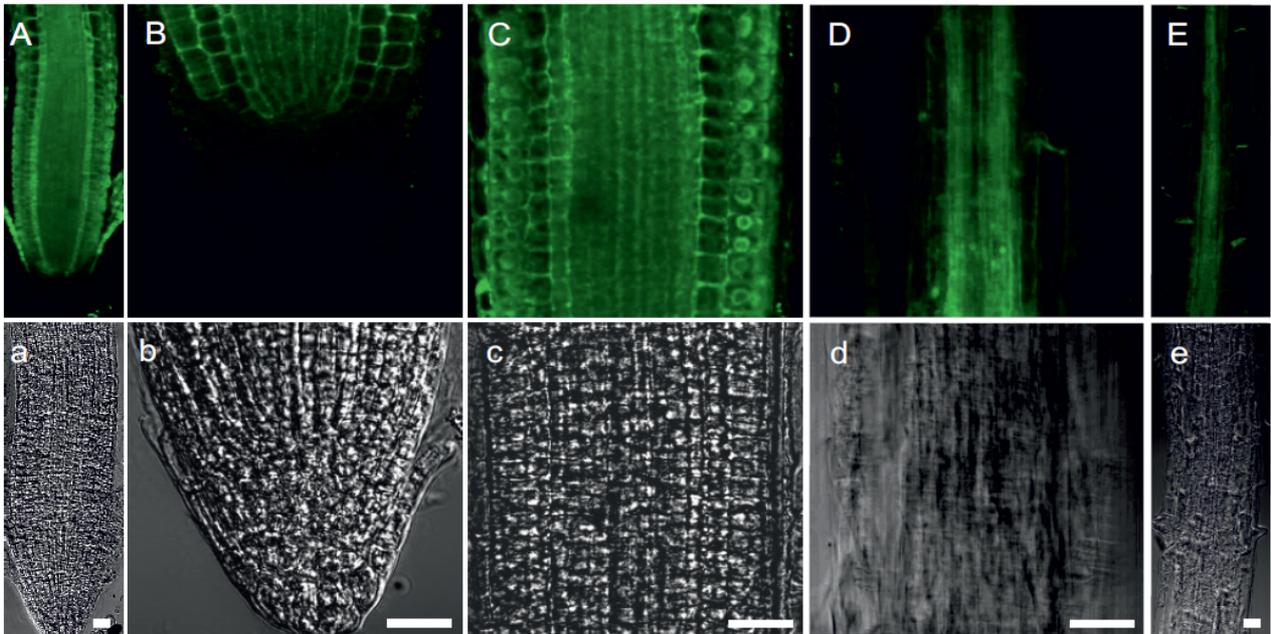


Abbildung 29: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *Wassilijewskia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Blaulicht und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) und E) beginnende Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.4.2 Wachstum der Keimlinge in $15\mu\text{E}$ Rotlicht

Die Abbildung 30 A - C zeigen die Expression in der Wurzelspitze. Das Fluoreszenzsignal ist insgesamt im Vergleich zu in Weißlicht oder Blaulicht angezogenen Keimlingen wesentlich reduziert. Fluoreszenz findet sich ausschließlich in der meristematischen Zone und dem Übergang zur Elongationszone. In den äußeren Zellschichten (Epidermis, Cortex, Endodermis) ist sie Plasmamembran-nah lokalisiert. In der Stele findet sie sich auch schwach cytosolisch. In der beginnenden Elongationszone ist lediglich in der Stele ein Signal zu verzeichnen, welches in Richtung Wurzelbasis schnell an Intensität abnimmt.

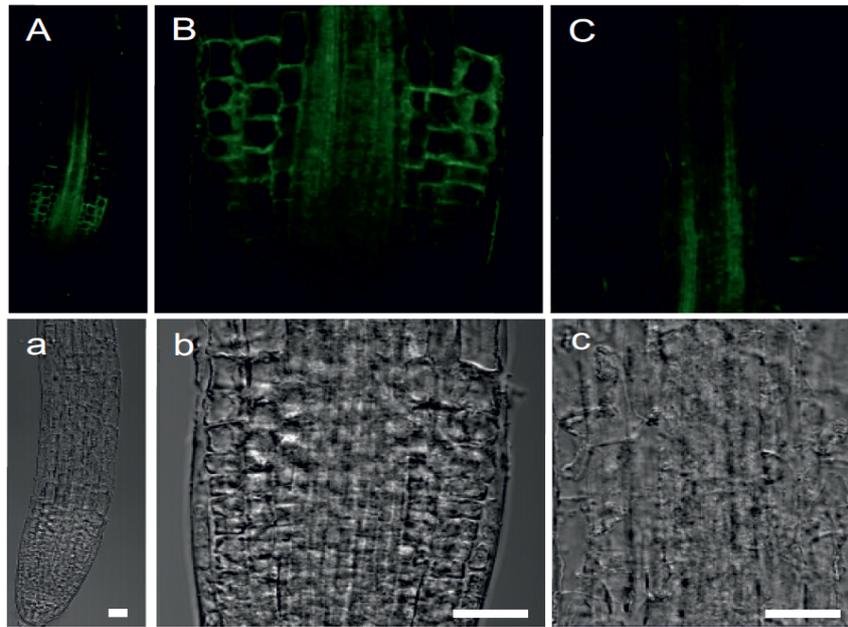


Abbildung 30: Wurzelspitze von *Wassilijewskia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Rotlicht und anschließendem Immunolabeling mit N-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, \emptyset , A)-C) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-c) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspr. $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.4.3 Wachstum der Keimlinge in $15\mu\text{E}$ Dunkelrotlicht

Die Abbildungen 31 A und B zeigen das spezifische Fluoreszenzsignal in der Wurzelspitze. Es beschränkt sich fast vollständig auf die meristematische Zone. In Epidermis, Cortex und Endodermis ist es Plasmamembran-nah vorzufinden, in der Stele schwach im Cytosol.

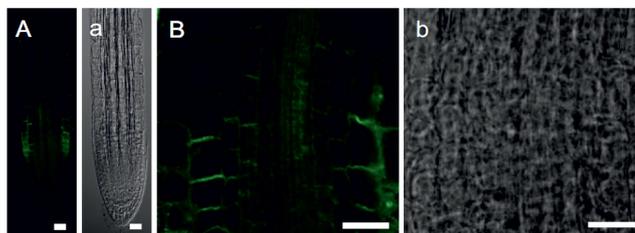


Abbildung 31: Wurzelspitze von *Wassilijewskia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Dunkelrotlicht und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) meristematische Zone, A)+B) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)+b) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.4.4 Zusammenfassende Darstellung

Im folgenden ist das Expressionsmuster der pPLA-I in der gesamten Wurzelspitze und als Detailaufnahme in der meristematischen Zone von *Arabidopsis* unter den verschiedenen getesteten Lichtbedingungen und in Dunkelheit zusammengefasst. Der Vergleich zeigt deutlich die verringerte Expression in rotem und dunkelrotem Licht, sowie in Dunkelheit (Abb. 32 C - E) im Vergleich zur starken Expression in weißem (Abb. 32 A) und blauem Licht (Abb. 32 B). Weiter auffallend ist die bei Wachstum in Blaulicht auftretende starke Expression im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum.

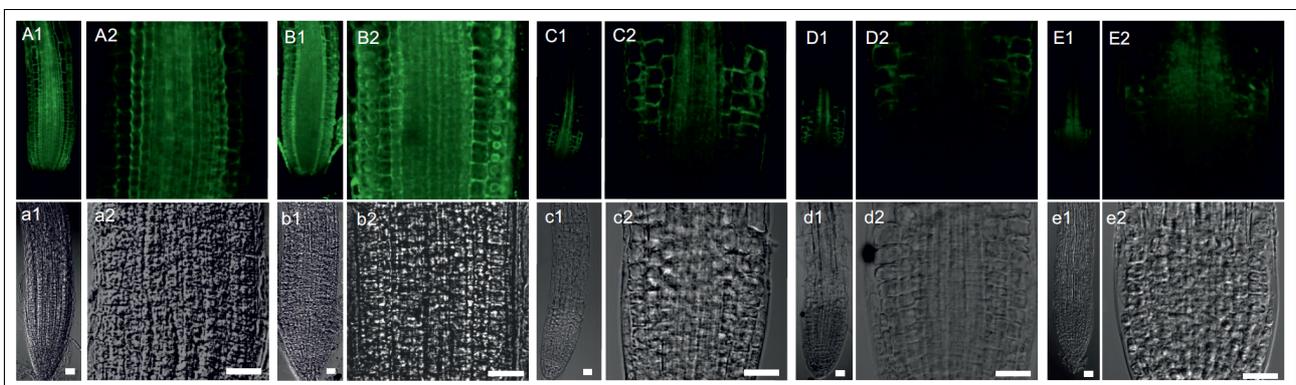


Abbildung 32: Konfokale Lasermikroskopie 7 Tage alter *A. thaliana* nach kontinuierlichem Wachstum in $15\mu\text{E}$ A) weißem Licht, B) blauem Licht C) rotem Licht, D) dunkelrotem Licht und Wachstum in E) Dunkelheit. 1) kennzeichnet Aufnahmen der Wurzelspitze, 2) kennzeichnet Detailaufnahmen der meristematischen Zone. a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Linie entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.5 Einfluss von 1-NAA auf die Lokalisierung der pPLA-I

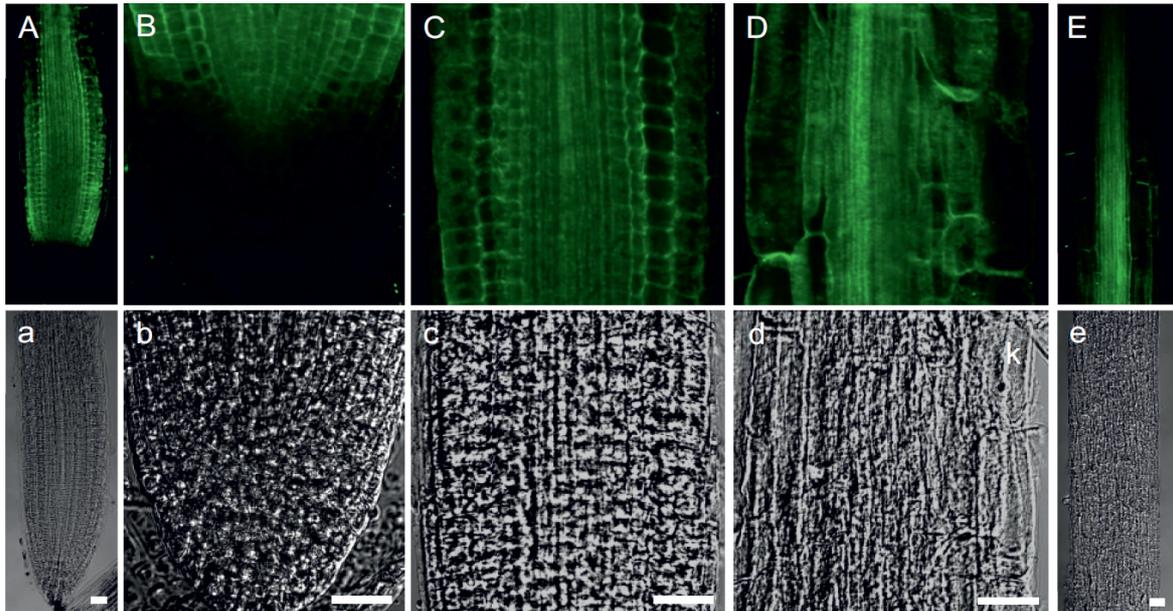
Die Abbildungen 33 A – C zeigen das Expressionsmuster nach Behandlung mit 1-NAA für 3h in der Wurzelspitze. In der Wurzelhaube und der unteren Wurzelspitze konnte kein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 33 B). In der beginnenden meristematischen Zone ist Plasmamembran-nah in Epidermis, Cortex und Endodermis eine schwache Fluoreszenz feststellbar (Abb. 33 C). Weiter in Richtung Wurzelbasis ist dieses Signal nahe der Plasmamembran zunächst auch vorzufinden und es kommt in den genannten Zellschichten ein stärkeres cytosolisches Signal hinzu. In den Abbildungen 33 D und E ist die Lokalisierung in der beginnenden Elongationszone dargestellt. In Epidermis, Cortex und Endodermis ist sie vorwiegend Plasmamembran-nah und vermutlich auch im Nukleus. In den Zellen der Stele findet sich eine cytosolische Fluoreszenz. In

Richtung zur Wurzelbasis nimmt das Fluoreszenzsignal schnell ab und ist in weiterer Entfernung von der Wurzelspitze nicht mehr detektierbar.

3.3.2.6 Einfluss von NPA auf die Lokalisierung der pPLA-I

Die Abbildungen 34 A – C zeigen das Fluoreszenzmuster in der Wurzelspitze nach Behandlung mit NPA für 3h. Erkennbar sind die cytosolische Lokalisierung (insbesondere im Bereich der Stele) und die Lokalisierung in der Nähe der Plasmamembran (insbesondere in Epidermis, Cortex und in der Endodermis). Zudem ist ein Fluoreszenzsignal im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum in allen Zellschichten und fast allen Zellen detektierbar (*Abb. 34 B*). Insbesondere in der Epidermis kommt es in einzelnen Zellen zu einer stark erhöhten Fluoreszenz um den Nukleus herum (*Abb. 34 C*). Die Abbildungen 34 D und E zeigen die beginnende Elongationszone. Hier findet sich ein cytosolisches Signal in der Stele, sowie Plasmamembran-nah in Epidermis, Cortex und Endodermis. Die Fluoreszenz nimmt in Richtung Wurzelbasis deutlich ab und ist in der Elongationszone in weiterer Entfernung zur Wurzelspitze nicht mehr detektierbar.

Immunolabeling von Col Wt mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern und Inkubation mit $0\mu\text{M}$ 1-NAA für 3h (Kontrolle)



Immunolabeling von Col Wt mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern und Inkubation mit $1\mu\text{M}$ 1-NAA für 3h

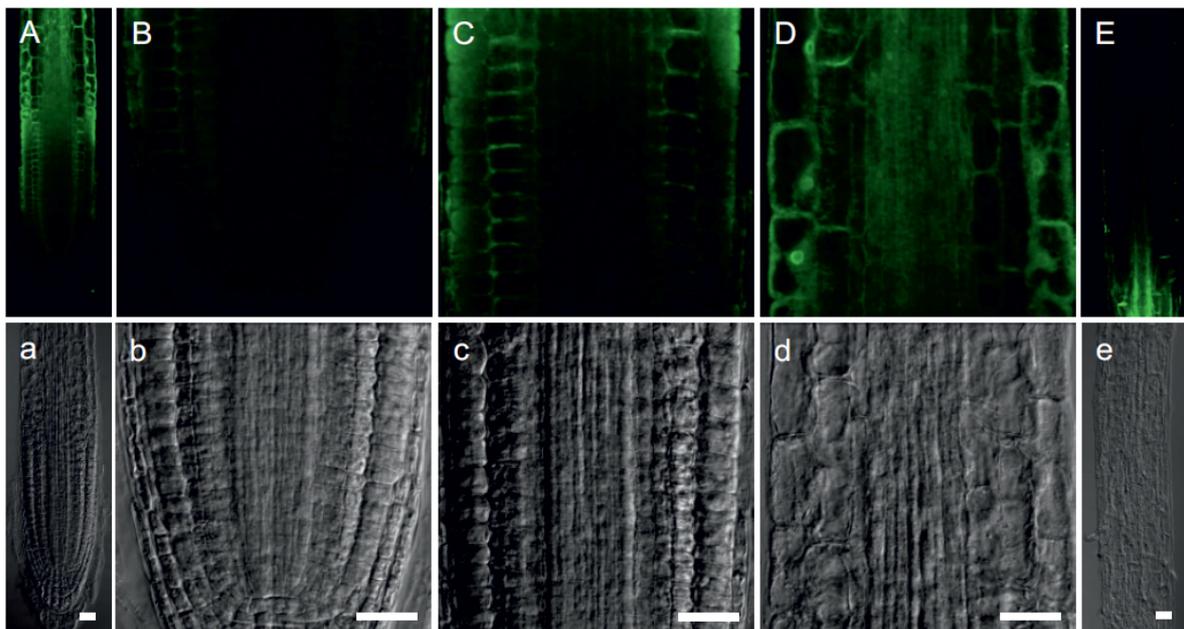
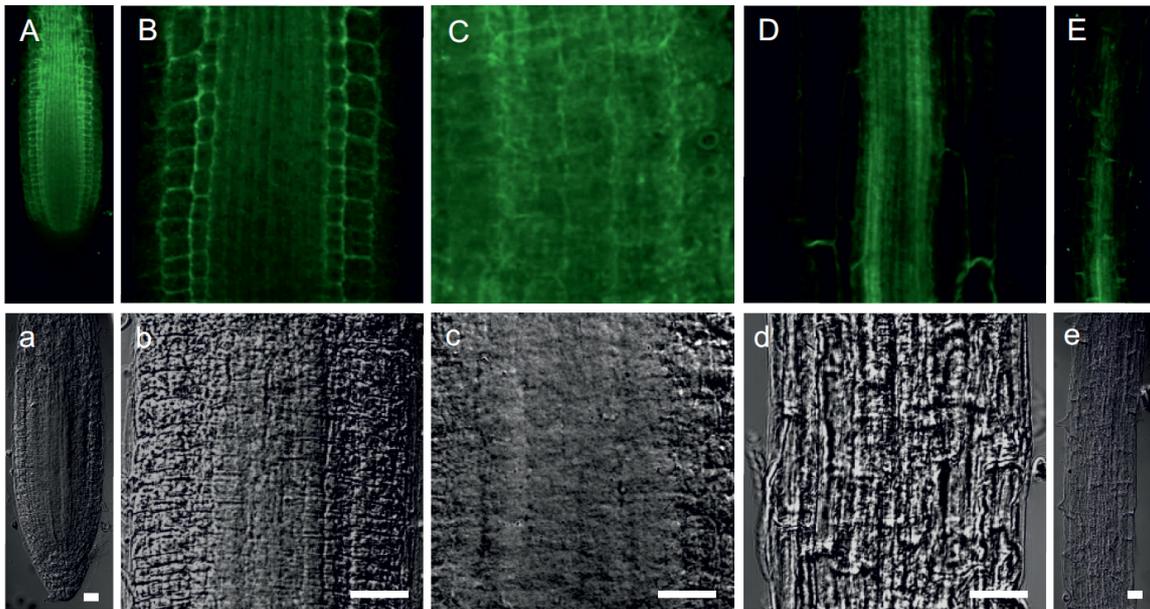


Abbildung 33: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *Columbia Wildtyp* nach 7 Tagen Wachstum in Weißlicht und anschließender Inkubation in $1\mu\text{M}$ 1-NAA, bzw. $0\mu\text{M}$ 1-NAA (Kontrolle) für 3h. Immunolabeling erfolgte mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) meristematische Zone und beginnende Elongationszone, E) beginnende Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Alle Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

Immunolabeling von Col Wt mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern und Inkubation mit 0 μ M NPA für 3h (Kontrolle)



Immunolabeling von Col Wt mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern und Inkubation mit 10 μ M NPA für 3h (Kontrolle)

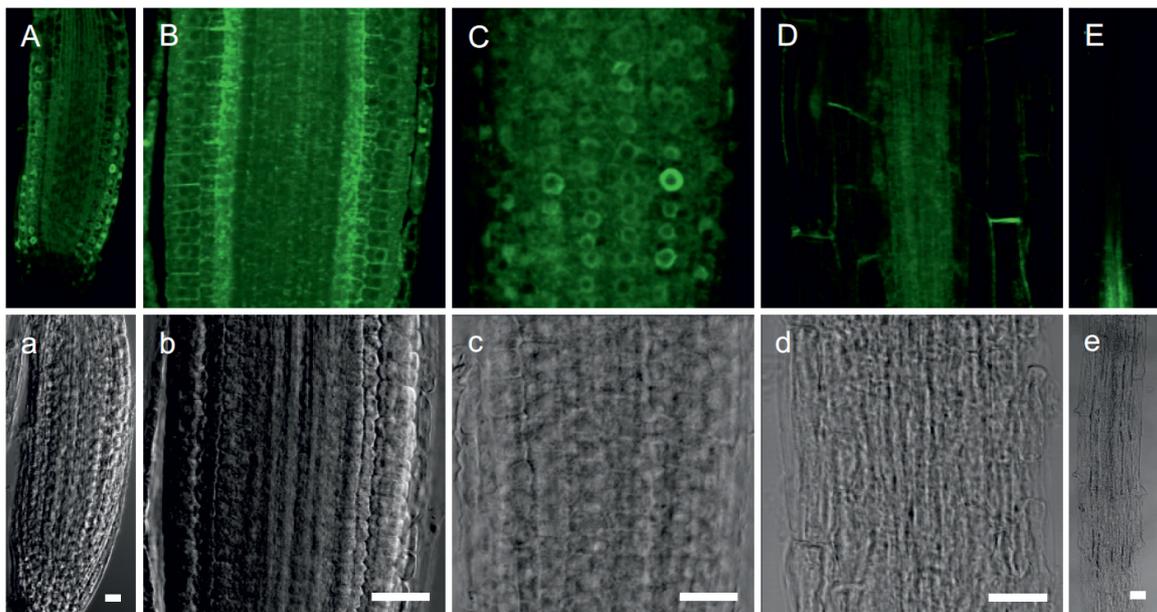
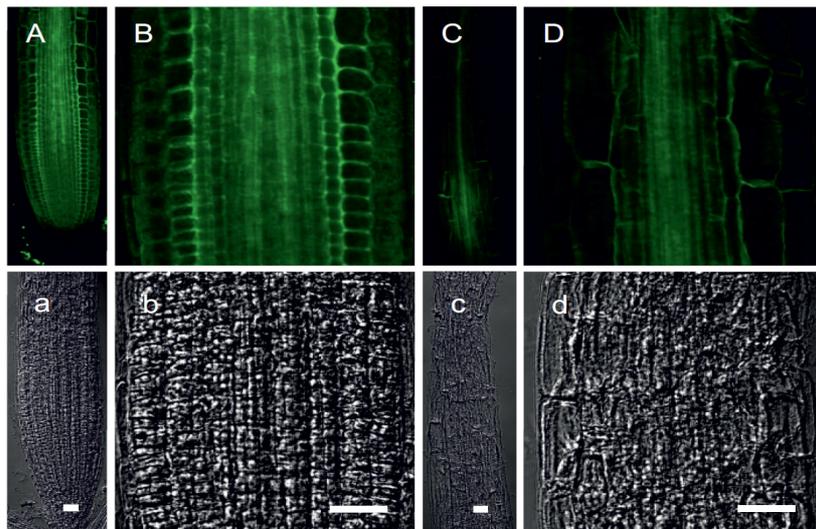


Abbildung 34: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *Wassilijewskia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in Weißlicht und anschließender Inkubation in 10 μ M NPA für 3h. Immunolabeling erfolgte mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. A) Wurzelspitze Ø, B) meristematische Zone Ø, C) meristematische Zone (Aufsicht Epidermis), D) und E) beginnende Elongationszone, Ø. A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Alle Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Weißer Balken entspricht 20 μ m. Ø = Längsschnitt.

3.3.2.7 Lokalisierung der pPLA-I in *ABP1*-Mutanten

In den Abbildungen 35 A und B ist die spezifische Fluoreszenz der Wurzelspitze der *abp1*-Insertionsmutanten *abp1_{m7}* und *abp1_{m8}* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Yunus Effendi) dargestellt.

Immunolabeling von *abp1_{m7}* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern



Immunolabeling von *abp1_{m8}* mit C-terminalen pPLA-I-Antikörpern

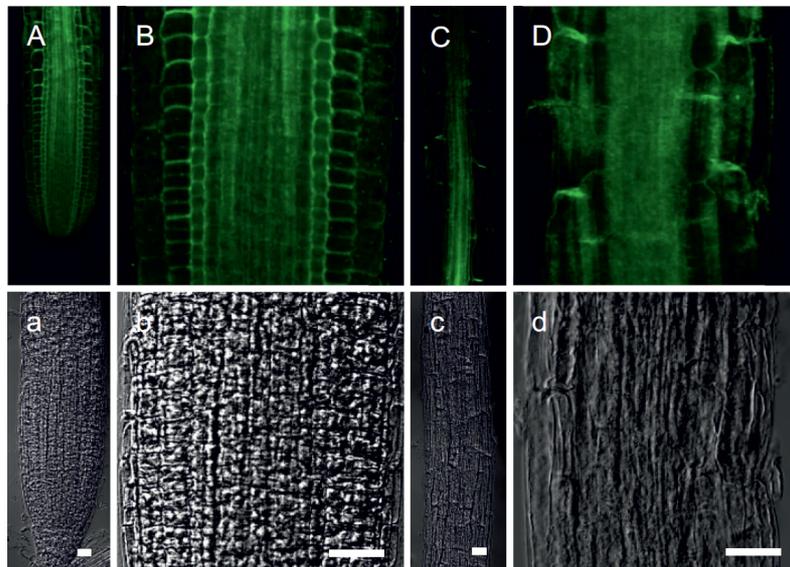


Abbildung 35: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *abp1/M7* und *abp1/M8* nach 7 Tagen Wachstum in $15\mu\text{E}$ Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) meristematische Zone, C) und D) beginnende Elongationszone, A)-D) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-d) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

Diese Mutanten exprimieren kein Wildtyp-ABP1 (homozygote T-DNA-Insertionsmutante) aber eine punktmutierte *ABP1*-cDNA. Sie ist bei beiden Mutanten vorwiegend cytosolisch (insbesondere in der Stele) aber auch Plasmamembran-nah (insbesondere in Cortex und Endodermis) erkennbar. In der beginnenden Elongationszone (Abb. 35 C und D) findet sich ein spezifisches Signal ebenfalls vorwiegend cytosolisch in der Stele aber auch Plasmamembran-nah in Epidermis, Cortex und Endodermis. Das Signal wird in Richtung Wurzelbasis jeweils geringer. Ein wesentlicher Unterschied zu den untersuchten Wildtyplinien ist, dass eine Lokalisierung im Nukleus oder im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum kaum feststellbar ist.

Neben den Insertionsmutanten *abp1_{m7}* und *abp1_{m8}* wurde auch eine Linie hergestellt, deren *ABP1*-cDNA identisch mit der von Wildtyp-Linien ist, jedoch mit synthetischen Promotor. Diese cDNA wurde in einen *ABP1*-Knockout-Hintergrund inseriert und so eine *ABP1*-Überexpressionsmutante (*ABP1/OEXP*) hergestellt. In den Abbildungen 36 A – D ist das Expressionsmuster und das Lokalisierungsmuster von pPLA-I in *ABP1/OEXP* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Yunus Effendi) dargestellt. Korrespondierend zu den Ergebnissen des Immunolabelings der *abp1*-Insertionsmutanten *abp1_{m7}* und *abp1_{m8}* findet sich ein spezifisches Fluoreszenzsignal in der Wurzelspitze (Abb. 36 A und B) und in der beginnenden Elongationszone (Abb. 36 C und D) cytosolisch, sowie Plasmamembran-nah. Auch in *ABP1/OEXP* ist keine Lokalisierung im Nukleus oder im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum feststellbar.

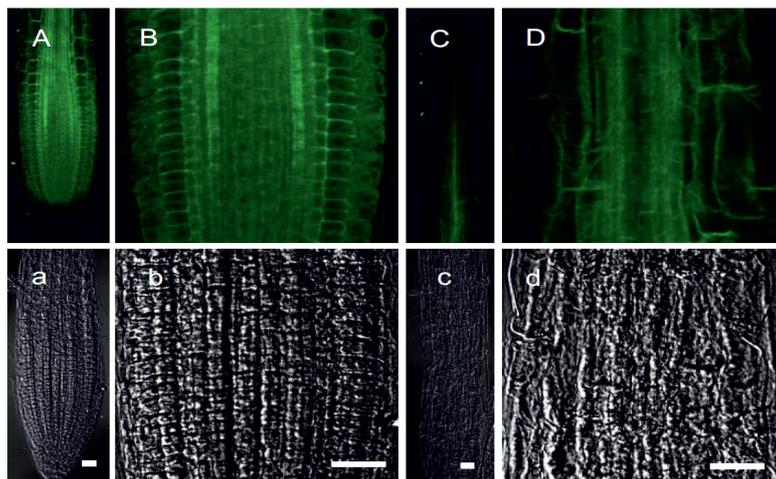


Abbildung 36: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *ABP1/OEXP* nach 7 Tagen Wachstum in 15µE Weißlicht und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) meristematische Zone, C) und D) beginnende Elongationszone, A)-D) Alexa Fluor®488-Signal, a)-d) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20µm. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.8 WAICO 2: PIN-Lokalisierung nach Wachstum in μg

Die Pflanzen für dieses Experiment waren 12 Tage im Weltraum gewachsen und wurden in den Zentrifugen des BIOLAB auf der ISS fixiert. Nach dem Rücktransport ins Labor Hannover wurden die Boxen fotografiert. Die Immunocytochemie wurden in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Klaus Palme in Freiburg in Zusammenarbeit mit Dr. F. Ditengou Immunocytochemisch untersucht. Festgestellt werden sollte eine mögliche Verlagerung der untersuchten PIN-Protein und der pPLA-I als Folge der Mikrogravitation. Weiter sollte festgestellt werden, ob sich die Anordnung von Mikrotubuli in μg von der Anordnung in 1g unterscheidet.

Im folgenden sind die Ergebnisse der mit den WAICO2-Keimlingen durchgeführten Immunolabelings dargestellt. Alle verwendeten Materialien, insbesondere die Antikörper (mit Ausnahme von pPLA-I-spezifischen Antikörpern) und die technische Ausrüstung wurden freundlicherweise vom Labor Palme zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der schlechten Fixierungsbedingungen im BIOLAB ist die Qualität der im folgenden gezeigten Präparate nicht optimal. Es kam häufig zur Vakuolisierung der Zellen, was als runder schwarzer Fleck in den einzelnen Zellen erkennbar wird. Zudem weisen viele Präparate eine gleichmäßige unspezifische Fluoreszenz in ihren Zellen auf. Auch wurde zur optimalen Ausnutzung der vorhandenen Keimlinge jeweils ein doppeltes Labeling jedes Keimlings mit je zwei Fluoreszenzfarben für die spezifische Lokalisierung zweier unterschiedlicher Proteine durchgeführt. Zur verbesserten Orientierung auf zellulärer Ebene wurde zudem DAPI verwendet, um den Zellkern anzufärben. Die Erläuterung jeder Abbildung beschränkt sich jedoch ausschließlich auf die jeweils betrachtete und als spezifisch definierte Fluoreszenzfarbe.

3.3.2.8.1 Lokalisierung des PIN1-spezifischen Antikörpers

Die Abbildungen 37 A - C (Ws Wt / 1g , Ws Wt / μg , *ppla-I-1* / 1g) zeigen spezifisches Fluoreszenzsignal im Bereich der Stele und der Endodermis in der Plasmamembran entsprechend des zu erwartenden Expressions- und Lokalisierungsmusters von PIN1. Trotz der sehr schlechten Präparat-Qualität in Abbildung 37 A lässt sich ein verstärktes spezifisches Signal in der Plasmamembran lokalisieren. In Abbildung 37 D (*ppla-I-1* / μg) ist im Vergleich zu Abbildung 37 A (Wildtyp in 1g) eine deutlich verringerte Polarisierung von anti-PIN1 in der Plasmamembran zu verzeichnen. Pfeile deuten auf Bereiche hin, in denen eine Lokalisierung in der Plasmamembran erkennbar ist. Im Präparat aus Abbildung 37 B (Wildtyp in μg) war die Fixierung offensichtlich

besser gelungen und im Bereich der Stele war PIN1 deutlich in der Plasmamembran lokalisiert. Die Fixierung in den Präparaten aus den Abbildungen 37 C und D war der von Abbildung 37 B gleichwertig. PIN1 war in *ppla-I-1* deutlich Plasmamembran-lokalisiert in 1g (Abb. 37 C), jedoch nur geringfügig in μ g (Abb. D).

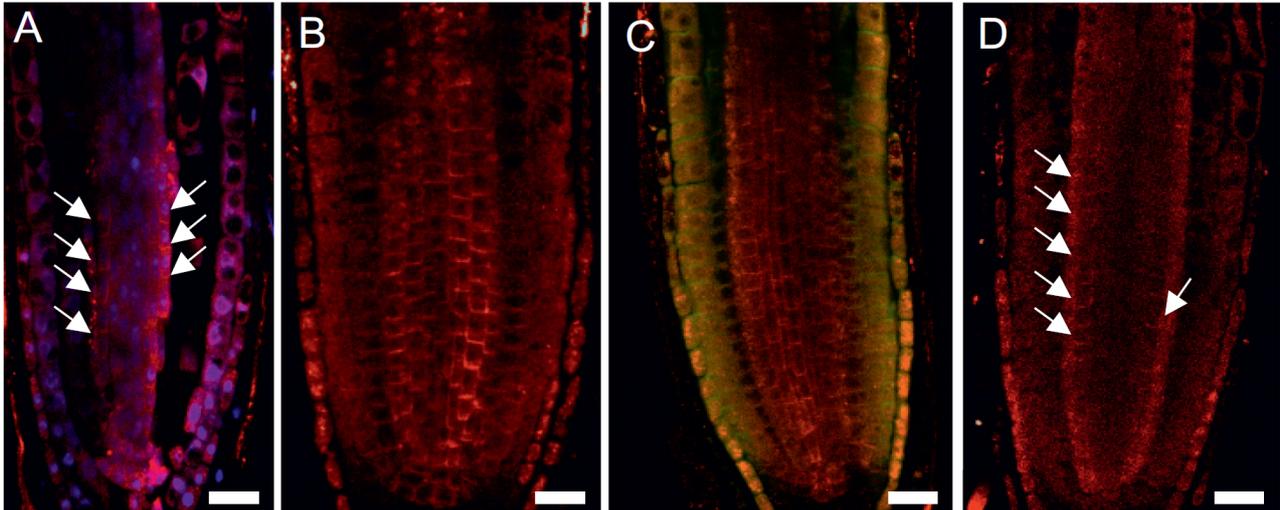


Abbildung 37: Lokalisierung von PIN1-spezifischen Antikörpern in A) *Ws Wt* / 1g ($n=1$) B) *Ws Wt* / μ g ($n=1$) C) *ppla-I-1* / 1g ($n=2$), D) *ppla-I-1* / μ g ($n=1$), jeweils in der Wurzelspitze, in 20-facher Vergrößerung. Weiße Linie entspricht 20μ m. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.8.2 Lokalisierung des PIN2-spezifischen Antikörpers

Die Abbildungen 3 A) – C) (*Ws Wt* / 1g, *Ws Wt* / μ g, *ppla-I-1* / 1g) zeigen ein Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran der Epidermis- und Cortezzellen entsprechend des zu erwartenden Expressions- und Lokalisierungsmusters von PIN2. Diese Plasmamembran-Lokalisierung ist im Wildtyp in 1g und in μ g festzustellen (Abb. 38 A und B), in μ g etwas schwächer. Bei *ppla-I-1* ist schon in 1g (Abb. 38 C) weniger Plasmamembran-Lokalisierung zu verzeichnen und in μ g (Abb. 38 D) ist fast gar keine Plasmamembran-Lokalisierung mehr erkennbar. Somit ist ein Gradient von Wildtyp zu Mutante und 1g zu μ g in abnehmender Lokalisierung von PIN2 in der Plasmamembran zu erkennen.

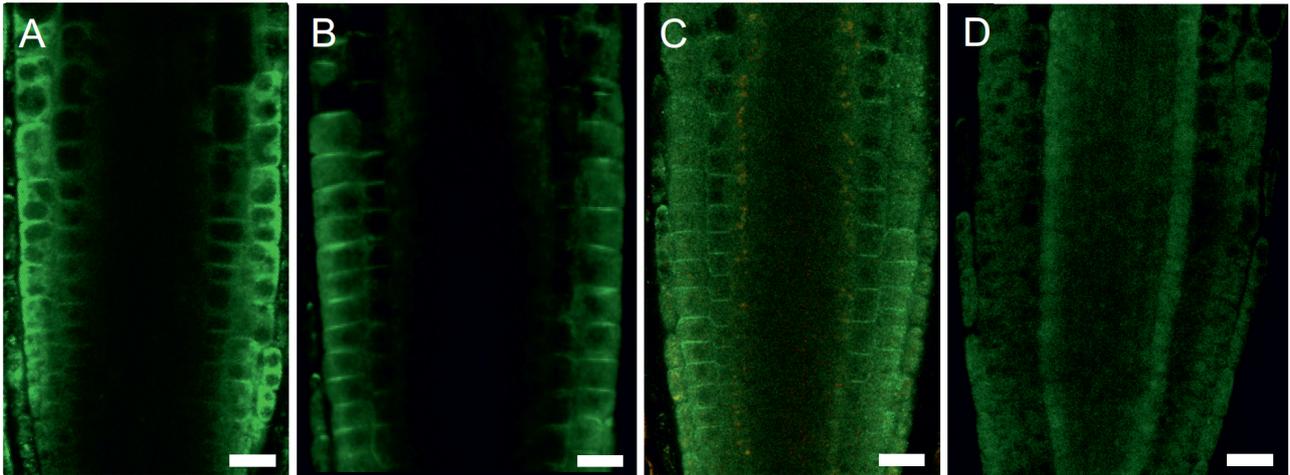


Abbildung 38: Lokalisierung von PIN2-spezifischen Antikörpern in A) *Ws Wt* / 1g ($n=3$), B) *Ws Wt* / μg ($n=2$), C) *ppla-I-1* / 1g ($n=4$) und D) *ppla-I-1* / μg ($n=3$), jeweils in der Wurzelspitze in 20-facher Vergrößerung. Weiße Linie entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.8.3 Lokalisierung des PIN4-spezifischen Antikörpers

In den Abbildungen 39 A) – C) ist jeweils deutlich ein spezifisches Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran des Meristems im Ruhenden Zentrum entsprechend des zu erwartenden Verteilungsmusters von PIN4 erkennbar. Diese Plasmamembran-Lokalisierung ist also im Wildtyp sowohl in 1g (Abb. 39 A) als auch in μg (Abb. 39 B) zu finden. Auch *ppla-I-1* zeigt in 1g eine deutliche Plasmamembran-Lokalisierung (Abb. 39 C), während in μg fast gar keine Plasmamembran-Lokalisierung detektierbar ist (Abb. 39 D). Dies ist ein klarer Hinweis auf eine Auswirkung der Schwerkraft auf die Plasmamembran-Lokalisierung im Ruhenden Zentrum.

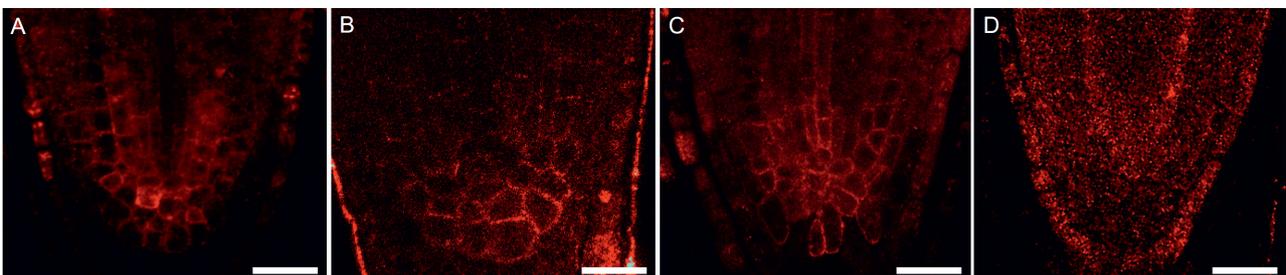


Abbildung 39: Lokalisierung von PIN4-spezifischen Antikörpern in A) *Ws Wt* / 1g ($n=3$), B) *Ws Wt* / μg ($n=1$), C) und E) *ppla-I-1* / 1g ($n=2$) und D) und F) *ppla-I-1* / μg ($n=1$), jeweils im Ruhenden Zentrum, in 20-facher Vergrößerung. Weiße Linie entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.3.2.8.4 Lokalisierung des pPLA-I-spezifischen Antikörpers

Die Abbildungen 40 A) und 40 a1) (Ws Wt / 1g) lassen eine hauptsächliche Lokalisierung von pPLA-I-spezifischen Antikörpern im Nukleus erkennen. Im Vergleich hierzu ist das Fluoreszenzsignal im Cytoplasma vermindert. Die Abbildungen 40 B) und 40 b1) (Ws Wt / μg) zeigen hingegen eine gleichmäßig cytosolische Fluoreszenz, während ein erhöhtes Signal innerhalb des Zellkerns nicht vorzufinden ist. Dies weist darauf hin, dass die Lokalisierung der pPLA-I-Schwerkraft-abhängig ist.

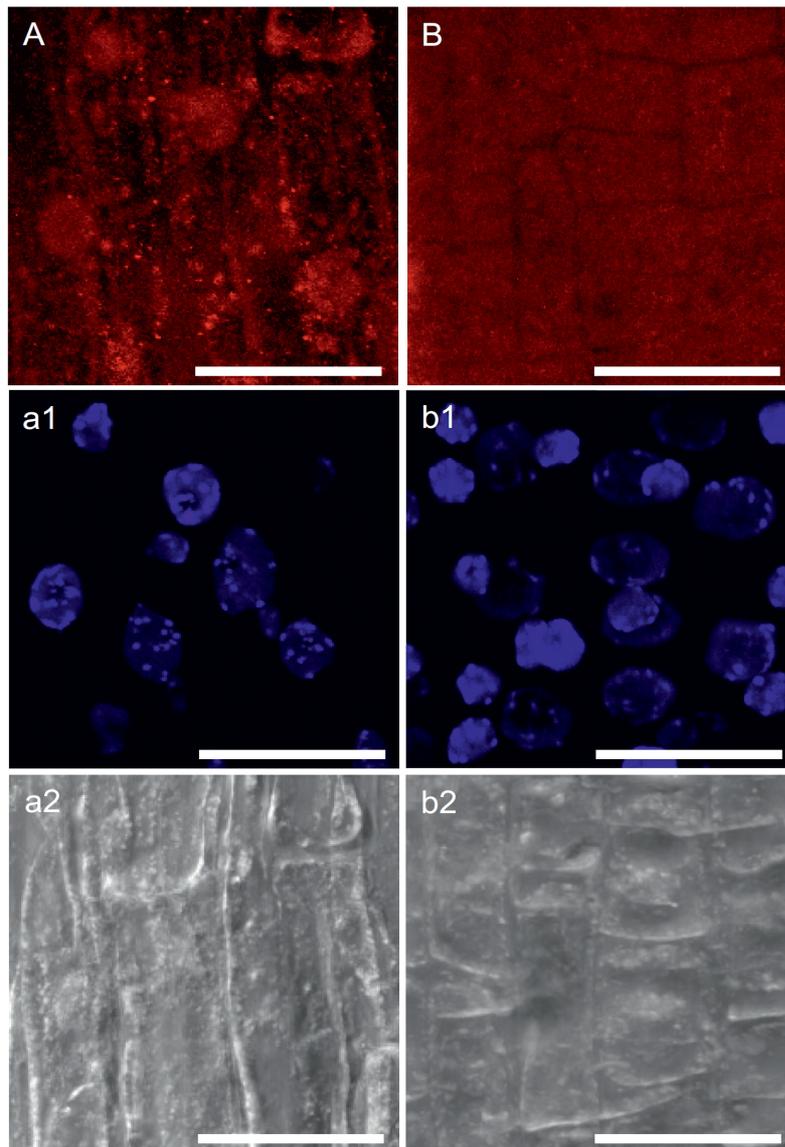


Abbildung 40: Lokalisierung von anti-pPLA-I-red in Ws Wt in 63-facher Vergrößerung. A) Ws Wt / 1g (n=2), B) Ws Wt / μg (n=2). A)+B) anti-pPLA-I-red, a1)+b1) DAPI-gefärbte Nuklei, a2)+b2) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weiße Linie entspricht 20 μm .

3.3.2.8.5 Lokalisierung des α -Tubulin-spezifischen Antikörpers

Abbildung 41 A (Ws Wt / 1g) zeigt die typische Anordnung cortikaler Mikrotubuli in gestreckten Zellen mit ihrer gleichmäßig parallel verlaufenden Struktur senkrecht zur Wachstumsrichtung. In Abbildung 41 B (Ws Wt / μ g) zeigen die Mikrotubuli eine deutliche Fragmentierung. Sie sind in ihrer Anzahl vermindert und weniger deutlich parallel angeordnet.

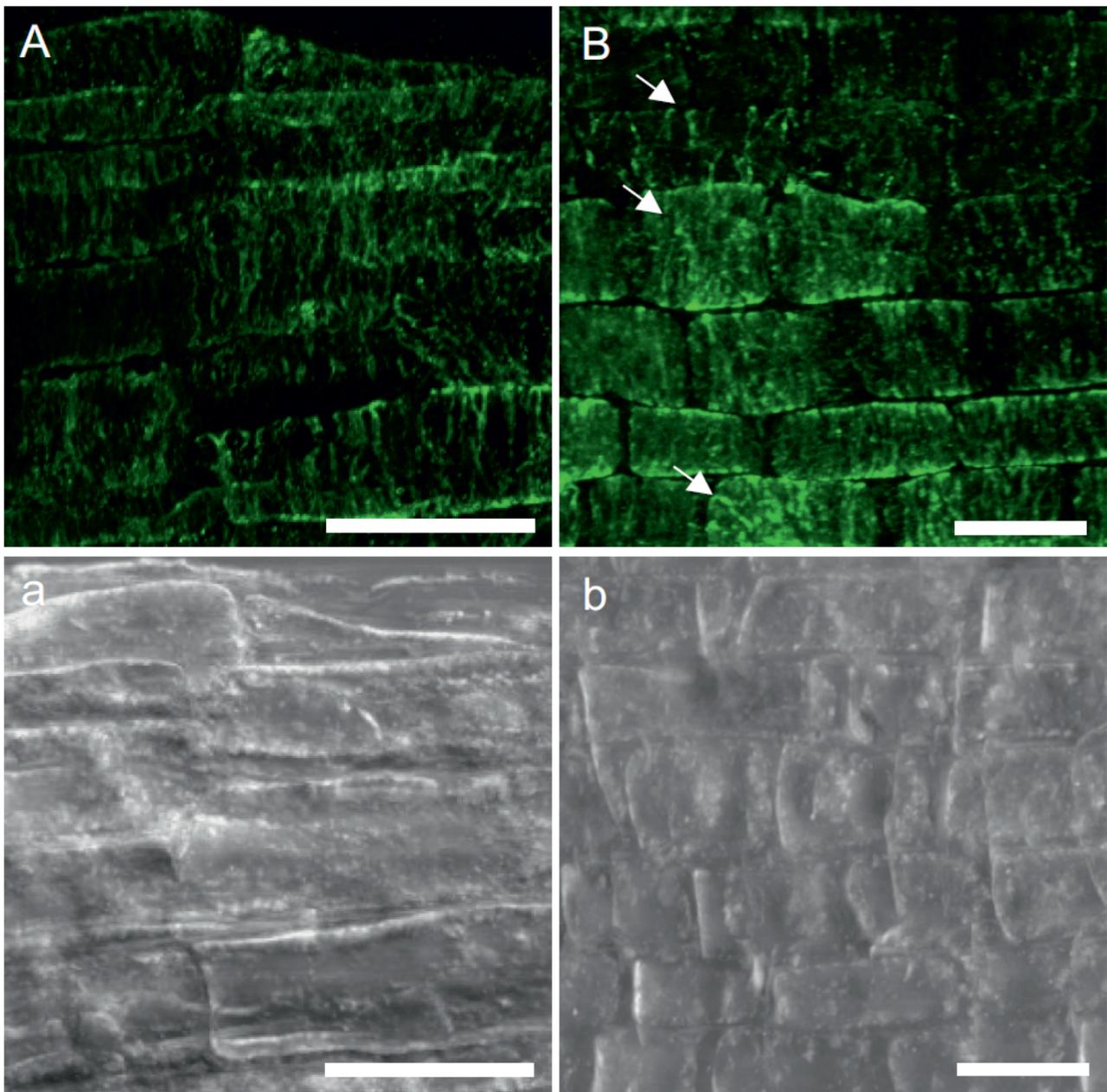


Abbildung 41: Lokalisierung von anti- α -Tubulin-green. A) Ws Wt / 1g, (n=2), B) Ws Wt / μ g, (n=2). A) und B) anti- α -Tubulin-green, a) und b) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weiße Linie entspricht 20 μ m.

In Tab. 32 ist die Anzahl an Wiederholungen der einzelnen Aufnahmen zusammengefasst.

Tabelle 32: Anzahl Wiederholungen der einzelnen Fotoaufnahmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Antikörper	<i>A. thaliana</i> / Wachstum	Anzahl (n) Wiederholungen gesamt
anti-PIN1	Ws Wt / 1g	1
anti-PIN1	Ws Wt / μg	1
anti-PIN1	<i>ppla-I-1</i> /1g	2
anti-PIN1	<i>ppla-I-1</i> / μg	1
anti-PIN2	Ws Wt / 1g	3
anti-PIN2	Ws Wt / μg	2
anti-PIN2	<i>ppla-I-1</i> /1g	4
anti-PIN2	<i>ppla-I-1</i> / μg	3
anti-PIN4	Ws Wt / 1g	3
anti-PIN4	Ws Wt / μg	1
anti-PIN4	<i>ppla-I-1</i> /1g	2
anti-PIN4	<i>ppla-I-1</i> / μg	1
anti-pPLA-I	Ws Wt / 1g	2
anti-pPLA-I	Ws Wt / μg	2
anti- α -Tubulin	Ws Wt / 1g	2
anti- α -Tubulin	Ws Wt / μg	2

3.4 Lokalisierung von pPLA-I-GFP-Reporterproteinen

Die *in vivo* - Lokalisierungsstudien mittels Reporterproteinen sollten die durch das Immunolabeling gefundene Expression der pPLA-I bestätigen. Gleichzeitig bietet diese Methode im Vergleich zur *in situ* - Lokalisierung die Möglichkeit, Veränderungen in der Lokalisierung von pPLA-I-GFP in einem einzigen Keimling als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen zu dokumentieren. Daher wurden in diesem Teil der Arbeit auch kurzfristige Schwankungen der pPLA-I-Expression in Abhängigkeit vom Licht-Dunkel-Rhythmus untersucht.

Neben einem GFP-Reporterprotein mit fusionierter vollständiger pPLA-I-Sequenz wurde zusätzlich ein Konstrukt mit der verkürzten pPLA-I-Sequenz verwendet. Die Untersuchung der entsprechenden Transformanten auf die Lokalisierung von pPLA-I (-Exon7) sollte Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion dieser Proteinvariante zulassen, bzw. eine Funktion auszuschließen. Die Sequenzvariante verfügt theoretisch auf Proteinebene noch über eine LRR-Region, die eine

mögliche G-Protein-Bindestelle darstellt. Eine Lokalisierung von $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) könnte daher weitere Hinweise auf die Funktion des N-terminus im vollständigen Protein liefern.

3.4.1 Herstellung eines *pPLA-I-GFP*-Konstruktes

Zur Durchführung von *in-vivo* - Lokalisierungsstudien der *pPLA-I* wurde ein *pPLA-I-GFP*-Fusionsprotein im *pPLA-I*-Nullhintergrund von *ppla-I-1* konstitutiv exprimiert. Hierzu wurde zunächst die genomische DNA der *pPLA-I* mit vorgeschaltetem nativen Promotor mittels spezifischer attB-Primer amplifiziert (B1- *pPLA-I* genom -B2). Das Amplifikat mit einer Länge von 7817bp (*Abb. 42 A*) wurde aufgereinigt und in einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR221 kloniert, um den ENTRY-Vektor L1- *pPLA-I* genom -L2 / pENTRY221 zu bilden. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges von L1- *pPLA-I* genom -L2 / pENTRY221 wurde eine PCR mit den Primern M13_for und *pPLA-I*genom_rev1 (*Abb. 42 B*), sowie eine Kontrollspaltung mit dem

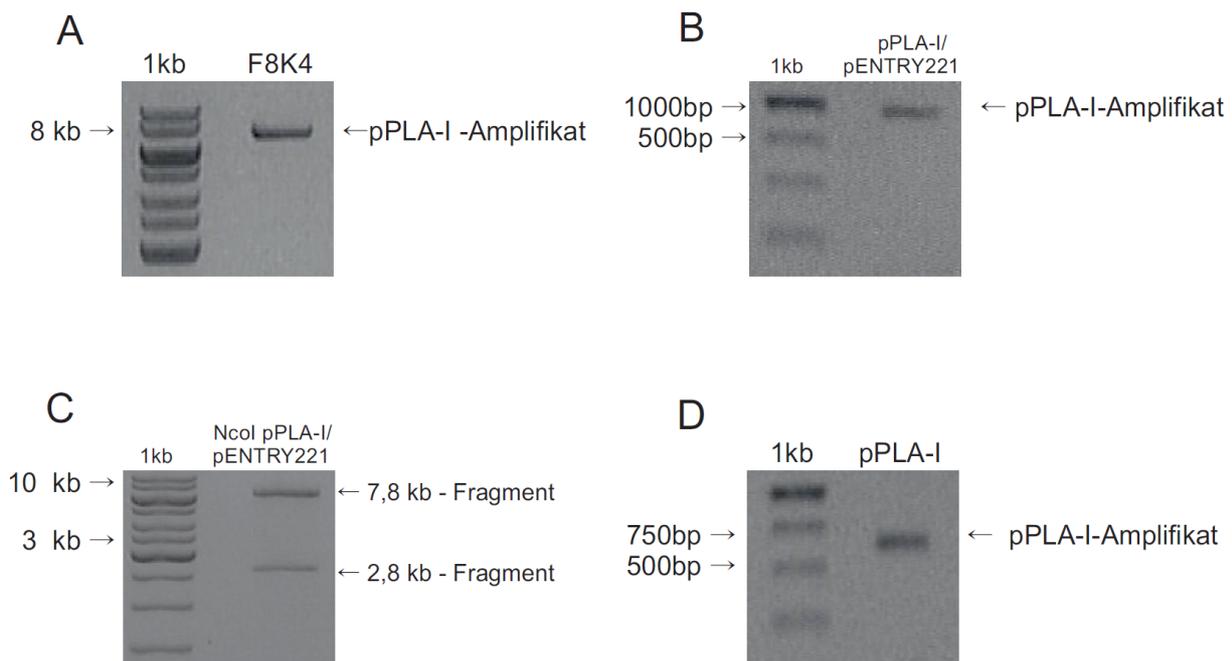


Abbildung 42: DNA-Gelelektrophorese A) des gebildeten Amplifikates B1- pPLA-Igenom -B2 unter Verwendung von F8K4 als Template und B1- pPLA-Igenom-B2-Primern, B) des gebildeten Amplifikates B- pPLA-Igenom -B2 unter Verwendung von B1- pPLA-Igenom-B2 / pENTRY221 als Template und den Primern M13_for und pPLA-Igenom_rev1, C) der Restriktionsenzymspaltung von B1- pPLA-Igenom-B2 / pENTRY221 mit NcoI. D) des gebildeten pPLA-I-Amplifikates unter Verwendung von B1- pPLA-Igenom-B2 / pGWB4 als Template und den Primern pPLA-Igenom_for und pPLA-Igenom_rev1. 1kb: DNA-Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

Restriktionsenzym *NcoI* durchgeführt (Abb. 42 C). Das Amplifikat sollte eine spezifische Länge von ca. 900bp aufweisen. Bei der Kontrollspaltung waren Banden mit einer Größe von 7800bp und 2800bp zu erwarten. Der positive Klon wurde mittels der Sequenzierprimer pPLA-Igenom_rev1 bis pPLA-Igenom_for13 vollständig sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Teilsequenzen mittels der Software „clc free workbench 3“ zusammengesetzt und auf Amplifikationsfehler hin untersucht. Der Klon mit korrekter genomischer *pPLA-I*-Sequenz (s. Anhang) wurde für die folgende LR-Reaktion mit dem Vektor pGWB4 eingesetzt. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges von B1- pPLA-Igenom -B2 / pGWB4 wurde eine PCR mit den Primern pPLA-Igenom_for und pPLA-Igenom_rev1 (Abb. 42 D) durchgeführt. Das Amplifikat sollte eine spezifische Länge von 650bp aufweisen. Der so hergestellte Klon wurde für die Transformation von *Arabidopsis* weiterverwendet.

3.4.2 Herstellung eines *GFP-pPLA-I (-Exon7)*-Konstruktes

Bei der Sequenzanalyse der *pPLA-I*-cDNA-Sequenz aus dem CD4-16-Klon konnte das Fehlen von Exon7 festgestellt werden. Hierdurch kam es innerhalb des Open Reading Frames (ORF) zu einer Verschiebung des Leserahmens, die den frühzeitigen Abbruch der Proteinsequenz zur Folge hat. Um festzustellen, ob diese verkürzte Proteinsequenz in ihrer Funktion gegenüber der Gesamtsequenz verändert oder eingeschränkt ist, wurde ein pPLA-I (-Exon7)-GFP-Fusionsprotein hergestellt, um aufgrund einer möglichen differentiellen Lokalisierung Aussagen über die Funktion treffen zu können. Hierzu wurde die spezifische Sequenz zunächst mittels B1-pPLA-I -Exon7-B2-Primern aus dem durch Phagenverdünnung aus der Phagenbank CD4-16 gewonnenen cDNA-Klon der *pPLA-I* (ohne Exon7) amplifiziert (Gesamtlänge ca. 3850bp, s. Abb. 43 A) und in pDONR221 kloniert.

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges von L1- pPLA-I (-Exon7) -L2 / pENTRY221 wurde eine PCR mit den Primern pPLA-I cDNA_for und pPLA-I cDNA_rev (Abb. 43 B), sowie eine Kontrollspaltung mit dem Restriktionsenzym *NcoI* durchgeführt (Abb. 43 C). Das Amplifikat sollte eine spezifische Länge von 3900bp aufweisen. Bei der Kontrollspaltung waren zwei Fragmenten mit einer Länge von 3,6kb und 2,8kb zu erwarten. Es folgte die Klonierung in pK7FWGF2. Die korrekte Klonierung von B1- pPLA-I (-Exon7) -B2 / pK7FWGF2 wurde durch PCR mit den Primern pPLA-I Exon18_for und pPLA-I Exon18_rev überprüft (Abb. 43 D). Das Amplifikat sollte eine spezifische Länge von 480bp aufweisen.

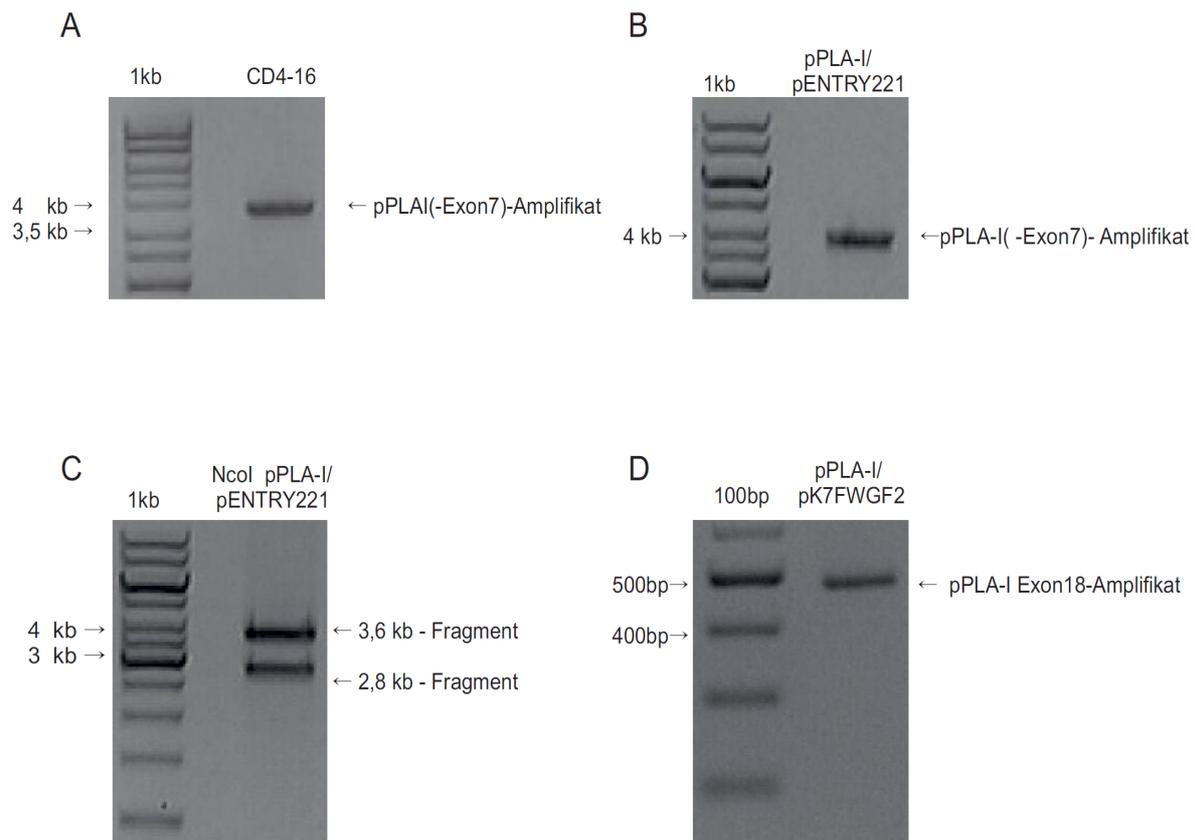


Abbildung 43: DNA-Gelelektrophorese A) des gebildeten pPLA-I-Amplifikates aus dem isolierten cDNA-Klon der Phagenbank CD4-16 mit B1-pPLA-I cDNA-B2 - Primern, B) des gebildeten pPLA-I-Amplifikates unter Verwendung von L1-pPLA-I (-Exon7)-L2 / pENTRY221 als Template mit und B1-pPLA-I cDNA-B2 - Primern, C) der Restriktionsenzymspaltung von L1-pPLA-I (-Exon7)-L2/pENTRY221 mit NcoI., D) des gebildeten pPLA-I Amplifikates unter Verwendung von B1-pPLA-I (-Exon7)-B2/ pK7FWGF2 als Template und pPLA-I Exon18- Primern. 100bp und 1kb: DNA- Standard. Auftragsvolumen je 5 μ l.

3.4.3 Transformation von *A. tumefaciens* und Saatgutanzucht

Plasmid-DNA je eines positiven Klons der pPLA-I in pGWB4 und der pPLA-I ohne Exon7 in pK7FWGF2 wurde für die Transformation von *A. tumefaciens* (GV3101) verwendet. Der Transformationsansatz wurde auf Selektionsmedium (Rifampicin 50 μ g/ml, sowie Vektor-spezifisches Selektivum, s. Tab. 33) ausplattiert. Nach 3 Tagen wuchsen zahlreiche transformierte Kolonien, die für die Agrotransformation von *A. thaliana* weiterverwendet werden konnten.

Tabelle 33: Verwendetes Selektivum im LB-Medium für die mit den hergestellten Genkonstrukten transformierten *A. tumefaciens*

Vektor-Konstrukt in <i>A. tumefaciens</i>	Selektivum
B1- pPLA-Igenom - B2 / pGWB4	Hygromycin (c = 50µg / ml)
B1- pPLA-I(-Exon7) -B2 / pK7FWGF2	Spectromycin (c = 50µg / ml)

Die ausgewählten *Agrobacterium*-Kolonien wurde für die Transformation von *ppla-I-1* verwendet (s. Tab. 34)

Nach dem Abtrocknen wurde das geerntete Saatgut auf Selektionsagar ausgesät. Nach 7-10 Tagen konnten die normal entwickelten, transformieren Keimlinge von den schlecht gewachsenen, nicht-transformierten Keimlingen unterschieden werden. Die Keimlinge wurden auf frisches Medium umgesetzt und bis zur Ausbildung eines ausreichenden Wurzelwerkes angezogen. Dann wurden sie in Einheitserde P1 umgesetzt und bis zur Samenreife angezogen. Die homozygot transformierten Samen der zweiten Filialgeneration wurden unter dem konfokalen Lasermikroskop auf spezifische Fluoreszenz hin untersucht.

Tabelle 34: Im Nähragar zugesetztes Selektivum für die Anzucht unterschiedlicher Transformanden

Vektor-Konstrukt	Transformand	Hintergrund	Selektivum
B1- pPLA-Igenom- B2 / pGWB4	$P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$	<i>ppla-I-1</i>	Hygromycin (c = 25 µg / ml)
B1- pPLA-I(-Exon7) -B2 / pK7FWGF2	$P_{35S}::GFP-pPLA-I (-Exon7)$	<i>ppla-I-1</i>	Kanamycin (c = 50 µg / ml)

3.4.4 Überprüfung der hergestellten Transformanden auf Komplementation

Von den mit kompletter genomischer DNA transformierten *ppla-I*-Transformanden war zu erwarten, dass sich der Wildtyp-Phänotyp wieder herstellen lässt. Zum Zeitpunkt der Experimente war hierzu nur der frühe Blühzeitpunkt von *ppla-I-1* als leicht zu testende Eigenschaft bekannt. Daher wurde ein Blühversuch auf potentielle Komplementation von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ und $P_{35S}::GFP-pPLA-I (-Exon7)$ durchgeführt.

In Abb. 44 ist der Blühversuch mit *Wassilijewskia* Wildtyp, *ppla-I-1*, sowie den Transformanden $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ und $P_{35S}::GFP-pPLA-I (-Exon7)$ nach 8 Wochen Anzucht im Kurztag (16h Licht/ 8h Dunkelheit) dargestellt. Während *ppla-I-1* und $P_{35S}::GFP-pPLA-I (-Exon7)$ zu diesem Zeitpunkt bereits blühen, haben *Wassilijewskia* Wildtyp und $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ noch keine Infloreszenz ausgebildet (s. Abb. 44). Demnach liegt in $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ eine Komplementation

vor, während $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) nicht komplementiert ist. Dies ist ein Hinweis auf die Funktionalität der pPLA-I-Gesamtsequenz. Gleichzeitig wird festgestellt, dass die verkürzte Sequenz ohne Exon7 keine vollständige Funktion erfüllen kann.



Abbildung 44: Arabidopsis-Pflanzen nach 8-wöchiger Anzucht im Kurztag von links nach rechts: Wassilijewskia Wildtyp ($n = 24$), $ppla-I-1$ ($n = 24$), $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ ($n = 24$), $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) ($n = 24$). $ppla-I-1$ und $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) zeigen verfrühtes Blühen im Vergleich zum Wassilijewskia Wildtyp, jedoch nicht $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$.

3.4.5 Konfokale Lasermikroskopie

3.4.5.1 Ermittlung der Expression und der Lokalisierung von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach Wachstum in 15 μ E Weißlicht

Die Abbildungen 45 A - C zeigen die GFP-Fluoreszenz der Keimlinge in der Wurzelspitze. Ein sehr starkes Fluoreszenzsignal ist in der Endodermis detektierbar, sowie ein starkes Signal in der gesamten Stele. In den äußeren Zellschichten (Epidermis, Cortex und Endodermis) ist hingegen nur eine schwache GFP-Fluoreszenz erkennbar (Abb. 45 A und C). Abb. 45 B zeigt auch in der Wurzelhaube ein schwaches Signal.

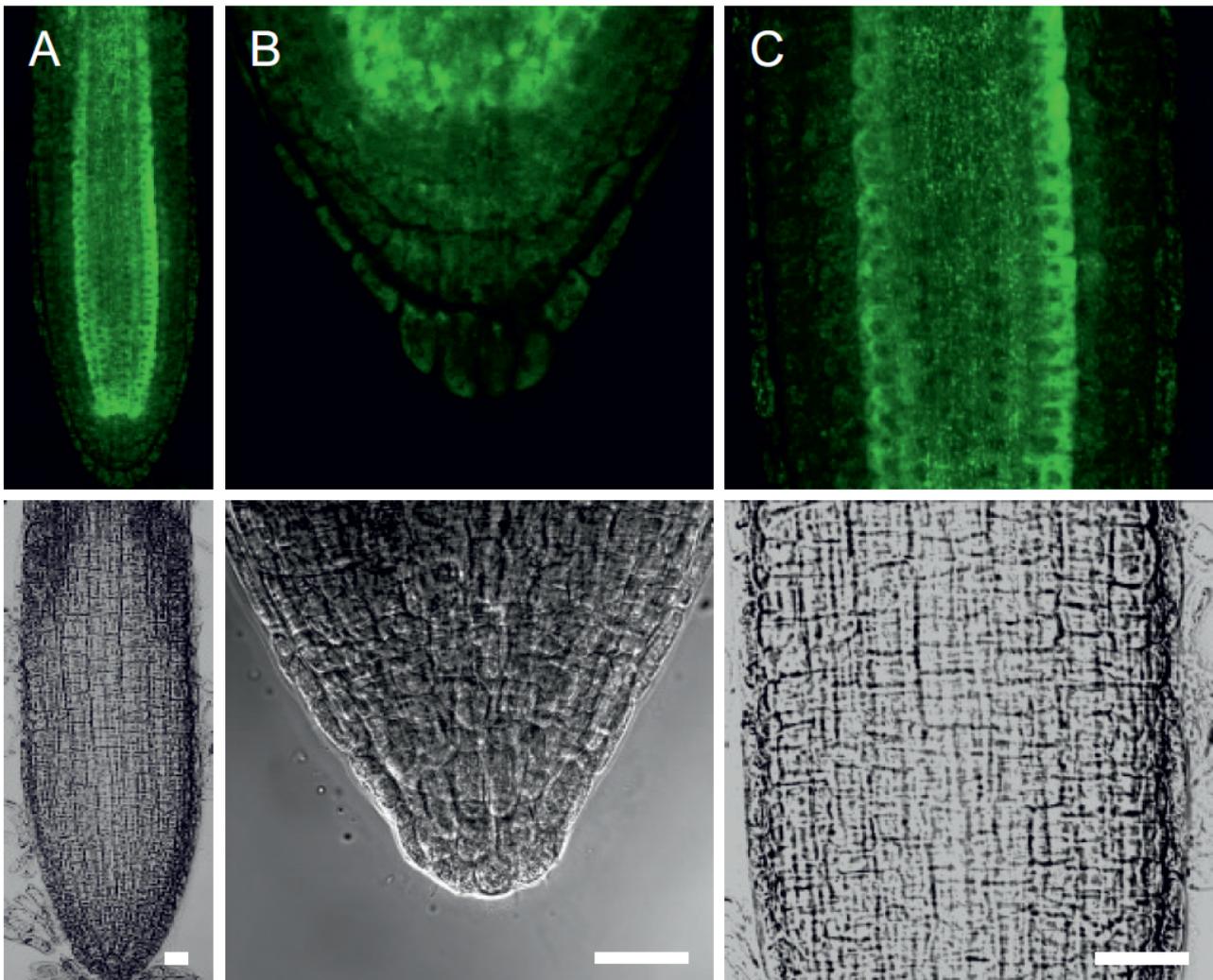


Abbildung 45: Wurzelspitze von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach 7-tägigem Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, A)-C) GFP-Signal, a)-c) DIC. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

Die Abbildungen 46 D - F zeigen Detail-Aufnahmen der Wurzelspitze. Abbildung 46 D zeigt Fluoreszenzspots in der Stele. Auch ist das GFP-Signal innerhalb des Nukleus vermindert. In Abbildung 46 E ist das verstärkte GFP-Signal in der Endodermis, sowie das sehr schwache Signal in Cortex und Epidermis erkennbar. In der Epidermis (Abb. 46 F) zeigt sich neben schwachen Spots ein Plasmamembran-nahes Signal. Das Innere der Zellkerne scheint weitgehend frei von Fluoreszenz zu sein. Dies ist trotz einer starken cytosolischen GFP-Fluoreszenz auch in den Endodermiszellen (Abb. 46 G) zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist ein Signal in den Zellkernen der Cortex-Zellen, sowie im Endoplasmatische Retikulum um den Nukleus herum, zu verzeichnen.

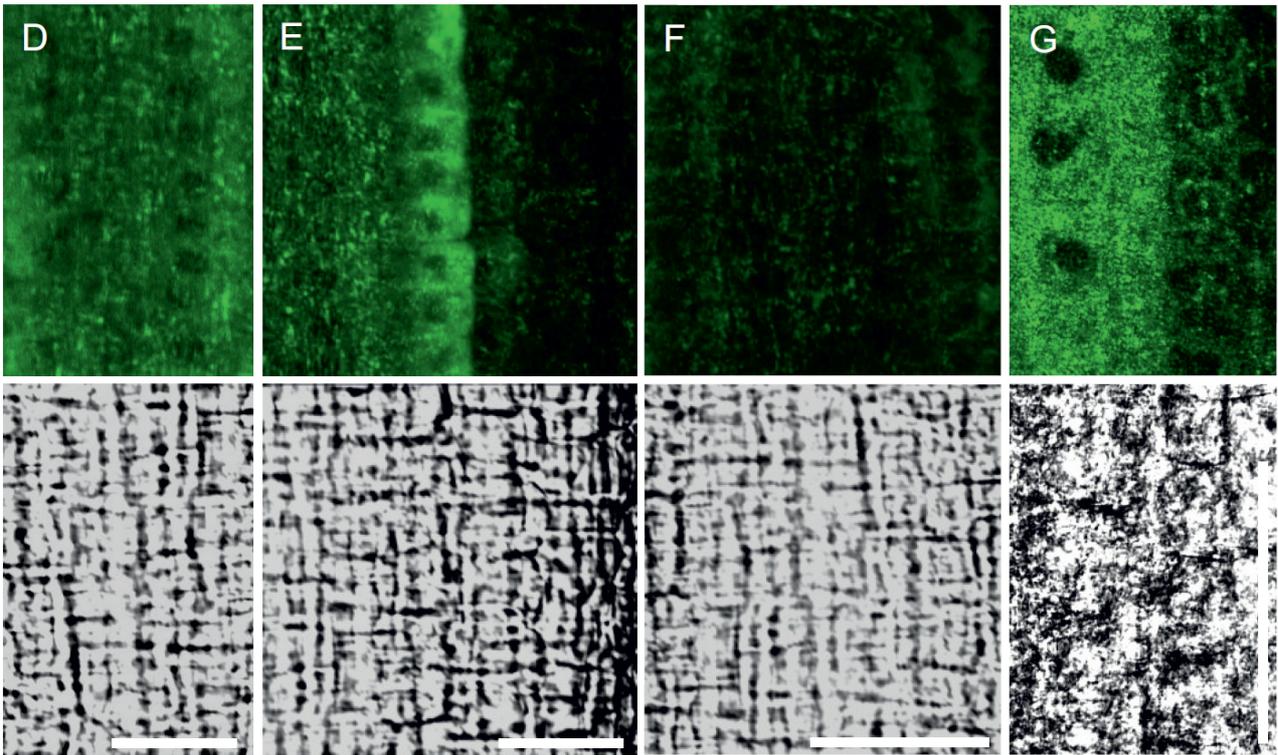


Abbildung 46: Detail-Aufnahmen der meristematische Zone der Wurzelspitze von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach 7-tägigem Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. D)d) Stele der Wurzelspitze, Ø, E)e) Stele, Endodermis und Cortex der Wurzelspitze, Ø, F)f) Epidermis, Aufsicht, G)g) Endodermis und Cortex der Wurzelspitze, Ø, D)-G) GFP-Signal, d)-g) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. Ø = Längsschnitt.

Die Abbildungen 47 H - K zeigen das spezifische GFP-Fluoreszenzsignal in der beginnenden Elongationszone, sowie im weiteren Verlauf der Elongationszone Richtung Basis. Aus Abbildung 47 H wird deutlich, dass das Signal mit dem Ende der meristematischen Zone deutlich abnimmt, insbesondere aber in der Endodermis. Im weiteren Verlauf der Elongationszone Richtung Basis beschränkt sich die Fluoreszenz größtenteils auf die Stele (Abb. 47 I und 47 J). Geringe Fluoreszenz ist zudem noch Plasmamembran-nah in der Epidermis (Abb. 47 K) zu verzeichnen.

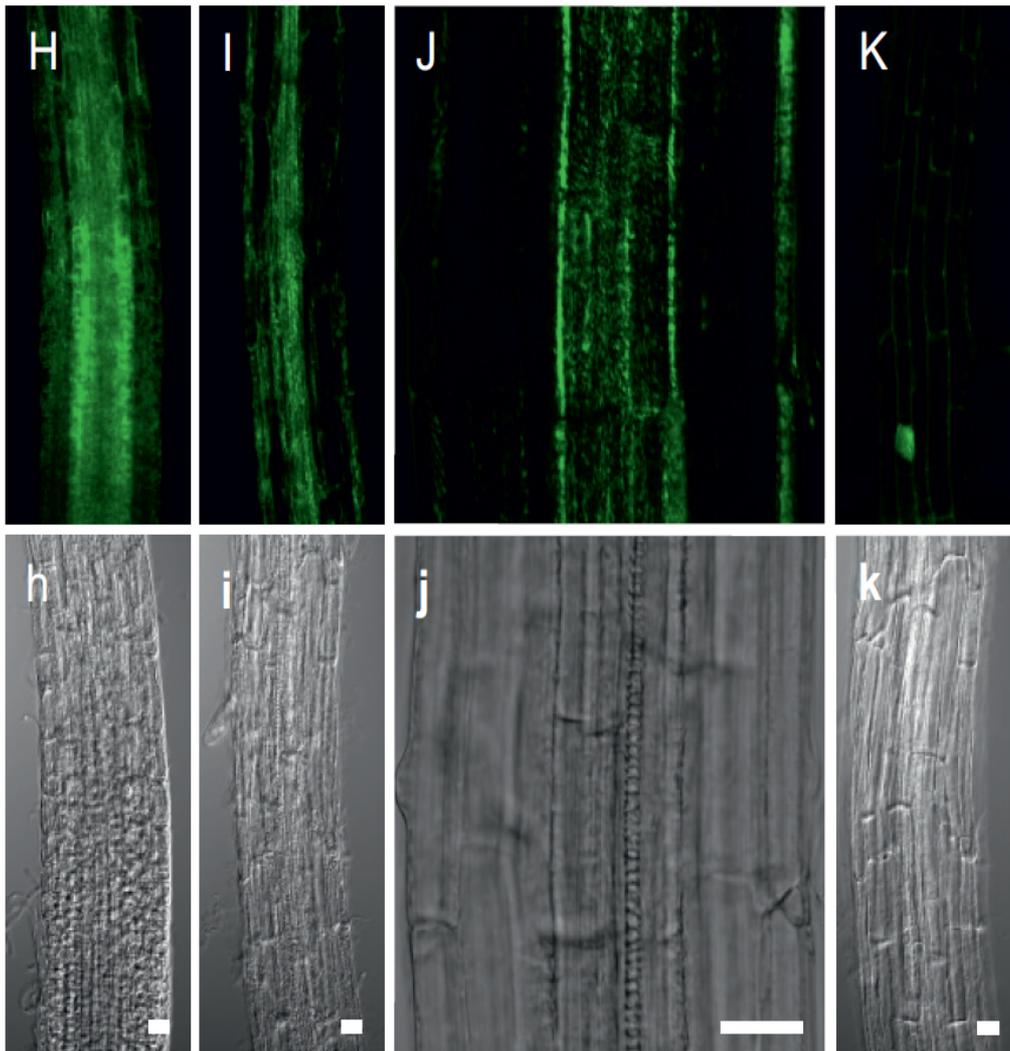


Abbildung 47: Elongationszone der Wurzel von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach 7-tägigem Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. H) beginnende Elongationszone \emptyset , I) Elongationszone, \emptyset , J) Vergrößerung Elongationszone \emptyset , K) Elongationszone (Aufsicht Epidermis), H)-K) GFP-Signal, h)-k) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. \emptyset = Längsschnitt.

Nach 14-tägigem Wachstum der Keimlinge wurde die Fluoreszenz in beginnenden Seitenwurzeln und Wurzelhaaren detektiert. Während in beginnenden Seitenwurzeln (Abb. 48 L) und in den äußeren Randbereichen der Pollenkörner (Abb. 48 N) Fluoreszenz detektierbar war, konnte in Wurzelhaaren (Abb. 48 M) und Trichomen (Abb. 48 O) kein spezifisches Signal festgestellt werden .

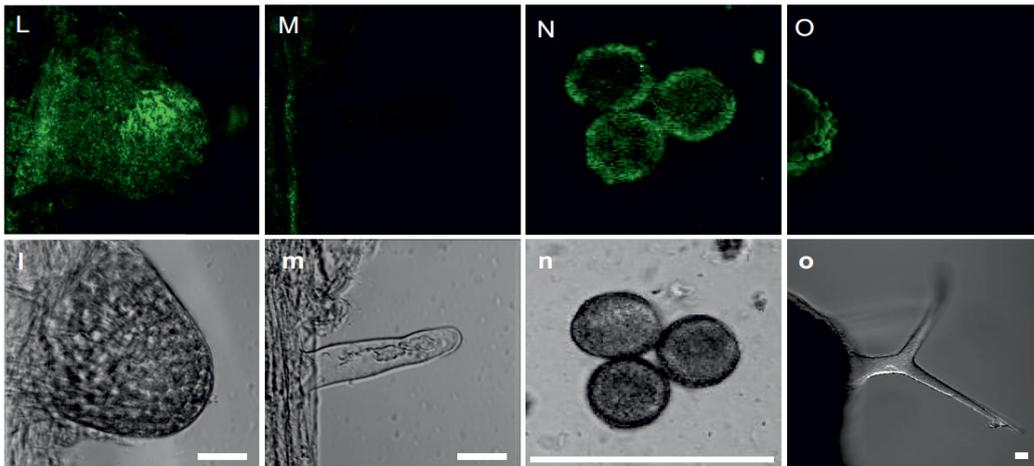


Abbildung 48: Wurzel und Pollen von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. L) beginnende Seitenwurzel, 14 Tage, Aufsicht, M) Wurzelhaar, 14 Tage, \emptyset , N) Pollenkörner, 8 Wochen, \emptyset , L)-N) GFP-Signal, l)-n) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. \emptyset = Längsschnitt.

3.4.5.2 Ermittlung der Expression von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach Wachstum in Dunkelheit

Die Abbildungen 49 A - C zeigen Wurzelgewebe von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ - Keimlingen nach 7-tägigem Wachstum in Dunkelheit. Auf spezifische Fluoreszenz wurden die Wurzelspitze, die Elongationszone und Wurzelhaare untersucht. Keines der Gewebe lieferte Hinweise auf das Vorhandensein einer spezifischen GFP-Fluoreszenz in den Keimlingen.

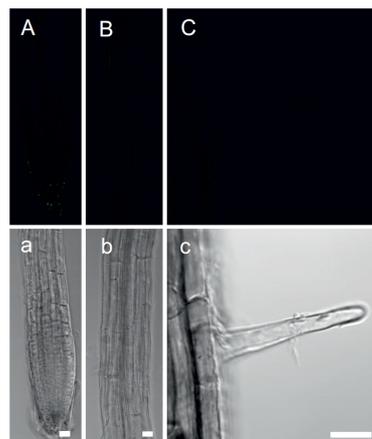


Abbildung 49: Wurzel von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach 7-tägigem Wachstum in Dunkelheit in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) Elongationszone, C) Wurzelhaar. A)-C) GFP-Signal, a)-c) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.4.5.3 Ermittlung der Expression von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ beim Dunkel-Licht-Wechsel

Die $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ -Keimlinge wurden nach 5-tägigem Wachstum in Weißlicht zunächst für 2 Tage in Dunkelheit inkubiert und anschließend wieder in Licht überführt. Nach 60min und 120min wurden die gleichen Keimlinge unter dem konfokalen Lasermikroskop mit identischen Mikroskopeinstellungen auf ihre spezifische GFP-Fluoreszenz hin untersucht.

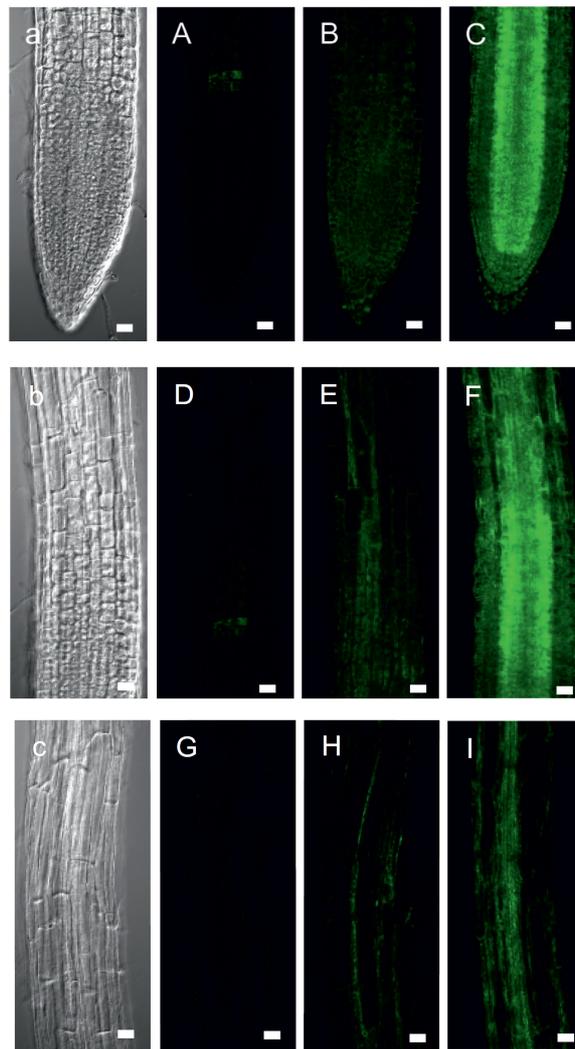


Abbildung 50: Wurzel von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ nach 7-tägigem Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht, 2h Inkubation in Dunkelheit und anschließender Inkubation in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. A-C) Wurzelspitze, D-F) beginnende Elongationszone, G-I) Elongationszone, A)D)G) Inkubation für 2h in Dunkelheit, B)E)H) Inkubation für 60min, C)F)I) Inkubation für 120min in $15\mu E$ Weißlicht. A)-I) GFP-Signal, a)-c) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

Die Abbildungen 50 A-I zeigen unterschiedliche Bereiche der Wurzel eines $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ - Keimlings. In *Abb. 50 A), D) und G)* (nach 2 Tagen Wachstum in Dunkelheit) ist lediglich eine minimale GFP-Fluoreszenz in einigen Zellen der Stele in der Wurzelspitze erkennbar. Die *Abbildungen 50 B), E) und H)* (Inkubation für 60min in Licht) zeigen eine geringe Fluoreszenz in der Wurzelspitze und der Stele der Elongationszone. *Abb. 50 C), F) und I)* (Inkubation für 120min in Licht) zeigen eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz in der Wurzelspitze, hauptsächlich in der Stele und der Endodermis, in geringerem Maße aber auch in Cortex und Endodermis. Lediglich in der Wurzelhaube ist nach wie vor keine Fluoreszenz detektierbar. In der beginnenden Elongationszone ist das Fluoreszenzsignal zunächst unverändert stark. In Richtung Wurzelbasis nimmt es jedoch in allen Zellschichten deutlich an Stärke ab. In der weiter zur Wurzelbasis verlaufenden Elongationszone ist nur noch Fluoreszenzsignal in der Stele feststellbar.

3.4.5.4 Ermittlung der Expression von $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7)

Die *Abbildungen 51 A - C* zeigen Wurzelgewebe von $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) nach 7- bzw. 14-tägigem Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht. Auf spezifische Fluoreszenz wurden die Wurzelspitze, die beginnende Elongationszone, die physiologisch ältere Elongationszone, beginnende Seitenwurzeln und Wurzelhaare untersucht. In keinem der genannten Wurzelgewebe konnte ein spezifische Fluoreszenzsignal detektiert werden.

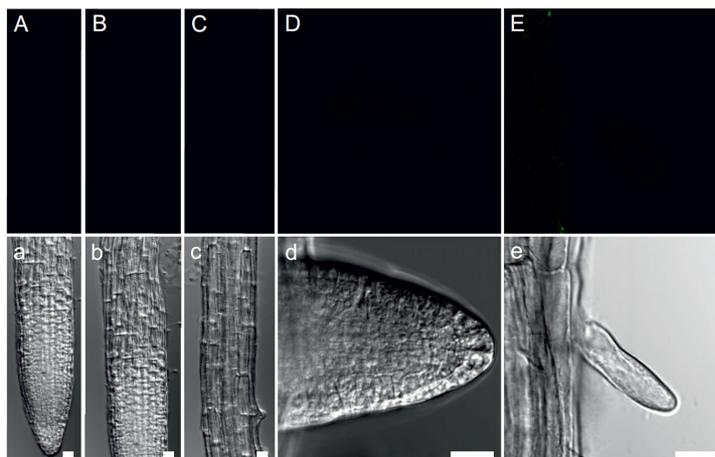


Abbildung 51: Wurzel von $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) nach Wachstum in $15\mu E$ Weißlicht in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, 7 Tage, B) beginnende Elongationszone, 7 Tage, C) Elongationszone, 7 Tage, D) beginnende Seitenwurzel, 14 Tage, E) Wurzelhaar, 14 Tage, A)-E) GFP-Signal a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu m$. Alle Aufnahmen zeigen mittige Längsschnitte.

3.5 Auswertung von WAICO 1

Die durch WAICO1 erhaltenen Keimlinge wurden für eine gründliche morphologische Analyse verwendet. So sollten Wachstumsunterschiede zwischen *ppla-I-1* und *Wassilijewskia* Wildtyp bei Wachstum in 1g und μg gefunden werden. Diese sollten Aufschluss über die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf das Keimlingswachstum geben, insbesondere in Verbindung mit den bereits vorliegenden Defekten der Knockoutmutante. Einen Teil der Auswertung bildet die Vermessung der Keimlinge nach 12 Tagen Wachstum anhand erstellter Astronautenfotos. Der andere Teil der Auswertung bezieht sich lediglich auf die Keimlinge der A-Boxen, welche nach 12-tägigem Wachstum und anschließender konstanter Kühlung auf die Erde verbracht werden konnten.

3.5.1 Manuell erstellte Bilder nach 12Tagen Wachstum

Die durch den Astronauten auf der ISS kurz vor Ende der Wachstumsphase nach 12 Tagen erstellten Bilder (s. *Abb. 52*) konnten nur einen groben Einblick in das Wachstumsverhalten der Keimlinge in den einzelnen Boxen liefern. Die Bildqualität wies deutliche Mängel auf, hauptsächlich verursacht durch eine schlecht regulierte Luftfeuchtigkeit in den Boxen. Diese führte zur Bildung von Wassertropfen auf der Frontscheibe, so dass lediglich eine Vermessung von Hypokotyllänge, Petiolenlänge und Blattfläche anhand der Bilder möglich war. Der Wurzelbereich konnte daher nur nach Entnahme der Keimlinge aus den Boxen und anschließendem einscannen vermessen werden. Die Bilder waren jedoch sehr hilfreich bei der Beurteilung des Wachstumsverlaufes und qualitativ besser als die automatisch erstellten Fotos. Es ist festzustellen, dass Keimung und Wachstum allgemein sehr gut verlaufen waren. Anzeichen einer Deetiolierung waren nicht erkennbar.

Anhand der Betrachtung der *Abb. 52* lässt sich die Morphologie bereits groß abschätzen. So sind bei Wachstum der *ppla-I-1*-Keimlinge in μg (Box A5) einige Coils zu erkennen, jedoch nicht bei Wachstum des *Wassilijewskia* Wildtyp in μg (Box A6). Deutlich erkennbar sind die großen Blattflächen des *Wassilijewskia* Wildtyps nach Wachstum in 1g (Boxen B3 und B5) im Vergleich zum Wachstum in μg (Boxen A3 und A6).

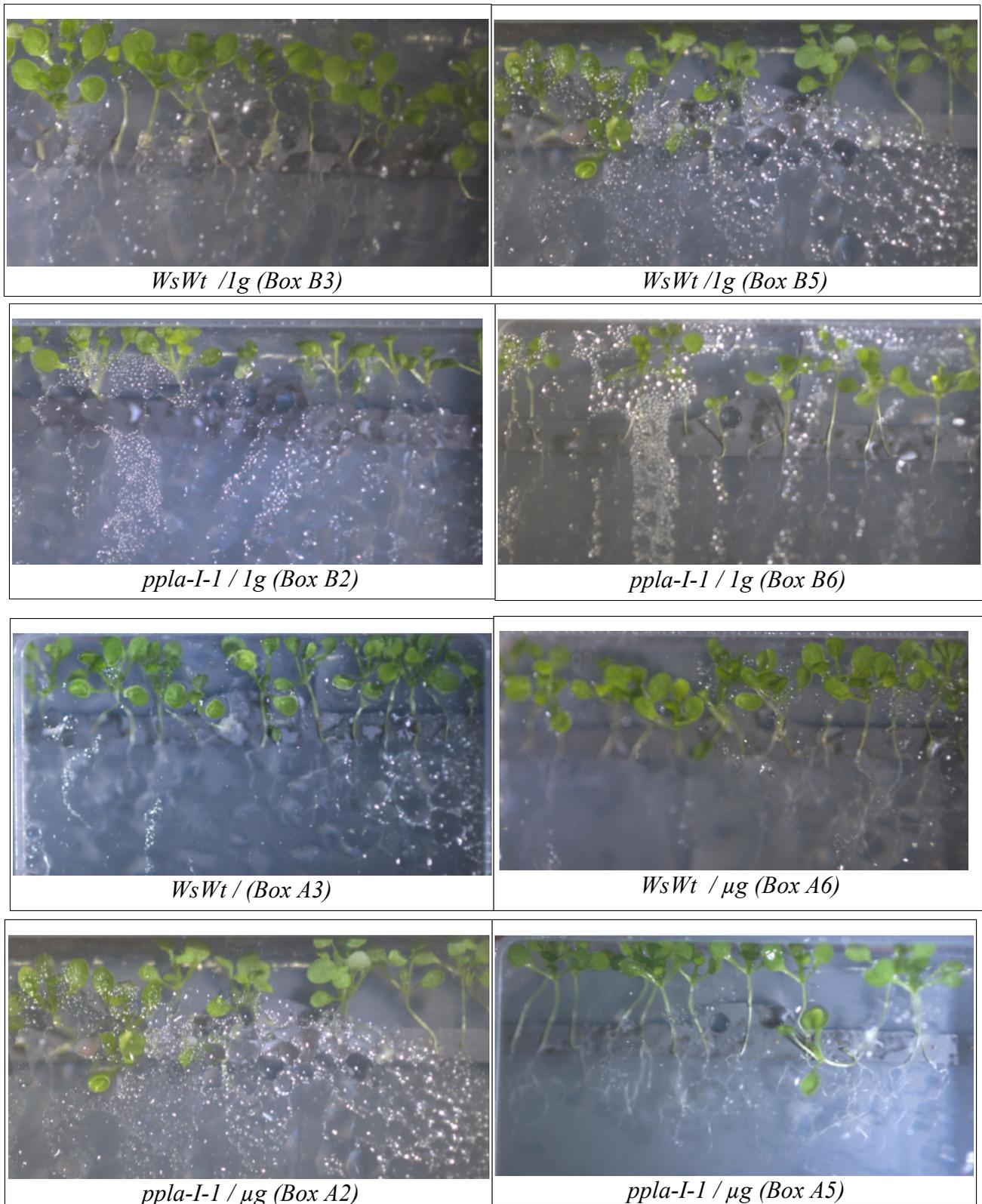


Abbildung 52: Manuell erstellte Bilder der acht Boxen von WAICO1 nach 12 Tagen Wachstum. Deutlich erkennbar sind störende Wassertropfen auf der Scheibe, verursacht durch eine schlechte Regulierung der Luftfeuchtigkeit in den Boxen. Die Bilder lassen jedoch erkennen, dass Keimung und Wachstum der *Arabidopsis*-Pflanzen gut verlaufen sind.

3.5.2 Morphologische Auswertung der Keimlingsphysiologie

Für WAICO1 erfolgte eine erste morphologische Auswertung nach 12-tägigem Wachstum anhand der vom Astronauten erstellten Fotos von unfixierten Keimlingen. Hier wurden zunächst die Keimlinge aller Boxen in Hinblick auf Hypokotyllänge, Petiolenlänge und Blattfläche vermessen und die erhaltenen Durchschnittswerte miteinander verglichen (s. Abb. 53). Die Vermessung der Hypokotyllängen ergab keine signifikanten Unterschiede beim Wachstum des Wildtyps in 1g und in μ g. Ein signifikant längeres Hypokotyl war jedoch bei Wachstum der Mutante in μ g im Vergleich zum Wachstum in 1g zu verzeichnen. Die durchschnittliche Petiolenlänge blieb beim Wildtyp im Vergleich von 1g und μ g konstant. Jedoch waren die Petiolen der Mutante in 1g signifikant kürzer als unter μ g-Bedingungen. Während die Blattfläche des Wildtyps unter 1g Bedingungen signifikant größer war, als unter μ g-Bedingungen, zeigte die Mutante keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen 1g und μ g.

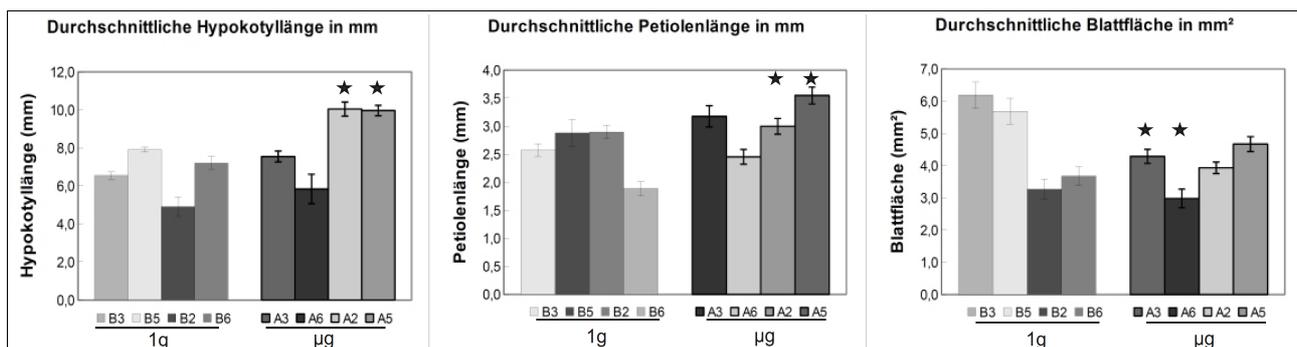


Abbildung 53: Auswertung der Keimlings-Physiologie nach 11 Tagen Wachstum: Ausgewertet wurde die durchschnittliche Hypokotyllänge, Petiolenlänge und Blattfläche. Jeweils aufgetragen sind die einzelnen Boxen getrennt nach Wachstum in Schwerelosigkeit (A-Boxen) und simulierter Schwerkraft (B-Boxen). Boxen A3, A6, B3 und B5 enthielten Wassilijewskia Wildtyp-Keimlinge, Boxen A2, A5, B2 und B6 enthielten *ppla-I-1*-Keimlinge. Sternchen kennzeichnen signifikante Wachstumsunterschiede. Dabei wurde zur Berechnung ein Durchschnitt der beiden Wachstumsboxen gleicher Behandlungsart verwendet. Verglichen wurde jeweils das Wachstum in 1g und μ g, getrennt nach Mutante und Wildtyp. Standardbalken zeigen S.E.

3.5.3 Auswertung des Wurzelwachstums der Keimlinge der A-Boxen

Nach Erhalt der unfixierten Keimlinge der A-Boxen (μ g-Bedingungen) wurden zunächst anhand von Aufnahmen der Boxen die Coiling-Rate, die Torsion der Coils und der Durchmesser der Coils

bestimmt (s. *Abb. 54*). Die durchschnittlichen Längen von Haupt- und Seitenwurzeln, sowie die durchschnittliche Anzahl an Seitenwurzeln wurden anhand von Bildern bestimmt, für die die Keimlinge einzeln aus den Agarboxen entnommen waren und geschnitten wurden.

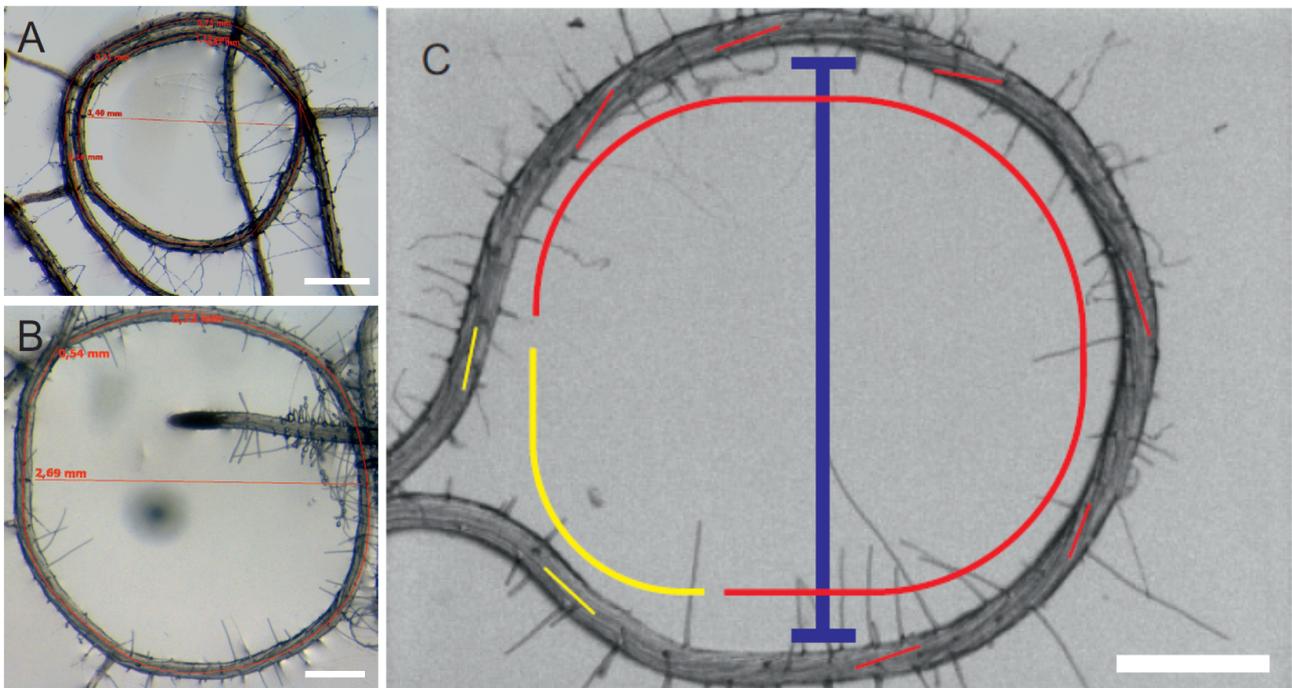


Abbildung 54: Vermessung von Coil-Durchmesser und Torsion. A) vermessener ppIa-I-Coil (Box A2), B) vermessener Wassilijewskia Wildtyp-Coil (Box A6), C) Schematische Darstellung der Vermessung. blau: Durchmesser des Coils, rot: Anteil des Gesamtumfanges des Coils mit Torsion, gelb: Anteil des Gesamtumfanges des Coils ohne Torsion. Balken entspricht 0,5mm.

Die Ermittlung der Coilingrate, also der Anzahl an Coils je Pflanze bei den unter μ g-Bedingungen gewachsenen Keimlingen ergab eine signifikant höhere Anzahl gebildeter Coils bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Als Coil wurde dabei ein Wurzelwachstum definiert, bei dem die Wurzel kreisförmig verläuft und mindestens einen vollständig geschlossenen Ring ausbildet. Der Vergleich der Coil-Durchmesser von Mutante und Wildtyp nach Wachstum in μ g ergab signifikant kleinere Coils bei der Mutante. Bei Wachstum unter μ g-Bedingungen zeigte die Mutante einen signifikant geringeren Grad an Torsion der Epideriszellen im Vergleich zum Wildtyp. So bildeten sich bei der Mutante im Schnitt kleinere Coils mit geringerer Torsion aus. Der Vergleich der Hauptwurzellängen, Seitenwurzellängen und Anzahl der Seitenwurzeln unter μ g-Bedingungen gewachsener Keimlinge ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp (s. *Abb. 55*).

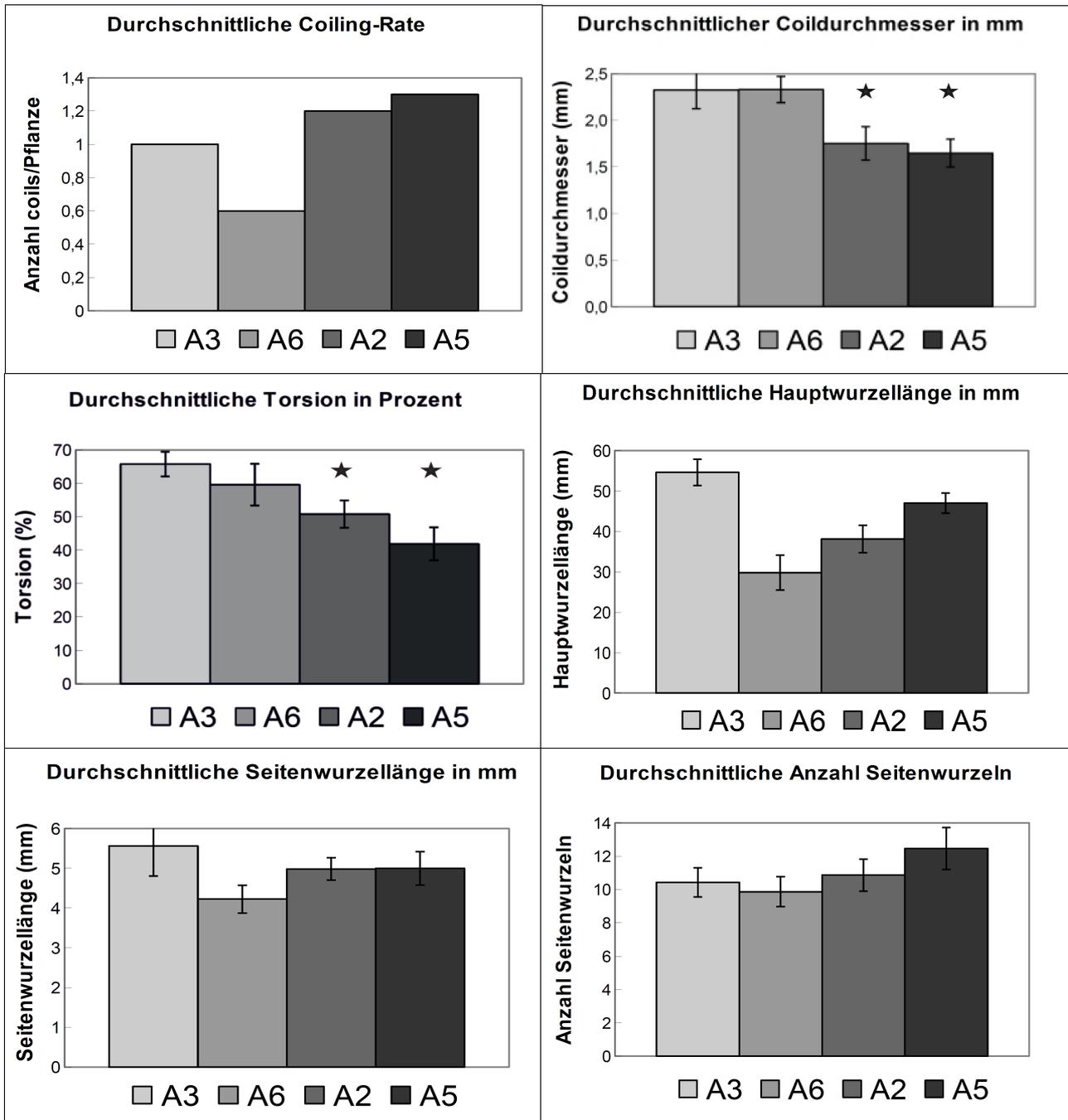


Abbildung 55: Auswertung der Wurzel-Morphologie der A-Boxen (μ g-Bedingung). Ausgewertet wurde die Durchschnittswerte der Coiling-Rate, des Coil-Durchmessers, des Torsionsgrads, der Hauptwurzellänge, der Seitenwurzellänge und der Anzahl Seitenwurzeln je Pflanze der Keimlinge der A-Boxen. Die Boxen A3 und A6 enthielten *Wassilijewskia* Wildtyp-Keimlinge, Boxen A2 und A5 enthielten *ppla-I-1* – Keimlinge. Sternchen kennzeichnen signifikante Wachstumsunterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Dabei wurde zur Berechnung ein Durchschnitt der beiden Wachstumsboxen gleicher Behandlungsart verwendet. Standardbalken zeigen S.E.

3.6 Coilingverhalten als Oberflächen-abhängiges Phänomen und Penetration des Agars bei *ppla-I-1* und *ppla-I-3*

Vermehrtes Coiling von Knockoutmutanten ist ein deutlicher Hinweis auf einen vorliegenden Gravitropismusschaden. Dieses Merkmal ist insbesondere in *ppla-I-1* gut zu beobachten. Bislang unklar ist jedoch, warum *ppla-I-3* eindeutig kein vermehrtes Coiling zeigt. Weiter ist ungeklärt, ob das häufige Coiling Ausdruck eines Defektes im Gravitropismus *per se* ist oder aber eine Strategie zum Ausgleich des durch den Defekt drohenden Schadens für die Pflanze. Eine denkbare Folge der verringerten Erkennung von Gravitation ist ein verringertes Wachstum der Wurzel hin zum Erdmittelpunkt und demnach ein verringertes Eindringen der Wurzel in das Nährmedium. Daher wurde zunächst die Penetrationsrate bei steigenden Agarkonzentrationen im Nährmedium, also steigendem Eintrittswiderstand der Wurzel in den Nährager, untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob vermehrtes Coiling in Abhängigkeit zum Penetrationswiderstand die Penetration verbessert, verschlechtert oder garnicht beeinflusst. Die Ermittlung der Coilingrate sollte Aufschluss darüber geben, ob Penetrationsrate und Anzahl der Coils direkt miteinander zusammenhängen. Die Messung des Coil-Durchmessers sollte klären, ob die Penetrationsrate mit den sterischen Eigenschaften der Coils in Verbindung stehen.

Dieser Versuchsteil dient einem besseren Verständnis des Coilings und ist vorbereitend für das in Schwerelosigkeit (WAICO) durchgeführte Coil-Experiment. Auch liefert es eine weitergehende Beschreibung der phänotypischen Unterschiede und Gemeinsamkeiten von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* in Bezug auf das Coiling.

Die Penetrationsrate wurde ermittelt, indem nach 10 Tagen Wachstum der Keimlinge auf den verschiedenen Agarkonzentrationen jeweils die Keimlinge gezählt wurden, deren Wurzel bereits in den Agar eingedrungen war. Die Anzahl der penetrierenden Keimlinge wurde dann zur Gesamtzahl der Keimlinge einer Behandlungsart ins Verhältnis gesetzt.

Die Auswertung der Penetrationsraten ergab eine deutlich erhöhte Penetration der *ppla-I-1* im Vergleich zum *Wassiljewskia* Wildtyp. Insbesondere im Bereich von 1,0 – 1,6% Agar ergaben sich signifikante Unterschiede. Bei einer Konzentration von 1,1% Agar im Nährmedium lag mit 21% der deutlichste Unterschied vor (s. *Abb. 56*).

Ein Vergleich der Penetrationsraten von *ppla-I-3* und *Columbia* Wildtyp ergab ebenfalls signifikante Unterschiede. Im Bereich von 1,3 – 2,0% Agarkonzentration wichen die Penetrationsraten von *ppla-I-3* und *Columbia* Wildtyp am deutlichsten voneinander ab. Bei einer Agarkonzentration von 1,5% wurde ein maximaler Unterschied von 22% erreicht.

Beide Mutanten weisen also eine ähnlich erhöhte Penetrationsrate im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp auf. Jedoch liegen die maximalen Unterschiede jeweils in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Weiter penetriert Columbia Wildtyp etwas schlechter als Wassilijewskia Wildtyp während *ppla-I-1* und *ppla-I-3* vergleichbar gut penetrieren.

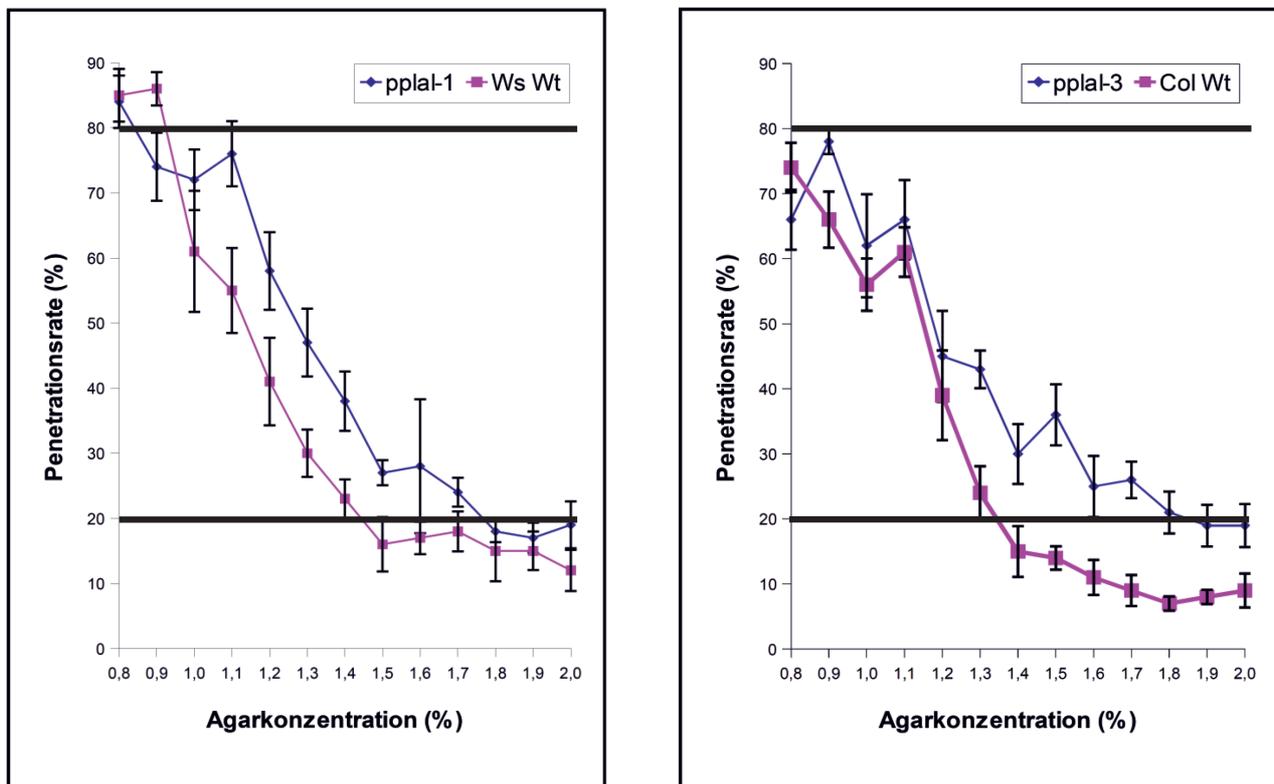


Abbildung 56: Dargestellt ist die durchschnittliche Penetrationsrate von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp bei Wachstum auf 1/2 MS-Medium für 10 Tage und steigenden Agarkonzentrationen im Bereich von 0,8 - 2,0% Agar. Die Auswertung erfolgte mit 4 biologischen Wiederholungen und jeweils ≥ 30 Keimlingen. Standardbalken zeigen S.E.

Die Coiling-Rate wurde analog zu der Auswertung von WAICO1 ermittelt, indem die Gesamtzahl gebildeter Coils einer Agarkonzentration bonitiert und ins Verhältnis zur Gesamtzahl ausgezählter Pflanzen der jeweiligen Agarkonzentration gesetzt wurde. Somit erhielt man den durchschnittlichen Anteil an Coils je Pflanze für jede Behandlungsart. Als Coil wurde dabei korrespondierend zu der Auswertung von WAICO1 ein Wurzelwachstum definiert, dass einen in sich geschlossenen Kreis ausbildet (s. Abb. 57).

Die Coiling-Rate von *ppla-I-1* schwankt im Bereich von 0,13 - 0,33, die des Wassilijewskia Wildtyp im Bereich von 0,03 - 0,23. Die durchschnittliche Coiling-Rate von *ppla-I-1* ist deutlich höher als die des Wassilijewskia Wildtyp. In Bezug auf die Agarkonzentration ist jeweils keine tendenzielle

Entwicklung der Coiling-Rate erkennbar. Es findet sich jedoch bei *ppla-I-1* ein deutliches Maximum bei einer Agarkonzentration von 1,2% (s. Abb. 58).

Die Coiling-Raten von *ppla-I-3* und Columbia Wildtyp schwanken im Bereich von 0,01 - 0,14. Die mittleren Coiling-Raten unterscheiden sich nicht eindeutig voneinander. In Bezug auf die Agarkonzentration ist keine Tendenz der Coiling-Rate erkennbar.

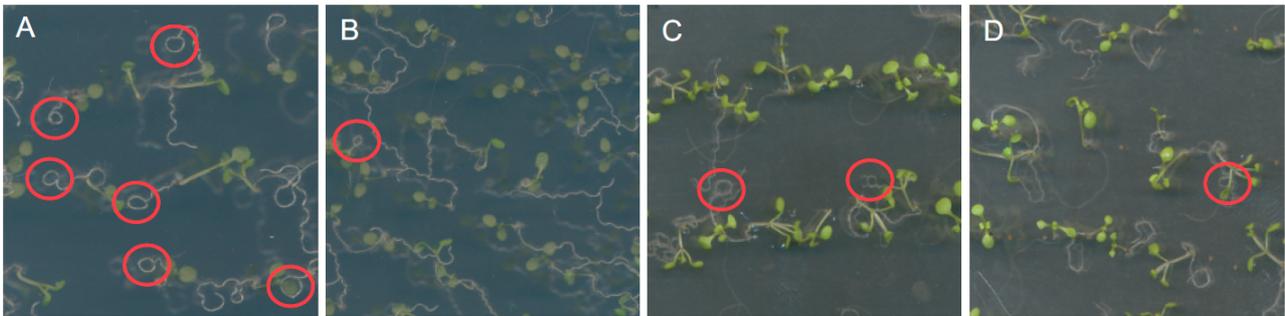


Abbildung 57: Ausschnitte des Wurzelwachstums von A) *ppla-I-1*, B) *Wassilijewskia* Wildtyp, C) *ppla-I-3* und D) *Columbia* Wildtyp. Als Coil gewertetes Wurzelwachstum wurde rot umrandet.

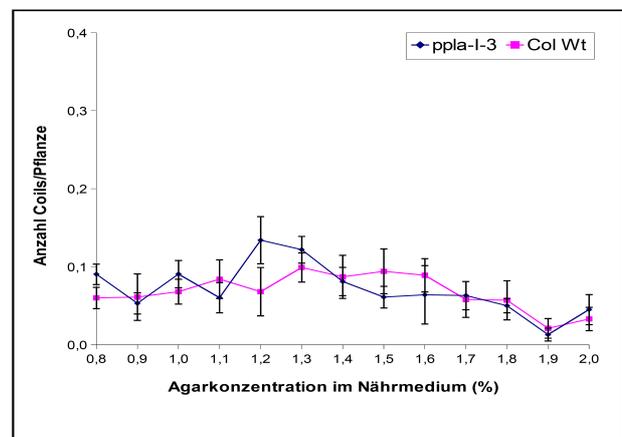
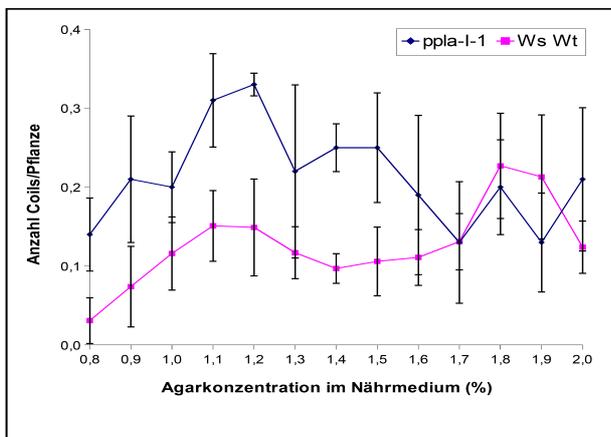


Abbildung 58: Dargestellt ist die durchschnittliche Coiling-Rate von *ppla-I-1* *ppla-I-3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp bei Wachstum auf 1/2 MS-Medium für 10 Tage und steigenden Agarkonzentrationen im Bereich von 0,8 - 2,0% Agar. Die Auswertung erfolgte mit 4 biologischen Wiederholungen und jeweils ≥ 30 Keimlingen. Standardbalken zeigen S.E.

Die Ermittlung der Coil-Durchmesser erfolgte analog zu der WAICO1-Auswertung. Die Coil-Durchmesser von *ppla-I-1* und *Wassilijewskia* Wildtyp nehmen mit steigender Agarkonzentration im Nährmedium kontinuierlich ab. Dabei ist der durchschnittliche Coil-Durchmesser der *ppla-I-1* im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner. Auch die Coil-Durchmesser von *ppla-I-3* und *Columbia*

Wildtyp nehmen bei steigender Agarkonzentration im Nährmedium kontinuierlich ab, aber ohne deutliche Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Insgesamt bilden *ppla-I-3* und Columbia Wildtyp durchschnittlich kleinere Coils aus als *ppla-I-1* und Wassilijewskia Wildtyp (s. Abb. 59).

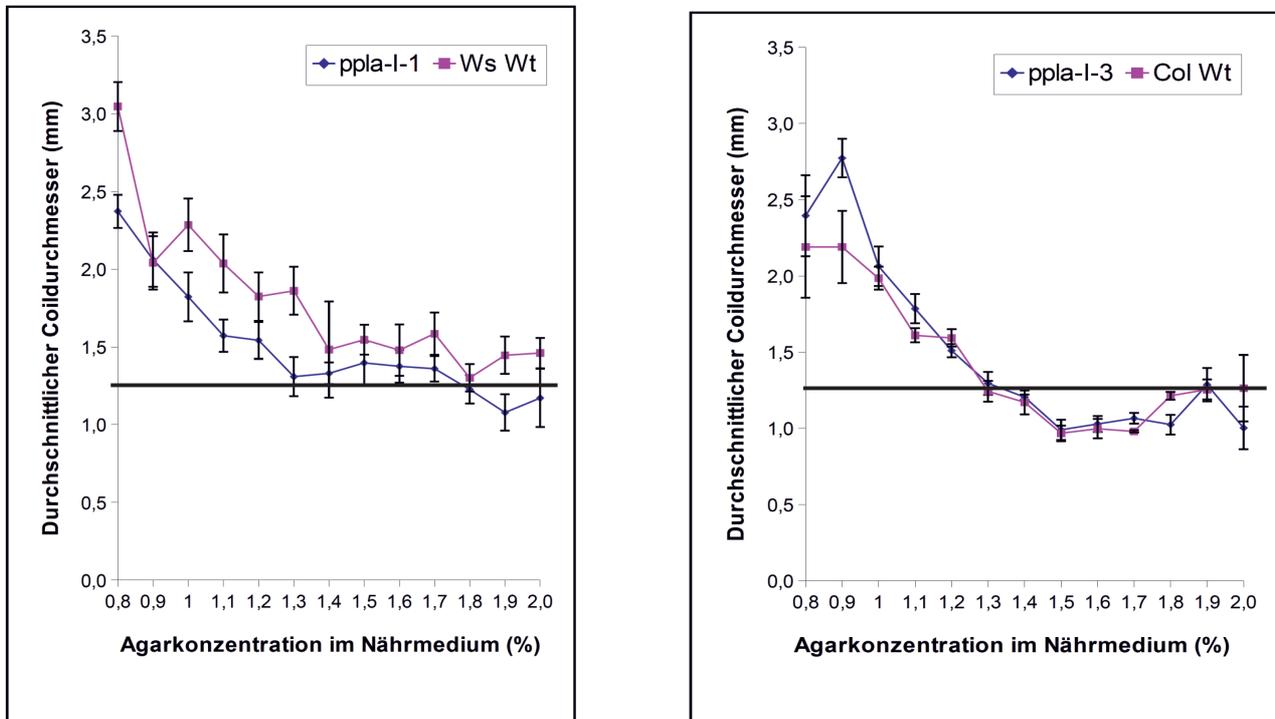


Abbildung 59: Dargestellt ist der durchschnittliche Coil-Durchmesser von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp bei Wachstum auf 1/2 MS-Medium für 10 Tage und steigenden Agarkonzentrationen im Bereich von 0,8 - 2,0% Agar. Standardbalken zeigen S.E.

So ergibt sich zwar eine gleiche, höhere Penetrationsfähigkeit für beide Mutanten, aber die Umsetzung durch das Coiling ist verschieden. *ppla-I-1* und Wassilijewskia Wildtyp zeigen höhere Coil-Zahlen je Pflanze, bilden aber im Vergleich zu *ppla-I-3* und Columbia Wildtyp größere Coils aus. Die kleineren Coils von *ppla-I-3* und Columbia Wildtyp, vor allem bei höheren Agarkonzentrationen, sind offenbar effizienter in der Penetration.

4. Diskussion

4.1 Phänotypische Unterschiede zwischen *ppla-I-1* und *ppla-I-3*

Effendi *et al.* (in Vorbereitung) zeigten, dass die beiden Knockoutmutanten *ppla-I-1* und *ppla-I-3* neben phänotypischen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in Phototropismus- und Gravitropismus-Versuchen aufweisen (s. Tab. 35).

Tabelle 35: Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Phänotyp von *ppla-I-1* und *ppa-I-3*

Defekt / Phänotyp	<i>ppla-I-1</i>	<i>ppla-I-3</i>
Phototropismus Hypokotyl	verzögert	normal
Gravitropismus Wurzel	normal	schwach verzögert
Gravitropismus Hypokotyl	verzögert	verzögert
Coil-Bildung	vermehrt	normal
Blühzeitpunkt	verfrüht	normal
frühe Auxin-Gene	RNA-Expression verändert	RNA-Expression verändert

So ist die phototrope Umorientierung des Hypokotyls auf einen neuen Lichtreiz in *ppla-I-1* nach 12h signifikant verzögert, aber nicht in *ppla-I-3*. Bei Kippen der Wachstumsplatten um 90° ist die gravitrope Umorientierung der Wurzel von *ppla-I-3* nach 24h signifikant verzögert, jedoch konnte dies nicht für *ppla-I-1* festgestellt werden. Bei einem entsprechenden Versuch zur gravitropen Umorientierung des Hypokotyls sind hingegen beide Mutanten verzögert. Weiter zeigt *ppla-I-1* im Gegensatz zu *ppla-I-3* auf 45° gekippten harten Agarplatten eine verstärkte Tendenz zur Ausbildung von Wurzel-Coils im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp. Den deutlichsten phänotypischen Unterschied stellt jedoch der frühe Blühzeitpunkt von *ppla-I-1* im Vergleich zum Wassilijewskia Wildtyp dar, während *ppla-I-3* keine signifikante Unterschiede im Blühzeitpunkt im Vergleich zum Columbia Wildtyp aufweist. qPCR-Analysen ergaben, dass die Regulierung früher Auxin-induzierbarer Gene in den beiden Allelen *ppla-I-1* und *ppla-I-3* Unterschiede aufweist.

Eine Annahme für eine mögliche Begründung der Unterschiede der beiden Knockoutmutanten resultierte aus den gefundenen Splicingvarianten der *pPLA-I* mit und ohne Exon7. Da *ppla-I-1* einen Wassilijewskia-Hintergrund und *ppla-I-3* einen Columbia-Hintergrund aufweist, wurde zunächst vermutet, dass die gefundenen Differenzen mit verschiedene Expressionsraten der

Splicingvarianten in den beiden Ökotypen zusammenhängen könnte. Jedoch ergab die Überprüfung mittels qPCR und Splicing-spezifischen Primern keine signifikanten Unterschiede in den RNA-Expressionsraten der Sequenzvarianten in Wassilijewskia und Columbia. Somit konnte diese Überlegung als Grund für die Unterschiede in *ppla-I-1* und *ppla-I-3* ausgeschlossen werden. Auch die Untersuchungen mittels Immunolabeling zeigten keine Hinweise auf ein unterschiedliches Protein-Expressionsmuster in den Ökotypen Wassilijewskia und Columbia. Dies führt zu der Annahme, dass die phänotypischen Differenzen nicht primär mit dem pPLA-I-Protein, bzw. mit einem Knockout der *pPLA-I* in Zusammenhang stehen, sondern weitere Faktoren ursächlich sein müssen.

Eine weitere Hypothese stützt sich auf eine von Aukermann *et al.* (1997) gefundene, im Wassilijewskia Ökotyp natürlich vorkommende Deletion des PHYD-Gens, während die Gene für die Phytochrome A, B und C vorhanden sind. *PHYD* teilt etwa 80% seiner Aminosäuresequenz mit *PHYB* (Mathews und Sharrock, 1997) und beide Photorezeptoren besitzen sehr ähnliche Funktionen, was bedeutet, dass die PHYD-Deletion in Wassilijewskia einen Defekt im Signalweg der PHYB-ähnlichen Phytochrome verursachen könnte. Auch wird aufgrund der Verbindung zu PHYB für PHYD eine Funktion in der Regulation des SAS vermutet (Aukermann *et al.*, 1997, Devlin *et al.*, 1999).

Mittels qPCR, Immunolabeling mit pPLA-I-spezifischen Antikörpern und pPLA-I-GFP-Reporterproteinen konnten in der vorliegenden Arbeit Anhaltspunkte auf die Regulation der pPLA-I-Expression durch Licht gefunden werden. Hieraus resultiert insgesamt die Hypothese, dass die Phytochrome B und eventuell D in ihrer Funktion mit pPLA-I verknüpft sein könnten.

Dies könnte im Mindesten schon eine Erklärung für den frühen Blühzeitpunkt von *ppla-I-1* bieten. Reed *et al.* (1993) konnten zeigen, dass eine Deletion von *PHYB* frühes Blühen zur Folge hat. Dieser Effekt könnte in abgeschwächtem Maße durch die natürliche *PHYD*-Deletion (*phyD-1*-Mutation) in *ppla-I-1* hervorgerufen werden. Weitere genetische Unterschiede zwischen Wassilijewskia Wildtyp und Columbia Wildtyp sind bekannt (Ulm *et al.*, 2001; Yang und Hua, 2004; Bartels *et al.*, 2009), wobei mögliche Zusammenhänge mit pPLA-I völlig unklar sind. Ob letztendlich die PHYB-Deletion in Wassilijewskia Wildtyp für die Unterschiede zwischen *ppla-I-1* und *ppla-I-3* ganz oder teilweise verantwortlich ist, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend geklärt werden.

4.2 Sequenzanalyse des *pPLA-I*-Gens

Yang *et al.* postulierten 2007 das Vorhandensein einer *pPLA-I* cDNA-Sequenz bestehend aus 17 Exonen, (fehlendes Exon 4 im Vergleich mit der hier vorgestellten Sequenz). Grundlage dieser Analyse war die Nutzung der Phagenbank CD4-16, welche die cDNA-Sequenz der *pPLA-I* enthält. Im Rahmen der für diese Arbeit notwendigen Sequenzgewinnung der *pPLA-I* wurde die Isolierung eines *pPLA-I*-haltigen Klon aus der Phagenbank CD4-16 durchgeführt. Eine vollständige Sequenzierung ergab das Fehlen von Exon7, vermutlich hervorgerufen durch alternatives Splicing. Es wurden zudem zahlreiche Punktmutationen gefunden, was auf eine schlechte Qualität der hergestellten cDNA, verursacht durch die Bedingungen der RT-PCR, schließen lässt. Die von Yang *et al.* (2007) vorgeschlagene Sequenzvariante mit fehlendem Exon4 konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gefunden werden. Auch wurde die dementsprechende Sequenz 2009 aus der Datenbank NCBI entfernt. Dies lässt vermuten, dass die von Yang *et al.* (2007) veröffentlichte Sequenz lediglich mittels Software aus der genomischen DNA der *pPLA-I* abgeleitet wurde und nicht durch Sequenzierung ermittelt wurde.

Das Fehlen von Exon7 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem Abbruch des Open Reading frames nach wenigen Nukleotiden. Die Folge ist ein Stop der Proteinbiosynthese nach nur 435 Aminosäuren.

In einem weiteren Versuch zur Gewinnung der vollständigen *pPLA-I*-Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit RNA isoliert und in cDNA umgewandelt. Die auf diese Weise gefundene cDNA-Sequenz der *pPLA-I* bestehend aus 18 Exonen wurde durch einen Eintrag bei NCBI im Jahr 2011, der eine vollständige Übereinstimmung der Sequenzabfolge aufweist, bestätigt (s. *Abb.* 14 und 15). Es ist daher davon auszugehen, dass die hier für die Erstellung verschiedener GFP-Konstrukte, Realtime-Primer und Antikörper verwendete Sequenz mit der nativen Sequenz vollständig identisch ist.

4.3 Mögliche Funktionen der gefundenen Splicingvarianten

Mittels qPCR mit Exon7-spezifischen, sowie N- und C-Terminus-spezifischen Primern konnte das Vorhandensein beider Splicingvarianten nachgewiesen werden. Es konnte weiter festgestellt werden, dass die „unvollständige“ Splicingvariante im Vergleich zur vollständigen Sequenzvariante etwa 25-fach häufiger auftritt (s. *Abb.* 18). Dies könnte eine Erklärung für die Problematik einer vollständigen Amplifikation der *pPLA-I* bieten, da die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation der

pPLA-I-Sequenz mit Exon7 demnach 25-fach verringert ist. Auch zeigte sich bei der Amplifikation der *pPLA-I*-Sequenz mittels Teilsequenzen, dass sowohl für die Benutzung von *Wassilijewskia* Wildtyp, als auch *Columbia* Wildtyp als Template das Teilfragment T2, welches Exon 7 (falls in der Sequenz vorhanden) beinhaltet, trotz konstanter PCR-Bedingungen für alle Teilfragmente stets schwächer amplifiziert wurde.

Die stark hochregulierte Expression von *pPLA-I* (-Exon7), bzw. die vergleichsweise schwache Expression von *pPLA-I* wirft die Frage auf, ob *pPLA-I* (-Exon7) eine Funktion auf Proteinebene zukommt und ob diese Funktion mit der der *pPLA-I* überlappt oder identisch ist. Auch könnte *pPLA-I* (-Exon7) ganz einfach auf Fehlsplicing zurückzuführen sein. In diesem Fall würde es sich bei dieser Sequenzvariante lediglich um ein Artefakt ohne Funktion handeln, welches in der Folge vollständig degradiert würde. Tatsächlich sind Fehlsplicing und der Zerfall von „nonsense“-mRNA in Eukaryoten keine Seltenheit (Roy und Irimia, 2008).

Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde ein *pPLA-I* (-Exon7)-Konstrukt mit synthetischem 35S-Promotor und N-terminalem GFP in *ppla-I-1* transformiert. Die korrekte Herstellung des Konstruktes und eine erfolgreiche Transformation von *Arabidopsis* wurden durch Sequenzierung und Verwendung von Selektionsmarkern überwacht. Als Resultat konnte keinerlei spezifische GFP-Fluoreszenz in diesen Transformanden ermittelt werden (s. Abb. 51). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass *pPLA-I* (-Exon7) trotz der hohen RNA-Expressionsrate auf Proteinebene nicht oder nur in Spuren vorhanden ist. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese vom Fehlsplicing und Zerfall der „nonsense“-mRNA.

Gegen eine vollwertige Funktion von *pPLA-I* (-Exon7) auf Proteinebene sprechen zudem die Komplementationsversuche mit den Transformanden. Im Blühexperiment konnte festgestellt werden, dass der Blühzeitpunkt von $P_{35S}::GFP-pPLA-I$ (-Exon7) dem von *ppla-I-1* entspricht, die Transformanden also wie die Mutante früh und nicht wie der Wildtyp vergleichsweise spät blühen. Hingegen konnte *ppla-I-1* mit einem Konstrukt, welche die vollständige *pPLA-I*-Sequenz beinhaltet ($P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$), im Blühversuch erfolgreich komplementiert werden (Blühverhalten wie *Wassilijewskia* Wildtyp) (s. Abb. 44).

4.4 Expressionsstudien der *pPLA-I*

Die mittels konfokaler Lasermikroskopie erhaltenen Daten beziehen sich größtenteils auf die Wurzel. Grund hierfür ist zum einen der durchschnittliche Wurzeldurchmesser junger, 5-7 Tage alter *Arabidopsis*-Keimlinge von etwa 100µM. Mit dieser Gewebedicke ist auch die Grenze zur

Erstellung konfokaler Aufnahmen erreicht. Organe mit einem größeren Durchmesser / einer größeren Gewebedicke, wie Hypokotyle, Petiolen und Blätter, können zwar mikroskopisch, aber nicht mehr konfokal betrachtet werden, da die spezifische Fluoreszenz der betrachteten Schicht durch darüber liegendes Gewebe absorbiert oder reflektiert wird und daher nicht mehr detektierbar ist. Auch die Wurzel kann daher nur bis etwas über den Querschnitt hinaus betrachtet werden, bevor das Fluoreszenzsignal signifikant abnimmt. Zudem stellt der hohe Gehalt an Pigmenten wie Chlorophyllen, Carotinoiden und Anthocyanen in Hypokotylen, Petiolen, Blättern und Knospen ein Problem dar. Diese weisen eine starke Autofluoreszenz auf, die die spezifische Fluoreszenz überlagern würde. Zwar können die Pigmente mittels einer Methanolreihe größtenteils entfernt werden. Die Behandlung schädigt jedoch das Gewebe und verschlechtert die Qualität des Immunlabelings erheblich. Aus den genannten Gründen beschränkten sich die Untersuchungen auf die Wurzel, den Pollen und die Trichome der Blätter. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Eignung des Immunlabelings im Embedding-Verfahren überprüft. Es zeigte sich jeweils, dass das Verfahren für *Arabidopsis*-Wurzeln nicht geeignet ist.

4.4.1 Spezifität der Antikörper gegen pPLA-I und des detektierten Signals

Für die hier durchgeführten Immunlabelings wurden zwei unterschiedliche pPLA-I-spezifische Antikörper hergestellt. Bei dem ersten Antikörper handelt es sich um einen Peptid-Antikörper, der spezifisch an ein Peptid in der N-terminalen Domäne der pPLA-I bindet. Der zweite Antikörper besteht aus einer 161 Aminosäuren langen, C-terminalen Peptidsequenz. Die beiden unterschiedlichen Antikörper wurden zum einen hergestellt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass für die Untersuchungen zumindest ein funktionsfähiger, spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Im Falle einer Verwendbarkeit beider Antikörper sollte nach Unterschieden in der Expression beider Antikörper gesucht werden. Da der N-terminale Antikörper sowohl an das vollständige pPLA-I-Protein, als auch an pPLA-I (-Exon7) spezifisch bindet, während der C-terminale Antikörper nur an das vollständige Protein binden kann, könnten so Aussagen über die Expression von pPLA-I (-Exon7) getroffen werden.

Erste Untersuchungen der Antikörper bestätigten deren Funktionsfähigkeit und Spezifität. So ergab ein Western Blot mit pPLA-I-His-Tag-Peptid (Sequenz von Exon 18) und dem C-terminalen Antikörper eine Bande spezifischer Größe. Der N-terminale Antikörper wurde mittels einer Peptid-

Säule durch die herstellende Firma aufgereinigt und so die spezifische Bindefähigkeit für das Peptid überprüft. Die entscheidende Nachweise zur spezifischen Bindungsaktivität der Antikörper im *Arabidopsis*-Gewebe erbrachten Immunolabelings von *ppla-I-1* und *ppla-I-3*. In diesen Versuchen war keine spezifische Fluoreszenz detektierbar, was den Schluss zulässt, dass die in *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen ermittelbare Fluoreszenz bei 488nm spezifisch sein muss (s. *Abb. 23*).

Der Vergleich der Expressionsmuster von Wurzelspitzen, die mit dem N-, bzw. dem C-terminalen Antikörper behandelt worden waren, ergab grundsätzlich keine Unterschiede. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Spezifität beider Antikörper, da unspezifische Bindungen abhängig von der zugrunde liegenden Peptidsequenz des zur Antikörperherstellung verwendeten Antigens sind. Diese Peptidsequenzen sind jedoch in N- und C-terminalen Antikörper grundverschieden. Demzufolge müssten die Antikörper ein unterschiedliches Expressionsmuster erzeugen, sobald nur einer von ihnen auch unspezifische Bindungsaktivitäten in *Arabidopsis*-Gewebe aufweisen würde. Auch führt dies zu der Annahme, dass pPLA-I (-Exon7) nicht in nennenswerter Weise auf Proteinebene exprimiert wird, da ansonsten eine zusätzliche Expression bei Verwendung des N-terminalen Antikörpers detektierbar sein müsste.

4.4.2 *In situ* - Expressionsstudien der pPLA-I

In allen hier durchgeführten Untersuchungen wurden jeweils *Arabidopsis*-Keimlinge des Wassilijewskia Wildtyp und des Columbia Wildtyp verwendet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Wie im Vergleich der Antikörper konnten auch in Bezug auf den Ökotyp keine Unterschiede im Expressionsmuster oder in der Expressionsstärke gefunden werden. Daher wurden alle Versuche unabhängig von verwendetem Antikörper oder Ökotyp zusammenfassend beschrieben.

Die Untersuchungen mittels Immunolabeling im Whole Mount-Verfahren ergaben die Expression von pPLA-I in der Wurzelspitze der Hauptwurzel, in der beginnenden Elongationszone und in den Pollenkörner. In Weißlicht angezogene Keimlinge zeigten dabei eine relativ starke Expression in der Wurzelspitze und eine Richtung Basis deutlich abnehmende Expression in der beginnenden Elongationszone. Keine Expression wurde in der Wurzelhaube, der physiologisch älteren Elongationszone, den Wurzelhaaren, beginnenden Seitenwurzeln und den Trichomen der Blätter gefunden (s. *Abb. 24 -27*).

4.4.3 *In vivo* - Expressionsstudien von *pPLA-I::pPLA-I-GFP*

Untersuchungen mit Reporterproteinen sind immer dann angezeigt, wenn Expressionsstudien am lebenden Objekt vorgenommen werden sollen. Im konkreten Fall sollte die mittels Immunolabeling gefundene Expression der pPLA-I und gewonnene Erkenntnisse über die Licht-gesteuerte Expression der pPLA-I bestätigt werden.

Expression fand sich in der Wurzelspitze, in der Wurzelhaube und in der beginnenden Elongationszone der Hauptwurzel, in beginnenden Seitenwurzeln und im Pollen. Dabei wurde die Expression in der beginnenden Elongationszone zunehmend schwächer und verschwand zunächst in den äußeren Zellschichten, dann auch in der Stele. In der Wurzelhaube war die Expression sehr schwach. Keine Expression konnte den Wurzelhaaren und den Trichomen der Blätter gefunden werden (s. *Abb.* 45 - 48).

4.4.4 Vergleich des gefundenen Expressionsmuster

Die Untersuchung des Expressionsmusters von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ zeigte große Ähnlichkeit zu den Ergebnissen der Immunocytochemie. Zu nennen sind hier die Expression in der Wurzelspitze und in der beginnenden Elongationsszone der Hauptwurzel, sowie im Pollen. Auch verschwand die Expression übereinstimmend in der physiologisch älteren Elongationszone und war nicht in den Trichomen detektierbar. Die Unterschiede sind in der Hauptsache die gefundene Expression in beginnenden Seitenwurzeln und die schwache Expression in der Wurzelhaube von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$

Mittels eines *pPLA-I-GUS*-Konstruktes konnten Effendi *et al.* (in Vorbereitung) die Promotor-gesteuerte Expression der pPLA-I in *Arabidopsis* zeigen. Die Untersuchungen ergaben GUS-Färbung in den Leitbündeln des Sprosses und der Petiolen, in der Stele der Hauptwurzel, an der Basis beginnender Seitenwurzeln, in der Wurzelspitze der Hauptwurzel (einschließlich der Wurzelhaube), in den Trichomen der Blätter und im Pollen (s. *Abb.* 3).

Ein Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Expressionsmuster mit der GUS-Verteilung in *Arabidopsis*-Keimlingen zeigt gute Übereinstimmungen bezüglich der Expression in der Wurzelspitze, in der Stele der beginnenden Elongationszone der Hauptwurzel, in den beginnenden Seitenwurzeln (nur in $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ gefunden) und im Pollen. Allerdings wurde keine Übereinstimmung in den Trichomen der Blätter gefunden. Auch konnte in dieser Arbeit keine

durchgängige Expression in der Stele der Hauptwurzel gefunden werden. Nicht verglichen werden konnte die Expression in Spross und den Petiolen.

Betrachtet man die Nachweismöglichkeiten von Immunocytochemie, Reporterproteinen und GUS-Konstrukten, finden sich Ansätze zur Begründung der gefundenen Unterschiede. Das Immunolabeling mit pPLA-I-spezifischen Antikörpern ergibt eine Momentaufnahme der Protein-Expression für den Zeitpunkt der vollständigen Fixierung der Keimlinge. Auch ist die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers erst ab einem Schwellenwert als spezifische Fluoreszenz von der Autofluoreszenz des Gewebes abgrenzbar. Ein weiterer, einschränkender Faktor für die Nachweismöglichkeiten der Immunocytologie ist der enzymatische Zellwandabbau nach erfolgter Fixierung. Ist dieser nicht ausreichend, etwa aufgrund zu kurzer Inkubationszeiten oder Verwendung unspezifischer Enzyme, können die Antikörper nicht bis ins Zellinnere diffundieren.

Anders verhält es sich mit der ermittelbaren GUS-Expression. Die Glucuronidase ist ein äußerst stabiles Protein (Jefferson *et al.* 1986), welches nur sehr langsam wieder abgebaut wird (Halbwertszeit etwa 50h, nicht publiziert). Dementsprechend ist das gefundene GUS-Expressionsmuster, im Unterschied zum Immunolabeling, als Anhäufung der Proteinexpression über einen längeren Zeitraum zu verstehen. Zudem ist die bläuliche Verfärbung im gebleichten Gewebe schon in geringen Mengen leicht detektierbar. Weiter tritt eine GUS-Färbung in nicht-transformierten Pflanzen nicht auf (Jefferson *et al.*, 1986), was bedeutet, dass jede gefundene GUS-Färbung spezifisch sein muss. Daher kann durch die GUS-Färbung auch eine sehr geringe Proteinexpression im Gewebe, die unter Umständen nur in einem kurzen Zeitraum stattgefunden hat, detektiert werden, während sich mittels Immunolabeling eher Veränderungen und Schwankungen der Expression darstellen lassen.

Die für die *in vivo* - Expressionsstudien verwendeten Reporterproteine mit fusioniertem GFP weisen ebenfalls eine gewisse Stabilität auf. Zwar ist die Halbwertszeit des verwendeten GFP wesentlich geringer, als es bei GUS-Konstrukten der Fall ist. Dennoch findet im Gegensatz zum Immunolabeling eine Anhäufung des Signals statt. Auch kann hier ein veränderter Transport mögliche Ursache für Unterschiede in der gefundenen Expression sein. Dieser könnte durch das angehängte GFP verändert sein.

In Bezug auf die Trichome könnte im unzureichenden Zellwandverdau der Grund für ein fehlendes Signal im Vergleich zu den GUS-Studien liegen, da die für das Immunolabeling verwendeten Enzyme zum Zellwandabbau spezifisch für die Epidermis der Wurzeln sind, jedoch nicht für die Kutikula der Trichome. Auch war die Inkubationszeit für einen vollständigen Zellwandabbau an den

Trichomen möglicherweise nicht ausreichend. Die erklärt jedoch noch nicht die fehlende Lokalisierung in den Trichomen von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$.

Die von Effendi *et al.* (in Vorbereitung) gefundene pPLA-I-GUS-Expression in den Trichomen ist möglich, jedoch nicht gesichert. Die Trichome erfüllen ihre Aufgabe als erste mechanische Barriere auf der Blattoberfläche (Glover, 1999) und spielen damit eine Rolle in der Pathogenabwehr. Yang *et al.* (2007) postulierten eine Funktion der pPLA-I in der Pathogenabwehr durch Hydrolyse polarer Lipide, die als Vorstufe für die Pathogen-induzierte Jasmonsäure-Produktion fungieren. Die beiderseits zugewiesene Rolle in der Pathogenabwehr könnte auf mögliche funktionale Zusammenhänge von pPLA-I und den Trichomen hinweisen.

Im Falle der unterschiedlichen Lokalisierung in der physiologisch älteren Elongationszone bei Immunocytochemie, $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ (jeweils keine Expression vorhanden) und GUS-Studien (Expression vorhanden) könnte eine geringe Proteinexpression die mögliche Erklärung sein. Geringe Proteinmengen könnten durch Anhäufungen in der GUS-Expression durchaus detektierbar sein, während sie im Falle von Immunocytochemie und Reporter-Proteinen unterhalb der Detektionsgrenze liegen könnten.

4.5 Zellbiologische Untersuchungen zur Lokalisierung und Expression von pPLA-I

4.5.1 *In situ* - Lokalisierung der pPLA-I auf Zellebene

Im Bereich der Wurzelspitze ist pPLA-I meist Plasmamembran-nah und cytosolisch lokalisiert. Dabei ist auch die Plasmamembran-nahe Lokalisierung grundsätzlich eine cytosolische Lokalisierung, bezieht aber eine nicht näher definierte Assoziation mit der Plasmamembran mit ein. Plasmamembran-nah ist pPLA-I insbesondere in den Zellen von Epidermis, Cortex und Endodermis detektierbar, cytosolisch dagegen hauptsächlich in der Endodermis und in der Stele. Betrachtungen auf zellulärer Ebene ergaben in Epidermis und Cortex zum Teil eine verstärkte Lokalisierung im endoplasmatische Retikulum um den Nukleus herum und auch im Zentrum des Nukleus. In der beginnenden Elongationszone findet sich ein vergleichbares Lokalisierungsmuster, jedoch nimmt die Expression in Richtung Wurzelbasis deutlich ab, bis sie vollständig verschwindet. Diese Abnahme ist zunächst in Epidermis, Cortex und Endodermis erkennbar. Im weiteren Wurzelverlauf Richtung Basis wird auch die Expression in der Stele deutlich schwächer. Plasmamembran-nah verschwindet das Signal zunächst entlang der lateralen Zellschichten. Eine Lokalisierung im

Endoplasmatischen Retikulum ist in der beginnenden Elongationszone nicht mehr zu verzeichnen. Weiter findet sich eine pPLA-I-Lokalisierung entweder im gesamten Pollenkorn oder nur in den äußeren Randbereichen des Pollens (s. *Abb. 24 -27*).

4.5.2 *In vivo* - Lokalisierung von $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ auf Zellebene

Die *in vivo* - Lokalisierung der pPLA-I auf Zellebene ist grundsätzlich der gefundenen *in situ* - Lokalisierung sehr ähnlich. In der Wurzelspitze ist sie ebenfalls cytosolisch und Plasmamembran-nah vorzufinden. Die cytosolische Lokalisierung ist in der Stele verstärkt vorzufinden. Ein deutlicher Unterschied zur Immunocytochemie ist das Auftreten von Spots im Cytoplasma der Stele. Plasmamembran-nah ist $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ vorwiegend in den äußeren Zellschichten (Epidermis, Cortex und Endodermis) lokalisierbar. Im Bereich der Stele ist keine oder eine sehr geringe Lokalisierung im Nukleus feststellbar. In den äußeren Zellschichten ist dagegen eine Lokalisierung im Nukleus und auch im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum zu verzeichnen. Aufgrund der hohen cytosolischen Lokalisierung in der Stele war es nicht möglich, die Lokalisierung in der Nähe der Plasmamembran und im Endoplasmatischen Retikulum zu bestätigen oder auszuschließen. Die Expression nimmt in Richtung Wurzelbasis deutlich ab und verschwindet dann vollständig. $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ ist zudem in den Randbereichen des Pollens lokalisiert (s. *Abb. 45 - 48*).

4.5.3 Vergleich der gefundenen Lokalisierungen der pPLA-I

Die gefundenen *in situ*-Lokalisierungsstudien durch pPLA-I-spezifische Antikörper stimmen grundsätzlich gut mit den *in vivo* - Lokalisierungsstudien überein. Leichte Unterschiede, wie das Auftreten von Spots bei der *in vivo* - Lokalisierung könnten durch das C-terminal fusionierte GFP verursacht werden. So könnten die Ankyrin-Motive des C-terminus (LRR) durch das angehängte GFP möglicherweise in ihrer Funktion gestört sein. Die Ankyrin-Motive sind an der Vermittlung spezifischer Protein-Protein-Interaktionen (Mosavi *et al.*, 2004), sowie an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt und damit an der vollständigen enzymatischen Funktion des Proteins (Balsinde und Balboa, 2005). Ein nicht vollständig funktionsfähiger C-terminus könnte damit auch Einfluss auf die Lokalisierung auf zellulärer Ebene haben.

Die unterschiedliche Ausprägung des Fluoreszenzsignals im Pollen könnte abhängig sein vom Entwicklungsstadium des gesamten Pollensacks und vom Erfolg der Fixierung. Durch die Größe

und Geschlossenheit der Pollensäcke wird möglicherweise das Vordringen der Antikörper bis zu den Pollenkörnern erschwert.

4.5.4 Interpretation der gefundenen Lokalisierungen der pPLA-I

Ein Großteil der gefundenen pPLA-I-Lokalisierung ist cytosolisch. Das war ein zu erwartendes Ergebnis, da Software-Programme eine cytosolische Lokalisierung aufgrund der vorwiegend hydrophilen Sequenz der pPLA-I vorschlagen und dies auch frühere Befunde ergaben (Holk *et al.*, 2002).

Auch die gefundene Lokalisierung in der Nähe der Plasmamembran ist nicht unerwartet. Die Sequenz der pPLA-I verfügt über eine Domäne für eine mögliche G-Protein-Bindestelle. Es ist also eine direkte Interaktion der pPLA-I mit G-Proteinen zu vermuten. Insbesondere für heterotrimeren G-Proteine ist bekannt, dass sie in der Hauptsache mit Plasmamembran-Rezeptoren assoziiert sind. Sie geben dabei Signale der Transmembranrezeptoren weiter, welche zuvor durch Interaktion mit extrazellulären Liganden aktiviert wurden. Es ist denkbar, dass insbesondere Plasmamembran-nahe pPLA-I in Interaktion mit den dort lokalisierten G-Proteinen steht. Auch ist die Interaktion von G-Proteinen mit Phospholipase A-Proteinen bereits bekannt (Roos *et al.*, 1999). Weiter sind die typischen heterotrimeren G-Proteine sowie die extra großen G-Proteine (XLG3) an der Kontrolle der Wurzelmorphogenese und an der Signalantwort auf Phytohormone, insbesondere Auxin, beteiligt (Ding *et al.*, 2007, Pandey *et al.*, 2006, Ullah *et al.*, 2002, 2003). Pandey *et al.* (2008) fanden deutliche Hinweise darauf, dass die β -Untereinheit der typischen heterotrimeren G-Proteine und XLG3 Waving und Slanting positiv regulieren. Hier könnte ein Erklärungsansatz für die gefundene veränderte Wurzelmorphologie der *ppla-I*-Knockoutmutanten auf der einen Seite und der gefundenen Plasmamembran-nahen Lokalisierung der pPLA-I auf der anderen Seite liegen.

Eine weitere Annahme für die Lokalisierung der pPLA-I an den Plasmamembranen und den Membranen des Zellkerns ist eine potentielle Regulierungsfunktion. Die pPLA-I könnte selektiv in der Plasmamembran befindliche Phospholipide hydrolysieren. Die Spaltprodukte könnten dann eine Funktion als second messenger in der Membran erfüllen (Scherer and Andre', 1989; Lee *et al.*, 1992, Scherer and Andre', 1993, Chandra *et al.*, 1996, Paul *et al.*, 1998, Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999; Roos *et al.*, 1999).

Die gefundene Lokalisierung im Pollen stimmt überein mit Daten von Holk *et al.* (2002), die bereits mittels semiquantitativer PCR festgestellt hatten, dass die mRNA-Gehalte der pPLA-I in Wurzel und Pollen in etwa identisch waren (ca. 30% der im Spross gefundenen Expressionsrate).

4.6 pPLA-I-Expression auf Protein- und RNA-Ebene und ihre Reaktionen auf Auxin und Licht

Effendi *et al.* (in Vorbereitung) konnten zeigen, dass insbesondere die *ppla-I*-Knockoutmutante *ppla-I-1* durch geänderte Reaktionen auf Auxin und Licht Unterschiede in ihrem Phänotyp aufweist. So blüht *ppla-I-1* im Kurztag früher und bildet bei Wachstum in schwachem Dauerlicht von Dunkelrot und Blau (je 1 μ E) ein signifikant längeres Hypokotyl aus. Auch wurde mittels qPCR festgestellt, dass 30min nach Applikation von 10 μ M IAA acht von dreizehn frühen Auxingenen in der *ppla-I-1* Veränderungen in der RNA-Expression aufwiesen. Weiter folgerten Effendi *et al.* (in Vorbereitung) aus diesen und weiteren Untersuchungen der *ppla-I-1*, dass Licht-gesteuerte und Auxin-gesteuerter Signalweg miteinander verknüpft sein müssten. Anlehnend an diese Ergebnisse wurde mittels der Lokalisierungsstudien unter anderem die Abhängigkeit der pPLA-I-Expression von unterschiedlichen Lichtbedingungen und veränderten Auxinkonzentrationen in den Zellen überprüft.

4.6.1 Auswirkung der Auxinkonzentration auf die pPLA-I-Expression auf Proteinebene

Die Auswirkung veränderter Auxinkonzentrationen auf die pPLA-I-Expression im Wurzelgewebe wurde immunocytologisch untersucht. Aus Zeitgründen wurde auf *in vivo* - Studien zur pPLA-I-Expression in Abhängigkeit von der Auxin-Konzentration verzichtet. Bei der Inkubation mit 1 μ M 1-NAA war ein eindeutiger Abfall des pPLA-I-Expressionslevels zu verzeichnen (s. Abb. 33). Die Expression war cytosolisch fast vollständig verschwunden und reduziert noch Plasmamembran-nah detektierbar. Eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum war nicht mehr zu verzeichnen, eine Lokalisierung im Nukleus jedoch nicht ganz auszuschließen. Dies sollte zu dem Schluss führen, dass erhöhte Auxinkonzentrationen im Gewebe zu einer Verringerung der pPLA-I-Expression oder zu einem Abbau der pPLA-I führen. Übereinstimmend mit diesen immunocytologischen Untersuchungen konnten Effendi *et al.* (in Vorbereitung) mittels qPCR eine ca. 3,5-fache Verringerung der RNA-Expressionsrate der *pPLA-I* nach dreistündiger Inkubation mit 10 μ M IAA feststellen.

Auch wurde der Einfluss von NPA auf die Expression der pPLA-I untersucht. NPA ist ein Auxin-Efflux-Inhibitor, welcher an den Auxin-Efflux-Carrier oder an einem assoziierten Protein (Davies und Rubery, 1978; Hertel *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1991) bindet und so den Auxin-Efflux hemmt.

Dies führt insgesamt zu Reduzierung des IAA-Gehaltes in der gesamten Wurzel (Reed *et al.*, 1998). Genauere Untersuchungen von Casimiro *et al.* (2001) zeigten jedoch, dass es sich tatsächlich um eine Umverteilung des IAA-Gehaltes in der Wurzel handelt, bei der es zu höheren Konzentrationen an IAA in der Wurzelspitze kommt, während die Wurzelgewebe nahe der Basis reduzierte Level an IAA aufweisen. Demnach ist von einer Erhöhung der IAA-Konzentration in der Wurzelspitze bei Applikation von 10 μ M NPA auszugehen.

Die Ermittlung der pPLA-I Expression in der Wurzelspitze nach Behandlung mit 10 μ M NPA ergab eine deutlich gesteigerte Expression und eine Lokalisierung im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums um den Nukleus herum (s. *Abb.* 34). Die Expression in diesem Bereich ist dabei in einigen Zellen noch deutlich verstärkt und übersteigt damit die bei Bestrahlung mit Blaulicht gefundenen Intensitäten am Endoplasmatischen Retikulum. Da Casimiro *et al.* (2001) feststellten, dass nach 10-tägigem Wachstum mit 10 μ M NPA der IAA-Gehalt in der Wurzelspitze von *Arabidopsis* zunimmt, findet sich hier ein Widerspruch zu der Überlegung, dass hohe IAA-Konzentrationen in den Wurzelzellen zu einer Verringerung der pPLA-I-Expression oder zu einem Abbau der pPLA-I führen. Allerdings ist ein unterschiedlicher Versuchsaufbau festzustellen (10-tägiges Wachstum auf NPA-haltigem Nährmedium anstelle der hier durchgeführten Inkubation mit NPA für 3h). Weiter zeigten die qPCR-Analysen von Effendi *et al.* (in Vorbereitung), dass die pPLA-I-Expression innerhalb von 24h nach IAA-Applikation stark schwankt. Grund hierfür könnten die vorherrschenden Lichtbedingungen und der Zeitpunkt im diurnalen Rhythmus bei Durchführung der Messungen sein. Wie in 4.6.2 dargestellt haben diese Faktoren ebenfalls großen Einfluss auf die pPLA-I-Expressionsrate.

Reed *et al.* (1998) stellten fest, dass NPA-Applikation an der unteren Hälfte der Wurzel das gravitrope Wachstum der Keimlinge reduziert. Ob diese Feststellung in Zusammenhang mit dem gefundenen pPLA-I-Lokalisierungsmuster nach NPA-Behandlung stehen könnte, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Abschließend kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Auxinkonzentration in der Zelle nach NPA-Behandlung und pPLAI-Expression gefunden werden.

4.6.2 Auswirkung von Licht auf die pPLA-I Expression und Lokalisierung

4.6.2.1 pPLA-I-Expression wird durch Blaulicht hochreguliert

Insbesondere *ppla-I-I*-Keimlinge bilden als Reaktion auf Wachstum in kontinuierlichem schwachen Licht aus nur einer Lichtfarbe (je 1 μ E rotes, dunkelrotes oder blaues Licht) im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant längeres Hypokotyl aus (Effendi *et al.*, in Vorbereitung). Aufgrund der Erkenntnis, dass die Bestrahlung mit einzelnen Lichtfarben Einfluss auf den *ppla-I*-Phänotyp haben kann, wurde das Expressionsmuster und die Expressionsstärke der pPLA-I nach 7-tägigem Wachstum in kontinuierlichem schwachen Licht der genannten Lichtfarben, sowie bei Wachstum in Dunkelheit, ermittelt.

Der Vergleich der Expressionsmuster bei Wachstum in Weißlicht, einzelnen Lichtfarben und Dunkelheit zeigt eindeutige Unterschiede. Die Anzucht der Licht-gewachsenen Keimlinge in konstanten 15 μ E ermöglicht einen Bezug der gefundenen Unterschiede auf die jeweiligen Lichtqualitäten. Dabei zeigen Anzucht in Weißlicht und Blaulicht eine relativ starke Expression entsprechend dem bereits aufgeführten Verteilungsmuster, während die Expression bei Wachstum in roten und dunkelrotem Licht, sowie in Dunkelheit schwach war und am Rande der Detektionsgrenze lag (s. *Abb. 32*).

Ein detaillierter Vergleich von Anzucht in konstanten 15 μ E Weißlicht und Blaulicht lässt eine geringfügig stärkere Expression in blauem Licht erkennen. Jedoch muss bei der Beurteilung der Expressionsstärke berücksichtigt werden, dass diese bei einem Immunolabeling nur grob abgeschätzt werden kann. Grund hierfür sind die leichten Unterschiede bei der Durchführung eines manuellen Immunolabelings, die Schwankungen in der Intensität der Fluoreszenz hervorrufen können. Daher kann eine Zu- oder Abnahme der Signalintensität mit dieser Methode nur grob abgeschätzt werden. Relative Sicherheit wurde in diesem Fall durch eine häufige Versuchsdurchführung gewonnen, bei der stets die selbe Tendenz erkennbar war.

Gleiches gilt beim Vergleich des Wachstums in rotem und dunkelrotem Licht, sowie in Dunkelheit. Bei allen drei Behandlungsarten ist die Expression sehr schwach. Jedoch zeichnen sich feine Unterschiede ab. So scheint die Expression bei Bestrahlung mit Rotlicht etwas stärker zu sein als mit dunkelrotem Licht oder bei Anzucht in Dunkelheit.

Auch gibt es Licht-abhängige Unterschiede in der subzellulären Lokalisierung. Während bei Belichtung mit blauem oder weißem Licht sowohl ein cytosolisch als auch ein Plasmamembran-nah lokalisiertes Fluoreszenzsignal feststellbar ist, bewirken rotes und dunkelrotes Licht primär eine

Plasmamembran-nahe Polarisierung. Etiolierte Keimlinge zeigen hingegen primär eine cytosolische Lokalisierung.

Die Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum ist ebenfalls abhängig von den Lichtbedingungen. So findet sie sich vorwiegend in der meristematischen Zone bei Anzucht in Weißlicht und in verstärktem Maße in blauem Licht, während sie nur in sehr geringem Maße bei der Anzucht in rotem oder dunkelrotem Licht feststellbar ist. Etiolierte Keimlinge zeigen ebenfalls keine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum.

Eine Lokalisierung innerhalb des Nukleus konnte grundsätzlich bei allen getesteten Lichtbedingungen und in Dunkelheit detektiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass diese Lokalisierung bei Wachstum in rotem und dunkelrotem Licht, sowie in Dunkelheit, verstärkt auftritt.

Die *in vivo* - Untersuchungen zur Licht-abhängigen pPLA-I-Expression ergaben, dass pPLA-I bei in Dunkelheit angezogenen $P_{pPLA-I}::pPLA-I-GFP$ - Keimlingen in den Organen und Geweben der Transformanten nicht exprimiert wird (s. Abb. 49). Setzt man die Keimlinge jedoch nach einer Dunkelphase hellem Weißlicht aus, so kommt es innerhalb von zwei Stunden zu einem starken Anstieg der Expression (s. Abb. 50).

Die Ergebnisse lassen den gesicherten Schluss zu, dass die pPLA-I-Expression Licht-gesteuert ist und dass primär der blaue Teil des Lichtspektrums für einen hohen Proteinlevel verantwortlich ist. Da rotes und dunkelrotes Licht, sowie Wachstum in Dunkelheit vergleichbar niedrige Expressionslevel erzeugen, gibt es zwei Erklärungsansätze für die Regulierung des pPLA-I-Proteinlevels. Entweder wird unter den genannten Bedingungen einfach keine Proteinexpression angeregt oder es wird ein nahezu vollständiger Abbau des Proteins induziert. Aufgrund der verwendeten einheitlichen und relativ geringen Lichtstärken von $15\mu E$ lässt sich schlussfolgern, dass die Lichtintensität im Verhältnis zur Lichtfarbe eine eher untergeordnete Rolle spielt. Die Lichtqualität zeigt sich als entscheidender Faktor der pPLA-I-Expression.

4.6.2.2 Nukleus-lokalisierte pPLA-I könnte in Zusammenhang mit Phytochrom-Funktionen stehen

Eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum war in den *in situ* - Lokalisierungsstudien immer dann zu verzeichnen, wenn der pPLA-I - Expressionslevel in der Wurzelspitze allgemein hoch war.

Um die Lokalisierung im Nukleus zu überprüfen, wurden vergleichende Färbungen mit DAPI

durchgeführt. So konnte festgestellt werden, dass die pPLA-I auch im Nukleus lokalisiert sein kann. Diese Lokalisierung ist vor allem bei insgesamt sehr schwachem Expressionslevel der pPLA-I, beispielsweise bei Dunkelwachstum, zu verzeichnen. Bei starken Expressionsleveln, wie dem Wachstum in Weißlicht, ist teilweise keine Lokalisierung im Nukleus feststellbar. Unklar ist, inwiefern ein Transport der pPLA-I in den Nukleus oder aus dem Nukleus heraus gesteuert werden könnte und welche Faktoren einen Transport begünstigen könnten. Lichtabhängiger Transport von Proteinen zwischen Nukleus und Cytoplasma ist für Phytochrome bekannt. So werden PHYA und PHYB im Rotlicht vom Cytoplasma in den Nukleus transportiert (Bae und Choi, 2008), wo sie für die meisten Phytochrom-induzierten Signalantworten als Bindungspartner für Transkriptionsfaktoren gebraucht werden (Castillon *et al.*, 2007, Jiao *et al.*, 2007, Leivar und Qail, 2011) und proteolytisch abgebaut werden (Al-Sady *et al.*, 2006, Bauer *et al.*, 2004, Nozue *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2005, 2007). Der Transfer von Phytochromen in den Nukleus hat demnach entscheidende Auswirkung auf die Aktivität der Photorezeptoren (Debrieux und Fankhauser, 2010). Aufgrund der festgestellten Parallelen in der Licht-gesteuerten Nukleuslokalisierung von pPLA-I und Phytochromen ist eine Interaktion von pPLA-I und Phytochromen nicht auszuschließen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Effendi *et al.* (in Vorbereitung) unterstützt, bei denen die *ppla-I*-Knockoutmutanten in ihrem Phänotyp einen schwachen Defekt in der PHYB-Signalantwort aufweisen. Zur Aufklärung einer möglichen Verbindung von Phytochrom und pPLA-I könnten weitere Vergleiche der Licht-Phänotypen von *ppla-I*-Knockoutmutanten und *phy*-Knockoutmutanten hilfreich sein. Aus Zeitgründen wurden solche Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Eine weitere Hypothese über die Funktion der pPLA-I-Lokalisierung im Nukleus und um den Nukleus herum bieten Immunolabelings mit zwei *abpI*-Insertionsmutanten und einer *ABPI*-Überexpressionsmutante unter Verwendung pPLA-I-spezifischer Antikörper. In diesen Mutanten ist der Auxinsignalweg jeweils verändert. Das Expressionsmuster nach Immunolabeling ist dem Expressionsmuster in Wildtyppflanzen sehr ähnlich. Während jedoch bei Wildtyppflanzen in der meristematischen Zone der Wurzelspitze eine deutliche Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Nukleus herum und im Nukleus zu verzeichnen ist, finden sich diese Lokalisierungen in den *ABPI*-Mutanten nur sehr selten (s. *Abb.* 35 und 36). Dieses Ergebnis lässt erneut die Relevanz der Kernlokalisierung und Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum um den Kern herum erkennen und deutet erneut auf die Beteiligung der pPLA-I am Auxin-Signalweg hin. Auch wird erneut die Hypothese von Effendi *et al.* (in Vorbereitung) unterstützt, dass *ABPI* und pPLA-I den selben Signalweg teilen.

4.6.2.3 RNA-Expression der *pPLA-I* wird durch Licht hochreguliert

Die mittels Immunolabeling und GFP-Reporterproteinen gefundenen Protein-Expressionsmuster unter definierten Wachstumsbedingungen sollten auch auf mRNA-Ebene erkennbar sein. Um die auf Proteinebene gefundenen Ergebnisse bei Behandlung mit Licht zu untermauern, wurden daher vergleichbare Versuche mittels qPCR ausgewertet.

Holk *et al.* (2002) ermittelten die relative mRNA-Expressionsrate der *pPLA-I* in den verschiedenen Organen von *Arabidopsis*: Blüten, Blätter, Hypokotyl und Wurzel. Sie stellten fest, dass die höchsten Raten im Spross zu finden waren. Nur etwa 30% der im Spross gefundenen *pPLA-I* mRNA-Menge fand sich in der Blüte oder in den Wurzeln, in den Blättern waren es sogar nur 10%. Diese Verteilung der *pPLA-I*-mRNA im *Arabidopsis*-Keimling ist bei der Bewertung der mittels qPCR erhaltenen Ergebnisse von großer Bedeutung, da hier jeweils komplette Keimlinge für die RNA-Extraktion verwendet wurden. So würden sich Schwankungen in der *pPLA-I*-Expressionsrate, die nur ein bestimmtes Organ betreffen, auch nur in verringertem Maße anhand der Messung der gesamt-Expressionsrate der Keimlinge bemerkbar machen. Weiter können anhand von qPCR-Analysen keine Aussagen über die Expressionsrate in den Blüten getroffen werden, da die Keimlinge zum Zeitpunkt der RNA-Expression nur wenige Tage alt waren und daher noch nicht blühten.

Die Expressionsstudien der *pPLA-I* mittels konfokaler Lasermikroskopie beziehen sich fast ausschließlich auf die Wurzel. Daher können Änderungen in der Expression der *pPLA-I*, die mittels konfokaler Lasermikroskopie festgestellt wurden, nur bedingt mittels qPCR überprüft werden. Auf die Durchführung von qPCR's unter selektiver Verwendung von Wurzeln oder Wurzelspitzen wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Mittels qPCR wurde aufgrund der neuen Erkenntnisse über die Protein-Expression der *pPLA-I* eine Analyse der mRNA-Expression bei Wechsel von Licht- und Dunkelphasen durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die mRNA-Expression innerhalb von 15min nach Wechsel zum Licht signifikant Anstieg, während sie 15min nach Ende einer Lichtphase leicht und nach 1-2h auf einen Wert von 60% abfiel. Die gefundenen Unterschiede waren relativ gering, aber eindeutig (s. *Abb.* 19). Somit ist im Licht-Dunkel-Rhythmus die mRNA-Expression durch Licht hochreguliert und im Dunkeln reprimiert.

Häufig werden Gene durch einen Signalreiz nicht nur in ihrer Proteinaktivität reguliert, sondern gleichzeitig auf Transkriptebene. Dies kann in Bezug auf die Wirkung von Licht auf die *pPLA-I*-Expression ebenfalls angenommen werden. Der Proteinlevel der *pPLA-I* nimmt in der Wurzelspitze

bei Dunkelheit cytosolisch ab. Anlehnend an die Erkenntnisse zu den Phytochromen kann vermutet werden, dass die Lokalisierung der pPLA-I im Nukleus in Zusammenhang mit der pPLA-I-Aktivität steht. Gleichzeitig kommt es zur Repression des RNA-Levels im Keimling. Somit ergibt sich ein schlüssiges Gesamtbild bezüglich der Wirkung von Licht auf die pPLA-I-Expression

4.7 Wurzelbewegungen von *ppla-I-1* und *ppla-I-3*

Der *Arabidopsis*-Wildtyp bildet auf 45° gekippten harten Agarplatten Waves als normale Wachstumsform aus. Diese Wachstumsbewegungen werden durch Circumnutation, Gravitropismus und negativen Thigmotropismus gesteuert (Simmons *et al.* 1995a, Simmons *et al.* 1995b, Migliaccio und Piconese, 2001, Sedbrook und Kaloriti, 2008, Migliaccio *et al.* 2009). Dem entgegen bildet *ppla-I-1* vermehrt Coils aus (s. Abb. 6). Dieser Defekt bietet einen Hinweis auf Schäden im Gravitropismus und negativen Thigmotropismus (Simmons *et al.* 1995a, Mullen *et al.* 1998, Ferrari *et al.*, 2000). Während der Gravitropismus ein Wachstum zum Erdmittelpunkt steuert, bewirkt der negative Thigmotropismus bei der Ausbildung von Waves den Richtungswechsel der Wurzel nach Kontakt mit der Agaroberfläche. Bleibt dieser Richtungswechsel durch einen Defekt des Gravitropismus und des Thigmotropismus aus, bildet sich ein Coil. Nach dieser allgemein anerkannten Hypothese wird die Circumnutation zum entscheidenden Faktor für Wachstumbewegungen. Weiter könnte man annehmen, dass durch diese Verminderung des gravitropen Wachstums auch die Penetration der Wurzel in den Agar erschwert wird und somit die Penetrationsrate in Gravitropismus-geschädigten Mutanten vermindert wird.

In dieser Arbeit konnte ein gegenteiliger Effekt festgestellt werden. Die Wurzeln von *ppla-I-1* und *ppla-I-3* können grundsätzlich besser in das Nährmedium eindringen, als die Wurzeln korrespondierender Wildtyppflanzen (s. Abb. 56). Hieraus lässt sich schließen, dass der Defekt der Mutanten einen Effekt auf die Morphologie der Wurzel hat, der zu einer verbesserten Penetration führt. Ein deutlicher morphologischer Unterschied in *ppla-I-1* ist die vermehrte Coil-Bildung (s. Abb. 58). Da dies in *ppla-I-3* nicht zu beobachten ist, muss zudem ein anderer Faktor Einfluss haben. Dies könnte der Coil-Durchmesser sein. Während die Anzahl der Coils offenbar nicht durch steigende Agarkonzentrationen (also zunehmende Härte des Agars) beeinflusst wird, existiert ein Zusammenhang zum Durchmesser der Coils. Mit steigender Agarhärte sinkt der Durchmesser der Coils (s. Abb. 59). Demnach könnten die Unterschiede in der Penetrationsrate beim Vergleich der *ppla-I*-Knockoutmutanten mit den korrespondierenden Wildtypen sowohl durch eine steigende

Anzahl Coils als auch durch einen verringerten Coil-Durchmesser verursacht werden, wobei die Gewichtung beider Effekte in *ppla-I-1* und *ppla-I-3* unterschiedlich ist. Möglicherweise hat die Verringerung des Coil-Durchmessers statische Effekte auf die Wurzel, so dass diese mehr Stabilität erhält und so auch in härtere Oberflächen eindringen kann. Auch könnte eine Verringerung des negativen Thigmotropismus, der die Wurzel über ein Hindernis führt (Massa und Gilroy, 2003) in den Knockoutmutanten die Bewegung nach vorwärts verstärken.

4.8 WAICO

4.8.1 Stellenwert der erhaltenen Daten aus WAICO

Grundsätzlich ist zu den aus den WAICO-Experimenten erhaltenen Daten festzustellen, dass diese teilweise nicht die methodischen Anforderungen gesicherten wissenschaftlichen Arbeitens erfüllen können. So konnte in keiner Analyse eine dreifache biologische Wiederholung durchgeführt werden. Bei der Durchführung der Experimente passierten Fehler. So wurde der Filterstreifen einer Box von der falschen Seite appliziert, wodurch ein Teil des pflanzlichen Gewebes bei den ersten fotografischen Auswertungen verdeckt wurde. Weiter gab es technische Defekte. So waren in WAICO1 die Scheiben aller Boxen durch zu hohe Luftfeuchtigkeit beschlagen, so dass anhand der Fotos der Astronauten nach 12 Tagen zunächst keine adäquaten Vermessungen der Keimlinge vorgenommen werden konnten. Weiter verhinderte eine verklemmte Zentrifuge die Beendigung des Wachstumsexperimentes, so dass ein weiteres Wachstum in Schwerelosigkeit bis zum Rücktransport auf die Erde stattfand. Diese Einschränkungen im wissenschaftlichen Arbeiten mussten akzeptiert werden. Auch wurden die Ergebnisse mit Hinweis auf die jeweiligen Einschränkungen präsentiert.

Eine Alternative in der erdbegleitenden Erforschung des Wachstums in Mikrogravitation ist derzeit die Random Positioning Machine (RPM). Mittels RPM ermittelte Daten ergeben sehr ähnliche Resultat im Vergleich zum Wachstum in Mikrogravitation (Kraft *et al.*, 2000, van Loon, 2007). Dennoch lassen sich vollständig zuverlässige Aussagen über das Wachstum von Pflanzen in Mikrogravitation nur durch Projekte wie WAICO treffen, bei denen eine reale Verminderung der Schwerkraft anstelle von simulierten Bedingungen vorliegt.

4.8.2 WAICO 1

4.8.2.1 Einfluss von Schwerelosigkeit auf den PHYB-Signalweg im Wildtyp und in *ppla-I-1*

Der Vergleich der Wildtyppflanzen untereinander zeigt, dass die unter μg -Bedingungen gewachsenen Keimlinge im Gegensatz zu Wachstum unter 1g-Bedingungen wesentlich kleinere Blattflächen ausbildeten. Bei Hypokotyl- und Petiolenlänge lassen sich hingegen keine Unterschiede feststellen (s. *Abb. 53*).

Die Betrachtung des Keimlingswachstums bei der Mutante zeigt, dass die Entwicklung unter μg -Bedingungen zur Ausbildung längerer Hypokotyle und längerer Petiolen im Vergleich zum Wachstum unter 1g-Bedingungen führte, während in Bezug auf die Blattfläche keine eindeutigen Unterschiede zu verzeichnen sind.

Diese Differenzierungen in μg zeigen Ähnlichkeiten zur Schattenvermeidungsreaktion, wie sie auch bei PHYB-Mutanten beobachtet werden können (Reed *et al.*, 1993). Der geschilderte Phänotyp (längeres Hypokotyl und längere Petiolen oder kleinere Blattflächen) ähnelt dem Phänotyp bei Vorliegen eines SA-Syndroms. SAS tritt auf, wenn Keimlinge in Licht mit einem niedrigen R:FR Quotienten angezogen werden. In den Wachstumskontainern herrschten Schwachlicht-Bedingungen durch Verstreubungen und eine dicke Plexiglasscheibe, die die Lichtintensität deutlich herabsetzten. Es ist daher möglich, dass die in den Boxen vorherrschenden Lichtbedingungen SAS auslösen. Die Resultate machen deutlich, dass das Wachstum in Mikrogravitation bei *ppla-I-1*-Keimlingen einen wesentlich stärkeren Effekt auf die Morphologie hat, als beim Wildtyp. PHYB ist der hauptsächliche Photorezeptor für die Induktion von SAS-Phänotypen (Robson *et al.*, 1993). Daher lässt sich vermuten, dass *ppla-I-1* auch im PHYB - Signalweg gestört ist und dementsprechend pPLA-I für die korrekte Ausführung des PHYB - Signalweges notwendig ist. Der Defekt wird unter μg -Bedingungen möglicherweise noch verstärkt und tritt dadurch morphologisch in Erscheinung. Steindler *et al.* (1999) konnten zeigen, dass beim SAS der Auxintransport verändert ist. Dieser veränderte Auxintransport wird wiederum durch PIN3 gesteuert (Keuskamp *et al.*, 2010b). Somit bietet sich hier über die Verbindung mit PHYB eine mögliche Erklärung für die Beteiligung der pPLA-I am Auxinsignalweg.

Der SAS-Phänotyp kann auch durch Bestrahlung mit blauem Licht simuliert werden (Keller *et al.*, 2011, Keuskamp *et al.*, 2011). Da die Signalantwort bei Blaulicht-Bestrahlung durch den Photorezeptor CRY1 gesteuert wird, ist auch ein Einfluss von pPLA-I auf den CRY1-Signalweg nicht auszuschließen. Für eine Unterstützung dieser Annahme fehlen jedoch Informationen über die

tatsächlichen Lichtverhältnisse in den Wachstumsboxen.

Die Beteiligung der pPLA-I am PHYB oder CRY1- Signalweg könnte durch Vergleich der Licht-Phänotypen von *ppla-I*-Knockoutmutanten, sowie *phyB*- und *cry1*-Knockoutmutanten genauer ermittelt werden. Solche Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen jedoch nicht durchgeführt.

4.8.2.2 Vermehrtes Coiling in Mikrogravitation erfolgt unabhängig von der Torsion

Ein Ziel von WAICO war die Feststellung der Beteiligung der pPLA-I an der Coil-Bildung in Schwerelosigkeit. Die Auswertung der in μg gewachsenen Keimlinge (A-Boxen) ergab deutliche Unterschiede in den Wurzelbewegungen und in der Ausbildung von Coils zwischen Wildtyp und Mutante. So bildete die Mutante vermehrt Coils aus. Diese waren im Durchmesser kleiner als die des Wildtyps und wiesen einen geringeren Torsionsgrad der Oberflächenzellen auf (s. Abb. 55). Die durchschnittlichen Längen von Haupt- und Seitenwurzeln, sowie die durchschnittliche Anzahl an Seitenwurzeln zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Die Anzahl an Seitenwurzeln war bei der Mutante lediglich geringfügig erhöht.

Zwar fehlt der direkte Vergleich zum Wachstum von Mutante und Wildtyp in 1g, da die B-Boxen nicht ausgewertet werden konnten. Dennoch lassen sich aufgrund der erhaltenen Daten wertvolle Aussagen treffen. So sind eine vermehrte Ausbildung von Coils und ein kleinerer Durchmesser der Coils bei der Mutante nach Wachstum in 1g bei Erdexperimenten ebenfalls zu verzeichnen. Diese morphologischen Unterschiede konnten in Studien durch Effendi *et al.* (in Vorbereitung), sowie durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen festgestellt werden. Zwar lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob sich die Unterschiede zwischen *Wassilijewskia* Wildtyp und *ppla-I-1* durch Wachstum in μg eher angleichen oder noch vergrößern, die Tendenz ist jedoch in 1g und μg die gleiche. Es ist festzustellen, dass die im Vorfeld der WAICO-Versuche aufgestellte Hypothese, dass Coiling in Mikrogravitation vermehrt auftritt, zutreffend ist. Sie beruht auf der Feststellung, dass *Arabidopsis*-Mutanten mit einem Defekt in der Schwerkraftekennung vermehrt Coils ausbilden (Mullen *et al.* 1998, Ferrari *et al.*, 2000). In Mikrogravitation in der Schwerkraftreiz fast nicht vorhanden, was den Coiling-Effekt in der Gravitropismus-Mutante deutlich verstärkt.

Interessanterweise bildete *ppla-I-1* in μg kleinere Coils und zudem eine geringere Torsion aus, als der Wildtyp. Dieses Verhalten widerspricht der Hypothese von Migliaccio und Piconese (2001), die in der Torsion einen Ausgleich der konformativen Spannungen sehen. Dies würde bedeuten, dass bei kleiner werdendem Durchmesser der Grad an Torsion zunehmen müsste. Daher kann diese

Hypothese, zumindest für das Wachstum der *ppla-I-1* in μg , widerlegt werden. Auch können Coils aufgrund dieser Feststellung nicht die Folge von Torsion sein oder umgekehrt.

In Bezug auf die Längen von Haupt- und Seitenwurzeln und die Anzahl gebildeter Seitenwurzeln wurden keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante gefunden. Diese weisen darauf hin, dass weder das Wachstum in μg -Bedingungen noch die Mutation in *ppla-I-1* einen eindeutigen Effekt auf diese Parameter hat.

4.8.3 WAICO 2

4.8.3.1 pPLA-I steuert Schwerkraft-abhängige PIN-Lokalisierung

Begründung für die Durchführung des Immunolabelings unter μg -Bedingungen gewachsener Keimlinge war die Hypothese, dass die Lokalisierung von Proteinen, die an der gravitropen Reaktion der Wurzel beteiligt sind, durch Wachstum in Mikrogravitation verändert wird. Untersucht wurde in dieser Versuchsreihe die Lokalisierung der PIN-Proteine PIN1, PIN2, und PIN4. Alle genannten Proteine können ihre Lokalisierung grundsätzlich verändern und haben zentrale Funktionen im Auxintransport (Petrasek *et al.*, 2006, Wisniewska *et al.*, 2006). Für alle untersuchten Proteine konnte eine eindeutige Veränderung der Lokalisierung in Schwerelosigkeit gezeigt werden.

Die PIN-Proteine befinden sich in einem konstitutiven zyklischen Transport zwischen der Plasmamembran und den Endosomen, der über Vesikel funktioniert (Geldner *et al.*, 2001). Unter 1g-Bedingungen waren die PIN-Proteine fast ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert. Bei Wachstum in μg konnte für PIN2 keine und für PIN1 und PIN4 nur noch eine minimale Lokalisierung in der Plasmamembran gefunden werden. Dies zeigt, dass das Endocytose-Exocytose-Gleichgewicht der PIN-Proteine in *ppla-I-1* in Mikrogravitation gestört war. pPLA-I ist also notwendig für die richtige Schwerkraft-abhängige PIN-Lokalisierung. Weiter ist anzunehmen, dass die Verschiebung des Gleichgewichtes der Auxin-Efflux-Transporter einen Einfluss auf die vorherrschende Auxinkonzentration in den Zellen der Wurzelspitze hat. So spielt PIN2 eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Gravitropismus, indem es die Umverteilung von Auxin aus der Stele in die Elongationszone steuert (Müller *et al.*, 1998). Eine Umverteilung von Auxin könnte ursächlich für die gefundenen morphologischen Unterschiede der *ppla-I-1* in Vergleich zum Wildtyp in Mikrogravitation (vermehrtes Coiling, kleinere Coils, verminderte Torsion) sein. In Bezug auf den Coiling-Phänotyp könnten PIN2 und PIN3 bedeutende Proteine sein (Friml *et al.*,

2003, Robert und Offringa, 2008, Kleine-Vehn und Friml, 2008). Weiter könnte die geringere Präsenz der PIN-Proteine an der Plasmamembran in Mikrogravitation als Verringerung des Auxin-Efflux interpretiert werden (Paciorek *et al.*, 2005). Wie genau sich die Auxinkonzentration in den Wurzelzellen verändert haben könnte, lässt sich durch die hier vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht klären.

4.8.3.2 Anordnung der Mikrotubuli ist in Mikrogravitation gestört

In einem weiteren Versuch wurden die Wurzeln von in Mikrogravitation gewachsenen *Wassilijewskia* Wildtyp-Keimlingen auf die Lokalisierung der Mikrotubuli untersucht. Die Immunocytochemie mit α -Tubulin-spezifischen Antikörpern ergab eine veränderte Strukturierung der Mikrotubuli bei Wachstum in μg im Vergleich zum Wachstum in 1g. Normalerweise sind die Mikrotubuli sehr einheitlich strukturiert und transvers zur Wachstumsrichtung angeordnet (Lloyd *et al.*, 2008, Sedbrook und Kaloriti, 2008, Abe *et al.*, 2004). Die in Mikrogravitation gewachsenen Mikrotubuli sind dagegen weniger einheitlich (parallel) angeordnet und weisen eine deutliche Fragmentierung auf. Solche Strukturierungen der Mikrotubuli wurden bereits in *lefty*-Mutanten gefunden. Diese weisen einen Defekt in der α -Tubulin-Synthese auf, was Auswirkungen auf die Zellmorphogenese hat (Abe *et al.*, 2004). Denkbar wäre, dass in den in μg gewachsenen Wildtyppflanzen eine ursächlich durch Mikrotubuli-Defekte hervorgerufene veränderte Zellmorphogenese vorliegt, die zu einer unterschiedlichen Wurzelmorphologie der in μg gewachsenen Keimlinge führen könnte.

Für die Organisation der Mikrotubuli mitverantwortlich sind die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP's). Sie interagieren mit den Mikrotubuli und regulieren so die dynamischen Prozesse von Polymerisierung und Depolymerisierung zur Neuordnung der Mikrotubuli während des Zellwachstums und Elongationsprozessen der Wurzel (Sedbrook und Kaloriti, 2008). Die geschilderte unorganisierte Mikrotubuli-Anordnung könnte auch mit einer Fehlfunktion der MAP's in Zusammenhang stehen.

Zusammengenommen verhelfen die WAICO-Studien zu einem besseren Verständnis des Gravitropismus der *Arabidopsis*-Wurzel und festigen die bisherigen Annahmen über die Beteiligung der PIN-Proteine am Gravitropismus der pPLA-I. Weiter konnte das Wissen über das Zusammenspiel von Circumnutation, Gravitropismus und Thigmotropismus bei der Wurzelmorphologie erweitert werden und frühere Hypothesen über das Auftreten von Torsion widerlegt werden.

5. Literatur

- Abe, T., Thitamadee, S., Hashimoto, T. (2004) Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45(2):211-220
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Cashmore, A. R. (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell*, 10, 197–208
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E., Quail, P. H. (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 23:439–46.
- Aukerman, M. J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M., Sharrock, R.A. (1997) A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* 9, 1317-1326.
- Bae, G., Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* 59:281–311.
- Baillaud, L., (1962) Les mouvements d'exploration et d'enroulement des plantes volubiles . In: Buenning E. ed. *Encyclopedia of Plant Physiology, Physiology of Movements*, Springer ; 17:637-715.
- Ballaré, C. L. (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci.* 4, 97–102.
- Ballaré, C. L. (2009) Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant Cell Environ.* 32, 713–725.
- Balsinde, J., Balboa, M. A. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 17, 1052–1062.
- Baluska, F., Hasenstein, K. H. (1997) Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. *Planta* 203:S69–S78.
- Bartels, S., Anderson, J. C., Besteiro, M. A. G., Carreri, A., Hirt, H., Buchala, A., Métraux, J. P., Peck, S. C., Ulm, R. (2009) Map Kinase Phosphatase1 and Protein Tyrosine Phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2884–2897.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T. (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant*

Cell 16:1433–45.

- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III* 316, 1194-1199.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B., Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism; *Science*, Vol. 273
- Blancaflor, E.B., Fasano, J. M., Gilroy, S. (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116, 213–222.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Buer, C.S., Masle, J., Wasteneys, G.O. (2000) Growth conditions modulate root-wave phenotypes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 41, 1164-1170.
- Juniper, B. E., Gorves, S., Landau-Schachar, B., Audus, L. J. (1966) Root cap and the perception of gravity. *Nature*, 209, 93–94.
- Karplus, P. A., Schulz, G. E. (1985) Bulk hydrophobic scale, *Naturwissenschaften* 72, 212
- Casal, J. J. (2000) Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants, *Photochemistry and Photobiology.* 71(1): 1–11.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graam, N., Inze, D., Sandberg, G., Caero, P. J., Bennett, M. (2001) Auxin Transport Promotes *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant Cell* Vol. 13, 843-852.
- Castillon, A., Shen, H., Huq, E. (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci.* 12:514–21.
- Chandra, S., Heinsteins P. F., Low, P. S. (1996) Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol* 110: 979–986
- Correll, M. J., Kiss, J. Z. (2005) The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol.* 46, 317-323.
- Davies, P. J., Rubery, P. H. (1978) Components of auxin transport in stem segments of *Pisum sativum*. *Planta.* 1425(1):211–219.
- Debrieux, D., Fankhauser, C. (2010) Light-induced degradation of phyA is promoted by transfer of the photoreceptor into the nucleus *Plant Mol Biol.* 73:687–695

- Devlin, P. F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R. A., Whitlam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* 119, 909-915.
- Ding, L., Pandey, S., Jones, A. M. (2007) *Arabidopsis* extra large proteins (XLGs) regulate root morphogenesis. *Plant J.* 53, 248-263
- Dohrmann, U., Hertel, R., Kowalik, H. (1978) Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140, 97–106
- Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U., Scherer, G.F.E. (2011) The heterozygous *abp1/ABP1* insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *Plant J.* 65, 282-294.
- Effendi, Y., Scherer, G.F.E. (2011) Auxin Binding-Protein1 (ABP1), a receptor to regulate auxin transport and early auxin genes in an interlocking system with PIN proteins and the receptor TIR1. *Plant Signal Behav.* 6, 1101-1103.
- Effendi, Y., Radatz, K., Rietz, S., Labusch, C., Wimalasekera, R., Zeidler, M., Scherer, G.F.E. (in Vorbereitung) *Arabidopsis* Phospholipase A pPLA-I is Involved in Auxin-Induced Gene Regulation, Tropisms, and Phytochrome-Dependent Light Responses
- Ephritikhine, G., Barbier-Brygoo, H., Muller, J.-F., Guern, J. (1987) Auxin Effect on the Transmembrane Potential Difference of Wild-Type and Mutant Tobacco Protoplasts Exhibiting a Differential Sensitivity to Auxin. *Plant Physiol.* 83, 801-804
- Ferrari, S., Piconese, S., Tronelli, G., Migliaccio, F. (2000), A new *Arabidopsis thaliana* root gravitropism and chirality mutant, *Plant Science* 158 , 77–85
- Fankhauser, C., Staiger, D. (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, 216, 1–16.
- Franklin, K.A. (2008) Shade avoidance. *New Phytol.* 179, 930–944.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., Palme, K. (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809
- Friml, J. (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 7-12.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhoff, Y.-D., Jürgens, G., Palme, K. (2001) Polar auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425–428.
- Glover, B. J. (1999) Differentiation in plant epidermal cells. *J. Exp. Bot.*, 347:497 - 505
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, 279, 1360–1363.
- Hertel, R., Thomson, K.-St., Russo, V. E. A. (1972) In vitro auxin binding to particulate cell

- fractions from corn coleoptiles. *Planta* 107, 325–340
- Hertel, R. (1983) The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. *Z. Pflanzenphysiol.* 1125(1):53–67
- Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Paul, R. U., Quader, H., Scherer, G.F.E. (2002) Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol.* 130, 90-101.
- Jaillais, Y., Chory, J. (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 642–645.
- Janin, J. (1979) accessibility scale, *Nature (London)* 277, 491
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387–405.
- Jiao, Y., Lau, O. S., Deng, X. W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet.* 8:217–30.
- Johnsson A. (1979) Circumnutation. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, n.s. Physiology of Movements*, ed. Springer 7:627-46.
- Karimi, M., Depicker, A., Hilson, P. (2007) Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol.* 145, 1144–1154.
- Keller, M., Jaillais, Y., Pedmale, U. V., Moreno, J. E., Chory, J., Ballare, C. L. (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades. *The Plant Journal.* 67, 195–207
- Keuskamp, D. H., Pollmann, S., Voeselek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M., Pierik, R. (2010b) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107, 22740–22744.
- Keuskamp, D. H., Sasidharan, R., Vos, I., Peeters, A. J. M., Voeselek, L. A. C. J., Pierik, R. (2011) Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 67, 208–217
- Kleine-Vehn, J., Friml, J. (2008) Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 24, 447-473.
- Konings, H. (1968) The significance of the root cap for geotropism. *Acta Bot. Neerl.* 17, 203–211.
- Kraft, T. F. B., van Loon, J. J. W. A., Kiss, J. Z. (2009) Plastid position in *Arabidopsis columella* cells is similar in microgravity and on a random-position machine. *Planta* 211, 415–422
- Kuznetsov, O. A., Hasenstein, K. H. (1996) Intracellular magnetophoresis of amyloplasts and induction of root curvature. *Planta* 198:8794

- Lee, S. S., Kawakita, K., Tsuge, T., Doke, N. (1992) Stimulation of phospholipase A2 in strawberry cells treated with AF-toxin 1 produced by *Alternaria alternata* strawberry phenotype. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 283–294
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A. (2008a) Multiple phytochromeinteracting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 2008a;18:1815–23.
- Lin, C., Ahmand, M., Cashmore, A. R. (1996) *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. Vol. 10, Issue 5, pages 893–902
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A. R. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2686–2690
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Loon, van J. J. W. A (2007) Some history and use of the Random Positioning Machine, RPM, in gravity related research *Adv Space Res*, 39:1161-1165.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P., Fink, G. R. (1998). EIR1, a rootspecific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 12, 2175-2187.
- Manzano, A. I., Matia, I., Gonzalez-Camacho, F., Cestero-Diaz, E., Vann Loon, J. J. W. A., Kijkstra, C., Larkin, O., Anthony, P., Davey, M. R., Marco, R. Medina, F. J. (2009) Germination of *Arabidopsis* seed in space and in simulated micro gravity: alterations in root cell growth and proliferation; *Microgravity Sci. Technol.* 21, 293-207
- Martinez-Garcia, J. F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemi, M., Bou-Torrent, J., Jean-Claude, K., Michel, D. (2010) Regulatory Components of Shade Avoidance Syndrome. *Advances in Botanical Research*. London: Academic Press, pp. 65–116.
- Massa, G. D., Gilroy, S. (2003) Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana* *The Plant Journal*. 33, 435–445
- Mathews, S., Lavin, M., Sharrock, R.A. (1995) Evolution of the phytochrome gene family and its utility for phylogenetic analysis of angiosperms. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82, 296-321.
- Mathews, S., Sharrock, R. A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ* 20: 666–71.

- Michael, T. P., Breton, G., Hazen, S. P., Priest, H., Mockler, T. C., Kay, S. A., Chory, J. (2008) A Morning-Specific Phytohormone Gene Expression Program underlying Rhythmic Plant Growth. Volume 6 Issue 9, e225
- Migliaccio, F., Piconese, S., Tronelli, G. (2000) The right-handed slanting of *Arabidopsis thaliana* roots is due to the combined effects of positive gravitropism, circumnutation and thigmotropism. *J Grav Physiol* 7:1-6.
- Migliaccio, F., Piconese, S. (2001) Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci.* 6, 561-565.
- Migliaccio, F., Fortunati, A., Tassone, P. (2009) *Arabidopsis* root growth movements and their symmetry. *Plant Signaling & Behavior* 4:3, 183-190
- Mirza J. (1987) The effect of light and gravity on the horizontal curvature of roots of gravitropic and agravitropic *Arabidopsis thaliana* *Plant Physiol* 83:118-20.
- Mita, S., Suzuki-Fujii, K., Nakamura, K. (1995) Sugar-inducible expression of a gene for β -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 107, 895 -904.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., Peng, Z.-Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition; *Protein Science*, 13:1435–1448
- Mullen, J. L., Turk, E., Johnson, K., Wolverton, C., Ishikawa, H., Simmons, C., Söll, D., Evans, M. L. (1998) Root-growth behavior of the *Arabidopsis* mutant *rgr1*. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. *Plant Physiol.* 118, 1139-1345.
- Morelli, G., Ruberti, I. (2000) Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiol.* 122, 621–626
- Morris D. A., Rubery P. H., Jarman J., Sabater M. (1991) Effects of inhibitors of protein synthesis on trans-membrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. hypocotyl segments. *J. Exp. Bot.* 425(1):773–783.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennet, M., Wismann, E., Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *The EMBO Journal* Vol. 17 No.23 pp.6903-6911
- Napier, R. M., David, K. M., Perrot-Rechenmann, C. (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 49, 339–348
- Narvaez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C. A. (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11: 2249–2260

- Nesterenko M. V., Tilley M., Upton S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 28:239-242.
- Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L. (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448:358–61.
- Okada, K., Shimura, Y. (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250, 274-6.
- Okada, K., Shimura, Y., (1995) Modulation of root growth by physical stimuli. Cold spring harbour laboratory press, pp 665 - 684.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J. Stierhof, Y.-D., Kleine-Vehn, J., Morris, D. A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., Friml, J. (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435, 1251-1256.
- Pandey, S., Chen, J. G., Jones, A. M., Assmann, S. M. (2006) G protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol.* 141, 243-256
- Pandey, S., Monshausen, G. B., Ding, L., Assmann, S. M. (2008) Regulation of root-wave response by extra large and conventional G proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55(2):311-22
- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W. I. (2004) Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol* 45: 968–75.
- Parker, J. M. R, Guo, D., Hodges, R. S. (1986) Hydrophilicity scale, *Biochemistry* 25, 5424-5432
- Paul, R., Holk, A., Scherer G. F. E. (1998). Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J*, 16:601-611.
- Paul, R. (1999) Untersuchungen zur Funktion von Phospholipase A2 und Phospholipase C im Signaltransduktionsweg von Auxin und Pilzelicitor in Petersiliezellkulturen. PhD thesis, University of Hannover, Germany
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes M., Covanova, M. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312: 914–918

- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Ac. Res.* 30, e36.
- Poppe, C., Hangarter, R. P., Sharrock, R. A., Nagy, F., Schäfer, E. (1996) The light-induced reduction of the gravitropic growth-orientation of seedlings of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. is a photomorphogenic response mediated synergistically by the far-red-absorbing forms of phytochromes A and B. *Planta* 199, 511-514.
- Raven, J. A. (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* 74: 163–172
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., Chory, J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5:147–57.
- Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G. K. (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118:1369-1378
- Rietz, S., Dermendjiev, G., Oppermann, E., Tafesse, F.G., Effendi, Y., Holk, A., Parker, J.E., Teige, M., Scherer, G.F.E. (2010) Roles of *Arabidopsis* patatin-related phospholipases A in root development related to auxin response and phosphate deficiency. *Mol. Plant* 3, 524-538.
- Robert, H.S., Offringa, R. (2008) Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 495-502.
- Robson, P. R. H., Whitelam, C. C., Smith, H. (1993) Selected Components of the Shade-Avoidance Syndrome Are Displayed in a Normal Manner in Mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* Deficient in Phytochrome B. *Plant Physiol.* 02: 1179-1184
- Roos, W., Dordschbal, B., Steighardt, J., Hieke, M., Weiss, D., Saalbach, G. (1999) A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochim Biophys Acta* 1448:390–402.
- Roy, S. W., Irimia, M. (2008) Minireview *Genome Biology* 2008, 9:208
- Rubery, P. H., Shelldrake, A. R. (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118, 101–121
- Ryu, S.B. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci.* 9: 229–235
- Sack, F. D. (1991) Plant gravity sensing. *International Review of Cytology* 127:193-252.
- Sack, F. D. (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta*, 203, S63–S68.
- Scherer, G. F. E., André, B. (1989) A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates

- Scherer, G. F. E., André, B. (1993) Stimulation of phospholipase A2 by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotides. *Planta* 191: 515–523
- Scherer, G. F. E., Arnold, B. (1997) Auxin-induced growth is inhibited by phospholipase A2 inhibitors. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* 202, 462-469.
- Scherer, G. F. E. (2002) Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction, *Plant Mol. Biol.*, 49, 357-372
- Scherer, G. F. E., Zahn, M., Callis, J., Jones, A. M. (2007) A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression. *FEBS Lett.* 581, 4205-4211.
- Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., Heitz, T. (2010) Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies, and functions in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 693-700.
- Scherer, G.F.E. (2011) Auxin-Binding-Protein1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *J. Exp. Bot.* 62, 3339-3357.
- Sedbrook, J. C., Kaloriti, D. (2008) Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends Plant Sci.* 13, 303-310.
- Shen, H., Moon, J., Huq, E. (2005) PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *Plant J* ;44:1023–35.
- Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M., Quail, P. H. (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol.* 145:1043–51.
- Simmons, C., Soll, D., Migliaccio, F. (1995a) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*; 46:143-50.
- Simmons, C., Migliaccio, F., Masson, P., Caspar, T., Söll, D. (1995b) A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology. *Physiol. Plant.* 93, 790-798
- Smith, H. (1994) Phytochrome-mediated responses, *International Lighting in Controlled Environments Workshop*.
- Steindler, C., Mateucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G., Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*, 126, 4235–4245.
- Thiel, G., Blatt, M. R., Fricker, M. D., White, I. R., Millner, P. (1993) Modulation of K⁺ channels in

- Vicia stomatal guard cells by peptide homologue stotho auxin-binding protein C-terminus. Proc Natl Acad Sci USA;90:11493–7.
- Tomas, A., Paponov, I., Perrot-Rechenmann, C. (2010) Auxin Binding Protein1: functional and evolutionary aspects, Trends in Plant Science 15 436–446
- Ullah, H., Chen, J. G., Wang, S., Jones, A. M. (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. Plant Physiol. 129, 897-907
- Ullah, H., Chen, J. G., Temple, B., Boyes, D. C., Alonso, J. M., Davis, K. R., Ecker, J. R., Jones, A. M. (2003) The α -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. Plant Cell, 15, 393-409
- Ulm, R., Revenkova, E., di Sansebastiano, G.-P., Bechtold, N., Paszkowski, J. (2001) Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. Genes Dev. 15, 699-709.
- Venis, M. A., Napier R. M. (1997) Auxin perception and signal transduction. In: Aducci P, editor. Signal Transduction in Plants. Basel: Birkhäuser Verlag; p. 45–63.
- Watanabe, K., Sakai, F., Orii, H. (1997) Stepwise dilution screening of a cDNA library by polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, vol. 252, no. 1, p. 213-214
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B., Friml, J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. Science 312, 883.
- Yang, S., Hua, J. (2004) A haplotype-specific resistance gene regulated by *Bonza1* mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. Plant Cell 16, 1060–1071
- Yang, W., Devaiah, S. P., Pan, X., Isaac, G., Welti, R., Wang, X. (2007) *AtPLAI* is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. J. Biol. Chem. 282, 18116-1828.
- Yanovsky, M. J., Kay, S. A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. Nature, 419, 308–312.
- Yi, H., Park, D., Lee, Y. (1996). *In vivo* evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. Physiol. Plant, 96:359-368.
- Younis, A. F. (1954) Experiments on the growth and geotropism of roots. J. Exp. Bot. 5, 357–372.

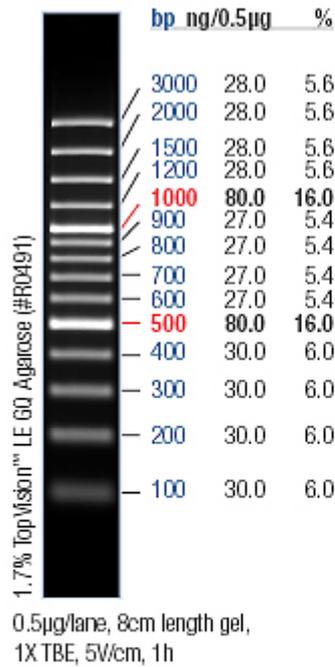
6 Anhang

6.1 Verwendete DNA- und Protein-Standards

50bp Ladder
(Invitrogen)



100 bp plus DNA Ladder
(GeneRuler™)



1 kb DNA Ladder
(GeneRuler™)

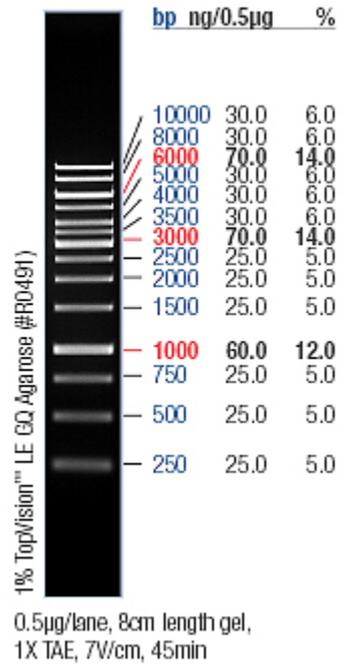


Abbildung 60: Verwendete Standards für die Agarose-Gelelektrophorese: 50bp DNA Ladder (Invitrogen, Katalog -Nr. 10416-014), 100bp DNA Ladder (Fermentas, Katalog-Nr. SM0321) und 1kb DNA Ladder (Fermentas, Katalog -Nr. SM 1331)

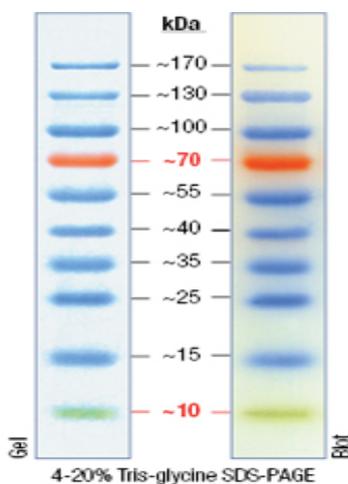


Abbildung 61: Verwendeter Protein-Standard für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Katalog-Nr. SM0671)

6.2 Verwendete Vektoren

Bei den zur Klonierung verwendeten Vektoren handelt es sich ausschließlich um Gateway-Vektoren. Diese verfügen über spezifische att-Sites, die eine Rekombination von Fragmenten mittels spezieller Clonasen der Firma Invitrogen ermöglichen. Die Positiv-Selektion nach einer Klonierung erfolgt über einen spezifischen Selektionsmarker (z.B. Kanamycin), dessen Gensequenz außerhalb der Rekombinationskassette liegt. Die Negativselektion erfolgt über das für *E. coli*-Zellen toxische *ccdB*-Gen innerhalb der Kassette. *E. coli*-Zellen, die das aus der Rekombination resultierende Nebenprodukt mit *ccdB*-Gen oder einen nicht rekombinierten Vektor enthalten, sterben ab.

pDONR221

Donorvektor mit spezifischen attP1-attP2 Rekombinationsstellen zur Rekombination mit attB1-attB2-Amplifikaten oder -Expressionsvektoren. Die Rekombinationskassette verfügt über das *ccdB*-Gen und eine Chloramphenicolresistenz. Die Positiv-Selektion erfolgt mittels Kanamycin-Resistenzgen. Die Überprüfung der inserierten Sequenz kann mittels die Kassette flankierender M13-Primer durchgeführt werden. Der Vektor (s. Abb. 62) hat eine Gesamtlänge von 4762bp (Invitrogen, Katalog-Nr. 12536017).

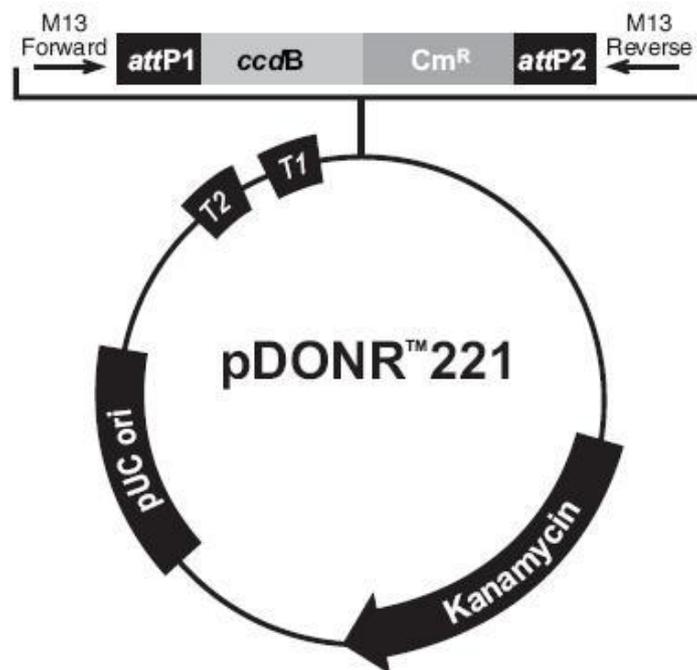


Abbildung 62: Karte des Vektors pDONR221 mit attP1-attP2 Rekombinationsstellen.

pGEX-2TM-GW

Dieser Destination-Vektor wurde aus dem Vektor pGEX-2T (Novagen, GenBank acc. U13850) weiterentwickelt (Bekir Ulker, Imre Somssich, u. a.). Er verfügt über spezifische attR1-attR2 Rekombinationsstellen. Die Rekombinationskassette verfügt über das ccdB-Gen und ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Die Positiv-Selektion erfolgt mittels Ampicillin-Resistenzgen. Der Vektor kann zur Proteinexpression und Proteinaufreinigung, wahlweise mit N-terminalem GST-tag oder C-terminalem His-tag, verwendet werden. Der Vektor hat eine Gesamtlänge von 6705bp (s. Abb. 63). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steffen Rietz.

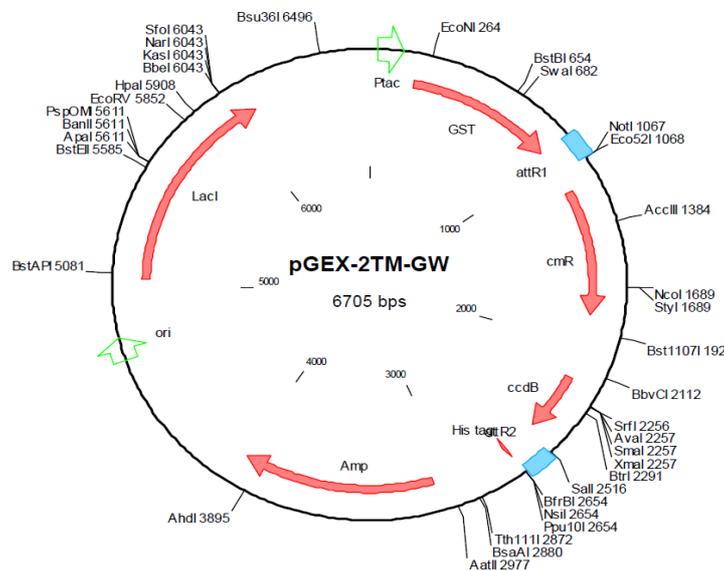


Abbildung 63: Karte des Vektors pGEX-2TM-GW mit attR1-attR2 Rekombinationsstellen.

pK7FWGF2

Destinationvektor mit spezifischen attR1-attR2 Rekombinationsstellen. Die Rekombinationskassette verfügt über das ccdB-Gen. Die Positiv-Selektion erfolgt mittels Spectinomycin-Resistenzgen. Der Vektor verfügt über Left- und Right-Border (LB/RB) und wird für Agrotransformationen verwendet. Zwischen LB und RB befindet sich ein Kanamycin-Resistenzgen für die Transformandenselektion, sowie ein N-terminales und ein C-terminales GFP, welche die inserierte Sequenz flankieren. Der Vektor hat eine Gesamtlänge von 12593bp. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karimi *et al.* (2007) (s. Abb. 64).

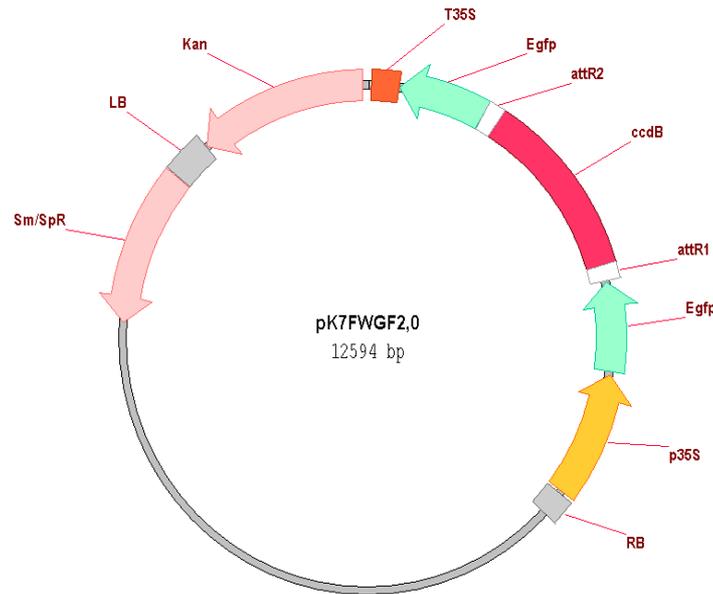


Abbildung 64: Karte des Vektors pK7FWGF2 mit attR1-attR2-Rekombinationsstellen

pGWB 4

Dieser Destination-Vektor stammt aus der pGWB-Serie binärer Gateway-Vektoren von Tsuyoshi Nakagawa (Research Institute of Molecular Genetics, Japan). Er wurde aus dem Vektor pABH-Hm1 (Mita *et al.*, 1995) durch Austausch der ursprünglichen HindIII-SacI-Region mit der dargestellten Gateway-Cassette (s. Abb. 65) hergestellt. Die inserierte Gateway-Cassette verfügt über eine Insertionsstelle für eine genomische Sequenz mit nativem Promotor und ein C-terminales sGFP. Der Vektor verfügt zudem über ein Kanamycin- (NPTII) und ein Hygromycin-Resistenzgen (HPT). Die Resistenzgene funktionieren sowohl auf bakterieller, als auch auf pflanzlicher Ebene. Der Vektor hat eine Größe von ca. 17kb. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tsuyoshi Nakagawa.

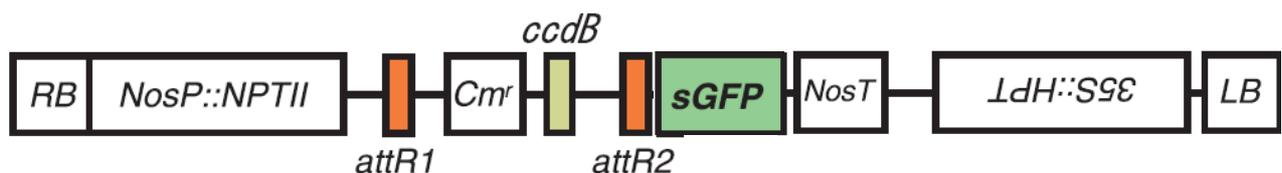


Abbildung 65: Karte der Sequenz des Vektors pGWB4 zwischen LB und RB mit attR1-attR2-Rekombinationsstellen

6.3 Verwendete Primer

Tabelle 36: Verwendete Primer zur Amplifikation der pPLA-I und pPLA-I-Teilsequenzen

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _M (°C)	Länge (bp)
pPLA-I TS1_for	ATGTCTTCTACATGTTCTTCTC	54,7	22
pPLA-I TS1_rev	ATCAGATACAAAAGCTAAGG	51,2	20
pPLA-I TS2_for	TGATATAATGAAGCCGACTG	53,2	20
pPLA-I TS2_rev	GGTTGAACCGAAAATATTGT	51,2	20
pPLA-I TS3_for	GAAGCTCTAAGCACATTGCT	55,3	20
pPLA-I TS3_rev	CTATACATTAGGAAGATGAC	51,2	20
pPLA-I TS4_for	GTGCAATAGTGGCAAACAATC	55,9	21
pPLA-I TS4_rev	TCTGGCGTCCAATATAACGG	57,3	20
pPLA-I cDNA_for	ATGTCTTCTACATGTTCTTCTCCA	63,7	24
pPLA-I cDNA_rev	CTATACATTAGGAAGATGACAAGTG	58,1	25
pPLA-I Yang_for	CGCGTCGACTGATGTCTTCTACATGTTC	66,6	28
pPLA-I Yang_rev	CTTGCGGCCGCGTCTTTCTATACATTAGG	68,1	29
pPLA-I Zahn_for	GATCTGAACGACGATCCGATTC	60,3	22
pPLA-I Zahn_rev	GCAGAAACGAACAAAACCTTCG	55,9	21
pPLA-I Exon18_for	ATGGTAGGAGCATGGAGAGATAGGA	68,1	25
pPLA-I Exon18_rev	CTATACATTAGGAAGATGACAAGTG	58,1	25

Tabelle 37: Verwendete Sequenzierprimer

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _M (°C)	Länge (bp)
pPLA-IcDNA_rev1	AACCCAGCCATCGCCCTGAA	61,4	20
pPLA-IcDNA_for2	CCAGTGGAACCTAAGACAGTG	57,3	20
pPLA-IcDNA_for3	CTCAGAAGATGCTCACCAAG	57,3	20
pPLA-IcDNA_for4	TGTGCTGATGAGGATGGAG	56,7	19
pPLA-IcDNA_for5	CTGTGGAATGGAGTTGGATG	57,3	20
pPLA-IcDNA_for6	TGTCGCCTCCATCATCTCCT	59,4	20
pPLA-IcDNA_for7	ACGAGCCACAAGAGACACCA	59,4	20
pPLA-Igenom_rev1	TCTTGAGTATGTAAATGGGT	51,2	20
pPLA-Igenom_for2	CGAACCCCCACTTTTATTAA	53,2	20
pPLA-Igenom_for3	CGGATCACATTTTGTTCATC	51,2	20
pPLA-Igenom_for4	TTGCTTCTTCTTGTGGGGTG	57,3	20
pPLA-Igenom_for5	GTAATCCCCTTGAATTCCTT	53,2	20
pPLA-Igenom_for6	AGTTCTGAAATCTTCGTCCC	55,3	20
pPLA-Igenom_for7	AAGTGGCAAGCCTATTCATG	55,3	20
pPLA-Igenom_for8	ACTGTAAAGGAAATGTGTG	51,2	20
pPLA-Igenom_for9	ATCCTACAATCTTTGCCATC	53,2	20
pPLA-Igenom_for10	GCGATTGAAGAATTCATACA	51,2	20

pPLA-Igenom_for11	CGACAAAGACAACCTCTATCT	53,2	20
pPLA-Igenom_for12	GCTGGATGGTAATGTTGTTA	53,2	20
pPLA-Igenom_for13	AGTGTCTGAATTTGTTTGCC	53,2	20
M13 (-21 uni)_for	GTAAAACGACGGCCAG	51,7	16
M13 (-21 uni)_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	50,4	17
pPLA-I TS1_s	TATCCGTTTCGTCGTCTTGT	55,3	20
pPLA-I TS1_as	CCCACAAGAAGAAGCAACG	56,7	19
pPLA-I TS2a_s	GCTACTACAAGCAAAGTGCT	55,3	20
pPLA-I TS2b_s	ATATCCGTTTCGTCGTCTTG	55,3	20
pPLA-I TS2_as	TTCATTCCTCCTCCATCCAT	55,3	20
pPLA-I TS2 CD4-16_as	CATCAGCACACATTTCTTTT	53,2	20
pPLA-I TS3_s	CTGAGTACAACATTGGAGAT	53,2	20
pPLA-I TS3_as	CCAGGAGTAGCAGTAGTATGTA	58,4	22

Tabelle 38: Verwendete Gateway-Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _M (°C)	Länge (bp)
B1-pPLA-I Exon18-B2_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAT GGTAGGAGCATGGAGA	74,4	49
B1-pPLA-I Exon18-B2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAT ACATTAGGAAGATGACAAGTG	>75,0	55
B1-pPLA-I genom-B2_for	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT ACT AGC TCA GCT CTC AAG T	74,4	49
B1-pPLA-I genom-B2_rev	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTTACATTAGGAAGATGACA	73,8	47
B1-pPLA-I cDNA-B2_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAG GAGGTACCATGTCTTCTACATGTTCTTCTCCA	>75,0	65
B1-pPLA-I cDNA-B2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATACA TTAGGAAGATGACA	73,7	48
B1-pPLA-I Exon7 -B2_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGA TATAATGAAGCCGACTGAAA	73,8	56
B1-pPLA-I Exon7 -B2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGATC AGTCTCATCCAACCT	>75,0	48

Tabelle 39: Verwendete Realtime-Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _M (°C)	Länge (bp)
Exon7/1_for	CTTTAAAATCCTTGTGTGCCC	55,9	21
Exon7/1_rev	TCCCAACTGCTAATAAGGCT	55,3	20
Exon7/2_for	CTTTAAAATCCTTGTGTGCCC	55,9	21
Exon7/2_rev	TTCCCAACTGCTAATAAGGC	55,3	20
Exon7/3_for	CACACCTGAACCACGAGTCA	57,9	21
Exon7/3_rev	CTTGCCTGCCTTTTATGGAAC	59,4	20
Exon7/4_for	GTCACACCTGAACCACGAGT	59,4	20

Exon7/4_rev	CTTGCCTGCCTTTTATGGAAC	57,9	21
Exon7/5_for	TGAACCACGAGTCAACAAAG	59,4	20
Exon7/5_rev	CTTGCCTGCCTTTTATGGAA	55,3	20
Exon7/6_for	TGGCAATTCTTGGAGAAAAT	55,3	20
Exon7/6_rev	CTTGCCTGCCTTTTATGGAA	55,3	20
N-term1_for	GGATTAGAGATGAGAGTTGA	53,2	20
N-term1_rev	TCAATGTAACCTGCTCGTAAC	53,2	20
N-term2_for	GGATTAGAGATGAGAGTTGA	53,2	20
N-term2_rev	CTTTCATCAATGTAACCTGCT	51,2	20
N-term3_for	GGATTAGAGATGAGAGTTGA	53,2	20
N-term3_rev	CAACCGCTTTCATCAATGTA	53,2	20
N-term4_for	ATGTCTTCTACATGTTCTTCTC	54,7	22
N-term4_rev	CCAATCTAAATCAATCCGAA	51,2	20
N-term5_for	TGTCTTCTACATGTTCTTCTC	54,0	21
N-term5_rev	GCCGTCCAATCTAAATCAAT	53,2	20
N-term6_for	CTGAATTAGGGTTTCGGATT	53,2	20
N-term6_rev	ATCAGCTGCGATTCCAATCG	57,3	20
N-term7_for	TTTGCCTGCACCGCATGATA	57,3	20
N-term7_rev	GCTCTCTCCGTTTCTCAACT	57,3	20
N-term8_for	TGAATTGAAGGGAATTGGCG	55,3	20
N-term8_rev	CTCTCCGTTTCTCAACTCTC	57,3	20
C-term1_for	CACTAATCACATCCCAAGGC	57,3	20
C-term1_rev	CGTTCTGATCTCCAATGTTG	55,3	20
C-term2_for	GCATCGTTTATGTTCCGCAGAA	58,4	22
C-term2_rev	CAGGAGTCAAGTGTGCCGAA	59,4	20
C-term3_for	CGTTTATGTTCCGCAGAACTGTAC	61,0	24
C-term3_rev	CATCAGGAGTCAAGTGTGCC	59,4	20
C-term4_for	CAAGAGTTGATGTTGCTCTT	55,3	20
C-term4_rev	CTATACATTAGGAAGATGACAAGTG	55,3	20
C-term5_for	CTGAATTTGTTTGCCAGTTA	53,2	20
C-term5_rev	TGAGAGGCAAGAGCTTTTTG	54	21
C-term6_for	GATCAGTTGTTTCAGAGAGAA	53,2	20
C-term6_rev	ACATTAGGAAGATGACAAGTG	58,1	25
C-term7_for	TTGGGAAGATGATGAAGAAG	53,2	20
C-term7_rev	CAACTCTTGAGTTCTCTCTG	55,3	20
C-term8_for	CAAGAGTTGATGTTGCTCTT	51,2	20
C-term8_rev	CTATACATTAGGAAGATGACAAGTG	55,3	20
Ubiquitin_for	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG	61,9	27
Ubiquitin_rev	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAG	60,4	27
Tubulin_for	AACCATTTGATCTCCGCA	55,3	20
Tubulin_rev	TGGAGTCCCACATTTGTTGA	55,3	20

6.4 Sequenzierungen

6.4.1 Vollständige cDNA-Sequenz der *pPLA-I*

Gefundene cDNA-Sequenz aus isolierter und transkribierter RNA der Ökotypen Wassilijewskia und Columbia (Sequenzen identisch zueinander):

atgtcttctacatgttcttccatccgccgtggaggatcctgaattagggttcggattgatttagattggacggcaggcgattcggaggatcaggt
 agcgttgcgattggaatcgagctgatgggtggcttgcctgcaccgatgatacagtagtggtgaattgaagggaattggcgatgacgatgaag
 gtggttagagaatgttgattagagatgagagttgagaaacggagagagccgttacgagcagttacattgatgaaagcggttggtccggtcag
 cagtacgacgggtgcggcgtttgacaaggctaatacggtctgatatgatgcctgcagccattcctgcgccgctatcgacgttgcttcttctgtg
 ggggtcattggaagactgtgacttcgtgagctatctggttggttattggaatgccagttgaagtgactgagttacctctgcttgagaagctat
 gccttgagcacaataaactgtcagtttggcacctgagatagggaaactgaagaaccttaagatacttagggttgacaataacatgcttattctgtc
 ccagtggaactaagacagtggttaggtcttgaattgtcgttgaacacaataaactgtccggccttcttgattcagggcgatggctgggtt
 acgaattctacggcttttgtaatccccctgaattcctccgaaatttacccttgcacagcttcgctcactgtctctgtaaatatcagaattgtgtct
 gatgagaatcctaatcagtaaatgtacagatagagacagaaaacacttctatcttggggcatctaggcacaagctcagtgcttctctccccta
 tattccgttcgtcttctgtcatcctctcttagcatctacattggtgaagataatgcaagatgaaggaaatcgttctgttattggttaaagatgaaaat
 gcggtgaggcagcttataagtatgataactagtgacaatcaacacgtgggtgagcaagctgtgtgctttatcatctcttctcgtcgagatgtggcgt
 agcaatgcagctgatgaagtgtgatataatgaagccgactgaacagttctgaaatcttctcccagacgaagtatccgtttacaagctgt
 ggtcaccttagctttgtatctgattccgtttctcagaagatgctcacaaggatgctaaaaagctttaaactcctgtgtgccataagaatcctgaa
 gtcaaagacaagccttattagcagttgggaactggcctctgttagaaaatcgtcgtattctgattactcagagagtttgagagagttattgatgc
 ggttaattgtcacacctgaaccacgagtcacaaaagctcggctcagcgtttggcaattctggagaaaatgaaattctgcgacgttccataaaag
 gcaggcaagtacaaaacaggactcgggatactccatggatggaggaggaatgaaaggtctgcaacgggtgcagattcttaaggagattg
 agaagggaagtggcaagcctattcatgaactattcgacctatattgtggcacatcaacaggaggaatgctagctattgcccttgggtgcaagcttat
 gacattggaacaatgtgaagaaattacaagaatctaggaaagctgttttctgtaactctgtccaaaggacaatgaagctgcaagctggcggg
 aaaagttggatcagctatataaaagttcatcgaaagtttagagttgtatccatgatctaagcacagtgcaaacgagttgagagactgttaaag
 gaaatgtgtgctgatgaggatggagattactaataagaatcagctgtgaagaatgtccaaaagtattgtgtatctactcttgttagtgtgatgcctg
 cgcaaccatttatatttcggaactaccagtatcctgttgaacaccggaaatgtcgtatgcatttccagatcattcaggcggcagctacactaactcat
 caactgccagtgatcaagctggctactacaagcaaagtgtttatgggaagtgtgaagatcaggtttggcaagcgatacagcatcatcagct
 gctccatattatcttgatgattttcagttggtacaaactcatatcgctggcaagatggtgcaatagtggaacaactctacaactttgccatcaga
 gaagcacaacttctatggcctgacacaaaaattgattgcttggttcgattggctctggctctgtaccaacaagggtacggaaaggtggatggcgt
 tatttagatactgggcaagtactgattgagagtcatgctcagtggaacgtgtgaagaagctctaagcacattgctccctatgttccagaaatac
 aatattttcggttcaaccagttgacgatcgtgtggaatggagttggatgagactgatccagcagctggctaaaattggaagctgcgattgaag
 aattcatacaaagcaatcccaagatattaaaaacgtatcgagagattaacactccccctcctaaacgatgagaaatggtgtgataattgaaacc

acgatttatgaatggaaagctaccaaatagcagagtagagagcagtccttctcttggatggagacgcaatgttttgcttatggaggctcagcatag
 tcctgactcagggagagtaaatgatcatgctcgtgcgctcgagtcattttgttcgaataatgaataaagtatcctcattacatactactgctactcct
 ggatgccaaaaaccatctccaggaactgctttccacaccatttacctctctcttataactggaagcttgcctccgagcccccttctcttactcct
 gagcttggcccacaaaagtcaataggattgatatggttccgccacttagcttggatgggggacatgttgggaagacgggtatgtcgcctccatca
 tctctccgcgacaaaagacaactctatcttccactacgacagatgcatgaaaagttacagaatttaccceaagtggggatcttacatctctcactca
 aatgattctaattggtcaatactgagttggcaaaatgatgtatttgggtgctgaacctggagatctagctgataagttctccaaagcgtcaaagt
 cagtattgtcagtcagcaagtaatcgccgaaaggctgcatcagttcttccaatatctgttcaatctcggatttgggtcgttagcaagaaatgctt
 ccaagttgaaatcatccaccgttatattggacgccagaccctagtgatggaagatgatcaagaaattgcatcgtttatgttccgcagaactgta
 ccttcggcacacttgactcctgatgatattcgtggatggtaggagcatggagagataggataatagtcttctcaggaacatttggaccaacacaa
 gctgtagttaaagccttttggactctggtgcaaaagctgtgattggtccatcaaacgagccacaagagacaccactaatcacatcccaaggctca
 tctgagtacaacattggagatcagaacgggaagttgagattggagaagaagaagacgaagatgaagaagtaaacgaggaaacggaaaggg
 aagagatggaaccaccgacaccgacaagtactgggaagatagcgaccacgagaaaacaacagagacggtaagtattgtggtctttggga
 agatgatgaagaagaagtgtctgaatttggccagttatgatcagttgttcagagagaactcaagagttgatgttgccttcaaaaagctcttgc
 ctctcatcgaaagctcaggtacactgtcatcttctaatgtatag

6.4.2 Sequenz der cDNA von *pPLA-I (-Exon7)*

Sequenzierung der *pPLA-I*-cDNA-Sequenz aus der Phagenbank CD4-16 (Columbia Ökotyp) mit fehlendem Exon 7 und zahlreichen Punktmutationen im Vergleich zur vollständigen cDNA-Sequenz:

atgtcttctacatgttctctccatccgccgtggaggatcctgaattagggttccgattgatttagattggacggcaggcattcggaggaccaggt
 agcgttgcgattggaatcgagctgatggtggcttgcctgcaccgcgtgatacagtagtggtgaattgaagggaattggcgtgacgatgaag
 gtggttagagaatgttggattagatgagtggtgagaaacggagagagccgttacgagcagttacattgatgaaagcggttggtccggtcag
 cagtacgacgggtgcggcgtttgacaaggctaatacggtctgatgatgctgcagccattcctgcgccggctatcagcttctcttcttctg
 ggtgcatggaagactgtgacttctgtgagctatctggttgggttattgtaaatgccagttgaagtgactgagttacctctgcttgagaagctat
 gccctgagcacaacaaactgtcagtttggccacctgagataggggaagctgaagaaccttaagatacttagggctgacaataacatgcttattctgt
 cccagtggaactaagacagtgtaggtcttgtgaattgctggtggaacacaataaacttgcggcctcttcttattcagggcgatggctgggt
 tacgaattctacggcttttggtaatcccctgaattcctccgaaactttaccttgcacagcttctcactgtctcttgaataatcagaattgtctc
 tgatgagaatctaagatcagtaaatgtacagatagagacagaaaacacttctatttggggcatctaggcacaagctcagtccttctctccctt
 atattccgttcgctcttgcacatcctcttctagcatctacattggtgaagataatacaagatgaaggaaatcgttctgttattgtaaatgaaa
 atcggtgaggcagcttataagtatgataactagtgacaatcaacagtggtgagcaagcttgttcttcttctctctgctcagatgttggc
 gtagcaatgcagctgatgaagtgtgatataatgaagccgactgaaacagttctgaaatcttctccccagacgaagtgatccggtttacaagtc

gtgggtcaccttagcttttgatctgattccgtttctcagaagatgctcaccaaggatatgctaaaagctttaaactcctgtgtgccataagaatcctg
 aagagaaaatgaaattctgcgacgttccatgaaaggcaggcaagtaccaaacaggactgcggatactaccatggatggaggaggaatga
 aaggctctgcaacgggtgcagattcttaaggagattgagaagggaagtggcaagcctattcatgaactattgaccttatatgtggcacatcaacag
 gaggaatgctagctattgcccttgggtgcaagcttatgacattggaacaatgtgaagaaattacaagaatctaggaaagcttgttttgccgaatct
 gtcccaaaggacaatgaagctgcaagctggcgggaagagtgggtcagctatataaaagttcatcgaagtttagagttgttatccatggatct
 aagcacagtgcaaacgagtttgagagactgttaaaggaaatgtgtgctgatgaggatggagattactaatagaatcagctgtgaagaatgtcca
 aaagtattgtgtatctactcttgttagtgtgacgcctgcgcaaccatttatatttcggaactaccagatcctgttggaacaccggaaatgtcgtatg
 catttcagatcattcaggcggcagctacactaacttcatcaactgccagtgatcaagctggctactacaagcaaagtgttttatgggaagttgtaa
 gcatcaggtttggcaagcgatacagcatcatcagctgctccatattatcttgatgattttcagttgactcatatcctggcaagatggtgcaatagt
 ggcaaacagtcctacaatctttgccatcagagaagcacaacttctatggcctgacacaaaattgattgcttggtttcgattggctctggctctgtac
 caacaagggtacggaaaggtggatggcgttatttagatactgggcaagctactgattgagagtgcacgctcagtggaacgtgttgaagaagctcta
 agcacattgctccctatgttccagaaatacaatattttcgggtcaaccagttgacgatcgtgtggaatggagttggatgagactgatccagcga
 tctggctaaaattggaagctgcgattgaagaattcatacaaagcaatccccagttttaaacaagctatgcgagagattaacactccccttctctaaa
 cgatgagaaatggtgtgataattgaaaccacgatttatgaatggaaagctaccaataacagagtagagagcagtccttctcttgatggagac
 gcaatgttttgcttatggaggctcagcatagctcctgactcaggagagtaaagtatcatgctcgtgcgctcgagtcattttgttcgaataatggaata
 aagttatcctcattacatactactgctactcctggatgccccaaaccatctccaggaactgctttccacaccatttacctctcttataactggaa
 gcttgcctccgagcccccttcttctcactcctgagcttggcccacaaaagttaaataggattgatatggttccgccacttagcttggatgggggaca
 tgttgggaagacggttatgtcgcctccatcatctcctccgcgacaaagacaactctatcttccactacgacagatgcatgaaaagttacagaattta
 cccaagtgggatcttacatctctcacttcaaaatgattctaattggttcaatactgagttggcaaaatgatgtattgtggttgctgaacctggagat
 ctactgataagtttctcaaagcgtcaaagtcagtatattgtcagtcacgaaagtaatgccgaaaggctgcatcagttcttccaatatctgttca
 atctcggatttgggtgcgtagcaagaatgcttccaagttggaatatcatccaccgttatattggacgccagaccctagtgtggaagatgatcaa
 gaaattgcatcgtttatgttccgcagaactgtacctcgacacactgactcctgatgatattcgctggatggttaggagcatggagagataggataa
 tagtcttctcaggaacatttggaccaacacaagctgtagttaaagccttttggactctggtgccaagctgtgattggtccatcaaacgagccaca
 agagacaccactaatcacatccaaggctcatctgagtacaacattggagatcagaacgggaagtttgagattggagaagaagaagacgaaga
 tgaagaagtaaacgaggaacggaaaggaagagatggaaccaccggcaccgacaagtgactgggaagatagcaccaccagagaaaacaa
 acagagacggtaagtattgtggtctttgggaagatgatgaagaagaagtgtctgaattgttccagttatgatcagttgttcagagagaactca
 agattgatgttgccttcaaaaagcttctcctctcatcgaagctcaggtgcacttgcattcttctaatgtatag

6.4.3 Verwendete cDNA-Sequenz von Exon18 zur Antikörperherstellung

Die zur Herstellung des C-terminalen Antikörpers verwendete cDNA-Sequenz von Exon 18 der *pPLA-I*-Sequenz wurde vor der LR-Klonierung auf Fehler untersucht. Es wurde eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Template-cDNA gefunden.

atggtaggagcatggagagataggataatagtcttctcaggaacatttggaccaacacaagctgtagftaaagccttttggactctggtgcaaaa
gctgtgattggtccatcaaacgagccacaagagacaccactaatcacatcccaaggctcatctgagtacaacattggagatcagaacgggaagt
ttgagattggagaagaagaagacgaagatgaagaagtaaacgaggaacggaaaggggaagagatggaaccaccgacaccgacaagtact
gggaagatagcgaccacgagaaaaacaacagagacggtaagtattgtggtctttgggaagatgatgaagaagaagtgtctgaatttggcca
gttatatgatcagttgtcagagagaactcaagattgatgttcttcaaaaagctcttgcctctcatgaaagctcaggtacacttgcacatctct
aatgtatag

6.4.4 Genomische Sequenz der *pPLA-I*

Die genomische Sequenz mit nativem Promotor wurde aus dem Template F8K4 amplifiziert und auf Fehler in der Amplifikation untersucht. Das Amplifikat mit 100%iger Übereinstimmung zum Template wurde für die Klonierung in pDONR221 und später pGWB4 verwendet.

atgtcttctacatgttcttccatccgccgtggaggatcctgaattagggttcggattgatttagattggacggcaggcattcggaggatcaggt
agcgttgcgattggaatcgagctgatgggtgcttgcctgcaccgcatgatacagtagtggtgaattgaaggggaattggcgtgacgatgaag
gtggttagagaatgttgattagatgagagttgaaaacggagagagccgttacgagcagttacattgatgaaagcgggtggtccggtcag
cagtacgacgggtgcggcgtttgacaaggctaagcggctgatgatgctgcagccattcctgcgccggtatcgacgttcttcttctgtg
gggtgcattggaagactgtgacttctgtgagctatctggttgggttattggtatgttacttttagcatttctgaatccaaggaagaaactttgattag
gaattgggttatgctgatccgtcttaatgcttgaatgttggcaggtaatgccagttgaagtactgagttacctctgcttgagaagctatgcctt
gagcacaataaactgtcagtttccacctgagatagggaaactgaagaaccttaagatacttagggtgacaataacatgcttatttctgtcccag
gtgaccgttatcgcatcttaataataaaaaaaaaacatattggaatcattagattttcagctgatgttgggtgaaactcttgtgtagtgaactaagac
agtgtgtaggtcttgtgaattgtcgttgaacacaataaactgtccggcctcttcttatttcaggtcattggggcagagagctggtattactgtttt
aatttcttgaagtagttaggatgctgattaagtatacattgaaatgcagggcgatggctgggttacgaattctacggccttttgtaatcccctt
gaattcctccggaattttacccttgcacagcttctcacttcttctgtaaatcagaattgtgtctgatgagaatctaagatcagtaaatgtaca
gatagaggtaagaagaaaactcatcagactatctgctgacttttcttcttaggtcactaagtttatgctaaggataagtttcatgattgcagaca
gaaaacacttctattttggggcatctaggcacaagctcagtccttctctccccttatattccgttcgctccttctcactctctcttagcatctac
attggtgaagataatgcaagatgaaggaaatcgttctgttattggtaaagatgaaaatcggtgaggcagcttataagatgataactagtgacaat
caacacgtggtatgttgggtttgtctgtgctatggttgaaaaaactttacttcttttgggaacaatcaccataactacaggtttgataggttgagca
agcttgtgttcttctctctctgctcgagatgtggcgtagcaatgcagctgatgaagtgtatataatgaagccgactgaaacagttctgaaat
cttctccccagacgaagtgatatccgtttacaagctgtggcaccttagctttgtatctgattccgtttctcagaagatgctcacaaggatgct
aaaagcttfaaaatccttgtggtgcccataagaatcctgaagtaagttgttcatttttctctcttataagaaaacctatagtttcttgcactgagat
cctttccccttaggtcaagacaagccttattagcagttgggaacttggccttctgtttagaaaatcgtcgtattctgattactcagagagttgagag
agttattgatcggttaattgtcacacctgaaccacgagtcacaaaagctcggctcgagctttggcaattcttgggtgttcttctgtatcaaatcg
tcattttgctgatattctggttgggcattacatagaacgttttcttctgatgacaggagaaaatgaaattctgcgacgttcataaaaggcaggcaa

gtacaaaacagggactgCGGatactcaccatggatggaggaggaatgaaaggcttGcaacggTgcagattcttaaggagattgagaaggg
aagtggcaagcctattcatgaactattcGacctatattgtggcacatcaacaggaggaatgctagctattGCCcttggTgcaagcttatgacattgg
aacaatgtgaagaaattacaagaatctaggtgtgtaaaattccctttacagcttcgtgacttattggttctggactttactttggatgttttctatagg
aaagcttgttttgctgaatctgtcccaaaggacaatgaagctgcaagctggcgggaaaagttggatcagctatataaaagtcatcgcaaagttt
agagttgttatccatggatctaaggatacacaacgctgttggctattcacagttgatttctctgtagcgacatagaatcaaatctagacttttgg
ttatgttttaaggacttatctttgatatttttagcgtcttggattttaaatgtaagaattcaaaaaaaaaattattGCCactaaggattgtaaagata
tgctttagaaaaccaaatagctcttcgtagttccgacatgacttggaaatcagattttataatactgtcttgcagcacagtGcaaacgagttgaga
gactgttaaaggaaatgtgtgctgatgaggatggagattfactaatagaatcagctgtgaagaatgtccaaaagtatttgtgtatctactctttag
tgtgatgcctgcGcaaccatttatattcGgaactaccaggtacaacacttctttttacttttggtaattcttattctctgtaattgcgatgaagtttt
accactttaaattgtctgtctattcttctgtgtatcatgttctctttttctatttgcagtatcctgttggaaacaccggaaatgctgatgactttcaga
tcattcaggcggcagTacaacttcatcaactGCCagtgatcaagctggctactacaagcaagtGcttttatgggagttgtaagcatcaggt
tggcaagcgatacagcatcatcagctgctccatattatcttgatgattttcagttggTacaagctaccttctctatttccactcttatccatgactct
ttgtgtaagcttttacgctgatattatcttgttcccttctaaatcattaagactcatacGctggcaagatggTgcaatagttggcaacaatcctacaat
ctttGCCatcagagaagcacaacttctatggcctgacacaaaaattgattgcttggtttcgattggctctggctctgtaccaacaagggtaattccg
ttttcctgtggctccagattgtGcaaaatctatgtttatgttgaaaaccactgaaatacatatggTgataaaatcttGCCgtccttgaatgttaagt
aattattttcattgttgatctaactccctgtaggtacggaaaggtggatggcgttatttagatactgggcaagtactgattgagagtgcagctcagt
ggaacgtgtgaagaagctcLaagcacattgctccctatgttgcagaaatacaatatttccgTtcaaccaggtacaacaacagcattttacaacat
gcaagaacactcttatctgtgaaacactatgaaacctgaattcttatccatcccgattccataatgcatgtttttgacgtagaatctagttaatct
ttacatatctgggtatatgcagttgacgatcgtgtggaatggagttggatgagactgatccagcGatctggctaaaattggaagctgcgattgaa
gaattcatacaaaGcaatccccagttatataaacgTatgcgagagattaacactccccctcctaaacgatgagaaatggTgtgataattgaaac
cacgattatgaatggaaagctaccaaatagcagaggtatcttttaaaatttatttGcttttcagcaaaaccttctcaactgttagcttagtaactct
atcattttctttcattcctaaacagtagagagcagctcttcttggatggagacgcaatgttttcttatggaggctcagcatagctcctgactcagg
gagagtaaagtatcatgctcgtgcgctcgagtcattttgtcgaataatggaataaagttatcctcattacatactactgctactcctggatGCCaaa
accatctccaggaactgcttttccacaccattacctctctcttataactggaagcttGCCtccgagccccctctcttcaactcctgagcttggccc
acaaaagttcaataggattgatattgttccGCCacttagcttggatgggggacatgttgggaagacggttatgtcGctccatcatctcctccgG
acaaagacaactctatcttccactacgacagatgcatgaaaagttacagaatttaccceaagTggggatcttcatctctcaactcaaaatgatteta
atggttcaactgaggttagtccaaactttcagttccaccatatcactcagttctaaaaaggttattctagtgaattgattacatttGcttttggT
ttcatttagttggcaaaatgatgtatttgggttctgaacctggagatctagctgataagtttccaaaagcTcaaaagtcagtatattgctagctatg
caaagtaatcGCCgaaaggctgcatcagttcttccaatatctgtcaatctcggatttggTgcgtagcaagaaatgctccaagttggaatatcat
ccaccgttatattggacGCCagaccctagtaagaatatgtttcatattaactcttttgggttactgttatagcgttgaagctttattttttgatg
ttacttGtaatactgtaggtgatggaagatgatcaagaaattgcatcgtttatgttccgcagaactgtaccttccGcacacttgactcctgatgata
ttcgtggtggttaattgttacttactttgtatactaaaattGCCgaaaggctagcttttGctcacatataattactctcGcattccttaaaaggct
agcttctacgaaaatattgctGtatacttatgttcagtttGttgacgggtacagaacccaacatcaaaagctagtataaacataaggaaggcta

ataagaagaaggccaaaagttgtcttatgctatgaacatcttatctgaaacaggtaggagcatggagagataggataatagtcttctcaggaaca
 ttggaccaacacaagctgtagttaaagccttttggactctggtgccaaagctgtgattggtccatcaaacgagccacaagagacaccactaatc
 acatcccaaggctcatctgagtacaacattggagatcagaacgggaagttgagattggagaagaagaagacgaagatgaagaagtaaacga
 ggaaacggaaaggaagagatggaaccaccgacaccgacaagtgactgggaagatagcgaccacgagaaaacaacagagacggtaagt
 attggtctttgggaagatgatgaagaagaagtgtctgaattgttggcagttatatgatcagttgttcagagagaactcaagagttgatgttctct
 tcaaaaagctcttgcctctcatcgaaagctcaggtacactgtcatcttctaatgtatag

6.4.5 Verwendete Primer zur vollständigen Sequenzierung der *pPLA-I*

Tabelle 40: Verwendete Primer und Amplifikate zur vollständigen Sequenzierung der *pPLA-I* aus den Ökotypen *Wassilijewskia* und *Columbia*. TS = Teilsequenz.

Ökotyp <i>Wassilijewskia</i> (aus RNA-Isolation)		Ökotyp <i>Columbia</i> (aus RNA-Isolation)		Ökotyp <i>Columbia</i> (aus Phagenbank CD4-16)	
Primer	Amplifikat	Primer	Amplifikat	Primer	Amplifikat
pPLA-I TS1_as	TS 1	pPLA-I TS1_as	TS 1	pPLA-I TS1_as	TS 1
pPLA-I TS1_s	TS 1	pPLA-I TS1_s	TS 1	pPLA-I TS1_s	TS 1
pPLA-I T1_for	TS 1	pPLA-I T1_rev	TS 1	pPLA-I T1_for	TS 1
pPLA-I T1_rev	TS 1	pPLA-I cDNA_rev1	TS 1	pPLA-I T1_rev	TS 1
pPLA-I cDNA_rev1	TS 1	pPLA-I cDNA_for2	TS 1	pPLA-I cDNA_rev1	TS 1
pPLA-I cDNA_for2	TS 1	pPLA-I T2_for	TS 2	pPLA-I cDNA_for2	TS 1
pPLA-I T2_for	TS 2	pPLA-I T2_rev	TS 2	pPLA-I T2_for	TS 2
pPLA-I T2_rev	TS 2	pPLA-I TS2_as	TS 2	pPLA-I T2_rev	TS 2
pPLA-I TS2_as	TS 2	pPLA-I TS2_s	TS 2	pPLA-I TS2_as	TS 2
pPLA-I TS2_s	TS 2	pPLA-I TS3_for	TS 3	pPLA-I TS2_s	TS 2
pPLA-I TS3_for	TS 3	pPLA-I TS3_rev	TS 3	pPLA-I TS3_for	TS 3
pPLA-I TS3_rev	TS 3	pPLA-I TS3_as	TS 3	pPLA-I TS3_rev	TS 3
pPLA-I TS3_as	TS 3	pPLA-I TS3_s	TS 3	pPLA-I TS3_s	TS 3
pPLA-I TS3_s	TS 3	pPLA-I cDNA_for5	TS 3	pPLA-I Exon18_for	TS 3
pPLA-I Exon18_for	TS 3	pPLA-I cDNA_for6	TS 3	pPLA-I cDNA_for7	TS3
pPLA-I TS4_for	TS 4	pPLA-I TS4_for	TS 4	pPLA-I TS4_for	TS4
pPLA-I TS4_rev	TS 4	pPLA-I TS4_rev	TS 4		
		pPLA-I cDNA_for6	TS 4		

6.5 Epitopenalyse zur pPLA-I-spezifischen Antikörper-Herstellung

6.5.1 N-Glykosylierungsstellen

Im Folgenden sind die in der Proteinsequenz der pPLA-I befindlichen N-Glykosylierungsstellen dargestellt (s. *Abb. 66*).

```

MSSTCSSPSAVEDPELGFRIDLDTAGDSEDQVALRLESQMLVALPAPHD
TVVVELKGI GDDDEGGLENVGLEMRVEKRREPLRAVTLMKAVGSGQQYDG
VGVLTRLMRSDMMPAAIPAPAI DVASSCGVHWKT VTSLSLSCGGLLVMPV
EVTELP LLEKLCLEHNKLSVLPPEIGKLNKILRVDNNMLISVPVELRQ
CVGLVELSLEHNKLV RPLLD FRAMAGLRILR LFGNPLEFLPEILPLHQLR
HLSLVNIRIVSDENLR SVNVQIETENTSYFGASRHKLSAFSPLIFRSSSC
HHPLLASTLVKIMQDEGNRSVIGKDENA VRQLISMITS DNQHVVEQACVA
LSSLARDVGVAMQLMKCDIMKPTETVLKSSSPDEVISVLQVVVTLAFVSD
SVSQKMLTKDMLKALKSLCAHKNPEVQRQALLAVGNLAFCLENRRILITS
ESLRELLMRLIVTPEPRVNKAAARALAILGENEILRRSIKGRQVPKQGLR
ILTM DGGGMKGLATVQILKEIEKSGSKPIHELFDLICGTSTGGMLAIALG
VKLMTLEQCEEIYKNLGKLVFAESVPKDNEAASWREKLDQLYKSSSQSFR
VVIHGSKHSANEFERLLKEMCADEDGDL LIESAVKNVPKVFVVSTLV SVM
PAQPFIFRNYQYPVGTPEMSYAFSDHSGGSTLTSSSTASDQAGYYKQSAFM
GCKHQVWQAIRASSAAPYYLDDFSVGTNSYRWQDGAI VANNPTIFAIRE
AQLLWPDTKIDCLV SIGSGSVPTRVRKGGWRYLDTGQV LIESACSVERVE
EALSTLLPMLPEIQYFRFNPVDDRCGMELDETDPAIWLKLEAAIEEFIQS
NPQVFKNVCERLTL PFLNDEKWC DNLPFRFMNGKLPNSRVESSPSLGWRR
NVLLMEAQHS PDSGRVKYHARALESFCSNNGIKLSSLHTTATPGCQKPS P
GTAFPTPFTSPLITGSLPPSPLLEFTELP GPQKFNRIDMVPPLSLDGGHVG
KTVMSPSSPPRQRQLYLPLRQMHEKLNLPQV GILHLSLQND SNGSILS
WQNDVFVVAEPGDLADKFLQSVKVSILSVMQSNRRKAASVLSNICISDL
VRSK KCFQVGNI IHRYIGRQTLVMEDDQEIASFMFRRTVPSAHLTPDDIR
WMVGAWRDRIIVFSGTFGPTQAVVKAF LDSGAKAVIGPSNEPQETPLITS
QGSSEYNIGDQNGKFEIGEEDEDEEVE NEETEREEMEPTPTSDWEDSDH
EKTNRDGKYCGLWEDDEEEVSEFVCQLYDQLFRENSRVDVALQKALASHR
KLRYTCHLPNV

```

Hervorgehoben – mögliche N-glykosylierungsstellen (NxT/NxS außer x=P/D)

Abbildung 66: Mögliche N-Glykosylierungsstellen innerhalb der Proteinsequenz der pPLA-I.

N-Glykosylierungsstellen könnten sich negativ auf die Funktionalität des Antikörpers auswirken. Signaltriplete wie NXT und NXS geben hinweise für eine mögliche N-Glykosylierung.

6.5.2 Avidität

Die pPLA-I-Peptidsequenz wurde auf Anhäufungen positiver oder negativer Ladungen hin untersucht (s. Abb. 67).

```

msstcsspsavEDpElgfrIdlDwtagDsEDqvalRlEsqImvalpapHD
tvvvElKgigDDDEgglEnvglEmRvEKRRERplRavtlmKavgsgqqyDg
vgvltRlmRsDmmpaaipapaiDvasscgVhWktvtstslsgcgllvmpv
EvtElplleKlclEHnKlsvlppEigKlKnlKilRvDnnmlisvpvElRq
cvglvElslEHnKlvRplldfRamaglRilRlfgnpleflpEilplHqlR
HlslvniRivsDENlRsvnvqiEtENTSyfgasRHKlsafsplifRssc
HHpllastlvKimqDEgNRSvigKDENavRqlimitsDnqHvvEqacva
lsslaRDvgvamqlmKcDimKptEtvIKssspDEvisvlqvvtlafvsD
svsqKmltKDmlKalkslcaHKnpEvqRqallavgnlafclEnRRilitS
EslREllmRlivtpEpRvnKaaaRalailgEnEilRRsiKgRqvpKqglR
iltmDgggmKglatvqilKEiEKgsgKpiHElfdlicgtstggmlaialg
vKlmtlEqcEEiyKnlgKlvfaEsvpKDnEaaswREKlDqlyKsssqsfR
vviHgsKHsanEfERllKEmcaDEDgDlIIEsavKnvpKvfvvstlvsvm
paqpfifRnyqypvgtpEmsyafsDHsggstltsstasDqagyyKqsafm
gscKHqvwqaiRassaapyylDDfsvgtnsyRwqDgaivannptifaiRE
aqllepDtKiDclvsigsgsvptRvRKggwRyldtgqvliEsacsVERVE
EalstllpmlpEiqyfrfnpvDDRcgmElDEtDpaiwlKlEaaiEEfigs
npqvfKnvcERltlpflnDEKwcdnlKpRfmngKlpnsRvEsspslgwRR
nvlmEaqHspDsgRvKyHaRalEsfcsnngiKlsslHttatpgcQKpsp
gtafptpftsplitgslppspllftpElgppqKfnRiDmvppslsldggHvg
KtvmspssppRqRqlylplRqmHEKlqnlpqvgilHlslqnDsNGSils
wqnDvfvvaEpgDlaDKflqsvKvsilsvmqsnRRKaasvlsnicssDl
vRsKKcfqvgniiHRYigRqtlvmEDDqEiasfmfRRtvpsaHltpDDiR
wmvgawRDRiivfsgtfgptqavvKaflDsgaKavigpsnEpqEtplits
qgssEynigDqngKfEigEEDEDEEvnEEtEREEmEppptsDwEDSDH
EKtnRDgKycglwEDDEEEvsEfvcqlyDqlfREnsRvDvalqKalashR
KlRytchlpnv

```

Abbildung 67: Überprüfung auf positiv und/oder negativ geladene Aminosäuren in der Peptidsequenz (AS grau hinterlegt)

6.5.3 Oberflächenprofil

Anhand des Oberflächenprofils ist deutlich zu erkennen, das insbesondere der C-terminus eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür aufweist, an der Oberfläche des Proteins lokalisiert zu sein (s. *Abb. 68*).

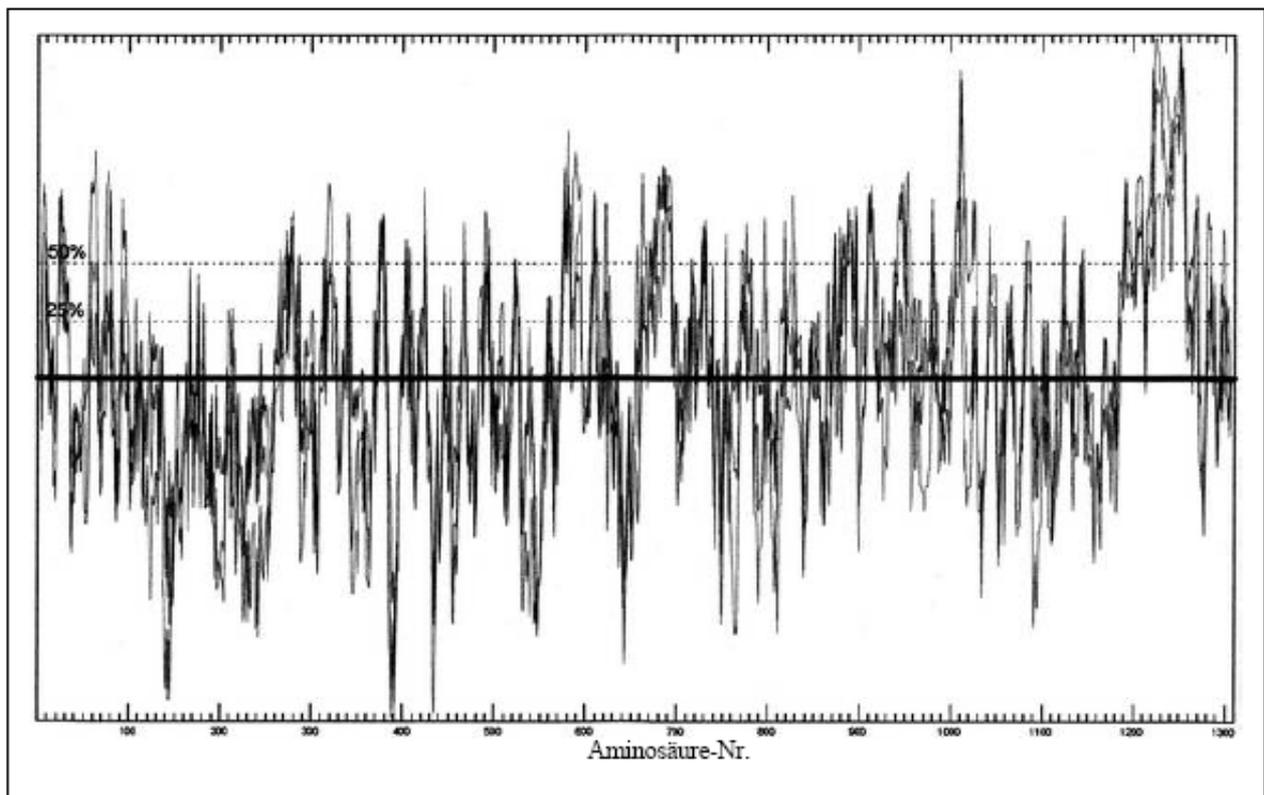


Abbildung 68: Oberflächenprofil der Proteinsequenz der pPLA-I.

6.6 Immunolabelings

6.6.1 Expression bei Wachstum in 15 μ E Blaulicht

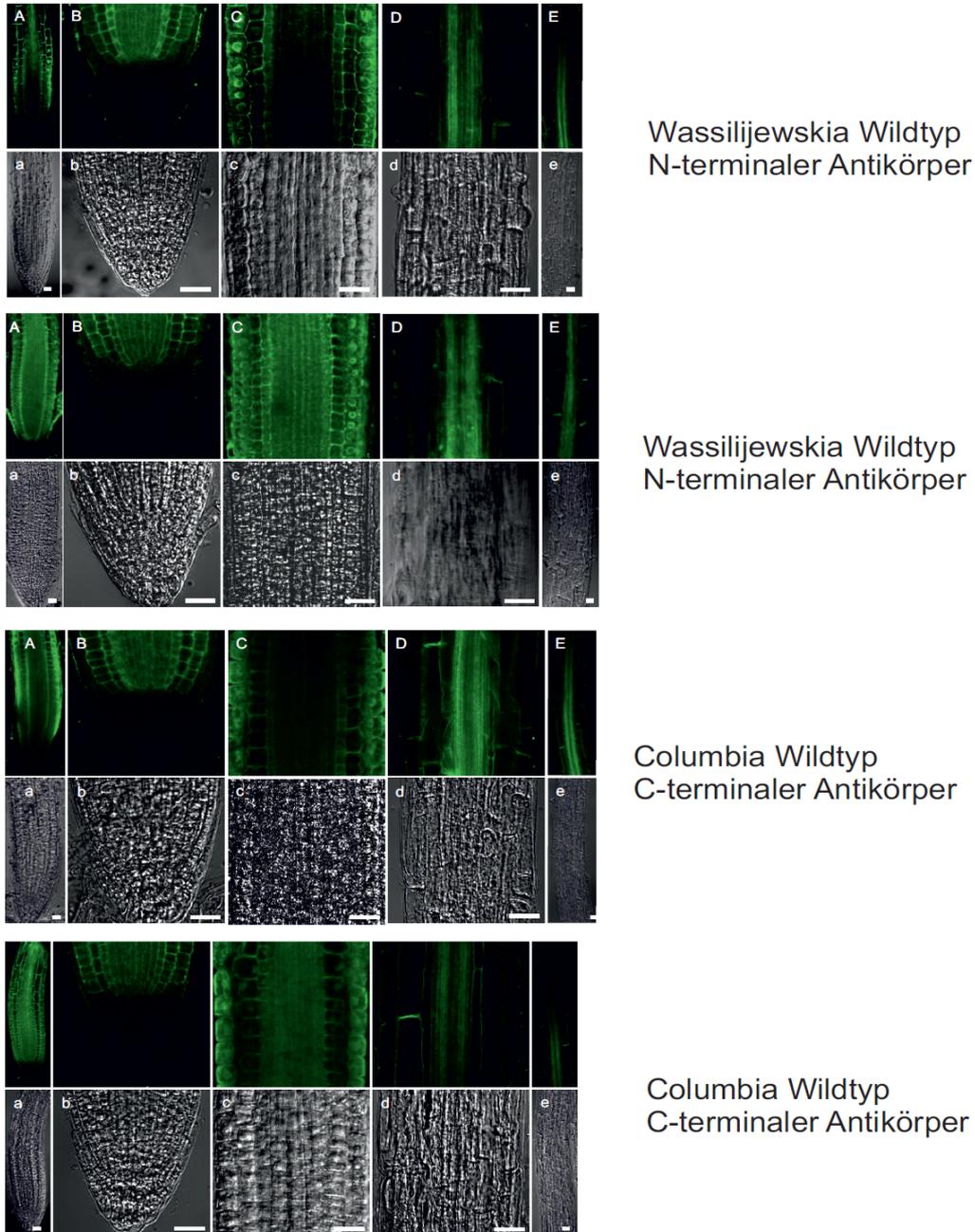
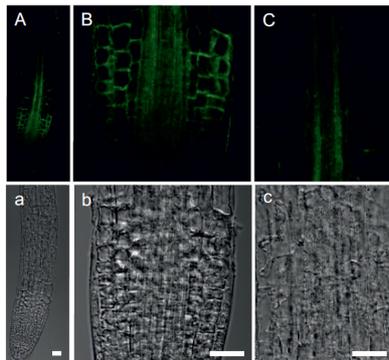
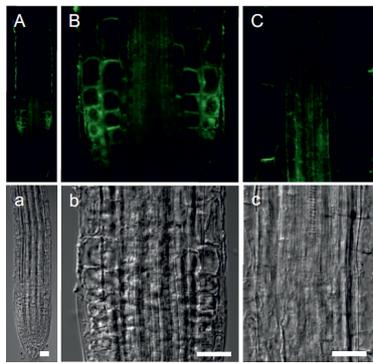


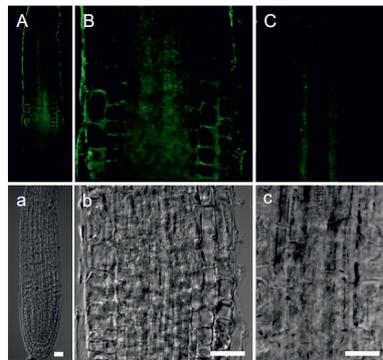
Abbildung 69: *Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von Wassilijewskia und Columbia Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in 15 μ E Blaulicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) und E) beginnenden Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20 μ m. Alle Aufnahmen sind mittige Längsschnitte.*

6.6.2 Expression bei Wachstum in 15 μ E Rotlicht

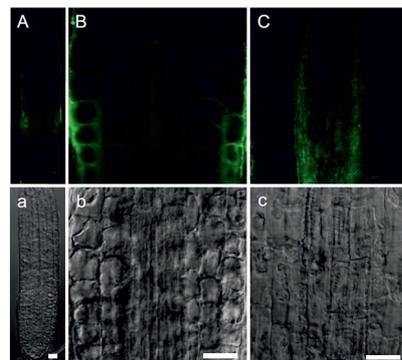
Wassilijewskia Wildtyp
N-terminaler Antikörper



Wassilijewskia Wildtyp
C-terminaler Antikörper



Columbia Wildtyp
N-terminaler Antikörper



Columbia Wildtyp
C-terminaler Antikörper

Abbildung 70: Wurzelspitze von Wassilijewskia und Columbia Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in 15 μ E Rotlicht und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, A)-C) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-c) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20 μ m. Alle Aufnahmen sind mittige Längsschnitte.

6.6.3 Expression bei Wachstum in 15 μ E Dunkelrotlicht

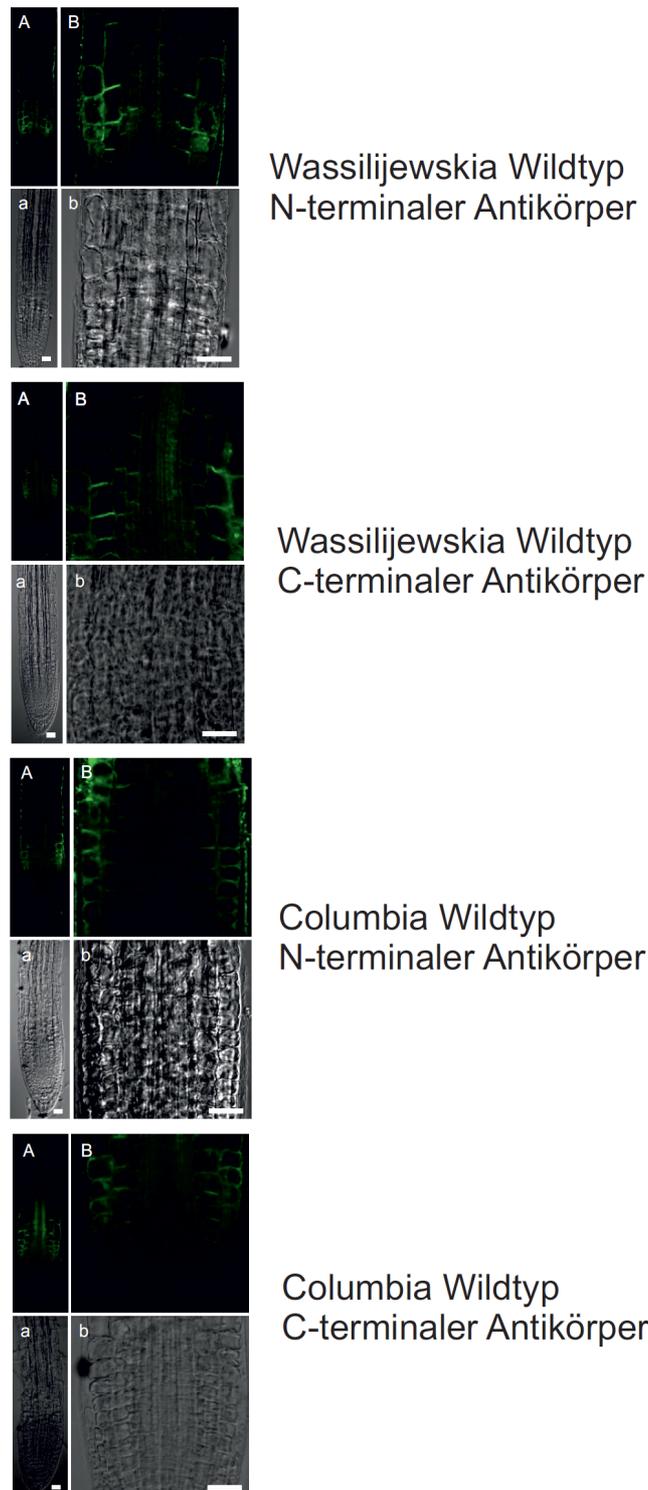


Abbildung 71: Wurzelspitze von Wassilijewskia Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in 15 μ E Dunkelrotlicht und anschließendem Immunolabeling mit C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze \emptyset , B) meristematische Zone, A)+B) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)+b) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20 μ m. Alle Aufnahmen sind mittige Längsschnitte.

6.6.4 Expression bei Wachstum in Dunkelheit

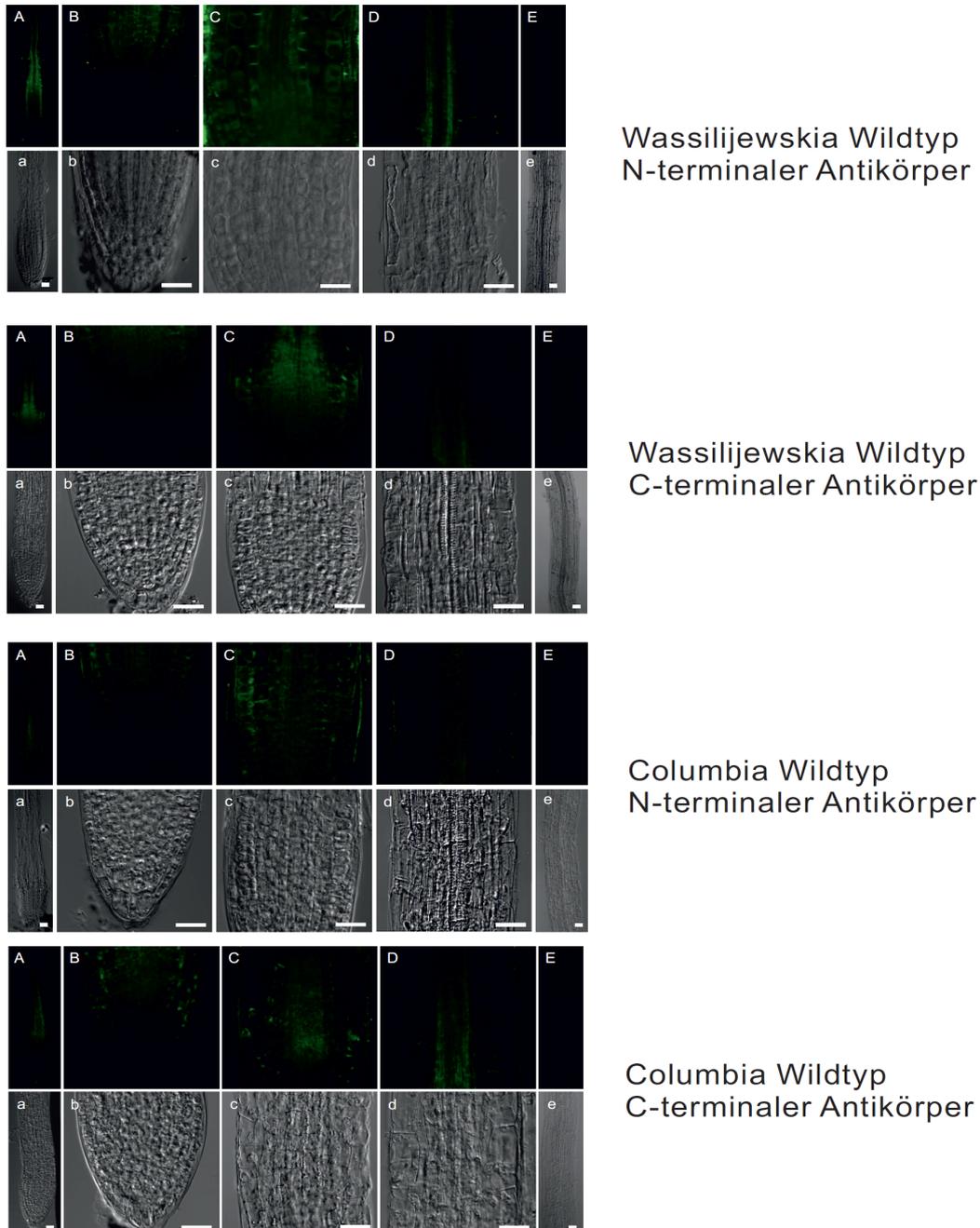


Abbildung 72: Meristematische Zone und Elongationszone von Wassilijewskia und Columbia Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in Dunkelheit und anschließendem Immunolabeling mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern in 20-facher Vergrößerung. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) meristematische Zone und beginnende Elongationszone, E) beginnende Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht 20µm. Alle Aufnahmen sind mittige Längsschnitte.

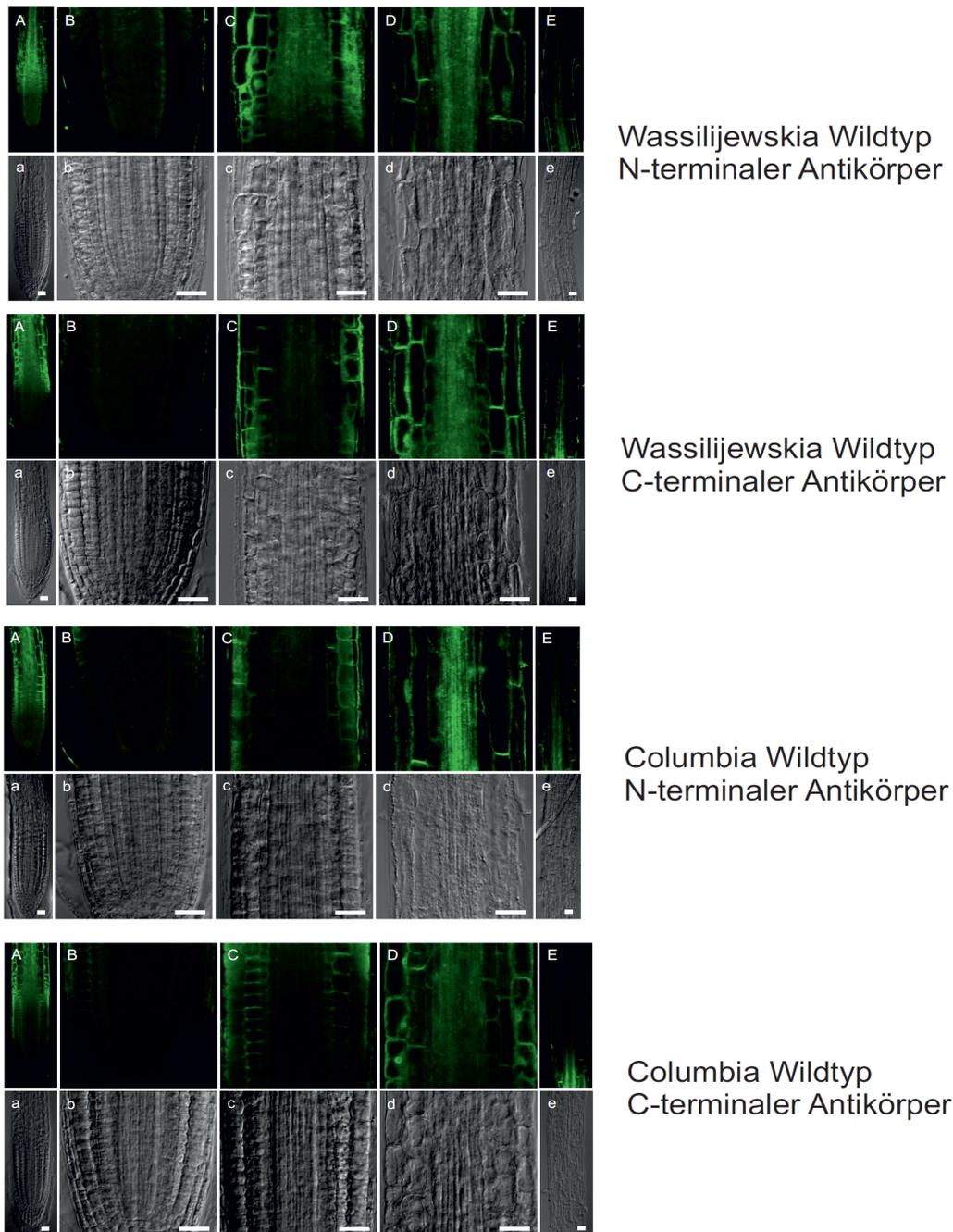
6.6.5 Expression nach Inkubation in $1\mu\text{M}$ 1-NAA

Abbildung 73: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *Wassilijewskia* und *Columbia* Wildtyp nach 7 Tagen Wachstum in Weißlicht und anschließender Inkubation in $1\mu\text{M}$ 1-NAA für 3h. Immunolabeling erfolgte mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. A) Wurzelspitze, B) untere Wurzelspitze und Wurzelhaube, C) meristematische Zone, D) meristematische Zone und beginnende Elongationszone, E) beginnende Elongationszone, A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Weißer Balken entspricht $20\mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind mittige Längsschnitte.

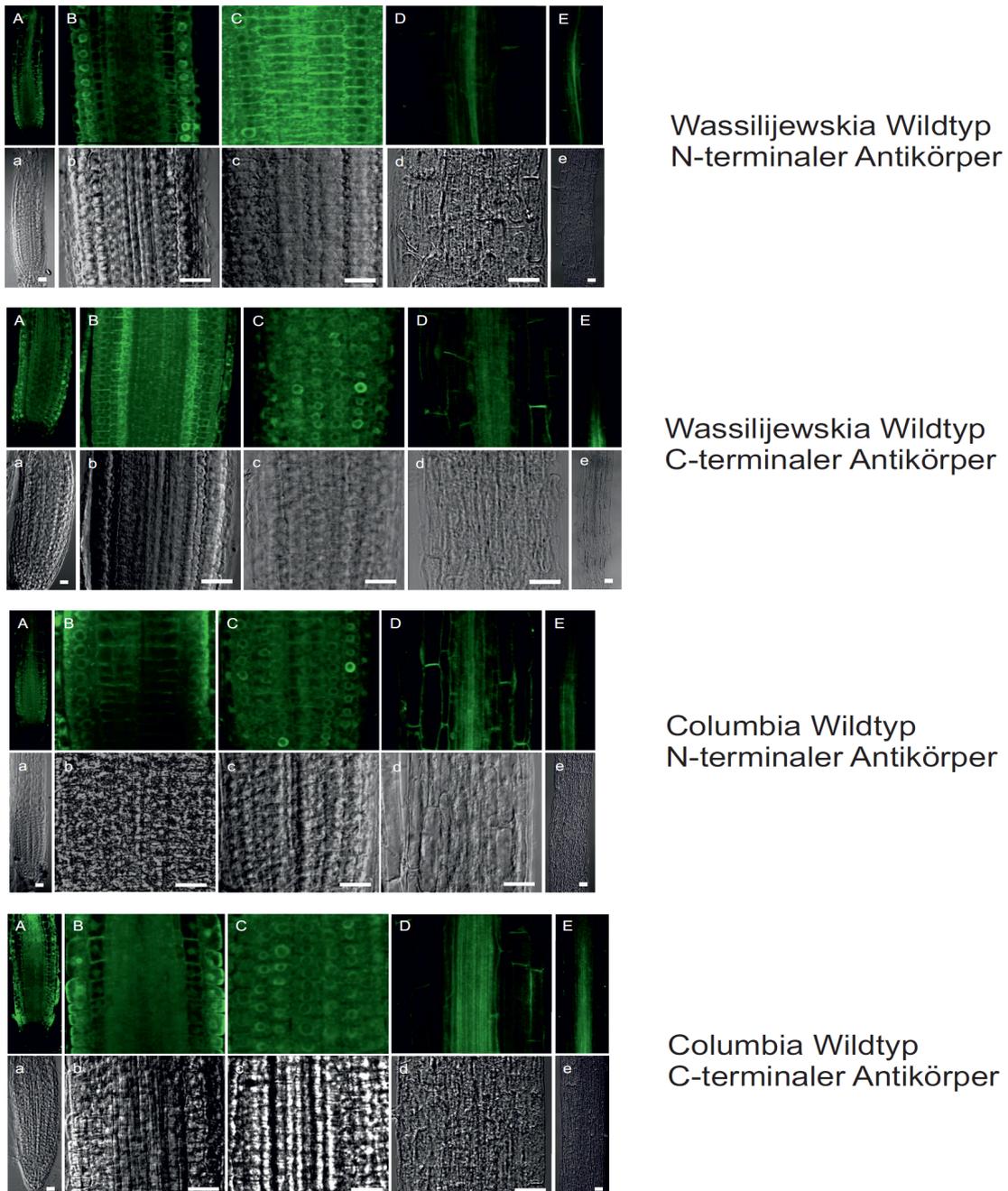
6.6.6 Expression nach Inkubation in 10 μ M NPA

Abbildung 74: Wurzelspitze und beginnende Elongationszone von *Wassilijewskia* und *Columbia* Wildtyp nach nach 7 Tagen Wachstum in Weißlicht und anschließender Inkubation in 10 μ M NPA für 3h. Immunolabeling erfolgte mit N- und C-terminalen pPLA-I-spezifischen Antikörpern. A) Wurzelspitze \emptyset , B) meristematische Zone \emptyset , C) meristematische Zone (Aufsicht Epidermis), D) und E) beginnende Elongationszone, \emptyset . A)-E) Alexa Fluor[®]488-Signal, a)-e) korrespondierende DIC-Aufnahmen. Alle Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Weißer Balken entspricht 20 μ m. \emptyset = mittlerer Längsschnitt.

Curriculum vitae

Name: Katrin Radatz
Geburtsdatum: 13.07.1980
Geburtsort: Göttingen
Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulbildung

1999 Abitur

berufliche Ausbildung

1999 - 2002 Ausbildung zur Chemielaborantin, Fachrichtung Chemie

akademische Ausbildung

2002 - 2005 Studentin an der Leibniz Universität Hannover
Studiengang Pflanzenbiotechnologie
Abschluss: Bachelor of Science

2005 - 2007 Studentin an der Leibniz Universität Hannover
Studiengang Pflanzenbiotechnologie
Abschluss: Master of Science

seit 2007 Doktorandin an der Leibniz Universität Hannover
Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Zierpflanzen und Gehölzwissenschaften
Abteilung Molekulare Ertragsphysiologie
Prof. Dr. G. F. E. Scherer

Publikationsliste

Effendi, Y., Radatz, K., Rietz, S., Labusch, C., Wimalasekera, R., Zeidler, M., Scherer, G. F. E. (eingereicht) *Arabidopsis* Phospholipase A pPLA-I is Involved in Auxin-Induced Gene Regulation, Tropisms, and Phytochrome-Dependent Light Responses

Radatz, K., Scherer, G. F. E. (in Vorbereitung) Subcellular localization and light-regulated expression of phospholipase A pPLA-I.

Radatz, K., Pietrzyk, P., Scherer, G. F. E. (in Vorbereitung) Patatin-related phospholipase A-I knockout *ppla-I-1* shows increased root coils and symptoms of shade avoidance in growth in microgravity.

Radatz, K., Ditengou, F., Pietrzyk, P., Palme, K., Scherer, G. F. E. (in Vorbereitung) Localization of PIN proteins in μ g and 1g

Radatz, K., Perrineaux, F., Effendi, Y., Pallmann, P., Wimalasekera, R., Scherer, G. F. E. (in Vorbereitung) Root coils in patatin-related phospholipase A-I knockout *ppla-I-1* as a defect in phospholipase A, auxin transport and red light signaling. In preparation.

Vorträge

Radatz, K., Scherer, G. F. E.: *ppla-I-1*, eine aphototrope und agravitrope Mutante, die „Wurzelkringel“ (Coils) bildet. Gravimeeting Erlangen, 2009.

Posterpräsentationen

Radatz, K., Effendi, Y., Labusch, C., Wimalasekera, R., Scherer, G. F. E.: Light-dependent Expression of Phospholipase A-I and Function in Shade Avoidance. Tagung Dabringhausen, 2012.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Scherer für die Ermöglichung dieser Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, dieses außergewöhnliche Thema verantwortungsvoll zu bearbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Christa Ruppelt, Marianne Langer, Rinukshi Wimalasekera und Sabine Reinecke, die mir immer freundschaftlich und wohlgesonnen zur Seite standen und mein Vorankommen immer bestmöglich unterstützt haben.

Weiter bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften und der umliegenden Institute, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Insbesondere möchte ich mich bei allen bedanken, die den Fortgang meiner Arbeit mit Interesse verfolgt und unterstützt haben.

Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der patatin-ähnlichen Phospholipase A-I (pPLA-I) aus *Arabidopsis thaliana*“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 16.04.2012